

DISEÑO Y PREPARACIÓN DE ANÁLOGOS ANTITUMORALES DE MILTEFOSINA Y PERIFOSINA

IGNACIO ENRIQUE TOBAL SALCEDO



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN EVALUACIÓN Y DESARROLLO DE
MEDICAMENTOS
ESPECIALIDAD DE DISEÑO

TUTORES

DRA. MARÍA ÁNGELES CASTRO GONZÁLEZ Y DR. ISIDRO SÁNCHEZ MARCOS

2016

**DISEÑO Y PREPARACIÓN DE ANÁLOGOS
ANTITUMORALES DE MILTEFOSINA Y
PERIFOSINA**



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Índice

Abreviaturas y acrónimos	I
Resumen.....	III
1. Introducción y antecedentes	1
2. Objetivos.....	10
3. Metodología.....	11
3.1. Instrumentación	11
3.2. Técnicas generales cromatográficas	12
3.3. Purificación de reactivos y disolventes	13
4. Desarrollo experimental.....	14
5. Discusión de resultados	28
Síntesis de análogos de miltefosina, 5	
5.1. Síntesis de miltefosina insaturada, 13	28
5.2. Síntesis de análogos yodados de miltefosina: 14 y 16	29
5.3. Aproximación sintética del análogo fluorescente 18	34
Síntesis de análogos de perifosina, 6	
5.4. Aproximación sintética del análogo yodado 22 e insaturado 20	36
6. Conclusiones.....	40
7. Bibliografía.....	41
Anexo I. Espectroscopía	44
Anexo II. Índice de moléculas	52

Ac: Acetilo.

AcOEt: Acetato de etilo.

AcOH: Ácido acético.

AEL: *Alkyl Ether Lipid*.

AEP: *Alkyl Ether Phospholipid*.

Akt: Proteína quinasa B.

Apaf-1: *Apoptosis Protease-Activating Factor-1*.

APC: *AlkylPhosphoCholine*.

APCI: *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*.

ATL: *AntiTumoral Lipid*.

Bax: *Bcl-2 like protein-4*. Proteína reguladora de apoptosis.

Bcl-2: *B-cell lymphoma-2*.

BODIPY: *BOron-DIPYrrromethene*.

CC: Cromatografía en Columna.

CMC: Concentración Micelar Crítica.

ChTsO: Tosilato de colina.

CuTC: Tiofeno-2-carboxilato de cobre (I).

δ : Desplazamiento químico.

d: doblete (RMN).

DD: Dominio de muerte (*Death Domain*).

DEPT: Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer.

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte (*Death Inductor Signaling Complex*).

DMF: *N,N*-dimetilformamida.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

ESI-HRMS: Espectrometría de masas (MS) de alta resolución (HR) con ionización por Electro spray (ESI).

Et: Etilo.

EtOH: Etanol.

FADD: *Fas-Associated protein with Death Domain*.

Fas/CD95: Receptor de muerte Fas/Cluster de Diferenciación 95.

FasL: Ligando del receptor Fas/CD95.

Hex: *n*-Hexano.

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation.

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation.

IR: Infrarrojo.

MeOH: Metanol.

mTOR: *Mammalian Target Of Rapamycin*.

NMO: *N*-óxido de *N*-metilmorfolina.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

Pir: Piridina.

PDK: Quinasa dependiente de fosfatidilinositol-3-fosfato.

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa.

PIP2: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.

PIP3: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato.

PC: Fosfocolina.

q: cuartete (RMN).

quin: quintuplete (RMN).

R_r: Factor de retención (cromatografía).

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

s: singulete; s.a. singulete ancho (RMN).

SAR: *Structure-Activity Relationship*.

sept: septuplete (RMN).

t: triplete (RMN).

T^a: Temperatura.

T_r: Temperatura de fusión.

t.a.: temperatura ambiente.

TADDOL: (4*S*,5*S*)-2,2-Dimetil- $\alpha,\alpha,\alpha',\alpha'$ -tetraphenyldioxolano-4,5-dimetanol.

TLC: *Thin Layer Chromatography*.

TPAP: Perrutenato de tetrapropilamonio.

TPS: Cloruro de 2,4,6-triisopropilbenceno sulfonilo.

Tr: Tritilo (trifenilmetilo).

Ts: Tosilo (*p*-toluensulfonilo).

UV/Vis: Ultravioleta/Visible.

v.o.: Vía oral.

Resumen

El descubrimiento de los lípidos antitumorales (ATLs) sintéticos de la familia de las alquilfosfolinas (APCs) y alquil éter fosfolípidos (AEPs), ha supuesto un importante avance en la búsqueda de fármacos antitumorales. Estos lípidos actúan principalmente a nivel de membrana celular, más concretamente sobre los lípidos *raft*. Aún no se conoce por completo el mecanismo de acción antitumoral, aunque sí se ha observado que estos ATLs inducen cambios estructurales y de composición de los lípidos *raft*, provocando apoptosis mediante múltiples vías de señalización. Esta actividad citotóxica se desarrolla selectivamente sobre las células tumorales. Los AEPs y APCs forman una familia de potenciales fármacos que además de actividad antitumoral, presentan actividad: antiinflamatoria, inmunomoduladora, antibacteriana, antifúngica, antileishmaniosis y otras parasitosis. Entre estos ATLs destacan la perifosina, por ser un potente antitumoral y la miltefosina, por ser la única de su familia en ser comercializada como fármaco ya sea antitumoral o antileishmaniosis. En este trabajo se realiza la síntesis de APCs análogas de miltefosina: insaturada y yodada, además de hacer una aproximación sintética de un análogo de miltefosina fluorescente y de análogos de perifosina yodada e insaturada.

1. Introducción y antecedentes

El cáncer es una de las enfermedades con mayor repercusión en el mundo desarrollado. Según datos de la OMS, en 2012 aparecieron 14 millones de casos nuevos y hubo 8.2 millones de muertes relacionadas con algún tipo de cáncer.¹ Actualmente se conocen más de un centenar de tipos de cáncer, necesiéndose comprender a nivel molecular los procesos cancerosos para así desarrollar fármacos de mayor eficacia y selectividad.

Con el descubrimiento del primer lisofosfolípido sintético en la década de 1960,² se abrió una nueva posibilidad en la quimioterapia del cáncer al revelar que ejercían acción antitumoral mediante un mecanismo de acción donde se produce interacción lisofosfolípido-membrana,³ a diferencia de los agentes antitumorales clásicos que tienen como diana el DNA o la tubulina.

Desde la síntesis del primer lisofosfolípido (Figura 1), también denominados lisolecitinas, se han desarrollado un gran número de análogos y derivados a fin de mejorar sus propiedades físico-químicas y farmacológicas como la actividad, selectividad, aspectos farmacocinéticos y toxicidad.⁴

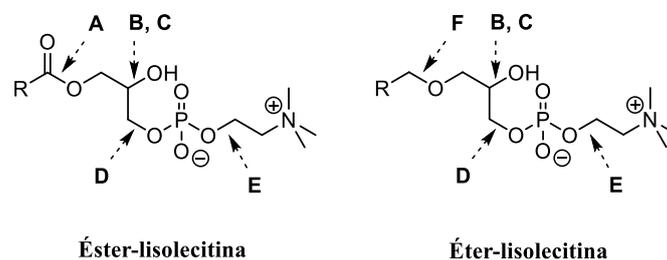


Figura 1. Estructura general de un lisofosfolípido con cadena lipídica unida con enlace éster o éter. Pueden ser degradados por acción enzimática: **A)** fosfolipasa A₁; **B)** aciltransferasa; **C)** transesterasa; **D)** fosfolipasa C; **E)** fosfolipasa D; **F)** O-alkilglicerol monooxigenasa.

Los primeros lisofosfolípidos sintéticos (Figura 2) presentaban una elevada inestabilidad metabólica debido a la acción de las fosfolipasas y otros enzimas que liberaban el ácido graso y las unidades de glicerol y fosfocolina, como **1**. Por ello se substituyó el enlace éster por un enlace éter en la unión cadena lipídica-glicerol, como la lisofosfatidilcolina **2**, con lo que se lograba diferenciar estructuralmente a los miembros de la familia de origen sintético de los naturales y resultando así el primer éter lipídico antitumoral (AEL), **2**, con mayor estabilidad metabólica.⁴

El grupo hidroxilo libre en la posición C2 del glicerol, posibilita la acción enzimática de transesterasa y aciltransferasa que habilitan la migración de la cadena lipídica de C1 a

C2 del glicerol. El enzima O-alkilglicerol monooxigenasa, introduce una función hidroxilo en C1 de la cadena alquílica (AEPs). Para aumentar la estabilidad metabólica, se sintetizó el derivado con función metoxilo en C2 del glicerol, denominado edelfosina **3**, que debido a sus prometedoras propiedades se reconoció como prototipo de los AEPs y ha sido ampliamente investigado desde su descubrimiento. Posteriormente en la década de 1980, se sintetizó la primera alquilfosfocolina (APC), la miltefosina o hexadecilfosfocolina, **5**, prototipo de las APCs, donde se ha suprimido la unidad de glicerol. Se observó que se mantenía la actividad biológica como antitumoral y se mejoraban aspectos de selectividad frente a células tumorales, mejora en parámetros farmacocinéticos a la vez que se obtenía un fármaco de estructura más sencilla. En los últimos años, se han sintetizado otros derivados en los que se ha elongado la cadena lipídica, formando la tercera generación. Entre estos análogos de cadena larga, se encuentran con cadenas de C-22 la erucilfosfocolina, **7**, y la erufosina **8**, esta última con una hidroxilamina análoga de la colina.

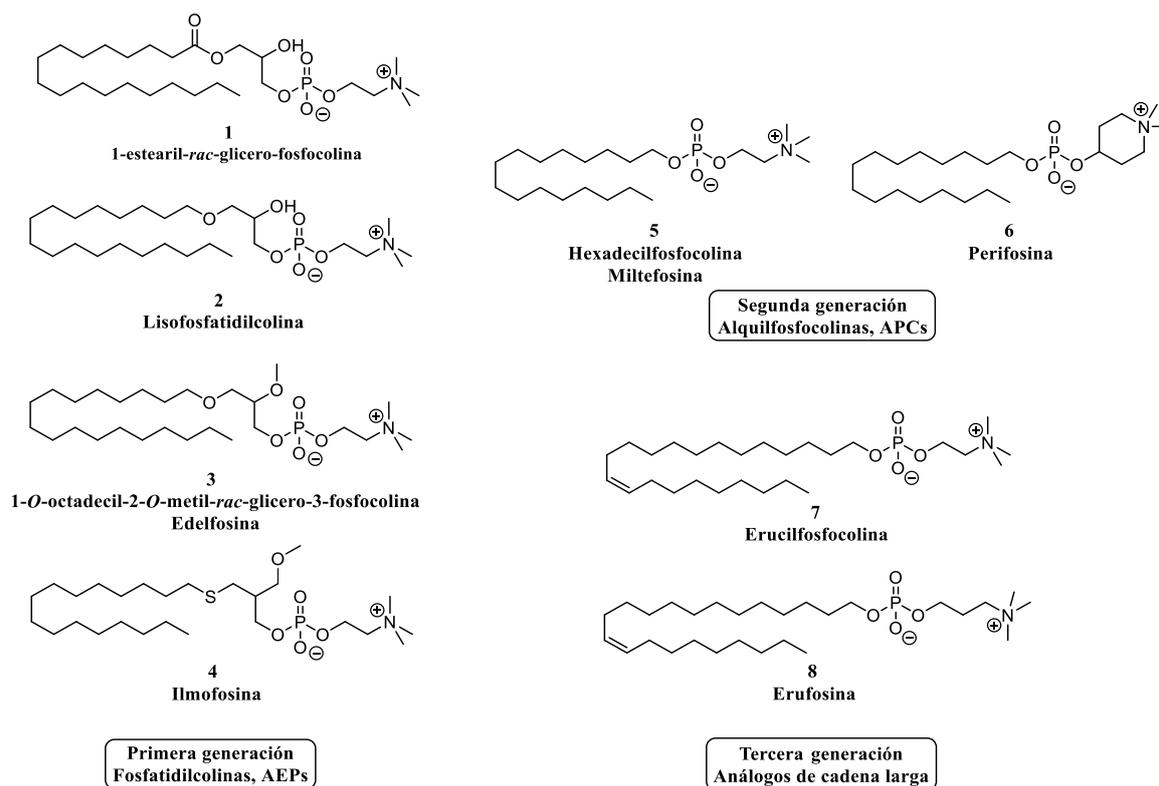


Figura 2. Evolución de los alquil éteres lipídicos y fosfocolinas. **Primera generación:** fosfatidilcolinas con enlace éster y posteriormente mejoradas con enlace éter (alquil éteres fosfolípidos). **Segunda generación:** unión directa de un alcohol graso con la unidad de fosfocolina, eliminando el glicerol, estructuralmente más simples. **Tercera generación:** con cadenas alquílicas de mayor longitud.

La edelfosina, **3** (Figura 2), presenta actividad antitumoral mediante la activación de rutas proapoptóticas. Esta acción citotóxica tiene un alto grado de selectividad sobre las células tumorales frente a las sanas, aunque presenta toxicidad gastrointestinal y capacidad hemolítica, que son problemas que limitan la dosis y vías de administración. Estos aspectos tóxicos estimularon la síntesis de análogos y derivados con mejores propiedades como fármaco, aunque no siempre con éxito (como la ilmofosina, **4**). La miltefosina, **5**, supuso una mejora en muchos aspectos respecto de la edelfosina, **3**, pero presenta igualmente capacidad hemolítica y toxicidad gastrointestinal lo que limita la dosis máxima diaria y conlleva una baja actividad antiproliferativa *in vivo*. Al modificar la unidad de colina por el análogo heterocíclico de piperidina como en la perifosina, **6**, se mejora significativamente la estabilidad metabólica y actividad antitumoral, aunque la toxicidad se mantiene semejante a la miltefosina, **5**. Los análogos de tercera generación erucilfosfocolina **7** y erufosina **8**, reducen la actividad hemolítica, lo que hace posible una administración intravenosa.

La capacidad hemolítica de esta serie de compuestos está directamente relacionada con su facilidad para formar micelas.⁵ Elevando la CMC (Concentración Micelar Crítica) de los lisofosfolípidos, derivados y análogos, se logra disminuir el potencial hemolítico, tal y como ocurre con la erucilfosfocolina, **7**, y erufosina, **8**, que forman en disoluciones acuosas estructuras laminares tipo empalizada preferentemente a micelas.

Las APCs y AEPs de forma análoga a los lisofosfolípidos de origen natural, poseen carácter de zwitterión y anfipático, presentan capacidad para emulsionar las grasas como los lisofosfolípidos naturales. También, por su estructura semejante a los fosfolípidos de membrana, tienen afinidad por las membranas pudiéndose incorporar a las mismas y promover mecanismos determinantes de su actividad biológica.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha trabajado en el campo de los lípidos antitumorales sintéticos análogos de edelfosina, **3**, (Figura 3). Se ha realizado la síntesis del lisofosfolípido **2**, edelfosina **3**, análogos insaturado (**9**) y yodado (**10-a** y **10-b**); además de haber realizado fosfatidilcolinas bioconjugadas con esqueletos de sesterterpenos obtenidos a partir de ácido *ent*-halímico (**11** y **12**).^{6,7} En la evaluación de las actividades biológicas se ha demostrado que los análogos yodados, **10-a** y **10-b**, mantienen la actividad como antitumorales y se incorporan mejor a las células tumorales; en los bioconjugados, hay un incremento significativo en la actividad antitumoral tanto del furano **11** como en la γ -hidroxibutenolida **12**.

En este trabajo fin de máster se comenzará una nueva línea de investigación realizando análogos de miltefosina, **5**, y perifosina, **6**.

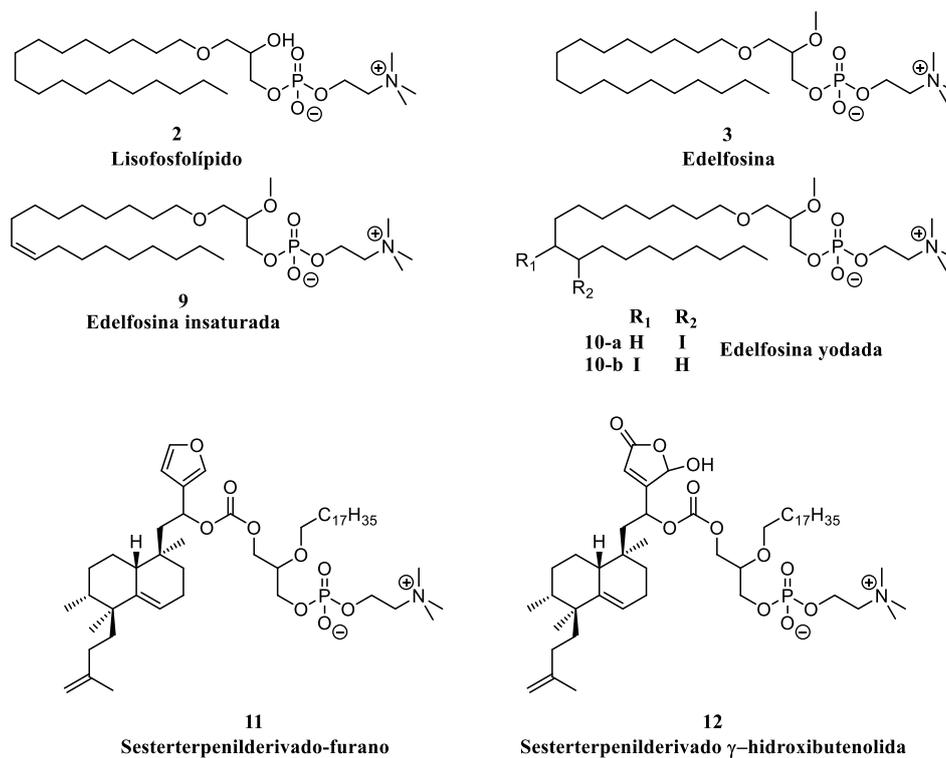


Figura 3. Edelfosina, **3**, fosfatidilcolinas análogos de edelfosina (**2**, **9** y **10**) y bioconjugados de sesterterpenos derivados del ácido *ent*-halímico (**11** y **12**) sintetizados en trabajos anteriores.

Mecanismo de acción antitumoral

Los estudios realizados para elucidar el mecanismo mediante el que los alquil éter fosfolípidos (AEPs) y alquilfosfocolinas (APCs) ejercen la acción antitumoral e inducen apoptosis aún no han revelado la totalidad del complejo mecanismo de actuación. Estos estudios se han realizado predominantemente con la edelfosina, **3**, aunque ensayos recientes demuestran que los demás AEPs y las APCs, parecen inducir la apoptosis mediante el mismo mecanismo.

Como ya se ha dicho anteriormente, las APCs y los AEPs tienen como diana la membrana celular, provocando modificaciones estructurales en ella e induciendo una disrupción de las rutas de señalización de supervivencia celular que terminan con la inducción de la apoptosis. Además de incorporarse a nivel de membrana celular, se ha observado que penetran al interior de la célula y se incorporan a membranas de orgánulos tales como mitocondria y retículo endoplasmático donde producen estrés metabólico y contribuyen a la inducción de la apoptosis.^{8,9} Esta actividad aparece

latente en células normales y se activa en las células tumorales.^{10,11} Esta selectividad junto con la actividad antitumoral con mecanismo de acción a través de la membrana celular, les confiere especial interés desde el punto de vista terapéutico, constituyendo los primeros fármacos que tienen como diana los lípidos *rafts*.¹²

Los lípidos *rafts* (*lipid rafts*) pueden definirse como microdominios de membrana ricos en ceramida, glicosfingolípidos y colesterol que se encuentran en ambas caras de la membrana celular.^{13,14} Se comportan como plataformas o balsas lipídicas que se encuentran en un mar de fosfolípidos desordenados que constituye el resto de la membrana. Estos microdominios de membrana contienen receptores y otras proteínas de membrana que participan en procesos de señalización y transducción de señales a través de la membrana.¹⁵⁻¹⁷ Su función y participación en procesos biológicos está estrechamente relacionada con su composición lipídica y proteica.

Las células tienen mecanismos de señalización para detectar el buen estado y correcto funcionamiento de las rutas metabólicas y orgánulos internos así como del medio que les rodea. Así pues, existen como mecanismos de protección rutas que promueven la muerte de la célula si se detecta un daño celular grave o si se recibe una señal de muerte celular. Tanto los procesos de señalización de supervivencia celular como los de muerte celular están degenerados, complejamente regulados e interrelacionados.

En general, el proceso de apoptosis o muerte celular inducida o programada es un proceso en el que se activa a la familia de proteínas caspasas (*cisteinil-aspartato proteasas*). La activación de las caspasas puede inducirse por dos vías (Figura 4, A y B):

- A. Vía intrínseca o mitocondrial de apoptosis.** Se activa esta vía en respuesta a daños celulares internos graves. Se inhibe la producción de estímulos de supervivencia y se produce un aumento en la permeabilidad mitocondrial. Se liberan proteínas al citosol como citocromo C, encargadas de activar caspasas. El proceso de liberación de citocromo C al citosol está regulado por la familia de proteínas Bcl-2. Libre en el citosol, el citocromo C actúa de cofactor de la procaspasa 9 y forma junto con el factor activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1), el denominado apoptosoma. Este complejo activa a la caspasa 3 e induce apoptosis.¹⁸

B. Vía extrínseca o mediada por receptores de apoptosis. Ruta proapoptótica en la que en respuesta a una señal extracelular, interacciona con un receptor de muerte presente en la membrana, por ejemplo: el ligando FasL interacciona con su receptor Fas/CD95 e induce una secuencia de señalización que conlleva la agregación y formación de un trímero de receptores Fas/CD95, denominado complejo de señalización inductor de muerte o DISC. Este complejo trimérico, permite el acoplamiento de sus dominios intracelulares, denominados dominios de muerte DD (Death Domain), a una proteína FADD (proteína adaptadora de dominios de muerte). El complejo formado, recluta a la procaspasa 8, donde se autoactiva y se libera la caspasa 8, que romperá entre otras proteínas a la procaspasa 3, formando caspasa 3 e induciendo apoptosis.¹⁸⁻²⁰

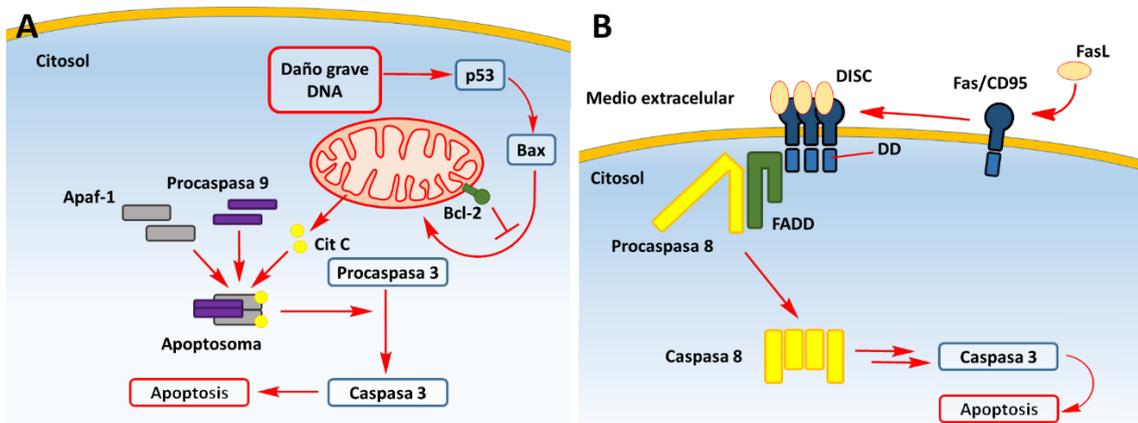


Figura 4. Esquema simplificado de las rutas de inducción de muerte celular: **A)** Vía intrínseca o mitocondrial, daños celulares graves como pueden ser daños mutágenos en DNA, inducen una secuencia de señalización a través de p53 y Bax como mediadores que inhiben a Bcl-2 y liberan a citocromo C al citosol, donde forma un complejo denominado apoptosoma junto con la procaspasa 9 y Apaf-1 que activan la proteína caspasa 3 y se induce apoptosis. **B)** Vía extrínseca, FasL interacciona con Fas/CD95 para formar el complejo DISC, que a través de sus dominios DD intracelulares recluta a FADD y a la proteína procaspasa 8 que terminan con la activación de la caspasa 3 e inducción de apoptosis.

Dentro de los lípidos *raft* se distinguen dos tipos de acuerdo a la mayor o menor presencia de ceramida o colesterol: lípidos *rafts* ricos en colesterol que participan en procesos de señalización y mantenimiento de la homeostasis celular y lípidos *rafts* ricos en ceramida, que participan en procesos proapoptóticos.²¹ Según qué estímulos intra o extracelulares reciba la célula, un lípido *raft* rico en colesterol puede evolucionar y convertirse en un *raft* rico en ceramida, modificar su composición proteica y facilitar la activación de señales en cascadas de transducción y señalización haciendo que la célula

induzca apoptosis o supervivencia celular según el estímulo recibido. Así pues, estos microdominios de membrana constituyen una importante localización celular a considerar en el desarrollo de fármacos, ya que están implicados en numerosos procesos de señalización relacionados con receptores del sistema inmune, supervivencia y crecimiento celular y apoptosis.

La incorporación de las APCs y AEPs en los lípidos *raft* induce cambios estructurales y de composición que modifican la señalización y regulación de supervivencia y muerte celular, induciendo apoptosis tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca. En la Figura 5 se indican estas variaciones inducidas por los ATLS. En la parte superior de la figura, se muestra la ruta de señalización de supervivencia celular PI3K/Akt que transcurre con participación del lípido *raft*.²² Esta ruta de supervivencia comienza con la activación de PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa), lo que permite en último término la fosforilación de Akt (proteína quinasa B), con la participación de PIP2/PIP3 (fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato y 3,4,5-trisfosfato) que reclutan a Akt y facilitan su fosforilación (en Ser473 y Thr308) por acción quinasa de PDK1 y mTOR/PDK2. Akt activado por fosforilación, fosforila a sus sustratos e inhiben las rutas proapoptóticas. Al tratar a esa misma célula con ATLS (Figura 5, parte inferior), se incorporan en los lípidos *raft* e inducen un cambio estructural provocando un desacoplamiento de las proteínas que participan en la activación de Akt y en consecuencia se inhibe la ruta de supervivencia PI3K/Akt induciendo apoptosis.²³

Al mismo tiempo, al incorporar los lípidos *raft* a las APCs o AEPs, se induce simultáneamente a lo anteriormente explicado, un desplazamiento y reagrupación del receptor de muerte Fas/CD95 en los lípidos *rafts*, formando un trímero desregulado que induce la apoptosis independientemente de FasL.¹⁹ En consecuencia a esta trimerización de Fas/CD95, se provoca un desplazamiento de canales iónicos de los *rafts* lipídicos. Estos canales iónicos, como el canal de K⁺ SK3, participan en procesos de migración y metástasis tumorales.⁸

Las células tumorales presentan mayor proporción de colesterol y esfingolípidos en los lípidos *rafts* que las células normales²⁴⁻²⁶ con lo que contribuyen al aumento en la capacidad de las células tumorales por la supervivencia y proliferación desregulada.

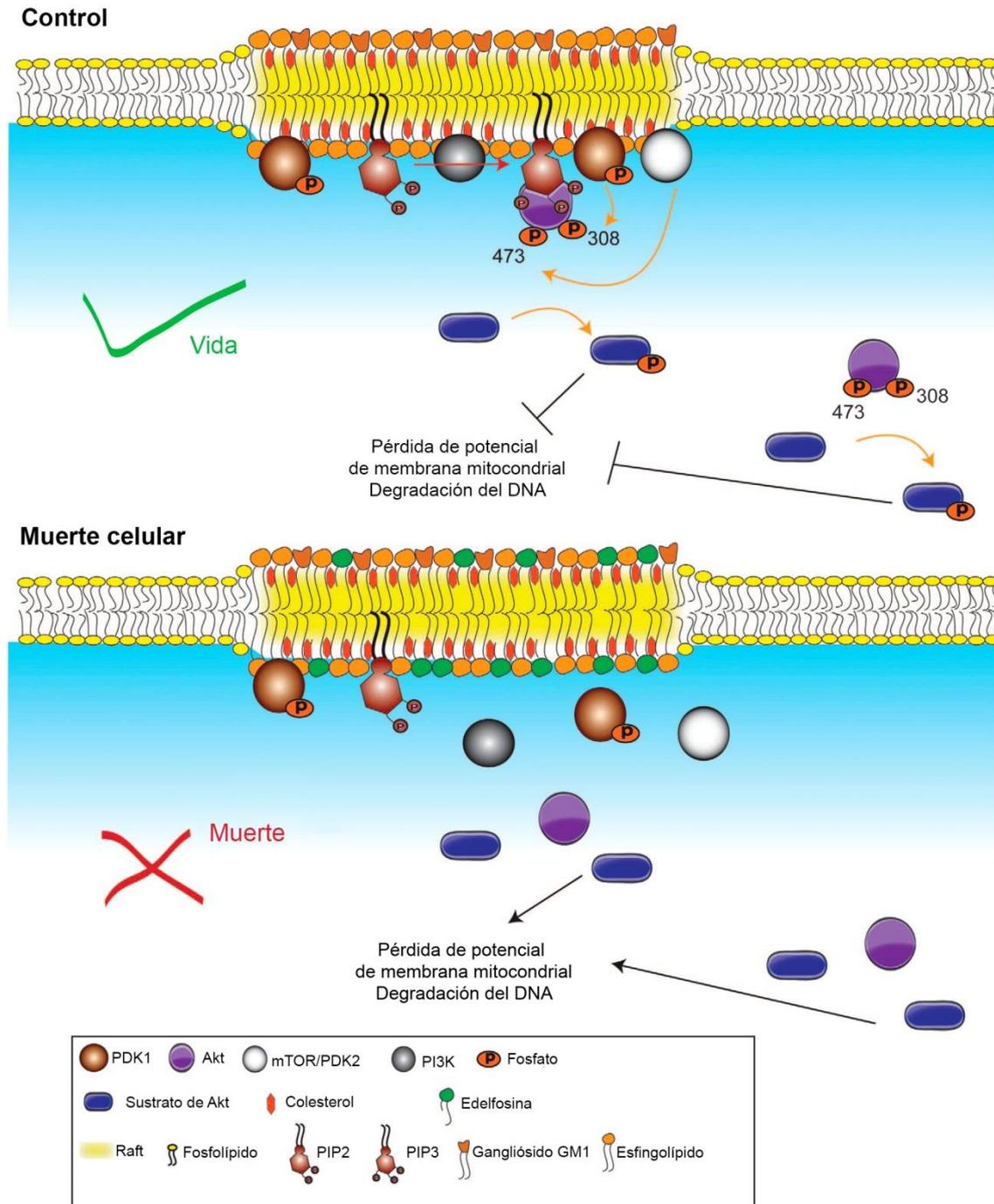


Figura 5. Modelo esquemático de la actuación de los lípidos *rafts* en la señalización de Akt en la regulación de la supervivencia y muerte celular antes y durante el tratamiento con ATL. Imagen traducida de Reis-Sobreiro *et al*, 2013.²³

Perspectivas actuales de los Lípidos Antitumorales (ATLs)

Tanto las APCs como los AEPs presentan un amplio espectro de actividades biológicas, donde influye tanto la longitud de la cadena lipídica (actividad antitumoral favorecida en intervalo C₁₆-C₁₈)²⁷ como la naturaleza de la amina cuaternaria.^{28,29} Además de la actividad como antitumorales, presentan actividad antiinflamatoria, antiparasitaria

contra la leishmaniosis (visceral y cutánea), antifúngica, antibacteriana e inmunomoduladora (pudiendo ser inmunosupresora o inmunoactivadora según la longitud de la cadena lipídica).^{4,30} Es importante destacar que tanto la erucilfosfocolina, **7**, como la erufosina, **8**, son permeables a la barrera hematoencefálica, confiriéndoles un importante atractivo por su potencial aplicación en el tratamiento del glioblastoma.³¹

Se ha realizado un gran número de ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer con diferentes alquilfosfocolinas (APCs): miltefosina, **5**, perifosina, **6**, erufosina, **7** y erucilfosfocolina, **8**.^{4,32,33} Actualmente, siguen realizándose ensayos clínicos con APCs tanto en fase I como en fase II, tanto en monoterapia³⁴ como en terapia combinada.³⁵ La terapia combinada de otros fármacos con las APCs y AEPs suponen un enfoque muy prometedor para el tratamiento del cáncer, entre otras actividades terapéuticas posibles. Al incorporarse estos ATLs en la membrana aumentan su fluidez³⁶ y en consecuencia, se aumenta la permeabilidad del otro fármaco consiguiendo un efecto sinérgico.

A pesar de los numerosos ensayos clínicos realizados con diferentes APCs y AEPs, únicamente la miltefosina, **5**, ha llegado a la comercialización. Se comercializa bajo el nombre de Miltex[®] (vía cutánea) para el tratamiento de metástasis cutáneas en cáncer de mama. Es comercializada como Impavido[®] (vía oral) para el tratamiento de leishmaniosis cutánea y visceral, siendo el único tratamiento oral para la leishmaniosis.⁴ Se comercializa como Milteforan[®] (v.o.) para uso veterinario contra la leishmaniosis.³⁰

La actividad antiparasitaria de la miltefosina, **5**, depende de la especie de *Leishmania* sp. y de la localización geográfica. Se ha observado que la exposición continuada a Impavido[®] (miltefosina, v.o.) induce mecanismos de resistencia y reduce la eficacia como antiparasitario. No obstante, aún sigue siendo el tratamiento de elección para el tratamiento de leishmaniosis cutánea y visceral resistentes a los antiparasitarios clásicos basados en Sb(V).³⁷ Actualmente, las perspectivas en el tratamiento de la leishmaniosis visceral y cutánea consisten en la posibilidad de la terapia combinada de miltefosina, **5**, con otros fármacos como paromomicina, que han demostrado mejorar eficacia, reducir tiempos de tratamiento y coste.

Actualmente, tras obtener resultados prometedores *in vitro*, se plantea mediante el desarrollo de ensayos clínicos la posibilidad de emplear la miltefosina, **5**, para el tratamiento del VIH-1 y para casos de VIH-1 coinfectado con leishmaniosis visceral y otros casos de parasitosis asociada.^{38,39}

2. Objetivos

Este trabajo de fin de máster se encuadra dentro de un proyecto general cuyo objetivo es la síntesis de agentes antitumorales análogos alquifosfolípidos dirigidos a los lípidos *rafts*. Dicho proyecto de I+D+i (SAF2014-59716R)⁴⁰ se realiza en colaboración con el Dr. F. Mollinedo del CIB-CSIC de Madrid. Uno de los objetivos generales del proyecto es la síntesis de análogos (**13-22**) de miltefosina, **5**, y perifosina, **6** (Figura 6), en los que aparece modificada la cadena lipídica. En dicha cadena, se introducen insaturaciones, heteroátomos y fluoróforos (BODIPYs), de este modo se induce fluorescencia en la APC para facilitar el seguimiento en el estudio mecanístico a nivel subcelular y SAR. Los análogos sintetizados se enviarán al CIB-CSIC de Madrid para su evaluación biológica.

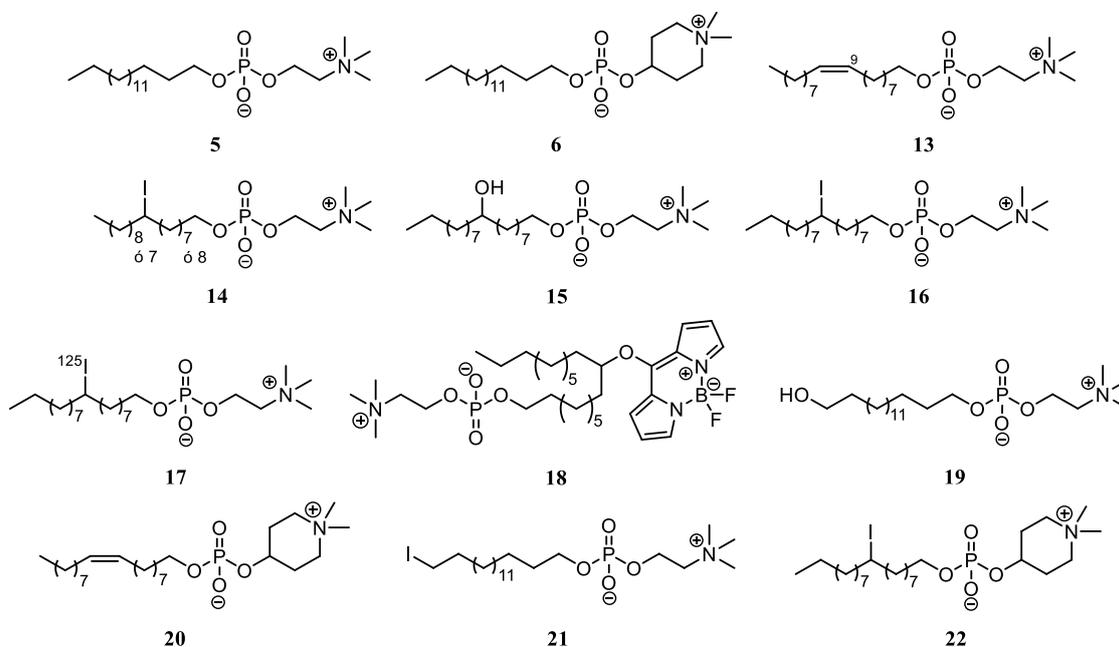


Figura 6

Como objetivo concreto de este trabajo se pretende realizar:

1. Síntesis de análogos de miltefosina, **5**.
 - 1.1. Síntesis de miltefosina insaturada **13**.
 - 1.2. Síntesis de análogos yodados **14** y **16**.
 - 1.3. Aproximación sintética de miltefosina fluorescente, **18**.
2. Síntesis de análogos de perifosina, **6**.
 - 2.1. Aproximación al análogo yodado **22** e insaturado **20**.

3. Metodología

3.1. Instrumentación

3.1.1. Espectroscopía de IR

Se efectúan las medidas de los espectros de IR mediante un espectrofotómetro Shimadzu IR Affinity-1, en película sobre cristales de NaCl.

3.1.2. Puntos de fusión

La determinación del punto de fusión (T_f) se realiza en un microscopio de platina caliente, Kofler, y están sin corregir.

3.1.3. Espectrometría de masas

Las medidas son realizadas por el Servicio General de Espectrometría de Masas de la USAL, llevándose a cabo en un espectrómetro de cuadrupolo-tiempo de vuelo Applied Biosystems QSTAR XL. Dispone de sondas de electrospray, APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) y fotoespray, pudiendo trabajar en modo positivo y negativo. Es capaz de determinar la masa exacta de un compuesto, alta resolución.

3.1.4. Espectroscopía de RMN

Se ha empleado un espectrómetro VARIAN 200 (200 MHz ^1H y 50 MHz ^{13}C) y también un espectrómetro BRUKER AVANCE 400 MHz DRX (400 MHz ^1H y 100 MHz ^{13}C), equipado con una sonda de detección inversa con bobina de gradientes y sonda $^1\text{H}/^{13}\text{C}$. Realizando espectros 1D y 2D para los núcleos de ^1H y ^{13}C .

Como disolvente habitual se ha empleado CDCl_3 , tomándose como referencia respecto al disolvente residual: CHCl_3 (7.26 ppm en ^1H y 77.0 ppm en ^{13}C). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J), en Hz.

La información de la multiplicidad de los carbonos se obtiene aplicando una secuencia de pulsos DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer). Esta secuencia distingue los carbonos primarios, secundarios y terciarios (CH_3 , CH_2 y CH) mediante la aplicación de pulsos de protón a través del desacoplador de 90° y 135° .

Para observar la correlación $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ a un enlace se realizan espectros 2D HMQC y para observar la correlación a dos y tres enlaces $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, se emplean experimentos HMBC.

3.1.5. Espectrofotometría UV/Vis

La medida del espectro de absorción se determina en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-2401PC, con sistema termostático, utilizando cubetas de cuarzo ($l= 1$ cm) por medida de la cantidad de radiación electromagnética absorbida, para un intervalo de longitudes de onda entre 190 nm y 700 nm (λ_{abs}), por una disolución del compuesto en estudio.

3.1.6. Fluorimetría

La determinación del espectro de emisión* se realiza en un fluorímetro Shimadzu RF-5301PC con baño termostático empleando cubeta de cuarzo ($l= 1$ cm) midiendo la cantidad de radiación emitida a 90° del haz de radiación de excitación a una longitud de onda (λ_{Ex}) determinada.

3.2. Técnicas generales cromatográficas

3.2.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina se realiza sobre placas de gel de sílice Merk (60 F254) de 0.2 mm de tamaño de partícula. Se eluyen isocráticamente, generalmente con mezclas de Hex:AcOEt. Una vez eluida, se revela en molibdato amónico, en $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ al 0.05/1 p/v, seguido de calentamiento a 120°C durante unos segundos. Las sustancias que presentan fluorescencia se visualizan por iluminación con luz UV de $\lambda = 254$ nm y $\lambda = 336$ nm antes de ser reveladas.

3.2.2. Cromatografía en columna (CC)

La separación cromatográfica por cromatografía en columna se realiza en columna de vidrio empaquetándola con gel de sílice Merck-60. Se tienen dos tipos de sílice para uso cromatográfico, dependiendo del tamaño de partícula: 0.200-0.063 mm (sílice normal) y 0.063-0.040 mm (sílice flash). La proporción generalmente utilizada es 20 g de gel de sílice por gramo de mezcla a cromatografiar, aunque puede modificarse esta proporción en función de los compuestos a separar. La CC se realiza con gradiente de concentración, generalmente mezclas de Hex:AcOEt, con polaridad creciente. Cada fracción eluida se controla por TLC.

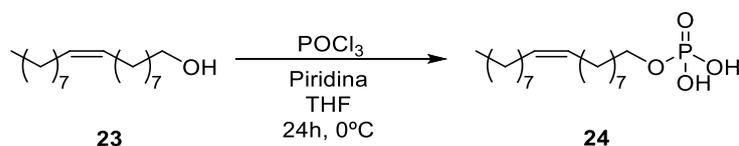
*Se agradece a los Profs. Dr. Emilio Calle Martín y Dr. Julio Casado Linarejos toda la ayuda prestada, tanto por su colaboración como por su disponibilidad para la utilización de los equipos.

3.3. Purificación de reactivos y disolventes

- **Acetona (Me₂CO):** Se calienta a ebullición sobre KMnO₄ y se destila, almacenándose sobre tamiz molecular de 3 Å.
- **Acetonitrilo (CH₃CN):** Destilado sobre CaH₂ y se almacena con tamiz molecular de 3 Å.
- **Benceno (C₆H₆):** Se almacena con Na.
- **Cloroformo (CHCl₃):** Se destila.
- **Diclorometano (CH₂Cl₂):** Se destila sobre CaH₂ bajo atmósfera de Ar.
- **N,N-Dimetilformamida (HCONMe₂, DMF):** Se destila a presión reducida sobre CaH₂ y se almacena con tamiz molecular de 3 Å.
- **Etanol (EtOH):** Se destila sobre Mg y I₂, se almacena sobre tamiz molecular de 3 Å.
- **Éter (Et₂O):** Se calienta a ebullición sobre Na y se destila sobre Na y benzofenona.
- **n-Hexano (C₆H₁₄):** Se destila y almacena con CaCl₂ o Na.
- **Metanol (MeOH):** Se destila sobre Mg y I₂, se almacena sobre tamiz molecular de 3 Å.
- **Oxicloruro de fósforo (POCl₃):** Se destila a presión reducida para cada uso.
- **Piridina (C₅H₅N):** Se destila sobre BaO y almacena con KOH.
- **Tetrahidrofurano (C₄H₈O):** Se calienta a ebullición sobre Na y se destila sobre Na y benzofenona.
- **Tolueno (PhCH₃):** Se almacena con Na.
- **Trietilamina (Et₃N):** Se somete a ebullición sobre CaH₂, se destila y almacena con KOH.

4. Desarrollo experimental

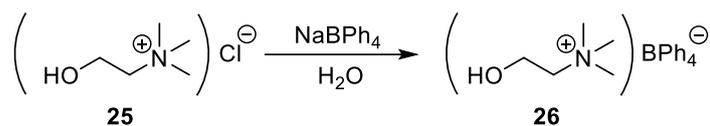
Reacción de alcohol oleico **23** con POCl₃: **24**



A una disolución de 476 mg (1.51 mmol) de alcohol oleico, **23**, en 7.5 ml de THF, se le añaden en frío 0.14 ml de POCl₃ (1.51 mmol) y 0.24 ml de piridina (2.96 mmol). Se deja en agitación a 0°C durante 24 h tras las cuales se añaden 2 ml de disolución acuosa de NaHCO₃ (6%) y se deja agitar durante 15 min, a continuación se añade hielo y se acidula cuidadosamente hasta pH=2 con HCl 2M. La disolución resultante se extrae con AcOEt, se lava con 10 ml de H₂O y se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora hasta sequedad obteniéndose 503 mg de **24** (97%).

(Z)-Octadec-9-en-1-il dihidrogenofosfato (24): IR (película) $\lambda^{-1}/\text{cm}^{-1}$: 3060, 1463, 1223 y 1029. **RMN ¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 5.34 (2H, t, $J= 4.8$ Hz, H-9 y H-10), 4.03-3.81 (2H, m, H-1), 2.02-1.99 (4H, m, H-8 y H-11), 1.8-1.5 (2H, m, H-2), 1.27 (22H, s, H-3 a H-7 y H-12 a H-17), 0.88 (3H, t, $J= 6.7$ Hz, H-18).

Reacción de **25** con NaBPh₄: **26**

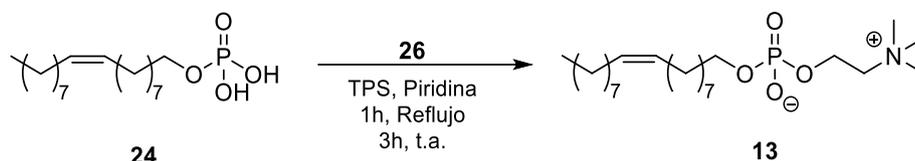


Sobre una disolución de 647 mg (4.62 mmol) de cloruro de colina, **25**, disueltos en 14 ml de H₂O, se añade en agitación continua una disolución de 1.05 g (3.04 mmol) de NaBPh₄ en 14.5 ml de H₂O. Inmediatamente se observa la aparición de unos cristales blancos en el seno de la disolución. El sólido formado se filtra y se lava con H₂O. Los cristales filtrados se redisuelven en PhCH₃:EtOH (1:1) y se evapora a sequedad. Para recrystallizar se disuelve el sólido en la mínima cantidad de CH₃CN y se deja cristalizar a -14°C obteniéndose 1.2 g de **26** (93%).

Tetrafenilborato de colina (26): RMN ¹H (200 MHz, DMSO-D₆) δ/ppm : 7.17-7.15 (H, m, H_{2,6}-Ph₄), 6.91 (H, t, $J= 7.2$ Hz, H_{3,5}-Ph₄), 6.81-6.76 (4H, m, H₄-Ph₄),

5.26 (1H, t, $J= 4.1$ Hz, -OH), 3.81-3.79 (2H, m, -CH₂-OH), 3.40-3.30 (2H, m, $J= 4.9$ Hz, -CH₂-N), 3.08 (9H, s, (CH₃)₃-N-).

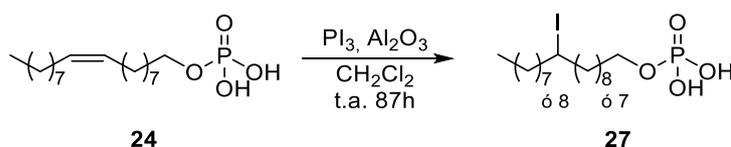
Reacción de 24 con 26: 13



A una disolución de 190 mg (0.55 mmol) de **24** en 4.2 ml de piridina destilada se añaden 238 mg (0.55 mmol) de **26** y 193 mg (0.64 mmol) de TPS. Se calienta a reflujo durante 1 h y posteriormente se deja 3 h a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se adiciona 5 ml de H₂O y se deja agitar 15 min. A continuación se evapora a sequedad y se purifica por cromatografía sobre gel de sílice. Se eluye secuencialmente con CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1), CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5) y con CHCl₃:MeOH:NH₄OH (65:30:5) se obtienen 90 mg de **13** (37%).

(Z)-Octadec-9-en-1-il fosfocolina (13): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 5.37-5.33 (2H, m, H-9 y H-10), 4.29 (2H, m, H-1'), 3.87 (2H, m, H-1), 3.79 (2H, m, H-2'), 3.41 (9H, s, (CH₃)₃N-), 2.10-1.93 (4H, m, H-8 y H-11), 1.57 (2H, m, H-2), 1.26 (22H, m, H-3 a H-7 y H-12 a H-17), 0.86 (3H, t, $J= 5.7$ Hz, H-18). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 129.9 y 129.7 (C-9 y C-10), 65.3 (C-1), 65.2 (C-2'), 58.5 (C-1'), 54.3 ((CH₃)₃N-), 32.1 (C-16), 31.9-29.3 (C-2, 4-8 y 12-15), 25.9 (C-3), 22.6 (C-17), 14.1 (C-18). **ESI-HRMS:** Calculado para C₂₃H₄₈NO₄PNa (M+Na⁺) 456.3219 uma. Observado 456.3197 uma.

Reacción de 24 con PI₃: 27

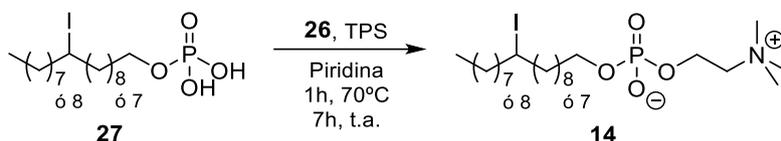


Sobre una disolución de 89 mg (0.26 mmol) de **24** y 210 mg (0.51 mmol) de PI₃ en 3 ml de CH₂Cl₂, se añade Al₂O₃ (593 mg), activada previamente en estufa a 120°C durante al menos 24 h. Se deja la mezcla reaccionar en agitación durante 87 h a temperatura

ambiente. Posteriormente se añade lentamente 2 ml de disolución de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5) y se filtra. La disolución se evapora a sequedad obteniéndose un aceite amarillo; 102 mg de **27** (84%).

9/10-yodo octadecil-1-dihidrogenofosfato (27): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 4.13-4.04 (1H, m, $-\underline{\text{CH}}-\text{I}$), 3.83-3.75 (2H, m, H-1), 1.9-1.6 (4H, m, $-\underline{\text{CH}}_2-\text{CHI}-\underline{\text{CH}}_2-$), 1.6-1.4 (2H, m, H-2), 1.27 (18H, s, H-3 a H-7 y H-12 a H-17), 0.88 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, H-18). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 68.4 (C-1), 40.9 ($-\underline{\text{CH}}-\text{I}$), 40.7 ($\underline{\text{CH}}_2-\text{CHI}-\underline{\text{CH}}_2-$), 33.7 (C-2), 32.1 (C-16), 32.1-28.7 (C-4-7 y 12-15), 25.6 (C-3), 22.9 (C-17), 14.4 (C-18).

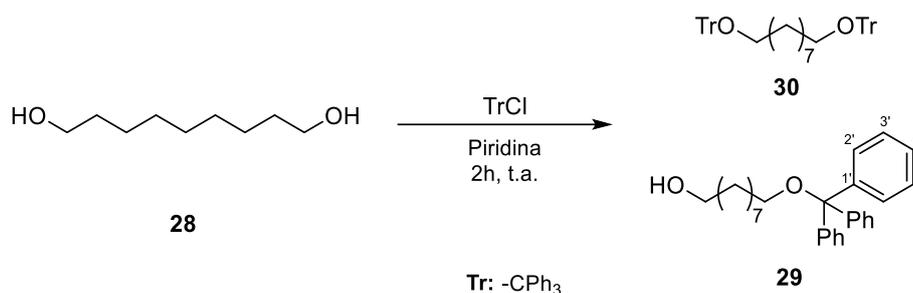
Reacción de 27 con 26: 14



A una disolución de 102 mg (0.22 mmol) de **27** en 1.6 ml de piridina, se le añaden 92 mg (0.22 mmol) de **26** y 85 mg (0.28 mmol) de TPS. Se calienta durante 1 h a 70°C en atmósfera de Ar y posteriormente se deja 7 h a temperatura ambiente. A continuación se añaden 0.5 ml de H_2O y se deja en agitación 40 min. Se adiciona $\text{PhCH}_3:\text{EtOH}$ y se evapora a sequedad. El bruto de reacción se extrae con Et_2O frío y la fracción soluble en éter, se cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con $\text{HCCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5) obteniéndose 4 mg de **14** (3%).

9/10-yodo octadecil-1-fosfocolina (14): RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 4.27 (2H, m, H-1'), 4.13 (1H, m, H-9 ó H-10), 4.08-3.79 (4H, m, H-1 y H-2'), 3.33 (9H, s, $(\underline{\text{CH}}_3)_3\text{N}^-$) 1.81-1.26 (30H, m, H-2 a 8 y H-10 a 17), 0.87 (3H, t, $J = 6$ Hz, H-18).

Protección de 28: 29 y 30

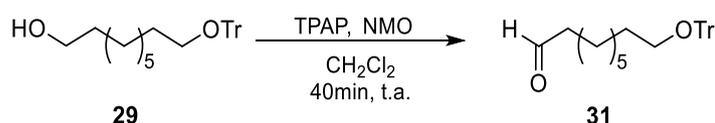


A una disolución de **28** (552 mg, 3.44 mmol) en piridina (6.9 ml) se añade TrCl (953 mg, 3.42 mmol) y se deja reaccionar en atmósfera inerte y en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Se añade H₂O y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lava con disolución de HCl 2M, NaHCO₃ (6%) y NaCl (sat) Se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente. El producto obtenido se purifica por cromatografía de columna sobre gel de sílice (Hex:AcOEt 9:1) aislándose **29** (553 mg, 40%) y **30** (624 mg, 28%).

9-tritiloxinonan-1-ol (29): IR (película) $\lambda^{-1}/\text{cm}^{-1}$: 3339, 3057, 2927, 899. **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 7.56-7.19 (15H, m, H-2'-6'), 3.63 (2H, t, $J=6.6$ Hz, H-1), 3.05 (2H, t, $J=6.6$ Hz, H-9), 1.73-1.52 (4H, m, H-2 y H-8), 1.35-1.22 (10H, m, H-3-7). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 144.5 (C-1'), 128.7 (C-3', 5'), 127.6 (C-2', 6'), 126.7 (C-4'), 86.2 (-C(Ph)₃), 63.6 (C-9), 63.0 (C-1), 32.7 (C-8), 30.0 (C-2), 29.5-25.7 (C-3-7). **ESI-HRMS**: Calculado para C₂₈H₃₄O₂Na: 425.2457 uma (M+Na⁺). Obtenido 425.2442 uma.

1,9-bis-(trityloxi)nonano (30): RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 7.55-7.15 (30H, m, H-2'-6'), 3.04 (4H, t, $J=6.6$ Hz, H-9), 1.62-1.55 (4H, m, H-2 y H-8), 1.35-1.22 (10H, m, H-3-7).

Oxidación de 29 con TPAP: 31



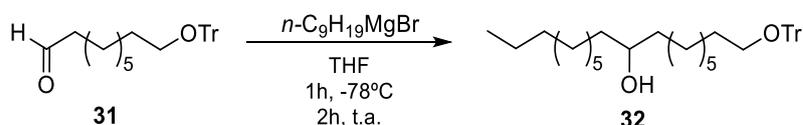
Sobre una disolución de **29** (1.230 g, 3.06 mmol) en CH₂Cl₂ (30.6 ml) se añade tamiz molecular 4 Å (1.5 g), NMO (1.242 g, 9.18 mmol) y TPAP (38 mg, 0.11 mmol) y se deja agitando a temperatura ambiente en atmósfera de Ar durante 40 min. El crudo de

reacción se filtra en columna sobre gel de sílice y celita, eluyendo CH_2Cl_2 y AcOEt. Se evapora a sequedad obteniéndose **31** (1.190 g, 97%).

9-tritiloxinonanal (31): IR (película) $\lambda^{-1}/\text{cm}^{-1}$: 3050, 2930, 2857, 1724, 1448, 706.

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 9.76 (1H, t, $J= 1.2$ Hz, $-\text{CHO}$), 7.47-7.33 (6H, m, H-2',6'), 7.30-7.25 (9H, m, H-3'-5'), 3.04 (2H, t, $J= 6.6$ Hz, H-9), 2.45-2.25 (2H, m, H-2), 1.62-1.55 (4H, m, H-3 y 8), 1.35-1.22 (8H, m, H-4-7).

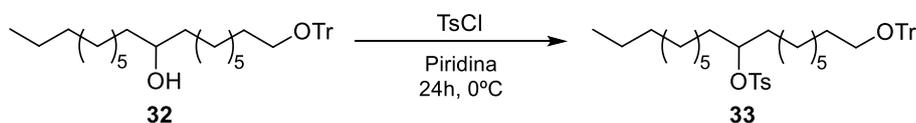
Adición de bromuro de *n*-nonilmagnesio a 31: 32



A una disolución de **31** (166 mg, 415 μmol) en THF (4.9 ml) a -78°C , en atmósfera inerte y en agitación, se le añade lentamente 4.8 ml (4.8 μmol) de $n\text{-C}_9\text{H}_{19}\text{MgBr}$ (1.0M en Et_2O). Se deja en agitación a -78°C 60 min y a continuación 2 h a temperatura ambiente. Se enfría a 0°C y se le añade lentamente $\text{H}_2\text{O}:\text{Et}_2\text{O}$ (1:1) y NH_4Cl sat. Se extrae con AcOEt y se lava la fase orgánica con disolución de NaCl (sat). Se seca con Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. Se separa por cromatografía en columna eluyendo con Hex:AcOEt 95:5 obteniéndose **32** (176 mg, 80%).

1-tritiloxioctadecan-9-ol (32): IR (película) $\lambda^{-1}/\text{cm}^{-1}$: 3375, 2926, 2854, 1449, 1070, 705. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7.46 (6H, d, $J= 7.5$ Hz, H-2', 6'), 7.30 (6H, t, $J= 7.5$ Hz, H-3',5'), 7.22 (3H, d, $J= 7.5$ Hz, H-4'), 3.59 (1H, s, H-9), 3.06 (2H, t, $J= 6.5$ Hz, H-1), 1.62 (4H, m, H-8 y 10), 1.44-1.23 (26H, m, H-2-7 y 11-17), 0.90 (3H, t, $J= 6.8$ Hz, H-18). **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 144.5 (C-1'), 128.7 (C-3',5'), 127.6 (C-2',6'), 126.7 (C-4'), 86.2 ($-\text{C}(\text{Ph})_3$), 72.0 (C-9), 63.6 (C-1), 37.5-25.6 (C-2-8 y 10-16), 22.7 (C-17), 14.1 (C-18). **ESI-HRMS**: Calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{52}\text{O}_2\text{Na}$: 528.3967 uma ($\text{M}+\text{Na}^+$). Observado: 551.3842 uma.

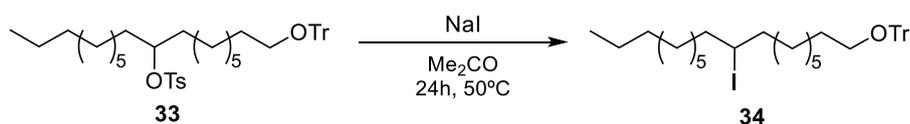
Reacción de tosilación de 32: 33



Sobre una disolución de **32** (595 mg, 1.13 mmol) en piridina (18.8 ml) a 0°C, se adiciona TsCl (902 mg, 4.73 mmol) y se deja reaccionar durante 24 h a 0°C, habiéndose consumido todo el reactivo, se adiciona hielo y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lava con disolución de HCl 2M y NaHCO₃ (6%). Se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora a vacío obteniéndose 700 mg de **33** (99%).

Tosilato de 1-tritiloxioctadecan-9-ol (33): IR (película) $\lambda^{-1}/\text{cm}^{-1}$: 3059, 2928, 2855, 1458, 1363, 1176, 899, 706. RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 7.78 (2H, d, $J= 8.2$ Hz, H-2'' y 6''), 7.47-7.22 (22H, m, H-2'-6', 3'' y 5''), 4.52 (1H, t, $J= 6.0$ Hz, H-9), 3.04 (2H, t, $J= 6.6$ Hz, H-1), 2.42 (3H, s, Ph-CH₃), 1.56-1.16 (25H, m), 0.89 (3H, t, $J= 6.8$ Hz, H-18).

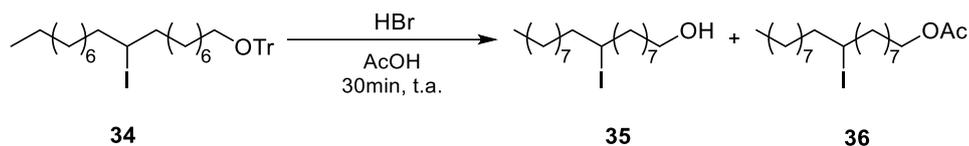
Reacción de 33 con NaI: 34



A una disolución de **33** (700 mg, 1.03 mmol) en Me₂CO (55.5 ml) se le añade NaI (1.720 g, 11.48 mmol) dejándose en agitación a 50°C durante 24 h. Se añaden 40 ml H₂O y se extrae con AcOEt. La fase orgánica se lava con disolución de Na₂SO₃ (10%), NaHCO₃ (6%) y NaCl (sat). Se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se evapora a sequedad. El bruto de reacción se purifica por cromatografía sobre 15 g de gel de sílice eluyendo con Hex:AcOEt (99:1) aislándose 646 mg de **34** (99%).

1-tritiloxi-9-yodo octadecano (34): IR (película) $\lambda^{-1}/\text{cm}^{-1}$: 2926, 2855, 1490, 1449, 1070, 696. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 7.47 (6H, d, $J= 8.4$ Hz, H-2',6'), 7.33-7.21 (9H, m, H-3', 5' y 4'), 4.13 (1H, m, H-9), 3.11 (2H, t, $J= 6.5$ Hz, H-1), 2.00-1.29 (15H, m, H-2-8 y 10-17), 0.90 (3H, t, $J= 6.7$ Hz, H-18). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 144.5 (C-1'), 128.7 (C-3' y 5'), 127.6 (C-2' y 6'), 126.7 (C-4'), 86.2 (-C(Ph)₃), 63.61 (C-1), 40.66 (C-9 y C-8, 10) 31.9-26.2 (C-2-7 y C-10-16), 22.7 (C-17), 14.1 (C-18). ESI-HRMS. Calculado para C₃₇H₅₁IONa: 661.2882 uma (M+Na⁺). Observado: 661.2868 uma.

Desprotección de 34 con HBr: 35 y 36

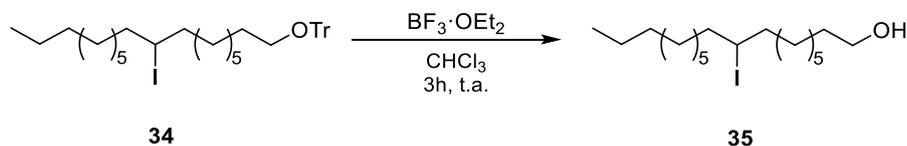


Se disuelve **34** (60.3 mg, 0.09 mmol) en 18.7 ml de AcOH y se adiciona a 10°C una disolución de HBr (48%) (10.6 μl , 0.09 mmol) en 18.7 ml de AcOH. Al cabo de 30 min a temperatura ambiente se filtra y se lava con H₂O. El producto obtenido se extrae con AcOEt y la fase orgánica se lava con disolución de NaHCO₃ (6%) y H₂O. La disolución se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y evapora a sequedad. El bruto de reacción se separa por cromatografía sobre gel de sílice eluyéndose con Hex:AcOEt (99:1) y se separa **35** (5.3 mg, 15%) y **36** (10 mg, 25%).

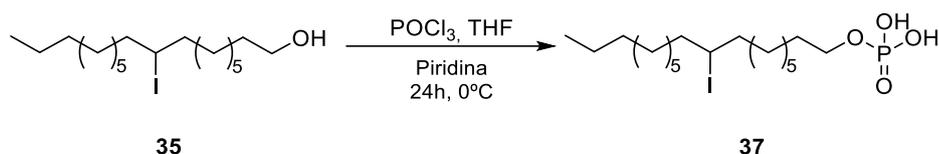
9-yodo octadecan-1-ol (35): IR (película) $\lambda^{-1}/\text{cm}^{-1}$: 3346, 2926, 2854, 1462, 1057, 721. **RMN ¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 4.13 (1H, m, H-9), 3.62 (2H, t, $J= 6.4$ Hz, H-1), 2.00-1.15 (15H, m, H-2-8 y 10-17), 0.86 (3H, t, $J= 6.8$ Hz, H-18). **RMN ¹³C** (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 63.2 (C-1), 40.9 (C-9 y C-8, 10), 32.9 (C-2), 32.1 (C-16), 29.8-26.0 (C-3-7 y C-11-15), 22.9 (C-17), 14.33 (C-18). **ESI-HRMS**. Calculado para C₁₈H₃₇IONa: 419.1781 uma (M+Na⁺). Observado: 419.1777 uma.

Acetato de 9-yodo octadecan-1-ol (36): IR (película) $\lambda^{-1}/\text{cm}^{-1}$: 2914, 2871, 1740, 752. **RMN ¹H** (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 4.13 (1H, m, H-9), 4.05 (2H, t, $J= 6.6$ Hz, H-1), 2.05 (3H, s, CH₃-COO-), 2.00-1.29 (15H, m, H-2-8 y 10-17), 0.89 (3H, t, $J= 6.6$ Hz, H-18).

Desprotección de 34 con BF₃: 35

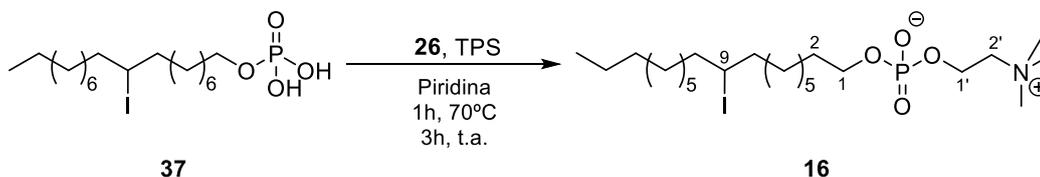


A una disolución de **34** (376 mg, 0.58 mmol) en 5.8 ml de CHCl₃ a 0°C, se adicionan 610 μl de BF₃·OEt₂. Tras 3 h a temperatura ambiente se adiciona H₂O:CHCl₃:MeOH (2:2:1) y se separa la fase orgánica, secándose con Na₂SO₄ anhidro. Se filtra y evapora a sequedad. El bruto obtenido se lava con hexano y la fracción soluble en hexano frío se evapora a sequedad. Se purifica por cromatografía sobre gel de sílice utilizando Hex:AcOEt (99:1) como eluyente obteniendo **35** (218 mg, 95%).

Reacción de 35 con POCl₃: 37

Sobre una disolución de **35** (310 mg, 0.78 mmol) en 3.9 ml de THF se adiciona en frío 12.6 μl de piridina y 7.2 μl de POCl₃. Se deja reaccionar a 0°C en atmósfera inerte y agitación durante 24 h. A continuación se añade 1 ml de disolución NaHCO₃ (6%) dejándose agitar 15 min, se añade hielo y se acidula cuidadosamente con HCl 2M hasta pH=2. El bruto de reacción se extrae con AcOEt y se lava con H₂O. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se evapora obteniéndose 362 mg de **37** (97%).

9-yodo octadecil dihidrogenofosfato (37): RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 4.15-4.00 (3H, m, H-1 y H-9), 2.15-1.00 (H, m, H-2-8, 10-17), 0.87 (3H, m, H-18).

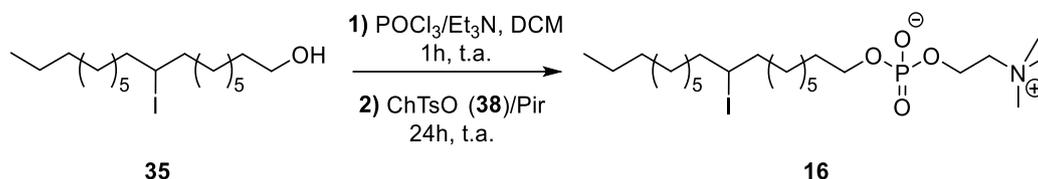
Reacción de 37 con 26: 16

A una disolución de 127 mg (0.27 mmol) de **37** en 2.1 ml de piridina, se adiciona TPS (102 mg, 0.33 mmol) y **26** (115 mg, 0.27 mmol). Se deja reaccionar 1 h a 70°C y 3 h a temperatura ambiente. A continuación se añade 1 ml de H₂O y se deja en agitación 15 min, tras los que se evapora a sequedad. La parte soluble en CHCl₃ del residuo sólido se extrae con Et₂O. La fracción soluble en Et₂O se cromatografía sobre gel de sílice eluyendo secuencialmente con CHCl₃, CHCl₃:MeOH, CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5) y con CHCl₃:MeOH:NH₄OH (65:30:5) se separan 9 mg de **16** (6%).

9-yodo octadecil-1-fosfocolina (16): IR (película) $\lambda^{-1}/\text{cm}^{-1}$: 3406, 2924, 2855, 1654, 1465, 1236, 968, 737. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 4.20 (3H, m, H-9, H-1'), 3.42 (9H, s, (CH₃)₃N-), 3.95 (2H, m, H-1) 3.82 (2H, m, H-2'), 2.20-1.08 (30H, m, H-2-8 y 10-17), 0.86 (3H, t, *J*= 6.4 Hz, H-18). RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 66.4 (C-2'), 66.1 (C-1), 59.5 (C-1'), 54.5 ((CH₃)₃N-), 41.4 (C-9), 41.3-41.0 (C-8 y 10), 32.1 (C-16), 29.9-29.1 (C-2, 4-6 y 12-16), 26.8 (C-7 y 11),

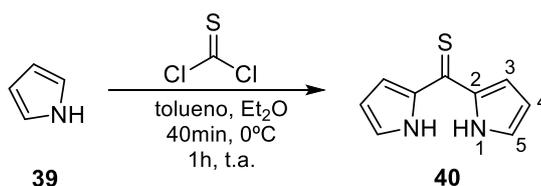
26.1 (C-3), 22.9 (C-17), 14.4 (C-18). **ESI-HRMS.** Calculado para $C_{23}H_{49}NO_4PINa$: 584.2336 uma ($M+Na^+$). Observado: 584.2342 uma.

Reacción de 35 con $POCl_3$ y tosilato de colina: 16



Sobre una disolución de $POCl_3$ (435 μ l, 0.47 mmol) destilado en el momento, en 1.8 ml DCM se adiciona gota a gota a $0^\circ C$ una disolución de **35** (149 mg, 0.38 mmol) y Et_3N (68 μ l, 0.49 mmol) en 2.7 ml DCM. Se deja reaccionar durante 1 h a t.a. tras la que se adiciona una disolución de tosilato de colina (211 mg, 0.744 mmol), **38**, en 239 μ l de piridina. Después de 24 h a t.a. se añade 1 ml de H_2O y se evapora sucesivas veces con $EtOH:PhCH_3$ (1:1) hasta obtener un sólido amarillo que se disuelve en $THF:H_2O$ (9:1) y se percola sobre amberlita MB3 eluyendo con $THF:H_2O$ (9:1). La disolución obtenida se evapora a vacío y se cromatografía sobre gel de sílice eluyendo secuencialmente con $HCCl_3$, $HCCl_3:MeOH$ (9:1) y $HCCl_3:MeOH:H_2O$ (65:30:5) obteniéndose 75 mg de **16** (36%).

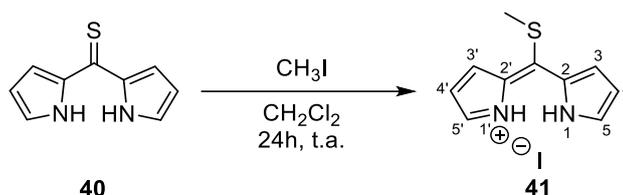
Reacción de 39 con tiofosgeno: 40



Sobre una disolución de tiofosgeno (32 μ l, 4.2 mmol) en tolueno (10 ml) a $0^\circ C$ y en atmósfera de Ar, se adiciona gota a gota una disolución de pirrol, **39**, (605 mg, 8.4 mmol) en Et_2O (15 ml). La disolución se agita durante 40 min a $0^\circ C$ tras los cuales, se añade $MeOH$ acuoso al 10% (12 ml) y se deja en agitación 1 h más a temperatura ambiente. Se evapora a sequedad y el producto sólido se disuelve en $PhCH_3:CHCl_3$ 9:1 y se purifica por cromatografía en columna sobre Al_2O_3 (neutra) eluyendo con $PhCH_3:CHCl_3$ 9:1, se obtienen 420 mg de **40** (57%).

Bis-(1*H*-pirrol-2-il)-metanotiona (40): RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 9.78 (2H, s.a., $\underline{\text{H-N}}$), 7.22-7.18 (2H, m, H-5), 7.06-7.04 (2H, m, H-3), 6.44-6.39 (2H, m, H-4). RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 193.1 ($\underline{\text{C=S}}$), 138.1(C-2), 127.6 (C-5), 114.7 (C-3), 112.4 (C-4).

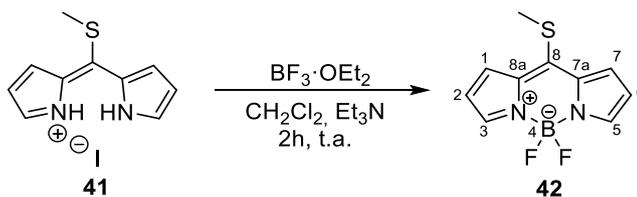
Reacción de metilación de 40: 41



A una disolución de **40** (285 mg, 1.62 mmol) en CH_2Cl_2 (4.8 ml) en atmósfera inerte y en agitación, se adiciona lentamente CH_3I (250 μl). Tras 24 h se evapora a sequedad obteniéndose una mezcla de **41**.

Yoduro de 2-[metil sulfanil-(1*H*-pirrol-2-il)-metileno]-2*H*-pirrolinio (41): IR (película) $\lambda^{-1}/\text{cm}^{-1}$: 3111, 1549, 1435, 1338, 1045. RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 12.03 (2H, s.a., $\underline{\text{H-N}}$), 7.90-7.89 (2H, m, H-5), 7.28-7.26 (2H, m, H-3), 6.68-6.64 (2H, m, H-4), 2.91 (3H, s, $\underline{\text{SCH}_3}$). RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 163.7 ($\underline{\text{C-SMe}}$), 139.7 (C-5), 130.6 (C-2), 129.8 (C-3), 117.7 (C-4), 22.7 ($\underline{\text{CH}_3\text{-S}}$ -)

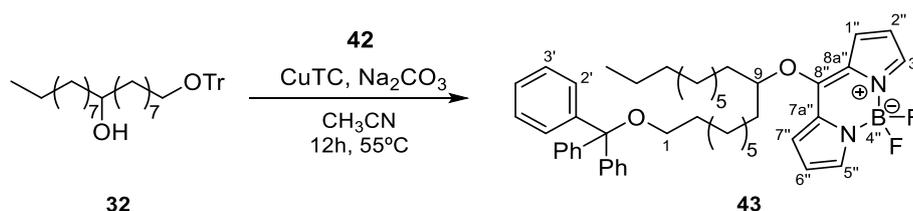
Reacción de 41 con $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$: 42



Se disuelve **41** (690 mg, 2.17 mmol) en CH_2Cl_2 (16.1 ml) y en atmósfera inerte se añade Et_3N (505 μl , 3.64 mmol), se deja en agitación durante 40 min a temperatura ambiente. Se añade $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (413 μl , 3.26 mmol) y la disolución se deja reaccionar durante 90 min. Se evapora a sequedad y el producto obtenido se cromatografía en columna en gel de sílice utilizando Hex:AcOEt (98:2) como eluyente aislándose **42** (470 mg, 91%).

8-(tiometil)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (42): RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7.79 (2H, s.a., H-3 y H-5), 7.42 (2H, d, $J= 4.2$ Hz, H-1 y H-7), 6.53 (2H, d, $J= 4.2$ Hz, H-2 y H-6), 2.91 (3H, s, $-\text{SCH}_3$). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 154.0 (C-8), 141.6 (C-3 y C-5), 134.1 (C-8a y C-7a), 127.8 (C-2 y C-6), 118.1 (C-1 y C-7), 20.7 ($\text{CH}_3\text{-S}$).

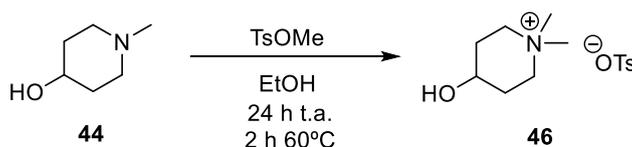
Reacción de 32 con 42: 43



Se disuelve **42** (118 mg, 0.49 mmol) en CH_3CN (0.5 ml) y se añade rápidamente CuTC (78 mg, 0.40 mmol) y una disolución de **32** (102 mg, 0.20 mmol) en CH_3CN (1.1 ml). Se deja agitar en atmósfera de Ar a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación se añade Na_2CO_3 (42 mg, 0.40 mmol). La disolución se calienta a 55°C durante 12 h. Se evapora el disolvente y el crudo se cromatografía sobre gel de sílice utilizando como eluyente Hex:AcOEt 98:2. Se aísla **43**, 12 mg (53%) y se recupera material de partida **42**, 100 mg y **32**, 89 mg.

9-O-(4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenil)-1-tritiloxi octadecano (43): RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7.71 (2H, s, H-3'' y 5''), 7.55-7.17 (17H, m, H-2'-6', H-1'' y 7''), 6.51 (2H, dd, $J_1= 4.1$ Hz, $J_2= 2.0$ Hz, H-2'' y 6''), 5.13 (1H, quin, $J= 5.8$ Hz, H-9), 3.03 (2H, t, $J= 6.0$ Hz, H-1), 2.04-1.00 (29H, m), 0.88 (3H, t, $J= 6.8$ Hz, H-18).

Reacción de 44 con TsOMe: 46

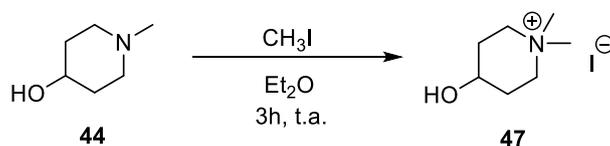


A una disolución de **44** (806 mg, 7 mmol) en 20 ml de EtOH en atmósfera de Argon y agitación, se le adicionan 1.45 ml de TsOMe (9.61 mmol). Se deja reaccionar 24 h a t.a.

y 2 h a 60°C tras las que se evapora a vacío. Se obtiene una mezcla compuesta mayoritariamente por **46**.

Tosilato de 4-hidroxi-*N,N*-dimetilpiperidinio (46): RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 7.78 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2',6'), 7.23 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3',5'), 3.99 (1H, m, H-3), 3.64-3.51 (2H, m, H-1 y H-5), 3.40-3.20 (2H, m, H-1 y H-5), 3.16 y 3.12 (3H, s c/u, N- CH_3), 2.20-2.00 (2H, m, H-2 y H-4), 1.98-1.75 (2H, m, H-1 y H-6).

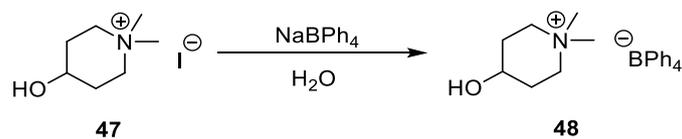
Reacción de 44 con MeI: 47



Sobre una disolución de **47** (4.3 g, 38 mmol) en 120 ml Et_2O se adicionan 32 ml de MeI (379 mmol). Se deja reaccionar en agitación y atmósfera de Ar durante 3 h a t.a. tras las que se filtra el sólido amarillento, se lavan con éter y se evaporan a vacío. Se obtienen 9.6 g de **47** (99%).

Yoduro de 4-hidroxi-*N,N*-dimetilpiperidinio (47): RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) δ/ppm : 3.98 (1H, m, H-3), 3.58 (2H, ddd, $J = 12.8, 9.6$ y 3.4 Hz, H-1 y H-5), 3.42-3.20 (2H, m, H-1, H-5), 3.16 y 3.14 (3H, s c/u, N- CH_3), 2.30-2.10 (2H, m, H-2 y H-4), 2.00-1.75 (2H, m, H-1 y H-6).

Reacción de 47 con NaBPh₄: 48

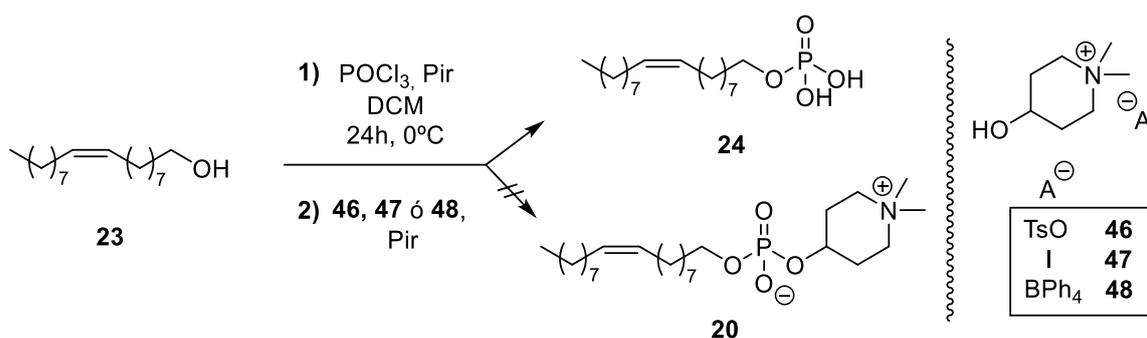


Sobre una disolución de **47** (1.13 g, 4.4 mmol) en 14 ml de H_2O , se adicionan 14.5 ml de una disolución acuosa de 1.00 g (2.9 mmol) de NaBPh_4 . Inmediatamente aparece un precipitado blanco que se filtra y se lava con H_2O . El sólido filtrado se redisuelve en $\text{PhCH}_3:\text{EtOH}$ (1:1) y se evapora a sequedad. El producto se purifica por recristalización

disolviendo el sólido en CH₃CN y se deja cristalizar a -14°C obteniéndose 1.20 g de **48** (92%).

Tetrafenilborato de 4-hidroxi-N,N-dimetilpiperidinio (48): T_f (°C): 248-250. **RMN** ¹H (200 MHz, DMSO-D6) δ/ppm: 7.20-6.74 (20H, m, Ph-H), 5.09 (1H, s, -OH), 3.73 (1H, m, H-3), 3.44-3.19 (4H, m, H-1, H-5), 3.04 y 3.00 (3H, s c/u, NCH₃), 2.05-1.90 (2H, m, H-2 y H-4), 1.89-1.70 (2H, m, H-2, H-4). **RMN** ¹³C (50 MHz, DMSO-D6): 169.8 y 167.8 (2C, d c/u J = 43 Hz, C-1'), 141.0, 130.8 y 127.0 (C-2',3' y 4'), 66.3 (C-3), 63.6 (C-1,5), 56.5 y 55.2 (NCH₃), 33.1 (C-2,4). **ESI-HRMS.** Calculado para C₃₈H₅₂BN₂O₂: 579.4122 uma (M+(4-hidroxi-N,N-dimetilpiperidinio))⁺. Observado: 579.4117 uma.

Reacción de 23 con 46-48



A una disolución de (0.28 ml, 2.97 mmol) POCl₃ recientemente destilado en 1.5 ml de DCM, se le adiciona a 0°C y en atmósfera de Ar una disolución de 0.73 g (2.7 mmol) de alcohol oleico, **23**, en 6 ml de DCM y 1 ml de piridina. Se deja reaccionar a 0°C durante 24 h tras las que se procede de forma diferente en función de la sal empleada.

a) Reacción con **47**

Sobre la mezcla reaccionante se adicionan 7 ml de DMF y se evapora a vacío hasta eliminar el DCM. A continuación, se adiciona una disolución de 2.7 g (10.8 mmol) de **47** y 1.6 ml de piridina en 8 ml de DMF. La reacción se mantiene a t.a. durante 12 h. A continuación, se añade H₂O (2 ml) y se agita durante 40 min tras los que se adiciona PhCH₃:EtOH (1:1) y se evapora a sequedad obteniéndose 650 mg de producto de reacción. El bruto de reacción (325 mg) se extrae con CHCl₃ y se lava con H₂O. Después de evaporar la fase orgánica se obtienen 284 mg de **24** (78%) y de la fase

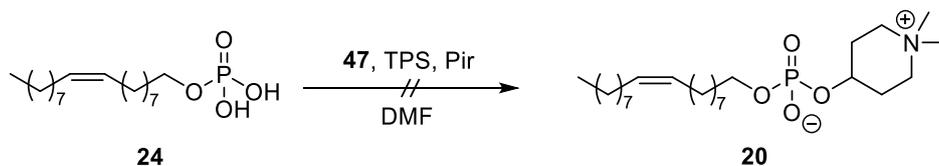
acuosa se aíslan 8 mg de **47** (3%). El resto del bruto de reacción se cromatografió en columna eluyendo secuencialmente con $\text{HCCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1) y $\text{HCCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5). Separándose **24** (31 mg, 9%).

Cuando la reacción se realiza a t.a. 12 h, seguido de calentamiento a 60°C durante 12 h, por CC se separa **24**, 10 mg (3%). Cuando se realiza calentando directamente 12 h a 60°C se separa tras CC **24**, 6 mg (2%).

b) Reacción con **46** y **48**.

Sobre la mezcla reaccionante, se adicionan 10.8 mmol de **46** (3.25 g) o **48** (4.85 g) y 10 ml de piridina tras los que se procede a evaporar el DCM. Después de concentrar la disolución, se deja reaccionar 24 h a t.a. y 5 h a 40°C tras las que se añaden 2 ml de H_2O , se deja en agitación 40 min y se evapora a sequedad con $\text{PhCH}_3:\text{EtOH}$ (1:1). En el análisis por TLC, como por espectroscopía de RMN ^1H , no se observa la presencia del compuesto **20**.

Reacción de 24 con 47: 20



A una disolución de 458 mg (1.32 mmol) de **24**, en 8.6 ml de DMF, se le adicionan 496 mg (1.64 mmol) de TPS y 1.34 g (5.23 mmol) de **47**. Se calienta en atmósfera de Ar a 60°C durante 6h. Después, se añade H_2O y se deja en agitación 40 min, seguido de adición de $\text{PhCH}_3:\text{EtOH}$ (1:1) y evaporar a sequedad. Se obtiene un residuo muy complejo (TLC), que en su espectro de RMN ^1H no presenta las señales correspondientes al compuesto **20**.

5. Discusión de resultados

A continuación se van a comentar los resultados obtenidos en el trabajo, comenzando por los análogos de miltefosina, **5**, y seguidamente se discutirán las aproximaciones sintéticas de los análogos de perifosina, **6**.

Síntesis de análogos de miltefosina, **5**.

5.1. Síntesis de miltefosina insaturada **13**.

5.2. Síntesis de análogos yodados de miltefosina: **14** y **16**.

5.3. Aproximación sintética de miltefosina fluorescente **18**.

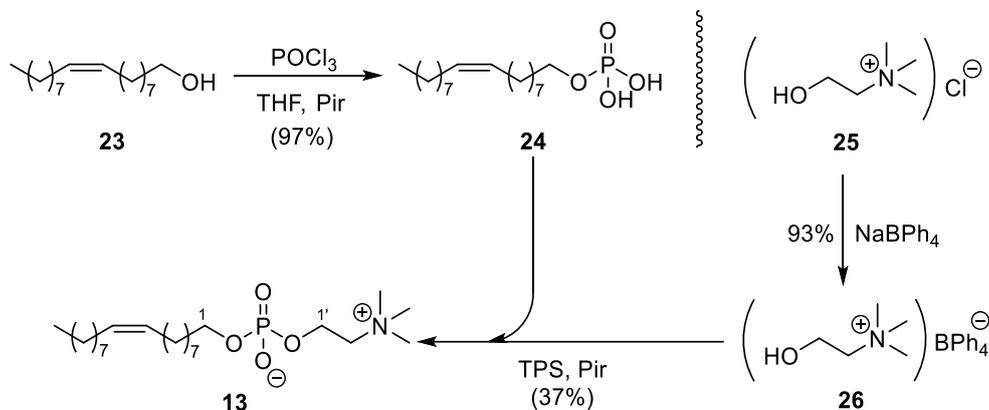
Síntesis de análogos de perifosina, **6**.

5.4. Aproximación al análogo yodado yodado **22** e insaturado **20**.

Síntesis de análogos de miltefosina (**5**)

5.1. Síntesis de miltefosina insaturada, **13**

La síntesis de miltefosina insaturada, **13**, se desarrolló según la siguiente secuencia sintética (Esquema 1).



Esquema 1

El alcohol oleico, **23**, reacciona con POCl_3 en frío proporcionando **24**. En el espectro RMN ^1H de **24** se observa el desapantallamiento que experimentan los hidrógenos geminales a la función oxigenada en C-1, ahora aparecen a 4.03-3.81 ppm.

Para realizar la síntesis del análogo insaturado **13**, es necesario preparar previamente la sal de colina adecuada, **26**. Por reacción de cloruro de colina, **25**, con tetrafenilborato sódico se obtiene el producto de cambio iónico **26**, que se recristaliza en acetonitrilo para ser utilizada posteriormente en la síntesis de **13**.

Por reacción de **24** con la recientemente preparada sal **26** en piridina y presencia de cloruro de 2,4,6-triisopropilbencenosulfonilo, TPS, se obtiene una mezcla de reacción de la que tras laboriosa cromatografía en columna sobre gel de sílice^{41,42} se logra separar miltefosina insaturada, **13**. En el espectro de masas de **13** aparece un ión a 456.3219 una correspondiente a $C_{23}H_{48}NO_4PNa$ y en su espectro de RMN 1H además de los hidrógenos olefínicos a 5.23 ppm, aparecen las señales correspondientes a los hidrógenos geminales a funciones oxigenadas a 4.29 ppm (2H, m, H-1') y 3.87 ppm (2H, m, H-1). También se observa la señal del metileno geminal a nitrógeno, 3.79 ppm (2H, m), así como tres metilos correspondientes a la sal de colina a 3.41 ppm (9H, s).

El producto **13**, miltefosina insaturada, ha sido enviado al CIB-CSIC (Madrid) para realizar pruebas de actividad antitumoral.

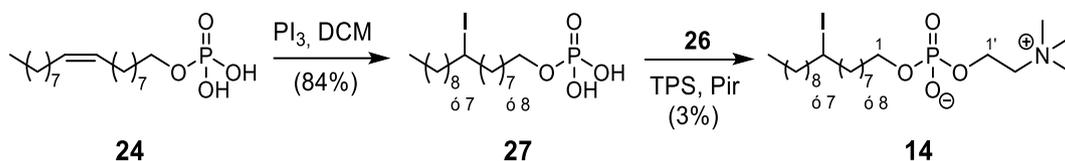
5.2. Síntesis de análogos yodados de miltefosina: **14** y **16**

El interés por la síntesis de análogos de miltefosina yodada se debe a que se conocen análogos de edelfosina que mantienen la capacidad antitumoral de edelfosina, pero se absorbe mejor en las células antitumorales.⁷ Por ello, en este trabajo se aborda la preparación de los análogos yodados de miltefosina **14** y **16**.

1. Síntesis de la mezcla de yoduros **14**.
2. Síntesis del yododerivado **16**.

5.2.1. Síntesis de la mezcla de yoduros **14**

En una aproximación a la síntesis de miltefosina yodada y con el fin de acceder de una manera inmediata a este tipo de moléculas, se ha diseñado una síntesis por transformación de los derivados insaturados anteriores, como el ácido **24** (Esquema 2).



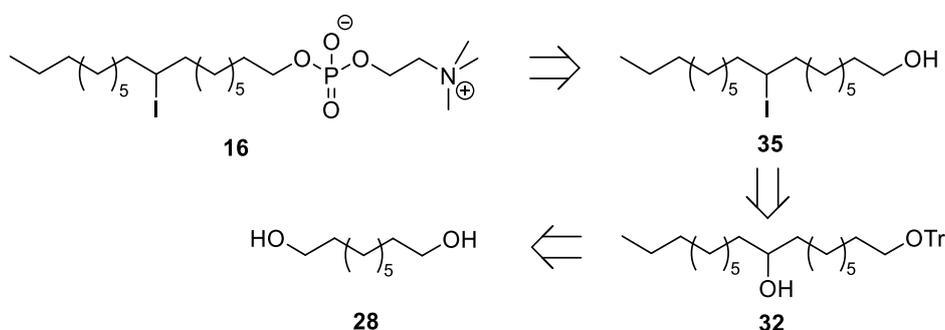
Esquema 2

Por reacción de **24** con PI_3 se obtiene el yododerivado **27**. En el espectro de RMN 1H de **27** se observa como han desaparecido las señales correspondientes a los hidrógenos olefínicos y aparece una señal multiplete a 4.13-4.04 ppm correspondiente al hidrógeno

geminal al yodo. En el espectro RMN ^{13}C a 40.9 ppm aparece la señal del C yodado y a 40.7 ppm las señales correspondientes a los metilenos vecinales a dicho carbono yodado. La reacción de **27** con tetrafenilborato de colina, **26**, en presencia de TPS. Tras evaporar, se obtiene una mezcla que por solubilidad en Et_2O se separa un residuo que tras separación cromatográfica se aísla **14**. Por RMN ^1H se observa el desapantallamiento de los CH_2 geminales al fosfato a 4.27 ppm (2H, m, H-1') y a 4.08-3.79 ppm aparece H-1 solapado con H-2' como un multiplete. Con este procedimiento se confirmó la posibilidad de utilizar **26** en la síntesis de análogos yodados, agotando la disponibilidad de los intermedios **24** y **27** se decidió abordar la síntesis de **16**.

5.2.2. Síntesis del yododerivado **16**

Para la síntesis de **16** se diseñó el siguiente esquema retrosintético (Esquema 3).



Esquema 3

El análogo **16** puede conseguirse desde el hidroxiderivado **35** por incorporación de la unidad de fosfocolina. Al intermedio **35** se puede acceder desde el tritol derivado **32**, mediante un intercambio adecuado de grupos funcionales en los que se realiza la reacción de sustitución en la que se incorpora el yodo.

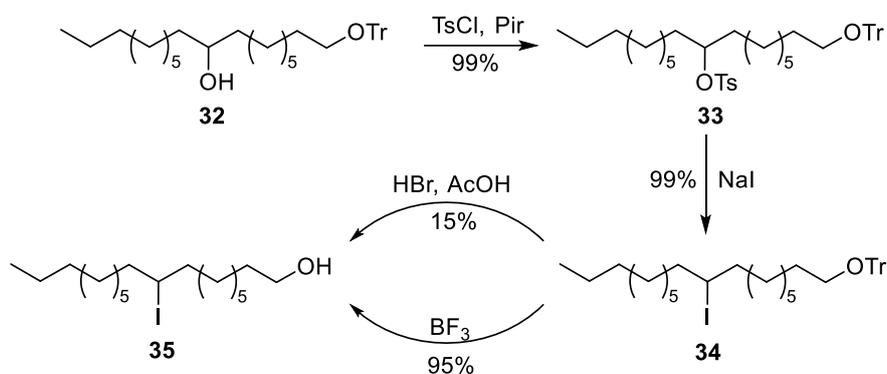
Para conseguir **32** se partirá del producto comercial 1,9-nonanodiol, **28**, para ello es necesaria la monoprotección de uno de los grupos hidroxilo y la posterior elongación del otro extremo de la cadena alquílica.

La síntesis de **16** se describirá considerando tres etapas:

1. Síntesis de **32**.
2. Preparación de **35**.
3. Obtención de **16**.

5.2.2.2. Preparación de **35**

La preparación de **35** desde **32** requiere tres transformaciones claves: activación del grupo hidroxilo, formando un buen grupo saliente (tosilato), sustitución por yodo y finalmente desprotección. (Esquema 5).

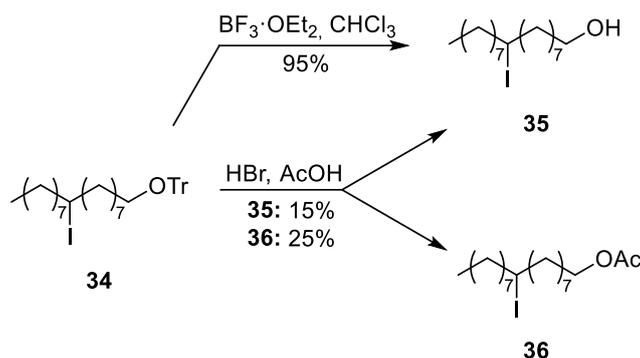


Esquema 5

Por reacción de **32** con TsCl en piridina se obtiene con rendimiento prácticamente cuantitativo el tosilderivado **33**. En su espectro de RMN ^1H se observa un singlete a 2.42 ppm del grupo metilo del tosilato y a 4.52 ppm aparece el H-9, geminal al tosilato.

El tosilato, **33**, se hace reaccionar inmediatamente tras su obtención con NaI para obtener **34**. Los intermedios **33** y **34** presentan un R_f muy parecido, complicando el seguimiento por TLC, por lo que fue necesario controlar la reacción por RMN hasta que se consume **33**. La formación del yoduro modifica el espectro de RMN ^1H notablemente desapareciendo las señales correspondientes al grupo tosilato y modificándose el desplazamiento del H-9, que en **34** aparece a 4.13 ppm como multiplete.

La reacción de desprotección de **34** se ensayó en primer lugar por reacción con HBr en AcOH. De este modo se obtiene una mezcla de reacción de la que finalmente se separan el hidroxiderivado requerido **35** (15%) y su acetilderivado, **36** (25%). Sin embargo, al realizar la reacción de desprotección con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ se consigue el hidroxiderivado **35** con excelente rendimiento. (Esquema 6).

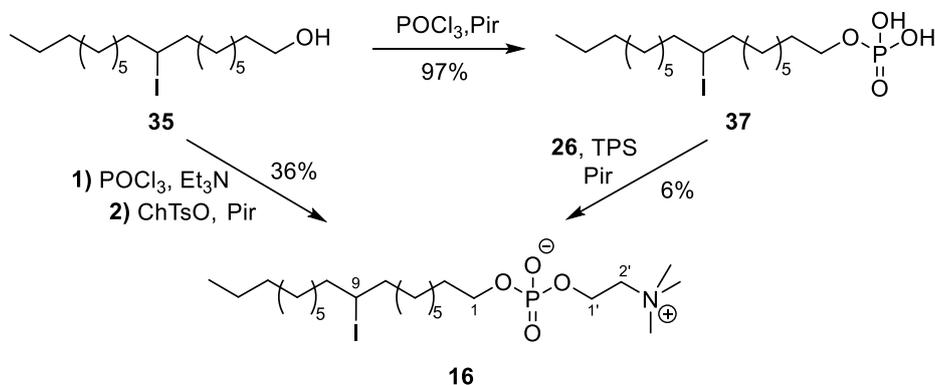


Esquema 6

Por RMN ^1H del hidroxiderivado **35** (IR: 3346 cm^{-1}) se observó la ausencia de las señales aromáticas del tritilo y los hidrógenos H-1 se desapantallan apareciendo como triplete a 3.63 ppm. El compuesto **36** se identificó espectroscópicamente como el acetil derivado de **35** (IR: 1740 cm^{-1} ; RMN ^1H : 7.05 ppm (3H, s, CH_3COO^-), 4.05 ppm (2H, t, H-1)).

5.2.2.3. Obtención de **16**

La incorporación de la unidad de fosfocolina al intermedio **35** en la obtención de la miltefosina yodada, **16** se ha realizado con dos metodologías diferentes (Esquema 7).



Esquema 7

La reacción del hidroxiderivado **35** con POCl_3 en piridina proporciona el ácido **37**. En su espectro de RMN ^1H se observa el desapantallamiento de los hidrógenos geminales a la función oxigenada en C-1 como consecuencia de la esterificación, apareciendo solapada con la señal del metino del yoduro a 4.17 ppm.

Por reacción de **37** con tetrafenilborato de colina, **26**, en presencia de TPS se obtiene una mezcla de la que por solubilidad en CHCl_3 y Et_2O se separa un residuo del que por posterior CC se logra aislar **16**. En su espectro de masas aparece a 584.2336 una un ion

M+Na⁺ (C₂₃H₄₉NO₄PINa) y en su espectro de RMN ¹H, se observa un singulete a 3.43 ppm correspondiente a los metilos de la colina. En su espectro de RMN ¹³C presenta las señales características de los metilenos geminales al fosfato (C-1: 66.1 ppm y C-1': 59.5 ppm) y la señal del CH₂ geminal a la amina (C-2'), 66.4 ppm.

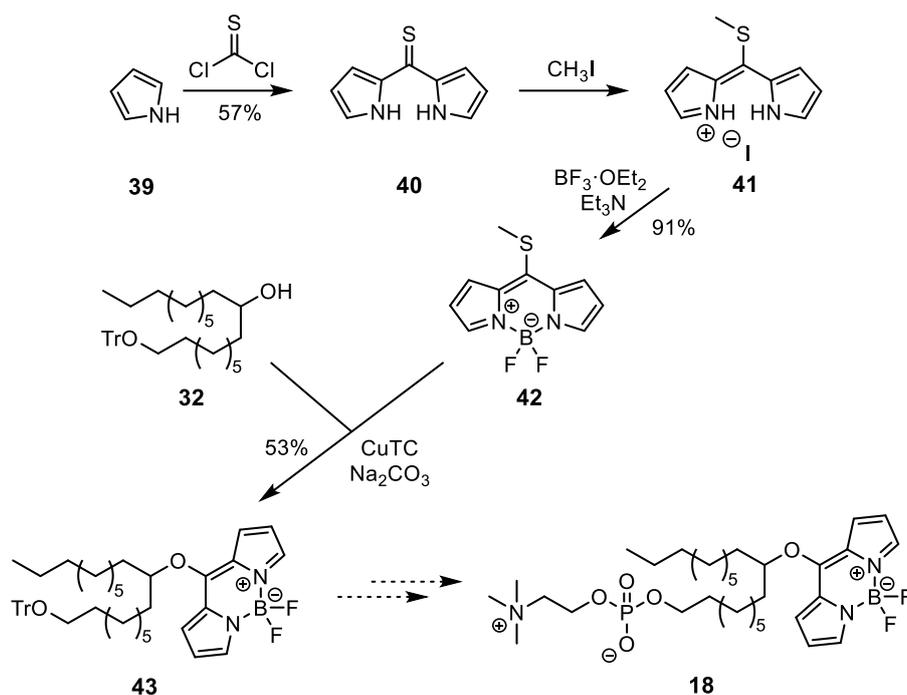
Con el fin de mejorar el rendimiento de **16**, se ensayó una metodología en la que no se aisla el fosfato intermedio, **37**, realizando la síntesis de manera consecutiva sin aislar el intermedio de reacción.⁴² En este caso, la reacción de **35** con POCl₃ y Et₃N, seguida por esterificación con tosilato de colina (ChTsO) proporciona **16** con mejor rendimiento. Optimizando esta reacción, se observó que se mejoraba el rendimiento destilando a vacío el POCl₃ inmediatamente antes de su utilización y empleando tosilato de colina en exceso (2 mol/mol de **35**), consiguiéndose **16** con un rendimiento del 36%.

El producto **16** se ha enviado al CIB-CSIC para realizar estudios de actividad antitumoral. En estudios previos para edelfosina se ha comprobado que la configuración no es determinante en la actividad antitumoral,⁴³ no obstante, a fin de completar los estudios con miltefosina, si los resultados para **16** como agente antitumoral son positivos, se planteará la síntesis enantioselectiva de análogos yodados, para ello se utilizará el inductor quiral (+) y/o (-)-TADDOL en la adición del magnesiano.⁴⁴

5.3. Aproximación sintética de miltefosina fluorescente **18**

El interés en el estudio del mecanismo de acción de las APCs ha llevado a la propuesta de la síntesis del análogos fluorescentes de miltefosina como **18**. Dichos análogos fluorescentes podrían ser utilizados para proporcionar imágenes de tumores *in vivo* y por último facilitar la visualización de metástasis y la progresión del cáncer. Como fluoróforo se ha elegido **42**, perteneciente a la familia de compuestos denominados BODIPYs.⁴⁵

La preparación del BODIPY utilizado, **42**,⁴⁶ así como la reacción con el hidroxiderivado **32**⁴⁷ se indican en el esquema 8.



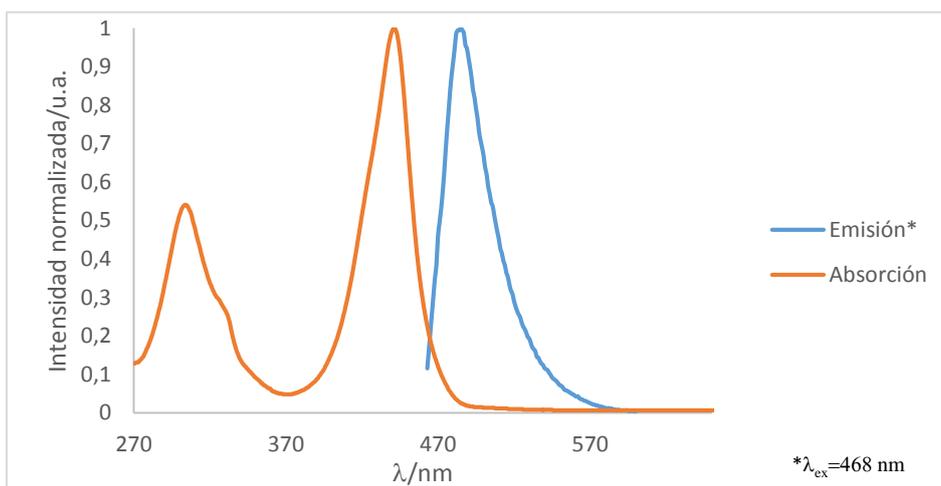
Esquema 8

En la síntesis del fluoróforo **42** se utiliza pirrol, **39**, y tiosogeno como reactivos de partida que por reacción y posterior separación cromatográfica permite alcanzar **40** cuyo espectro de RMN ^1H muestra las señales multiplete correspondientes a los hidrógenos pirrólicos además de los hidrógenos de las funciones amina que aparecen como singuletes anchos. El intermedio **40** por reacción con CH_3I proporciona una mezcla que en su espectro de RMN ^1H permite observar la formación de un metilsulfuro, **41**. Por reacción de dicha mezcla, sin purificación posterior, con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ en presencia de Et_3N conduce al BODIPY derivado **42**, con un rendimiento del 91% en las dos etapas de **40** a **42**. En el producto **42**, por RMN ^1H se detecta la ausencia de las señales de los H de la amina presentes en **40** y **41**.

Para obtener el intermedio avanzado **43** se han ensayado diferentes condiciones de reacción. Las condiciones más favorables se obtienen por reacción de una disolución de **32** en CH_3CN (concentración de **32** 0.4M) con **42** en exceso (2.5 mol **42**/mol **32**), en presencia de CuTC (2.0 mol CuTC /mol **32**) y Na_2CO_3 (2.0 mol Na_2CO_3 /mol **32**), durante 12 h a 25°C . Por RMN ^1H se confirma la presencia de **43** presentando un espectro similar al de los productos de partida **42** y **32** salvo por la ausencia del singulete a 2.04 ppm correspondiente al metilo de **42** y el desapantallamiento del metino C-9 provocado por la formación del éter con el sistema conjugado del BODIPY, apareciendo ahora como un quintuplete a 5.31 ppm.

Una vez abierta la ruta sintética de **43**, se procederá en el futuro a la preparación de una mayor cantidad de dicho compuesto, con el que se abordará la síntesis de **18** siguiendo los procedimientos utilizados en la síntesis de **16**.

Se ha determinado el espectro de absorción y de emisión de fluorescencia a 25°C para el intermedio fluorescente **43** disuelto en acetonitrilo (Disolución de **43** de concentración $1.7 \cdot 10^{-5} \text{M}$). (Tabla 1 y figura 7)



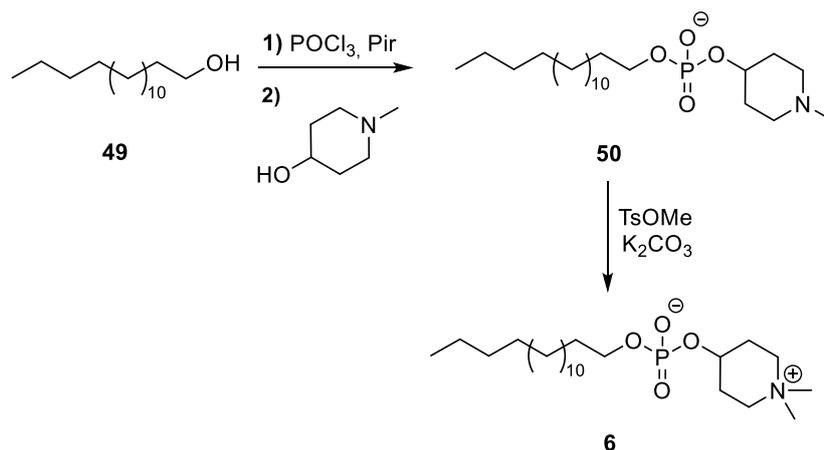
	$\lambda_{\text{Abs}}(\text{máx})/\text{nm}$	$\epsilon / \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$	$\lambda_{\text{em}}(\text{máx})/\text{nm}$	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$
43	441	35000	485	468

Figura 7 y Tabla 1. Resumen de los resultados de la medida de fluorescencia de **43**.

Síntesis de análogos de perifosina (6)

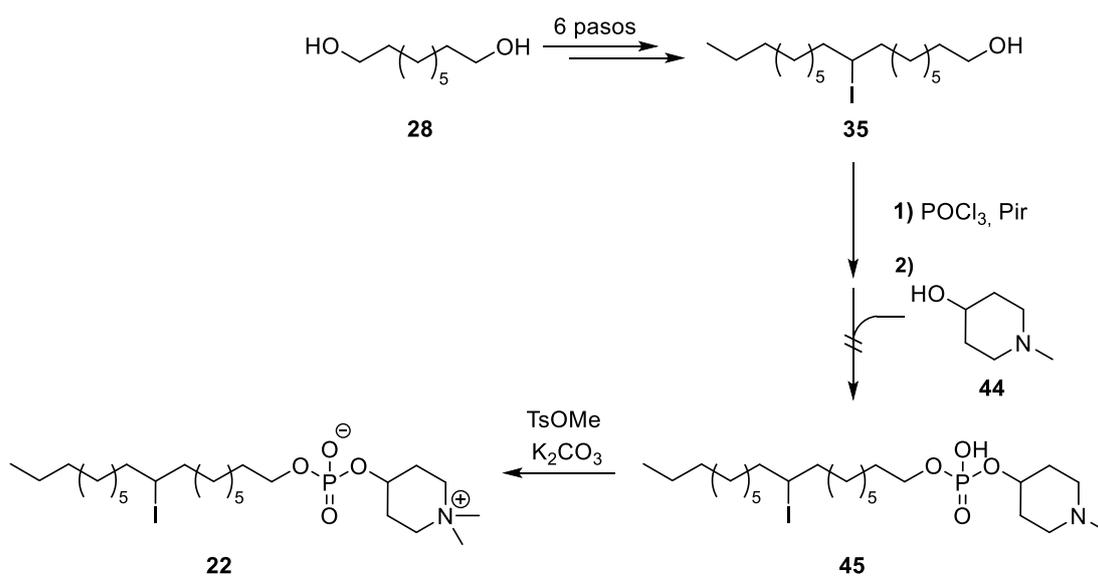
5.4. Aproximación sintética de perifosina yodada 22 e insaturada 20

La metodología conocida de síntesis de perifosina⁴⁸, se desarrolla de acuerdo al siguiente esquema (Esquema 9), en el que como se puede observar, primero se realiza en una etapa desde **49** la obtención del intermedio **50** y en la última etapa sintética se procede a la metilación del derivado de piperidina, **50** con tosilato de metilo obteniéndose **6**.



Esquema 9

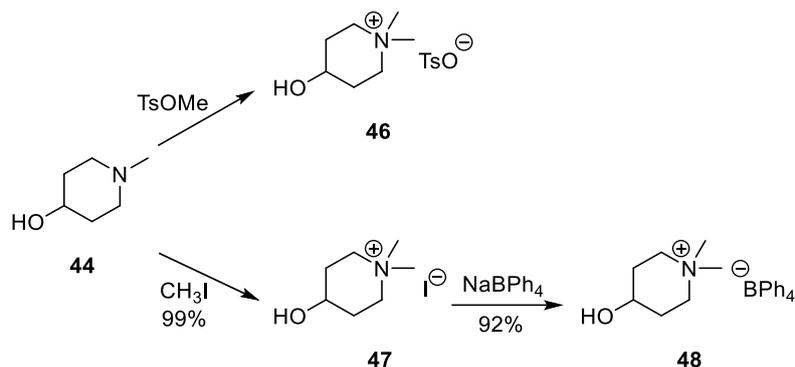
Esta metodología no se puede aplicar a la síntesis de la perifosina yodada, **22**, con el yodoalcohol **35** como intermedio, dado que el yododerivado podría alquilar a la hidroximetilpiperidina (Esquema 10).



Esquema 10

En consecuencia, hay que buscar una metodología alternativa en la que se utilice directamente la sal cuaternaria de la amina, análoga a la colina. Por ello, en primer lugar se procedió a la obtención de dicha sal (Esquema 11).

Dado que en algunas síntesis de análogos de perifosina utiliza la metilación final por reacción con tosilato de metilo⁴⁸ (Esquema 9), esta fue la primera alternativa que se utilizó.

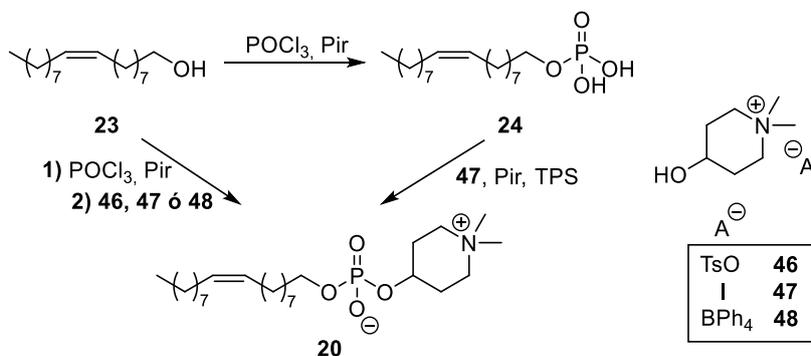


Esquema 11

En la reacción de **44** con TsOMe se obtiene una mezcla de la que resultó complicado el aislamiento de **46**. Sin embargo, cuando se realiza la metilación de **44** con CH₃I, se consigue el producto de metilación, **47**, con rendimiento cuantitativo. En el espectro de RMN ¹H en CD₃OD de **47**, se observa además de la señal de los H geminales al grupo hidroxilo 3.98 ppm, las señales de dos metilos a 3.16 y 3.14 ppm. La utilización de **47** en la síntesis de análogos de perifosina, como se verá más adelante, resulta ineficaz debido a su baja solubilidad en disolventes adecuados (tetrahidrofurano, diclorometano, piridina) para realizar la reacción de formación de la APC. Únicamente puede utilizarse **47** haciendo la reacción en DMF.

Para mejorar la solubilidad de **47**, se realiza un cambio iónico de forma análoga al realizado para la colina. Cuando se adiciona una disolución acuosa de NaBPh₄ sobre una disolución acuosa de **47**, se produce la precipitación de **48**. Dicha sal, **48**, a diferencia de **47** se solubiliza perfectamente en piridina. En su espectro de RMN ¹H (DMSO-D₆) se observan las señales de los dos metilos a 3.04 y 3.00 ppm así como el hidrógeno geminal al hidroxilo a 3.73 ppm.

Se han realizado diferentes ensayos para la síntesis de **20** (Esquema 12).



Esquema 12

La obtención de la perifosina insaturada **20** utilizando el yoduro **47** se intentó utilizando la metodología directa desde **23** o en dos pasos aislándose el intermedio **24**.

En la transformación de **23** con POCl₃ en piridina y diclorometano a temperatura ambiente, después de 24 h de reacción. Después, se elimina el diclorometano y se añade, en el mismo matraz de reacción, el yoduro **47** disuelto en DMF. Se realizaron diferentes pruebas variando el tiempo de reacción, la temperatura y la proporción molar de **47** respecto a **23**. (Tabla 2). Transcurrido el tiempo de reacción, el producto bruto se manipula de dos formas diferentes. Por una lado, se extrae con CHCl₃ y se cromatografía en columna eluyendo con CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5), separando **24** con pequeño rendimiento (Entradas 2, 3 y 4). Por otro lado, cuando la parte soluble en CHCl₃ se lava con H₂O (Entrada 1), se obtiene **24** con buen rendimiento (78%). En la fase acuosa, únicamente se observa la presencia de **47**. En ninguno de los dos casos se identifica la presencia de **20**.

De la reacción del derivado **24**, en presencia de TPS y **47** en piridina y DMF (Entrada 5), calentando a 60°C durante 6 h, tampoco pudo aislarse la perifosina insaturada **20**. También se ensayó la reacción de **23** con **46** y con **48**. En ambos casos se producen mezclas complejas de reacción de las que no se consigue el compuesto **20**.

En el futuro se ensayará la reacción de **24** con **48** en presencia de TPS que es la metodología más ampliamente utilizada en la síntesis de este tipo de compuestos.

Tabla 2.

Entrada	Sustrato	Disolvente	Sal	Eq**	t/h	Temperatura	24 (%)
1	23	DMF	47	4	12	t.a.	78
2	23	DMF	47	4	12	t.a.	9
3	23	DMF	47	4	12 / 12	t.a. / 60°C	3
4	23	DMF	47	2	12	60°C	2
5	24	DMF	47*	4	6	60°C	-
6	23	Piridina	46	4	24 / 5	t.a. / 40°C	-
7	23	Piridina	48	4	24 / 5	t.a. / 40°C	-

* La reacción con **24** como sustrato se realiza en presencia de TPS.

** Se indica como equivalentes (Eq) la relación de mol sal (**46-48**)/mol **23** ó **24** según corresponda.

6. Conclusiones

- I. Los alquil éter fosfolípidos (AEPs) y las alquilfosfocolinas (APCs) constituyen un importante grupo de potenciales fármacos con una gran variedad de actividades biológicas.

La actividad antitumoral de estos lípidos antitumorales (ATLs) es de gran interés. Actúan a través de mecanismos complejos y no del todo conocidos, principalmente a nivel de membrana, sobre los denominados lípidos *rafts*.
- II. Se ha realizado la síntesis de una serie de éteres lipídicos antitumorales análogos de miltefosina: miltefosina insaturada (**13**), miltefosina yodada (**14** y **16**) así como el intermedio avanzado **43** para la síntesis de miltefosina fluorescente (**18**).
- III. La purificación de las alquilfosfocolinas es compleja debido a la alta retención en la fase estacionaria. En la separación de **16**, se ha utilizado un procedimiento en el que primero se realiza un cambio iónico con amberlita MB3, lo que facilita la posterior separación cromatográfica sobre gel de sílice.
- IV. Hasta donde se ha podido comprobar, es la primera vez que se caracteriza el tetrafenilborato de 4-hidroxi-*N,N*-dimetilpiperidinio, **48**, y dada su solubilidad parece ser la sal más conveniente para la realización de los derivados de perifosina.
- V. Los productos **13** y **16** se han enviado al CIB-CSIC donde se realizarán los estudios de actividad biológica. En función de los resultados de las pruebas de actividad biológica para dichos análogos, se completarán los estudios SAR y se orientarán los futuros objetivos sintéticos.

7. Bibliografía

- (1) OMS, Cáncer [Internet]. Who.int. 2016 [Citado: 28 Junio 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/en/>.
- (2) Eibl, H.; Unger, C. Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. *Cancer Treat. Rev.* **1990**, *17*, 233-242.
- (3) Gunstone, F. D. "The Chemistry of oils and fats. Sources, Composition, Properties and Uses. *CRC Press, Oxford, UK.* **2001**.
- (4) Pachioni Jde, A.; Magalhaes, J. G.; Lima, E. J.; Bueno Lde, M.; Barbosa, J. F.; de Sa, M. M.; Rangel-Yagui, C. O. Alkylphospholipids - a promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, *16*, 742-759.
- (5) Jeswani, G.; Alexander, A.; Saraf, S.; Saraf, S.; Qureshi, A.; Ajazuddin. Recent approaches for reducing hemolytic activity of chemotherapeutic agents. *J. Control. Release* **2015**, *211*, 10-21.
- (6) Gil-Meson, A.; Roncero, A. M.; Tobal, I. E.; Basabe, P.; Diez, D.; Mollinedo, F.; Marcos, I. S. Synthesis of Bioconjugate Sesterterpenoids with Phospholipids and Polyunsaturated Fatty Acids. *Molecules* **2016**, *21*, 47.
- (7) Gil Mesón, A. Síntesis de éteres lipídicos antitumorales. Bioconjugados de sesterterpenoides con glicerofosfolípidos, alquil-acil-gliceroles y PUFAs. *Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca* **2013**.
- (8) Jaffres, P. A.; Gajate, C.; Bouchet, A. M.; Couthon-Gourves, H.; Chantome, A.; Potier-Cartereau, M.; Besson, P.; Bougnoux, P.; Mollinedo, F.; Vandier, C. Alkyl ether lipids, ion channels and lipid raft reorganization in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **2016**.
- (9) Bonilla, X.; Dakir el, H.; Mollinedo, F.; Gajate, C. Endoplasmic reticulum targeting in Ewing's sarcoma by the alkylphospholipid analog edelfosine. *Oncotarget* **2015**, *6*, 14596-14613.
- (10) Mollinedo, F.; Fernandez-Luna, J. L.; Gajate, C.; Martin-Martin, B.; Benito, A.; Martinez-Dalmau, R.; Modolell, M. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1320-1328.
- (11) Gajate, C.; Fonteriz, R. I.; Cabaner, C.; Alvarez-Noves, G.; Alvarez-Rodriguez, Y.; Modolell, M.; Mollinedo, F. Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* **2000**, *85*, 674-682.
- (12) Cuesta-Marban, A.; Botet, J.; Czyz, O.; Cacharro, L. M.; Gajate, C.; Hornillos, V.; Delgado, J.; Zhang, H.; Amat-Guerri, F.; Acuna, A. U.; McMaster, C. R.; Revuelta, J. L.; Zaremborg, V.; Mollinedo, F. Drug uptake, lipid rafts, and vesicle trafficking modulate resistance to an anticancer lysophosphatidylcholine analogue in yeast. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 8405-8418.
- (13) Maxfield, F. R. Plasma membrane microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 483-487.
- (14) Ikonen, E. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 470-477.
- (15) Karnovsky, M. J.; Kleinfeld, A. M.; Hoover, R. L.; Klausner, R. D. The concept of lipid domains in membranes. *J. Cell. Biol.* **1982**, *94*, 1-6.
- (16) Brown, D. A.; London, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17221-17224.
- (17) Simons, K.; Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, *387*, 569-572.
- (18) Mollinedo, F.; Gajate, C. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv. Biol. Regul.* **2015**, *57*, 130-146.

- (19) Gajate, C.; Mollinedo, F. Lipid rafts and raft-mediated supramolecular entities in the regulation of CD95 death receptor apoptotic signaling. *Apoptosis* **2015**, *20*, 584-606.
- (20) Gajate, C.; Mollinedo, F. Lipid raft-mediated Fas/CD95 apoptotic signaling in leukemic cells and normal leukocytes and therapeutic implications. *J. Leukoc. Biol.* **2015**, *98*, 739-759.
- (21) Patra, S. K. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1785*, 182-206.
- (22) Lasserre, R.; Guo, X. J.; Conchonaud, F.; Hamon, Y.; Hawchar, O.; Bernard, A. M.; Soudja, S. M.; Lenne, P. F.; Rigneault, H.; Olive, D.; Bismuth, G.; Nunes, J. A.; Payrastré, B.; Marguet, D.; He, H. T. Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 538-547.
- (23) Reis-Sobreiro, M.; Roue, G.; Moros, A.; Gajate, C.; de la Iglesia-Vicente, J.; Colomer, D.; Mollinedo, F. Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J.* **2013**, *3*, e118.
- (24) Tosi, M. R.; Tugnoli, V. Cholesteryl esters in malignancy. *Clin. Chim. Acta* **2005**, *359*, 27-45.
- (25) Dessi, S.; Batetta, B.; Pulisci, D.; Spano, O.; Anchisi, C.; Tessitore, L.; Costelli, P.; Baccino, F. M.; Arosio, E.; Pani, P. Cholesterol content in tumor tissues is inversely associated with high-density lipoprotein cholesterol in serum in patients with gastrointestinal cancer. *Cancer* **1994**, *73*, 253-258.
- (26) Kolanjiappan, K.; Ramachandran, C. R.; Manoharan, S. Biochemical changes in tumor tissues of oral cancer patients. *Clin. Biochem.* **2003**, *36*, 61-65.
- (27) Markova, A. A.; Plyavnik, N. V.; Morozova, N. G.; Maslov, M. A.; Shtil, A. A. Antitumor phosphate-containing lipids and non-phosphorus alkyl cationic glycerolipids: chemical structures and perspectives of drug development. *Russ. Chem. B+* **2014**, *63*, 1081-1087.
- (28) Ravu, R. R.; Chen, Y. L.; Jacob, M. R.; Pan, X.; Agarwal, A. K.; Khan, S. I.; Heitman, J.; Clark, A. M.; Li, X. C. Synthesis and antifungal activities of miltefosine analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4828-4831.
- (29) Lukac, M.; Mojzis, J.; Mojzisova, G.; Mrva, M.; Ondriska, F.; Valentova, J.; Lacko, I.; Bukovsky, M.; Devinsky, F.; Karlovska, J. Dialkylamino and nitrogen heterocyclic analogues of hexadecylphosphocholine and cetyltrimethylammonium bromide: effect of phosphate group and environment of the ammonium cation on their biological activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4970-4977.
- (30) Dorlo, T. P. C.; Balasegaram, M.; Beijnen, J. H.; de Vries, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemoth.* **2012**, *67*, 2576-2597.
- (31) Henke, G.; Meier, V.; Lindner, L. H.; Eibl, H.; Bamberg, M.; Belka, C.; Budasch, W.; Jendrossek, V. Effects of ionizing radiation in combination with Erufosine on T98G glioblastoma xenograft tumours: a study in NMRI nu/nu mice. *Radiat. Oncol.* **2012**, *7*, 172.
- (32) Fensterle, J.; Aicher, B.; Seipelt, I.; Teifel, M.; Engel, J. Current view on the mechanism of action of perifosine in cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2014**, *14*, 629-635.
- (33) Mollinedo, F. *Expert. Opin. Ther. Patents* **2007**, *17*, 385-405.
- (34) Figg, W. D.; Monga, M.; Headlee, D.; Shah, A.; Chau, C. H.; Peer, C.; Messman, R.; Elsayed, Y. A.; Murgo, A. J.; Melillo, G.; Ryan, Q. C.; Kalnitskiy, M.; Senderowicz, A. M.; Hollingshead, M.; Arbuck, S. G.; Sausville, E. A. A phase I and pharmacokinetic study of oral perifosine with different loading schedules in patients with refractory neoplasms. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2014**, *74*, 955-967.
- (35) Guidetti, A.; Carlo-Stella, C.; Locatelli, S. L.; Malorni, W.; Mortarini, R.; Viviani, S.; Russo, D.; Marchiano, A.; Sorasio, R.; Doderò, A.; Farina, L.; Giordano, L.; Di

Nicola, M.; Anichini, A.; Corradini, P.; Gianni, A. M. Phase II study of perifosine and sorafenib dual-targeted therapy in patients with relapsed or refractory lymphoproliferative diseases. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 5641-5651.

(36) de Sa, M. M.; Sresht, V.; Rangel-Yagui, C. O.; Blankschtein, D. Understanding Miltefosine-Membrane Interactions Using Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir* **2015**, *31*, 4503-4512.

(37) Croft, S. L. Kinetoplastida: new therapeutic strategies. *Parasite* **2008**, *15*, 522-527.

(38) Ritmeijer, K.; Dejenie, A.; Assefa, Y.; Hundie, T. B.; Mesure, J.; Boots, G.; den Boer, M.; Davidson, R. N. A Comparison of Miltefosine and Sodium Stibogluconate for Treatment of Visceral Leishmaniasis in an Ethiopian Population with High Prevalence of HIV Infection. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *43*, 357-364.

(39) Diro, E.; Lynen, L.; Ritmeijer, K.; Boelaert, M.; Hailu, A.; van Griensven, J. Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2869.

(40) Lípidos rafts, células madre cancerígenas y microentorno tumoral inflamatorio en la terapia del cáncer: análogos alquilfosfolípidos como agentes líder en terapias dirigidas a los lípidos rafts. *Investigador principal: F. G. Mollinedo.*

(41) Huang, Z.; Szoka, F. C., Jr. Sterol-modified phospholipids: cholesterol and phospholipid chimeras with improved biomembrane properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15702-15712.

(42) Pedersen, P. J.; Christensen, M. S.; Ruyschaert, T.; Linderoth, L.; Andresen, T. L.; Melander, F.; Mouritsen, O. G.; Madsen, R.; Clausen, M. H. Synthesis and biophysical characterization of chlorambucil anticancer ether lipid prodrugs. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3408-3415.

(43) Samadder, P.; Bittman, R.; Byun, H. S.; Arthur, G. Synthesis and use of novel ether phospholipid enantiomers to probe the molecular basis of the antitumor Effects of alkyllysophospholipids: correlation of differential activation of c-Jun NH(2)-terminal protein kinase with antiproliferative effects in neuronal tumor cells. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2710-2713.

(44) Weber, B.; Seebach, D. Highly enantioselective addition of primary alkyl Grignard reagents to carbocyclic and heterocyclic arylketones in the presence of magnesium TADDOLate preparative and mechanistic aspects. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 6117-6128.

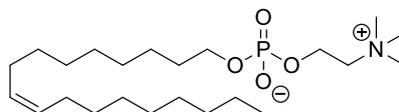
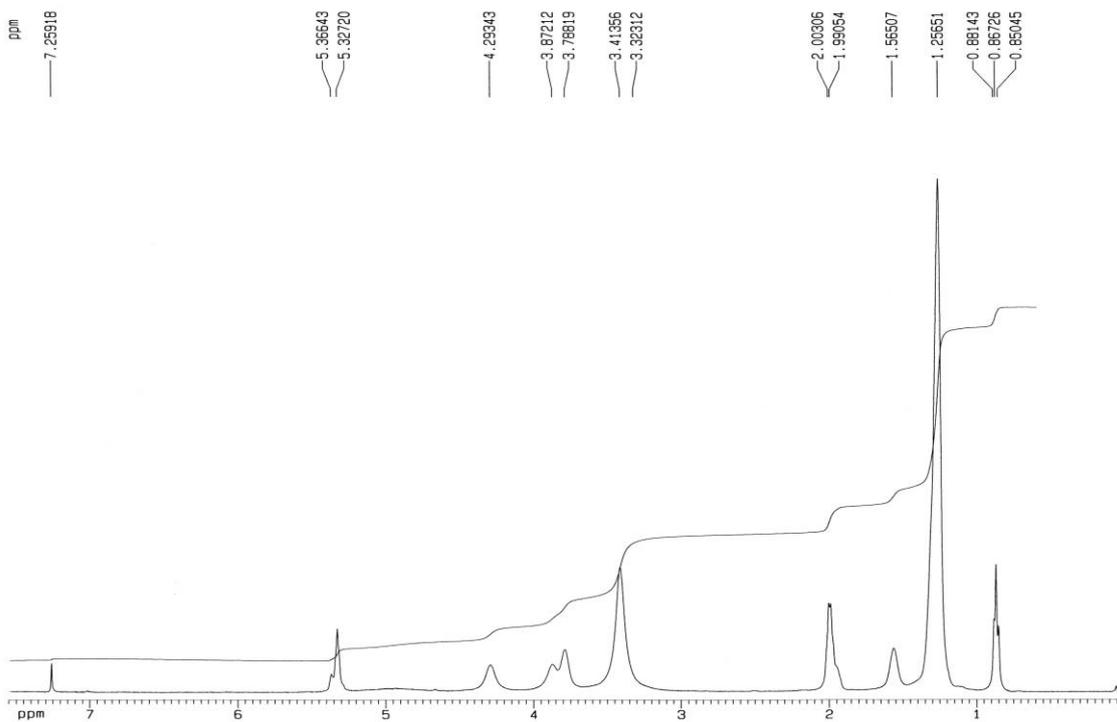
(45) Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.

(46) Goud, T. V.; Tutar, A.; Biellmann, J.-F. Synthesis of 8-heteroatom-substituted 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene dyes (BODIPY). *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5084-5091.

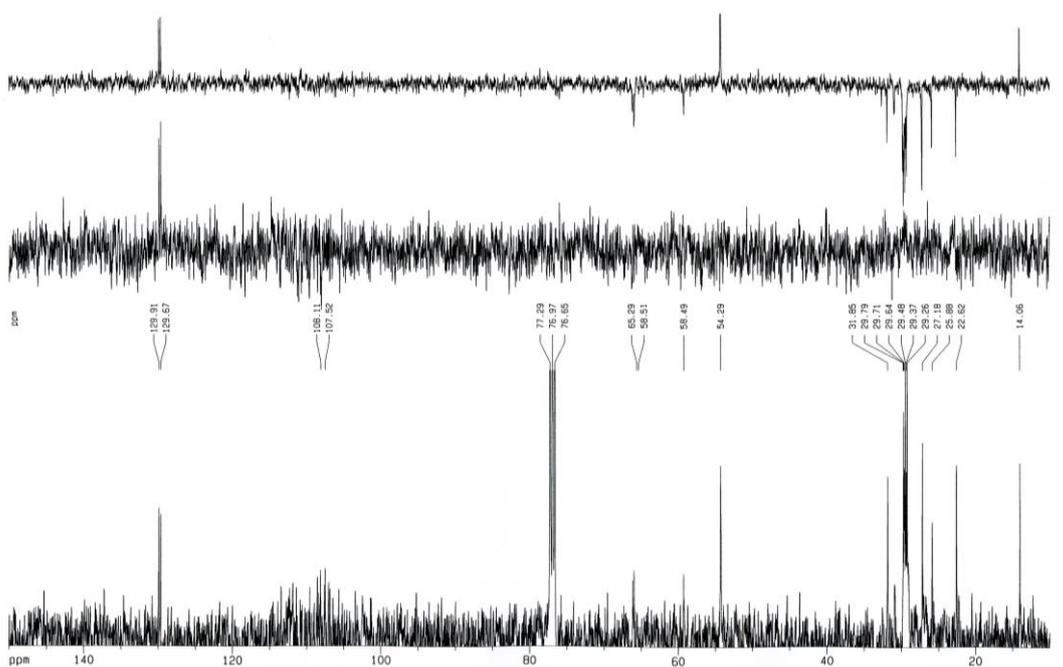
(47) Flores-Rizo, J. O.; Esnal, I.; Osorio-Martinez, C. A.; Gomez-Duran, C. F. A.; Banuelos, J.; Lopez Arbeloa, I.; Pannell, K. H.; Metta-Magana, A. J.; Pena-Cabrera, E. 8-Alkoxy- and 8-Aryloxy-BODIPYs: Straightforward Fluorescent Tagging of Alcohols and Phenols. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5867-5877.

(48) Mravljak, J.; Zeisig, R.; Pecar, S. Synthesis and biological evaluation of spin-labeled alkylphospholipid analogs. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6393-6399.

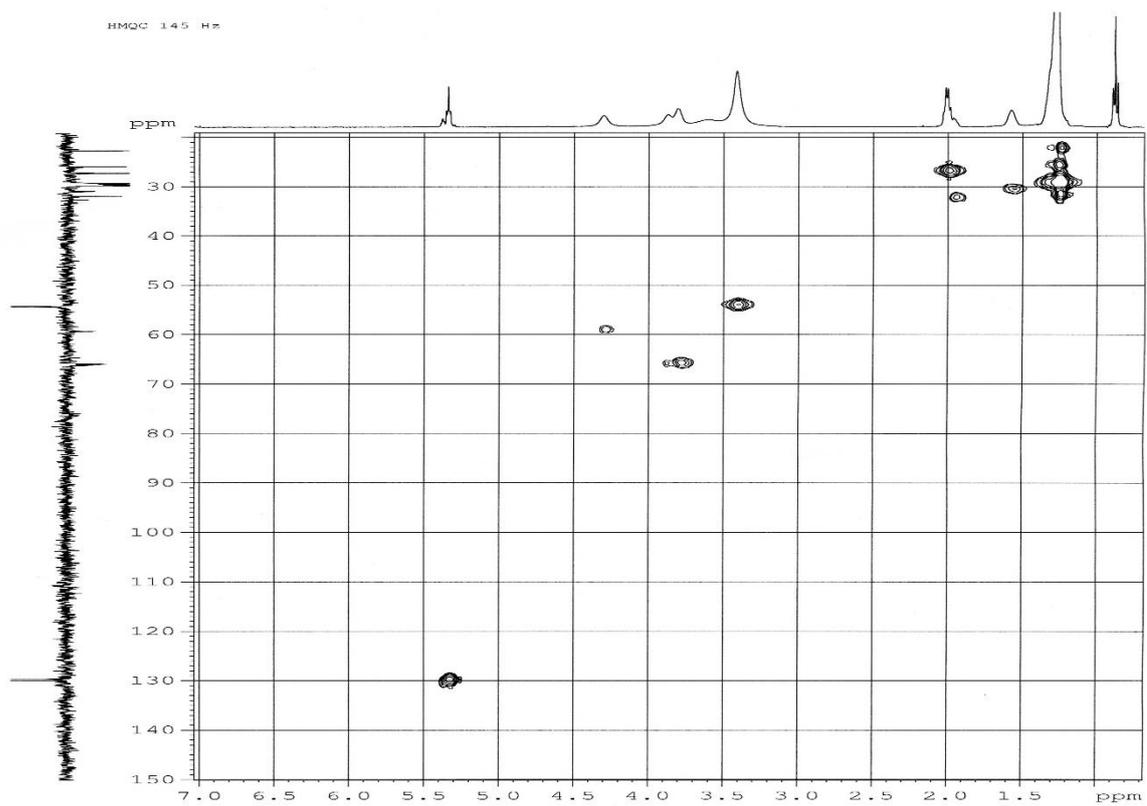
Anexo I. Espectroscopía



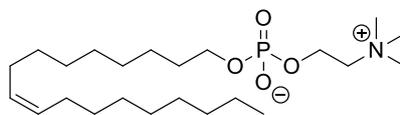
13



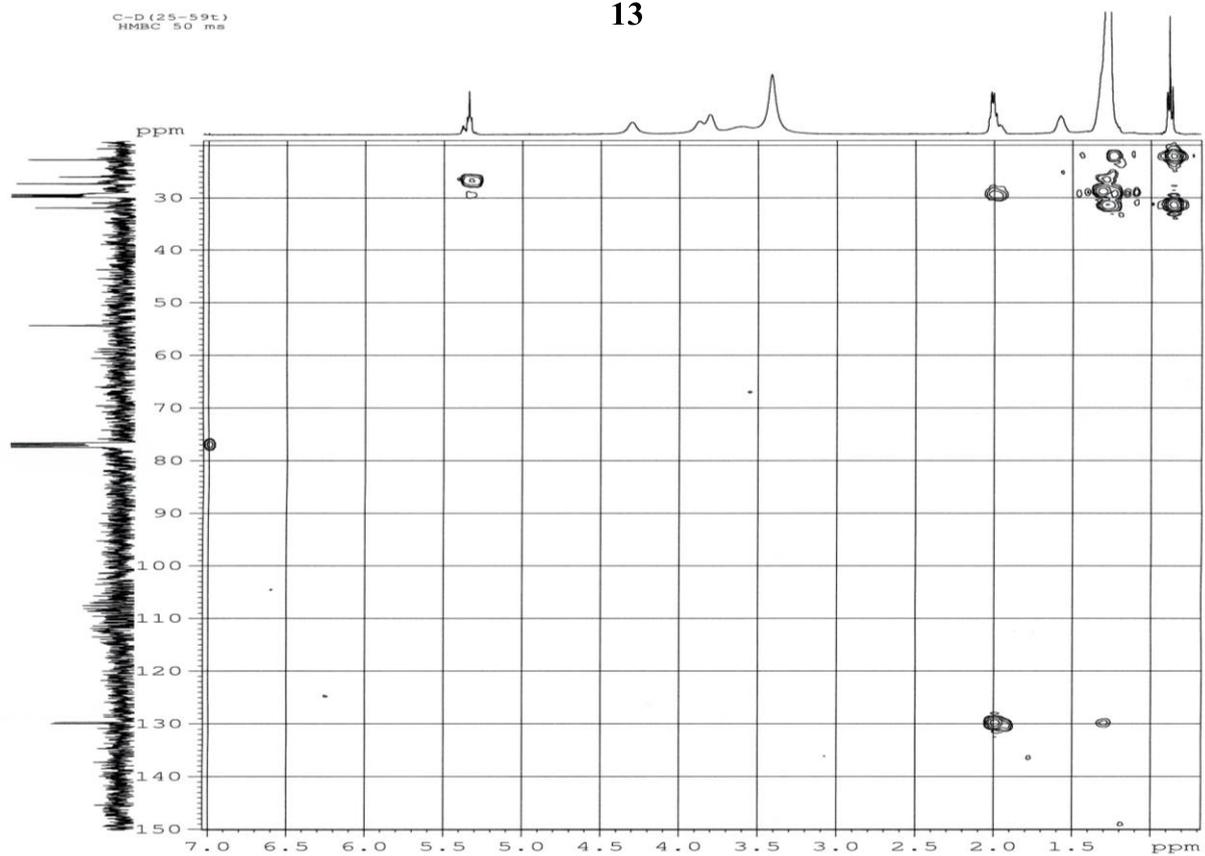
HMBC

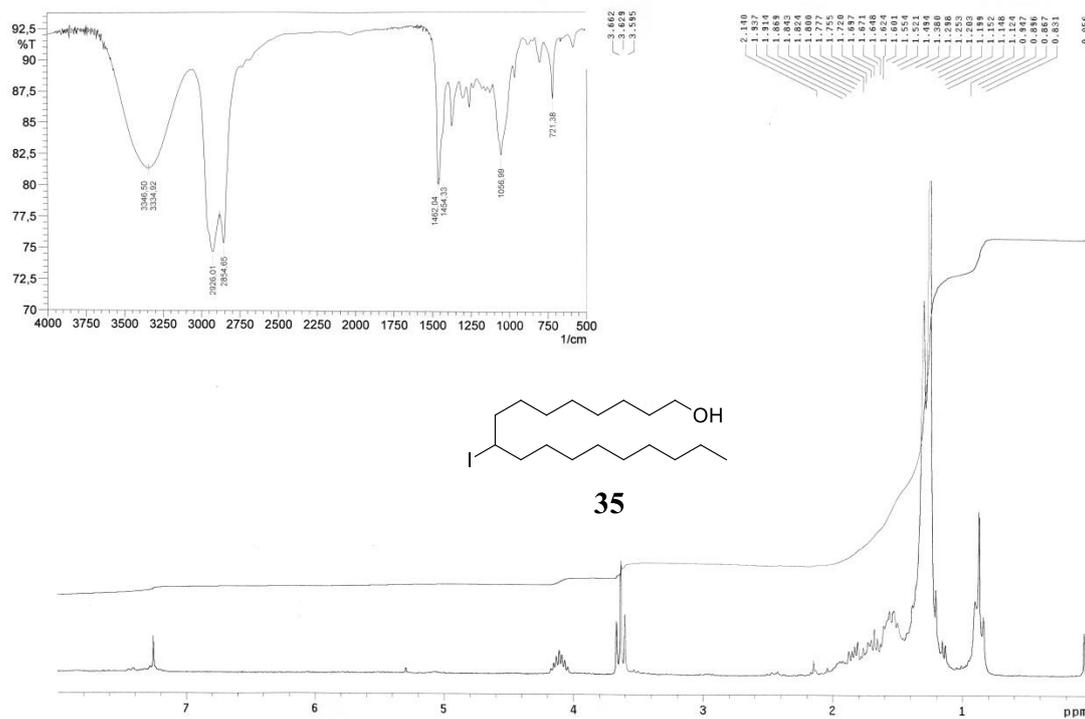


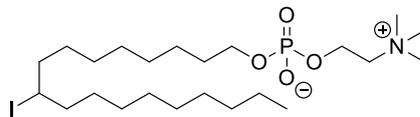
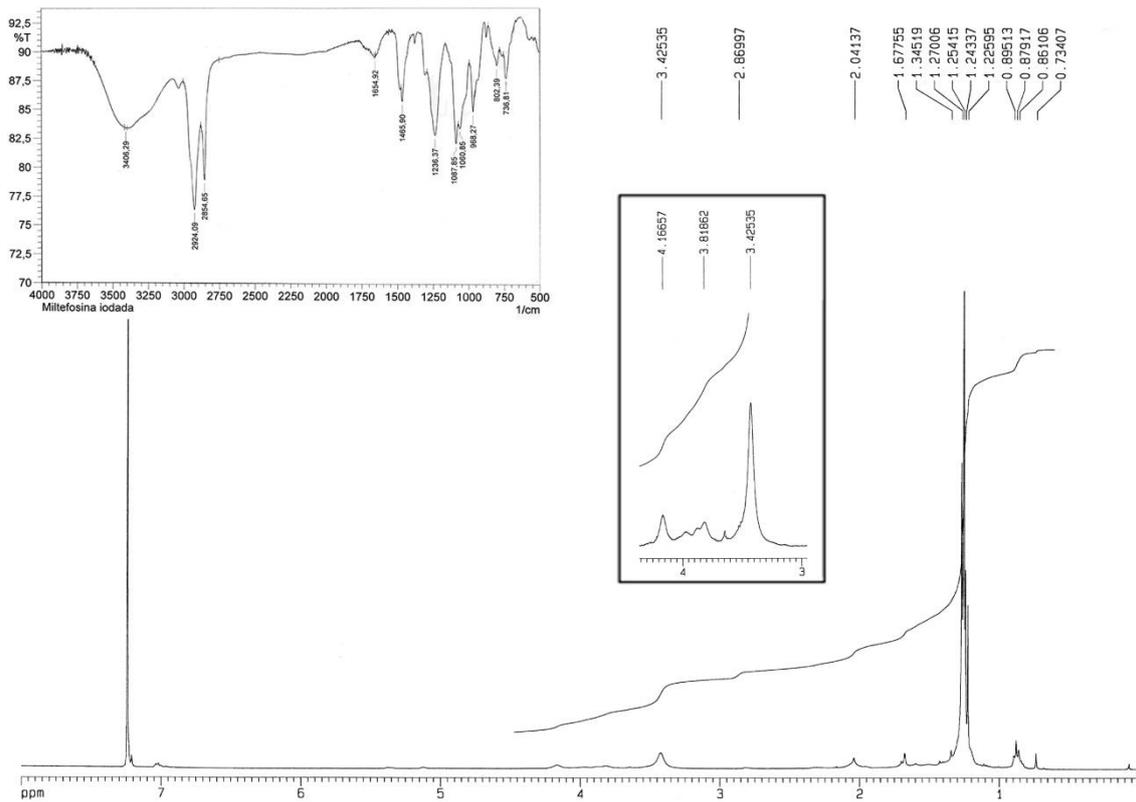
HMQC



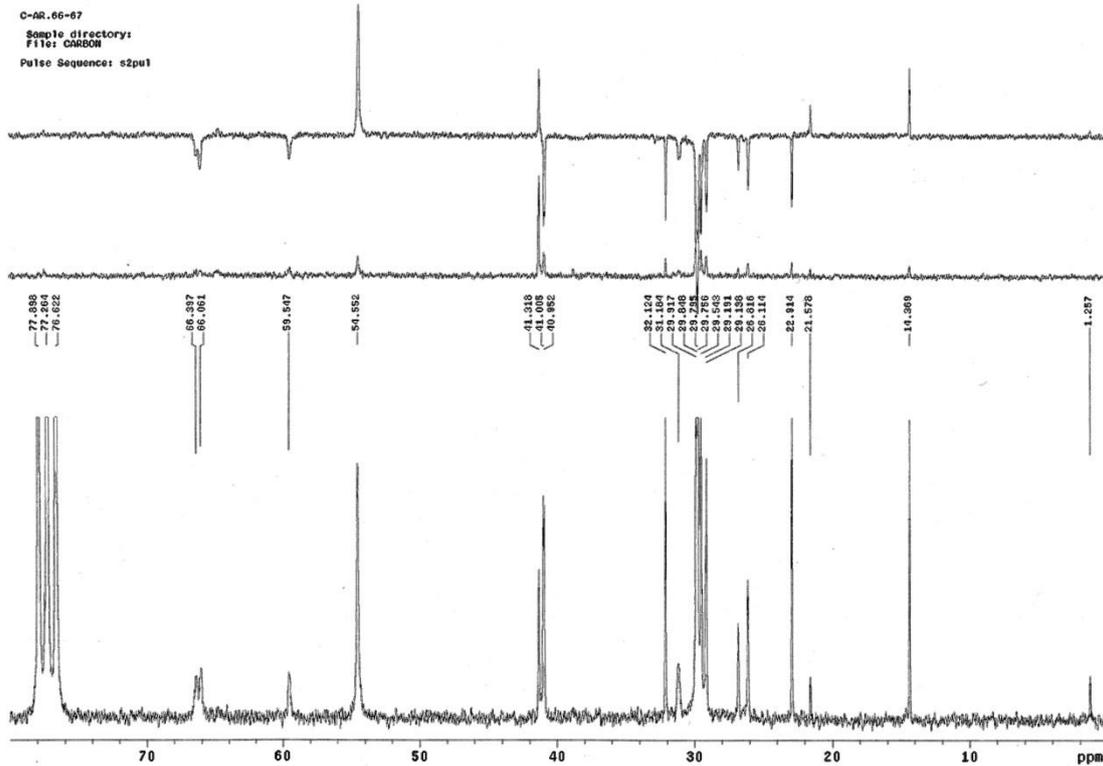
13

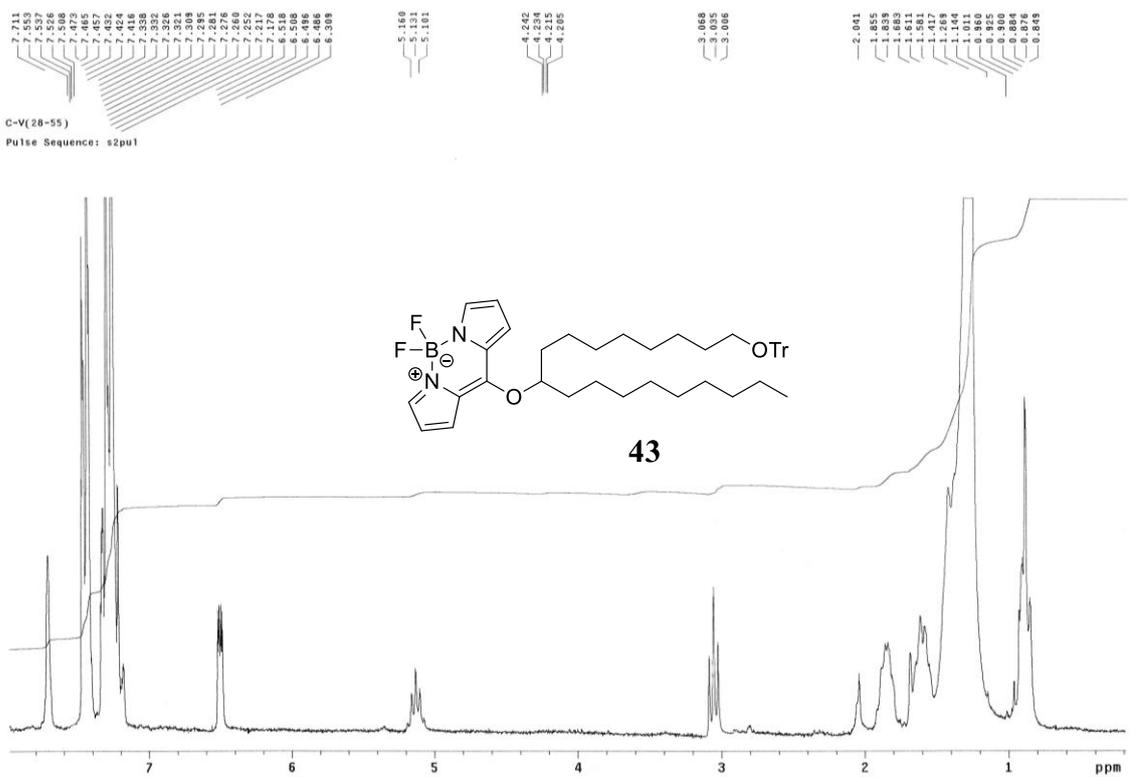
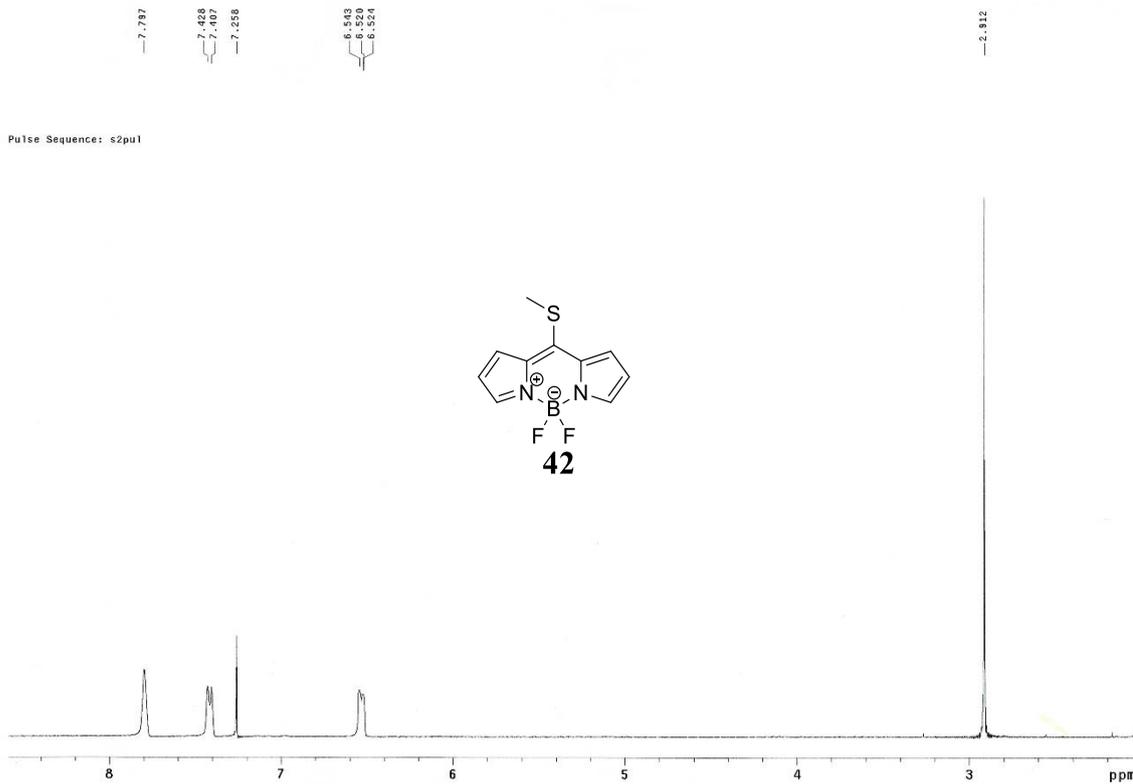


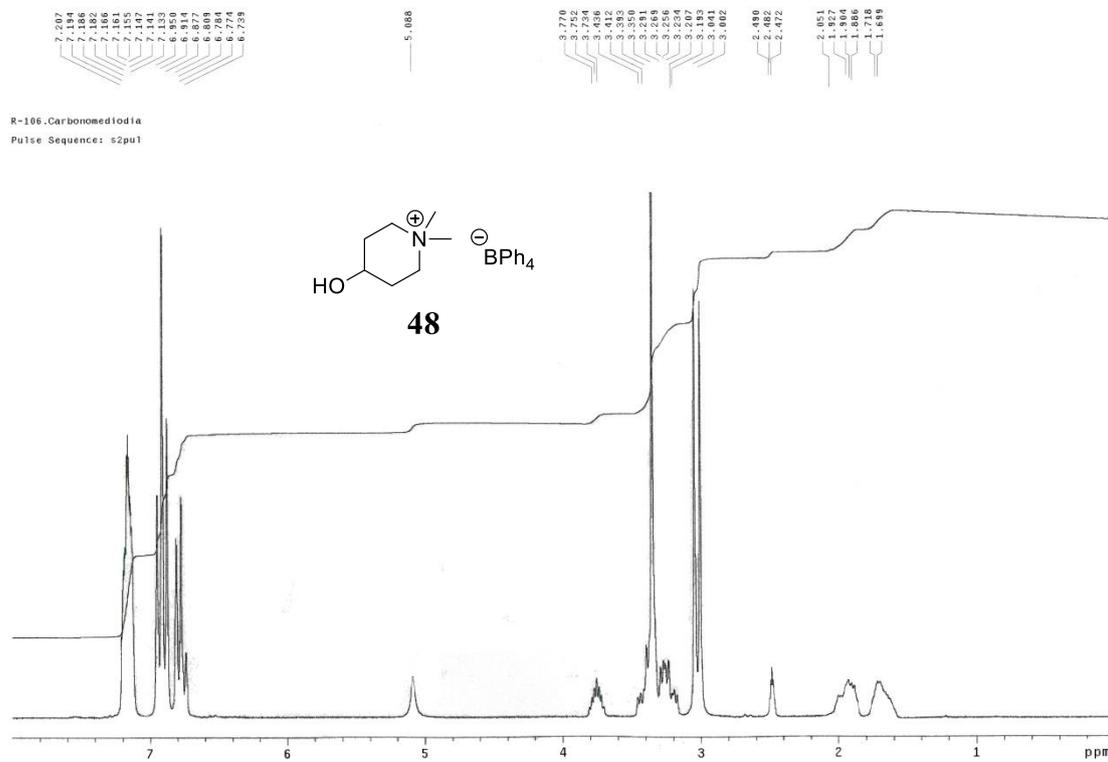
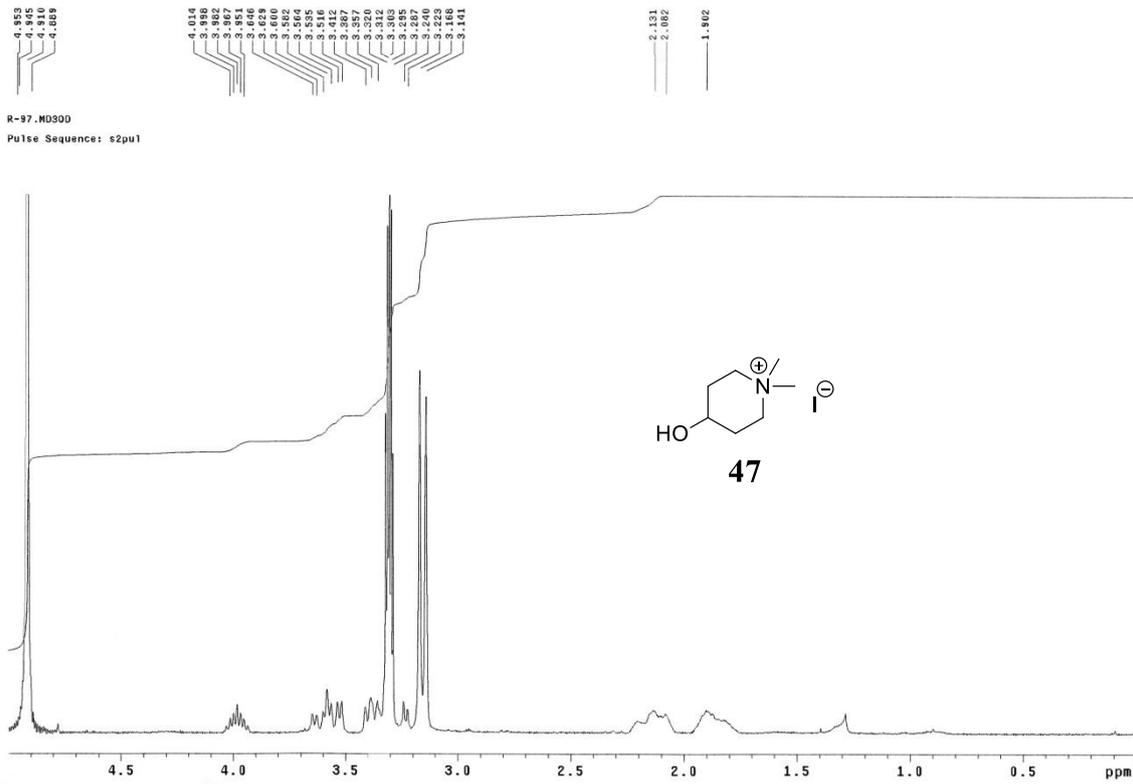


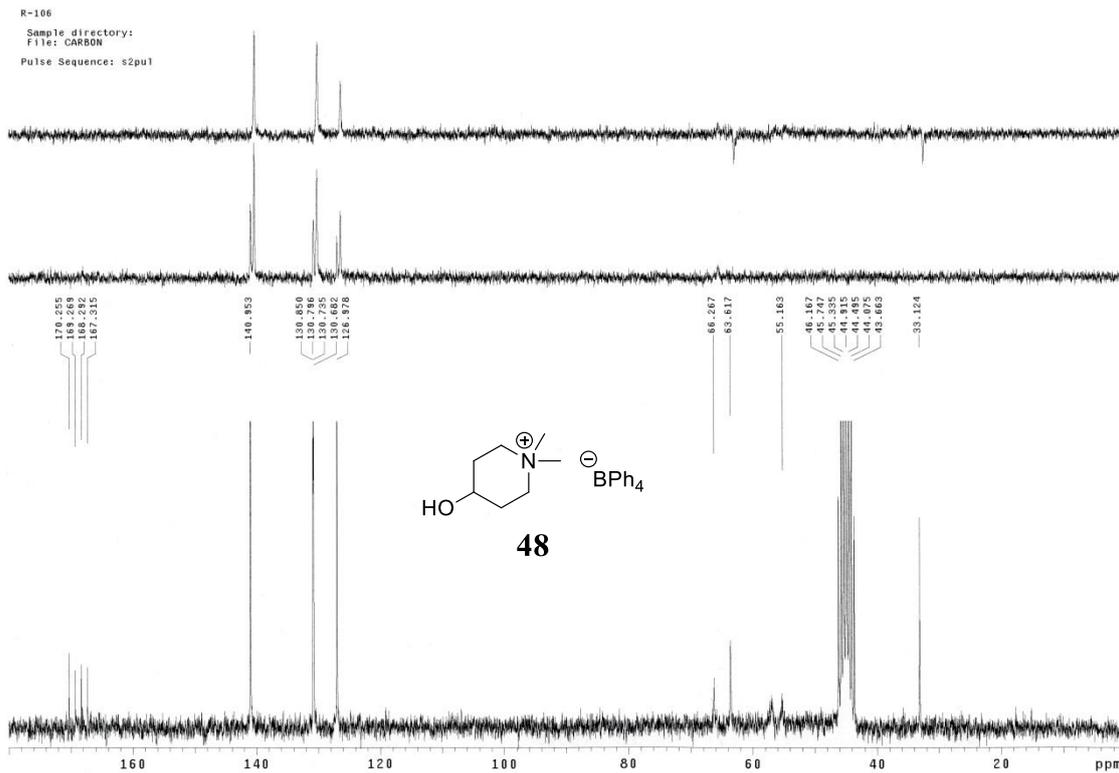


16









Anexo II. Índice de moléculas

