



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Facultat de Química
Departament de Química Inorgànica

**Targeting G4 DNA structures
with novel triphenylamine derivatives**

Isabel Pont Niclòs

Memòria per a l'obtenció del títol de Doctor en Nanociència i
Nanotecnologia per la Universitat de València

Abril, 2019

Treball dirigit per:
Prof. Enrique García-España
Prof. M. Teresa Albelda
Dr. Jorge González



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



PARC CIENTÍFIC

ICMOL
Institut de Ciència Molecular



EXCELENCIA
MARÍA
DE MAEZTU

Prof. Enrique García-España Monsonís, Catedràtic del Departament de Química Inorgànica de la Universitat de València, **Prof. M. Teresa Albelda Gimeno**, Professora del Departament de Química Inorgànica de la Universitat de València i **Dr. Jorge González García**, Investigador Post-Doctoral del Institut de Ciència Molecular de la Universitat de València,

CERTIFIQUEN:

Que la present memòria titulada “Targeting G4 DNA structures with novel polyamine derivatives”, ha sigut realitzada sota la seua direcció en el Departament de Química Inorgànica de la Universitat de València per la llicenciada **Isabel Pont Niclòs** i com que es troba finalitzada, autoritzen la seua presentació per a ser avaluada com a tesi doctoral.

Per tant, emeten i firmen el present informe a la Facultat de Química.

Paterna, 25, de Abril de 2019

Prof. Enrique Garcia-España

Prof. M. Teresa Albelda

Dr. Jorge González



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



PARC CIENTÍFIC

ICMOL
Institut de Ciència Molecular



EXCELENCIA
MARÍA
DE MAEZTU

Aquesta tesi doctoral ha sigut realitzada amb el suport de l'ajuda per a la formació de personal investigador de caràcter predoctoral **“Atracció al Talent”** de la Universitat de València.

“Per això la majoria dels éssers humans viuen tan falsament; perquè creuen que les imatges exteriors són la realitat i no permeten al seu propi món interior manifestar-se. Es pot ser molt feliç així, per descomptat. Però quan es coneix l'altra part, ja no es pot triar el camí de la majoria. Sinclair, el camí de la majoria és fàcil, el nostre, és difícil. Caminem”

Demian, Herman Hesse.

Table of contents

List of abbreviations	1
Abstract	7
1. - Introducció	8
1.1. - Estructura i funcions biològiques de l'ADN	11
1.1.1. - Estructura de l'ADN	12
1.1.2. - Replicació de l'ADN	16
1.1.3. - Diferències estructurals entre l'ADN i l'ARN	19
1.1.4. - Expressió gènica	21
1.1.5. - Cicle cel·lular	23
1.1.6. - Càncer: un conjunt de malalties	24
1.2. - L'ADN G-quàdruplex	26
1.2.1. - Diversitat conformacional del G4	26
1.2.2. - Detecció de G4 en cèl·lules	30
1.2.3. - Un petit recull d'exemples del paper biològic dels G4	34
1.2.4. - G4 com a dianes terapèutiques	41
1.3. - Disseny de lligands-G4	50
1.3.1. - Poliamines com a cadenes laterals	50
1.3.2. - Trifenilamina i trifenilbenzè com a motius centrals	53
1.4. - Nanomedicina	56
1.4.1. - La nanociència aplicada a la medicina	57
1.4.2. - Liposomes com a nanopartícules teranòstiques	61
1.5. - Bibliografia	63
2. - Objectives	76

3. - Materials and methods	82
3.1. - General methodology	85
3.2. - Study of acid-base behaviour	86
3.2.1. - Potentiometric studies	86
3.2.2. - UV/Vis and fluorescence spectrophotometric studies	89
3.3. - Assessment of interaction with DNA	90
3.3.1. - Preparation of buffer solutions	90
3.3.2. - Preparation of oligonucleotides for fluorimetric titrations	90
3.3.3. - Preparation of oligonucleotides for FRET-Melting assays	91
3.3.4. - Preparation of oligonucleotides for CD titrations	92
3.3.5. - Fluorimetric titrations	92
3.3.6. - FRET-Melting assays	95
3.3.7. - Circular dichroism spectroscopy	98
3.3.8. - Computational studies	100
3.4. - Liposome nanoparticles characterisation	101
3.4.1. - Dynamic light scattering (DLS)	102
3.4.2. - Cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM)	103
3.4.3. - Inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)	104
3.4.4. - Encapsulation efficiency	105
3.5. - Biological studies	106
3.5.1. - Cell cultures and maintenance	106
3.5.2. - Preparation of stock solutions	109
3.5.3. - Cell viability assessment by MTT assays	109

3.5.4. - Liposomes imaging	112
3.6. - References	115
4. - Synthesis	118
4.1. - TPA derivatives	121
4.2. - TPB derivatives	133
4.3. - Liposome preparation	138
4.5. - References	141
5. - Acid - base behaviour	142
5.1. - TPA derivatives	145
5.1.1. - TPA-PX derivatives	149
5.1.2. - TPA-P derivatives	153
5.1.3. - TPA-PY derivatives	158
5.2. - TPB derivatives	164
5.2.1. - TPB3P	165
5.2.2. - TPB3PY	167
5.3. - References	169
6. - DNA interaction	172
6.1. - DNA sequences investigated	175
6.2. - Molecular design of the studied compounds	176
6.3. - FRET-Melting assays	176

6.3.1. - TPA-PX derivatives	178
6.3.2. - TPA-P derivatives	179
6.3.3. - TPA-PY derivatives	181
6.3.4. - TPB derivatives	183
6.3.5. - Relation between ΔT_m and the charge at pH = 7.4	185
6.4. - Fluorescence spectroscopy studies	185
6.4.1. - TPA-P derivatives	186
6.4.2. - TPA-PY derivatives	190
6.5. - Circular dichroism studies	194
6.5.1. - TPA-P derivatives	194
6.5.2. - TPA-PY derivatives	197
6.6. - Computational studies	198
6.7. - References	204
7. - Liposome nanoparticles characterisation	206
7.1. - Liposomes design	209
7.2. - Physical characterisation	211
7.3. - Liposomes therapeutic properties	213
7.4. - Liposomes diagnostic properties	216
7.5. - References	217

8. - Biological studies	218
8.1. - Cell viability assessment	221
8.1.1. - TPA derivatives	222
8.1.2. - TPB derivatives	225
8.1.3. - Relation between cytotoxicity and the charge at pH = 7.4	226
8.1.4. - Untargeted and targeted liposome nanoparticles	227
8.2. - Cell imaging	232
8.3. - References	238
Conclusions	240
Resum de la tesi	248
Appendix 1. - NMR spectra	264
Appendix 2. - FRET-Melting data	280
Appendix 3. - Fluorescence and circular dichroism data	290
Appendix 4. - Cytotoxicity data	304
Appendix 5. - List of publications	318
Agraïments	323

List of abbreviations

ΔT_m	Increment of the melting temperature
$^{\circ}\text{C}$	Degree Celsius
5'-UTR	5'-Untranslated region
A	Adenine
Å	Angstroms
a.u.	Arbitrary units
ACQ	Aggregation-caused quenching
AIE	Aggregation-induced emission
AMBER	Assisted model building with energy refinement
C	Cytosine
CCDC	Cambridge crystallographic data centre
CD	Circular Dichroism
CDCl_3	Deuterated chloroform
CHCl_3	Chloroform
ChIP-Seq	Chromatin immunoprecipitation sequencing
cm	Centimetre
cryo-SEM	Cryogenic scanning electron microscopy
d	Doublet
D_2O	Deuterated water
DCM	Dichloromethane
DFMO	Difluoromethylornithine

DLS	Dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
dsDNA	Double stranded DNA
DTPA	Diethylenetriaminepentaacetic acid
EE	Encapsulation efficiency
EPR	Enhancing permeability and retention
EtOH	Ethanol
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	Fetal bovine serum
FRET	Förster resonance energy transfer
G	Guanine
G4	G-quadruplex
G4-Seq	G-quadruplex sequencing
Gd-DTPA-DSA	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-diethylenetriaminepentaacetic acid (gadolinium salt)
h	Hour
H₂O	Water
HCac	Dimethylarsinic acid
HIV	Human immunodeficiency viruses
HOMO	Highest occupied molecular orbital

HPLC	High performance liquid chromatography
HPS	Hexaphenylsilole
ICD	Induced circular dichroism
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry
J	Coupling constant
K	Kelvin
KCl	Potassium chloride
LiCac	Lithium cacodylate
LiCl	Lithium chloride
LiOH	Lithium hydroxide
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
M	Molar
m	Multiplet
m/z	mass-to-charge ratio
MD	Molecular dynamics
MeOD	Deuterated methanol
MeOH	Methanol
mg	Milligrams
min	Minutes
mL	Millilitre
mm	Millimetre
mM	Millimolar

mPEG2000-DSPE	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt)
MRI	Magnetic resonance imaging
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
mV	Millivolts
Na₂SO₄	Sodium sulphate anhydrous
NaBH₄	Sodium borohydride
NaCl	Sodium chloride
NBD-DPPE	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (ammonium salt)
nm	Nanometre
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OCD	Ornithine cyclodeaminase
PBS	Phosphate-buffered saline
PDB	Protein Data Bank
PDS	Pyrodistatin
PEG	Polyethylene glycol
PET	Photoinduced-electron transfer
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine
PQS	Putative quadruplex-forming sequences
PRQS	Putative RNA quadruplex-forming sequences
q	Quadruplet

r.p.m.	Revolutions per minute
RIR	Restriction of intramolecular rotations
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal RNA
s	Second
s	Singlet
SSB	Single-stranded binding
T	Temperature
t	triplet
TAMRA	5-Tetramethylrhodamine
THF	Tetrahydrofuran
T_m	Melting temperature
TPA	Triphenylamine
TPB	Triphenylbenzene
tRNA	Transfer RNA
TSS	Transcriptional start site
Tween 80	Polyethylene glycol sorbitan monooleate
U	Uracil
UV/Vis	Ultraviolet / Visible region of the light spectrum
δ	Chemical displacement
λ	Wavelength
μL	Microliters
μM	Micromolar

Abstract

Apart from double-stranded DNA (dsDNA), a wide variety of alternative non-canonical DNA structures are well known, such as i-motifs, hairpins, triplexes or G-quadruplexes (G4). This latter sort of DNA is formed by stacks of two or more guanine tetrads, which are held together through hydrogen bonds and electrostatic interactions. Within the human genome, G4 are mainly located in telomeres and promoter regions of several genes. Therefore, G4 may play an essential role in different biological processes, for instance transcription and expression of genetic information, as well as genomic stability. Consequently, G4 DNA has been identified as a potential target for antitumour therapy. In this context, several research groups have sought to design small molecules, known as G4 binders, with the aim to target G4 DNA *in vivo*. The typical molecular structure of potential G4 binders includes a π -delocalised core and positively charged side chains, enabling the establishment of π - π interactions with the G-tetrad, in addition to electrostatic interactions with the negatively charged phosphate backbone.

The work presented deals with the design of novel polyamine-based compounds as G4 binders. The central core of the compounds and their side chains have been systematically modified, aiming to get insight into the influence of the molecular structure on the G4 affinity. Since the protonation state of the ligands modulates their interaction with DNA, their acid-base behaviour has been studied by potentiometric and spectroscopic techniques. In terms of G4 stabilisation, different G4 topologies have been assessed by fluorescence spectroscopy, Förster Resonance Energy Transfer (FRET) assays and circular dichroism. Some of the compounds have proved to be G4 selective fluorescent sensors, being able to distinguish between G4 DNA and dsDNA.

Those compounds that have demonstrated to be potential G4 binders show a high positive charge at physiological pH, which may hamper their cell uptake and consequently their therapeutic effect. In order to overcome this limitation, they have been encapsulated inside liposome nanoparticles, which act as delivery vehicles. Furthermore, a specific liposome formulation including an aptamer has been designed in order to target the cell nucleus. The cytotoxicity of both compounds and liposomes nanoparticles has been studied in different tumour cell lines, proving the outstanding antitumour effect of the targeted nanoparticles. Finally, confocal fluorescence microscopy studies have confirmed the nuclear uptake of the targeted formulation.

És impossible començar a escriure el marc teòric d'aquesta tesi pel principi, per que no el té, i si el tingués, estaria perdut en els orígens de l'Univers. Així doncs, resulta enormement complicat remuntar-se a eixa època tant llunyana. Tanmateix, es pot reduir el problema a unes poques molècules. Tots els organismes coneguts feien, i fan servir, un limitat repertori de blocs de construcció per a emmagatzemar la informació que permet no sols mantindre, sinó també crear un organisme viu. Aquesta informació es troba englobada en l'ADN (àcid desoxiribonucleic), present en tots els organismes cel·lulars i alguns virus.

I com es troba confinada eixa informació en l'ADN? Així com en un sistema computacional tenim 0s i 1s, l'ADN està escrit en un codi químic representat per 4 lletres de l'alfabet: A (adenina), C (citosina), G (guanina) i T (timina). Aquests són en definitiva els blocs de construcció a partir dels quals sorgeixen els éssers vius i és precisament per on començarem la introducció d'aquesta tesi.

1.1. - Estructura i funcions biològiques de l'ADN

Malgrat que el descobriment de l'estructura de l'ADN s'atribueix quasi de manera exclusiva a James Watson i Francis Crick, aquesta gran troballa científica és el resultat de la recerca d'un bon recull d'investigadors. El camí va començar a l'any 1869, quan Friederich Miescher va identificar per primer cop el que ell anomenava "nucleïna".^[1] Posteriorment, altres científics com Phoebus Levene^[2] i Erwin Chargaff^[3] continuaren la recerca desxifrant el codi químic que compon l'ADN.

Cap a l'any 1950 començà la coneguda com "història fosca del ADN".^[4] Rosalind Franklin, experta en difracció de raigs X, va obtindre la fotografia 51,^[4] que desemascararia l'estructura de l'ADN. En una època en la qual les dones no eren benvingudes, ni als laboratoris, ni a les sales de reunions, el seu company Maurice Wilkins, promogut per un sentiment de competitivitat, va compartir els resultats de Franklin amb Watson i Crick. A l'any 1953, aquests dos últims investigadors van publicar el seu model estructural per a l'ADN en la revista Nature.^[5] Després a l'any 1962, Watson, Crick i Wilkins varen ser guardonats amb el Premi Nobel, i des d'aleshores, Franklin ha passat a ser una icona del fosc paper que representen les dones en la història de la ciència.^[6,7]

La descripció de l'estructura de l'ADN pot realitzar-se segons tres nivells de complexitat. En primer lloc, l'estructura primària, que correspon a una seqüència específica; després, l'estructura secundària, la qual té en compte les interaccions supramoleculares que donen lloc a una topologia concreta; i per últim, l'estructura terciària, que explica com s'emmagatzema l'ADN en un espai reduït.

1.1.1. - Estructura de l'ADN

En essència l'ADN és un polímer de nucleòtids, cadascun dels quals està compost per un grup fosfat, un sucre (desoxiribosa) i una nucleobase o base (A, T, G o C). Així doncs, una cadena d'ADN està formada per nucleòtids enllaçats mitjançant unions fosfodièster, en les quals el grup fosfat en posició 5' d'un nucleòtid queda unit al següent per l'hidroxil en posició 3'. Per tant, les bases queden unides a intervals regulars i es poden considerar com substituents de la cadena fosfatada (Figura 1.1).^[8]

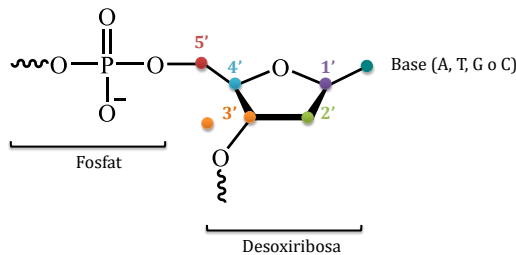


Figura 1.1. Estructura molecular d'un nucleòtid. Els nombres en la figura representen la nomenclatura de l'anell de desoxiribosa adoptada per convenció.

En la Figura 1.2 s'esquematitza l'estructura primària d'una cadena curta d'ADN, formada per unions repetitives de nucleòtids. El fosfat en posició 5' està representat en blau fosc i el grup hidroxil en 3' és l'espai buit. Les bases corresponen amb els quadrats units a la cadena fosfatada.^[9]

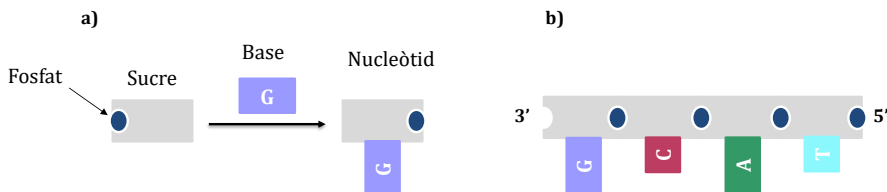


Figura 1.2. Esquema de la composició a) d'un nucleòtid i b) d'una cadena polimèrica de ADN. Imatge adaptada de [9].

A pH fisiològic, els grups fosfats es troben ionitzats i la seua càrrega negativa normalment és neutralitzada per interaccions electrostàtiques amb proteïnes, ions metàl·lics o poliamines.^[10] En definitiva, les cadenes d'ADN tenen caràcter hidrofílic amb una direccionalitat (o polaritat) marcada de 5' a 3', el que és de vital importància en diversos processos biològics on l'ADN és "llegit" i "interpretat".

Les bases es classifiquen segons la seua estructura molecular. L'A i la G són purines, ja que contenen 2 anells aromàtics amb 4 nitrògens, mentre que la C i la T són pirimidines, que sols presenten un anell aromàtic amb 2 nitrògens. Totes elles són molècules lleugerament bàsiques, i es troben neutres a pH fisiològic (Figura 1.3).^[11]

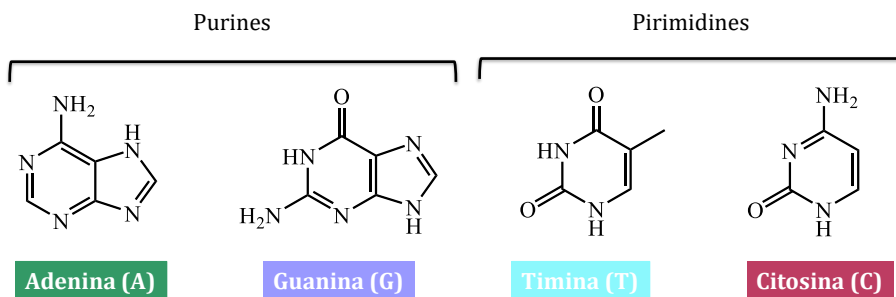


Figura 1.3. Estructura molecular de les bases de l'ADN, classificades en purines i pirimidines.

L'estructura secundària en doble hèlix de l'ADN és el resultat de diverses interaccions supramoleculares establides entre dos cadenes amb direccionalitat oposada (antiparal·leles), com ara les que es donen entre les bases. De fet, existeix una "complementarietat" de les bases, conseqüència de la seua estructura molecular.^[12]

Tal i com es representa en la Figura 1.4, A i T s'emparellen mitjançant dos enllaços d'hidrogen, mentre que G i C queden unides per tres, originant així la doble hèlix. Les interaccions π - π entre les bases, així com les forces de Van der Waals i dipol-dipol, ajuden a estabilitzar l'estructura helicoidal de la cadena fosfatada, minimitzant el seu contacte amb les molècules d'aigua del medi fisiològic.^[12]

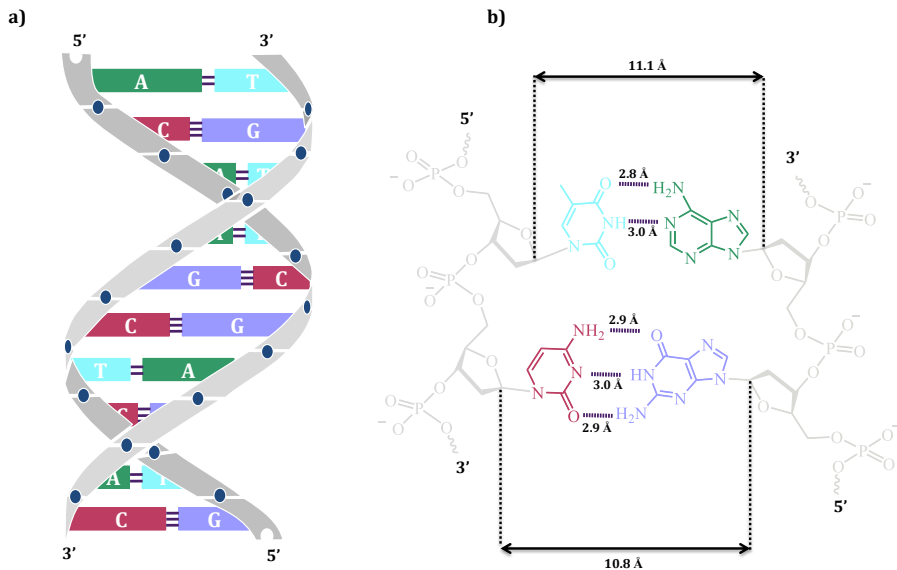


Figura 1.4. a) Esquema de l'estructura helicoidal de l'ADN i b) interaccions supramoleculares entre les bases corresponents a les dues cadenes. Imatge adaptada de [9].

Existeixen principalment tres variacions estructurals per a l'ADN de doble cadena: A-ADN, Z-ADN i B-ADN (Figura 1.5).^[8] Aquesta última és la que normalment predomina en les cèl·lules: una doble hèlix enrotllada cap a la dreta que mesura 2.37 nm de diàmetre, en la qual una volta completa de 3.54 nm conté 10.4 parells de bases en disposició coplanar. Els solcs gran i petit, d'aproximadament 2.2 nm i 1.2 nm respectivament, depenen de la seqüència específica de bases.^[8]

D'altra banda, la conformació A sol trobar-se en seqüències tipus GAGGGA, o bé en entorns on el nombre de molècules d'aigua es reduït. L'apilament de les bases en aquest cas no és coplanar i l'hèlix posseeix una menor diferència entre els solcs, contenint 11 parells de bases per cada volta completa. Pel que fa al Z-ADN, presenta una conformació en "zig-zag" que conté parells alternants G-C, donant lloc a una hèlix cap a l'esquerra amb 12 parells de bases per volta, que quasi no presenta solcs. Malgrat que a nivell cel·lular no són formes predominants, es pensa que tant l'A-ADN com el Z-ADN, tenen importants rols biològics, com per exemple en la unió de proteïnes a l'ADN o en l'expressió i recombinació genètica.^[13]

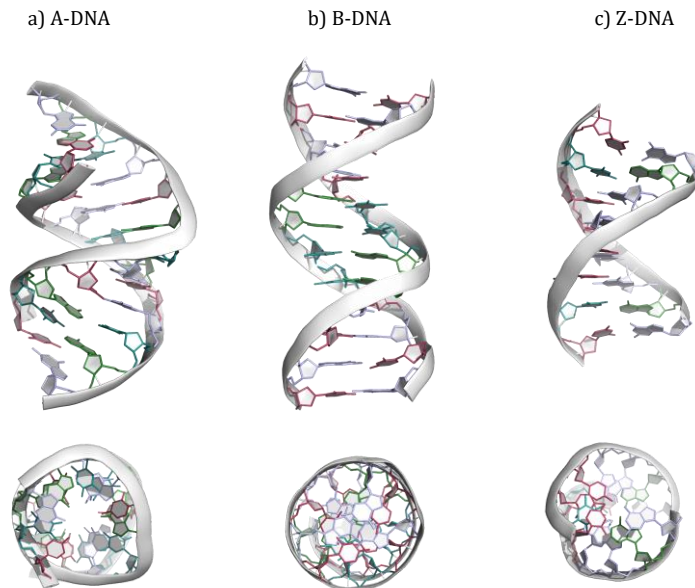


Figura 1.5. Visualització de l'estructura de diverses conformacions d'ADN de doble hèlix: a) A-ADN (PDB: 5MVT), b) B-ADN (PDB: 1BNA) i c) Z-ADN (PDB: 6DWT). Representacions realitzades amb el software PyMOL per Àlvar Martínez-Camarena.

Tanmateix, la conformació de doble cadena, no és l'única descrita per a l'ADN. De fet, existeixen un gran nombre de topologies que fan que l'ADN siga una quasi perfecta forma d'emmagatzematge d'informació genètica, ja que cadascuna desenvolupa una funció específica en diversos processos biològics essencials, com per exemple la replicació o la transcripció d'informació genètica.^[14,15] A més a més, eixes estructures no-canòniques d'ADN poden ser emprades com a dianes terapèutiques, ja que a més a més estan relacionades amb certes malalties resultants d'alteracions genètiques com el càncer o l'Alzheimer.^[16]

Un petit recull de topologies d'ADN alternatives a la doble cadena es troben a la Figura 1.6. En primer lloc, es representa una seqüència d'ADN palindròmica en forma de forquilla (hairpin).^[17] També es mostra el conegut com ADN de triple cadena o trípex, en el qual una doble hèlix s'enrotlla amb un fragment de cadena monocatenari.^[18] Altres exemples curiosos que actualment estan despertant un gran interès són les conformacions en forma de quàdruplex, ja siguen tètredes de citosines (i-motifs)^[19] o tètredes de guanines (G-quàdruplex o G4). Aquesta última topologia serà descrita més en detall al llarg d'aquest capítol, ja que ha estat triada com a diana terapèutica en aquesta tesi.

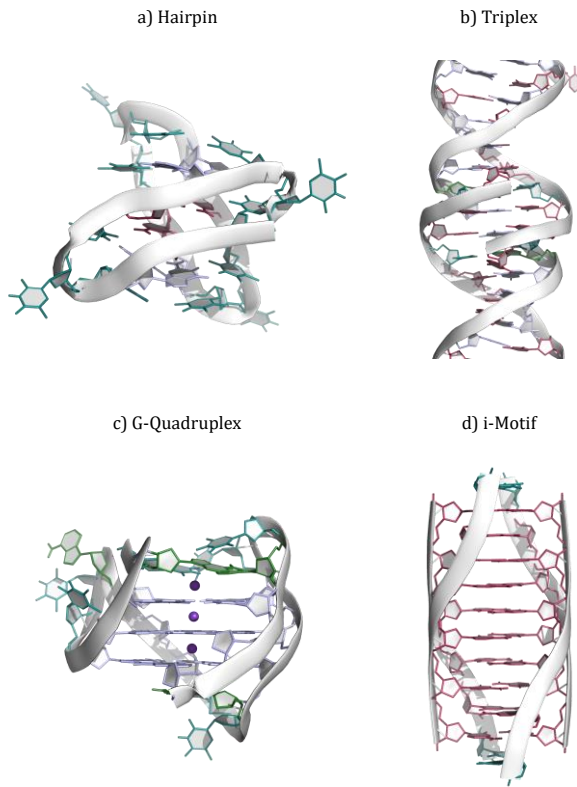


Figura 1.6. Visualització de l'estructura de diverses conformacions de ADN no-canòniques: a) hairpin (PDB: 2LSX), b) triplex (PDB: 1D3R), c) G-quàdruplex (PDB: 2JSM) i d) i-motif (PDB: 225D). Representacions realitzades amb el software PyMOL per Àlvar Martínez-Camarena.

1.1.2. - Replicació de l'ADN

Un dels mecanismes que garanteixen l'existència de la vida tal i com la coneguem és l'herència de la informació genètica, mitjançant la replicació de l'ADN des de les cèl·lules preexistents, a les seues filles. La direccionalitat i la complementarietat que caracteritza l'estructura en doble cadena de l'ADN són precisament les forces que regeixen aquest procés. Es diu que la replicació de l'ADN és semiconservativa, ja que a partir d'una molècula d'ADN s'obtenen dues molècules, cadascuna de les quals inclou dues cadenes, una nova i una altra que prové de l'ADN originari que actua com a motle (Figura 1.7).^[20]

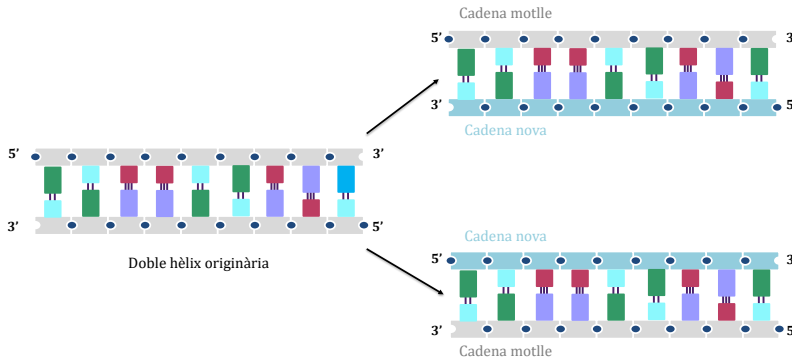


Figura 1.7. Síntesi d'ADN en direcció 5' a 3'. Imatge adaptada de [9].

La regió cel·lular on té lloc aquest fenomen s'anomena forqueta de replicació, en la qual intervien un gran nombre de diferents enzims (Figura 1.8). En cèl·lules eucariotes, la replicació s'inicia de manera coordinada en milers de punts d'inici, el que garanteix una correcta velocitat de duplicació cromosòmica.^[21]

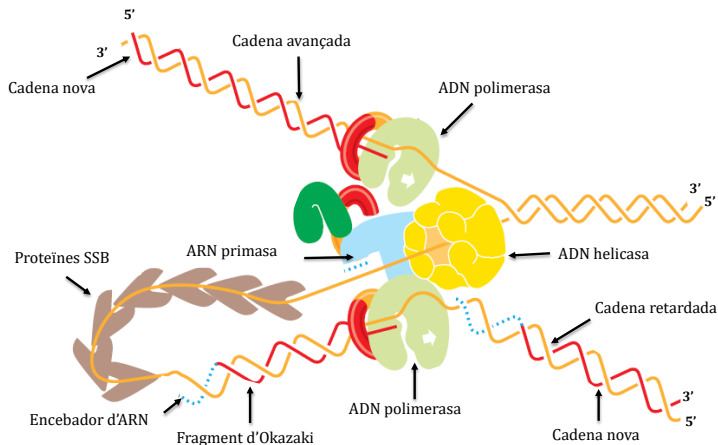


Figura 1.8. Forqueta de replicació simplificada on s'indiquen alguns dels enzims que hi intervien. Imatge adaptada de [9].

El primer pas del procés implica l'obertura de la doble hèlix. Donat que l'estructura helicoïdal és molt estable en el medi fisiològic, és necessària la intervenció de diverses proteïnes, com ara ADN helicases, topoisomereses i proteïnes d'unió a ADN monocatenari (proteïnes SSB). Així, s'aconsegueix separar les dos cadenes d'ADN que actuaran com a motlle.

D'una banda, l'helicasa es desplaça al llarg de l'ADN consumint ATP, provocant la separació de les cadenes parentals. D'altra banda, les proteïnes SSB s'uneixen a cadascuna de les cadenes per tal d'estabilitzar-les. Les topoisomereses alleugeren les tensions generades. Un cop separades les dues cadenes de la doble hèlix, cadascuna d'elles actua com a motle per a la síntesi de dues cadenes noves. Aquest procés sempre té lloc en direcció 5' a 3': s'addicionen catalíticament nucleòtids a l'extrem 3' de la cadena en creixement per l'acció de les ADN polimerases.

Tanmateix, és necessari que abans l'enzim ARN primasa sintetitzi petits fragments d'ARN (encebadors) en les cadenes motle, ja que les ADN polimerases únicament poden afegir nous nucleòtids a l'extrem 3' dels encebadors. Donada la naturalesa antiparal·lela de l'ADN, la forqueta de replicació posseeix una conformació asimètrica. És a dir, com que les ADN polimerases únicament poden actuar en direcció 5' a 3', una cadena de la forqueta de replicació és sintetitzada de manera contínua (cadena avançada), mentre que l'altra (cadena retardada) és polimeritzada en xicotets fragments de nucleòtids (fragments d'Okazaki), també en direcció 5' a 3'. La síntesi de cada fragment en la cadena retardada finalitza quan la polimerasa arriba al següent encebador. Després, l'ADN polimerasa substitueix els encebadors per fragments d'ADN i finalment, l'ADN ligasa uneix tots els fragments donant lloc a una cadena contínua.

L'elevada fidelitat del procés de replicació i el baix índex d'errors (mutacions) és conseqüència no només de l'especificitat del procés de emparellament de bases, sinó també dels processos de reparació.^[22] La majoria d'ADN polimerases conegudes presenten també activitat 3'-5' exonucleasa. Aleshores, si un nucleòtid erroni ha sigut incorporat a la nova cadena d'ADN, s'inhibeix l'addició del següent nucleòtid, s'elimina el nucleòtid erroni i el procés s'inicia altre cop (Figura 1.9).

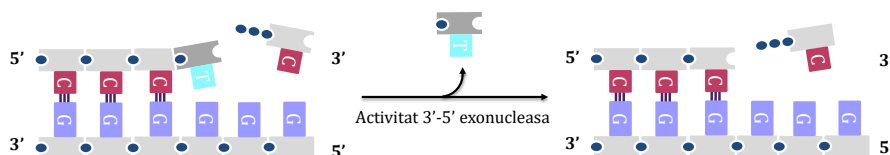


Figura 1.9. Representació de la capacitat correctora d'errors de l'ADN polimerasa. Imatge adaptada de [9].

1.1.3. - Diferències estructurals entre l'ADN i l'ARN

Un cop introduïdes les principals característiques estructurals de l'ADN i el seu mecanisme de replicació, és imprescindible dirigir l'atenció cap al segon material genètic més important en les cèl·lules: l'àcid ribonucleic o ARN. Aquest està present tant en procarïotes, com eucariotes i fins i tot, és l'únic material genètic per a alguns virus.^[23]

L'expressió de la informació genètica de l'ADN dóna lloc a les proteïnes necessàries per als diferents processos biològics del cicle cel·lular. El mecanisme d'expressió genètica comença per la síntesi d'ARN, mitjançant la transcripció de l'ADN motle. Després, durant el procés de traducció, l'ARN dóna lloc a les proteïnes pertinents. Per tant, mentre que la informació genètica es troba emmagatzemada en l'ADN de forma més o menys fixa, les molècules d'ARN són produïdes i emprades reiteradament per a la producció de proteïnes (Figura 1.10).

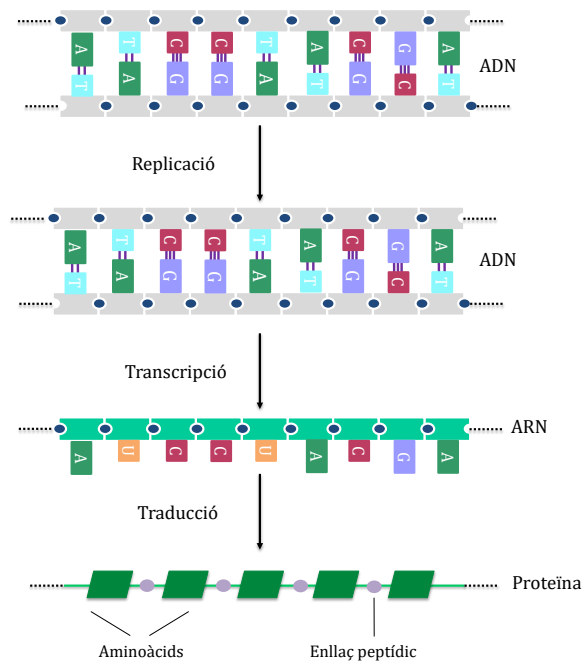


Figura 1.10. Representació del camí de transformació de la informació genètica des de l'ADN a l'ARN per a obtenir proteïnes funcionals. Imatge adaptada de [9].

Així doncs, l'ARN es troba no sols en el nucli cel·lular, sinó també en el citoplasma i a més a més, té una gran varietat d'estructures i funcions específiques. Per exemple, l'ARN obtingut a partir de la traducció d'ADN es coneix com ARN missatger (mARN), el qual normalment és d'una mida reduïda i codifica una proteïna en particular. Tanmateix, existeixen altres tipus d'ARN no codificants, com ara l'ARN ribosomal (rARN) o l'ARN de transferència (tARN). D'una banda, el rARN és el component catalític dels ribosomes, encarregats de sintetitzar les proteïnes a partir del mARN. D'altra banda, el tARN serveix per a unir aminoàcids al mARN, de manera que queden enllaçats covalentment a la cadena polipeptídica que finalment compondrà la proteïna.^[24]

Com l'ADN, l'ARN és un polímer de nucleòtids, malgrat que l'estructura molecular de la cadena polimèrica és diferent. En primer lloc, el grup hidroxil en posició 2' en l'anell de sucre és una de les característiques distintives de l'ARN - ribosa en compte de desoxiribosa - que el converteix en una molècula més reactiva que l'ADN. Pel que fa al contingut en bases, l'ARN conté uracil (U) en compte de timina (T). Com es pot observar en la Figura 1.11, l'U no presenta un grup metil en l'anell aromàtic. Així doncs, en l'ARN U s'uneix a l'A mitjançant dos enllaços d'hidrogen.

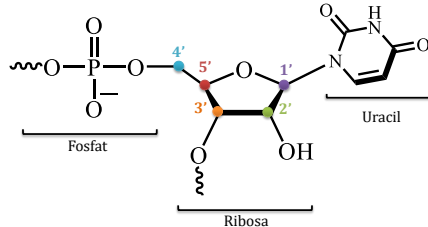


Figura 1.11. Estructura molecular d'un nucleòtid d'ARN que conté U com a base. Els nombres en la figura representen la nomenclatura de l'anell de ribosa adoptada per convenció.

Com s'ha mencionat anteriorment, l'ARN està compost per una sola cadena de nucleòtids, el qual li confereix una gran flexibilitat permetent el seu plegament mitjançant interaccions supramoleculares entre les diferents parts del polímer. Aquest tipus de forces intramoleculares fan que l'ARN adquireixi una conformació dictada en gran mesura per la seua seqüència, que està estretament relacionada amb la seua activitat biològica. De fet, l'ARN presenta sovint conformacions més exòtiques que les descrites anteriorment per a l'ADN. Les forquilles i bucles dins de fragments auto-complementaris són els motius estructurals més freqüents en l'ARN (Figura 1.12).^[25]

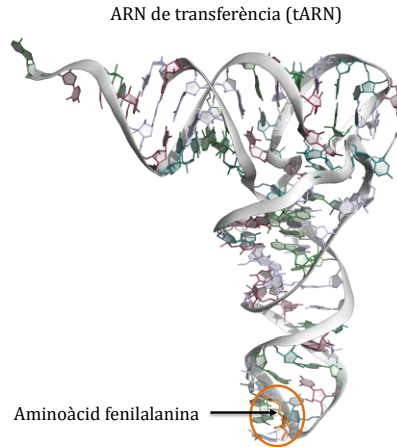


Figura 1.6. Visualització de l'estructura d'un ARN de transferència (tARN) transportant el aminoàcid fenilalanina (PDB: 4TNA). Representació realitzada amb el software PyMOL per Àlvar Martínez-Camarena.

1.1.4. - Expressió gènica

Com s'ha mencionat anteriorment, l'ADN regeix la síntesi de proteïnes funcionals per a l'organisme, emprant l'ARN com a intermediari. Així doncs, d'alguna manera les 4 lletres que componen l'ADN (A,T,G i C), han de donar lloc a les 20 lletres que representen als aminoàcids que componen les proteïnes. L'exacta correspondència és el que es coneix com codi genètic. Malgrat que aquest codi es considerat el dogma central de la biologia molecular, no va ser desxifrat fins fa uns 60 anys.^[26] D'altra banda, el mecanisme mitjançant el qual la informació genètica de l'ADN és utilitzat en la síntesi de proteïnes s'anomena expressió gènica, un procés que es divideix en dues etapes. En primer lloc, l'ADN és transcrit a mRNA en el nucli cel·lular, després aquest mRNA és traduït als ribosomes citoplasmàtics per a donar lloc a les proteïnes.

La transcripció és duta a terme pels enzims ARN polimerases, que a partir d'una cadena d'ADN motle (gen), allarguen les cadenes d'ARN en direcció 5' a 3' addicionant ribonucleòtids a l'extrem 3'-hidroxil. El lloc on s'inicia el procés s'anomena promotor (seqüències d'ADN riques en A i T). En aquesta regió és on s'uneix l'ARN polimerasa per a desenrotllar la doble hèlix i començar la polimerització del pre-mRNA. Els triplets de bases (codons) que es troben al final del gen marquen la terminació del procés (Figura 1.13).

Seguidament, el pre-mARN és alliberat i sotmés a una sèrie de modificacions químiques que fan que les regions no codificants (introns) siguin eliminades per deixar unides únicament les regions codificants (exons). Finalment, el mARN és dirigit al citoplasma.^[27]

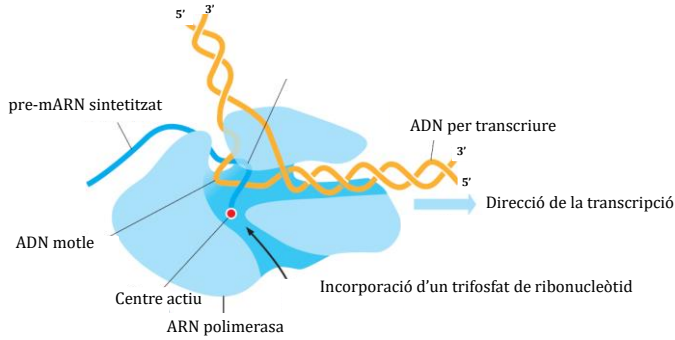


Figura 1.13. Esquematzació del procés de transcripció dut a terme per l'enzim ARN polimerasa.

Un cop en el citoplasma, el mARN s'uneix al ribosoma, una maquinària molecular encarregada de catalitzar la síntesi de les proteïnes. El procés que té lloc s'anomena traducció ja que, com s'ha mencionat anteriorment, l'ARN només presenta 4 tipus diferents de nucleòtids, mentre que una proteïna està composta per 20 aminoàcids diferents. En el mecanisme de traducció intervé el tARN, que serveix com a adaptador entre els nucleòtids del mARN i els aminoàcids. Així doncs, el tARN posseeix dos llocs d'unió: l'anticodó que reconeix els codons del mARN i un altre lloc que reconeix l'aminoàcid codificat. D'aquesta manera, el tARN llegeix la informació genètica englobada en el mARN i incorpora els aminoàcids pertinents a la cadena polipeptídica, fins que troba l'últim codó del mARN. En aquest moment, s'allibera la cadena formada, que acaba plegant-se per donar lloc a l'estructura tridimensional funcional de la proteïna (Figura 1.14).^[28]

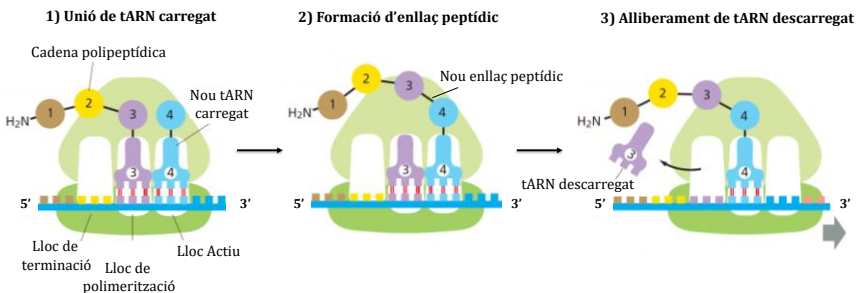


Figura 1.14. Procés de traducció dut a terme pel ribosoma. Imatge adaptada de [9].

Com que cadascun dels 20 aminoàcids existents poden ser codificats per codons diferents, es diu que el codi genètic és redundat, existint 64 combinacions possibles. Cal dir que el procés d'expressió gènica resumit en aquesta secció és extremadament més complex i implica la participació de gairebé in comptables entitats moleculars. A més a més, actualment nous descobriments han derivat en l'establiment de mecanismes alternatius, com ara la transcripció invertida en alguns retrovirus com el HIV, en la qual una molècula d'ADN prové d'una d'ARN.^[29]

1.1.5. - Cicle cel·lular

En essència, el cicle cel·lular és el procés mitjançant el qual es garanteix el creixement i la creació de noves cèl·lules a partir de les preexistents. Es tracta d'una sèrie d'esdeveniments ordenats i regulats que resulten en última instància en la duplicació del contingut genòmic, així com en la seua distribució entre dues cèl·lules filles. A banda de la informació genètica, la majoria de les cèl·lules també dupliquen els seus orgànuls i macromolècules, per tal de mantindre el tamany en cada divisió cel·lular.

En cèl·lules eucariotes, el cicle està dividit principalment en quatre fases diferents: G_1 (del anglès *gap 1*), S (síntesi), G_2 (del anglès *gap 2*) i M (mitosi), (Figura 1.15). Les tres primeres fases són conegudes com a interfase, i són les que requereixen més temps: la cèl·lula tarda més en créixer i duplicar els cromosomes, proteïnes i orgànuls, que en dividir-se. A més a més, eixe temps permet monitoritzar les condicions de l'entorn cel·lular i establir si són adequades per a donar un altre cicle.^[30]

En aquest context, és especialment important la fase G_1 , que pot mantenir-se durant un determinat temps o evolucionar fins a la fase G_0 , on les cèl·lules deixaran de proliferar i esperaran fins que les condicions siguin favorables. Ambdues fases poden inclús mantenir-se fins que l'organisme mor. Així doncs, les fases G són punts de control essencials, que assegurin que totes les etapes s'han completat de manera correcta abans de prosseguir el cicle. Durant la fase mitòtica, M, la cèl·lula distribueix el contingut genòmic de manera que cada cèl·lula filla heretarà una còpia fidel de tot el genoma. Es tracta d'una etapa que engloba diferents processos que impliquen la segregació del nucli (mitosi) i finalment, la divisió del citoplasma (citocinesi).

La regulació d'aquest cicle cel·lular és duta terme per un conjunt de proteïnes, que o bé estan sempre actives, o bé només actuen quan hi ha algun error durant el procés, assegurant així l'adequat creixement i proliferació cel·lular. Tanmateix, pot donar-se un incorrecte funcionament d'aquests mecanismes de control, ocasionant inestabilitat genètica i donant lloc a una divisió cel·lular incontrolada: dos aspectes fonamentals en el desenvolupament de càncer.^[31]

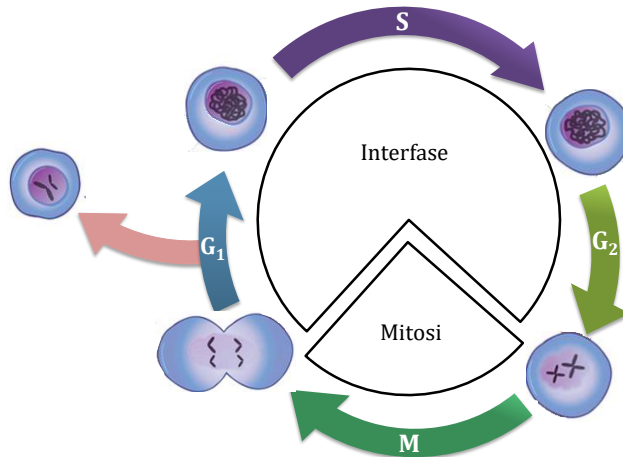


Figura 1.15. Diagrama simplificat del cicle cel·lular. Les 4 etapes principals es troben representades en fletxes (G₁, S, G₂ i M). Imatge adaptada de [30].

1.1.6. - Càncer: un conjunt de malalties

Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), el càncer és un terme genèric referit a un conjunt de malalties caracteritzades per una proliferació incontrolada de cèl·lules, que pot afectar gairebé qualsevol part de l'organisme. Es tracta de la segona causa principal de mortalitat a escala global. L'OMS estima que és la responsable de 9.6 milions de morts durant 2018. Els càncers de pulmó, pròstata, còlon, estomac i fetge són els més comuns en homes, mentre que els de mama, còlon, pulmó, cèrvix i tiroides ho són per a les dones. Tanmateix, entre el 30% i el 50% podrien ser evitats controlant els factors principals de risc, com ara el tabac, el sobrepès, l'alcohol o la vida sedentària.^[32,33]

Com s'ha mencionat anteriorment, les cèl·lules normals posseeixen multitud de gens encarregats de regular la seua divisió i proliferació. L'activitat d'aquests depén de nombrosos factors. Per exemple, les cèl·lules epitelials són renovades contínuament, mentre que altres, com ara les neurones, no són gairebé regenerades. Les mutacions introduïdes en aquests mecanismes de regulació es relacionen directament amb el càncer. Primerament, les cèl·lules tumorals comencen a créixer de manera descontrolada en el teixit on s'originen les mutacions. Després de cert nombre de divisions successives, generen la capacitat d'estendre's cap a altres compartiments cel·lulars i finalment, poden passar al torrent sanguini o al sistema limfàtic, viatjant fins a altres teixits de l'organisme i formant tumors secundaris (metàstasi).^[34]

Les alteracions genètiques que poden resultar en càncer són molt diverses, englobant des de mutacions puntuals, fins a grans aberracions cromosòmiques. Algunes són comuns a diferents tipus de càncer, mentre que certs càncers presenten mutacions més característiques.^[35] De manera general, podem distingir tres classes de gens susceptibles de donar lloc a mutacions: proto-oncogens, gens de supressió tumoral i gens de mutacions.

Els proto-oncogens no són més que gens que codifiquen proteïnes relacionades amb la proliferació cel·lular, necessàries per al correcte manteniment i desenvolupament dels teixits. Ara bé, mutacions en aquests proto-oncogens els converteixen en oncogens, el quals donen lloc a la producció massiva proteïnes que produeixen una divisió cel·lular incontrolada.^[36] D'altra banda, els gens de supressió tumoral inhibeixen el creixement cel·lular i les mutacions. Finalment, els gens de mutacions, s'encarreguen de mantindre l'estabilitat genòmica i controlar la precisió del procés de replicació. Quan aquests dos tipus de gens estan inactivats a causa de mutacions, condueixen a la desregulació del cicle cel·lular, a més mutacions, i finalment a l'aparició de teixits tumorals.^[37]

En general es pot considerar que les cèl·lules canceroses es caracteritzen per posseir alteracions en els sistemes que controlen el cicle cel·lular. Un intent de recopilació d'aquestes alteracions es troba en els treballs de Hanahan i Weinberg "The Hallmarks of Cancer"^[38] i "The Hallmarks of Cancer: The Next Generation".^[39] L'objectiu que tenen es intentar establir els trets biològics que poden servir com a base per al tractament del càncer. Particularment, en aquesta tesi es prenen com a diana terapèutica dos d'eixos trets: la inactivació de la telomerasa i la inhibició de certs oncogens, tot mitjançant la interacció de petites molècules amb ADN G-quàdruplex (G4).

1.2. - L'ADN G-quàdruplex

Des del seu descobriment fins l'actualitat, els G4 han anat adquirint cada cop més rellevància, degut no tan sols a les seues possibles funcions biològiques, sinó també a les seues potencials aplicacions terapèutiques. La primera evidència d'estructures G4 es remunta a fa més d'un segle. L'any 1910, Ivar Bang va observar que els àcids nucleics rics en guanines presentaven propietats inusuals característiques d'un gel.^[40]

Posteriorment, a l'any 1962 Martin Gellert i els seus col·laboradors van analitzar per raigs X unes fibres similars als gels obtinguts prèviament per Bang. Les imatges revelaven un elevat ordre, que va ser explicat en base a l'establiment d'enllaços d'hidrogen de tipus Hoogsten entre tètredes de G.^[41] La formació de G4 va ser confirmada anys després mitjançant la realització d'estudis de difracció de raigs X més exhaustius.^[42-45]

1.2.1. - Diversitat conformacional del G4

L'estructura del ADN G4 està composta per tètredes de guanines (G-tètredes) que es troben unides per enllaços d'hidrogen de tipus Hoogsten (Figura 1.16). Cadascuna de les G actua com a dadora i acceptora d'hidrògens, de manera que adopten una disposició plano-quadrada, possibilitant el seu apilament mitjançant interaccions π - π . A més a més, la presència de cations en el canal central de les G-tètredes proporciona una estabilització addicional a l'estructura, resultat de la interacció electrostàtica del catió amb els grups carbonil de les guanines.^[46,47]

Sovint, els cations que es situen en el canal central són monovalents i d'una clara prevalença biològica, com ara K^+ o Na^+ . D'una banda els cations Na^+ solen situar-se en el pla de les tètredes establint interaccions amb els 4 grups carbonil de les guanines, mentre que els K^+ , al ser de major tamany, es troben desplaçats del pla i poden interaccionar fins amb 8 grups carbonil. D'entre aquests dos, es coneix que el K^+ dona lloc a una major estabilització de l'estructura G4.^[48] Tanmateix, l'estabilitat també depèn de la força iònica del medi on es troba el G4.^[49]

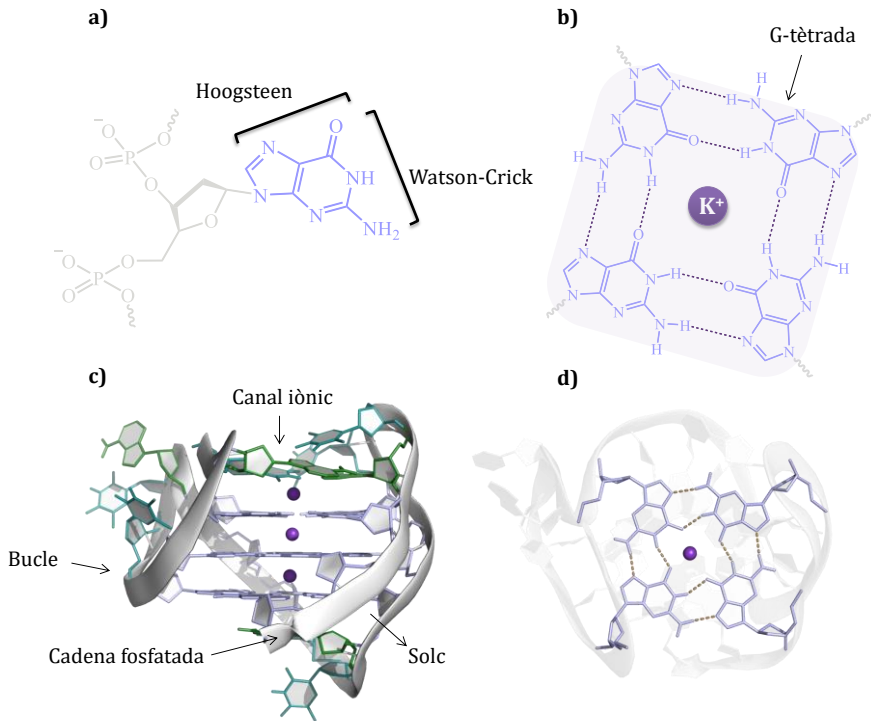


Figura 1.16. a) Possibles tipus els enllaços d'hidrogen que pot formar la guanina, b) estructura molecular corresponent a una G-tètrada, c) representació d'un G4 amb algunes característiques estructurals assenyalades (PDB: 2JSM) i d) visió des de dalt del mateix G4. Representació realitzada amb el software PyMOL per Àlvar Martínez-Camarena.

Cal destacar que l'ADN G4 no presenta una única estructura, si no que té associat un elevat polimorfisme. Pel que fa al nombre de les cadenes, els G4 poden estar formats per una (unimolecular), dos (bimolecular) o quatre (tetramolecular) cadenes de ADN riques en guanines.^[50] També es coneix l'existència de G4 trimèrics, tot i que es tracta d'una conformació més exòtica, que requereix de la combinació de dos dúplex.^[51] Segons l'orientació relativa de les cadenes que componen el G4 podem tindre una conformació paral·lela o antiparal·lela i fins i tot, una barreja d'ambdues. Per exemple els G4 tetramoleculars normalment presenten una conformació paral·lela, mentre que els bimoleculars i unimoleculars presenten una major riquesa estructural.

D'altra banda, atenent al criteri de disposició dels bucles de les cadenes podem classificar els G4 en laterals (cadenes adjacents unides), diagonals (cadenes oposades diagonalment unides) o extrems (cadenes adjacents connectades per l'extrem exterior).^[52] En la Figura 1.17 s'il·lustren tres exemples de topologies d'un G4 unimolecular dependent de l'orientació relativa de les cadenes.

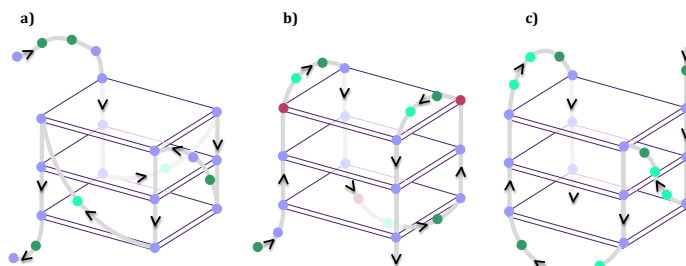


Figura 1.17. Topologies d'un G4 unimolecular: a) paral·lela, b) antiparal·lela i c) híbrida.

Respecte a la conformació de les guanines, es distingeixen dos configuracions: *syn* o *anti*. El tret distintiu entre ambdues recau en la posició relativa dels anells aromàtics. En la conformació *syn*, el protó H_1 de la desoxiribosa es troba molt pròxim al protó H_8 de la G, mentre que en disposició *anti*, aquests dos es troben més distanciat (Figura 1.18).^[53] Finalment, els G4 presenten quatre solcs que poden ser de tres tipus diferents: estret, mitjà o ample. Tot i que el dúplex sempre presenta un solc major i un menor, els G4 no sempre contenen el mateix tipus de solcs, ja que depenen en gran mesura de la topologia del G4 en general i de la conformació de les guanines. Per exemple, en el cas de G4 paral·lels totes les G es troben en *anti*, generant quatre solcs mitjans, d'altra banda els G4 antiparal·lels i híbrids requereixen Gs en conformacions *syn* i *anti* per a possibilitar l'establiment d'interaccions de tipus Hoogsten, el que resulta en l'aparició dels tres tipus de solcs.^[54]

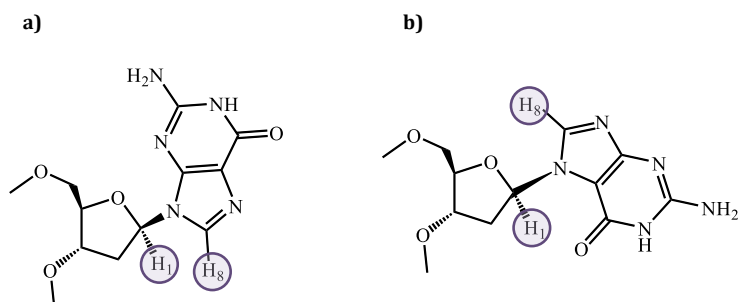


Figura 1.18. Representació de la conformació de guanina en a) *syn* i b) *anti*.

Recapitulant, el terme G4 fa referència a un conjunt d'estructures secundàries no-canòniques d'ADN que presenten uns trets bàsics comuns. Tanmateix és poden donar diferents conformacions tridimensionals que depenen de multitud de factors: concentració d'ADN, força iònica, natura dels bucles i els solcs, modificacions i conformacions de bases en la seqüència, etc.^[55-58] Fins a la data, han sigut resoltes multitud d'estructures tipus G4 que recolzen aquest fet. Com es pot observar en la Figura 1.19, poden donar-se conformacions diferents per a una mateixa seqüència, com ara la telomèrica de tipus d(TTAGGG)_n. Així doncs, designar una topologia a un G4 en dissolució pot suposar un repte, que sovint s'adreça fent ús de diverses tècniques espectroscòpiques, com dicromisme circular (DC) o ressonància magnètica nuclear (RMN).

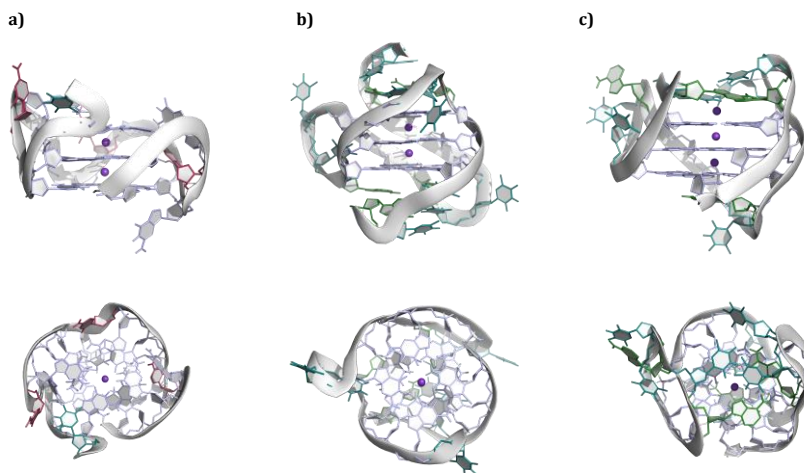


Figura 1.19. Visualització de l'estructura de diverses conformacions d'ADN G4: a) paral·lel (PDB: 2L88), b) antiparal·lel (PDB: 2MBJ) i c) híbrid (PDB: 2JSM). Representacions realitzades amb el software PyMOL per Àlvar Martínez-Camarena.

En les últimes dècades ha hagut un creixement exponencial del coneixement respecte a l'estabilitat termodinàmica i cinètica de les estructures tipus G4 *in vitro*.^[59-61] No obstant, l'interès actualment és focalitza en dilucidar els possibles rols biològics que aquestes estructures juguen *in vivo*. Molts treballs han evidenciat l'existència dels G4 en cèl·lules, demostrant el seu paper regulador en certs processos biològics i malalties, com ara el càncer: “*If G-quadruplexes form so readily in vitro, Nature will have found a way of using them in vivo*” – Aaron Klug, Premi Nobel en Química a l'any 1982.

1.2.2. - Detecció de G4 en cèl·lules

Abans de discutir el paper biològic dels G4, és important considerar en quina regió genòmica es pot trobar aquest tipus d'ADN. Donada l'extensió del genoma humà i l'elevat polimorfisme de les estructures G4, preveure la formació de G4 *in vivo* és una tasca complicada. Malgrat això, la bioinformàtica ha permès establir algorismes dissenyats per a localitzar seqüències del genoma amb potencial per a formar G4 (PQS, de l'anglès *Putative Quadruplex-forming Sequences*).^[62]

Per exemple, l'algorisme Quadparser, publicat per Huppert i Balasubramanian busca regions d'ADN que compleixen la "regla de plegament": seqüències de la forma $d(G_{3+N_{1-7}} G_{3+N_{1-7}} G_{3+N_{1-7}} G_{3+})$ on N és qualsevol base, incloent la G.^[63] Com a resultat d'aplicar aquesta regla a tot el genoma humà s'obtenen al voltant de 376000 PQS.^[64] Utilitzant el mateix algorisme, però restringit a les regions promotores de gens reguladors de processos de transcripció, s'ha trobat que en més d'un 40% d'aquests pot existir almenys un G4. A més a més, la probabilitat és màxima en els llocs d'inici del procés de transcripció (TSS, del anglès *Transcriptional Start Site*).^[64]

Altres algorismes amb restriccions i condicions addicionals han sigut també dissenyats amb l'objectiu d'obtenir una estimació més precisa, com el publicat per Neidle i els seus col·laboradors, que restringeix el nombre de guanines a un valor menor de sis.^[65]

Tots aquests algorismes i els seus corresponents resultats es troben recopilats en bases de dades online, el que ha possibilitat la conciliació de la informació disponible (Taula 1.1). Tanmateix, la realitat és que la formació d'estructures G4 no sols depèn d'un recull de regles senzilles, sinó que han de considerar-se molts altres factors determinants, com ara la intermolecularitat, el tamany dels bucles, les alteracions en la triada de guanines...

Taula 1.1. Alguns dels programes i bases de dades en relació amb seqüències G4.

Nom	Pàgina Web	Referència
QuadBase	http://quadbase.igib.res.in/	[66]
QuadFinder	https://omictools.com/quadfinder-tool	[67]
QGRS Mapper	http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php	[68]
G4IPDB	http://bsbe.iiti.ac.in/bsbe/ipdb/index.php	[69]
G4Hunter	https://bioinformatics.cruk.cam.ac.uk/G4Hunter/README.html	[70]

Avui dia, els algorismes matemàtics són complementats amb observacions experimentals per tal d'obtindre una millor aproximació a la realitat, com és el cas del recentment publicat G4Hunter.^[70] No obstant, encara queda un llarg camí per a poder determinar *in vivo* i amb precisió exacta els punts concrets del genoma humà on els G4 no sols poden formar-se, sinó que de fet, es formen. Per aquesta raó, existeix una ampli recull de treballs que tenen com ambició objectiu la detecció de G4 *in vivo*, és a dir en cèl·lules. Les tècniques emprades són molt diverses i van des de l'ús de molècules, anticossos o proteïnes que actuen de sensors, fins a tècniques de seqüenciació d'ADN.^[71]

El primer anticòs selectiu per a G4 publicat va ser el Sty49. Aquest va ser emprat per a detectar la presència de G4 en el macronucli de ciliats on abunda l'ADN telomèric. Altres anticossos, com el BG4^[72] o el 1H6^[73] han sigut utilitzats en estudis immunofluorescents en diferents línies cel·lulars, tot i que existeix un gran debat respecte a la seua sensibilitat. De fet, el BG4 es capaç de detectar la formació de G4 en ARN, mentre que el 1H6 no.^[74] D'altra banda, tot i que l'ADN telomèric és ric en seqüències repetitives de guanines, el BG4 apunta a que altres regions no telomèriques tenen associat un major contingut de G4 (Figura 1.20).^[72]

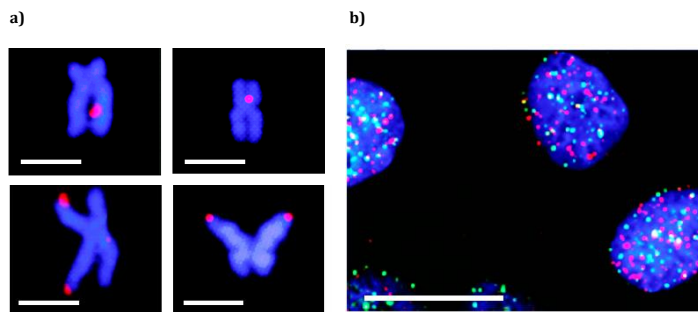


Figura 1.20. a) Detecció de BG4 (roig) en zones telomèriques i no telomèriques de cromosomes metafàsics aïllats a partir de cèl·lules HeLa i b) nucli de cèl·lules UO2 (blau) on s'aprecia falta de colocalització entre la proteïna d'unió telomèrica TFR2 (verd) i l'anticòs BG4 (roig). Barra d'escala de 20 μ M. El nucli cel·lular està tenyit amb DAPI.

Com s'ha mencionat abans, altra aproximació és la utilització de petites molècules que actuen com a sensors de G4. Aquests sensors hauran de ser permeables a la membrana cel·lular i la seua citotoxicitat haurà de ser mínima. A més a més, hauran de presentar una elevada afinitat i selectivitat pel G4, que done lloc a una resposta mesurable com un augment de la fluorescència. Tot i que són criteris molt restrictius, han sigut publicats multitud de sensors fluorescents que evidencien l'existència d'estructures G4 en cèl·lules.^[75,76]

En la Figura 1.21 es troben les estructures moleculars de dos d'aquests tipus de sensors. El diiodur de 3,6-bis(1-metil-4-vinilpiridinio)carbazol (Figura 1.21a) dóna lloc a temps de vida de fluorescència més llargs quan s'uneix a ADN G4 que quan interacciona amb ADN dúplex en assajos *in vitro*. Al tractar cèl·lules HeLa amb aquest complex, s'obtenen temps de vida anàlegs als obtinguts per interacció amb G4 i a més a més, es veu modificada l'expressió de dos gens que són PQS.^[77]

Altra referència important a citar quan es parla de sensors de G4 és el DAOTA-M2 (Figura 1.21b), publicat pel grup de Ramon Vilar. Aquest compost també dóna lloc a un augment considerable del temps de vida de fluorescència quan interacciona amb G4, el qual depén estretament de la conformació del G4. Els temps de vida mesurats en cèl·lules U2OS després de ser tractades amb DAOTA-M2 també apunten a la presència d'estructures G4 *in vivo*.^[78]

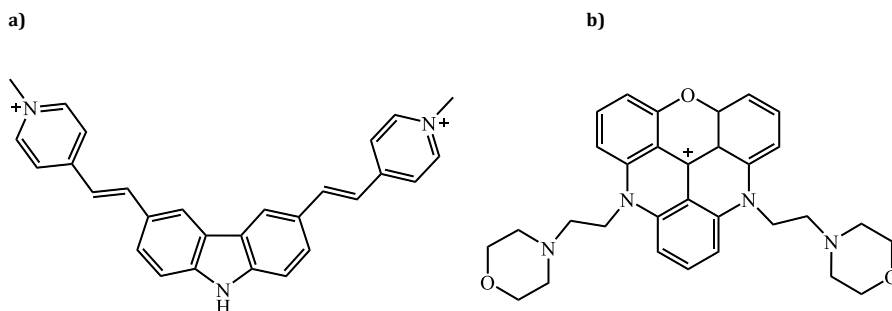


Figura 1.21. Estructures moleculars de a) 3,6-bis(1-metil-4-vinilpiridinio)carbazol i b) DAOTA-M2.

La detecció de G4 en cèl·lules pels mètodes anteriorment comentats és controvertida, ja que la seua correcta visualització depén enormement del tipus de sensor emprat i les condicions de l'experiment. A més a més, les qüestions respecte al paper biològic dels G4 no s'han de respondre basant-se en mesures de fluorescència puntuals, sinó més bé des d'una perspectiva dinàmica al llarg del cicle cel·lular, intentant englobar tot el genoma. En aquest sentit, les tècniques de seqüenciació gènica resulten d'especial interès. Per exemple, els mètodes *in vivo* d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP-seq) permeten aïllar fragments determinats d'ADN de les cèl·lules, com l'ADN G4, mitjançant la interacció amb anticossos específics, per a posteriorment detectar-los mitjançant seqüenciació.

En un estudi publicat per Balasubramanian i col·laboradors es va emprar l'anticòs hf2 per a extraure ADN G4 de cèl·lules de càncer de mama (MCF-7). Es va demostrar l'existència d'uns 700 G4 estables presents en regions telomèriques, en zones promotores i en el cos de gens reguladors de la transcripció.^[79] L'anticòs BG4, anteriorment comentat, s'ha emprat en experiments anàlegs, amb l'objectiu d'aïllar ADN G4 present en la cromatina. En aquest cas, es van trobar unes 10000 PQS, majoritàriament en zones transcripcionalment actives de la cromatina, en regions promotores i en els extrems 5' de seqüències no traduïdes corresponents a gens reguladors de la transcripció (5'-UTR), que estan molt relacionats amb el càncer.^[80] En un altre experiment de Chl-Seq, els llocs d'ADN danyats al llarg del genoma van ser detectats després de tractar les cèl·lules amb piridostatina (PDS), un lligand estabilitzador d'estructures G4. En aquest cas, les regions d'ADN danyat obtingudes coincidien amb les regions PQS estimades en càlculs computacionals.^[81]

Altres tipus de tècniques de seqüenciament d'alt rendiment (G4-seq) han sigut també aplicades en la determinació de la prevalença i la distribució dels G4 al llarg del genoma humà. Aquestes metodologies estan basades en l'ús de condicions que faciliten la formació de G4. Quan s'utilitzen agents estabilitzadors de G4 (molècules o ions), l'ADN polimerasa queda estancada en els llocs on aquests es formen, donant lloc a una senyal que s'associa amb la seua existència.^[82] Per exemple, en un estudi G4-seq recent es van identificar més de 700000 PQS al llarg del genoma humà, trobant una gran densitat de G4 en zones promotores d'oncogens i en regions 5'-UTR, així com en gens reguladors.^[83]

Aquesta última xifra és tres ordres de magnitud major que l'obtinguda per ChIP-Seq i casi el doble de la calculada fent ús de mètodes computacionals. La disparitat en les dades es deguda a que la detecció de G4 és complexa i depèn de molts factors. En les tècniques G4-Seq i ChIP-Seq poden ser identificats G4 que no compleixen "la regla de plegament" establerta als algorismes matemàtics, o bé perquè no contenen 3 guanines consecutives, o bé per la llargària dels bucles o la molecularitat. D'altra banda, la diferència numèrica entre G4-Seq i ChIP-Seq apunta al paper fonamental que l'entorn cel·lular juga en la dinàmica biològica de formació dels G4. Per exemple, l'acció de proteïnes d'unió als G4 o helicases poden modificar en gran mesura l'existència de G4 a nivell cel·lular. A més a més, l'ús d'anticossos específics en ChIP-Seq limita la selectivitat i sensibilitat del procés. I sense dubte, les variacions en el protocol experimental influeixen en els resultats obtinguts.

Malgrat tota aquesta aparent incertesa, el que sembla clar és que els G4, no sols poden, sinó que realment es formen a nivell cel·lular, i a més a més de forma no aleatòria. Resumint i de manera generalitzada, podem concloure que els G4 es poden trobar en regions telomèriques i en zones promotores de diversos gens i sobretot oncogens. Per tant, tenen un paper essencial en nombrosos processos biològics, com ara en el manteniment de la llargària dels telòmers i la regulació de la replicació d'ADN o de l'expressió gènica (Figura 1.22).^[84-89] Seguidament es presenten alguns exemples rellevants del paper biològic dels G4.

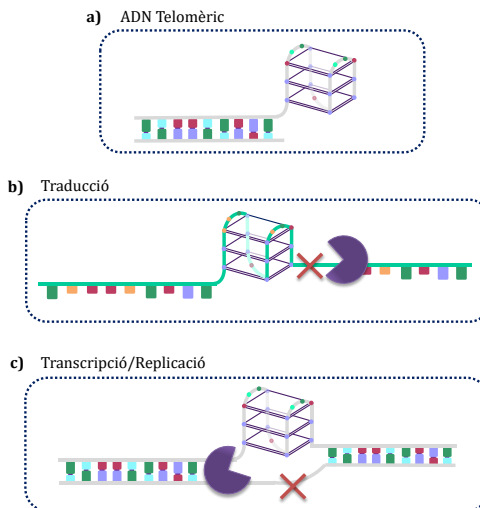


Figura 1.22. Esquematzació del paper biològic del G4 en a) l'estabilitat genòmica, b) la traducció i c) la transcripció i replicació.

1.2.3. - Un petit recull d'exemples del paper biològic dels G4

G4 als telòmers

Els telòmers són regions no codificants del genoma que es troben als extrems dels cromosomes. Aquests són en part responsables de l'estabilitat de la informació genètica, és a dir de mantindre la integritat dels cromosomes i protegir els seus extrems de recombinacions, fusions i la degradació per part d'exonucleases (Figura 1.23).^[90]

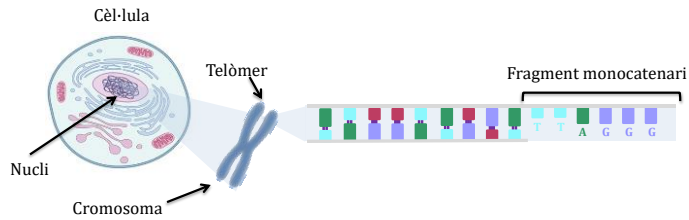


Figura 1.23. Representació de la localització de l'ADN telomèric en una cèl·lula eucariota.

L'ADN telomèric va ser identificat per primer cop en els anys 1930 pel científic Hermann Muller.^[91] La seua seqüència està composta per una sèrie de nucleòtids repetitiva i rica en guanines. En eucariotes normalment es tenen repeticions d(TTAGGG)_n, d'una llargària d'entre 9000 a 15000 bases.

Tot i que l'ADN telomèric es presenta típicament en forma de dúplex, en el seu extrem 3' sempre hi ha un fragment d'ADN monocatenari (d'entre 50 a 300 bases de longitud) que sobreix respecte a la seua cadena complementària.^[92] Així doncs, existeixen maquinaries enzimàtiques que poden reconèixer els extrems telomèrics com ADN danyat i deshibridat, la qual cosa activaria la seua degradació.^[93]

Per aquesta raó, l'extrem telomèric 3' es troba doblegat sobre el telòmer, de manera que es forma una estructura en forma de "bucle-T".^[94] A més a més, també es troba unit a una sèrie de proteïnes (TRF1, TRF2, TPP1, TIN2, POT1 i RAP1 entre altres), que donen a lloc a un complex proteic conegut com shelterina o telosoma (Figura 1.24).^[95,96] Aquesta estructuració dels extrems telomèrics pareix ser la responsable de la seua capacitat de garantir l'estabilitat genòmica.^[97]

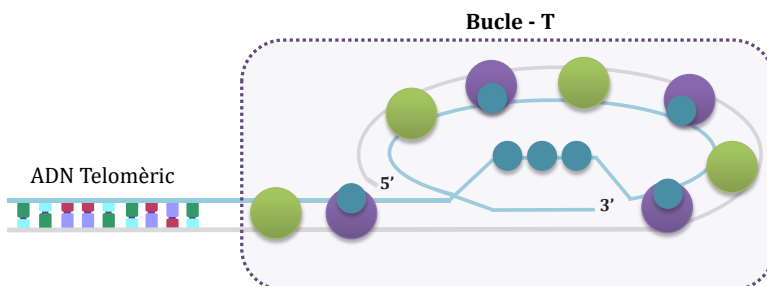


Figura 1.24. Representació esquemàtica del bucle-T format en l'extrem dels cromosomes.

Malgrat el paper vital dels telòmers en la protecció dels cromosomes, aquests s'acurten en cada divisió cel·lular degut al "problema de la replicació", el qual causa en última instància la mort cel·lular.^[98] Tornant al mecanisme de replicació, l'ADN polimerasa requereix d'un encebador (petit fragment d'ARN que actua com a iniciador) per a afegir nucleòtids a la cadena nova d'ADN. Com que l'addició sempre és en direcció 5' a 3', una de les dues cadenes es sintetitza de forma contínua (cadena avançada), mentre que l'altra ha de construir-se de manera discontinua (cadena retardada) amb fragments d'Okazaki, cadascun amb el seu propi encebador. Al finalitzar, els fragments d'ARN són eliminats i substituïts per ADN, amb l'excepció de l'últim encebador de l'extrem 5' que no es reemplaça per ADN. Aquest és precisament el "problema de la replicació" i l'origen del fragment monocatenari 3' dels telòmers.

Conseqüentment, en cada cicle cel·lular es produeix una pèrdua neta de nucleòtids (d'entre 100 a 200 bases).^[99] Després d'un determinat nombre de cicles, s'assoleix el conegut com límit Hayflick,^[100,101] és a dir, la longitud dels telòmers és tan curta que ni es pot formar el bucle-T, ni es pot donar un altre cicle. En aquest punt la cèl·lula té associada una gran inestabilitat genòmica i entra en l'etapa de senescència, deixant de dividir-se i finalment donant lloc a la mort cel·lular.^[102,103]

Així doncs, la llargària dels telòmers s'entén com un marcador d'envelliment: les cèl·lules amb telòmers llargs són considerades joves i poden donar lloc a un elevat nombre de cicles, mentre que les cèl·lules amb telòmers curts estan properes a entrar en estat de senescència i morir. De fet, diversos estudis han demostrat la relació entre la llargària telòmers i certes dolències associades a l'edat,^[104-107] com per exemple el càncer^[108,109], malalties cardiovasculars^[110,111] o infermetats neurodegeneratives com l'Alzheimer.^[112,113] A més a més, una elevada quantitat de telòmers curts ha sigut associada amb aspectes perjudicials de l'estil de vida,^[114,115] com ara alts nivells d'estrés^[116,117] o dietes insalubres.^[118]

Els telòmers doncs, susciten un gran interès en el públic general. Tant és així que existeixen llibres que proporcionen consells per a mantindre la longitud telomèrica amb el propòsit de millorar la qualitat de vida.^[119,120] Fins i tot, hi han empreses dedicades a mesurar la longitud dels telòmers amb l'objectiu d'estimar una edat biològica real del pacient, com ara LifeLenght® o TeloYears®.

Però cal dir que “el problema d’escurçament telomèric” té solució: l’enzim telomerasa. Es tracta d’una riboproteïna responsable del manteniment de la llargària dels telòmers, capaç de sintetitzar ADN a partir d’un motle d’ARN. El seu descobriment s’atribueix a Carol Greider, Elisabeth Blackburn i Jack Szostak, els quals varen ser guardonats amb el Premi Nobel de Medicina l’any 2009.^[121]

En realitat, la telomerasa és un enzim complex format per diversos components: diferents grup proteics (Hsp90, p23...), una proteïna de transcripció reversa (hTERT) i un motle d’ARN (TERC) complementari de l’extrem 3’ telomèric.^[122] Com s’ha mencionat anteriorment, la seua funció és allargar els telòmers en un procés que inclou quatre etapes. A grans trets, el primer pas és la formació del complex proteic. Després es produeix el reconeixement de l’extrem 3’ de l’ADN telomèric per la seqüència complementària d’ARN que es troba en TERT. Seguidament, hTERT catalitza l’addició de nucleòtids a l’extrem 3’ del telòmer. Finalment, es produeix el desplaçament de la telomerasa al llarg del nou fragment d’ADN sintetitzat per a que pugua continuar el procés d’elongació fins que el telòmer assoleix una llargària adequada.^[123]

Cal dir no totes les cèl·lules presenten activitat telomerasa i que la seua regulació depèn de diversos factors.^[124,125] Concretament, en cèl·lules somàtiques normals hi ha un escurçament progressiu dels telòmers, mentre que en cèl·lules mare, embrionàries i de teixits renovables, com les epitelials, la telomerasa sí que es troba activada. Ara bé, es coneix que la telomerasa està sobreexpresada en aproximadament el 90% de les cèl·lules tumorals, el que està estretament relacionat amb la proliferació incontrolada i la immortalització dels tumors (Figura 1.25).^[126]

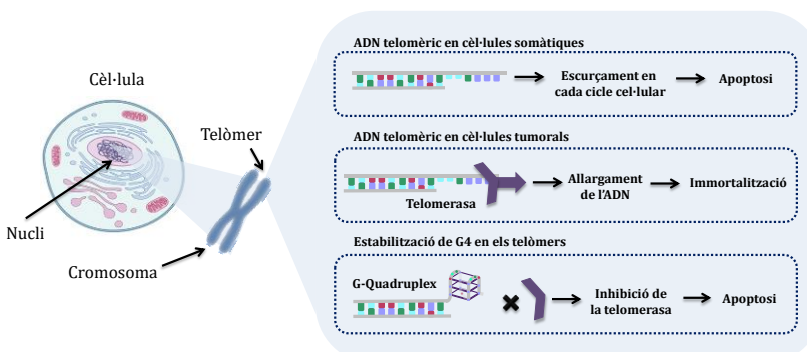


Figura 1.25. Esquema del paper biològic dels G4 als telòmers.

És per aquest motiu que la telomerasa es considerada una atractiva diana terapèutica per al disseny de fàrmacs antitumorals. Actualment, existeix una ampla recerca focalitzada en el disseny d'inhibidors de la telomerasa,^[127,128] per exemple mitjançant l'estabilització d'estructures G4 en l'extrem telomèric 3'.^[129] Va ser Blackburn la primera que va postular que les repeticions d(TTAGGG)_n telomèriques podrien adquirir conformacions G4,^[130] i avui dia es tenen nombroses evidències experimentals de la seua formació *in vivo* en els telòmers (Secció 1.2.2).

G4 als promotors de gens i oncogens

Com s'ha mencionat anteriorment, diversos estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat que els G4 existeixen en els promotors de diversos gens i oncogens, particularment, en zones properes als TSS (Secció 1.2.2).

Al contrari dels fragments monocatenaris telomèrics, els promotors són fragments d'ADN amb conformació de doble hebra, el que fa que siga menys probable que donen lloc a la formació d'estructures G4. Tanmateix, els processos de transcripció gènica requereixen del desenrotllament previ de la doble hèlix, cosa que facilita l'estabilització de G4.^[131,132] És precisament per aquesta raó que els G4 estan lligats a llocs actius transcripcionalment, com és el cas dels promotors de gens i oncogens.

Fins a la data, han sigut publicats nombrosos treballs relacionats amb la presència de G4 en promotors i les seues corresponents implicacions biològiques,^[88,133,134] com per exemple el factor de transcripció c-Myc,^[135,136] els receptors tirosina-cinasa c-KIT^[137,138] o les proteïnes reguladores mitocondrials Bcl-2.^[139,140] A continuació, s'analitza en més detall la presència de G4 en aquests promotors.

Pel que fa al c-myc, va ser un dels primers oncogens identificat, el qual s'encarrega de controlar l'expressió de c-Myc. Aquesta proteïna contribueix a la regulació d'aproximadament el 15% dels gens del genoma humà relacionats amb l'apoptosi, el metabolisme, la proliferació i en definitiva, el control del cicle cel·lular.^[141,142] En cas de que c-myc es trobe mutat i sobreexpressat, té lloc una alteració d'eixos processos de regulació. Com a resultat, es produeix la sobreexpressió de diversos gens associats a diferents tipus de càncers, com ara de mama, còlon o cerebrals.^[143] Així doncs, el control de l'expressió de c-Myc és considerat una potencial diana terapèutica per a al disseny de fàrmacs antitumorals.

Una regió en la part superior del promotor P1 de *c-myc* (NHE-III) conté una seqüència de 27 parells de bases rica en G (Pu27), la qual dóna lloc a la formació de G4 paral·lels en presència de K^+ (Figura 1.26).^[144] Es coneix que és precisament aquesta regió la que controla aproximadament el 90% de l'activitat transcripcional de *c-myc*,^[145] i a més a més, que l'existència de G4 suposa una obstaculització per a la seua transcripció. Conseqüentment, l'estabilització de G4 per interacció amb petites molècules o complexos dificultaria l'expressió de *c-myc*, inhibint la proliferació de les cèl·lules tumorals.^[146-148]

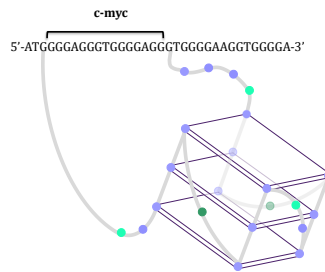


Figura 1.26. Representació esquemàtica de la formació de G4 al promotor de *c-myc*.

D'altra banda, el promotor de *c-KIT* presenta dues regions riques en G, conegudes com *c-kit1* i *c-kit2*. Es tracta de seqüències de 22 i 20 parells de bases respectivament, properes al lloc TSS.^[137,138] Ambdues són potencialment formadores de G4, amb topologies que resulten de particular interès. *C-kit1* té associada una conformació paral·lela amb G-tètrades que contenen Gs de la regió CGCT i un gran bucle establitzat per interaccions A-G.^[149] En canvi, *c-kit2* presenta una topologia paral·lela més convencional, tot i que presenta una discontinuïtat en uns dels eixos de les tètrades i té associada una gran a la flexibilitat deguda al bucle CGCGT (Figura 1.27).^[150]

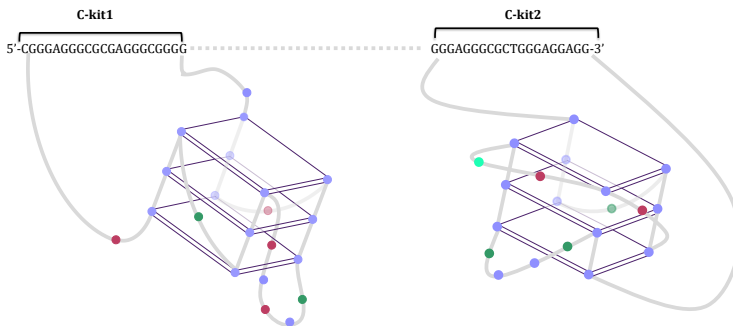


Figura 1.27. Representació esquemàtica de la formació de G4 al promotor de *c-kit*.

En aquest cas, el gen *c-kit* codifica a *c-KIT*, un receptor transmembrana amb activitat tirosina-cinasa, que estimula la proliferació i la diferenciació cel·lular.^[151] S'ha demostrat que aquest gen està estretament relacionat amb nombrosos tipus de tumors, com ara dels nòduls limfàtics o de pulmó, i especialment amb càncer gastrointestinal.^[152,153] Com que les regions riques en G del promotor de *c-KIT* són essencials per a la seua transcripció, l'estabilització de G4 tindria un paper fonamental en la inactivació de la seua expressió en cèl·lules tumorals.^[153-155]

Per últim, el gen *bcl-2* presenta una regió rica en GC en el promotor P1, la qual és crítica per a la regulació de la seua expressió. En aquest cas, pot donar lloc a la formació de tres G4, sent el G4 central el més estable.^[139] Es creu que aquest presenta una conformació híbrida paral·lela/antiparal·lela que conté tres G-tètrades i amb tres possibles conformacions que depenen dels bucles (Figura 1.28).^[140,156]

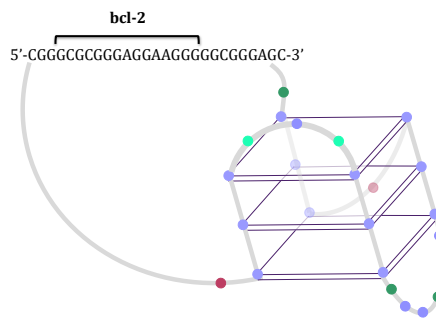


Figura 1.28. Representació esquemàtica de la formació del G4 central al promotor de *bcl-2*.

El producte proteic de *bcl-2*, *Bcl-2*, és una proteïna mitocondrial que està relacionada amb el control de la mort cel·lular, ja que funciona com a un inhibidor de l'apoptosi.^[157] S'ha demostrat que existeix una sobreexpressió de *bcl-2* en multitud de càncers, com ara de mama, pròstata pulmó, còlon, cervical o limfàtic.^[158] Així doncs, l'estabilització de G4 en *bcl-2* podria induir l'apoptosi cel·lular en aquest tipus de cèl·lules canceroses.^[159,160]

Altres G4 amb importància biològica

Tots els exemples mencionats fins ara corresponen a ADN G4, tot i que l'ARN també pot donar lloc a G4 en condicions fisiològiques. Com que l'ARN és monocatenari, la seua capacitat per a donar lloc a estructures secundàries no-canòniques *in vivo* és més elevada en comparació amb l'ADN.^[161] A més a més, els enllaços d'hidrogen intramoleculars que poden formar els grups 2'-hidroxil

de l'ARN milloren la seua estabilitat termodinàmica.^[162] Tanmateix, l'ARN G4 sol presentar una conformació paral·lela *in vitro*, probablement conseqüència del grup 2'-hidroxil, que força a les G a adoptar una conformació *anti* respecte a l'anell de ribosa.^[163]

Com en el cas de l'ADN, també s'han realitzat estudis bioinformàtics que han demostrat l'existència de seqüències potencialment formadores de G4 en el mRNA conegudes com PRQS (de l'anglès *Putative RNA Quadruplex Sequences*).^[164] Concretament, es troben PRQS en el mRNA corresponent a 3000 gens humans, incloent TRF2,^[165] bcl-2^[166] i TERRA.^[167] També s'han realitzat estudis de seqüenciació (rG4-seq) que indiquen la presència d'aproximadament 13500 PRQS en cèl·lules humanes.^[168] La inhibició de la traducció mitjançant l'estabilització d'estructures G4 en el mRNA també sembla ser una atractiva diana terapèutica. Tanmateix, l'existència i estabilitat d'aquestes estructures *in vivo* encara genera controvèrsia en la comunitat científica.^[169,170]

En resum, nombrosos estudis demostren l'important paper de les estructures G4 en diferents processos biològics, tot i que els mecanismes exactes i les seues repercussions encara no estan del tot ben definits. El que sí que es dona per descomptat és que prendre els G4 com a diana terapèutica és un bon punt de partida per al desenvolupament de fàrmacs antitumorals.

1.2.4. - G4 com a dianes terapèutiques

Actualment, diversos grups d'investigació dirigeixen els seus esforços cap al disseny de compostos que interaccionen amb G4 (l·ligands-G4), amb l'objectiu d'assolir cada cop una millor selectivitat i major afinitat per aquest tipus d'estructures d'ADN. Així doncs, existeixen en la literatura un gran recull de l·ligands-G4 estudiats tant *in vitro* com *in vivo*.^[171-177] Abans de descriure breument alguns dels exemples més rellevants, és interessant fer una reflexió del tipus de forces que intervenen en la interacció amb G4, ja que el seu anàlisi és primordial per a l'optimització del disseny dels l·ligands-G4.

Interaccions supramoleculares en el disseny de l·ligands-G4

Les interaccions intermoleculares no covalents tenen un paper d'essencial importància en el reconeixement d'estructures G4. El camp de la química que estudia aquest tipus de forces es coneix com química supramolecular: la química més enllà de la molècula (Jean Marie Lehn, Premi Nobel de Química en l'any 1987). Un complex supramolecular s'entén com aquella entitat química

que està formada per l'associació de dos o més entitats més menudes unides mitjançant interaccions no covalents.^[178-180] Sovint, s'anomena receptor a l'entitat de major tamany, mentre que les restants es coneixen com a substrats, per analogia al terme de receptor biològic de Paul Elrich.^[181]

En el cas de que la interacció establerta entre el receptor i el substrat siga selectiva, es diu que hi ha reconeixement molecular. Aquest últim concepte va ser introduït per Emil Fischer, amb l'objectiu de donar una explicació a com el centre actiu d'un enzim encaixa perfectament amb el seu corresponent substrat, exactament com ocorre amb un pany i la seua clau.^[182] Tot i que posteriorment Daniel Koshland va evidenciar que els enzims són més bé estructures flexibles, que poden modificar la composició química del seu substrat abans d'alliberar-lo.^[183] Així doncs, el reconeixement molecular es regit per interaccions supramoleculares, que són precisament les forces que modulen nombrosos processos biològics tan bàsics com la replicació, la transcripció o traducció d'informació genètica, presentades a l'inici d'aquest capítol.

En la Taula 1.2 es recullen les energies corresponents a les interaccions supramoleculares més comunes. Com es pot observar, totes són remarcablement més baixes que la corresponent a un enllaç covalent. Per exemple, les interaccions de van der Waals sols suposen uns pocs $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.^[180] Tanmateix, la suma de totes aquestes forces establertes entre el substrat i el receptor possibiliten un reconeixement específic i selectiu.

Taula 1.2. Energia de dissociació aproximada de diversos tipus d'interaccions supramoleculares en comparació amb l'enllaç covalent.^[180]

Tipus d'interacció	Energia de dissociació [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]
Enllaç covalent	400 - 100
Ió-dipol	200 - 50
Enllaç de hidrogen	120 - 4
Catió - π	80 - 5
Enllaç d'halogen	50 - 10
Anió - π	50 - 5
Dipol - dipol	50 - 5
Apilament π - π	50 - 2
Van der Waals	< 5

A l'hora d'aplicar aquests conceptes al disseny de lligands que interaccionen amb G4 (lligands-G4) s'han de tindre en compte diversos aspectes. En primer lloc, s'entén com a substrat el lligand-G4 i com a receptor el G4. Seguidament, s'ha de considerar l'estructura del G4 en qüestió, per a dilucidar els possibles punts d'ancoratge amb el lligand. L'objectiu és maximitzar l'àrea de contacte entre ambdós i assolir l'establiment del major nombre d'interaccions supramoleculares possibles.

De manera general, la topologia del G4 permet el seu reconeixement per apilament intern o extern, per interacció amb els bucles i solcs, o bé per una combinació d'aquestes (Figura 1.29).

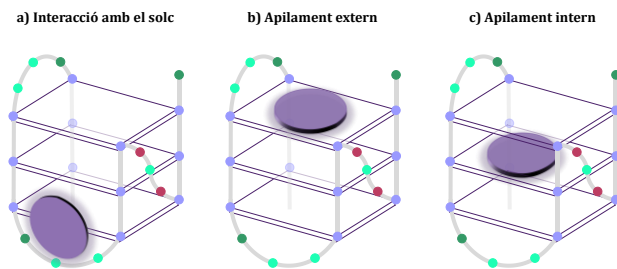


Figura 1.29. Representació dels possibles modes de interacció d'un lligand-G4.

Així doncs, tenint en compte la topologia del G4, el disseny molecular del lligand-G4 haurà de focalitzar-se en maximitzar les interaccions supramoleculares. D'una banda, una superfície aromàtica extensa similar en tamany a la G-tètrada afavorirà l'apilament extern per interaccions π - π . En el cas de que existisca una deficiència de càrrega que es situe en el canal central del G4, les interaccions electrostàtiques milloraran més l'afinitat. D'altra banda, la presència de grups amb tendència a protonar-se a pH fisiològic en les cadenes laterals, com ara amines, possibilitaran l'establiment d'interaccions electrostàtiques amb els grups fosfats dels bucles o solcs. Finalment, grups lleugerament voluminosos en les cadenes laterals afavoriran la selectivitat per G4 front a ADN dúplex, donat l'impediment estèric que ocasionaria la intercalació entre els parells de bases en la doble hèlix (Figura 1.30).

Un cop descrites les premisses a considerar per al disseny de lligands-G4, a continuació es recopilen alguns dels exemples més rellevants de la bibliografia. Aquests es presenten agrupats en dos grans famílies: petites molècules i complexos metàl·lics. Cal remarcar que tot i la multitud de publicacions en aquesta àrea, únicament dos compostos, Quarfloxin^[184] i CX-5461^[185], es troben actualment en fase clínica.

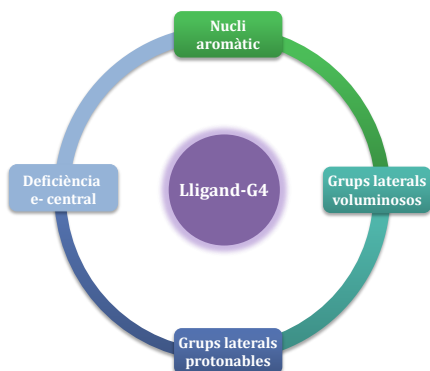


Figura 1.30. Esquema de les característiques estructurals per al disseny d'un lligand-G4.

Alguns exemples de lligands-G4: Petites molècules

El primer lligand reconegut com inhibidor de la telomerasa és l'antraquinona 2,6-disubstituida BSU-1051.^[186] Posteriorment, han sigut publicats diversos estudis estructura-activitat basats en aquest tipus de derivats, en els quals es modificaven els substituents en les posicions 1,4; 1,5;1,8; 2,6; i 2,7. En general, s'obtingueren bones afinitats pel G4, però una selectivitat limitada front a ADN dúplex.^[187-189] Mitjançant estudis computacionals posteriors s'ha establert que l'anell d'antraquinona dóna lloc a interaccions π - π amb la G-tètrada i que les cadenes laterals amb grups carregats positivament es situen en els solcs (Figura 1.31).^[190,191]

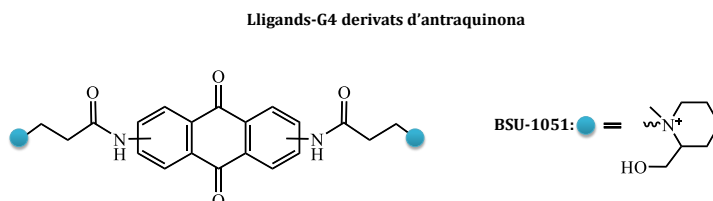


Figura 1.31. Estructura molecular bàsica de lligands-G4 basats en antraquinones.

D'altra banda, nombrosos derivats d'acridina també han sigut extensament estudiats. Aquests presenten una característica estructural beneficiosa en comparació amb l'anterior família de compostos: una carga positiva en el cor central del lligand-G4, que a més a més millora la solubilitat en aigua.^[192-195] Amb l'objectiu d'optimitzar la selectivitat d'aquests derivats es va recórrer a la modelització molecular i es va postular que una acridina trisubstituïda donaria lloc a una major selectivitat pel G4 front a dúplex.^[196] Es va dissenyar així el compost conegut com BRACO-19, en el qual les dos cadenes amido laterals interaccionen preferentment amb els solcs del G4 més amples, mentre que la restant ho fa amb el solc més estret (Figura 1.32).^[197,198]

De fet, aquest últim compost presenta una clara milloria tant en la selectivitat, com en l'afinitat pel G4 ($\text{Log } K_{a(\text{G4})} = 7$, $\text{Log } K_{a(\text{duplex})} = 5$). A més a més, estudis d'expressió gènica van revelar que BRACO-19 reduïa l'expressió d'hTERT, la unitat catalítica de la telomerasa.^[196]

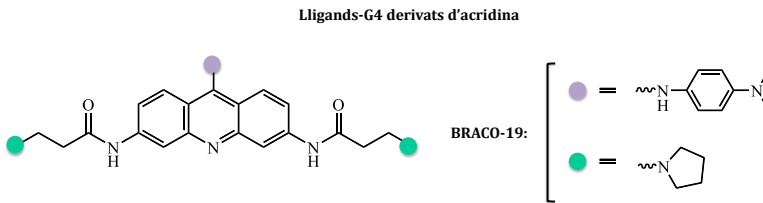


Figura 1.32. Estructura molecular bàsica de lligands-G4 basats en acridines.

Altra família a destacar en aquest camp són les porfirines. La planaritat, l'aromaticitat i el tamany de l'estructura macrocíclica modulen l'apilament en la G-tètrada. El lligands pioners clàssics d'aquesta família són coneguts com TMPyP4 i TMPyP2 (Figura 1.33). Els dos presenten càrregues positives en els extrems del macrocicle, el que augmenta l'afinitat pel G4 com a resultat de les interaccions electrostàtiques amb els grups fosfats de l'ADN. Ara bé, TMPyP2 té una afinitat remarcablement menor que TMPy4, el que demostra que la posició de les càrregues a les cadenes laterals no és trivial.^[199,200] Però no tot podien ser avantatges, malgrat l'elevada afinitat per G4, TMPyP4 és molt poc selectiu front a ADN dúplex.^[201] Malgrat açò, nombrosos estudis han demostrat el seu potencial terapèutic.^[202,203] A més a més, ha servit de base per al disseny de nous lligands-G4. Per exemple, s'ha comprovat que reduint el nombre de grups carregats en les cadenes laterals i introduint-hi grups voluminosos s'obté una millora en la selectivitat per G4.^[204,205]

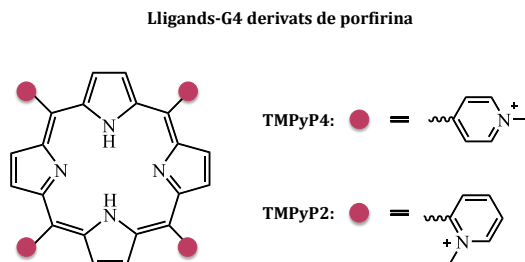


Figura 1.33. Estructura molecular bàsica de lligands-G4 basats en porfirines.

D'altra banda, el lligand neutre Telomestatin (Figura 1.34a) és un producte natural aïllat de l'*Streptomyces Anulatuts*, que ha demostrat no sols ser extremadament afí per G4, sinó també ser molt selectiu front a ADN dúplex.^[206] Aquest està format per un anell pla que conté oxazolats neutres i metilats, de tamany adequat per a apilar-se amb la G-tètrada. Diversos estudis biològics han demostrat les seues propietats antiproliferatives en diferents línies tumorals.^[207,208] Tanmateix, la seua complicada síntesi fa que el seu estudi a gran escala no resulte viable. No obstant, l'anell base ha servit com a punt de partida per a la síntesi de nous derivats, com per exemple HXDV (Figura 1.34b), que posseeix una elevada selectivitat per G4.^[209,210]

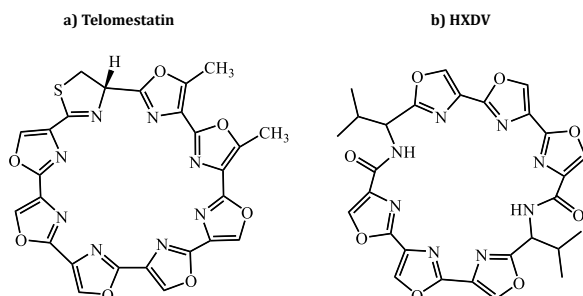


Figura 1.34. Estructura molecular dels lligands-G4 a) telomestatin i b) HXDV.

Com a exemples de lligands-G4 amb unitats aromàtiques fusionades es tenen les quindolines.^[211,212] Particularment, resulten interessants els derivats substituïts amb grups electró-dadors en posició 11, ja que afavoreixen la protonació de l'anell de piridina a pH fisiològic. Aquesta funcionalització millora l'afinitat i la selectivitat pels G4, donat que la càrrega positiva pot situar-se en el canal central del G4.^[213] S'ha comprovat que aquest tipus de derivats pot induir la formació de G4 en la regió promotora de c-myc, el que causa la inhibició de la seua expressió en cèl·lules hepàtiques tumorals.^[214]

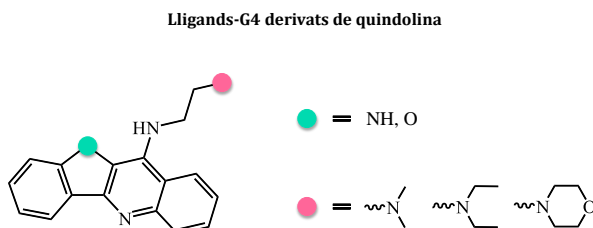


Figura 1.35. Estructura molecular bàsica de lligands-G4 basats en quindolines.

Alguns exemples de lligands-G4: Complexos metàl·lics

A banda de molècules purament orgàniques, els complexos metàl·lics també resulten molt interessants per al disseny de lligands-G4, ja que li poden conferir propietats addicionals a l'andami orgànic. En primer lloc, el centre metàl·lic té l'habilitat d'organitzar els lligands que coordina en una geometria i orientació específica, el que pot donar lloc a l'optimització de la interacció amb el G4. A més a més, la seua naturalesa electró-acceptora fa que es reduisca la densitat electrònica dels lligands aromàtics coordinats, originant sistemes electrònicament deficients que establiran interaccions π més fortes amb la G-tètrada. Fins i tot, l'àtom metàl·lic pot posicionar-se en el canal central del G4, interaccionant amb les guanines de la G-tètrada. Per últim, mitjançant l'elecció del tipus de catió metàl·lic es poden modular les propietats lligand-G4.

Entre els primer exemples de complexos metàl·lics com a lligands-G4 es troben les metaloporfirines (Figura 1.36a).^[215] D'una banda, el tamany de l'anell de porfirina resulta apropiat per a l'apilament en la G-tètrada, i d'altra banda, la coordinació d'un catió metàl·lic afavoreix les interaccions electrostàtiques, millorant l'afinitat pel G4. Mitjançant els estudis realitzats amb aquest tipus de derivats es va comprovar que la geometria dictada pel metall influïa de manera extrema en la interacció amb el G4. Amb un derivat de la porfirina TMPyP4 es van preparar complexos metàl·lics de diferent geometria, com ara planoquadrada amb Ni(II) i octaèdrica amb Mn(II). Ambdós presenten una elevada afinitat per G4, tot i que el complex amb dos lligands axials de Mn(II) és molt més selectiu, presentant una afinitat quatre cops major pel G4 que pel dúplex. Tot apunta a que les aigües axials d'aquest complex passen a ser làbils en contacte amb el G4 i que dificulten la seua intercalació en el dúplex.^[215,216] Per tal de millorar les propietats d'aquests derivats, s'han realitzat estudis en els quals es modificaven les cadenes laterals del macrocicle introduint càrregues positives o grups voluminosos.^[217]

a) Lligands-G4 derivats de metaloporfirines

b) Lligands-G4 derivats de metalocorrols

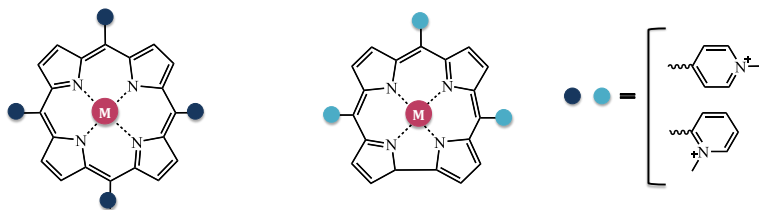


Figura 1.36. Estructura molecular bàsica de lligands-G4 basats en a) metaloporfirines i b) metalocorrols.

Altre exemple curiós en relació a la geometria dels complexos ve donat pels derivats de metalocorrols (Figura 1.36b), que presenten una estructura similar a la de les porfirines. En aquest cas, també s'ha comprovat que tot i no ser plans, els metalocorrols de Mn(II) i Cu(II) són remarcablement selectius per G4 front a ADN dúplex, molt probablement per l'impediment estèric que suposaria la intercalació en la doble hèlix.^[218-220] Mitjançant estudis de modelització computacional s'ha pogut observar que aquest tipus de complexos interaccionen amb el G4 pels solcs i per apilament π - π . Com ocorre per a les altres famílies de lligands-G4, es poden modular les seues propietats modificant les cadenes laterals racionalment.^[221]

Tanmateix, l'habilitat de certs complexos plano-quadrats per a interaccionar amb G4 via apilament π extern és innegable. S'han publicat estudis amb complexos de Pt(II) amb fenantrolina i bipyridina que presenten una elevada afinitat per G4 (Figura 1.37a). L'augment de la superfície aromàtica i la funcionalització amb grups protonables en aquest tipus de complexos no sols millora l'afinitat, sinó també la selectivitat.^[222,223] Però cal remarcar que aquests lligands també han sigut utilitzats per a la formació de complexos octaèdrics amb Ru(II) (Figura 1.37b), que tot i no ser plans, mostren una afinitat per G4 telomèric també molt elevada. D'entre ells, resulta de particular interès un complex bimetàl·lic publicat per J. Thomas i col·laboradors ($\log K_{a(G4)} \sim 7$), que dóna lloc a un augment de la fluorescència d'una magnitud que depèn de la topologia del G4 estudiat.^[224,225]

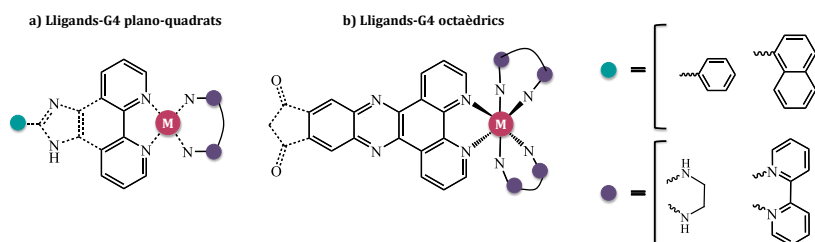


Figura 1.37. Estructura molecular bàsica de lligands-G4 basats en complexos a) plano-quadrats i b) octaèdrics.

Un altra família de complexos rellevants en aquest camp són els coneguts com “*salphens*”, en els quals el catió metàl·lic força al lligand a adoptar una disposició plana (Figura 1.38). El primer estudi amb aquests tipus de lligands-G4 va ser publicat pel grup de Ramon Vilar, en el qual es demostrava que dos complexos de Ni(II) amb *salphen* donaven lloc a una gran afinitat i selectivitat per G4.^[226] Posteriors estudis amb altres metalls, com ara Cu(II), Pt(II), Pd(II), Zn(II) i V(IV) demostren com l'elecció del catió metàl·lic afecta dràsticament a

l'afinitat: els complexos plano-quadrats solen donar lloc a una major estabilització del G4, tot i que sovint tenen associat un cert sacrifici de selectivitat.^[227] Per últim, l'elecció dels substituents del *salphen* és crucial, per exemple, la introducció de càrregues positives o de grups voluminosos pot millorar la selectivitat.^[228]

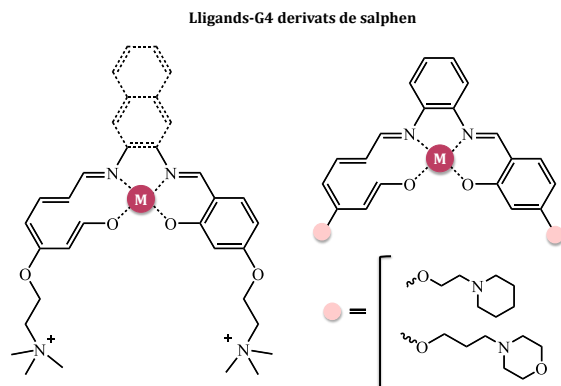


Figura 1.38. Estructura molecular bàsica de lligands-G4 basats en salphen.

En aquest context, cal destacar un treball publicat recentment a la revista *Chemical Science* per V. Rakers i col·laboradors, en el qual es va realitzar la síntesi *in situ* de tres complexos de Ni(II) tipus *salphen*, emprant un sistema microfluídic sense necessitat de purificació posterior.^[229] Així doncs, es tracta d'un sistema de flux continu que permet la síntesi de lligands-G4 de manera ràpida i eficient. A més a més, en aquest mateix treball es presenta per primer cop un dispositiu que permet una estimació acurada de l'afinitat dels lligands-G4 via un assaig FRET-Melting (de l'anglès *Förster Resonance Energy Transfer*) en flux continu (Figura 1.39).

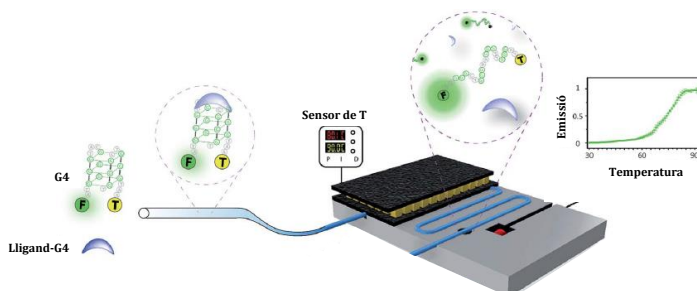


Figura 1.39. Representació esquemàtica del sistema microfluídic dissenyat per a avaluar l'afinitat de lligands-G4 mitjançant un assaig FRET-Melting. Imatge adaptada de [229].

1.3. - Disseny de lligands-G4

D'entre totes les possibilitats a l'abast per al disseny de lligands-G4, en aquesta tesi s'ha escollit la trifenilamina (TPA), trifenilbenzé (TPB) i diversos derivats poliamínics com a motius estructurals principals. Concretament, el TPA i el TPB constitueixen el cor central dels lligands-G4, mentre que les poliamines són utilitzades com a cadenes laterals. En aquesta secció es descriuen breument els principals rols biològics de les poliamines naturals i la seua relació amb el càncer. També s'inclouen alguns exemples bibliogràfics del disseny de fàrmacs antitumorals basats en poliamines. Seguidament, s'introdueixen el TPA i el TPB. Finalment, es recopilen alguns estudis previs publicats en els quals compostos basats tant en poliamines, com en TPA, han sigut emprats com a lligands-G4.

1.3.1. - Poliamines com a cadenes laterals

Les poliamines naturals són molècules petites amb naturalesa bàsica essencials per al creixement normal i el desenvolupament de cèl·lules eucariotes. La putrescina, l'espermidina i l'espermina són considerades les principals poliamines en l'entorn cel·lular (Figura 1.40).^[230] Tant la seua càrrega a pH fisiològic com la seua flexibilitat fan que siga possible que aquestes molècules interaccionen amb gran multitud de receptors aniònics a nivell cel·lular, com ara ADN, ARN, proteïnes o fosfolípids, el que fa que la concentració de poliamines no complexades en medi fisiològic siga notablement baixa.^[231]

Així doncs, les poliamines són de vital importància en diferents processos biològics: l'empaquetament i la replicació de l'ADN, la regulació de l'expressió gènica, la modulació de canals iònics o la mantenció de la integritat de les membranes. En definitiva, es pot considerar que les poliamines estan relacionades amb la regulació de la proliferació i l'apoptosi cel·lular.^[232] En condicions fisiològiques normals, la seua concentració està modulada per un conjunt complex de processos biosintètics, catabòlics i de transport que avui dia encara no estan completament descrits.^[233] En la Figura 1.40 es mostra un esquema simplificat del metabolisme de les poliamines en el medi cel·lular. En primer lloc, l'enzim ornitina descarboxilasa (ODC) catalitza la descarboxilació dels aminoàcids ornitina o arginina, donant lloc a la putrescina. Seguidament, mitjançant una sèrie de reaccions enzimàtiques s'obtenen la resta de poliamines naturals. Aquest procés pot ser inhibit per la unió de la difluorometilornitina (DFMO) a l'ODC.

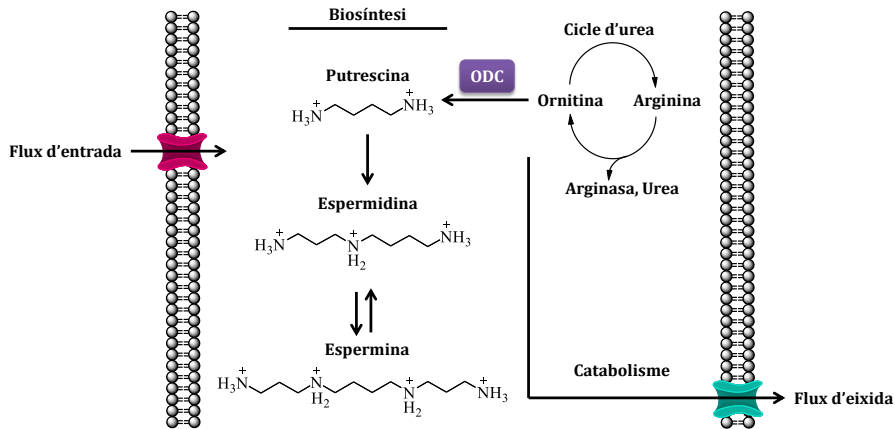


Figura 1.40. Representació simplificada del metabolisme de poliamines en el medi cel·lular.

Ara bé, tot i que les poliamines són essencials per al correcte creixement cel·lular, una concentració intracel·lular elevada està relacionada amb un augment descontrolat de la proliferació cel·lular.^[234-236] Així doncs, diversos estudis han relacionat una elevada concentració de poliamines amb diferents tipus de càncer, com ara de mama, còlon, pròstata o pell. A més a més, es pensa que existeix una correlació directa entre la sobreexpressió dels enzims implicats en la biosíntesi de les proteïnes, com ara ODC, i l'aparició de cèl·lules tumorals.^[236,237]

Com s'ha mencionat anteriorment, l'aminoàcid ornitina (provinent del cicle d'urea) es transforma catalíticament a putrescina per acció de l'enzim ODC. L'expressió d'ODC es troba controlada per un conjunt complex de mecanismes. Entre ells, el factor de transcripció c-Myc juga un paper primordial: s'uneix al promotor de ODC i activa la seua expressió.^[238] A més a més, s'ha demostrat que les poliamines naturals afecten a la conformació G4 del promotor de c-Myc, estabilitzant una topologia transcripcionalment activa que afavoreix la seua sobreexpressió.^[239] En definitiva podem dir que estem davant "d'un peix que es menja la cua": la biosíntesi de poliamines és activada per c-Myc, les poliamines indueixen la sobreexpressió de c-Myc i tant les poliamines com c-Myc donen lloc a la proliferació incontrolada de les cèl·lules i processos de tumorigènesi (Figura 1.41). Per tant, existeix un nexa d'unió directe entre aquests dos camins de desregulació del creixement cel·lular i tumorigènesi.

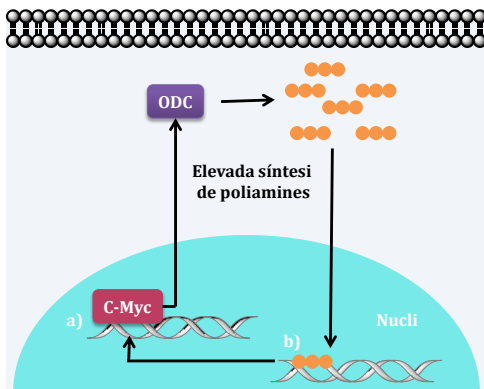


Figura 1.41. Representació esquemàtica del paper de a) c-Myc en la sobreexpressió d'ODC i b) les poliamines en la sobreexpressió de c-Myc.

Una de les estratègies seguides en el disseny de fàrmacs antitumorals és la utilització de derivats poliamínics que actuen a nivell metabòlic, com per exemple inhibint l'enzim ODC.^[240] D'altra banda, donades les característiques intrínseques de les poliamines, com ara la seua versatilitat sintètica, la seua basicitat, o la seua facilitada captació cel·lular, aquestes es consideren andamis idonis per a l'obtenció de compostos que interaccionen de manera selectiva amb una topologia concreta d'ADN, detenint així la proliferació incontrolada de les cèl·lules tumorals.^[241]

En el grup de Química Supramolecular de la Universitat de València s'ha adoptat aquesta última estratègia per al disseny de fàrmacs amb activitat antitumoral. Durant els últims anys, han sigut publicats pel grup nombrosos estudis en els quals s'ha demostrat el potencial de diversos lligands poliamínics per a interaccionar selectivament amb una topologia concreta d'ADN o ARN.^[242,243] Per exemple, el lligand Pytren funcionalitzat amb antracé (PytrenA) dóna lloc a respostes espectroscòpiques diferents segons el tipus d'àcid nucleic emprat (Figura 1.42a).^[244-246] Aportacions d'altres grups d'investigació en aquesta àrea també han demostrat l'habilitat de les poliamines per a estabilitzar l'ADN G4, com per exemple certes poliamines lineals funcionalitzades amb unitats aromàtiques (Figura 1.42b).

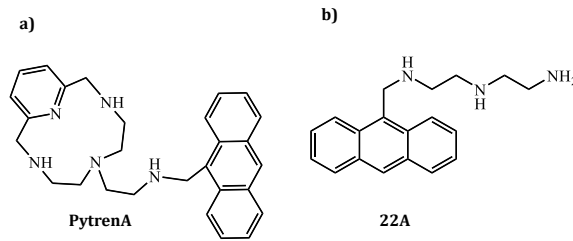


Figura 1.42. Estructura molecular de dos derivats poliamínics emprats en estudis d'interacció amb ADN.^[245-247]

De manera general, pareix que els compostos poliamínics posseeixen una gran tendència a unir-se a l'ADN. A més a més, s'ha comprovat que la interacció depèn fortament del grau de protonació de la poliamina estudiada.^[247-251] Altres estudis més exhaustius han demostrat que concentracions baixes de poliamines donen lloc a l'estabilització de l'ADN G4, mentre que concentracions altes produeixen la seua desnaturalització.^[252] Particularment, en aquesta tesi s'utilitzaran diferents derivats poliamínics com a cadenes laterals en la construcció de lligands-G4, per tal d'analitzar la influència tant del grau de protonació, com del disseny molecular en la interacció amb G4 (Figura 1.43).

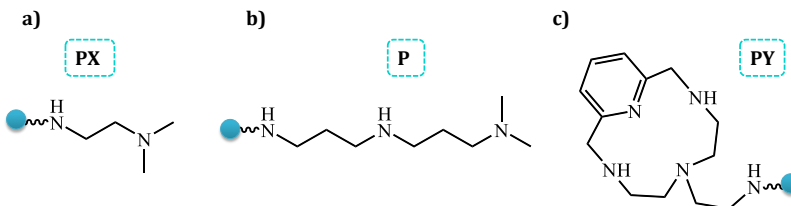


Figura 1.43. Estructura molecular dels derivats poliamínics emprats com a cadenes laterals en el disseny dels lligands d'aquesta tesi: a) PX, b) P i c) PY.

1.3.2. - Trifenilamina i trifenilbenzè com a motius centrals

La trifenilamina (TPA) i molts dels seus derivats són àmpliament utilitzats en aplicacions luminescents, com ara en el disseny de materials fotoelèctrics o de sensors fluorescents.^[253,254] Típicament, el TPA presenta una estructura helicoidal no plana, degut principalment a les repulsions estèriques generades entre els hidrògens dels anells aromàtics (Figura 1.44).^[255]

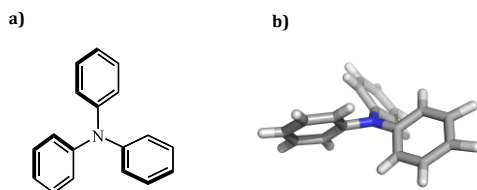


Figura 1.44. Esquema de la conformació espacial del TPA: a) estructura molecular i b) representació espacial realitzada amb el software PyMOL per Àlvar Martínez-Camarena.

Es tracta d'una molècula electró-dadora extremadament flexible, ja que els grups fenils es troben girant contínuament sobre l'eix central de l'amina, raó per la qual la desexcitació no radiativa d'aquesta molècula està afavorida.^[256] Aquest fet és precisament el causant d'una de les propietats més interessants del TPA: l'emissió causada per l'agregació (AIE, de l'anglès *Aggregation-Induced Emission*),^[257] de la qual es fa una descripció detallada al Capítol 5. Pel que fa a la versatilitat sintètica, el TPA resulta un andami estructural molt útil, ja que permet obtenir derivats, mono-, bi- o tri- funcionalitzats de manera més o menys senzilla. Així doncs, es poden dissenyar lligands que continguin un cor central amb propietats luminescents interessants, modulades segons l'elecció de les cadenes laterals.

En la bibliografia es poden trobar exemples de lligands basats en TPA com a sensors fluorescents d'ADN dúplex i G4. La majoria d'aquests són sistemes conjugats que en alguns casos donen lloc a un augment de fluorescència en presència de G4.^[258-261] D'entre ells, resulta de particular interès un treball recentment publicat per Teulade-Fichou i col·laboradors, en el qual dos derivats de TPA donen lloc a un augment de fluorescència considerable al interaccionar amb el solc menor de l'ADN dúplex. Utilitzant microscopia confocal multi-fotó es va poder observar com aquests derivats s'acumulaven al citoplasma de cèl·lules HeLa, principalment a les mitocondries. Posteriorment, al ser excitats amb una longitud d'ona adequada, es relocalitzaven en el nucli cel·lular ocasionant l'apoptosi cel·lular (Figura 1.45).^[262]

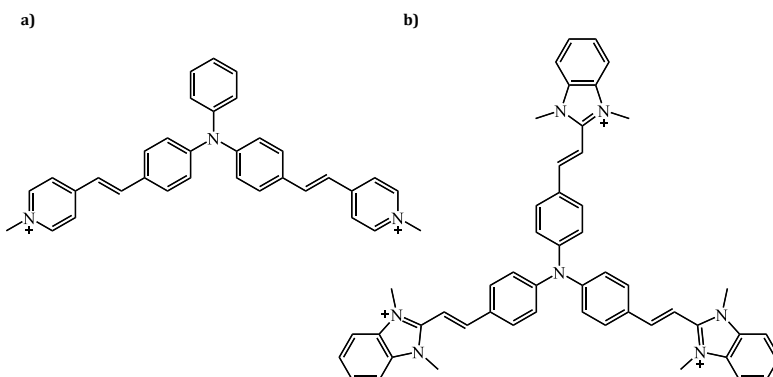


Figura 1.45. Estructura molecular dels derivats de TPA emprats en l'estudi de Teulade-Fichou: a) TP2Py i b) TP3Bzim.^[262]

Tanmateix, fins a la data no han sigut publicats lligands-G4 basats en TPA i poliamines. Per tant, en aquesta tesi doctoral s'aborda la combinació de les propietats luminescents del TPA amb els trets intrínsecs de les poliamines.

D'una banda es pretén estudiar l'efecte de la llargària de les poliamines lineals (P i PX), així com la substitució d'aquestes per una poliamina macrocíclica (PY). A més a més, en alguns dels lligands sintetitzats es substituirà el TPA per trifenilbenzè (TPB), amb l'objectiu analitzar també el paper del nucli central (Figura 1.46).

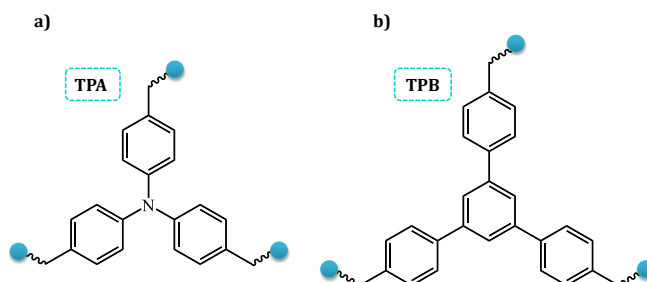


Figura 1.46. Estructura molecular dels motius centrals emprats en el disseny dels lligands-G4 d'aquesta tesi: a) TPA i b) TPB.

1.4. - Nanomedicina

Un cop discutit el disseny molecular de lligands-G4, el següent pas consisteix en considerar la seua captació cel·lular, la qual determinarà si realment són actius biològicament. En aquest context, *la regla dels 5* de Lipinski pot resultar molt útil, tot i que va ser inicialment ideada per al disseny de fàrmacs considerant la difusió passiva com a únic mecanisme d'entrada a la cèl·lula.^[263] Segons aquesta regla, només aquelles molècules que compliren certes premisses (massa molecular menor de 500 Daltons, coeficient de partició octanol-aigua amb un valor de $\text{Log } P < 5$, no més de 5 àtoms de hidrogen donadors i 10 àtoms d'hidrogen acceptors) tindrien associada una bona permeabilitat cel·lular. Avui dia, es coneix que la captació cel·lular depèn de molts altres factors i pot ocórrer via diferents mecanismes específics, com ara aquells que permeten el pas de macromolècules carregades o proteïnes hidrofòbiques a l'interior cel·lular mitjançant proteïnes transmembrana.^[264-266]

Per exemple, la difusió passiva de les poliamines naturals a través de la membrana cel·lular està dificultada degut a l'elevada energia que seria requerida per a forçar el seu pas per un medi hidrofòbic.^[267] No obstant, tenen l'habilitat de creuar les barreres cel·lulars, donat que la seua entrada està mediada per mecanismes de transport específics.^[241,264] De fet, en un estudi publicat per Cohen i col·laboradors als anys 90 es demostrava com un conegut fàrmac antitumoral (Clorambucil) tenia associada una major citotoxicitat al ser funcionalitzat amb espermina, el que es va relacionar amb una millora de la captació cel·lular gracies al sistema de transport de poliamines.^[268] Tanmateix, com s'ha mencionat abans, els processos pels quals els fàrmacs poden ser internalitzats en les cèl·lules depenen de molts factors, difícilment controlables. Conseqüentment, la captació cel·lular és en essència un paràmetre a determinar empíricament.

Com que els lligands-G4 estudiats en aquesta tesi són derivats poliamínic potencialment protonables a pH fisiològic, la seua internalització en les cèl·lules podria estar dificultada, reduint així la seua possible activitat terapèutica. Per aquest motiu es va recórrer a la nanomedicina, la qual ofereix les ferramentes necessàries per al disseny de nanovehicles que possibiliten el transport del lligands-G4 cap a l'interior cel·lular.

1.4.1. - La nanociència aplicada a la medicina

- "It would be interesting in surgery if you could swallow the surgeon. You put the mechanical surgeon inside the blood vessel and it goes into the heart and looks around"-

Així es com Richard Feynman en la seua ponència *There's plenty of room at the bottom*^[269] va introduir el que actualment es coneix com a Nanomedicina: l'aplicació de la nanociència i nanotecnologia al tractament, diagnòstic i prevenció de malalties i traumatismes. En aquest camp entren en joc les nanopartícules, que tenen associades característiques fisicoquímiques molt diferents als seus corresponents materials macroscòpics. A més a més, poden ser sintetitzades controlant el tamany, la forma i inclús la càrrega superficial. Fins i tot, poden ser funcionalitzades amb diverses molècules, obtenint així materials multifuncionals (Figura 1.47).^[270-272]

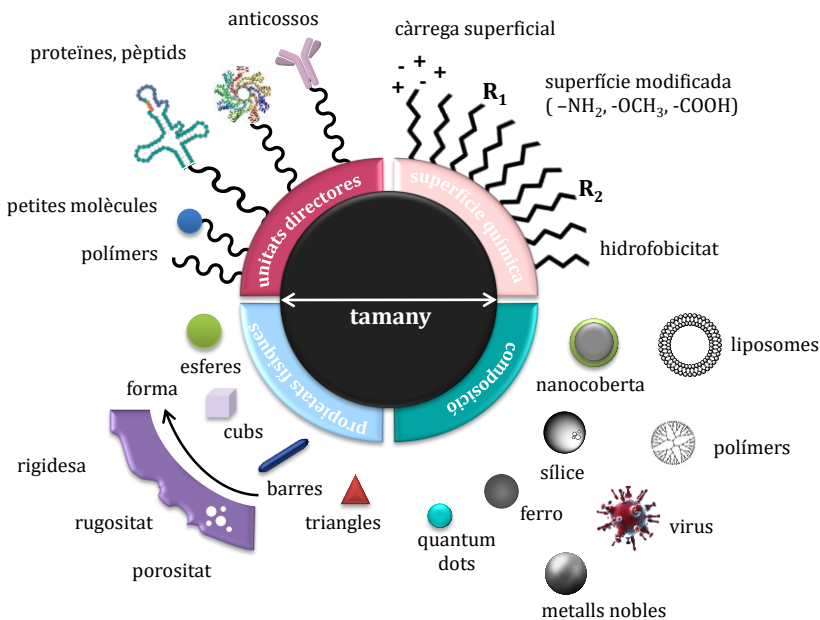


Figura 1.47. Representació esquemàtica de la versatilitat sintètica de les nanopartícules.

Avui dia existeix una ampla investigació centrada en el disseny de materials nanoestructurats amb potencials aplicacions biomèdiques. D'entre tots els tipus de nanopartícules estudiades es poden destacar les d'or,^[273] de plata,^[274-276] de magnetita^[277] i de boehmita,^[278] així com les vesícules polimèriques^[279] i els liposomes.^[280]

De fet, el primer fàrmac nanoestructurat que va ser aprovat clínicament per al tractament del càncer, conegut com Doxil®, consisteix en nanopartícules de tipus liposoma que contenen doxorubicina encapsulada en el seu interior.^[281] En l'actualitat existeixen més de 300 estudis oberts en relació al terme nanopartícula segons la pàgina web ClinicalTrials.gov. Tanmateix, sembla que per l'enorme volum d'aquesta àrea d'investigació, molts pocs sistemes nanoestructurats aconsegueixen realment passar les proves clíniques per a ser finalment comercialitzats.^[282]

Una nanopartícula ideal per a aplicacions biomèdiques haurà de tindre un tamany d'entre 10 a 200 nm, a banda de presentar una càrrega superficial el més neutra possible.^[283,284] A més a més, s'ha demostrat que la funcionalització de les nanopartícules amb molècules hidrofòbiques, com polietilenglicol (PEG), fa que aquestes passen desapercebudes pel reticle endoplasmàtic i el fetge.^[285,286] D'altra banda, existeixen dos estratègies sintètiques per a aconseguir que les nanopartícules assolisquen la seua diana terapèutica: el direccionament passiu i el direccionament actiu.^[272]

La primera estratègia mencionada fa referència als mecanismes pels quals les nanopartícules tendeixen a acumular-se en els teixits inflamats i vascularitzats, especialment mitjançant el procés conegut com EPR (de l'anglès *Enhancing Permeability and Retention*).^[287-289] Aquest efecte és una conseqüència directa de l'aparició de porus i la producció massiva de vasos sanguinis (vascularització) en eixos teixits. L'EPR fa que augmente el transport dinàmic de fluids i conseqüentment, la internalització de les nanopartícules que viatgen pel torrent sanguini. Així doncs, la funcionalització amb PEG també contribueix a l'efecte EPR, ja que s'afavoreix la recirculació de les nanopartícules. Un cop les nanopartícules arriben a les cèl·lules patògenes, existeixen diferents mecanismes endocitòtics pels quals poden ser internalitzades a través de la membrana cel·lular. Aquests depenen de molts diversos factors, com ara el tipus de cèl·lula, el tamany i la forma de la nanopartícula, i a més a més la flexibilitat i densitat dels seus lligands superficials (Figura 1.48a).^[290-292]

L'altra alternativa és el direccionament actiu, més conegut com *active targeting*, que consisteix en la funcionalització de les nanopartícules amb anticossos, pèptids, àcids nucleics o altres molècules que siguin capaces de dirigir les nanopartícules cap a un receptor específic sobreexpressat en les cèl·lules patògenes.^[272,291,293] El primer antecedent d'aquesta estratègia data del segle XIX, quan Paul Ehrlich va emprar el terme "bala màgica" per a fer referència a els fàrmacs específicament dissenyats per a viatjar cap a les cèl·lules diana.^[294]

De fet, sembla gairebé “màgic” que una nanopartícula funcionalitzada amb certa unitat directora siga capaç de dirigir-se únicament cap a un receptor situat en les cèl·lules patògenes, sense afectar a la resta de cèl·lules. Les implicacions d’aquest direccionament actiu de fàrmacs en malalties amb tractaments agressius, com ara el càncer, són clares: es minimitzarien els efectes secundaris en l’organisme i els protocols d’administració es simplificarien (Figura 1.48b).^[295,296]

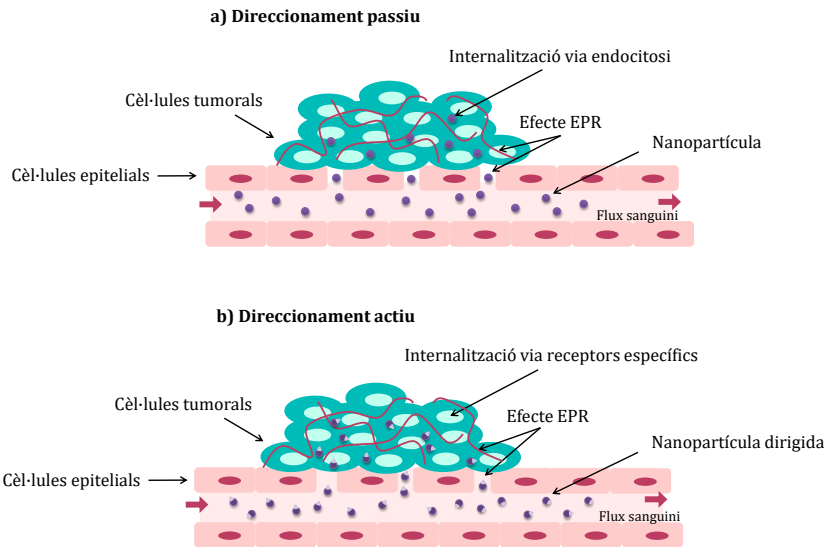


Figura 1.48. Representació dels dos mecanismes de direccionament de nanopartícules a) passiu i b) actiu. En ambdues s’il·lustra la vascularització dels teixits tumorals i l’efecte EPR.

En la literatura existeixen nombrosos exemples de com el direccionament actiu de nanopartícules dóna lloc a una acumulació en el lloc desitjat.^[297] Tanmateix, també existeixen estudis on s’ha obtingut el efecte contrari, és a dir, on no s’observa diferència entre el nanosistema funcionalitzat o no amb la unitat directora.^[298] En definitiva, encara queda un llarg camí per a trobar la “bala màgica” amb la que somiava Ehrlich. El que sí que és clar és que la nanomedicina ofereix nombrosos avantatges respecte a la medicina convencional. A banda de la multifuncionalitat o del direccionament, també dóna lloc a una major biodisponibilitat i eficàcia terapèutica, així com a un menor nombre d’efectes secundaris. Sense dubte, açò fa que la nanomedicina siga un camp de recerca molt ampli i actiu.^[299]

Les aplicacions de la nanomedicina són molt variades (Figura 1.49). Pel que fa a la teràpia, certes nanopartícules poden actuar per elles mateixes com a fàrmacs, gràcies a les seues propietats fisicoquímiques. Per exemple, les nanopartícules d'or poden ser emprades en teràpia fotodinàmica.^[300] D'altra banda, també poden emprar-se com a nanovehicles per a transportar fàrmacs a les seues corresponents dianes terapèutiques, augmentant així la seua biodisponibilitat i captació cel·lular.^[281] A més a més com s'ha comentat abans, és possible direccionar-les per a que transporten el fàrmac selectivament a les cèl·lules patògenes. En aquest cas s'utilitzen típicament nanopartícules basades en lípids o polímers, malgrat que també són utilitzades nanopartícules inorgàniques com d'or o magnetita. Aquest tipus de nanovehicles pot dissenyar-se amb un avantatge addicional: l'alliberament controlat del fàrmac com a resposta a un estímul intern, com un canvi de pH, o un estímul extern, com un feix de llum o un camp magnètic o elèctric.^[301]

L'aplicació de la nanomedicina al diagnòstic resulta també de particular interès. Els materials nanoestructurats, ja siga per la seua naturalesa intrínseca o per estar funcionalitzats, poden ser emprats com agents de contrast en tècniques tant òptiques, com magnètiques o radiatives. El seu ús sovint dóna lloc a una millora de la qualitat de les imatges obtingudes i a més a més, un mateix nanosistema pot ser dissenyat per a la seua aplicació en diferents tècniques d'imatge, obtenint així un agent de contrast multimodal. D'aquesta manera, es reuneix una major quantitat de informació complementaria durant el diagnòstic, el que serà de gran ajuda a l'hora de planificar el tractament de la malaltia.^[302,303]

L'última aplicació és la coneguda com nanomedicina teranòstica, que es tracta precisament de la unió entre la teràpia i el diagnòstic. La versatilitat sintètica de les nanopartícules fa possible que el mateix nanosuport pugui incloure tant agents terapèutics, com agents de diagnòstic, a banda de vectors directors que les dirigeixen cap a les corresponents dianes terapèutiques. El gran avantatge que presenten aquest tipus de nanopartícules és que permeten la monitorització de l'acció de l'agent terapèutic mitjançant tècniques de diagnòstic, el que ajuda a optimitzar els protocols d'administració i tractament. Actualment, la recerca centrada en el disseny d'agents teranòstics és molt amplia.^[304,305] Una de les nanopartícules que més ha atret l'atenció en aquest camp són les nanopartícules de tipus liposoma, que són les que s'empenen en aquesta tesi com a nanovehicles dels lligands-G4.

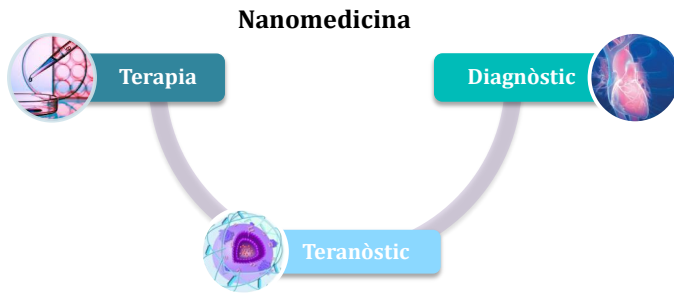


Figura 1.49. Esquematzació de les diferents aplicacions de la nanomedicina.

1.4.2. - Liposomes com a nanopartícules teranòstiques

La primera referència a liposomes data de l'any 1960, quan Alec Bangham va descobrir un "sistema fosfolipídic ample" mitjançant la visualització de lípids tenyits negativament amb un microscopi electrònic.^[306] Avui dia, els liposomes es defineixen com nanopartícules esfèriques de tamany entre 50 nm i 1 μM , compostes per una o més bicapes lipídiques concèntriques amb un interior aquós. Aquest tipus de vesícules tenen multitud d'aplicacions i es troben en diferents productes comercials que van des de fàrmacs,^[307] com l'anteriorment mencionat Doxil®, fins a cremes antiedat, com el Reti Age Serum de Sesderma®.

Els components bàsics dels liposomes són lípids i/o fosfolípids, ja siguin naturals o sintètics. Es tracta de molècules amfífiliques, és a dir, que contenen una part polar (cap hidrofílic) i una part apolar (cua hidrofòbica). Quan es troben en un medi aquós, aquestes molècules s'auto-ensamblen. Així es minimitza el contacte de les cues hidrofòbiques amb les molècules d'aigua de l'entorn i alhora, es maximitza el contacte entre els caps hidrofílics, originant així la forma esfèrica característica dels liposomes (Figura 1.50).^[308]

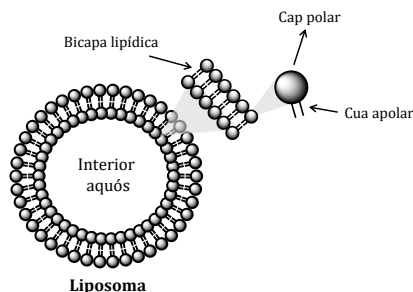


Figura 1.50. Representació esquemàtica de la composició d'un liposoma.

El fet de que els liposomes siguin tan interessants en el camp de la medicina deriva dels avantatges que presenten en comparació amb altres nanovehicles.^[309] En primera instància, els liposomes són biocompatibles, biodegradables i biològicament inerts. A més a més, poden transportar molècules tant hidrofòbiques, que es situen en la bicapa lipídica, com hidrofíliques, que queden encapsulades en el interior aquós. Altre punt a favor és que poden ser fàcilment funcionalitzats amb agents de contrast per tal d'obtenir nanopartícules teranòstiques, fent possible el tractament simultani al diagnòstic. Malgrat tots aquest avantatges, els liposomes tenen associada una limitada estabilitat i una baixa eficiència d'encapsulació. Per aquesta raó, actualment s'estan dissenyant els coneguts com liposomes de segona generació, amb l'objectiu d'optimitzar els protocols d'encapsulació i al mateix temps assolir un alliberament controlat del fàrmac.^[310,311]

Com es discutirà en capítols posteriors, alguns dels lligands-G4 sintetitzats durant aquesta tesi poden presentar una elevada càrrega positiva a pH fisiològic. Amb la finalitat de millorar la seua captació cel·lular i el seu efecte terapèutic, es realitzarà la seua encapsulació en nanopartícules de tipus liposoma (Figura 1.51). A més a més, els liposomes dissenyats contindran un derivat fosfolipídic fluorescent (DPPE-NBD) i un complex de gadolini (Gd-DTPA-DSA), el que permetrà la seua visualització mitjançant microscòpia confocal i ressonància magnètica d'imatge (RMI). Finalment, els liposomes es funcionalitzaran amb un aptàmer anomenat AS1411,^[312,313] el qual s'uneix de manera selectiva a la proteïna nucleolina. Aquesta proteïna es troba sobreexpressada en les cèl·lules tumorals, tant en la membrana citoplasmàtica, com en la nuclear, de manera que actua com a vehicle transportador entre ambdues. Així doncs, es pretén assolir un direccionament actiu cap al nucli, que és en definitiva on es troba la diana terapèutica dels lligands-G4.

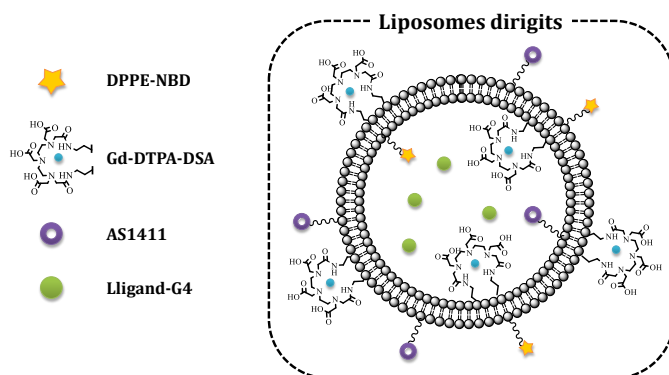


Figura 1.51. Representació del disseny dels liposomes dirigits emprats en aquesta tesi.

1.5. - Bibliografia

- [1] R. Dahm, *Dev. Biol.* **2005**, *278*, 274–288.
- [2] P. A. Levene, *J. Biol. Chem.* **1919**, *40*, 415–424.
- [3] E. Chargaff, *Experientia* **1950**, *6*, 201–209.
- [4] B. Maddox, *Rosalind Franklin: The Dark Lady of DNA*, Harper Collins, London, **2003**.
- [5] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [6] A. Sayre, *Rosalind Franklin and DNA*, Norton, New York, **1975**.
- [7] B. Maddox, *Nature* **2003**, *421*, 407–408.
- [8] R. R. Sinden, *DNA Structure and Function*, Elsevier, Texas, **2012**.
- [9] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, **2014**.
- [10] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger. Principles of Biochemistry*, Macmillan Higher Education, New York, **2013**.
- [11] T. M. Devlin, *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, Wiley, **2015**.
- [12] P. Yakovchuk, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 564–574.
- [13] D. W. Ussery, *DNA Structure: A-, B- and Z-DNA Helix Families*, Encyclopedia of Life Science **2002**.
- [14] G. Wang, K. M. Vasquez, *DNA Repair* **2014**, *19*, 143–151.
- [15] M. Kaushik, S. Kaushik, K. Roy, A. Singh, S. Mahendru, M. Kumar, S. Chaudhary, S. Ahmed, S. Kukreti, *Biochem. Biophys. Reports* **2016**, *5*, 388–395.
- [16] N. Saini, Y. Zhang, K. Usdin, K. S. Lobachev, *Biochimie* **2013**, *95*, 117–123.
- [17] D. Bikard, C. Loot, Z. Baharoglu, D. Mazel, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 570–588.
- [18] A. R. Chandrasekaran, D. A. Rusling, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 1021–1037.
- [19] H. Abou Assi, M. Garavís, C. González, M. J. Damha, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 8038–8056.
- [20] L. D. Langston, M. O'Donnell, *Mol. Cell* **2006**, *23*, 155–160.
- [21] P. M. J. Burgers, T. A. Kunkel, *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 417–438.
- [22] P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 30305–30309.
- [23] B. A. Pierce, *Genetics: A Conceptual Approach*, Freeman, New York, **2000**.
- [24] S. R. Eddy, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 919–929.
- [25] K. M. Weeks, *Biopolymers* **2015**, *103*, 438–448.
- [26] F. H. C. Crick, L. Barnett, S. Brenner, J. Watts-Tobin, *Nature* **1961**, *30*, 1227–1961.
- [27] S. Clancy, *Nat. Educ.* **2008**, *1*, 41.
- [28] S. Clanzly, W. Brown, *Nat. Educ.* **2008**, *1*, 101.

- [29] P. Charneau, G. Mirambeau, P. Roux, S. Paulous, H. Buc, F. Clavel, *J. Mol. Biol.* **1994**, *241*, 651–662.
- [30] Z. Tang, I. Hickey, *Nat. Educ.* **2014**, *5*, 1–2.
- [31] P. Nurse, *Cell* **2000**, *100*, 71–78.
- [32] Latest Global Cancer Data : www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf.
- [33] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal, *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424.
- [34] R. A. Weinberg, *The Nature of Cancer. In the Biology of Cancer*, Garland Science, New York, **2007**.
- [35] P. Peltomäki, *Exp. Cell Res.* **2012**, *318*, 299–310.
- [36] H. Chial, *Nat. Educ.* **2008**, *1*, 33.
- [37] Stratton MR, *Science* **2011**, *331*, 1553–1558.
- [38] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- [39] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- [40] I. Bang, *Biochem. Zeitschrift* **1910**, *26*, 293–311.
- [41] M. Gellert, M. N. Lipsett, D. R. Davies, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1962**, *48*, 2013–2018.
- [42] P. Tougard, J. F. Chantot, W. Guschlbauer, *Biochem. Biophys. Acta* **1973**, *308*, 9–16.
- [43] V. Sasisekhar, S. Zimmerman, D. R. Davies, *J. Mol. Biol.* **1975**, *92*, 171–179.
- [44] D. Sen, W. Gilbert, *Nature* **1988**, *334*, 364–366.
- [45] W. Guschlbauer, J. Chantot, D. Thiele, *J. Biom. Struc. Dynam.* **1990**, *8*, 491–511.
- [46] J. R. Williamson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 357–362.
- [47] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5402–5415.
- [48] C. C. Hardin, T. Watson, M. Corregan, C. Bailey, *Biochemistry* **1992**, *31*, 833–841.
- [49] D. Bhattacharyya, G. M. Arachchilage, S. Basu, *Front. Chem.* **2016**, *4*, 1–14.
- [50] S. Kolesnikova, M. Hubálek, L. Bednářová, J. Cvacka, E. A. Curtis, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 8684–8696.
- [51] J. Zhou, A. Bourdoncle, F. Rosu, V. Gabelica, J.-L. Mergny, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11002–11005.
- [52] D. J. Patel, *Nature* **2002**, *417*, 807–808.
- [53] M. A. Keniry, *Biopolymers* **2001**, *56*, 123–146.
- [54] S. Neidle, *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*, Elsevier, **2011**.
- [55] J. Gros, F. Rosu, S. Amrane, A. de Cian, V. Gabelica, L. Lacroix, J.-L. Mergny, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 3064–3075.
- [56] M. Kaushik, S. Kaushik, A. Bansal, S. Saxena, S. Kukreti, *Curr. Mol. Med.* **2011**, *11*, 744–769.
- [57] P. Hazel, J. Huppert, S. Balasubramanian, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16405–16415.

- [58] J. Li, J. J. Correia, L. Wang, J. O. Trent, J. B. Chaires, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4649–4659.
- [59] J. B. Chaires, *FEBS J.* **2010**, *277*, 1098–1106.
- [60] A. N. Lane, J. B. Chaires, R. D. Gray, J. O. Trent, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5482–5515.
- [61] C. C. Hardin, A. G. Perry, K. White, *Biopolymers* **2001**, *56*, 147–194.
- [62] J. L. Huppert, *Biochimie* **2008**, *90*, 1140–1148.
- [63] J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2908–2916.
- [64] J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 406–413.
- [65] A. K. Todd, M. Johnston, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2901–2907.
- [66] V. K. Yadav, J. K. Abraham, P. Mani, R. Kulshrestha, S. Chowdhury, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, D381–D385.
- [67] V. Scaria, M. Hariharan, A. Arora, S. Maiti, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W683–W685.
- [68] O. Kikin, L. D. Antonio, P. S. Bagga, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W676–W682.
- [69] S. K. Mishra, A. Tawani, A. Mishra, A. Kumar, *Nat. Sci. Reports* **2016**, *6*, 38144.
- [70] A. Bedrat, L. Lacroix, J.-L. Mergny, *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 1746–1759.
- [71] C. K. Kwok, C. J. Merrick, *Trends Biotechnol.* **2017**, *35*, 997–1013.
- [72] G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 182–186.
- [73] A. Henderson, Y. Wu, Y. C. Huang, E. A. Chavez, J. Platt, F. B. Johnson, R. M. B. Jr, D. Sen, P. M. Lansdorp, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 860–869.
- [74] G. Biffi, M. Di Antonio, D. Tannahill, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2013**, *6*, 75–80.
- [75] D. L. Ma, Z. Zhang, M. Wang, L. Lu, H. J. Zhong, C. H. Leung, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 812–828.
- [76] B. R. Vummidi, J. Alzeer, N. W. Luedtke, *ChemBioChem.* **2013**, *14*, 540–558.
- [77] T. Tseng, Z. Wang, C. Chien, T. Chang, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 10605–10618.
- [78] A. Shivalingam, M. A. Izquierdo, A. L. Marois, A. Vyšniauskas, K. Suhling, M. K. Kuimova, R. Vilar, *Nat. Commun.* **2015**, 8178.
- [79] E. Yi, N. Lam, D. Beraldi, D. Tannahill, S. Balasubramanian, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1796.
- [80] R. Hänsel-hertsch, D. Beraldi, S. V Lensing, G. Marsico, K. Zyner, A. Parry, M. Di Antonio, J. Pike, H. Kimura, M. Narita, D. Tannahill, S. Balasubramanian, *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 1267–1275.
- [81] R. Rodriguez, K. M. Miller, J. V Forment, C. R. Bradshaw, M. Nikan, S. Britton, T. Oelschlaegel, B. Xhemalce, S. P. Jackson, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 301–310.

- [82] E. Zorzan, R. Elgendy, M. Giantin, M. Dacasto, C. Sissi, *Nat. Sci. Rep.* **2018**, *8*, 17107.
- [83] V. S. Chambers, G. Marsico, J. M. Boutell, M. Di Antonio, G. P. Smith, S. Balasubramanian, *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 877–881.
- [84] H. J. Lipps, D. Rhodes, *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 414–422.
- [85] P. Sarkies, C. Reams, L. J. Simpson, J. E. Sale, *Mol. Cell* **2010**, *40*, 703–713.
- [86] S. De, F. Michor, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 950–955.
- [87] P. Murat, S. Balasubramanian, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2014**, *25*, 22–29.
- [88] D. Rhodes, H. J. Lipps, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 8627–8637.
- [89] T. Tian, Y. Chen, S. Wang, X. Zhou, *Chem.* **2018**, *4*, 1–31.
- [90] E. H. Blackburn, *Nature* **1991**, *350*, 569–573.
- [91] H. J. Muller, *Collect. Net* **1938**, *13*, 181–198.
- [92] R. J. O. Sullivan, J. Karlseder, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 171–181.
- [93] V. A. Zakian, *Exp. Cell Res* **2012**, *318*, 1456–1460.
- [94] T. de Lange, *Science* **2009**, *326*, 948–953.
- [95] J. D. Griffith, L. Comeau, S. Rosenfield, R. M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, T. de Lange, *Cell* **1999**, *97*, 503–514.
- [96] T. de Lange, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 323–329.
- [97] T. de Lange, *Genes Dev.* **2005**, *19*, 2100–2110.
- [98] R. J. Wellinger, *Mol. Cell* **2014**, *53*, 855–856.
- [99] K. E. Huffman, S. D. Levene, V. M. Tesmer, J. W. Shay, W. E. Wright, *Biol. Chem.* **2000**, *275*, 19719–19722.
- [100] A. Hayflick, *Exp. Cell Res.* **1965**, *37*, 614–636.
- [101] J. W. Shay, W. E. Wright, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 72–76.
- [102] C. M. Counter, A. A. Avilion, C. E. Lefevrel, N. G. Stewart, C. W. Greider, C. B. Harley, S. Bacchetti, *EMBO J.* **1992**, *11*, 1929–1992.
- [103] J. Campisi, F. di Fagagna, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 729–740.
- [104] J. W. Shay, W. E. Wright, *J. Pathol.* **2007**, *211*, 114–123.
- [105] M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer, C. Lo, *Cell* **2013**, *123*, 1194–1217.
- [106] M. A. Blasco, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 640–649.
- [107] S. Kim, P. Kaminker, J. Campisi, *Oncogene* **2002**, *21*, 503–511.
- [108] M. Serrano, M. A. Blasco, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 715–722.
- [109] J. Maciejowski, T. de Lange, *Nat. Publ. Gr.* **2017**, *18*, 175–186.
- [110] F. Fyhrquist, O. Saijonmaa, T. Strandberg, *Nat. Rev. Cardiol.* **2013**, 1–10.
- [111] R. Farzaneh-Far, J. Lin, E. Epel, K. Lapham, E. Blackburn, M. A. Whooley, *PLoS One* **2010**, *5*, e8612.
- [112] E. Reback, D. Masterman, J. L. Cummings, R. B. Effros, *Neurobiol. Aging* **2003**, *24*, 77–84.
- [113] S. Franco, M. A. Blasco, S. L. Siedlak, P. L. R. Harris, P. I. Moreira, G. Perry, M. A. Smith, *Alzheimer's Dement.* **2006**, *2*, 164–168.
- [114] J. Lin, E. Epel, E. Blackburn, *Mutat. Res.* **2012**, *730*, 85–89.
- [115] E. H. Blackburn, E. S. Epel, J. Lin, *Science* **2015**, *350*, 1193–1198.
- [116] E. S. Epel, E. H. Blackburn, J. Lin, F. S. Dhabhar, N. E. Adler, J. D. Morrow, R. M. Cawthon, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 17312–17315.

- [117] M. F. Haussmann, B. J. Heidinger, *Biol. Lett.* **2015**, *11*, 1–7.
- [118] J. L. Tarry-Adkins, M. S. Martin-Gronert, D. S. Fernandez-Twinn, I. Hargreaves, M. Z. Alfaradhi, J. M. Land, C. E. Aiken, S. E. Ozanne, *FASEB J.* **2013**, *27*, 379–390.
- [119] M. A. Blasco, M. G. Salomone, *Morir joven, a los 140*, Paidós, Madrid, **2016**.
- [120] E. H. Blackburn, E. Epel, *The Telomere Effect*, Grand Central Publishing, **2017**.
- [121] C. W. Greider, E. H. Blackburn, **1985**, *43*, 405–413.
- [122] J. Jiang, Y. Wang, H. Chan, R. Basu, L. Su, Z. H. Zhou, J. Feigon, *Cell* **2018**, *173*, 1179–1190.
- [123] A. Bianchi, D. Shore, *Mol. Cell.* **2008**, *25*, 153–165.
- [124] J.-L. Mergny, J. Riou, P. Mailliet, M.-P. Teulade-Fichou E. Gilson, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 839–865.
- [125] C. W. Greider, *Genes Dev.* **2016**, *30*, 1483–1491.
- [126] N. W. Kim, M. A. Piatyszczek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. C. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, J. W. Shay, *Science* **1994**, *266*, 2011–2016.
- [127] C. B. Harley, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 167–179.
- [128] M. A. Jafri, S. A. Ansari, M. H. Alqahtani, J. W. Shay, *Genome Med.* **2016**, *8*, 1–18.
- [129] S. Neidle, G. Parkinson, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 303–393.
- [130] E. Henderson, C. C. Hardin, S. K. Walk, I. J. Tinoco, E. H. Blackburn, *Cell* **1987**, *51*, 899–908.
- [131] R. Hänsel-Hertsch, D. Beraldi, S. V. Lensing, G. Marsico, K. Zyner, A. Parry, M. di Antonio, J. Pike, H. Kimura, M. Narita, D. Tannahill, S. Balasubramanian, *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 1267–1272.
- [132] S. Selvam, D. Koirala, Z. Yu, H. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13967–13970.
- [133] T. A. Brooks, S. Kendrick, L. Hurley, *FEBS J.* **2010**, *277*, 3459–3469.
- [134] S. Balasubramanian, L. H. Hurley, S. Neidle, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 261–275.
- [135] D. Yang, L. H. Hurley, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2006**, *25*, 951–968.
- [136] T. Simonsson, P. Pecinka, M. Kubista, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1167–1172.
- [137] S. Rankin, A. P. Reszka, J. Huppert, M. Zloh, G. N. Parkinson, A. K. Todd, S. Ladame, S. Balasubramanian, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10584–10589.
- [138] H. Fernando, A. P. Reszka, J. Huppert, S. Ladame, S. Rankin, A. R. Venkitaraman, S. Neidle, S. Balasubramanian, *Biochemistry* **2006**, *45*, 7854–7860.
- [139] T. S. Dexheimer, D. Sun, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5404–5415.

- [140] J. Dai, D. Chen, R. A. Jones, L. H. Hurley, D. Yang, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5133–5144.
- [141] C. V. Dang, K. A. O. Donnell, K. I. Zeller, T. Nguyen, R. C. Osthus, F. Li, *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 253–264.
- [142] Y. Zhao, D. Cheng, S. Wang, J. Zhu, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 10385–10398.
- [143] V. González, L. H. Hurley, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 111–129.
- [144] A. Tua, Y. S. Modi, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8710–8716.
- [145] T. Ou, Y. Lu, C. Zhang, Z. Huang, X. Wang, J. Tan, Y. Chen, D. Ma, K. Wong, J. Tang, A. Chan, L. Gu *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1465–1474.
- [146] L. H. Hurley, D. D. von Hoff, A. Siddiqui-Jain, D. Yang, *Semin. Oncol.* **2006**, *1*, 498–512.
- [147] J. Seenisamy, E. M. Rezler, T. J. Powell, D. Tye, V. Gokhale, C. S. Joshi, A. Siddiqui-Jain, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8702–8709.
- [148] A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 11593–11598.
- [149] A. T. Phan, V. Kuryavyi, S. Burge, S. Neidle, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4386–4392.
- [150] S. D. Hsu, P. Varnai, A. Bugaut, A. P. Reszka, S. Neidle, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13399–13409.
- [151] Y. Yarden, W. Kuang, T. Yang-Feng, L. Coussens, S. Munemitsu, T. J. Dull, E. Chen, J. Schlessinger, U. Francke, A. Ullrich, *EMBO J.* **1987**, *6*, 3341–3351.
- [152] S. Ali, S. Ali, *Gene* **2007**, *401*, 38–45.
- [153] L. K. Ashman, R. Griffith, *Exp. Op. Invest. Drugs* **2013**, *22*, 103–115.
- [154] P. S. Shirude, B. Okumus, L. Ying, T. Ha, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7484–7485.
- [155] K. I. E. Mcluckie, A. E. Waller, D. A. Sanders, D. Alves, J. Dash, G. J. Mckenzie, A. R. Venkitaraman, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2658–2663.
- [156] J. Dai, T. S. Dexheimer, D. Chen, M. Carver, A. Ambrus, R. A. Jones, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1096–1098.
- [157] D. T. Chao, S. J. Korsmeyer, *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 395–419.
- [158] J. M. Adams, S. Cory, *Oncogene* **2007**, *26*, 1324–1337.
- [159] P. Sengupta, S. Chattopadhyay, S. Chatterjee, *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 1165–1186.
- [160] J. Amato, A. Pagano, D. Capasso, S. di Gaetano, M. Giustiniano, E. Novellino, A. Randazzo, B. Pagano, *ChemMedChem* **2018**, *13*, 406–410.
- [161] M. M. Fay, S. M. Lyons, P. Ivanov, *J. Mol. Biol.* **2017**, *429*, 2127–2147.
- [162] G. W. Collie, S. M. Haider, S. Neidle, G. N. Parkinson, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 5569–5580.
- [163] O. Mendoza, M. Porrini, G. F. Salgado, V. Gabelica, J.-L. Mergny, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 6732–6739.
- [164] J. Beaudoin, J. Perreault, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 5898–5911.

- [165] D. Gomez, A. Guedin, J.-L. Mergny, B. Salles, J. Riou, M.-P. Teulade-Fichou, P. Calsou, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 7187–7198.
- [166] R. Shahid, A. Bugaut, S. Balasubramanian, *Biochemistry* **2010**, *49*, 8300–8306.
- [167] H. Martadinata, B. Heddi, K. W. Lim, A. Phan, *Biochemistry* **2011**, *50*, 6455–6461.
- [168] C. K. Kwok, G. Marsico, A. B. Sahakyan, V. S. Chambers, S. Balasubramanian, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 841–844.
- [169] J. U. Guo, D. P. Bartel, *Science* **2016**, *353*, aaf5371.
- [170] A. Cammas, S. Millevoi, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 1584–1595.
- [171] J. Tan, L. Gu, J. Wu, *Mini-Reviews Med. Chem.* **2008**, *8*, 1163–1178.
- [172] D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 627–636.
- [173] S. N. Georgiades, N. H. Abd Karim, K. Suntharalingam, R. Vilar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4020–4034.
- [174] S. Chan, T. Jia-Heng, O. Tian-Miao, H. Zhi-Shu, *Sci. Chin. Chem.* **2013**, *56*, 1351–1363.
- [175] S. Neidle, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5987–6011.
- [176] Q. Cao, Y. Li, E. Freisinger, P. Z. Qin, R. Sigel, Z. Mao, *Inorg. Chem. Front.* **2017**, *4*, 10–32.
- [177] S. Neidle, *Nature* **2017**, *1*, 1–10.
- [178] J.- M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 89–112.
- [179] A. Bianchi, K. Bowman-James, E. García-España, *Supramolecular Chemistry of Anions*, Wiley-VCH, New York, **1997**.
- [180] J. W. Steed, P. A. Gale, *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, John Wiley & Sons, Ltd, **2012**.
- [181] A. Maehle, *Endeavour* **2009**, *33*, 135–140.
- [182] E. Fisher, *Chem. Ges. Ber.* **1894**, *27*, 2985–2993.
- [183] E. Koshland, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1958**, *44*, 98–104.
- [184] D. Drygin, A. Siddiqui-Jain, S. O. Brien, M. Schwaebe, A. Lin, J. Bliesath, C. B. Ho, C. Proffitt, K. Trent, J.P. Whitten, J. K. C. Lim, D. von Hoff, K. Anderes, W. G. Rice, *Cancer Res.* **2009**, *69*, 7653–7661.
- [185] H. Xu, M. di Antonio, S. Mckinney, V. Mathew, B. Ho, N. J. O. Neil, N. Dos Santos, J. Silvester, V. Wei, J. Garcia, F. Kabeer, D. Lai, P. Soriano, J. Banath, D.S. Chiu, D. Yap, D. D. Le, F. B. Ye, A. Zhang, K. Thu, J. Soong, S. Lin, A. Tsai, T. Osako, T. Algara, D. N. Saunders, J. Wong, J. Xian, M. B. Bally, J.D. Brenton, G. W. Brown, S. P. Shah, D. Cescon, T. W. Mak, C. Caldas, P. C. Stirling, P. Hieter, S. Balasubramanian, S. Aparicio, *Nature* **2017**, *8*, 14432.
- [186] D. Sun, B. Thompson, B. E. Cathers, M. Salazar, S. M. Kerwin, J. O. Trent, T. C. Jenkins, S. Neidle, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2113–2116.
- [187] P. J. Perry, A. P. Reszka, A. A. Wood, M. A. Read, S. M. Gowan, H. S. Dosanjh, J. O. Trent, T. C. Jenkins, L. R. Kelland, S. Neidle, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4873–4884.

- [188] P. J. Perry, S. M. Gowan, A. P. Reszka, P. Polucci, T. C. Jenkins, L. R. Kelland, S. Neidle, *J. Med. Chem.* **1998**, 3253–3260.
- [189] G. Zagotto, A. Ricci, E. Vasquez, A. Sandoli, S. Benedetti, M. Palumbo, C. Sissi, *Bioconjug. Chem.* **2011**, 22, 2126–2135.
- [190] M. A. Read, S. Neidle, *Biochemistry* **2000**, 39, 13422–13432.
- [191] V. P. Zambre, P. R. Murumkar, R. Giridhar, M. R. Yadav, *J. Mol. Graph. Model.* **2010**, 29, 229–239.
- [192] R. J. Harrison, S. M. Gowan, L. R. Kelland, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2463–2468.
- [193] S. M. Haider, G. N. Parkinson, S. Neidle, *J. Mol. Biol.* **2003**, 326, 117–125.
- [194] S. Ladame, J. A. Schouten, J. Stuart, J. Roldan, S. Neidle, S. Balasubramanian, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2925–2931.
- [195] N. H. Campbell, M. Patel, A. B. Tofa, R. Ghosh, G. N. Parkinson, S. Neidle, *Biochemistry* **2009**, 48, 1675–1680.
- [196] M. J. B. Moore, C. M. Schultes, J. Cuesta, F. Cuenca, M. Gunaratnam, F. A. Tanious, W. D. Wilson, S. Neidle, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 582–599.
- [197] M. Read, R. J. Harrison, B. Romagnoli, F. A. Tanious, S. H. Gowan, A. P. Reszka, W. D. Wilson, L. R. Kelland, S. Neidle, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 4844–4849.
- [198] N. H. Campbell, G. N. Parkinson, A. P. Reszka, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6722–6724.
- [199] N. V. Anantha, M. Azam, R. D. Sheardy, *Biochemistry* **1998**, 37, 2709–2714.
- [200] F. X. Han, R. T. Wheelhouse, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3561–3570.
- [201] J. Ren, J. B. Chaires, *Biochemistry* **1999**, 38, 16067–16075.
- [202] C. L. Grand, H. Han, M. Muñoz, S. Weitman, D. D. Von Hoff, L. H. Hurley, D. J. Bearss, *Mol. Canc. Ther.* **2002**, 1, 565–573.
- [203] P. Wang, L. Ren, H. He, F. Liang, X. Zhou, Z. Tan, *ChemBioChem.* **2006**, 7, 1155–1159.
- [204] D. Shi, R. T. Wheelhouse, D. Sun, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 4509–4523.
- [205] G. Dna, T. L. Ruan, S. J. Davis, B. M. Powell, C. P. Harbeck, J. Habdas, P. Habdas, L. A. Yatsunyk, *Biochimie* **2017**, 132, 121–130.
- [206] M. Kim, H. Vankayalapati, K. Shin-Ya, K. Wierzba, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2098–2099.
- [207] T. Tauchi, G. Sashida, M. Sumi, S. Okabe, J. H. Ohyashiki, K. Ohyashiki, *Oncogene* **2006**, 25, 5719–5725.
- [208] N. Binz, T. Shalaby, P. Rivera, K. Shin-Ya, M. A. Grotzer, *Eur. J. Cancer* **2005**, 41, 2873–2881.
- [209] M. Tera, H. Ishizuka, M. Takagi, M. Suganuma, K. Shin-Ya, K. Nagasawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 5557–5560.
- [210] C. M. Barbieri, A. R. Srinivasan, S. G. Rzuczek, J. E. Rice, E. J. Lavoie, D. S. Pilch, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 3272–3286.

- [211] Y. Long, Z. Li, J. Tan, T. Ou, D. Li, L. Gu, Z. Huang, *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 1821–1831.
- [212] V. Caprio, B. Guyen, Y. Opoku-Boahen, J. Mann, S. M. Gowan, L. M. Kelland, M. A. Read, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2063–2066.
- [213] J. Zhou, Y. Lu, T. Ou, J. Zhou, Z. Huang, X. Zhu, C. Du, X. Bu, L. Ma, L. Gu, Y. Li, A. Chan, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7315–7321.
- [214] T. Ou, J. Lin, Y. Lu, J. Hou, J. Tan, S. Chen, Z. Li, Y. Li, D. Li, L. Gu, Z. Huang, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5671–5679.
- [215] E. Izbicka, R. T. Wheelhouse, E. Raymond, K. K. Davidson, R. A. Lawrence, D. Sun, B. E. Windle, L. H. Hurley, D. D. Von Hoff, *Cancer Cell* **1999**, *59*, 639–644.
- [216] I. M. Dixon, F. Lopez, A. M. Tejera, J.-P. Esteve, M. A. Blasco, G. Pratviel, B. Meunier, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1502–1503.
- [217] I. M. Dixon, F. Lopez, J.-P. Esteve, A. M. Tejera, M. A. Blasco, G. Pratviel, B. Meunier, *ChemBioChem.* **2005**, *6*, 123–132.
- [218] I. H. Wasbotten, T. Wondimagegn, A. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8104–8116.
- [219] Z. Gershman, I. Goldberg, Z. Gross, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *119*, 4398–4402.
- [220] B. Fu, D. Zhang, X. Weng, M. Zhang, H. Ma, Y. Ma, X. Zhou, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 9431–9441.
- [221] Z. Zhang, J. Wen, B. Lv, X. Li, X. Ying, Y. Wang, H. Zhang, H. Wang, H. Liua, C.-K. Chang, *Appl. Organomet. Chem.* **2016**, *30*, 132–139.
- [222] R. Kiełtyka, J. Fakhoury, N. Moitessier, H. F. Sleiman, *Chem. Eur. J.* **2008**, 1145–1154.
- [223] J. Wang, X. Zheng, Q. Xia, Z. Mao, L. Ji, K. Wang, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 7214–7216.
- [224] C. Rajput, R. Rutkaite, L. Swanson, I. Haq, J. A. Thomas, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4611–4619.
- [225] T. Wilson, P. Williamson, J. A. Thomas, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2617–2621.
- [226] J. E. Reed, A. Arola-Arnal, S. Neidle, R. Vilar, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5992–5993.
- [227] A. Arola-Arnal, J. Benet-Buchholz, S. Neidle, R. Vilar, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 11910–11919.
- [228] N. H. A. Karim, O. Mendoza, A. Shivalingam, A. J. Thompson, S. Ghosh, M. K. Kuimova, R. Vilar, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 3355–3363.
- [229] V. Rakers, P. Cadinu, J. B. Edel, R. Vilar, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 3459–3469.
- [230] S. S. Cohen, *A Guide to the Polyamines*, Oxford University Press, New York, **1998**.
- [231] H. M. Wallace, A. V Fraser, A. Hughes, *Biochem. J.* **2003**, *376*, 1–14.
- [232] L. Miller-Fleming, V. Olin-Sandoval, K. Campbell, M. Ralser, *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 3389–3406.
- [233] T. Thomas, T. J. Thomas, *Cell Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 244–258.

- [234] R. A. Casero Jr, L. J. Marton, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 373–390.
- [235] E. W. Gerner, F. L. Meyskens Jr, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 781–792.
- [236] S. L. Nowotarski, P. M. Woster, R. A. Casero Jr, *Expert Rev. Molt. Med.* **2014**, *15*, 1–28.
- [237] L. M. Shantz, V. A. Levin, *Amino Acids* **2007**, *33*, 213–223.
- [238] C. Bello-Fernandez, G. Packham, J. L. Cleveland, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 7804–7808.
- [239] N. Kumar, R. Basundra, S. Maiti, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 3321–3331.
- [240] C. E. Weeks, A. L. Herrmann, F. R. Nelson, T. J. Slaga, *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, *79*, 6028–6032.
- [241] A. J. Palmer, H. M. Wallace, *Amino Acids* **2010**, *38*, 415–422.
- [242] N. Lomadze, E. Gogritchiani, H.-J. Schneider, M. T. Albelda, J. Aguilar, E. García-España, S.V. Luis, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7801–7803.
- [243] N. Lomadze, H.-J. Schneider, M. T. Albelda, E. García-España, B. Verdejo, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1755–1759.
- [244] B. Verdejo, A. Ferrer, S. Blasco, C. E. Castillo, J. González, J. Latorre, M. A. Máñez, M. G. Basallote, C. Soriano, E. García-España, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 5707–5719.
- [245] M. Inclán, M. T. Albelda, J. C. Frías, S. Blasco, B. Verdejo, C. Serena, C. Salat-Canela, M. L. Díaz, A. García-España, E. García-España, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9644–9656.
- [246] M. Inclán, L. Guijarro, I. Pont, J. C. Frías, C. Rotger, F. Orvay, A. Costa, E. García-España, M. T. Albelda, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 15966–15973.
- [247] R. Rodriguez, G. D. Pantos, D. P. N. Gonçalves, J. K. M. Sanders, S. Balasubramanian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *119*, 5501–5503.
- [248] M. Franceschin, C. M. Lombardo, E. Pascucci, D. d'Ambrosio, E. Micheli, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2292–2304.
- [249] M. A. Keniry, *FEBS Lett.* **2003**, *542*, 153–158.
- [250] J. Carvalho, J. Ferreira, P. Pereira, E. Coutinho, A. Guédin, P. Nottelet, G. F. Salgado, J.-L. Mergny, J. A. Queiroz, F. Sousa, E. J. Cabrita, C. Cruz, *Tetrahedron* **2016**, *72*, 1229–1237.
- [251] E. Micheli, C. M. Lombardo, D. d'Ambrosio, M. Franceschin, S. Neidle, M. Savino, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3903–3908.
- [252] H. Sun, J. Xiang, Y. Liu, L. Li, Q. Li, G. Xu, Y. Tang, *Biochimie* **2011**, *93*, 1351–1356.
- [253] P. Cias, C. Slugovc, G. Gescheidt, *J. Phys. Chem.* **2011**, *115*, 14519–14525.
- [254] J. Wang, C. He, P. Wu, J. Wang, C. Duan, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12402–12405.
- [255] I. Reva, L. Lapinski, N. Chattopadhyay, R. Fausto, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 3844–3850.
- [256] A. K. Mandal, M. Suresh, P. Das, A. Das, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 3906–3917.
- [257] J. Mei, Y. Hong, J. W. Y. Lam, A. Qin, Y. Tang, B. Z. Tang, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 5429–5479.

- [258] H. Lai, Y. Xiao, S. Yan, F. Tian, C. Zhong, Y. Liu, X. Weng, X. Zhou, *Analyst* **2014**, *139*, 1834–1838.
- [259] M. Wang, L. Gao, Y. Yang, X. Xiong, Z. Zheng, S. Li, Y. Wu, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 5042–5046.
- [260] B. Dumat, E. Faurel-Paul, P. Fornarelli, N. Saettel, G. Metgé, C. Fiorini-Debuisschert, F. Charra, F. Mahuteau-Betzer, M.-P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 358–370.
- [261] M. Wang, Z. Wang, Y. Yang, G. Ren, X. Liu, S. Li, J. Wei, L. Zhang, *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58*, 3296–3300.
- [262] R. Chennoufi, H. Bougherara, N. Gagey-Eilstein, B. Dumat, E. Henry, F. Subra, S. Bury-Moné, F. Mahuteau-Betzer, P. Tauc, M.-P. Teulade-Fichou, E. Deprez, *Nature* **2016**, *6*, 21458.
- [263] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- [264] P. D. Dobson, D. B. Kell, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 205–220.
- [265] D. B. Kell, S. G. Oliver, *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 1–32.
- [266] A. Mullard, *Nature* **2018**, *17*, 777.
- [267] A. Parsegian, *Nature* **1969**, *221*, 844–846.
- [268] J. L. Holley, A. Mather, R. T. Wheelhouse, P. M. Cullis, J. A. Hartley, J. P. Bingham, G. M. Cohen, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4190–4195.
- [269] Richard P. Feynman, *Eng. Sci.* **1960**, *23*, 22–36.
- [270] V. Wagner, A. Dullaart, A. Bock, A. Zweck, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1211–1217.
- [271] R. A. Freitas Jr, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2005**, *1*, 2–9.
- [272] V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 813–827.
- [273] E. Boisselie, D. Astruc, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1759–1782.
- [274] L. Ge, Q. Li, M. Wang, J. Ouyang, X. Li, M. M. Xing, *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *4*, 2399–2407.
- [275] P. Gisbert-Quilis, M. Masetti, J. Morla-Folch, J. M. Fitzgerald, N. Pazos-Perez, E. Garcia-Rico, V. Giannini, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *Adv. Mat. Interfaces* **2017**, *4*, 1700724.
- [276] J. Morla-Folch, H. Xie, P. Gisbert-Quilis, S. G. Pedro, N. Pazos-Perez, R. A. Alvarez-Puebla, L. Guerrini, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *127*, 13854–13858.
- [277] G. Liu, J. Gao, H. Ai, X. Chen, *Small* **2013**, *9*, 1533–1545.
- [278] Á. Martínez-Camarena, E. Delgado-Pinar, C. Soriano, J. Alarcón, J. M. Llinares, R. Tejero, E. García-España, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 3871–3874.
- [279] M. Elsbahy, K. L. Wooley, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2545–2561.
- [280] V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 145–160.
- [281] Y. Zhang, H. F. Chan, K. Leong, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 104–120.
- [282] R. Juliano, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 171–172.
- [283] N. Doshi, S. Mitragotri, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3843–3854.
- [284] S. Stolnik, I. Illum, S. S. Davis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16*, 195–214.

- [285] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, L. M. Ensign, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, 99, 28–51.
- [286] V. Jokerst, J. T. Lobovkina, R. N. Zare, S. S. Gambhir, *Nanomedicine* **2011**, 6, 715–728.
- [287] J. W. Nichols, Y. H. Bae, *J. Control. Release* **2014**, 190, 451–464.
- [288] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O. C. Farokhzad, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, 66, 2–25.
- [289] H. Maeda, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, 91, 3–6.
- [290] G. Sahay, D. Y. Alakhova, A. V. Kabanov, *J. Control. Release* **2010**, 145, 182–195.
- [291] R. A. Petros, J. M. DeSimone, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 615–627.
- [292] J. Mosquera, I. García, L. M. Liz-Marzán, *Acc. Chem. Res.* **2018**, 51, 2305–2313.
- [293] R. van der Meel, L. J. C. Vehmeijer, R. J. Kok, G. Storm, E. V. B. van Gaal, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65, 1284–1298.
- [294] K. Strebhardt, A. Ullrich, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, 8, 473–480.
- [295] F. X. Gu, R. Karnik, A. Z. Wang, F. Alexis, E. Levy-Nissenbaum, S. Hong, R. S. Langer, O. C. Farokhzad, *Nano Today* **2007**, 2, 14–21.
- [296] L. Peppas, J. Blanchette, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64, 206–212.
- [297] C. Mamot, D. C. Drummond, C. O. Noble, V. Kallab, Z. Guo, K. Hong, D. B. Kirpotin, J. W. Park, *Cancer Res.* **2005**, 65, 11631–11638.
- [298] I. Pont, A. Calatayud-Pascual, A. López-Castellano, E. P. Albelda, E. García-España, L. Martí-Bonmatí, J. C. Frias, M. T. Albelda, *PLoS One* **2018**, 13, 1–11.
- [299] K. Riehemann, S. W. Schneider, T. A. Luger, B. Godin, M. Ferrari, H. Fuchs, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 872–897.
- [300] S. S. Lucky, K. C. Soo, Y. Zhang, *Chem. Rev.* **2015**, 115, 1990–2042.
- [301] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, *Nat. Mater.* **2013**, 12, 991–1003.
- [302] W. Cai, X. Chen, *Small* **2007**, 3, 1840–1854.
- [303] J. Cheon, J. Lee, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1630–1640.
- [304] T. Lammers, S. Aime, W. E. Hennink, G. Storm, F. Kiessling, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 1029–1038.
- [305] D. E. Lee, H. Koo, I. C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim, I. C. Kwon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2656–2672.
- [306] A. D. Bangham, R. W. Horne, *J. Mol. Biol.* **1964**, 8, 660–668.
- [307] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, 1, 147–168.
- [308] D. Marsh, *Biophys. J.* **2012**, 102, 1079–1087.
- [309] T. M. Allen, P. R. Cullis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65, 36–48.
- [310] K. Sen, M. Mandal, *Int. J. Pharm.* **2013**, 448, 28–43.
- [311] L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S. Y. Wu, A. K. Sood, S. Hua, *Front. Pharmacol.* **2015**, 6, 1–13.
- [312] E. M. Reyes-Reyes, Y. Teng, P. J. Bates, *Cancer Res.* **2010**, 70, 8617–8629.
- [313] P. J. Bates, E. M. Reyes-Reyes, M. T. Malik, E. M. Murphy, M. G. O. Toole, J. O. Trent, *Biochim. Biophys. Act. Gen. Subj.* **2017**, 1861, 1414–1428.

The design of G4 binders has attracted increasing interest in recent years, since this sort of non-canonical DNA plays an essential role in different biological process related to transcription and expression of genetic information, as well as the maintenance of genomic stability. Therefore, G4 DNA is an appealing target for antitumour drugs. Within this context, the general objective of this thesis deals with the design, preparation and evaluation of polyamine-based derivatives targeting G4 DNA structures. Accordingly, this work has the following specific objectives.

- Design, synthesis and characterisation of novel polyamine derivatives

Taking as starting point the expertise of the Supramolecular Chemistry Group of the Universitat de València, novel polyamine-based compounds will be synthesised and characterised. As a central core, two different π -delocalised moieties will be used, triphenylamine (TPA) and triphenylbenzene (TPB), which will be functionalised with both linear and macrocyclic polyamines.

- Study of acid-base behaviour

The protonation state of the synthesised compounds modulates the establishment of supramolecular interactions. Consequently, the acid-base behaviour will be assessed by means of potentiometric measurements and spectroscopic techniques. Firstly, the protonation constants of each compound will be calculated, and then the corresponding species distribution diagrams will be constructed, enabling the determination of the net charge and the predominant species along the pH.

Furthermore, some photophysical properties, such as Aggregation-Induced Emission (AIE) or Photo-Induced Electron Transfer (PET) will be further analysed by means of spectroscopic methods.

- Study of interaction with DNA

Aiming to explore the capability of the synthesised compounds to selectively stabilise G4 DNA over dsDNA, their interaction with a wide range of DNA structures, including telomeric and oncogenic G4, will be assessed. To this end, compounds will be tested by means of fluorescence and circular dichroism (CD) spectroscopies, as well as Förster Resonance Energy Transfer (FRET) melting assays.

- Liposome nanoparticles synthesis and characterisation

The most promising compounds will be encapsulated inside liposome nanoparticles in order to achieve additional functionalities while enhancing their cell uptake. Moreover, vesicles will be functionalised with a fluorescent phospholipid (DPPE-NBD) along with a gadolinium complex (Gd-DTPA-DSA), enabling their application as diagnostic agents, by means of both confocal fluorescence microscopy and magnetic resonance imaging (MRI). Consequently, liposomes will constitute a theranostic platform, including therapeutic and diagnostic functionalities within the same nano-scaffold. Furthermore, liposomes will be functionalised with the aptamer AS1411 in order to enhance their nuclear uptake, where the majority of genomic material is found.

- Cytotoxicity and cellular uptake assessment

Once having studied the interaction of the synthesised compounds with different DNA structures, their cytotoxicity will be tested in different tumour cell lines. Then, liposomes will be studied and compared to their corresponding free compounds, aiming to prove their delivery potential. Finally, the cell uptake of the different liposome formulations will be assessed by means of confocal fluorescence microscopy, in order to explore the effectivity of the nuclear targeting provided by the aptamer functionalisation.

All commercially available reagents, solvents and materials were purchased from Sigma Aldrich, Thermo Fisher or VWR. Specifically, oligonucleotides were obtained from IDT Technologies and lipids from NOF or Avanti Polar Lipids.

3.1. - General methodology

Elemental analysis

The C, H and N elemental microanalysis of the synthesised compounds were carried out on an EA1108 CHNS-O Carlo-Elba equipment belonging to the Servei Central de Suport a la Investigació (SCSIE) of the Universitat de València. All the experiments were performed in triplicate and the final values are given as the average of the results.

Electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS)

The mass spectra of the obtained ligands were registered on an ESQUIRE 3000 ion trap mass spectrometer instrument at the SCSIE.

Nuclear magnetic resonance measurements

In order to obtain the NMR spectra of the compounds, samples were dissolved in the appropriate solvent. The experiments were run on either a Bruker Advance DPX 300 MHz or Bruker Advance DPX 400 MHz spectrometers, operating at 300 MHz and 400 MHz for ^1H , and at 75.4 MHz and 100.6 MHz for ^{13}C . Both instruments are located at the SCSIE. In the spectra analysis, either the solvent or the tetramethylsilane (TMS) signal was taken as reference.

UV/Vis and fluorescence spectroscopy

An Agilent Cary 100 UV/Vis spectrometer, a Varian Cary Eclipse spectrometer and a modular PTI fluorescence instrument were used to record the UV/Vis and fluorescence emission spectra, respectively. Generally, the measurements were performed in solution, thermostated at 298 K, using 1 mL quartz cuvettes with a path-length of 1 cm.

3.2. - Study of acid-base behaviour

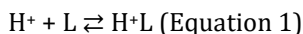
Supramolecular forces, such as electrostatic interactions, π - π stacking or hydrogen bonding, play a key role in the interaction between small molecules and DNA. Despite the relevance of molecular design, the acid-base behaviour of the compounds also influences in the establishment of this sort of forces. The synthesised compounds during this thesis contain amino groups which are susceptible to protonation in a wide range of pH. Therefore, the acid-base properties of those compounds were studied by means of both potentiometric and spectrometric methods.

3.2.1. - Potentiometric studies

Background

The determination of the stability constants corresponding to an equilibrium in solution requires, at least, measuring the concentration of one implied specie, for instance, H^+ . Potentiometric titrations allow the registration of the solution potential, E , upon the addition of a titrant. By using the Nernst equation, the concentration of H^+ can be calculated. Finally, the equilibrium constants can be obtained by fitting the experimental data to a mathematical model.

As a starting point, a generalised acid-base equilibrium is considered as follows:



The thermodynamic equilibrium constant, K , can be expressed in terms of the activity coefficient (γ) and the concentration of species at equilibrium:

$$K_{\text{thermodynamic}} = \frac{[H^+L]}{[H^+][L]} \cdot \frac{\gamma_{H^+L}}{\gamma_{H^+} \gamma_L} \text{ (Equation 2)}$$

In practical terms, it is assumed that the activity coefficients are constant, since the temperature is maintained during the experiment and the ionic strength used is relatively high. This assumption leads to the usual expression of the equilibrium constant:

$$K = \frac{[LH^+]}{[L][H^+]} \text{ (Equation 3)}$$

The potential of the solution depends on those species for which the electrode is sensitive (in this case $[H^+]$). Consequently, the relationship between K and the potential of the solution (E) is given by the well-known Nernst equation:

$$E = E^{\circ'} + \frac{RT}{nF} \ln[H^+] \quad (\text{Equation 4})$$

As mentioned above, E is measured potentiometrically. Therefore, in order to determine $[H^+]$ applying the Nernst equation, it is essential to previously estimate the value of $E^{\circ'}$, which depends on the experimental parameters E_j , junction potential, and E_{ass} , asymmetry potential. Hence, a calibration step prior to measurement is required in order to establish $E^{\circ'}$. Once E and $[H^+]$ are registered for each experimental point of the titration, the equilibrium constants of the studied system can be calculated by creating a mathematical model correlated with the experimental data.

Equipment

The potentiometric system used is detailed in Table 3.1. The titration is automatically controlled by the PASAT software,^[1] which monitors the addition of the titrant (mL) and compiles the corresponding E data (mV) measured by the potentiometer. For each titrant aliquot added, ten E values are registered. The final E value is given as an average, as long as the standard deviation and difference between the higher and the lower E value do not exceed 0.05 mV. Otherwise, one more E value is measured, until the parameters are within the appropriate range. Then, the value of E is recalculated from the last 10 points. If 100 measurements are not enough to satisfy the stabilised conditions, it is considered that the system has not reached the equilibrium and a new titrant aliquot is added, starting the calculation procedure once again. The final output collects the volume of the titrant added (mL) and the corresponding averaged E (mV).

Table 3.1. Details related to the potentiometric system.

Component	Description
Potentiometer	Crison micropH 2002
Automatic burette	Crison BU 20 31
Computer	PC Pentium Dual-Core E5300
Glass electrode	Crison 52 50, Ag/AgCl
Reference electrode	Crison 52 40, Ag/AgCl in 0.5 M NaCl
Wilhelm salt bridge	0.5 M NaCl
Pyrex cell	70 mL cell connected to a circulation bath
Thermostat	Haake EK 51
Stirrer	Crison microstirrer 2038

All the experiments were carried out at 298 ± 0.1 K under Ar atmosphere, using NaCl 0.15 M as supporting electrolyte, in order to simulate physiological conditions. The pH typically investigated ranged from 2 to 11.

Data acquisition and analysis

Regarding the experimental procedure, the first step is the calibration of the glass electrode, which is performed by titrating a fixed volume of standardised HCl with a CO₂-free NaOH solution. The PASAT software,^[1] by applying the GRAN method,^[2,3] calculates the base concentration, the ionic product of water (pK_w), and E^0 . This latter value may differ by a maximum of 1% between replicates to validate the calibration.

Afterwards, the compound under study is titrated with exactly the same CO₂-free NaOH solution used at the calibration. The PASAT software^[1] controls the titration and compiles the E (mV) and the titrant added volume (mL), as described above. Then, the dataset is further analysed with the software SUPERQUAD^[4] or HYPERQUAD.^[5] Once having established an initial equilibrium model, the software applies an iterative algorithm in order to fit the experimental data to the proposed model, enabling the determination of the equilibrium constants.

Finally, a distribution diagram of species is plotted as a function of pH, by using the software HySS.^[6] At least two different titrations of each ligand were performed and analysed together aiming to ensure the accuracy of the proposed model.

3.2.2. - UV/Vis and fluorescence spectrophotometric studies

Background

Since the protonation state of the molecules has a remarkable effect on their photophysical behaviour, it is essential to assess their UV/vis and fluorescence spectra as a pH function. Therefore, apart from the potentiometric titrations of the synthesised compounds, both UV/Vis and fluorescence titrations were carried out. Moreover, in order to gain more insight into the photophysical properties of the compounds, such as Aggregated-Induced Emission (AIE), further experiments were performed varying the concentration of the ligand and the polarity of the solvents.

Experimental procedure

The 10 μM ligand solutions were obtained by further dilution of a 1 mM stock solution in 10 mL of 0.15 M NaCl (the same ionic strength used in the potentiometric titrations). The UV/Vis and fluorescence spectra of this solution were recorded at 0.2 pH intervals, by addition of small volumes of either, concentrated HCl or NaOH solutions. The obtained data were analysed with the OriginPro 2017 software, taking into account the addition of acid and base. The equipment used is described in Section 3.1.

Additionally, the fluorescence spectra of some compounds were explored using solvents of different polarity. In this case, 10 μM solutions were obtained by further dilution of the 1 mM stock solution in a wide range of solvents, such as acetonitrile, water, dichloromethane and tetrahydrofuran (THF). Moreover, in order to investigate in depth this sort of molecular arrangements, the fluorescence spectra of 10 μM solutions in THF/water mixtures were also recorded.

Finally, aiming to corroborate the aggregation processes in alkali medium, the UV/Vis and fluorescence spectra of the compounds were registered upon increasing their concentration (from 0.5 μM to 1 mM) at pH = 12 in an aqueous solution.

3.3. - Assessment of interaction with DNA

A wide range of biophysical and biochemical techniques are available to study the binding properties of small molecules to DNA, which are well reviewed at the literature.^[7,8] Some of such methods have been utilised in order to achieve one specific purpose of this thesis: studying the interaction between the synthesised compounds with different DNA topologies. This section aims to provide insights into not only the theoretical background, but also the methodology followed.

3.3.1. - Preparation of buffer solutions

Depending on the aimed DNA structure, a specific buffer is required to ensure the proper hybridisation of the oligonucleotide sequence, since its stability is linked to the ionic strength of the medium. Table 3.2 shows the composition of the buffer solutions used during this thesis.

Table 3.2. Buffer solutions used at the assessment of the DNA interaction.

Buffer solution name	KCl [mM]	NaCl [mM]	LiCl [mM]	LiCac [mM]
1	10	-	90	10
2	-	10	90	10
3	1	-	99	10
4	100	-	-	10

Experimental procedure

Two stock solutions, 1 M LiOH and 500 mM HCac, were prepared. Then, the necessary amount of salts was dissolved in 150 mL of milli-Q water (Table 3.2). Immediately, 4 mL of the HCac stock solution were added. The pH was adjusted to 7.4 by adding aliquots of the LiOH stock solution. Finally, the necessary amount of milli-Q water was incorporated to reach 200 mL.

3.3.2. - Preparation of oligonucleotides for fluorimetric titrations

The unlabelled oligonucleotide sequences tested by fluorescence spectroscopy and their corresponding molar extinction coefficient are listed in Table 3.3. All of them were purchased from IDT Technologies as lyophilised stocks, purified by standard desalting.

In order to achieve the desired DNA conformation, DNA was reconstructed in buffer 4 (Table 3.2) and solutions were annealed by heating up to 95°C for 5 minutes and let to cool down gradually until reaching 25°C.

Table 3.3. DNA sequences for fluorimetric titrations.

Name	Sequence	ϵ [L·mol ⁻¹ cm ⁻¹]
HTelo22-K	AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-G	215000
HTelo22- Na	AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-G	215000
22CTA	AGG-GCT-AGG-GCT-AGG-GCT-AGG-G	220400
Bcl-2	GGG-CGC-GGG-AGG-AGG-GGG-GCC-GG	229400
c-Myc	TGA-GGG-TGG-GTA-GGG-TGG-GTA-A	228700
CEB25	AAG-GGT-GGG-TGT-AAG-TGT-GGG-TGG-GT	265100
c-kit1	AGG-GAG-GGC-GCT-GGG-AGG-AGG-G	226700
c-kit2	GGG-CGG-GCC-CGA-GGG-AGG-GG	199100
ds26	CAA-TCG-GAT-CGA-ATT-CGA-TCC-GAT-TG	253200

The concentration of DNA stock solutions was calculated by means of UV/Vis spectroscopy. Prior to measurement, the UV/Vis spectrum of 1 mL of buffer 4 was taken as blank. Then, DNA aliquots of 1 μ L were added sequentially, registering their corresponding absorbance at 260 nm. Finally, the concentration of the DNA solution was determined using the Lambert-Beer Law, by combination of the molar extinction value and the measured absorbance. The oligonucleotide solutions were stored at -20°C until usage.

3.3.3. - Preparation of oligonucleotides for FRET-Melting assays

Alternatively to the above described techniques, the FRET-Melting studies required doubled labelled oligonucleotides, which were purchased from IDT Technologies as lyophilised solids purified by HPLC (Table 3.4). Each of the sequences was reconstituted in milli-Q water at concentration of 100 μ M. The exact concentration was determined spectrophotometrically as previously described. The buffer solutions used are detailed in Table 3.2. All the labelled DNA solutions were stored at -20°C until usage.

Table 3.4. DNA Sequences for FRET-Melting assays.

Name	Sequence	Buffer (Table 3.2)
HTelo21-K	FAM-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TAMRA	1
HTelo21-Na	FAM-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TAMRA	2
22CTA	FAM-AGG-GCT-AGG-GCT-AGG-GCT-AGG-G-TAMRA	1
Bcl-2	FAM-GGG-CGC-GGG-AGG-AGG-GGG-GCG-GG-TAMRA	4
c-Myc	FAM-TGA-GGG-TGG-GTA-GGG-TGG-GTA-A-TAMRA	3
CEB25	FAM-AAG-GGT-GGG-TGT-AAG-TGT-GGG-TGG-GT-TAMRA	1
c-kit1	FAM-AGG-GAG-GGC-GCT-GGG-AGG-AGG-G-TAMRA	1
c-kit2	FAM-GGG-CGG-GCG-CGA-GGG-AGG-GG-TAMRA	1
ds26	FAM-CAA-TCG-GAT-CGA-ATT-CGA-TCC-GAT-TG-TAMRA	1

3.3.4. - Preparation of oligonucleotides for CD titrations

The unlabelled oligonucleotides used for CD titrations are listed in Table 3.5. The preparation, the hybridisation and the calibration of the DNA stock solutions are analogous to the above described.

Table 3.5. DNA sequences for CD titrations.

Name	Sequence	ϵ [L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]
HTelo22 - K	AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-G	215000
22CTA	AGG-GCT-AGG-GCT-AGG-GCT-AGG-G	220400
c-Myc	TGA-GGG-TGG-GTA-GGG-TGG-GTA-A	228700

3.3.5. - Fluorimetric titrations

Background

The interaction between fluorescent molecules and different DNA topologies can be evaluated by studying their emission upon increasing the oligonucleotide concentration.^[9] Interestingly, the titration of some compounds with G4 DNA may result in an enhancement of the fluorescence. Consequently, those molecules may be considered as “molecular sensors”, which are able to selectively recognise and detect G4 *in vitro* and even *in vivo* (Figure 3.1).^[10-15]

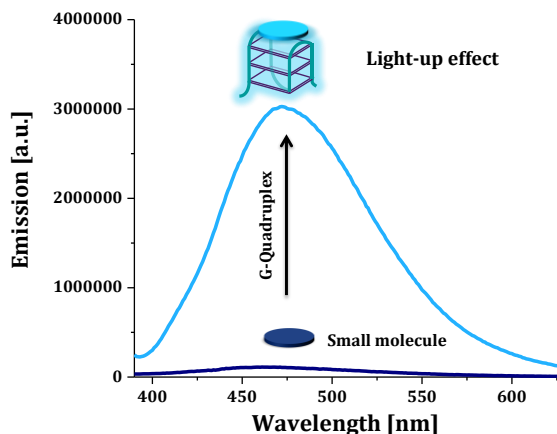


Figure 3.1. Example of a fluorimetric titration with G4 DNA showing a light-up effect.

Moreover, the data obtained by fluorimetric titrations may enable to calculate an equilibrium affinity constant (K_a) through a mathematical algorithm. Among all the available procedures, the values of K_a in this thesis have been obtained applying the Aldrich-Wright model,^[16,17] one of the most widely used at the literature. Briefly, this method relies on the fitting of experimental data to a simplified equilibrium model.

In this context, a 1:1 equilibrium for the interaction between the ligand and the DNA may be defined according to Equation 5:



The corresponding affinity constant may be stated as follows:

$$K_a = \frac{[\text{L-DNA}]}{[\text{L}][\text{DNA}]} \text{ (Equation 6)}$$

Unfortunately, it is not possible to measure neither $[\text{L-DNA}]$, $[\text{L}]$ nor $[\text{DNA}]$. Thankfully, the concentration of the complex ($[\text{L-DNA}]$) may be indirectly measured by titration methods. In a typical experiment, the concentration of the ligand ($[\text{L}]$) is kept constant while being titrated with DNA. The photophysical response during the titration is monitored and then plotted as a function of DNA concentration (binding isotherm). The observed modifications in the emission profile are directly related with the concentration of the complex $[\text{L-DNA}]$.

The fitting of the binding isotherm to a mathematical model may enable the calculation of an affinity constant (K_a). The first step to establish the model is considering the initial and the equilibrium concentrations (Equations 7 and 8), as well as the molar fraction (Equation 9):

$$[L]_t = [L] + [L\text{-DNA}] \text{ (Equation 7)}$$

$$[\text{DNA}]_t = [\text{DNA}] + [L\text{-DNA}] \text{ (Equation 8)}$$

$$f_{L\text{-DNA}} = \frac{[L\text{-DNA}]}{[L]_t} \text{ (Equation 9)}$$

Equation 10 is obtained by combining these latter three equations with the definition of K_a (Equation 6):

$$[L - \text{DNA}] = [L]_t \frac{K_a [\text{DNA}]}{1 + [\text{DNA}]} \text{ (Equation 10)}$$

As mentioned before, the $[L\text{-DNA}]$ is measured indirectly in the experiment but it is not possible to determine $[\text{DNA}]$. Consequently, Equation 10, has to be rewritten as a function of $[L\text{-DNA}]$, the total concentrations $[L]_t$ and $[\text{DNA}]_t$, while keeping K_a as the unknown. Combining Equations 7, 8, 9 and 10, the mathematical statement 11 is obtained.

$$[L - \text{DNA}] = \frac{1}{2} \left[[\text{DNA}]_t + [L]_t + \frac{1}{K_a} - \sqrt{\left([\text{DNA}]_t + [L]_t + \frac{1}{K_a} \right)^2 - 4[L]_t[\text{DNA}]_t} \right]$$

$$\text{(Equation 11)}$$

In practice, the observed fluorescent changes (y) are plotted against the total DNA concentration (x). Finally, Equation 11 is simplified as Equation 12. This latter equation can be implemented at the OriginPro 2017 software. The fitting procedure relies on the least-squares method and the Levenburg-Marquadt iteration algorithm. The parameters R , A and B are given by the fitting. The K_a is determined by applying the relationship established in Equation 13.

$$y = \frac{1}{2} R \left[x + B + A - \sqrt{(x + B + A)^2 - 4Bx} \right] \text{ (Equation 12)}$$

$$K_a = \frac{B}{A[L]_t} \text{ (Equation 13)}$$

Experimental procedure

Firstly, a 1 mM stock solution of the ligand under assessment was further diluted to 10 μ M using buffer 4 (Table 3.2). An initial fluorescence spectrum of 1 mL of this solution was registered. Then, aliquots of the DNA stock solution (Section 3.3.2) were subsequently added. After each addition, the cuvette was shaken and let to stand two minutes prior to measure the emission spectra.

Slit widths of 5 nm and a power of 750 mV were used for all the experiments. Alternatively, the excitation wavelength depends on the studied ligand. All titrations presented in this thesis were performed, at least, in duplicate to ensure the reproducibility of the data. The values calculated for K_a and their associated error come from averaging the replicates.

3.3.6. - FRET-Melting assays

Background

The Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) is the basis for some of the most widespread and useful assays used for studying the ligand interaction with G4 DNA.^[18-21] Some of the appealing features of these methodologies are their high sensitivity and throughput format, apart from the reduced volume and concentration required. Several experimental parameters were optimised by Mergny *et al.*, by carrying out control measurements to establish the proper conditions under which this assay should be performed.^[22]

In a typical FRET-Melting experiment, the oligonucleotide under study is labelled at the 5' and 3' ends with two fluorophores, one donor and one acceptor. The excitation spectrum of the acceptor has to overlap with the emission spectrum of the donor. Dyes which satisfied this standard are denominated FRET pairs, such as 6-carboxyfluorescein (FAM) and 5-tetramethylrhodamine (TAMRA) (Figure 3.2).

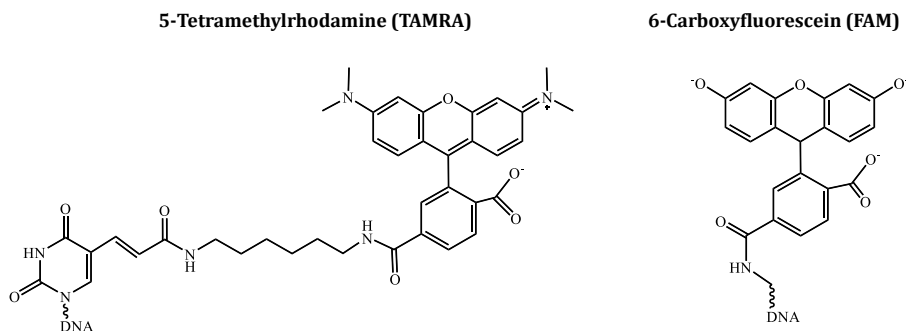


Figure 3.2. Molecular structures of the FRET pair FAM/TAMRA.

When the DNA is folded, the FAM/TAMRA pair is spatially close. Therefore, the donor transfers its excitation energy to the acceptor through a non-radiative process. As a consequence, the fluorescence of the donor is quenched. Both fluorophores have to be within a distance of 10 - 80 Å, known as a Förster distance, in order to yield a reasonable energy transfer.^[23]

Upon increasing the temperature, the DNA unfolds. Consequently, the distance between the donor and the acceptor increases, hampering the energy transfer and restoring the fluorescence of the donor. Following the fluorescence of the donor, it is possible to determine the melting temperature of the DNA (T_m), in which the 50% of the DNA is unfolded.

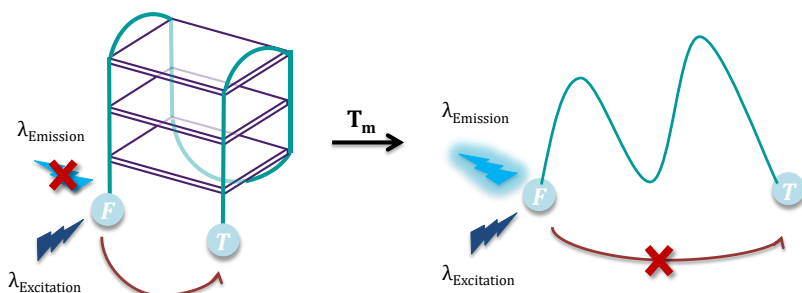


Figure 3.3. Depiction of the FRET-Melting assay principle.

If the ligand under assessment stabilises the DNA structure, the melting temperature is supposed to increase (ΔT_m). Typically, a potential G4 binder gives approximately a ΔT_m of around 15 - 20°C.^[22]

Furthermore, the selectivity towards G4 DNA over double-stranded DNA may be evaluated by incorporating an unlabelled duplex competitor. If the ΔT_m value decreases in the presence of duplex, the interaction between the ligand and the double-stranded DNA prevails over the interaction with G4 DNA and consequently, the G4 selectivity of the ligand may be considered to be low.

Experimental procedure of FRET-Melting assays

Several FRET-Melting experiments were carried out following a protocol firstly set up by Mergny *et. al.* and optimised by the Vilar's Group at the Imperial College of London.^[22,24]

Solutions of labelled oligonucleotides (0.4 μM) were prepared by further dilution of the 100 μM stock solutions, by using the appropriate buffer (Section 3.3.3 and Table 3.6). These solutions were annealed by heating up to 95°C for 5 minutes and let to cool down slowly until reaching 25°C.

Table 3.6. Correspondence between buffers and DNA solutions for FRET-Melting assays.

Buffer (Table 3.2)	DNA sequence (Table 3.5)
1	HTelo21-K, CEB25, c-kit1, c-kit2, 22CTA, ds26
2	HTelo21-Na
3	c-Myc
4	Bcl-2

Then, 10 μM ligand solutions were prepared using exactly the same buffer as the oligonucleotide to be tested. Each ligand solution was further diluted to yield three ligand stock solutions (0.8 μM , 2 μM and 4 μM). Finally, 20 μL of DNA (0.4 μM) and 20 μL of the appropriate ligand stock solution were added into the wells of a 96-well plate (Applied Biosystems), obtaining the final ligand-to-DNA ratios of 0, 2, 5 and 10.

All the experiments were performed with an Agilent Stratagene Mx3005P RT-qPCR machine (Imperial College of London). The temperature on the well-plate was increased incrementally at a rate of 0.5°C/min, from 25°C up to 95°C. After each increase, the emission of the FAM was registered. The fluorescence emission data were normalised and analysed with the OriginPro 2017 software. The values of the melting temperature (T_m) were calculated by fitting the data to a bi-dose response equation and determining the midpoint from the fitted curves. Each experiment was performed, at least, in triplicate and the errors arise from their average.

Experimental procedure of FRET-Melting competition assays

For the FRET-Melting competition studies, the DNA sequences were annealed as described before (Section 3.3.3). The ligand under study was dissolved in the appropriate buffer to yield a concentration of 4 μM . Then, a master solution was prepared consisting on 0.4 μM of the G4 under consideration and 2 μM of the ligand (ratio ligand to G4 of 5). In all the competitive assays, the studied double-stranded DNA was unlabelled ds26. The ds26 stock solution (Section 3.3.2) was further diluted to prepare 0.4, 1.2, 2, 4, 12, 20 and 40 μM solutions. To each PCR well, 20 μL of the master solution and 20 μL of the corresponding ds26 solution were added, obtaining the following duplex-to-G4 ratios: 0, 1, 3, 5, 10, 30, 50, 100, 150, 300 and 500.

All the measurements were performed with an Agilent Stratagene Mx3005P RT-qPCR machine. The temperature on the well-plate was increased at a rate of 0.5°C/min from 25°C up to 95°C. The data were normalised and analysed with the OriginPro 2017 software. The values of the melting temperature (T_m) were calculated by fitting the data to a bi-dose response equation and determining the midpoint (0.5) from the fitted curves. Errors arise from the average of the three repeats.

3.3.7. - Circular dichroism spectroscopy

Background

Circular dichroism is a spectroscopic technique widely used to study chiral systems.^[25,26] For instance, the CD spectrum of DNA depends on its topology due to its specific chiral conformation. Consequently, CD is a useful technique to get insight into the modifications of the DNA structure by interaction with small molecules.^[26-28] Interestingly, those achiral molecules which interact with DNA may show Induced Circular Dichroism (ICD) bands, resulting from the chirality provided by the oligonucleotide conformation.

The CD spectra arise from the combination of both left and right circular polarised light. When polarised light passes through an absorbing optically active medium, such as a chiral molecule, the absorption of each light component is different, making left and right light components become out of phase. Consequently, a rotation of the polarisation plane in an angle of θ , called ellipticity, emerges. The plot of the ellipticity (θ) versus wavelength gives a CD spectrum (Figure 3.4).

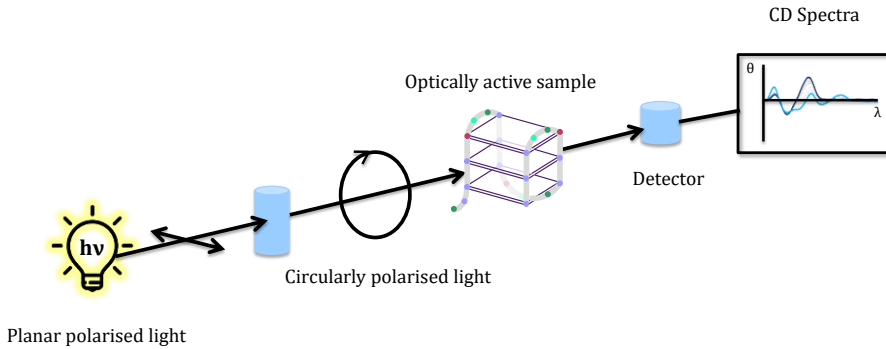


Figure 3.4. Depiction of the circular dichroism spectroscopy principle.

Despite the complexity of G4 structures, there are two basic CD profiles associated to the strands orientation. The CD spectrum of parallel G4 displays a positive band over 260 nm and a negative band at about 240 nm, whereas the CD spectrum of antiparallel G4 shows a negative band at around 260 nm and a positive band at 295 nm. In the case of hybrid G4, features of parallel and antiparallel G4 are observed simultaneously (Figure 3.5).^[29]

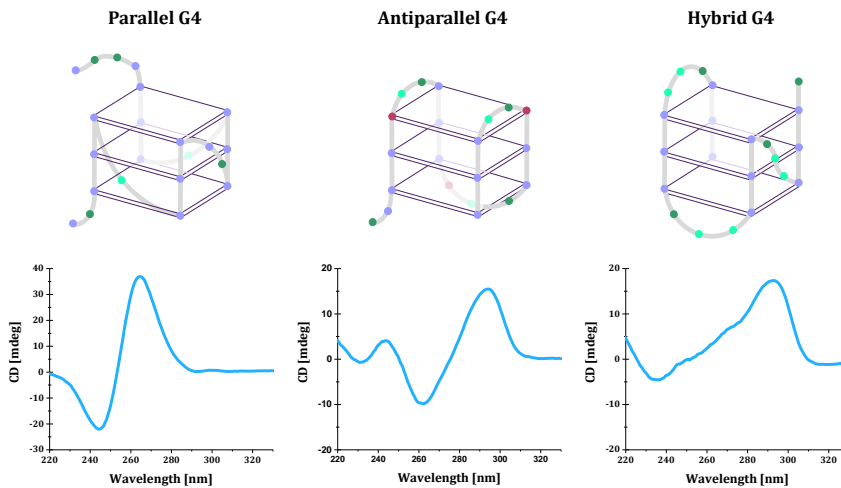


Figure 3.5. CD spectra corresponding to different G4 topologies.

Commonly, the G4 CD spectrum is associated with the strand orientation. However, the origin of the chirality arises from the stacking orientation of the guanines in the G-tetrads. The twists in the columnar structure lead to a chiral environment, which provides the CD spectrum.^[30]

Apart from studying the G4 topology, CD spectroscopy allows the assessment of the interaction between ligands and G4 DNA through different sort of assays, such as melting experiments or titrations. This latter one consists in monitoring the CD spectrum of the oligonucleotide upon increasing the ligand concentration. The observed modifications are related to either the disruption of the DNA structure or its reinforcement by the ligand binding.

Experimental procedure of CD titrations

In order to perform CD titrations, 5 μ M DNA solutions were prepared by further diluting the stock DNA solutions using the appropriate buffer solution (Section 3.3.4). Then, DNA solutions were annealed by heating up to 95°C for 5 minutes and let to cool down gradually to 25°C.

During the titration, aliquots of a 0.5 mM ligand solution were added sequentially to 500 μ L of the annealed G4, obtaining DNA-to-ligand ratios ranging from 0 to 3. After each addition, the solution was mixed and let to stand for 5 minutes prior to measurement.

The CD spectrum was measured within the range 220 - 550 nm with a JASCO-715 spectrophotometer (Imperial College London). The scanning speed was 200 nm \cdot min⁻¹ with 1 nm of step size, 2 nm of band width, using 2 s as response time. The final CD spectrum was the average of 3 scan accumulations. The buffer contribution was subtracted manually during the data analysis.

3.3.8. - Computational studies

Computational methods are extremely useful in order to get further insight into the binding mode between small molecules and DNA structures. During this thesis, Àlvar Martínez-Camanera (Supramolecular Chemistry Group of the Universitat de València) kindly performed Molecular Dynamic (MD) studies addressed to analyse the interaction between two of the synthesised compounds and G4 DNA, as well as double-stranded DNA.

Both assessed compounds were constructed from an already reported structure of the TPA moiety (CCDC code: 1448378),^[31] using the software *xleap* for the incorporation of the polyamine-based substituents. Regarding the construction of the DNA models, different approaches have been followed. The double-stranded model (ds26) was generated by using the NAB molecular manipulation language, included in the AMBER16 software (Assisted Model Building with Energy Refinement).^[32] On the other hand, the G4 DNA model (HTelo22-K) was taken from the Protein Data Bank (PDB: 2JSM)^[33] and the potassium cations located in the central G4 channel were included *a posteriori*.

The approximation of the ligands to the DNA model was performed by means of the LEaP software. The resulting systems were solvated and neutralised by the addition of 21098 and 13700 water residues for ds26 and G4 DNA, respectively. The software used for this aim was TIP3PBOX. Once the systems were constructed, an energetically minimisation was carried out. After equilibrating the obtained systems to 300 K, a total of 10 ns Molecular Dynamics (MD) was performed. The ligands were modelled applying the *gaff*^[34] force field, while the *ff14SB*^[35] was used for the DNA bases. The environmental conditions were simulated by means of the *ionsjc_tip3p* field.^[36]

Finally, those 10 minimal energy conformers selected from the study were further energetically minimised. The MD simulation trajectory was analysed using the *cpptraj* module^[37] corresponding to the software AmberTools17. The visual inspection and the design of the molecular graphics were performed using the PyMOL software.^[38]

3.4. - Liposome nanoparticles characterisation

The characterisation of the synthesised liposome nanoparticles is essential in order to ensure their proper *in vitro* and *in vivo* performance. Several techniques are commonly used to assess different critical parameters, such as size, morphology and encapsulation efficiency.

3.4.1. - Dynamic light scattering (DLS)

Background

One of the most widespread methods to characterise particle size distributions is the Dynamic Light Scattering (DLS), which is based on the light scattering resulted from the Brownian movement of particles.^[39,40]

When a laser beam illuminates a solution containing particles, light scatters in an angle θ (scattering angle). The movement of particles causes fluctuations in this scattered light angle, which are registered as a time function. Such motion of particles depends on their size, temperature and solvent viscosity.

The DLS instrument correlates the intensity of fluctuations to time by applying Equation 14:

$$g_2(\tau) = 1 + \beta e^{-2D_\tau q^2 \tau} \text{ (Equation 14),}$$

where $g_2(\tau)$ is the intensity correlation function, τ is the delayed time, β is the coherence factor, which depends on the instrument geometry, q is the Bragg wave vector relative to the solvent refractive index, and $D\tau$ is the diffusion coefficient.^[41] This latter parameter, $D\tau$, is the key point in the determination of the hydrodynamic radius of the particles, R_h :

$$D\tau = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \text{ (Equation 15),}$$

where k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature and η the viscosity of the medium.^[42]

Equipment

All the DLS measurements were carried out using a Malvern Mastersizer 2000 instrument located at the Institut de Ciència dels Materials of the Universitat de València (ICMUV). All the samples were equilibrated to 25°C, taking into account the viscosity of the solvent. The particle size distribution diagrams result from the averaging of three replicates.

3.4.2. - Cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM)

Background

The cryo-Scanning Electron Microscopy (cryo-SEM) was developed by Jacques Dubochet, Joaquim Frank and Richard Henderson, which were awarded with the Chemistry Nobel Prize in 2017. This is one of the most suitable techniques to imaging biological samples, as well as liposome nanoparticles.^[43,44]

Due to the aqueous nature of liposomes, samples have to be frozen prior to the imaging process. Alternatively, the vesicles may collapse instantly under the high vacuum required by the equipment. Therefore, prior to measurement, samples were instantaneously frozen under liquid N_2 . Moreover, due to the non-conducting composition of the particles, it is essential to perform a sputter coating with Au/Pd, in order to visualize the sample using an electron beam.

A scheme of the cryo-SEM equipment is shown in Figure 3.6. The sample is scanned with an electron beam in a defined (x,y) area. The registered signal, z , corresponds to the secondary and retro-dispersed electrons, which allow the construction of a 3D image (x,y,z) .

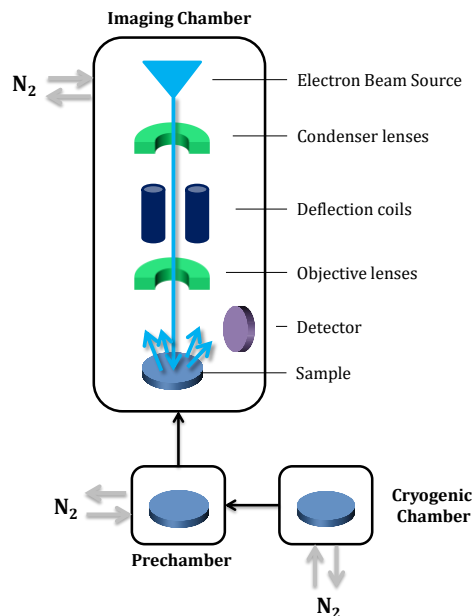


Figure 3.6. Depiction of the cryo-SEM equipment.

Equipment and experimental procedure

The cryo-SEM instrument (JEOL JSM 5410) used is located at the Servei de Microscopia Electrònica of the Universitat Politècnica de València. For the imaging process, one drop of the liposome suspension was deposited onto a membrane, which was plunged into liquid N₂ (GATAN cryogenic system). Then, the sample was transferred into the cryo-SEM pre-chamber at -170°C, where the sputtering process takes place after the sublimation of superficial water. Afterwards, the sample was conveyed to the imaging chamber. The electron beam scans the surface under liquid N₂ and the detector registers the secondary and retro-dispersed electrons. Finally, the data were compiled by a computer resulting in 3D images of the sample surface.

3.4.3. - Inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)

Background

One of the main techniques for elemental analysis is the Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), which allows the simultaneous determination of a wide range of elements with an extremely low limit of detection.^[45] In this thesis, ICP-MS was used to characterise the gadolinium content of the synthesised liposomes.

The analytical process implies four different steps. Prior to measurement, the liposomes sample was digested in nitric acid, in order to disrupt the vesicles. Then, the obtained solution was transferred into the ICP-MS instrument, where it was vaporised and conveyed to the plasma, causing its ionisation. The ions were directed to a quadrupole system and separated accordingly to the charge/mass ratio. Finally, the detector registered the abundance of each distinct entity.^[46]

Equipment

The quantification of gadolinium in liposome suspensions were carried out in an ICP-MS-7900 instrument (Agilent Technologies), belonging to the SCSIE. The measurement of each sample was performed in triplicate.

3.4.4. - Encapsulation efficiency

Background

The concentration of the encapsulated compound inside liposomes modulates the cytotoxicity of the nanoparticles. Therefore, quantifying this parameter before proceeding to test liposomes *in vitro* is crucial. The methodology depends on the nature of the cargo and typically ranges from NMR or mass spectrometry, to UV/Vis and fluorescence spectroscopy.

In the literature, there are an extensive variety of definitions referred to the “encapsulation capability” of liposomes. However, the most widely used is the “encapsulation efficiency (EE)”, which corresponds to the ratio between the encapsulated compound and the total compound used during the synthesis (Equation 16).^[47]

$$EE = \frac{[\text{encapsulated compound}]}{[\text{encapsulated compound input}]} \cdot 100 \text{ (Equation 16)}$$

Nevertheless, prior to the quantification of the encapsulated compound it is essential to disrupt the liposome vesicles. One approach to address this aim is adding a co-solvent with slightly lower polarity than water, such as methanol. In this medium, the spherical morphology of liposomes is disrupted causing their collapse, which in turn results in the release of the encapsulated compound.

Equipment and experimental procedure

Liposomes synthesised during this thesis include the compounds TPA3P, TPA3PY, TPB3P and TPB3PY. These compounds can be quantified by means of fluorescence spectroscopy by constructing a standard curve for each ligand. Therefore, several solutions at increasing concentrations were prepared by diluting a 1 mM ligand stock solution. The solvent used for the standards was a water/methanol mixture at the same ratio that the samples of liposomes were disrupted.

The fluorescence of the standards was recorded using the excitation wavelength corresponding to each compound. Then, each maximum emission was plotted against the concentration of the ligand. Finally the data were fitted accordingly to the least-squares method.

The release of the encapsulated compound was carried out by adding 20 μL (for TPA3P, TPB3P and TPB3PY) or 10 μL (for TPA3PY) of the liposome suspension into 720 μL of methanol. The necessary amount of milli-Q water was incorporated in order to reproduce the solvent ratio of the standards. The fluorescence spectra were registered after sonicating the samples for 5 minutes. The excitation wavelength was chosen accordingly to the maximum absorption of each compound. Finally, the maximum emission of the samples was interpolated using the corresponding standard curve, allowing to calculate the compound concentration in the liposome suspension.

3.5. - Biological studies

The *in vitro* antitumour activity of the synthesised compounds and nanoparticles was tested using different cell lines. Moreover, the cell uptake of both, untargeted liposomes and targeted liposomes was further investigated by means of confocal fluorescence microscopy. This section aims to describe the experimental procedures and data analysis methods.

3.5.1. - Cell cultures and maintenance

The cell lines used in this thesis correspond to adherent cells derived from different solid human tumours (Table 3.7). The MCF-7 and HeLa cell lines were kindly provided by the Servei de Cultius Cel·lulars of the Universitat de València. The LN229 cell line was generously supplied by Dr. Joan Seoane (Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona).

Table 3.7. Description of the cell lines used at this thesis.

Cell line name	Tissue	Cell type	Disease	References
LN229	Brain	Epithelial	Glioblastoma	[48,49]
MCF-7	Breast	Epithelial	Adenocarcinoma	[50,51]
HeLa	Cervix	Epithelial	Adenocarcinoma	[52,53]

All the cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose, which was supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS, 30 min, 56 $^{\circ}\text{C}$), 100 U/mL penicillin and 10 $\mu\text{g/L}$ streptomycin. The cultures were maintained at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a humidified environment with 5% CO_2 . All the operations were carried out in a microbiological safe cabinet with laminar airflow system (TELSTAR BIO IIA).

The growth and the proliferation of the cells were exhaustively controlled using an optical microscope to check out the cell morphology, the adherent conditions and the absence of contamination.

Subculture and Trypan Blue counting

In order to ensure the proper cell growth, the cultures were subdivided twice per week before reaching confluence. When passaging cells, it is essential to assess the culture cell viability. In this thesis, the cell recount was determined by the Trypan Blue protocol. The Trypan Blue dye is only able to penetrate in non-viable cells, which cytoplasmic membrane is disjointed. Therefore, after the staining, it is possible to distinguish between the viable cells and the blue dyed non-viable cells by using an optical microscope.^[54]

- Experimental protocol

Firstly, the cell medium was eliminated from a 100 mm² culture plate by using a Pasteur pipette connected to a vacuum pump. Then, the film of adherent cells was washed with 1 mL of PBS (pH = 7.4). After removing the PBS, 1 mL of trypsin-EDTA (25% trypsin-EDTA, pH = 8) was added, and the plate was incubated at standard culture conditions for 5 minutes.

Immediately after the incubation, 1 mL of complete culture medium was added neutralising the trypsin effect. The cells were harvested and the resulting suspension was centrifuged (1000 r.p.m., 5 minutes). The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1 mL of complete culture medium. With the aim to obtain a homogeneous cell suspension, the solution was subtly mixed.

Afterwards, 10 µL of the resultant cell suspension and 10 µL of Trypan Blue (0.4% in NaCl 0.15M) were gently mixed and transferred to a Neubauer chamber. The cell density and the estimation of the cell viability were determined using an optical microscope equipped with a Neubauer chamber lector. Finally, the appropriate volume of the cell suspension to prepare a subculture was calculated accordingly to Equation 17. The new cell culture vessel was prepared by adding new fresh medium. In all the passages, the cell viability of the suspension was, at least, 95%. The final cell density of each subculture was adapted to a preconfluence phase, ensuring the proper growth and proliferation of cells.

$$\text{Cell density} = \frac{\text{cells/mL in the subculture}}{\text{cells/mL in the suspension}} \cdot V_{\text{suspension}} \text{ (Equation 17)}$$

Cryopreservation

Several difficulties are associated to uninterrupted culture growth such as, contamination, microbial infections or even genetic modifications. Therefore, frozen stocks were prepared for long-term storage. In this thesis, different seed stocks were prepared from cell subcultures serving as a source for working solutions.

The protocol for cryopreservation involves preparing a cell subculture in complete medium supplied with a cryoprotective agent, for instance DMSO. The resultant cell suspension is stored in liquid nitrogen. The DMSO ensures a slow cooling rate, avoiding the crystal formation which may cause the cell death.

- Experimental protocol of freezing

The required volume of the stock suspension to prepare a subculture of $1 \cdot 10^6$ cells/mL was determined by the Trypan Blue counting method as described above (Equation 17). After centrifugation (1000 r.p.m., 5 minutes), the supernatant was removed and the pellet was resuspended in 900 μL of complete culture medium and 100 μL of DMSO.

After subtle mixing, the resulting suspension was transferred into a cryovial, which was stored in an isopropanol container (Mr. Frosty, Nalgene) at -80°C during 24 hours. Finally, the cryovial was introduced into a liquid nitrogen tank (-196°C) until usage.

- Experimental protocol of defrosting

The cryovial was defrosted in a thermostated bath at 37°C . Then, the suspension was transferred to a 15 mL Falcon tube with 5 mL of complete culture medium. The resultant solution was centrifuged (1000 r.p.m., 5 minutes) and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 10 mL of complete cultured medium into a 100 mm vessel. Finally, the plate was introduced in an incubator at standard culture conditions.

3.5.2. - Preparation of stock solutions

Aiming to assess the cytotoxicity of the synthesised compounds and liposomes, several solutions at increasing concentrations of those were needed. Regarding the compounds, a 1 mM stock solution was prepared and then, it was further diluted to yield the desired concentrations. In the case of liposomes, the concentration is referred to the encapsulated compound, which is responsible of the cytotoxic effect. Therefore, the first step corresponds to the quantification of the encapsulated compound as described in Section 3.4.4. Finally, different liposomes solutions at increasing concentrations were obtained by further diluting the stock liposome suspensions.

3.5.3. - Cell viability assessment by MTT assays

Background

As mentioned above, the cytotoxicity of the synthesised compounds and liposome nanoparticles was tested in different tumour cell lines (Table 3.7). The method followed was the MTT assay, firstly described by Mosmann^[55] and still, one of the most efficient and widely used protocols.

The basic principle relies on the capability of metabolic active cells to cleave the tetrazolium rings of the pale yellow MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), yielding purple formazan crystals. This reaction corresponds to a cellular reduction involving the cofactors NADH and NADPH (Figure 3.7).^[56] Consequently, those formed purple crystals are directly related to living cells. Therefore, the cell viability may be estimated by their quantification. Usually, this process is carried out spectrophotometrically, using DMSO to favour the solubilisation of the crystals.

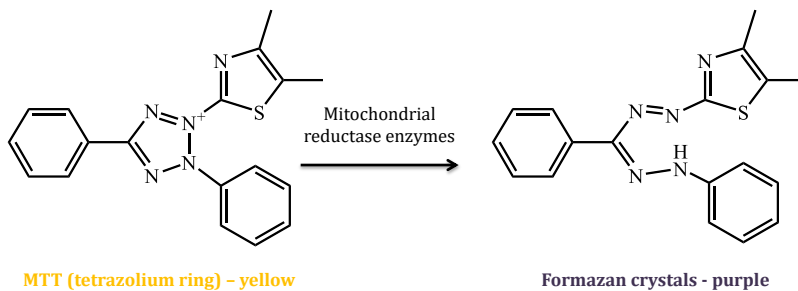


Figure 3.7. Metabolical reaction corresponding to the MTT tetrazolium ring cleavage.

MTT protocol

A general scheme of the MTT assay is illustrated in Figure 3.8. Each step is described during the following paragraphs.

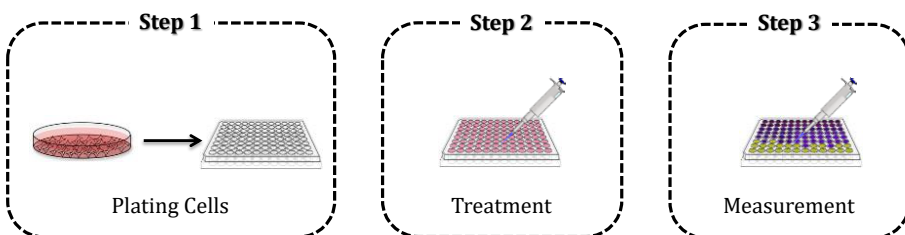


Figure 3.8. An illustrative scheme of the MTT protocol.

- Step 1: Plating cells

Firstly, cells were harvested as described above in order to prepare a subculture of 18 mL (480000 cells/mL). Then, 150 μ L of this suspension was added into the wells of a 96 well-plate, yielding a final concentration of 4000 cells per well. Finally, the plate was incubated at standard culture conditions for 24 hours, allowing the cells to adhere.

- Step 2: Treatment with compounds or liposomes under study

On the second day of the assay, the medium was removed from the wells. Then, 100 μ L of the compounds or the liposome solutions under assessment were added at increasing concentrations. The plate was further incubated for 48 hours.

- Step 3: Measurement

A MTT stock solution of 12 mM was prepared by dissolving 5 mg of MTT in 1 mL of PBS (pH = 7.4). Then, the working MTT solution was obtained by further diluting the stock solution to 1.2 mM, using complete culture medium. The solution of the wells was replaced with 100 μ L of the MTT working solution. Finally, the plate was incubated for 4 hours.

- Step 4: Absorbance measurement

In order to solubilize the formed formazan crystals, 100 μ L of DMSO were added to each well and the plate was further incubated for 20 minutes. Finally, the absorbance at 570 nm of each well was registered using an ESPECTRA-MAX PLUS spectrophotometer located in the Servei de Cultius Cel·lulars of the Universitat de València.

Data analysis

In a typical experiment, the first row of the assessed 96 well-plate only contains complete culture medium and DMSO. The second row is not treated during the assay and consequently, it corresponds to the 100% cell viability. The following rows are treated with increasing concentrations of the tested compounds or liposomes. Each concentration was investigated in triplicate and at least two independent experiments were carried out (Figure 3.9).

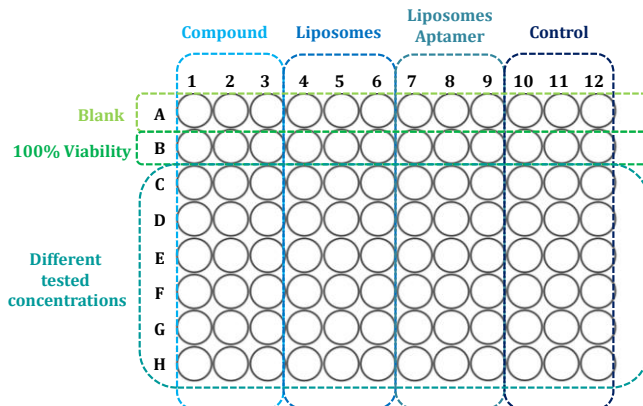


Figure 3.9. Typical set-up of a MTT experiment.

The absorbance at 570 nm of the treated wells was referred to the non-treated wells (100% cell viability), in order to estimate the cell viability associated to each studied concentration. Finally, the IC₅₀ value was calculated. This parameter refers to the concentration of the drug which causes a 50% decrease of the cell viability. The software used was OriginPro 2017 and the data were fitted accordingly to a sigmoidal response.

3.5.4. - Liposomes imaging

Background

With the aim to enhance the cell uptake, some of the synthesised compounds were encapsulated inside liposome nanoparticles. One approach to assess the efficiency of these vesicles as delivery systems is determining their cytotoxicity (Section 3.5.3). Furthermore, since liposome formulations designed in this thesis include a fluorescent phospholipid (Figure 3.10), it is possible to visualize them inside the cells by means of confocal fluorescence microscopy.

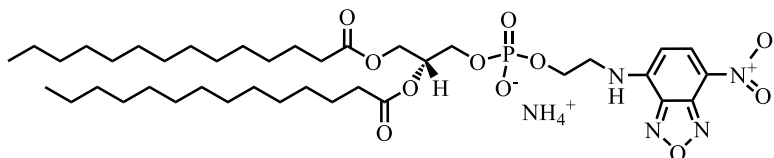


Figure 3.10. Molecular structure of the phospholipid DPPE-NBD.

This sort of non-invasive technique is broadly used in life science and offers better optical resolution than conventional microscopy. The Figure 3.11 shows a depiction of a confocal microscope.^[57] A laser beam, used as a light source, is pointed to the sample by a dichroic mirror and two scanning mirrors. The emission of the sample passes through back the same mirrors and is focused as a confocal point on the detector pinhole aperture. The detector registers the fluorescence, point by point, as the sample is scanned. Finally, the information is pieced together into an image. The term confocal stems in the fact that the excitation and emission pathways coincidence.

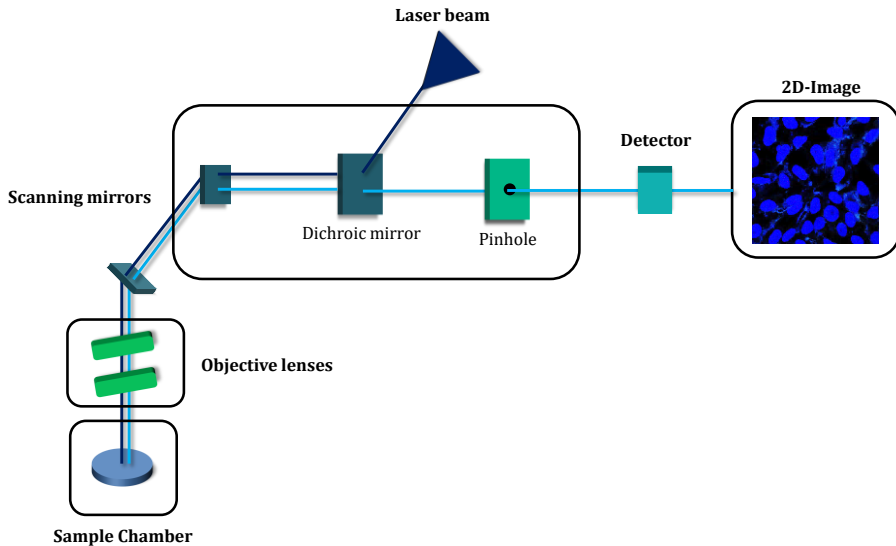


Figure 3.11. Depiction of the confocal microscope instrument.

Equipment and experimental procedure

- Step 1: Seeding

A subculture of 3 mL (90000 cells/mL) was prepared (Section 3.5.1). Then, 300 μL of this suspension was added into the wells of an 8 well-plate, resulting in a final concentration of 9000 cells per well. The plate was incubated at standard culture conditions for 24 hours, allowing the cells to adhere.

- Step 2: Treatment with liposomes under study

Prior to the treatment, a solution containing 2.4 mL of fresh complete medium and 24 μL of the liposome suspension was prepared. Afterwards, the medium of the 8 well-plate was removed and replaced with 300 μL of the previously prepared solution. The plate was incubated for 24 hours, enabling the cell uptake of liposomes.

- Step 3: Cell nucleus staining

A staining process with Hoechst 33258 was used to visualise the cell nucleus in living cells. This dye interacts with AT-rich regions of DNA, resulting in a remarkable blue emission.^[58]

The labelling process was carried out in 2 wells of the 8 well-plate. Firstly, the medium of the wells was removed. Then, 300 μL of an 8 μM Hoechst solution were added to the wells. During an incubation of 15 minutes, the dye stained the cell nucleus. Finally, the staining solution was removed and the wells were washed three times with PBS.

- Step 4: Cell imaging

The visualisation of the cells was carried out in a confocal microscope (Olympus FV1000) located at the Departament de Genètica of the Universitat de València, with the kindly collaboration of Maria Sabater and Ruben Artero. The excitation and emission wavelengths corresponding to the fluorescent phospholipid (DPPE-NBD) and the Hoechst are summarised in Table 3.8.

Table 3.8. Excitation and emission wavelengths using for cell imaging.

Dye	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]
DPPE-NBD	463	536
Hoechst	346	460

3.6. - References

- [1] M. Fontanelli, M. Micheloni, Peñíscola, España, **1990**.
- [2] G. Gran, *Analyst* **1952**, *77*, 661–671.
- [3] G. Gran, *Acta Chem. Scand.* **1950**, 559–577.
- [4] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **1985**, 1195–1200.
- [5] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **1996**, *43*, 1739–1753.
- [6] L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311–318.
- [7] P. Murat, Y. Singh, E. Defrancq, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5293–5307.
- [8] P. Baumann, *G-Quadruplex DNA: Methods and Protocols*, Humana Press, Kansas City, USA, **2009**.
- [9] S. Manna, S. G. Srivatsan, *RSC Adv.* **2018**, *8*, 25673–25694.
- [10] H. Arthanari, S. Basu, T. L. Kawano, P. H. Bolton, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3724–3728.
- [11] G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 182–186.
- [12] B. R. Vummidi, J. Alzeer, N. W. Luedtke, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 540–558.
- [13] B. Jin, X. Zhang, W. Zheng, X. Liu, C. Qi, F. Wang, D. Shangguan, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 943–952.
- [14] D. L. Ma, Z. Zhang, M. Wang, L. Lu, H. J. Zhong, C. H. Leung, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 812–828.
- [15] A. Shivalingam, M. A. Izquierdo, A. L. Marois, A. Vyšniauskas, K. Suhling, M. K. Kuimova, R. Vilar, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1–10.
- [16] P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305–1323.
- [17] F. H. Stootman, D. M. Fisher, A. Rodger, J. R. Aldrich-Wright, *Analyst* **2006**, *131*, 1145–1151.
- [18] T. Simonsson, R. Sjoback, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17379–17383.
- [19] J.-L. Mergny, L. Lacroix, M.-P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittat, M. Hoarau, P. B. Arimondo, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, J.-F. Riou, T. Garestier, C. Helene, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 3062–3067.
- [20] J.-L. Mergny, J. C. Maurizot, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 124–132.
- [21] B. Juskowiak, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *568*, 171–180.
- [22] A. de Rache, J.-L. Mergny, *Biochimie* **2015**, *115*, 194–202.
- [23] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, *6*, 55–75.
- [24] A. Leczkowska, J. Gonzalez-Garcia, C. Perez-Arnaiz, B. Garcia, A. J. P. White, R. Vilar, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 11785–11794.
- [25] R. D. Gillard, *Analyst*, **1963**, *88*, 825–828.
- [26] B. Ranjbar, P. Gill, *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 101–120.
- [27] J. Kypr, I. Kejnovská, D. Renčiuk, M. Vorlíčková, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1713–1725.
- [28] M. Vorlíčková, I. Kejnovská, K. Bednářová, D. Renčiuk, J. Kypr, *Chirality* **2012**, *24*, 691–698.

- [29] M. Vorlíčková, I. Kejnovská, J. Sagi, D. Renčíuk, K. Bednářová, J. Motlová, J. Kyrp, *Methods* **2012**, *57*, 64–75.
- [30] S. Masiero, R. Trotta, S. Pieraccini, S. de Tito, R. Perone, A. Randazzo, G. P. Spada, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2683–2692.
- [31] P. S. Hariharan, V. K. Prasad, S. Nandi, A. Anoop, D. Moon, S. P. Anthony, *Cryst. Growth Des.* **2017**, *17*, 146–155.
- [32] D. A. Case, R. M. Betz, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham, T. A. Darden, R. E. Duke, T. J. Giese, H. Gohlke, A. W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K. M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H. T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C. L. Simmerling, W. M. Botello-Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, P. A. Kollman, *AMBER 2016, Univ. California, San Fr.* **2017**.
- [33] A. T. Phan, V. Kuryavvi, K. N. Luu, D. J. Patel, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 6517–6525.
- [34] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174.
- [35] J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser, C. Simmerling, *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11*, 3696–3713.
- [36] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- [37] D. R. Roe, T. E. Cheatham, *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084–3095.
- [38] *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC, 2015.*
- [39] W. I. Goldberg, *Am. J. Phys.* **1999**, *67*, 1152–1160.
- [40] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, *Biophys. Rev.* **2016**, *8*, 409–427.
- [41] W. Burchard, *Static and Dynamic Light Scattering from Branched Polymers and Biopolymers*, Springer, Berlin, **2007**.
- [42] H. Z. Cummings, E. R. Pike, *Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy*, Springer, New York, **1974**.
- [43] E. Callaway, *Nature* **2017**, *550*, 167–167.
- [44] R. Henderson, P. N. T. Unwin, *Nature* **1975**, *257*, 28.
- [45] A. L. Gray, *Analyst* **1985**, *110*, 551–556.
- [46] D. Beauchemin, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 4786–4810.
- [47] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, *1*, 147–168.
- [48] G. C. Lines, N. Ishii, D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A. Diserens, E. G. van Meir, *Brain Pathol.* **1999**, *9*, 469–479.
- [49] A. C. Diserens, N. de Tribolet, A. Martin-Achard, A. C. Gaide, J. F. Schnegg, S. Carrel, *Acta Neuropathol.* **1981**, *53*, 21–28.
- [50] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, *J. Natl. Cancer. Inst.* **1973**, *51*, 1409–1416.
- [51] B. J. Sugarman, B. B. Aggarwal, P. E. Hass, I. S. Figari, M. Palladino, H. M. Shepard, *Science* **1985**, *230*, 943–946.

- [52] G. O. Gey, W. D. Coffman, M. T. Kubicek, *Cancer Res.* **1953**, *12*, 264–265.
- [53] J. R. Masters, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 311–314.
- [54] W. Strober, *Curr. Protoc. Immunol.* **2001**, A.3B.1-A.3B.2.
- [55] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- [56] M. V. Berridge, A. S. Tan, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303*, 474–482.
- [57] M. Minsky, *Scanning* **1987**, *10*, 128–138.
- [58] B. Chazotte, *Cold Spring Harb. Protoc.* **2011**, *6*, 83–86.

This chapter deals with the synthesis and characterisation of eleven novel polyamine compounds, which are classified within two groups: TPA and TPB derivatives. First of all, a schematic representation of the structural design of each compound is presented. Then, the reaction mechanism and the experimental conditions for the ligand synthesis are briefly described. The characterisation of the obtained compounds is also included. Finally, the preparation and functionalisation of liposome nanoparticles, which include four of these compounds, are detailed.

4.1. - TPA derivatives

As presented in the introduction, TPA is a versatile scaffold which draws the researchers' attention in a wide range of fields. In the following chapters, its geometry, basicity and aggregation appealing properties will be described in detail. With regards to the synthetic point of view, TPA is a convenient reagent for obtaining compounds by further functionalisation, since it is affordable and commercially available. During this thesis, three different ligand families containing the TPA moiety as a central core have been obtained by varying both the nature and the number of polyamine substituents (Figure 4.1).

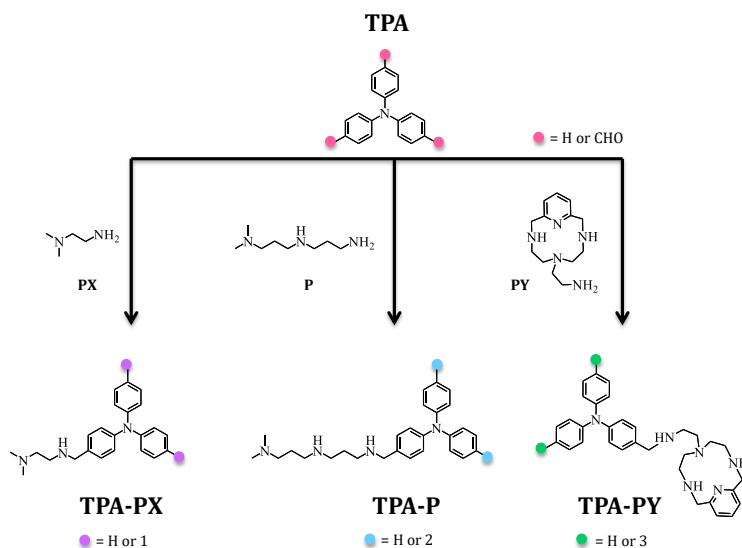


Figure 4.1. Scheme of the TPA derivatives molecular structure and their classification.

Concerning the polyamine substituents, the TPA-PX family includes the N,N-dimethylethylenediamine (PX) as pending arms, whereas TPA-P presents the N,N-dimethylpropylentriamine (P). Both linear polyamines are commercially available, which reduces the complexity of the synthetic protocol. Finally, TPA-PY compounds are functionalised with the 6-(2-Aminoethyl)-3,6,9-triaza-1-(2,6)-pyridinecyclodecaphane (PY), instead of linear polyamines. This latter compound was previously described by the Supramolecular Chemistry Group of the Universitat de València.^[1]

Mechanism of the synthesis

A simple one-pot reaction has been used in order to obtain all the TPA derivatives. The methodology is based on the well-known synthetic method of preparing imines, the Schiff reaction, firstly established by the Italian organic chemist Hugo Schiff.^[2]

A schematic representation of the synthetic mechanism for obtaining a TPA derivative is showed in Figure 4.2. The first step is the condensation of an aldehyde and a primary amine, which acts as a nucleophile attacking the carbonyl carbon. Then, the nitrogen is deprotonated resulting in an imine bond (C=N), with the concomitant formation of a water molecule. The formed imine is reduced by addition of sodium borohydride, which yields to the final polyamine derivative. Commonly the crude product is oily, therefore the final step of the synthesis comprises its precipitation as hydrochloride salt in order to facilitate its manipulation. ^[3,4]

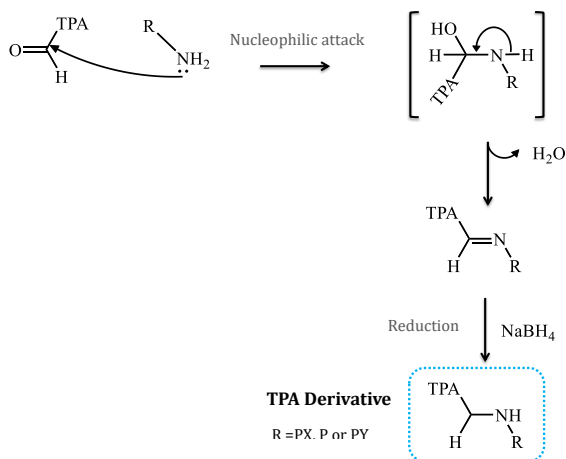


Figure 4.2. General mechanism for the synthesis of a TPA derivative.

In a typical synthetic procedure, the aldehyde used corresponds to either the mono-, bi- or tri-aldehyde of TPA, which functionalisation yields to the final product. Regarding the polyamine substituents either PX, P or PY, would be used depending on the aimed family, TPA-PX, TPA-P or TPA-PY, respectively.

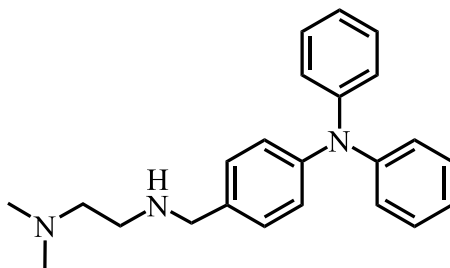
General procedure

Briefly, 1, 2 or 3 equivalents of the corresponding polyamine substituent were dissolved in 50 mL of dry EtOH in order to obtain the mono-, bi- or tri-branched TPA derivative, respectively. As mentioned before, the linear polyamines corresponding to the TPA-PX and TPA-P families were commercially obtained. Alternatively, the aza-macrocyclic substituent of the TPA-PY compounds was synthesised following a protocol previously reported by the Supramolecular Chemistry Group of the Universitat de València.^[1]

Then, a solution of the TPA mono-, bi-, or tri-aldehyde (1 - 2 mmol) in 150 mL of anhydrous EtOH was added dropwise to the above mentioned polyamine solution. The mixture was stirred under nitrogen 12 hours at room temperature, resulting in the formation of the corresponding Schiff base.

The reduction step was carried out by adding 10 equivalents of NaBH₄ and further stirring during 2 hours. Then, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting residue was treated with H₂O (20 mL) and extracted with DCM (3 x 30 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄ and evaporated to afford a yellow oil, which was dissolved with anhydrous ethanol. The final product was obtained as its hydrochloride salt by precipitation with HCl in dioxane (0.4M).

TPA1PX



4-[5-methyl-(2,5-diazahex-1-yl)]triphenylamine

Molecular formula: C₂₃H₂₇N₃·2HCl.

Molecular weight: 418.41 g/mol.

Yield: 50 %.

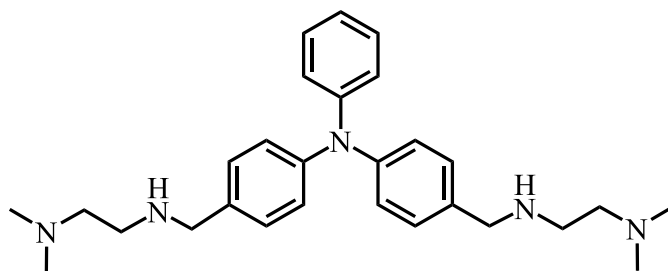
Elemental Analysis Calcd (%) for C₂₃H₂₇N₃·2HCl: C 66.0; H 6.9; N 10.0;
found: C 65.4; H 6.5; N 9.8.

ESI-MS m/z: 346.1 ([M+H]⁺).

¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O): δ = 7.22 (d, *J* = 6 Hz, 2H), 6.92 - 6.88 (m, 4H), 6.78 - 6.72 (m, 8H), 4.14 (s, 2H), 3.64 - 3.52 (m, 4H), 3.00 (s, 6H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O): δ = 151.5, 149.5, 133.8, 132.2, 127.2, 125.9, 125.2, 55.1, 53.8, 46.1, 43.7.

TPA2PX



4,4'-bis[5-methyl-(2,5-diazahex-1-yl)]triphenylamine

Molecular formula: $C_{28}H_{39}N_5 \cdot 4HCl \cdot 1H_2O$.

Molecular weight: 609.12 g/mol.

Yield: 58 %.

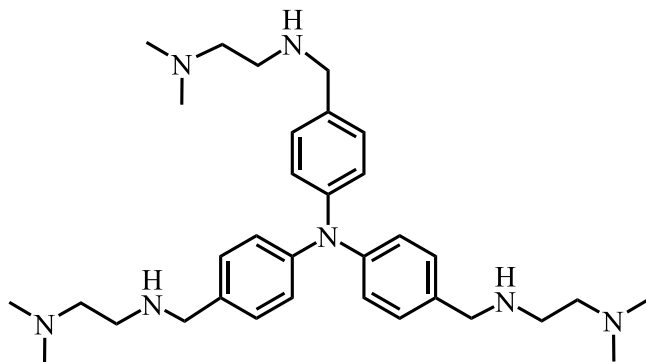
Elemental Analysis Calcd (%) for $C_{28}H_{39}N_5 \cdot 4HCl \cdot 1H_2O$: C 55.2; H 7.4; N 11.5;
found: C 55.4; H 7.9; N 11.3.

ESI-MS m/z: 446.3 ($[M+H]^+$).

1H -NMR (300.1 MHz, D_2O): δ = 7.44 - 7.36 (m, 6H), 7.24 - 7.10 (m, 7H), 4.31 (s, 4H), 3.60 (s, 8H), 3.02 (s, 12H).

^{13}C -NMR (75.4 MHz, D_2O): δ = 149.3, 147.2, 131.9, 130.6, 125.2, 124.9, 124.5, 124.1, 52.8, 51.9, 43.8, 41.2.

TPA3PX



4,4',4''-tris[5-methyl-(2,5-diazahex-1-yl)]triphenylamine

Molecular formula: C₃₅H₅₁N₇·6HCl·2H₂O.

Molecular weight: 800.12 g/mol.

Yield: 62 %.

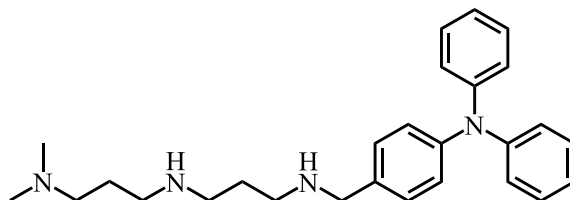
Elemental Analysis Calcd (%) for C₃₅H₅₁N₇·6HCl·2H₂O: C 50.0; H 7.5; N 11.9;
found: C 49.1; H 8.0; N 11.7.

ESI-MS m/z: 546.4 ([M+H]⁺).

¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O): δ = 7.48 - 7.45 (m, 6H), 7.26 - 7.23 (m, 6H), 4.34 (s, 6H), 3.62 (s, 12H), 3.03 (s, 18H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O): δ = 148.6, 131.7, 125.3, 125.1, 52.8, 51.6, 43.8, 41.4.

TPA1P



4-[10-methyl-(2,6,10-undecaphan-1-yl)]triphenylamine

Molecular formula: $C_{27}H_{36}N_4 \cdot 3HCl \cdot 1H_2O$.

Molecular weight: 543.99 g/mol.

Yield: 53 %.

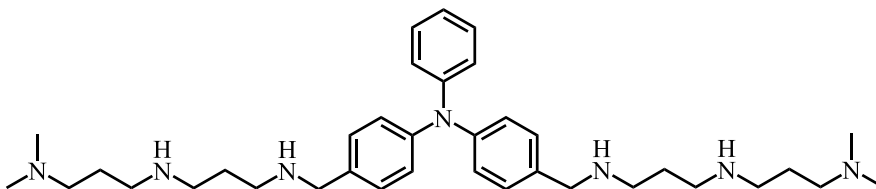
Elemental Analysis Calcd (%) for $C_{27}H_{36}N_4 \cdot 3HCl \cdot 1H_2O$: C 59.6; H 7.6; N 10.3;
found: C 60.2; H 8.3; N 11.7.

ESI-MS m/z: 417.0 ($[M+H]^+$).

1H -NMR (300.1 MHz, D_2O): δ = 7.24 (d, J = 9 Hz, 2H), 7.05 - 7.00 (m, 4H), 6.89 - 6.84 (m, 8H), 4.09 (s, 2H), 3.32 - 3.27 (m, 2H), 3.22 - 3.14 (m, 6H), 2.95 (s, 6H), 2.26 - 2.14 (m, 4H).

^{13}C -NMR (75.4 MHz, D_2O): δ = 149.1, 147.4, 131.5, 129.9, 125.1, 124.0, 123.1, 54.6, 51.2, 45.1, 44.9, 44.2, 43.2, 23.1, 21.7.

TPA2P



4,4'-bis[10-methyl-(2,6,10-undecaphan-1-yl)]triphenylamine

Molecular formula: C₃₆H₅₇N₇·6HCl.

Molecular weight: 806.23 g/mol.

Yield: 61 %.

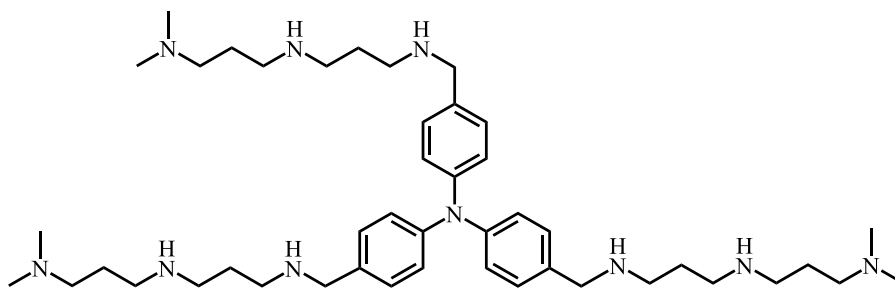
Elemental Analysis Calcd (%) for C₃₆H₅₇N₇·6HCl: C 50.8; H 13.9; N 11.2;
found: C 53.6; H 7.9; N 12.1.

ESI-MS m/z: 588.3 ([M+H]⁺).

¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O): δ = 7.43 - 7.37 (m, 6H), 7.24 - 7.16 (m, 7H), 4.24 (s, 4H), 3.33 - 3.18 (m, 16H), 2.95 (s, 12H), 2.26 - 2.13 (m, 8H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O): δ = 148.9, 147.2, 131.6, 130.2, 126.0, 124.9, 124.1, 54.6, 51.1, 45.1, 44.9, 44.1, 43.2, 23.1, 21.6.

TPA3P



4,4',4''-tris[10-methyl-(2,6,10-undecaphan-1-yl)]triphenylamine

Molecular formula: C₄₅H₇₈N₁₀·9HCl·8H₂O.

Molecular weight: 1231.33 g/mol.

Yield: 72 %.

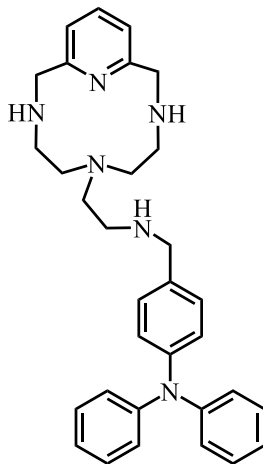
Elemental Analysis Calcd (%) for C₄₅H₇₈N₁₀·9HCl·8H₂O: C 43.9; H 8.4; N 11.4; **found:** C 45.7; H 10.9; N 11.6.

ESI-MS m/z: 759.53 ([M+H]⁺).

¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O): δ = 7.45 (d, *J* = 10 Hz, 6H), 7.24 (d, *J* = 9 Hz, 6H), 4.27 (s, 6H), 3.33 - 3.20 (m, 24H), 2.95 (s, 18H), 2.28 - 2.13 (m, 12H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O): δ = 148.5, 131.7, 125.7, 125.0, 54.6, 51.2, 45.1, 44.9, 44.2, 43.2, 23.1, 21.6.

TPA1Y



4-{4-[3,6,9-triaza-1(2,6)pyridinecyclodecapa-6-yl]-2-azabutyl}triphenylamine

Molecular formula: C₃₂H₃₈N₆·3HCl·2.5H₂O.

Molecular weight: 660.21 g/mol.

Yield: 23 %.

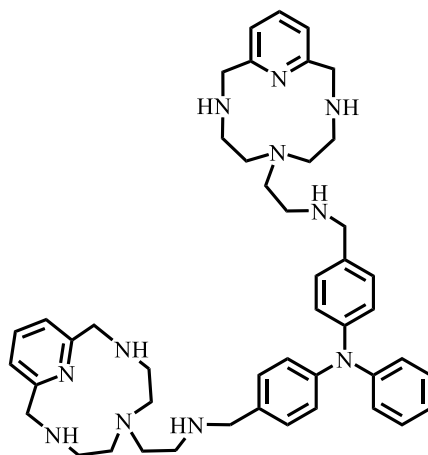
Elemental Analysis Calcd (%) for C₃₂H₃₈N₆·3HCl·2.5H₂O: C 58.2; H 7.0; N 12.7; **found:** C 58.0; H 7.5; N 12.7.

ESI-MS m/z: 507.3 ([M+H]⁺).

¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O): δ = 7.88 (t, *J* = 8 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.00 (t, *J* = 15 Hz, 4H), 6.82 (d, 8H), 4.57 (s, 4H), 4.08 (s, 2H), 3.29 - 3.15 (m, 6H), 3.04 - 2.96 (m, 2 H), 2.88 - 2.78 (m, 4H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O): δ = 149.2, 147.5, 140.2, 131.6, 129.9, 125.1, 124.1, 123.1, 122.6, 51.4, 50.8, 49.9, 46.3, 30.6.

TPA2PY



4,4'-bis{4-[3,6,9-triaza-1(2,6)pyridinecyclodecapha-6-yl]-2-azabutyl}triphenylamine

Molecular formula: C₄₆H₆₁N₁₁·5HCl·6.7H₂O.

Molecular weight: 768.07 g/mol.

Yield: 47 %.

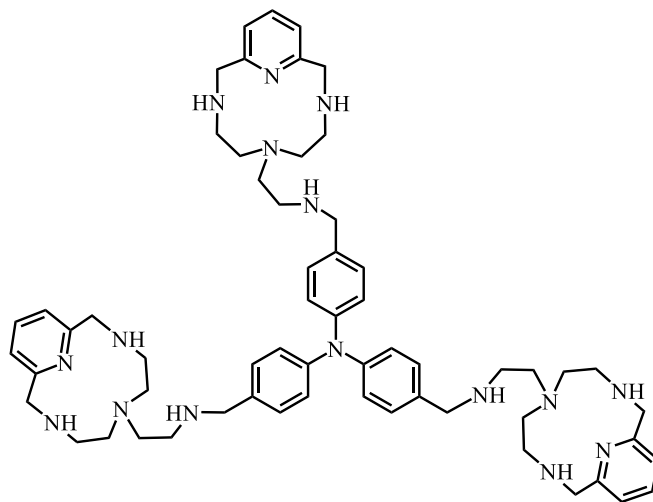
Elemental Analysis Calcd (%) for C₄₆H₆₁N₁₁·5HCl·6.7H₂O: C 51.6; H 7.5; N 14.4; **found:** C 51.9; H 7.8; N 14.3.

ESI-MS m/z: 384.0 ([M+2H]⁺).

¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O): δ = 8.00 (t, *J* = 8 Hz, 2H), 7.51 - 7.40 (m, 11H), 7.27 - 7.19 (m, 7H) 4.68 (s, 8H), 4.29 (s, 4H), 3.41 - 3.30 (m, 12H), 3.16 - 3.10 (m, 4H), 2.99 - 2.95 (m, 8H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O): δ = 151.8, 151.5, 149.8, 142.7, 134.2, 132.8, 128.6, 127.5, 126.6, 125.1, 54.0, 53.8, 53.4, 52.4, 48.8, 45.5.

TPA3PY



4,4',4''-tris{4-[3,6,9-triaza-1(2,6)pyridinecyclodecapha-6-yl]-2-azabutyl}triphenylamine

Molecular formula: C₆₀H₈₄N₁₆·9HCl·11H₂O.

Molecular weight: 1556.20 g/mol.

Yield: 22 %.

Elemental Analysis Calcd (%) for C₆₀H₈₄N₁₆·9HCl·11H₂O: C 46.3; H 7.4; N 14.4; **found:** C 46.8; H 7.8; N 14.0.

ESI-MS m/z: 1030.4 ([M+H]⁺).

¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O): δ = 7.98 (t, *J* = 8 Hz, 3H), 7.34 - 7.28 (m, 12H), 7.22 (d, *J* = 9 Hz, 6H), 4.66 (s, 12H), 4.31 (s, 6H), 3.42 - 3.29 (m, 18H), 3.19 - 3.08 (m, 6H), 3.12 (m, 6H), 3.02 2.98 (m, 12H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O): δ = 149.5, 148.8, 140.4, 131.9, 126.1, 125.2, 122.8, 51.7, 51.5, 51.1, 50.1, 46.5, 43.3.

4.2. - TPB derivatives

Aiming to modify the hydrophobicity and aromaticity of the compounds above described, the TPA central moiety was substituted by the scaffold 1,3,5-tris(4-formylbenzyl)benzene (TPB-3CHO). Since tri-branched derivatives were expected to show the most promising properties due to their possibility to accommodate high positive charge at physiological pH, two additional tri-branched compounds were synthesised containing the TPB moiety as a central core, TPB3P and TPB3PY, which are analogous to TPA3P and TPA3PY, respectively (Figure 4.3).

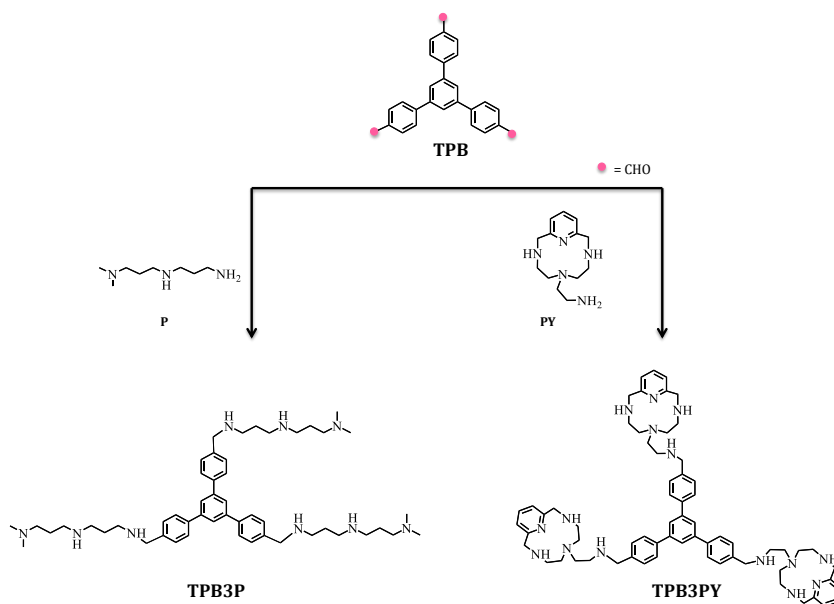


Figure 4.3. Scheme of the TPB derivatives molecular structure and their classification.

Mechanism of the synthesis

The synthetic pathway for the TPB-3CHO formation relies on the thoroughly studied Suzuki cross-coupling reaction (Figure 4.3).^[5,6] The first step is an oxidative addition of the organohalide to a Pd (0) complex, yielding to a Pd (II) complex. The next step is the transmetalation between the organoborane and the Pd (II) complex, under basic conditions. Finally, a reductive elimination takes place yielding to the desired product, followed by the regeneration of the initial Pd (0) complex.

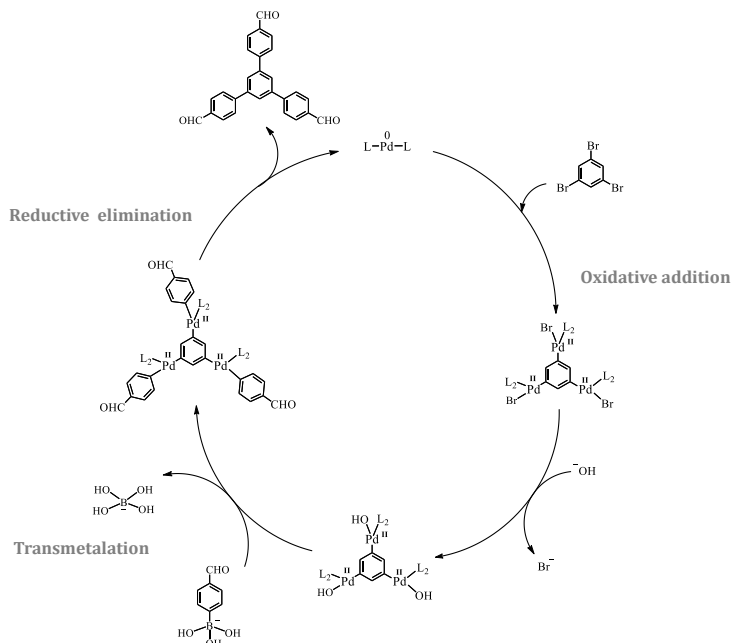


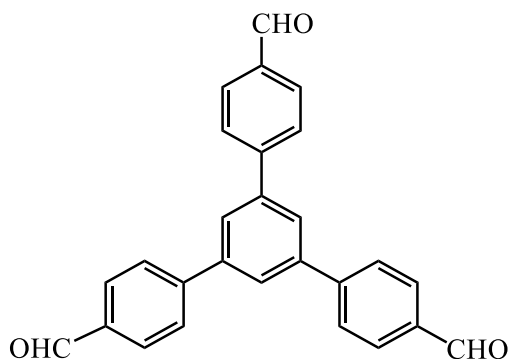
Figure 4.3. Mechanism of the Suzuki cross coupling reaction for the TPB-3CHO synthesis.

General procedure

Firstly, 1,3,5-tribromobenzene (1.0 g, 3.2 mmol), 4-formylphenylboronic acid (1.5 g, 95.3 mmol) and bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride (300 mg, 0.4 mmol) were added into a 1 L round-bottom flask, which was evacuated and backfilled with nitrogen three times. After incorporating 200 mL of degasified THF, the mixture was heated to reflux 12 hours under nitrogen. Then, the solution was extracted with DCM (3 x 50 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated under reduced pressure. The crude product was recrystallized from acetonitrile, obtaining white crystals (TPB-3CHO).^[7]

The functionalisation of the TPB moiety is analogous to the described for the TPA scaffold. Particularly, a solution of 1 equivalent of TPB-3CHO in anhydrous DCM was added dropwise to an anhydrous EtOH solution of 3 equivalents of either P or PY. Then, the mixture was stirred for 12 hours under nitrogen. The solvent was removed under reduced pressure and the resulting crude product was treated with water (25 mL) and extracted with DCM (3 x 40 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated to afford a yellow oil. Finally, the oily product was dissolved in anhydrous ethanol and precipitated with HCl in dioxane (0.4 M), yielding the hydrochloride salt of TPB3P or TPB3PY.

TPB



1,3,5-tris(4-formylphenyl)benzene

Molecular formula: C₂₇H₁₈O₃·1H₂O.

Molecular weight: 408.13 g/mol.

Yield: 53 %.

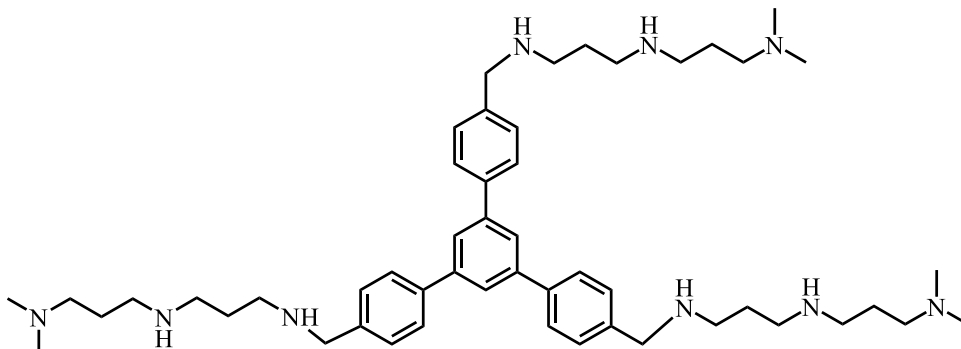
Elemental Analysis Calcd (%) for C₂₇H₁₈O₃·1H₂O: C 79.4; H 4.9; **found:** C 79.8; H 5.9.

ESI-MS m/z: 309.1 ([M+H]⁺).

¹H-NMR (300.1 MHz, CDCl₃): δ = 10.10 (s, 3H), 8.04 (d, *J* = 8 Hz, 6H), 7.91 (s, 3H), 7.87 (d, *J* = 9 Hz, 6H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, CDCl₃): δ = 191.8, 146.3, 141.6, 135.8, 130.4, 128.0, 126.5.

TPB3P



1,3,5-tris{4-[10-methyl-2,6,10-triazaundecaphan-1-yl]}phenyl}benzene

Molecular formula: C₅₁H₈₁N₉·9HCl.

Molecular weight: 1148.41 g/mol.

Yield: 66 %.

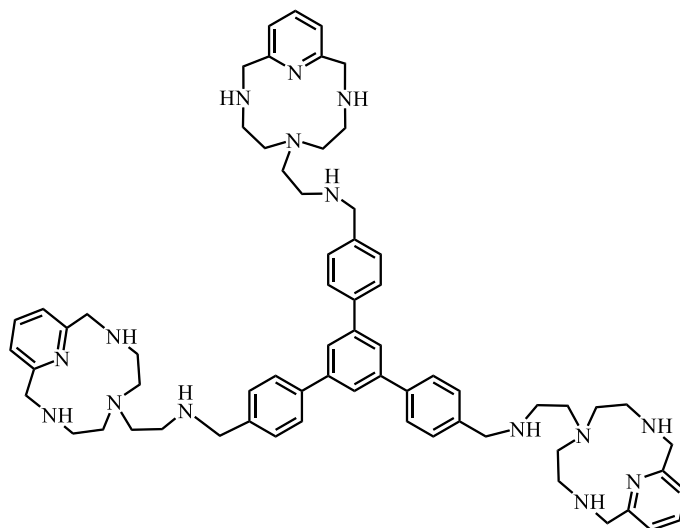
Elemental Analysis Calcd (%) for C₅₁H₈₁N₉·9HCl: C 53.3; H 7.9; N 10.9;
found: C 53.5; H 8.1; N 10.5.

ESI-MS m/z: 820.6 ([M+H]⁺).

¹H-NMR (300.1 MHz, D₂O): δ = 7.85 (s, 3H), 7.78 (d, *J* = 7 Hz, 6H), 7.54 (d, *J* = 7 Hz, 6H), 4.27 (s, 6H), 3.21 - 3.07 (m, 24H), 2.17 - 2.04 (m, 12H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, D₂O): δ = 141.3, 130.5, 130.0, 127.9, 125.2, 54.2, 51.0, 44.7, 44.5, 44.0, 42.8, 22.7, 21.2.

TPB3PY



1,3,5-tris{4-[3,6,9-triaza-1(2,6)pyridinecyclodecaphan-6-yl]2-azabutyl}benzene

Molecular formula: C₆₆H₈₇N₁₅·9HCl·2H₂O.

Molecular weight: 1419.03 g/mol.

Yield: 52 %.

Elemental Analysis Calcd (%) for C₆₆H₈₇N₁₅·9HCl: C 55.8; H 7.3; N 11.7;
found: C 56.2; H 7.6; N 11.4.

ESI-MS m/z: 1090.8 ([M+H]⁺).

¹H-NMR (300.1 MHz, MeOD): δ = 7.98 (t, *J* = 15 Hz), 7.81 - 7.68 (m, 12 H), 7.54 - 7.44 (m, 9H), 4.67 (s, 12H), 4.41 (s, 6H), 3.45 (s, 12H), 3.25 (s, 24H).

¹³C-NMR (75.4 MHz, MeOD): 149.4, 139.2, 130.7, 127.4, 127.3, 126.9, 121.6, 51.5, 50.6, 50.2, 49.3, 45.7.

4.3. - Liposome preparation

Some of the compounds synthesised during this thesis have been encapsulated inside liposome nanoparticles. The liposome preparation is based on the intrinsic amphiphilic character of phospholipids, which causes their self-assembly into spherical vesicles in an aqueous medium (Chapter 1).

Among all the synthetic available techniques, the conventional lipid film hydration has been used due to its simplicity and relatively low cost. This method involves five basic steps: mixing the phospholipids in an organic solvent, the formation of a lipid film onto a substrate, the hydration of the film by adding an aqueous solution containing the to-be-encapsulated compound and finally, the sonication of the suspension followed by its purification.^[8-11]

Regarding the liposomes design, different amphiphilic moieties were included at the formulations, aiming to obtain multifunctional nanoparticles. Specifically, a fluorescent phospholipid (NBD-DPPE) and a gadolinium complex (Gd-DTPA-DSA) were used conferring diagnostic capabilities to the vesicles, by means of not only confocal microscopy, but also Magnetic Resonance Imaging (MRI) (Figure 4.5).

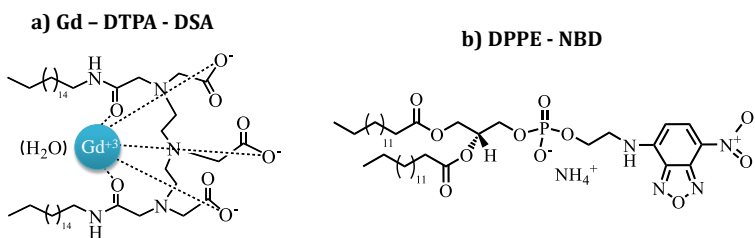


Figure 4.5. Molecular structure of a) Gd-DTPA-DSA and b) DPPE-NBD.

Apart from imaging applications, the composition of the different liposome formulations allows their application as therapeutic agents, since four of the synthesised compounds (TPA3P, TPA3PY, TPB3P and TPB3PY) were encapsulated within the vesicles. This specific design provides nanoparticles with theranostic properties, combining in the same system both therapy and diagnostic functionalities. Furthermore, nanoparticles were functionalised with the aptamer AS1411, aiming to target the nucleolin overexpressed in cancer cells (Figure 4.6).

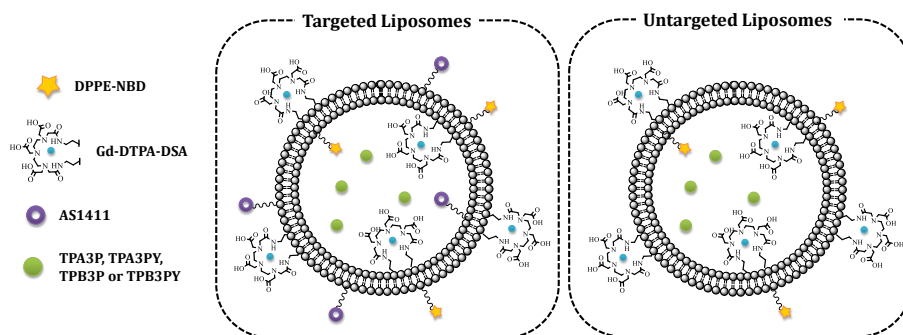


Figure 4.6. Representation of the liposome formulations designed during this thesis.

General procedure

- Step 1: Solubilisation of the membrane components

All the components of the liposome bilayer were dissolved in 5 mL of CHCl_3 in order to ensure a complete and homogenous mixing. The formulation used in a typical synthesis was 80% POPC, 6% mPEG2000-DSPE, 2% NBD-DPPE, 5% Gd-DTPA-DSA and 7% Tween 80.

- Step 2: Solvent evaporation

The removal of the organic solvent was carried out by heating up to 65°C continuously stirring, yielding the formation of a thin lipid film. Then, the film was further dried at high vacuum overnight.

- Step 3: Hydration of the lipid film

Once the lipid film was completely dried, 4 mL of a 10 mM solution of either TPA3P, TPA3PY, TPB3P or TPB3PY in PBS were added. In the case of targeted liposomes, 250 μL of 21.8 μM AS1411 solution were also included. The solution was swirled with a bath sonicator until all the lipids were incorporated to the solution. The resulting suspension contained multilamellar liposomes, which inner aqueous core included the desired compound.

- Step 4: Sonication of the suspension

The following step was the disruption of the multilamellar vesicles by probe sonication, yielding unilamellar nanoparticles with diameters ranging from 80 to 120 nm, depending on the formulation. The process comprises three cycles of 15 minutes sonication.

- Step 5: Purification

The suspension was centrifuged (3200 r.p.m., 10 minutes) in order to remove the metal particles from the tip of the sonicator probe. Finally, unencapsulated compounds were removed by thorough dialysis in PBS.

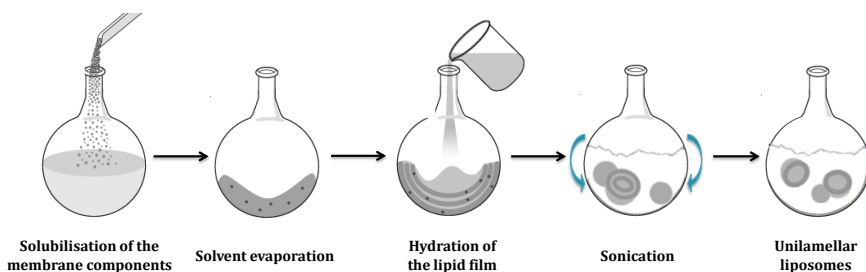


Figure 4.7. Representation of the lipid film formation process.

4.5. - References

- [1] B. Verdejo, A. Ferrer, S. Blasco, C. E. Castillo, J. González, J. Latorre, M. A. Máñez, M. G. Basallote, C. Soriano, E. García-España, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 5707–5719.
- [2] H. Schiff, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1864**, *131*, 118–119.
- [3] W. Qin, S. Long, M. Panunzio, S. Biondi, *Molecules* **2013**, *18*, 12264–12289.
- [4] E. H. Cordes, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 832–837.
- [5] A. Suzuki, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6723–6733.
- [6] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457–2483.
- [7] Z. Gong, B. Yang, H. Lin, Y. Tang, Z. Tang, J. Zhang, H. Zhang, Y. Li, Y. Xie, Q. Li, et al., *ACS Nano* **2016**, *10*, 4228–4235.
- [8] M. R. Mozafari, *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2005**, *10*, 711–719.
- [9] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, *1*, 147–168.
- [10] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S. W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifepour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8*, 102.
- [11] Y. P. Patil, S. Jadhav, *Chem. Phys. Lipids* **2014**, *177*, 8–18.

Polyamine derivatives may be protonated depending on the pH range, therefore their net charge may vary from one pH value to another. The protonation degree of these compounds plays a key role in both their photophysical properties and their electrostatic interactions with other substrates. Consequently, this chapter describes the acid-base behaviour of the synthesised ligands. Several techniques have been used to address this study, such as potentiometric or spectroscopic titrations. The data obtained enabled the determination of the protonation constants and the construction of the distribution diagrams of species, within a specific pH interval. Moreover, some of the compounds present striking aggregation properties, which were further investigated by means of both UV/Vis and fluorescence spectroscopy.

5.1. - TPA derivatives

Background

The molecular structure of the TPA derivatives is depicted in Figure 5.1. The families of compounds differ from each other by the substituents. The branches of the TPA-PX and TPA-P families are linear polyamines (PX and P, respectively), while the pending arms of the TPA-PY family correspond to PY macrocycles.

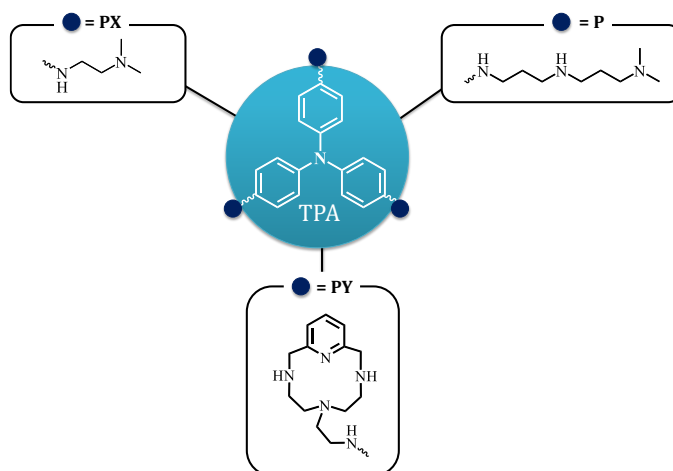


Figure 5.1. Depiction of the synthesised TPA derivatives: TPA-PX, TPA-P and TPA-PY.

Prior to analyse the acid-base behaviour of these compounds, it is crucial to consider which amino groups are susceptible for protonation. Each ligand includes secondary and tertiary amines, which may be protonated. However, it is well-described in the literature that the basicity of the TPA amine is remarkably low due to the delocalization of the electron lone pair throughout the aromatic structure.^[1-6] Consequently, it was not amenable to analysis at the pH range investigated (pH = 2 - 11).

Aggregation-Induced Emission (AIE)

The definition of luminescence, either fluorescence or phosphorescence, is referred to the emission caused by the radiative de-excitation of an electronic state after absorption of light (Figure 5.2).^[7,8] Although this concept dates back to 1900s, the design of fluorescent molecules still remains a hot topic in the scientific research.

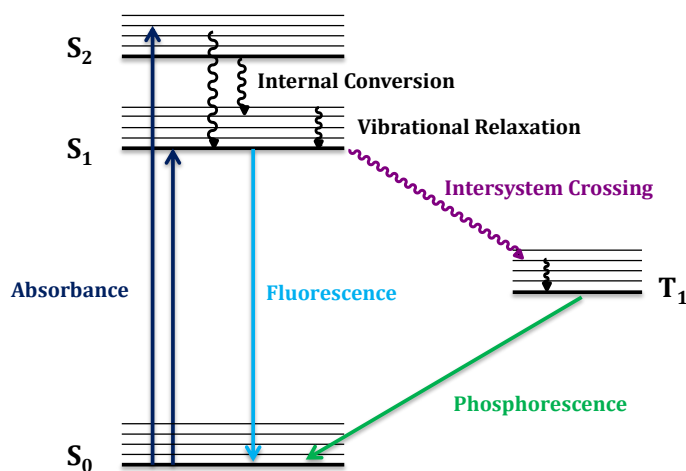


Figure 5.2. Jablonski's diagram illustrating possible transitions between electronic states.

Indeed, emissive compounds are particularly intriguing in life sciences and medicine, since they may provide relevant insights into biological processes and moreover, they may serve as helpful sensors for developing targeted therapies. However, some probes usually display a notably detrimental counterpart, since as their concentration increases, the emission may be partially or completely reduced.

This phenomenon is known as Aggregation-Caused Quenching (ACQ). Typically, spatially close aromatic planar molecules display π - π stacking. The de-excitation of the corresponding aggregates often occurs via radiative pathways from the excited state to the ground state, for example through excimer formation.^[9,10]

For instance, perylene is highly emissive when dissolved in “good solvents”, such as water. However, as the content in “poor solvent” increases, the molecules tend to aggregate, establishing π - π interactions. This fact promotes the formation of excimers, which cause the quenching of the fluorescence (Figure 5.3).^[11]

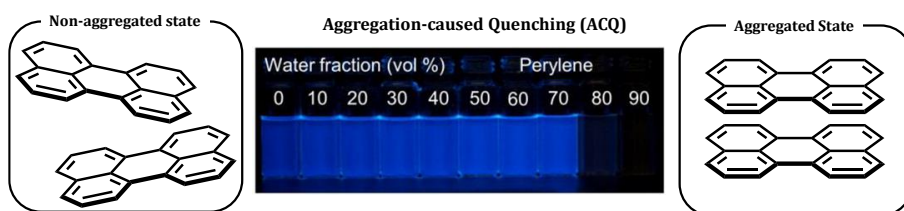


Figure 5.3. Images of 20 μ M perylene fluorescence in different THF/water mixtures. At high water content, the ACQ effect is observed due to π - π stacking at the aggregates. Adapted from [11].

Nevertheless, there are other probes that show the exactly opposite effect to ACQ, the Aggregation-Induced Emission (AIE). Commonly these fluorescent molecules, despite containing aromatic units, are non-planar due to steric restrictions. In the aggregate state, their highly twisted conformation hampers the formation of strong π - π stacking interactions. Several hypotheses have been proposed in order to elucidate the mechanistic pathway of the AIE effect.^[12] Among them, the restriction of intramolecular rotations (RIR) has provided solid insights into the understanding of AIE.^[13]

The hexaphenylsilole (HPS) is an illustrative example of the AIE effect. This propeller-shaped molecule undergoes dynamic intramolecular rotations when dissolved in “good solvents”, which allows its non-radiative de-excitation. Nonetheless in a “poor solvent” solution, HPS molecules tend to aggregate (without establishing robust π - π interactions owing to its propeller conformation), leading to the restriction of intramolecular rotations (RIR). Consequently, for the aggregate state the non-radiative pathway is blocked, providing a remarkable fluorescence (Figure 5.4).^[13]

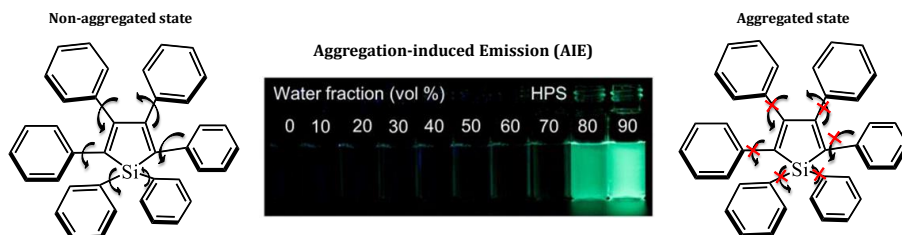


Figure 5.4. Images of 20 μM HPS fluorescence in different THF/water mixtures. At high water content, the AIE effect is observed due to the restriction of intramolecular rotations (RIR effect). Adapted from [11].

TPA moiety: a versatile AIE luminogen

Currently, several efforts have been addressed to develop novel AIE probes. In this context, the triphenylamine (TPA) is considered as a fascinating building block for the design of light-up probes, owing to its easily functionalisation and outstanding AIE effect.^[14–16]

The TPA moiety shows a D_3 propeller shape geometry with twisted bonds around the central nitrogen, resulting from the steric hindrances caused by the hydrogens of the phenyl groups.^[17] This twisted molecular conformation favours the intramolecular rotations, which not only helps in dissipating the excitation energy in the solution state, but also prevents the formation of π - π interactions in the aggregated state. Thereby, the phenyl groups rotate continuously in dilute solutions, annihilating the excited state through non-radiative relaxation. Conversely, aggregated TPA molecules are firmly packed without establishing π - π interactions, which hampers the intramolecular rotations (RIR effect) and restores the emission (Figure 5.5).

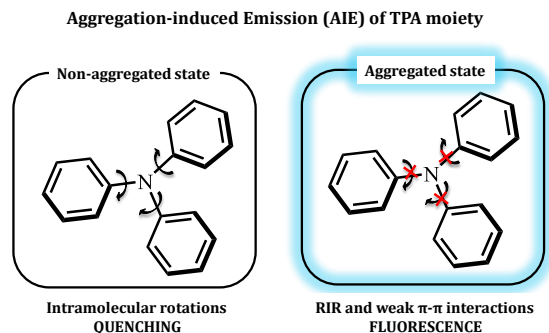


Figure 5.5. Illustration of the AIE effect for the TPA moiety. The RIR and the reduced π - π interactions at the aggregates result in the enhancement of the emission.

As well as other photophysical properties, the AIE effect strongly depends on the protonation state of the considered molecule, since the establishment of supramolecular interactions are subjected to the net charge. In this chapter the AIE effect showed by some of the TPA derivatives is explained by means of spectroscopic studies, taken into account the protonation state of the compounds.

5.1.1. - TPA-PX derivatives

The family of TPA-PX comprises three ligands which include the TPA moiety as a central aromatic core and one, two or three PX linear chains as substituents for TPA1PX, TPA2PX and TPA3PX, respectively (Figure 5.1).

The logarithms of the stepwise protonation constants obtained by means of potentiometric titrations are shown in Table 5.1. The compound TPA1PX displays two, TPA2PX four and TPA3PX six measurable protonation steps in the studied pH range, which correspond to the number of secondary and tertiary amines in the substituents of each ligand. The Figures 5.6, 5.7 and 5.8 include the distribution diagrams of species obtained from the protonation constants, as well as the absorbance and emission spectra of the TPA-PX compounds as pH function.

As mentioned before, the extremely low basicity of the TPA core prevents the determination of its protonation constant. Furthermore, some precipitation due to aggregation processes was observed at high pH values, which complicated the analysis of the obtained data.

Table 5.1. Logarithms of the stepwise protonation constants of the three TPA-PX ligands determined by potentiometric titrations.^[a-c]

Reaction	TPA1PX	TPA2PX	TPA3PX
$H + L \rightleftharpoons HL$	8.23(2)	9.16(2)	9.881(7)
$H + HL \rightleftharpoons H_2L$	6.28(2)	9.03(1)	9.020(8)
$H + H_2L \rightleftharpoons H_3L$		6.60(2)	8.930(6)
$H + H_3L \rightleftharpoons H_4L$		5.72(2)	6.86(1)
$H + H_4L \rightleftharpoons H_5L$			5.87(1)
$H + H_5L \rightleftharpoons H_6L$			5.50(1)
$\log \beta$	14.51(2)	30.52(2)	46.07(1)

[a] Charges omitted for clarity. [b] Experiments were carried out in a 0.15 M NaCl aqueous solution at 298.1±1 K. [c] Values in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

Considering the protonation constants for TPA2PX, it is possible to arrange two groups containing two protonation constants. This sort of arrangement is also shown by the tri-branched compound TPA3PX, in which the protonation constants can be classified in two groups of three values. The reason why the values of the first group decrease each protonation step deals with statistical probability. The values of the second group of constants are generally lower, since these protonation steps create significant electrostatic repulsions in the substituents already protonated.

Several factors contribute to the basicity of amines in water. For instance the inductive effect of alkyl groups makes tertiary amines more susceptible for protonation, whereas the solvation effect favours the protonation of primary amines.^[18,19] In addition to this, the hydrophobic character of TPA derivatives may also interfere in the protonation capability. Taking all these points into account, the establishment of a protonation sequence must be proposed based on the combination of potentiometric, NMR and computational data.

Particularly, the value of the first protonation constant of the mono-branched TPA1PX is lower in comparison with the bi-branched TPA2PX and tri-branched TPA3PX. This fact may be rationalised in terms of statistical probability, due to the increase of protonation sites as the number of substituents increases. This first protonation step may be possibly associated with the dimethylated amine at the substituents ends, considering the inductive effect of the alkyl groups and the hydrophobicity of the TPA moiety.^[20] During this thesis, NMR spectra at different pH were recorded in order to shed light on this hypothesis. However, the large extent of the aggregation widens the signals in the spectra, preventing the accurate interpretation of the data.

Within the context of this thesis, the net charge at pH 7.4 is essential to assess, since it corresponds to the predominant pH value at physiological medium. As it might be expected, the higher number of branches the derivative has, the higher positive charge it shows, being 1.0, 2.1 and 3.2 for TPA1PX, TPA2PX and TPA3PX, respectively.

The UV/Vis spectra of the TPA-PX ligands (Figures 5.6a, 5.7a and 5.8a), show a band centred at 285 - 330 nm, which can be associated with the π - π^* transition of the TPA moiety.^[21,22] The variation of the absorption profile is nearly negligible, which may deal with the fact that the TPA core cannot be protonated in the studied pH range.

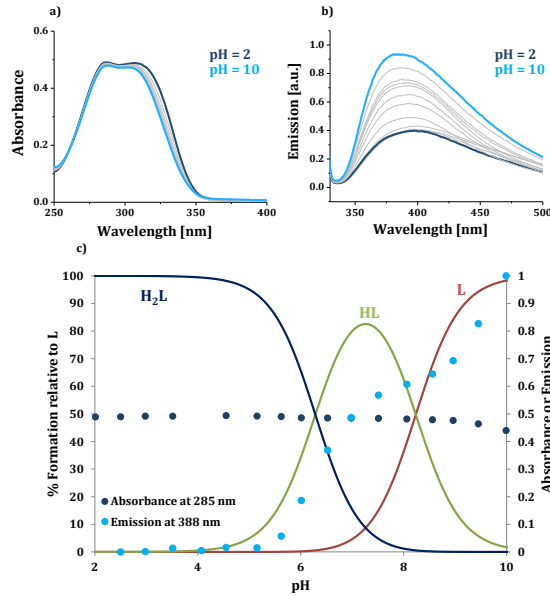


Figure 5.6. a) UV/Vis spectra of TPA1PX versus pH; b) normalized emission of TPA1PX versus pH and c) molar fraction distribution diagram for protonated species of TPA1PX superposed to its normalized emission at 388 nm ($\lambda_{ex} = 309$ nm) (●) and the absorbance at 285 nm (●).

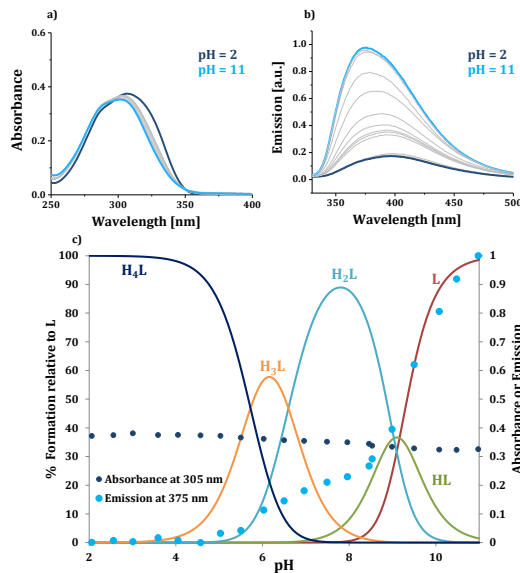


Figure 5.7. a) UV/Vis spectra of TPA2PX versus pH; b) normalized emission of TPA2PX versus pH and c) molar fraction distribution diagram for protonated species of TPA2PX superposed to its normalized emission at 375 nm ($\lambda_{ex} = 309$ nm) (●) and the absorbance at 305 nm (●).

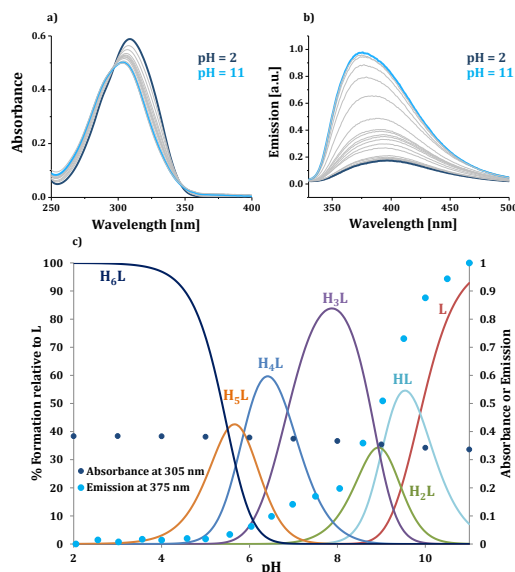


Figure 5.8. a) UV/Vis spectra of TPA3PX versus pH; b) normalized emission of TPA3PX versus pH and c) molar fraction distribution diagram for protonated species of TPA3PX superposed to its normalized emission at 375 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 309$ nm) (●) and the absorbance at 305 nm (●).

The modifications in the emission spectra of the TPA-PX compounds are of notably relevance (Figures 5.6b, 5.7b and 5.8b). Upon increasing pH, a remarkable enhancement and a blue-shift of the emission are observed. This pattern, particularly pronounced for the tri-branched compound, may be justified in terms of AIE.

As described above, the TPA-PX positive charge in acidic medium may hinder the formation of intermolecular interactions. Moreover, the intramolecular rotations of the phenyl groups enable the relaxation of the excited state through a non-radiative pathway. Consequently, the fluorescence at low pH is reduced. Nonetheless, as the pH increases the deprotonation of the ligands results in the formation of intermolecular interactions, such as hydrogen bonding. As a result, molecules tend to pack forming aggregates yielding the restriction of intramolecular rotations (RIR).

Given the propeller shape of the TPA moiety, the establishment of π - π interactions in the aggregates are hampered and this, in conjunction with the RIR, may be responsible of the AIE effect observed at alkali pH.

In order to corroborate the aggregates formation, the UV/Vis and the emission spectra of TPA3PX were registered upon increasing the concentration at pH 12 (Figure 5.9).

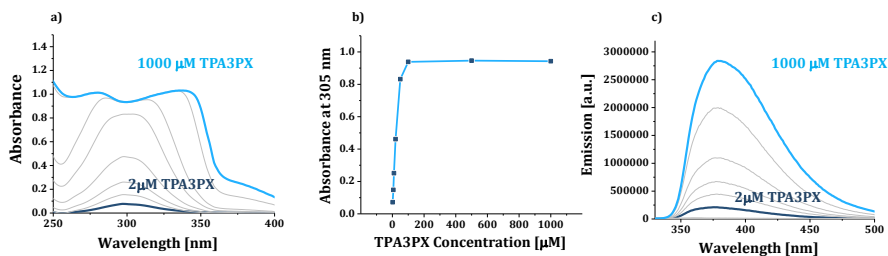


Figure 5.9. a) UV/Vis spectra upon increasing TPA3PX concentration at pH 12 b) absorbance at 305 nm versus TPA3PX concentration at pH 12 and c) emission spectra upon increasing TPA3PX concentration at pH 12 ($\lambda_{\text{ex}} = 309 \text{ nm}$).

The absorbance bands level off at high TPA3PX concentrations and furthermore, the band tail rises at the visible region of the spectra, demonstrating the formation of nanoaggregates by Mie dispersion.^[23,24] Regarding the emission, a blue-shifted enhancement is observed without the emergence of a new emission band, which is associated with a weak AIE effect.^[25]

5.1.2. - TPA-P derivatives

The TPA-P series (Figure 5.1) includes three compounds, in which the central TPA moiety is functionalised with one, two or three P linear chains (TPA1P, TPA2P and TPA3P, respectively).

In Table 5.2 are shown the logarithms of the stepwise protonation constants of the TPA-P ligands. Three, six and nine protonation reactions were observed for TPA1P, TPA2P and TPA3P respectively, which corresponds to the number of secondary and tertiary amines in the compounds. The protonation associated to TPA central amine was not detected in the investigated pH range.

Table 5.2. Logarithms of the stepwise protonation constants of the three TPA-P ligands determined by potentiometric titrations.^[a-c]

Reaction	TPA1P	TPA2P	TPA3P
$H + L \rightleftharpoons HL$	8.93(1)	10.268(9)	10.66(2)
$H + HL \rightleftharpoons H_2L$	8.874(6)	9.42(5)	10.22(6)
$H + H_2L \rightleftharpoons H_3L$	7.327(9)	8.75(2)	9.91(2)
$H + H_3L \rightleftharpoons H_4L$		8.61(1)	9.27(1)
$H + H_4L \rightleftharpoons H_5L$		7.49(2)	8.76(1)
$H + H_5L \rightleftharpoons H_6L$		7.10(2)	8.37(1)
$H + H_6L \rightleftharpoons H_7L$			7.77(1)
$H + H_7L \rightleftharpoons H_8L$			7.29(1)
$H + H_8L \rightleftharpoons H_9L$			6.82(1)
$\log \beta$	25.132(9)	51.64(2)	78.98(1)

[a] Charges omitted for clarity. [b] Experiments were carried out in a 0.15 M NaCl aqueous solution at 298.1±1 K. [c] Values in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

In general, the values for the TPA-P ligands are higher than the corresponding ones for the TPA-PX family. This fact may be related to the molecular structure of the compounds. The TPA-P derivatives include propylene-based chains, in which the electrostatic repulsions are smaller than those for TPA-PX compounds with ethylene-based chains.

The observed trends within each compound can be analysed analogously to the TPA-PX family. The value of the first protonation constant of the mono-branched TPA1P is lower than those for the bi-branched TPA2P and tri-branched TPA3P compound, which may be explained by the lower available protonation sites for TPA1P in comparison to TPA2P and TPA3P. Moreover, the tendency to protonation decreases as the number of protonated amines increases, which is expected in terms of electrostatic repulsions and statistical probability.

The distribution diagrams of species for the TPA-P ligands are shown in Figures 5.10, 5.11 and 5.12, as well as their corresponding absorbance and emission spectra as pH function. As a consequence of the higher number of amines, the TPA-P compounds are more charged at physiological pH (7.4) than the TPA-PX derivatives (2.4, 4.8 and 7.3 for TPA1P, TPA2P and TPA3P, respectively).

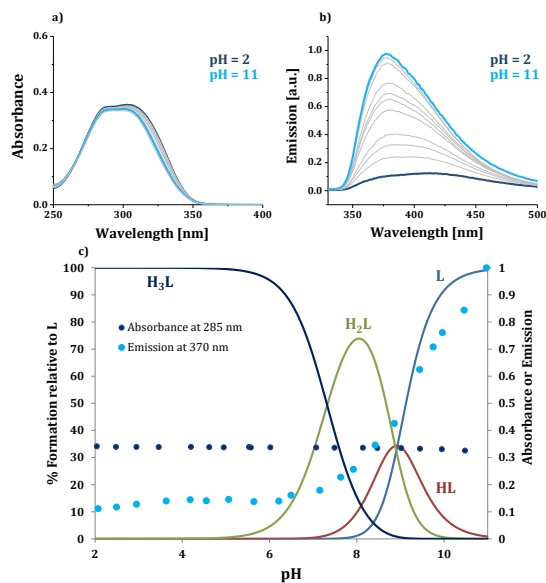


Figure 5.10. a) UV/Vis spectra of TPA1P versus pH; b) normalized emission of TPA1P versus pH and c) molar fraction distribution diagram for protonated species of TPA1P superposed to its normalized emission at 370 nm ($\lambda_{ex} = 309$ nm) (●) and the absorbance at 285 nm (●).

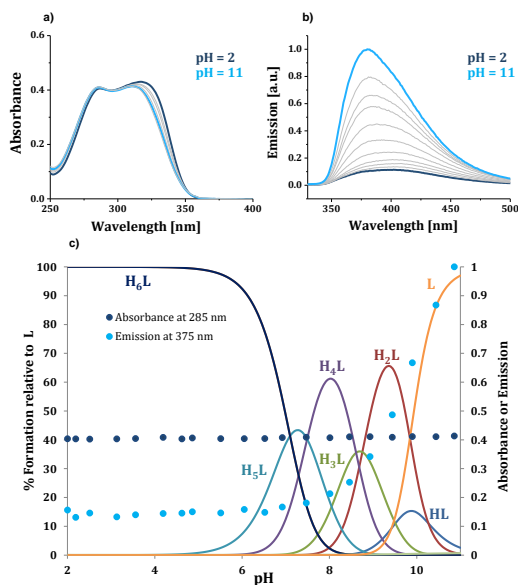


Figure 5.11. a) UV/Vis spectra of TPA2P versus pH; b) normalized emission of TPA2P versus pH and c) molar fraction distribution diagram for protonated species of TPA2P superposed to its normalized emission at 375 nm ($\lambda_{ex} = 309$ nm) (●) and the absorbance at 285 nm (●).

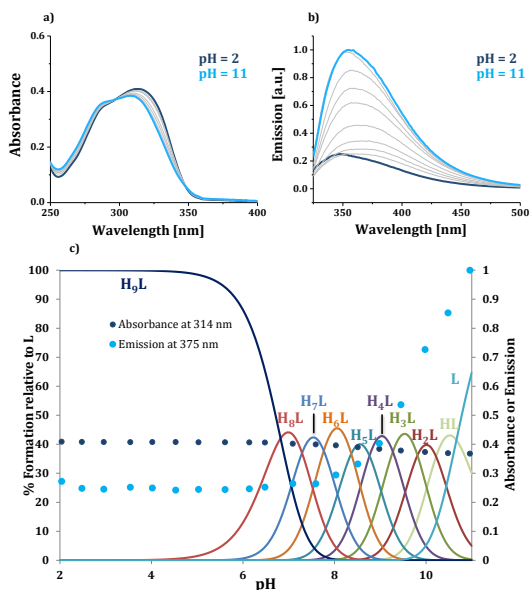


Figure 5.12. a) UV/Vis spectra of TPA3P versus pH; b) normalized emission of TPA3P versus pH and c) molar fraction distribution diagram for protonated species of TPA3P superposed to its normalized emission at 375 nm ($\lambda_{ex} = 309$ nm) (●) and the absorbance at 314 nm (●).

Regarding the variation of the absorbance and the emission spectra as function of pH, the observed changes are similar to those showed by the TPA-PX compounds. While the modification of the absorbance is very low, the emission displays a remarkable enhancement as the pH is increased. This change may be explained by the AIE effect described above (Figures 5.10a, 5.10b, 5.11a, 5.11b, 5.12a, 5.12b). To gain more insight into this aggregation process, the UV/Vis and the emission spectra at increasing TPA3P concentrations were measured at pH 12 (Figure 5.13 and 5.14).

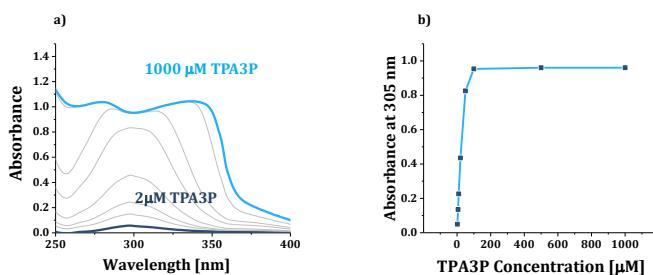


Figure 5.13. a) UV/Vis spectra upon increasing TPA3P concentration at pH 12 b) absorbance at 305 nm versus TPA3P concentration at pH 12.

The absorbance increases with the concentration until reaching a threshold around 100 μM . Furthermore, Mie dispersion is observed at long wavelengths due to the aggregates formation (Figure 5.13).

Conversely to TPA3PX for which only a light-up effect was detected (Figure 5.9.c), the TPA3P emission spectra not only present a blue-shifted fluorescence enhancement, but also a red-shifted quenching at high concentrations (Figure 5.14a). Indeed, by using the proper excitation wavelength for the aggregate state (375 nm), the emission is negligible for low TPA3P concentrations, for which aggregates rarely form. However, the emission experiences a 500000-fold enhancement at 1000 μM TPA3P when the aggregated state prevails (Figure 5.14b).

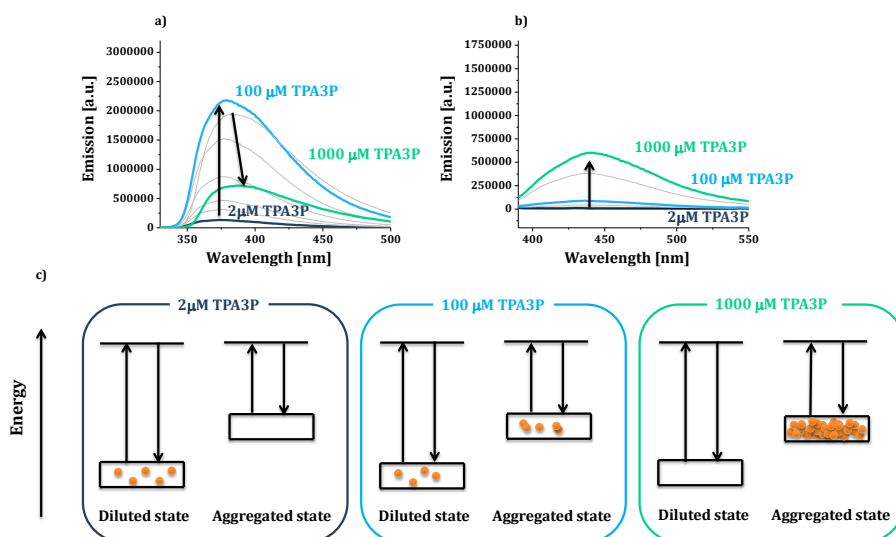


Figure 5.14. a) Emission spectra of increasing TPA3P concentrations at pH 12 ($\lambda_{\text{ex}} = 309 \text{ nm}$), b) emission spectra of increasing TPA3P concentrations at pH 12 ($\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$) and c) depiction of the aggregated state formation and the AIE effect.

These observations point out an outstanding AIE effect. The fluorescence of the diluted state increases as the concentration increases, until reaching a threshold (100 μM). From there, the emission of the diluted state decreases, as a consequence of the population increase in the aggregated state (Figure 5.14.c). In this case, by using a proper excitation wavelength, a new emission band emerges at longer wavelengths, which corresponds to the emission of the aggregated state.

The intermolecular interactions in the TPA3P aggregates are stronger than those corresponding to the TPA3PX aggregates, owing to the higher number of amino groups at the TPA3P substituents. This fact may favour both, the restriction of intramolecular rotations (RIR) and the formation of a lower energy aggregated state. As a result, the AIE effect of TPA3P is more prominent than the one observed for TPA3PX.

5.1.3. - TPA-PY derivatives

The last family of TPA derivatives, TPA-PY, contains the aza-macrocycle PY as a substituent, instead of linear polyamines. Therefore, the derivatives TPA1PY, TPA2PY and TPA3PY include one, two and three PY, respectively (Figure 5.1).

The stepwise protonation constants of the compounds are listed in Table 5.3, along with the values corresponding to the PY macrocycle.^[26] Conversely to the above described TPA derivatives, the number of protonation constants coincides only with the number of secondary amines of the compounds. The protonation of the tertiary amines of both, the PY substituent and the TPA moiety could not be calculated in the investigated pH range.

Table 5.3. Logarithms of the stepwise protonation constants of the three TPA-PY ligands determined by potentiometric titrations.^[a-c]

Reaction	PY ^[26]	TPA1PY	TPA2PY	TPA3PY
H + L \rightleftharpoons HL	10.20(6)	8.74(3)	9.87(5)	10.38(6)
H + HL \rightleftharpoons H ₂ L	9.18(3)	8.59(1)	9.49(6)	9.55(9)
H + H ₂ L \rightleftharpoons H ₃ L	7.84(4)	6.80(3)	8.82(6)	9.5(1)
H + H ₃ L \rightleftharpoons H ₄ L			8.19(6)	8.98(9)
H + H ₄ L \rightleftharpoons H ₅ L			7.51(6)	8.51(9)
H + H ₅ L \rightleftharpoons H ₆ L			6.69(8)	8.13(8)
H + H ₆ L \rightleftharpoons H ₇ L				7.50(7)
H + H ₇ L \rightleftharpoons H ₈ L				7.24(5)
H + H ₈ L \rightleftharpoons H ₉ L				6.21(5)
log β		24.13(3)	50.57(6)	76.04(6)

[a] Charges omitted for clarity. [b] Experiments were carried out in a 0.15 M NaCl aqueous solution at 298.1 \pm 1 K. [c] Values in parentheses are standard deviations in the last significant figure. [d] The values are extracted from reference 26.

As an overview, TPA1PY displays three, TPA2PY four and TPA3PY nine protonation steps. The values of the corresponding protonation constants may be arranged in three groups, on account of the type of protonable amino groups. The number of protonation constants included in each group corresponds to the number of branches.

Consequently, TPA1PY includes one, whereas TPA2PY shows two and TPA3PY displays three protonation constants, in each of the three groups. The values for TPA1PY are lower than those for TPA2PY and TPA3PY, which may be explained in terms of statistical probability. In general, these $\log K_a$ values are lower in comparison to the TPA-P ligands. This may be result of the larger stabilisation provided by the propylene-based substituents at TPA-P compounds, which may accommodate to a better extent the positive charges, reducing the electrostatic repulsions.

The distribution diagrams of species for the TPA-PY compounds were constructed from the values of the protonation constants. Furthermore, the absorbance and emission spectra were recorded as pH function (Figures 5.15, 5.16 and 5.17). As the number of branches increases, the positive net charge of the compound at physiological pH increases. Accordingly, the net positive charges are 2.1, 5.0 and 7.1 for TPA1PY, TPA2PY and TPA3PY, respectively.

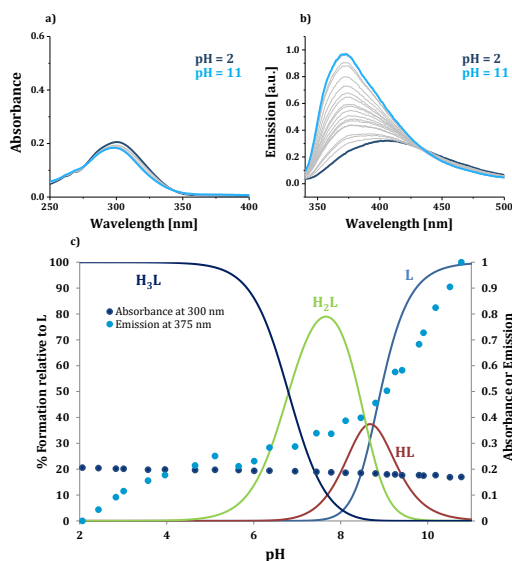


Figure 5.15. a) UV/Vis spectra of TPA1PY versus pH; b) normalized emission of TPA1PY versus pH and c) molar fraction distribution diagram for protonated species of TPA1PY superposed to its normalized emission at 375 nm ($\lambda_{ex} = 314$ nm) (●) and the absorbance at 300 nm (●).

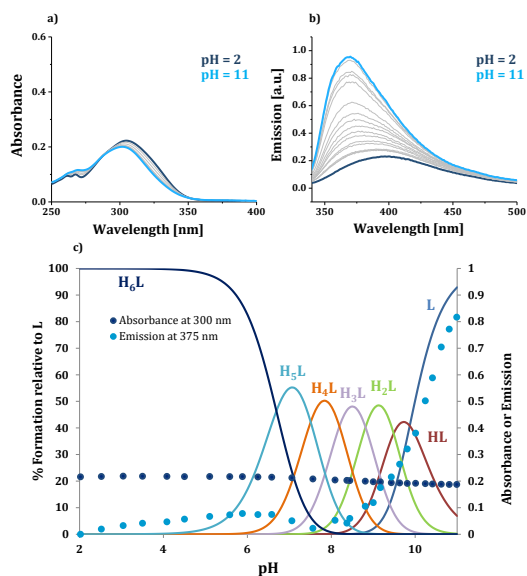


Figure 5.16. a) UV/Vis spectra of TPA2PY versus pH; b) normalized emission of TPA2PY versus pH and c) molar fraction distribution diagram for protonated species of TPA2PY superposed to its normalized emission at 375 nm ($\lambda_{ex} = 314$ nm) (●) and the absorbance at 300 nm (●).

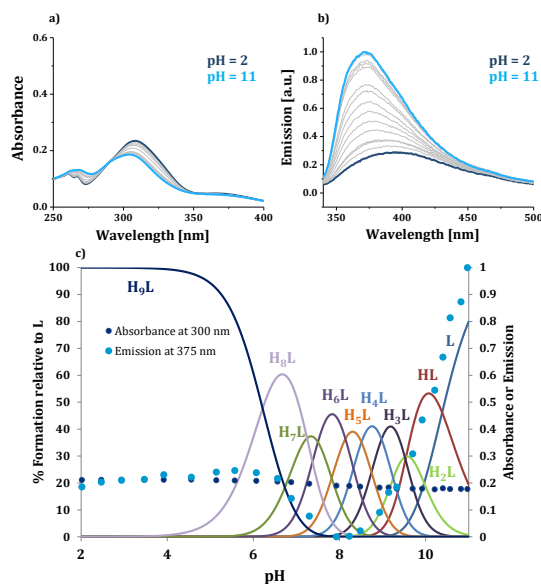


Figure 5.17. a) UV/Vis spectra of TPA3PY versus pH; b) normalized emission of TPA3PY versus pH and c) molar fraction distribution diagram for protonated species of TPA3PY superposed to its normalized emission at 375 nm ($\lambda_{ex} = 314$ nm) (●) and the absorbance at 300 nm (●).

Concerning the UV/Vis spectra of the TPA-PY derivatives, not only one, but two absorption bands can be observed, alternatively to the TPA-PX and TPA-P families. While the band at 285 - 330 nm is associated with the π - π^* transition of the TPA core,^[21,22] the band at 260 - 270 nm corresponds to the pyridine ring of the pendant PY moiety. In addition to these bands, TPA3PY also displays a longer wavelength band centred over 375 nm (Figures 5.15.a, 5.16.a, 5.17.a).

The modifications of the UV/Vis spectra upon deprotonation of TPA-PY derivatives are almost unnoticeable, whereas the changes in the emission are especially remarkable, even more prominent than the corresponding ones to the TPA-PX and TPA-P systems (Figures 5.15.b, 5.16.b, 5.17.b). This fact may be related to the molecular structure of the TPA-PY compounds, which may favour the aggregation, resulting in a stronger AIE effect.

In order to further investigate the outstanding AIE effect showed by the TPA-PY derivatives, the UV/Vis and the emission spectra of TPA3PY at increasing concentrations were registered at pH 12 (Figure 5.18).

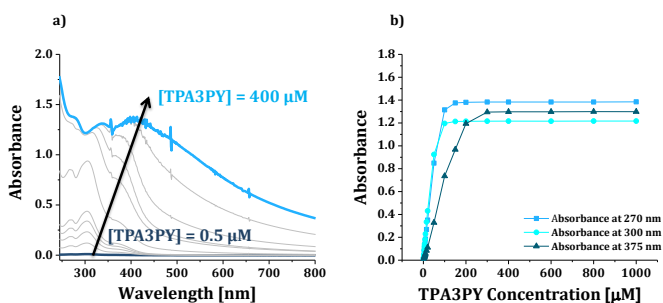


Figure 5.18. a) UV/Vis spectra upon increasing TPA3PY concentration at pH 12 b) absorbance at 270, 300 and 375 nm versus TPA3PY concentration at pH 12.

The absorbance increases as the TPA3PY concentration increases, achieving a maximum for values around 100 μ M. At this point the aggregate state is supposed to be predominant. Furthermore, a band tail rising caused by Mie dispersion confirms the aggregation (Figure 5.18).^[23,24]

Intriguingly, the emission recorded upon increasing the TPA3PY concentration using 314 nm as excitation wavelength shows an initial blue-shift increase, followed by a red-shifted quenching. This trend is typically associated with an especially strong AIE effect, provided by a large number of intermolecular interactions in the aggregates.

The spectra were also measured using 375 nm as excitation wavelength, which is the optimal excitation wavelength for the aggregates emission (Figure 5.19). In this case, the switch-on effect showed by TPA3PY aggregates is more intense than the observed one for TPA3P (Figure 5.14).

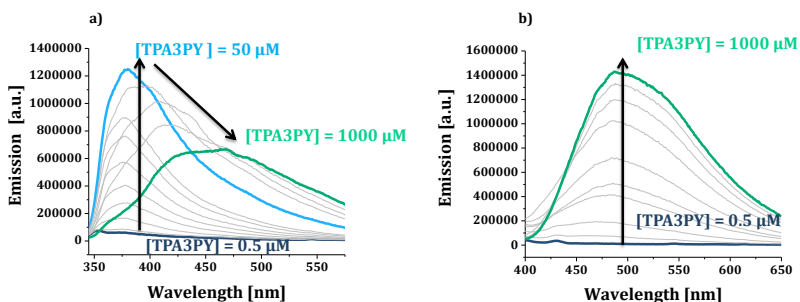


Figure 5.19. a) Emission spectra of increasing TPA3PY concentrations at pH 12 ($\lambda_{\text{ex}} = 314$ nm), b) emission spectra of increasing TPA3PY concentrations at pH 12 ($\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm).

With the aim to further explore the AIE effect of the TPA-PY system, the emission profile of the compounds was registered in solvents of different polarity (Figure 5.20).

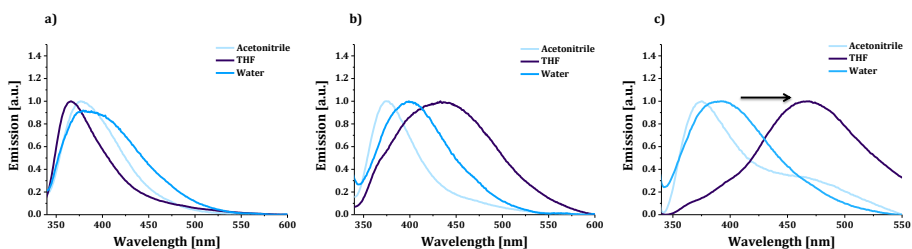


Figure 5.20. Normalised emission fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 314$ nm) in different solvents of a) TPA1PY, b) TPA2PY and c) TPA3PY.

Whereas the emission of the mono-branched TPA1PY displays no relevant modifications, the spectrum of the bi-branched and especially the tri-branched TPA3PY is red-shifted in non-polar solvents (THF), in comparison with polar solvents (water, CH_3CN). Indeed, in polar solvents the molecules are properly solvated and thus well-dispersed. Alternatively, low-polarity solvents favour supramolecular interactions between the molecules, resulting in the formation of aggregates in which the intramolecular rotations are restricted (RIR). This fact causes the AIE effect and, ultimately, the emission switch-on.

The transition from the diluted to the aggregated state of TPA-PY compounds was further studied by measuring the emission profile in different H₂O/THF mixtures, using 314 nm and 375 nm as excitation wavelengths (Figure 5.21).

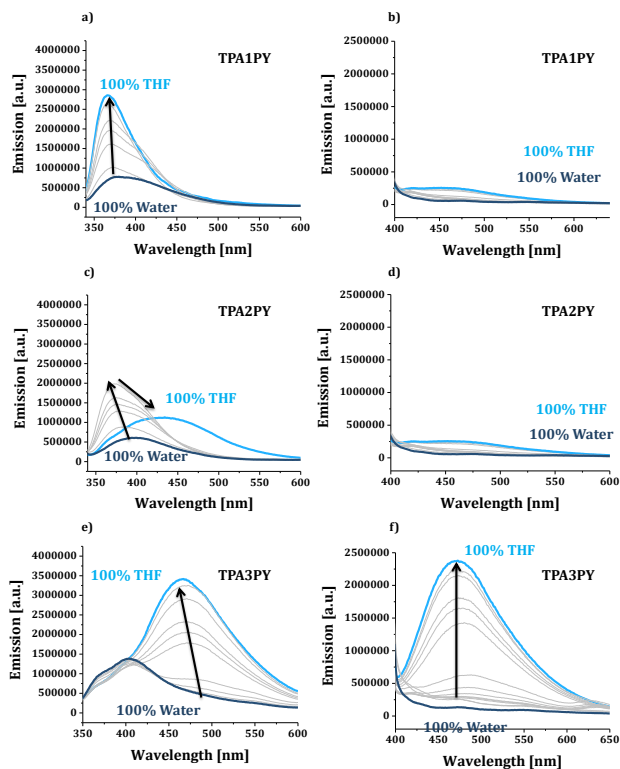


Figure 5.21. Emission of TPA1PY in different THF:H₂O solution mixtures: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ nm and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm, emission of TPA2PY in different THF:H₂O solution mixtures: c) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ nm and d) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm, emission of TPA3PY in different THF:H₂O solution mixtures: e) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ nm and f) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

TPA1PY displays a blue-shift enhancement of the emission when excited at 314 nm. However, TPA2PY and particularly TPA3PY show a red-shifted enhancement of the emission caused by their larger aggregative nature. This trend is also reflected when exciting at 375 nm, the optimal wavelength for the emission of the aggregates. The spectrum of the compound TPA1PY hardly experienced any modification, while TPA2PY and specially TPA3PY do show a remarkably enhancement of the emission, owing to the stronger interactions within the aggregates.

5.2. - TPB derivatives

Background

The TPB derivatives synthesised and studied throughout this thesis are illustrated in Figure 5.22. Alternatively to the TPA derivatives, the central moiety corresponds to an extended aromatic molecule: 1,3,5-triphenylbenzene (TPB). This variation directly influences several chemical and photophysical properties of the TPB derivatives and consequently, the intramolecular forces associated with the aggregation processes. The propeller shape of the TPA unit prevents the establishment of π - π interactions, whilst the π - π stacking of TPB molecules is more favoured given its more extended aromatic surface.

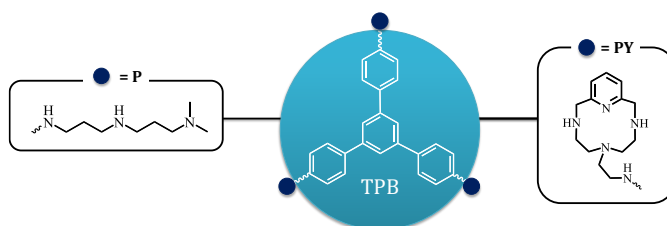


Figure 5.22. Scheme of the TPB derivatives synthesised during this thesis: TPB3P and TPB3PY.

Photoinduced-electron transfer (PET)

Providing the aromatic nature of the TPB central core, the study of the acid-base behaviour of the TPB derivatives requires considering not only potential aggregation processes, but also the likely Photoinduced-Electron Transfer (PET) caused by the secondary amino groups closest to the TPB unit.

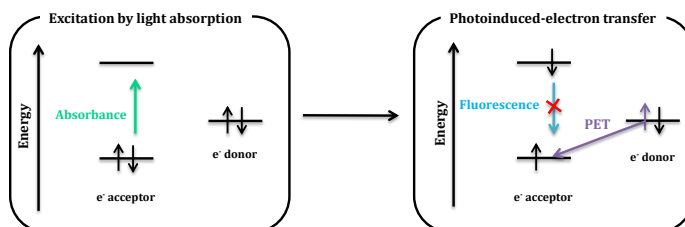


Figure 5.23. Illustration of the Photoinduced-Electron Transfer in an acceptor-donor system.

When a chromophore is excited, an electron is promoted from the HOMO to the LUMO level, yielding a vacancy in the former level. If an electron donor group is close to the chromophore, an electron from the donor may be transferred to the vacancy. Consequently, the radiative de-excitation through fluorescence emission of the acceptor is prohibited (Figure 5.23).^[27,28]

The TPB derivatives are susceptible to experience the PET effect at alkali pH, since they include deprotonated amino groups close to the TPB core. In other words, when protonated at acidic pH, the lone pair of the amino group is not available for an electron transfer and therefore, the emission of the molecule is maximum. However, as the pH increases, the deprotonation of the amine enables the Photoinduced-Electron Transfer (PET), resulting in a fluorescence quenching.

5.2.1. - TPB3P

The TPB3P derivative includes the TPB central core, as well as three P chains, being analogous to TPA3P (Figure 5.1 and 5.22). This compound presents nine protonation constants (Table 5.4), which is in correlation with the number of both, secondary and tertiary amines. It is possible to distinguish three different groups containing three similar values, according to the TPB3P molecular structure. The value of the first protonation constant is higher in comparison to TPA3P, which may be consequence of the inductive effect provided by the TPB moiety. As expected from electrostatic repulsions, the protonation constants are less favourable at every each protonation step.

Table 5.4. Logarithms of the stepwise protonation constants of the TPB3P ligand determined by potentiometric titrations.^[a-c]

Reaction	TPB3P
$H + L \rightleftharpoons HL$	10.38(6)
$H + HL \rightleftharpoons H_2L$	9.55(9)
$H + H_2L \rightleftharpoons H_3L$	9.5(1)
$H + H_3L \rightleftharpoons H_4L$	8.98(9)
$H + H_4L \rightleftharpoons H_5L$	8.51(9)
$H + H_5L \rightleftharpoons H_6L$	8.13(8)
$H + H_6L \rightleftharpoons H_7L$	7.50(7)
$H + H_7L \rightleftharpoons H_8L$	7.24(5)
$H + H_8L \rightleftharpoons H_9L$	6.21(5)
$\log \beta$	76.04(6)

[a] Charges omitted for clarity. [b] Experiments were carried out in a 0.15 M NaCl aqueous solution at 298.1±1 K. [c] Values in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

In Figure 5.24 are plotted the distribution diagram of species for TPB3P, obtained from the values of the protonation constants, as well as the UV/Vis and fluorescence spectra as a pH function.

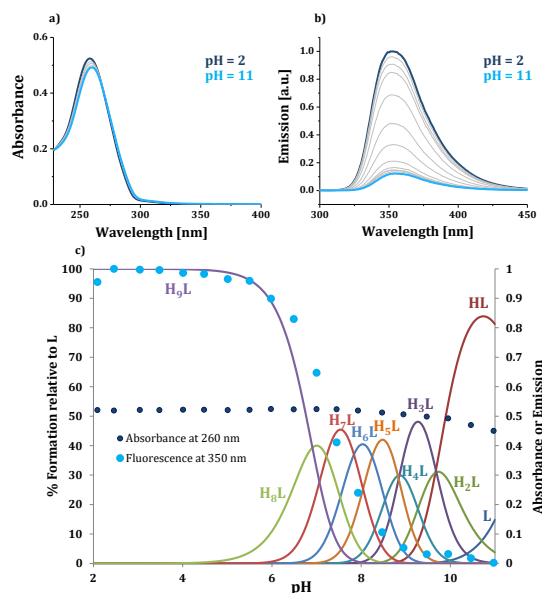


Figure 5.24. a) UV/Vis spectra of TPB3P versus pH; b) normalized emission of TPB3P versus pH and c) molar fraction distribution diagram for protonated species of TPB3P superposed to its normalized emission at 350 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 270$ nm) (●) and the absorbance at 260 nm (●)

In this case, the overall net charge at physiological pH calculated from the distribution diagram of species is 7.3, which is in correlation with the large number of amino groups present at the tri-branched TPB3P.

Despite the almost unnoticeable changes in the absorption spectra, the emission quenching at alkali pH is evident (Figure 5.24a and 5.24b). As mentioned before, a PET is likely to occur when the amino groups close to the TPB moiety are deprotonated, causing the fluorescence quenching. However, when the amino groups are protonated, the electron pair of the nitrogen atoms are shared with the protons, hampering the PET and restoring the emission.

The fluorescence quenching process coincides with the seventh, the eighth and the ninth protonation steps (Figure 5.24c). Therefore, it can be suggested that these may correspond with the secondary amines closest to the TPB moiety.

5.2.2. - TPB3PY

The molecular structure of TPB3PY comprises the TPB central core and three PY macrocycles (Figure 5.22). In Table 5.5 are listed the logarithms of the stepwise protonation constants. As it can be observed, TPB3PY presents nine protonation steps, which are associated with the secondary amines of the ligand. In general, these values are less favourable than those corresponding to TPB3P, which may be consequence of the larger stabilisation provided by the propylene-based substituents in TPB3P.

Table 5.5. Logarithms of the stepwise protonation constants of the TPB3PY ligand determined by potentiometric titrations.^[a-c]

Reaction	TPB3PY
$H + L \rightleftharpoons HL$	9.79(2)
$H + HL \rightleftharpoons H_2L$	9.65(2)
$H + H_2L \rightleftharpoons H_3L$	8.93(2)
$H + H_3L \rightleftharpoons H_4L$	8.76(2)
$H + H_4L \rightleftharpoons H_5L$	7.82(3)
$H + H_5L \rightleftharpoons H_6L$	7.57(2)
$H + H_6L \rightleftharpoons H_7L$	6.71(3)
$H + H_7L \rightleftharpoons H_8L$	6.45(2)
$H + H_8L \rightleftharpoons H_9L$	3.06(4)
$\log \beta$	68.77(4)

[a] Charges omitted for clarity. [b] Experiments were carried out in a 0.15 M NaCl aqueous solution at 298.1±1 K. [c] Values in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

The distribution diagram of species for TPB3PY is plotted in Figure 5.25, along with the absorbance and emission spectra as pH function. Regarding the positive charge at physiological pH (5.6), it is lower in comparison to TPB3P, which is in correlation to the more reduced tendency to protonation of TPB3PY.

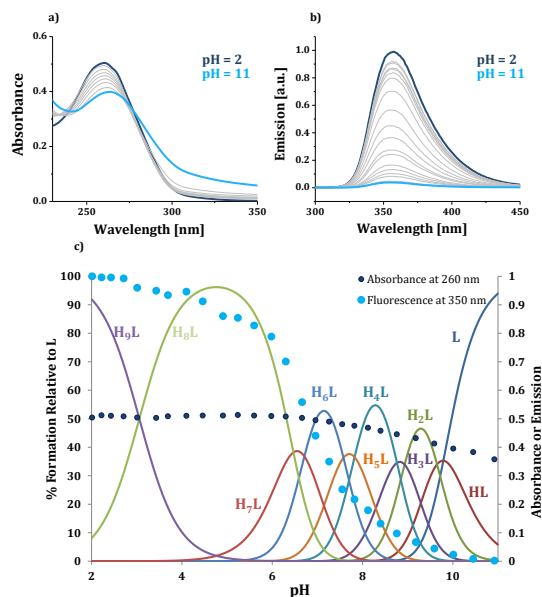


Figure 5.24. a) UV/Vis spectra of TPB3PY versus pH; b) normalized emission of TPB3PY versus pH and c) molar fraction distribution diagram for protonated species of TPB3PY superposed to its normalized emission at 350 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 270$ nm) (●) and the absorbance at 260 nm (●)

The absorption spectra (Figure 5.25a) show a band centred around 260 nm, which may be the absorbance overlapping of the pyridine rings and the TPB core. As the pH increases, a slight decrease in the absorbance is observed. From pH = 9, the precipitation of the ligand caused the band tail rising. Concerning the fluorescence spectra (Figure 5.25b), the observed behaviour is similar to the one associated to TPB3P. After the first three protonation steps, a remarkable fluorescence quenching is observed, due to the above described PET effect. Therefore, the fourth, fifth and sixth protonation steps may correspond to the amine groups closer to the TPB moiety.

5.3. - References

- [1] A. J. Hoefnagel, M. A. Hoefnagel, B. M. Wepster, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4209–4211.
- [2] T. Manifar, S. Rohani, *Can. J. Chem. Eng.* **2004**, *82*, 323–334.
- [3] J. Luo, O. Conrad, I. F. J. Vankelecom, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 20574–20579.
- [4] I. Kaljurand, R. Lilleorg, A. Murumaa, M. Mishima, P. Burk, I. Koppel, I. A. Koppel, I. Leito, *J. Phys. Org. Chem.* **2013**, *26*, 171–181.
- [5] C. Quinton, V. Alain-Rizzo, C. Dumas-Verdes, F. Miomandre, G. Clavier, P. Audebert, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 2230–2240.
- [6] M. U. Munshi, G. Berden, J. Martens, J. Oomens, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 19881–19889.
- [7] A. Jablonski, *Nature* **1933**, *131*, 839–840.
- [8] J. R. Albani, *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*, Blackwell Science, Oxford, **2007**.
- [9] E. A. Chandross, C. J. Dempster, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3586–3593.
- [10] W. Naumann, *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 064505.
- [11] J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 11718–11940.
- [12] J. Mei, Y. Hong, J. W. Y. Lam, A. Qin, Y. Tang, B. Z. Tang, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 5429–5479.
- [13] J. Chen, C. C. W. Law, J. W. Y. Lam, Y. Dong, S. M. F. Lo, I. D. Williams, D. Zhu, B. Z. Tang, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1535–1546.
- [14] M. Yang, D. Xu, W. Xi, L. Wang, J. Zheng, J. Huang, J. Zhang, H. Zhou, J. Wu, Y. Tian, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10344–10359.
- [15] W. Yang, C. Li, M. Zhang, W. Zhou, R. Xue, H. Liu, Y. Li, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 28052–28060.
- [16] C. Li, W. Yang, W. Zhou, M. Zhang, R. Xue, M. Li, Z. Cheng, *New J. Chem.* **2016**, *40*, 8837–8845.
- [17] I. Reva, L. Lapinski, N. Chattopadhyay, R. Fausto, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 3844–3850.
- [18] E. M. Arnett, F. M. Jones, M. Taagepera, W. G. Henderson, J. L. Beauchamp, D. Holtz, R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4724–4726.
- [19] R. W. Alder, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1215–1223.
- [20] A. Bencini, A. Bianchi, E. Garcia-España, M. Micheloni, J. A. Ramirez, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *188*, 97–156.
- [21] B. Xu, J. He, Y. Liu, B. Xu, Q. Zhu, M. Xie, Z. Zheng, Z. Chi, W. Tian, C. Jin, F. Zhao, Y. Zhanga, J. Xu, *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2*, 3416–3428.
- [22] M. Aydemir, G. Haykir, F. Türksoy, S. Gümüş, F. B. Dias, A. P. Monkman, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 25572–25582.
- [23] B. Z. Tang, Y. Geng, J. W. Y. Lam, B. Li, *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 1581–1589.
- [24] Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* **2009**, *0*, 4332–4353.

- [25] S. Y. Kim, Y. J. Cho, G. F. Jin, W. S. Han, H. J. Son, D. W. Cho, S. O. Kang, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 15679–15682.
- [26] B. Verdejo, A. Ferrer, S. Blasco, C. E. Castillo, J. González, J. Latorre, M. A. Máñez, M. G. Basallote, C. Soriano, E. García-España, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 5707–5719.
- [27] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 151–1566.
- [28] D. Escudero, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1816–1824.

One of the central pillars of this thesis deals with the interaction between the synthesised compounds and different DNA topologies. Several spectroscopic methods have been used in order to address this specific aim, such as FRET-Melting assays, as well as fluorimetric and circular dichroism titrations. The obtained data have provided insight into the relevance of the molecular design on the G4 selectivity.

6.1. - DNA sequences investigated

The binding properties of the synthesised compounds have been studied using a wide variety of DNA topologies, including both double-stranded DNA (dsDNA) and G4 DNA. The assessment of the former is crucial, since duplex DNA prevails among all the genomic material and therefore, it is an inherent competitor for G4-binders at physiological media.

The Table 6.1 shows the DNA sequences used and their corresponding conformation. This selection covers dsDNA and three different G4 structures: parallel, antiparallel and hybrid (Figure 6.1). The study of these DNA topologies is important to assess the compounds selectivity. The experimental protocol to set-up all the studies is described in Chapter 3.

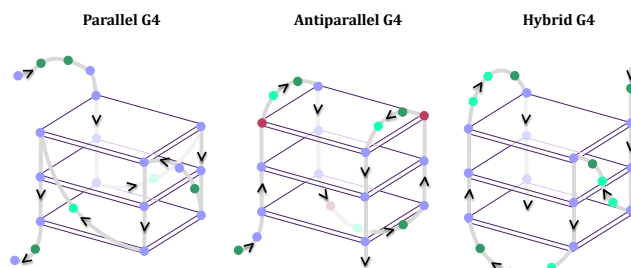


Figure 6.1. Depiction of the different G4 topologies studied.

Table 6.1. DNA sequences tested in this thesis.

Name	Sequence	Topology
HTelo22/21-K	(A)GG-GTT-AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-G	Hybrid ^[1,2]
HTelo22/21-Na	(A)GG-GTT-AGG-GTT-AGG-GTT-AGG-G	Antiparallel ^[3,4]
22CTA	AGG-GCT-AGG-GCT-AGG-GCT-AGG-G	Antiparallel ^[5]
Bcl-2	GGG-CGC-GGG-AGG-AGG-GGG-GCG-GG	Hybrid ^[6,7]
c-Myc	TGA-GGG-TGG-GTA-GGG-TGG-GTA-A	Parallel ^[8]
CEB25	AAG-GGT-GGG-TGT-AAG-TGT-GGG-TGG-GT	Parallel ^[9]
c-kit1	AGG-GAG-GGC-GCT-GGG-AGG-AGG-G	Parallel ^[10]
c-kit2	GGG-CGG-GCG-CGA-GGG-AGG-GG	Parallel ^[11]
ds26	CAA-TCG-GAT-CGA-ATT-CGA-TCC-GAT-TG	Double-stranded

6.2. - Molecular design of the studied compounds

The studied ligands are those introduced in previous chapters. The design of their molecular structure aims to gain understating about the role of both, the central moiety and its substituents in the DNA interaction. Regarding the central core, two different scaffolds have been used, TPA and TPB. As described in Chapter 5, the TPA moiety displays a propeller shape, leading to interesting aggregation properties such as AIE, while TPB presents a more rigid and extended aromatic nature. The branches used as substituents are linear and macrocyclic polyamine-based moieties. In this chapter, the results will be discussed focusing on the analysis of the molecular structure.

6.3. - FRET-Melting assays

Background

Firstly, the affinity towards DNA has been evaluated throughout a FRET-Melting study. This technique enables the study of a large number of samples in a short period of time and moreover, provides valuable information about the stabilisation of different DNA topologies. Therefore, prior to performing other experiments, all the synthesised compounds were studied by FRET-Melting, in order to select those which display a remarkable G4 stabilisation.

The basic principle of this method is described in Chapter 3. Briefly, the DNA sequences tested are labelled at the 5' end with FAM and at the 3' end with TAMRA. The former dye acts as the donor and the latter one as the acceptor.

When the DNA is folded, the donor transfers its excitation energy to the acceptor, thereby quenching its fluorescence. Upon increasing the temperature, the DNA unfolds and the distance between the donor and the acceptor becomes larger, hampering the energy transfer and restoring the fluorescence of the donor.

In a typical FRET-Melting assay, the fluorescence of the donor is recorded upon increasing the temperature. The melting temperature (T_m) corresponds to the temperature at which the 50% of the DNA is unfolded. If the studied ligand stabilises the DNA structure, the melting temperature increases (ΔT_m). Typically, a strong G4 binder gives an increase of around 10 - 20°C in the melting temperature of the DNA (Figure 6.2).^[12,13]

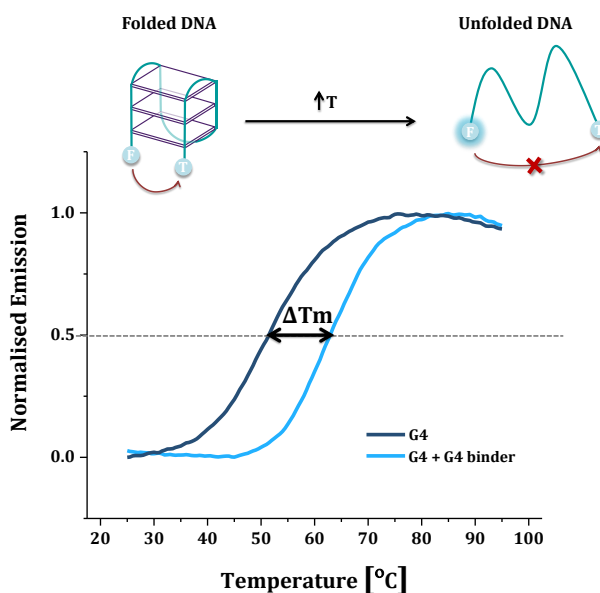


Figure 6.2. Illustration of the FRET-Melting principle. The G4 DNA is unfolded by thermal activation (dark blue), which can be changed through the addition of a G4-binder (light blue). The extent of the stabilisation is estimated by the change in the melting temperature (ΔT_m) at the midpoint.

All the assays were performed at least in triplicate. The ΔT_m is expressed as the average of the repeats. The DNA concentration tested was 0.2 μM and the compounds were added at increasing concentrations, with ligand-to-DNA ratios of 0, 2, 5 and 10 (Chapter 3). In the following sections, the FRET-Melting studies are classified attending to the series of derivatives.

6.3.1. - TPA-PX derivatives

The compounds corresponding to the TPA-PX family can be structurally described as a TPA central core functionalised with one, two or three PX substituents (TPA1PX, TPA2PX and TPA3PX, respectively).

The ΔT_m values for the TPA-PX derivatives are plotted in Figure 6.3 and listed in Appendix 2. As the number of branches increases, the increment in the melting temperature is higher, indicating a stronger stabilisation. This observation may be linked to the number of positively charged amino groups at the substituents, which may strengthen the electrostatic interactions with the negatively charged phosphate groups in the loops and grooves of the G4 DNA.

Unfortunately, none of the compounds shows a noticeable G4 stabilisation ($\Delta T_m < 6^\circ\text{C}$), while the ΔT_m for the double-stranded DNA was negligible for the three studied ratios for all the compounds ($\Delta T_m \sim 0^\circ\text{C}$).

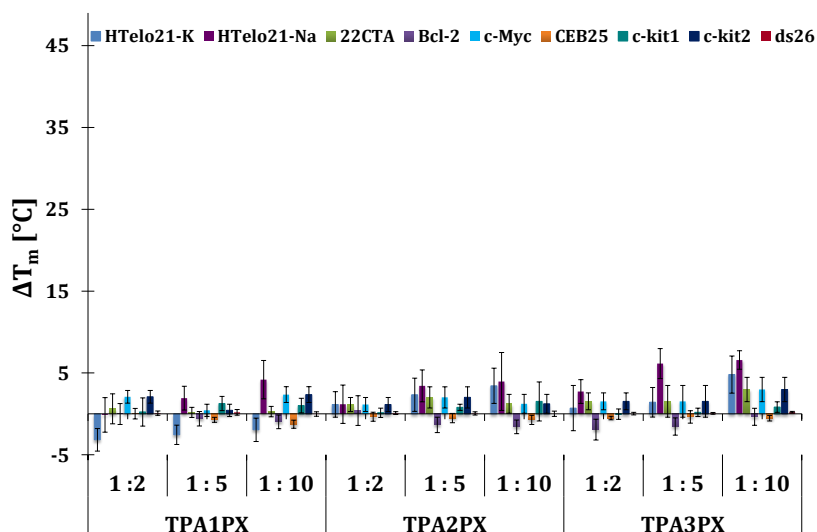


Figure 6.3. Plot of ΔT_m [$^\circ\text{C}$] for the interaction of TPA-PX ligands with various DNA sequences.

6.3.2. - TPA-P derivatives

The TPA-P series comprises three ligands which involve a central TPA unit and one, two or three P chains (TPA1P, TPA2P and TPA3P, respectively). These compounds present a higher positive charge at physiological pH than the TPA-PX ligands (Chapter 5). Therefore, the electrostatic interactions with the negatively charged G4 DNA are supposed to be larger, which may result in a higher G4 stabilisation.

The ΔT_m values for the TPA-P compounds are compiled in Figure 6.4 and in Appendix 2. These ligands show a larger G4 stabilisation than the TPA-PX family. For instance, TPA3P displays a stabilisation of 23.6°C for the G4 HTelo21-Na, while TPA3PX only shows a stabilisation of 5.1°C (ligand-to-G4 ratio of 5 for both cases). Within the TPA-P compounds, TPA3P presents the most remarkable increment of the melting temperature, which is in correlation with the larger number of protonable groups at the substituents. Indeed, the stabilisation of HTelo21-Na provided by TPA1P is 8.1°C, whereas TPA3P presents ΔT_m values ranging from 15°C to 25°C for the G4 sequences HTelo21-K, HTelo21-Na, c-Myc and ckit-2 (ligand-to-DNA ratio of 5). These results point out the essential role that the molecular design of the branches and the positive charge play in the supramolecular interactions established between the compounds and the G4 DNA.

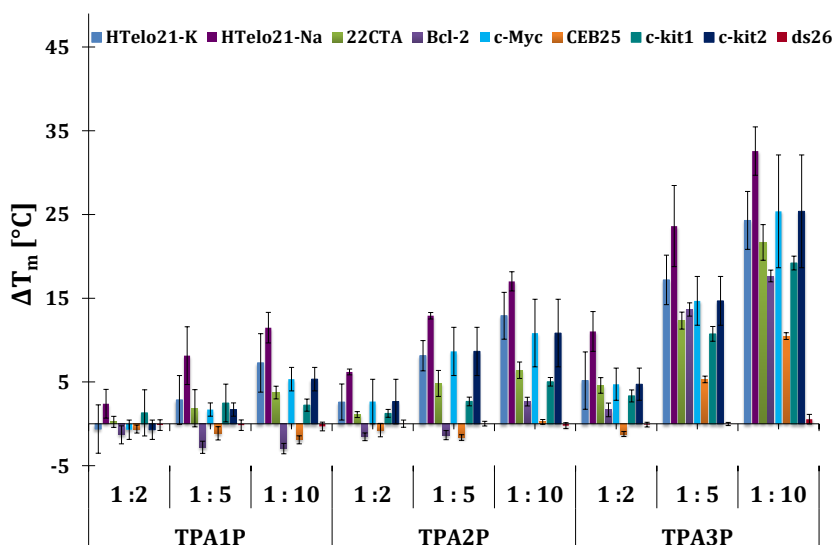


Figure 6.4. Plot of ΔT_m [°C] for the interaction of TPA-P ligands with various DNA sequences.

However, the most striking feature is the little-to-no stabilisation of the dsDNA (ds26) provided by the TPA-P derivatives, even for the highest ligand-to-DNA ratio used ($r = 10$). In the light of these results, the observed G4 selectivity over dsDNA is promising and moreover, the G4 stabilisation displayed for TPA3P is comparable with the classical G4-binders.^[12]

In order to further analysing the G4 selectivity, TPA3P was studied by means of FRET-Melting competition assays. The experimental procedure is similar to the one above described, but this sort of assay is conducted by adding increasing concentrations of unlabelled dsDNA (Chapter 3). Poor selective G4-binders tend to interact with the double-stranded competitor rather than with the G4 DNA, yielding a decrease of the G4 ΔT_m . Alternatively, a selective G4-binder would show no modification of the ΔT_m upon addition of the duplex competitor (Figure 6.5).

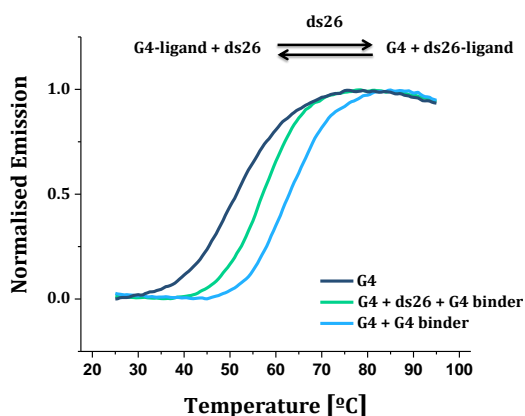


Figure 6.5. FRET-Melting competition curves illustrating the modification of the ΔT_m upon the addition of a double-stranded competitor for a non-selective G4-binder.

The TPA3P ΔT_m values for four different G4 sequences in presence of increasing concentrations of ds26 are plotted in Figure 6.6. The addition of duplex DNA does not modify the ΔT_m values of HTelo21-Na and Bcl-2, even at the highest duplex-to-G4 ratio of 100. Nevertheless, a slight decrease is observed for HTelo21-K and 22CTA at high ratios. These results highlight the TPA3P selectivity for G4 DNA over duplex DNA.

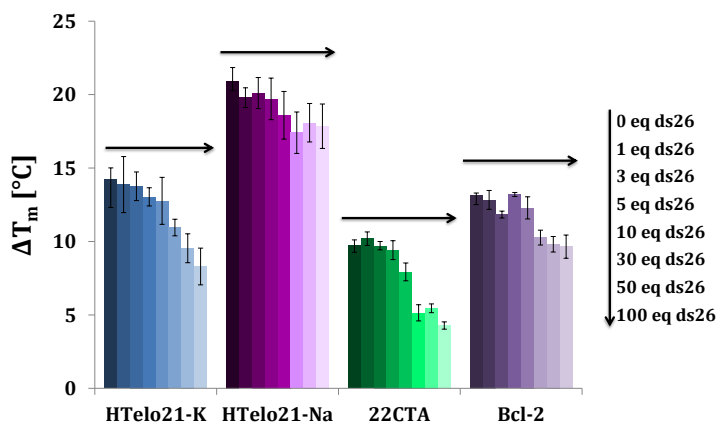


Figure 6.6. Plot of ΔT_m [°C] for FRET competition assays of TPA3P.

6.3.3. - TPA-PY derivatives

The TPA-PY family includes the macrocycle PY as substituent. The positive net charge at physiological pH of the TPA-PY compounds is similar to those of the TPA-P ligands (Chapter 5). However, the molecular structure of the derivatives is different, which may influence their interaction with DNA.

The FRET-Melting data for the TPA-PY derivatives are compiled in Figure 6.7 and in Appendix 2. As expected, the more branches the ligand has, the larger ΔT_m is obtained, as consequence of the higher positive charge at the molecules. For instance, TPA3PY displays an ΔT_m of 26.6°C for HTelo21-Na, while TPA1PY only shows an increase of 0.9°C (ligand-to-G4 of 5 ratio).

In comparison to the other TPA derivatives, the TPA-PY family provides a similar G4 stabilisation to the TPA-P compounds and in turn higher than the TPA-PX derivatives. Consequently, apart from the TPA key role in the G4 interaction, the positively charged substituents also contribute to the G4 stabilisation, through electrostatic interactions with the DNA phosphate backbone. The relation between the positive charge of the compounds and the ΔT_m is further analysed in Section 6.3.5.

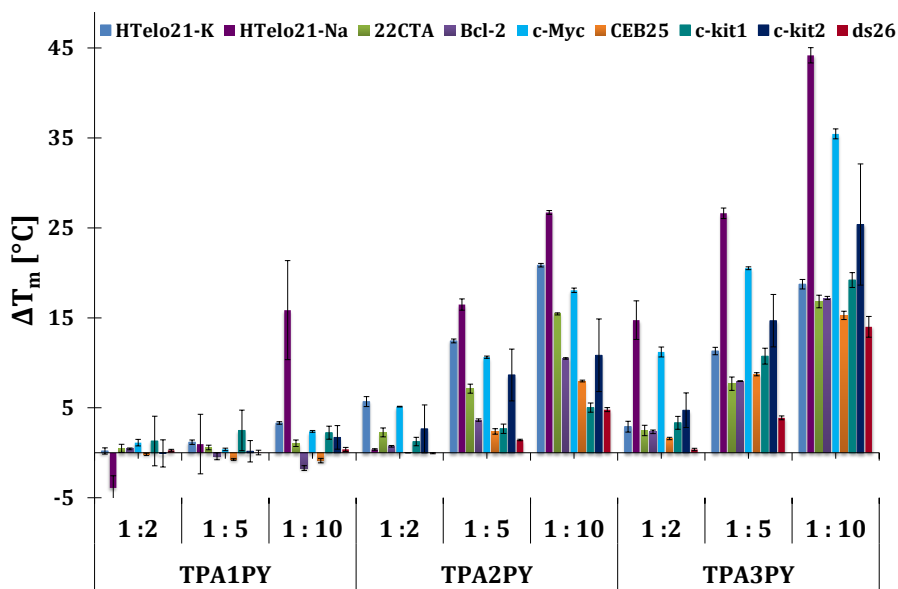


Figure 6.7. Plot of ΔT_m [$^{\circ}\text{C}$] for the interaction of TPA-P ligands with various DNA sequences.

Regarding the ΔT_m values for dsDNA, TPA3PY shows a slight stabilisation effect (3.8°C and 14.0°C for ligand-to-DNA ratios of 5 and 10, respectively). These results denote that TPA3PY displays less selectivity than TPA3P, which stabilisation of dsDNA is almost negligible (0.1°C and 0.5°C for ligand-to-DNA ratios of 5 and 10, respectively).

With the aim to get more insight into the TPA3PY preference for G4 topologies, FRET-Melting competition assays were carried out using labelled G4 DNA and unlabelled dsDNA as competitor (Figure 6.8). While the addition of the double-stranded competitor yields a slight ΔT_m decrease for HTelo21-K at very high ratios, the ΔT_m for HTelo21-Na, 22CTA, Bcl-2 and c-Myc remains almost constant. Hence, TPA3PY still may be considered as a G4 selective binder, despite being less selective than TPA3P.

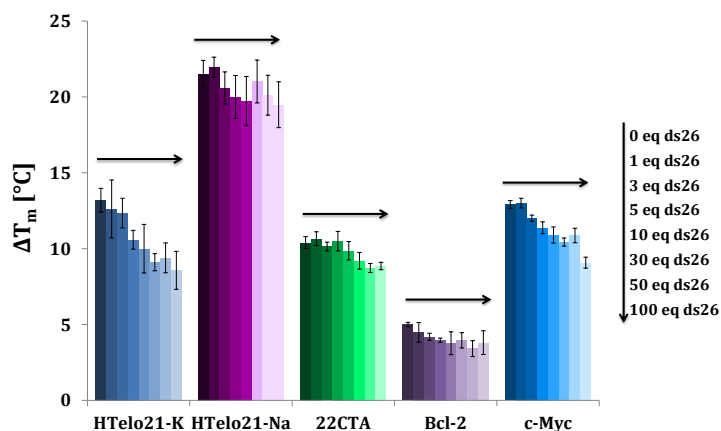


Figure 6.8. Plot of ΔT_m [°C] for FRET competition assays of TPA3PY.

6.3.4. - TPB derivatives

Alternatively to the TPA derivatives, the following family presents the TPB scaffold as a central core. This molecular modification may favour the interaction with G4 topologies by enhancing the π - π stacking with the guanine tetrads in the G4 structure. Within this series, TPB3P includes the linear P substituent, while TPB3PY presents the macrocycle PY. Taking the previous discussed results into account, the electrostatic interactions of these TPB derivatives with DNA may be reinforced by the high positively charged substituents.

For the TPB family study, only the sequences HTelo21-K, c-kit1 and ds26 were tested, as representatives of both telomeric and oncogenic G4 DNA, as well as dsDNA. The FRET-Melting data are summarised in Figure 6.9 and listed in Appendix 2.

In general, the ΔT_m values are slightly higher than the corresponding ones for the TPA analogues TPA3P and TPA3PY. Particularly, TPB3P shows larger stabilisation than TPB3PY, reaching striking values around 30°C for a ligand-to-G4 ratio of 5. There is not a clear preference between the two studied G4, obtaining similar values for each one. Interestingly, the ds26 stabilisation given by both compounds is almost negligible (3.9°C and 1.4°C for TPB3P and TPB3PY, for ligand-to-DNA ratios of 5). These results highlight the remarkable selectivity of the compounds towards G4 structures over double-stranded DNA.

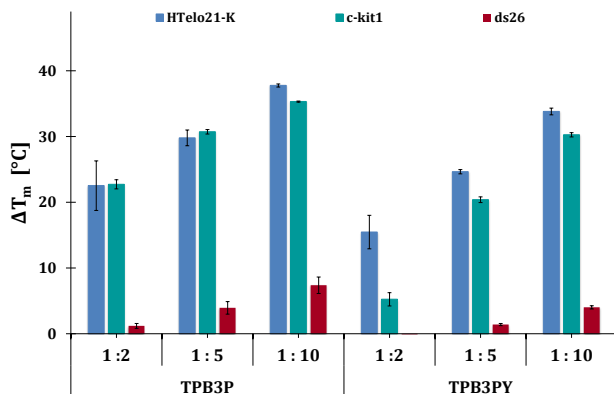


Figure 6.9. Plot of ΔT_m [°C] for the interaction of TPB derivatives with various DNA sequences.

The results corresponding to the FRET-Melting competition assays are plotted in Figure 6.10. The decrease of the ΔT_m in the presence of double stranded competitor is more pronounced than those experienced by the analogous TPA compounds. Despite this fact, the ΔT_m value is still high ($\sim 10^\circ\text{C}$), even at the presence of 100 equivalents of duplex. This fact may be related with the aggregation processes that only the TPA compounds experienced when interact with G4 DNA. Therefore, aggregates may hamper the displacement caused by the competitor. Consequently, non-aggregated TPB derivatives are more likely to release the G4 DNA in the presence of ds26. Nevertheless, the compound TPB3PY displays remarkable selectivity towards c-kit1, since the ΔT_m values are mostly maintained even at high competitor concentrations.

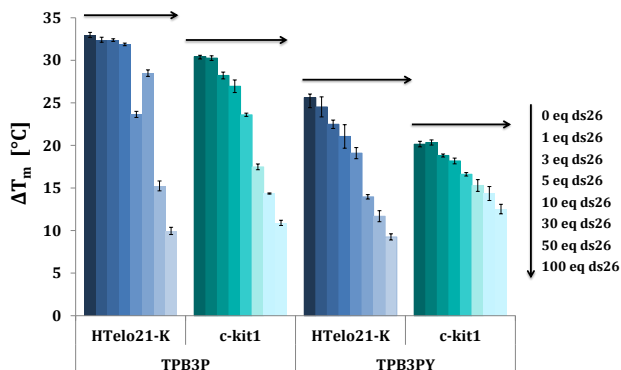


Figure 6.10. Plot of ΔT_m [°C] for FRET competition assays of TPB derivatives.

6.3.5. - Relation between ΔT_m and the charge at pH = 7.4

As discussed in the previous sections, the positive net charge of the compounds is supposed to modulate the ΔT_m values, owing to the importance of electrostatic interactions in the stabilisation of G4 structures. The plot in Figure 6.11 shows the correlation between the ΔT_m values and the positive net charge of both, TPA derivatives and TPB derivatives.

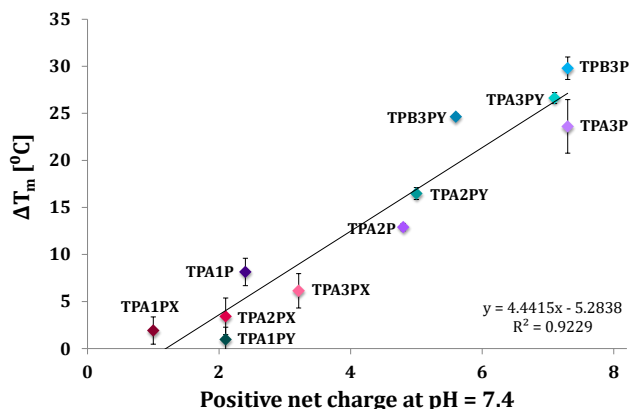


Figure 6.11. Plot of the ΔT_m [°C] values for HTelo21-Na and the studied compounds (ligand-to-G4 ratio of 5) versus the positive net charge at pH = 7.4, calculated from the distribution diagrams of species.

Regardless the polyamine-based substituent, the higher ΔT_m corresponds to tri-branched compounds for each family, which are more positively charged at physiological pH than those bi-branched or mono-branched compounds. These results highlight the relevance of electrostatic interactions in the G4 DNA stabilisation. This insight would help to the design of novel G4 binders with improved binding properties.

6.4. - Fluorescence spectroscopy studies

Background

One of the approaches in the design of G4 fluorescent probes relies on the aggregation processes taking place upon G4 interaction.^[14] Moreover, the data obtained by fluorimetric titrations give insight into the strength of that interaction. Indeed, the change of the emission profile may allow to calculate an affinity constant (K_a), which in turn may provide further insight into the selectivity of the compound.^[15]

Following from the results obtained by FRET-Melting, several fluorimetric titrations of the synthesised compounds with different DNA topologies were carried out, aiming to assess their potential Aggregation-Induced Emission (AIE) properties and their affinity towards G4 DNA. All the experimental details are described in Chapter 3. Briefly, the fluorescence emission spectrum of the ligand is monitored upon addition of small aliquots of DNA, until reaching a saturation point.

TPA derivatives show a remarkable AIE effect depending on the number of amino groups in their molecular structure. Those TPA compounds including a low number of amine groups, such as TPA-PX ligands, probed to display a slight AIE effect. Therefore, only TPA-P and TPA-PY families were further studied by fluorimetric titrations. Regarding TPB derivatives, their excitation wavelength coincides with the maximum absorption of DNA ($\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$). Consequently, the interaction between the TPB compounds and DNA was not amenable to analysis by means of fluorescence spectroscopy.

6.4.1. - TPA-P derivatives

The emission spectra of the TPA-P compounds were registered upon addition of several DNA structures. The study of TPA3P covers eight different G4 topologies and one double-stranded sequence, while, only the G4 HTelo22-K and the double-stranded ds26 were investigated for TPA1P and TPA2P. A selection of the fluorimetric data are shown in Figure 6.12. The measurements were conducted using two excitation wavelengths (314 nm and 375 nm). All the titration data are compiled in Appendix 3. The emission change of the ligand upon addition of 2 equivalents of DNA is plotted in Figure 12e.

TPA3P displays an emission band at 390 nm upon excitation at 314 nm, while no fluorescence is observed when exciting at 375 nm. As mentioned in Chapter 5, the former excitation wavelength corresponds to the diluted state, whereas the latter is associated to the aggregated state. The addition of G4 DNA yields a blue-shifted quenching of this emission band ($\lambda_{\text{ex}} = 314 \text{ nm}$) and interestingly, a new emission band emerges around 480 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$). Considering the AIE properties of TPA3P, the apparition of this new band may be associated with the formation of TPA3P-G4 aggregates. These aggregates may hamper the TPA3P intramolecular rotations in solution, with the concomitant AIE effect. Not surprisingly, the titration with double-stranded DNA does not lead to any significant emission enhancement, most likely due to the little formation of aggregates.

Consequently, TPA3P may be considered as a fluorescent probe able to selectively recognise G4 DNA. Alternatively, the emission changes experienced by the bi-branched TPA2P and the mono-branched TPA1P are less intense than those observed for the tri-branched TPA3P (Figures 6.13 and 6.14), which points out their low-to-moderate affinity towards the studied DNA topologies. This fact may be rationalised in terms of the number of electrostatic interactions established with the negatively charged backbone of DNA, which is higher for the TPA3P given its larger positive charge at physiological pH (Chapter 5).

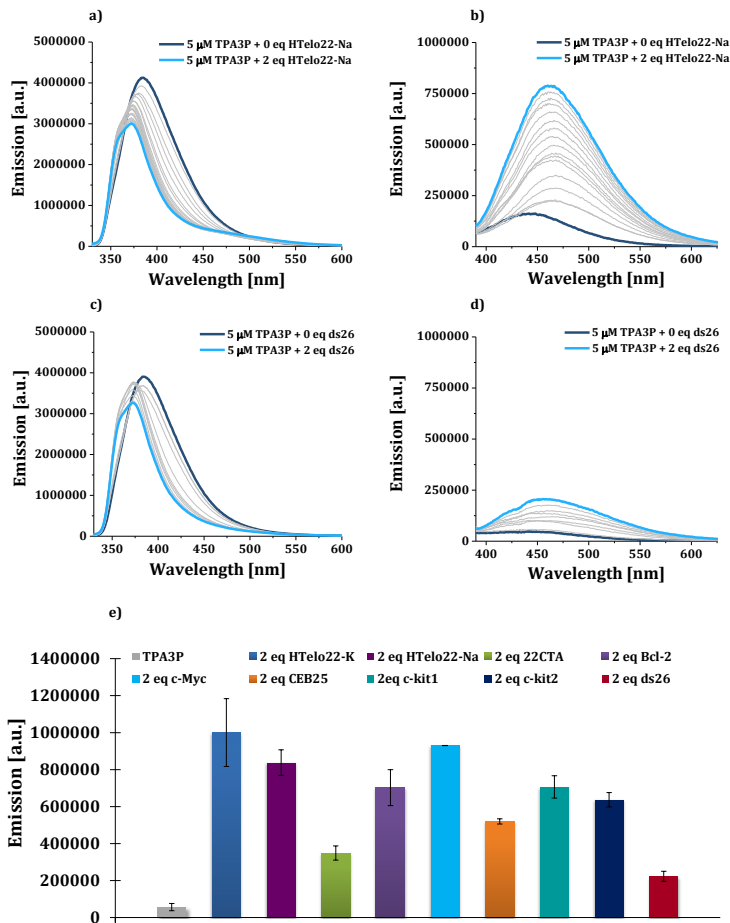


Figure 6.12. Fluorimetric titration of TPA3P with HTelo22-Na: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ nm and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm. Fluorimetric titration of TPA3P with ds26: c) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ nm and d) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm. e) Emission change experienced upon the addition of 2 equivalents of different DNA sequences to a solution of TPA3P ($\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm).

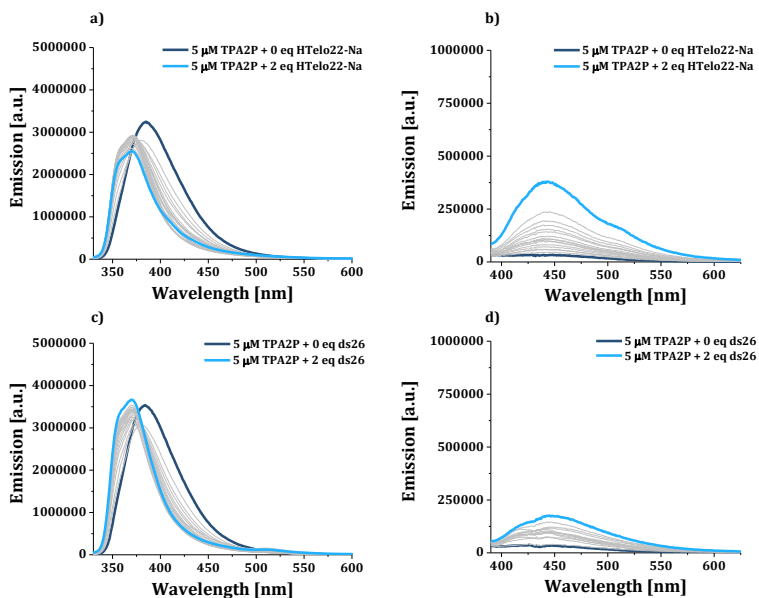


Figure 6.13. Fluorimetric titration of TPA2P with HTelo22-K: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ nm and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm. Fluorimetric titration of TPA2P with ds26: c) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ nm and d) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

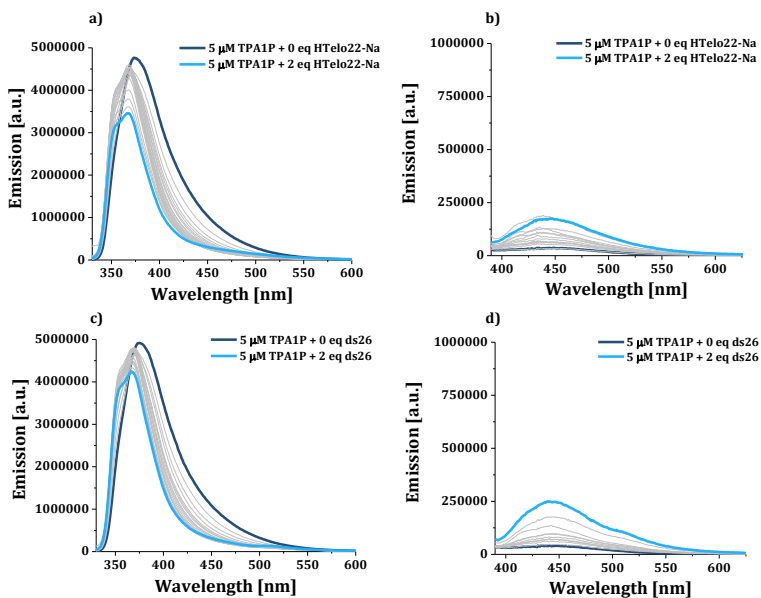


Figure 6.14. Fluorimetric titration of TPA1P with HTelo22-K: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ nm and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm. Fluorimetric titration of TPA1P with ds26: c) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ nm and d) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

The titration data enable the determination of an affinity constant (K_a) for each DNA topology. The emission was fitted to a 1:1 binding model according to the Aldrich-Wright method described in Chapter 3.^[15] Then, the plot of the emission change ($F-F_0/F_0$) against DNA concentration was fitted according to Equation 6.1, using a Levenberg-Marquadt iteration algorithm. The affinity constant was calculated from the parameters A and B following the Equation 6.2.

$$y = \frac{1}{2} R \left[x + B + A - \sqrt{(x + B + A)^2 - 4Bx} \right] \text{ (Equation 6.1)}$$

$$K_a = \frac{B}{A[L]_t} \text{ (Equation 6.2)}$$

The logarithmic values of the affinity constants ($\log K_a$) for the TPA-P compounds are listed in Table 6.2. The fitting curves for each compound are shown in Appendix 3.

Table 6.2. Logarithms of the affinity constants ($\log K_a$) calculated from the fluorimetric titrations of the systems TPA-P - DNA.

	DNA Sequence	$\log K_a$ [a]
TPA3P	HTelo22-K	6.0(1)
	HTelo22-Na	5.5(5)
	22CTA	6.1(1)
	Bcl-2	7.2(3)
	CEB25	5.8(5)
	c-Myc	5.31(2)
	c-kit1	6.5(2)
	c-kit2	7.0(4)
ds26	2.3(4)	
TPA2P	HTelo22-K	3.4(2)
	ds26	3.5(1)
TPA1P	HTelo22-K	1.6(3)
	ds26	1.3(4)

[a]Numbers in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

For all the G4 structures, the obtained $\log K_a$ values for TPA3P are considerably high, indicating a large affinity. However, the values corresponding to TPA2P and TPA1P are remarkably lower, denoting a weaker interaction. Indeed, neither of the fitting curves of TPA2P nor those for TPA1P reach a plateau even at high DNA to ligand ratios ($r = 5$). These results are in agreement with those previously described in the FRET-Melting section, demonstrating the key role of the TPA substitution with protonable polyamine-based groups for the design of potential G4-binders.

The highest values of the calculated affinities for TPA3P correspond to the sequences Bcl-2, c-kit2, c-kit1 and HTelo22-K. Not surprisingly, the value obtained for dsDNA (ds26) is very low and indeed, the fitting curve does not reach a plateau highlighting the non-specific nature of the interaction. Consequently, it can be concluded that TPA3P may act as a selective probe which strongly binds to G4 DNA.

6.4.2. - TPA-PY derivatives

Owing to the similarities between the TPA-PY and TPA-P families, the affinity and selectivity of the TPA-PY compounds were analogously assessed by fluorescence spectroscopy. A selection of the fluorimetric data are shown in Figure 6.15, while all the results are compiled in Appendix 3. The enhancement of the ligand emission upon addition of 2 equivalents of DNA is plotted in Figure 6.15e.

As expected, tri-branched TPA3PY provides the most appealing results among the TPA-PY derivatives. The fluorescence titrations of G4 DNA show a slight increase in the TPA3PY emission when exciting at 314 nm. More intriguingly, an emission band appears over 480 nm, which is associated with the aggregated state (Figure 6.15a). Moreover, using the optimal excitation wavelength for the aggregates (375 nm), this new band emerges upon the addition of G4 DNA, owing to the aggregates formation (Figure 6.15b). Regarding the titration corresponding to dsDNA, any relevant increase in the fluorescence is observed, demonstrating the high G4 selectivity of TPA3PY and its potential application as G4 fluorescent sensor.

Comparing these observations with those discussed above, TPA3PY offers a $2 \cdot 10^6$ -fold emission increase, whereas TPA3P only shows an $8 \cdot 10^5$ -fold increase in its emission upon binding the G4 HTelo22-Na. These results suggest that the aggregation tendency of TPA3PY is larger, which leads to a stronger AIE effect when interacting with G4 DNA.

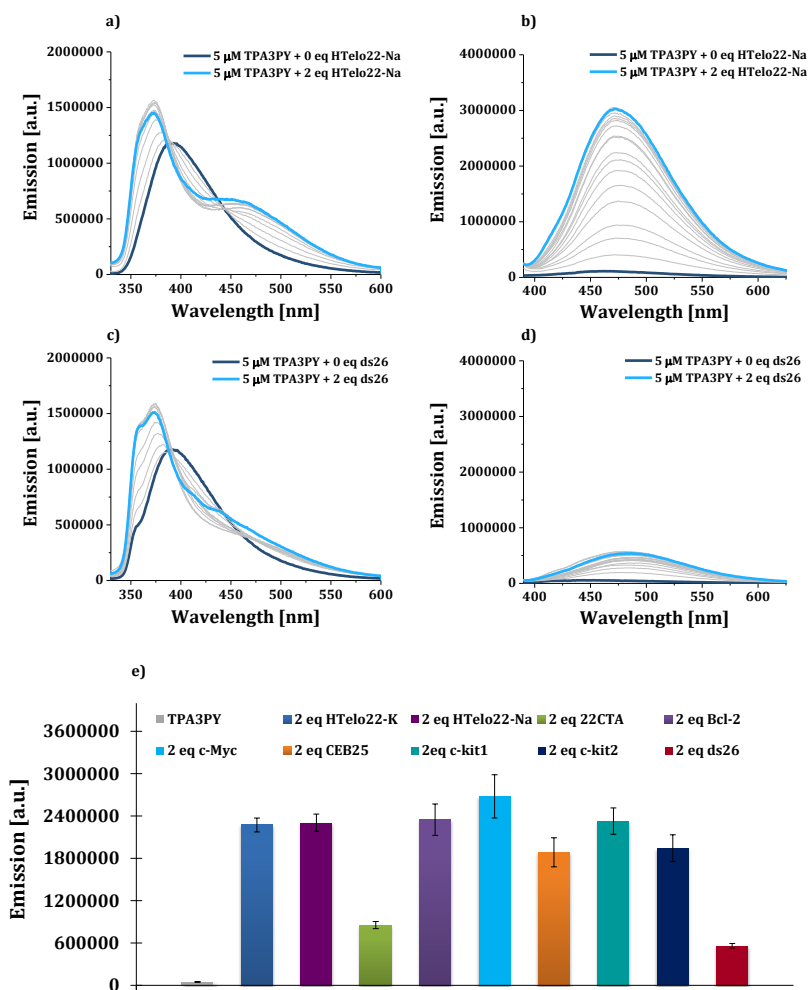


Figure 6.15. Fluorimetric titration of TPA3PY with HTelo22-Na: a) $\lambda_{ex} = 314$ nm and b) $\lambda_{ex} = 375$ nm. Fluorimetric titration of TPA3PY with ds26: c) $\lambda_{ex} = 314$ nm and d) $\lambda_{ex} = 375$ nm. e) Emission change experienced upon the addition of 2 equivalents of different DNA sequences to a solution of TPA3PY ($\lambda_{ex} = 375$ nm).

Although the photophysical behaviour displayed by TPA2PY and TPA1PY is similar to TPA3PY, the observed changes of the spectra by addition of G4 DNA are less pronounced, which is in correlation with their low-to-moderate AIE effect and lower positive net charge at physiological pH (Figures 6.16 and 6.17).

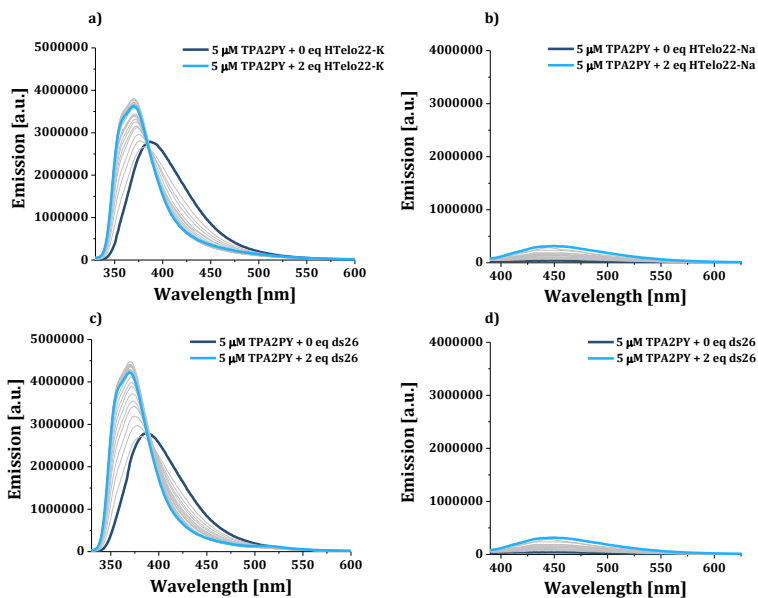


Figure 6.16. Fluorimetric titration of TPA2PY with HTelo22-K: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314 \text{ nm}$ and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$. Fluorimetric titration of TPA2PY with ds26: c) $\lambda_{\text{ex}} = 314 \text{ nm}$ and d) $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$.

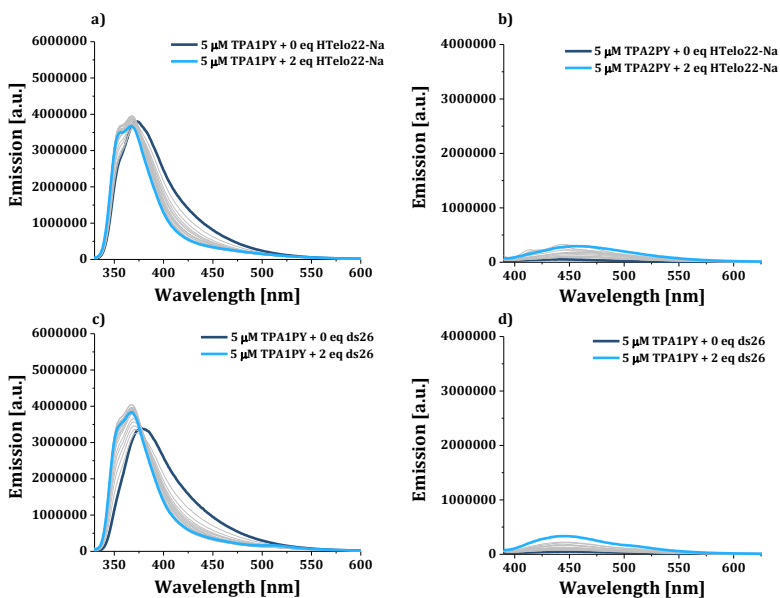


Figure 6.17. Fluorimetric titration of TPA1PY with HTelo22-K: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314 \text{ nm}$ and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$. Fluorimetric titration of TPA1PY with ds26: c) $\lambda_{\text{ex}} = 314 \text{ nm}$ and d) $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$.

All the emission data were fitted according to the Aldrich-Wright model mentioned before. The corresponding fitting curves are shown in Appendix 3 and the affinity constants ($\log K_a$) are listed in Table 6.3.

Table 6.3. Logarithms of the affinity constants ($\log K_a$) calculated from the fluorimetric titrations of the systems TPA-PY - DNA.

	DNA Sequence	$\log K_a$ ^[a]
TPA3PY	HTelo22-K	6.7(4)
	HTelo22-Na	6.6(6)
	22CTA	6.5(2)
	Bcl-2	7.2(1)
	CEB25	7.4(3)
	c-Myc	6.3(4)
	c-kit1	7.0(2)
	c-kit2	8.0(6)
	ds26	6.2(3)
TPA2PY	HTelo22-K	3.6(6)
	ds26	2.7(1)
TPA1PY	HTelo22-K	1.4(2)
	ds26	1.1(1)

^[a]Numbers in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

The $\log K_a$ values for TPA3PY are three orders of magnitude higher than those for TPA2PY, whereas TPA1PY displays the lower affinity values. Therefore, TPA3PY displays the highest affinity towards G4 DNA. These results are analogous to those obtained for the TPA-P family, which highlights the relevance of the electrostatic interactions and the TPA substitution for an effective ligand-DNA interaction.

Regarding the selectivity, the $\log K_a$ for dsDNA is higher for TPA3PY than the one for TPA3P, which denotes the larger selectivity towards G4 DNA of TPA3P. This fact may be explained in terms of charge density distribution in the TPA substituents. While TPA3P presents propylene-based branches, TPA3PY has macrocycle arms which may interact with both strands of the duplex structure at a time, resulting in a stronger interaction with this DNA topology. Nevertheless, the value of $\log K_a$ for dsDNA is estimative, due to the almost linear trend of the fitting curve (Appendix 3). Analogously, TPA2PY and TPA1PY fitting curves also show this linear trend for all the studied DNA topologies (Appendix 3).

6.5. - Circular dichroism studies

Background

The interaction between small molecules and G4 DNA may yield conformational changes in the oligonucleotide structure, which may be detected by circular dichroism (CD) titrations. These variations may be caused by the disruption, reinforcement or modification of the G4 structure. Furthermore, induced circular dichroism (ICD) bands may emerge during the titration, confirming the relevance of the ligand interaction (Chapter 3).

Therefore, those families showing a remarkable G4 affinity (TPA-P and TPA-PY) have been further studied by means of CD titrations. Three different G4 structures have been analysed: c-Myc (parallel), HTelo22-K (hybrid) and 22CTA (antiparallel). Each G4 conformation has associated a specific CD spectrum. The c-Myc sequence corresponds to a parallel conformation, which CD spectrum shows two bands, one positive at around 265 nm and one negative at over 240 nm. Alternatively, the G4 22CTA displays an antiparallel topology presenting a CD spectrum with a positive band at 295 nm and a negative band at 240 nm. Finally, the HTelo22-K includes both, parallel and antiparallel arrangements, therefore its typical CD spectrum shows a negative band at 240 nm and a positive band at 290 nm, as well as a shoulder at around 270 nm.

The experimental protocol used for the CD titrations is described in Chapter 3. Briefly, 5 μ M DNA solutions were titrated with aliquots from a 0.5 mM ligand stock solution (pH 7.4), until reaching a ligand-to-G4 ratio of 5.

6.5.1. - TPA-P derivatives

The CD spectra corresponding to the c-Myc titrations with the TPA-P compounds are plotted in Figure 6.19. Upon addition of the TPA derivatives, a decrease in the c-Myc CD bands is observed. Furthermore, the more branches the ligand has, the more remarkable the decrease is, demonstrating the importance of the TPA substitution in the G4-binder interaction.

However, since the overall shape of the spectrum is retained, the interaction between the ligands and the G4 does not cause a disruption of the c-Myc structure. However, the decrease of the bands may suggest the change of the G-tetrads disposition by the ligand interaction.

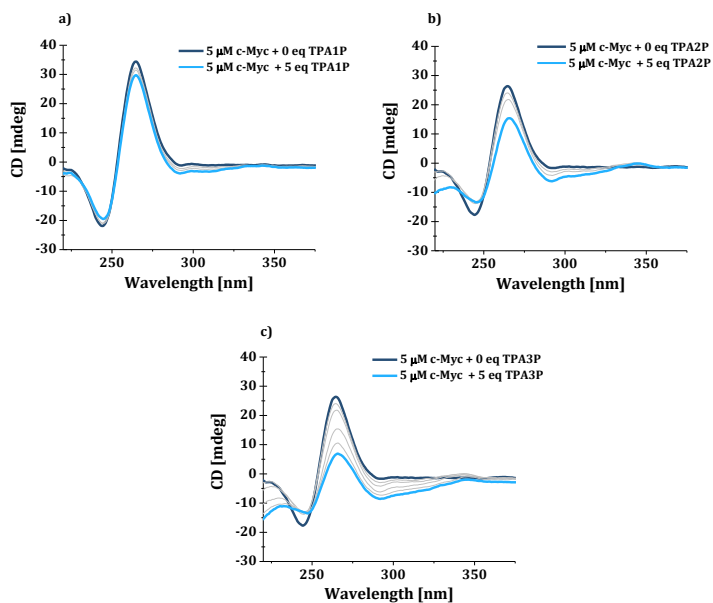


Figure 6.19. CD Titrations of c-Myc with a) TPA1P, b) TPA2P and c) TPA3P.

The 22CTA titrations with TPA1P, TPA2P and TPA3P are shown in Figure 6.20. In correlation with the above described results, the CD spectra changes are more prominent as the number of the TPA substituents increases. Particularly, upon the addition of the ligand, the positive band centred at 295 nm decreases, while an ICD band emerges at around 342 nm. This latter band may be result of the chirality conferred to the TPA derivatives when interacting with 22CTA, by either binding to the grooves or stacking on top of the G-tetrads.

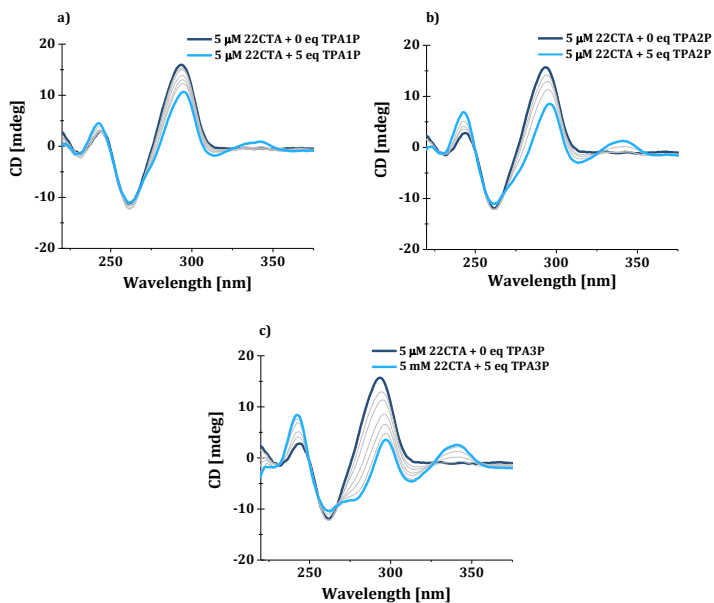


Figure 6.20. CD Titrations of 22CTA with a) TPA1P, b) TPA2P and c) TPA3P.

Finally, the CD spectra of HTelo22-K titrations are compiled in Figure 6.21. A similar effect to 22CTA titrations is observed. The addition of TPA-P ligands result in a decrease of the positive band at 295 nm and the appearance of an ICD band at over 330 nm, maintaining the spectrum shape.

All these results point out not only that TPA-P ligands strongly interact with G4 DNA, but also that the G4 conformation is not disrupted upon the binding. Furthermore, the role of the TPA substitution in the establishment of supramolecular interactions with G4 DNA is also highlighted.

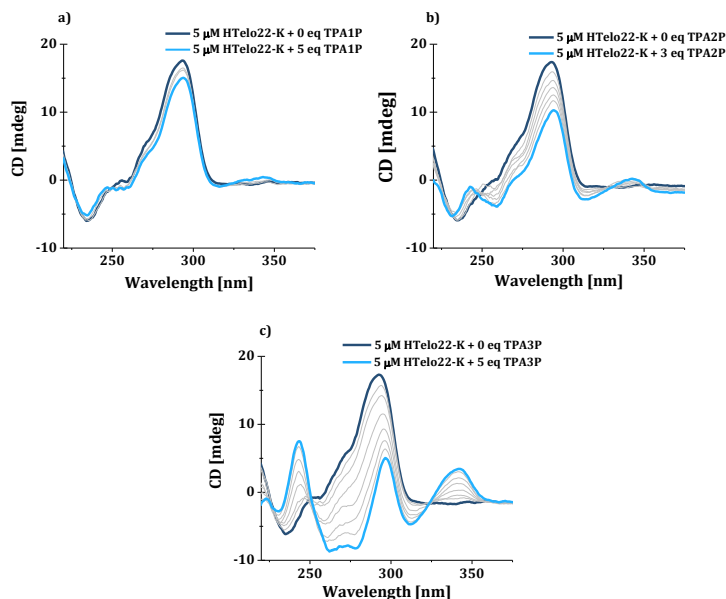


Figure 6.21. CD Titrations of HTelo22-K with a) TPA1P, b) TPA2P and c) TPA3P.

6.5.2. - TPA-PY derivatives

The CD titrations corresponding to the TPA-PY ligands are conjointly shown in Appendix 3. The variations of the G4 CD spectra upon the addition of TPA-PY ligands are analogous to the previously described for the TPA-P compounds. All the G4 sequences experience a decrease in their CD bands and moreover an ICD band appears at around 340 nm for HTelo22-K and 22CTA. These changes are more remarkable as the number of PY substituents increases. In comparison to the other TPA derivatives, the observed changes during the CD titrations are more significant for TPA-PY derivatives than those displayed by TPA-P compounds, denoting a stronger interaction with G4 DNA (Figure 6.22). This fact may be explained in terms of the TPA substituents molecular design. The higher density charge at the PY macrocycle may favour the interaction with the G4 DNA, while the P propylene-based arms of the TPA-P compounds may provide a slightly lower stabilisation.

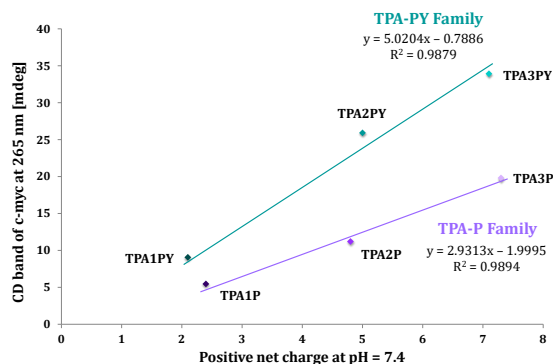


Figure 6.22. Plot of the intensity change of the c-Myc CD band at 265 nm [mdeg] upon adding 5 equivalents of the TPA-P and TPA-PY compounds versus their positive net charge at pH = 7.4, calculated from the distribution diagrams of species.

6.6. - Computational studies

Aiming to get further insight into the G4 selectivity and the binding mode of TPA3P and TPA3PY compounds, Àlvar Martínez-Camarena kindly conducted computational studies using G4 and double-stranded DNA models. The details regarding the set-up of these studies are explained in Chapter 3. The cartoon representation of the studied DNA is showed in Figure 6.23. The structure of the G4 DNA corresponds to the typical hybrid conformation of the HTelo22-K sequence, while the analysed dsDNA presents the most common topology of duplex DNA, the B form.

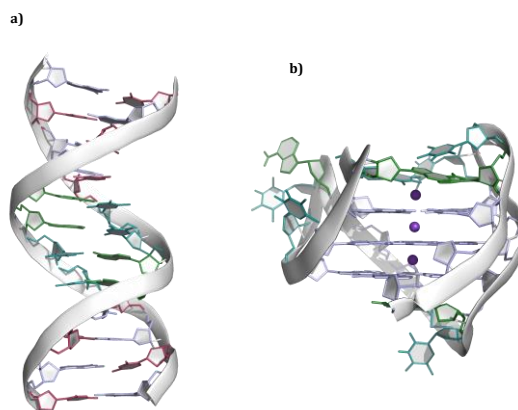


Figure 6.23. DNA structures used in the computational studies: a) the dsDNA was constructed using the NAB molecular manipulation language (AMBER16)^[18] and b) the G4 was taken from Protein Data Bank (PDB: 2JSM). The potassium ions were lately included.

The representative minimal energy conformers for the interaction between G4 DNA and the TPA derivatives are illustrated in Figures 6.24 and 6.25. The binding mode of both compounds is through the upper G-tetrad. The interaction is supported by means of different supramolecular interactions. Salt bridges are formed between the protonated amino groups of the polyamine substituents and the phosphate backbones of the G4 grooves (average distance of $d_{O^{\dots}+H-N} \approx 1.97 \text{ \AA}$ for TPA3P-G4 and $d_{O^{\dots}+H-N} \approx 1.96 \text{ \AA}$ for TPA3PY-G4). Moreover, the TPA central moiety establishes π - π interactions with the upper G-tetrad of the G4, providing further stabilisation to the binding (average distance of $d \approx 3.40 \text{ \AA}$ for TPA3P-G-tetrad and $d \approx 3.29 \text{ \AA}$ for TPA3PY-G-tetrad).

Indeed, the importance of the combination of these two forces in the G4 interaction is also reflected in the previously discussed experimental results. Tri-substituted TPA derivatives show a higher affinity towards G4 DNA than bi-branched and mono-branched compounds. This fact may be related to the larger stabilisation achieved by the interaction between the G4 grooves and the three polyamine-based substituents (Figures 6.26, 6.27 and 6.28). The alignment of the TPA central moiety and the G-tetrad is similar for both tri-branched compounds, although the central amine of TPA is displaced from the ion channel of the G-tetrad in one direction for TPA3P and in the opposite for TPA3PY ($d_{K^+ \dots N_{\text{central}}} = 8.1 \text{ \AA}$ for TPA3PY and $d_{K^+ \dots N_{\text{central}}} = 6.6 \text{ \AA}$ for TPA3P). The TPA phenyl groups in both cases are located close to the guanines, showing a propeller disposition (Figures 6.24 and 6.25).

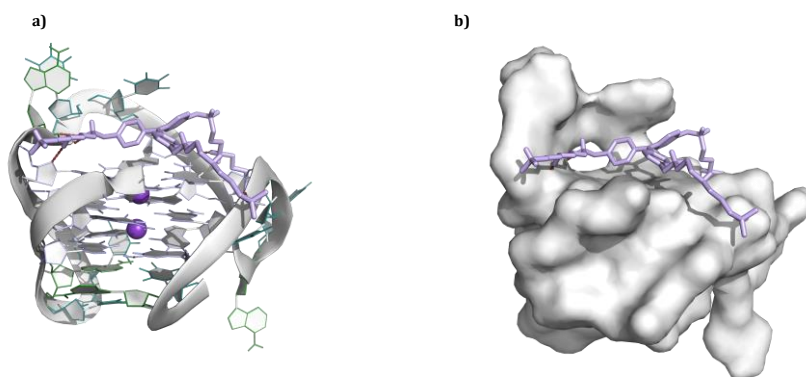


Figure 6.24. Illustration of the interaction between TPA3P and the G4 model through a) a cartoon and b) surface representation.

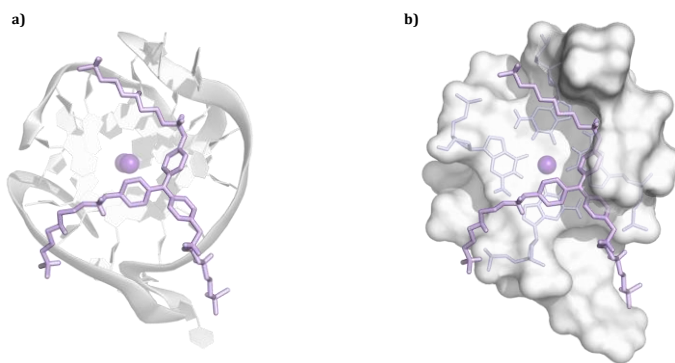


Figure 6.25. Top view of the interaction between TPA3P and the G4 DNA model through a) a cartoon and b) surface representation.

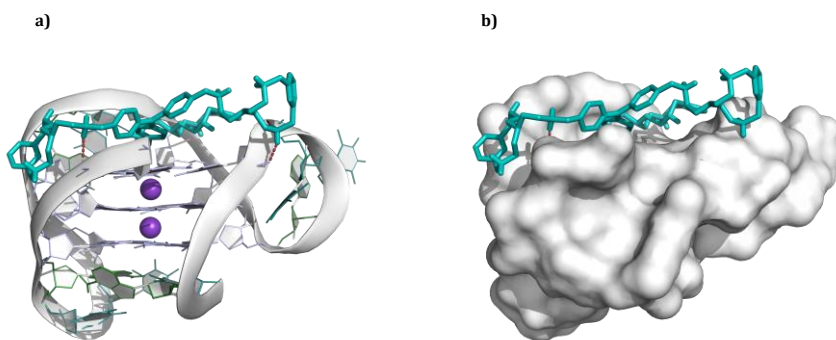


Figure 6.26. Illustration of the interaction between TPA3PY and the G4 DNA model through a) a cartoon and b) surface representation.

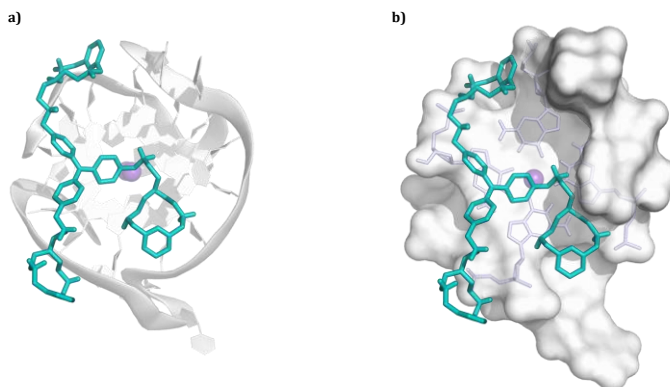


Figure 6.27. Top view of the interaction between TPA3PY and the G4 DNA model through a) a cartoon and b) surface representation.

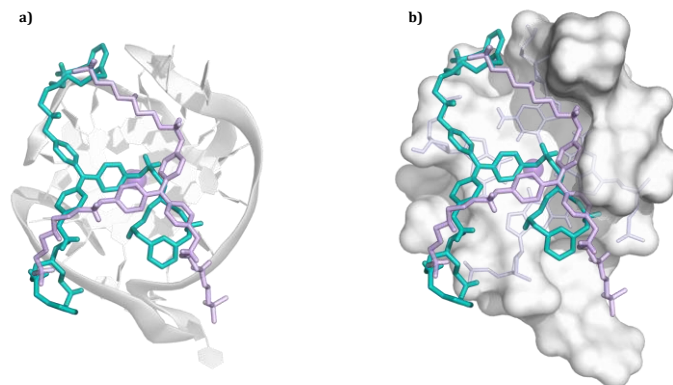


Figure 6.28. Overlapping of the top view of the interaction between TPA3P and TPA3PY with the G4 DNA model through a) a cartoon and b) surface representation.

Regarding the computational studies with dsDNA, TPA3P and TPA3PY show the same binding mode preference with the double helix. However the repercussions in the duplex structure are different. The interaction between both compounds and the minor groove of the DNA is observed in Figures 6.29 and 6.30. The positively charged amino groups are close to the negatively charged DNA backbone, indicating the relevance of salt bridges in the duplex binding (average distance of $d_{O^{\cdot-}\dots^+H-N} \approx 2.04 \text{ \AA}$ for TPA3P-dsDNA and $d_{O^{\cdot-}\dots^+H-N} \approx 1.89 \text{ \AA}$ for TPA3PY-dsDNA).

Nevertheless, providing the macrocyclic nature of the substituents in TPA3PY, those are able to interact simultaneously with the phosphate groups corresponding to both duplex strands, while the branches in TPA3P only are able to interact with one strand. As a result, TPA3PY causes a modification of the duplex structure (elongation of the major groove of $\sim 9 \text{ \AA}$ and contraction of the minor groove of $\sim 5 \text{ \AA}$, Figure 6.30), whereas TPA3P does not modify the duplex structure (Figures 6.28 and 6.29). Moreover, the variations between the representative minimal energy conformers are less pronounced for TPA3PY than those for TPA3P, which suggest that the interaction between TPA3PY and dsDNA is more stable than those with TPA3P.

The hydrophobicity of the TPA moiety is an important feature to be considered when comparing the interaction with the different DNA structures. While TPA interacts with the upper G-tetrad through π - π stacking stabilising the G4 structure, this moiety remains close to the charged phosphate backbone when interacting with duplex DNA, which generates instability. This fact may explain the high selectivity found for the TPA derivatives previously discussed in this chapter, which is reinforced by the functionalisation with protonable amino substituents.

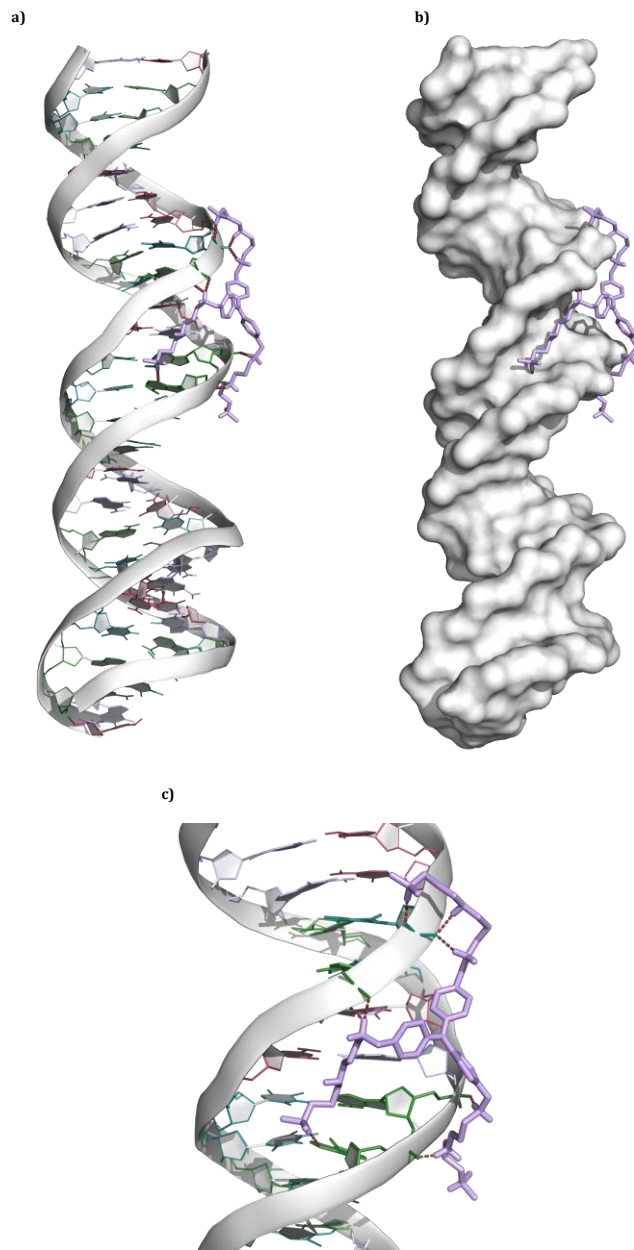


Figure 6.29. Illustration of the interaction between TPA3P and the double-stranded DNA model through a) a cartoon and b) surface representation. The image c) is a detailed view.

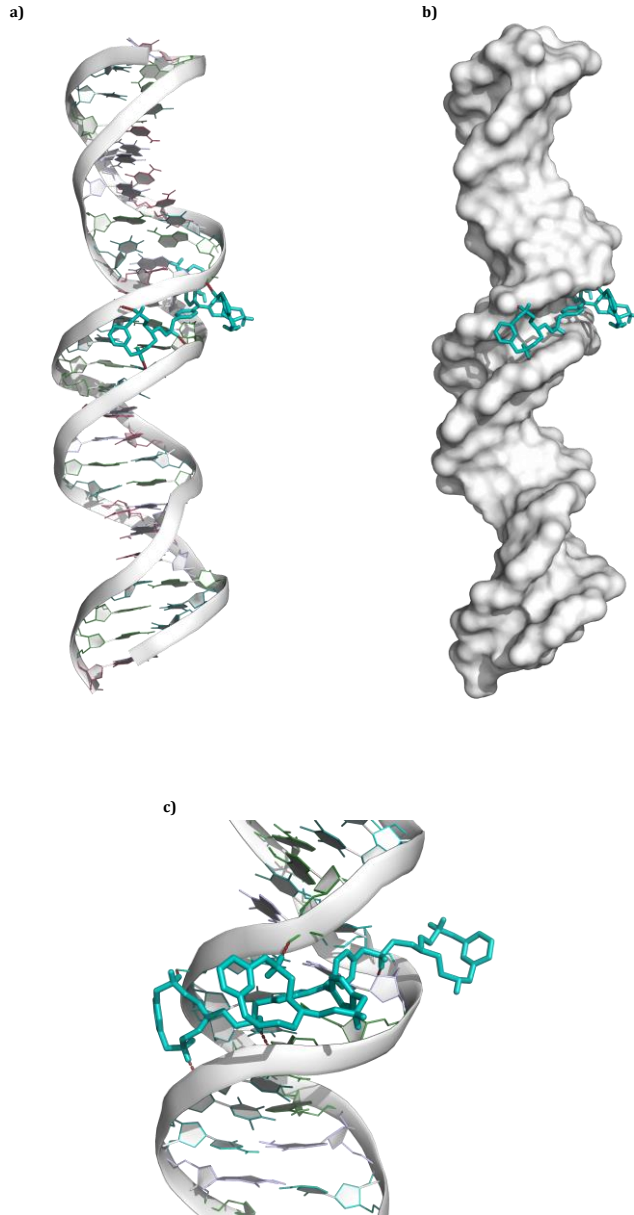


Figure 6.30. Illustration of the interaction between TPA3PY and the double-stranded DNA model through a) a cartoon and b) surface representation. The image c) is a detailed view.

6.7. - References

- [1] A. T. Phan, K. N. Luu, D. J. Patel, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5715–5719.
- [2] A. T. Phan, V. Kuryavyyi, K. N. Luu, D. J. Patel, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 6517–6525.
- [3] Y. Wang, D. J. Patel, *Structure* **1993**, *1*, 263–282.
- [4] K. W. Lim, V. C. M. Ng, N. Martín-Pintado, B. Heddi, A. T. Phan, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 10556–10562.
- [5] K. W. Lim, P. Alberti, A. Guédin, L. Lacroix, J.-F. Riou, N. J. Royle, J.-L. Mergny, A. T. Phan, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 6239–6248.
- [6] J. Dai, D. Chen, R. A. Jones, L. H. Hurley, D. Yang, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5133–5144.
- [7] J. Dai, T. S. Dexheimer, D. Chen, M. Carver, A. Ambrus, R. A. Jones, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1096–1098.
- [8] A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, R. A. Jones, D. Yang, *Biochemistry* **2005**, *44*, 2048–2058.
- [9] S. Amrane, M. Adrian, B. Heddi, A. Serero, A. Nicolas, J. L. Mergny, A. T. Phan, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5807–5816.
- [10] A. T. Phan, V. Kuryavyyi, S. Burge, S. Neidle, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4386–4392.
- [11] V. Kuryavyyi, A. T. Phan, D. J. Patel, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 6757–6773.
- [12] A. de Rache, J.-L. Mergny, *Biochimie* **2015**, *115*, 194–202.
- [13] J.-L. Mergny, L. Lacroix, M.-P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittat, M. Hoarau, P. B. Arimondo, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, J.-F. Riou, T. Garestier, C. Helene, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 3062–3067.
- [14] D. Ding, K. Li, B. Liu, B. Z. Tang, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2441–2453.
- [15] F. H. Stootman, D. M. Fisher, A. Rodger, J. R. Aldrich-Wright, *Analyst* **2006**, *131*, 1145–1151.
- [16] E. A. Chandross, C. J. Dempster, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3586–3593.
- [17] W. Naumann, *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 064505.
- [18] D. A. Case, R. M. Betz, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham, T. A. Darden, R. E. Duke, T. J. Giese, H. Gohlke, A. W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K. M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H. T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C. L. Simmerling, W. M. Botello-Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, P. A. Kollman, AMBER 2016, *Univ. California, San Fr.* **2017**.

Prior to study nanoparticles *in vitro* it is crucial to assess several parameters. This chapter compiles both chemical and physical characterisation of the liposomes obtained during this thesis. Firstly, all the liposome formulations designed are presented. Then, their size and morphology are assessed by means of dynamic light scattering (DLS) and cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM). The latter part of this chapter is focused in quantifying the content of both the therapeutic and the diagnostic agent within the nanoparticles.

7.1. - Liposomes design

As previously described in Chapter 1, liposome formulations in this thesis were conceived attempting to obtain theranostic nanoparticles. The main advantage of these systems is the combination of both therapeutic and diagnostic properties within the same nano-scaffold.^[1,2]

Among all the compounds presented in this thesis, those tri-substituted (TPA3P, TPA3PY, TPB3P and TPB3PY) show the highest affinity and selectivity towards G4 DNA (Chapter 6). Accordingly, the therapeutic effect of these compounds is supposed to be the most promising. However, their cell uptake may be hampered due to their high positive charge at physiological pH. The approach taken to overcome this possible limitation is the encapsulation of the compounds inside liposome nanoparticles, which may enhance their cell internalisation. Aside from the therapeutic application, the liposome design is addressed to achieve diagnostic properties. Indeed, vesicles were functionalised with a gadolinium complex (Gd-DTPA-DSA) and a fluorescent phospholipid (DPPE-NBD) (Figure 7.1). As a result, liposomes may be able to act as contrast agents and fluorescent sensors for magnetic resonance imaging (MRI) and confocal fluorescence microscopy.^[3]

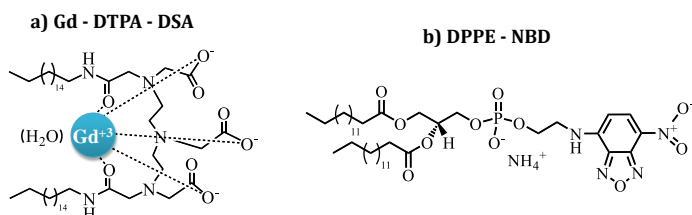


Figure 7.1. Depiction of the molecular structure of a) Gd-DTPA-DSA and b) DPPE-NBD.

Therefore, taking the overall composition of liposomes into account, they can be considered as theranostic nanoparticles. Furthermore, these vesicles were further functionalised with the aptamer AS1411, pursuing to achieve an optimal internalisation into the cell cytoplasm and nucleus. This aptamer is supposed to interact specifically with the protein nucleolin, which is overexpressed in the cytoplasmic and nuclear membrane of tumour cells, acting as a shuttle between them (Figure 7.2).^[4,5]

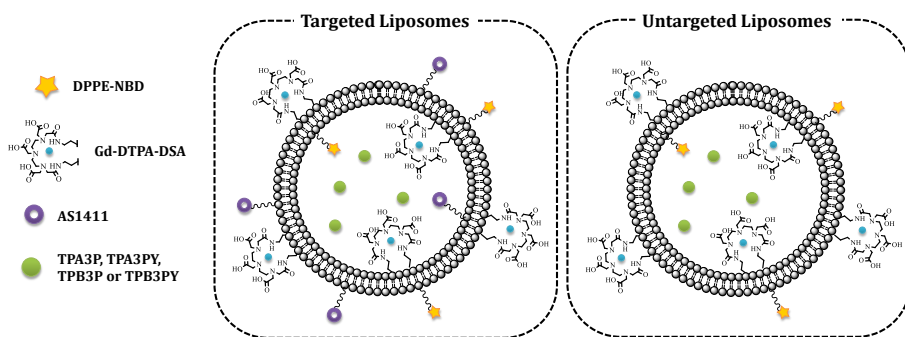


Figure 7.2. Depiction of the liposome formulations designed during this thesis.

Several formulations were designed in order to get insight into the role of the liposome composition. The nomenclature and description of those are compiled in Table 7.1. The liposome general formulation is named Lip. The therapeutic agents incorporated in the vesicles were the tri-branched compounds TPA3P, TPA3PY, TPB3P or TPB3PY, which are specified at the end of the formulation name. Those liposomes which were further functionalised with the AS1411 aptamer are denoted as Lip-Ap.

Table 7.1. Liposome formulations designed during this thesis.

Liposomes (Lip)	
Encapsulated compound	Name
TPA3P	Lip - TPA3P
TPA3PY	Lip - TPA3PY
TPB3P	Lip - TPB3P
TPB3PY	Lip - TPB3PY
Liposomes-Aptamer (Lip - Ap)	
Encapsulated compound	Name
TPA3P	Lip - Ap - TPA3P
TPA3PY	Lip - Ap - TPA3PY
TPB3P	Lip - Ap - TPB3P
TPB3PY	Lip - Ap - TPB3PY

7.2. - Physical characterisation

Two of the key physical parameters for liposomes application in the biomedical field are size distribution and morphology. In this context, Dynamic Light Scattering (DLS) is a widely used technique for size analysis, by measuring the light scattered by Brownian motion of nanoparticles (Chapter 3).

Therefore, all the liposome suspensions synthesised were analysed by DLS. The size distribution diagrams are plotted in Figure 7.3. All of them show an index of polydispersity over 0.16, which denotes a narrow size distribution with a highly homogeneous nanoparticle size.

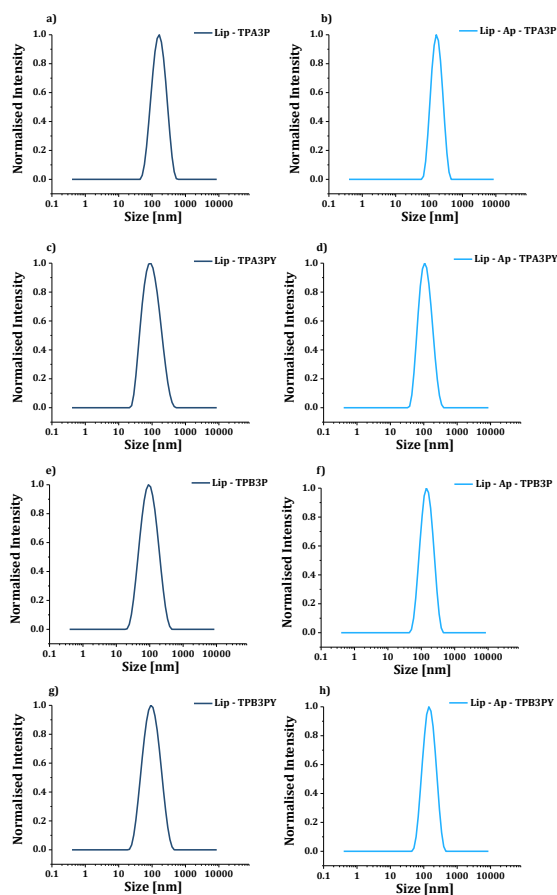


Figure 7.3. Particle size distribution of liposomes suspensions in PBS (pH = 7.4).

The averaged liposome diameter corresponding to each formulation is listed in Table 7.2. All the samples show nanometric size ranging from 80 nm to 150 nm, which is convenient for biomedical applications owing to the enhancement of the cell uptake via EPR effect.^[6-8] A more detailed analysis of the values has given insight into the aptamer functionalisation. Those liposomes which include the aptamer show a slightly larger average size than those bare liposomes, due to the surface functionalisation.

Table 7.2. Average size of liposome formulations.^[a]

Liposomes (Lip)	
Encapsulated compound	Average Size [nm]
TPA3P	134(4)
TPA3PY	81(2)
TPB3P	82(3)
TPB3PY	83(2)
Liposomes-Aptamer (Lip-Ap)	
Encapsulated compound	Average Size [nm]
TPA3P	148(6)
TPA3PY	101(2)
TPB3P	124(5)
TPB3PY	125(4)

[a] Values in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

Apart from size, liposomes morphology is another key point to be evaluated. A wide range of techniques are available for assessing the typical spherical shape of vesicles and confirm their formation, such as electron microscopy, atomic force microscopy or confocal fluorescence microscopy.

All of them provide valuable information about the shape, as well as the size of the nanoparticles. However, the sample preparation is extremely crucial, since liposomes require an aqueous environment to maintain its native shape. At this thesis, liposomes morphology was studied by means of cryo-Scanning Electron Microscopy (cryo-SEM). Briefly, this technique allows to visualise the vesicles morphology by freezing them under N₂, avoiding the disruption due the high vacuum required for the electron imaging (Chapter 3). A representative image of a liposome suspension is showed in Figure 7.4, in which the spherical shape of the liposomes is observed.

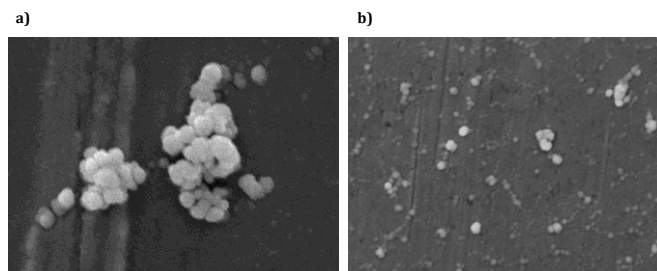


Figure 7.4. Images obtained by cryo-SEM of a liposomes suspension sample (Lip).

7.3. - Liposomes therapeutic properties

Liposome formulations in this thesis were designed aiming to achieve theranostic nanoparticles. Prior to assess these liposomes through biological studies, it is essential to characterise their cargo content, since this would be linked to their therapeutic properties.

This section aims to describe the quantification of TPA3P, TPA3PY, TPB3P and TPB3PY encapsulated inside the different liposome suspensions. As mentioned above, these compounds show a striking affinity towards G4 DNA (Chapter 6), being potential drugs for antitumour therapies. However, their cell uptake may be hampered, given their high positive charge at physiological pH. Consequently, liposomes would act as delivery systems, enhancing their therapeutic properties.

Generally, the determination of the liposomes cargo relies on the disruption of the lipid bilayer, followed by the quantification of the released compound. Nevertheless, the methodology used depends on the nature of the confined molecule and its response to external stimuli. In this thesis all the encapsulated ligands are fluorescent. Therefore, the emission of compounds was the property selected to assess the cargo content. Hence, a standard calibration curve for each compound was constructed using their emission maxima. The concentration of the cargo was calculated by interpolation of the samples emission at 370 nm after leakage (Chapter 3). In Figure 7.5 the emission spectra of the ligand standards at increasing concentrations are plotted along with their corresponding standard curve.

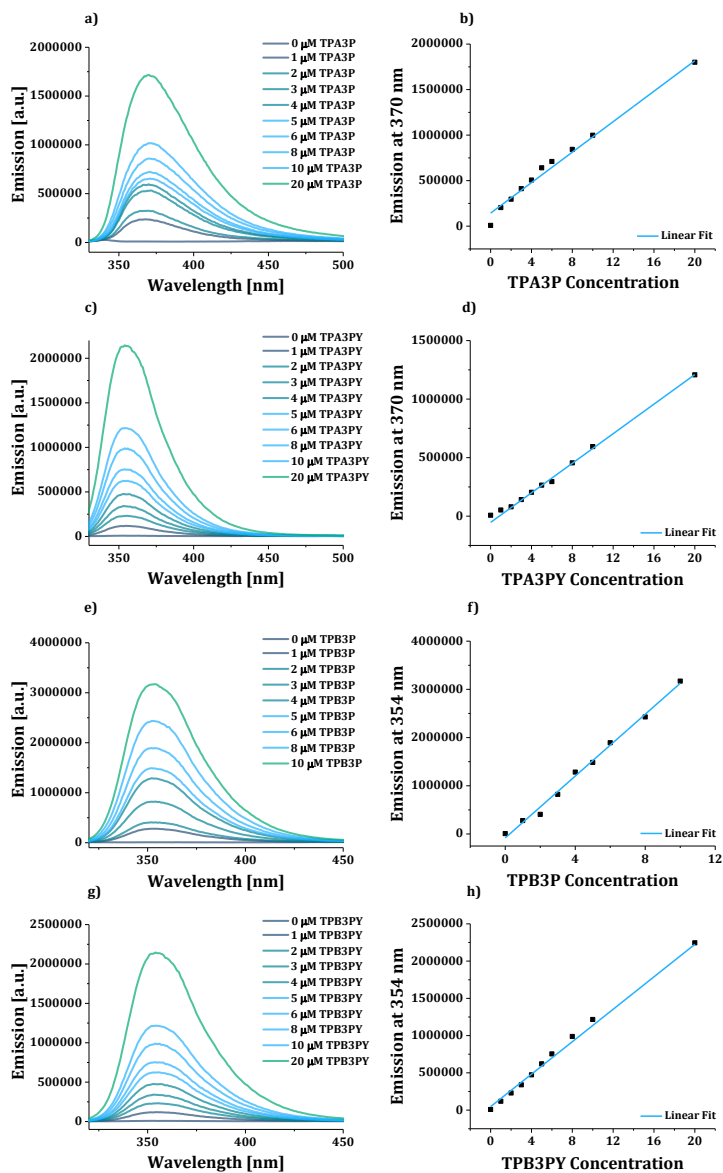


Figure 7.5. Emission spectra of increasing concentrations of ligand standards (right) and their corresponding standard curve (left). All the experimental details are described in Chapter 3.

The quantification of the cargo was carried out by interpolating the emission of disrupted liposomes at 370 nm (for TPA derivatives) or 354 nm (for TPB derivatives) at the standard curve. The final value results from averaging at least three replicates of the sample (Table 7.3).

The encapsulation of TPA derivatives is a more favourable process than the corresponding one to TPB derivatives, since the values of liposomes containing TPA-based compounds are one order of magnitude higher than those with TPB-based ligands. Regarding the formulations with and without aptamer, the amount of encapsulated compound is within the same range. Therefore, the aptamer functionalisation do not modified the entrapment capability of liposomes.

Table 7.3. Concentration of therapeutic agent inside the synthesised liposomes.^[a]

Liposomes	
Encapsulated compound	Concentration [μM]
TPA3P	424(2)
TPA3PY	261(8)
TPB3P	72.0(1)
TPB3PY	43.8(5)
Liposomes-Aptamer	
Encapsulated compound	Concentration [μM]
TPA3P	323(5)
TPA3PY	265(9)
TPB3P	45(1)
TPB3PY	44(2)

[a] The emission were registered after disrupting the vesicles using a MeOH/Water mixture. All the measurements were performed at least in triplicate. Values in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

7.4. - Liposomes diagnostic properties

Since the phospholipidic bilayer of liposomes contains the complex Gd-DTPA-DSA, another key point to be assessed is the capability of liposomes to act as contrast agents for MRI. As described in Chapter 3, the first step is to quantify the content in gadolinium at the suspensions by means of Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). In Table 7.4 are compiled the gadolinium concentration for the different liposomes formulations. All the concentrations are similar, probing the reproducibility of the methodology used for the liposome synthesis.

Table 7.3. Quantification of the therapeutic component inside the synthesised liposomes.^[a]

Liposomes	
Encapsulated compound	Concentration of Gd [mg/L]
TPA3P	136.2(1)
TPA3PY	148(3)
TPB3P	149.1(1)
TPB3PY	145(2)
Liposomes-Aptamer	
Encapsulated compound	Concentration of Gd [mg/L]
TPA3P	161(2)
TPA3PY	153.4(6)
TPB3P	121.6(1)
TPB3PY	137(4)

[a] Values in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

7.5. - References

- [1] H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 999–1008.
- [2] V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 145–160.
- [3] Y. Namiki, T. Fuchigami, N. Tada, R. Kawamura, S. Matsunuma, Y. Kitamoto, M. Nakagawa, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1080–1093.
- [4] J. Wu, C. Song, C. Jiang, X. Shen, Q. Qiao, Y. Hu, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 3555–3563.
- [5] P. J. Bates, E. M. Reyes-Reyes, M. T. Malik, E. M. Murphy, M. G. O. Toole, J. O. Trent, *Biochim. Biophys. Act. Gen. Subj.* **2017**, *1861*, 1414–1428.
- [6] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O. C. Farokhzad, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 2–25.
- [7] H. Maeda, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *91*, 3–6.
- [8] J. W. Nichols, Y. H. Bae, *J. Control. Release* **2014**, *190*, 451–464.

The eighth chapter deals with the study of the synthesised compounds and nanoparticles at a cellular level. Firstly, the cytotoxicity of the ligands has been assessed by means of MTT assays, in order to get insight into their therapeutic activity. Secondly, the drug delivery properties of both targeted and untargeted liposome nanoparticles has been characterised using the same procedure. Finally, confocal fluorescence microscopy has been used to study the cell location of the different liposome formulations.

8.1. - Cell viability assessment

As presented in the introduction, G4 DNA is a potential target in antitumour therapy. Therefore, once having demonstrated the high selectivity and affinity of some of the synthesised compounds towards G4 DNA *in vitro* (Chapter 6), it is essential to study their cytotoxicity in tumour cell lines, in order to assess their potential as therapeutic agents.

The protocol used was the well-known MTT assay, described in Chapter 3. Briefly, its principle relies on the cellular reduction of MTT, yielding the formation of blue formazan crystals, which are directly related with the number of living cells. Consequently, by measuring the absorbance at 570 nm, it is possible to quantify the metabolic active cells and calculate an IC₅₀ value for the tested compound. With the aim to check out the reproducibility of the results, several tumour cell lines have been assessed (Table 8.1). All the experimental details and data analysis procedures are compiled in Chapter 3.

Typically, IC₅₀ values lower than 10 μM indicate high cytotoxicity. For instance, the well-known antitumour drug Cis-platin has associated IC₅₀ values over 5 - 8 μM ,^[1] whereas the G4-binder Quarfloxacin, currently in clinical trials, shows values around 0.07 - 1.3 μM (these values correspond to MCF-7 tested in the same conditions as those described above).^[2]

Table 8.1. Description of the cell lines used in this thesis.

Name	Tissue	Cell type	Disease	References
LN229	Brain	Epithelial	Glioblastoma	[3,4]
MCF-7	Breast	Epithelial	Adenocarcinoma	[5,6]
HeLa	Cervix	Epithelial	Adenocarcinoma	[7,8]

8.1.1. - TPA derivatives

As described in Chapter 6, TPA derivatives with PX substituents (TPA-PX), show lower affinity towards G4 DNA than the other families of compounds. Nevertheless, the IC_{50} values for the tumour cell lines investigated denote moderate cytotoxicity for TPA1PX ($IC_{50} = 8 - 7 \mu M$) and low cytotoxicity for TPA2PX and TPA3PX ($IC_{50} = 12 - 22 \mu M$) (Figure 8.1).

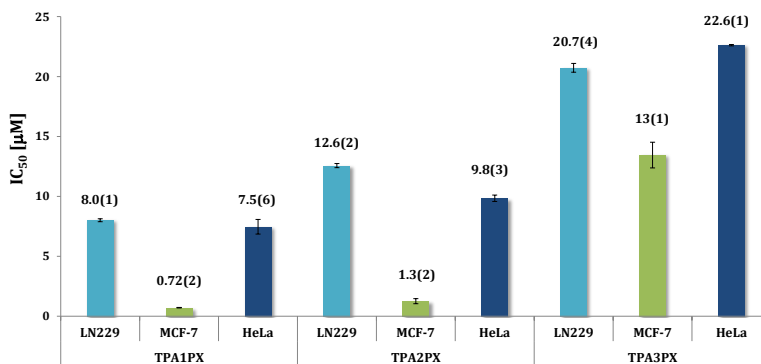


Figure 8.1. Plot of the IC_{50} values corresponding to TPA-PX derivatives tested in different cell lines.

A more detailed analysis shows that the cytotoxicity of the TPA-PX derivatives decreases as the number of substituents increases. Indeed, despite displaying the lowest affinity towards G4 DNA, TPA1PX presents IC_{50} values remarkably lower than TPA3PX. This observation may be linked to the compound cell uptake: as the number of substituents increases, the positive net charge of the ligand increases, resulting in a less efficient cell uptake and in turn a lower therapeutic effect. This fact may be explained by the hydrophobic nature of the cell membrane, which hampers the internalisation of ionic molecules. [9] Consequently, the tri-branched compound TPA3PX, which causes a larger stabilisation of G4 DNA *in vitro*, is not efficiently internalised by the cell, and therefore, its antitumour activity is low.

The results corresponding to TPA-P derivatives are in correlation with those above presented (Figure 8.2). In general, these compounds display lower cytotoxicity than TPA-PX compounds, most likely due to their higher positive charge at physiological pH (Chapter 5). Particularly, TPA3P, despite showing an outstanding selectivity towards G4 DNA *in vitro* (Chapter 6), it presents little-to-no cytotoxicity for the studied cell lines ($IC_{50} = 19 - 40 \mu M$).

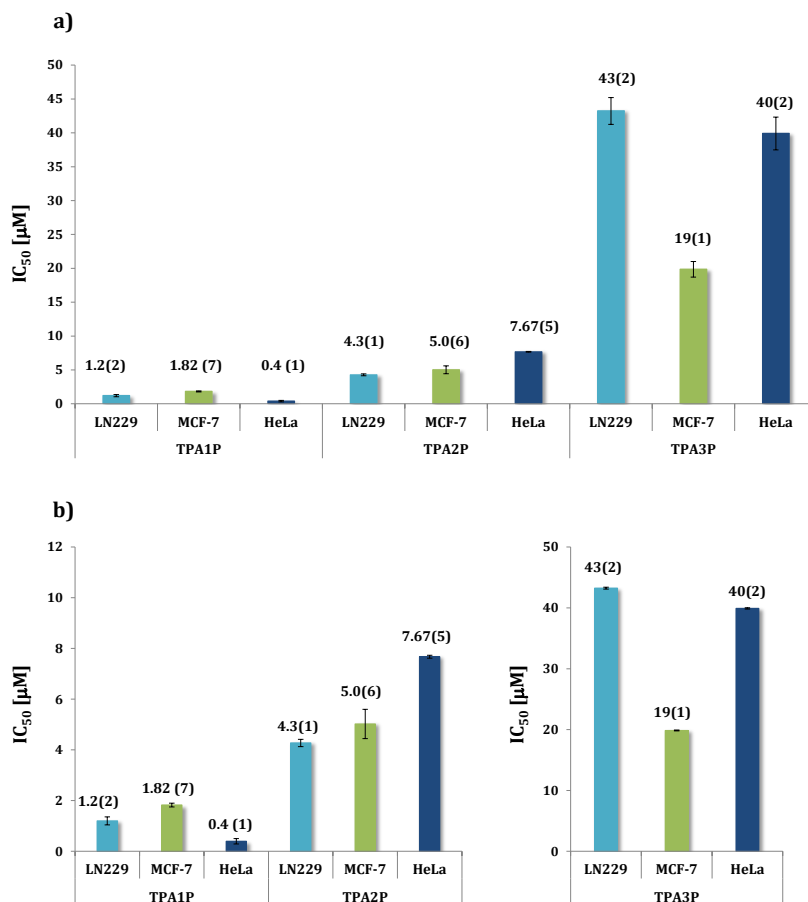


Figure 8.2. a) Plot of the IC₅₀ values corresponding to TPA-P derivatives tested in different cell lines. The same scale is referred to the highest IC₅₀ value, b) detailed IC₅₀ plot adjusting the scale.

The behaviour of TPA-PY derivatives is analogous to the corresponding TPA-P compounds (Figure 8.3). The cytotoxicity is high for the mono-branched and the bi-branched compounds (1 - 7 μM), whereas it is low for the tri-branched TPA3PY (24 - 47 μM). Consequently, the positive charge at pH = 7.4 plays a key role in the cell uptake and cytotoxicity of these compounds, being more favourable for those with lower positive charge.

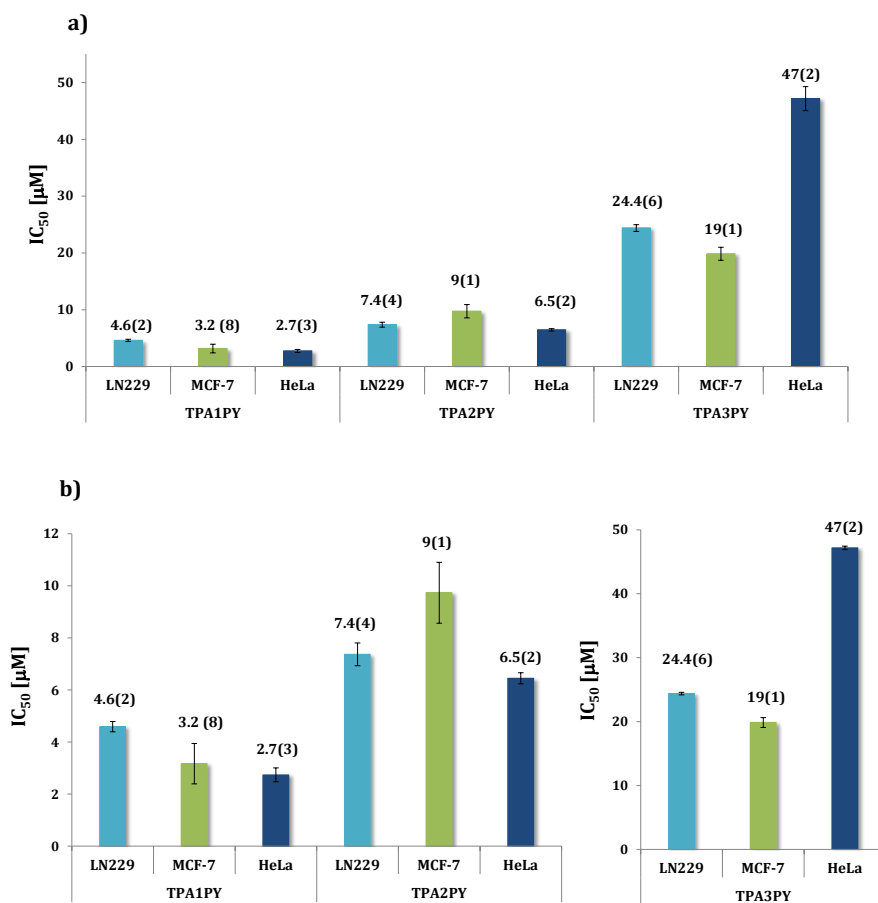


Figure 8.3. a) Plot of the IC₅₀ values corresponding to TPA-PY derivatives tested in different cell lines. The same scale is referred to the highest IC₅₀ value, b) detailed IC₅₀ plot adjusting the scale.

8.1.2. - TPB derivatives

The compounds of the TPB family include a central core with a more extended aromatic nature than TPA. Both synthesised compounds, TPB3P and TPB3PY, are tri-branched, being analogous to TPA3P and TPA3PY, respectively. As described in Chapter 6, their interaction with G4 DNA has proved to be prominent. However, it can be envisaged that the cell uptake of these derivatives may be hindered due to their positive charge at physiological pH.

The IC_{50} values corresponding to the studied cell lines treated with TPB3P and TPB3PY are compiled in Figure 8.4. Surprisingly, despite being high positively charged at pH 7.4, the obtained IC_{50} values for both compounds are low, especially for TPB3P (2 - 3 μ M). This fact may be consequence of the hydrophobicity in the molecular design: the TPB moiety shows a larger hydrophobic character than TPA, due to the presence of a central benzyl groups instead of an amino group. Moreover, the methyl groups in the P substituents of TPB3P may further contribute to the cell internalisation.

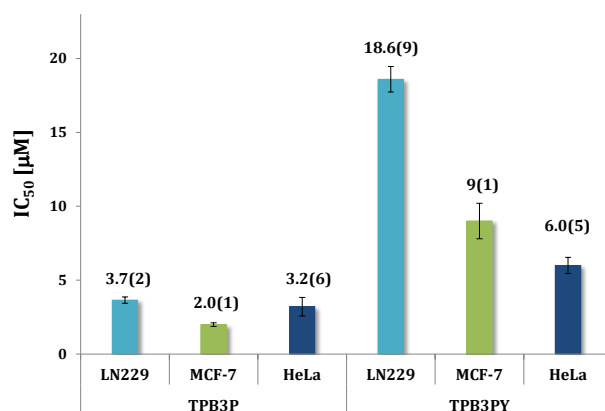


Figure 8.4. Plot of the IC_{50} values corresponding to TPB derivatives tested in different cell lines.

8.1.3. - Relation between cytotoxicity and the charge at pH = 7.4

As discussed previously, the number of branches in the synthesised compounds modulates their G4 selectivity *in vitro*, which is the therapeutic target at cellular level. However, the positive charge of compounds hampers their cell uptake, owing to the hydrophobic nature of the cytoplasmic membrane. Hence, the limited internalisation of the compounds results in their low cytotoxicity.

As a summary, the IC_{50} values (LN229 cells) of the compounds are plotted versus the positive charge at pH = 7.4 in Figure 8.5. In general, the lowest cytotoxicity is obtained for tri-branched compounds, whereas bi-branched and mono-branched derivatives display higher cytotoxicity. The exception is given by TPB3P, whose hydrophobic character may favour its cell uptake.

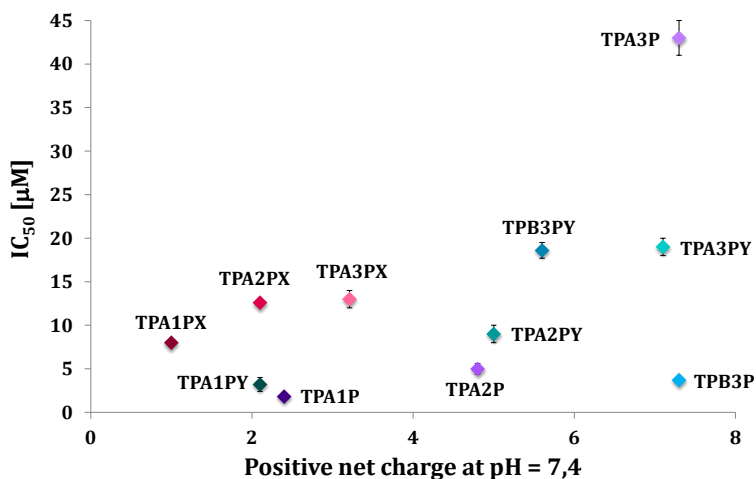


Figure 8.5. Plot of the IC_{50} [μM] values for LN229 cells treated with the studied compounds versus their positive net charge at pH = 7.4 calculated from the species distribution diagrams.

The approach taken in this thesis to overcome the limited cell uptake of tri-branched compounds is the design of a drug delivery system. Particularly, nanoparticles based on liposomes have been prepared to encapsulate the tri-branched derivatives. Those nanoparticles are supposed to act as delivery vehicles, enhancing the compounds cell uptake and promoting their therapeutic activity.

8.1.4. - Untargeted and targeted liposome nanoparticles

As described in Chapter 6, the tri-branched compounds TPA3P, TPA3PY, TPB3P and TPB3PY display high affinity towards G4 DNA *in vitro*. Consequently, they are potential candidates to act as antitumour drugs. However, their cell uptake is in general limited, most likely due to their high positive charge at physiological pH.^[9] For this reason, liposome nanoparticles were designed as vehicles to deliver the compounds inside the cell, aiming to improve their therapeutic activity (Figure 8.6). The cytotoxicity of the delivery systems was investigated in tumour cell lines by using the MTT assay.

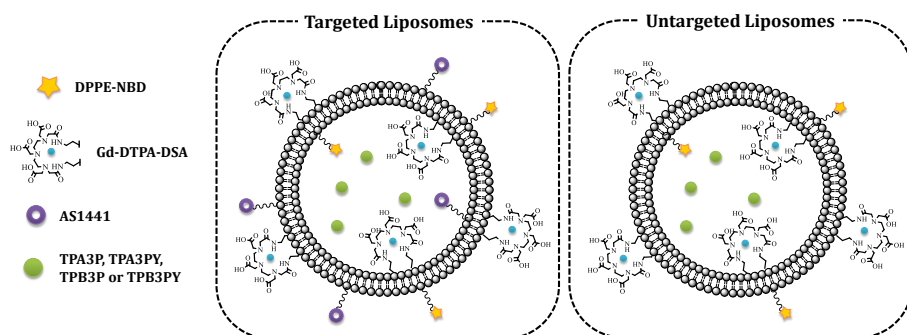


Figure 8.6. Depiction of liposome formulations designed in this thesis.

In Figures 8.7, 8.8, 8.9 and 8.10 are compiled the IC_{50} values obtained for liposome nanoparticles in comparison to their corresponding tri-branched ligands. Firstly, the cytotoxicity of untargeted liposomes is remarkably higher than the associated to the unencapsulated compound (up to a 40-fold increase). Accordingly, vesicles are supposed to enhance the compound internalisation.^[9]

Despite the extensive research on this topic, the biological mechanisms regarding liposomes cell uptake are not completely elucidated yet. However, recent studies have addressed this question considering four different mechanisms. Briefly, liposomes may be absorbed onto the cell surface, either non-specifically or specifically, maintaining their integrity. The lipid bilayer of liposomes may also merge with the plasma membrane releasing their cargo into the cytoplasm. Apart from that, lipid molecules of liposomes and the plasma membrane may undergo mediated or non-mediated transfer. However, the most likely mechanism of internalisation is thought to be endocytosis.^[10-13]

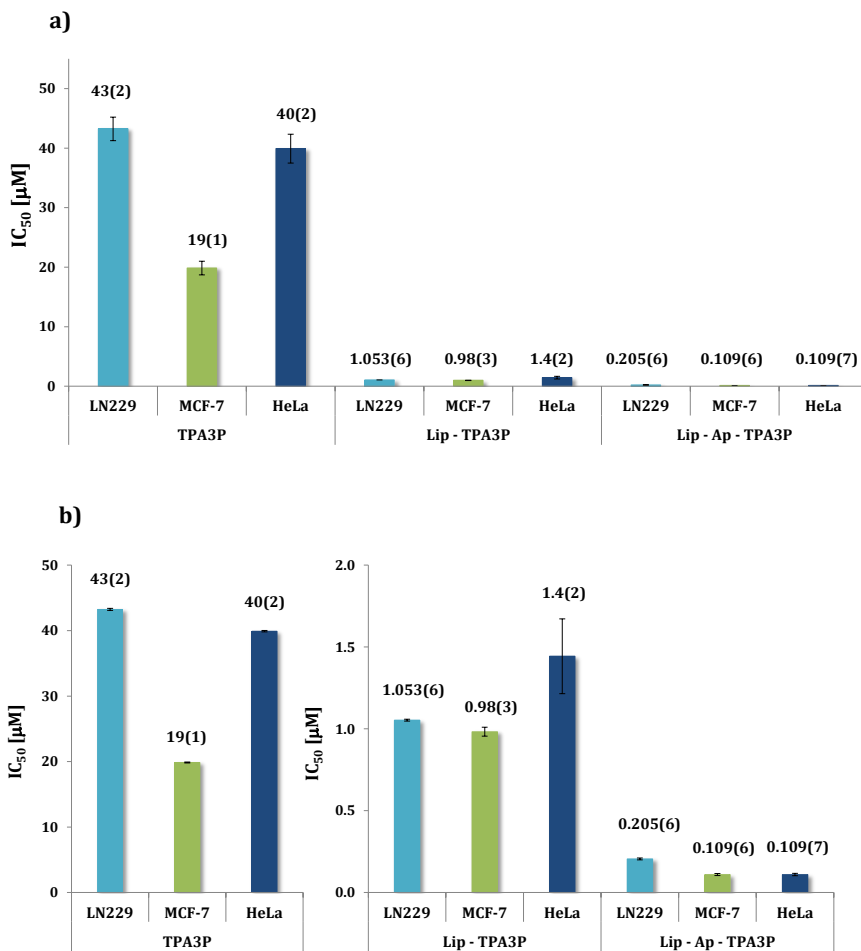


Figure 8.7. a) Plot of the IC_{50} values for TPA3P and untargeted (Lip - TPA3P) and targeted liposome nanoparticles (Lip - Ap - TPA3P) corresponding to different tumour cell lines. The same scale is referred to the highest IC_{50} value, b) detailed IC_{50} plot adjusting the scale.

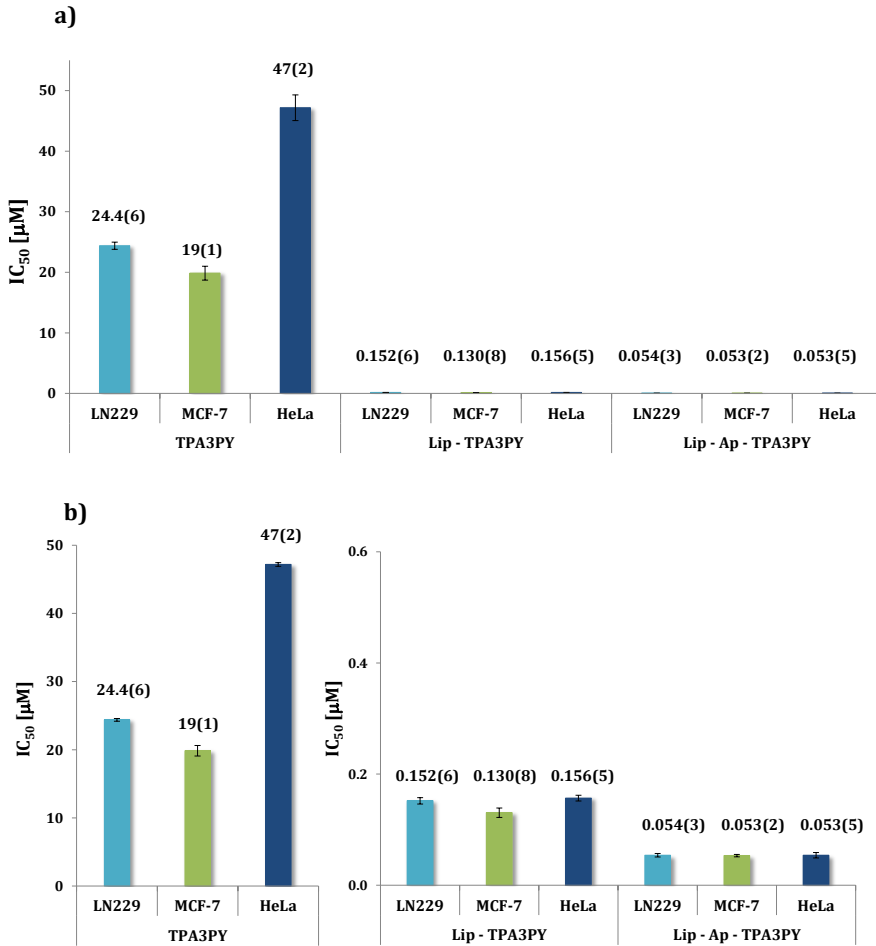


Figure 8.8. Plot of the IC_{50} values for TPA3PY and untargeted (Lip - TPA3PY) and targeted liposome nanoparticles (Lip - Ap - TPA3PY) corresponding to different tumour cell lines. The same scale is referred to the highest IC_{50} value, b) detailed IC_{50} plot adjusting the scale.

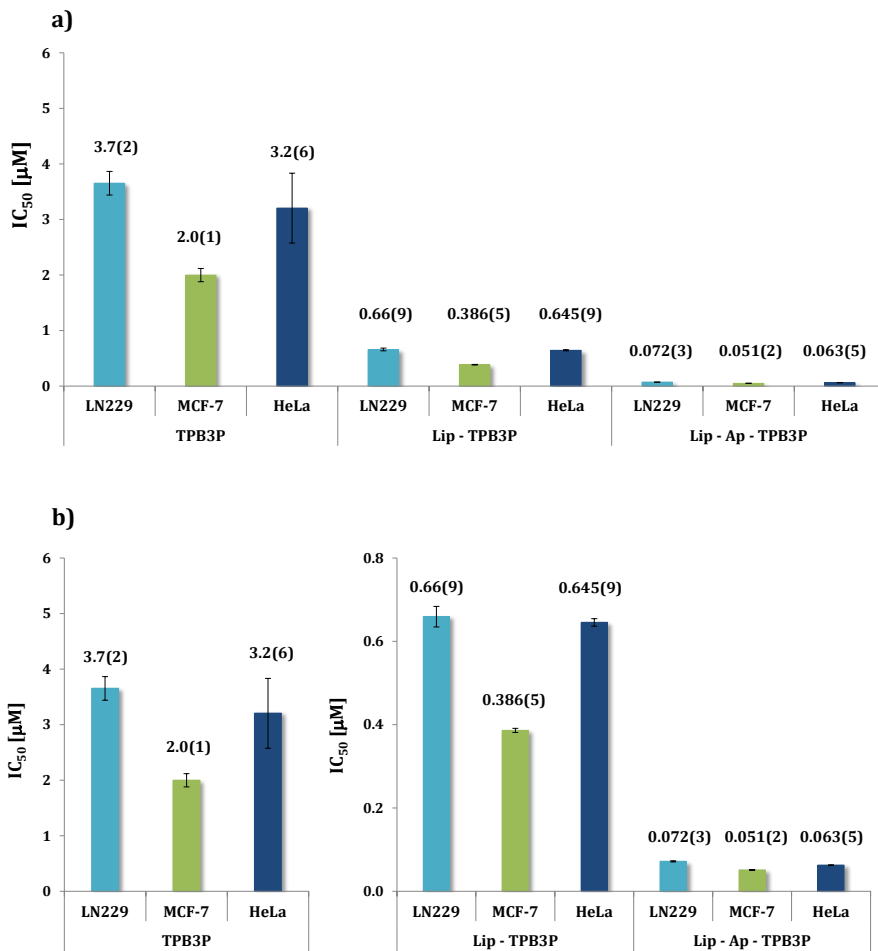


Figure 8.9. Plot of the IC_{50} values for TPB3P and untargeted (Lip - TPB3P) and targeted liposome nanoparticles (Lip - Ap - TPB3P) corresponding to different tumour cell lines. The same scale is referred to the highest IC_{50} value, b) detailed IC_{50} plot adjusting the scale.

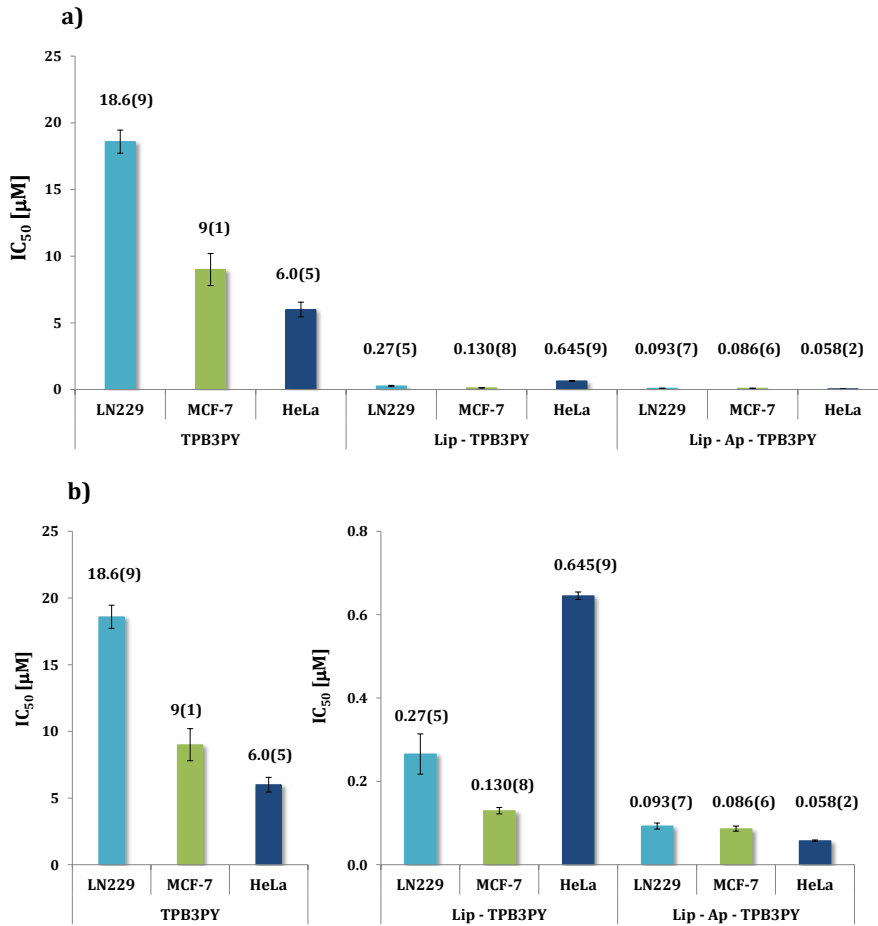


Figure 8.10. Plot of the IC_{50} values for TPB3PY and untargeted (Lip - TPB3PY) and targeted liposome nanoparticles (Lip - Ap - TPB3PY) corresponding to different tumour cell lines. The same scale is referred to the highest IC_{50} value, b) detailed IC_{50} plot adjusting the scale.

Interestingly, the IC_{50} value corresponding to the targeted liposome formulations is within the nanomolar range (100 nM), which implies a decrease of about three orders of magnitude in comparison to the free compounds TPA3P, TPA3PY and TPB3PY. Although TPB3P is cytotoxic without the need of a drug delivery system, its encapsulation inside liposome nanoparticles also provides up to a 50-fold enhancement of its cytotoxicity.

As previously mentioned, targeted liposomes include the aptamer AS1411 which specifically binds to the protein nucleolin.^[14-16] As described in the introduction, nucleolin acts as a molecular shuttle between the cytoplasm and the nucleus. Therefore, this protein can be found ubiquitously not only at the cell surface, but also at the nuclear membrane.^[17-20] Intriguingly, nucleolin is overexpressed over tumour cell membranes, being a promising target to transport antitumour drugs from the cytoplasm to the nucleus.^[21-23] The cell uptake of targeted liposomes may be nucleolin-mediated and consequently, their nuclear internalisation would be larger in comparison to untargeted liposomes, resulting in an enhancement of their therapeutic effect.

8.2. - Cell imaging

Once having assessed the cytotoxicity, the liposomes cell uptake was evaluated by means of imaging techniques. This characterisation is crucial in order to get insight into the drug delivery properties of these systems, as well as their distribution at cellular level.

As described in Chapter 3, liposome formulations include a fluorescent phospholipid, DPPE-NBD (Figure 8.11), which enables the visualisation of the vesicles by means of confocal microscopy. With this aim, cells were treated during 24 h with untargeted and targeted liposomes. Prior to the imaging, the nucleus was stained with Hoechst 33258 in order to localise the nuclear area and to gain better understanding into the liposomes cellular distribution. All the experimental details are described in Chapter 3.

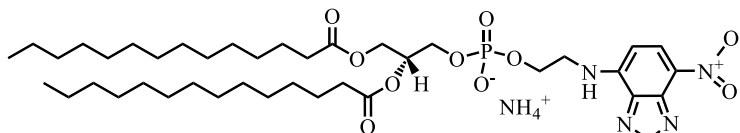


Figure 8.11. Molecular structure of the DPPE-NBD phospholipid.

In Figure 8.12 is shown a representative confocal image of untreated LN229 cells, whereas in Figures from 8.13 to 8.20 are compiled images of LN229 cells treated with untargeted or targeted liposomes. The green fluorescence corresponds to liposome vesicles, whereas the nucleus of the cells is blue stained.

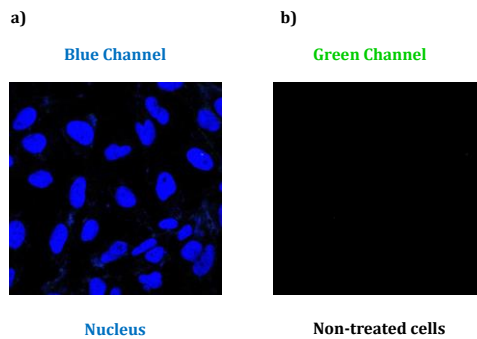


Figure 8.12. Confocal images of non-treated LN229 cells. The cell nucleus is blue stained.

Since control LN229 cells in Figure 8.12 were not treated with liposomes, no fluorescence is observed in the green channel. Alternatively, in Figure 8.13, it is possible to discern the spherical morphology of untargeted liposomes in the cell culture, which denotes their high stability in the culture medium.

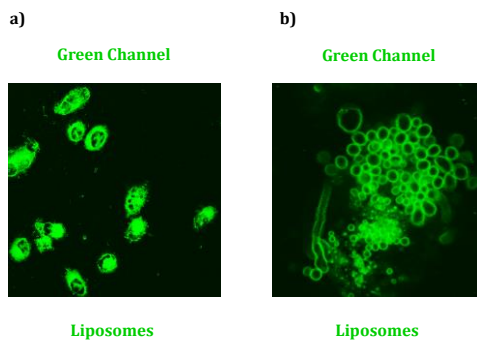


Figure 8.13. Confocal images of LN229 cells treated with untargeted liposomes. The cell nucleus was not stained aiming to distinguish the vesicles. b) corresponds to an expanded region from a).

The images corresponding to LN229 cells treated with untargeted liposomes (Figures 8.14, 8.15 and 8.16) show green fluorescence accumulated at the vicinity of the cell nucleus, suggesting not only that liposomes are internalised into the cell, but also that they are able to accumulate close to the nuclear membrane.

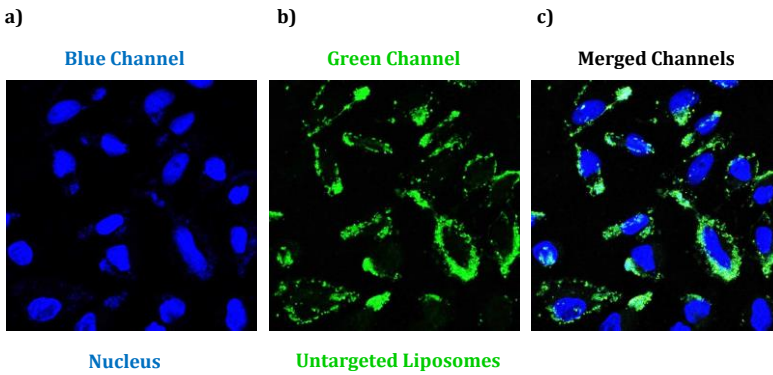


Figure 8.14. Confocal images of LN229 cells treated with untargeted liposomes.

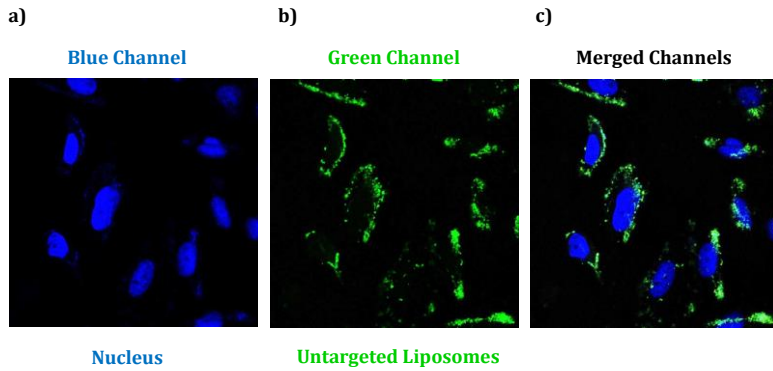


Figure 8.15. Confocal images of LN229 cells treated with untargeted liposomes.

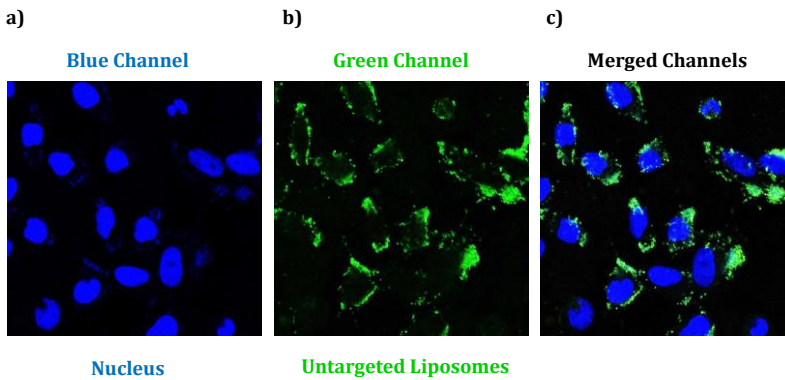


Figure 8.16. Confocal images of LN229 cells treated with untargeted liposomes.

These results point out the cell uptake mechanism of untargeted liposomes. Firstly, vesicles may be captured by cells through endocytosis, maintaining their morphology. Then, liposomes may be directed to the nucleus via transcytosis.^[24] Once reaching the nuclear envelope, liposomes may tend to accumulate onto the nuclear membrane, since nuclear pores have a diameter of around 5 - 9 nm, hindering the passive uptake of vesicles.^[25,26] Finally, the releasing of the cargo may occur through membrane fusion or lipid exchange, allowing the tri-branched encapsulated compound to reach its therapeutic target, the nuclear G4 DNA, which results in the antitumour desired effect.

Given the overlapping of green and blue fluorescence in Figures 8.17, 8.18, 8.19 and 8.20, a nuclear uptake of targeted liposomes is supposed to take place. This fact is in correlation with their higher cytotoxic effect in comparison to untargeted liposomes, denoting a different mechanism of internalisation. The first step is the binding of the aptamer AS1411 to the nucleolin overexpressed at the cell surface membrane. Then, the uptake of the vesicles is supposed to occur via a specific sort of endocytosis, leading to the formation of macropinosomes which are shuttled to the nuclear envelope owing to the nucleolin activity. ^[14] Once reaching the nuclear pores, morphological deformations are supposed to take place, enabling the internalisation of the liposomes.^[27-29]

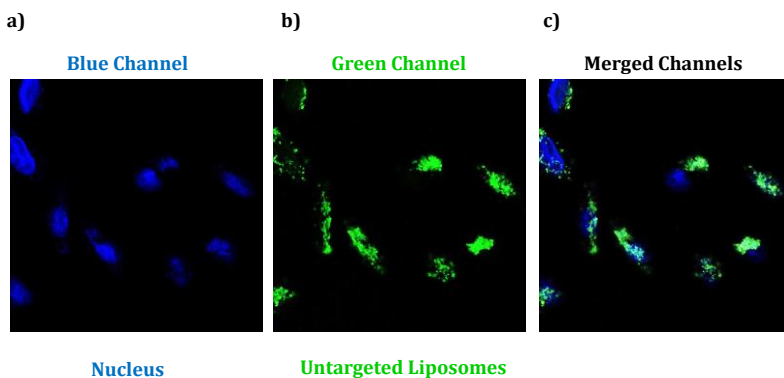


Figure 8.17. Confocal images of LN229 cells treated with targeted liposomes.

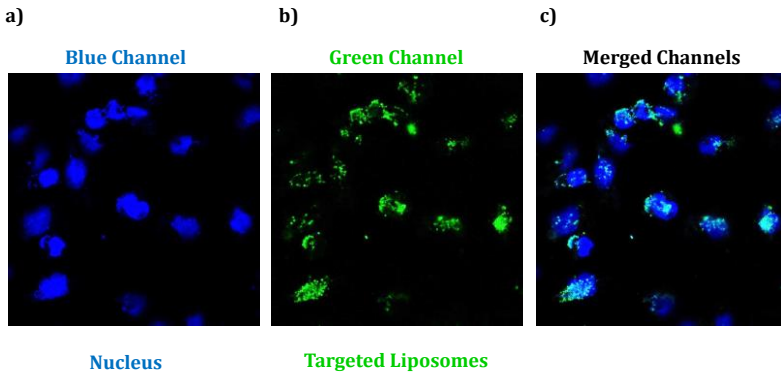


Figure 8.18. Confocal images of LN229 cells treated with targeted liposomes.

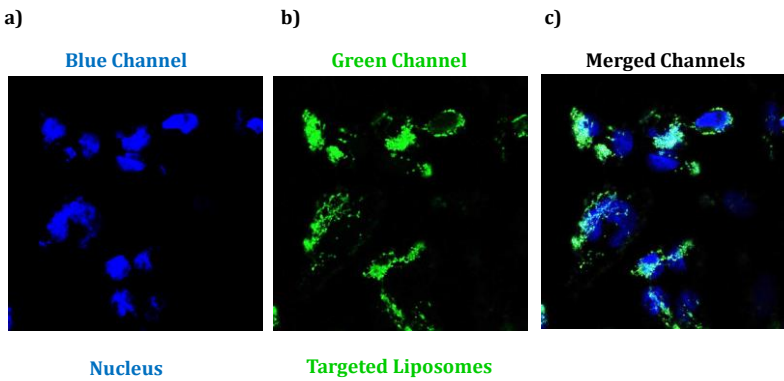


Figure 8.19. Confocal images of LN229 cells treated with targeted liposomes.

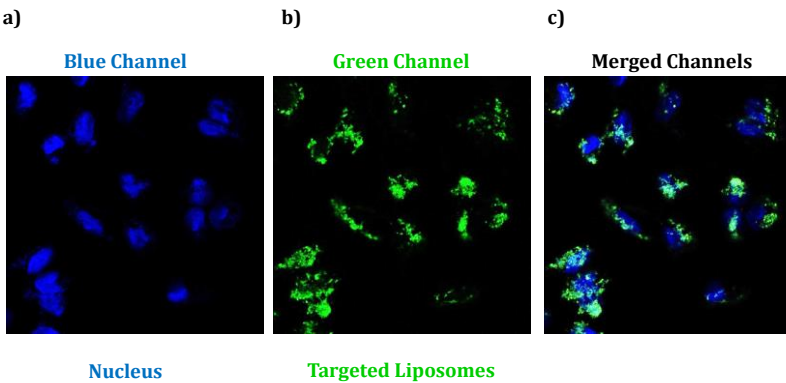


Figure 8.20. Confocal images of LN229 cells treated with targeted liposomes.

The enhanced nuclear uptake of targeted liposomes may explain their high cytotoxicity, since the amount of tri-branched compound that reaches the nucleoplasm is supposed to be higher. Therefore, the interaction between the compound and the G4 DNA is more likely to occur, resulting in an improved antitumour effect (Figure 8.21).

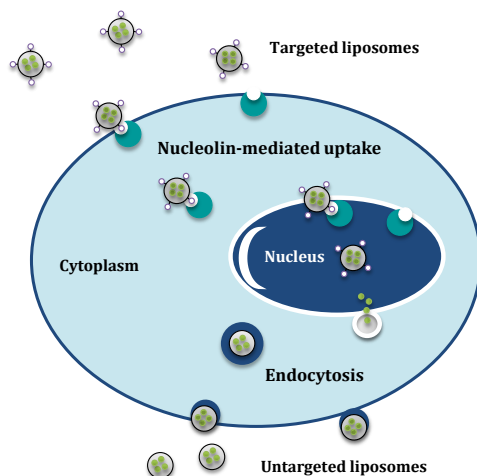


Figure 8.21. Representation of the different cell uptake mechanisms associated to untargeted and targeted liposome nanoparticles. The encapsulated compound is represented in green and nucleolin receptor is represented in turquoise.

8.3. - References

- [1] J. O. Suberu, I. Romero-Canelón, N. Sullivan, A. A. Lapkin, G. C. Barker, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2791–2797.
- [2] D. Drygin, A. Siddiqui-Jain, S. O'Brien, M. Schwaebe, A. Lin, J. Bliesath, C. B. Ho, C. Proffitt, K. Trent, J. P. Whitten, J. K. C. Lim, D. von Hoff, K. Anderes, W. G. Rice, *Cancer Res.* **2009**, *69*, 7653–7661.
- [3] A. C. Diserens, N. de Tribolet, A. Martin-Achard, A. C. Gaide, J. F. Schnegg, S. Carrel, *Acta Neuropathol.* **1981**, *53*, 21–28.
- [4] N. Ishii, D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A. Diserens, E. G. van Meir, *Brain Pathol.* **1999**, *9*, 469–479.
- [5] B. J. Sugarman, B. B. Aggarwal, P. E. Hass, I. S. Figari, M. Palladino, H. M. Shepard, *Science*, **1985**, *230*, 943–946.
- [6] H. D. Soule, J. Vazquez, Long, S. Albert, M. Brennan, *J. Natl. Cancer. Inst.* **1973**, *51*, 1409–1416.
- [7] G. O. Gey, W. D. Coffman, M. T. Kubicek, *Cancer Res.* **1953**, *12*, 264–265.
- [8] J. R. Masters, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 311–314.
- [9] K. Wagstaff, D. Jans, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1371–1387.
- [10] R. E. Pagano, J. N. Weinstein, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1978**, *7*, 435–468.
- [11] N. Düzgüneş, S. Nir, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *40*, 3–18.
- [12] V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 145–160.
- [13] N. Oh, J. Park, *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *4*, 51–63.
- [14] E. M. Reyes-Reyes, Y. Teng, P. J. Bates, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 8617–8629.
- [15] S. Lago, E. Tosoni, M. Nadai, M. Palumbo, S. N. Richter, *Biochim. Biophys. Act. Gen. Subj.* **2017**, *1861*, 1371–1381.
- [16] P. J. Bates, E. M. Reyes-Reyes, M. T. Malik, E. M. Murphy, M. G. O. Toole, J. O. Trent, *Biochim. Biophys. Act. Gen. Subj.* **2017**, *1861*, 1414–1428.
- [17] R. A. Borer, C. F. Lehner, H. M. Eppenberger, E. A. Nigg, *Cell* **1989**, *56*, 379–390.
- [18] L. Creancier, H. Prats, C. Zanibellato, F. Amalric, B. Bugler, *Mol. Biol. Cell.* **1993**, *4*, 1239–1250.
- [19] M. S. Schmidt-Zachmann, E. A. Nigg, *J. Cell Sci.* **1993**, *105*, 799–806.
- [20] H. Ginisty, H. Sicard, B. Roger, P. Bouvet, *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 761–772.
- [21] M. Koutsoumpa, E. Papadimitriou, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2014**, *9*, 137–152.
- [22] N. A. Fonseca, A. S. Rodrigues, P. Rodrigues-Santos, V. Alves, A. C. Gregório, Â. Valério-Fernandes, L. C. Gomes-da-Silva, M. S. Rosa, V. Moura, J. Ramalho-Santos, S. Simões, J. N. Moreira, *Biomaterials* **2015**, *69*, 76–88.
- [23] S. Romano, V. Moura, S. Simões, J. N. Moreira, J. Gonçalves, *Nat. Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–12.
- [24] P. L. Tuma, A. L. Hubbard, *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 871–932.
- [25] R. Wang, M. G. Brattain, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3164–3170.
- [26] K. Maeshima, H. Iino, S. Hihara, N. Imamoto, *Nucleus* **2011**, *2*, 113–118.

- [27] D. H. M. Dam, J. H. Lee, P. N. Sisco, D. T. Co, M. Zhang, M. R. Wasielewski, T. W. Odom, *ACS Nano* **2012**, *6*, 3318–3326.
- [28] J. Wu, C. Song, C. Jiang, X. Shen, Q. Qiao, Y. Hu, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 3555–3563.
- [29] X. Li, P. Kang, Z. Chen, S. Lal, L. Zhang, J. J. Gassensmith, Z. Qin, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 2479–2482.

In the framework of this thesis, eleven polyamine-based compounds have been designed as potential G4-binders. During their study, some of them have demonstrated to be G4 selective probes, being able to specifically recognise G4 DNA over double-stranded DNA. However, the high positive charge that those present at physiological pH hampers their cell uptake. The strategy followed to overcome this limitation has been their encapsulation in liposome nanoparticles, which demonstrates to successfully deliver the compounds inside tumour cells. Following, a detailed analysis of these conclusions is presented.

- I. Eleven polyamine-based derivatives have been synthesised and characterised. Their molecular structures have been systematically modified by changing the central core, as well as the side chains. The compounds have been classified in two groups regarding the core: TPA and TPB. Within each group, different families of compounds have been obtained by functionalisation with different polyamine-based side chains. Therefore, the families TPA-PX and TPA-P comprise ethylene-based (PX) and propylene-based (P) polyamine chains, whereas TPA-PY includes a macrocyclic polyamine (PY) as substituent. With regard to the TPB series, tri-branched compounds with either P or PY have been prepared. These structural modifications were aimed to get insight into the role of the central core and the substituents in the interaction with DNA.

- II. The acid-base behaviour of the compounds has been exhaustively studied by means of potentiometric and spectroscopic methods, since it has a direct influence in the photophysical properties and the interaction with DNA. The stepwise protonation constants of secondary and primary amines have been determined potentiometrically for all the compounds. An additional protonation step has been associated to tertiary amines of the compounds containing PX or P side chains. Not surprisingly, the protonation of the amine corresponding to the TPA moiety was not amenable to analysis due to its extremely low basicity. The construction of the distribution diagrams of species has enabled the estimation of the net charge at physiological pH (7.4), which can modulate the establishment of supramolecular interactions at cellular level.

The effect of the protonation state in the photophysical behaviour has been assessed by means of both UV/Vis and fluorescence spectroscopy. In general, as increasing the pH the absorbance spectra have not showed any remarkable change, while the emission profiles have displayed outstanding modifications. Particularly, TPA-based and TPB-based compounds have displayed dissimilarities. Whereas the former series has presented an emission enhancement as increasing the pH, the latter one has showed the opposite effect. These results have been ascribed to an AIE effect and a PET caused quenched, respectively.

III. The assessment of the interaction between the synthesised compounds and a wide panel of DNA structures has been carried out by means of different spectroscopic methods. From the FRET-Melting data analysis, the importance of the electrostatic forces in the DNA binding has been highlighted: the higher the positive charge of the compound, the larger the interaction with G4 DNA. Consequently, tri-branched compounds (TPA3P, TPA3PY, TPB3P and TPB3PY) have displayed a remarkable high affinity towards G4 DNA. Among them, TPA3P has shown an outstanding G4 selectivity over dsDNA, which is an appealing feature giving the predominance of this latter DNA conformation at cellular level.

These results have been supported by fluorescence studies, which have allowed the estimation of affinity constants (K_a) from the DNA titration data. In the case of the TPA group, the emission of the polyamine-based derivatives, especially the tri-substituted TPA3P and TPA3PY, has shown a striking enhancement of the emission in the presence of G4 DNA. More interestingly, the magnitude of this enhancement is far larger than the one associated to dsDNA, corroborating their G4 selectivity. These results have been ascribed to the formation of aggregates between the TPA compounds and the G4 DNA, which leads to an AIE effect.

In terms of the G4 topology modification, circular dichroism experiments have probed that the structural conformation of the DNA is retained upon binding the TPA derivatives. The CD spectra corresponding to the titrations with TPA3P and TPA3PY have shown ICD bands, indicating the relevance of the interaction.

IV. Tri-branched compounds have shown high selectivity towards G4 DNA. Consequently, they may be considered as potential antitumour therapeutic agents. Nevertheless, their high positive charge at physiological pH prevents their cellular internalisation. For this reason, those compounds have been encapsulated inside liposome nanoparticles aiming to enhance their cell uptake. The design of the liposome formulations has been addressed to achieve theranostic vesicles, integrating therapeutic and diagnostic functionalities within the same nanoparticle. Therefore, liposomes not only include the polyamine derivative, but also a fluorescent phospholipid (DPPE-NBD) and a gadolinium complex (Gd-DTPA-DSA), enabling their visualisation by means of confocal fluorescence microscopy and MRI.

Aiming to target the nucleus of tumour cells, in which the vast majority of genetic material is located, a specific liposome formulation has been designed including a targeting aptamer (AS1411). This aptamer binds the protein nucleolin, which is overexpressed in the cytoplasmic and nuclear membrane of tumour cells and acts as a shuttle between them. The synthesised liposomes (untargeted and targeted) have been characterised by means of cryo-SEM and DLS, proving to display a proper size distribution for biological purposes.

The content of compound encapsulated has been calculated by means of fluorescence microscopy. The results have suggested that the efficiency of the process largely depends on the experimental procedure and the nature of the encapsulated compound. The quantification of gadolinium has been carried out by using ICP-MS as a prior step to the relaxivity determination.

V. The cytotoxicity of the eleven polyamine-based derivatives, as well as the untargeted and targeted liposomes, has been assessed in three different tumour cell lines by means of MTT assays. As a general overview, the cytotoxicity of the compounds decreases as the number of substituents increases, with the exception of TPB3P. Consequently, those tri-branched compounds that have shown a remarkable affinity towards G4 DNA have displayed the lower therapeutic effect. This fact has been ascribed to their high positive charge at physiological pH, which may hamper their internalisation.

The encapsulation of those compounds inside liposome nanoparticles has probed to overcome this limitation, since the cytotoxicity of the corresponding vesicles improves dramatically. These results confirmed the capability of liposomes to deliver their cargo inside the cells.

The localisation of liposome nanoparticles inside tumour cells has been explored by means of confocal fluorescence microscopy. The untargeted formulation has been found accumulated at the nuclear vicinity, which explains the increase of the vesicles cytotoxicity in comparison to the free compound. With regard to targeted liposomes, the images have demonstrated their nuclear uptake, which is directly related to their extremely high cytotoxicity. Consequently, this targeting strategy has successfully helped to overcome the intrinsic limitations of the designed G4-binders to reach the cell nucleus and showing their therapeutic effect.

Introducció

L'àcid desoxiribonucleic (ADN) és una biomolècula essencial, ja que és responsable de controlar i modular la informació genètica mitjançant processos de transcripció i expressió. Sovint aquesta biomolècula es presenta en conformació de doble hèlix, coneguda com B-ADN, tot i que l'ADN té associat un elevat polimorfisme. De fet, avui dia es coneixen multitud d'estructures no canòniques d'ADN, com ara *hairpins*, *i-motifs*, tríplex o G-quàdruplex (G4).

D'entre totes aquestes conformacions, els G4 constitueixen el focus d'una àmplia recerca degut al seu paper biològic. Aquest tipus d'ADN pot donar-se en seqüències riques en guanines (G), les quals s'apilen formant anells plans de quatre membres coneguts com G-tètrades. Les G queden unides mitjançant ponts d'hidrogen de tipus Hoogsteen i interaccions electrostàtiques amb els cations situats en el canal central del G4. Així doncs, es tracta d'estructures d'ADN que poden donar lloc a diferents conformacions dependent de l'orientació del les G-tètrades, dels bucles i dels solcs.

Malgrat que a l'inici del descobriment dels G4 aquests es consideraven només una curiositat exòtica, posteriorment amb estudis de seqüenciació genètica s'han detectat més de 716000 punts dins del genoma humà amb un elevat potencial de formació de G4, destacant-ne les regions promotores de certs oncogens i els extrems cromosòmics coneguts com telòmers.

D'una banda, la formació de G4 ha sigut detectada als promotors d'oncogens que controlen processos de creixement i apoptosi cel·lular, com ara *c-Myc*, *c-Kit* o *Bcl-2*. En el cas de que aquests es troben sobreexpressats, es produeix una proliferació cel·lular incontrolada, cosa que ocorre als teixits tumorals. L'estabilització d'estructures G4 als promotors inhibiria l'expressió d'aquests oncogens, frenant la immortalització de les cèl·lules tumorals.

D'altra banda, l'ADN telomèric es troba al final dels cromosomes i és l'encarregat de mantindre la integritat cromosòmica. En aquesta regió, sobreix un fragment d'ADN monocatenari amb un alt contingut de G, pel que es poden formar G4. Durant el procés de divisió cel·lular, es produeix una pèrdua neta de nucleòtids en aquesta regió. Així doncs, la longitud dels telòmers va acurtant-se en cada cicle cel·lular, fins que és tan curta que ja no pot donar-se altre cicle, desencadenant en última instància la mort cel·lular. Tanmateix, existeix un enzim capaç de contrarestar l'escurçament telomèric: la telomerasa. Aquest enzim es troba activat en cèl·lules mare, embrionàries i de teixits renovables

que han de mantindre constant la llargària dels seus telòmers i per tant la seua continua replicació. Ara bé, es coneix que la telomerasa es troba sobreexpressada en aproximadament el 90% de les cèl·lules tumorals, el que causa la seua proliferació incontrolada. Per tant, la inhibició de la telomerasa mitjançant l'establiment d'estructures G4 als telòmers podria resultar en l'apoptosi de les cèl·lules tumorals.

En resum, el paper biològic dels G4 està estretament relacionat amb processos de transcripció i expressió gènica, així com d'estabilitat genòmica. Per aquest motiu, l'ADN G4 constitueix una atractiva diana terapèutica per al disseny de fàrmacs antitumorals. Així doncs, en l'actualitat existeix una àmplia àrea de recerca focalitzada en el disseny de petites molècules (lligands-G4) que faciliten la formació i estabilització selectiva d'estructures G4 a nivell cel·lular.

Les interaccions supramoleculares constitueixen la base fonamental en el reconeixement d'estructures G4. De manera general, la topologia del G4 permet l'apilament (intern o extern) i la interacció amb els bucles i solcs. Per tant, el disseny molecular dels lligands-G4 s'ha de adreçar a la optimització de les interaccions amb aquests punts d'ancoratge. Generalment, una superfície aromàtica extensa afavoreix l'apilament extern mitjançant interaccions π - π . La funcionalització amb cadenes laterals que continguen grups protonables a pH fisiològic (pH = 7.4), com amines, possibiliten l'establiment d'interaccions electrostàtiques amb els bucles i solcs. A més a més, la presència de grups voluminosos afavoreixen la selectivitat per ADN G4 front a ADN de doble hèlix, ja que dificultarien la intercalació entre parells de bases.

En aquest context, el grup de Química Supramolecular de la Universitat de València ha publicat nombrosos estudis en els quals s'ha demostrat el potencial de diversos lligands poliamínics per a interaccionar selectivament amb una topologia d'ADN concreta. Particularment, en aquesta tesi s'han escollit la trifenilamina (TPA) i el trifenilbenzè (TPB) com a cors centrals per al disseny de lligands-G4. D'altra banda, com a cadenes laterals s'utilitzen derivats poliamínics, lineals i macrocíclics, per a potenciar la interacció amb els G4.

Altre aspecte rellevant a considerar en el disseny de lligands-G4 és la seua captació cel·lular. Típicament, els lligands-G4 posseeixen un tamany i càrrega considerable a pH fisiològic, pel que la internalització cel·lular podria estar dificultada a causa de la hidrofobicitat de la membrana cel·lular. Així doncs, el seu potencial terapèutic seria limitat.

És precisament ací on entra en joc la Nanomedicina: l'aplicació de la nanociència i la nanotecnologia al tractament, diagnòstic i prevenció de malalties i traumatismes.

Les nanopartícules tenen associades característiques fisicoquímiques molt diferents als seus corresponents materials macroscòpics, i a més a més poden ser sintetitzades controlant el tamany, la forma i la càrrega superficial. Fins i tot, poden ser funcionalitzades amb molt diverses molècules. Dins d'aquesta àrea, existeixen dos estratègies sintètiques per a aconseguir que les nanopartícules assolisquen la seua diana terapèutica. En primer lloc, el direccionament passiu fa referència als mecanismes pels quals les nanopartícules tendeixen a acumular-se en els teixits inflamats i vascularitzats, el que es coneix comunament com efecte EPR (del anglès *Enhancing Permeability and Retention*). L'altra estratègia correspon al direccionament actiu, que consisteix en la funcionalització de les nanopartícules amb anticossos, pèptids, aptàmers o altres molècules que siguen capaces de dirigir les nanopartícules específicament cap a un receptor sobreexpressat en les cèl·lules patògenes. Les implicacions del direccionament de fàrmacs en malalties amb tractaments agressius, com el càncer són evidents: és minimitzarien els efectes secundaris i els protocols d'administració es simplificarien.

Les aplicacions de la nanomedicina són molt variades. Pel que fa a la teràpia, certes nanopartícules poden actuar per elles mateixa com a fàrmacs, gràcies a les seues propietats fisicoquímiques. Per exemple, les nanopartícules d'or poden ser emprades en teràpia foto-dinàmica. D'altra banda, també poden emprar-se com a nanovehicles per a transportar fàrmacs a les seues corresponents dianes terapèutiques, augmentant així la seua biodisponibilitat i captació cel·lular. En aquest cas s'utilitzen típicament nanopartícules basades en lípids o polímers, malgrat que també son utilitzades nanopartícules inorgàniques com d'or o de magnetita. L'aplicació de la nanomedicina al diagnòstic resulta també de particular interès. Els materials nanoestructurats, ja siga per la seua naturalesa intrínseca o per estar funcionalitzats, poden ser emprats com agents de contrast en tècniques tant òptiques, com magnètiques o radiatives. El seu ús sovint dona lloc a una millora de la qualitat de les imatges obtingudes i a més a més, un mateix nanosistema pot ser dissenyat per a la seua aplicació en diferents tècniques d'imatge, obtenint així un agent de contrast multimodal. D'aquesta manera, es reuneix una major quantitat de informació complementaria durant el diagnòstic, el que seria de gran ajuda al hora de planificar el tractament de la malaltia.

L'última aplicació és la coneguda com nanomedicina teranòstica, que es tracta precisament de la unió entre la teràpia i el diagnòstic. La versatilitat sintètica de les nanopartícules fa possible que el mateix nanosoport pugui incloure tant agents terapèutics, com agents de diagnòstic, a banda de vectors directores que les direccionen cap a les corresponents dianes terapèutiques. El gran avantatge que presenten aquest tipus de nanopartícules és que permeten la monitorització de l'acció de l'agent terapèutic mitjançant tècniques de diagnòstic, el que ajuda a optimitzar els protocols d'administració i tractament. Actualment, la recerca centrada en el disseny d'agents teranòstics és molt amplia, tot i que una de les nanopartícules que més ha atret l'atenció en aquest camp són les nanopartícules de tipus liposoma, que són les que s'empren en aquesta tesi com a nanovehicles dels lligands-G4.

Els liposomes es poden definir com nanopartícules esfèriques de tamany entre 50 nm i 1000 nm, composades per una o més bicapes lipídiques concèntriques amb un interior aquós. Els components bàsics dels liposomes són lípids i/o fosfolípids, ja siguin naturals o sintètics. Es tracta de molècules amfifíliques, és a dir, que contenen una part polar (cap hidrofílic) i una part apolar (cua hidrofòbica). Quan es troben en un medi aquós, aquestes molècules s'autoensamblen. Així es minimitza el contacte de les cues hidrofòbiques amb les molècules d'aigua de l'entorn i alhora, es maximitza el contacte entre els caps hidrofílics, originant així la forma esfèrica característica dels liposomes.

El fet de que els liposomes siguin tan interessants en el camp de la nanomedicina deriva dels avantatges que presenten en comparació amb altres nanovehicles. En primera instància, els liposomes són biocompatibles, biodegradables i biològicament inerts. A més a més, poden transportar molècules tant hidrofòbiques, que es situen en la bicapa lipídica, com hidrofíliques, que queden encapsulades en el interior aquós. Altre punt a favor és que poden ser fàcilment funcionalitzats amb agents de contrast per tal d'obtenir nanopartícules teranòstiques, fent possible el tractament simultani al diagnòstic.

Els lligands-G4 sintetitzats durant aquesta tesi poden presentar una elevada càrrega positiva a pH fisiològic. Amb la finalitat de millorar la seua captació cel·lular i el seu efecte terapèutic, s'ha realitzat la seua encapsulació en nanopartícules de tipus liposoma. A més a més, els liposomes dissenyats contenen un derivat fosfolipídic fluorescent i un complex de gadolini, el que permet la seua visualització mitjançant microscòpia confocal i ressonància magnètica d'imatge (RMI). Finalment, els liposomes s'han funcionalitzat amb

un aptàmer anomenat AS1411, el qual s'uneix de manera selectiva a la proteïna nucleolina. Aquesta proteïna es troba sobreexpressada en les cèl·lules tumorals, tant en la membrana citoplasmàtica, com en la nuclear, de manera que actua com a vehicle transportador entre ambdues. Així doncs, es persegueix assolir un direccionament actiu dels liposomes cap al nucli, que és en definitiva on es troba la diana terapèutica dels lligands-G4.

Objectius

Durant els últims anys, el desenvolupament de lligands-G4 ha despertat un gran interès en el camp de la biomedicina, ja que aquest tipus d'ADN té un paper essencial en diferents processos biològics relacionats amb la transcripció i l'expressió d'informació genètica, així com amb l'estabilitat genòmica. Així doncs, l'ADN G4 és una atractiva diana terapèutica per l'obtenció de fàrmacs antitumorals. Dins d'aquest context, l'objectiu general d'aquesta tesi és el disseny, preparació i avaluació de derivats poliamínics dirigits a estructures G4. Per tal d'assolir aquest objectiu general, s'han establert els següents objectius específics:

I - Disseny, síntesi i caracterització de nous derivats poliamínics

Prenent com a punt de partida l'experiència del grup de Química Supramolecular de la Universitat de València, es sintetitzaran i caracteritzaran diversos compostos poliamínics. Com a nucli central s'empraran dos motius estructurals que presenten deslocalització π , trifenilamina (TPA) i trifenilbenzé (TPB), els quals es funcionalitzaran tant amb poliamines lineals i macrocíclicues.

II - Estudi del comportament àcid-base dels compostos obtinguts

L'estat de protonació dels compostos sintetitzats modula la seua capacitat per establir interaccions supramoleculares. Conseqüentment, el seu comportament àcid-base serà estudiat mitjançant tècniques potenciomètriques i espectroscòpiques. En primer lloc, es calcularan les constants de protonació, a partir de les quals es construiran els diagrames de distribució d'espècies. Açò permetrà la determinació de les espècies predominants i de la seua corresponent càrrega neta a pH fisiològic. A més a més, diferents propietats foto-físiques, com l'emissió induïda per agregació (AIE, de l'anglès *Aggregation-Induced Emission*), seran analitzades en detall mitjançant mètodes espectroscòpics.

III - Estudi de la interacció amb ADN

Amb l'objectiu d'avaluar la capacitat dels compostos sintetitzats d'estabilitzar selectivament estructures d'ADN G4 front ADN dúplex, s'estudiarà un ampli recull de diferents topologies d'ADN, que inclourà tant seqüències ADN telomèric, com oncogènica. Per a assolir aquest objectiu els compostos s'estudiaran utilitzant assajos tipus *FRET-Melting* (de l'anglès *Förster Resonance Energy Transfer*) i tècniques espectroscòpiques com fluorescència o dicromisme circular.

IV - Síntesi i caracterització de nanopartícules de tipus liposoma

Els compostos que donen lloc als resultats més prometedors seran encapsulats en nanopartícules de tipus liposoma amb l'objectiu de maximitzar la seua captació cel·lular. A més a més, les vesícules inclouran un fosfolípid fluorescent i un complex de gadolini que possibilitaran la seua visualització mitjançant microscòpia confocal i ressonància magnètica d'imatge (RMI). Així doncs, aquests liposomes constituïran un sistema teranòstic, unint en la mateixa nanopartícula funcions terapèutiques i diagnòstiques. A banda, els liposomes seran funcionalitzats amb l'aptàmer AS1411 per a dirigir-los cap al nucli cel·lular, on es troba la majoria del material genètic.

V - Estudis de la citotoxicitat i avaluació de la captació cel·lular

Un cop havent estudiat la interacció dels compostos amb diferents topologies d'ADN, s'estudiarà la seua citotoxicitat en línies cel·lulars tumorals, de igual manera que s'avaluaran els liposomes sintetitzats. D'aquesta manera, es realitzarà un estudi comparatiu de la citotoxicitat dels liposomes i els corresponents lligands lliures. Finalment, la captació cel·lular de les diferents formulacions de liposomes s'estudiarà mitjançant microscòpia confocal, amb l'objectiu de determinar l'eficiència de l'aptàmer per a dirigir els liposomes cap al nucli cel·lular.

Metodologia

Durant aquesta tesi han sigut emprades diverses tècniques i protocols per tal d'assolir els objectius establerts. Aquests es recopilen a continuació, classificats d'acord als seus corresponents objectius.

I - Disseny, síntesi i caracterització de nous derivats poliamínics

Per a la síntesi dels derivats poliamínics s'han emprat dos tipus de cors centrals (TPA i TPB), així com diferents substituents tant lineals (N,N-dimetiletilendiamina (PX) i N,N-dimetilpropilentriamina (P)), com macrocíclics (6-(2-aminoetil)-3,6,9-triaza-1-(2,6)piridinciclodecafà (PY)). El protocol sintètic està basat fonamentalment en una reacció de formació de base de Schiff. En primer lloc es realitza una condensació de l'aldehid del nucli central del lligand (TPA, comercial o TPB, obtingut mitjançant una reacció tipus Suzuki) amb els equivalents pertinents del substituent poliamínic per tal d'obtenir el derivat mono-, bi- o tri-ramificat. Un cop formada la imina, aquesta es redueix *in situ* emprant borohidruir sòdic, cosa que dona lloc a l'amina corresponent. Com que el producte sol tindrà un aspecte oliós, es precipita com a clorhidrat per a facilitar la seua manipulació i emmagatzemament. La caracterització de tots els productes obtinguts s'ha realitzat mitjançant ressonància magnètica nuclear (RMN), anàlisi elemental i espectrometria de masses.

II - Estudi del comportament àcid-base dels compostos obtinguts

La determinació de les constants de protonació corresponents als grups amino dels compostos sintetitzats s'ha realitzat mitjançant valoracions potenciomètriques en dissolució aquosa. Així doncs, s'ha registrat el potencial (E) de la dissolució durant l'addició d'alíquotes d'hidròxid de sodi. Després, aplicant l'equació de Nernst s'ha pogut calcular la concentració de H⁺ corresponent a cada punt. Finalment, les constants d'equilibri s'han determinat emprant un algoritme matemàtic per a l'ajust de les dades experimentals a un model establert prèviament. Com que el grau de protonació dels derivats sintetitzats també afecta a les seues propietats foto-físiques, a banda de les valoracions potenciomètriques també han sigut realitzades valoracions per UV/Vis i fluorescència.

III - Estudi de la interacció amb ADN

L'estudi de la interacció entre els derivats sintetitzats amb ADN ha sigut realitzat emprant nou seqüències d'oligonucleòtids diferents, incloent huit topologies diferents d'ADN G4 i un dúplex. A més a més, han sigut utilitzades diverses tècniques espectroscòpiques que proporcionen informació complementaria. En primer lloc, els compostos han sigut

sotmesos a assajos de tipus *FRET-Melting*, els quals donen una idea sobre l'estabilització de l'estructura de l'ADN proporcionada pel lligand. També han sigut realitzades valoracions fluorimètriques per tal de calcular una constant d'afinitat (K_a) per a cada tipus de seqüència estudiada. Finalment, mitjançant valoracions per dicroisme circular s'ha estudiat la modificació de la conformació de l'ADN per interacció amb els derivats sintetitzats.

IV - Síntesi i caracterització de nanopartícules de tipus liposoma

Les nanopartícules de tipus liposoma han sigut sintetitzades emprant el mètode d'evaporació del dissolvent, el qual està basat en la capacitat dels fosfolípids d'auto-ensamblar-se en un medi aquós. El protocol sintètic inclou cinc passos bàsics: dissoldre els fosfolípids en un medi orgànic, evaporar el dissolvent per a formar una monocapa lipídica, addicionar una dissolució aquosa que continga el compost a encapsular i finalment, sonicar i purificar la suspensió obtinguda. La caracterització dels liposomes obtinguts ha sigut realitzada per DLS (de l'anglès *Dynamic Light Scattering*), ICP-MS (de l'anglès *Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry*) i microscòpia confocal i electrònica. A més a més, el contingut de compost encapsulat ha sigut quantificat emprant espectroscòpia de fluorescència, utilitzant una recta de calibratge construïda a partir de patrons dels corresponents lligands.

V - Estudis de la citotoxicitat i avaluació de la captació cel·lular

La citotoxicitat dels compostos i liposomes obtinguts ha sigut estudiada en línies cel·lulars tumorals mitjançant assajos MTT (bromur de 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli). Aquest mètode es basa en la reducció cel·lular del MTT, que dona lloc a la formació de cristalls de formazà blaus, els quals estan directament relacionats amb el nombre de cèl·lules viables. Així doncs, mesurant l'absorbància a 570 nm, es possible quantificar el nombre de cèl·lules vives i calcular un valor d'IC₅₀, el qual coincideix amb la concentració del compost o formulació de liposoma que es necessària per a reduir a la meitat el nombre de cèl·lules viables. Per tal de garantir la reproductibilitat dels resultats, han sigut estudiades tres línies tumorals diferents (LN229, MCF-7 i HeLa) i a més a més, s'han realitzat com a mínim tres experiments independents per a cadascun dels compostos i liposomes estudiats.

Resultats i conclusions

Durant aquesta tesi, s'han dissenyat nous derivats poliamínics amb potencial per a actuar com a lligands-G4. El seu estudi ha demostrat que alguns d'ells són sondes fluorescents selectives, ja que són capaces de distingir ADN G4 d'ADN dúplex. Tanmateix, l'elevada càrrega positiva a pH fisiològic que aquestes molècules presenten a pH fisiològic dificulta la seua captació cel·lular. L'estratègia que s'ha seguit per a superar aquesta limitació ha sigut l'encapsulació dels compostos en nanopartícules de tipus liposoma, les quals han demostrat el seu potencial per a dirigir els compostos a l'interior cel·lular. Seguidament, s'inclou un anàlisi més detallat d'aquests resultats.

- I - S'han sintetitzat i caracteritzat onze derivats poliamínics. La seua estructura molecular s'ha modificat sistemàticament canviant la naturalesa del nucli central, així com dels substituents al seu voltant. Els compostos s'han classificat en dos grans grups respecte al nucli central: derivats de TPA i de TPB. Dins de cadascun dels grups, s'han obtingut diferents famílies de lligands mitjançant la seua funcionalització amb diversos derivats. Així doncs, les famílies TPA-PX i TPA-P inclouen els substituents poliamínics lineals N,N-dimetiletilendiamina (PX) i N,N-dimetilpropilentriamina (P), respectivament. D'altra banda els compostos TPA-PY presenten unitats 6-(2-aminoetil)-3,6,9-triaza-1-(2,6)piridinciclodecafa (PY) com a cadenes laterals. Pel que fa al grup de lligands TPB, s'han obtingut derivats tri-ramificats emprant com a substituents les poliamines P i PY. Aquestes modificacions en l'estructura molecular dels compostos estaven enfocades a dilucidar el paper tant del nucli central, com dels seus substituents en les interaccions supramoleculares amb l'ADN.
- II - El comportament àcid-base dels compostos ha sigut estudiat mitjançant tècniques potenciomètriques i espectroscòpiques, ja que aquest té una influència directa en les propietats foto-físiques i en la interacció amb l'ADN. Les constants de protonació successives de les amines primàries i secundàries han sigut determinades potenciomètricament per a tots els compostos. Una etapa de protonació addicional associada a amines terciàries ha pogut ser detectada per als compostos que inclouen substituents PX o P. Com era d'esperar, la protonació de l'amina corresponent al motiu estructural TPA no ha pogut ser determinada, degut probablement a la seua extremadament baixa basicitat. La

construcció dels diagrames de distribució d'espècies han permès l'estimació de la càrrega neta dels compostos a pH fisiològic, la qual modula en gran part la seua capacitat d'establir interaccions supramoleculares.

L'efecte del grau de protonació en el comportament foto-físic dels compostos ha sigut estudiat mitjançant espectroscòpia UV/Vis i de fluorescència. En general, malgrat les lleugeres modificacions en els espectres UV/Vis dels compostos obtingudes al modificar el pH, el seu espectre d'emissió presenta canvis rellevants. Tanmateix, s'observen clares diferències entre les famílies de compostos TPA i TPB. Mentre que la primera dona lloc a un augment de la intensitat de fluorescència al augmentar el pH, la segona presenta l'efecte contrari. Aquest fet ha estat assignat a un efecte AIE i PET (de l'anglès, *Photoinduced Electron Transfer*), respectivament.

III - L'estudi de la interacció entre els compostos sintetitzats i les diferents estructures d'ADN ha sigut realitzat mitjançant diverses tècniques espectroscòpiques. A partir dels assajos *FRET-Melting* s'ha pogut confirmar la rellevància de les forces electrostàtiques en la interacció amb ADN, de manera que aquells lligands que presenten una major càrrega neta donen lloc a una interacció amb ADN més forta. Conseqüentment, els compostos tri-ramificats TPA3P, TPA3PY, TPB3P i TPB3PY mostren una afinitat per l'ADN G4 elevada. D'entre aquests, TPA3P té associada una gran selectivitat per la topologia d'ADN G4 front a dúplex. Aquest fet resulta de particular interès donada la predominança d'aquesta última conformació d'ADN a nivell cel·lular.

Aquests resultats han sigut recolzats amb estudis de fluorescència, els quals han permès la determinació de constants d'afinitat (K_a) a partir de les dades obtingudes de valoracions fluorimètriques. En el cas de la família TPA, l'emissió dels derivats, especialment TPA3P i TPA3PY, dona lloc a un considerable augment de la fluorescència en presència d'ADN G4. El que resulta més interessant és que la magnitud d'aquest augment és molt més elevada que l'obtinguda a partir de les valoracions amb ADN dúplex. Aquest fet ha estat atribuït a la formació d'agregats entre els derivats del TPA i l'ADN G4, els quals donen lloc a l'augment de fluorescència degut a l'efecte AIE. Pel que fa al grup de compostos TPB, aquests no han pogut ser estudiats per fluorescència degut a que la seua λ_{ex} és pròxima a la λ d'absorció màxima de l'ADN.

Quant a la modificació de l'estructura G4, s'han realitzat valoracions per dicroisme circular que han demostrat que la conformació de l'ADN és manté tot i que aquest es trobe interaccionant amb els compostos. Les valoracions corresponents a TPA3P i TPA3PY mostren bandes de dicroisme circular induït, el que és indicatiu de la magnitud de la força de la seua interacció amb l'ADN G4.

- IV - Els compostos tri-ramificats (TPA3P, TPA3PY, TPB3P i TPB3PY) han mostrat una elevada selectivitat per l'ADN G4. Conseqüentment, aquests es poden considerar com a potencials agents antitumorals. Tanmateix, la seua elevada càrrega positiva a pH fisiològic podria dificultar la seua captació cel·lular. Per aquesta raó, aquests compostos han sigut encapsulats en nanopartícules de tipus liposoma per tal de facilitar el seu pas per la membrana cel·lular. El disseny de les vesícules ha permès obtindre sistemes teranòstics, unint funcions terapèutiques i diagnòstiques en la mateixa nanopartícula. Per tant, els liposomes no només inclouen el lligand poliamínic, sinó que també contenen un fosfolípid fluorescent i un complex de gadolini que permet la seua visualització mitjançant microscòpia confocal i ressonància magnètica d'imatge (RMI).

Una formulació específica de liposomes ha sigut específicament dissenyada per a dirigir les nanopartícules cap al nucli cel·lular, on es troba la gran majoria de material genètic. S'ha emprat l'aptàmer AS1411, el qual s'uneix selectivament a la proteïna nucleolina que es troba sobreexpressada en el citoplasma i en la membrana nuclear de cèl·lules tumorals. Els liposomes obtinguts, tant els dirigits com els no dirigits, han sigut caracteritzats per microscòpia electrònica i dispersió dinàmica de llum (DLS, de l'anglès *Dynamic Light Scattering*), demostrant posseir una distribució de tamany adequada per a aplicacions biomèdiques.

El contingut de compost encapsulat ha sigut calculat mitjançant espectroscòpia de fluorescència. Els resultats obtinguts apunten que la eficiència del procés depén del protocol experimental emprat, així com de la naturalesa del compost encapsulat. La quantificació de gadolini ha sigut realitzada emprant ICP-MS (de l'anglès *Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry*), com a pas previ per a la determinació de la relaxativitat.

- V - La citotoxicitat dels onze compostos sintetitzats, així com de les diferents formulacions de liposomes ha sigut estudiada en tres línies cel·lulars tumorals diferents, aplicant l'assaig MTT. De manera general, la citotoxicitat dels compostos disminueix a mesura que disminueix el nombre de substituents en la seua estructura molecular, amb l'excepció de TPB3P. Conseqüentment, els compostos tri-ramificats que han demostrat posseir una elevada selectivitat cap a l'ADN G4, tenen associat l'efecte terapèutic més reduït.

Aquest fet ha sigut explicat en base a l'elevada càrrega positiva que aquests compostos presenten a pH fisiològic, la qual dificulta la seua captació cel·lular. L'encapsulació d'aquests compostos en nanopartícules de tipus liposoma ha possibilitat afrontar aquesta limitació, ja que la citotoxicitat dels compostos encapsulats millora dràsticament. Aquests resultats confirmen l'habilitat dels liposomes per a transportar l'agent terapèutic cap a l'interior cel·lular.

La localització cel·lular de les nanopartícules ha sigut estudiada en cèl·lules tumorals mitjançant microscòpia confocal. Els liposomes no dirigits han sigut trobats en les proximitats del nucli cel·lular, el qual explica l'augment de citotoxicitat en comparació amb el compost lliure. Pel que fa als liposomes dirigits, les imatges obtingudes han demostrat la seua captació pel nucli cel·lular, el qual està estretament relacionat amb la seua extremadament elevada citotoxicitat. Així doncs, l'estratègia de direccionament actiu dels liposomes ha possibilitat superar les limitacions intrínseques donades pel disseny molecular dels lligands-G4 sintetitzats, possibilitant així que els compostos assolisquen la seua diana terapèutica, l'ADN G4.

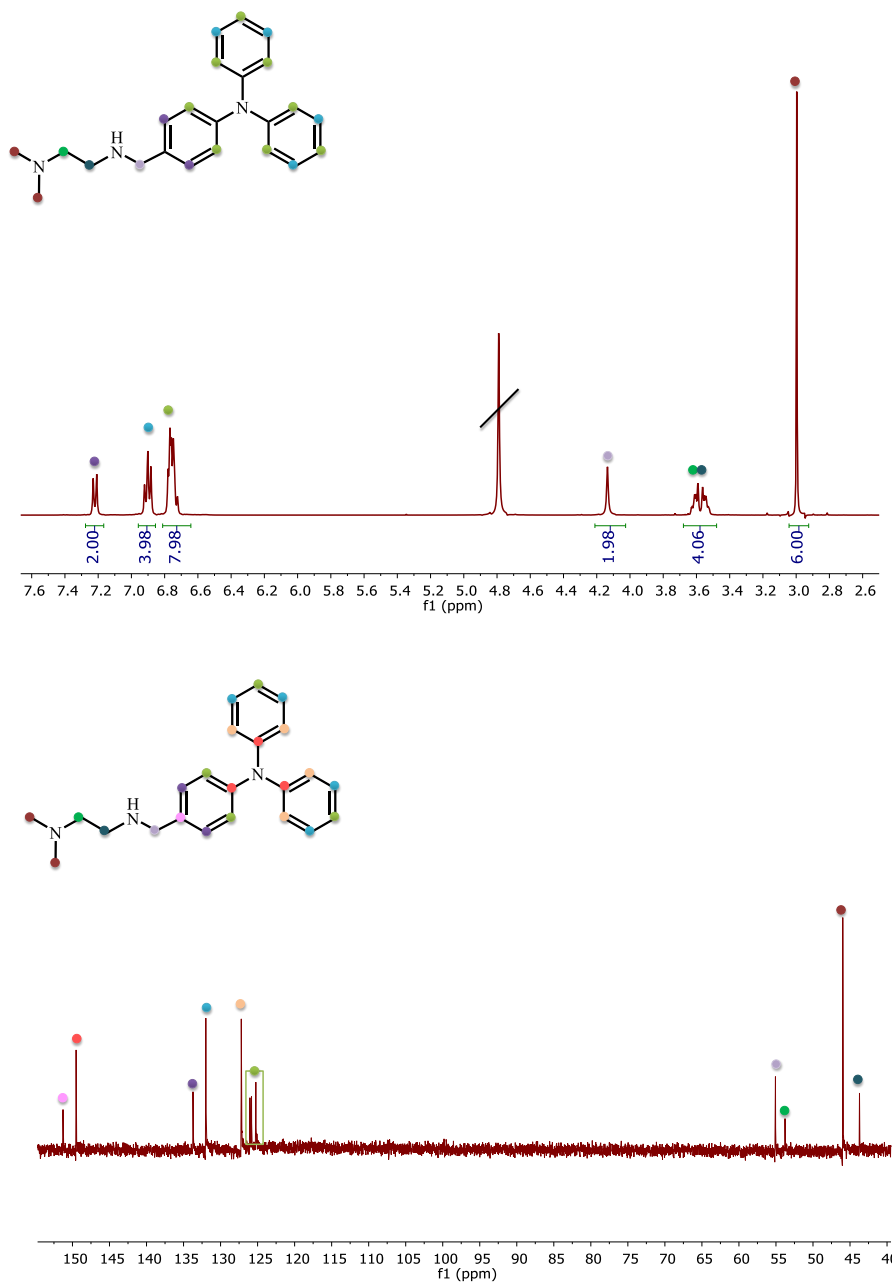


Figure App1.1. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of TPA1PX hydrochloride salt in D₂O.

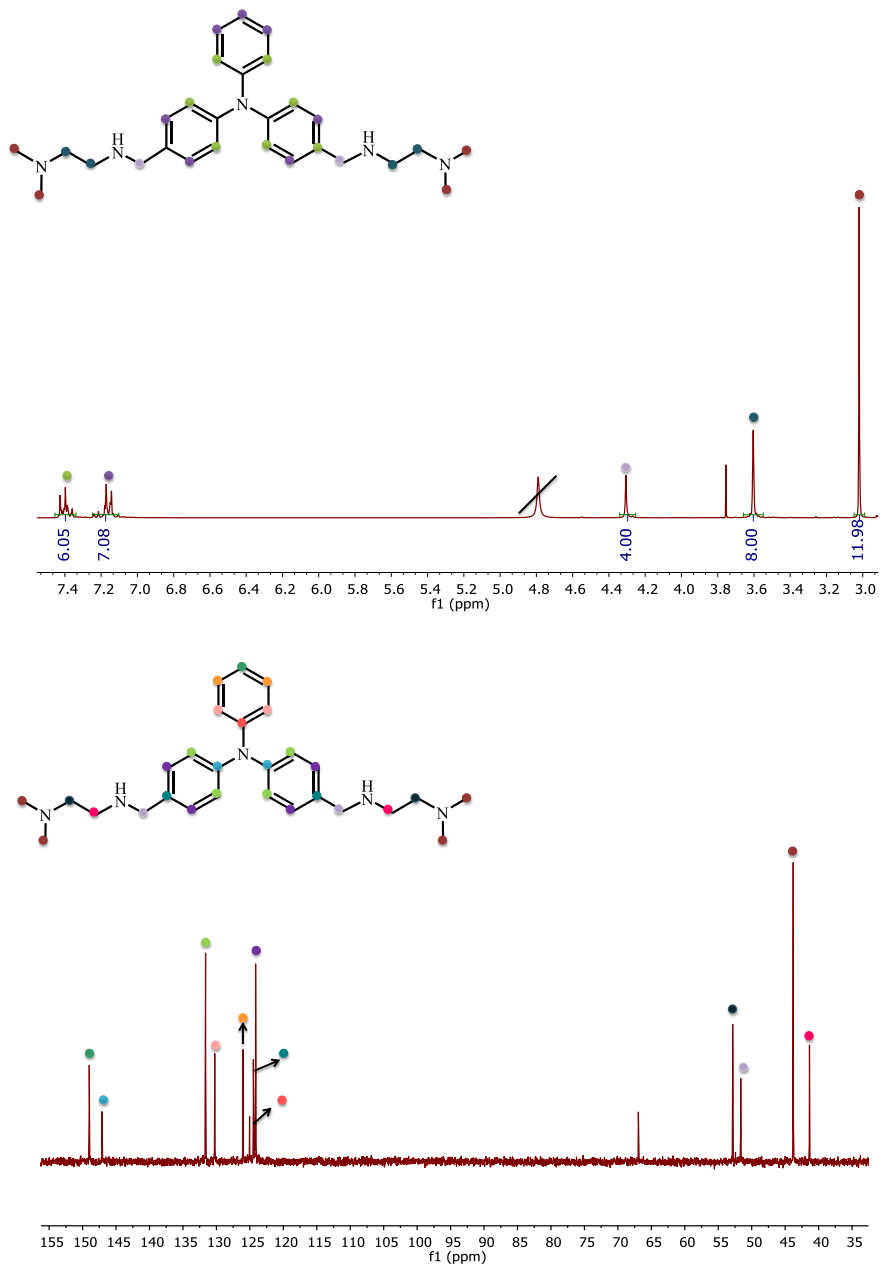


Figure App1.2. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of TPA2PX hydrochloride salt in D_2O .

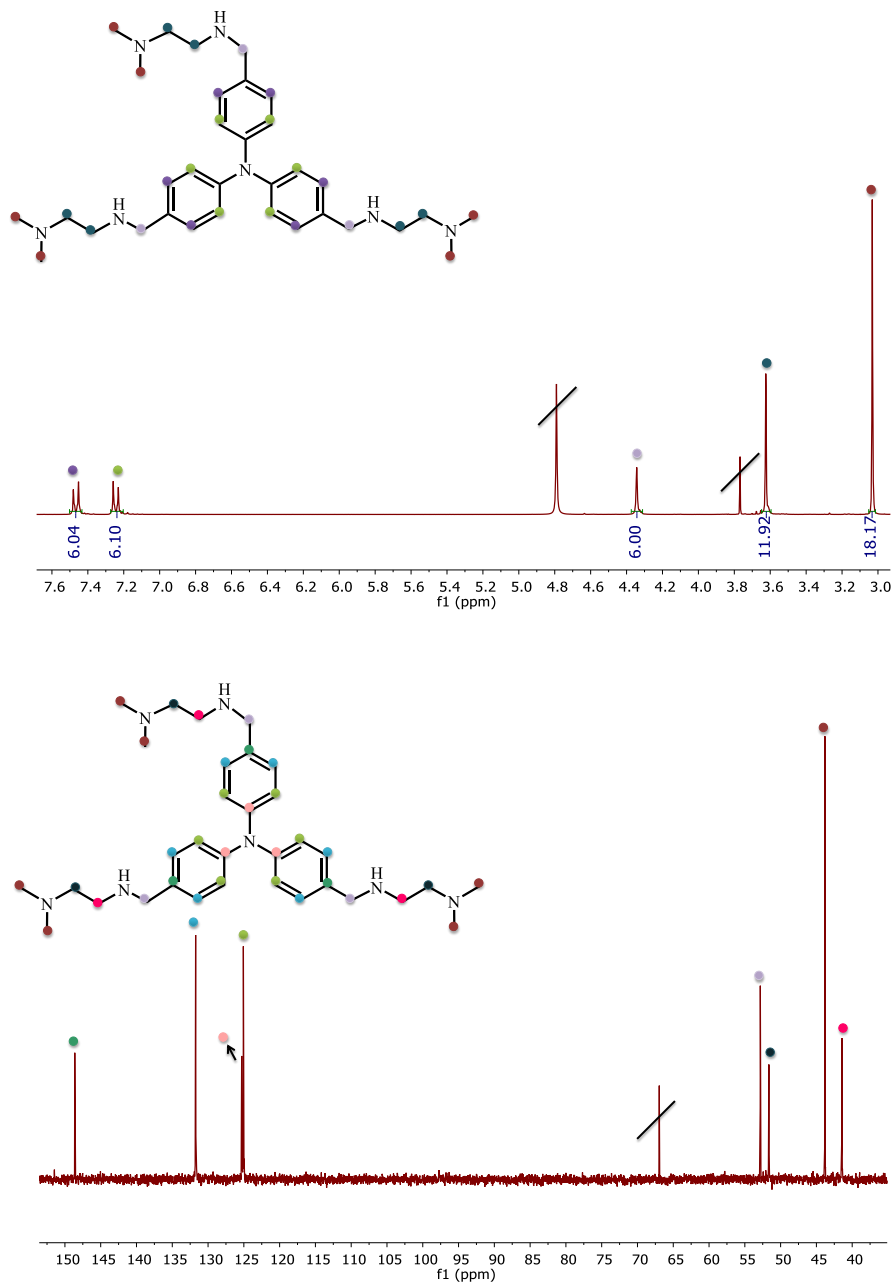


Figure App1.3. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of TPA3PX hydrochloride salt in D₂O.

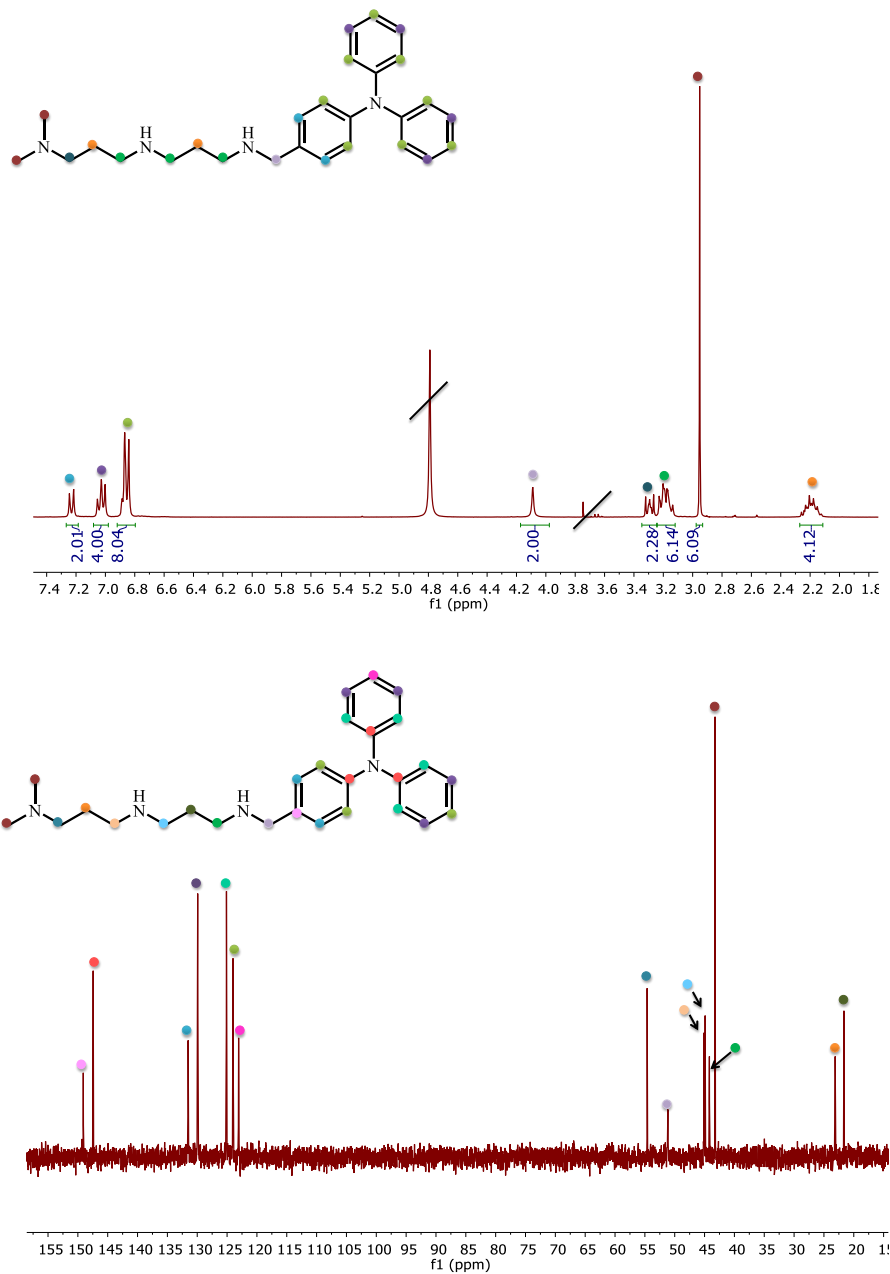


Figure App1.4. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of TPA1P hydrochloride salt in D_2O .

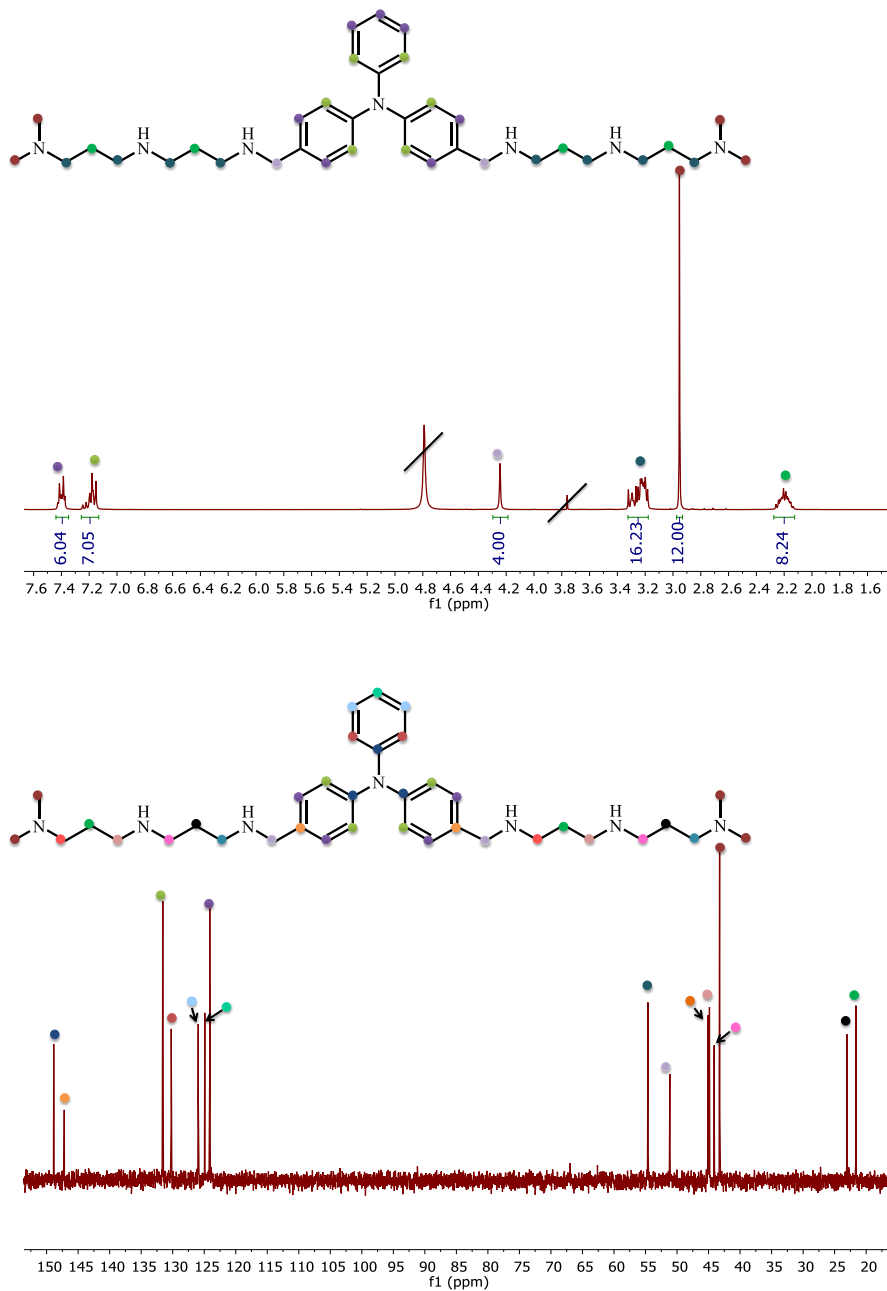


Figure App1.5. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of TPA2P hydrochloride salt in D_2O .

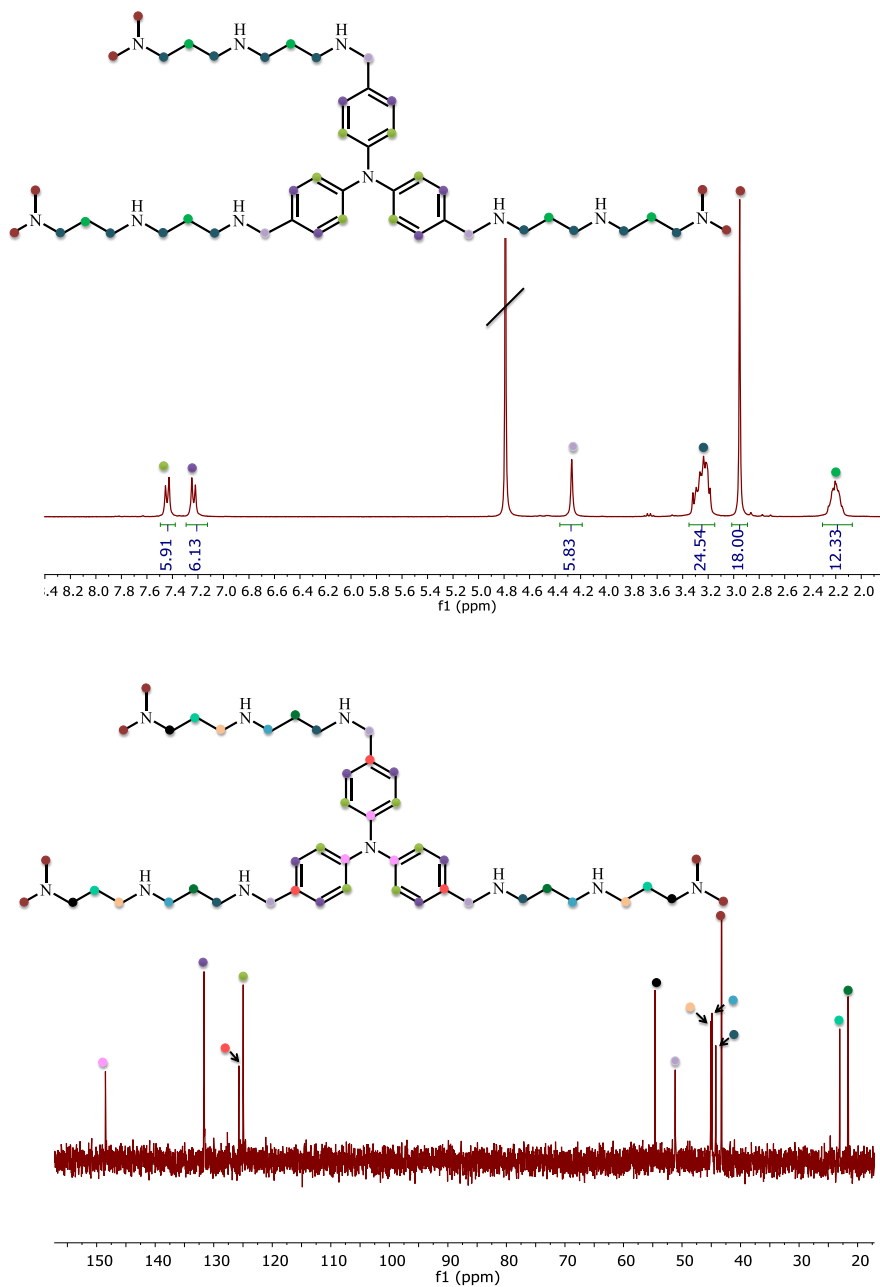


Figure App1.6. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of TPA3P hydrochloride salt in D₂O.

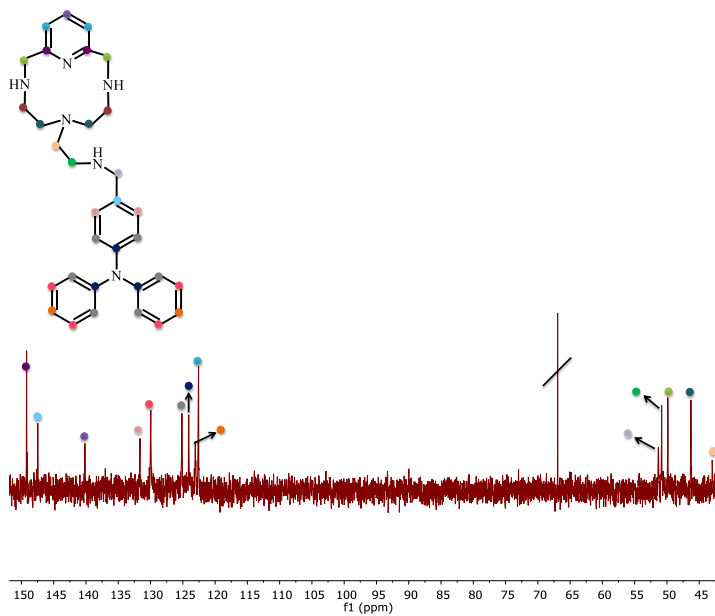
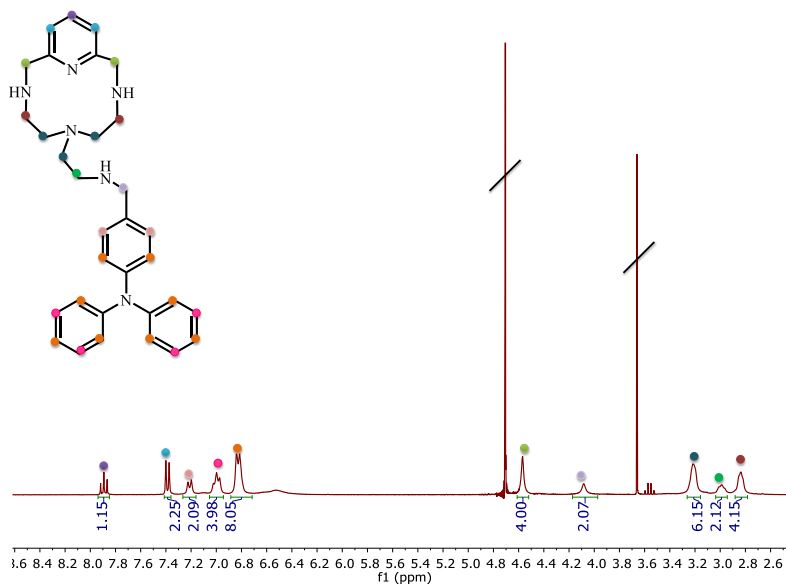


Figure App1.7. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of TPA1PY hydrochloride salt in D₂O.

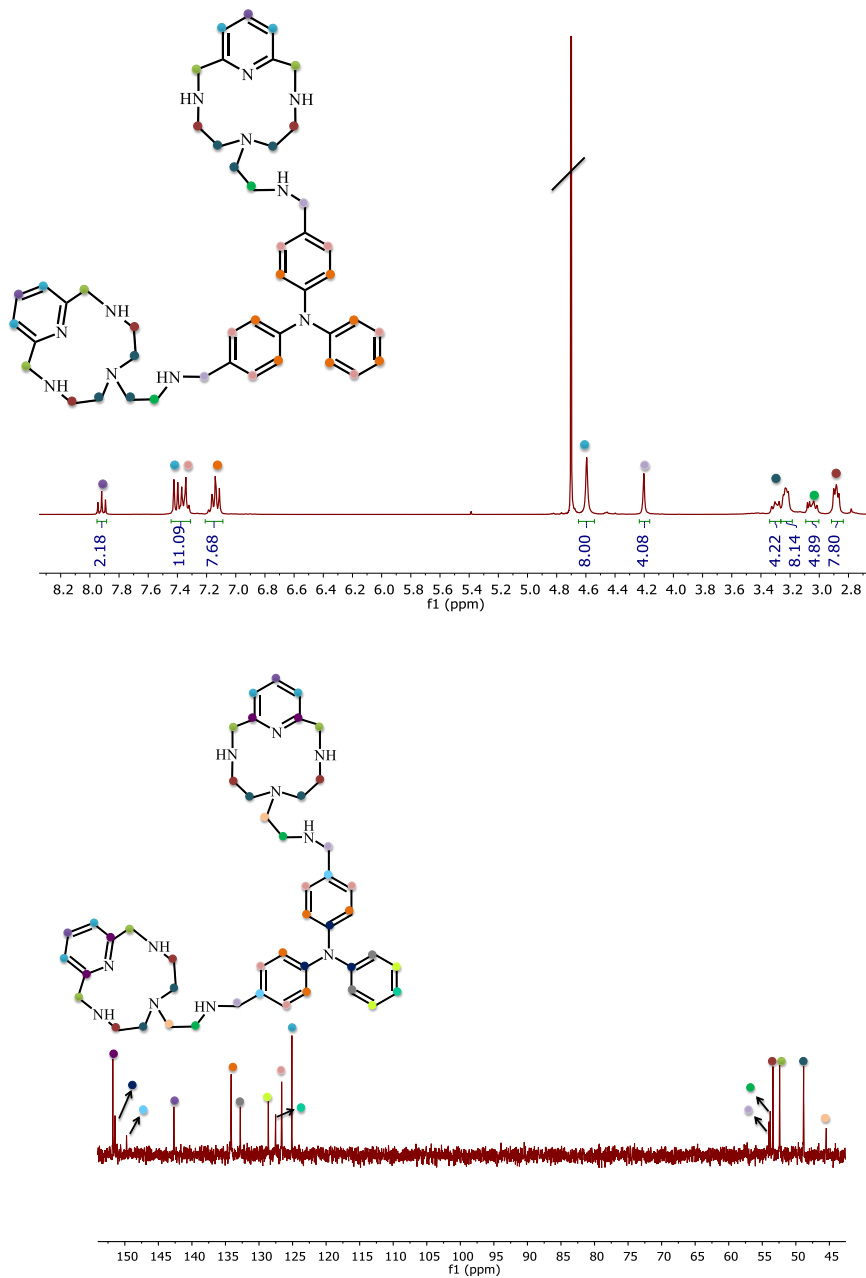


Figure App1.8. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of TPA2PY hydrochloride salt in D_2O .

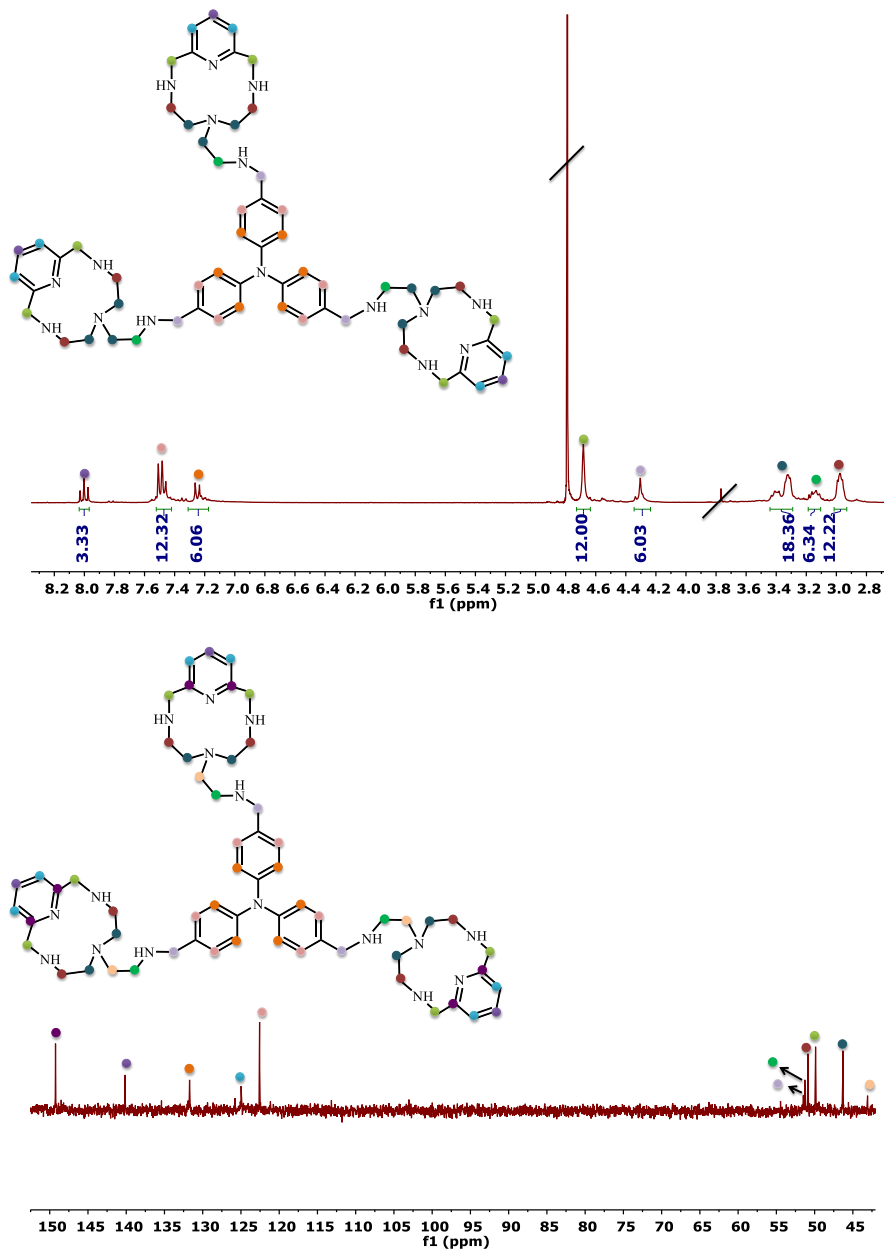


Figure App1.9. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of TPA3PY hydrochloride salt in D₂O.

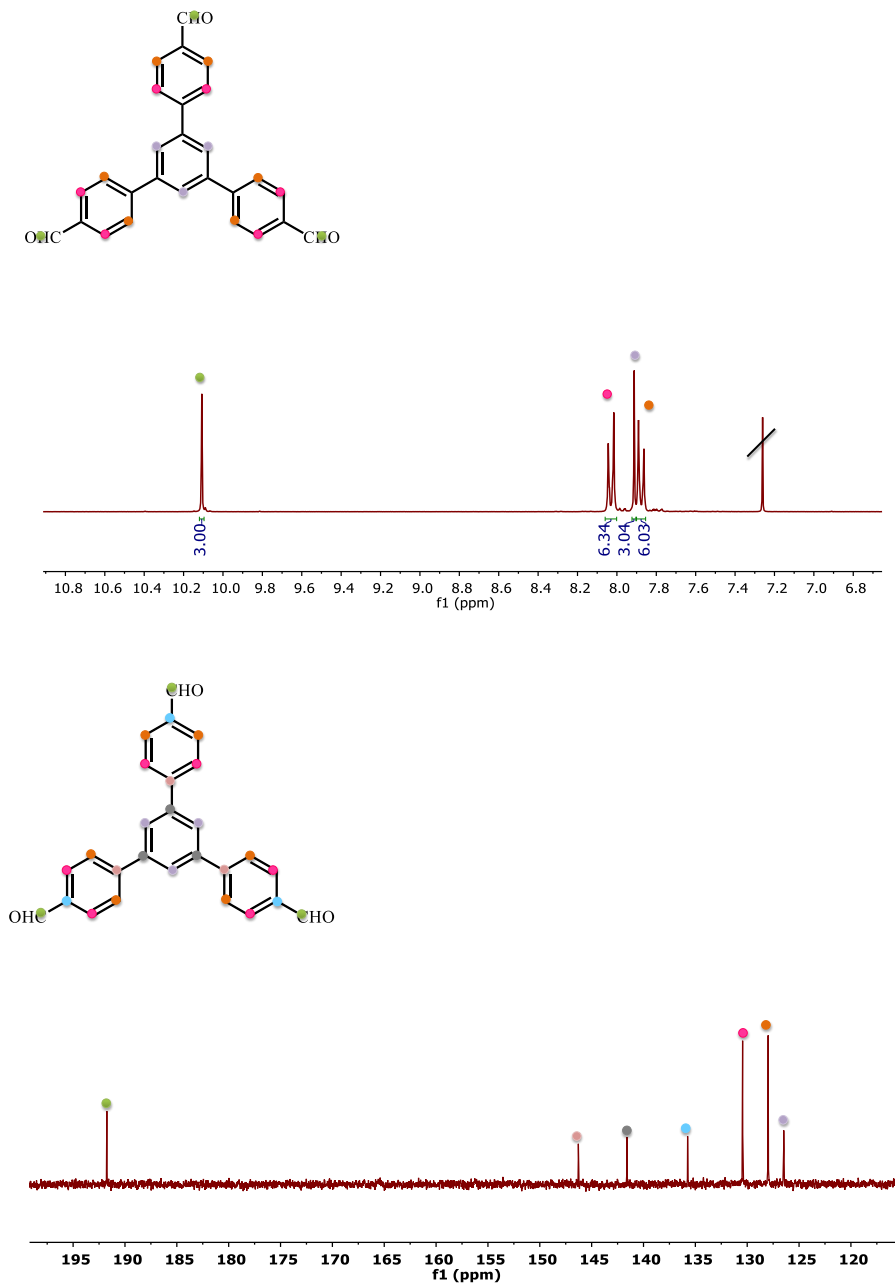


Figure App1.10. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of TPB in CHCl_3 .

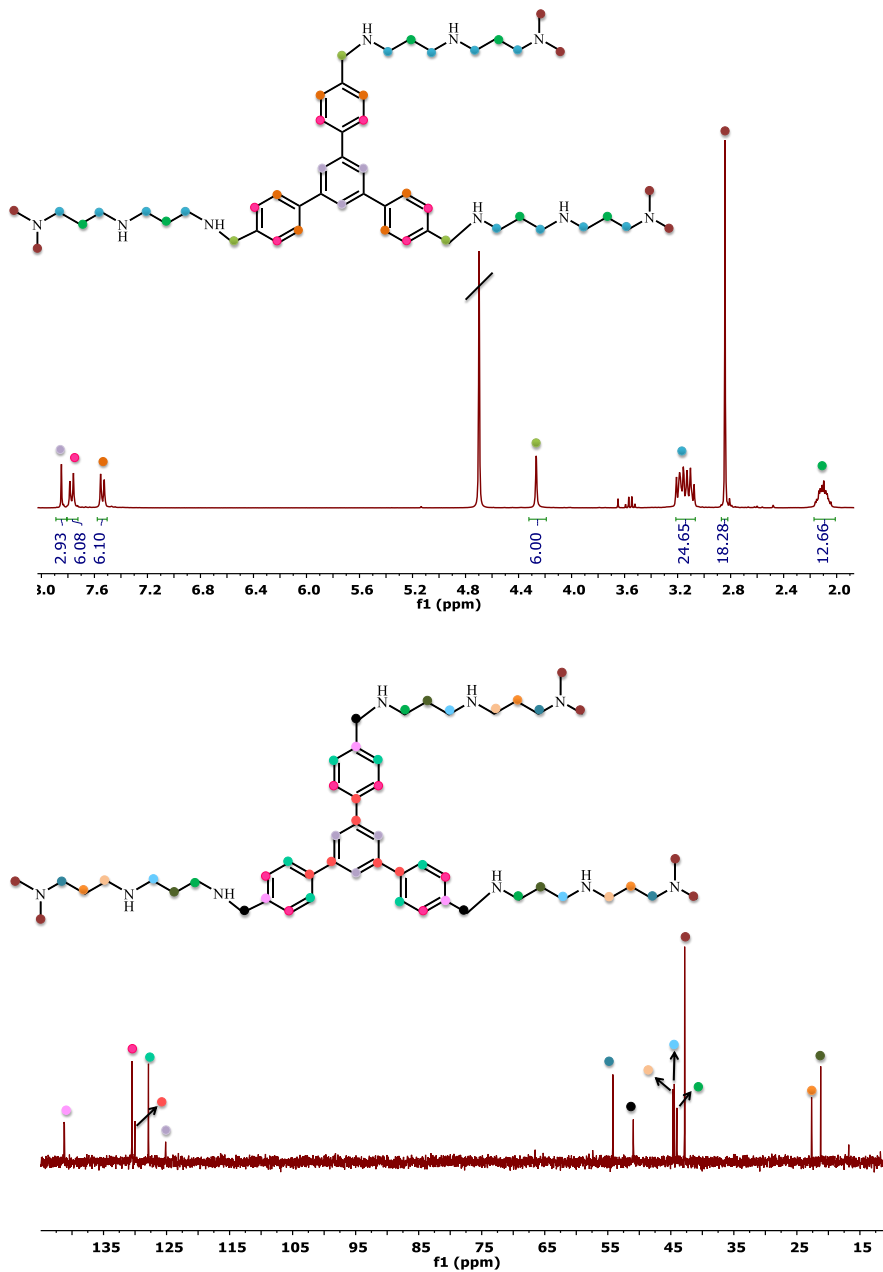


Figure App1.11. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra of TPB3P hydrochloride salt in D₂O.

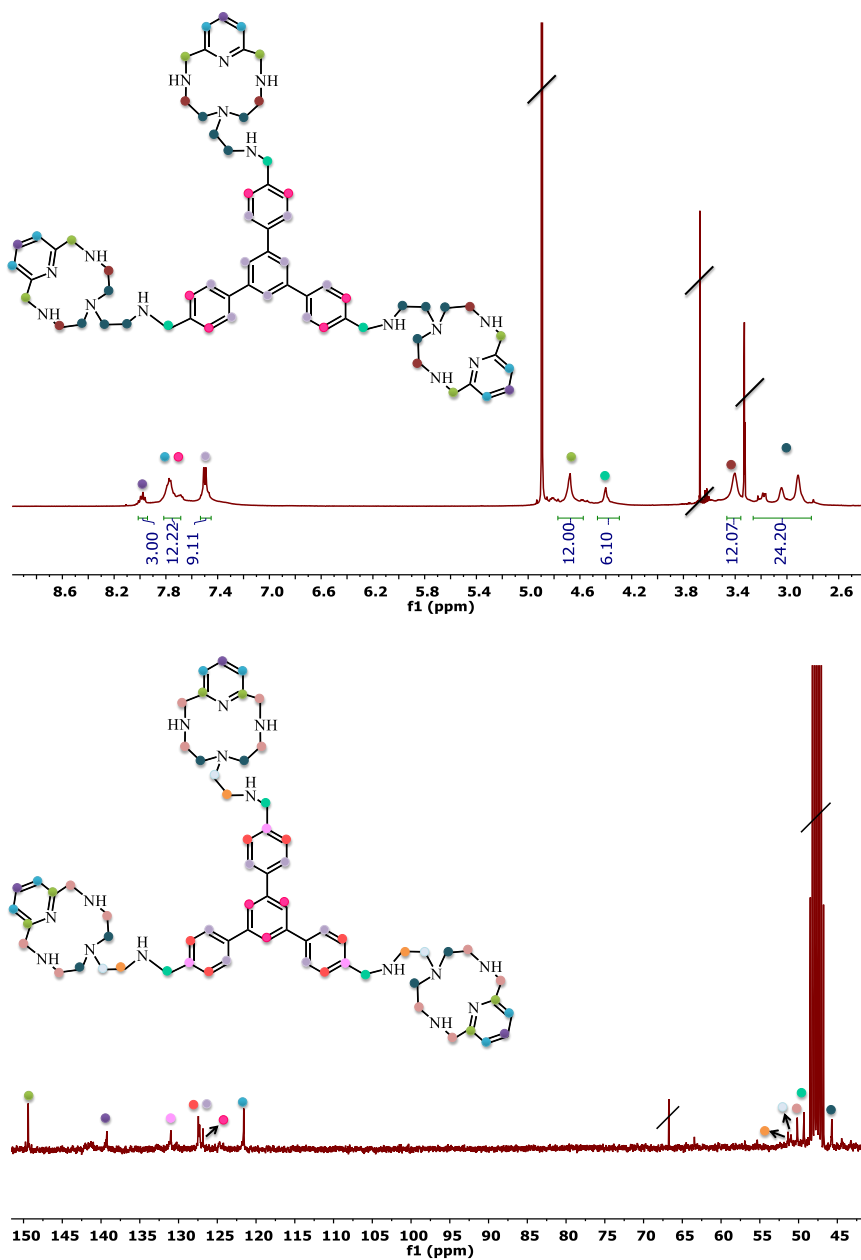


Figure App1.12. ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of TPB3PY hydrochloride salt in D_2O .

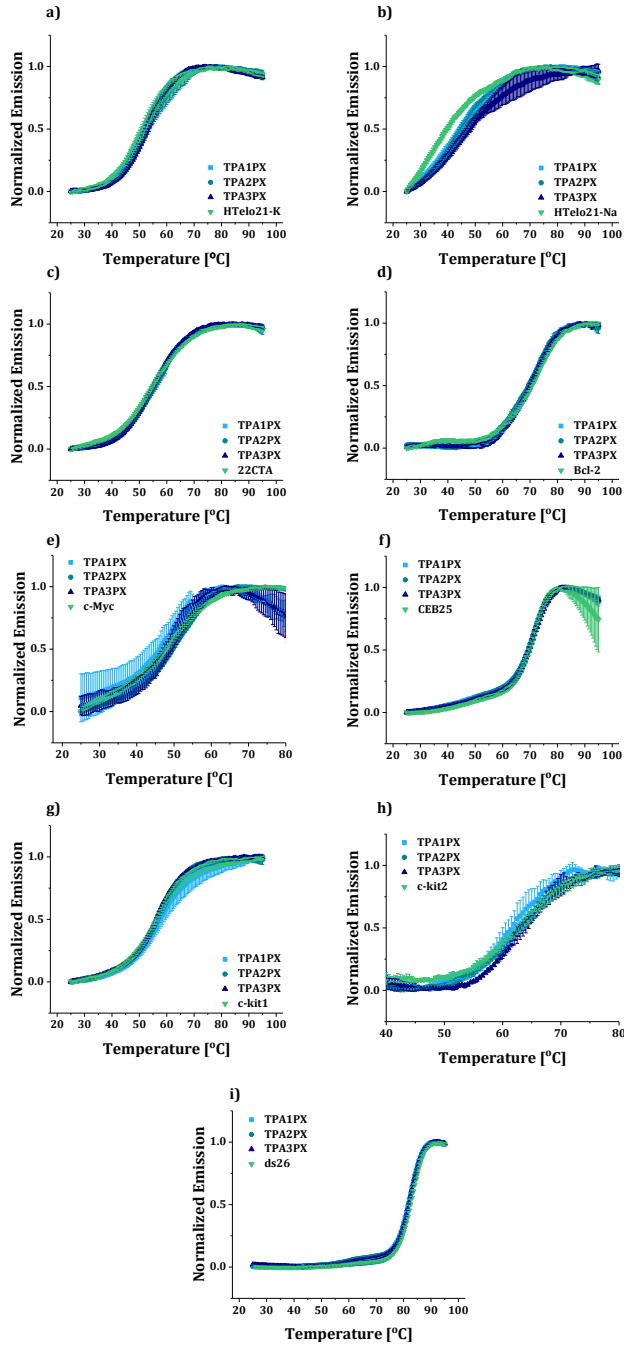


Figure App2.1. FRET melting curves with 0.2 μM labelled DNA and 1 μM of TPA-PX ligands: a) HTelo21-K, b) HTelo21-Na, c) 22CTA, d) Bcl-2, e) c-Myc, f) CEB25, g) c-kit1, h) c-kit2 and i) ds26).

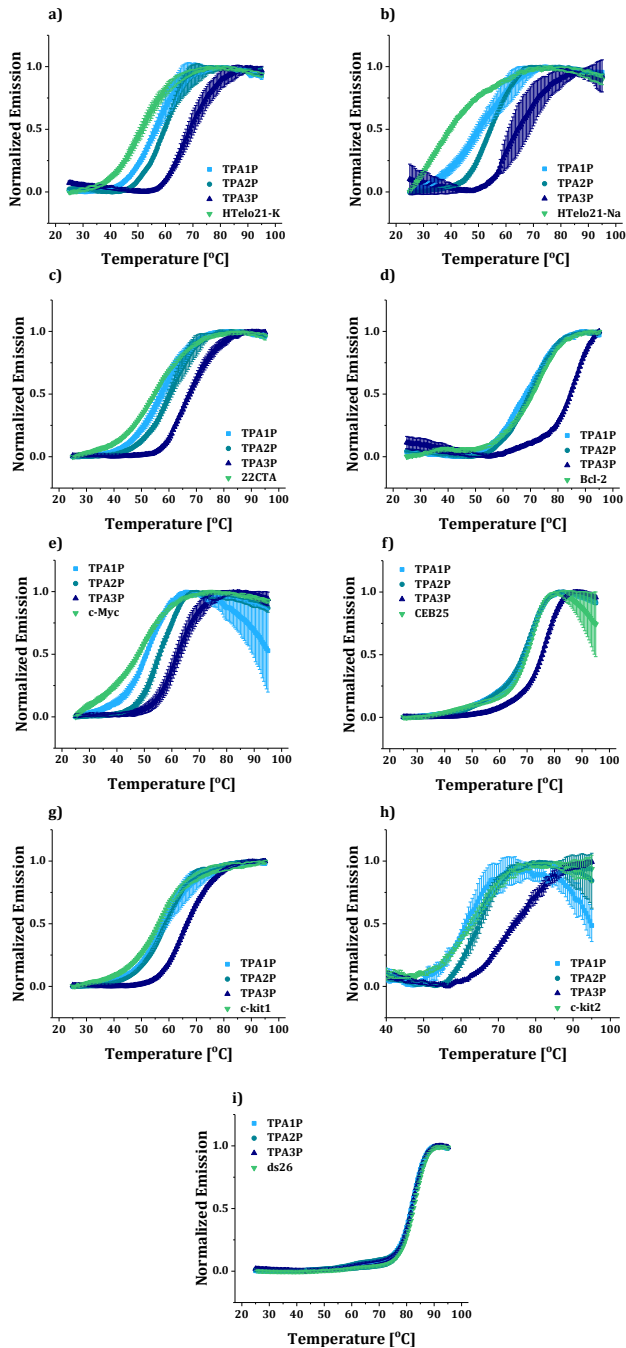


Figure App2.2. FRET melting curves with 0.2 μM labelled DNA and 1 μM of TPA-P ligands: a) HTelo21-K, b) HTelo21-Na, c) 22CTA, d) Bcl-2, e) c-Myc, f) CEB25, g) c-kit1, h) c-kit2 and i) ds26.

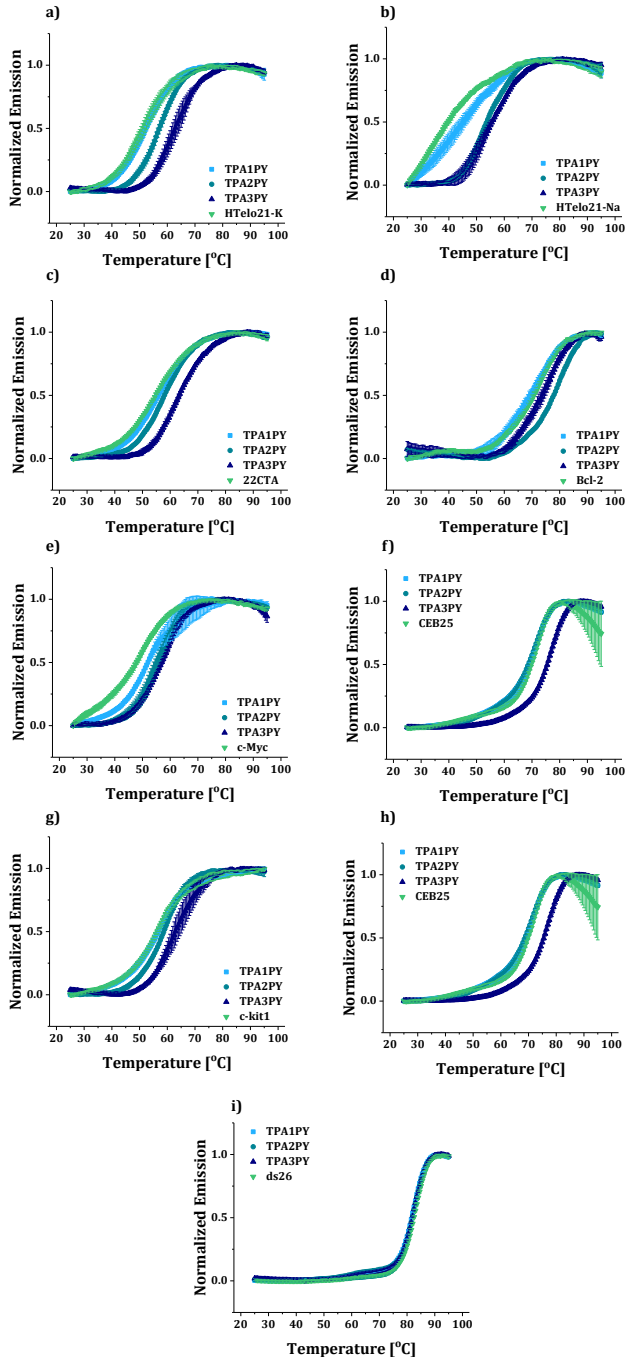


Figure App2.3. FRET melting curves with 0.2 μM labelled DNA and 1 μM of TPA-PY ligands: a) HTelo21-K, b) HTelo21-Na, c) 22CTA, d) Bcl-2, e) c-Myc, f) CEB25, g) c-kit1, h) c-kit2 and i) ds26.

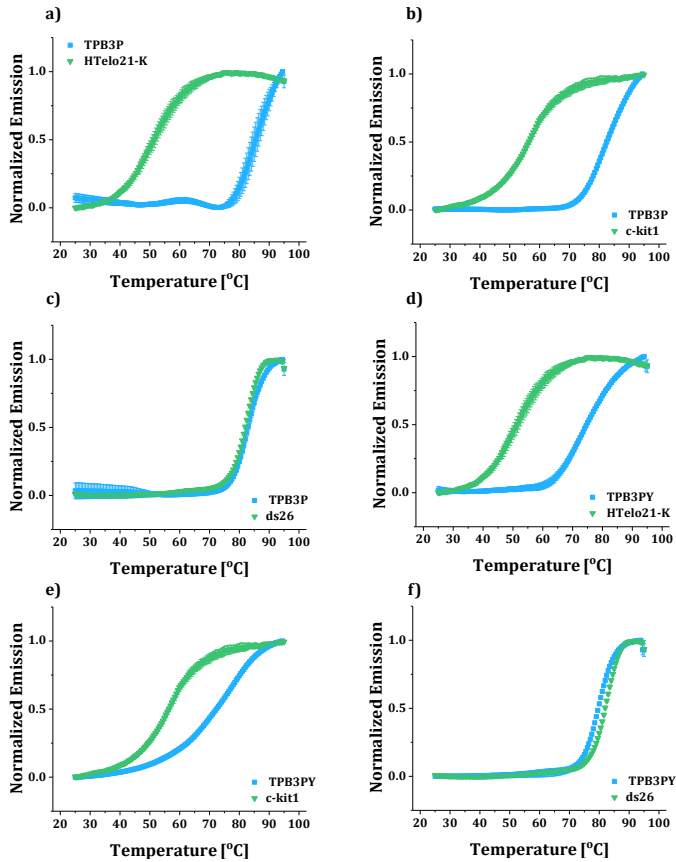


Figure App2.4. FRET melting curves with 0.2 μM labelled DNA and 1 μM of TPB3P: a) HTelo21-K, b) c-kit1, c) ds26. FRET melting curves with 0.2 μM labelled DNA and 1 μM of TPB3PY: a) HTelo21-K, b) c-kit1, c) ds26.

Table App2.1. ΔT_m values [$^{\circ}\text{C}$] for different DNA topologies and the TPA-PX derivatives.

Compound	TPA1PX			TPA2PX			TPA3PX		
	1:2	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10
HTelo21-K	8	-2(1)	-2(1)	1(1)	2(2)	4(2)	0(2)	1(1)	5(2)
HTelo21-Na	0(2)	2(1)	4(2)	1(2)	3(2)	4(2)	3(1)	6(2)	6(1)
22CTA	0(2)	0.2(6)	0.3(6)	1.1(8)	2(1)	1(1)	1(1)	2(1)	3(1)
BCI-2	0(1)	0(1)	-0.9(8)	1(1)	1.0(9)	1.0(8)	0(1)	-1(1)	3(1)
c-Myc	2.0(7)	2.5(7)	2.7(9)	1.1(8)	2.0(1)	2.1(8)	1(1)	2(1)	4(1)
CEB25	0.0(6)	0.7(3)	-1.2(4)	-0.3(5)	-0.5(5)	-0.7(5)	-0.5(2)	-0.3(7)	0.5(3)
c-kit1	0(1)	0.3(8)	0.1(8)	0.13(5)	0.7(3)	0.5(2)	0.3(3)	0.2(5)	1.8(6)
c-kit2	2.1(7)	2.1(7)	2.3(9)	1.4(8)	2.0(1)	1.2(1)	1.5(1)	1.9(1)	3(1)
ds26	0.1(2)	0.1(3)	-0.1(2)	0.1(1)	0.1(1)	0.0(3)	0.0(1)	0.0(1)	0.2(1)

Table App2.2. ΔT_m values [$^{\circ}\text{C}$] for different DNA topologies and the TPA-P derivatives.

Compound	TPA1P			TPA2P			TPA3P		
	1:2	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10
HTelo21-K	0(2)	3(2)	7(3)	2(2)	8(1)	13(3)	5(3)	18(3)	24(3)
HTelo21-Na	2(1)	8(3)	12(2)	6.1(3)	12.9(3)	17(1)	11(2)	24(6)	33(3)
22CTA	0.2(6)	2(2)	3.7(7)	1.1(3)	5(1)	6.4(9)	4.6(9)	12(1)	22(2)
BCI-2	-1(1)	-2.8(7)	-2.9(6)	-1.5(4)	-1.3(5)	2.6(5)	1.7(8)	14.0(8)	17.7(7)
c-Myc	-0(1)	1.7(8)	5(1)	6(2)	8(2)	10(4)	4(2)	15(3)	25(7)
CEB25	-0.6(4)	-1.1(7)	-1.9(4)	-0.7(7)	-1.6(3)	0.2(2)	-1.2(2)	5.3(4)	10.4(4)
c-kit1	1(2)	2(2)	2.2(7)	1.2(4)	2.6(5)	5.0(5)	3.3(7)	10.7(8)	20.2(8)
c-kit2	0(1)	1.7(8)	5(1)	2(2)	7(3)	10(4)	5(2)	15(3)	25(6)
ds26	0.1(6)	-0.1(6)	-0.3(5)	0.1(4)	0.1(2)	-0.2(3)	-0.1(2)	-0.1(2)	0.5(5)

Table App2.3. ΔT_m values [$^{\circ}\text{C}$] for different DNA topologies and the TPA-PY derivatives.

Compound	TPA1PY			TPA2PY			TPA3PY		
	1:2	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10
HTelo21-K	0.2(3)	1.2(2)	3.3(1)	5.7(5)	12.4(2)	20.9(2)	2.9(6)	11.3(7)	18.7(5)
HTelo21-Na	3(1)	0.9(2)	15.5(5)	0.35(8)	16.5(6)	26.7(2)	14(2)	26.6(6)	44.1(8)
22CTA	0.4(4)	0.6(2)	1.0(3)	2.2(5)	7.13(5)	15.4(1)	2.5(5)	7.7(7)	16.8(7)
BCI-2	0.4(1)	0.3(4)	1.6(2)	0.72(9)	3.6(1)	10.54(8)	2.3(2)	7.9(1)	17.2(1)
c-Myc	1.1(3)	0.4(1)	2.4(9)	5.1(3)	10.6(1)	18.01(2)	11.2(5)	20.5(1)	35.4(5)
CEB25	0.1(1)	0.7(9)	0.8(2)	0.12(1)	2.4(3)	7.9(7)	1.5(1)	8.7(1)	15.2(4)
c-kit1	1.3(2)	2(2)	2.2(7)	1.2(4)	2.7(5)	5.0(5)	3.4(7)	10.7(8)	18.2(8)
c-kit2	0.1(1)	0.14(1)	1(1)	2.6(6)	8(2)	10(4)	4.7(1)	14(2)	25.4(6)
ds26	0.2(7)	0.1(2)	0.3(2)	0.01(6)	1.4(2)	4.7(2)	0.36(1)	3.8(2)	14(1)

Table App2.4. ΔT_m values [$^{\circ}\text{C}$] for different DNA topologies and the TPB derivatives.

Compound	TPB3P			TPB3PY		
	1:2	1:5	1:10	1:2	1:5	1:10
HTelo21-K	22(4)	30(1)	37.7(2)	15(2)	24.6(3)	33.8(5)
c-kit1	22.8(7)	30.7(3)	35.31(8)	5(1)	20.4(4)	30.2(3)
ds26	1.2(4)	3.9(9)	7(1)	0.09(2)	1.4(1)	4.0(2)

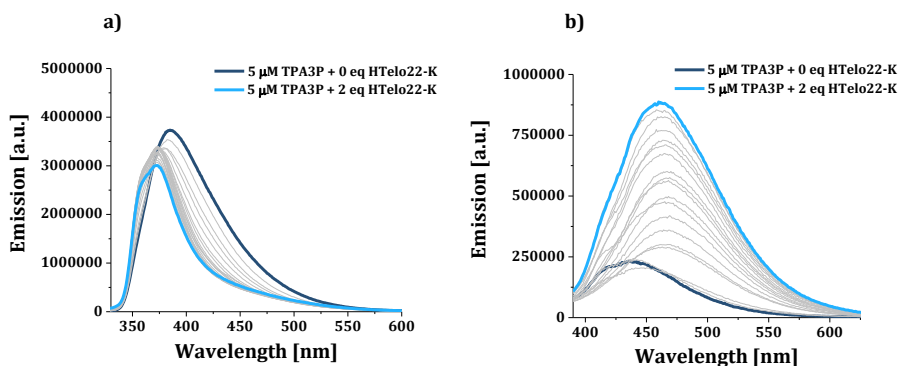


Figure App3.1. Fluorimetric titration of TPA3P with HTelo22-K: a) $\lambda_{ex} = 314$ and b) $\lambda_{ex} = 375$ nm.

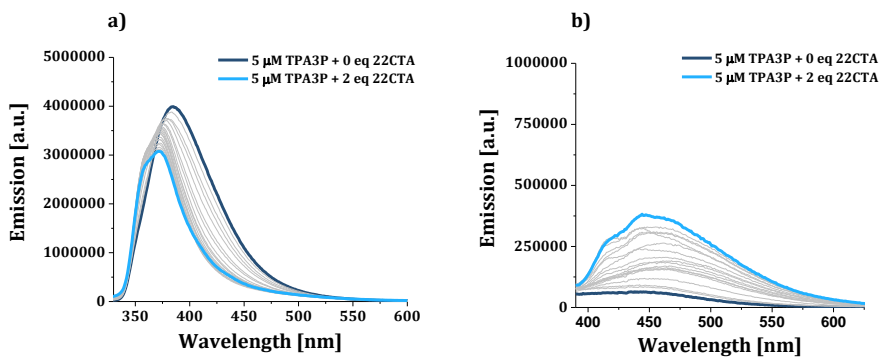


Figure App3.2. Fluorimetric titration of TPA3P with 22CTA: a) $\lambda_{ex} = 314$ and b) $\lambda_{ex} = 375$ nm.

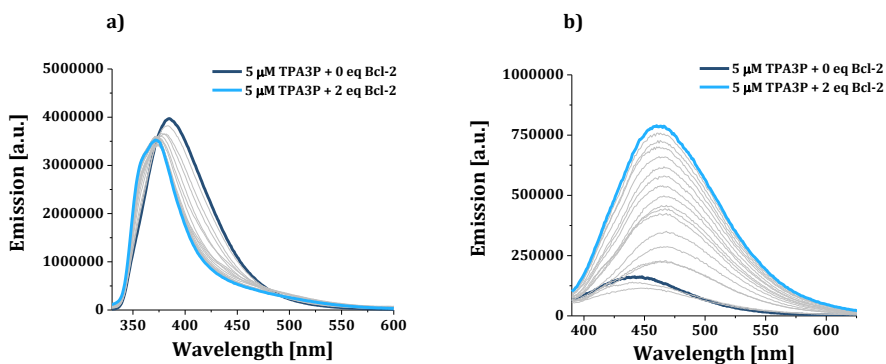


Figure App3.3. Fluorimetric titration of TPA3P with Bcl-2: a) $\lambda_{ex} = 314$ and b) $\lambda_{ex} = 375$ nm.

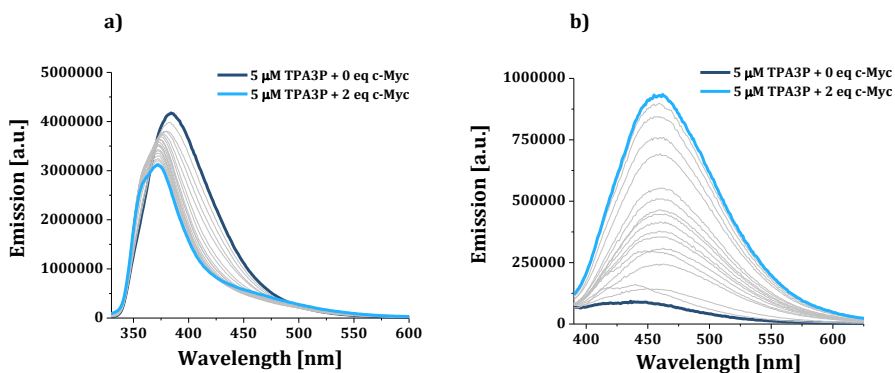


Figure App3.4. Fluorimetric titration of TPA3P with c-Myc: a) λ_{ex} = 314 and b) λ_{ex} = 375 nm.

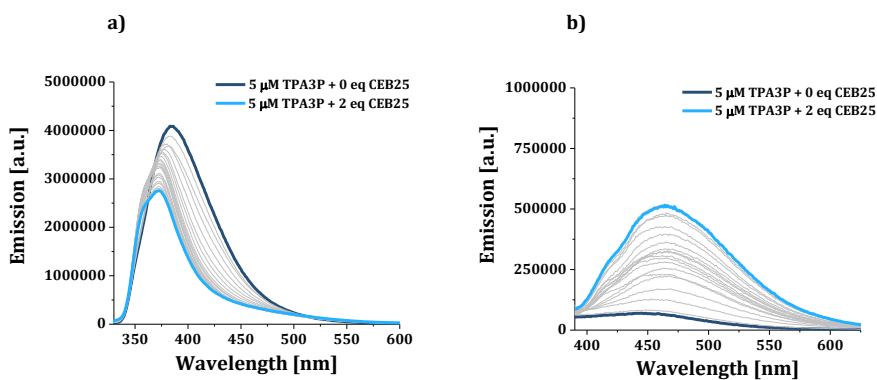


Figure App3.5. Fluorimetric titration of TPA3P with CEB25: a) λ_{ex} = 314 and b) λ_{ex} = 375 nm.

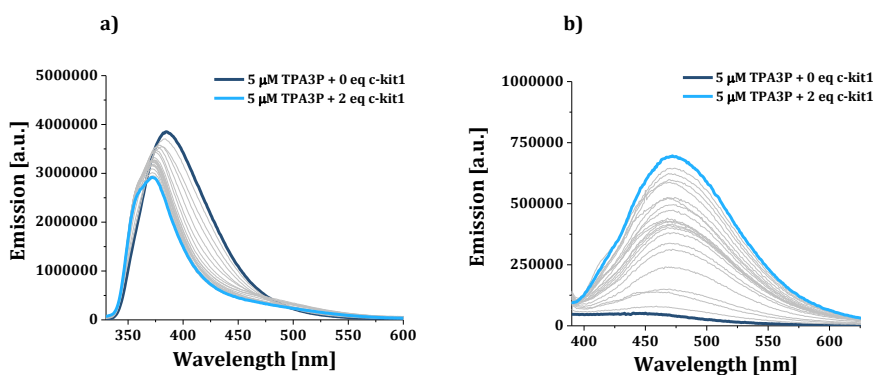


Figure App3.6. Fluorimetric titration of TPA3P with c-kit1: a) λ_{ex} = 314 and b) λ_{ex} = 375 nm.

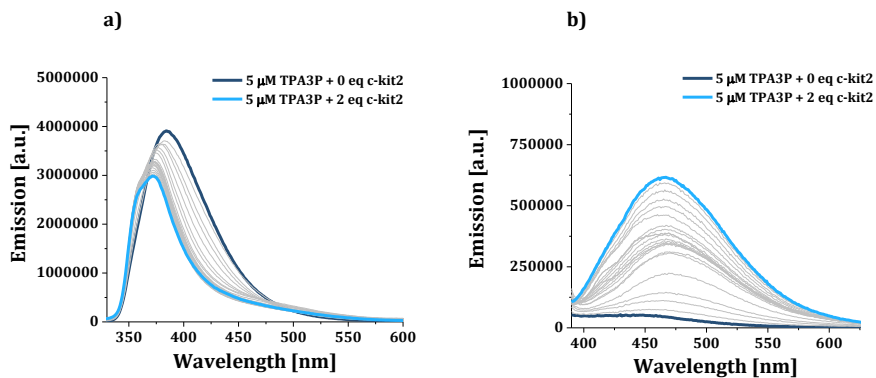


Figure App3.7. Fluorimetric titration of TPA3P with c-kit2: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

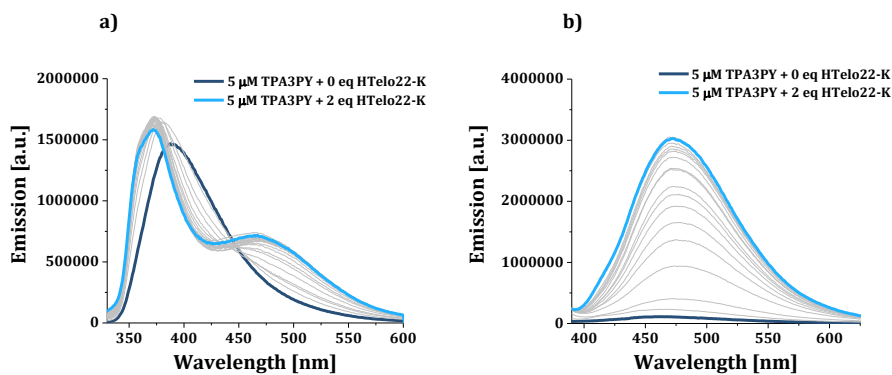


Figure App3.8. Fluorimetric titration of TPA3PY with HTelo22-K: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

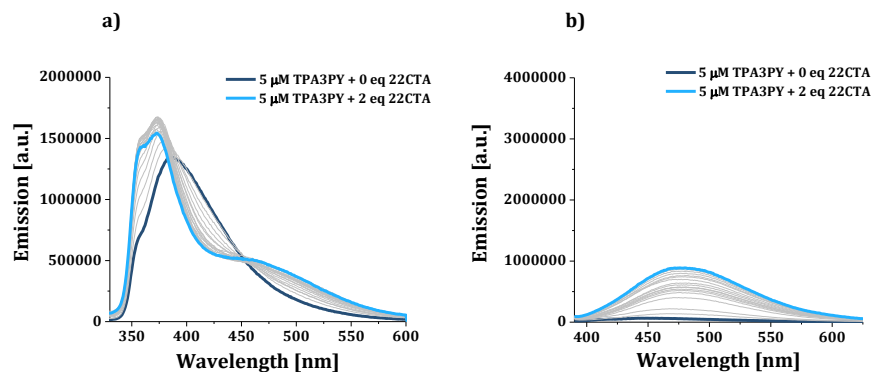


Figure App3.9. Fluorimetric titration of TPA3PY with 22CTA: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

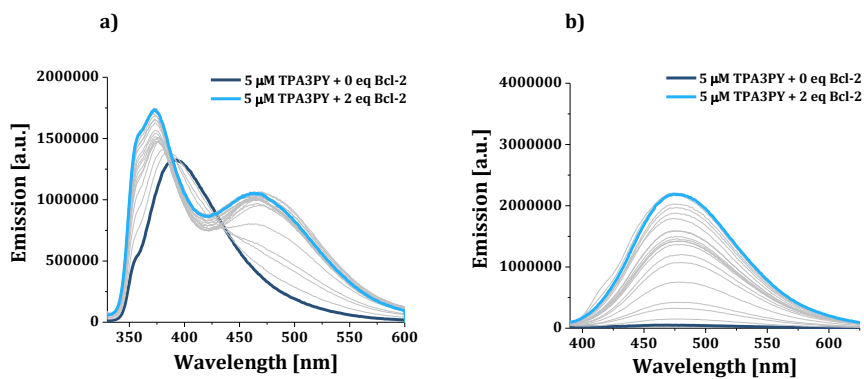


Figure App3.10. Fluorimetric titration of TPA3PY with Bcl-2: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

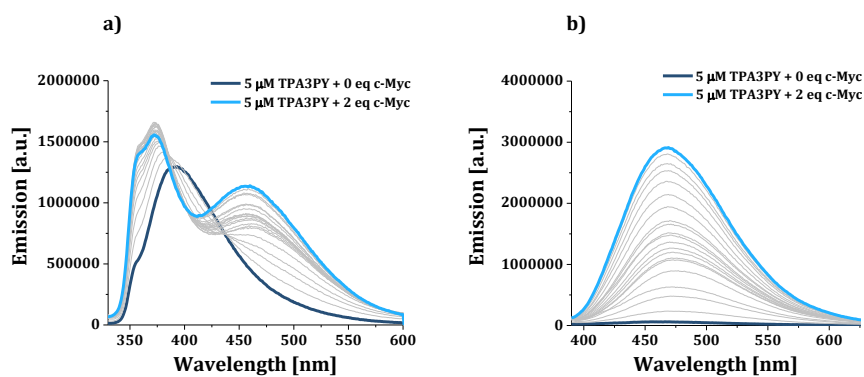


Figure App3.11. Fluorimetric titration of TPA3PY with c-Myc: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

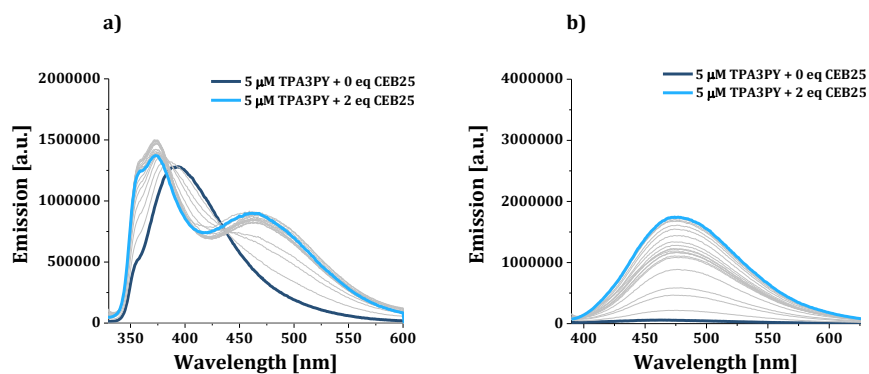


Figure App3.12. Fluorimetric titration of TPA3PY with CEB25: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

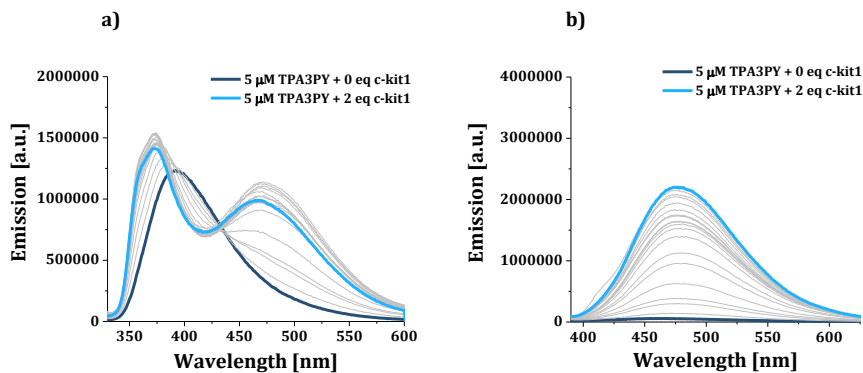


Figure App3.13. Fluorimetric titration of TPA3PY with c-kit1: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

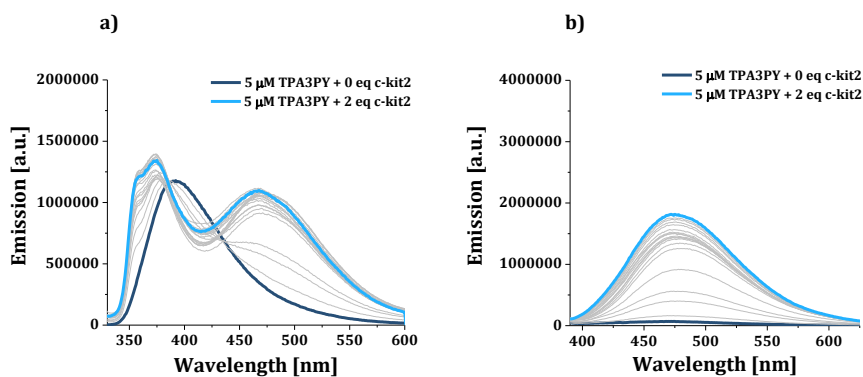


Figure App3.14. Fluorimetric titration of TPA3PY with c-kit2: a) $\lambda_{\text{ex}} = 314$ and b) $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

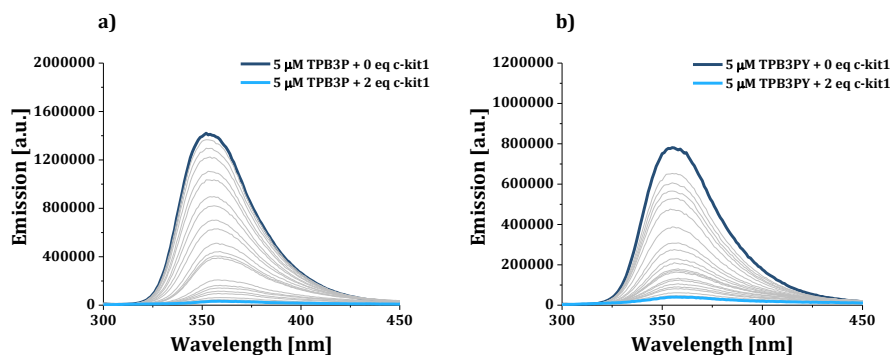


Figure App3.15. Fluorimetric titration of a) TPB3P and b) TPB3PY with c-kit1 ($\lambda_{\text{ex}} = 270$ nm).

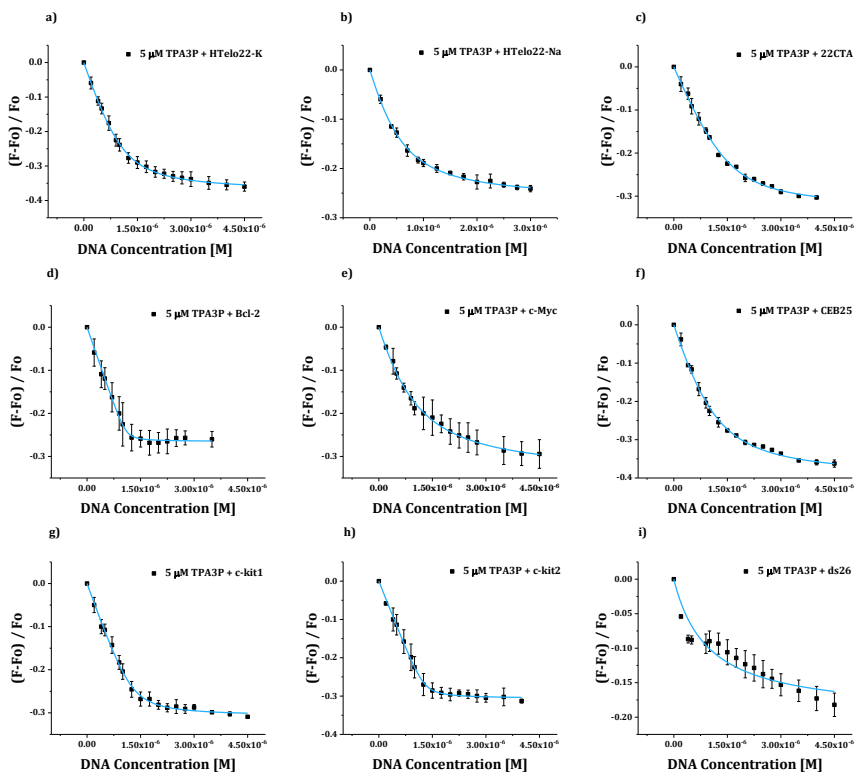


Figure App3.16. Plot of $(F_0-F)/F_0$ vs DNA concentration for TPA3P titrations with different DNA topologies, showing the corresponding fitted curves (a) HTelo22-K, b) HTelo22-Na, c) 22CTA, d) Bcl-2, e) c-Myc, f) CEB25, g) c-kit1, h) c-kit2 and i) ds26).

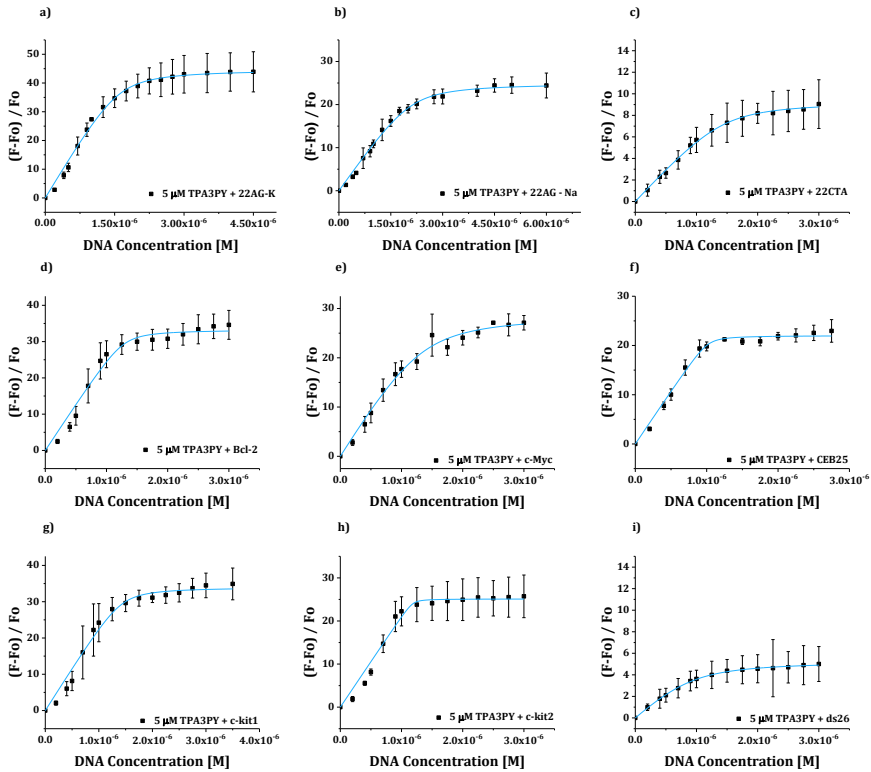


Figure App3.17. Plot of $(F_0-F)/F_0$ vs DNA concentration for TPA3PY titrations with different DNA topologies, showing the corresponding fitted curves (a) HTelo22-K, b) HTelo22-Na, c) 22CTA, d) Bcl-2, e) c-Myc, f) CEB25, g) c-kit1, h) c-kit2 and i) ds26).

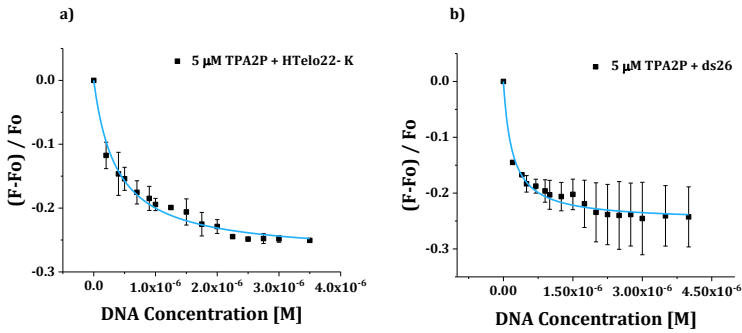


Figure App3.18. Plot of $(F_0-F)/F_0$ vs DNA concentration for TPA2P titrations with different DNA topologies, showing the corresponding fitted curves (a) HTelo22-K and b) ds26).

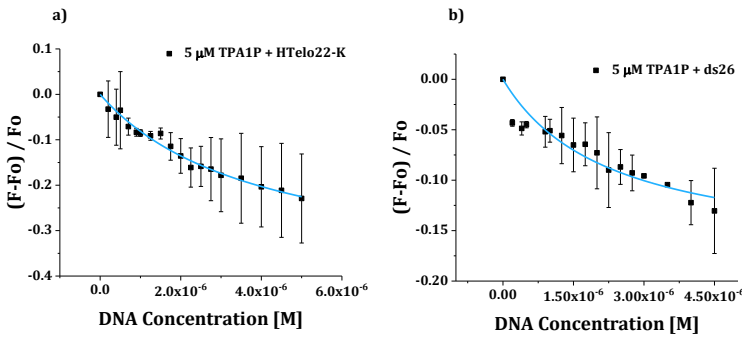


Figure App3.19. Plot of $(F_0-F)/F_0$ vs DNA concentration for TPA1P titrations with different DNA topologies, showing the corresponding fitted curves (a) HTelo22-K and b) ds26).

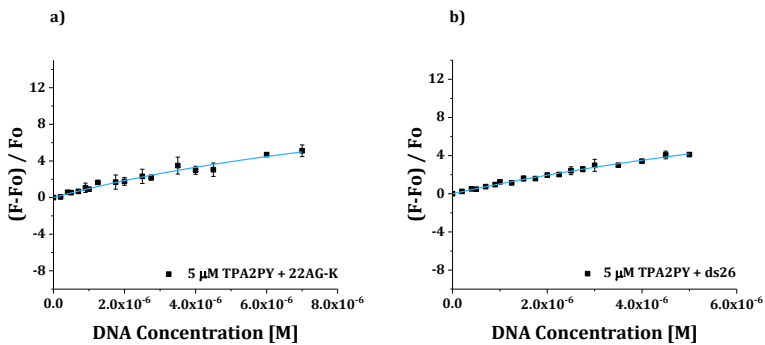


Figure App3.20. Plot of $(F_0-F)/F_0$ vs DNA concentration for TPA2PY titrations with different DNA topologies, showing the corresponding fitted curves (a) HTelo22-K and b) ds26).

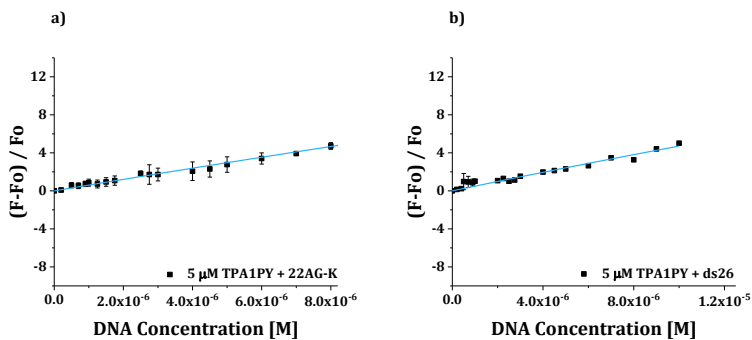


Figure App3.21. Plot of $(F_0-F)/F_0$ vs DNA concentration for TPA1PY titrations with different DNA topologies, showing the corresponding fitted curves (a) HTelo22-K and b) ds26).

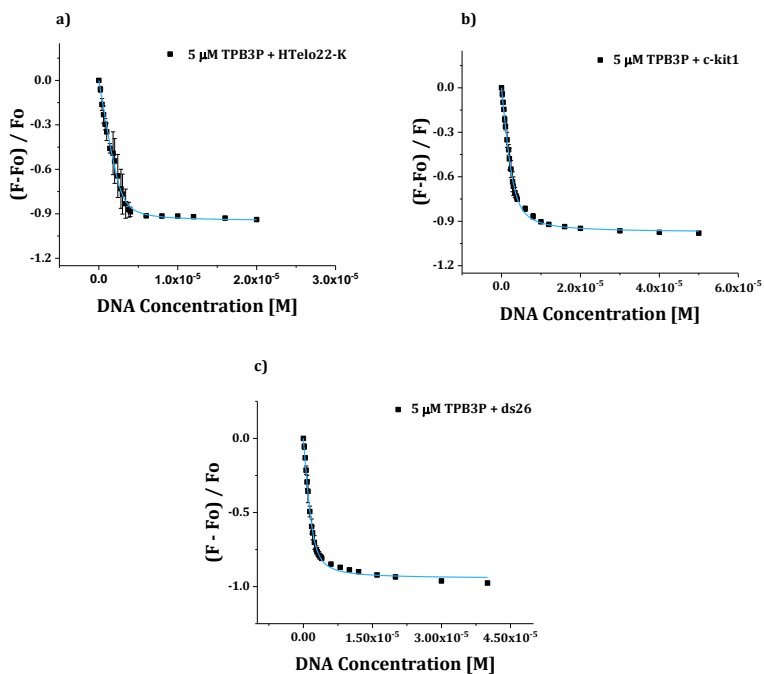


Figure App3.22. Plot of $(F_0-F)/F_0$ vs DNA concentration for TPB3P titrations with different DNA topologies, showing the corresponding fitted curves (a) HTelo22-K, b) c-kit1 and c) ds26.)

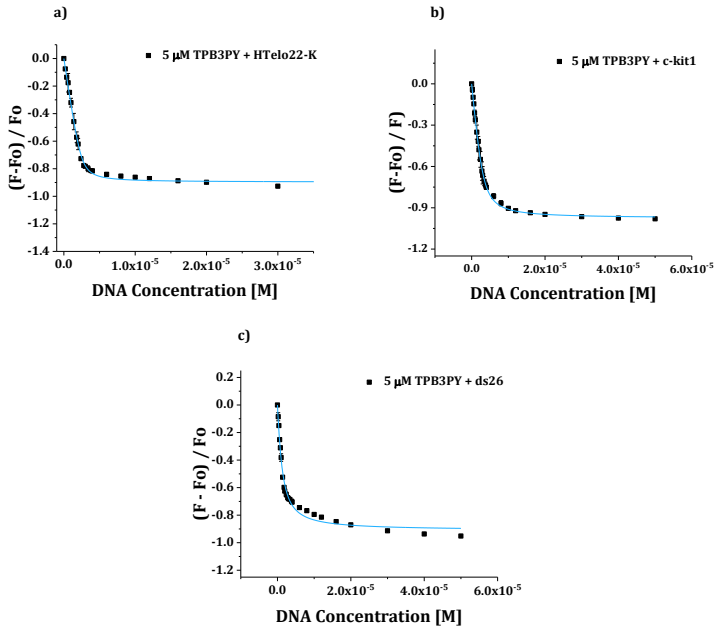


Figure App3.23. Plot of $(F_0-F)/F_0$ vs DNA concentration for TPB3PY titrations with different DNA topologies, showing the corresponding fitted curves (a) HTelo22-K, b) c-kit1 and c) ds26.)

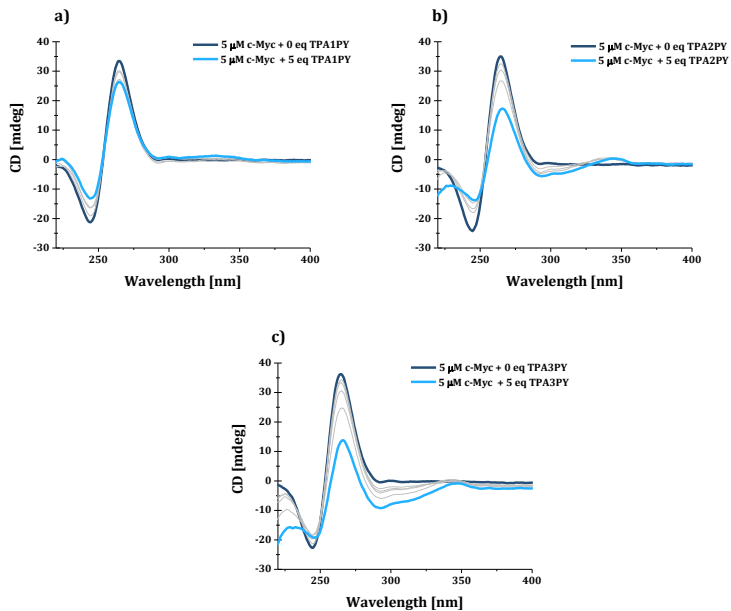


Figure App3.24. CD Titrations of c-Myc with a) TPA1PY, b) TPA2PY and c) TPA3PY.

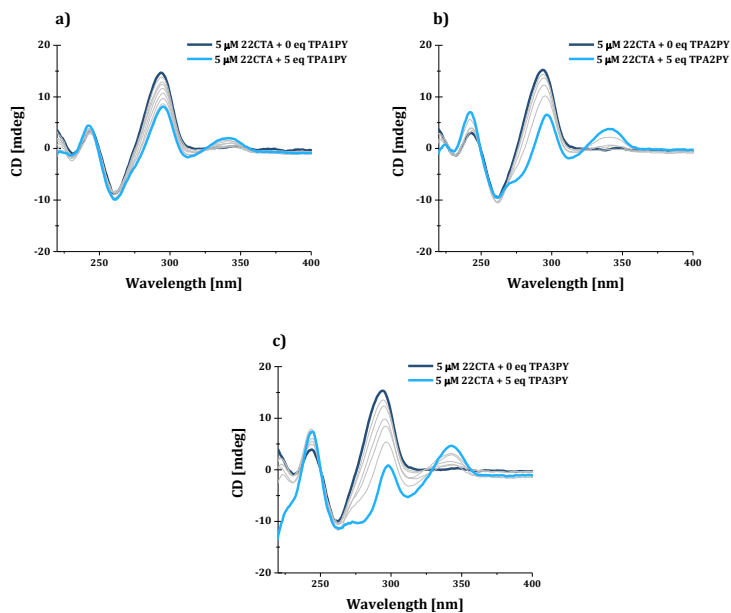


Figure App3.25. CD Titrations of 22CTA with a) TPA1PY, b) TPA2PY and c) TPA3PY.

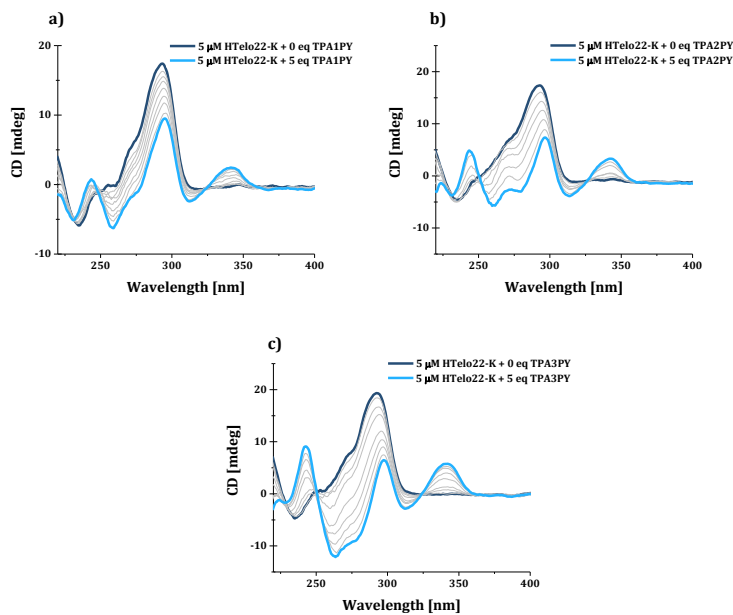


Figure App3.26. CD Titrations of HTelo22-K with a) TPA1PY, b) TPA2PY and c) TPA3PY.

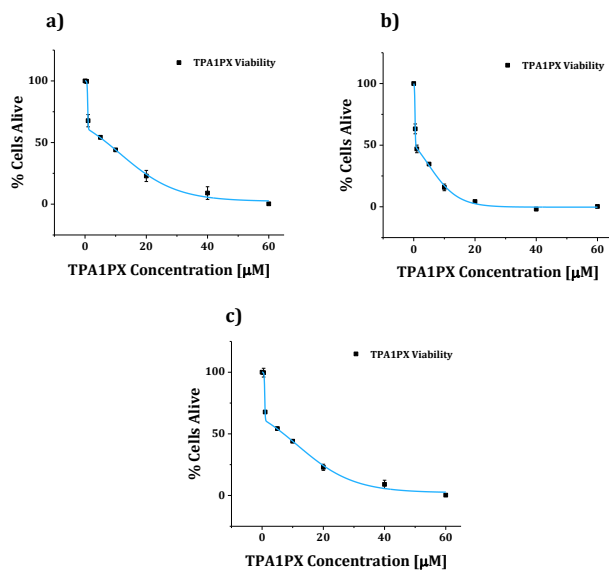


Figure App4.1. Percentage of TPA1PX cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

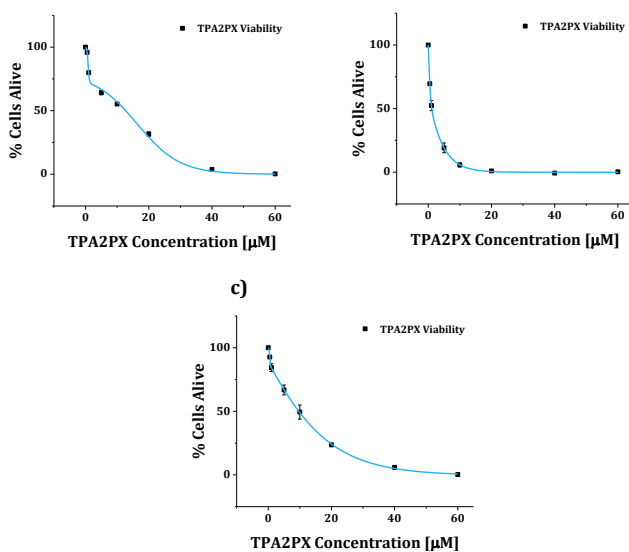


Figure App4.2. Percentage of TPA2PX cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

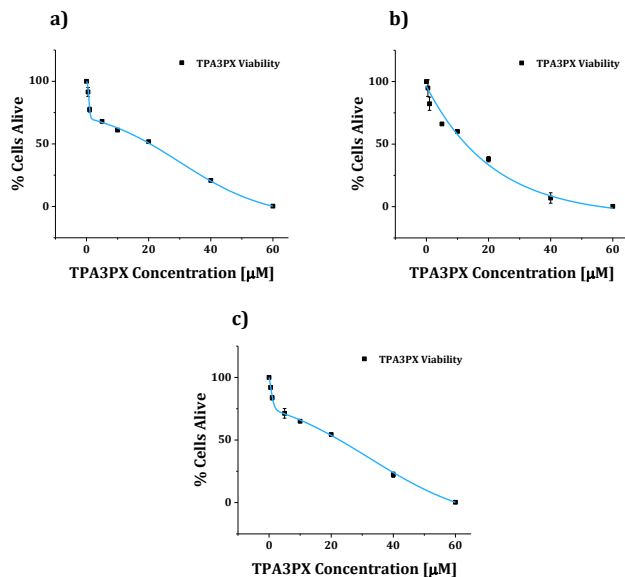


Figure App4.3. Percentage of TPA3PX cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

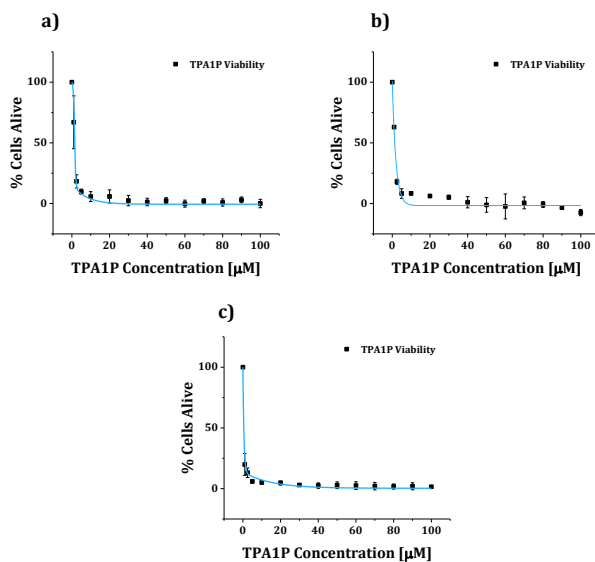


Figure App4.4. Percentage of TPA1P cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

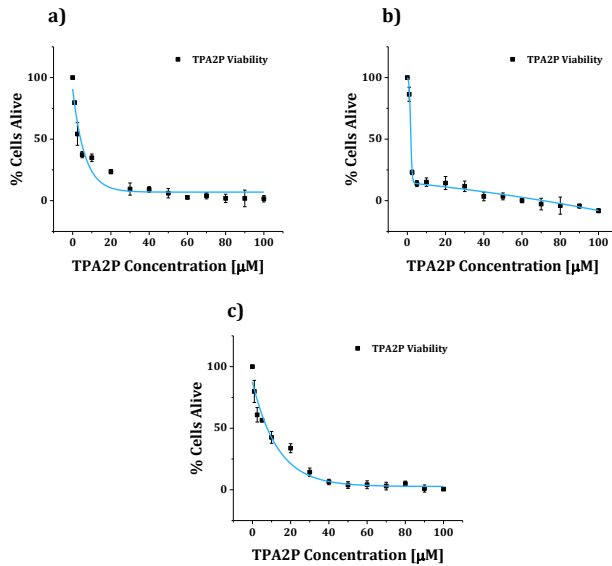


Figure App4.5. Percentage of TPA2P cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

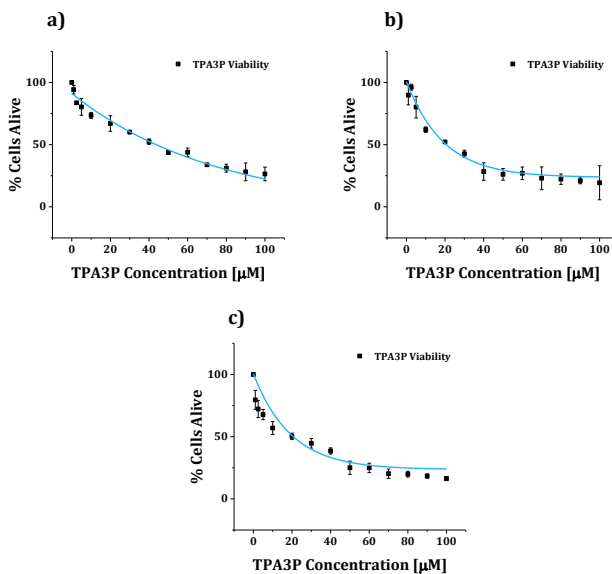


Figure App4.6. Percentage of TPA3P cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

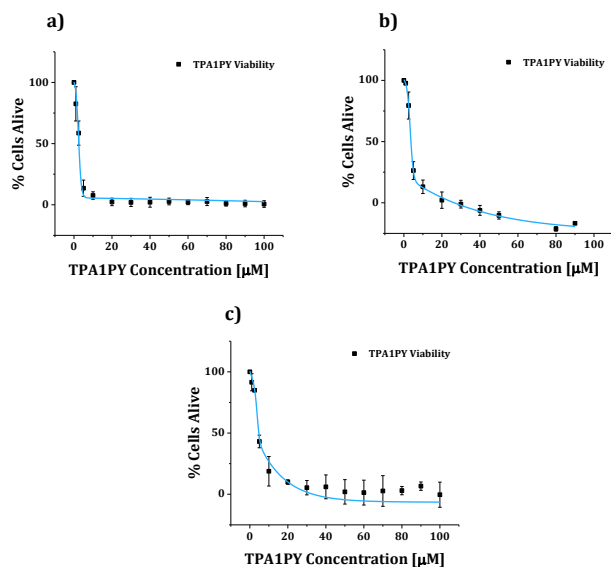


Figure App4.7. Percentage of TPA1PY cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

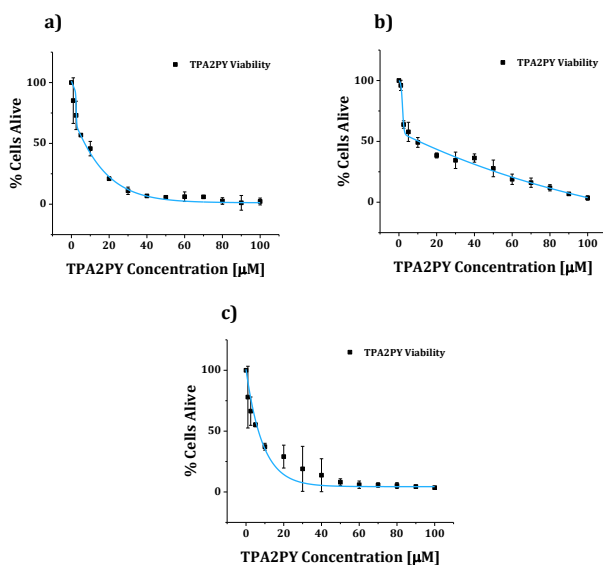


Figure App4.8. Percentage of TPA2PY cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

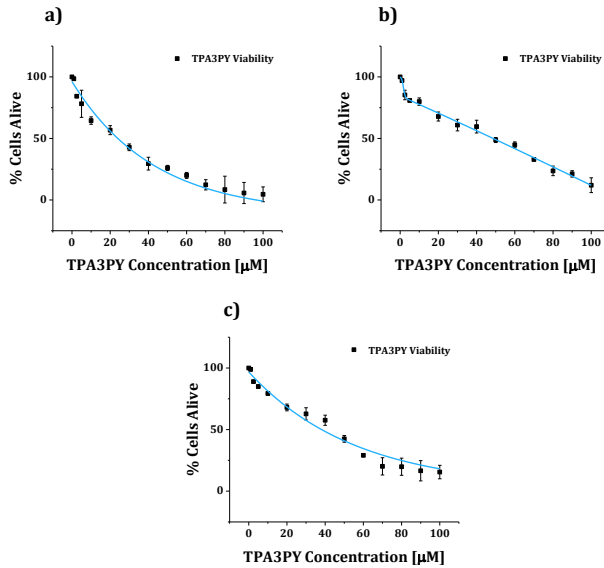


Figure App4.9. Percentage of TPA3PY cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC₅₀ value was calculated from the data fitting.

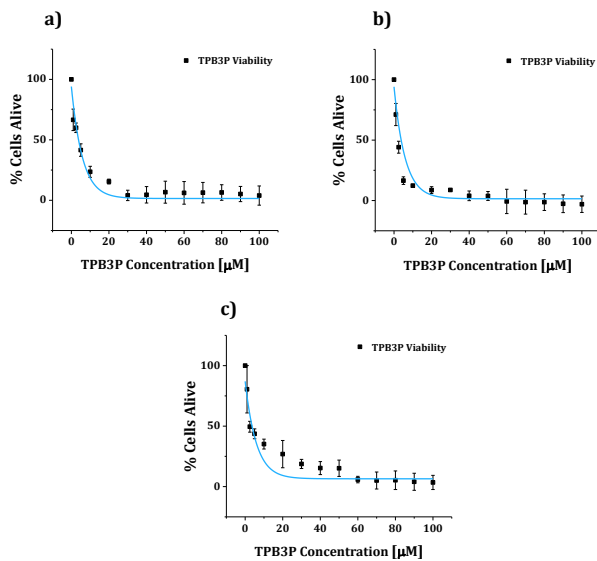


Figure App4.10. Percentage of TPB3P cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC₅₀ value was calculated from the data fitting.

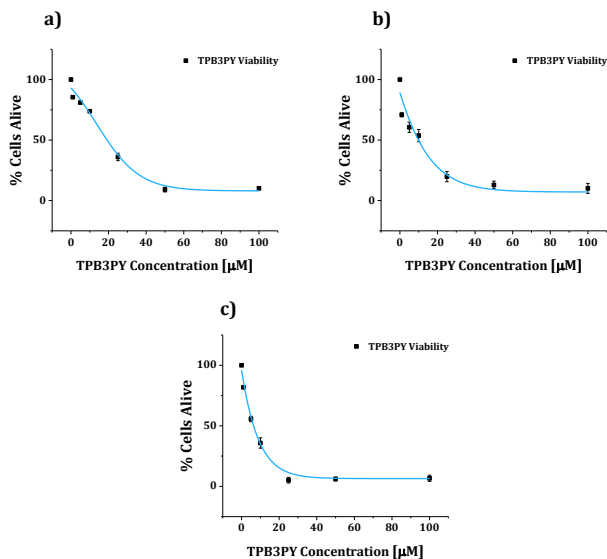


Figure App4.11. Percentage of TPB3PY cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC₅₀ value was calculated from the data fitting.

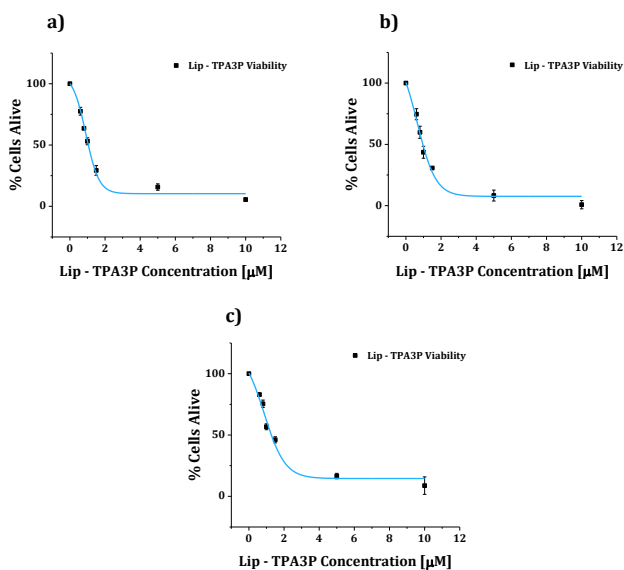


Figure App4.12. Percentage of Lip - TPA3P cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC₅₀ value was calculated from the data fitting.

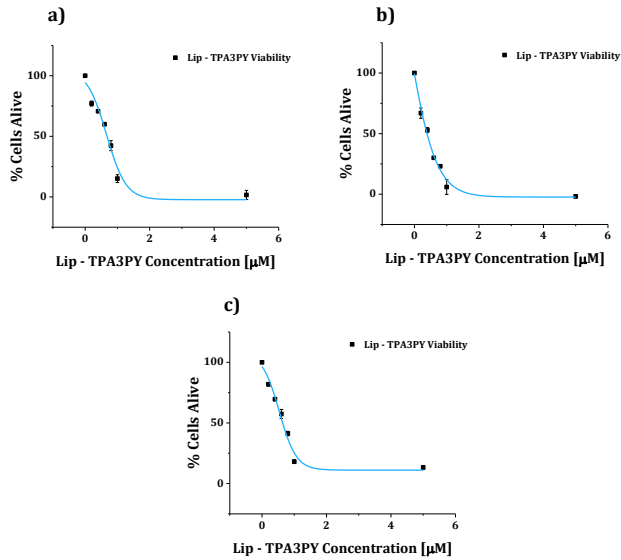


Figure App4.13. Percentage of Lip - TPA3PY cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

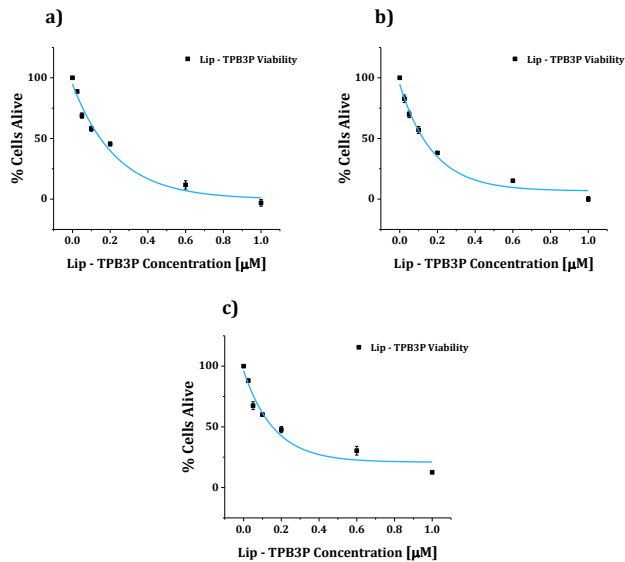


Figure App4.14. Percentage of Lip - TPB3P cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

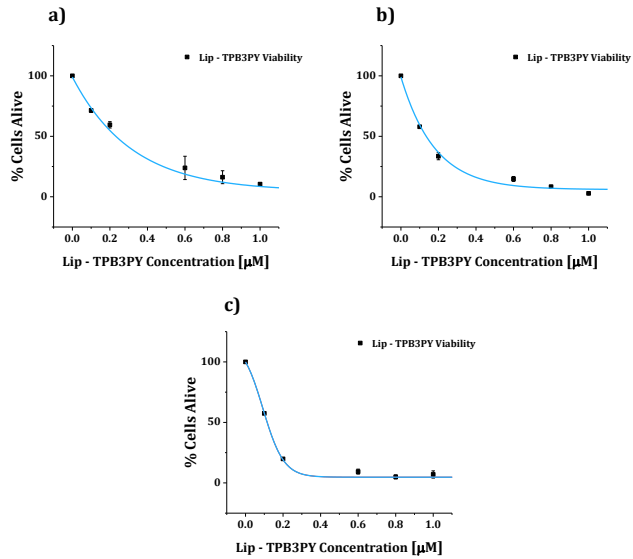


Figure App4.15. Percentage of Lip - TPB3PY cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC₅₀ value was calculated from the data fitting.

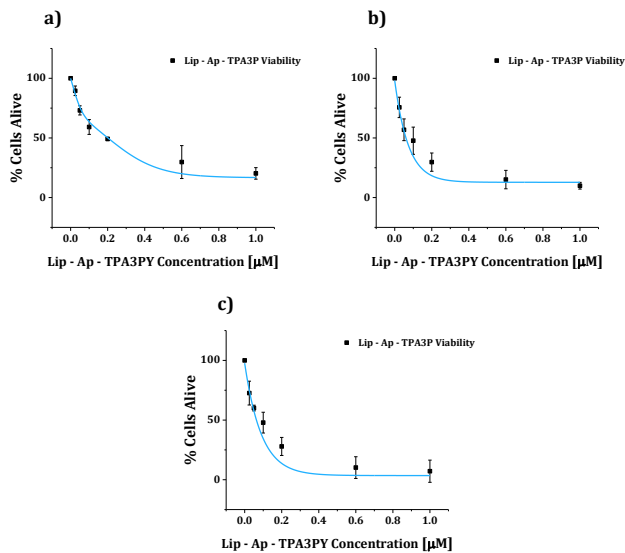


Figure App4.16. Percentage of Lip - Ap - TPA3P cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC₅₀ value was calculated from the data fitting.

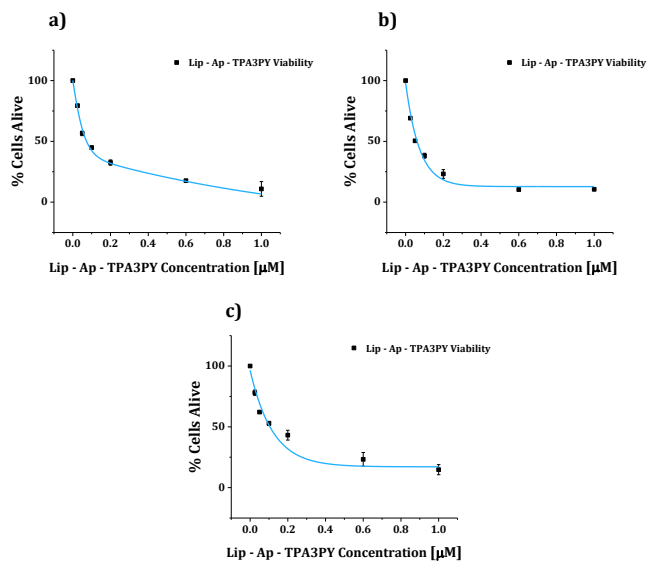


Figure App4.17. Percentage of Lip - Ap - TPA3PY cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

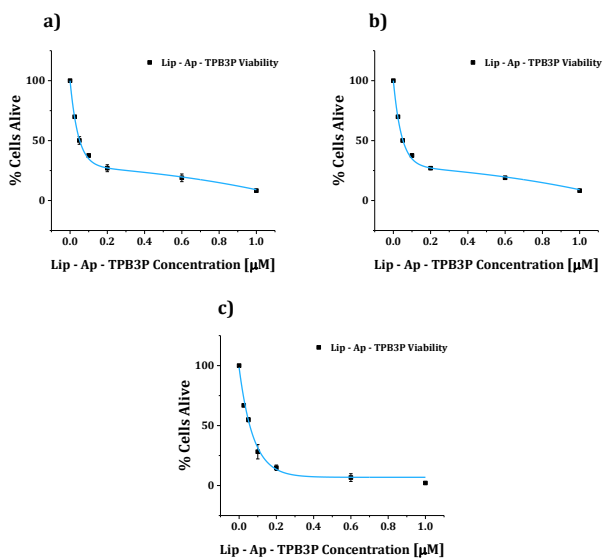


Figure App4.18. Percentage of Lip - Ap - TPB3P cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

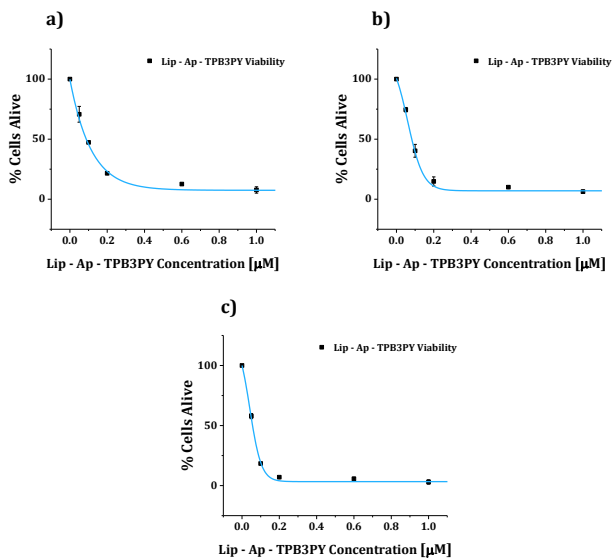


Figure App4.19. Percentage of Lip - Ap - TPB3P cell viability from duplicated MTT assays performed with a) LN229, b) MCF-7 and c) HeLa cell lines. The IC_{50} value was calculated from the data fitting.

- I. Pont, J. González-García, M. Inclán, M. Reynolds, E. Delgado-Pinar, M. T. Albelda, R. Vilar, E. García-España, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 10850–10858.

Fluorescent Probes | Hot Paper |

Aza-Macrocyclic Triphenylamine Ligands for G-Quadruplex Recognition

Isabel Pont,^[a, b] Jorge González-García,^{*[a, b]} Mario Inclán,^[a] Matthew Reynolds,^[b] Estefanía Delgado-Pinar,^[a] M. Teresa Albelda,^[a, c] Ramon Vilar,^{*[b]} and Enrique García-España^{*[a]}

Dedicated to Professor Juan Faus Payá

Abstract: A new series of triphenylamine-based ligands with one (TPA1PY), two (TPA2PY) or three pendant aza-macrocycle(s) (TPA3PY) has been synthesised and studied by means of pH-metric titrations, UV/Vis spectroscopy and fluorescence experiments. The affinity of these ligands for G-quadruplex (G4) DNA and the selectivity they show for G4s over duplex DNA were investigated by Förster resonance energy transfer (FRET) melting assays, fluorimetric titrations and circular dichroism spectroscopy.

Interestingly, the interactions of the bi- and especially the tri-branched ligands with G4s lead to a very intense redshifted fluorescence emission band that may be associated with intermolecular aggregation between the molecule and DNA. This light-up effect allows the application of the ligands as fluorescence probes to selectively detect G4s.

Introduction

In addition to the canonical double-stranded DNA structure, a number of other alternative nucleic acid structures are known, for example, triplexes, i-motifs, three-way junctions, Holliday junctions and G-quadruplexes (G4s).^[1] G4s are formed from stacks of two or more planar guanine tetrads arising from a hydrogen-bonding network of four guanines assembled and stabilised by alkali metal cations (Figure 1).^[2]

A large number of putative G-quadruplex forming sequences (over 700 000) have been identified in vitro in the human genome.^[3] These G4 DNA-forming sequences can be found in telomeres, promoter regions of various oncogenes, introns and immunoglobulin switch regions.^[4] There is mounting evidence to suggest that these non-canonical DNA secondary structures

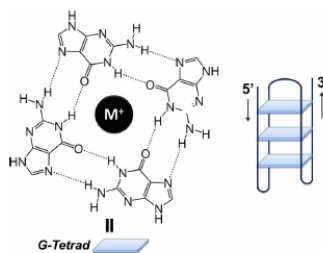


Figure 1. Schematic representation of the G-quadruplex.

[a] I. Pont, Dr. J. González-García, Dr. M. Inclán, Dr. E. Delgado-Pinar, Dr. M. T. Albelda, Prof. E. García-España
Department of Inorganic Chemistry, Institute of Molecular Science
University of Valencia
Catedrático José Beltrán 2, 46100 Paterna (Spain)
E-mail: jorge.gonzalez@uv.es
enrique.garcia-es@uv.es

[b] I. Pont, Dr. J. González-García, Dr. M. Reynolds, Prof. R. Vilar
Department of Chemistry, Imperial College London
London SW7 2AZ (UK)
E-mail: rvilar@imperial.ac.uk

[c] Dr. M. T. Albelda
GIB2030, Grupo de Investigación Biomédica en Imagen
IIS La Fe, Valencia (Spain)

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:
<https://doi.org/10.1002/chem.201802077>.

play a pivotal role in key biological processes.^[5] Consequently, G4s have been identified as potential targets for therapeutic intervention by using small molecules.^[6]

The design of G4 DNA binders largely relies on the presence of π -delocalised extended rings (which can display strong π - π interactions with the G-tetrads) and positively charged substituents, which increase their affinity towards DNA through interactions with the negatively charged phosphate backbone and the nucleobases.^[7]

The most studied G4 DNA structures to date are those found in the human telomere^[8] and in the promoter regions of various oncogenes, such as *c-kit*,^[9] *Bcl-2*,^[10] *k-RAS*^[11] and *VEGF*.^[12] More recently, there has been significant interest in the G4s formed in RNAs, such as TERRA.^[13] Although all these

Agraïments

Podríem comparar la realització d'una tesi doctoral a un passeig per un camp de roses, una dicotomia agradable i perillosa, alhora bonica i plena d'espines. Així doncs, no puc dir que sempre haja sigut fàcil, és més, he necessitat molta ajuda al llarg d'aquest camí. Per aquest motiu, abans de posar-ne el punt i final, m'agradaria dedicar unes paraules d'agraïment a totes aquelles persones que, d'una manera o altra, han contribuït a fer d'aquest, un camí més planer.

En primer lloc, vull donar les gràcies als meus directors de tesi, Enrique García-España, Jorge Gonzalez i M. Teresa Albelda, per oferir-me l'oportunitat de treballar al grup de Química Supramolecular de la Universitat de València, pels seus consells i per totes les hores que han dedicat a ensenyar-me com funciona el món de la investigació.

A tots els companys de laboratori de Supramol, no tan sols per la seua ajuda, sinó també per fer interessant i especial cada dia de treball al laboratori. Gràcies Fany, per guiar-me durant els primers anys al grup. Gràcies Alberto, pels moments compartits a la peixera. Gràcies Lluís, per ser el millor compi de congressos. Gràcies Cristina, per compartir amb mi dies interminables a cultius i per ensenyar-me que encara que no ho sembla, l'esforç sempre paga la pena. Gràcies Àlvar, tu has sigut el meu company i amic a la batalla, perquè no tot en la vida és feina i per ensenyar-me que les penes amb una cervesa, són més lleugeres.

També volia agrair al Prof. Ramon Vilar i a tot el seu grup per haver-me acollit en Londres i haver-me possibilitat conèixer com funciona el món científic fora del nostre país. Gràcies Viktoria i Carmen, les meues alemanyes. Vosaltres vau fer de l'estada no sols una experiència enriquidora científicament, sinó també una experiència vital que hem va ensenyar a veure el món des d'un altre prisma.

A tots els tècnics i personal administratiu de la Universitat de València, que amb el seu treball i dedicació han contribuït al desenvolupament d'aquesta tesi. Gràcies a Enric i a Rafa de microscòpia, per totes les hores dedicades a la busca i captura de liposomes. Gràcies a les xiques de cultius, per estar sempre disposades a ajudar. Gràcies a Salomé, no sols pels seus consells, sinó per ensenyar-me que preocupar-se és la feina prèvia a ocupar-se.

Gràcies a tota la meua família, per estar al meu costat des de molt abans de l'inici d'aquesta etapa. A mon tio Pepe i ma tia Rosita, per a mi, heu sigut els meus segons pares. A Mariajo, més germana que cosina. També done les gràcies a la Cuqui i a la Xix, que tot i que han sigut companyes canines, la seua companyia ha inundat d'alegria els meus dies.

Als meus pares, sense ells, res hauria sigut possible, gràcies a vosaltres sóc qui sóc avui dia. A mon pare, per sembrar les arrels del camí. A ma mare, per ajudar-me a maurar durant el recorregut i ensenyar-me la doble cara de la vida.

He d'afegir que he tingut la sort de compartir el passeig per aquest camp de roses amb gairebé in comptables amics. Gràcies Shishi, per ensenyar-me que es millor penedir-se d'haver-ho fet, que de no haver-ho fet. Gràcies Nèstor, el meu bessó de rebot, per tots els moments que em compartit i sobretot, per demostrar-me que l'amistat verdadera pot amb la distancia i amb el temps. Gràcies Viajero, les teues notetes, detalls i graciets, així com la teua visió particular del món han donat color als meus dies. Gràcies Verin, pel teu recolzament incondicional. Des del primer any de carrera hem caminat juntes, i poquet a poquet, com les tortuguetes, ho aconseguirem. *Eres mi persona.*

Malauradament, he de dir que aquest camí a vegades ha estat envoltat d'ombres, pel que en ocasions ha sigut complicat i descoratjador. Però, què és de l'ombra sense llum? Gràcies Patri, la meua wel, el meu sol. La teua llum ha il·luminat totes les meues ombres i m'ha ajudat a ser qui sóc. *You make us one.*

Finalment, gràcies Carlos. Tot va començar la nit d'un concert d'un grup que mai no recorde i va passar tot com solen passar estes coses. Tanmateix, no sé com hauria aconseguit arribar fins ací sense tu, ni tan sols vull imaginar-ho. El que em dones és gairebé cosa de bruixes. Gràcies per contagiar-me les ganes de viure, per arreplegar-me l'ànima dels peus. Per mostrar-me l'altra cara de la lluna. Espere poder explorar amb tu un nou camí, ple de llum i noves sendes. T'estime, del dret i del revés.

