

**ALQUILFOSFOLÍPIDOS Y BIOCONJUGADOS
ANTITUMORALES ANÁLOGOS DE MILTEFOSINA Y
PERIFOSINA: DISEÑO, SÍNTESIS Y BIOACTIVIDAD**

*ALKYLPHOSPHOLIPIDS AND BIOCONJUGATED ANTITUMORAL
COMPOUNDS ANALOGUES OF MILTEFOSINE AND PERIFOSINE:
DESIGN, SYNTHESIS AND BIOACTIVITY*



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

IGNACIO ENRIQUE TOBAL SALCEDO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

OCTUBRE 2022

**ALQUILFOSFOLÍPIDOS Y BIOCONJUGADOS
ANTITUMORALES ANÁLOGOS DE MILTEFOSINA Y
PERIFOSINA: DISEÑO, SÍNTESIS Y BIOACTIVIDAD**

*ALKYLPHOSPHOLIPIDS AND BIOCONJUGATED ANTITUMORAL
COMPOUNDS ANALOGUES OF MILTEFOSINE AND PERIFOSINE:
DESIGN, SYNTHESIS AND BIOACTIVITY*



TESIS DOCTORAL

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**ALQUILFOSFOLÍPIDOS Y BIOCONJUGADOS
ANTITUMORALES ANÁLOGOS DE MILTEFOSINA Y
PERIFOSINA: DISEÑO, SÍNTESIS Y BIOACTIVIDAD**

*ALKYLPHOSPHOLIPIDS AND BIOCONJUGATED ANTITUMORAL
COMPOUNDS ANALOGUES OF MILTEFOSINE AND PERIFOSINE:
DESIGN, SYNTHESIS AND BIOACTIVITY*

Trabajo para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Fdo.: Ignacio Enrique Tobal Salcedo

Salamanca, Octubre 2022

Visado en Salamanca

Octubre 2022

Fdo.: Isidro Sánchez Marcos

Catedrático de Química Orgánica

Fdo.: David Díez Martín

Catedrático de Química Orgánica

*Muchas gracias a todos los que habéis ayudado
en cualquier momento a lo largo de las etapas de este trabajo.*

*Especialmente, a los directores de esta Tesis Doctoral:
los Profs. Dr. Isidro S. Marcos y Dr. David Díez*

Y, por supuesto, a mi familia.

A mis padres

*«Para investigar,
hay que tener la precaución de olvidarse de uno mismo.»*

Antonio Escotado Espinosa

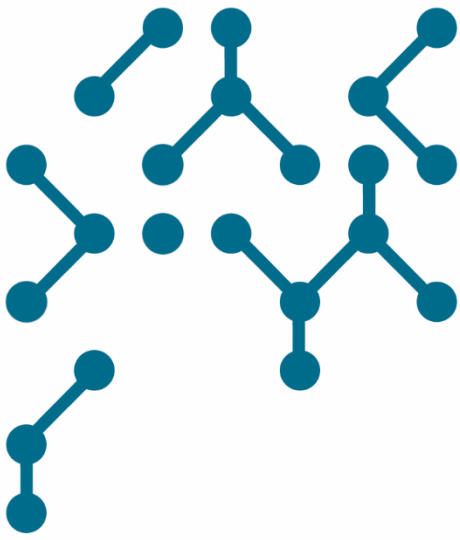
Índice

Index

Resumen	1
Abreviaturas y acrónimos	7
Introducción	13
Antecedentes	17
1. Lípidos antitumorales	20
1.1. Cáncer.....	20
1.2. Lípidos	21
1.3. Lípidos antitumorales, ATLS.....	26
1.4. Propiedades fisicoquímicas de los ATLS	31
1.5. Membrana celular y <i>lipid rafts</i>	32
1.6. Mecanismo de acción antitumoral de ATLS.....	35
1.7. Alquilfosfocolinas como antileishmaniosos y otras bioactividades.....	46
1.8. Ensayos clínicos y preclínicos de ATLS	48
2. Síntesis enantioselectiva de compuestos bioactivos. Agentes neurotróficos....	50
2.1. Diterpenos bicíclicos de esqueleto halimano. Biosíntesis general	52
2.2. <i>Halimium viscosum</i> . Quimiotipos y nuevos esqueletos carbonados. Halimanos	54
2.3. Ácido <i>ent</i> -halímico como material de partida en síntesis	64
2.4. Halimanos naturales antibacterianos	66
2.5. Agentes neurotróficos	75
2.6. Bioconjugados. γ -Hidroxibutenolida como farmacóforo de acción antitumoral	79
3. Bibliografía de Antecedentes	86
Objetivos	99

Discusión de resultados	109
1. Lípidos antitumorales	111
1.1. Síntesis de los análogos de miltefosina funcionalizados en mitad de cadena...	111
1.2. Síntesis del análogo insaturado de perifosina 25	120
1.3. Síntesis de análogos de miltefosina funcionalizados en C16	126
1.4. Síntesis de análogos de miltefosina con fluoróforo en la cadena	134
2. Aislamiento y preparación de halimanos naturales y sintéticos para su evaluación biológica como neurotróficos y antiparasitarios	142
3. Aproximación sintética a diterpenolidas del tipo tessmannolida y secochilotrínolida	146
3.1. Obtención de la enona 78	150
3.2. Preparación del intermedio funcionalizado en C3, 92 y 93	156
3.3. Síntesis del intermedio hidrogenado 97	158
4. Estudios biológicos	160
4.1. Evaluación de ATLs como antitumorales y frente a leishmania	160
4.2. Evaluación biológica de compuestos de esqueleto halimano	170
5. Bibliografía de <i>Discusión de resultados</i>	177
Metodología General	179
Experimental	185

Espectroscopía.....	275
Tablas de RMN ¹³C.....	407
Tablas bidimensionales.....	431
Conclusiones	461
Índice de moléculas.....	471



Resumen

Summary



En esta Tesis Doctoral se pueden distinguir dos apartados diferentes y complementarios: síntesis de éteres lipídicos antitumorales análogos de miltefosina y perifosina y utilización del ácido *ent*-halímico como material de partida para la síntesis de compuestos bioactivos (neurotróficos, antiparasitarios y antitumorales).

Dentro de la línea de investigación de síntesis de éteres lipídicos antitumorales, se han sintetizado análogos de miltefosina con insaturación en la cadena lipídica, yodados en mitad de cadena y funcionalizados al final de la cadena lipídica con función acetato, hidroxilo, éter y con un fluoróforo tipo BODIPY. También, se ha sintetizado un análogo de perifosina insaturada.

Los análogos sintetizados se han ensayado como antitumorales frente a las líneas celulares HeLa y HL-60. Además, se han evaluado como antileishmaniosos frente a *Leishmania major*. El compuesto fluorescente **49** presenta excelentes propiedades espectroscópicas de absorción y emisión, haciéndolo interesante para estudios *in vitro* de la actividad antitumoral de los ATLs, a pesar de no presentar actividad antitumoral. El análogo de perifosina **25** presenta gran actividad como antitumoral en los ensayos realizados con la línea HL-60, mientras que no presenta actividad en HeLa. Cuando **25** se ensayó como antileishmanioso en *L. major*, se observó que es capaz de secuestrar el ciclo celular de *L. major* en fase sub G0/G1, siendo más activo que miltefosina.

En la línea de investigación correspondiente a la síntesis de compuestos bioactivos a partir de ácido *ent*-halímico, se ha realizado la extracción del ácido *ent*-halímico, producto mayoritario del extracto en acetato de etilo de *Halimium viscosum*, como material de partida. Se han preparado una serie de compuestos de fácil acceso para ensayar su bioactividad como neurotróficos y como antiparasitarios frente a *S. venezuelensis*; sin observarse actividad para ninguna de las moléculas ensayadas. También, se ha avanzado en la aproximación sintética a ácido tessmánico a partir de ácido *ent*-halímico. En esta síntesis se ha optado por una estrategia sintética que tiene las siguientes etapas fundamentales: funcionalización en C-2 y C-3, hidrogenación del doble enlace $\Delta^{1,10}$, apertura del anillo A y funcionalización de la cadena lateral. En trabajos futuros se terminará la síntesis del ácido tessmánico, realizando cambios en la ruta sintética; primero rompiendo el anillo A y posteriormente realizando la hidrogenación.

This Thesis can be divided in two different and complementary research lines: Synthesis of antitumoral ether lipids analogues of miltefosine and perifosine and the use of *ent*-halimic acid as starting material for the synthesis of bioactive compounds (neurotrophic, antiparasitary and antitumoral).

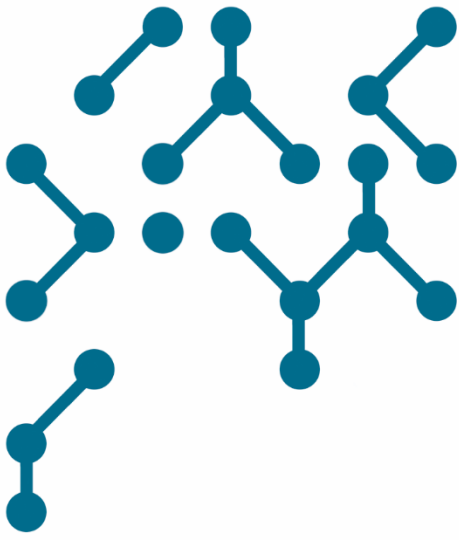
Within the research line of antitumoral ether lipids, analogues of miltefosine with unsaturation and iodine in the middle position of the lipid chain as well as functionalized at the end of the lipid chain (with acetate, hydroxyl, ether and BODIPY-type fluorophore) were synthesized. An analogue of perifosine with unsaturation in the middle position of the carbon chain was also prepared.

The synthesized analogues have been assayed as antitumor agents vs HeLa and HL-60 cell lines. In addition, compound **25** was evaluated as antileishmanial testing the activity in *Leishmania major*. The fluorescent compound **49** has excellent absorption and emission spectroscopic properties, opening the possibility of its application for *in vitro* studies of the antitumor activity of ATLs, despite not showing remarkable antitumoral activity so far.

The perifosine analogue **25**, shows great antitumoral activity against HL-60 cell line, while does not show activity against HeLa. The antileishmanial assays of **25** against *L. major* presented the unsaturated derivative **25** as a more potent antileishmanial compared with miltefosine, arresting the cell cycle of the parasite in sub G0/G1 phase.

In the research line corresponding to the synthesis of bioactive compounds using *ent*-halimic acid as starting material, it was carried out the extraction with ethyl acetate of *Halimium viscosum* isolating its major compound: *ent*-halimic acid. A series of facile accessible compounds were synthesized and evaluated as antiparasitary against *S. venezuelensis* and neurotrophic, but no activity was observed so far.

In this work, it was also afforded a synthetic approach to tessmannic acid starting from *ent*-halimic acid. In this synthetic route, it was tried a synthetic strategy consisting on: the functionalization at C-2 and C-3, hydrogenation of the $\Delta^{1,10}$ double bond, ring-A cleavage, and functionalization of the side chain. In a continuation of this work, a different synthetic strategy will be tried; affording firstly the ring-A opening and then, the hydrogenation of the double bond.



Abreviaturas y acrónimos

Abbreviations and acronyms



Relación de las abreviaturas y acrónimos utilizados en este trabajo junto con su significado en español. Entre paréntesis y en cursiva se indica el significado en inglés y, si procede, la abreviatura o acrónimo utilizado en la redacción en inglés.

Ac	Acetilo (<i>acetyl</i>)	BODIPY	Borodipirrometano (<i>Boron-dipyrrromethene</i>)
AcN	Acetonitrilo (<i>acetonitrile</i>)	c	cuartete, RMN (<i>q: quartet, NMR</i>)
AEP	Alquiléter Fosfolípidos (<i>Alkyl-ether phospholipids</i>)	calcd	Calculado (<i>calculated</i>)
AcOEt	Acetato de etilo (<i>EtOAc, ethyl acetate</i>)	Caspasa	Cisteinil-aspartato proteasa (<i>caspase: cysteinyl-aspartate protease</i>)
Akt	Proteína kinasa B (<i>Protein kinase B</i>)	CC	Cromatografía de columna (<i>column chromatography</i>)
AktL	Sustrato de Akt/proteína kinasa B (<i>Akt/Protein kinase B ligand</i>)	CCT	Fosfocolina citidiltransferasa (<i>phosphocholine cytidylyltransferase</i>)
Apaf-1	Proteasa factor de activación de apoptosis (<i>Apoptosis protease-activating factor-1</i>)	Ch	Colina (<i>Choline</i>)
APC	Alquilfosfocolinas (<i>Alkylphosphocholines</i>)	Cit C	Citocromo C (<i>Cytochrome C</i>)
APCI	Ionización química a presión atmosférica (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)	CMC	Concentración micelar crítica (<i>Critical micelle concentration</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	CPP	Difosfato de copalilo (<i>copaly diphosphate</i>)
ATL	Lípidos antitumorales (<i>Antitumour Lipids</i>)	CSC	Células madre tumorales (<i>Cancer stem cells</i>)
Bax	<i>Bcl-2 like protein-4</i> . Proteína reguladora de apoptosis.	CuTC	Tiofeno carboxilato-2 de cobre(I) (<i>copper (I) thiophene-2-carboxylate</i>)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>	d	Doblete, RMN (<i>doublet, NMR</i>)
		D_f	Dimensión fractal (<i>Fractal dimension</i>)

DCM Diclorometano (<i>dichloromethane</i>)	HMBC Correlación heteronuclear a enlaces múltiples (<i>Heteronuclear multiple Bond Correlation</i>)
DD Dominio de Muerte (<i>Death Domain</i>)	HMQC Coherencia heteronuclear cuántica múltiple (<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence</i>)
DEPT <i>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer</i>	HPP Halimenil difosfatos (<i>Halimanyl diphosphates</i>)
DISC Complejo inductor de señal de muerte celular (<i>Death-induction signaling complex</i>)	HRMS Espectrometría de Masas de Alta Resolución (<i>High Resolution Mass Spectroscopy</i>)
DNA Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)	IR Infrarrojo (<i>Infrared</i>)
DMEM <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>	IV Ivermectina (<i>Ivermectin</i>)
DMF <i>N,N</i> -Dimetilformamida (<i>N,N-dimethylformamide</i>)	J Constante de acoplamiento, RMN (<i>coupling constant</i>)
DMSO Dimetilsulfóxido (<i>Dimethyl sulfoxide</i>)	LTA Tetraacetato de plomo(IV) (<i>Lead(IV) Tetraacetate</i>)
DTC Diterpeno ciclasas (<i>diterpene cyclases</i>)	MCA Metilencicloalquil acetato (<i>Methylenecycloalkyl acetate</i>)
ESI Ionización por electroespray (<i>Electrospray ionization</i>)	mCPBA Ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico (<i>m-chloroperbenzoic acid</i>)
Et Etilo (<i>ethyl</i>)	Me Metilo (<i>methyl</i>)
FADD Proteína de muerte asociada al dominio de muerte de Fas (<i>Fas-associated Death Domain</i>)	m Multiplete, RMN (<i>m: multiplet, NMR</i>)
FBS Suero fetal bovino (<i>Fetal bovine serum</i>)	NGF Factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve growth factor</i>)
FV Factor de virulencia (<i>VF, virulence factor</i>)	NMO N-óxido de N-metilmorfolina (<i>N-methylmorpholine-N-oxide</i>)
GG geranylgeranilo (<i>geranylgeranyle</i>)	OMS Organización Mundial de la Salud (<i>WHO, World Health Organization</i>)
GGEL Glico-glicero éteres lipídicos (<i>Glyco-Glycero Ether Lipids</i>)	PAF Factor Activador de Plaquetas (<i>Platelet Activating Factor</i>)
GPGEL Glico-fosfo-glicero éteres lipídicos (<i>Glyco-Phospho-Glycero Ether Lipids</i>)	PBS Disolución de tampón fosfato salino (<i>Phosphate-buffered saline solution</i>)
Hex <i>n</i> -Hexano (<i>n-Hexane</i>)	PC Fosfocolina (<i>Phosphocholine</i>)
	PDMP Fosfodimetilpiperidinio (<i>phosphodimethylpiperidinium</i>)

PDK1 y 2	Kinasa Dependiente de Fosfatidilinosítido 1 ó 2 (<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 or 2</i>)	sn	numeración estereoespecífica (<i>stereospecific numbering</i>)
Ph	Fenilo (<i>Phenyl</i>)	t	Triplete, RMN (<i>triplet, NMR</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol-3 kinasa (<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>)	T_f	Temperatura de fusión (<i>mp, melting point</i>)
PIP₂	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>)	t.a.	Temperatura ambiente (r.t.: <i>room temperature</i>)
PIP₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate</i>)	TADDOL	$\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -tetraaril-1,3-dioxolano-4,5-dimetanol, auxiliar quiral (<i>$\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$-tetraaryl-1,3-dioxolane-4,5-dimethanol, quiral auxiliary</i>)
Pir	Piridina (<i>Pyr, pyridine</i>)	t-BuOH	terc-butanol (<i>tert-butanol</i>)
PMB	<i>p</i> -Metoxibencilo (<i>p-methoxybenzyl</i>)	TCE	1,1,2-tricloroetileno (<i>1,1,2-trichloroethylene</i>)
PP	Difosfato, también en nomenclatura tradicional pirofosfato (<i>diphosphate</i> , also in tradicional nomenclature <i>pyrophosphate</i>)	THF	Tetrahidrofurano (<i>tetrahydrofuran</i>)
pTsOH	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico (<i>p-toluensulfonic acid</i>)	TLC	Cromatografía de capa fina (<i>thin-layer chromatography</i>)
q	Quintuplete, RMN (<i>quin: quintuplet, NMR</i>)	TMS	Trimetilsililo (<i>trimethylsilyl</i>)
RE	Retículo endoplasmático (<i>Endoplasmic reticulum</i>)	TPAP	Perrutenato de tetrapropilamonio (<i>tetrapropylammonium perruthenate</i>)
RER	Retículo endoplasmático rugoso (<i>Rough Endoplasmic Reticulum</i>)	TPS	Terpenilsintasa (<i>terpenylsynthase</i>)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear, (<i>NMR, Nuclear Magnetic Resonance</i>)	TPS	Cloruro de 2,4,6-Triisopropilbencenosulfonilo (<i>2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride</i>)
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)	Tr	Tritilo, trifenilmetil (<i>trityl, triphenylmethyl</i>)
RTK	Receptor Tirosina Kinasa (<i>Tyrosine Kinase Receptor</i>)	Ts	Tosilo, <i>p</i> -toluensulfonilo (<i>tosyl, p-toluensulfonyl</i>)
s	Singulete, RMN (<i>singlet, NMR</i>)	TsOCh	Tosilato de colina (<i>Choline tosylate</i>)
SAR	Estudios de relación estructura-actividad (<i>Structure-activity relationship studies</i>)	UV-Vis	Ultravioleta-Visible (<i>Ultraviolet-Visible</i>)
SE	Error estándar (<i>Standard error</i>)		



Introducción

Introduction



El presente trabajo puede encuadrarse dentro de las líneas de investigación que ha venido desarrollando nuestro grupo dirigidas al estudio y síntesis de moléculas bioactivas.

En el trabajo pueden distinguirse dos apartados diferentes, que finalmente podrían complementarse. En primer lugar, se puede destacar el trabajo desarrollado dirigido a la síntesis de éteres lipídicos antitumorales, análogos de miltefosina y perifosina, y en una segunda parte se estudiarán los trabajos realizados en la obtención de compuestos bioactivos (agentes neurotróficos, antiparasitarios y antitumorales) mediante el aprovechamiento de recursos naturales propios de nuestra región, utilizando ácido *ent*-halímico como material de partida. Dichos trabajos podrían complementarse en el futuro mediante la síntesis de moléculas bioconjugadas de los mismos con actividad antitumoral.

A continuación, se describirán algunas características de los grupos de moléculas con las que se va a trabajar

1.- Lípidos antitumorales.

2.- Síntesis enantioselectiva de compuestos bioactivos. Agentes Neurotróficos.



Antecedentes

Background



En este capítulo se describirán las propiedades estructurales y biológicas de los lípidos antitumorales (ATLs) y diterpenos bicíclicos:

1. Lípidos antitumorales

- 1.1. Cáncer
- 1.2. Lípidos
- 1.3. Lípidos antitumorales, ATLs
- 1.4. Propiedades fisicoquímicas de los ATLs
- 1.5. Membrana celular y *lipid rafts*
- 1.6. Mecanismo de acción antitumoral de ATLs
- 1.7. Alquilfosfocolinas como antileishmaniosos y otras bioactividades
- 1.8. Ensayos clínicos y preclínicos de ATLs

2. Síntesis enantioselectiva de compuestos bioactivos. Agentes neurotróficos

- 2.1. Diterpenos bicíclicos de esqueleto halimano. Biosíntesis general
- 2.2. *Halimium viscosum*. Quimiotipos y nuevos esqueletos carbonados. Halimanos
- 2.3. Ácido *ent*-halímico como material de partida en síntesis
- 2.4. Halimanos naturales antibacterianos
- 2.5. Agentes neurotróficos
- 2.6. Bioconjugados. γ -Hidroxibutenolida como farmacóforo de acción antitumoral

3. Bibliografía de Antecedentes

1. Lípidos antitumorales

1.1. Cáncer

El cáncer es un término que se refiere al conjunto de enfermedades en donde las células proliferan descontroladamente invadiendo tejidos cercanos y con posibilidad de migración a otras partes del cuerpo a través de los sistemas sanguíneo o linfático. Se trata una de las enfermedades con mayor repercusión en el mundo desarrollado. Según estima la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 2021 hubo 10 millones de muertes atribuibles al cáncer como causa de muerte, siendo los más frecuentes de pecho, pulmón, colon, recto y próstata.^{1,2} Actualmente se conocen más de un centenar de tipos de cáncer, necesiándose comprender a nivel molecular los procesos cancerosos para así desarrollar fármacos de mayor eficacia y selectividad.

La mortalidad del cáncer ha ido disminuyendo a lo largo de los años. Este descenso es debido tanto a los avances en estrategias y técnicas terapéuticas, como de diagnóstico e imagen, que permiten una detección temprana y determinar un tratamiento más eficaz y específico para cada tipo de tumor, aumentando de esta manera las perspectivas de recuperación de los pacientes.² Continuar la investigación en la fisiopatología de la enfermedad así como el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas y diagnósticas, permitirán seguir mejorando el pronóstico de los pacientes diagnosticados con cáncer y disminuir la mortalidad de esta enfermedad.

1.2. Lípidos

Los lípidos como biomoléculas han ido adquiriendo una importancia creciente, convirtiéndose en foco de interés en investigación debido a que son el principal componente de las membranas biológicas en general y de la membrana celular en particular. No solo tienen función estructural en la célula, sino que el mantenimiento de niveles fisiológicos de lípidos contribuye al mantenimiento de la homeostasis en el organismo.³ De esta manera se ha llegado a considerar relevante el lipodoma y la composición lipídica ligada a la funcionalidad de la membrana celular y de los diferentes orgánulos.⁴

El descubrimiento de nuevas técnicas de análisis y purificación ha liderado los avances en el conocimiento químico y estructural de los lípidos presentes en el organismo y ha permitido profundizar en la comprensión del metabolismo lipídico y de las funciones biológicas relacionadas con los lípidos.⁵ En la *Figura 1* se muestra el orden cronológico en el descubrimiento de aspectos clave en este área.

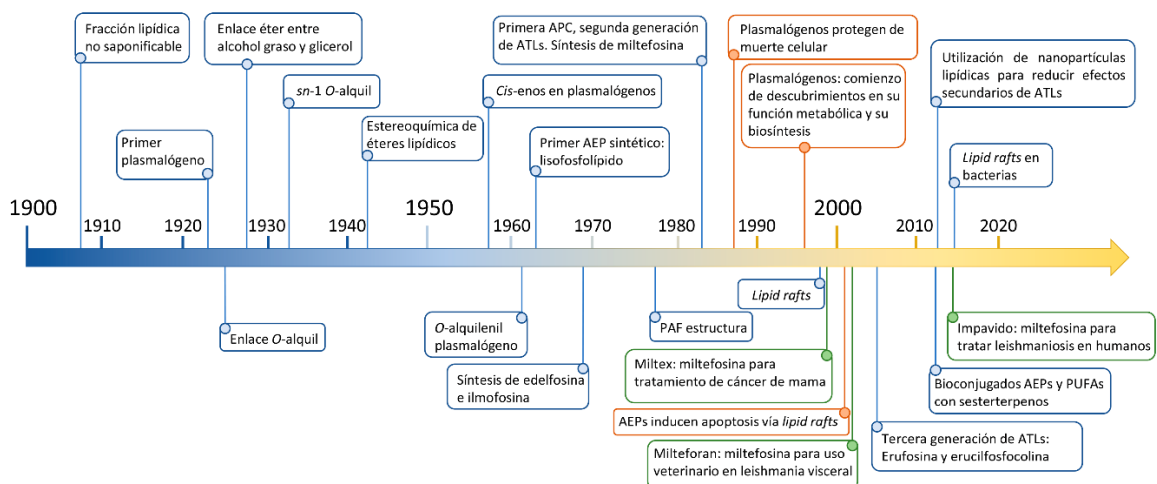


Figura 1. Línea cronológica de avances significativos y relevantes en el descubrimiento de fosfolípidos naturales y sintéticos (Azul), así como su función en el metabolismo celular y mecanismos de acción (Rojo) y fosfolípidos que han superado los ensayos clínicos y se han aprobado para uso terapéutico (Verde).

Los lípidos estructurales de las membranas tienen carácter anfipático, y contienen al menos una cadena lipídica de un ácido o un alcohol graso y una cabeza polar. Dentro de dichos lípidos se pueden encontrar fosfolípidos y glucolípidos, según la cabeza polar contenga un grupo fosfato o únicamente un azúcar respectivamente. En este trabajo se describirán únicamente los fosfolípidos. (Figura 2)

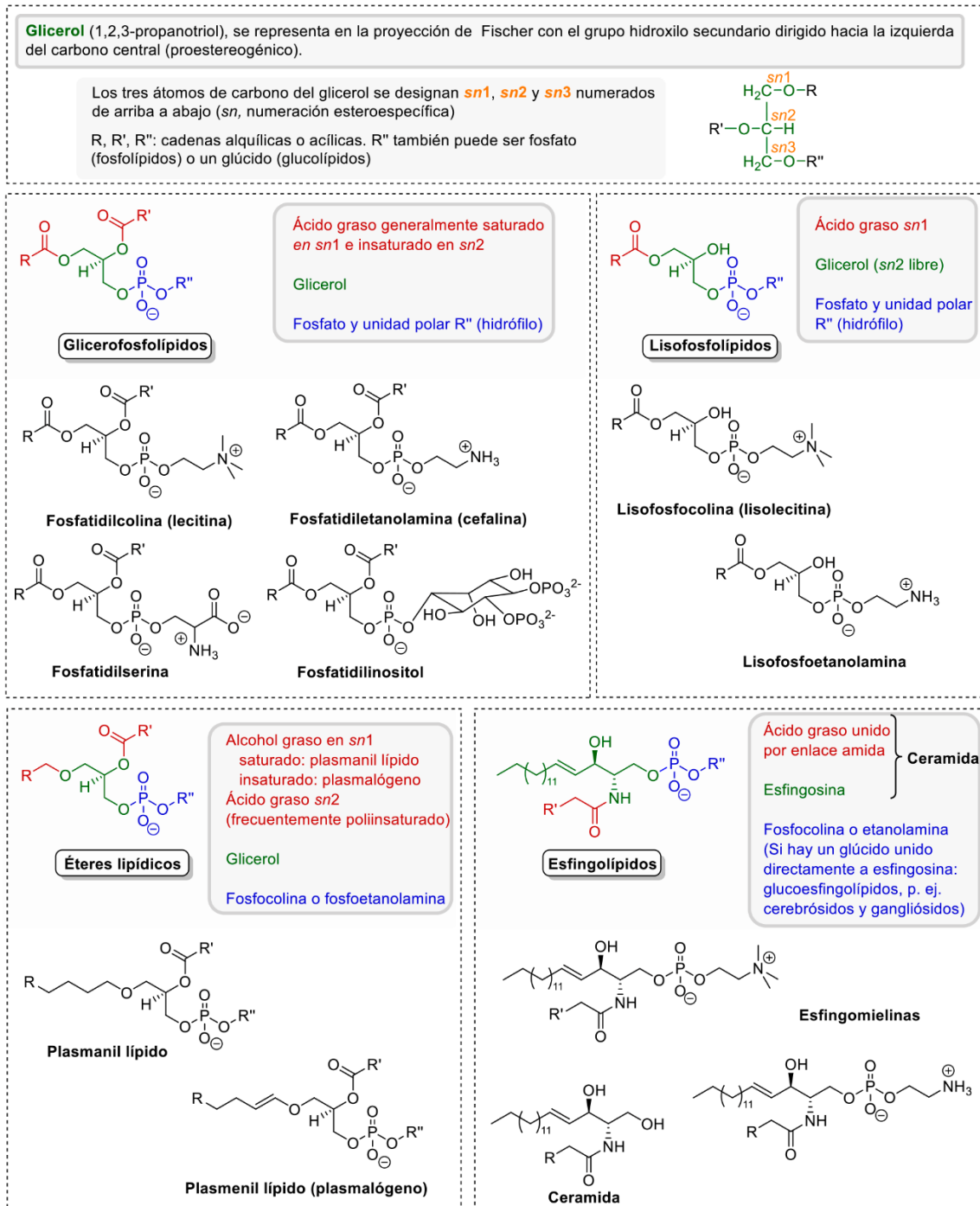


Figura 2. Familias de fosfolípidos.

Glicerofosfolípidos. Presentan una unidad de glicerol que está esterificada a un grupo fosfato (en *sn3*) y a dos cadenas lipídicas unidas por enlace éster (en *sn1* y *sn2*). Normalmente el ácido graso que esterifica al glicerol en la posición *sn1* es saturado mientras que en la posición *sn2* es insaturado. Dependiendo del grupo polar que se encuentre unido al fosfato se originan las lecitinas (colina), cefalinas (etanolamina), fosfatidilserinas (serina) o fosfatidilinositoles (inositol), entre otros. Las fosfatidilcolinas son los lípidos más abundantes en las membranas de células animales, mientras que las fosfatidiletanolaminas son muy abundantes en células vegetales.

Lisofosfolípidos. Tienen el grupo hidroxilo del glicerol de la posición *sn2* libre, de manera que únicamente se encuentra esterificado a un ácido graso el hidroxilo de la posición *sn1*. La cabeza polar (*sn3*) puede ser colina o etanolamina para dar lugar a las lisofosfolcolinas o lisofosfoetanolas respectivamente. La cadena lipídica puede estar unida también mediante enlace éter y viniléter al glicerol y pueden presentar diferentes grados de insaturación. Respecto de los glicerofosfolípidos, los lisofosfolípidos representan una fracción poco abundante en el organismo. Actúan de mensajeros en diferentes procesos (flujo del Ca^{2+} , funciones vasculares y neuronales, migración, proliferación y muerte celular) relacionados con la membrana de la célula e interaccionando con receptores específicos de lisofosfolípidos.⁶

Éteres lipídicos. Presentan la cadena lipídica unida mediante enlace éter al glicerol en la posición *sn1* y un ácido graso unido por enlace éster en la posición *sn2*. Si la cadena alifática del alcohol graso es saturada se denominan plasmanil lípidos mientras que si se encuentra unida por enlace viniléter al glicerol se llaman plasmalógenos. Son poco abundantes en humanos y presentan diferentes funciones relacionadas con el sistema cardiovascular y sistema inmune. El PAF (Factor Activador de Plaquetas) es un plasmanil lípido donde en *sn1* hay un octadecilo alquilando el glicerol y en *sn2* un grupo acetato; se trata de un mediador que actúa en numerosos procesos de activación de fosfolípidos en inflamación, neuroprotección y quimiotaxis.⁷

Esfingolípidos. El aminoalcohol graso esfingosina es la cadena principal de los esfingolípidos sobre la que se une la cabeza polar y un ácido graso esterificado a través del grupo amino de la esfingosina. La cabeza polar en los fosfolípidos es fosfolcolina o bien fosfoetanolamina y se denominan esfingomielinas, aunque también pueden

presentar en la cabeza polar mono-, di-, tri- y oligosacáridos unidos a la esfingosina (glucoesfingolípidos). Cuando la esfingosina solo aparece enlazada a un grupo fosfato, también se considera un lisofosfolípido. Las esfingomielinas se encuentran presentes en las membranas plasmáticas de células animales y forman parte de las vainas de mielina en los axones neuronales. Cuando la esfingosina aparece esterificada únicamente en el grupo amino surgen las ceramidas, que no contienen grupo fosfato y no son fosfolípidos.

El descubrimiento del glicofosfolípido fosfatidilcolina (lecitina) y del lisofosfolípido lisofosfatidilcolina (lisolecitina) y su acumulación en la membrana de los macrófagos cuando se activaba la fosfolipasa A₂, sugirió que se trataba de un factor de activación de los mismos. Cuando se administraban pequeñas cantidades de lisolecitina exógena, se estimulaba la fagocitosis tanto *in vitro* como *in vivo*.⁸ El papel de la lisolecitina en procesos inmunológicos despertó el interés en investigar este tipo de lípidos. La elevada inestabilidad metabólica de las lisolecitinas debido a su enlace éster (éster-lisolecitinas, *Figura 3*), impedía su acumulación en las membranas al ser rápidamente degradada por acción de lipasas y aciltransferasas. En cambio, sus análogos que contienen la cadena lipídica unida con un enlace éter (éter-lisolecitina, *Figura 3*) resultan más estables.

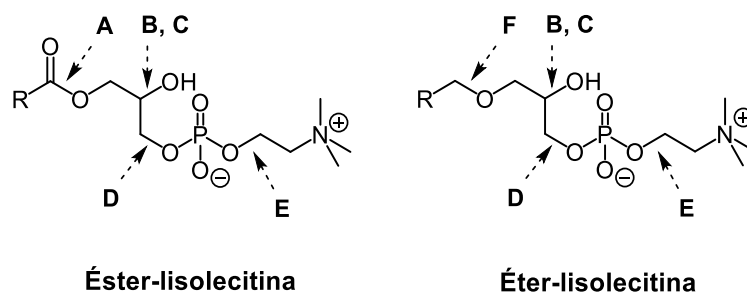


Figura 3. Estructura general de un lisofosfolípido con cadena lipídica unida con enlace éster o éter. Pueden ser degradados por acción enzimática: **A)** fosfolipasa A₁; **B)** aciltransferasa; **C)** transesterasa; **D)** fosfolipasa C; **E)** fosfolipasa D; **F)** O-alkilglicerol monooxigenasa.

De esta manera, se motivó la síntesis de análogos que se diferenciaban estructuralmente de los lípidos naturales y así aumentar la estabilidad metabólica e incrementar su actividad y potencial uso terapéutico.

Los primeros lisofosfolípidos sintéticos (*Figura 4*) continuaban presentando 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, las primeras modificaciones estructurales se centraron en las posiciones *sn1* y *sn2* del glicerol, para diferenciarlo de las lisolecitinas naturales. Se sustituyó el enlace éster por un enlace éter en *sn1*, realizando la síntesis del primer éter lisofosfolípido sintético **2** en la década de 1960 y originando así el primer lípido antitumoral (ATL)⁹ al que le siguieron un elevado número de análogos en la búsqueda del farmacóforo, dando lugar a una amplia familia de compuestos bioactivos.

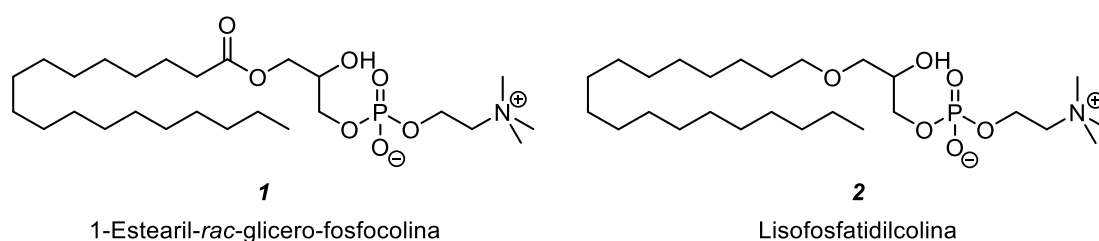


Figura 4. Éster lisofosfolípido **1** y lisofosfatidilcolina **2**.

1.3. Lípidos antitumorales, ATLS

A raíz de las investigaciones relacionadas con la fosfatidilcolinas y lisofosfatidilcolinas y el descubrimiento de su bioactividad, surgió el interés por la síntesis de nuevos fosfolípidos y su potencial aplicación terapéutica. De esta manera se sintetizaron los primeros ATLS (lípidos antitumorales). Actualmente se pueden clasificar en primera, segunda y tercera generación, y se explicarán a continuación.

1.3.1. Primera generación de ATLS: alquiléter fosfolípidos (AEPs)

La primera generación de ATLS, denominada también AEPs (alquiléter fosfolípidos) fueron los primeros derivados en sintetizarse. (Figura 5) Con la síntesis de **2**, se inicia la preparación de nuevos compuestos que mejoran la estabilidad metabólica respecto de los fosfolípidos naturales, presentando además potente actividad moduladora del sistema inmune y actividad antitumoral. Dicho lisofosfolípido **2** constituyó el primer éter lipídico antitumoral.

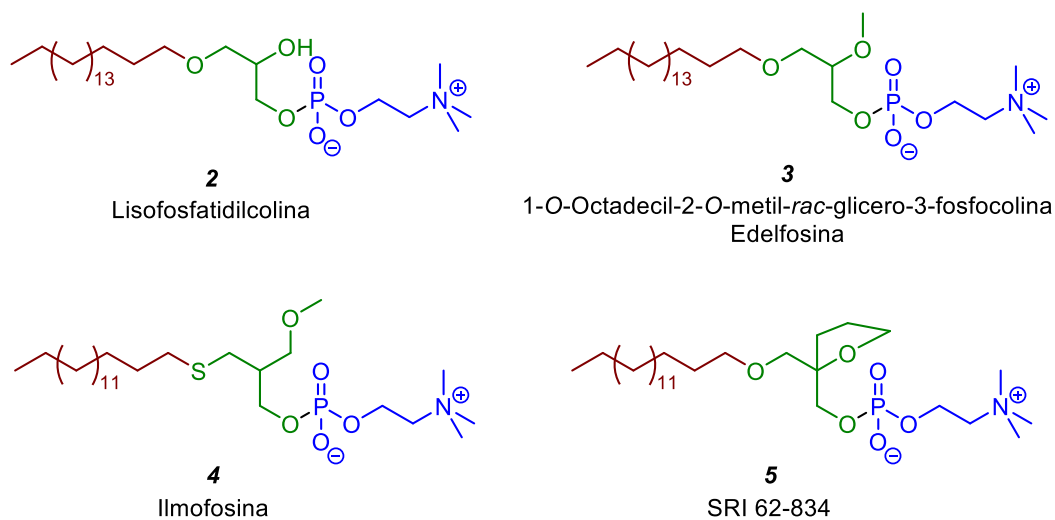


Figura 5. Alquiléter fosfolípidos, primera generación de ATLS.

Posteriormente se descubriría que la acción antitumoral de los ATLS la ejercen mediante un mecanismo donde se produce interacción lisofosfolípido-membrana,¹⁰ a diferencia de los agentes antitumorales clásicos que tienen como diana el DNA o la tubulina. De esta manera se abrió una nueva posibilidad en la quimioterapia del cáncer.

En las décadas posteriores se trabajó extensamente en la síntesis de análogos¹¹ y derivados a fin de mejorar sus propiedades físico-químicas y farmacológicas como la actividad, selectividad, aspectos farmacocinéticos y toxicidad.¹² En esta primera generación, las modificaciones estructurales se centraron en la unidad de glicerol, tal y como se puede observar en la *Figura 5*.

El grupo hidroxilo libre en la posición C2 del glicerol, como ocurre en **2**, posibilita la acción enzimática transesterasa y aciltransferasa que habilitan la migración de la cadena lipídica de C1 a C2 del glicerol, por lo que se vio la necesidad de incorporar un sustituyente en el grupo hidroxilo de C2; de ese modo, se aumenta la estabilidad metabólica.

A finales de la década de 1960 se sintetizó el derivado con función metoxilo en C2 del glicerol, denominado edelfosina (1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina) **3**. (*Figura 5*) Debido a las prometedoras propiedades que presentaba edelfosina **3** se reconoció como prototipo de los AEPs y ha sido ampliamente investigado desde su descubrimiento considerándose un estándar en la evaluación de nuevos alquilfosfolípidos como agentes antineoplásicos.¹³

La edelfosina **3** presenta actividad antitumoral mediante la activación de rutas proapoptóticas.¹⁴ 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 limitan tanto la dosis como las posibles vías de administración.

Estos aspectos tóxicos estimularon la síntesis de análogos y derivados con mejores propiedades como fármaco, aunque no siempre con éxito. Se continuó la síntesis de derivados de la familia de los AEPs donde se introdujeron modificaciones en el fragmento del glicerol, como por ejemplo en la ilmfosina **4** o en el derivado SRI 62-834 **5**, pero no desplazaron a la edelfosina **3** como compuesto líder en la búsqueda de actividad antitumoral debido a sus excelentes propiedades.

1.3.2. Segunda generación de ATLS: alquilfosfocolinas (APCs)

Posteriormente en la década de 1980, se sintetizó la primera alquilfosfocolina (APC), denominada miltefosina o hexadecilfosfocolina **6**, prototipo de las APCs, (Figura 6) donde se ha suprimido la unidad de glicerol y se encuentra más alejada estructuralmente de los lisofosfolípidos naturales.¹⁵ Se observó que se mantenía la actividad biológica como antitumoral y se mejoraban aspectos de selectividad frente a células tumorales y parámetros farmacocinéticos a la vez que se obtenía un fármaco de estructura más sencilla.

La miltefosina **6** supuso una mejora en muchos aspectos respecto de la edelfosina **3**, pero presenta igualmente capacidad hemolítica¹⁶ y toxicidad gastrointestinal lo que limita la dosis máxima diaria y conlleva una baja actividad antiproliferativa *in vivo*.

La segunda generación de ATLS se centró en modificar la cabeza polar del fosfolípido, tal y como se puede observar en la Figura 6.

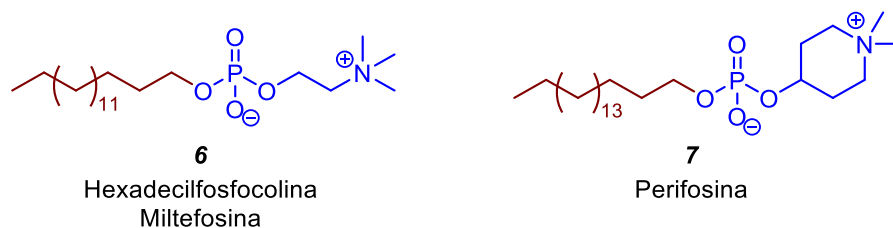


Figura 6. Segunda generación de ATLS: alquilfosfocolinas (APCs).

Al modificar la unidad de colina por el análogo heterocíclico de piperidina como en la perifosina **7** se mejora significativamente la estabilidad metabólica y actividad antitumoral, aunque la toxicidad se mantiene semejante a la miltefosina **6**.^{17,18} Estudios de la actividad antitumoral de perifosina **7** han demostrado que tiene una potente actividad, aunque mantiene la toxicidad debido a sus propiedades hemolíticas. Parece que en glioblastoma puede potenciar a la radioterapia, esperando una actividad sinérgica como resultado del tratamiento del glioblastoma mediante radioterapia combinada con la administración de **7**.

1.3.3. Tercera generación de ATLS: análogos de cadena larga

En los últimos años, se han sintetizado otros derivados en los que se ha elongado la cadena lipídica, formando la tercera generación de ATLS o también a veces englobada dentro de la segunda generación de APCs. (Figura 7) Entre estos análogos de cadena larga, se encuentran con cadenas de C-22 la erucilfosfocolina **8**, y la erufosina **9**, esta última presenta una hidroxilamina análoga de la colina.¹⁶

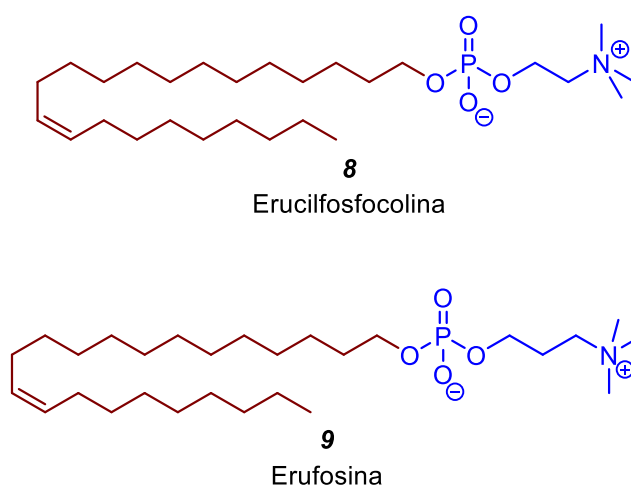


Figura 7. Tercera generación de ATLS.

Estos análogos son permeables a la barrera hematoencefálica y tienen capacidad hemolítica reducida,¹⁶ lo que ha llevado a proponerlos como posibles tratamientos de leucemia y glioblastoma.

1.3.4. Gliceroglicolípidos sintéticos

Se han sintetizado otros análogos de AEPs (*Figura 8*) cuya cabeza polar está constituida por azúcares unidos al glicerol a través de un grupo fosfato (**10**, glico-fosfo-glicero éteres lipídicos, GPGEL) o azúcares unidos directamente al glicerol (**11**, glico-glicero éteres lipídicos, GGEL). La ohmlina **11** no presenta grupo fosfato en su cabeza polar, sino que el grupo hidrófilo corresponde al disacárido lactosa unido directamente al glicerol por enlace éter. Presenta actividad antitumoral inhibiendo la migración celular y metástasis en estudios *in vitro*, reduciendo la actividad de los canales de potasio SK3.¹⁹

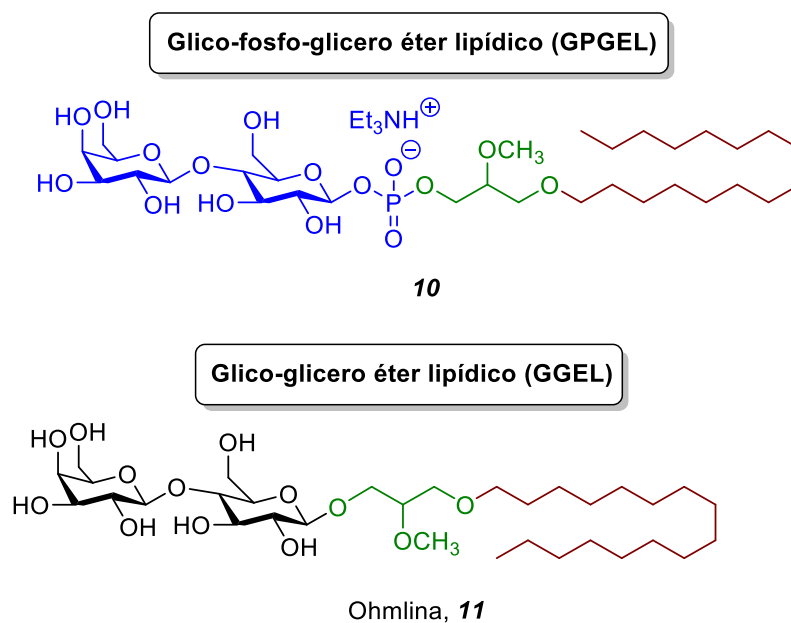


Figura 8. Alquiléteres lipídicos con azúcares en la cabeza polar **10** y **11**.

1.4. Propiedades fisicoquímicas de los ATLS

Las APCs y AEPs poseen carácter de zwitterión y anfipático, presentando capacidad para emulsionar las grasas de forma análoga a los lisofosfolípidos naturales. También, por su estructura semejante a los fosfolípidos de membrana, tienen afinidad por las membranas pudiéndose incorporar a las mismas e influir en el metabolismo y rutas de señalización de la célula, capacidad que determina la actividad biológica y el mecanismo de acción de los ATLS.²⁰

Debido a sus propiedades fisicoquímicas, los fosfolípidos se pueden utilizar como excipientes en formulaciones liposómicas de preparados farmacéuticos que van a ser administrados por vía parenteral donde el principio activo tiene una alta lipofilia y de esta manera se facilita su solubilidad para la administración o bien, se utilizan los liposomas como vehículo de liberación lenta en inyecciones subcutáneas o intramusculares. Los fosfolípidos sintéticos se preparan para su uso como excipientes en preparaciones farmacéuticas, de esta manera se logra una mayor capacidad de modulación de las propiedades fisicoquímicas y de agregación de estos lípidos (tamaño de las micelas y concentración micelar crítica, CMC) respecto de sus análogos naturales.

Por todo esto, se han desarrollado métodos de preparación de fosfolípidos a gran escala para satisfacer las necesidades de la industria de este tipo de moléculas.

1.5. Membrana celular y *lipid rafts*

Desde el modelo de membrana celular como un mosaico fluido propuesto en 1972 por Singer y Nicolson,²¹ su comprensión ha avanzado mucho concibiéndose ahora como un orgánulo mucho más complejo de lo que se creía en un principio. Esta complejidad radica tanto en la composición (lípidos y proteínas que forman la membrana), como a nivel de los procesos celulares que ocurren en las inmediaciones y a través de la membrana celular.^{22,23} La distribución heterogénea de los lípidos y proteínas que conforman la membrana celular origina determinados dominios y microdominios de membrana, que son regiones discretas con una composición diferente al resto de la membrana y de cuyos componentes depende su función y los procesos de señalización en los que están involucrados.

Los *lipid rafts* (balsas lipídicas), también denominados *membrane rafts* (balsas de membrana), son microdominios de membrana ricos en ceramida, esfingolípidos y colesterol que se encuentran en ambas caras de la membrana celular (*Figura 9*).²⁴⁻²⁶ La composición en esfingolípidos y colesterol le confiere a estas regiones una especial rigidez y consistencia, que en consecuencia hace que se comporten como balsas lipídicas que flotan en un mar de fosfolípidos con un mayor grado de desorden, diferenciándose del resto de la membrana celular.

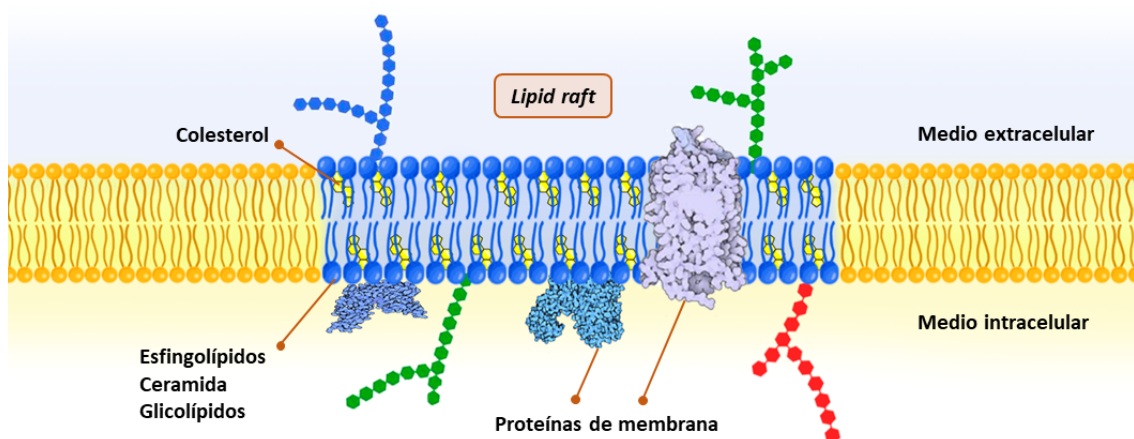


Figura 9. Composición y modelo estructural de los *lipid rafts* o balsas lipídicas: regiones ricas en esfingolípidos, ceramida y colesterol con glicolípidos y proteínas de membrana asociadas (receptores y canales iónicos).

Estos microdominios de membrana son capaces de reclutar receptores y otras proteínas de membrana bajo el estímulo fisiológico adecuado, jugando un papel fundamental en procesos de señalización y transducción de señales a través de la membrana.²⁷⁻²⁹ Su función y participación en procesos biológicos está estrechamente relacionada con su composición lipídica y proteica. Dentro de los procesos de señalización y transducción de señales en los que están involucrados caben destacar las rutas de señalización de supervivencia y muerte celular.³⁰⁻³²

Dentro de las alteraciones metabólicas ligadas al desarrollo tumoral y estrechamente relacionado con la malignidad de un tumor está la modificación del metabolismo lipídico. El tejido tumoral presenta una absorción, almacenamiento y síntesis lipídica incrementada que está ligada a la proliferación del tumor. Dentro de este acontecimiento, en las células tumorales se han detectado niveles de colesterol y *lipid rafts* superiores a los encontrados en células no tumorales; ya que el colesterol es el principal regulador de la organización lipídica a nivel de membrana y formación de *lipid rafts*. Por ello, se puede considerar a los *lipid rafts* como excelentes dianas terapéuticas para la quimioterapia del cáncer.³³

Dentro de los *lipid raft* se pueden encontrar dos tipos diferentes en función de su composición abundante en ceramida o colesterol: *lipid rafts* ricos en colesterol, que participan en procesos de señalización y mantenimiento de la homeostasis celular, y *lipid rafts* ricos en ceramida, que están involucrados en procesos proapoptóticos.³⁴ Según qué estímulos reciba la célula tanto intracelulares como extracelulares, un *lipid raft* rico en colesterol puede ver modificada su composición convirtiéndose en un *raft* rico en ceramida. De manera asociada a su composición lipídica, el *lipid raft* ve modificada su composición proteica, que es lo que determina en última instancia su funcionalidad. Según el estímulo recibido, el *lipid raft* rico en ceramida sirve de plataforma de activación de señales metabólicas en cascadas de transducción y señalización haciendo que la célula induzca apoptosis o promueva la supervivencia celular.

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, crecimiento celular y apoptosis. Las células tumorales presentan mayor proporción de colesterol y esfingolípidos en los *lipid rafts* que las células normales³⁵⁻³⁷ lo que contribuye al aumento de la capacidad de las células cancerosas por la supervivencia y proliferación descontrolada. Además, las células tumorales de algunos tipos de cáncer presentan las rutas apoptóticas desreguladas, impidiendo la activación de estas vías de señalización de muerte celular.³⁸

Estudios recientes han revelado la acumulación del principal receptor del SARS-CoV2 en los *lipid rafts* de las células, por lo que estas regiones podrían ser una diana terapéutica para hacer frente a las infecciones de este³⁹ y otros coronavirus como el VIH o el ébola.^{23,40} Los procesos inflamatorios asociados a infecciones víricas están relacionados con una desregulación en el metabolismo de esfingolípidos, por lo que la modulación del metabolismo lipídico podría mejorar la respuesta inmune.⁴¹

La organización de los *lipid rafts* en eucariotas se ha considerado como una etapa clave dentro de la evolución y adquisición de una mayor complejidad en la organización celular. No obstante, se ha observado que las bacterias presentan complejos proteicos asociados a la membrana que amplifican la señal en el proceso de transducción en diferentes rutas de señalización.^{42,43} Por ello, las bacterias son capaces de organizar sus sistemas de transducción de señales a través de la membrana mediante plataformas de cierta complejidad análogas a los *lipid rafts*.

1.6. Mecanismo de acción antitumoral de ATLS

Los lípidos antitumorales (ATLS) ejercen acción antitumoral induciendo apoptosis a través de la membrana celular mediante un mecanismo complejo que no se ha revelado por completo. Estos estudios se han efectuado predominantemente utilizando la edelfosina como compuesto de referencia de los ATLS, aunque hasta donde se ha podido observar, tanto AEPs como APCs ejercen su actividad antitumoral mediante el mismo mecanismo biológico.

Tanto los AEPs como las APCs se incorporan en las membranas celulares, más concretamente en los *lipid rafts*; donde provocan una disrupción de las rutas de señalización de supervivencia celular e inducen apoptosis en células tumorales con selectividad debida a la mayor incorporación de estos lípidos antitumorales en células tumorales.^{14,44,45}

Además, pueden permear al citosol donde se incorporan también a las membranas de los orgánulos tales como mitocondria, retículo endoplasmático (RE) y aparato de Golgi, donde producen estrés metabólico y oxidativo generando daños celulares contribuyendo a la inducción de apoptosis.⁴⁶⁻⁴⁸ Los ATLS incorporados dentro de la célula, impiden la síntesis de fosfatidilcolina en el RE, alterando la formación de vesículas y membrana celular.⁴⁸

La selectividad en la inducción de apoptosis preferentemente sobre las células tumorales, 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 *lipid rafts*.⁴⁹

Las células tienen mecanismos de señalización que detectan su buen estado y un correcto funcionamiento de los orgánulos y las rutas metabólicas. Existen rutas metabólicas que promueven la muerte celular o apoptosis en respuesta a daños graves en la célula y señales metabólicas de muerte celular. Así pues, hay mecanismos de protección frente a las rutas que promueven la apoptosis. Tanto los procesos de señalización de supervivencia celular como los de muerte celular están altamente degenerados, complejamente regulados e interrelacionados, lo que en condiciones fisiológicas asegura que la célula pueda crecer y proliferar adecuadamente o morir en caso de no estar sana.

A continuación, se van a detallar los procesos fisiológicos donde intervienen los ATLS explicando el normal funcionamiento de estas rutas metabólicas tanto en condiciones normales para la célula tumoral, como cuando se tratan dichas células con estos ATLS.

1.6.1. Visión global en los mecanismos de acción antitumoral de los ATLS

1.6.2. Ruta de inducción de muerte celular Fas/CD95

- ATLS como activadores de Fas/CD95

1.6.3. Ruta de supervivencia celular PI3K/Akt

- ATLS como inhibidores de PI3K/Akt

1.6.4. Otros puntos de actuación de los ATLS

1.6.1. Visión global en los mecanismos de acción antitumoral de ATLS

Los ATLS ejercen actividad antitumoral induciendo apoptosis en células tumorales de manera selectiva. Esta inducción de muerte celular la realizan tanto AEPs como APCs con mecanismos de acción análogos donde intervienen en varios puntos clave en el metabolismo de las células tumorales. (Figura 10) Su incorporación puede tener lugar en:

- La membrana celular, concretamente en los *lipid raft*.
- La membrana mitocondrial.
- La membrana del retículo endoplasmático (RE).

Dicha incorporación provoca en conjunto la disrupción de rutas de señalización de supervivencia celular, daños celulares graves y estrés mitocondrial y del RE que generan estrés metabólico, inhiben la metástasis y terminan con la inducción de muerte celular o apoptosis.^{50,51}

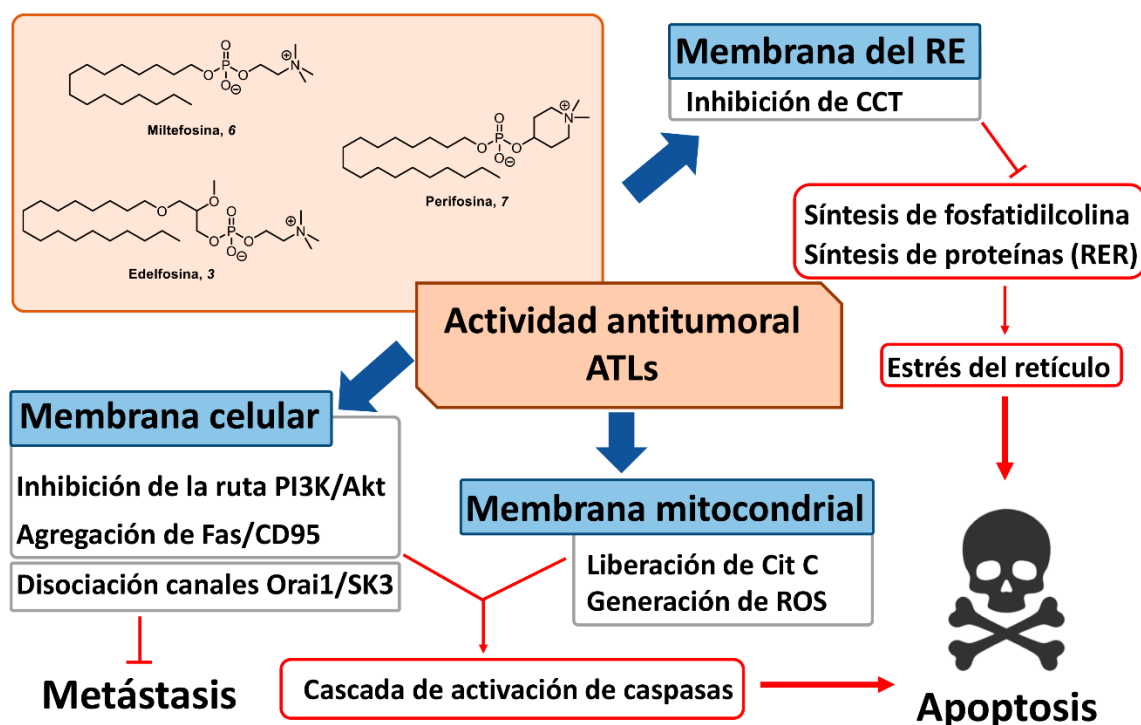


Figura 10. Mecanismos de actuación de los ATLS para ejercer su actividad antitumoral y antimetastática.

1.6.2. Ruta de inducción de muerte celular FAS/CD95

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 mitocondria tiene un papel central en rutas de señalización de muerte celular, convergiendo en este orgánulo estas rutas apoptóticas.⁵² La activación de las caspasas puede inducirse mediante la ruta iniciada por Fas/CD95 y puede evolucionar por dos vías: intrínseca y extrínseca (*Figura 11*).⁵³

El comienzo de la ruta tiene lugar cuando el receptor de muerte Fas/CD95 interacciona con su ligando endógeno FasL/CD95L. Como resultado de la asociación con su ligando, el receptor migra hacia los *lipid rafts*, donde es capaz de trimerizar. Fas/CD95 transduce la señal, a través de su dominio de muerte (DD) citosólico, reclutando a FADD (proteína de muerte asociada al DD de Fas) y esta a su vez a la procaspasa 8 formando un complejo proteico denominado DISC (complejo de inducción de señalización de muerte). La procaspasa 8 en el DISC evoluciona por proteólisis generando caspasa 8.

Cuando la cantidad de caspasa 8 es elevada, la inducción de muerte transcurre por la vía extrínseca (*Figura 11, c*), activando la caspasa 3 y la cascada de activación de caspasas induciendo apoptosis.⁵⁴⁻⁵⁶

En los casos en los que no se ha generado suficiente caspasa 8 o en respuesta a daños celulares internos graves, la señal se amplifica en la mitocondria, para lo que sigue la vía de inducción de apoptosis por la vía intrínseca o mitocondrial (*Figura 11, d-g*). Se inhibe la producción de estímulos de supervivencia, se produce un aumento en la permeabilidad mitocondrial y se liberan proteínas al citosol como citocromo C (Cit 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 Cit 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.⁵⁴ La sobreexpresión de Bcl-2 previene de la inducción de apoptosis provocada por la edelfosina en células cancerosas.^{51,52}

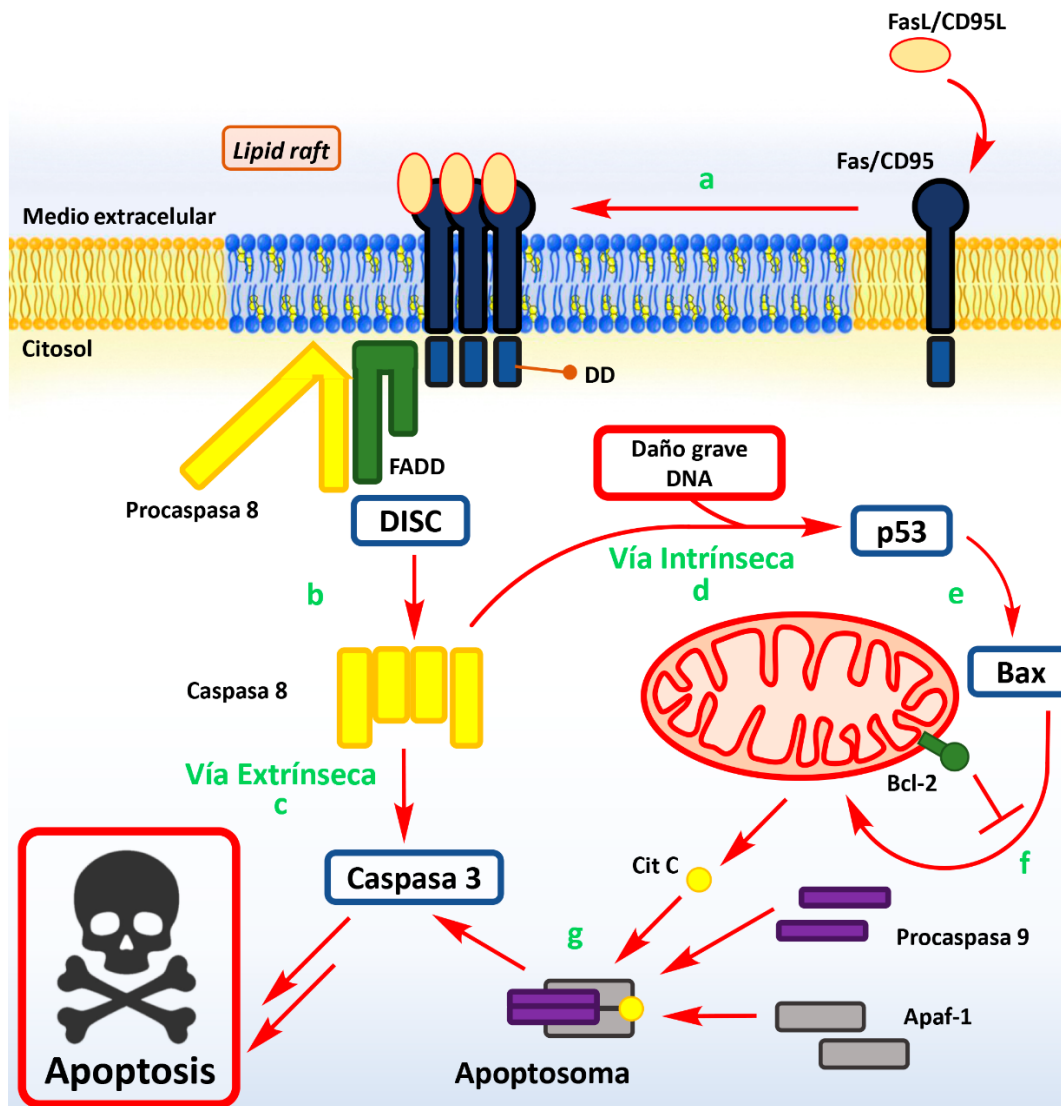


Figura 11. Ruta de inducción de muerte celular Fas/CD95. (a) FasL/CD95L interacciona con Fas/CD95 que migra y forma un trímero en los *lipid raft*. El receptor de muerte a través de sus dominios DD intracelulares recluta a FADD y procaspasa 8 formando un complejo de inducción de señales de muerte (DISC). (b) La proteólisis de la procaspasa 8 genera caspasa 8, que puede evolucionar por la vía extrínseca o intrínseca en caso de necesitar amplificar la señal. (c) **Vía extrínseca.** Una vez generada la caspasa 8, se inicia la cascada de activación de caspasas que acaba con la inducción de apoptosis. **Vía intrínseca** o mitocondrial, (d) daños celulares graves como pueden ser daños mutágenos en DNA también pueden iniciar esta ruta, (e) inducen una secuencia de señalización a través de p53 y Bax como mediadores que liberan a Cit C al citosol. (f) En condiciones normales Bcl-2 inhibe la acción de Bax sobre la mitocondria y Cit C. (g) El Cit C citosólico forma un complejo denominado apoptosoma junto con la procaspasa 9 y Apaf-1 que activan la proteína caspasa 3 y se induce apoptosis.

- **ATLs como activadores de FAS/CD95.**

La incorporación de las APCs y AEPs en los *lipid raft* (Figura 12) induce cambios estructurales y de composición que modifican la señalización y regulación de supervivencia y apoptosis, induciendo muerte celular tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca.^{14,38,52,57,58}

Los ATL, una vez incorporados a los *lipid raft* (Figura 12), inducen una reorganización estructural del *raft* donde se produce el reclutamiento de los receptores de muerte Fas/CD95, provocando su trimetización.^{38,57,59} Esta agrupación de Fas/CD95 independientemente de la presencia de su ligando FasL/CD95L genera el complejo proteico DISC que activa las caspasas y provoca la apoptosis de la célula de manera análoga a la ruta de señalización fisiológica anteriormente descrita.^{14,55}

Por otro lado, los ATLs pueden permear la membrana y una vez en el citosol, incorporarse a la membrana mitocondrial, provocando una disrupción en la cadena de transporte electrónico, liberando citocromo C (Cit C) al citosol, lo que genera ROS (Especies reactivas de oxígeno) en la mitocondria. El Cit C liberado activa a las caspasas, induciendo muerte celular.⁵²

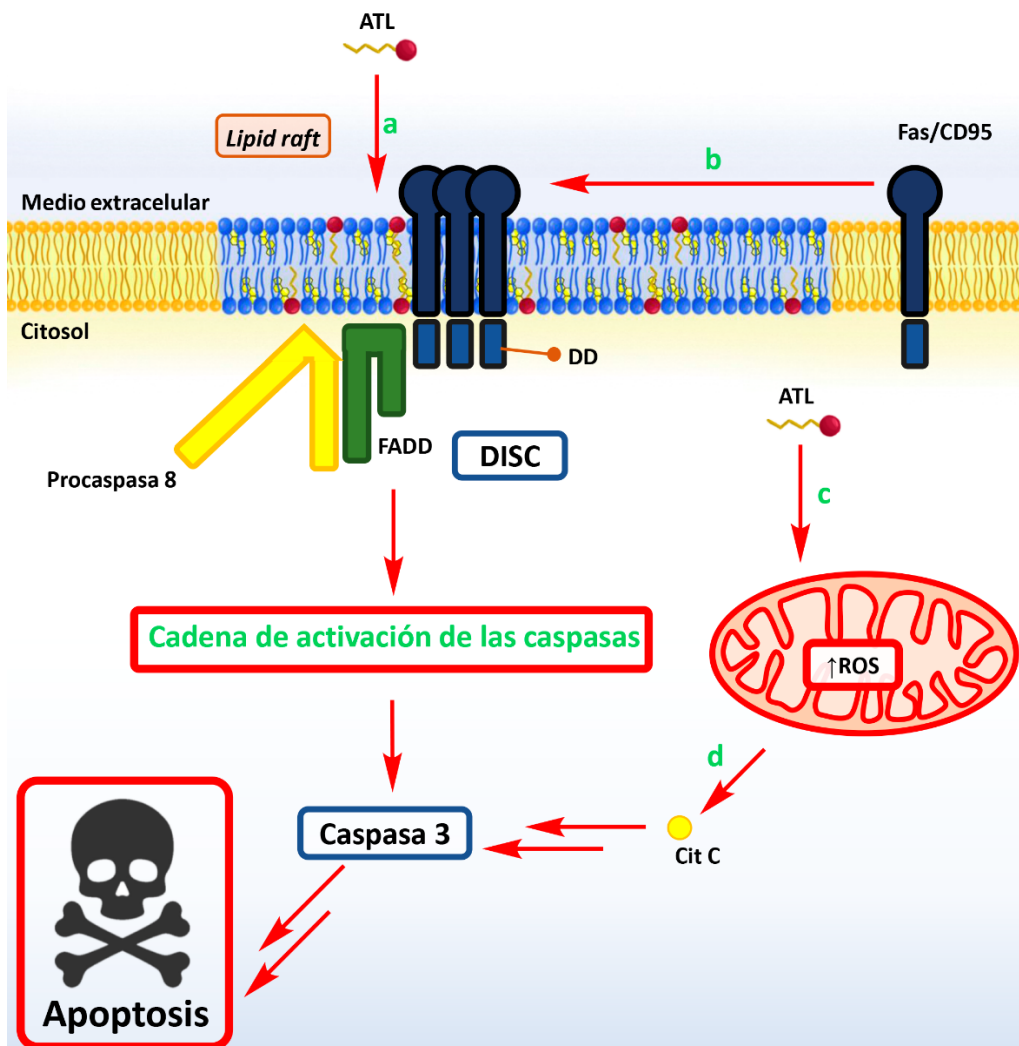


Figura 12. Inducción de muerte celular en presencia de ATLS. (a) Los ATLS se incorporan en el *lipid raft* y provocan la agregación (b) de los receptores de muerte Fas/CD95 y formación del complejo de muerte celular (DISC) independientemente de su ligando natural. También los ATLS (c) se incorporan a la membrana mitocondrial generando estrés oxidativo (ROS) y liberación de Cit C al citosol (d) activando a las caspasas e induciendo apoptosis.

1.6.3. Ruta de supervivencia celular PI3K/Akt

La ruta de señalización de supervivencia celular PI3K/Akt tiene lugar en el *lipid raft* y consiste en una cadena de activación por fosforilación de diferentes sustratos y proteínas que transduce una señal externa a la célula en señales metabólicas que inhiben la apoptosis y promueven la proliferación, crecimiento y supervivencia celular.^{60,61} A continuación se describirá la ruta de señalización PI3K/Akt (*Figura 13*) en condiciones fisiológicas.

El receptor RTK (receptor tirosina kinasa) se activa cuando dimeriza como consecuencia de la unión con un ligando endógeno (activador de RTK), como puede ser un factor de crecimiento.^{62,63} Esta dimerización provoca que se reclute PI3K (fosfatidilinositol-3 kinasa) al *lipid raft* y de esta manera pueda ejercer su función kinasa sobre fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂). PIP₂ es un glucolípidio de membrana que actúa de intermediario en esta ruta de señalización. La fosforilación de PIP₂ produciendo PIP₃ (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato) conduce a la migración de la proteína kinasa Akt (también denominada proteína kinasa B) al *lipid raft*, que se asocia a PIP₃, donde se producirá su activación en dos aminoácidos: Thr308 y Ser473 por acción de PDK1 y PDK2 (Kinasa dependiente de fosfatidilinosítido 1 y 2) respectivamente.^{64,65} La fosforilación en Thr308 ya forma una Akt monofosforilada y activa, pero su máximo grado de activación lo alcanza cuando se encuentra fosforilada en sendos aminoácidos: Thr308 y Ser473.⁶⁶

Una vez se ha fosforilado Akt, su forma fosforilada y activa se libera al citosol, donde puede fosforilar a sus sustratos (AktL) que inhiben procesos de arresto del ciclo celular y de inducción de apoptosis, promoviendo el crecimiento y proliferación celular.

Se ha detectado una estrecha relación entre Akt y los daños en el DNA, ya que Akt activado, promueve la reparación del DNA y mecanismos de defensa antioxidante por activación de la ruta Nrf2.⁶⁷ Por ello, mutaciones que afectan a proteínas de la ruta PI3K/Akt, pueden conllevar una hiperactivación de Akt dificultando la inducción de apoptosis de células tumorales y originar, por tanto, células radiorresistentes y quimiorresistentes.^{63,68-70}

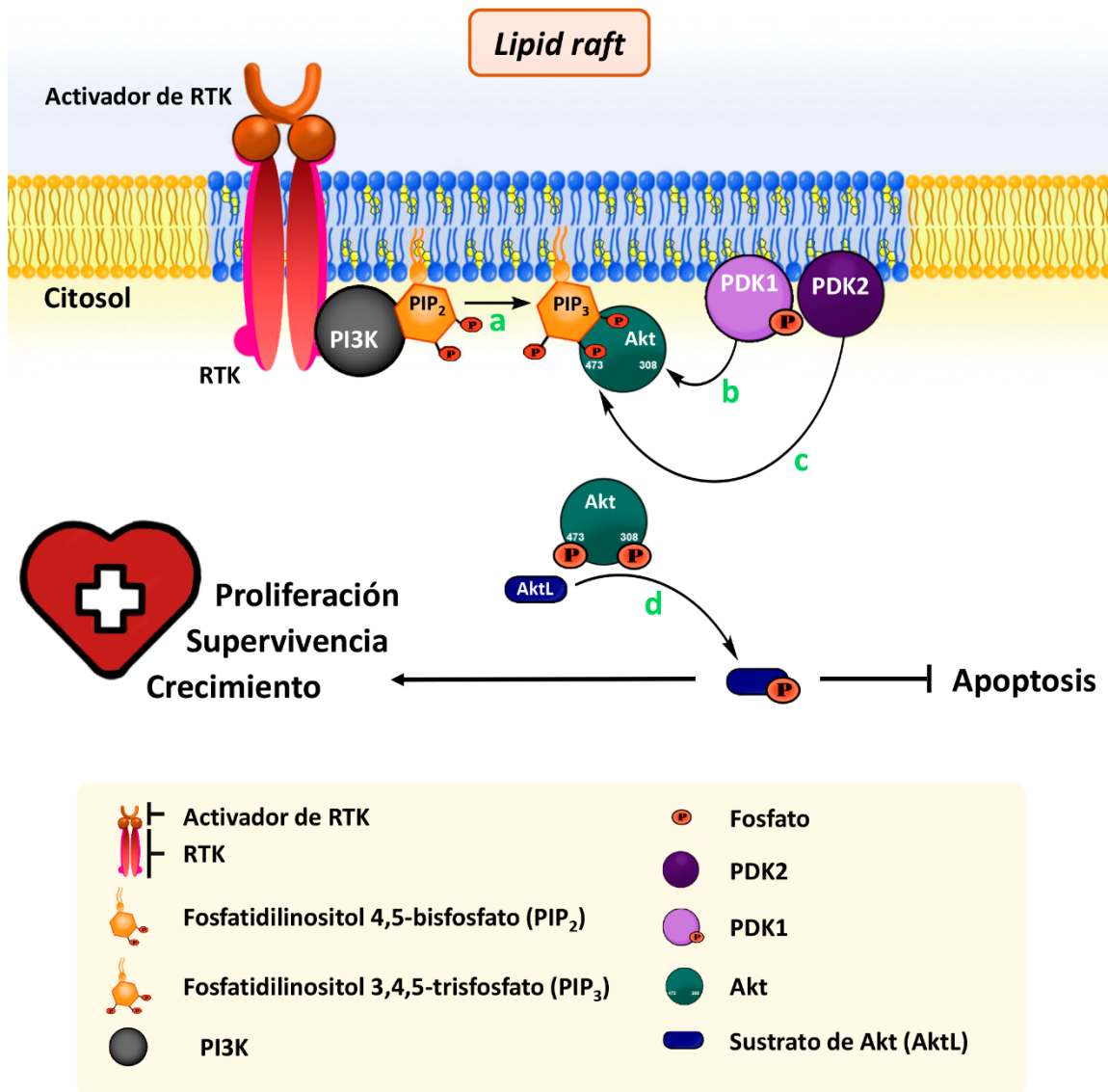


Figura 13. Modelo de participación de los *lipid rafts* como plataforma en la ruta de señalización de supervivencia PI3K/Akt. En condiciones fisiológicas, RTK es activada dimerizando, secuestra a PI3K a la membrana celular, (a) donde PI3K fosforila PIP₂ a PIP₃. PIP₃ recluta a Akt y sus proteínas kinasas PDK1 y PDK2 atrayéndolos a la membrana celular, donde ejercen su actividad kinasa sobre Thr308 (b) y Ser473 (c) respectivamente. Una vez Akt es activado por fosforilación, puede actuar en diversas rutas de señalización de supervivencia celular a través de la fosforilación de diferentes sustratos (d) que inhiben la muerte celular y mantienen la homeostasis de la célula.

- **ATLs como inhibidores de la ruta de supervivencia celular PI3K/Akt**

La incorporación de ATLs en los *lipid raft* reorganizan estos dominios de membrana a nivel de estructura y composición, modificando la señalización y regulación de supervivencia y muerte celular. (Figura 14) Los ATLs provocan un desacoplamiento de las proteínas que participan en la fosforilación de Akt, provocando que predomine su forma inactiva y desfosforilada y en consecuencia, inhibir la supervivencia celular en la ruta de señalización PI3K/Akt, induciendo apoptosis.^{18,62,71,72}

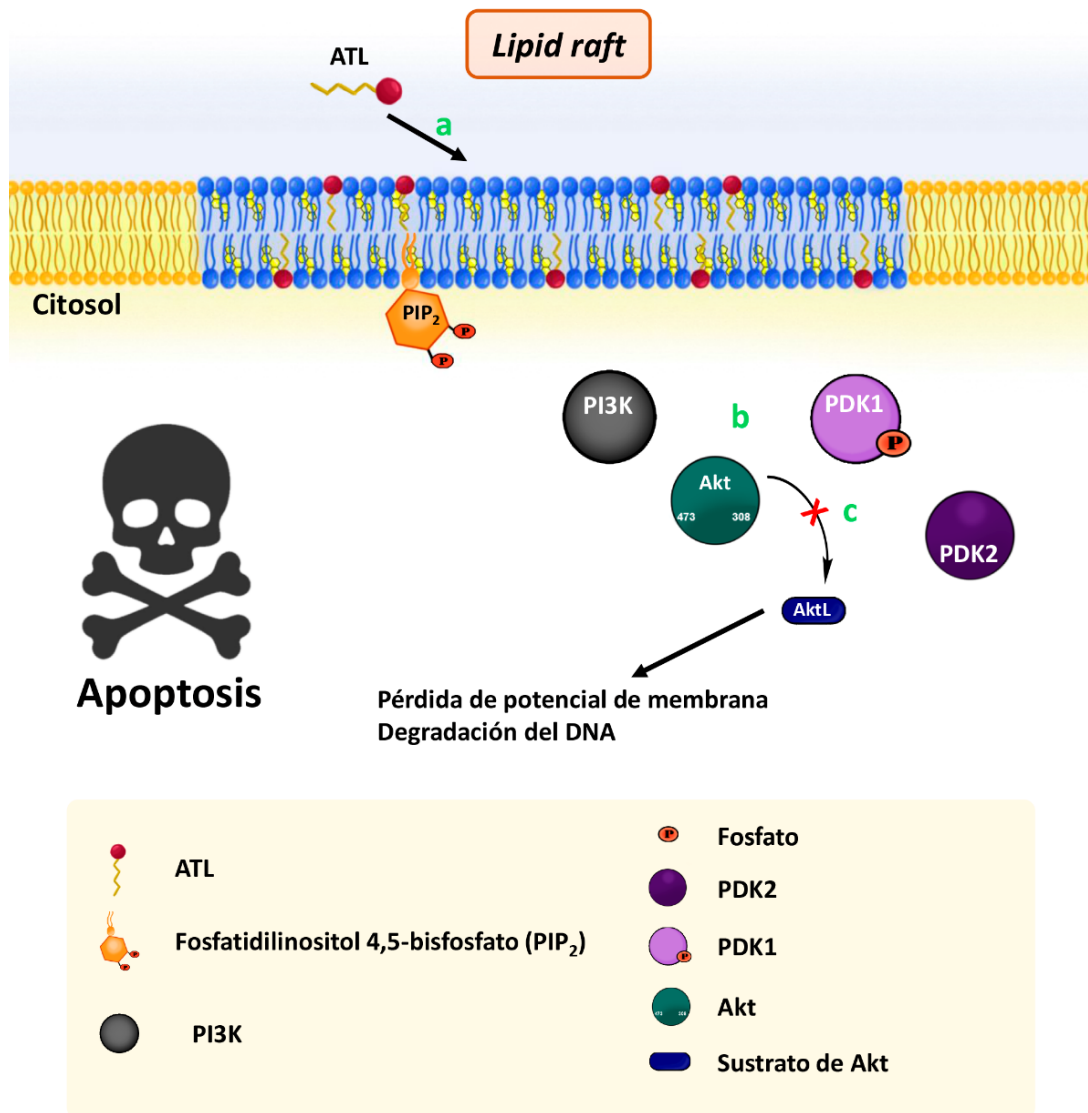


Figura 14. Actuación de los ATLs en la ruta de señalización PI3K/Akt. (a) El ATL se incorpora en el *raft* lipídico. En consecuencia, (b) se reorganiza la estructura y composición de la balsa lipídica, desacoplándose de la membrana proteínas kinasa que participan en la ruta de señalización (PI3K, PDK1, PDK2 y Akt) interrumpiéndose la ruta PI3K/Akt. Libre en el citosol, (c) Akt desfosforilada está inactiva y no ejerce su función kinasa sobre AktL. Los sustratos de Akt sin fosforilar participan en procesos de inducción de muerte celular, arresto del ciclo celular, degradación de DNA y pérdida de potencial de membrana.

1.6.4. Otros puntos de actuación de ATls

La incorporación de los ATls en los *lipid raft*, en conjunto con los procesos anteriormente explicados, también provoca un desplazamiento y reorganización de los canales iónicos en *rafts* lipídicos, aumentando los niveles de Ca^{2+} intracelular.⁷³ En los *lipid rafts* de las células tumorales tiene lugar la asociación de los canales de calcio Orai1 con el canal de potasio SK3. Esta asociación se ha encontrado únicamente en células tumorales y participa en procesos de metástasis tumoral.⁷⁴ La incorporación de ATls a los *raft*, provoca la disgregación del complejo SK3-Orai1,⁴⁶ inhibiendo la entrada de calcio al medio intracelular y con ello la metástasis.^{19,48,57,75}

Los ATls impiden la síntesis de fosfatidilcolina inhibiendo el enzima CCT (fosfocolina citidiltransferasa),⁴⁸ que ejerce su función en el retículo endoplasmático (RE). En consecuencia, interrumpir su actividad enzimática, modifica el metabolismo lipídico, generando estrés en el retículo endoplasmático y generando señales proapoptóticas.

1.7. Alquilfosfolinas como antileishmaniosos y otras bioactividades

Las APCs y los AEPs presentan un amplio espectro de actividades biológicas, donde la longitud de la cadena lipídica es de alta importancia (actividad antitumoral favorecida en intervalo C₁₆-C₁₈)⁷⁶ así como la naturaleza de la cabeza polar.^{77,78} Además de la actividad como antitumorales, presentan actividad antiinflamatoria, antiparasitaria contra la leishmaniosis (visceral y cutánea), antifúngica, antibacteriana e inmunomoduladora (que puede ser inmunosupresora o inmunoactivadora según la longitud de la cadena lipídica).^{12,79,80}

La leishmaniasis es una enfermedad tropical emergente con una gran incidencia en la población presentando altos índices de mortalidad.⁸¹ Esta enfermedad parasitaria está causada por la infección de células a nivel cutáneo o visceral por protozoos del género *Leishmania* (P. ej.: *L. donovani* y *L. infantum*). La leishmania presenta dos formas morfológicas según se encuentre infectando una célula o libre. Los promastigotos presentan flagelo mientras que se denominan amastigotos cuando se encuentran infectando una célula, carecen de flagelo y presentan un cinetoplasto y es la forma observada en biopsia para el diagnóstico de la enfermedad.

Los ATLs como miltefosina, perifosina y edelfosina muestran potente actividad *in vitro* e *in vivo* frente a la leishmania. La miltefosina se comercializa para tratamiento de leishmania siendo la única opción farmacológica disponible por vía oral (Impavido, vía oral, para uso clínico y Milteforan, vía oral, para uso veterinario),^{12,79} lo que la ha convertido en compuesto líder de esta familia de ATLs para la búsqueda de actividad anti-leishmania.⁸² La miltefosina presenta actividad anti-leishmania variable en función de la especie de *Leishmania* y de la región geográfica. Se puede generar mecanismos de resistencia a miltefosina por exposición prolongada al fármaco, reduciendo su actividad como antiparasitario. No obstante, Impavido (miltefosina, vía oral) es el tratamiento de elección para tratar leishmaniosis visceral y cutánea resistente a otros fármacos anti-leishmania como los basados en Sb(V).⁸³

Estos ATLS muestran actividad antiparasitaria frente a *Trypanosoma cruzi* y *T. brucei* aunque no se conoce todavía el mecanismo de acción farmacológica.

El mecanismo de acción anti-leishmania permanece en gran medida desconocido. No obstante, se ha observado que hay un incremento en las ROS y estrés mitocondrial en conjunto con la inhibición de la acil-CoA aciltransferasa alquil específica glicosómica; alterando la composición lipídica.⁸⁴

La incorporación de estos ATLS en la membrana aumentan su fluidez⁸⁵ y en consecuencia, se aumenta la permeabilidad del otro fármaco consiguiendo un efecto sinérgico,⁸⁶ por lo que la terapia combinada o la realización de moléculas híbridas con ATLS representa una herramienta farmacológica a considerar. Por ejemplo, en coinfecciones de leishmania y otros casos de parasitosis asociada con VIH se ha contemplado la terapia combinada.⁸⁷⁻⁸⁹

1.8. Ensayos clínicos y preclínicos de ATls

Dentro de la gran familia de los lípidos antitumorales, únicamente la miltefosina se ha aprobado para uso clínico como antitumoral (Miltex), de uso tópico para metástasis cutáneas en cáncer de mama.

Se ha explorado la posible aplicación farmacológica de diferentes alquilfosfocolinas (APCs): miltefosina **6**, perifosina **7**, erufosina **8** y erucilfosfocolina **9**.^{12,17,90-94} Se ha planteado la posibilidad de usar la edelfosina **3** para tratar la esclerosis múltiple⁸⁰ además de como antitumoral.^{95,96} (Figura 15)

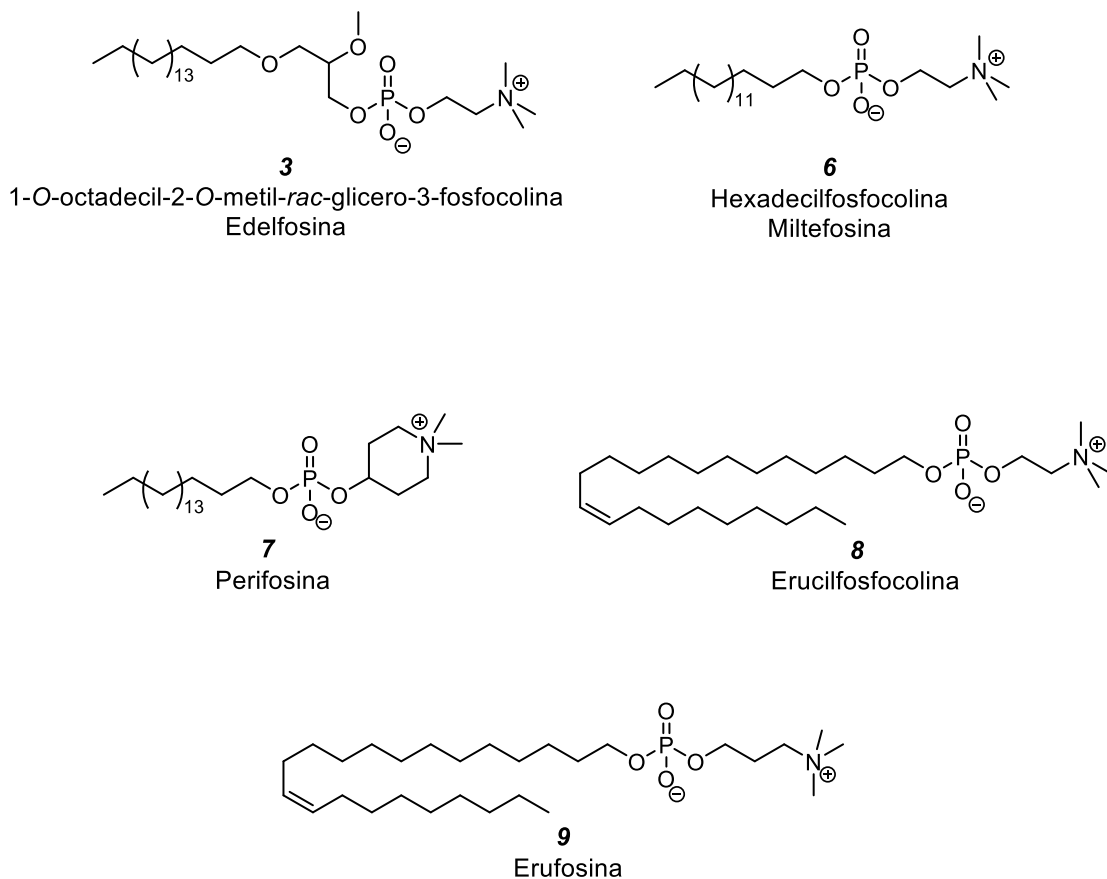


Figura 15. ATls de especial interés en clínica: edelfosina **3**, miltefosina **6**, perifosina **7**, erucilfosfocolina **8** y erufosina **9**.

La perifosina **7** incrementa la eficacia de la radioterapia en algunas líneas celulares de carcinoma cuando se usan en combinación.^{17,62} Se han realizado ensayos clínicos con APCs tanto para monoterapia^{97,98} como en terapia combinada.⁹⁹ Actualmente hay ensayos clínicos abiertos para el uso de miltefosina contra la leishmaniosis.¹⁰⁰

La utilización de los ATLS en terapia multidiana combinada con diferentes fármacos antitumorales ha pretendido buscar un efecto sinérgico producto de dicha asociación.¹⁰¹ Por otro lado, la toxicidad de los ATLS y efectos secundarios se ha reducido significativamente con éxito mediante su encapsulación en nanopartículas lipídicas¹⁰²⁻¹⁰⁶ o utilización de nanoemulsiones.¹⁰⁷

Estudios recientes *in vivo* administrando edelfosina **3** encapsulada en nanopartículas lipídicas marcadas radiactivamente han estudiado diferentes vías de administración, pareciendo la vía intraperitoneal la más adecuada para maximizar la biodisponibilidad de la edelfosina **3**.¹⁰⁸

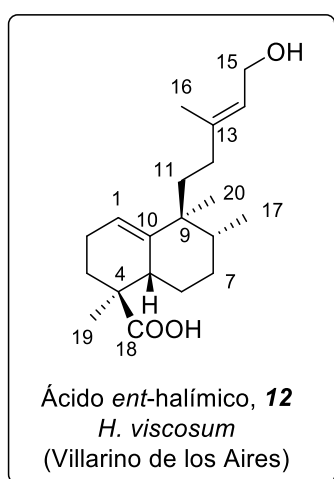
Se ha continuado investigando a los ATLS y su mecanismo de actuación, donde el grupo del Dr. Mollinedo demostró que la edelfosina es capaz de inducir selectivamente apoptosis sobre células tumorales del linfoma de manto y leucemia linfocítica crónica tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁰⁹ También, la edelfosina **3** es efectiva para el tratamiento del cáncer de páncreas, actividad en la que se logra afectar a las células madre tumorales (CSCs, *Cancer Stem Cells*),¹¹⁰ siendo estas células, resistentes a la quimio y radioterapia, las principales responsables de la reincidencia, resistencia, proliferación y metástasis tumoral constituyendo el ~5 % de la masa tumoral.¹¹¹

Se ha iniciado la posibilidad de realizar adaptaciones en la formulación de los ATLS, administrándolos en forma de nanopartículas, para ejercer su actividad antitumoral reduciendo su toxicidad habiéndose realizado ensayos *in vivo* con edelfosina **3**.¹⁰³ De esta manera, caben esperar prometedores avances en la aplicación de los ATLS, incluso de los actualmente conocidos, ya que podrían encontrar o mejorar su utilidad farmacológica mediante la aplicación de los últimos conceptos en química medicinal y tecnología farmacéutica.

2. Síntesis enantioselectiva de compuestos bioactivos. Agentes neurotróficos

La síntesis enantioselectiva de compuestos bioactivos ha sido uno de los objetivos fundamentales de nuestro grupo de trabajo desde hace algunos años. Para realizar, dichas síntesis, en muchas ocasiones resulta ventajosa la utilización de compuestos naturales abundantes y fácilmente accesibles, ya que estos procedimientos en numerosos casos permiten reducir el número de etapas sintéticas y obtener finalmente mejores rendimientos, que en el desarrollo de una síntesis total.

El ácido *ent*-halímico **12**, diterpeno bicíclico, aislado de *Halimium viscosum* (Familia: Cistaceae, quimiotipo: Villarino de los Aires, Salamanca)¹¹² (Figura 16) es uno de los materiales de partida más ampliamente utilizado por nuestro grupo, debido a que sus características estructurales: cadena lateral insaturada Δ^{13} funcionalizada en C15; un doble enlace 1(10) y un grupo carboxílico en C18, son muy adecuadas para nuestros propósitos sintéticos referentes a la obtención de productos naturales bioactivos o de compuestos de alto valor añadido.



Halimium viscosum

Figura 16. Ácido *ent*-halímico **12**, estructura de referencia y *Halimium viscosum*.

A continuación, se describirán los siguientes apartados clave en el desarrollo de este trabajo referentes a los halimanos y ácido *ent*-halímico como material de partida.

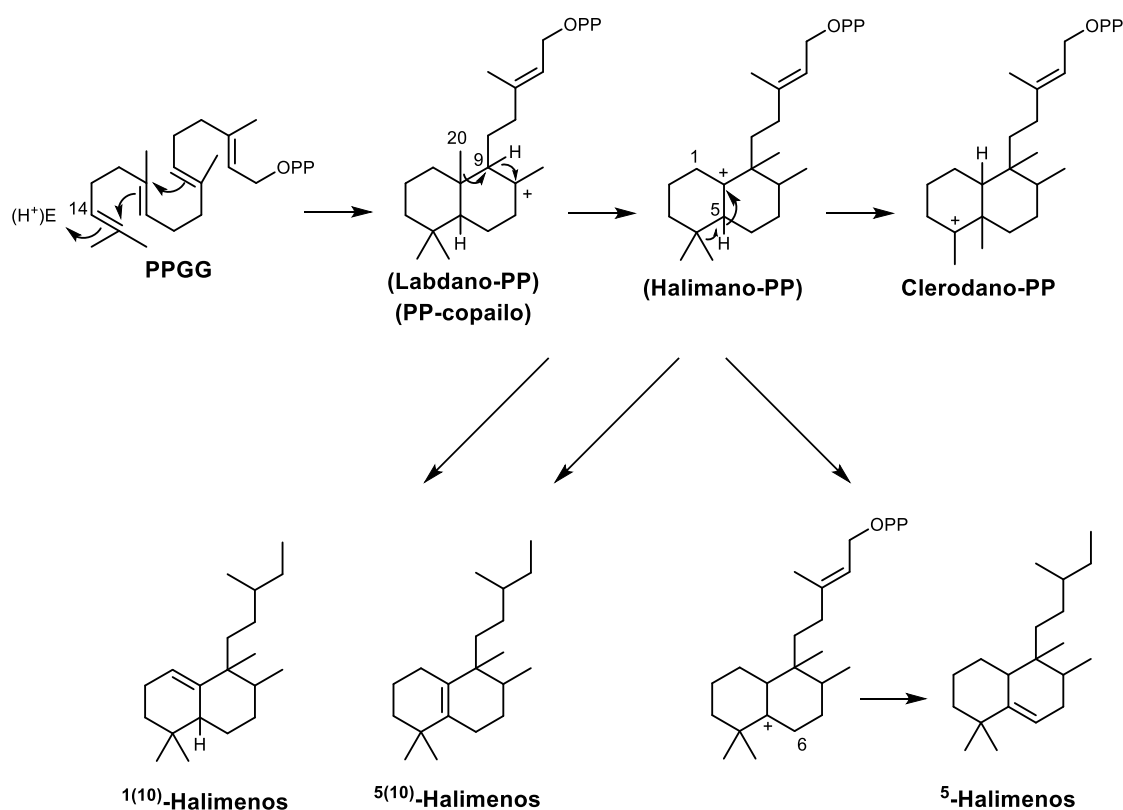
- 2.1.** Diterpenos bicíclicos de esqueleto halimano. Biosíntesis general
- 2.2.** *Halimium viscosum*: quimiotipos y nuevos esqueletos carbonados.
Halimanos
 - 2.2.1. Clasificación de halimanos
 - 2.2.2. Biosíntesis de halimanos
- 2.3.** Ácido *ent*-halímico como material de partida en síntesis.
- 2.4.** Halimanos naturales antibacterianos
 - 2.4.1. Clasificación de halimanos naturales antibacterianos
 - 2.4.2. Halimanos aislados de bacterias
 - 2.4.3. Halimanos antibacterianos aislados de plantas
- 2.5.** Agentes neurotróficos
- 2.6.** Bioconjugados γ -hidroxibutenolida como farmacóforo de acción antitumoral
 - 2.6.1. Antecedentes del grupo en el campo de los ATLs y bioconjugados

2.1. Diterpenos bicíclicos de esqueleto halimano. Biosíntesis general

Los terpenos constituyen una de las familias de productos naturales más numerosa, (actualmente se conocen más de 18.000 derivados) y estructuralmente diversa, que se encuentra en los seres vivos desarrollando diferentes funciones fisiológicas.

Los diterpenos son un grupo de terpenos derivados de pirofosfato de geranilgeranilo (PPGG) de los que se conocen actualmente más de 126 esqueletos carbonados diferentes.

Dichos compuestos se pueden agrupar en dos grandes grupos; aquellos diterpenos en los que el grupo pirofosfato (PP) interviene directamente en la generación de un carbocatión en el primer paso de la biogénesis, y en el otro grupo aparecen los diterpenos generados a partir de ciclaciones previas y posterior pérdida del grupo pirofosfato. Los labdanos y los diterpenos relacionados (como los clerodanos) se incluyen entre estos últimos. Dentro de ellos se enmarca el pequeño grupo de halimanos como se indica en el esquema biogénético general. (*Esquema 1*) A diferencia de labdanos y clerodanos, cuyos miembros rebasan los mil derivados, los halimanos conocidos hasta el momento son mucho menos numerosos, únicamente se conocen unos 300 compuestos con este tipo de esqueleto.



Esquema 1. Biosíntesis general: labdanos, halimanos y clerodanos.

La ciclación de PPGG (*Esquema 1*) genera el pirofosfato de copailo (PP-copailo) que da lugar a los diferentes labdanos. La evolución de PP-copailo mediante migración de H9 y Me-20 conduce al pirofosfato de tipo halimano que puede estabilizarse mediante eliminación de H1 o H5 o bien por transposición de H5 y eliminación de H6 dando lugar a diferentes esqueletos halimenos conocidos. Estos pueden clasificarse según resulte la posición del doble enlace anular en: halim-1(10)-eno, halim-5(10)-eno y halim-5-eno.¹¹³

2.2. *Halimium viscosum*. Quimiotipos y nuevos esqueletos carbonados. Halimanos

El *Halimium viscosum* (familia Cistaceae) es, hasta el momento, la planta de la que se ha aislado un mayor número de halimanos. Originalmente dichos compuestos se conocían con el nombre de labdanos reordenados,^{114,115} isolabdanos¹¹⁶ o friedolabdanos,¹¹⁷⁻¹²¹ pero con el propósito de simplificar la nomenclatura del gran número de compuestos de este tipo aislados de *Halimium viscosum* se propuso denominarlos halimanos, haciendo referencia a su fuente vegetal.¹²² Con el estudio de plantas clasificadas como *H. viscosum*, extensamente estudiada en nuestro grupo de trabajo del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Salamanca, se ha podido comprobar la existencia de cinco quimiotipos diferentes, conocidos de acuerdo al lugar de procedencia de la planta: *H. viscosum* (Villarino de los Aires, Salamanca),¹¹² (La Fregeneda, Salamanca),^{123,124} (Valparaíso, Zamora),¹²⁵ (Celorico da Beira, Portugal)¹²⁶ y (San João da Pesqueira, Portugal).¹²⁷

Como hecho más reseñable de dichos estudios, destacaremos la determinación estructural de compuestos correspondientes a cinco nuevos esqueletos carbonados: Tormesanos,^{128,129} tormesolanos,¹³⁰ fregenedanos,^{131,132} isofregenedanos,^{133,134} valparanos¹³⁵⁻¹³⁹ y valparolanos.¹⁴⁰ (Figura 17)

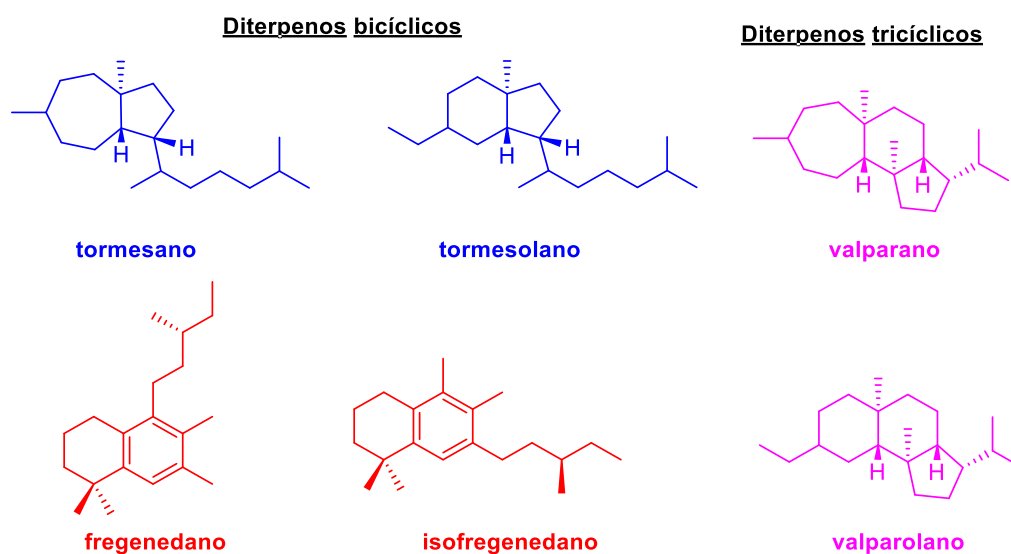


Figura 17. Nuevos esqueletos diterpénicos encontrados en *Halimium viscosum*.

Debido al continuo trabajo desarrollado por nuestro grupo con compuestos de esqueleto halimano, en 2018 se realizó una revisión bibliográfica publicada en *Natural Product Reports*¹¹³ en el que se realizó una clasificación, y una propuesta biosintética de dichos compuestos.

A continuación se tratará la clasificación que se ha establecido para dichos compuestos y un resumen de la propuesta biosintética de los mismos.

2.2.1. Clasificación de los halimanos

La clasificación propuesta para los halimanos (*Figura 18*) se basa en la posición del doble enlace anular y en la transformación de las estructuras básicas. De esta manera surgen los seis grupos de halimanos:

- 1.- Halim-1(10)-eno.
- 2.- Halim-5(10)-eno.
- 3.- Halim-5-eno.
- 4.- Dihidrohalimanos.
- 5.- Seco- y norhalimanos.
- 6.- Halimanos reordenados.

Los grupos principales de halimanos son los tres primeros, según la posición del doble enlace anular: 1(10), 5(10) y 5-eno. Por transformación de estos esqueletos básicos, aparecen otros tres grupos de halimanos: dihidro, seco y norhalimanos y finalmente halimanos reordenados, tal y como puede observarse en la *Figura 18*.

Hasta el momento, en las revisiones realizadas en nuestro grupo, se ha descrito la estructura de 246 halimanos¹¹³ y más recientemente se han encontrado 51 nuevos compuestos con dicho esqueleto.¹⁴¹

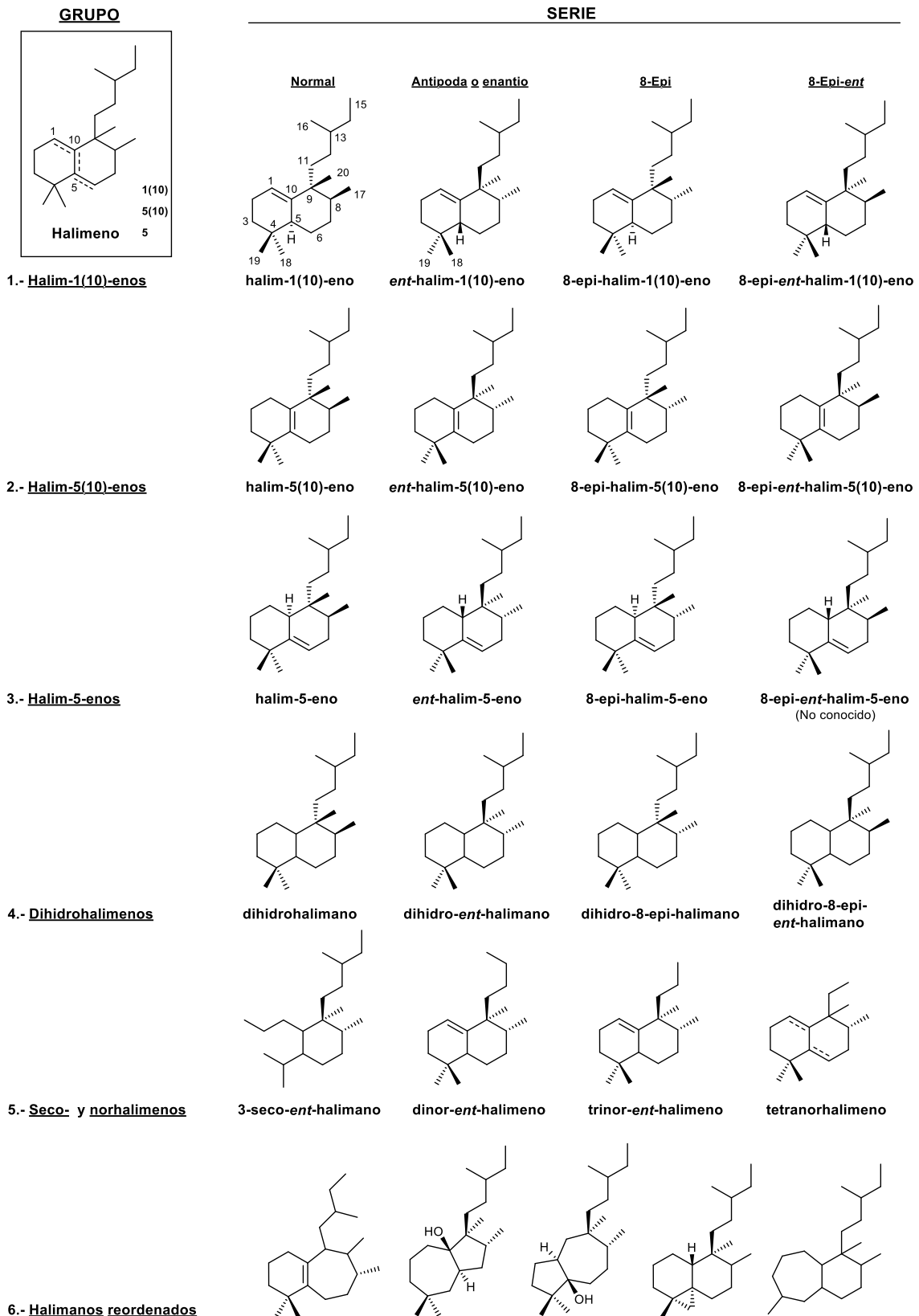


Figura 18. Clasificación de los halimanos.

Buena parte de los halimanos conocidos presentan actividades biológicas como antitumorales,¹⁴²⁻¹⁴⁶ antiinflamatorios,¹⁴⁷ antimicrobianos,¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ antifúngicos,¹⁵¹ inhibidores de la germinación,¹⁵² etc. y están siendo objeto de estudio actualmente.

En la *Figura 19* aparecen algunos de los halimanos conocidos más relevantes, como son ácido *ent*-halímico **12**, chettaphanín I **13**, chettaphanín II **14**, tuberculosinol **15**, isotuberculosinol **16**, 1-tuberculosinil-adenosina (1-TbAd) **17** y N⁶-tuberculosinil-adenosina (N⁶-TbAd) **18**.

Tuberculosinol^{153,154} **15**, isotuberculosinol¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ **16** y análogos **17-18** (*Figura 19*) son halimanos que, como se detallará más adelante, pueden ser considerados como Factores de Virulencia (FV) de *Mycobacterium tuberculosis*, que es el microorganismo que causa la enfermedad de la tuberculosis, una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en el mundo.¹⁵⁸ Estos compuestos podrían ser dianas en una nueva ruta hacia la terapia antiinfecciosa.^{158, 159} Recientemente, los derivados de la tuberculosinil-adenosina **17** y **18** se están probando como biomarcadores para el diagnóstico precoz de la tuberculosis.^{160,161}

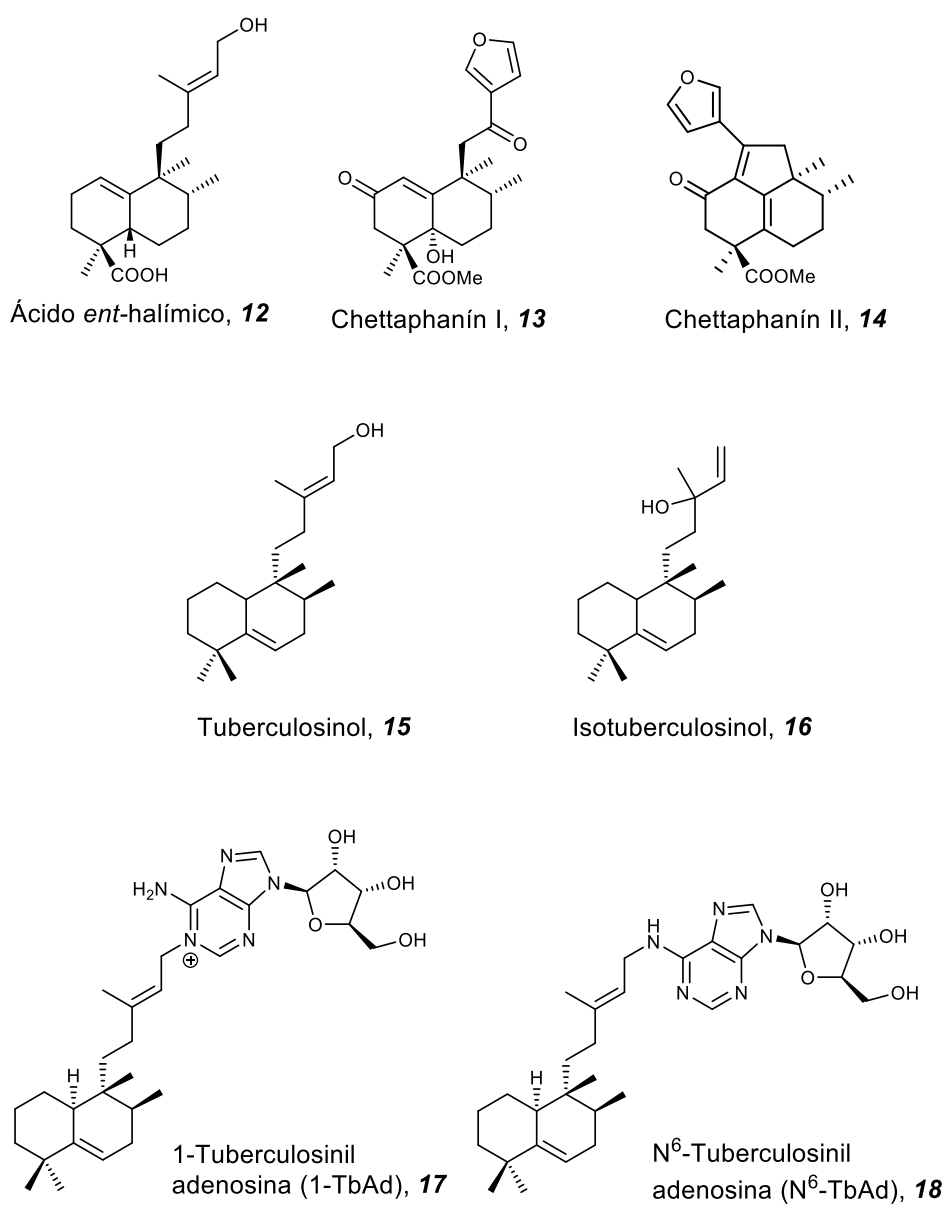


Figura 19. Halimanos más relevantes **12-18**.

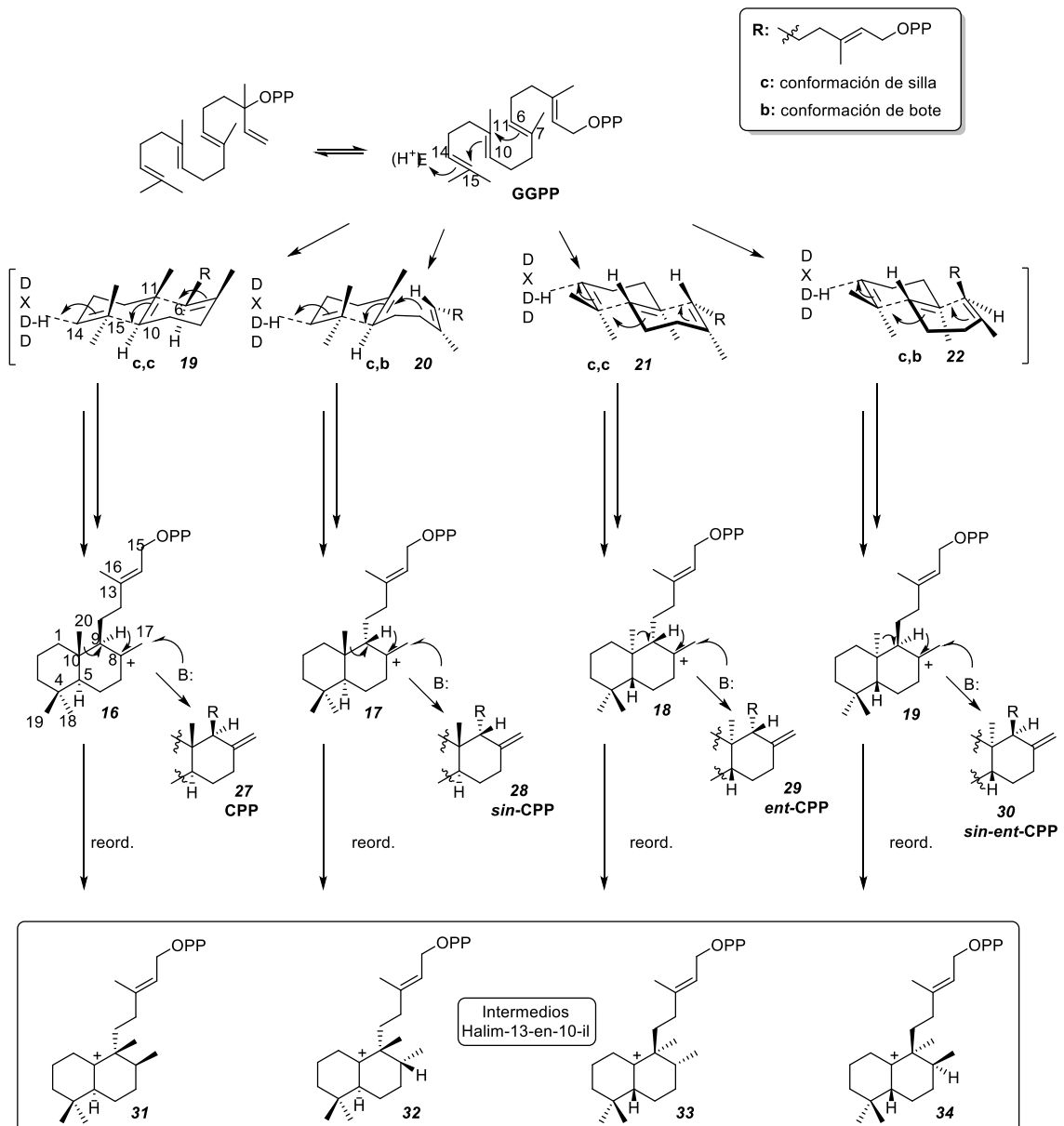
2.2.2. Biosíntesis de halimanos

Los diferentes diterpenos de esqueleto halimano se forman por ciclación de difosfato geranilgeranilo (GGPP) catalizada por diterpeno ciclasas de tipo II (DTCs).¹⁶²⁻¹⁶⁴

Las DTCs de tipo II se caracterizan por poseer una secuencia DXDD, rica en aspartato, y se diferencian de las terpenil sintasas de tipo I (TPS) por no tener el fragmento rico en aspartatos DDXXD. (Esquema 2) Se han realizado diferentes estudios que revelan que es el aspartato de “mitad” del fragmento DXDD actúa como catalizador ácido.^{165,166}

Dichas DTCs catalizan la biciclación de GGPP mediante un mecanismo ácido-base general. El proceso se inicia mediante protonación del doble enlace 14,15 del *E,E,E*-GGPP seguido por sucesivos ataques, mediante adición *anti*, de los dobles enlaces: C10 sobre C15, seguido de C7 sobre C11. Como resultado, se pueden formar cuatro sistemas bicíclicos. Dependiendo del conformero del sustrato proquiral (**19-22**) que intervenga en la ciclación, surgen los diferentes estereoisómeros de labda-13-en-8-il⁺ difosfatos intermedios (**23-26**). Estos difosfatos por reacción con una base proporcionan los diferentes tipos de labdano de la serie normal y antípoda **27-30**.

Cuando en lugar de producirse la estabilización de **23-26** (Esquema 2) por pérdida de protón se produce un reordenamiento, aparecen los cationes intermedios halim-13*E*-en-il difosfatos **31-34** respectivamente, que ya contiene la estructura con esqueleto halimano. Dicho reordenamiento se produce mediante un reordenamiento-1,2 secuencial de hidruro (H-C9 a H-C8) y de grupo metilo (migración de metilo de C10 a C9).

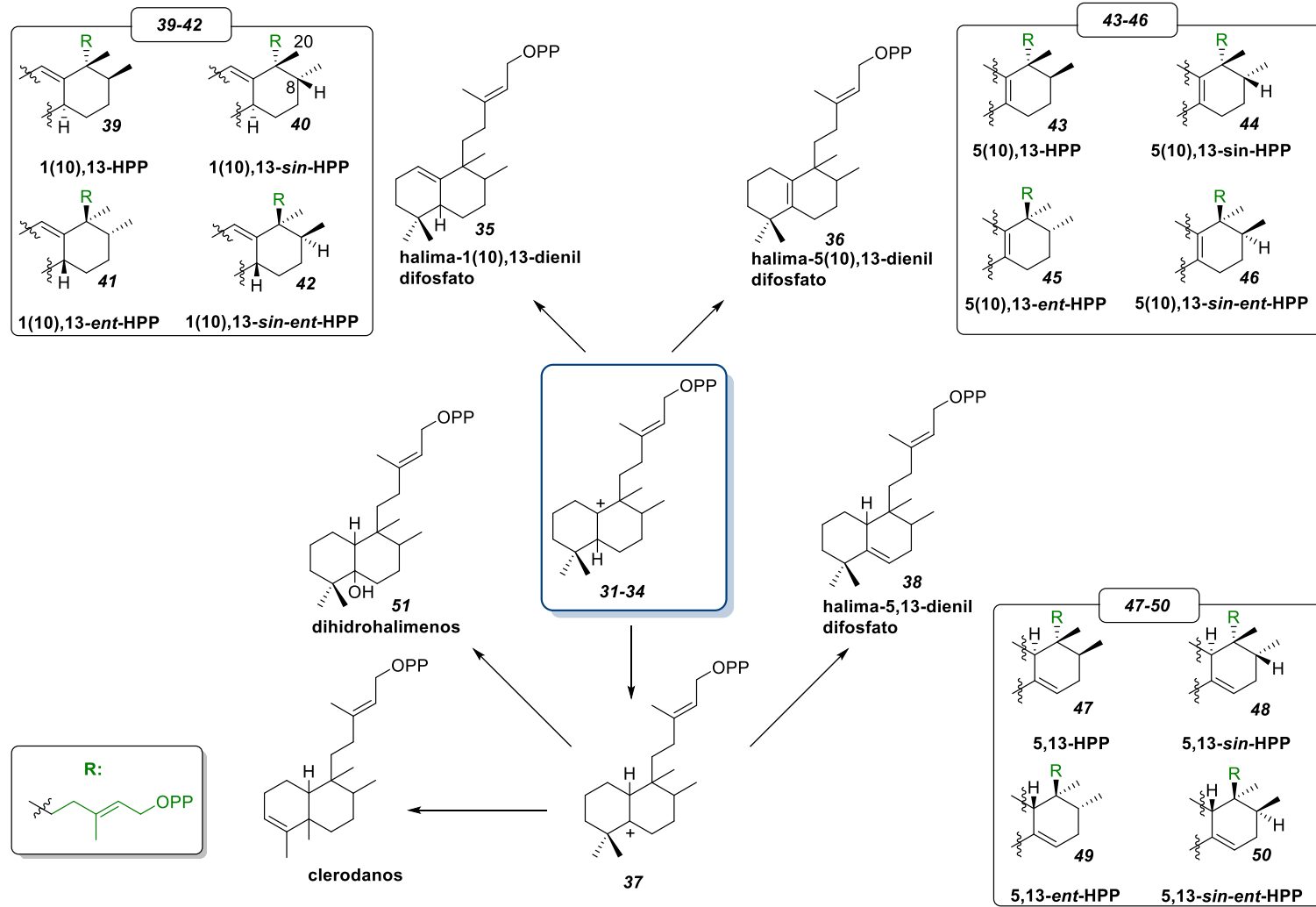


Esquema 2. Biogénesis de los halimanos.

Dichos halimenil-difosfatos **31-34** pueden evolucionar de diferentes formas. (*Esquema 3*) Puede ser por pérdida de protón y dar lugar a los dos halimenil difosfato intermedios **35** y **36** o reordenar mediante trasposición de hidruro, generando el carbocatión intermedio **37**, que puede perder un protón y generar el halimenil difosfato **38**.

Los intermedios halimenil difosfatos **35**, **36** y **38** pueden presentar diferentes formas diastereoisoméricas (**39-42**), (**43-46**) y (**47-50**) que corresponden a HPP, *sin*-HPP, *ent*-HPP y *sin-ent*-HPP respectivamente y son los intermedios precursores de la mayoría de los halimanos conocidos.^{162,167,168} El prefijo *sin* hace referencia a la configuración *cis* entre H8 y C20.

El intermedio **37** también puede estabilizarse con agua para formar dihidrohalimenos **51** o reordenar un grupo metilo (migración de metilo de C4 a C5) generándose así una estructura diterpénica de esqueleto clerodano, que pueden ser *trans* y *cis* clerodanos generando las más de 1300 estructuras conocidas de esta familia de diterpenoides.



Esquema 3. Biogénesis de los halimanos. (Continuación)

2.3. Ácido *ent*-halímico como material de partida en síntesis

El ácido *ent*-halímico **12** y su acetyl derivado, son los componentes mayoritarios del extracto de hexano de *Halimium viscosum* (Villarino de los Aires).^{112,123,124,169} Actualmente se ha desarrollado un procedimiento de aislamiento barato y eficaz que permite disponer de forma rápida de dicho compuesto como material de partida, que puede ser utilizado en cantidad de multigramos.

En la *Figura 20* aparecen algunos de los derivados sintetizados a partir de ácido *ent*-halímico **12**, clasificados en diferentes grupos:

- 1.- *ent*-Halimanolidas.¹⁷⁰⁻¹⁷³
- 2.- Chettaphanines.^{174,175}
- 3.- Sesterterpenolidas.^{122, 209-211}
- 4.- Bioconjugados de sesterterpenolidas y glicerofosfolípidos.¹⁷⁶
- 5.-Compuestos reordenados de diferentes esqueletos: *ent*-labdanos,¹⁷⁷abeopicrasanos¹⁷⁸ y propelanos.¹⁷⁹
- 6.- Sesquiterpeno quinona e hidroquinona.¹⁸⁰
- 7.- Sesqui- y diterpeno-alcaloides.^{127, 217-221}

2.4. Halimanos naturales antibacterianos

Actualmente se tiene constancia de que las bacterias son microorganismos capaces de desarrollar colonias estructuradas denominadas biopelículas (*biofilm*) y que estas agrupaciones presentan mayor resistencia frente a agentes biocidas. Se conocen halimanos con propiedades como bactericidas que potencialmente podrían utilizarse como agentes *antibiofilm*.

Por ello, durante el desarrollo de este trabajo doctoral, y dada la relación de nuestro grupo con los halimanos, se decidió llevar a cabo una revisión¹⁸¹ sobre los halimanos antibacterianos naturales conocidos, del cual se describe a continuación un resumen.

Una biopelícula bacteriana es una colonia estructurada de células bacterianas que aparece cuando el plancton de dichos microorganismos está incrustado en una matriz polimérica compuesta por exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos desarrollados por los mismos, y adheridos a una superficie viva o inerte.^{182,183} Para formar parte de una biopelícula, las bacterias realizan cambios importantes en sus estructuras y metabolismo.

El *biofilm* bacteriano facilita la supervivencia de las bacterias patógenas en su ambiente biológico, protegiendo a las bacterias de la respuesta inmunitaria del huésped y de biocidas como antibióticos o desinfectantes. El impacto de las biopelículas en la salud está fuera de discusión, pues a medida que aumenta la formación de biopelículas aumenta la resistencia bacteriana a los antibióticos. El concepto moderno de biopelículas fue introducido por Costerton y col.,¹⁸² pero no fue hasta la década de 1990 cuando apareció el concepto actual de biopelícula.¹⁸⁴

Las biopelículas pueden actuar como reservorios de agentes infecciosos. Más del 60% de las infecciones bacterianas son causadas por biopelículas y son considerados como una amenaza clínica por su crecimiento en catéteres o instrumentos quirúrgicos, por ello es necesario desarrollar nuevos protocolos para desinfección, no solo en entornos clínicos sino también en granjas de animales y en el procesamiento de alimentos.^{184,185}

Las biopelículas de *Mycobacterium tuberculosis* descubiertas recientemente abren un nuevo área de investigación. El tratamiento de estas infecciones es más efectivo cuando

se utilizan antibióticos en los primeros pasos del desarrollo de la biopelícula.¹⁸⁴ Se ha demostrado que el *biofilm* está implicado en la resistencia de *M. tuberculosis* a medicamentos antituberculosos y se ha comprobado que la tasa de muerte de bacterias aumenta cuando se combinan, en los tratamientos, los antibióticos con agentes *antibiofilm*.^{184,186-188} Por ello, es fundamental desarrollar nuevos procedimientos que permitan una detección precoz de la enfermedad introduciendo nuevos biomarcadores.

Las nuevas terapias dirigidas al control de los factores de virulencia (FV) son de máximo interés. Los FV están involucrados en invasión, persistencia, lisis y evasión del sistema inmunitario innato, aunque las FV no son esenciales para el crecimiento bacteriano fuera de la célula huésped. Dos diterpenos tuberculosinol, **15** e isotuberculosinol, **16**, pueden considerarse FV en *Mycobacterium tuberculosis*. (Figura 21)^{159,189}

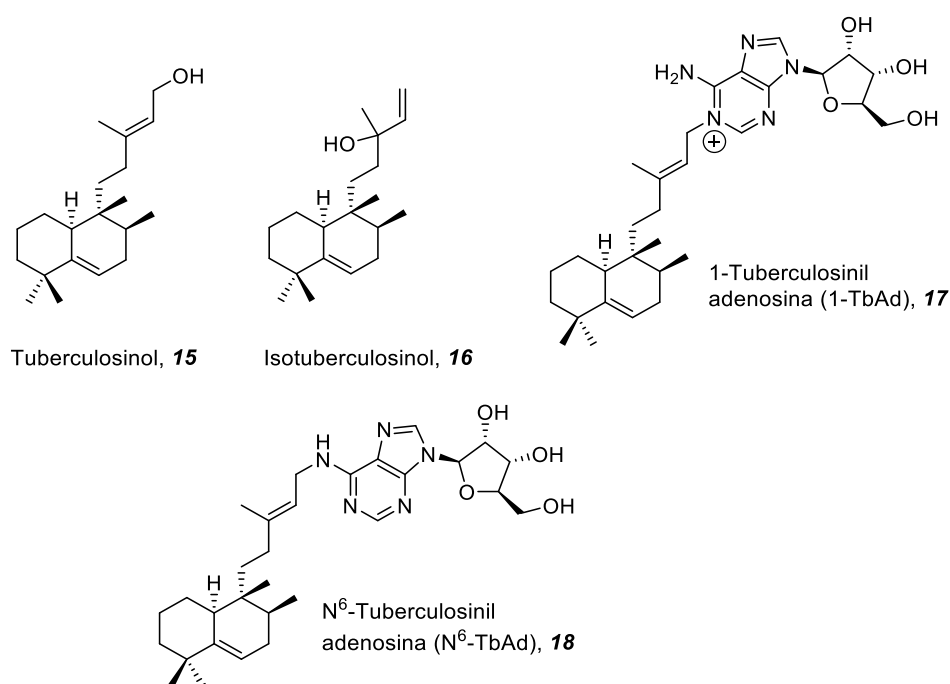


Figura 21. Halimanos como VF y potenciales biomarcadores.

En la biosíntesis de tuberculosinol, **15**, e isotuberculosinol, **16**, intervienen dos genes (Rv3377c y Rv3378c) que se encuentran solo en especies virulentas del género *Mycobacterium* (como *M. tuberculosis* y *M. bovis*),^{190,191} por lo que pueden estar involucradas en los procesos de infección de estas bacterias. Tuberculosinol, **15**, e

isotuberculosinol, **16**, inhiben la maduración del fagolisosoma, así como la fagocitosis de los macrófagos, además se produce un efecto sinérgico debido a la coexistencia de ambos compuestos.¹⁹²⁻¹⁹⁴

Dado que, tuberculosinol, **15**, como isotuberculosinol, **16**, son biosintetizados por las proteínas (Rv3377c y Rv3378c) que son esenciales para la supervivencia de las bacterias dentro del macrófago, ambas enzimas son nuevos objetivos para terapias anti-infecciosas y para el desarrollo de nuevos fármacos contra tuberculosis pues bloquean la formación de los factores de virulencia (tuberculosinolos).¹⁸⁹

Además, los nuevos derivados naturales del tuberculosinol, con una unidad de adenosina en C15 del diterpeno, aislados de *M. tuberculosis*,^{160,195} 1-TbAd, **17** y N⁶-TbAd, **18**, se están probando como biomarcadores para el diagnóstico precoz de la tuberculosis. (*Figura 20*)

En ese estudio lipidómico se ha demostrado que la enzima Rv3378c es la responsable de la formación de 1-TbAd, **17**; y por tanto esta proteína parece ser una tuberculosinil transferasa (prenil transferasa).¹⁶⁰

A continuación se realizara un resumen de dicha revisión bibliográfica,¹⁸¹ referente a halimanos naturales antibacterianos.

2.4.1. Clasificación de halimanos naturales antibacterianos

En organismos marinos y bacterias, los halimanos no son muy abundantes, pero son muy interesantes debido a sus propiedades biológicas. Estos compuestos han sido aislados de moluscos (*Austrodoris*, *Spurilla*), esponjas (*Agelas*, *Raspailia*, *Dysidea*), tunicados (*Cystodytes*), cnidarios (*Echinomuriceae*, medusa, anémonas, pólipos o corales). Los halimanos aislados de organismos marinos se han organizado en tres grupos atendiendo a sus características estructurales: halimanos simples, halimano-gliceroles y halimano-purinas. En otros grupos, se recogen los halimanos procedentes de bacterias y plantas.

Las halimano-purinas, derivados de halimano de biogénesis mixta, siguen procesos biosintéticos similares a las rutas en las que actúan la Rv3378c como enzima.

- **Halimanos simples de origen marino con actividad antibacteriana**

En la *Figura 22* aparecen los halimanos de origen marino **16** y **52-58** encontrados hasta el momento. Entre ellos se encuentra nosybercol, aislado como un solo estereoisómero en 2004 de la esponja *Raspailia sp.* de las Islas Nosy Be (Madagascar).¹⁹⁶ En el momento de su descubrimiento, no se determinó ni la configuración del C-13 ni la configuración absoluta. Unos años más tarde, el nosybercol fue identificado como isotuberculosinol, **16**, uno de los metabolitos aislados de *M. tuberculosis* que aparece junto con tuberculosinol **15**. Las estructuras de estos últimos compuestos fueron corroboradas por síntesis, estableciéndose de esta manera la configuración absoluta.^{197,198}

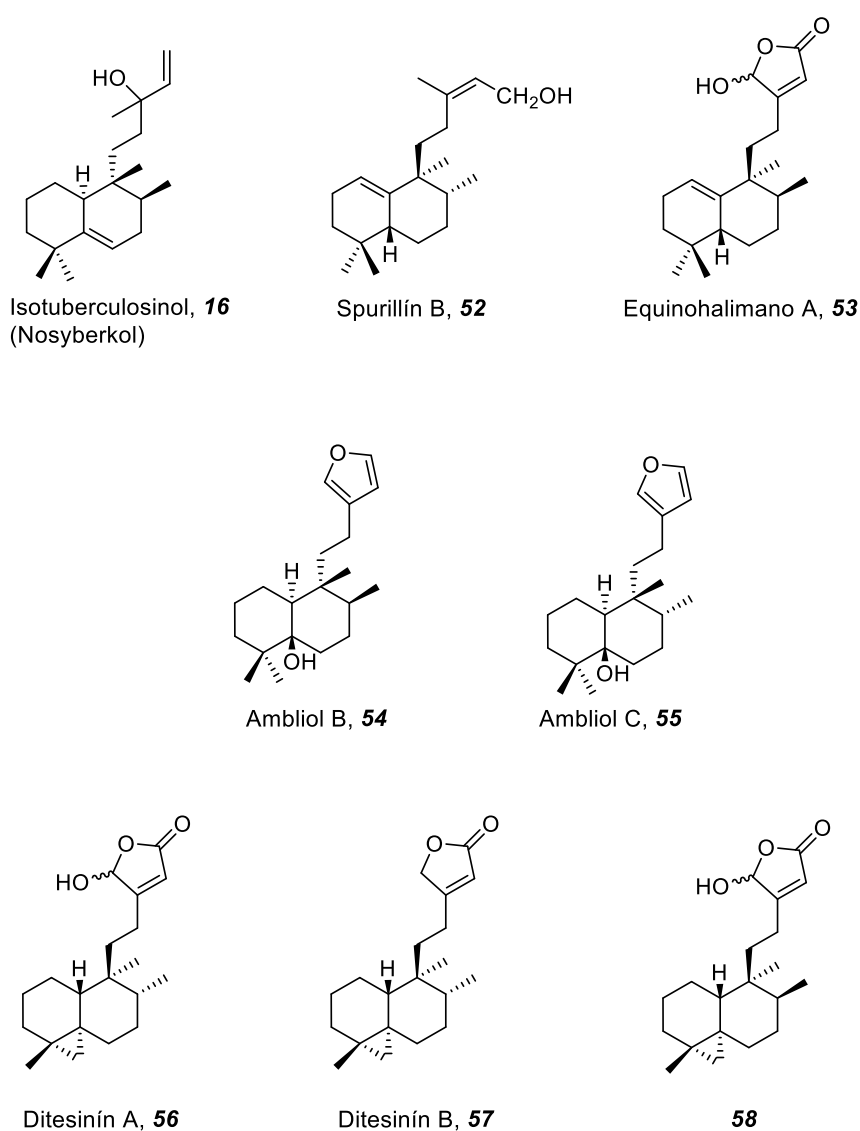


Figura 22. Halimanos simples de origen marino, antibacterianos **16** y **52-58**.

- **Derivados halimano-glicerol aislados de organismos marinos**

En la *Figura 23* aparece la estructura de una serie de halimano glicerol aislados de alomonas procedentes del nudibranquio antártico (*Austrodoris kerguelensis*), conocidos como babosas de mar. Dichas alomonas están envueltas en la defensa de dichos moluscos. Todos estos compuestos, **59-62**, son ésteres de 8-epi-ent-halim-1(10)-eno glicerol, con el resto de glicerol libre o esterificado como acetatos.¹⁹⁹⁻²⁰¹

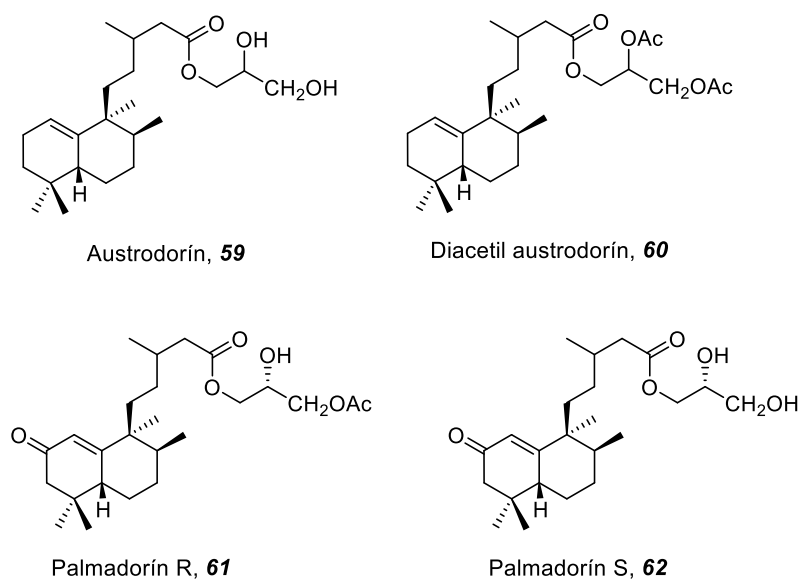


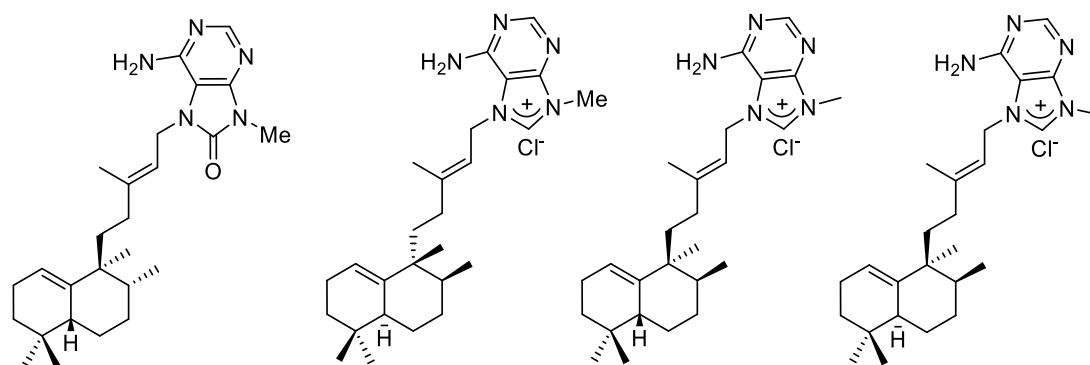
Figura 23. Halimano-glicerol de organismos marinos, **59-62**.

- **Derivados halimano-purinas**

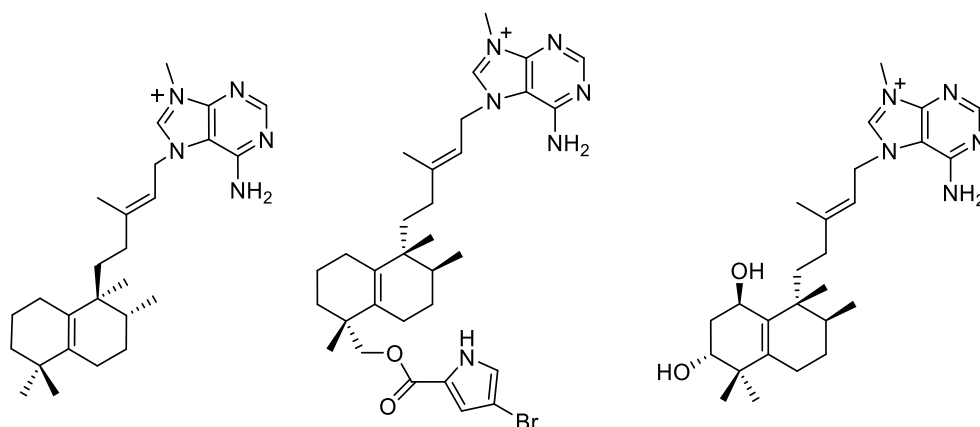
Se han caracterizado 11 halimano-purinas (**63-73**), principalmente aisladas de esponjas marinas. (*Figura 24*) Como puede observarse, aparecen halimanos que estructuralmente pertenecen a diferentes grupos.

Todos ellos fueron aislados de esponjas del género *Agellas* excepto asmarina I **72** y asmarina J **73**, aislados de *Raspailia* sp.²⁰² Estos compuestos muestran actividad antibacteriana, antifúngica, antipalúdica y citotóxica entre otras.¹⁹⁵ Algunos de estos compuestos poseen actividad antiadherente frente a macroalgas por lo que pueden ser útiles en la industria pesquera como alternativa a la utilización de derivados metálicos más contaminantes.²⁰³ Varios de estos compuestos son estructuralmente similares a las

purinas diterpénicas aisladas de *Mycobacterium tuberculosis* (1-TbAd, **17** y N⁶-TbAd, **18**) aunque en estos últimos la purina aparece glicosilada y con una unión diferente a la unidad diterpénica.²⁰³



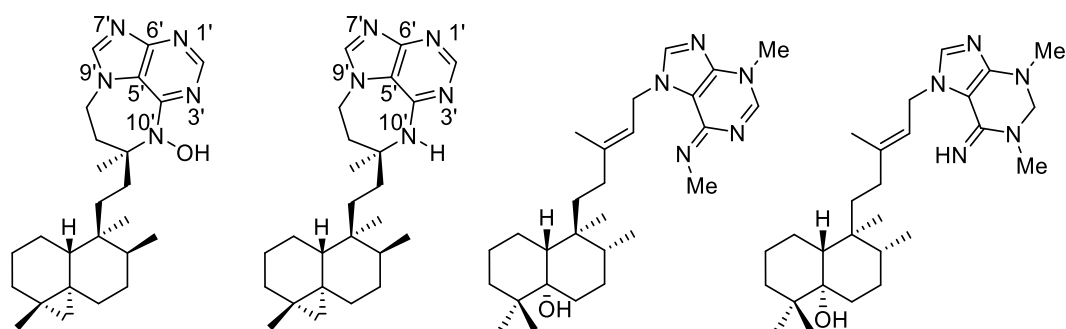
(+)-8'-Oxo-agelasina C, **63** (-)-Agelasina C, **64** Epi-agelasina C, **65** Isoagelasina C, **66**



(+)-Agelasina J, **67**

(+)-Agelasina O, **68**

(+)-Agelasina S, **69**



(+)-Agelasimina B, **71** (+)-Agelasimina A, **70**

Asmarina J, **73**

Asmarina I, **72**

Figura 24. Derivados halimano-purinas de organismos marinos, **63-73**.

2.4.2. Halimanos aislados de bacterias

En la *Figura 25* aparecen los halimanos aislados de bacterias, pero entre ellos también se encuentra nosyberkol (isotuberculosinol), **16**, aislado de esponjas marinas del género *Raspailia* sp.^{193,194} Todos ellos son halim-5-enos (**15-18** y **74-76**) y se caracterizan por sus actividades antibacterianas, la importancia de estos compuestos ya se ha comentado anteriormente.^{160,194,195,197,198,204-207}

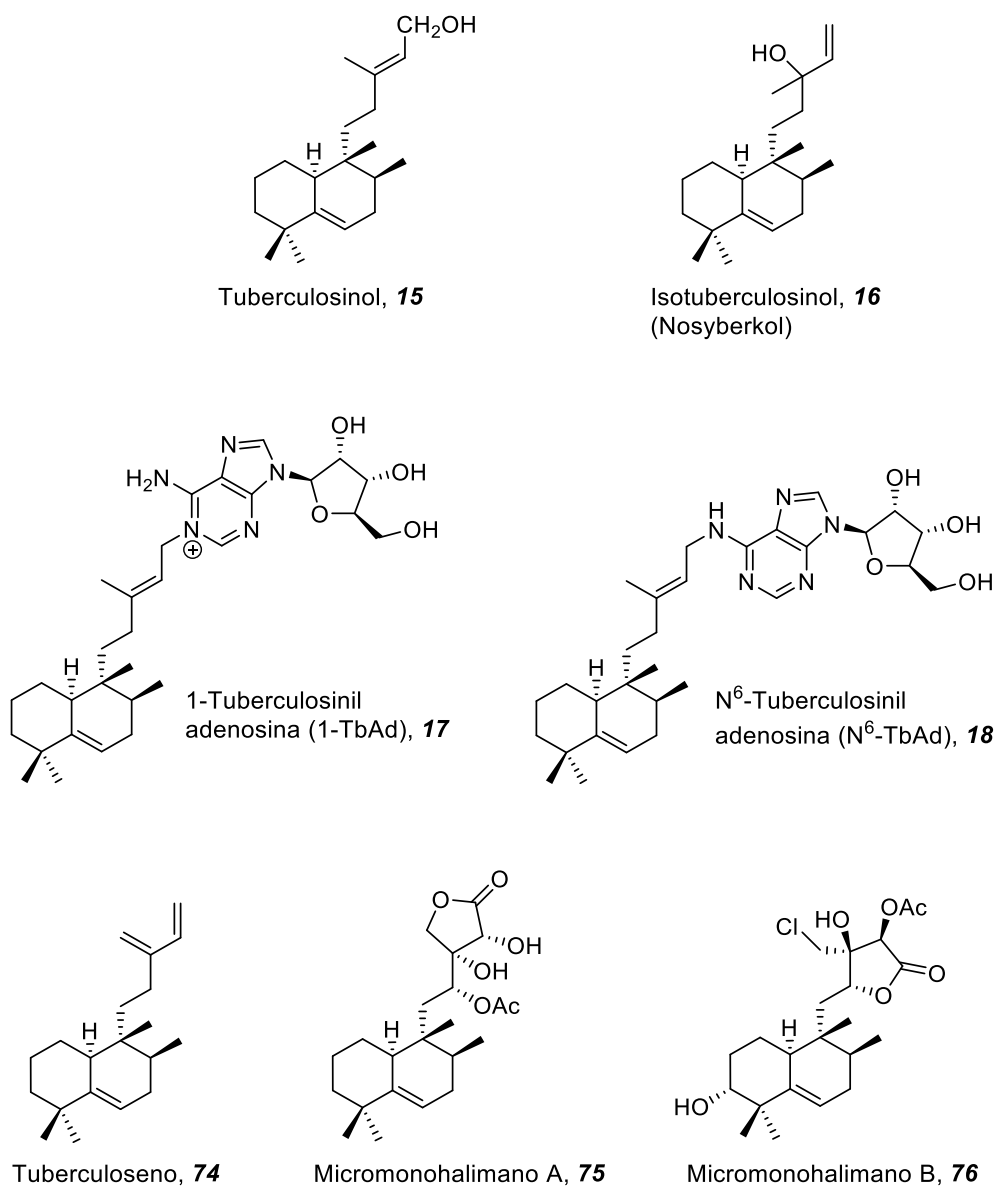


Figura 25. Halimanos de origen bacteriano **15-18** y **74-76**.

2.4.3. Halimanos antibacterianos aislados de plantas

Los halimanos antibacterianos aislados de plantas (**77-81**) se muestran en la *Figura 26*.

Todos ellos son *ent*-halimanos excepto **79** que es un halimano.^{150,208-212}

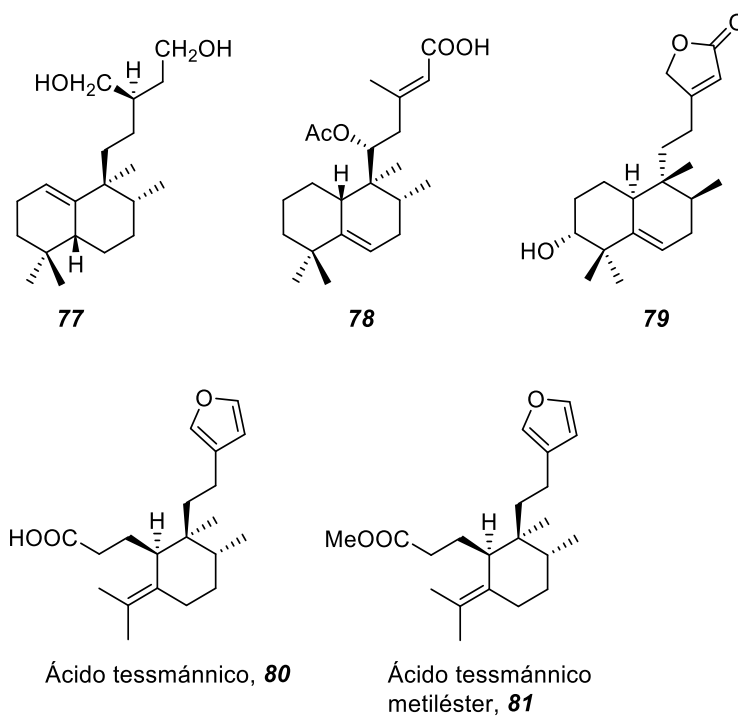


Figura 26. Halimanos antibacterianos aislados de plantas, **77-81**.

Hasta el momento, se ha realizado la síntesis total de los halimanos naturales recogidos en la *Figura 27*. Mediante su síntesis total, queda corroborada la estructura de dichos productos naturales y establecida su configuración absoluta.

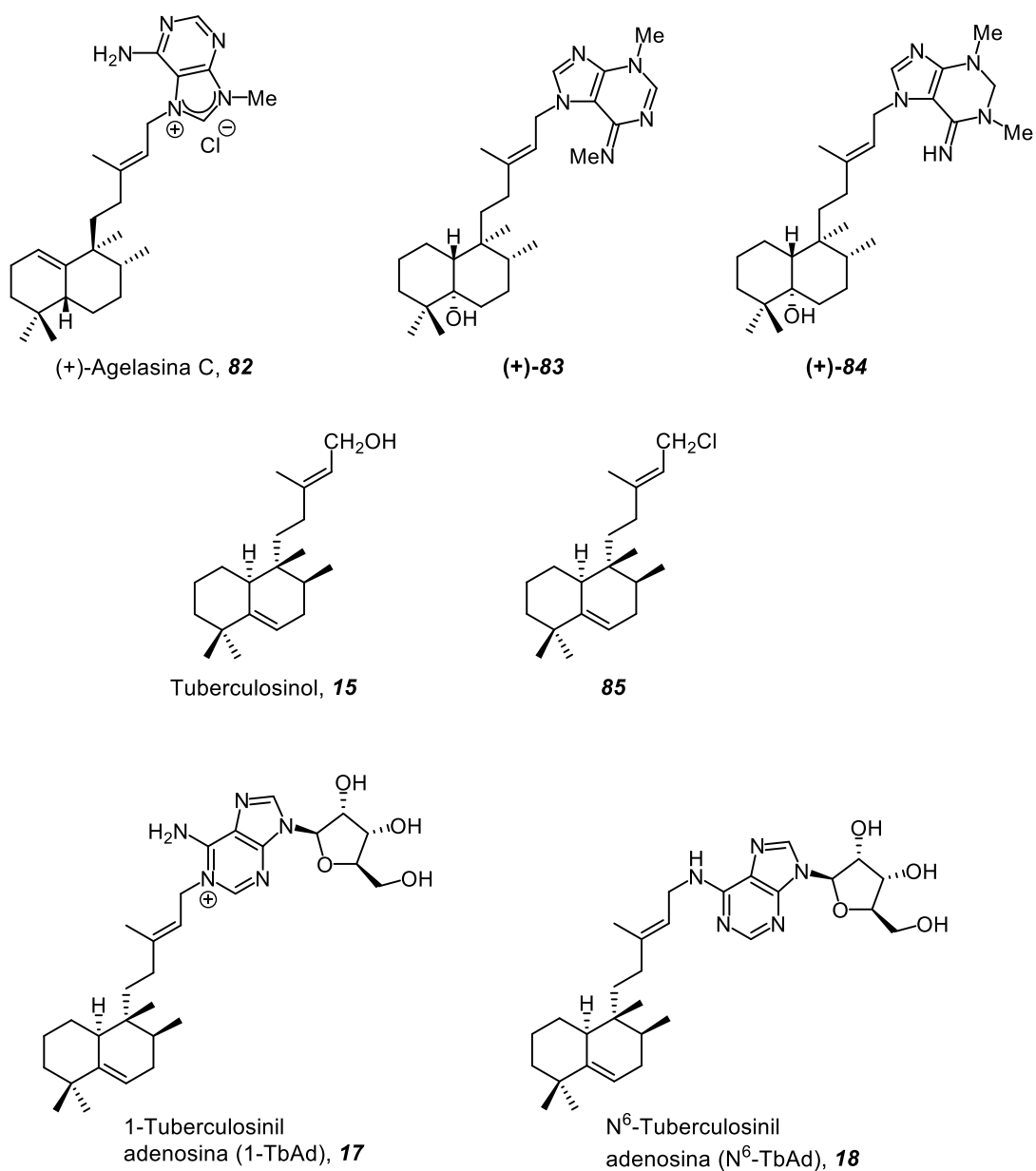


Figura 27. Halimanos antibacterianos sintetizados hasta el momento, **82-85**.

2.5. Agentes neurotróficos

Uno de los principales síntomas en las enfermedades degenerativas es la muerte de la célula neuronal seguida de la pérdida de vías neuronales. En cultivos neuronales, el crecimiento de las neuritas produce brotes celulares capaces de transformarse en axones o dendritas, que facilitan conexiones funcionales en el espacio sináptico neuronal. Tales conexiones juegan un papel importante en la cognición cerebral, plasticidad neuronal, supervivencia neuronal y en la regeneración.

Por lo tanto, los fármacos que estimulan el crecimiento de las neuritas (*neurotróficos*) resultan beneficiosos y evitan de ese modo la degeneración neuronal.

Recientemente se ha establecido la existencia de una familia de compuestos que contienen el fragmento metilencicloalquil acetato (MCA), que interactúan con las células neuronales y podrían ser inductores del crecimiento de las neuritas. (Figura 28) De esta manera, el fragmento MCA se presenta como un farmacóforo de compuestos con actividad neurotrófica.²¹³

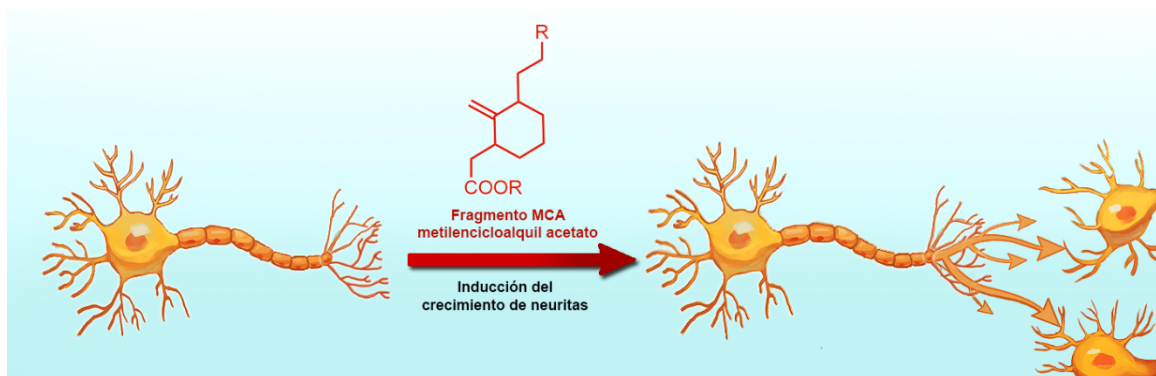


Figura 28. Efecto de los MCA como neurotróficos.

La estructura del farmacóforo MCA puede ser frecuentemente observada como fragmento estructural de varios compuestos y moléculas de origen natural. Dicha unidad de MCA se puede observar (Figura 29) en compuestos de origen biológico muy diverso como en terpenoides, alcaloides, y antibióticos.

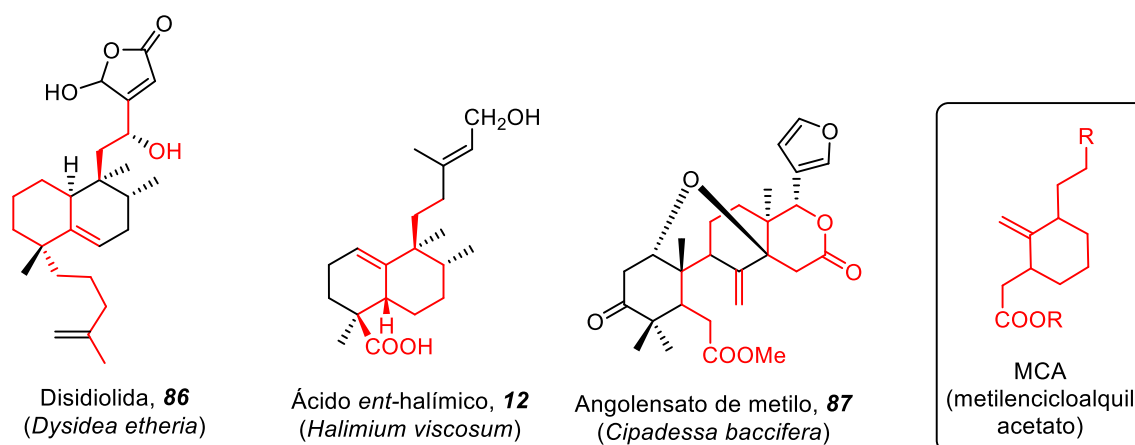


Figura 29. Compuestos naturales que contienen el fragmento de MCA.

Debido a que entre los terpenoides señalados en el citado artículo de P. Lazarovici, D. Tsvetikhovskiy y col.²¹³ se encuentra el ácido *ent*-halímico **12**, nuestro grupo decidió realizar una revisión sobre este tipo de compuestos diterpénicos,²¹⁴ recogiendo en dicha publicación únicamente los diterpenos de origen natural.

Además, en el trabajo que ahora se presenta, se pretende ensayar dicha actividad, en algunos halimanos naturales y sintéticos fácilmente asequibles, frente a células PC12. Estas células constituyen un modelo neuronal utilizado en la investigación de nuevos fármacos en el campo de las neurociencias.²¹⁵

En el resumen de la revisión que aquí recogemos, en las Figuras 30-32, únicamente aparecen los compuestos que se han considerado más relevante de cada grupo en el que han sido clasificados dichos compuestos.¹¹³

Los diterpenos naturales que contienen el fragmento MCA, se han clasificado en tres grupos según el doble enlace anular se encuentre en el anillo A, Grupo I (Figura 30) o en el anillo B, Grupo II (Figura 31) y los secoderivados aparecen en el Grupo III. (Figura 32) En el trabajo de revisión aparecen recogidos para los compuestos de cada grupo una tabla en la que se indica la procedencia natural, la actividad biológica y la referencia bibliográfica. Todos estos compuestos se han aislado en plantas de diferentes familias y únicamente dos de ellos se han encontrado en microorganismos, bacterias del género *Micromonospora*.

Grupo de halim-1(10)-enos

En este grupo se encuentran 47 compuestos de esqueleto *ent*-halimano (Figura 30) Casi todos ellos aparecen funcionalizados en C18 con función carboxílica, y únicamente dos presentan en C19 un grupo hidroxilo o función carboxílica. En este grupo se encuentran compuestos como chettaphanín I **13**, que es el primer halimano conocido y el ácido *ent*-halímico **12**, que da nombre a esta familia de diterpenos.

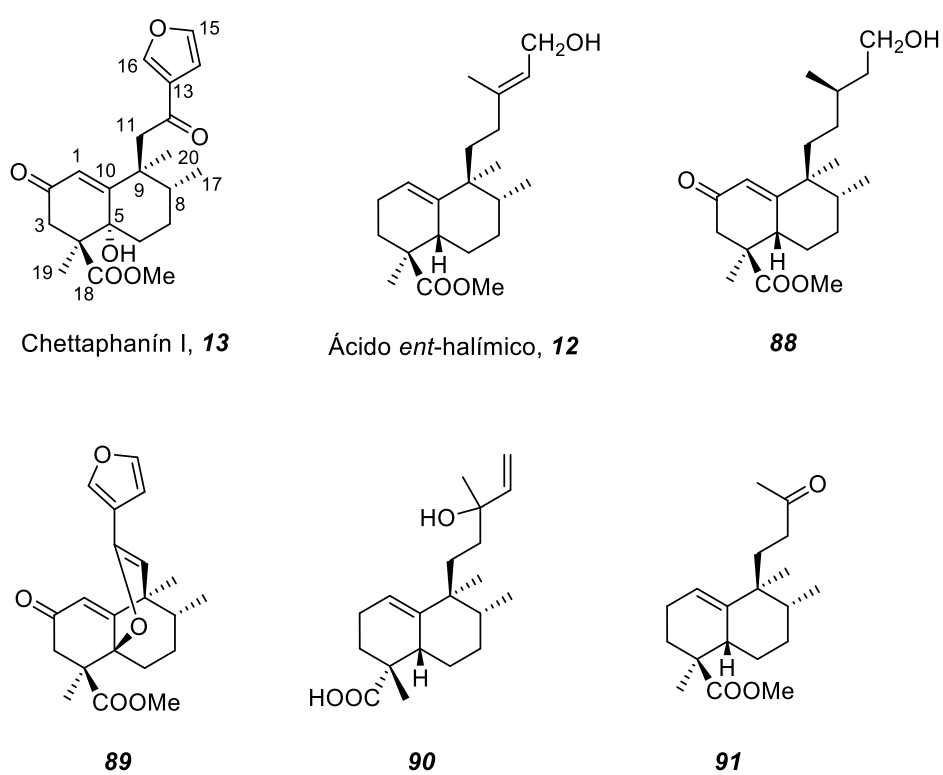


Figura 30. Halimanos del grupo *Ent*-halim-1(10)-enos **12-13** y **88-91**.

2.6. Bioconjugados γ -hidroxibutenolida como farmacóforo de acción antitumoral

El proyecto de investigación en el que se encuadra este trabajo tiene como uno de sus objetivos la preparación de bioconjugados resultantes de la unión de halimanolidas con alquilfosfocolinas antitumorales.

Actualmente, se utiliza bien la terapia combinada, o bien la preparación de bioconjugados resultantes de la unión de productos naturales o derivados sintéticos de los mismos con otros fármacos a fin de lograr un efecto sinérgico en la acción farmacológica.^{216,217} Los híbridos funcionales o bioconjugados son sistemas liberadores de moléculas bioactivas en una diana farmacológica; dichos sistemas están formados por un agente bioactivo unido a un fragmento que le otorgue bien selectividad, o bien que actúe en otra diana y constituyan en conjunto un sistema de acción farmacológica dirigida o multidiana respectivamente.

Los fragmentos que forman el bioconjugado, pueden estar unidos directamente o separados a través de una molécula de pequeño tamaño denominada separador o *linker*.

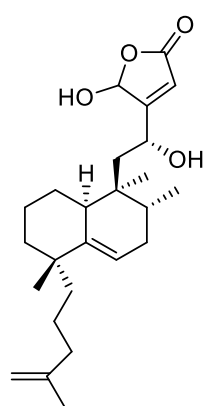
La naturaleza del híbrido uniendo dos o más agentes biológicamente activos se puede clasificar dependiendo del tipo de unión. Así, el híbrido puede formarse por unión de dos o más fragmentos moleculares, enlazándolos de manera que sea una unión disociable o no, normalmente mediante la utilización de un separador (*linker*). De esta manera, el bioconjugado mantiene o no su estructura íntegra para lograr los efectos deseados mientras se encuentra en el organismo según el enlace sea estable o se facilite su ruptura. En consecuencia, se considera la estrategia prodroga cuando el enlace del híbrido es disociable o si no se produce la ruptura, se considera una aproximación farmacológica mediante híbridos.

2.6.1. Antecedentes del grupo en el campo de los ATLs y bioconjugados

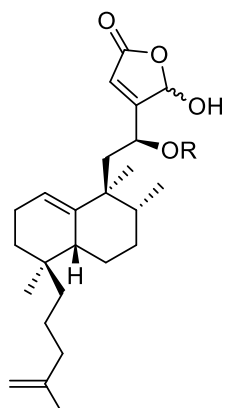
Durante años, nuestro grupo ha mostrado interés en la síntesis de butenolidas y γ -hidroxibutenolidas tanto diterpénicas como sesterterpénicas, (*Figura 33*) debido a la interesante actividad biológica que presentan estas moléculas que aparece asociada a la presencia de dicho fragmento lactónico como farmacóforo para la acción citotóxica. Dichos compuestos presentan estructura carbonada bicíclica del tipo de disidiolida **86** o 15-*epi-ent*-cladocorán **101-102** o tricíclica como luffolida **106**.

Considerando la inhibición que ejercen las sesterterpenolidas tipo disidiolida sobre la proteína fosfatasa Cdc25A (IC₅₀ \approx 9.4 μ m) y su homólogo Cdc25B (IC₅₀ \approx 87 μ m), que son enzimas que intervienen en el ciclo celular, tal y como se podría esperar, se ha comprobado que inhiben el crecimiento de varias líneas de tumores sólidos y leucemias a baja concentración micromolar.

Las 15,18-bisepi-cladocorán A y B **101** y **102**, o sus análogas **103-105**, sintetizadas por primera vez por nuestro grupo, son tan activas como la propia disidiolida **86** frente a varias líneas tumorales.²¹⁸ Con la sesterterpenolida **86** se han sintetizado diferentes híbridos funcionales,¹⁷⁶ como se verá más adelante. Del mismo modo, sesterterpenolidas tipo luffolida **106** son inhibidores de fosfolipasa A₂ presentando actividad antiinflamatoria. Como materiales de partida en la síntesis de dichas butenolidas **86-109** se utilizaron compuestos naturales abundantes y bien conocidos como ácido *ent*-halímico **12**, ácido zamoránico²¹⁹ y esclareol.²²⁰



Disidiolida, **86**
(*Dysidea etheria*)

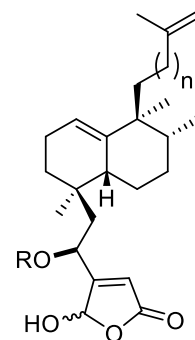


15-epi-ent-
cladocorán A y B

R

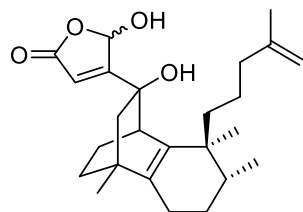
Ac **101**

H **102**

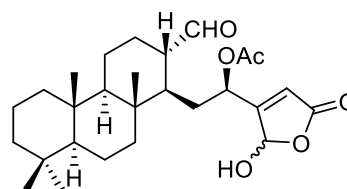


103 R: Ac, H, n=1

104 R: Ac, H, n=2



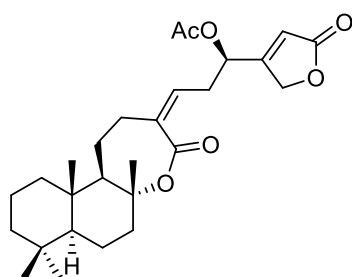
105



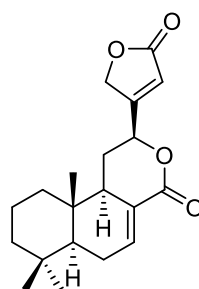
Luffolida, **106**

(*Luffariella* sp.)

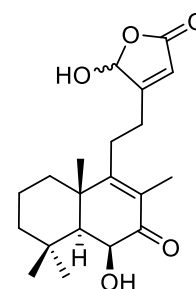
PLA₂ inhibidor



Luffalactona, **107**
(*Luffariella variabilis*)
PLA₂ inhibidor



Limonidilactona, **108**



Sibiricinona B, **109**

Figura 33. Sesterterpenolidas y diterpenolidas bioactivas, **86** y **101-109**.

En una nueva línea de investigación en la que está trabajando nuestro grupo se han sintetizado tanto ATLS, como bioconjugados en los que participan éteres lipídicos antitumorales y lactonas sesterterpénicas antitumorales.

En el primer trabajo que realizamos en el campo de los ATLS se sintetizaron análogos de edelfosina con diferentes modificaciones en la cadena lateral.²²¹ Uno de ellos (*Figura 34*) es un derivado insaturado en la posición de mitad de la cadena alquílica, **110**, desde el cual se puede acceder a la mezcla de yoduros derivados **111**, también se sintetizaron el lisofosfolípido **112** y la fosfatidilserina **113**. Dichos compuestos presentan resultados biológicos prometedores.

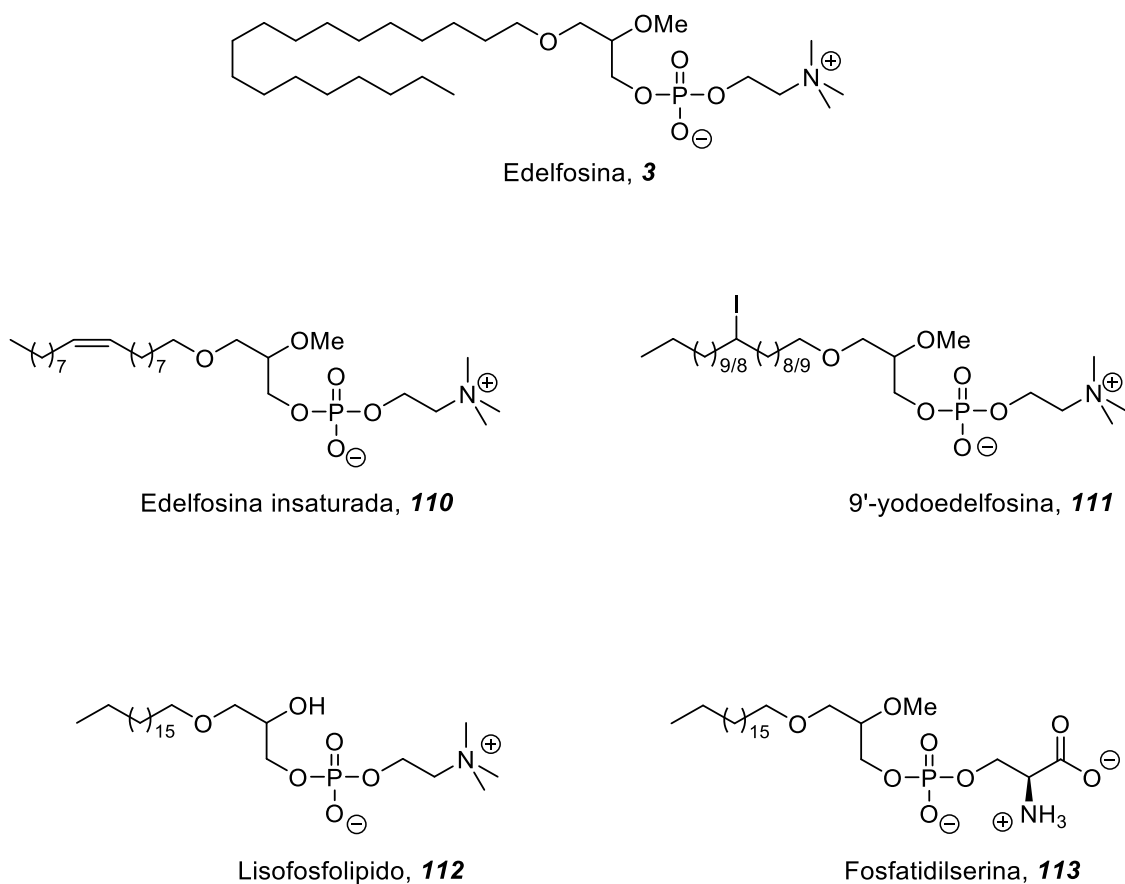


Figura 34. Análogos de edelfosina **3** sintetizados: **110-113**.

En un trabajo posterior se sintetizaron una serie de derivados de edelfosina (*Figura 35*)¹⁴¹ funcionalizados en la posición de mitad de la cadena, derivados **114-116**, al final de la cadena, derivados (**117-120**) y derivados funcionalizados en C2 (**121-123**).

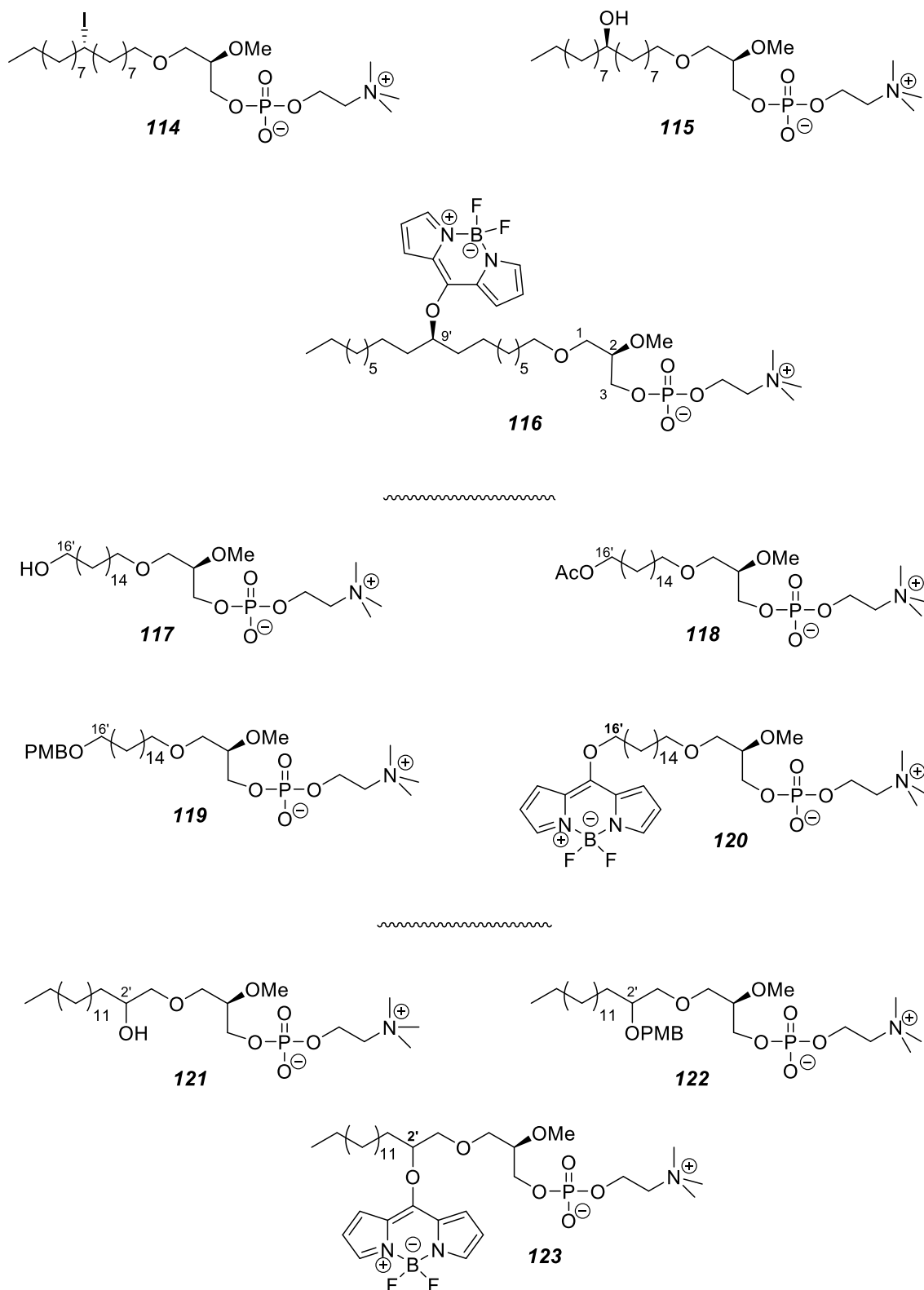


Figura 35. Análogos de edelfosina **3** diferentemente funcionalizados en la cadena lipídica **114-123**.

Dependiendo de dónde esté ubicado el grupo hidroxilo, su actividad como inductor de apoptosis cambia dramáticamente, siendo el más activo el análogo **121** frente a las tres líneas celulares ensayadas (HL-60, Jurkat y HeLa), con una actividad comparable a aquella de la edelfosina **3**. Estos resultados nos hacen pensar que el carácter anfifílico de este tipo de antitumorales es crucial a la hora de incorporarse en los *lipid rafts* y ejercer su actividad.

Los tres análogos fluorescentes, interesantes debido a su posible uso como trazadores tumorales *in vivo*, **116**, **120** y **123**, son activos frente a HL-60 en bajas concentraciones, 10-30 μM , sobre todo a tiempos largos.

Los análogos que poseen heteroátomos, como yodo **114** o grupos hidroxilos protegidos en forma de acetoxilo **118**, o éter: **119** y **122**, no resultaron activos

Los ensayos biológicos realizados con estos compuestos se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC (CIB-CSIC) de Madrid por el Profesor Dr. D. Faustino Mollinedo.

En el campo de compuestos bioconjugados se sintetizaron una serie de furosesterterpenoides y sesterterpenolidas (**124**, **125**) análogas de disidiolida que se unieron con edelfosina o análogos utilizando una unidad de carbonato como *linker*.²²¹ (Figura 36)

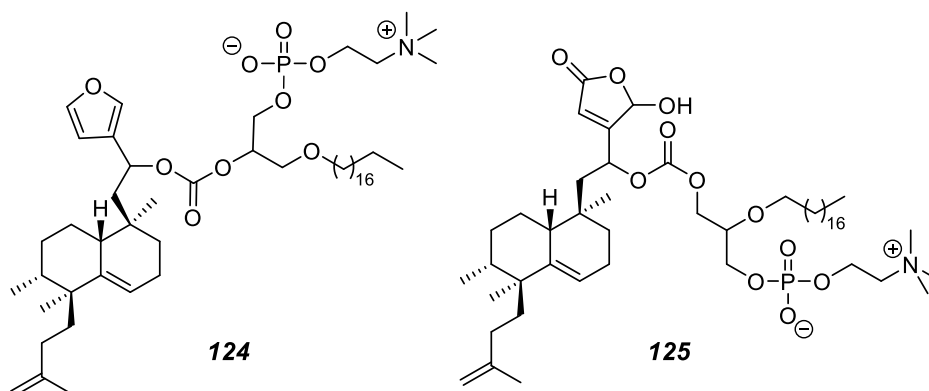


Figura 36. Bioconjugados de sesterterpenoides con ATLS: **124-125**.

Los bioconjugados de ATL con sesterterpenolidas no resultaron muy activos, se piensa que el fragmento terpénico puede que sea demasiado grande para dichos propósitos de generación de fármacos altamente eficaces en la quimioterapia del cáncer.

En el futuro se pretende incorporar en el bioconjugado una parte terpénica más pequeña, como diterpenolidas derivadas de los secohalimanos ácido tessmannico **80** o de su epímero en C10 secochiliotrin **97** y utilizar en la parte lipídica, APLs, análogos de miltefosina **6** o perifosina **7**. (Figura 37)

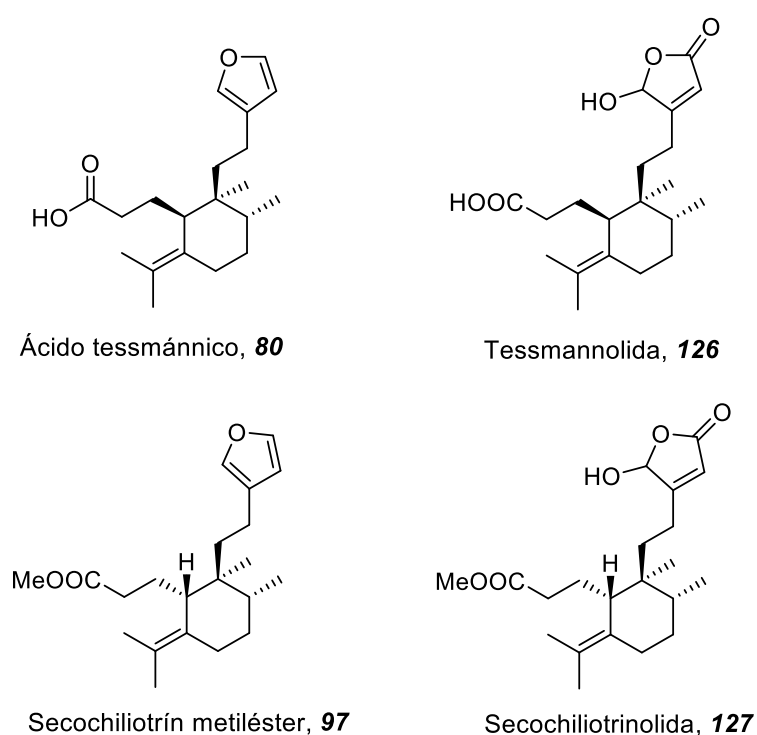


Figura 37. Furoditerpenoides naturales **80** y **81** y diterpenolidas **126** y **127**.

3. Bibliografía de Antecedentes

- 1 OMS, <http://www.who.int/cancer/en/>. Comprobado 28/06/2022.
- 2 Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Fuchs, H. E.; Jemal, A., Cancer statistics, 2022. *CA* **2022**, *72*, 7.
- 3 Yu, Y.; Gao, L.; Wang, Y.; Xu, B.; Maswikiti, E. P.; Li, H.; Zheng, P.; Tao, P.; Xiang, L.; Gu, B.; Lucas, A.; Chen, H., A forgotten corner in cancer immunotherapy: The role of lipids. *Front. Oncol.* **2021**, *11*.
- 4 Han, X., Lipidomics for studying metabolism. *Nat. Rev. Drug Endocrin.* **2016**, *12*, 668.
- 5 Koch, J.; Watschinger, K.; Werner, E. R.; Keller, M. A., Tricky isomers—The evolution of analytical strategies to characterize plasmalogens and plasmalogen ether lipids. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*.
- 6 Isao Ishii; Nobuyuki Fukushima; Xiaoqin Ye, a.; Chun, J., Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 321.
- 7 Almshergji, Z. A., Potential role of plasmalogens in the modulation of biomembrane morphology. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*.
- 8 Munder, P. G.; Westphal, O., Antitumoral and other biomedical activities of synthetic ether lysophospholipids. *Chem. Immunol. Allergy* **1990**, *49*.
- 9 Eibl, H.; Unger, C., Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. *Cancer Treat. Rev.* **1990**, *17*, 233.
- 10 Gunstone, F. D., "The Chemistry of oils and fats. Sources, Composition, Properties and Uses. *CRC Press, Oxford, UK.* **2001**.
- 11 Eibl, H., Phospholipid synthesis: Oxazaphospholanes and dioxaphospholanes as intermediates. *PNAS* **1978**, *75*, 4074.
- 12 Pachioni J, A.; Magalhaes, J. G.; Lima, E. J.; Bueno L, 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.
- 13 Baburina, I.; Jackowski, S., Apoptosis triggered by 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine is prevented by increased expression of CTP: Phosphocholine cytidyltransferase. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2169.
- 14 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.
- 15 Unger, C.; Eibl, H., Hexadecylphosphocholine: Preclinical and the first clinical results of a new antitumor drug. *Lipids* **1991**, *26*, 1412.
- 16 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.
- 17 Mollinedo, F., Antitumour ether lipids: proapoptotic agents with multiple therapeutic indications. *Expert. Opin. Ther. Pat.* **2007**, *17*, 385.
- 18 Hideshima, T.; Catley, L.; Yasui, H.; Ishitsuka, K.; Raje, N.; Mitsiades, C.; Podar, K.; Munshi, N. C.; Chauhan, D.; Richardson, P. G.; Anderson, K. C., Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* **2006**, *107*, 4053.
- 19 Herrera, F. E.; Sevrain, C. M.; Jaffrès, P.-A.; Couthon, H.; Grélard, A.; Dufourc, E. J.; Chantôme, A.; Potier-Cartereau, M.; Vandier, C.; Bouchet, A. M., Singular interaction between an antimetastatic agent and the lipid bilayer: the ohmlin case. *ACS Omega* **2017**, *2*, 6361.
- 20 Busto, J. V.; Sot, J.; Goñi, F. M.; Mollinedo, F.; Alonso, A., Surface-active properties of the antitumour ether lipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine (edelfosine). *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **2007**, *1768*, 1855.
- 21 Singer, S. J.; Nicolson, G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **1972**, *175*, 720.

- 22 Munro, S., Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell* **2003**, *115*, 377.
- 23 Brown, D. A. In *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*; Lennarz, W. J., Lane, M. D., Eds.; Academic Press: Waltham, 2013, p 741.
- 24 Maxfield, F. R., Plasma membrane microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 483.
- 25 Ikonen, E., Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 470.
- 26 Simons, K.; Ikonen, E., Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, *387*, 569.
- 27 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.
- 28 Brown, D. A.; London, E., Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17221.
- 29 Simons, K.; Ikonen, E., Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, *387*, 569.
- 30 Mollinedo, F.; Gajate, C., Lipid rafts as signaling hubs in cancer cell survival/death and invasion: implications in tumor progression and therapy: Thematic Review Series: Biology of Lipid Rafts. *J. Lipid Res.* **2020**, *61*, 611.
- 31 Helms, J. B.; Zurzolo, C., Lipids as targeting signals: Lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* **2004**, *5*, 247.
- 32 George, K. S.; Wu, S., Lipid raft: A floating island of death or survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *259*, 311.
- 33 Hryniewicz-Jankowska, A.; Augoff, K.; Biernatowska, A.; Podkalicka, J.; Sikorski, A. F., Membrane rafts as a novel target in cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2014**, *1845*, 155.
- 34 Patra, S. K., Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1785*, 182.
- 35 Tosi, M. R.; Tugnoli, V., Cholesteryl esters in malignancy. *Clin Chim Acta* **2005**, *359*, 27.
- 36 Dessi, S.; Batetta, B.; Pulisci, D.; Spano, O.; Anchisi, C.; Tessitore, L.; Costelli, P.; Baccino, F. M.; Aroasio, 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.
- 37 Kolanjiappan, K.; Ramachandran, C. R.; Manoharan, S., Biochemical changes in tumor tissues of oral cancer patients. *Clin. Biochem.* **2003**, *36*, 61.
- 38 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.
- 39 Sorice, M.; Misasi, R.; Riitano, G.; Manganelli, V.; Martellucci, S.; Longo, A.; Garofalo, T.; Mattei, V., Targeting lipid rafts as a strategy against coronavirus. *Front Cell Dev. Biol.* **2021**, *8*.
- 40 Ripa, I.; Andreu, S.; López-Guerrero, J. A.; Bello-Morales, R., Membrane rafts: Portals for viral entry. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*.
- 41 Törnquist, K.; Asghar, M. Y.; Srinivasan, V.; Korhonen, L.; Lindholm, D., Sphingolipids as modulators of SARS-CoV-2 infection. *Front Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*.
- 42 Bramkamp, M.; Lopez, D., Exploring the existence of lipid rafts in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2015**, *79*, 81.
- 43 Ma, C.; Wang, C.; Luo, D.; Yan, L.; Yang, W.; Li, N.; Gao, N., Structural insights into the membrane microdomain organization by SPFH family proteins. *Cell Res.* **2022**, *32*, 176.
- 44 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.
- 45 Mollinedo, F., Editorial (Thematic Issue: Antitumor alkylphospholipid analogs: a promising and growing family of synthetic cell membrane-targeting molecules for cancer treatment). *Anticancer Agents Med. Chem.* **2014**, *14*, 495.

- 46 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**.
- 47 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.
- 48 Nieto-Miguel, T.; Fonteriz, R. I.; Vay, L.; Gajate, C.; López-Hernández, S.; Mollinedo, F., Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 10368.
- 49 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.; Zarembeg, 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.
- 50 Mollinedo, F.; Gajate, C.; Martin-Santamaria, S.; Gago, F., ET-18-OCH3 (Edelfosine): a selective antitumor lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas / CD95 Death Receptor. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3163.
- 51 Gajate, C.; Matos-da-Silva, M.; Dakir, E. L. H.; Fonteriz, R. I.; Alvarez, J.; Mollinedo, F., Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene* **2012**, *31*, 2627.
- 52 Mollinedo, F.; Gajate, C., Mitochondrial targeting involving cholesterol-rich lipid rafts in the mechanism of action of the antitumor ether lipid and alkylphospholipid analog edelfosine. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 763.
- 53 Gajate, C.; Mollinedo, F., The antitumor ether lipid ET-18-OCH3 induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* **2001**, *98*, 3860.
- 54 Mollinedo, F.; Gajate, C., Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv. Biol. Regul.* **2015**, *57*, 130.
- 55 Gajate, C.; Mollinedo, F., Lipid rafts and raft-mediated supramolecular entities in the regulation of CD95 death receptor apoptotic signaling. *Apoptosis* **2015**, *20*, 584.
- 56 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.
- 57 Jaffrès, P.-A.; Gajate, C.; Bouchet, A. M.; Couthon-Gourvès, H.; Chantôme, 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**, *165*, 114.
- 58 Gajate, C.; Mollinedo, F., Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* **2006**, *109*, 711.
- 59 Consuelo, G.; Faustino, M., Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH3 (Edelfosine), A proapoptotic agent in tumor cells. *Curr. Drug Metab.* **2002**, *3*, 491.
- 60 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.; Payrastre, B.; Marguet, D.; He, H. T., Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 538.
- 61 Canaud, G.; Hammill, A. M.; Adams, D.; Vikkula, M.; Keppler-Noreuil, K. M., A review of mechanisms of disease across PI3CA-related disorders with vascular manifestations. *Orphanet J. Rare Dis.* **2021**, *16*, 306.
- 62 Gills, J. J.; Dennis, P. A., Perifosine: update on a novel Akt inhibitor. *Curr. Oncol. Rep.* **2009**, *11*, 102.
- 63 Kaboli, P. J.; Imani, S.; Jomhori, M.; Ling, K. H., Chemoresistance in breast cancer: PI3K/Akt pathway inhibitors vs the current chemotherapy. *Am J Cancer Res* **2021**, *11*, 5155.
- 64 Dong, L. Q.; Liu, F., PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2005**, *289*, E187.

- 65 Sarbassov, D. D.; Guertin, D. A.; Ali, S. M.; Sabatini, D. M., Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* **2005**, *307*, 1098.
- 66 Vivanco, I.; Sawyers, C. L., The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 489.
- 67 Wang, L.; Chen, Y.; Sternberg, P.; Cai, J., Essential Roles of the PI3 Kinase/Akt Pathway in Regulating Nrf2-Dependent Antioxidant Functions in the RPE. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2008**, *49*, 1671.
- 68 Iida, M.; Harari, P. M.; Wheeler, D. L.; Toulany, M., Targeting AKT/PKB to improve treatment outcomes for solid tumors. *Mutat Res - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2020**, *819-820*, 111690.
- 69 Pungsrinont, T.; Kallenbach, J.; Baniahmad, A., Role of PI3K-AKT-mTOR Pathway as a pro-survival signaling and resistance-mediating mechanism to therapy of prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11088.
- 70 Papadimitrakopoulou, V., Development of PI3K/AKT/mTOR Pathway Inhibitors and Their Application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2012**, *7*, 1315.
- 71 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.
- 72 Kondapaka, S. B.; Singh, S. S.; Dasmahapatra, G. P.; Sausville, E. A.; Roy, K. K., Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol. Cancer Ther.* **2003**, *2*, 1093.
- 73 Guéguinou, M.; Felix, R.; Marionneau-Lambot, S.; Oullier, T.; Penna, A.; Kouba, S.; Gambade, A.; Fourbon, Y.; Ternant, D.; Arnoult, C.; Simon, G.; Bouchet, A. M.; Chantôme, A.; Harnois, T.; Haelters, J.-P.; Jaffrès, P.-A.; Weber, G.; Bougnoux, P.; Carreaux, F.; Mignen, O.; Vandier, C.; Potier-Cartereau, M., Synthetic alkyl-ether-lipid promotes TRPV2 channel trafficking through PI3K/Akt-girdin axis in cancer cells and increases mammary tumour volume. *Cell Calcium* **2021**, *97*, 102435.
- 74 Potier, M.; Joulin, V.; Roger, S. b.; Besson, P.; Jourdan, M.-L.; LeGuennec, J.-Y.; Bougnoux, P.; Vandier, C., Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 2946.
- 75 Girault, A.; Haelters, J. P.; Potier-Cartereau, M.; Chantome, A.; Pinault, M.; Marionneau-Lambot, S.; Oullier, T.; Simon, G.; Couthon-Gourves, H.; Jaffres, P. A.; Corbel, B.; Bougnoux, P.; Joulin, V.; Vandier, C., New alkyl-lipid blockers of SK3 channels reduce cancer cell migration and occurrence of metastasis. *Curr. Cancer Drug Targets* **2011**, *11*, 1111.
- 76 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.
- 77 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.
- 78 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.
- 79 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.
- 80 Abramowski, P.; Otto, B.; Martin, R., The Orally Available, Synthetic ether lipid edelfosine inhibits T Cell proliferation and induces a Type I interferon response. *PLOS ONE* **2014**, *9*, e91970.

- 81 Sane, S. A.; Shakya, N.; Haq, W.; Gupta, S., CpG oligodeoxynucleotide augments the antileishmanial activity of miltefosine against experimental visceral leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 1448.
- 82 Croft, S. L.; Engel, J., Miltefosine – discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *100*, S4.
- 83 Croft, S. L., Kinetoplastida: new therapeutic strategies. *Parasite* **2008**, *15*, 522.
- 84 Lux, H.; Heise, N.; Klenner, T.; Hart, D.; Opperdoes, F. R., Ether–lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether–lipid analogues in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *111*, 1.
- 85 de Sa, M. M.; Sresht, V.; Rangel-Yagui, C. O.; Blankschtein, D., Understanding miltefosine-membrane interactions using molecular dynamics simulations. *Langmuir* **2015**, *31*, 4503.
- 86 Fragiadaki, I.; Katogiritis, A.; Calogeropoulou, T.; Brückner, H.; Scoulica, E., Synergistic combination of alkylphosphocholines with peptaibols in targeting *Leishmania infantum* in vitro. *Int. J. Parasitol.: Drugs. Drug. Resist.* **2018**, *8*, 194.
- 87 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.
- 88 Diro, E.; Lynen, L.; Ritmeijer, K.; Boelaert, M.; Hailu, A.; van Griensven, J., Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa. *PLoS neglected tropical diseases* **2014**, *8*, e2869.
- 89 Rebello, K. M.; Andrade-Neto, V. V.; Gomes, C. R. B.; de Souza, M. V. N.; Branquinha, M. H.; Santos, A. L. S.; Torres-Santos, E. C.; d'Avila-Levy, C. M., Miltefosine-Lopinavir combination therapy against *Leishmania infantum* infection: *In vitro* and *in vivo* approaches. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*.
- 90 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.
- 91 Mollinedo, F., *Expert. Opin. Ther. Pat.* **2007**, *17*, 385.
- 92 Kaley, T. J.; Panageas, K. S.; Mellinghoff, I. K.; Nolan, C.; Gavrilovic, I. T.; DeAngelis, L. M.; Abrey, L. E.; Holland, E. C.; Lassman, A. B., Phase II trial of an AKT inhibitor (perifosine) for recurrent glioblastoma. *J. Neuro-Oncol.* **2019**, *144*, 403.
- 93 Hasegawa, K.; Kagabu, M.; Mizuno, M.; Oda, K.; Aoki, D.; Mabuchi, S.; Kamiura, S.; Yamaguchi, S.; Aoki, Y.; Saito, T.; Yunokawa, M.; Takehara, K.; Okamoto, A.; Ochiai, K.; Kimura, T., Phase II basket trial of perifosine monotherapy for recurrent gynecologic cancer with or without PIK3CA mutations. *Invest New Drugs* **2017**, *35*, 800.
- 94 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.
- 95 Berdel, W. E.; Fink, U.; Rastetter, J., Clinical phase I pilot study of the alkyl lysophospholipid derivative ET-18-OCH31. *Lipids* **1987**, *22*, 967.
- 96 Drings, P.; Günther, I.; Gatzemeier, U.; Ulbrich, F.; Khanavkar, B.; Schreml, W.; Lorenz, J.; Brugger, W.; Schick, H. D.; Pawel, J. V.; Nordström, R., Final evaluation of a phase II study on the effect of edelfosine (an ether lipid) in advanced non-small-cell bronchogenic carcinoma. *Oncol. Res. Treat.* **1992**, *15*, 375.
- 97 Figg, W. D.; Monga, M.; Headlee, D.; Shah, A.; Chau, C. H.; Peer, C.; Messman, R.; Elsayed, Y. A.; Murgu, 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.
- 98 Becher, O. J.; Millard, N. E.; Modak, S.; Kushner, B. H.; Haque, S.; Spasojevic, I.; Trippett, T. M.; Gilheaney, S. W.; Khakoo, Y.; Lyden, D. C.; De Braganca, K. C.; Kolesar, J. M.; Huse, J. T.;

- Kramer, K.; Cheung, N.-K. V.; Dunkel, I. J., A phase I study of single-agent perifosine for recurrent or refractory pediatric CNS and solid tumors. *PLOS ONE* **2017**, *12*, e0178593.
- 99 Guidetti, A.; Carlo-Stella, C.; Locatelli, S. L.; Malorni, W.; Mortarini, R.; Viviani, S.; Russo, D.; Marchiano, A.; Sorasio, R.; Doderio, 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. *Clinical cancer* **2014**, *20*, 5641.
- 100 NIH. Clinical Trials

www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=miltefosine&term=&cntry=&state=&city=&dist=

Comprobado 06/06/2022.

- 101 Yang, P.; Zhang, L.; Wang, T.; Liu, Q.; Wang, J.; Wang, Y.; Tu, Z.; Lin, F., Doxorubicin and Edelfosine Combo-Loaded Lipid-Polymer Hybrid nanoparticles for synergistic anticancer effect against drug-resistant osteosarcoma. *OncoTargets Ther.* **2020**, *13*, 8055.
- 102 González-Fernández, Y.; Brown, H. K.; Patiño-García, A.; Heymann, D.; Blanco-Prieto, M. J., Oral administration of edelfosine encapsulated lipid nanoparticles causes regression of lung metastases in pre-clinical models of osteosarcoma. *Cancer Lett.* **2018**, *430*, 193.
- 103 Lasa-Saracibar, B.; Aznar, M. Á.; Lana, H.; Aizpún, I.; Gil, A. G.; Blanco-Prieto, M. J., Lipid nanoparticles protect from edelfosine toxicity in vivo. *Int. J. Pharm.* **2014**, *474*, 1.
- 104 Aznar, M. Á.; Lasa-Saracibar, B.; Estella-Hermoso de Mendoza, A.; Blanco-Prieto, M. J., Efficacy of edelfosine lipid nanoparticles in breast cancer cells. *Int. J. Pharm.* **2013**, *454*, 720.
- 105 Estella-Hermoso de Mendoza, A.; Prétat, V.; Mollinedo, F.; Blanco-Prieto, M. J., In vitro and in vivo efficacy of edelfosine-loaded lipid nanoparticles against glioma. *Control Release* **2011**, *156*, 421.
- 106 Mendoza, A. E.-H. d.; Campanero, M. A.; Lana, H.; Villa-Pulgarin, J. A.; Iglesia-Vicente, J. d. I.; Mollinedo, F.; Blanco-Prieto, M. J., Complete inhibition of extranodal dissemination of lymphoma by edelfosine-loaded lipid nanoparticles. *Nanomedicine* **2012**, *7*, 679.
- 107 Saraiva, S. M.; Gutiérrez-Lovera, C.; Martínez-Val, J.; Lores, S.; Bouzo, B. L.; Díez-Villares, S.; Alijas, S.; Pensado-López, A.; Vázquez-Ríos, A. J.; Sánchez, L.; de la Fuente, M., Edelfosine nanoemulsions inhibit tumor growth of triple negative breast cancer in zebrafish xenograft model. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 9873.
- 108 Lasa-Saracibar, B.; El Moukhtari, S. H.; Tsotakos, T.; Xanthopoulos, S.; Loudos, G.; Bouziotis, P.; Blanco-Prieto, M. J., *In vivo* biodistribution of edelfosine-loaded lipid nanoparticles radiolabeled with Technetium-99m: comparison of administration routes in mice. *Eur J Pharm. Biopharm.* **2022**, *175*, 1.
- 109 Mollinedo, F.; de la Iglesia-Vicente, J.; Gajate, C.; de Mendoza, A. E.-H.; Villa-Pulgarin, J. A.; de Frias, M.; Roué, G.; Gil, J.; Colomer, D.; Campanero, M. A.; Blanco-Prieto, M. J., *In vitro* and *In vivo* selective antitumor activity of edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 2046.
- 110 Gajate, C.; Gayet, O.; Fraunhoffer, N. A.; Iovanna, J.; Dusetti, N.; Mollinedo, F., Induction of apoptosis in human pancreatic cancer stem cells by the endoplasmic reticulum-targeted alkylphospholipid analog edelfosine and potentiation by autophagy inhibition. *Cancers* **2021**, *13*, 6124.
- 111 Lawson, D. A.; Bhakta, N. R.; Kessenbrock, K.; Prummel, K. D.; Yu, Y.; Takai, K.; Zhou, A.; Eyob, H.; Balakrishnan, S.; Wang, C.-Y.; Yaswen, P.; Goga, A.; Werb, Z., Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature* **2015**, *526*, 131.
- 112 Urones, L. G.; De Pascual Teresa, J.; Marcos, L. S.; Díez Martín, D.; Martín Garrido, N.; Guerra, R. A., Diterpenoids from *Halimium viscosum*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1077.
- 113 Roncero, A. M.; Tobal, I. E.; Moro, R. F.; Díez, D.; Marcos, I. S., Halimane diterpenoids: sources, structures, nomenclature and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *35*, 955.
- 114 Asakawa, Y.; Lin, X.; Tori, M.; Kondo, K., Fusicoccane-, dolabellane- and rearranged labdane-type diterpenoids from the liverwort *Pleurozia gigantea*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2597.

- 115 Jakupovic, J.; Banerjee, S.; Bohlmann, F.; King, R. M.; Robinson, H., New diterpenes from *Chiliotrichium rosmarinifolium* and *Nardophyllum lanatum*. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 1305.
- 116 Tschritzis, F.; Jakupovic, J., Diterpenes and other constituents from *Relhania species*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3173.
- 117 Zdero, C.; Bohlmann, F.; King, R. M.; Robinson, H., Diterpene glycosides and other constituents from argentinian *Baccharis species*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2841.
- 118 Siems, K.; Jakupovic, J.; Castro, V.; Poveda, L., Constituents of two *Acalypha species*. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 851.
- 119 Zdero, C.; Bohlmann, F.; Niemeyer, H. M., Friedolabdanes and other constituents from chilean *Haplopappus species*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3669.
- 120 Jakupovic, J.; Ellmauerer, E.; Bohlmann, F.; Whitemori, A.; Gage, D., Diterpenes from *Eupatorium turbinatum*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2677.
- 121 Jakupovic, J.; Baruah, R. N.; Zdero, C.; Eid, F.; Pathak, V. P.; Chau-thi, T. V.; Bohlmann, F.; King, R. M.; Robinson, H., Further diterpenes from plants of the compositae, subtribe solidagininae. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1873.
- 122 Urones, J. G.; De Pascual Teresa, J.; Marcos, I. S.; Díez Martín, D.; Martín Garrido, N.; Guerra, R. A., Diterpenoids from *Halimium viscosum*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 1077.
- 123 De Pascual Teresa, J.; Urones, J. G.; Basabe, P.; Carrillo, H.; Muñoz, M. A. G.; Marcos, I. S., Diterpenoids of *Halimium viscosum*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 791.
- 124 Pascual Teresa, J. D.; Urones, J. G.; Carrillo, H.; Muñoz, M. A. G., *An. Quim.* **1978**, *75*, 140.
- 125 De Pascual Teresa, J.; Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Martín, D. D.; Alvarez, V. M., Labdane diterpenoids from *Halimium viscosum*. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 711.
- 126 Rodilla, J. M. L.; De Mendonça, D. I. M.; Urones, J. G.; Moro, R. F., Hydroxylated diterpenoids from *Halimium viscosum*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 817.
- 127 Rodilla, J. M. L.; Mendonça, D. I. D.; Ismael, M. I. G.; Figueiredo, J. A.; Silva, M. L. A.; Lopes, E., Bi- and Tricyclic Diterpenoids from *Halimium viscosum*. *Nat. Prod. Lett.* **2001**, *15*, 401.
- 128 Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Garrido, N. M.; de Pascual Teresa, J.; Feliciano Martín, A. S., A diterpene alcohol from *Halimium viscosum*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 183.
- 129 Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Garrido, N. M., Tormesane derivatives of *Halimium viscosum*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3243.
- 130 Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Garrido, N. M., A diterpenoid from *Halimium viscosum*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2585.
- 131 Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Garrido, N. M.; Moro, R. F., Fregenedadiol: A rearranged labdane from *Halimium viscosum*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3042.
- 132 Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Basabe, P.; Garrido, N. M.; Jorge, A.; Moro, R. F.; Lithgow, A. M., Chemistry of 7-labden-3 β ,15-diol (I): homochiral synthesis of fregenedadiol. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6079.
- 133 Urones, J. G.; Jorge, A.; Marcos, I. S.; Basabe, P.; Díez, D.; Garrido, N. M.; Lithgow, A. M.; Olimpia C.F. da Fonseca, M.; Rodilla, J. M. L., I2 Rearrangement reaction: Synthesis of isofregenedane type diterpenoids. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1659.
- 134 Marcos, I. S.; Jorge, A.; Díez, D.; Basabe, P.; Lithgow, A. M.; Sexmero, M. J.; Garrido, N. M.; Urones, J. G., Isofregenedadiol: A novel diterpenic diol from *Halimium viscosum*. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1155.
- 135 Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Basabe, P.; Alonso, C. A.; Díez, D.; Garrido, N. M.; Oliva, I. M.; Rodilla, J. S.; Slawin, A. M. Z.; Williams, D. J., Valparene: A tricyclic diterpene hydrocarbon with a new carbon skeleton. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4501.
- 136 Urones, J. G.; Basabe, P.; Marcos, I. S.; Alonso, C.; Oliva, I. M.; Garrido, N. M.; Martín, D. D.; Lithgow, A. M., New diterpenes with a valparane skeleton. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5269.
- 137 Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Basabe, P.; Alonso, C.; Oliva, I. M.; Garrido, N. M.; Martín, D. D.; Lithgow, A. M., Valparane, a new diterpene skeleton (part iv). Absolute stereochemistry of

- valparone, valparolone and other compounds with valparane skeleton. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4051.
- 138 Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Basabe, P.; Alonso, C.; Oliva, I. M.; Garrido, N. M.; Martín, D. D.; Lithgow, A. M., Diterpenes with a valparane skeleton. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 747.
- 139 Marcos, I. S.; Moro, R. F.; Gil-Mesón, A.; Díez, D. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta ur, R., Ed.; Elsevier: 2016; Vol. 48, p 137.
- 140 Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Basabe, P.; Alonso, C. A.; Díez-Martin, D.; Garrido, N. M.; Oliva, I. M., Valparolone: A tricyclic diterpene ketone with a new carbon skeleton. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5665.
- 141 Martín Roncero, A., Síntesis y bioactividad de éteres lipídicos antitumorales análogos de edelfosina. *Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca* **2021**.
- 142 Wang, J.-J.; Chung, H. Y.; Zhang, Y.-B.; Li, G.-Q.; Li, Y.-L.; Huang, W.-H.; Wang, G.-C., Diterpenoids from the roots of *Croton crassifolius* and their anti-angiogenic activity. *Phytochemistry* **2016**, *122*, 270.
- 143 Sánchez, M.; Mazzuca, M.; Veloso, M. J.; Fernández, L. R.; Siless, G.; Puricelli, L.; Palermo, J. A., Cytotoxic terpenoids from *Nardophyllum bryoides*. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 1395.
- 144 Chung, H.-M.; Hu, L.-C.; Yen, W.-H.; Su, J.-H.; Lu, M.-C.; Hwang, T.-L.; Wang, W.-H.; Sung, P.-J., Echinohalimane A, a bioactive halimane-type diterpenoid from a Formosan Gorgonian *Echinomuricea* sp. (Plexauridae). *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 2246.
- 145 Lei, H., Diterpenoids of Gorgonian corals: chemistry and bioactivity. *Chem. Biodivers.* **2016**, *13*, 345.
- 146 Abdel-Kader, M.; Berger, J. M.; Slebodnick, C.; Hoch, J.; Malone, S.; Wisse, J. H.; Werkhoven, M. C. M.; Mamber, S.; Kingston, D. G. I., Isolation and Absolute Configuration of ent-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 11.
- 147 Cheng, H.-H.; Cheng, Y.-B.; Hwang, T.-L.; Kuo, Y.-H.; Chen, C.-H.; Shen, Y.-C., Randainins A–D, Based on unique diterpenoid architectures, from *Callicarpa randaiensis*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1823.
- 148 Zhang, Y.; Adnani, N.; Braun, D. R.; Ellis, G. A.; Barns, K. J.; Parker-Nance, S.; Guzei, I. A.; Bugni, T. S., Micromonohalimanes A and B: antibacterial halimane-type diterpenoids from a Marine *Micromonospora* species. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2968.
- 149 Du, K.; De Mieri, M.; Neuburger, M.; Zietsman, P. C.; Marston, A.; van Vuuren, S. F.; Ferreira, D.; Hamburger, M.; van der Westhuizen, J. H., Labdane and clerodane diterpenoids from *Colophospermum mopane*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2494.
- 150 Silva, C. G.; Santos Júnior, H. M.; Barbosa, J. P.; Costa, G. L.; Rodrigues, F. A. R.; Oliveira, D. F.; Costa-Lotufo, L. V.; Alves, R. J. V.; Eleutherio, E. C. A.; Rezende, C. M., Structure elucidation, antimicrobial and cytotoxic activities of a halimane isolated from *Vellozia kolbekii* Alves (Velloziaceae). *Chem. Biodivers.* **2015**, *12*, 1891.
- 151 Kubota, T.; Iwai, T.; Takahashi-Nakaguchi, A.; Fromont, J.; Gonoï, T.; Kobayashi, J. i., Agelasines O–U, new diterpene alkaloids with a 9-N-methyladenine unit from a marine sponge *Agelas* sp. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 9738.
- 152 del Corral, S.; Cuffini, S. L.; Cardoso, S. G.; Bortoluzzid, A. J.; Palacios, S. M., Phytotoxic halimanes isolated from *Baccharis salicifolia* Pers. *Phytochemistry Lett.* **2012**, *5*, 280.
- 153 Nakano, C.; Okamura, T.; Sato, T.; Dairi, T.; Hoshino, T., *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv3377c encodes the diterpene cyclase for producing the halimane skeleton. *Chem. Commun.* **2005**, 1016.
- 154 Maugel, N.; Mann, F. M.; Hillwig, M. L.; Peters, R. J.; Snider, B. B., Synthesis of (±)-nosyberkol (isotuberculosinol, revised structure of edaxadiene) and (±)-tuberculosinol. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2626.
- 155 Nakano, C.; Ootsuka, T.; Takayama, K.; Mitsui, T.; Sato, T.; Hoshino, T., Characterization of the Rv3378c gene product, a new diterpene synthase for producing tuberculosinol and

- (13*R,S*)-isotuberculosinol (Nosyberkol), from the *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Genome. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 75.
- 156 Spangler, J. E.; Carson, C. A.; Sorensen, E. J., Synthesis enables a structural revision of the *Mycobacterium tuberculosis*-produced diterpene, edaxadiene. *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 202.
- 157 Hoshino, T.; Nakano, C.; Ootsuka, T.; Shinohara, Y.; Hara, T., Substrate specificity of Rv3378c, an enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*, and the inhibitory activity of the bicyclic diterpenoids against macrophage phagocytosis. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2156.
- 158 Chan, H.-C.; Feng, X.; Ko, T.-P.; Huang, C.-H.; Hu, Y.; Zheng, Y.; Bogue, S.; Nakano, C.; Hoshino, T.; Zhang, L.; Lv, P.; Liu, W.; Crick, D. C.; Liang, P.-H.; Wang, A. H. J.; Oldfield, E.; Guo, R.-T., Structure and inhibition of tuberculosinol synthase and decaprenyl diphosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2892.
- 159 Liu, C.-I.; Liu, G. Y.; Song, Y.; Yin, F.; Hensler, M. E.; Jeng, W.-Y.; Nizet, V.; Wang, A. H.-J.; Oldfield, E., A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science* **2008**, *319*, 1391.
- 160 Young, D. C.; Layre, E.; Pan, S.-J.; Tapley, A.; Adamson, J.; Seshadri, C.; Wu, Z.; Buter, J.; Minnaard, A. J.; Coscolla, M.; Gagneux, S.; Copin, R.; Ernst, J. D.; Bishai, W. R.; Snider, B. B.; Moody, D. B., In Vivo Biosynthesis of Terpene Nucleosides Provides unique chemical markers of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 516.
- 161 Buter, J.; Heijnen, D.; Wan, I. C.; Bickelhaupt, F. M.; Young, D. C.; Otten, E.; Moody, D. B.; Minnaard, A. J., Stereoselective synthesis of 1-tuberculosinyl adenosine; a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 6686.
- 162 Peters, R. J., Two rings in them all: The labdane-related diterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1521.
- 163 Wendt, K. U.; Schulz, G. E., Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. *Structure* **1998**, *6*, 127.
- 164 MacMillan, J.; Beale, M. H. *Comprehensive Natural Products Chemistry: Isoprenoids including carotenoids and steroids*; Elsevier, 1999; Vol. 2.
- 165 Pristic, S.; Xu, J.; Coates, R. M.; Peters, R. J., Probing the role of the DXDD motif in class II diterpene cyclases. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 869.
- 166 Wendt, K. U.; Poralla, K.; Schulz, G. E., Structure and function of a squalene cyclase. *Science* **1997**, *277*, 1811.
- 167 Li, R.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K.-H., Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 1166.
- 168 Merritt, A. T.; Ley, S. V., Clerodane diterpenoids. *Nat Prod Rep* **1992**, *9*, 243.
- 169 Urones, J. G.; Marcos, I. S.; Basabe, P.; Sexmero, M. J.; Carrillo, H.; Melchor, M. J., Minor diterpenoids from *Halimium viscosum*. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1359.
- 170 Marcos, I. S.; Pedrero, A. B.; Sexmero, M. J.; Díez, D.; Basabe, P.; Hernández, F. A.; Urones, J. G., Synthesis and absolute configuration of three natural *ent*-halimanolides with biological activity. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 369.
- 171 Marcos, I. S.; Pedrero, A. B.; Sexmero, M. J.; Díez, D.; García, N.; Escola, M. A.; Basabe, P.; Conde, A.; Moro, R. F.; Urones, J. G., Synthesis of *ent*-halimanolides from *ent*-halimic acid. *Synthesis* **2005**, 3301.
- 172 S. Marcos, I.; Conde, A.; F. Moro, R.; Basabe, P.; Díez, D.; Mollinedo, F.; G. Urones, J., Synthesis of an *ent*-halimanolide from *ent*-halimic acid. *Molecules* **2008**, *13*, 1120.
- 173 Marcos, I. S.; Gonzalez, J. L.; Sexmero, M. J.; Díez, D.; Basabe, P.; Williams, D. J.; Simmonds, M. S. J.; Urones, J. G., Diterpenic α - and β -hydroxybutanolides with antifeedant activity: semisynthesis and absolute configuration. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2553.
- 174 Marcos, I. S.; Hernández, F. A.; Sexmero, M. J.; Díez, D.; Basabe, P.; Pedrero, A. B.; García, N.; Urones, J. G., Synthesis and absolute configuration of (–)-chettaphanin I and (–)-chettaphanin II. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 685.

- 175 Marcos, I. S.; Hernández, F. A.; Sexmero, M. J.; Díez, D.; Basabe, P.; Pedrero, A. B.; García, N.; Sanz, F.; Urones, J. G., Synthesis and absolute configuration of (-)-chettaphanin II. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1243.
- 176 Gil-Meson, A.; Roncero, A. M.; Tobal, I. E.; Basabe, P.; Díez, D.; Mollinedo, F.; Marcos, I. S., Synthesis of bioconjugate sesterterpenoids with phospholipids and polyunsaturated fatty acids. *Molecules* **2016**, *21*, 47.
- 177 S. Marcos, I.; Sexmero, M. J.; Hernández, F. Á.; Corrales, M.; Basabe, P.; Díez, D.; G. Urones, J., Synthetic studies towards the *ent*-labdane diterpenoids: rearrangement of *ent*-halimanes. *Molecules* **2006**, *11*, 792.
- 178 Marcos, I. S.; García, N.; Sexmero, M. J.; Hernández, F. A.; Escola, M. A.; Basabe, P.; Díez, D.; Urones, J. G., Synthetic studies towards picrasane quassinoids. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2335.
- 179 Marcos, I. S.; Martínez, B.; Sexmero, M. J.; Díez, D.; Basabe, P.; Urones, J. G., Chemistry of *ent*-halimic acid: synthesis of [4.3.3]propellanes. *Synthesis* **2006**, 3865.
- 180 Marcos, I. S.; Conde, A.; Moro, R. F.; Basabe, P.; Díez, D.; Urones, J. G., Synthesis of quinone/hydroquinone sesquiterpenes. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8280.
- 181 Tobal, I. E.; Roncero, A. M.; Moro, R. F.; Díez, D.; Marcos, I. S., Antibacterial natural halimanes: potential source of novel antibiofilm agents. *Molecules* **2020**, *25*, 1707.
- 182 Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284*, 1318.
- 183 Donlan, R. M.; Costerton, J. W., Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 167.
- 184 Esteban, J.; García-Coca, M., *Mycobacterium* biofilms. *Front. Microbiol.* **2018**, *8*.
- 185 Verderosa, A. D.; Totsika, M.; Fairfull-Smith, K. E., Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 824.
- 186 Anderson, G. G.; O'Toole, G. A. In *Bacterial Biofilms*; Romeo, T., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2008**, p 85.
- 187 Lewis, K. In *Bacterial Biofilms*; Romeo, T., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2008**, p 107.
- 188 Kester, J. C.; Fortune, S. M., Persists and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *49*, 91.
- 189 Chan, H.-C.; Feng, X.; Ko, T.-P.; Huang, C.-H.; Hu, Y.; Zheng, Y.; Bogue, S.; Nakano, C.; Hoshino, T.; Zhang, L.; Lv, P.; Liu, W.; Crick, D. C.; Liang, P.-H.; Wang, A. H. J.; Oldfield, E.; Guo, R.-T., Structure and inhibition of tuberculosin synthase and decaprenyl diphosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2892.
- 190 Nakano, C.; Oshima, M.; Kurashima, N.; Hoshino, T., Identification of a new diterpene biosynthetic gene cluster that produces *O*-methylkolavelool in *Herpetosiphon aurantiacus*. *ChemBioChem* **2015**, *16*, 772.
- 191 Mann, F. M.; Pristic, S.; Hu, H.; Xu, M.; Coates, R. M.; Peters, R. J., Characterization and inhibition of a Class II Diterpene Cyclase from *Mycobacterium tuberculosis*: implications for tuberculosis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 23574.
- 192 Hoshino, T.; Nakano, C.; Ootsuka, T.; Shinohara, Y.; Hara, T., Substrate specificity of Rv3378c, an enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*, and the inhibitory activity of the bicyclic diterpenoids against macrophage phagocytosis [Erratum to document cited in CA154:533393]. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8507.
- 193 Chen, F.; Tholl, D.; Bohlmann, J.; Pichersky, E., The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.* **2011**, *66*, 212.
- 194 Prach, L.; Kirby, J.; Keasling, J. D.; Alber, T., Diterpene production in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS J.* **2010**, *277*, 3588.
- 195 Buter, J.; Heijnen, D.; Wan, I. C.; Bickelhaupt, F. M.; Young, D. C.; Otten, E.; Moody, D. B.; Minnaard, A. J., Stereoselective synthesis of 1-tuberculosinyl adenosine; avirulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 6686.

- 196 Rudi, A.; Akinin, M.; Gaydou, E.; Kashman, Y., Asmarines I, J, and K and nosyberkol: four new compounds from the marine sponge *Raspailia* sp. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1932.
- 197 Spangler, J. E.; Carson, C. A.; Sorensen, E. J., Synthesis enables a structural revision of the *Mycobacterium tuberculosis*-produced diterpene, edaxadiene. *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 202.
- 198 Maugel, N.; Mann, F. M.; Hillwig, M. L.; Peters, R. J.; Snider, B. B., Synthesis of (±)-nosyberkol (Isotuberculosinol, revised structure of edaxadiene) and (±)-tuberculosinol. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2626.
- 199 Gavagnin, M.; Trivellone, E.; Castelluccio, F.; Cimino, G.; Cattaneo-Vietti, R., Glyceryl ester of a new halimane diterpenoic acid from the skin of the antarctic nudibranch *Austrodoris kerguelensis*. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7319.
- 200 Maschek, J. A.; Mevers, E.; Diyabalanage, T.; Chen, L.; Ren, Y.; McClintock, J. B.; Amsler, C. D.; Wu, J.; Baker, B. J., Palmadorin chemodiversity from the Antarctic nudibranch *Austrodoris kerguelensis* and inhibition of Jak2/STAT5-dependent HEL leukemia cells. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 9095.
- 201 Soldatou, S.; Baker, B. J., Cold-water marine natural products, 2006 to 2016. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 585.
- 202 Zhang, H.; Dong, M.; Chen, J.; Wang, H.; Tenney, K.; Crews, P., Bioactive Secondary Metabolites from the Marine Sponge Genus *Agelas*. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 351.
- 203 Potter, K.; Criswell, J.; Zi, J.; Stubbs, A.; Peters, R. J., Novel product chemistry from mechanistic analysis of *ent*-copalyl diphosphate synthases from plant hormone biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7198.
- 204 Oldfield, E., Tuberculosis terpene targets. *Chem Biol* **2015**, *22*, 437.
- 205 Gao, J.; Ko, T.-P.; Chen, L.; Malwal, S. R.; Zhang, J.; Hu, X.; Qu, F.; Liu, W.; Huang, J.-W.; Cheng, Y.-S.; Chen, C.-C.; Yang, Y.; Zhang, Y.; Oldfield, E.; Guo, R.-T., "Head-to-Middle" and "Head-to-Tail" *cis*-prenyl transferases: structure of isosesquilavandulyl diphosphate synthase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 683.
- 206 Zhang, Y.; Adnani, N.; Braun, D. R.; Ellis, G. A.; Barns, K. J.; Parker-Nance, S.; Guzei, I. A.; Bugni, T. S., Micromonohalimanes A and B: Antibacterial halimane-type diterpenoids from a marine *Micromonospora* Species. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2968.
- 207 Jia, M.; Potter, K. C.; Peters, R. J., Extreme promiscuity of a bacterial and a plant diterpene synthase enables combinatorial biosynthesis. *Metab. Eng.* **2016**, *37*, 24.
- 208 Rijo, P.; Gaspar-Marques, C.; Simões, M. F.; Jimeno, M. L.; Rodríguez, B., Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P. grandidentatus*. *Biochem. Sys. Ecol.* **2007**, *35*, 215.
- 209 Rijo, P.; Rodríguez, B.; Duarte, A.; Simoes, M. F., Antimicrobial properties of *Plectranthus ornatus* extracts, 11-acetoxyhalima-5, 13-dien-15-oic acid metabolite and its derivatives. *Nat. Prod. J.* **2011**, *1*, 57.
- 210 Burmistrova, O.; Simões, M. F.; Rijo, P.; Quintana, J.; Bermejo, J.; Estévez, F., Antiproliferative activity of abietane diterpenoids against Human Tumor Cells. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1413.
- 211 Du, K.; De Mieri, M.; Neuburger, M.; Zietsman, P. C.; Marston, A.; van Vuuren, S. F.; Ferreira, D.; Hamburger, M.; van der Westhuizen, J. H., Labdane and clerodane diterpenoids from *Colophospermum mopane*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2494.
- 212 Kihampa, C.; Nkunya, M. H. H.; Joseph, C. C.; Magesa, S. M.; Hassanali, A.; Heydenreich, M.; Kleinpeter, E., Anti-mosquito and antimicrobial nor-halimanooids, isocoumarins and an anilinoid from *Tessmannia densiflora*. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1233.
- 213 Lankri, D.; Haham, D.; Lahiani, A.; Lazarovici, P.; Tselikhovsky, D., Methylene-Cycloalkylacetate (MCA) Scaffold-based compounds as novel neurotropic agents. *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, *9*, 691.

- 214 Tobal, I. E.; Roncero, A. M.; Moro, R. F.; Díez, D.; Marcos, I. S., The Methylene-Cycloalkylacetate (MCA) Scaffold in terpenyl compounds with potential pharmacological activities. *Molecules* **2019**, *24*, 2120.
- 215 Venkatesan, R.; Ji, E.; Kim, S. Y., Phytochemicals that regulate neurodegenerative disease by targeting neurotrophins: a comprehensive review. *BioMed research international* **2015**, *2015*, 814068.
- 216 Wetzel, S.; Bon, R. S.; Kumar, K.; Waldmann, H., Biology-oriented synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10800.
- 217 Ruhela, D.; Kivimäe, S.; Szoka, F. C., Chemoenzymatic synthesis of oligohyaluronan–lipid conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 718.
- 218 Marcos, I. S.; Pedrero, A. B.; Sexmero, M. J.; Díez, D.; Basabe, P.; García, N.; Moro, R. F.; Broughton, H. B.; Mollinedo, F.; Urones, J. G., Synthesis of bioactive sesterterpenolides from *ent*-halimic acid. 15-*epi-ent*-Cladocoran A and B. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7496.
- 219 Marcos, I. S.; Moro, R. F.; Carballares, S.; Urones, J. G., Synthesis of (+)-limonidilactone and 12-*epi*-limonidilactone. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 713.
- 220 Basabe, P.; Boderó, O.; Marcos, I. S.; Díez, D.; Blanco, A.; de Román, M.; Urones, J. G., Yamaguchi-type lactonization as a key step in the synthesis of marine metabolites: (+)-luffalactone. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7750.
- 221 Gil Mesón, A., Síntesis de éteres lipídicos antitumorales. Bioconjugados de sesterterpenoides con glicerofosfolípidos, alquil-acil-gliceroles y PUFAs. *Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca* **2013**.



Objetivos

Objectives



Los Alquilfosfolípidos antitumorales (APLs) también conocidos colectivamente como Lípidos antitumorales (ATLs), constituyen una familia de compuestos sintéticos que presentan actividad anticancerígena actuando a nivel de membrana celular.

Las Alquilfosfocolinas (APCs) son las APLs estructuralmente más simples, pues no contienen glicerol, sino que un alcohol de cadena larga está unido directamente con la fosfocolina o con una hidroxilamina derivada de la misma. Son conocidos como APLs de segunda generación. Los compuestos más representativos de este grupo como la miltefosina y perifosina. (Figura 1)

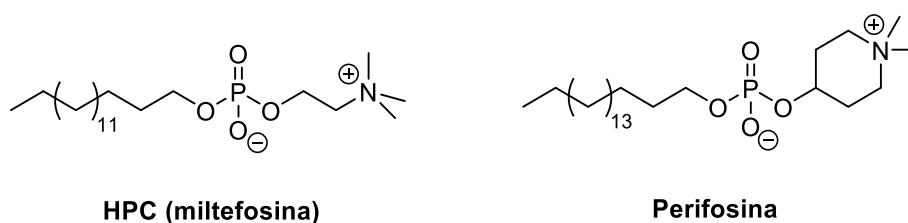


Figura 1. Alquilfosfocolinas (APCs).

El objetivo general de este trabajo es llevar a cabo la síntesis de una serie de análogos de miltefosina y perifosina en los que aparecen diferentes modificaciones en la cadena lipídica.

Dichas modificaciones que incluyen la presencia de insaturaciones, heteroátomos y fluoróforos (BODIPYs) en diferentes posiciones de la cadena permitirá evaluar la actividad de dichas moléculas con respecto a los prototipos miltefosina y perifosina. La fluorescencia en este tipo de moléculas puede facilitar el seguimiento del tumor y el estudio mecanístico a nivel subcelular y SAR.

Como complemento de dicho trabajo se pretende realizar el estudio de la bioactividad de una serie de compuestos naturales y sintéticos derivados del ácido *ent*-halímico y en el futuro, alguno de ellos se pretende utilizar para sintetizar bioconjugados con las APCs sintetizadas.

Como objetivos concretos de este trabajo se pueden señalar los siguientes, que se explicarán y desarrollarán a continuación:

1.- Síntesis de análogos de miltefosina y perifosina.

1.1.- Síntesis de análogos miltefosina.

1.2.- Síntesis de perifosina insaturada.

1.3.- Síntesis de análogos de miltefosina funcionalizados en C16.

1.4.- Síntesis de análogos fluorescentes de miltefosina.

2.- Aislamiento y preparación de halimanos naturales y sintéticos sencillos. Evaluación biológica como neurotróficos y antiparasitarios.

3.- Aproximación sintética a diterpenolidas del tipo de tessmanolida y secochiliotrinolida.

1.- Síntesis de análogos de miltefosina y perifosina.

En este apartado se abordará la síntesis de los análogos de miltefosina y perifosina siguiendo el orden que aparece a continuación:

1.1- Síntesis de análogos miltefosina: se describirá la síntesis de análogos insaturados y iodados. (Figura 2)

- Síntesis de análogo de miltefosina insaturada **5**
- Síntesis de análogos iodados de miltefosina **8** y **19**.

Primero se describirá la síntesis del análogo insaturado **5**, seguidamente se aprovechará dicho derivado insaturado para conseguir la mezcla de yoduros **8** y después se realizará la síntesis de **19** con el heteroátomo sobre C9.

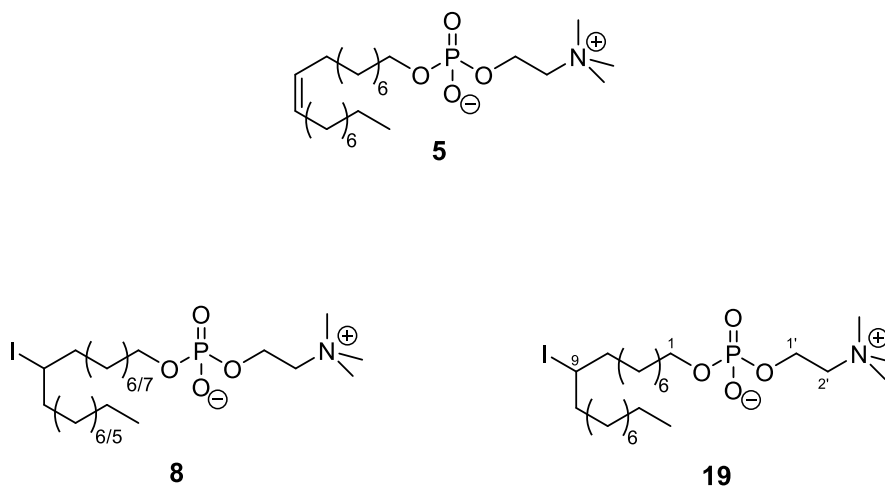


Figura 2. Análogos de miltefosina **5**, **8** y **19**.

1.2.- Síntesis del análogo insaturado de perifosina **25**

En la Figura 3 aparecen el análogo de perifosina **25** que se pretende sintetizar. Este compuesto presenta un doble enlace en la posición C9.

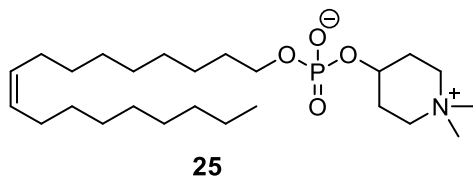


Figura 3. Análogo de perifosina insaturado **25**.

1.3.- Síntesis de análogos de miltefosina funcionalizados en C16.

En la Figura 4 aparece la estructura de los análogos de miltefosina que contienen como función oxigenada al final de la cadena un grupo acetoxilo **32**, tritiloxi **36** o hidroxilo **39**, la síntesis de estos compuestos se describirá en este orden.

- Síntesis del análogo de miltefosina con grupo acetoxilo en C16, **32**.
- Obtención de 16-tritiloximiltefosina, **36**.
- Preparación del análogo 16-hidroximiltefosina, **39**.

La obtención de estos compuestos funcionalizados en C16 se comienza estudiando la síntesis de 16-acetoxi miltefosina **32** desde el que se pretendía acceder a los otros derivados, sin embargo, como se verá en la discusión de resultados, fue necesario cambiar la estrategia sintética para acceder a **36** y **39**.

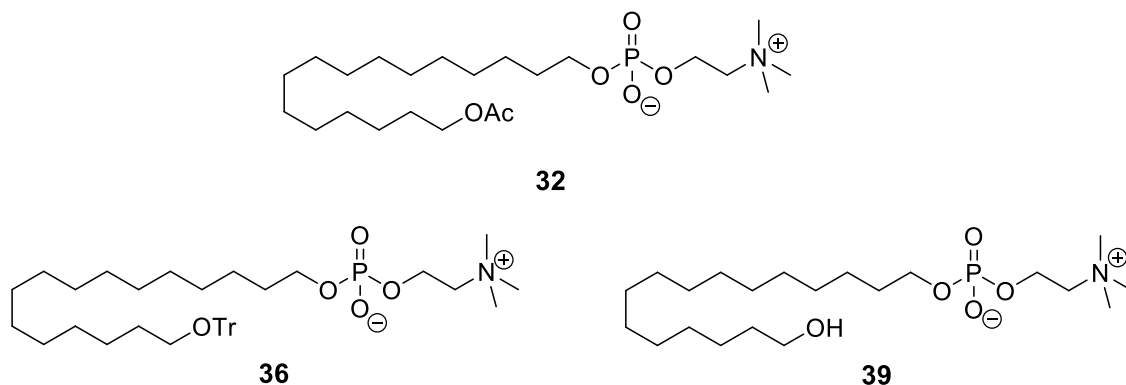


Figura 4. Análogos de miltefosina funcionalizados en C16 **32**, **36** y **39**.

1.4.- Síntesis de análogos de miltefosina con fluoróforo en la cadena.

La incorporación de un fluoróforo en el agente antitumoral abre la posibilidad de disponer de moléculas que permitan realizar una observación más directa sobre la evolución del tumor a nivel subcelular, por ello en una primera aproximación a este tipo de compuesto se propuso la síntesis de **49**. (Figura 5) El fragmento fluorescente corresponde a una unidad de BODIPY (*boro dipirrometeno*).

También se describirá la preparación de un intermedio avanzado en la síntesis del análogo **53** que contiene la unidad de fluoróforo a mitad de cadena.

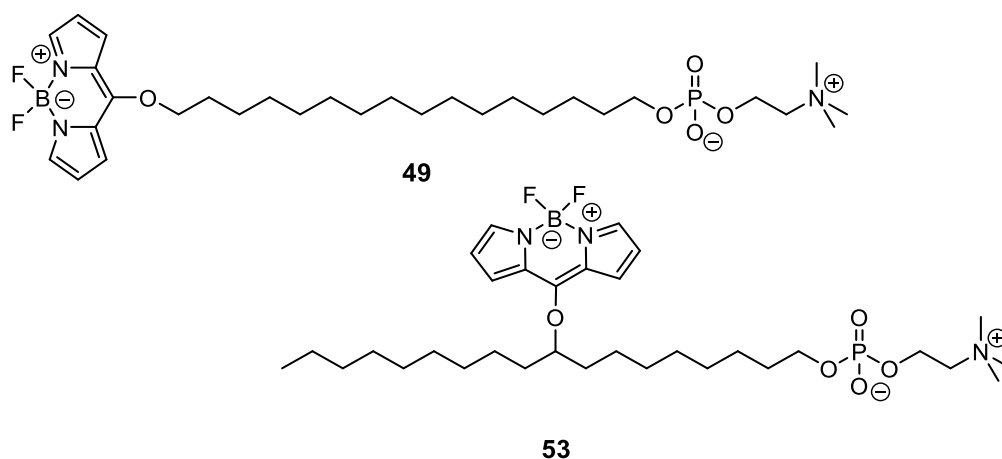


Figura 5. Análogos de miltefosina con fluoróforo en la cadena **49** y **53**.

2.- Aislamiento y preparación de halimanos naturales y sintéticos sencillos. Evaluación biológica como neurotróficos y antiparasitarios.

El desarrollo de fármacos neurotróficos naturales o sintéticos, que puedan prevenir o retrasar la muerte celular y preservar o inducir las vías para estimular la formación de axones, dendritas y conexiones sinápticas es una necesidad clínica no resuelta, hasta el momento. Por lo que, el desarrollo de fármacos neurotróficos, que pueden inducir regeneración de brotes, puede representar un avance importante en medicina regenerativa. Actualmente se están desarrollando considerables esfuerzos dirigidos al desarrollo de agentes neuroprotectores (que promueve la supervivencia) y fármacos neurotróficos (que promueven el crecimiento de las neuritas), realizando finalmente una adecuada evaluación para descubrir un compuesto eficaz.

Uno de los estudios se realizó desarrollando un bioensayo en el que se observa el efecto neurotrófico que provocan moléculas que contienen fragmentos de metilencicloalquil acetato (MCA) en células PC12, comparándolo, con el efecto de NGF (factor de crecimiento nervioso) que sirve de referencia como activador del crecimiento de las neuritas. Entre los diferentes compuestos de origen natural que contienen fragmentos de MCA, en el artículo referente a “Nuevos agentes Neurotróficos” se encuentra el ácido *ent*-halímico **54**, (Figura 6) motivo por el cual se decidió realizar un estudio de la actividad, frente a células PC12, de una serie de halimanos naturales y sintéticos **54-64**.

Los compuestos **54-59** (Figura 6) también se evaluaron como agentes antiparasitarios frente a *Strongyloides venezuelensis*.

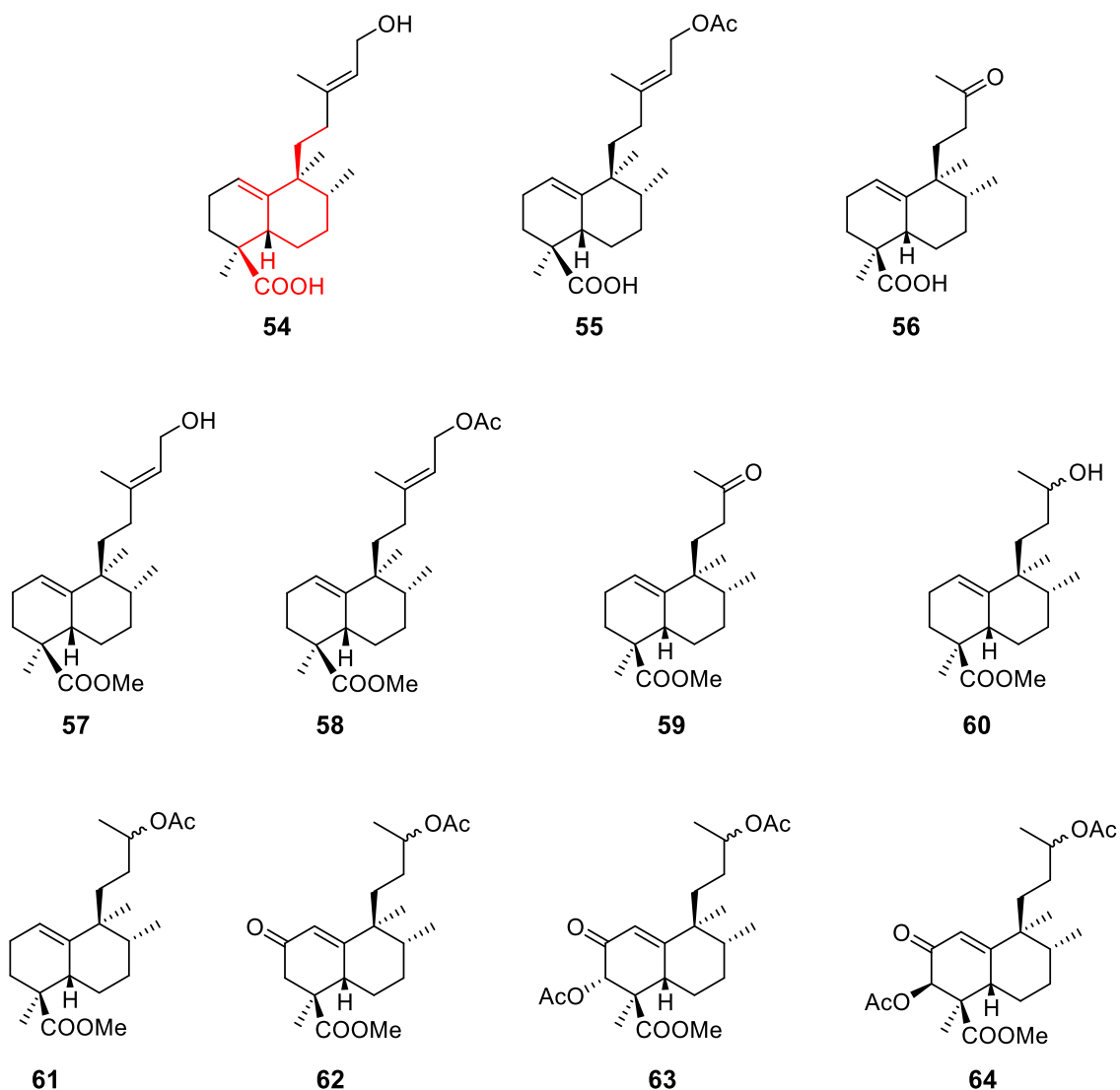


Figura 6. Halimanos que contienen fragmento MCA **54-64** que se prepararán para su evaluación como agentes neurotróficos y como antiparasitarios (**54-59**).

3.- Aproximación sintética a diterpenolidas del tipo de tessmanolida y secochiliotrinolida.

El fragmento de γ -hidroxibutenolida que se encuentra presente en diferentes productos naturales, como las sesterterpenolidas, disidiolida y cladocorán A y B así como en un buen número de derivados sintéticos que aparecen en la Figura 7, se ha comprobado, que es un farmacóforo para la acción citotóxica, de interés en la síntesis de fármacos antitumorales.

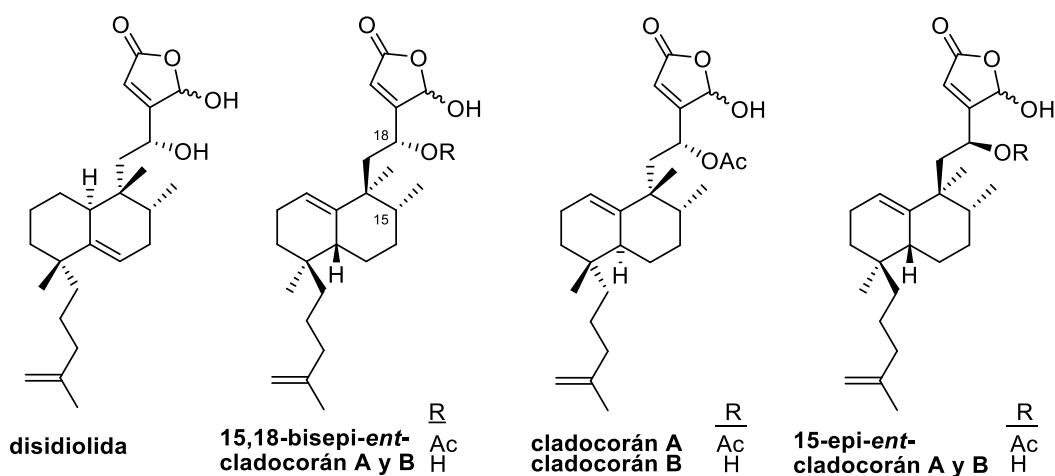


Figura 7. Sesterterpenolidas bioactivas.

Con el propósito de abordar en el futuro la síntesis de bioconjugados de terpenolidas con ATLs, en este trabajo se pretende iniciar la síntesis de diterpenolidas bioactivas con las que formar híbridos conjugados de menor tamaño que los sintetizados anteriormente por nuestro grupo.

El ácido tessmánnico y secochiliotrín son furo-secohalimanos naturales bioactivos aislados de *Tessmannia densiflora* y *Chiliotrichium rosmarinifolium* respectivamente (Figura 8) sus estructuras se determinarán espectroscópicamente faltando establecer la configuración absoluta de los mismos. El fragmento furano de dichos productos naturales facilitará, utilizando metodología bien conocida por nuestro grupo, la síntesis de los derivados que tienen potencial actividad antitumoral al poder incorporar la función γ -hidroxibutenolida preparando la tessmannolida y secochiliotrinolida.

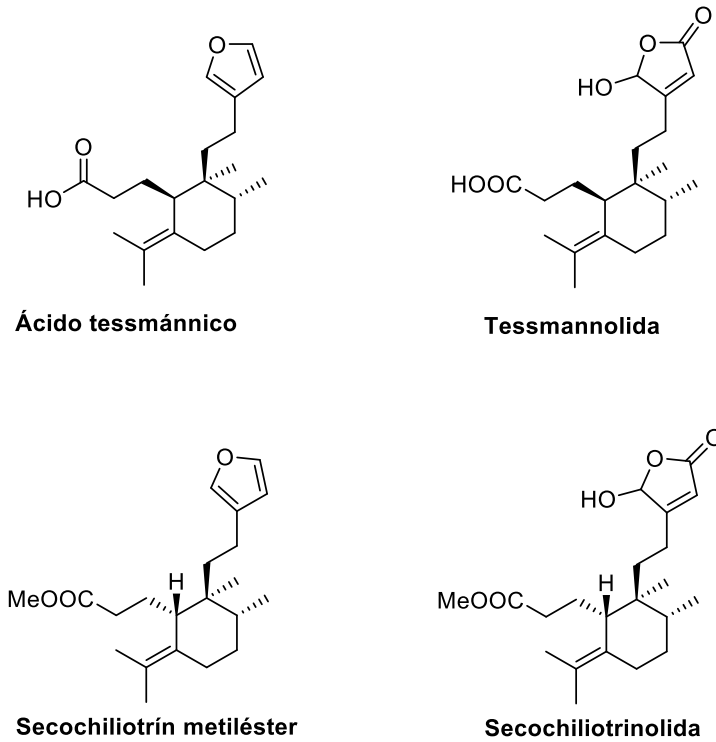


Figura 8. Furo-secohalimanos y diterpenolidas derivadas.

La preparación de moléculas bioconjugadas con ATLs pretenden buscar un resultado sinérgico como resultado de la hibridación potenciando su actividad como antitumorales. En la Figura 9 aparecen algunos de los bioconjugados propuestos que se podrán desarrollar en trabajos futuros.

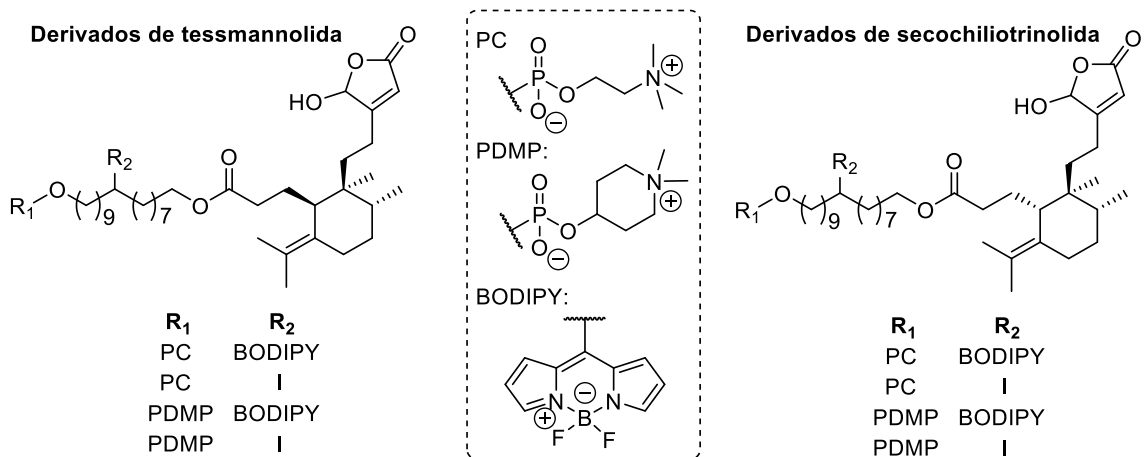
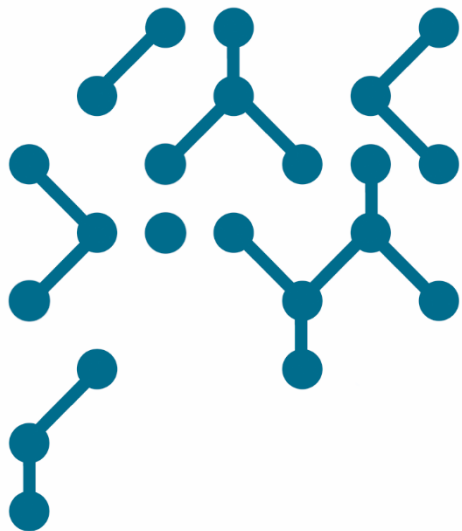


Figura 9. Bioconjugados de diterpenolidas con ATLs.



Discusión de resultados

Results and discussion



1. Síntesis de análogos de miltefosina y perifosina

En este apartado se discutirán los resultados obtenidos en el trabajo referente a la síntesis de análogos de alquil-éteres lipídicos antitumorales (AEPs) análogos de miltefosina y perifosina.

Los análogos sintetizados en este trabajo se enviaron al CIB-CSIC Margarita Salas (Madrid), donde el grupo de investigación del Prof. F. Mollinedo los evalúa como agentes antitumorales y antiparasitarios frente a la leishmania. Los resultados de los ensayos biológicos se muestran en el capítulo 4 de la *Discusión de resultados*.

1.1. Síntesis de los análogos de miltefosina funcionalizados en mitad de cadena

En primer lugar, se describirá la síntesis de miltefosina insaturada **5** y posteriormente la síntesis de derivados con heteroátomos en mitad de la cadena como **8** y **19**. (Figura 10)

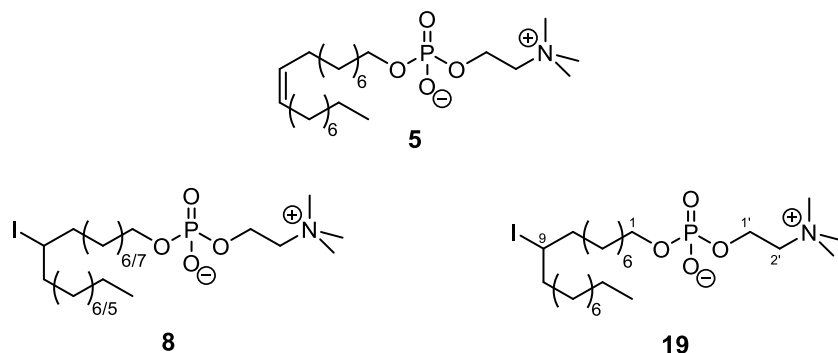
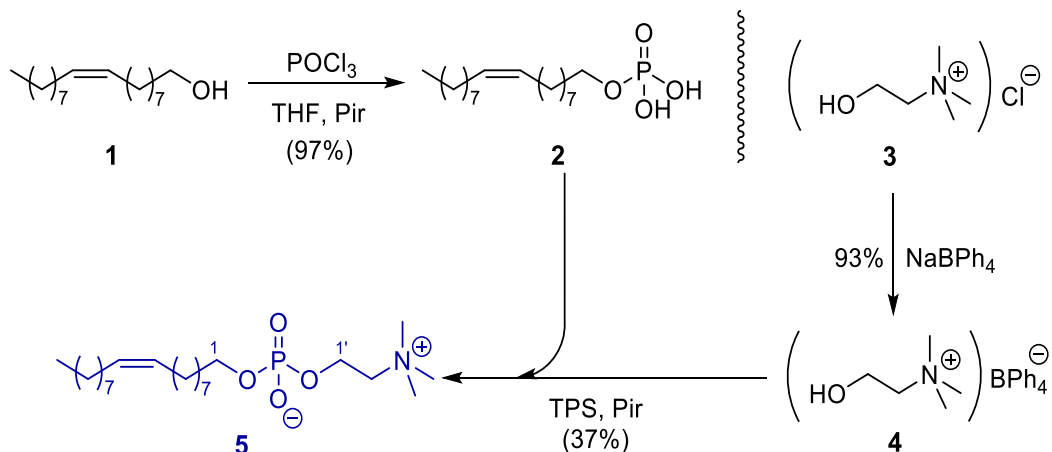


Figura 10. Análogos de miltefosina con función en mitad de la cadena lipídica: **5**, **8** y **19**.

1.1.1. Síntesis de miltefosina insaturada 5

La síntesis de miltefosina insaturada **5**, se llevó a cabo según la siguiente secuencia sintética. (Esquema 1)



Esquema 1. Ruta sintética para acceder al análogo insaturado de miltefosina **5**.

El alcohol oleico **1** reacciona a 0 °C con POCl_3 proporcionando **2**. En el espectro de RMN ^1H de **2** se observa el desapantallamiento que experimentan los hidrógenos geminales a la función oxigenada en C-1 como consecuencia de la presencia del éster fosfato, ahora aparecen a 4.03-3.81 ppm.

Para realizar la síntesis del análogo insaturado **5**, es necesario preparar previamente la sal de colina adecuada **4**. Por reacción de cloruro de colina **3** con tetrafenilborato sódico se obtiene el producto de intercambio iónico **4**, que se recristaliza en acetonitrilo anhidro para ser utilizada posteriormente en la síntesis de **5**. (Esquema 1)

Por reacción de **2** con la recientemente preparada sal **4** en piridina y en 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^{1,2} se logra separar miltefosina insaturada **5**. En el espectro de masas de **5** aparece un ión a 456.3219 una correspondiente a $\text{C}_{23}\text{H}_{48}\text{NO}_4\text{PNa}$ 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).

1.1.2. Síntesis de análogos yodados de miltefosina: 8 y 19

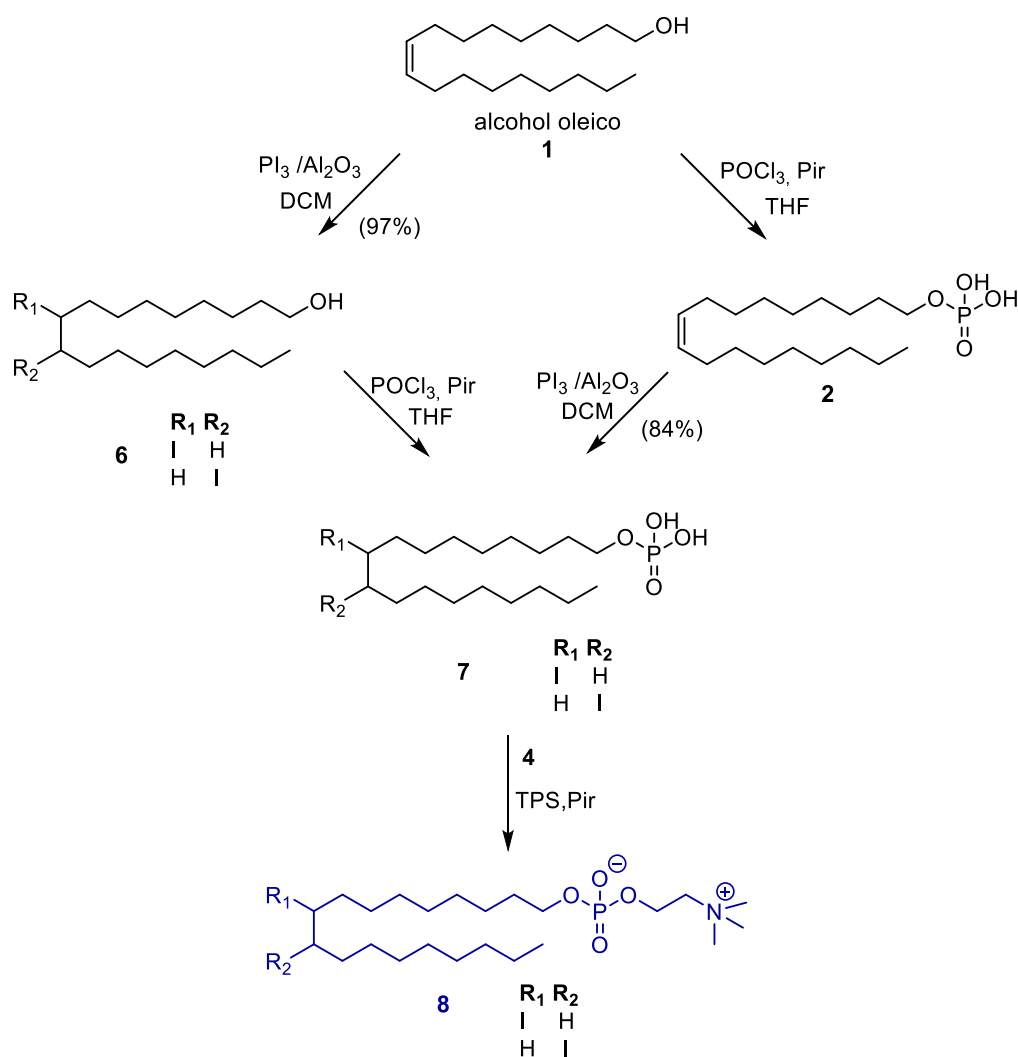
El interés por la síntesis de análogos de miltefosina yodada se debe a que se conocen análogos de edelfosina yodados que mantienen la capacidad antitumoral de edelfosina, pero se absorben mejor en las células antitumorales. Por ello, en este trabajo se aborda la preparación de los análogos yodados de miltefosina **8** y **19**.

– Síntesis de la mezcla de yoduros **8**.

– Síntesis del yododerivado **19**.

• Síntesis de la mezcla de yoduros 8

En una aproximación a la síntesis de miltefosina con función yoduro en mitad de cadena 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 dihidrogenofosfato **2** (Esquema 2).



Esquema 2. Obtención del análogo yodado de miltefosina **8** a partir de alcohol oleico **1**.

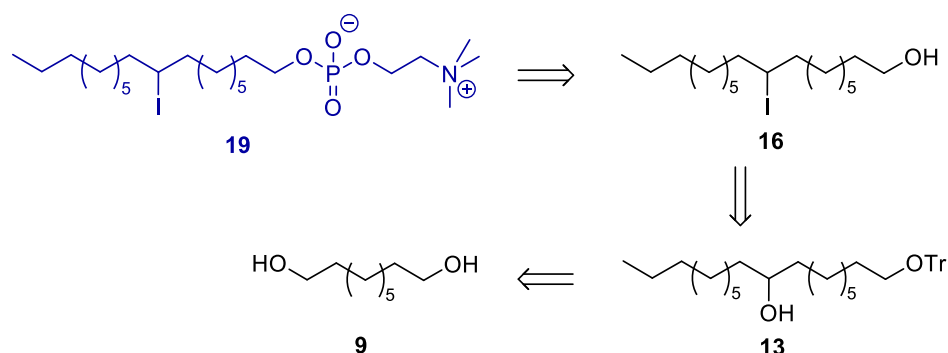
La obtención del yododerivado intermedio **7** se puede realizar utilizando **6** ó **2** como intermedios, según se realice en primer lugar bien la yodación o bien la fosforilación del alcohol oleico **1**. En la secuencia que pasa por **6** se obtiene un 75 %, y cuando se utiliza el fosfato **2** como intermedio se obtiene un mejor rendimiento (80 %).

En el espectro de RMN ^1H de **7** 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 geminal al yoduro y a 40.7 ppm las señales correspondientes a los metilenos vecinales a dicho carbono. Por reacción de **7** con

tetrafenilborato de colina **4** en presencia de TPS, se obtiene una mezcla de la que por solubilidad en Et₂O se separa un residuo del que tras separación cromatográfica se aísla **8**. Por RMN ¹H se observa el desapantallamiento de los CH₂ 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 tetrafenilborato de colina **4** en la síntesis de análogos yodados. No obstante, con el fin de determinar más específicamente la bioactividad de este tipo de compuestos, se decidió abordar la síntesis de **19**.

• Síntesis del yododerivado **19**

La síntesis de **19** se afrontó de acuerdo al siguiente planteamiento retrosintético (Esquema 3).



Esquema 3. Retrosíntesis del análogo de miltefosina **19**. Incorporación de la cabeza polar: **16**; sustitución de hidroxilo por yoduro: **13** y elongación de la cadena carbonada: **9**.

Al análogo **19** se puede acceder desde el hidroxiderivado **16** por incorporación de la unidad de fosfocolina. El intermedio **16** se puede preparar desde el tritilderivado **13**, mediante un intercambio adecuado de grupos funcionales en los que se realiza la reacción de sustitución en la que se incorpora el yodo.

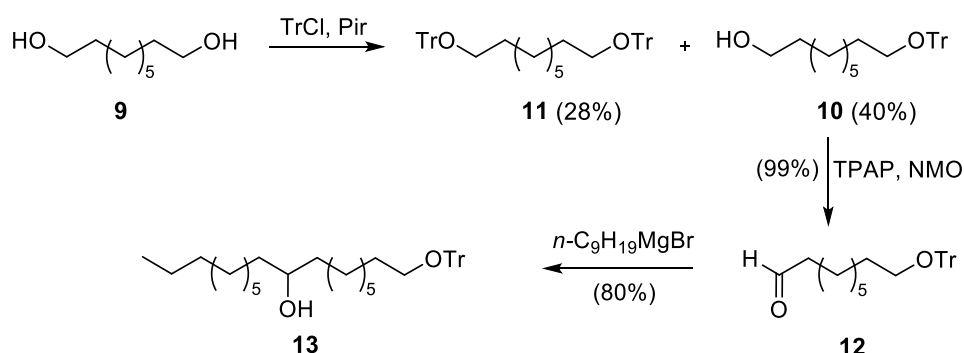
Para realizar la síntesis de **13** se partirá del producto comercial 1,9-nonanodiol **9**, para ello es necesaria la monoprotección de uno de los grupos hidroxilo y la posterior elongación del otro extremo de la cadena alquílica.

La síntesis de **19** se describirá considerando tres etapas:

- Síntesis de **13**.
- Preparación de **16**.
- Obtención de **19**.

Síntesis de **13**

Por reacción de 1,9-nonanodiol **9** con cloruro de tritilo en presencia de piridina y controlando la reacción por TLC, se obtiene una mezcla de los productos mono y diprotegido **10** y **11** respectivamente, separable por CC. (Esquema 4)



Esquema 4. Preparación del intermedio **13** a partir de 1,9-nonanodiol **9**.

En el espectro de RMN ¹H de **10**, además de las señales de los H aromáticos (tritilo), 7.30 ppm, aparecen dos señales de hidrógenos geminales a funciones oxigenadas. A 3.63 ppm aparece un triplete correspondiente a los hidrógenos geminales al grupo hidroxilo y a 3.05 ppm se observa un triplete de los hidrógenos del metileno geminal al

trilitéer. En el espectro de RMN ^1H de **11** además de las señales de los tritilos, aparece únicamente un triplete a 3.05 ppm correspondiente a los hidrógenos geminales a los éteres.

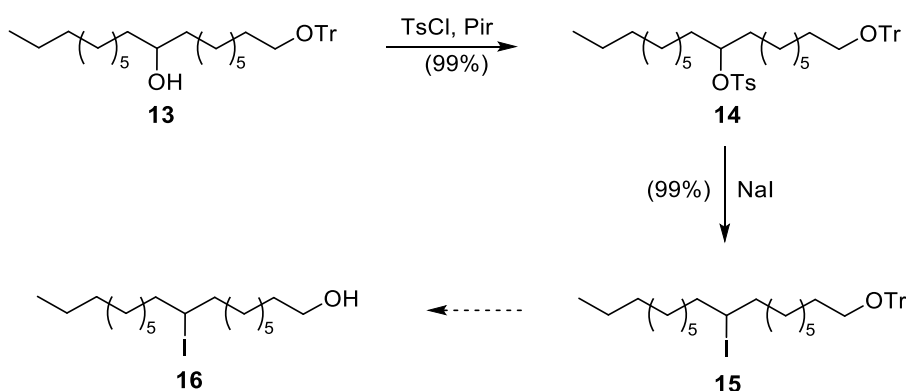
El intermedio **10** en presencia de TPAP y NMO, conduce al aldehído **12**. Este compuesto presenta cierta inestabilidad y una vez preparado, se hace reaccionar inmediatamente con bromuro de *n*-nonilmagnesio, obteniéndose el producto de adición **13**. El aldehído **12** se oxida espontáneamente a temperatura ambiente hasta el ácido carboxílico derivado, lo que impide una caracterización completa.

En el espectro de RMN ^1H de **12** se observa la aparición de una señal triplete a 9.76 ppm correspondiente al hidrógeno del aldehído. Por IR se confirma el grupo aldehído con la aparición de una banda fina a 1724 cm^{-1} .

El hidroxiderivado **13** (IR: banda ancha a 3375 cm^{-1}) en su espectro de RMN ^1H presenta una señal a 3.59 ppm correspondiente al H geminal al grupo hidroxilo secundario.

Síntesis de 16

La preparación de **16** desde **13** requiere tres transformaciones claves: activación del grupo hidroxilo, formando un buen grupo saliente (tosilato), sustitución por yodo y finalmente desprotección. (Esquema 5)

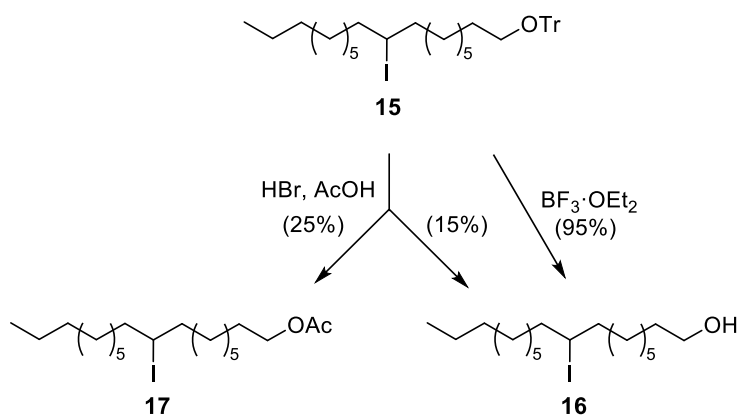


Esquema 5. Síntesis del yoduro **15** a partir del hidroxiderivado **13**.

Por reacción de **13** con TsCl en piridina se obtiene con rendimiento prácticamente cuantitativo el tosilderivado **14**. (Esquema 5) En su espectro de RMN ^1H se observa un singlete a 2.42 ppm del grupo metilo del tosionato y a 4.52 ppm aparece el H-9, geminal al tosionato.

El tosionato **14**, se hace reaccionar inmediatamente tras su obtención con NaI para obtener **15**. Los intermedios **14** y **15** 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 **14**. La formación del yoduro modifica el espectro de RMN ^1H notablemente, desapareciendo las señales correspondientes al grupo tosilo y modificándose el desplazamiento del H-9, que en **15** aparece a 4.13 ppm como multiplete.

La reacción de desprotección de **15** se ensayó en primer lugar por reacción con HBr en AcOH. (Esquema 6) De este modo se obtiene una mezcla de reacción de la que finalmente se separan el hidroxiderivado requerido **16** (15%) y su acetilderivado, **17** (25%). Sin embargo, al realizar la reacción de desprotección con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ se consigue el hidroxiderivado **16** con excelente rendimiento. (Esquema 6)

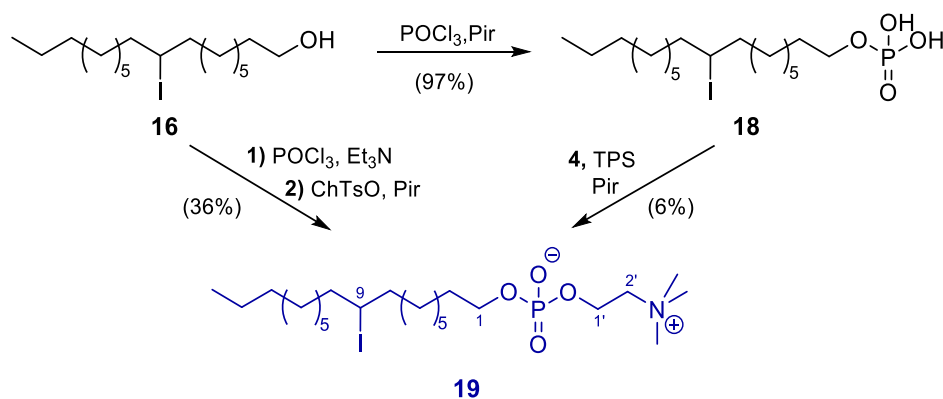


Esquema 6. Reacciones de desprotección de **15** para obtener el yodoalcohol **16**.

Por RMN ^1H del hidroxiderivado **16** (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 **17** se identificó espectroscópicamente como el acetilderivado de **16** (IR: 1740 cm^{-1} ; RMN ^1H : 2.05 ppm (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO-}$), 4.05 ppm (2H, t, H-1).

Síntesis de 19

La incorporación de la unidad de fosfocolina al intermedio **16** en la obtención de la miltefosina yodada **19**, se ha realizado con dos metodologías diferentes (Esquema 7).



Esquema 7. Preparación del análogo de miltefosina **19**.

La reacción del hidroxiderivado **16** con POCl_3 en piridina proporciona el dihidrógenofosfato **18**. 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 **18** con tetrafenilborato de colina **4** en presencia de TPS, se obtiene un producto bruto de reacción que por solubilidad en CHCl_3 y Et_2O se separa una mezcla de la que por posterior CC se logra aislar **19**. En su espectro de masas aparece a 584.2336 una un ión $\text{M}+\text{Na}^+$ ($\text{C}_{23}\text{H}_{49}\text{NO}_4\text{PINa}$) 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 ^{13}C presenta las señales características de los metilenos unidos al fosfato (C-1: 66.1 ppm y C-1': 59.5 ppm) y la señal del CH_2 de la amina (C-2'), 66.4 ppm.

Con el fin de mejorar el rendimiento de **19**, se ensayó una metodología en la que no se aísla el fosfato intermedio **18**, realizando la síntesis de manera consecutiva sin aislar el intermedio de reacción.² En este caso, la reacción de **16** con POCl_3 recientemente

destilado y Et₃N, seguida por esterificación con tosilato de colina (ChTsO), utilizado en exceso (2 mol/mol de **16**) proporciona **19** con un mejor rendimiento del 36%.

El producto **19** 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, no obstante, a fin de completar los estudios con miltefosina, si los resultados para **19** 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.

1.2. Síntesis del análogo insaturado de perifosina 25

La perifosina es uno de los ATL conocidos de segunda generación que presentan una mayor actividad antitumoral, por ello se decidió realizar la síntesis de su análogo insaturado **25** (Figura 11) para estudiar y comparar su bioactividad.

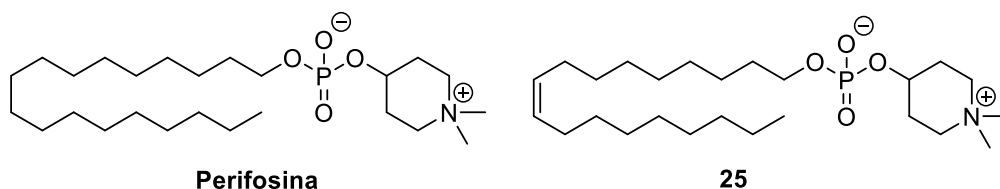
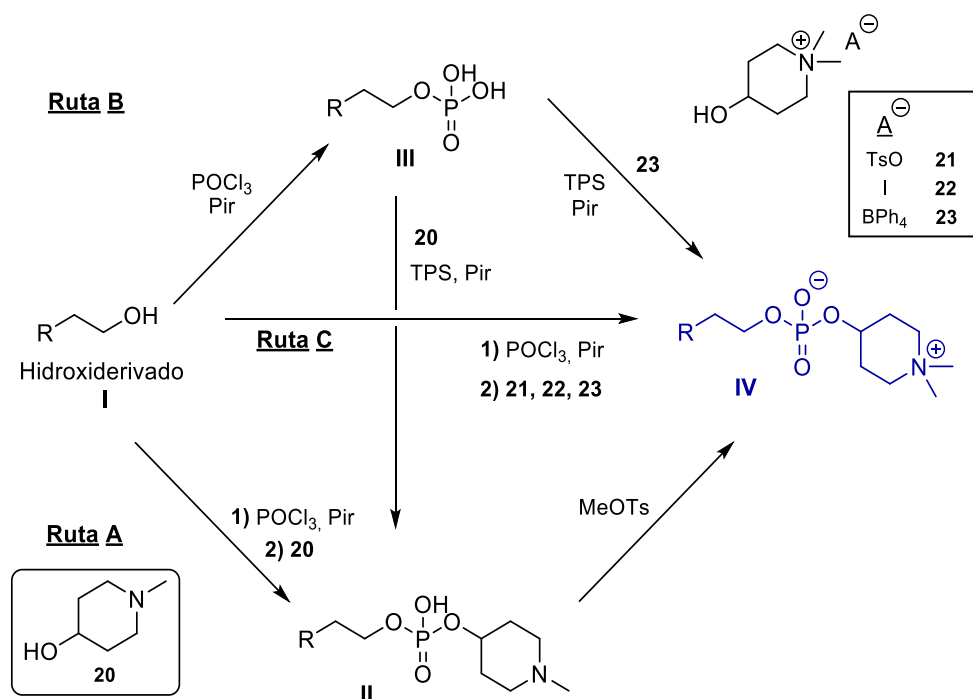


Figura 11. Perifosina y su análogo insaturado **25**.

La incorporación de la cabeza polar de perifosina que contiene un fragmento de hidroxil-*N,N*-dimetilaminopiperidina se realizó desarrollando tres rutas alternativas **A**, **B** y **C**. (Esquema 8)



Esquema 8. Esquema general de las rutas sintéticas para la incorporación de la cabeza polar de fosfodimetilpiperidinio (PDMP) presente en la perifosina.

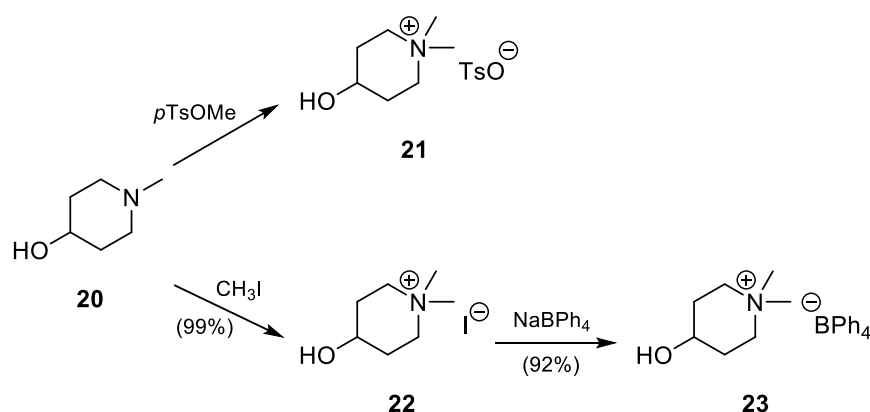
En la **Ruta A**, se aplica una metodología conocida en la síntesis de perifosina, en la que se utiliza la piperidina **II** como intermedio. La preparación de la amina **II** se realiza en una sola etapa desde el producto de partida **I** por reacción con oxiclورو de fósforo y la hidroxipiperidina **20**. La posterior metilación de la amina **II** con tosilato de metilo conduciría a **IV** que contiene la cabeza polar requerida.

La **Ruta B** transcurre a través del fosfato **III**, obtenido por reacción de **I** con oxiclورو de fósforo. Dicho fosfato **III** posteriormente se hace reaccionar con una sal adecuada de la dimetil-hidroxipiperidina como **23** que proporcionaría **IV**.

Alternativamente en la **Ruta B**, también se puede acceder al análogo de perifosina **IV** desde el fosfato **III** en dos etapas, preparando la fosfopiperidina intermedia **II** por reacción con 4-hidroxi-*N*-metilpiperidina **20** en presencia de TPS y piridina. Posteriormente la metilación de **II** con TsOMe permite obtener el derivado de perifosina **IV**.

Finalmente, mediante la **Ruta C**, se puede acceder a **IV** de modo directo sin aislamiento del fosfato intermedio **III**, haciendo reaccionar el material de partida **I** con POCl_3 y seguidamente con una sal de hidroxipiperidina adecuada **21**, **22** ó **23**.

Dado que en algunas síntesis de análogos de perifosina se realiza la metilación final por reacción con tosilato de metilo³ (Esquema 9) esta fue la primera alternativa que se utilizó para la preparación de una sal de amonio de hidroximetilpiperidina como **21**, necesaria para realizar la transformación directa del dihidrogenofosfato de la **Ruta B**.



Esquema 9. Síntesis de sales de amonio derivadas de hidroxipiperidina **21-23**.

Por reacción de **20** con $p\text{TsOMe}$, se obtiene un producto de reacción cuya purificación resulta muy laboriosa, obteniéndose una mezcla en la que aparece **21**. En cambio, el yoduro **22** se obtiene con rendimiento cuantitativo cuando se realiza la metilación de **20** con CH_3I . (Esquema 9) En el espectro de RMN ^1H de **22** en CD_3OD , se observan las señales de dos metilos a 3.16 y 3.14 ppm y la señal de los H geminales al grupo hidroxilo a 3.98 ppm. La baja solubilidad de **22** en disolventes adecuados (tetrahydrofurano, diclorometano o piridina) para realizar la reacción de formación de la alquilfosfopiperidina, desaconseja su utilización en dicha reacción.

En consecuencia, es necesario realizar un cambio iónico, de forma análoga al realizado en la colina, para mejorar la solubilidad de **22**.

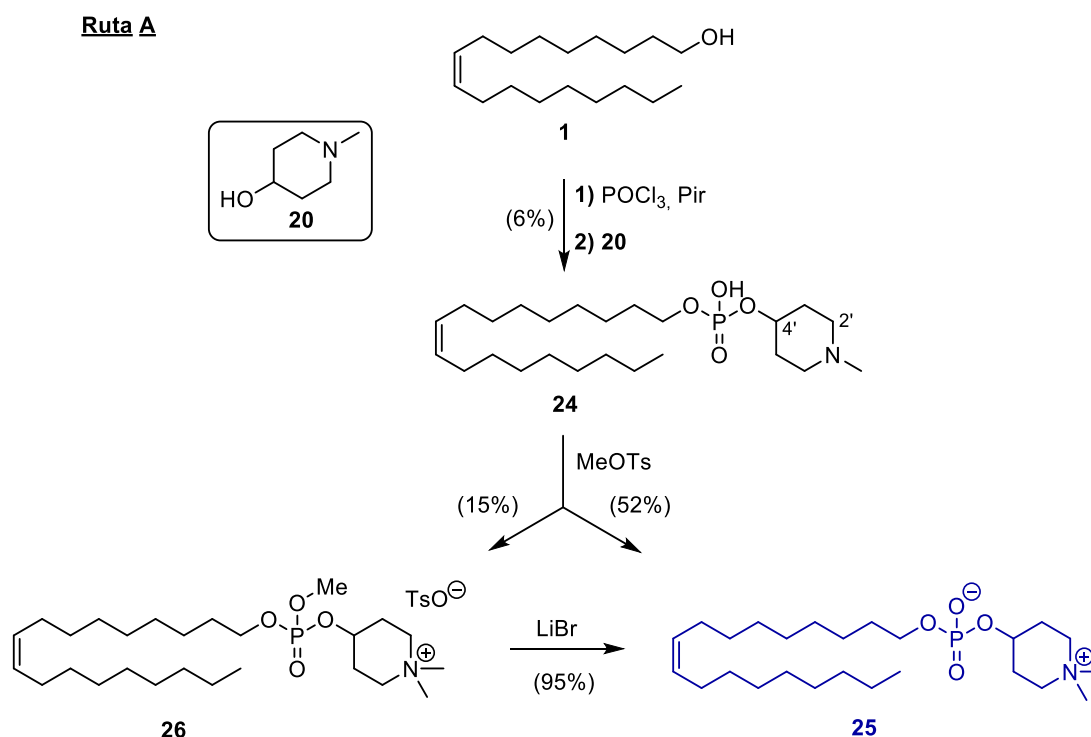
Por adición de una disolución acuosa de NaBPh_4 sobre una disolución acuosa de **22**, se produce la precipitación de **23**. Este tetrafenilborato derivado **23**, sí es soluble en

piridina, a diferencia de **22**. En el espectro de RMN ¹H de **22** (DMSO-d₆) se observan las señales del hidrógeno geminal al grupo hidroxilo a 3.73 ppm y las señales de los dos metilos a 3.04 y 3.00 ppm.

A continuación, se describen los resultados obtenidos desarrollando cada una de estas Rutas **A**, **B** y **C** para acceder al análogo **25** (Esquemas 10, 11 y 12)

- **Ruta A**

Por reacción de alcohol oleico **10** con POCl₃ (Esquema 10, **Ruta A**) seguido de tratamiento con 4-hidroxi-*N*-metilpiperidina **20** se consigue aislar, después de una laboriosa cromatografía de columna, el hidrógeno fosfato intermedio **24**, con un rendimiento bajo (6%). (Esquema 10) En el espectro de masas de **24** aparece un ión molecular a 468.3209 uma correspondiente a una fórmula C₂₄H₄₈NO₄PNa⁺. En su espectro de RMN ¹H se observan a 4.43 (1H, m) ppm la señal correspondiente al hidrogeno H4' del anillo de piperidina y a 3.84 ppm aparecen los hidrógenos H1, desapantallados con respecto a los hidrógenos correspondientes del producto de partida.



Esquema 10. Síntesis de perifosina insaturada, **Ruta A**.

La reacción de la fosfopiperidina **24** con tosilato de metilo proporciona una mezcla del tosilato derivado de metilperifosina insaturada **26** (52 %) y de perifosina insaturada **35** (15 %) que se separaron por cromatografía.

El espectro de RMN ^1H de **26** presenta a 3.70 ppm (3H, d, $J = 6$ Hz) correspondientes al metilo de un metilfosfato y en el espectro de RMN ^{13}C aparece dicho carbono a 54.5 ppm. En el espectro de masas de **26**, correspondiente a la parte catiónica aparece un ión a 474.3706 uma, de acuerdo con la estructura propuesta.

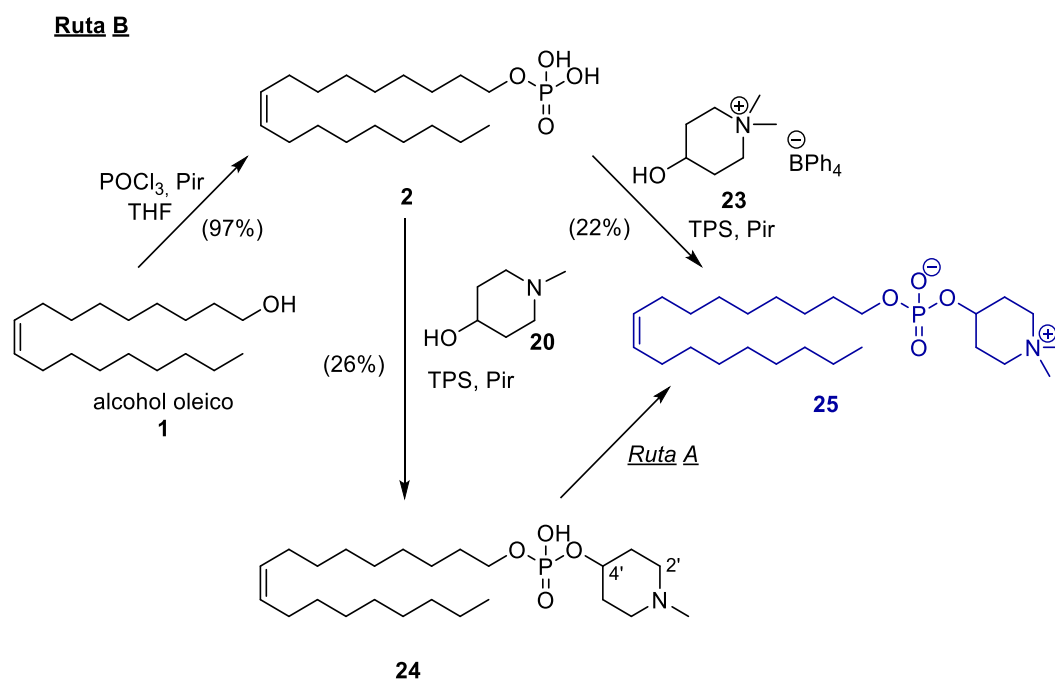
Por reacción de **26** con LiBr en 2-butanona calentando a 85 °C se obtiene con rendimiento prácticamente cuantitativo el producto esperado **25**.

En el espectro de masas de **25** aparece el ión molecular a 460.3550 uma correspondiente a la fórmula $\text{C}_{25}\text{H}_{51}\text{NO}_4\text{P}$, esperada. En el espectro de RMN ^1H se observa a 4.39 ppm la señal del hidrogeno H4', geminal a la función oxigenada sobre el anillo piperidínico y a 3.28 ppm aparece un singulete de los dos metilos sobre el amonio cuaternario.

- **Ruta B**

La reacción de **1** con POCl_3 (Esquema 11, **Ruta B**) en piridina proporciona el dihidrogenofosfato **2** con excelente rendimiento. Desde dicho fosfato **2** también se puede acceder a la piperidina **4** por reacción con 4-hidroxi-*N*-metilpiperidina **20** en presencia de TPS y piridina, mejorando de este modo el rendimiento con respecto a la ruta directa a **24** desde **1**.

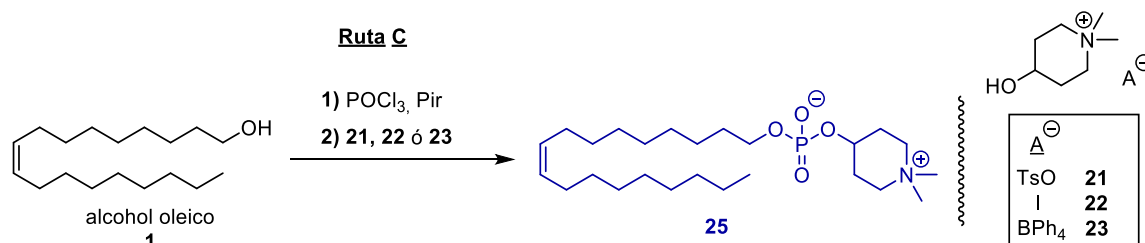
A la perifosina insaturada **25** también se puede acceder de modo directo desde **2**. Por reacción de **2** con la sal **23** se obtiene, después de purificar por CC, la perifosina insaturada deseada **25** con un mejor rendimiento (22 %). (Esquema 11)



Esquema 11. Síntesis de perifosina insaturada **4** mediante la **Ruta B**.

- **Ruta C**

Finalmente, (Esquema 12, **Ruta C**) a la perifosina insaturada **25** se puede obtener de modo directo sin aislamiento del fosfato intermedio como en las rutas anteriores (**Rutas A** y **B**). En esta reacción se ensayó la utilización de las sales de amonio derivadas de la hidroxipiperidina sintetizadas previamente **21**, **22** y **23**. La perifosina insaturada **25** únicamente se obtiene cuando la reacción de **1** con POCl_3 en piridina se realiza adicionando *in situ* la sal derivada del tetrafenilborato **23**, aunque la purificación del producto de reacción requiere una laboriosa CC, consiguiéndose **25** con un rendimiento bajo.



Esquema 12. Síntesis de perifosina insaturada, **Ruta C**.

En consecuencia, el mejor procedimiento para la obtención de **25** es el que se sigue en la ruta B, es decir utilizando el fosfato **2** como intermedio, con un rendimiento global del 21 %.

1.3. Síntesis de análogos de miltefosina funcionalizados en C16

En este apartado se describen las síntesis de los análogos de miltefosina funcionalizados al final de cadena **32**, **36** y **39**. (Figura 12)

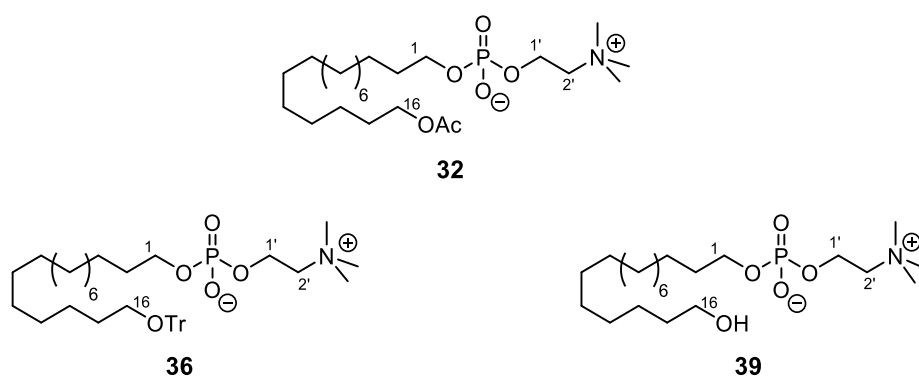


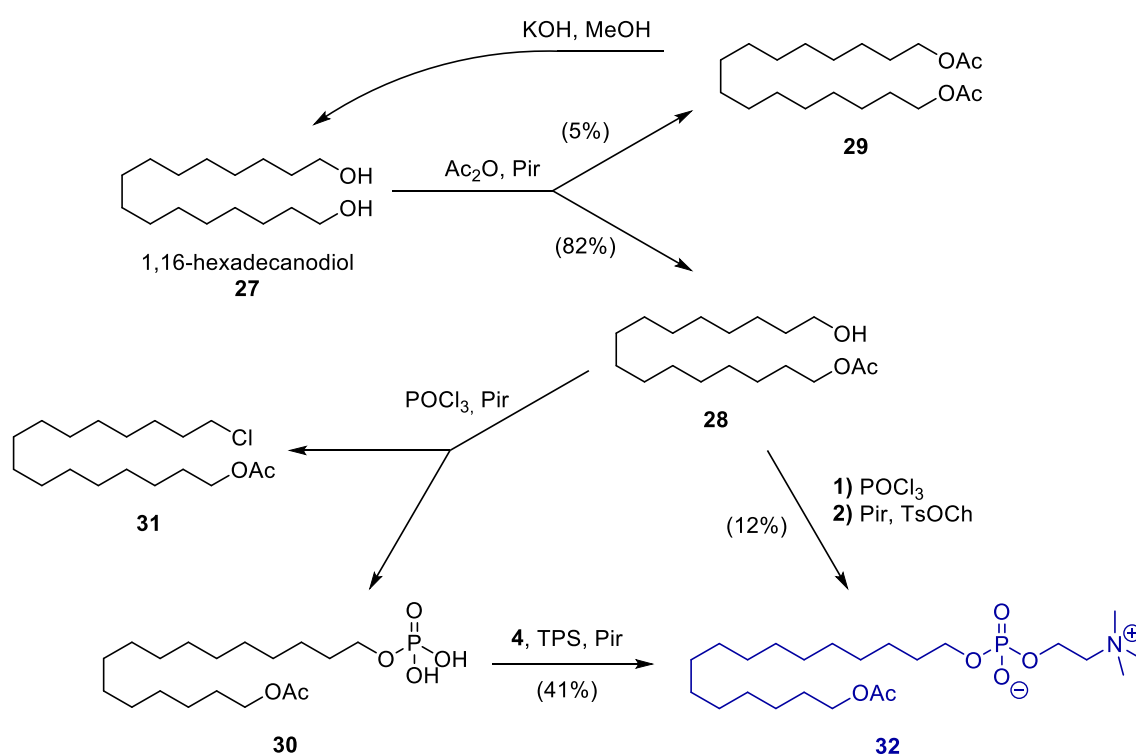
Figura 12. Análogos de miltefosina funcionalizados en C16 (**32**, **36** y **39**).

1.3.1. Síntesis del análogo de miltefosina con función acetoxilo en C16, **32**

La síntesis de **32** se desarrolla de acuerdo al siguiente esquema sintético. (Esquema 13)

La acetilación de 1,16-hexadecanodiol **27** con Ac₂O (1 equivalente) en piridina conduce a la mezcla de acetilderivados **28** y **29** de la que por CC se separa mayoritariamente **28** (82%).

La reacción de fosforilación de **28** con POCl₃ recientemente destilado y Pir, inicialmente no condujo al hidrogenofosfato **30** como se esperaba; sino que se produjo el producto de sustitución del hidroxilo por cloruro, **31** (Figura 13, Espectro) con rendimiento cuantitativo, por lo que el espectro A corresponde a **31**.



Esquema 13. Síntesis del análogo 16-acetoximiltefosina **32**.

Por ello, se procedió a modificar las condiciones de reacción para evitar la formación del cloroderivado **31** y maximizar la obtención del fosfato **30**. Se modificaron los disolventes y la temperatura de reacción recogiendo las diferentes condiciones y los espectros de RMN ^1H del producto bruto de reacción para cada caso en la Figura 13.

Realizando la reacción: a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, THF y piridina de disolvente se obtiene una mezcla de **30/31** con espectro **B** (Figura 13) y a $0\text{ }^\circ\text{C}$ utilizando de disolvente TCE y piridina se obtiene la mezcla de **30/31** de espectro **C** (Figura 13). Con estas condiciones de reacción, se disminuyó la cantidad de producto de sustitución, de manera que tanto menores temperaturas como el TCE permiten un mejor rendimiento en la obtención del hidrogenofosfato **30**.

En consecuencia, se combinaron ambas condiciones realizando la reacción a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y utilizando TCE y piridina de disolvente (Figura 13, Espectro **D**), lo que permitió obtener con excelente rendimiento el fosfato **30**, sin observar en el espectro de RMN ^1H del producto bruto de reacción la presencia de cloroderivado **31**.

En el espectro de RMN ^1H de **30** se observa el desapantallamiento de los hidrógenos geminales al fosfato que ahora aparecen a 3.91 ppm y en **28** aparecían a 3.60 ppm. En el cloroderivado **31**, la señal triplete de los hidrógenos geminales al cloruro aparecen a 3.52 ppm, presentando un espectro similar al hidroxiderivado **28**.

El hidroxiderivado **28** y el producto de sustitución **31** presentan un espectro de RMN ^1H muy semejante, aunque en cromatografía de capa fina (TLC) son perfectamente distinguibles cada una de las moléculas de este proceso **28**, **30** y **31**.

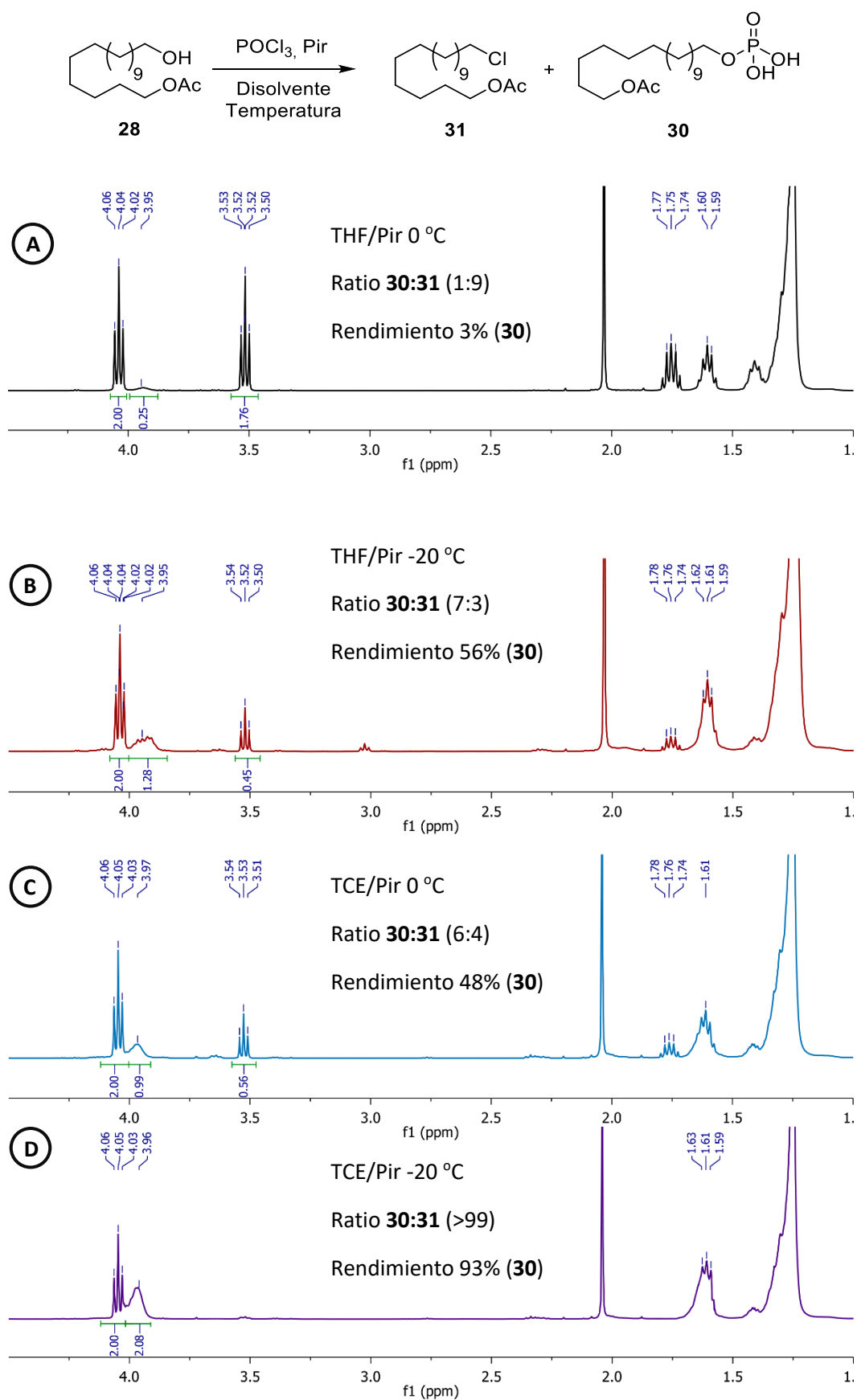
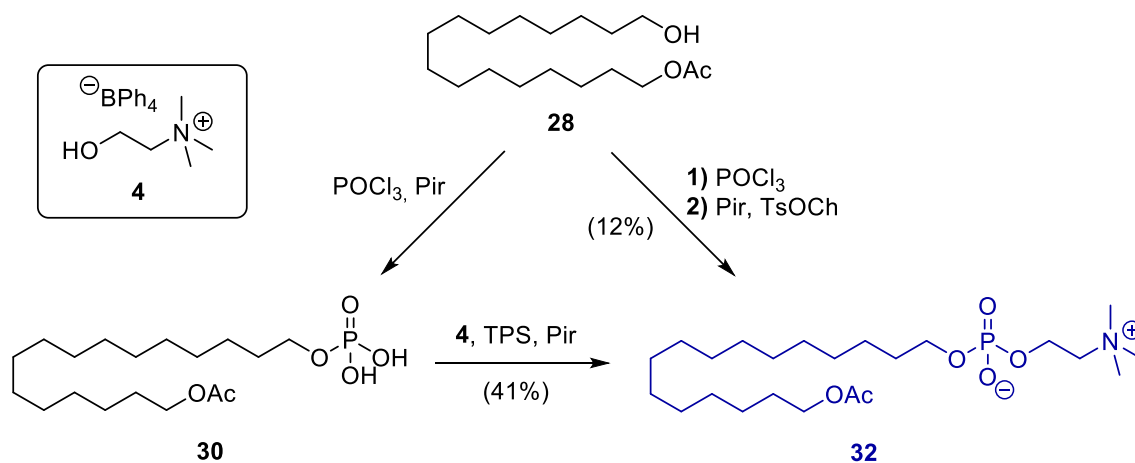


Figura 13. RMN ¹H del bruto de reacción de fosforilación de **28** en diferentes condiciones A-D.

Por reacción de **30** con tetrafenilborato de colina **4**, (Esquema 14) recientemente preparado y en presencia de cloruro de triisopropilbencenosulfonilo (TPS) se obtiene una mezcla de la que se separa por CC eluyendo con $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5) el producto deseado **32** con un 41%. El espectro de masas de presenta un ión molecular ($\text{M}+\text{H}^+$) a 466.3290 una correspondiente con la fórmula $\text{C}_{23}\text{H}_{49}\text{O}_6\text{NP}$. En el espectro de RMN ^1H aparecen las señales correspondientes a los hidrógenos geminales al grupo acetoxilo del final de cadena a 4.04 ppm y a 3.60 ppm se observan los hidrógenos sobre el C1 unido a la unidad de fosfocolina. Los hidrógenos H1' y H2' del fragmento de colina aparecen a 4.42 y 3.90 ppm respectivamente. A 3.44 ppm aparece un singlete de 9H correspondiente al trimetilamonio del fragmento de colina.

Por otro lado, cuando se lleva a cabo la reacción *one pot* del monoacetil derivado **28** con oxiclورو de fósforo recientemente destilado, (Esquema 14) seguido de la reacción con tosilato de colina conduce a un crudo de reacción del que separa tras laboriosa CC el análogo de miltefosina **32**.

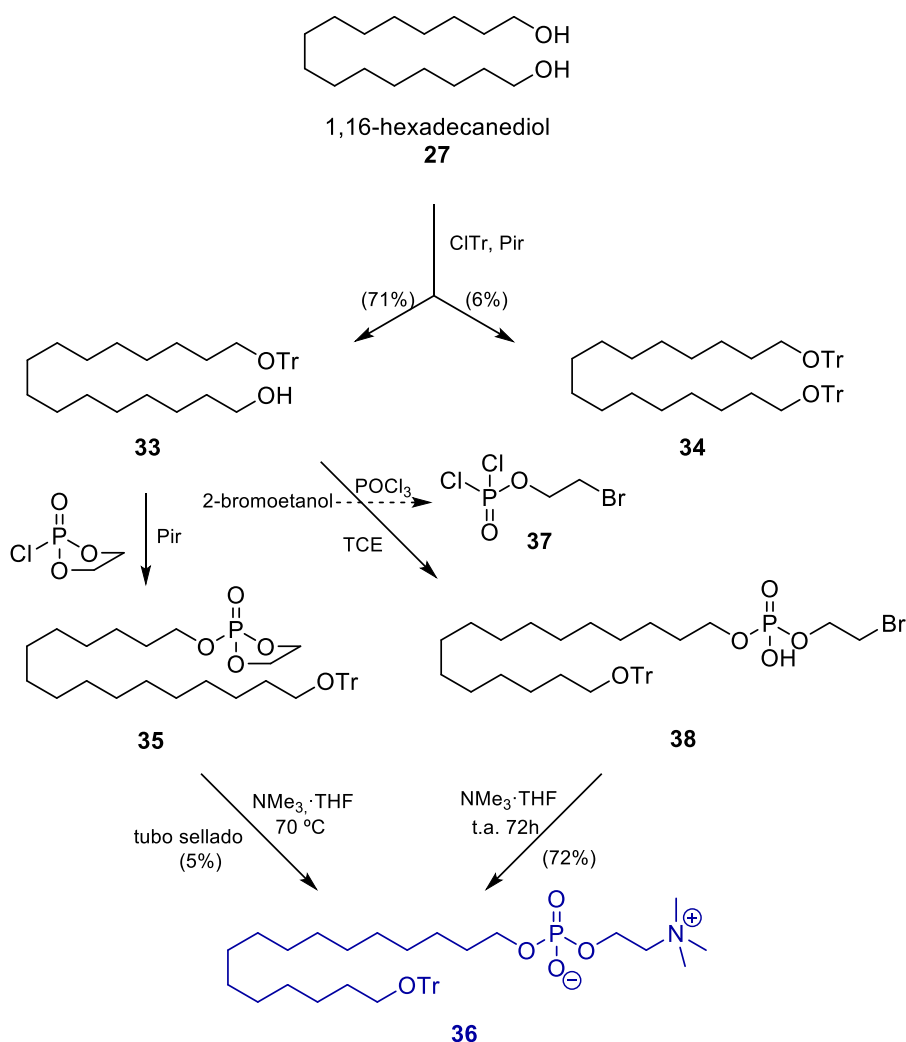


Esquema 14. Síntesis de **32**.

De esta manera, se ha accedido al derivado acetilado **32** mediante dos procedimientos diferentes. En la ruta por etapas se ha conseguido un mejor rendimiento, consiguiendo un 38% de rendimiento global en la obtención del derivado de miltefosina **32**.

1.3.2. Obtención de 16-tritiloximiltefosina, **36**

La ruta sintética del análogo con una función éter en C16 aparece en el Esquema 15.



Esquema 15. Síntesis de 16-tritiloximiltefosina **36**.

La obtención del monotritilderivado **33** (71 %) se realiza mediante reacción de **27** con cloruro de tritilo (1 equivalente) en piridina. En su espectro de RMN ¹H, **33** presenta los hidrógenos geminales al grupo tritilo apantallados a 3.05 ppm respecto de la señal correspondiente a los hidrógenos geminales al hidroxilo. Por reacción de **33** con 2-cloro-2-oxa-1,3,2-dioxafosfolano en piridina se obtiene el fosfolano derivado **35**. Dicho compuesto, muy inestable, se hace reaccionar inmediatamente con una disolución de trimetilamina en THF calentando a 70 °C en un tubo sellado. Después de cromatografiar el producto crudo de reacción, se obtiene **36** con bajo rendimiento.

| *Discusión de resultados*

Cuando el tritilderivado **33** reacciona con bromoetildiclorofosfato **37** (preparado recientemente a partir de 2-bromoetanol y POCl_3) en disolución de tricloroetileno se obtiene el bromoetilderivado **38**. Este compuesto se hace reaccionar directamente con una disolución de trimetilamina en THF obteniéndose **36** con un 72% de rendimiento, de este modo se consigue el análogo deseado con un rendimiento global del 51 %.

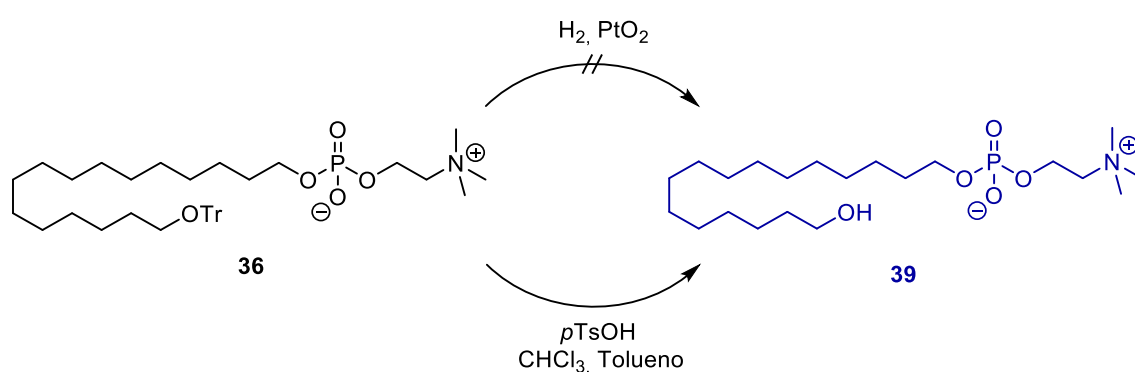
El espectro de masas de **36** con ion molecular a 666.4271 una corresponde con la estructura propuesta. Efectivamente en el espectro de RMN ^1H , realizado en DMSO- d_6 , entre 7.38-7.21 ppm aparecen los hidrógenos correspondientes al grupo tritilo. Los hidrogeno del fragmento de fosfocolina H1' y H2' se observan a 4.02 y 3,49 ppm respectivamente y a 3.12 aparece un singulete de 9H correspondientes a los tres grupos metilo.

1.3.3. Preparación del análogo 16-hidroximiltefosina, **39**

La obtención del análogo 16-hidroximiltefosina **39** puede plantearse utilizando el acetilderivado **32** o el tritilderivado **36** como precursores.

Mediante la hidrólisis del acetilderivado **32** no se consiguió aislar el producto deseado con el hidroxilo libre **39**. Por ello, la obtención de **39** se realizó desde el derivado **36**.

La reacción de desprotección del grupo tritilo en primer lugar se intentó realizar mediante reacción de hidrogenolisis de **36** en presencia de PtO_2 , no observándose transformación. En cambio, la reacción de **36** en medio ácido conduce **39**. (Esquema 16)



Esquema 16. Síntesis de 16-hidroximiltefosina **39**.

La reacción de **36** con $p\text{TsOH}$, debido a las dificultades de solubilidad, se realizó en disolución de CHCl_3 /tolueno, la mezcla de reacción se para por adición de agua (1 equivalente) y la mezcla resultante se introduce en la columna cromatográfica directamente. La utilización de Sephadex LH-20 para eliminar trazas de $p\text{TsOH}$ que pueda coeluir con el producto resulta una forma conveniente de purificación de estas moléculas de elevada polaridad. De este modo se obtiene el análogo deseado **39** con un excelente rendimiento (89%).

En el espectro de RMN ^1H (DMSO-d_6) de **39** aparecen los hidrógenos geminales al grupo hidroxilo a 3.36 ppm, desapantallados con respecto a los hidrógenos geminales al grupo tritilo en **36**, que se observan a 2.93 ppm.

1.4. Síntesis de análogos de miltefosina con fluoróforo en la cadena

En este apartado se describen la síntesis del análogo de miltefosina **49** (Figura 14) que contiene un fluoróforo al final de la cadena y la preparación de un intermedio avanzado para la síntesis del análogo **53** que contiene el fluoróforo en mitad de cadena. Los análogos fluorescentes son de interés para el estudio del mecanismo de acción de los ATLS, ya que pueden ser utilizados para proporcionar imágenes de tumores *in vivo* y por último facilitar la visualización de procesos tumorales como la metástasis y la progresión del cáncer.

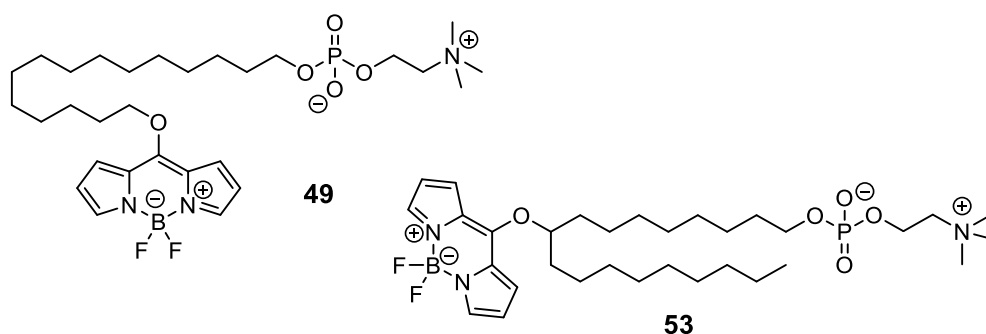
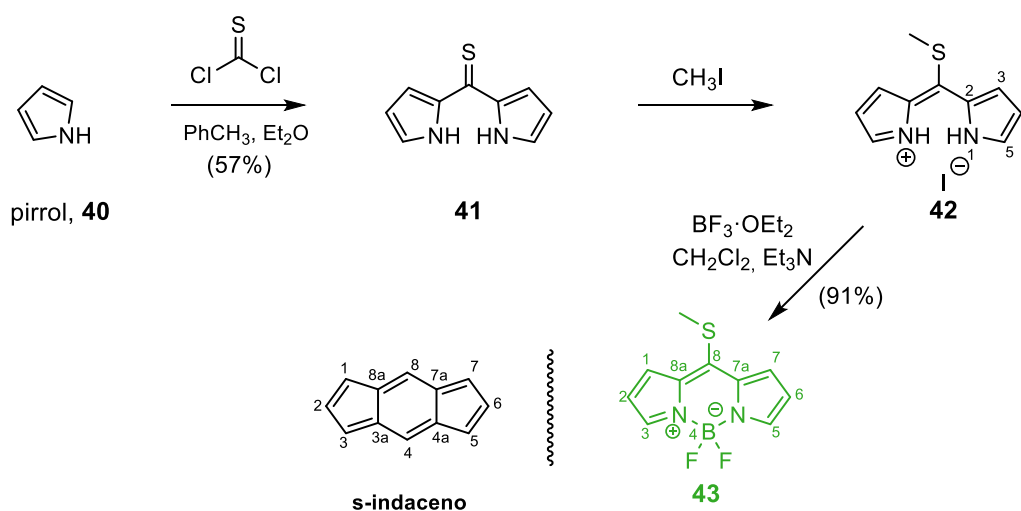


Figura 14. Análogos fluorescentes de miltefosina **49** y **53**.

El fluoróforo elegido es un derivado de BODIPY (**43**) que proporciona una fluorescencia adecuada para nuestros propósitos de seguimiento tumoral.⁴ Para su incorporación en los ATLS es necesario sintetizar el BODIPY derivado **43**. La preparación de **43** se realiza siguiendo el esquema sintético que aparece en el Esquema 17.⁵

El fluoróforo **43** se sintetiza utilizando pirrol **40** como material de partida. Por tratamiento de **40** (2 equivalentes) con tiofosgeno, se obtiene la tiocetona **41**, que reacciona con yoduro de metilo proporcionando un producto crudo de reacción que en su espectro de RMN ^1H se observa la nueva señal singulete a 2.91 ppm correspondiente al metilsulfuro de **42**. El metilsulfuro **42** suficientemente puro y se utiliza directamente en el siguiente paso.

La reacción posterior con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ en presencia de Et_3N conduce al BODIPY derivado **43**. El espectro RMN ^1H de **43** presenta a 2.91 ppm la señal correspondiente a los hidrógenos del metilsulfuro y ya no aparecen las señales a 12.03 ppm correspondientes a los hidrógenos de los pirroles.



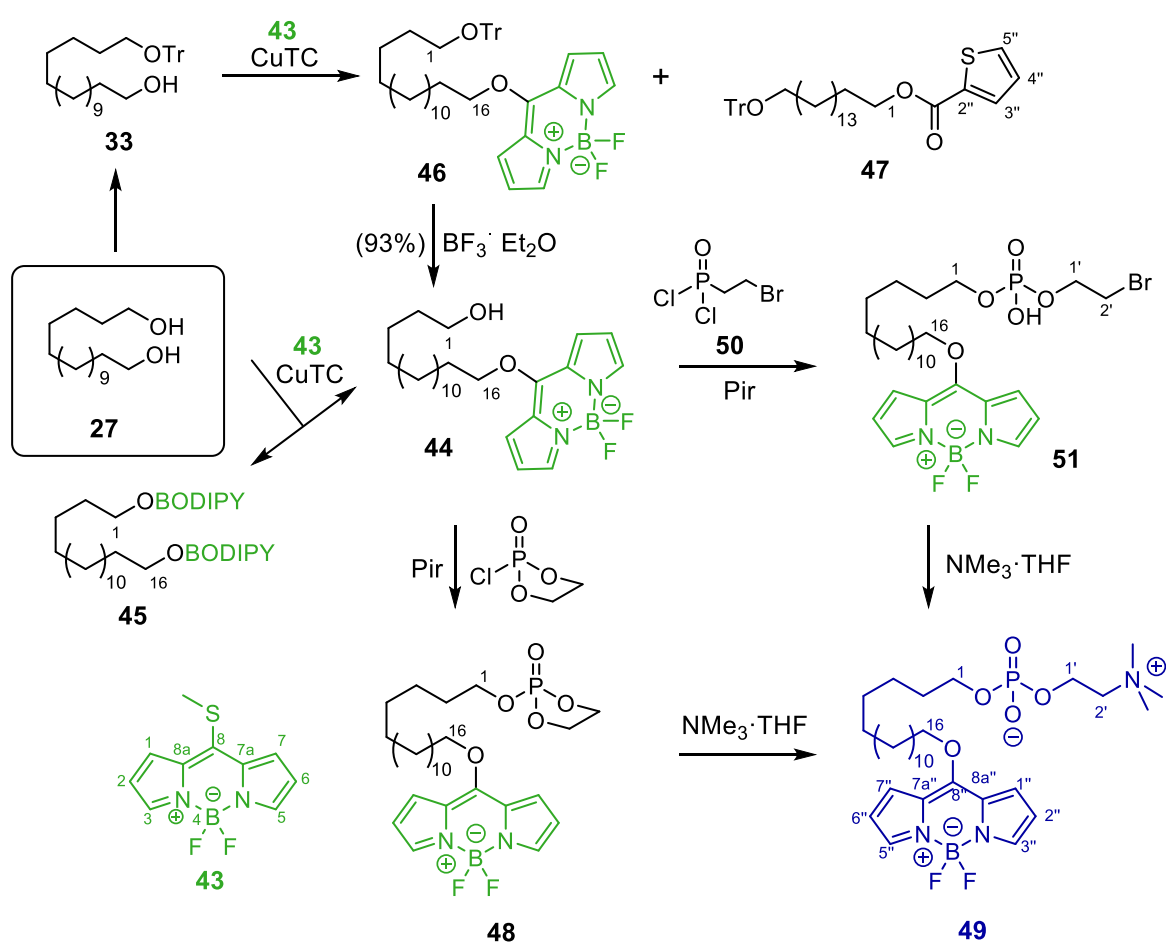
Esquema 17. Síntesis de derivado del BODIPY **43** a partir de pirrol, **40**.

1.4.1. Síntesis del análogo fluorescente 49

La síntesis de **49** se ha realizado por dos rutas: **A** y **B**, que difieren en la estrategia de incorporación del fluoróforo y la cabeza polar.

• Síntesis de **49**, Ruta A

La primera ruta sintética hacia los análogos fluorescentes, se desarrolla siguiendo el Esquema 18, en el que puede observarse que a partir del 1,16-hexadecanodiol **27**, primero se introduce el fragmento del fluoróforo⁶ y seguidamente se incorpora la cabeza polar de la fosfocolina.



Esquema 18. Síntesis de análogo fluorescente de miltefosina **49**, Ruta A.

Por reacción de **27** con el BODIPY derivado **43** en presencia de tiofenocarboxilato de cobre (CuTC) proporciona una mezcla en la que se encuentra mayoritariamente el requerido mono-BODIPY derivado **44** y minoritariamente **45**. En el espectro RMN ^1H de **44** se observan las señales correspondientes a los hidrógenos del heterociclo a 7.73, 7.34 y 6.52 ppm y la señal de los hidrógenos geminales al alcoxiBODIPY aparece como triplete a 4.69 ppm ($J = 6.4$ Hz). A este mismo compuesto **44** también se puede acceder utilizando el tritild derivado **33**, ya conocido. La reacción de **33** con BODIPY **43** y tiofeno-2-carboxilato de cobre(I) (CuTC)⁶ proporciona mayoritariamente el derivado **46** (93%) y una pequeña proporción identificada como **47**. En el espectro de RMN ^1H de **46** aparecen las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos del grupo tritilo, 7.42-7.15 (15H, m), y las señales del sistema heterocíclico del BODIPY a 7.70, 7.30 y 6.48 ppm. La señal, triplete, de los hidrógenos geminales a la función oxigenada geminal al BODIPY aparece desapantallada a 4.65 ppm. La reacción de desprotección del grupo hidroxilo de **48** con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ conduce a **44**. El primer procedimiento directo tiene el inconveniente de la laboriosa separación cromatográfica, lo que lleva a un rendimiento menor.

La transformación de **44** en el deseado análogo **49** se realizó utilizando dos procedimientos alternativos que utilizan el fosfolano **48** o el bromoetildiclorofosfato **51** como intermedios. (Esquema 18)

La reacción de **44** con 2-cloro-2-oxa-1,3,2-dioxafosfolano conduce al intermedio inestable **48**, que sin purificación posterior se hace reaccionar con una disolución de trimetilamina calentando en tubo cerrado, de este modo se obtiene el análogo **49**, pero con bajo rendimiento.

Por reacción del bromoetildiclorofosfato **50** recientemente preparado, con el hidroxiderivado **44**, se obtiene el bromoetilhidrógenofosfato **51**. El espectro de RMN ^1H de **51** presenta las señales características de grupo bromoetild derivado a 4.45 y 3.53 ppm correspondientes a los hidrógenos sobre H1' y H2' respectivamente. La reacción de **51** con disolución de trimetilamina en THF conduce a **49**.

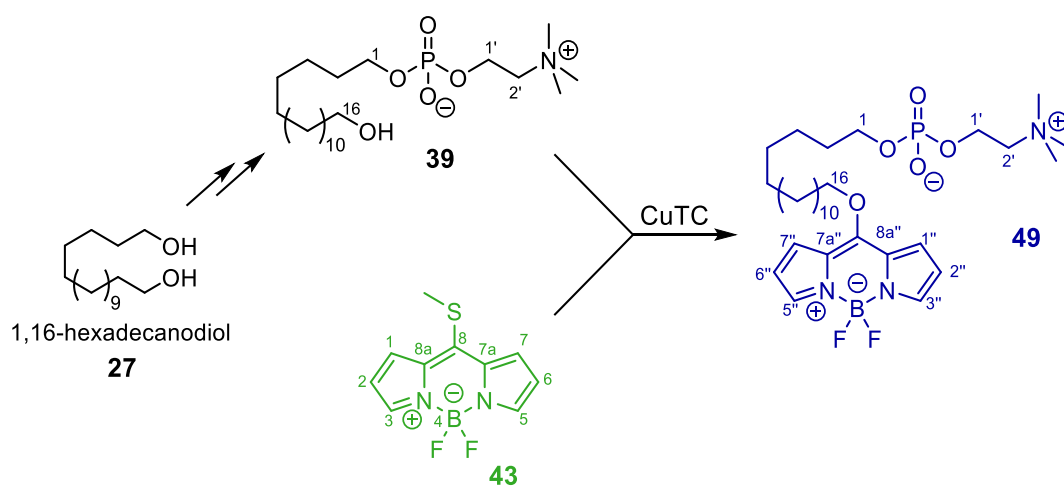
En el espectro de masas **49** aparece un ion molecular ($\text{M}+\text{H}^+$) a 613.3731 uma lo que está de acuerdo con la estructura esperada correspondiente a la fórmula $\text{C}_{30}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$.

En su espectro de RMN ^1H en DMSO- d_6 , se observan las señales características del fluoróforo BODIPY a 7.80 (H-3'' y 5''), 7.56 (H-1'' y 7'') y 6.63 (H-2'' y 6'') ppm y las señales, multipletes, correspondientes a los metilenos de la fosfocolina a 4.01 y 3.51 ppm y a 3.34 ppm aparece el singulete de los tres metilos.

• Síntesis de **49**, *Ruta B*

La obtención de **49** también se pudo conseguir utilizando una estrategia sintética en la que se invierte la incorporación de los grupos funcionales, es decir, introduciendo primero la cabeza polar y finalmente el fluoróforo. En este caso, para obtener **49** se utiliza como intermedio el análogo **39**. (Esquema 19)

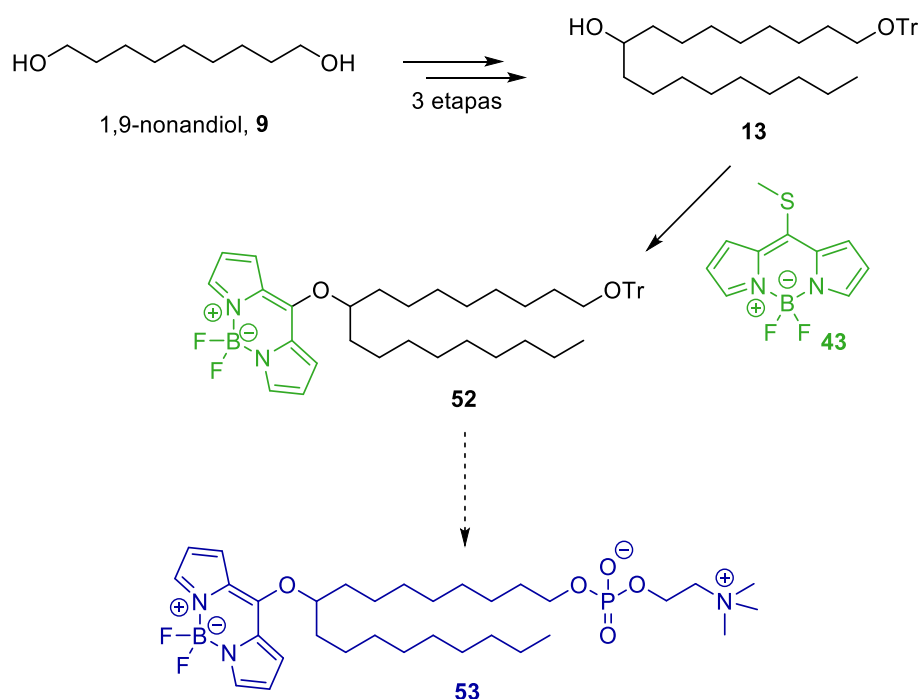
Por reacción de **39** con el BODIPY **43** en acetonitrilo y CuTC, después de cromatografiar el bruto de reacción se obtiene **49** con un buen rendimiento (46 %).



Esquema 19. Síntesis de análogo fluorescente de miltefosina **49**, *Ruta B*.

1.4.2. Aproximación sintética a 53

Utilizando el hidroxiderivado **13**, precursor del análogo yodado de mitad de cadena, se intentó la síntesis del análogo fluorescente **53**. (Esquema 20) Por reacción de **13** con el BODIPY **42** en presencia de tiofeno-2-carboxilato de cobre(I) (CuTC) se obtiene **52** con rendimiento moderado. El espectro de masas de **52** presenta ion molecular a 733.4717 una lo que está de acuerdo con una fórmula molecular de $C_{47}H_{60}BF_2N_2O_2$ ($M+H^+$) de acuerdo con la estructura propuesta. En el espectro de RMN 1H de **52** aparecen los hidrógenos geminales al tritiléter y al alcoxiBODIPY: como triplete 3.03 ppm y multiplete a 5.13 ppm respectivamente. Los intentos de desprotección del grupo hidroxilo primario realizados no proporcionaron los resultados esperados. En el futuro se procederá a la preparación de una mayor cantidad de dicho compuesto, con el que se abordará la síntesis de **53** siguiendo los procedimientos utilizados en la síntesis de **49**, o se cambiará la estrategia sintética introduciendo primero la cabeza polar y finalmente se incorporará el fluoróforo.



Esquema 20. Aproximación sintética al análogo fluorescente de miltefosina **53**.

1.4.3. Fluorimetría y espectroscopía UV-Vis de los análogos fluorescentes

Se ha medido el espectro de absorción y de emisión de fluorescencia a 25 °C para el BODIPY **43**, el intermedio fluorescente **52** y el análogo de miltefosina **49** en disolución en EtOH. (Tabla 1 y Figura 15) De esta manera, se han determinado los máximos de absorción y de emisión cuando se excita a la molécula con una λ_{Ex} correspondiente a su máximo de absorción.

Cuando el BODIPY se incorpora en la estructura del lípido, las propiedades espectroscópicas se ven modificadas, observándose un efecto hipsocrómico como resultado de sustituir el metilsulfuro de **43** por el oxígeno en los derivados alquilo-BODIPY **52** y **49** tanto en los máximos de absorción como en los máximos de emisión de fluorescencia.

En los espectros de emisión de fluorescencia, cuando se excita a la longitud de onda de su máximo de absorción **52** y **49** presentan un máximo de emisión similar: a 485 y 489 nm respectivamente; mientras que el BODIPY **43** presenta un máximo de emisión a 534 nm ($\lambda_{\text{Ex}} = 490$ nm).

Tabla 1. Datos espectroscópicos de UV-Vis y fluorescencia.

	$\lambda_{\text{Abs}}(\text{máx})/\text{nm}$	$\varepsilon/\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$	$\lambda_{\text{em}}(\text{máx})/\text{nm}$	$\lambda_{\text{Ex}}/\text{nm}$
43	490	16000	534	490
52	441	10000	485	441
49	444	9000	489	444

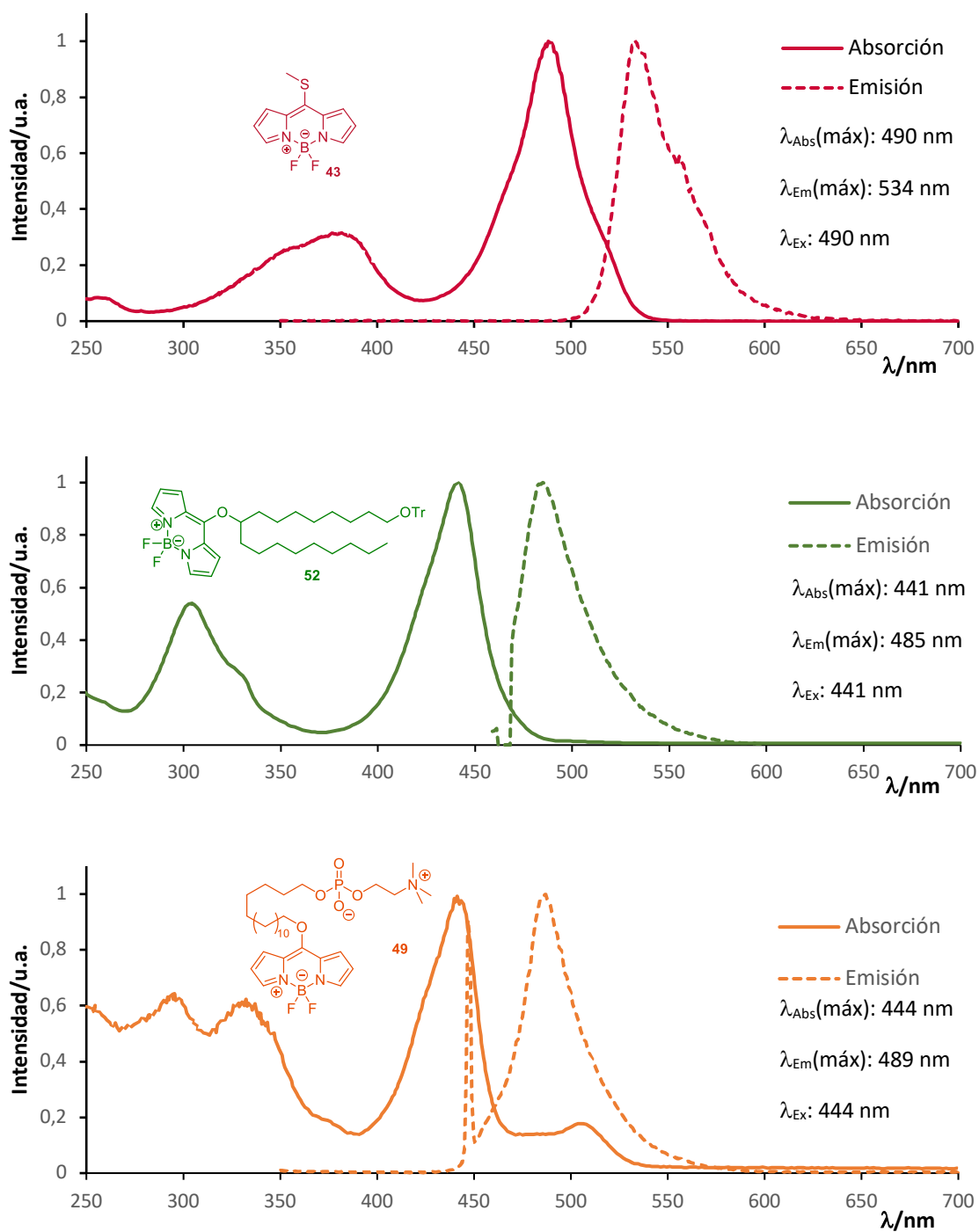


Figura 15. Espectros de absorción y emisión de **43**, **52** y **49**. Se representa la intensidad de absorción y emisión normalizada.

2. Aislamiento y preparación de halimanos naturales y sintéticos para su evaluación biológica como neurotróficos y antiparasitarios

En el trabajo referente a la búsqueda de nuevos agentes neurotróficos, publicado en 2019, se indica el interés por los compuestos que contienen el fragmento de metilencicloalquil acetato (MCA).⁷ A raíz de esto, nuestro grupo de investigación centró su atención en este tipo de compuestos. Dichos compuestos interactúan con las células neuronales y funcionan como farmacóforos inductores del crecimiento de las neuritas, comportándose como nuevos agentes neurotróficos. Entre los productos naturales que se señalan en la citada publicación aparece el ácido *ent*-halímico **54**, motivo por el que se decidió preparar una serie de derivados de dicho compuesto con el fin de realizar su valoración biológica como agentes neurotróficos.

En la Figura 16 aparecen los compuestos derivados de ácido *ent*-halímico **54** que se han preparado para su evaluación como neurotróficos.

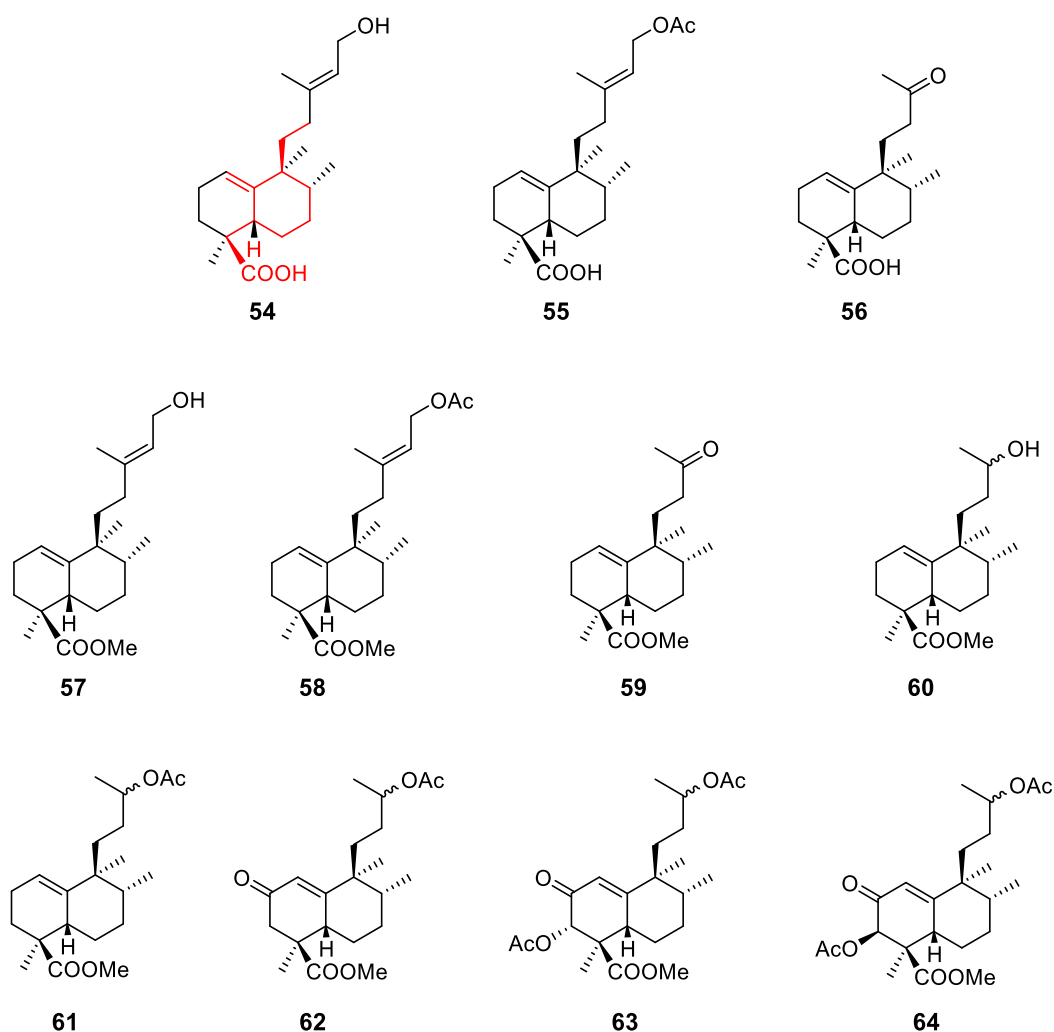
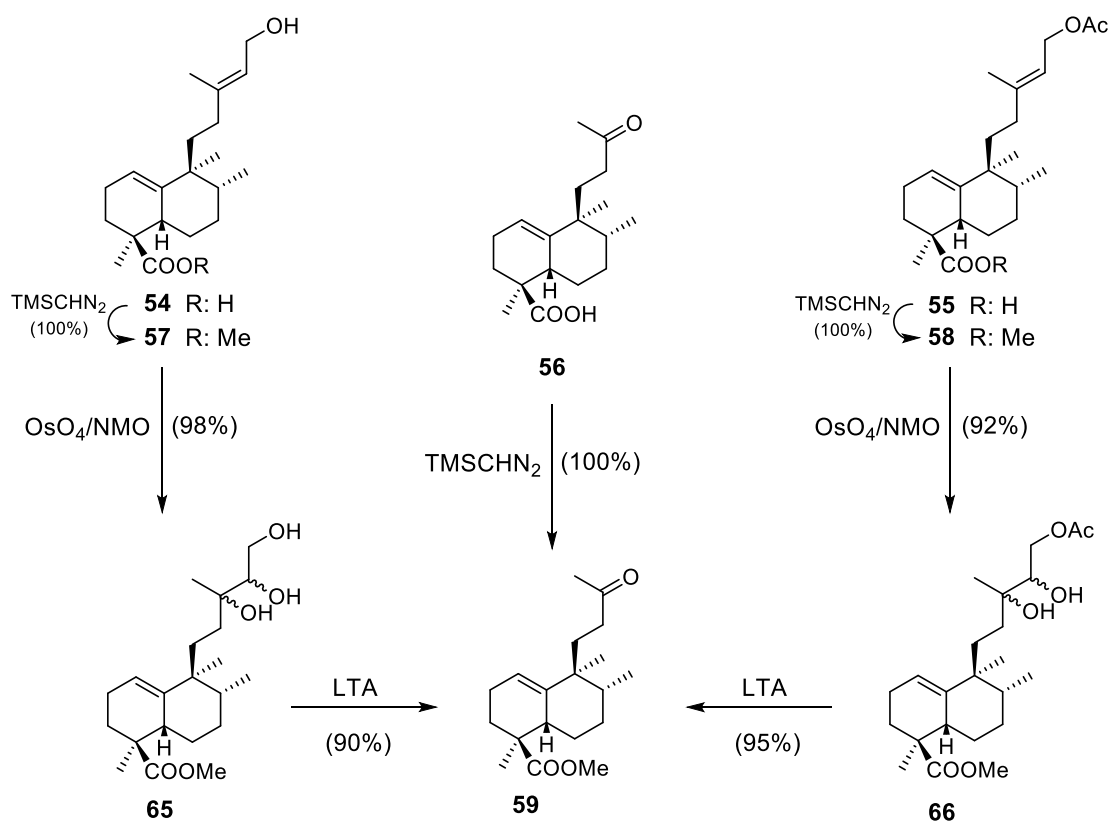


Figura 16. Halimanos que contienen el fragmento MCA evaluados como neurotróficos **54-64** y como antiparasitarios frente a *S. venezuelensis* **54-59**.

Como puede observarse entre estos compuestos además de los productos naturales ácido ent-halímico **54** y su acetilderivado **55** y la metilcetona **56**, componentes mayoritarios del extracto de AcOEt de *Halimium viscosum* aparecen sus esteres metílicos derivados **57**, **58** y **59**, y una serie de dinorderivados diferentemente funcionalizados en C18, en la cadena lateral o en el anillo A (**60-64**).

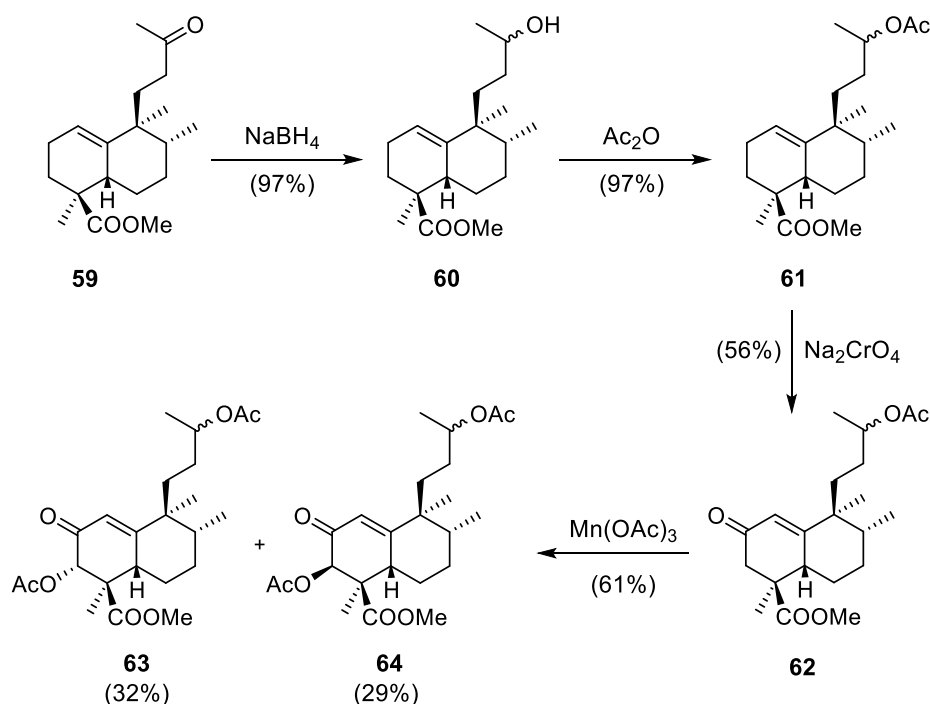
A continuación, se describirá la preparación de estos compuestos a partir de los productos naturales **54** y **55**. (Esquema 21 y 22)



Esquema 21. Obtención de derivados con fragmento MCA **54-59**.

La esterificación de los productos naturales **54**, **55** y **56** con TMSCHN_2 (Esquema 21) proporciona cuantitativamente los respectivos metiléster derivados **57**, **58** y **59**. A **59** también se puede acceder desde los ésteres **57** y **58** procedentes de los compuestos naturales mayoritarios **54** y **55**, a través de los derivados **65** y **66** obtenidos por oxidación quimioselectiva de **57** y **58** con OsO_4 . La oxidación de **65** y **66** con tetraacetato de plomo (LTA) proporciona **59** con excelente rendimiento.

La reducción de **59** con NaBH₄ conduce al hidroxiderivado **60** (Esquema 22) que por acetilación con Ac₂O en piridina proporciona el acetilderivado **61**. El tratamiento de **61** con Na₂CrO₄ conduce a la enona **62**. En el espectro RMN ¹H de **62**, la señal del hidrógeno olefínico aparece desapantallada 5.82 ppm como consecuencia de estar el doble enlace conjugado con el carbonilo. La reacción de **62** con Mn(OAc)₃ conduce a la mezcla **63** y **64** con buen rendimiento, estos acetilderivados se separan por cromatografía de columna. En los espectros de RMN ¹H de **63** y **64** los hidrógenos geminales a los acetoxilos en C3 aparecen desapantallados a 5.36 y 5.66 ppm respectivamente.



Esquema 22. Obtención de derivados con fragmento MCA **60-64**.

Los compuestos naturales y sintéticos que contienen el fragmento MCA (**54-64**) que aparecen en la Figura 16 se enviaron para su evaluación como neurotróficos al grupo de investigación del Prof. Dr. Juan Carlos Arévalo (Instituto de Neurociencias de Castilla y León, INCyL) y los compuestos **54-59** se enviaron para evaluar su actividad antiparasitaria al grupo de investigación del Prof. Dr. Julio L. Abán del Instituto de Enfermedades Tropicales (IBSAL, Universidad de Salamanca).

3. Aproximación sintética a diterpenolidas del tipo tessmannolida y secochilotrinolida

Desde hace unos años, el fragmento de γ -hidroxibutenolidas presente en un buen número de productos naturales y sintéticos se ha venido asociando a la capacidad antitumoral de dichos compuestos, por ello a dicho fragmento puede considerársele como un farmacóforo para dicha actividad citotóxica.

Uno de los últimos proyectos sintéticos de nuestro grupo va dirigido a la síntesis de bioconjugados de ATLS con γ -hidroxibutenolidas diterpénicas buscando de este modo disminuir el tamaño de la parte terpénica del híbrido conjugado con respecto a los sintetizados anteriormente por nuestro grupo.

En este trabajo se realiza una aproximación a la síntesis de ácido tessmánico **66** y secochilotrin **67** dos secohalimanos naturales, epímeros en C10, cuya estructura se determinó espectroscópicamente, pero falta por establecer su configuración absoluta. (Figura 17)

Con la síntesis de dichos productos naturales se pretende por una parte corroborar su estructura y fijar su configuración absoluta y por otra parte aprovechar la γ -hidroxibutenolidas derivadas de los mismos: tessmannolida **68** y secochilotrinolida **69**, para sintetizar conjugados con ATLS y probar el efecto sinérgico antitumoral que puede surgir con estos bioconjugados.

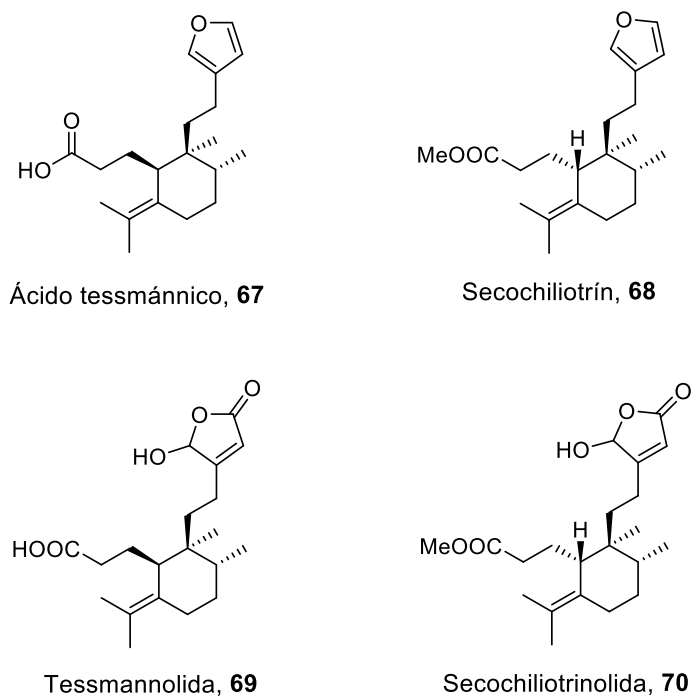


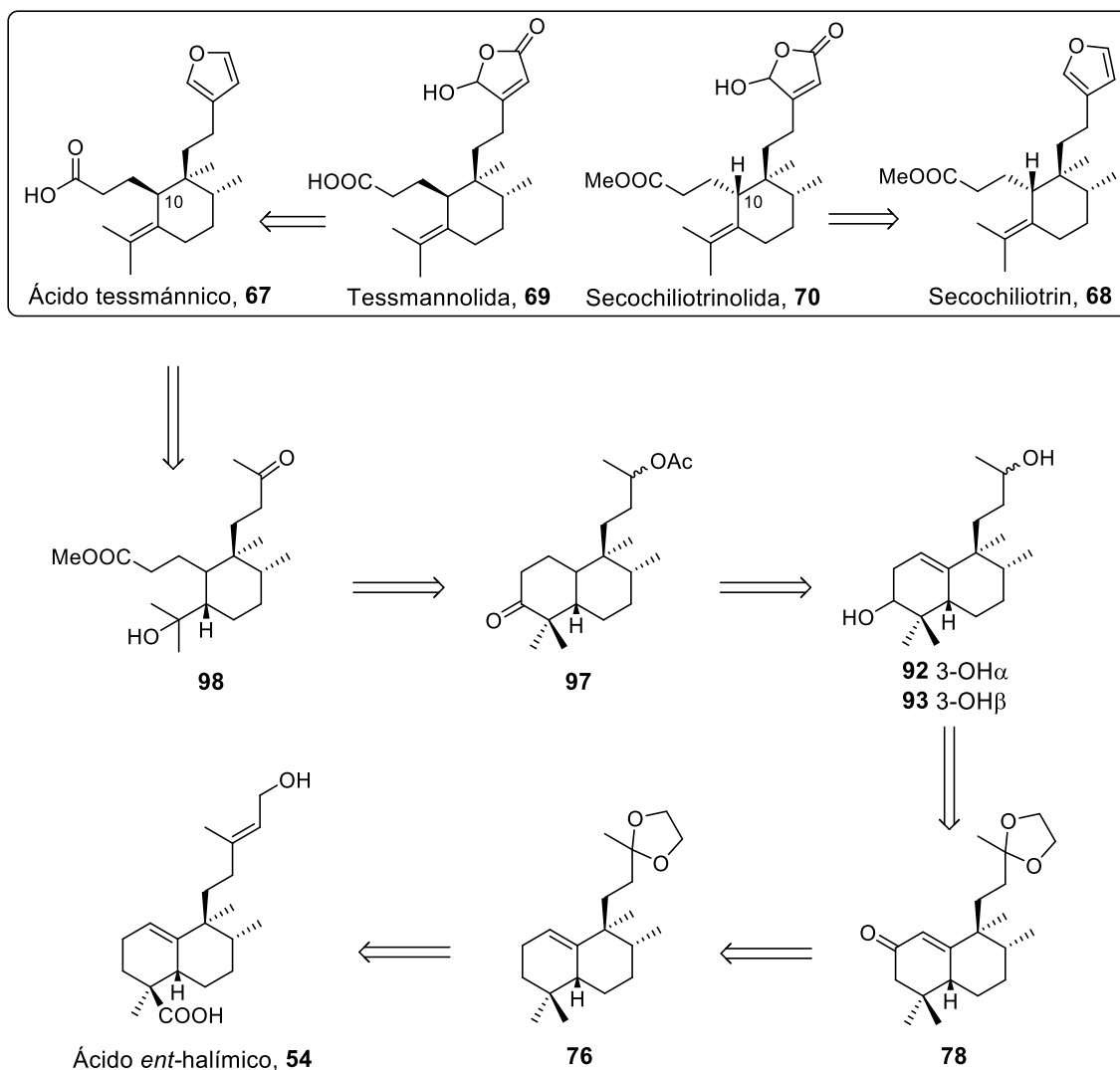
Figura 17. Furoditerpenoides naturales (**67** y **68**) y diterpenolidas (**69** y **70**).

Considerando al ácido *ent*-halímico **54** como material de partida y comparándolo estructuralmente con ácido tesmánico **67** y con secochilotrín **68** o con sus γ -hidroxibutenolidas tesmannolida **69** y secochilotrínolida **70**, se deduce que hay que realizar las siguientes transformaciones fundamentales en el producto de partida:

- Instalar el fragmento de γ -hidroxibutenolidas en la cadena lateral.
- Apertura del anillo A y adecuación de grupos funcionales.

Para la elaboración del furo-derivado o de la γ -hidroxibutenolida en la cadena, nuestro grupo dispone con una gran experiencia en la síntesis de este tipo de compuestos.⁸⁻¹⁰ La ruptura del anillo A y la elaboración de un 3,4-secoderivado requiere la funcionalización de C3 del esqueleto halimano.

Teniendo en cuenta estas consideraciones se ha elaborado el siguiente esquema retrosintético (Esquema 23) para abordar la síntesis de **67-70**.



Esquema 23. Retrosíntesis de **67-70**.

El acceso a los productos naturales furo-secohalimanos derivados **67** y **68**, epímeros en C10, puede realizarse desde sus γ -hidroxibutenolidas derivadas **69** y **70**. La síntesis de los mismos permitirá confirmar su estructura y establecer su configuración absoluta, hasta ahora desconocida. Un intermedio adecuado para la síntesis de **69** y **70** es el seco-dinorderivado **98**. La transformación de la metilcetona de la cadena lateral en γ -hidroxibutanolida ya ha sido realizada anteriormente en nuestro grupo.¹¹ La obtención de un 3,4-seco-derivado como **98** puede conseguirse utilizando como etapa clave una reacción de Baeyer-Villiger de un 3-oxoderivado **97** al que podría accederse a su vez desde los dioles **92** y **93**. La hidrogenación catalítica del doble enlace anular de los *ent*-halimanos-1(10) no se ha realizado anteriormente en ningún caso. Estudios moleculares indican que el doble enlace está impedido por ambas caras y es muy

posible que el resultado de la hidrogenación catalítica sea una mezcla de isómeros en C10. Dado que nuestro propósito sintético son los productos naturales **67** y **68**, que son compuestos epímeros en C10, la referida hidrogenación permitiría el acceso a ambos compuestos, llevando a cabo la debida separación de la mezcla epimérica en alguno de los intermedios que hay que manejar antes de llegar a los productos finales. El acceso a los dioles **92** y **93** funcionalizados en C3 puede realizarse desde la enona **78** utilizando la metodología puesta a punto en la síntesis de thyersindol C y de 12-*epi-ent*-polialthenol y análogos.^{12,13} Desde el dinorderivado **76** procedente del producto de partida ácido *ent*-halímico **54**, puede conseguirse la enona **78** mediante reducción de C18 utilizando como transformación clave la reacción de Huang-Minlon.

El desarrollo sintético se describirá en las siguientes etapas:

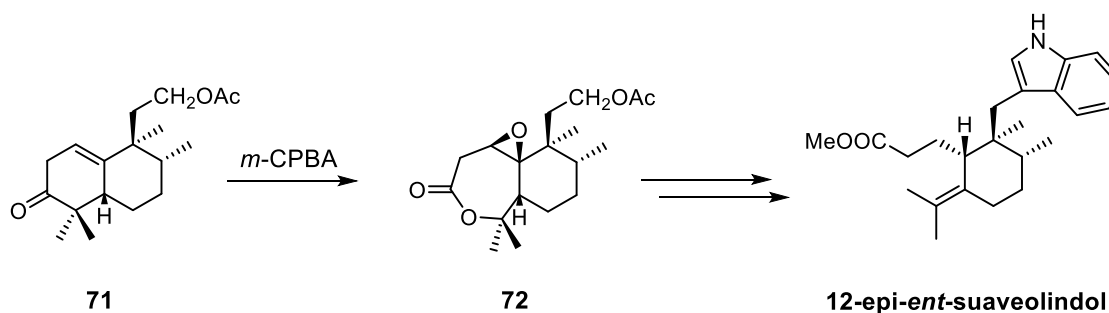
3.1. Obtención de la enona **78**.

3.2. Preparación del intermedio funcionalizado en C3, **92** y **93**.

3.3. Síntesis del intermedio hidrogenado **95**.

3.4. Como trabajo futuro se realizará la ruptura del anillo A y se completará la funcionalización de la cadena.

Para este último apartado, a continuar desarrollando en el futuro, se cuenta con el antecedente de la oxidación del 3-oxotetranorhalimano **71**, intermedio clave en la síntesis de 12-*epi-ent*-polialthenol.¹⁴ Por reacción de Baeyer-Villiger de **71** proporciona la lactona **72**, que podría utilizarse en la síntesis de 12-*epi-ent*-suaveolindol. El secoderivado **72** es análogo al requerido en la síntesis en la que se trabaja ahora. (Esquema 24)

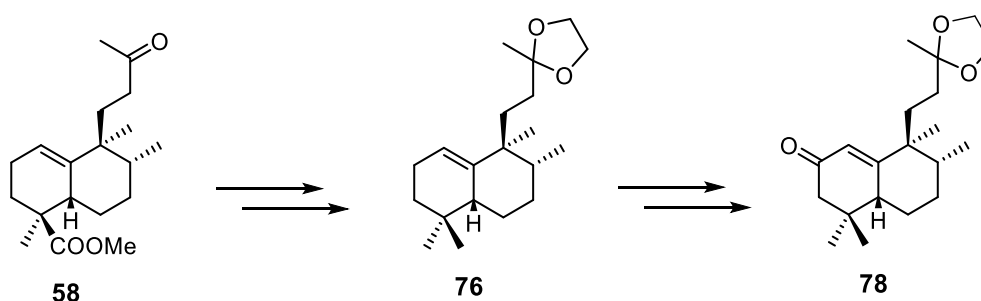


Esquema 24. Síntesis del 3-secoderivado **72**, precursor de 12-*epi-ent*-suaveolindol.

3.1. Obtención de la enona **78**

La preparación de la enona **78** se realiza partiendo de la metilcetona **58**, procedente de ácido *ent*-halímico **54**, ya utilizada anteriormente en la síntesis de compuestos neurotróficos.

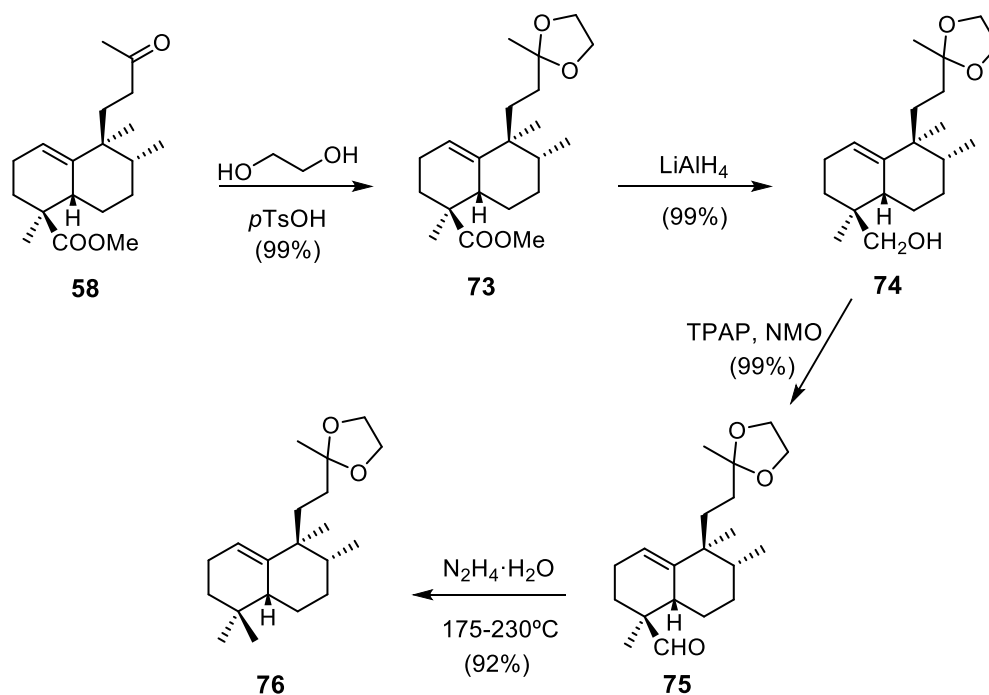
Las transformaciones fundamentales para la preparación de **86** desde la metilcetona **58**, (Esquema 25) requieren en primer lugar la reducción del metoxicarbonilo de C18 a metilo obteniendo **76** y después realizar la funcionalización de C2 que proporcionaría la enona deseada **78**.



Esquema 25. Obtención de la enona **86**.

La protección de **58** se realiza mediante tratamiento con etilenglicol en medio ácido, obteniéndose el dioxolano **73**. (Esquema 26) El espectro de masas de **73** (HRMS $C_{21}H_{34}O_4$: 350.2453 uma) corresponde a un compuesto con 4 oxígenos, dos de ellos del anillo de dioxolano. En el espectro de RMN ^{13}C de **73** aparece a 110.4 ppm el carbono cuaternario acetálico de C13.

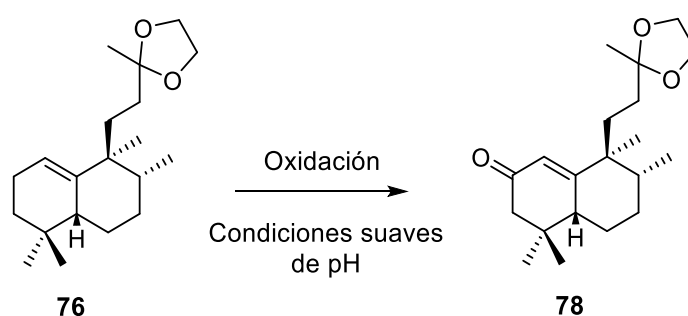
Una vez protegida la cadena lateral, se procede a la reducción de C18 transformando el grupo metoxicarbonilo de **73** en metilo. La transformación clave en este proceso es la reducción de Huang-Minlon del carbonilo adecuado, en este caso el aldehído **75**.



Esquema 26. Obtención del intermedio **76**.

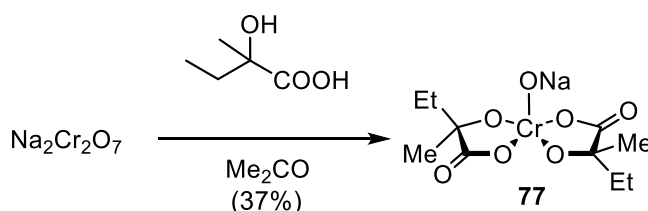
La reducción de **73** con LiAlH_4 proporciona cuantitativamente el hidroxiderivado **74**. La oxidación de **74** con TPAP en presencia NMO como cooxidante conduce a **75** con rendimiento cuantitativo. La señal singulete a 9.52 ppm en el espectro de $\text{RMN } ^1\text{H}$, la señal del espectro de $\text{RMN } ^{13}\text{C}$ a 206.3 ppm y la banda que aparece en su espectro de IR a 1722 cm^{-1} confirman la estructura del aldehído **75**. Por tratamiento de **75** con hidrato de hidrazina en dietilenglicol en medio alcalino se obtiene el producto de reducción **76** con excelente rendimiento. Para realizar esta reducción, se requiere de calentar primero a 175°C durante 20 h 30 min y a continuación, retirar el refrigerante durante 20 min para permitir la evaporación del agua. Por último, se calienta a 230°C otras 3h y 30 min. En el espectro $\text{RMN } ^1\text{H}$ y de $\text{RMN } ^{13}\text{C}$ de **76** aparecen señales correspondientes a 5 grupos metilo, lo que está de acuerdo con la estructura esperada.

Partiendo desde el dioxolano **76**, la transformación en **78** requiere la funcionalización en C2. El intermedio **78** es adecuado para proceder posteriormente a la funcionalización en C3. Para la obtención de **78** a partir de **76** es precisa la utilización de un oxidante suave en términos de pH, de manera que se introduzca la función oxigenada en C2 sin desproteger simultáneamente el 1,3-dioxolano de la cadena. (Esquema 27)



Esquema 27. Transformación de **76** en la enona **78**.

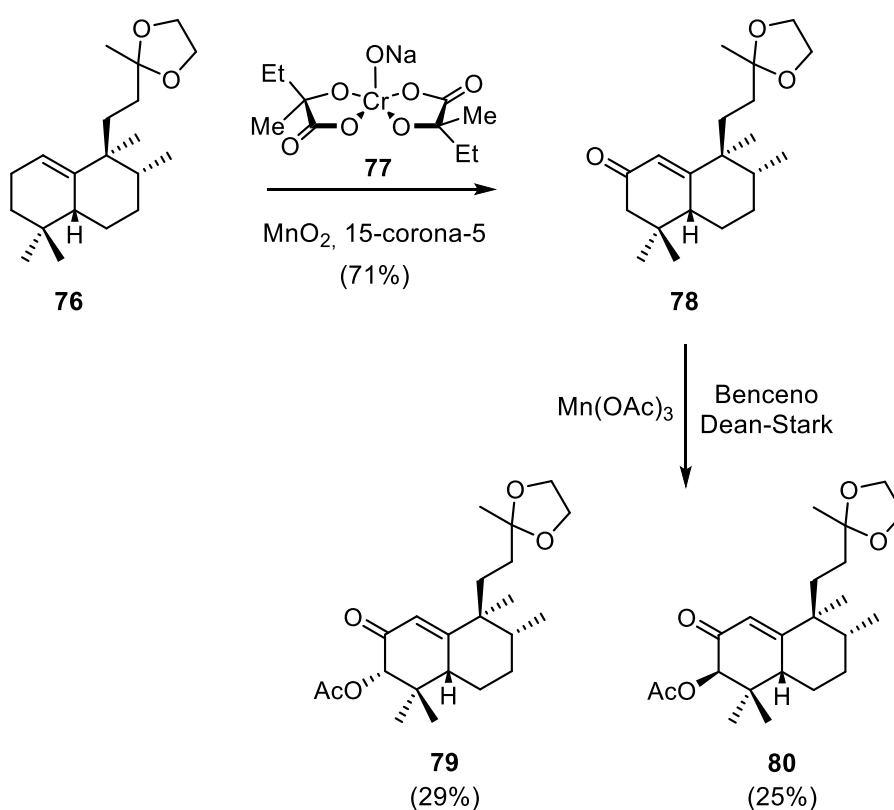
Primero, se sintetizó el complejo de Cr(V) **77** (Esquema 28) con el que se oxidará la posición alílica de **76**. La síntesis de dicho complejo se realiza por reacción de ácido 2-hidroxi-2-metilbutírico con dicromato potásico anhidro, purificándose por recristalización el producto obtenido de acuerdo al procedimiento descrito en la bibliografía.^{15,16}



Esquema 28. Preparación del complejo de Cr(V) **77**.

La síntesis de **78** a partir de **76** utilizando **77** (Esquema 29) permite unas condiciones suaves de oxidación en términos de pH en las que se respeta el dioxolano como grupo protector, obteniéndose **78** con rendimiento moderado.

El espectro de masas de **78** presenta un ión molecular con fórmula $C_{20}H_{33}O_3^+$ ($M+H^+$) 320.2335 una correspondiente a la enona deseada. En su espectro de RMN 1H aparece la señal de un hidrógeno desapantallado a 5.83 (1H, s) correspondiente a H1. En el espectro de RMN ^{13}C se observa la señal del carbono carbonílico de C2 a 199.7 ppm.



Esquema 29. Funcionalización en C3 de los 1,3-dioxolanoderivados.

Por reacción de **78** con $Mn(OAc)_3$ se obtiene con buen rendimiento la mezcla de los correspondientes acetoxiderivados en C3, **79** y **80** que se separan por cromatografía de columna. En los espectros de RMN 1H de **79** y **80**, los hidrógenos geminales a los grupos acetoxilo en C3 aparecen a 5.09 (1H, s) y 5.31 (1H, s) respectivamente.

La configuración de C3 de estos compuestos se estableció por comparación de sus espectros con los de sus análogos **81** y **82** (Figura 18) utilizados como intermedios en la

síntesis de 12-*epi-ent*-polialtenol¹³ cuya configuración se estableció por experimentos nOe y se confirmó mediante rayos X de uno de sus derivados

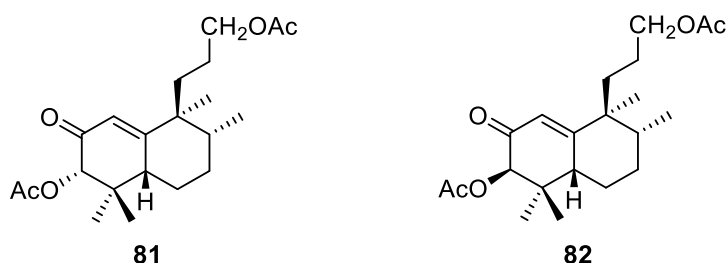
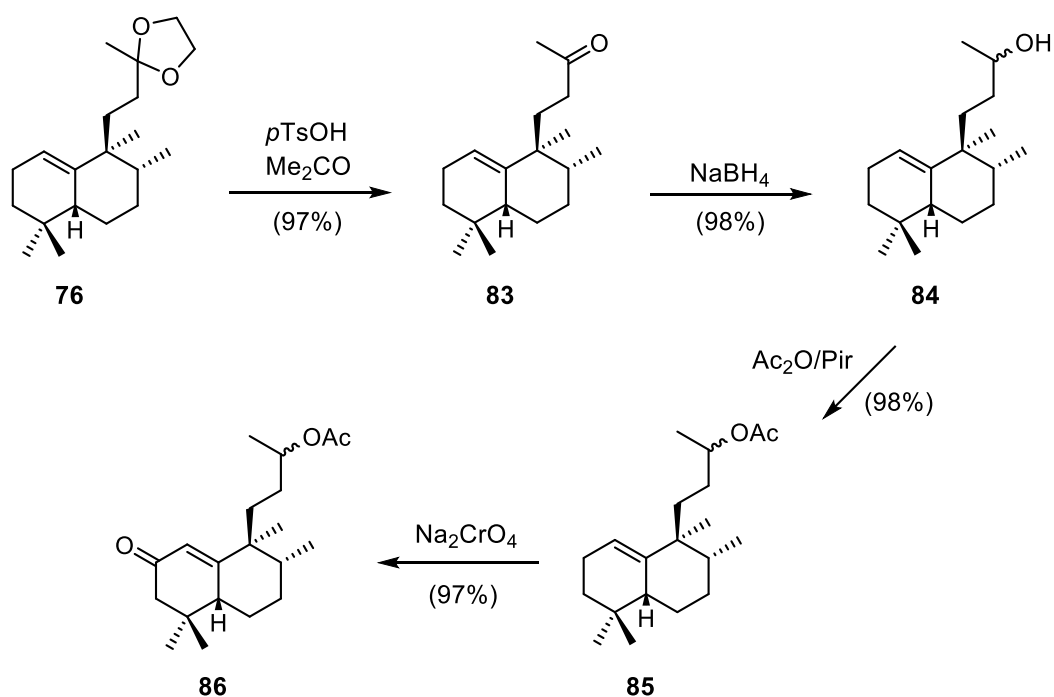


Figura 18. Estructuras de análogos funcionalizados en C3: **81** y **82**.

Las reacciones de reducción del carbonilo de C2, desoxigenación, no fueron posibles en presencia del dioxolano. Por ello, se tuvo que cambiar de estrategia sintética y primero se modifica la funcionalización de la cadena lateral, preparando una enona análoga a **78** pero con un acetato de grupo protector, **86**. (Esquema 30) Una vez sintetizada la enona **86**, se puede proceder a la funcionalización de C3.



Esquema 30. Obtención de la enona **86**.

La reacción de **76** con *p*TsOH en acetona conduce a la metilcetona **83** (Esquema 30) que en su espectro de RMN ¹H presenta la señal singulete del Me16 a 2.11 ppm.

Por reducción de **83** con NaBH₄ se obtiene cuantitativamente **84** como una mezcla de epímeros en C13. La reacción de **84** con Ac₂O en piridina proporciona los acetilderivados correspondientes **85**.

La oxidación de **85** con Na₂CrO₄ conduce a la enona **86** con buen rendimiento. En el espectro RMN ¹H de **86** aparece desapantallado el hidrógeno olefínico como un singulete a 5.82 ppm. El espectro de masas de **86** (HRMS [M+H⁺] C₂₀H₃₃O₃: 321.2421 uma) corresponde al compuesto esperado con 3 oxígenos uno de ellos del carbonilo. En el espectro de IR aparece una banda 1669 cm⁻¹ correspondiente al carbonilo conjugado y en el espectro de RMN ¹³C se observa a 199.7 ppm la señal del carbono del carbonilo en C2.

3.2. Preparación del intermedio funcionalizado en C3, 92 y 93

Desde la enona **86** se procede a la obtención de los intermedios funcionalizados en C3, que son adecuados para poder realizar en los siguientes pasos a la ruptura del anillo A del sistema bicíclico. (Esquema 31)

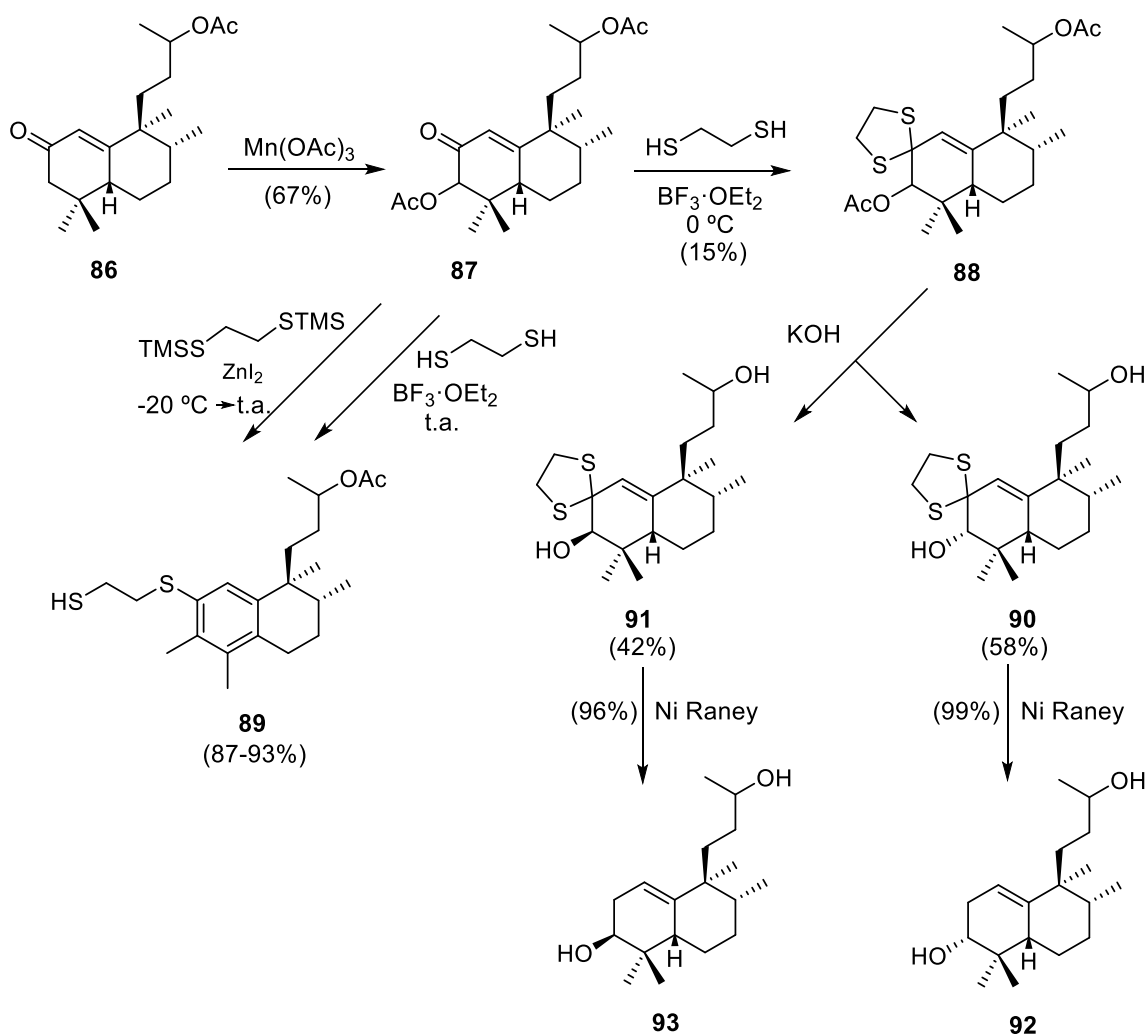
La funcionalización en C3 se lleva a cabo mediante reacción de **86** con $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ obteniéndose **87** con buen rendimiento. Los epímeros en C3 formados no pudieron separarse por cromatografía. (Esquema 31)

En el espectro de RMN ^1H de **87** aparecen las señales correspondientes a los hidrógenos geminales de sendos epímeros de los acetoxilos en C3 como señales singuletes a 5.10/5.09 y 5.31 ppm. La configuración en C3 de cada uno de ellos se estableció por comparación de dichas señales con las correspondientes homólogas de la pareja de epímeros de los tetranorderivados utilizados en la síntesis de 12-epi-*ent*-polialthenol,¹³ semejantes estructuralmente. (Figura 18)

Una vez conseguida la funcionalización de C3, (Esquema 31) para continuar el plan sintético propuesto es necesario reducir el carbonilo sobre C2. Para ello, se decidió utilizar el 1,3-ditiolano derivado **88** como intermedio. En un primer intento de formación de **88** se realizó la reacción de **87** en presencia del reactivo de Evans 1,2-bistrimetilsililetanoditiol en presencia de yoduro de zinc, tratando de evitar el siempre tedioso manejo de etanoditiol, pero en este caso lo que se obtiene con rendimiento prácticamente cuantitativo el compuesto **89**. En el espectro de RMN ^1H de **89** se observan las señales de un hidrógeno aromático a 7.27 ppm y la señal de dos metilos sobre anillo aromático a 2.43/2.42 y 2.15 ppm.

La formación de este compuesto podría explicarse mediante coordinación del ácido de Lewis con el oxígeno carbonílico, ataque del etanoditiol y eliminación de agua seguido de un proceso equivalente a un reordenamiento dienol-benceno.

Cuando la reacción de **87** se realiza con 1,2-etanoditiol en presencia de BF_3 a temperatura ambiente se obtiene de nuevo **89**. En cambio, cuando la reacción de **87** con 1,2-etanoditiol y BF_3 se realiza a 0 °C, se obtiene el ditiolano deseado **88** como una mezcla de epímeros en C3 que no pudo resolverse por cromatografía.



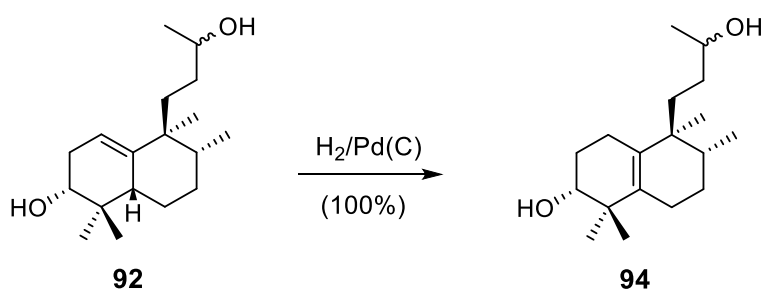
Esquema 31. Obtención de los dioles funcionalizados en C3, **92** y **93**.

La hidrólisis alcalina de **88** conduce a la mezcla de dioles **90** y **91**. En el espectro de RMN ^1H de estos compuestos aparecen a 3.62 y 3.83 ppm las señales de los hidrógenos geminales a los grupos hidroxilos de C3. La configuración de cada uno de ellos se fijó por comparación de sus espectros con los de los análogos ya mencionados anteriormente utilizados en la síntesis de 12-*epi-ent*-polialthenol. (**81** y **82**, Figura 18)

La reacción de cada uno de los ditiolanos **90** y **91** con Ni Raney proporcionó los dioles esperados **92** y **93** con excelente rendimiento. Los espectros de masas de **92** y **93** corresponden con la fórmula $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ y sus espectros de RMN ^1H con señales de hidrógenos geminales a los grupos hidroxilos en C3 a 3.38 y 3.52 ppm, respectivamente, confirman la configuración asignada a cada uno de ellos.

3.3. Síntesis del intermedio hidrogenado 97

Con cada uno de los dioles **92** y **93** se realizaron pruebas de hidrogenación catalítica del doble enlace anular. La hidrogenación catalítica de cada uno de estos compuestos (**92** y **93**) mediante reacción con H₂ en presencia de PtO₂, a presión ordinaria, no conduce a resultados positivos. Por ello, se realizaron reacciones de hidrogenación catalítica a 5 atm de presión. (Esquemas 32 y 33)

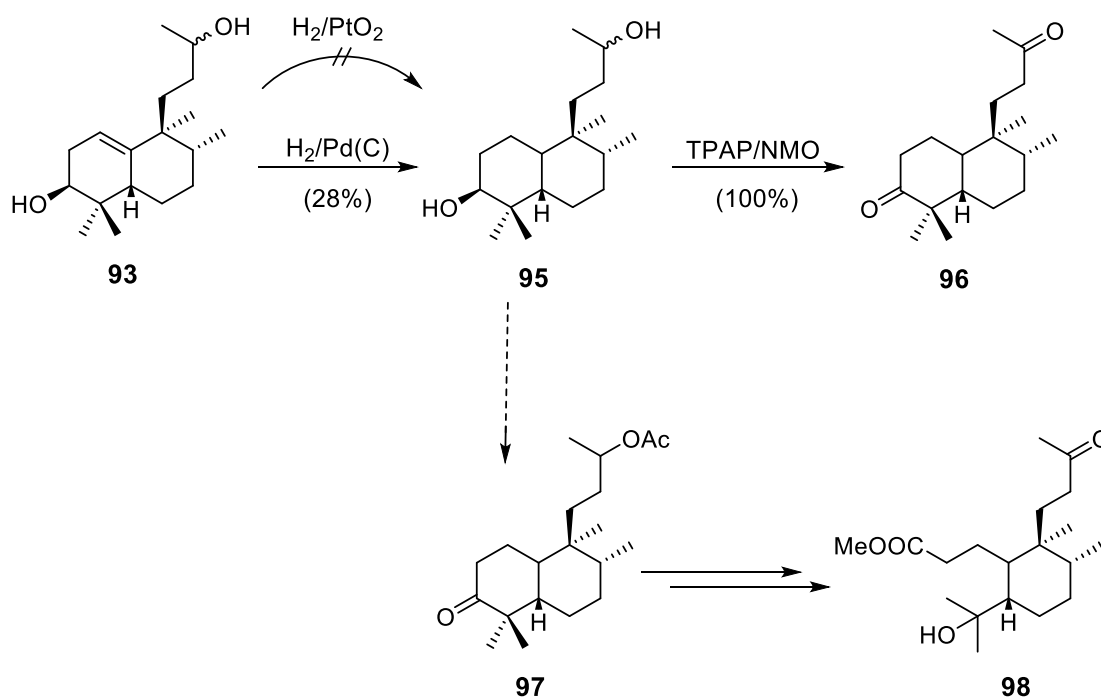


Esquema 32. Reacción de **92** con hidrógeno en presencia de Pd(C).

Sorprendentemente, por reacción de **92** con hidrógeno en presencia de Pd/C a 5 atm conduce cuantitativamente a **94**. En el espectro de RMN ¹H de **94** no se observan señales de hidrógenos olefínicos, pero en su espectro de RMN ¹³C aparecen señales de dos carbonos cuaternarios olefínicos a 136.0 y 131.5 ppm, correspondientes a un doble enlace tetrasustituido. Por lo que en lugar de producirse la hidrogenación, ha tenido lugar la isomerización del doble enlace. Dicha reacción no pudo repetirse en otras condiciones por no disponer más cantidad del diol **92**.

La reacción de **93**, en las mismas condiciones, con hidrógeno en presencia de Pd/C a 5 atmosferas conduce al esperado diol **95** con rendimiento moderado. (Esquema 33) En los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C no aparecen ni hidrógenos, ni carbonos olefínicos.

Con el fin de hacer una primera prueba de separación de los epímeros en C10 resultantes de la hidrogenación se realizó una oxidación de **95** con TPAP en presencia de NMO, obteniéndose cuantitativamente la diona **96** que resulto ser muy inestable y no se pudo conseguir su caracterización completa. Y no disponiendo de más cantidad de diol **95** no fue posible continuar la síntesis hacia el intermedio **97** y así poder proceder a la ruptura del anillo A y acceder a **98**.



Esquema 33. Reacciones con **93**.

En el futuro, disponiendo de una mayor cantidad de los dioles funcionalizados en C3 se podrá continuar con la síntesis de los productos naturales objetivo. Probablemente sea necesario, a la vista de las dificultades encontradas en el proceso de hidrogenación del doble enlace, proceder primero a la apertura del anillo A y seguidamente conseguir la reducción en C1-C10.

4. Estudios biológicos

Se han realizado estudios biológicos de los ATL sintetizados y de compuestos de esqueleto halimano que se describen a continuación.

4.1. Evaluación de ATLs como antitumorales y antileishmaniosos

4.1.1. Evaluación de ATLs como antitumorales

4.1.2. Evaluación de ATLs frente a *Leishmania major*

4.2. Evaluación de compuestos de esqueleto halimano como antiparasitarios y neurotróficos

4.2.1. Evaluación de la actividad antiparasitaria frente a *Strongyloides venezuelensis*

4.2.2. Evaluación de la actividad neurotrófica

4.1. Evaluación de ATLs como antitumorales y como antileishmaniosos

Los ensayos de ATLs para evaluar su actividad como agentes antitumorales y antileishmania los ha realizado el Dr. D. Faustino Mollinedo (CIB-CSIC, Madrid).

• Cultivo celular

La línea celular HL-60 (*human acute myeloid leukemia*) se hacen crecer en medio de cultivo RPMI-1640 con la adición de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor (10%(v/v)), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml); a una temperatura de 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ y 95% de aire. La línea celular HeLa (*human cervical carcinoma*) se crecen en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con la adición de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor (10%(v/v)), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml); a una temperatura de 37 °C en una atmósfera

humidificada con un 5% de CO₂ y 95% de aire. Las células HL-60 and HeLa proceden de *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA). Las células fueron testeadas periódicamente frente a infección por *Mycoplasma*, resultando siempre negativo.

- **Análisis del ciclo celular**

Las células tratadas y no tratadas con los compuestos a estudio ($3 \cdot 10^5$ para células animales y $1.5 \cdot 10^6$ para parásitos) se centrifugaron y fijaron durante una noche en etanol 70% a 4 °C. Después, las células se lavaron tres veces con PBS (*Phosphate buffered saline*) y se incubaron con 200 µg/mL de RNAasa y 20 µg/ml de yoduro de propidio durante 1h a temperatura ambiente. Se analizaron con un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCalibur (San José, CA) como se describe en bibliografía.^{17,18} La cuantificación de las células apoptóticas se calculó como el porcentaje de células en la región sub-G0/G1 en el análisis del ciclo celular. Los resultados se presentan como la media y el error estándar de, al menos, tres determinaciones independientes (Tablas 2, 3 y 4).

- **Cultivo de parásitos**

Las células de *Leishmania major* (Leishmaniosis cutánea, cepa 5-ASKH) se mantienen en medio difásico NNN (*rabbit blood agar + Locke's solution*) y se cultivan *in vitro* en un frasco cerrado con medio de cultivo RPMI-1640 con la adición de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor (10%(v/v)), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml); a una temperatura de 26 °C.

4.1.1. Evaluación de ATLs como antitumorales.

• Resultados y conclusiones.

Resultados de los experimentos tiempo-respuesta y dosis-respuesta de inducción de apoptosis en líneas celulares de cáncer humano por diversos análogos de miltefosina y perifosina. (Figura 19) La apoptosis se determina como el porcentaje de células en sub-G0/G1 evaluadas por citometría de flujo usando yoduro de propidio como agente de tinción del ADN. Los resultados se presentan como la media \pm SE (error estándar) de al menos tres determinaciones independientes en forma de tabla (Tablas 2 y 3 para HeLa y HL-60 respectivamente) y de forma gráfica (Figura 20, HeLa y Figura 21, HL-60).

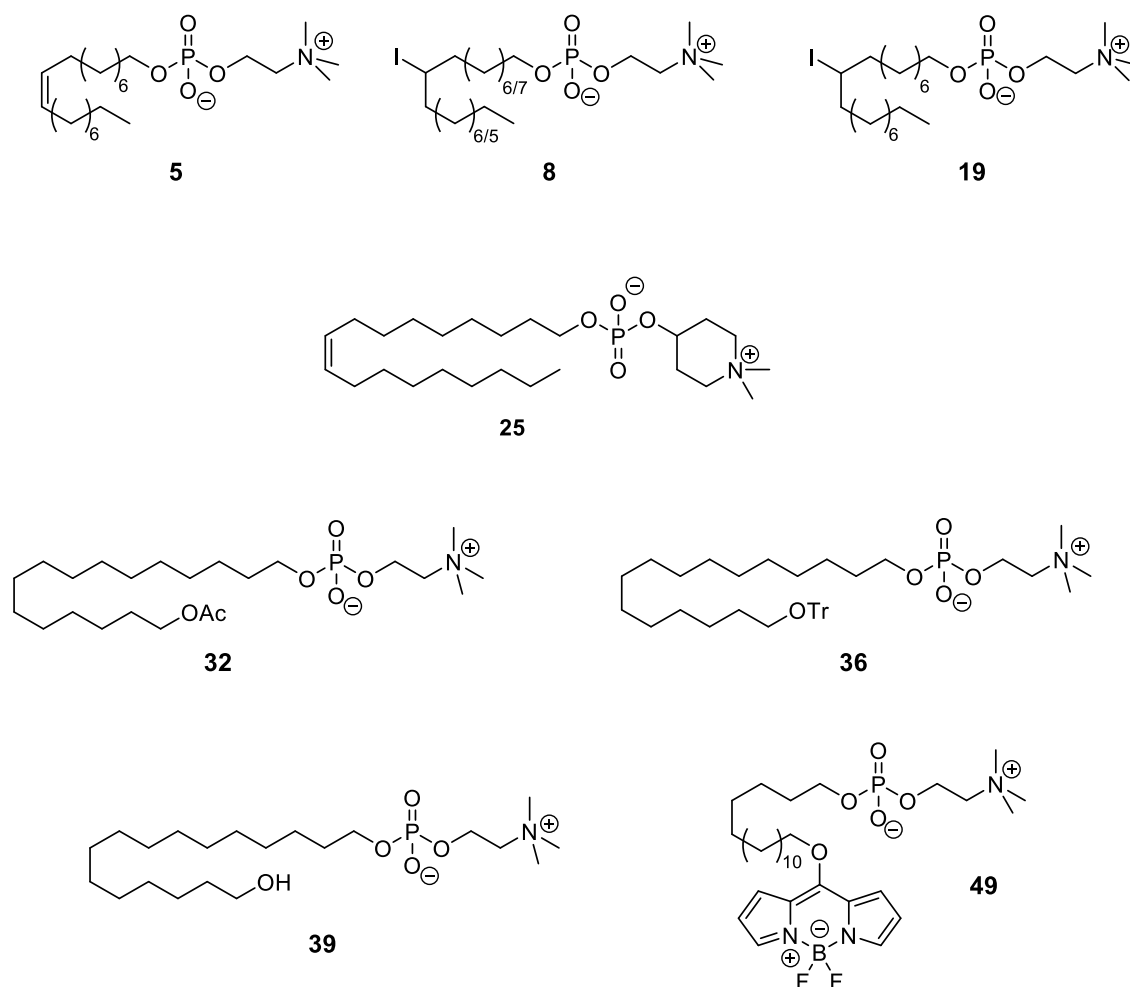


Figura 19. Alquilfosfolípidos evaluados como antitumorales (5, 8, 19, 25, 32, 36, 39 y 49).

Las moléculas evaluadas (Figura 19) cuya síntesis se ha descrito anteriormente, son análogos de miltefosina y perifosina funcionalizados en mitad de cadena con una insaturación o yoduro (**5**, **8**, **19** y **25**) o al final de cadena con diferentes funciones oxigenadas y un *O*-alquiloxi-BODIPY (**32**, **36**, **39** y **49**). De esta manera, se tienen dos cabezas polares diferentes: fosfocolina (análogos de miltefosina) y fosfodimetilpiperidinio (análogos de perifosina) además de funciones en mitad y final de la cadena lipídica.

Los análogos fluorescentes, como **49**, tienen especial interés ya que podrán aportar información sobre la capacidad y regiones de incorporación de estos ATLs.

Los análogos con función al final de cadena **32**, **36**, **39** y **49** no han mostrado gran actividad antitumoral, aunque sí parece haber un ligero incremento en el secuestro de la fase celular sub-G0/G1 de las células tumorales para 72 h de incubación y concentraciones más elevadas: 20 μ M y 30 μ M. La carencia de actividad antitumoral cuando la molécula presenta estos grupos polares al final de cadena, puede disminuir el carácter anfifílico del fosfolípido perdiendo una interacción adecuada con la membrana celular. No obstante, el derivado fluorescente de miltefosina **49** a pesar de no presentar una destacable actividad como antitumoral, debido a sus excelentes propiedades fluorescentes, podría ser de interés para observar su incorporación a la célula y observar la selectividad en la incorporación en las células tumorales frente a las células sanas. Para este propósito se realizarán estudios de microscopía de fluorescencia.

Los mejores resultados de actividad antitumoral los muestra el análogo de perifosina **25**, (Figura 21) donde la cadena lipídica del alcohol oleico se encuentra esterificada a la cabeza polar de fosfodimetilpiperidinio. Mientras que la actividad antitumoral de este análogo **25** en HeLa es baja y solo empieza a observarse en altas concentraciones y tiempos de incubación, la actividad antitumoral de este análogo en la línea HL-60 es comparable a la de la miltefosina, único ATL antitumoral y antileishmanioso de uso clínico. El análogo **25** en HL-60 presenta a igual concentración, un mayor % de células arrestadas en fase sub G0/G1 que miltefosina a partir de las 48 h de incubación.

Mientras que el análogo **25** presenta esta potente actividad antitumoral, el derivado insaturado análogo de miltefosina **5**, no presenta actividad en ninguna de las líneas celulares. De esta manera, será interesante incrementar el número de análogos con cabeza polar de fosfodimetilpiperidinio frente a la de fosfocolina y terminar de establecer si es definitivamente más ventajoso sintetizar análogos de perifosina frente a análogos de miltefosina para lograr mejores actividades como antitumorales.

Los derivados de miltefosina con función en mitad de la cadena lipídica: el análogo insaturado **5** y los yodados **8** y **19** no presentan en ningún caso actividad antitumoral.

Las diferencias en actividad en la línea de HL-60 respecto de HeLa, especialmente destacables en **25**, indican que la respuesta farmacológica es específica del tipo celular; lo que puede venir dada por un lipodoma diferente, que variará según el tejido y la línea celular.

La falta de actividad de los análogos de miltefosina como **5**, **8** y **19** podría ser debido a que no se incorporan adecuadamente en la membrana celular o citosol.

Las representaciones gráficas (Figura 20 y 21) se han realizado a partir de los datos de las Tablas 2 y 3, que se presentan a continuación de los diagramas de barras. Únicamente se ha representado el Control, las referencias y el análogo de perifosina **25**, que es el único con actividad antitumoral destacable y comparable a los ATLs de referencia. Los valores en el gráfico de 100% corresponden a los datos de la tabla de >90, asignado de esta manera a fin de observarlos gráficamente y representando de esta manera la saturación del equipo de medida en la citometría.

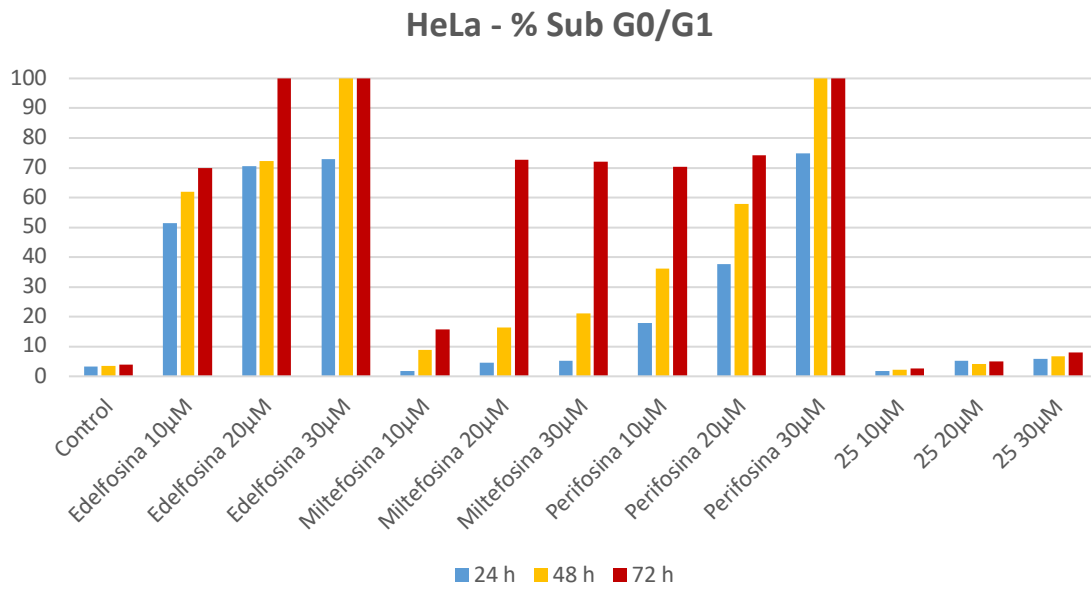


Figura 20. Representación gráfica del % Sub G0/G1 de células HeLa. Se representa el Control, y los resultados de incubar en presencia de los ATLs de referencia (Edelfosina, Miltefosina y Perifosina) y el análogo de perifosina **25**.

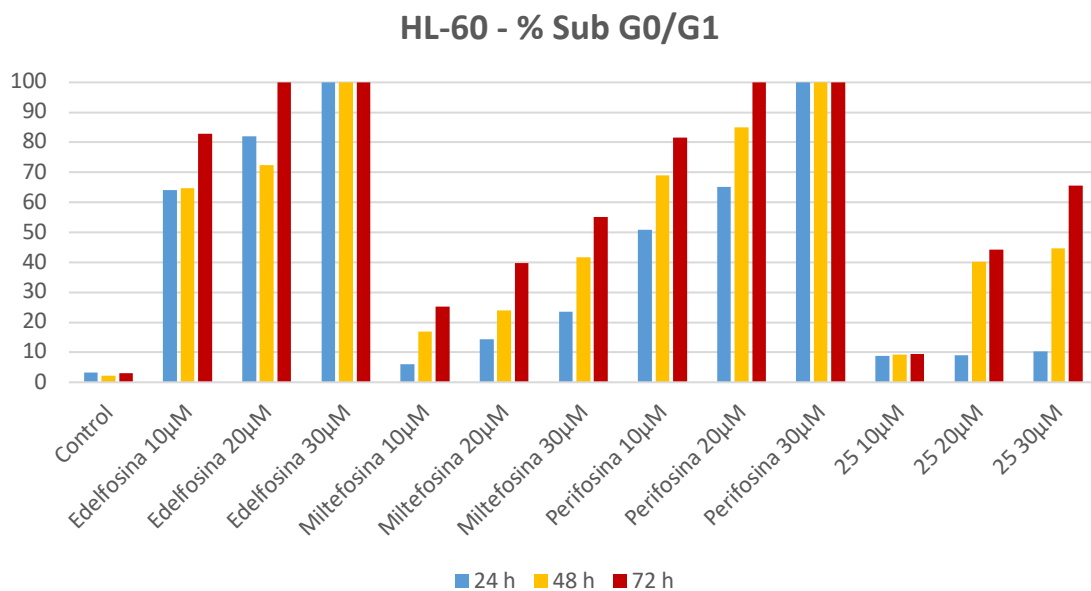


Figura 21. Representación gráfica del % Sub G0/G1 de células HL-60. Se representa el Control, y los resultados de incubar en presencia de los ATLs de referencia (Edelfosina, Miltefosina y Perifosina) y el análogo de perifosina **25**.

Tabla 2. Tabla 3. Resultados de inducción de apoptosis en HeLa de los derivados de miltefosina y perifosina sintetizados en este trabajo. Los resultados se muestran como la media \pm SD calculada a partir de, al menos, tres medidas independientes.

Entrada	Condiciones	% Sub G0/G1		
		24 h	48 h	72 h
1	Control	3.25 \pm 1.14	3.55 \pm 0.66	3.83 \pm 0.71
2	10 μ M	51.45 \pm 1.54	62.02 \pm 17.98	69.91 \pm 10.10
3	Edelfosina 20 μ M	70.60 \pm 1.66	72.36 \pm 9.26	>90
4	30 μ M	72.94 \pm 4.37	>90	>90
5	10 μ M	1.87 \pm 0.36	8.96 \pm 1.04	15.68 \pm 0.89
6	Miltefosina 20 μ M	4.66 \pm 1.99	16.32 \pm 1.85	42.14 \pm 1.12
7	30 μ M	5.26 \pm 0.55	21.13 \pm 2.66	72.77 \pm 3.69
8	10 μ M	17.96 \pm 3.49	36.15 \pm 14.67	70.40 \pm 19.61
9	Perifosina 20 μ M	37.70 \pm 1.28	57.88 \pm 3.97	74.18 \pm 15.8
10	30 μ M	74.81 \pm 0.48	>90	>90
11	10 μ M	1.75 \pm 0.19	2.07 \pm 0.26	2.85 \pm 0.25
12	5 20 μ M	2.49 \pm 0.26	4.74 \pm 0.36	6.21 \pm 0.42
13	30 μ M	2.38 \pm 0.34	4.81 \pm 0.31	4.54 \pm 0.61
14	10 μ M	1.57 \pm 0.24	3.24 \pm 0.39	3.17 \pm 0.47
15	19 20 μ M	2.26 \pm 0.37	2.78 \pm 0.57	6.40 \pm 1.12
16	30 μ M	2.81 \pm 0.25	3.57 \pm 0.34	5.27 \pm 0.74
17	10 μ M	1,81 \pm 0.21	2.11 \pm 0.68	2.74 \pm 1.02
18	25 20 μ M	5.21 \pm 0.36	4.15 \pm 0.67	4.87 \pm 0.98
19	30 μ M	5.85 \pm 1.34	6.74 \pm 1.47	8.04 \pm 1.24
20	10 μ M	2.59 \pm 0.69	2.68 \pm 0.34	3.83 \pm 1.12
21	32 20 μ M	3.77 \pm 0.47	2.56 \pm 0.26	4.19 \pm 0.78
22	30 μ M	2.21 \pm 0.26	2.17 \pm 0.19	3.98 \pm 0.93
23	10 μ M	2.04 \pm 0.42	2.36 \pm 0.35	3.19 \pm 1.38
24	36 20 μ M	2.34 \pm 0.23	2.15 \pm 1.38	3.63 \pm 0.93
25	30 μ M	2.18 \pm 0.34	2.09 \pm 0.27	5.40 \pm 0.83
26	10 μ M	2.58 \pm 0.53	2.60 \pm 0.15	3.84 \pm 1.40
27	39 20 μ M	3.77 \pm 0.28	2.61 \pm 1.22	7.23 \pm 3.13
28	30 μ M	2.49 \pm 0.20	2.03 \pm 0.17	4.74 \pm 1.02
29	10 μ M	4.41 \pm 0.50	2.20 \pm 0.61	5.02 \pm 0.38
30	49 20 μ M	4.58 \pm 0.93	5.61 \pm 0.32	5.17 \pm 0.76
31	30 μ M	4.81 \pm 0.33	5.69 \pm 0.74	4.76 \pm 1.43

Tabla 3. Resultados de inducción de apoptosis en HL-60 de los derivados de miltefosina y perifosina sintetizados en este trabajo. Los resultados se muestran como la media \pm SD calculada a partir de, al menos, tres medidas independientes.

Entrada	Condiciones	% Sub G0/G1		
		24 h	48 h	72 h
1	Control	3.20 \pm 0.47	2,21 \pm 0.37	3.14 \pm 1.28
2	10 μ M	64.05 \pm 9.37	64.80 \pm 18.77	82.93 \pm 1.61
3	Edelfosina 20 μ M	82.12 \pm 3.12	72.34 \pm 17.95	>90
4	30 μ M	>90	>90	>90
5	10 μ M	6.06 \pm 0.25	16.81 \pm 0.18	25.28 \pm 0.54
6	Miltefosina 20 μ M	14.30 \pm 0.82	23.92 \pm 4.04	39.68 \pm 1.98
7	30 μ M	23.55 \pm 1.35	41.68 \pm 0.88	55.15 \pm 0.43
8	10 μ M	50.77 \pm 1.40	69.08 \pm 0.92	81.54 \pm 1.11
9	Perifosina 20 μ M	65.07 \pm 2.25	85.06 \pm 0.34	>90
10	30 μ M	>90	>90	>90
11	10 μ M	3.30 \pm 0.38	2.70 \pm 0.29	1.90 \pm 0.27
12	5 20 μ M	3.70 \pm 0.37	3.60 \pm 0.38	3.70 \pm 0.36
13	30 μ M	3.80 \pm 0.48	4.30 \pm 0.52	6.30 \pm 0.54
14	10 μ M	2.10 \pm 0.26	2.50 \pm 0.29	2.50 \pm 0.27
15	8 20 μ M	2.90 \pm 0.25	3.90 \pm 0.35	3.70 \pm 0.28
16	30 μ M	3.40 \pm 0.28	4.10 \pm 0.38	5.90 \pm 0.31
17	10 μ M	2.60 \pm 0.41	1.80 \pm 0.25	3.10 \pm 0.29
18	19 20 μ M	2.50 \pm 0.37	1.80 \pm 0.26	3.90 \pm 0.42
19	30 μ M	2.70 \pm 0.36	2.10 \pm 0.31	5.50 \pm 0.48
20	10 μ M	8.90 \pm 0.92	9.30 \pm 0.99	9.50 \pm 1.01
21	25 20 μ M	9.10 \pm 0.88	40.10 \pm 3.91	40.30 \pm 3.72
22	30 μ M	10.20 \pm 0.98	44.70 \pm 1.10	55.50 \pm 0.30
23	10 μ M	3.75 \pm 0.71	1.72 \pm 0.32	1.97 \pm 0.03
24	32 20 μ M	3.61 \pm 0.87	1.39 \pm 0.29	2.31 \pm 0.24
25	30 μ M	3.28 \pm 0.99	1.45 \pm 0.37	2.52 \pm 0.23
26	10 μ M	2.88 \pm 0.61	2.01 \pm 0.72	2.81 \pm 0.23
27	36 20 μ M	3.23 \pm 0.37	1.82 \pm 0.77	2.98 \pm 0.34
28	30 μ M	3.31 \pm 0.69	1.05 \pm 0.86	2.50 \pm 0.21
29	10 μ M	2.65 \pm 0.32	2.63 \pm 0.67	2.41 \pm 0.92
30	39 20 μ M	2.17 \pm 0.54	2.05 \pm 0.41	2.85 \pm 0.78
31	30 μ M	3.21 \pm 0.73	1.82 \pm 0.09	3.15 \pm 0.20
32	10 μ M	2.11 \pm 0.1	2.06 \pm 0.01	3.16 \pm 0.03
33	49 20 μ M	2.26 \pm 0.18	2.36 \pm 0.27	4.11 \pm 0.46
34	30 μ M	2.91 \pm 0.42	2.04 \pm 0.16	5.57 \pm 0.34

4.2.2. Evaluación de ATIs frente a *Leishmania major*

• **Resultados y conclusiones.**

El análogo de perifosina **25** presenta actividad frente a *Leishmania major* secuestrando a las células del protozoo en fase sub G0/G1 e impidiendo su replicación incrementando el conteo de células que se encuentran en esta fase frente al control para cualquiera de las concentraciones ensayadas (Tabla 4, entradas 8-11).

Tabla 4. Tabla de resultados de la citometría donde se recoge el % de células en fase G0/G1 de *Leishmania major*. Los resultados se muestran como la media \pm SD calculada a partir de, al menos, tres medidas independientes.

Entrada	Condiciones	% Sub G0/G1
1	Control	3.82 \pm 0.82
2	10 μ M	10.50 \pm 1.95
3	Edelfosina 20 μ M	38.78 \pm 6.81
4	30 μ M	57.44 \pm 9.12
5	10 μ M	5.94 \pm 2.33
6	Miltefosina 20 μ M	4.56 \pm 1.21
7	30 μ M	6.70 \pm 1.61
8	10 μ M	5.71 \pm 0.57
9	25 20 μ M	12.90 \pm 0.66
10	30 μ M	21.17 \pm 0.49
11	50 μ M	34.88 \pm 0.92

En la representación gráfica de los resultados (Figura 22 y 23) se puede observar que aumentando la dosis de **25**, se produce un incremento de la cantidad de células que se encuentran en fase sub G0/G1, teniendo una relación directamente proporcional dosis.

Junto con estos resultados cuantitativos, las observaciones con microscopio de los cultivos celulares han permitido observar que la administración de **25** va asociada a un descenso de la motilidad y disgregación de los conglomerados celulares de *L. major in vitro*. Se continuará estudiando este análogo, completando su evaluación frente a otras especies de *Leishmania*.

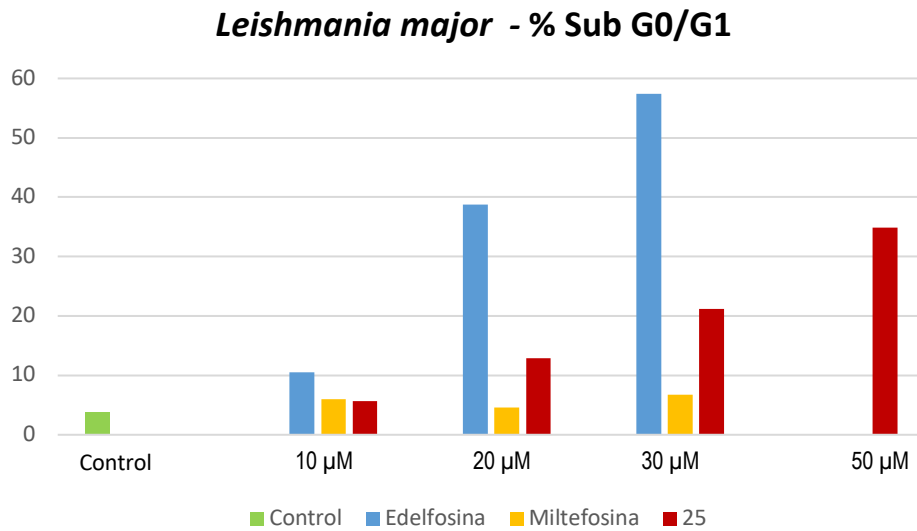


Figura 22. Representación gráfica de los datos recogidos en la Tabla 4. Se representa el control y los resultados obtenidos para la incubación con las referencias (edelfosina y miltefosina) a concentraciones de 10, 20 y 30 μM y el análogo de perifosina **25** a concentraciones de 10, 20, 30 y 50 μM .

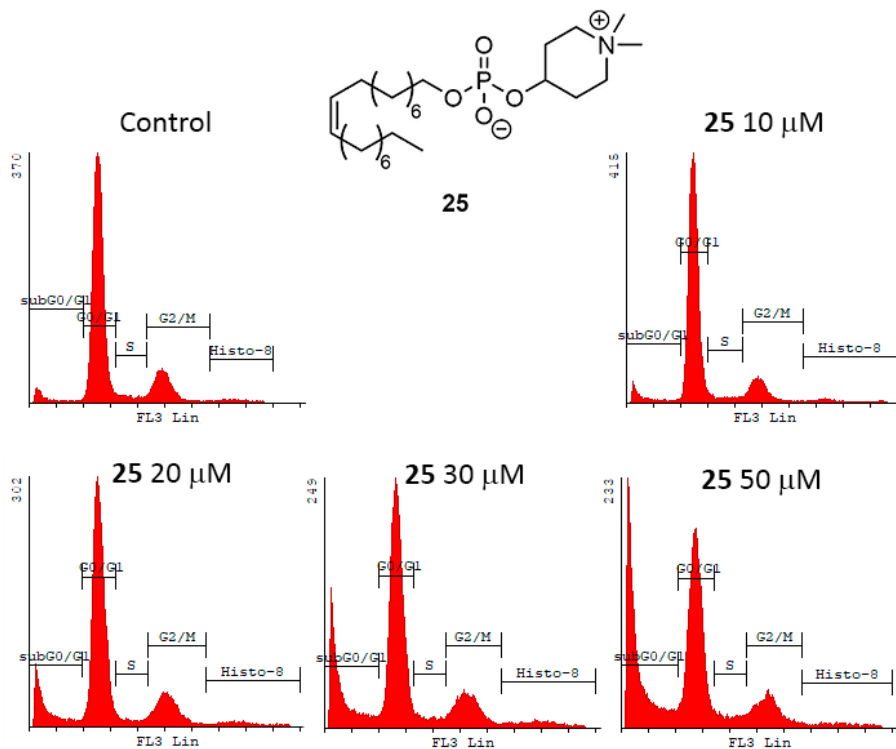


Figura 23. Histogramas del ciclo celular de control y cultivos de **25** a diferentes concentraciones.

4.2. Evaluación biológica de compuestos de esqueleto halimano

4.2.1. Evaluación de la actividad antiparasitaria frente a *Strongyloides venezuelensis*

Se ha realizado un estudio de la actividad antiparasitaria frente a *Strongyloides venezuelensis* de los compuestos de esqueleto halimano **54-59**. (Figura 24)

Para estudiar el potencial como nematocida se utilizaron larvas infectivas de tercer estadio (L3) de *Strongyloides venezuelensis*. Estas L3 se trataban con distintas concentraciones de los compuestos y se estudiaba la viabilidad por observación microscópica.¹⁹

Para el mantenimiento del ciclo de *S. venezuelensis* se usan ratas Wistar macho de 60 y 120 g procedentes del Servicio de Experimentación Animal (USAL) donde se alojan en jaulas de policarbonato y alambre donde disponen de libre acceso a comida y agua bajo condiciones controladas de luz (12 h luz/12 h oscuridad) y temperatura (23-27 °C). La cepa de *S. venezuelensis* procede de la Universidad Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil y se mantiene en el laboratorio de Parasitología (Facultad de Farmacia, USAL) mediante pases en ratas Wistar. Los procedimientos con animales están de acuerdo con la normativa europea y española (Di 2010/63/CE) y (L32/2007, L6/2013, RD53/2013) sobre experimentación con animales. El comité de ética de la Universidad de Salamanca aprobó los procedimientos (ref 335) que han sido utilizados en este estudio.

Las ratas Wistar se infectaron mediante vía subcutánea con 6000 L3 en 0.5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las ratas se colocan en rejillas sobre papel absorbente húmedo y limpio, y se les deja defecar. Las muestras individuales de heces se recolectaron y se cultivaron en botes de plástico de 250 ml con vermiculita y agua de modo que estuvieran a 28 °C, con humedad de más del 80 % y se permitiera buena oxigenación de la mezcla. Las L3 se obtenían de coprocultivos de 3 a 4 días utilizando el aparato de Baermann. Los coprocultivos se envolvían en 8 capas de gasa y se ponían en el aparato de Baermann, que contenía agua a 42 °C. Tras 45 minutos las

larvas se habían depositado en el fondo del tubo de ensayo tras desplazarse del coprocultivo al agua estimuladas por la temperatura del agua y la luz de una lámpara fría de 550 Lm.

Las larvas L3 se descontaminaron de acuerdo con la técnica descrita por Martins *et al.*²⁰ Las larvas L3 obtenidas se lavan seis veces, 20 min cada lavado, con agua destilada. La ausencia de contaminación bacteriana se confirmó por cultivo de las larvas de cada lote en una placa Petri en medio de agar sangre a 28 °C durante 24 horas. Las larvas se dispensaban a razón de 100 L3 por pocillo en placas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos. Tras tres horas de adaptación se añadían los compuestos por triplicado en concentraciones de 1 µM y 20 µM para tener una idea del potencial de cada uno de estos compuestos para inmovilizar L3. Después se observaba la motilidad a las 24, 48 y 72 h y se establecía el porcentaje de larvas móviles. En cada tiempo se iluminaban los pocillos durante 2 minutos con luz del sol y se observaban en un microscopio (CK2, Olympus). Las larvas se consideraban muertas cuando no se detectaban movimientos durante un minuto. Se utilizaron como testigo L3 en agua con 1% de DMSO que permanecían móviles durante el experimento y L3 tratadas con ivermectina 10 µM. Cada condición se repetía al menos en tres tiempos diferentes. En caso de observarse actividad contra las L3 en alguna de las condiciones se hacía una escala de 1, 10, 20, 40 100 µM para determinar la concentración que inmoviliza al 50% de las L3.

• Tratamiento de datos

Los resultados se expresan como medias y errores estándar de la media. Para buscar diferencias entre grupos se aplica ANOVA de una vía y en caso de encontrar diferencias significativas ($p < 0.01$) se aplica la prueba estadística de Tukey para determinar entre qué grupos se encuentra.

• **Resultados y conclusiones**

Los compuestos **54-59** (Figura 24) no tienen actividad frente a las L3 de *S. venezuelensis*.

Como se puede observar en los resultados obtenidos, (Tabla 5 y Figura 25) no hay diferencias entre los compuestos evaluados **54-59** a ninguna concentración y el cultivo de L3 en agua con 1% de DMSO, no reduciendo para ninguno de los casos el % de supervivencia de las larvas de *S. venezuelensis* en fase L3.

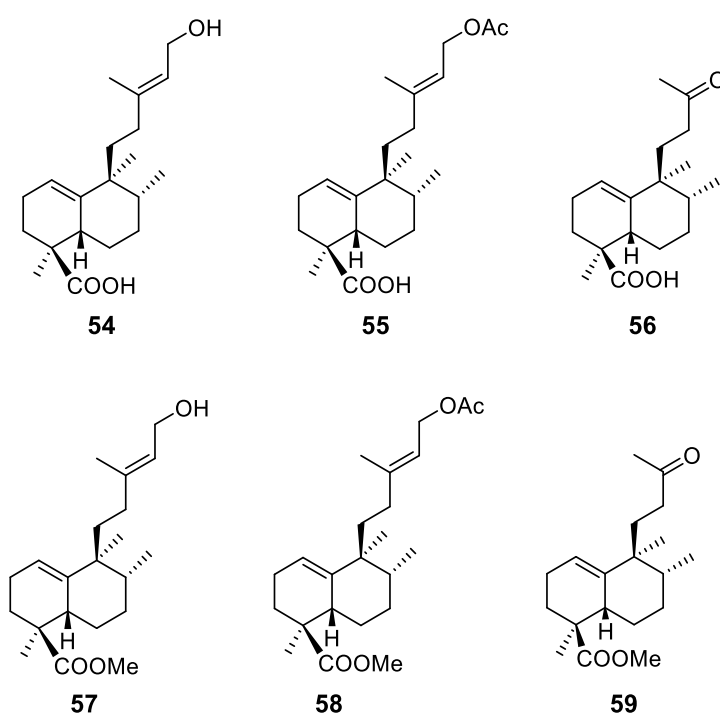


Figura 24. Compuestos con esqueleto halimano (**54-59**) evaluados como antiparasitarios frente a L3 de *S. venezuelensis*.

Tabla 5. Medias de % de muerte (\pm error estándar) para control (agua destilada), DMSO 1%, Ivermectina (IV, control positivo y referencia) y ensayos a dos concentraciones para cada uno de los compuestos evaluados **54-59** medidos a 0, 24, 48 y 72 h.

Entrada	Condiciones	% Muerte				
		Media 0h	Media 24h	Media 48h	Media 72h	
1	Agua destilada	0.0	5.3 \pm 1.8	6.4 \pm 2.6	9.1 \pm 2.9	
2	DMSO 1%	0.0	5.3 \pm 2.0	7.3 \pm 1.9	9.2 \pm 3.3	
3	IV 10 μ L	0.0	77.7 \pm 6.9	94.8 \pm 1.8	95.5 \pm 1.4	
4	54	05 μ M	0.0	3.0 \pm 2.1	8.6 \pm 1.9	8.4 \pm 2.5
5		20 μ M	0.0	3.7 \pm 1.3	6,3 \pm 2.1	7.6 \pm 2.8
6	55	05 μ M	0.0	6.6 \pm 3.0	5.8 \pm 2.6	9.9 \pm 2.9
7		20 μ M	0.0	4.9 \pm 2.8	6.2 \pm 3.1	9.2 \pm 2.8
8	56	05 μ M	0.0	5.7 \pm 1.9	6.4 \pm 2.5	10.1 \pm 3.0
9		20 μ M	0.0	6.7 \pm 1.5	5.7 \pm 2.9	10.4 \pm 1.2
10	57	05 μ M	0.0	4.9 \pm 2.9	6.6 \pm 3.0	11.3 \pm 2.5
11		20 μ M	0.0	5.7 \pm 2.5	7.9 \pm 1.8	7.2 \pm 2.9
12	58	05 μ M	0.0	6.1 \pm 2.0	7.8 \pm 1.9	12.2 \pm 1.1
13		20 μ M	0.0	7.1 \pm 2.6	7.9 \pm 2.4	11.8 \pm 2.6
14	59	05 μ M	0.0	4.4 \pm 1.8	7.5 \pm 3.1	7.9 \pm 1.5
15		20 μ M	0.0	6.1 \pm 1.6	7.6 \pm 3.0	6.6 \pm 2.8

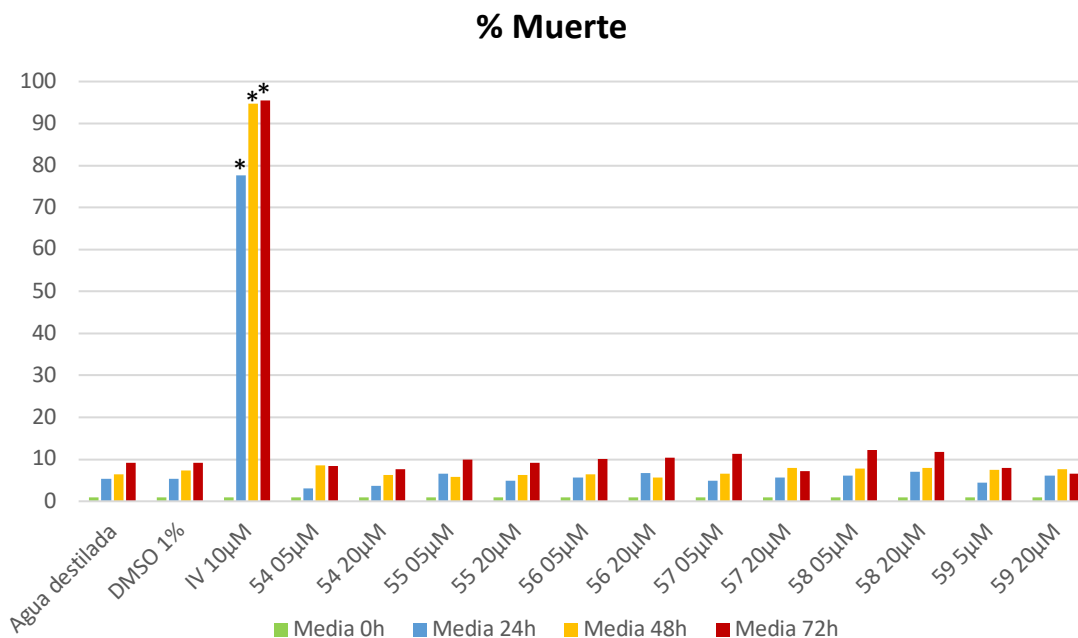


Figura 25. Se muestran los valores de la media del % de supervivencia para tiempos de incubación 0 h, 24 h, 48 h y 72 h para: agua destilada, agua destilada y DMSO 1%, Ivermectina (IV) 10 μ M y **54-59**. *Diferencias significativas $p < 0.01$ comparado con L3 cultivadas en agua con DMSO 1%.

4.2.2. Evaluación de la actividad neurotrófica

El modelo neuronal más utilizado para realizar este tipo de ensayos es el cultivo de células PC12 que sin duda son el primer modelo de elección para el estudio de diferenciación neuronal.²¹ Cuando se tratan células PC12 con concentraciones nanomolares de NGF (*Nerve Growth Factor*) dichas células paran su división, iniciando un corto proceso de crecimiento de la neurita en los 2 primeros días de tratamiento, elongando significativamente en 7 días con brotes (ramificaciones) y formando conexiones sinápticas entre las neuritas que, con el tiempo, llegan a ser eléctricamente excitables. Los efectos de las NGF en las PC12 modelo pueden evaluarse convenientemente utilizando la dimensión fractal (D_f), un parámetro adecuado que refleja una elongación del crecimiento de la neurita dosis-dependiente.

Se ha comprobado que algunos compuestos naturales procedentes de diferentes procedencias biogénicas (flavonoides, fenilbutanoides, etc) presentan actividad en este campo. Recientemente se ha encontrado una familia de compuestos MCAs que interconectan con células neuronales y operan como farmacóforos para nuevos compuestos neurotróficos cabeza de serie. Dichos fragmentos MCAs pueden observarse frecuentemente en esqueletos de diferentes compuestos de origen natural como terpenoides y alcaloides.

En este proyecto se pretende, en primer lugar, llevar a cabo la evaluación de la actividad neurotrófica de compuestos de esqueleto halimano de fácil acceso a partir de ácido *ent*-halímico **54** que contienen el fragmento MCA.

- **Metodología para la evaluación de la diferenciación de PC12 en respuesta a diferentes compuestos.**

La evaluación biológica se realiza utilizando células P12 siguiendo el siguiente protocolo: *Día 1*: Colocar 5000 células/pocillo en una placa de 12 pocillos recubierta de colágeno en medio DMEM + 10% Suero caballo + 5% suero bovino fetal + 1 mM Glutamina + Pen/Strep. *Día 2*: 1- Cambio a medios reducidos en suero (1% HS y 0,5% FBS) y 2- Añadir los compuestos (concentración final 10 μ M), NGF (50 ng/ml) o DMSO

(1%). *Día 4:* Hacer 3-5 fotos de cada pocillo. *Día 7:* Hacer 3-5 fotos de cada pocillo. Finalmente, se puede cuantificar el % de diferenciación con respecto al de NGF.

• **Resultados y conclusiones**

Las micrografías obtenidas al tercer día se muestran en la Figura 27. Como se puede observar, las células donde se ha cultivado en presencia de **54-64** (Figura 26) no presentan diferencias respecto del control (C-). A diferencia de cuando se encuentra NGF en el medio, que las células han sufrido un proceso de diferenciación y crecimiento de las neuritas, los compuestos **54-64** no presentan actividad neurotrófica.

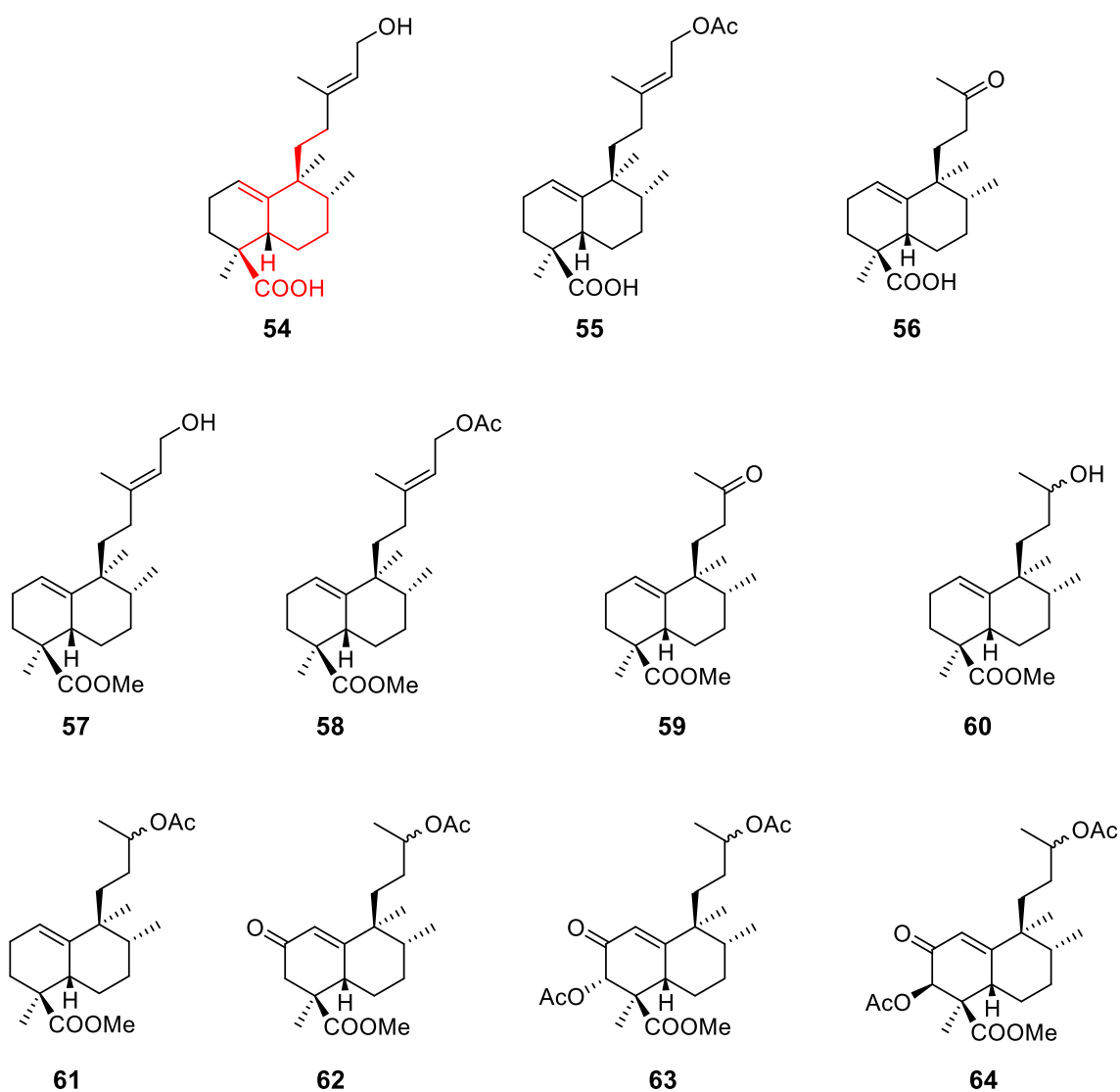


Figura 26. Moléculas evaluadas como neurotróficos **54-64**.

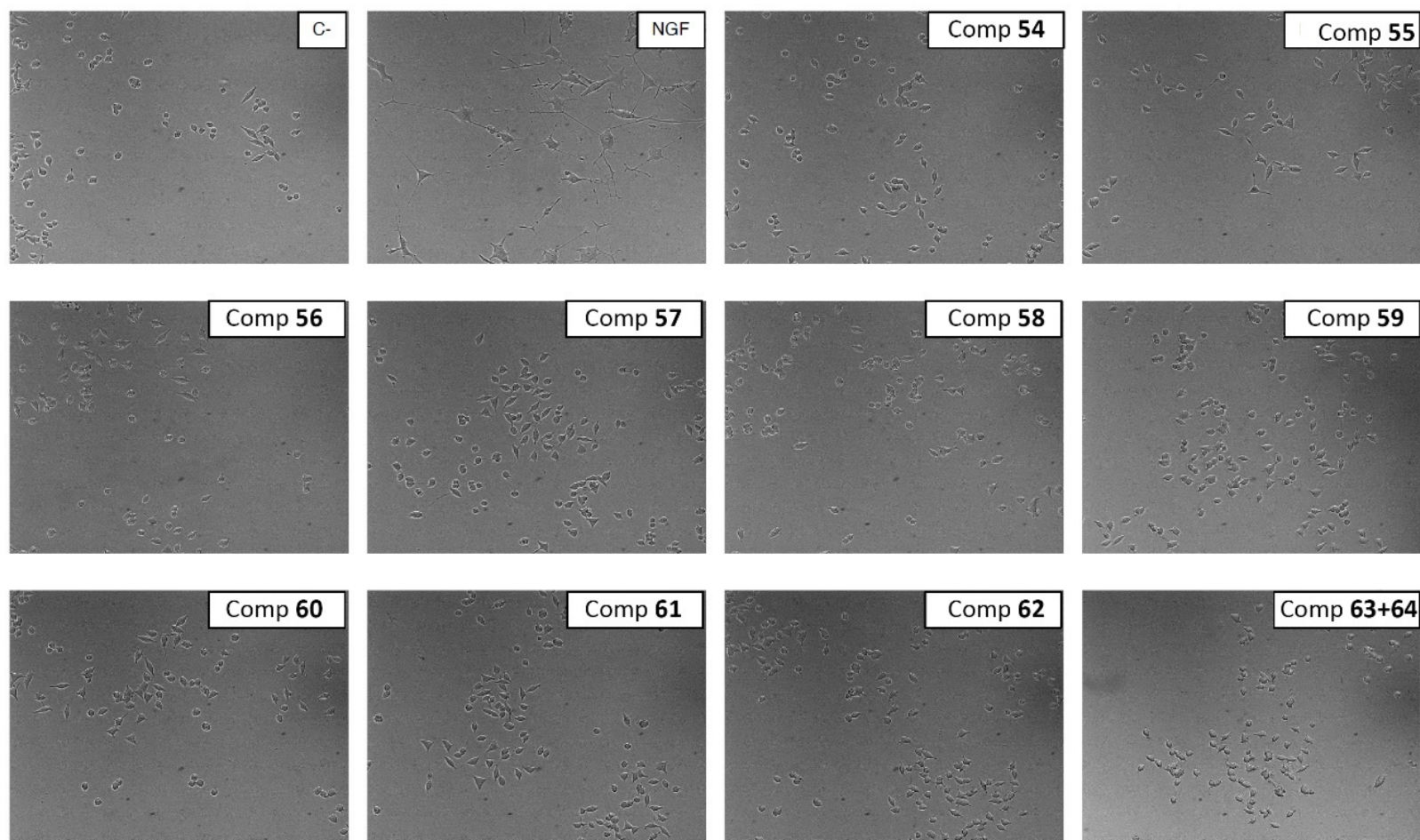
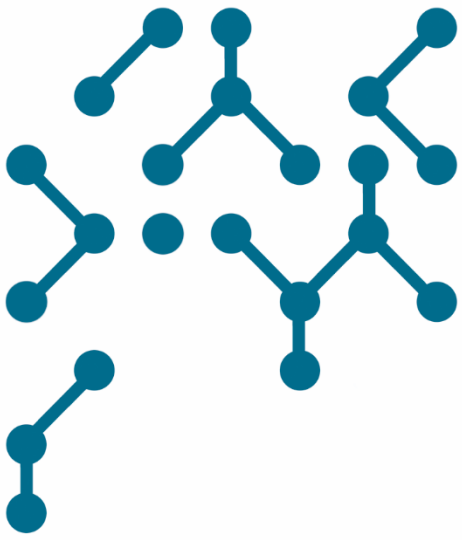


Figura 27. Células PC12 estimuladas durante 3 días. C-, control 1 μ l DMSO. NGF, cultivo con Nerve Growth Factor. Cultivado en presencia de compuesto 10 μ M en 1 μ l DMSO.

5. Bibliografía de *Discusión de resultados*

- 1 Huang, Z.; Szoka, F. C., Jr., Sterol-modified phospholipids: cholesterol and phospholipid chimeras with improved biomembrane properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15702.
- 2 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.
- 3 Mravljak, J.; Zeisig, R.; Pecar, S., Synthesis and biological evaluation of spin-labeled alkylphospholipid analogs. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6393.
- 4 van der LUIT, A. H.; BUDDE, M.; VERHEIJ, M.; van BLITTERSWIJK, W. J., Different modes of internalization of apoptotic alkyl-lysophospholipid and cell-rescuing lysophosphatidylcholine. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 747.
- 5 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.
- 6 Flores-Rizo, J. O.; Esnal, I.; Osorio-Martínez, C. A.; Gómez-Durán, C. F. A.; Bañuelos, J.; López Arbeloa, I.; Pannell, K. H.; Metta-Magaña, A. J.; Peña-Cabrera, E., 8-Alkoxy- and 8-aryloxy-BODIPYs: straightforward fluorescent tagging of alcohols and phenols. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5867.
- 7 Tobal, I. E.; Roncero, A. M.; Moro, R. F.; Díez, D.; Marcos, I. S., The methylene-cycloalkylacetate (MCA) scaffold in terpenyl compounds with potential pharmacological activities. *Molecules* **2019**, *24*, 2120.
- 8 Basabe, P.; Delgado, S.; Marcos, I. S.; Díez, D.; Diego, A.; De Román, M.; Urones, J. G., Synthesis of three marine natural sesterterpenolides from methyl isoanticopalate. First enantioselective synthesis of Luffolide. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9480.
- 9 Marcos, I. S.; Pedrero, A. B.; Sexmero, M. J.; Díez, D.; Basabe, P.; García, N.; Moro, R. F.; Broughton, H. B.; Mollinedo, F.; Urones, J. G., Synthesis of bioactive sesterterpenolides from *ent*-halimic acid. 15-*epi-ent*-cladocoran A and B. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7496.
- 10 Marcos, I. S.; Pedrero, A. B.; Sexmero, M. J.; Díez, D.; García, N.; Escola, M. A.; Basabe, P.; Conde, A.; Moro, R. F.; Urones, J. G., Synthesis of *ent*-halimanolides from *ent*-halimic acid. *Synthesis* **2005**, *19*.
- 11 Gil-Mesón, A.; Roncero, A. M.; Tobal, I. E.; Basabe, P.; Díez, D.; Mollinedo, F.; Marcos, I. S., Synthesis of bioconjugate sesterterpenoids with phospholipids and polyunsaturated fatty acids. *Molecules* **2016**, *21*, 47.
- 12 Marcos, I. S.; Escola, M. A.; Moro, R. F.; Basabe, P.; Díez, D.; Mollinedo, F.; Urones, J. G., Synthesis of (+)-Thiersindole C. *Synlett* **2007**, *2007*, 2017.
- 13 Marcos, I. S.; Moro, R. F.; Costales, I.; Basabe, P.; Díez, D.; Mollinedo, F.; Urones, J. G., Synthesis of 12-*epi-ent*-polyalthenol an antitumour indole sesquiterpene alkaloid. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7932.
- 14 Costales González, M. I. Síntesis de terpenil-indoles bioactivos: 12-*epi-ent*-polialthenol, 12-*epi-ent*-pentacicclindol y análogos. *Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca* **2012**.
- 15 Krumpolc, M.; Rocek, J., Stable chromium(V) compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 872.
- 16 Wilde, N. C.; Isomura, M.; Mendoza, A.; Baran, P. S., Two-Phase synthesis of (–)-Taxuyunnanine D. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4909.
- 17 Gajate, C.; Barasoain, I.; Andreu, J. M.; Mollinedo, F., Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one: Protection by Bcl-2 and Bcl-XL and cell cycle Arrest. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2651.

- 18 Gajate, C.; Santos-Beneit, A. M.; Macho, A.; Lazaro, M. d. C.; Hernandez-De Rojas, A.; Modolell, M.; Muñoz, E.; Mollinedo, F., Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH₃-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int. J. Cancer* **2000**, *86*, 208.
- 19 Legarda-Ceballos, A. L.; Rojas-Caraballo, J.; López-Abán, J.; Ruano, A. L.; Yepes, E.; Gajate, C.; Mollinedo, F.; Muro, A., The alkylphospholipid edelfosine shows activity against *Strongyloides venezuelensis* and induces apoptosis-like cell death. *Acta Tropica* **2016**, *162*, 180.
- 20 Martins, W. A.; Melo, A. L.; Nicoli, J. R.; Cara, D. C.; Carvalho, M. A.; Lana, M. A.; Vieira, E. C.; Farias, L. M., A method of decontaminating *Strongyloides venezuelensis* larvae for the study of strongyloidiasis in germ-free and conventional mice. *J. Med. Microbiol.* **2000**, *49*, 387.
- 21 Wiatrak, B.; Kubis-Kubiak, A.; Piwowar, A.; Barg, E., PC12 Cell Line: Cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions. *Cells* **2020**, *9*, 958.



Metodología general

General methodology



1. Instrumentación

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.

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.

1.3. Rotaciones específicas, $[\alpha]_D^{22}$

Las medidas del poder rotatorio y determinación de la rotación específica ($[\alpha]_D^{22}$) se realizan en un polarímetro digital Perkin-Elmer 241 utilizando una cubeta de cuarzo ($l = 1$ dm) termostatzada a 20 °C y en la línea de emisión del Na ($\lambda = 589$ nm). La concentración de la muestra y el disolvente utilizado se indica en cada caso.

1.4. 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 fotospray, pudiendo trabajar en modo positivo y negativo. Es capaz de determinar la masa exacta de un compuesto, alta resolución.

1.5. Espectroscopía de RMN

Se han empleado los equipos pertenecientes al Servicio General de RMN de Nucleus, Universidad de Salamanca): un espectrómetro Varian Mercury 200 (200 MHz ^1H y 50 MHz ^{13}C) y también un espectrómetro BRUKER AVANCE Neo 400 MHz (400 MHz ^1H y 100 MHz ^{13}C), equipado con una criosonda Prodigy CPPBBO BB-H&F con gradiente en z y un cambiador de muestras de 24 posiciones.

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 (Distorsionless 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.

1.6. 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.

1.7. 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.

2. Técnicas generales cromatográficas

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 H_2SO_4/H_2O al 0.05/1 p/v, seguido de calentamiento a $120^\circ C$ 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.

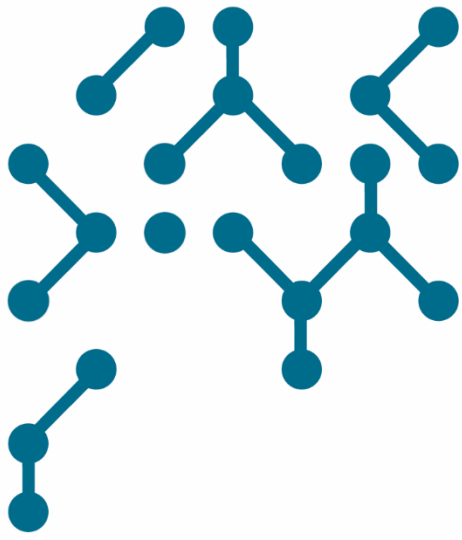
2.2. Cromatografía en columna

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 cromatografía en columna 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. Purificación de reactivos y disolventes

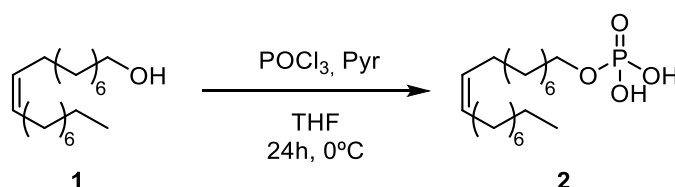
- **Acetona (Me₂CO):** Se calienta a ebullición sobre KMnO₄ y se destila, almacenándose sobre tamiz molecular de 3 Å.
- **Acetonitrilo (CH₃CN):** Se calienta a ebullición sobre CaH₂ y destila sobre CaH₂ bajo atmósfera de Ar.
- **Benceno (C₆H₆):** Se almacena con Na.
- **Diclorometano (CH₂Cl₂, DCM):** 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 3Å.
- **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 bajo atmósfera de Ar.
- **n-Hexano (C₆H₁₄, Hex):** Se destila.
- **Metanol (MeOH):** Se destila sobre Mg y I₂, se almacena sobre tamiz molecular (3 Å).
- **Oxicloruro de fósforo (POCl₃):** Se destila a presión reducida para cada uso.
- **Piridina (C₅H₅N, Pir, Pyr):** Se destila sobre BaO y se almacena con KOH.
- **Tetrahidrofurano (C₄H₈O, THF):** Se calienta a ebullición sobre Na y se destila sobre Na y benzofenona bajo atmósfera de Ar.
- **Tolueno (PhCH₃):** Se almacena con Na.
- **Trietilamina (Et₃N):** Se calienta a ebullición sobre CaH₂, se destila y almacena con KOH.



Experimental

Experimental



Reaction of oleyl alcohol 1 with POCl₃: 2

To a solution of 476 mg (1.51 mmol) of oleyl alcohol, **1** in 7.5 ml of THF, 0.14 ml of POCl₃ (1.51 mmol) and 0.24 ml of Pyridine (2.96 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 0°C 24 h. Then, 2 ml NaHCO₃ (6 %) was added and stirred for additional 15 min. afterwards it was acidulated to pH=2 with HCl 2 M. The resulting mixture was extracted in EtOAc and the organic layers were washed with 10 ml H₂O, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum obtaining **2** (503 mg, 97%).

Oleylphosphate, 2:

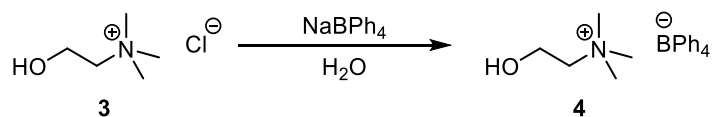
IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3700-2400, 3003, 2924, 2854, 1463, 1223, 1029.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.34 (2H, t, J = 4.8 Hz, H-9 and H-10), 4.03-3.81 (2H, m, H-1), 2.02-1.99 (4H, m, H-8 and H-11), 1.8-1.5 (2H, m, H-2), 1.27 (22H, s, H 3-7 and H-12 a H-17), 0.88 (3H, t, J = 6.7 Hz, H-18).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 130.2-130.0 (C-9 and 10), 68.3 (C-1), 32.9 (C-2), 32.1-27.1 (C-4 to 8 and 11 to 16), 25.7 (C-3), 22.9 (C-17), 14.4 (C-18).

† *Systematic numbering used in the compound nomenclature may not correspond to the one used for spectroscopic assignment.*

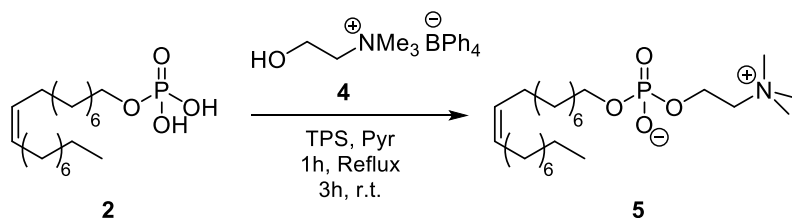
Reaction of 3 with NaBPh₄: 4



A solution of **3** (647 mg, 4.62 mmol) in 14 ml de H₂O, was added to a solution of NaBPh₄ (1.05 g, 3.04 mmol) in 14.5 ml de H₂O. The white solid obtained was filtered and washed with H₂O. The resulting white powder was redissolved in PhCH₃:EtOH (1:1) and evaporated. The dried residue was recrystallized in CH₃CN obtaining **4** (1.2 g, 93 %).

Choline tetraphenylborate, 4:

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 7.17-7.15 (8H, m, H_{Ar}-2,6), 6.91 (8H, t, J = 7.2 Hz, H_{Ar}-3,5), 6.81-6.76 (4H, m, H_{Ar}-4), 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, NMe₃).

Reaction of 2 with 4: 5

To a solution of **2** (190 mg, 0.55 mmol) in pyridine (4.2 ml), **4** (238 mg, 0.55 mmol) and TPS (193 mg, 0.64 mmol) were added. The resulting mixture was refluxed for 1 h and then it was allowed to react at r.t. for additional 3 h. Then, 5 ml H₂O were added and it was stirred for 15 min. The crude was evaporated and purified by silica gel column chromatography using CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1), CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5) and CHCl₃:MeOH:NH₃ (65:30:5) obtaining **5** (90 mg, 37 %).

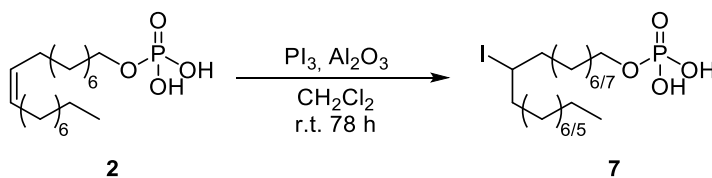
Oleylphosphocholine, 5:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 5.37-5.33 (2H, m, H-9 and H-10), 4.29 (2H, m, H-1'), 3.87 (2H, m, H-1), 3.79 (2H, m, H-2'), 3.41 (9H, s, NMe₃), 2.10-1.93 (4H, m, H-8 and 11), 1.57 (2H, m, H-2), 1.26 (22H, m, H 3-7 and 12-17), 0.88 (3H, t, *J* = 5.7 Hz, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 130.0 and 129.7 (C-9 and 10), 66.2 (C-1, d, *J* = 4 Hz), 66.0 (C-2', d, *J* = 5 Hz), 59.3 (C-1'), 54.3 (NMe₃), 32.1 (C-16), 31.9-29.3 (C-2, 4-8 and 12-15), 25.9 (C-3), 22.6 (C-17), 14.1 (C-18).

HRMS (ESI): Calcd. for C₂₃H₄₈NO₄PNa (M+Na⁺) 456.3219 uma; found 456.3197 uma.

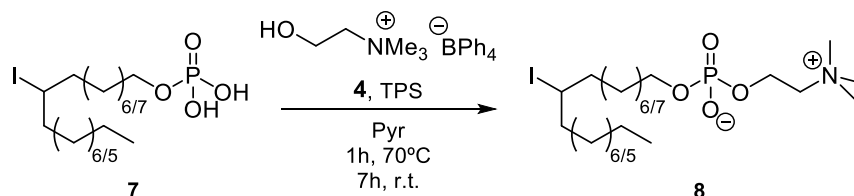
Reaction of 2 with PI₃: 7



To a solution of **2** (89 mg, 0.26 mmol) in DCM (3 ml), PI₃ (210 mg, 0.51 mmol) and Al₂O₃ (593 mg, previously activated in oven by heating at 120 °C for 24 h) were added. The resulting mixture was stirred at r.t. for 78 h. After that time, it was added slowly a mixture CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5), the reaction was filtered and evaporated under vacuum obtaining **7** (102 mg, 84 %).

9/10-iodo-1-octadecyl phosphate, 7:

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 4.10 (1H, m, H-9 or 10), 3.80 (2H, m, H-1), 2.00-1.20 (30H, m, H-2-8, 10-17), 0.87 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-18).

Reaction of 7 with 4: 8

To a solution of **7** (102 mg, 0.22 mmol) in pyridine (1.26 ml), were subsequently added choline tetraphenylborate **4** (92 mg, 0.22 mmol) and 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride TPS (85 mg, 0.28 mmol). The resulting solution was heated at 70 °C for 1 h and additional 7 h at r.t.. After that time, it was added 0.5 ml of H₂O and stirred for 40 min. The reaction was dried by addition of PhCH₃:EtOH and vacuum evaporation. The crude reaction mixture was extracted with cold Et₂O and purified by silica gel column chromatography eluting with HCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5) to obtain **8** (4 mg, 3 %).

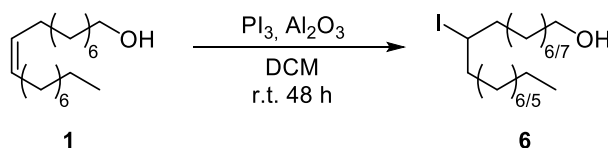
9/10-iodooctadecyl-1-phosphocholine, 8:

IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3401, 2925, 1658, 1462, 1231, 970, 731.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 4.27 (2H, m, H-1'), 4.13 (1H, m, H-9 or H-10), 4.08-3.79 (4H, m, H-1 and H-2'), 3.33 (9H, s, Me₃N-) 1.81-1.26(30H, m, H 2-8 and H 10-17), 0.87 (3H, t, *J* = 6.0 Hz, H-18).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 66.4 (C-2'), 66.1 (C-1), 59.5 (C-1'), 54.5 (NMe₃), 41.4 (C-9), 41.3-41.0 (C-8 and 10), 32.1 (C-16), 29.9-29.1 (C-2, 4-6 and 12-15), 26.8 (C-7 and 11), 26.1 (C-3), 22.9 (C-17), 14.4 (C-18).

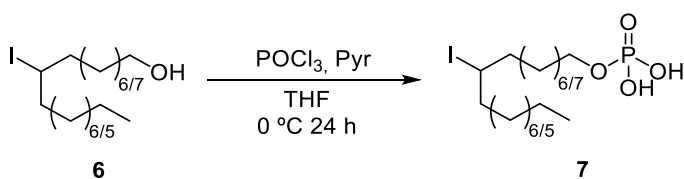
HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₂₃H₄₉NO₄PiNa⁺ 584.2336 uma; found 584.2339 uma.

Reaction of 1 with PI₃: 6

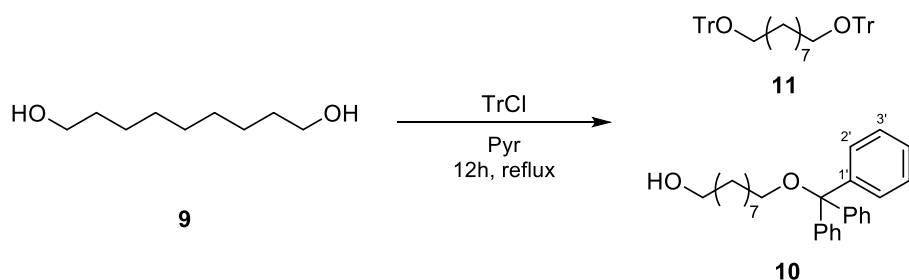
To a solution of **1** (225 mg, 0.83 mmol) in DCM (3 ml), PI₃ (584 mg, 1.42 mmol) and Al₂O₃ (1.62 g, previously activated in oven by heating at 120 °C for 24 h) were added. The resulting mixture was stirred at r.t. for 48 h. After that time, it was added slowly a mixture CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5), the reaction was filtered and evaporated under vacuum. The crude reaction product was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (9:1) obtaining **6** (310 mg, 97 %).

9/10-iodo-1-octadecanol, 6:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 4.12 (1H, m, H-9 or 10), 3.62 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H-1), 1.87-1.52 (8H, H-8, 10 or 9, 11 and H-2), 1.28 (26H, m), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz).

Preparation of phosphate 7

To a solution of iododerivative **6** (310 mg, 0.78 mmol) in THF (3.8 ml), 0.13 ml of POCl₃ (1.35 mmol) and 0.23 ml of Pyridine (2.87 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 0°C 24 h. Then, 2 ml NaHCO₃ (6 %) was added and stirred for additional 15 min. afterwards it was acidulated to pH=2 with HCl 2 M. The resulting mixture was extracted in EtOAc and the organic layers were washed with 10 ml H₂O, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum obtaining **2** (323 mg, 87 %).

Protection of 9: 10 and 11

To a solution of **9** (552 mg, 3.44 mmol) in pyridine (6.9 ml), trityl chloride (953 mg, 3.42 mmol) was added and the resulting solution was refluxed for 12 h. Then, it was added H₂O and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with HCl 2 M, NaHCO₃ (6 %) and NaCl (sat.), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude product is purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (9:1) affording **10** (1.02 g, 74 %) and **11** (312 mg, 14 %).

9-trityloxynonan-1-ol, 10:

IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3339, 3057, 2927, 899.

¹H NMR (200 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 and H-8), 1.35-1.22 (10H, m, H-3-7).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 144.5 (C-1'), 128.7 (C-3' and 5'), 127.7 (C-2' and 6'), 126.8 (C-4'), 86.2 (-C(Ph)₃), 63.6 (C-9), 63.1 (C-1), 32.8 (C-8), 30.0 (C-2), 29.5-25.7 (C-3-7).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₂₈H₃₄O₂Na 425.2457 uma; found 425.2442 uma.

1,9-ditritylloxynonane, 11:

¹H NMR (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 and H-8), 1.35-1.22 (10H, m, H-3-7).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 144.5 (C-1'), 128.6 (C-3' and 5'), 127.9 (C-2' and 6'), 126.8 (C-4'), 86.2 (-C(Ph)₃), 63.6 (C-1 and 9), 30.0 (C-2 and 8), 29.4 (C-4-6), 26.2 (C-3 and 7).

Oxidation of 10 using TPAP: 12



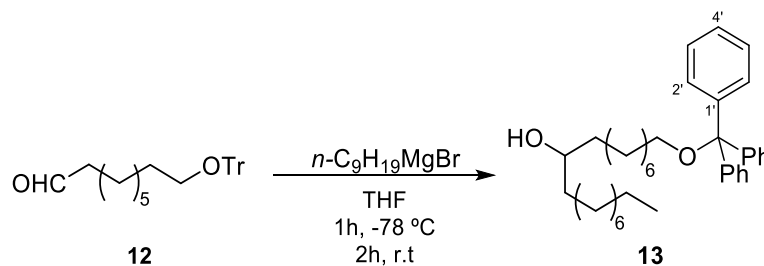
To a solution of **10** (549 mg, 1.37 mmol) in DCM (13.7 ml) containing molecular sieves 4 Å (685 mg), it was added NMO (556 mg, 4.11 mmol) and TPAP (17 mg, 0.048 mmol) and the resulting mixture was stirred at r.t. under argon atmosphere for 40 min. The crude reaction mixture was filtered over silica gel and celite washing with DCM and EtOAc. The filtered solution was evaporated obtaining **12** (510 mg, 93 %).

9-trityloxynonanaldehyde, 12:

IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3050, 2930, 2857, 1724, 1489, 1448, 1070, 706.

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9.76 (1H, t, *J* = 1.2 Hz, -CHO), 7.46-7.42 (6H, m, H-2' and 6'), 7.32-7.21 (9H, m, H-3', 4' and 5'), 3.03 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H-9), 2.45-2.25 (2H, dt, *J* = 7.4 Hz, 1.2 Hz, H-2), 1.62-1.55 (4H, m, H-3 and 8), 1.35-1.22 (8H, m, H-4-7).

¹³C NMR(100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 202.8 (C-1), 144.6 (C-1'), 128.8 (C-3',5'), 127.7 (C-2',6'), 126.8 (C-4'), 86.4 (-C(Ph)₃), 68.1 (C-2), 63.7 (C-9), 44.0 (C-3), 30.1-22.1 (C-3-8).

Addition of *n*-nonylmagnesium bromide to **12: **13****

To a solution of **12** (166 mg, 415 μmol) in THF (4.9 mol) cooled to $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under argon atmosphere, it was added dropwise *n*-C₉H₁₉MgBr (4.8 ml, 1.0 M in Et₂O). It was stirred at that temperature for 1 h and then additional 2 h at r.t. Then, the reaction was cooled to $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ and a mixture of Et₂O: H₂O was slowly added and NH₄Cl (sat.) was subsequently added. The resulting mixture was extracted with EtOAc and the combined organic extracts were washed with NaCl (sat.), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The addition product **13** was isolated from the reaction mixture by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (95:5) obtaining 176 mg (80 %).

1-trityloxyoctadecan-9-ol, **13:**

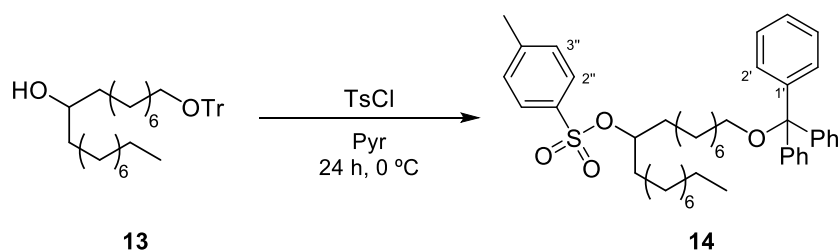
IR (film) $\nu_{\text{max}}\text{ cm}^{-1}$: 3375, 2926, 2854, 1724, 1449, 1070, 705.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7.46 (6H, d, $J = 7.5\text{ Hz}$, H-2', 6'), 7.30 (6H, t, $J = 7.5\text{ Hz}$, H-3',5'), 7.22 (3H, d, $J = 7.5\text{ Hz}$, H-4'), 3.59 (1H, s, H-9), 3.06 (2H, t, $J = 6.5\text{ Hz}$, H-1), 1.62 (4H, m, H-8 and 10), 1.44-1.23 (26H, m, H-2-7 and 11-17), 0.90 (3H, t, $J = 6.8\text{ Hz}$, H-18)

¹³C NMR (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), 72.0 (C-9), 63.6 (C-1), 37.5-25.6 (C-2-8 and 10-16), 22.7 (C-17), 14.1 (C-18).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₃₇H₅₂O₂Na 528.3967 uma; found 551.3842 uma.

Reaction of 13 with TsCl: 14

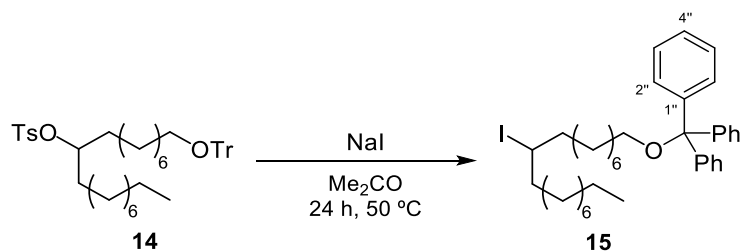


To a solution of **13** (595 mg, 1.13 mmol) in pyridine (18.8 ml) at 0 °C, TsCl (902 mg, 4.73 mmol) was added and it was stirred for 24 h at 0 °C. After that time, it is added ice and the resulting mixture was extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with HCl 2 M, NaHCO₃ (6 %) and NaCl (sat.), dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated under vacuum affording **14** (700 mg, 99 %)

1-(trityloxy)-9-tosyloctadecane, 14:

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3059, 2928, 2855, 1458, 1363, 1176, 899, 706.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7.82 (2H, d, J = 8.2 Hz, H-2'' and 6''), 7.47-7.22 (22H, m, H-2'-6', 3'' and 5''), 4.54 (1H, t, J = 5.8 Hz, H-9), 3.04 (2H, t, J = 6.6 Hz, H-1), 2.42 (3H, s, PhCH₃), 1.56-1.16 (25H, m), 0.89 (3H, t, J = 6.8 Hz, H-18).

Reaction of **14 with NaI: **15****

To a solution of **14** (700 mg, 1.03 mmol) in Me₂CO (55.5 ml), NaI (1.720 g, 11.48 mmol) was added. The resulting solution was heated at 50 °C for 24 h. Then, 40 ml H₂O were added and it was extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with Na₂SO₃ (10 %), NaHCO₃ (6 %) and NaCl (sat.), it was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude reaction was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (99:1) isolating **15** (651 mg, 99 %).

1-(trityloxy)-9-iodooctadecane, **15:**

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 2926, 2855, 1490, 1449, 1070, 696.

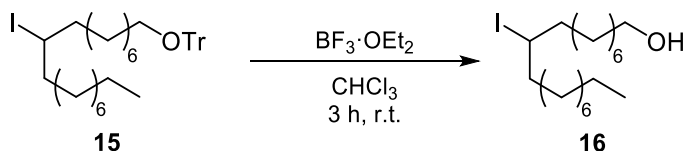
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7.47 (6H, d, J = 8.4 Hz, H-2'' and 6''), 7.33-7.21 (9H, m, H-3'', 5'' and 4''), 4.13 (1H, m, H-9), 3.11 (2H, t, J = 6.5 Hz, H-1), 2.00-1.29 (30H, m, H-2-8 and 10-17), 0.90 (3H, t, J = 6.7 Hz, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 144.5 (C-1''), 128.7 (C-3'' and 5''), 127.6 (C-2'' and 6''), 126.7 (C-4''), 86.2 (-C(Ph)₃), 63.6 (C-1), 40.8 (C-9), 40.7 (C 8 and 10) 31.9-26.2 (C-2-7 and 10-16), 22.7 (C-17), 14.1 (C-18).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₃₇H₅₁IONa⁺ 661.2882 uma; found 661.2868 uma.

HMBC and HSQC: see *Bidimensional tables*.

Deprotection of 15 with BF₃: 16



To a solution of **15** (568 mg, 0.89 mmol) in CHCl₃ (9 ml), 0.2 ml of BF₃·OEt₂ are added. The reaction mixture was stirred for 3 h at r.t. till no starting material is observed by TLC. Then, a mixture of H₂O:CHCl₃:MeOH (2:2:1) was added and placed in a separatory funnel, the organic layer is separated, dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (95:5) obtaining **16** (310 mg, 91 %).

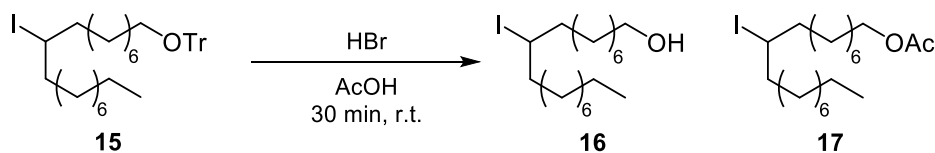
9-iodooctadecan-1-ol, 16:

IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3346, 2926, 2854, 1462, 1057, 721.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 4.13 (1H, m, H-9), 3.62 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-1), 2.99-1.15 (15H, m, H-2 to 8 and 10 to 17), 0.86 (3H, t, *J* = 6.8 Hz).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 63.2 (C-1), 40.8 (C-9), 40.7 (C-8 and 10), 32.9 (C-2), 32.1 (C-16), 29.8-26.0 (C-3 to 7 and 11 to 15), 22.9 (C-17), 14.3 (C-18).

HRMS (ESI): Calcd. for C₁₈H₃₇IO⁺ (M+Na⁺) 419.1781 uma; found 419.1777 uma.

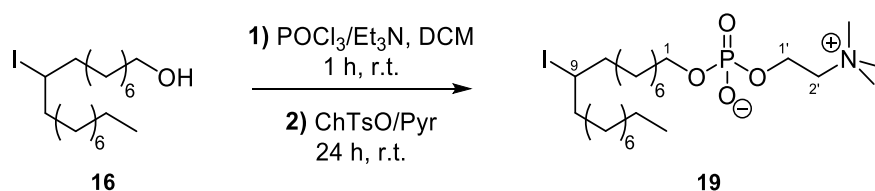
Deprotection of 15 with HBr: 16 and 17

To a solution of **15** (78 mg, 0.12 mmol) in AcOH (2.5 ml) cooled in a water-ice bath at 10 °C, a solution of 13.8 μl (0.12 mmol) of HBr (aq. 48 %) in AcOH (2.5 ml) was added. The reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. Then, the reaction mixture was filtered and washed with H_2O . The resulting solution was extracted with EtOAc and the combined organic extracts was washed with NaHCO_3 (6%) and H_2O . The resulting solution was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (99:1) obtaining **16** (7 mg, 15 %) and **17** (26, 50 %).

9-iodooctadecyl acetate, 17:

IR (film) ν_{max} cm^{-1} : 2916, 2871, 1462, 1057, 721.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 4.13 (1H, m, H-9), 3.62 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-1), 2.99-1.15 (15H, m, H-2 to 8 and 10 to 17), 0.86 (3H, t, $J = 6.8$ Hz).

Reaction of 16 with POCl₃ and choline tosylate: 19

To a solution of POCl₃ (435 μ l, 0.47 mmol) freshly distilled in DCM (1.8 ml) and cooled to 0 °C, it was added dropwise a solution of **16** (149 mg, 0.38 mmol) and Et₃N (68 μ l, 0.49 mmol) in DCM (2.7 ml). The resulting solution was allowed to warm up to r.t. and it was stirred for 1 h. Then, a solution of choline tosylate (211 mg, 0.744 mmol) in pyridine (239 μ l) was added. After 24 h at r.t. 1 ml H₂O was added to the reaction mixture and the resulting mixture was evaporated under vacuum till is completely dried. The residue was redissolved in THF:H₂O (9:1) and was filtered over amberlyte MB3 washing with THF:H₂O (9:1). The filtered solution was evaporated and the crude product was purified by silica gel column chromatography eluting with HCl₃, HCl₃:MeOH (9:1) and HCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5) obtaining 75 mg of **19** (36 %).

9-iodooctadecyl-1-phosphocholine, 19:

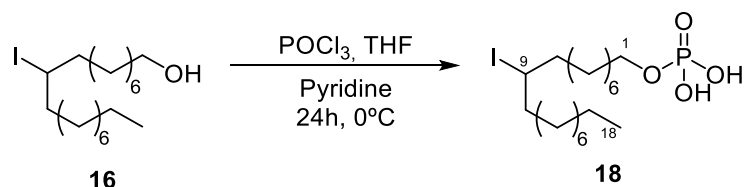
IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3406, 2924, 2855, 1654, 1465, 1236, 968, 737.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 4.20 (3H, m, H-9, H-1'), 3.95 (2H, m, H-1) 3.82 (2H, m, H-2'), 3.42 (9H, s, NMe₃), 2.20-1.08 (30H, m, H-2-8 and 10-17), 0.86 (3H, t, J = 6.4 Hz, H-18).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 66.4 (C-2'), 66.1 (C-1), 59.5 (C-1'), 54.5 (NMe₃), 41.4 (C-9), 41.3-41.0 (C-8 and 10), 32.1 (C-16), 29.9-29.1 (C-2, 4-6 and 12-15), 26.8 (C-7 and 11), 26.1 (C-3), 22.9 (C-17), 14.4 (C-18).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₂₃H₄₉NO₄PiNa⁺ 584.2336 uma; found 584.2342 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

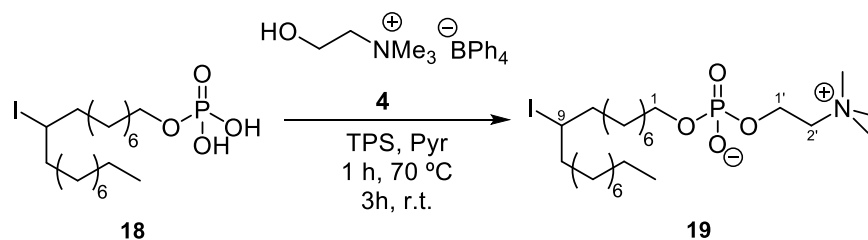
Reaction of 16 with POCl₃: 18

To a solution of **16** (310 mg, 0.78 mmol) in THF (3.9 ml) cooled at 0 °C, pyridine (15 μ l) and POCl₃ (7.2 μ l) were added. The resulting solution was stirred at that temperature for 24 h. After that time, 1 ml of NaHCO₃ (6 %) was added and the resulting mixture was stirred for 15 min, then it was carefully acidulated by addition of HCl 2 M still pH=2. The crude reaction mixture was extracted with EtOAc and washed with a small portion of H₂O. The resulting organic extract was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure yielding **18** (362 mg, 97 %).

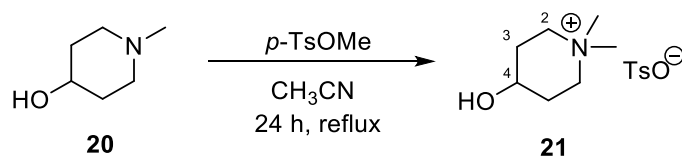
9-iodo-1-octadecyl phosphate, 18:

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

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 68.4 (C-1), 40.9 (C-9), 40.8 (C 8 and 10), 32.9 (C-2), 32.1 (C-16), 29.8-26.0 (C 3- 7 and 11-15), 22.9 (C-17), 14.3 (C-18).

Reaction of 18 with 4: 19

To a solution of **18** (127 mg, 0.27 mmol) in pyridine (2.1 ml), TPS (102 mg, 0.33 mmol) and recently synthesized and recrystallized **4** (115 mg, 0.27 mmol) were added. The resulting mixture was heated at 70 °C for 1h and additional 3 h at r.t.. Afterwards, it was added 1 ml H₂O to the reaction mixture and was stirred for 15 min. The resulting mixture was evaporated to obtain a solid residue. The CHCl₃ soluble fraction was evaporated and then, extracted with Et₂O. The Et₂O soluble fraction was evaporated and purified by silica gel column chromatography eluting with CHCl₃, CHCl₃:MeOH, CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5) and CHCl₃:MeOH:NH₃ (65:30:5) isolating **19** (9 mg, 6 %).

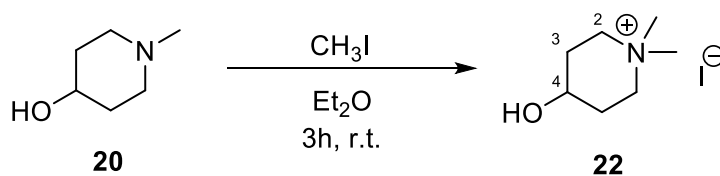
Methylation of 20 with *p*-TsOMe: 21

To a solution of **20** (860 mg, 7.52 mmol) in CH₃CN (22 ml), *p*-TsOMe (1.45 ml) was added. The solution was refluxed for 24 h observing the formation of a white solid in suspension. The resulting mixture was filtered, and the solid was washed with cold Et₂O and evaporated under vacuum obtaining a mixture containing **21**.

4-Hydroxy-*N,N*-dimethylpiperidinium tosylate, 21:

¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ/ppm: 7.78 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H 2' and 6'), 7.32 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H 3' and 5'), 3.99 (1H, m, H-3), 3.64-3.51 (2H, m, H-1 (1H, m, H-1 and 5), 3.40-3.20 (2H, m, H-1 and 5), 3.16 and 3.12 (3H, s each, NMe₂), 2.20-2.00 (2H, m, H-2 and 4), 1.98-1.75 (2H, m, H-1 and 6).

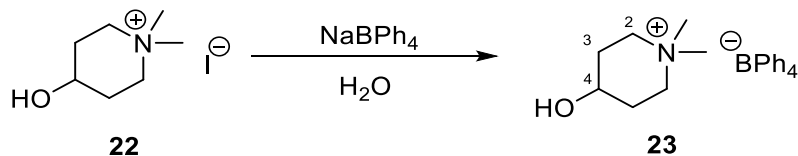
Methylation of 20 with MeI: 22



To a solution of **20** (4.3 g, 38 mmol) in Et₂O (120 ml), CH₃I (32 ml, 379 mmol) were added. The solution was stirred at r.t. for 3 h obtaining a solid precipitated. The resulting suspension was filtered, and the solid was washed with Et₂O and evaporated under vacuum obtaining **22** (9.6 g, 99%).

4-Hydroxy-N,N-dimethylpiperidinium iodide, 22:

¹H NMR (200 MHz, CD₃OD) δ/ppm: 3.98 (1H, m, H-4), 3.58 (2H, ddd, *J* = 12.8, 9.6 and 3.4 Hz, H_A-2 and 6), 3.42-3.20 (2H, m, H_B-2 and 6), 3.16 and 3.14 (3H, s each, N-CH₃), 2.30-2.10 (2H, m, H_A-3 and 5), 2.00-1.75 (2H, m, H_B-3 and H-5).

Reaction of **124 with NaBPh₄: **125****

To a solution of **124** (1.13 g, 4.4 mmol) in H₂O (14.0 ml), it was added other solution of NaBPh₄ 1.00 g, 2.9mmol) in H₂O (14.5 ml). Instantaneously, a white solid is formed, that is filtered and washed with H₂O. Then, the solid is dissolved again in PhCH₃:EtOH (1:1) and it is evaporated still is completely dried. The product is purified by recrystallization at -14 °C using CH₃CN as solvent, obtaining **125** (1.20 g (92 %)).

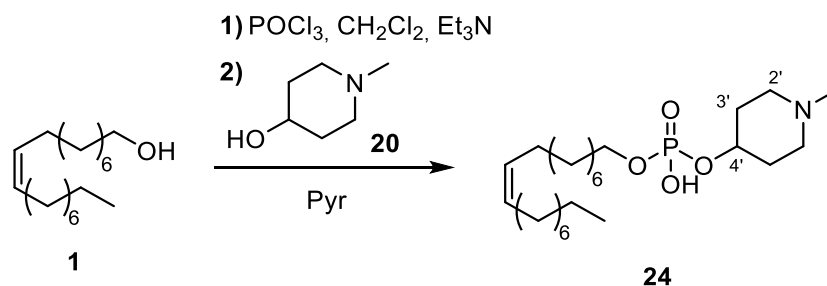
4-Hydroxy-*N,N*-dimethylpiperidinium tetraphenylborate, **23:**

mp (°C): 248-250.

¹H NMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ/ppm: 7.20-6.74 (20H, m, Ph-H), 5.09 (1H, s, -OH), 3.73 (1H, m, H-4), 3.44-3.19 (4H, m, H-2 and 6), 3.04 and 3.00 (3H, s each, NCH₃), 2.05-1.90 (2H, m, H_A-3 and 5), 1.89-1.70 (2H_B, m, H-3 and 5).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-D₆): 169.8 and 167.8 (2C, d each *J* = 43 Hz, C-1'), 141.0, 130.8 and 127.0 (C-2',3' and 4'), 66.3 (C-4), 63.6 (C-2 and 6), 56.5 and 55.2 (NMe₂), 33.1 (C-3 and 5).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+(4-hydroxy-*N,N*-dimethylpiperidinium)⁺) C₃₈H₅₂BN₂O₂⁺: 579.4122 uma; found: 579.4117 uma.

Reaction of 1 with 20: 24

To a solution of POCl₃ (386 μl, 4.10 mmol) freshly distilled in DCM (2 ml) cooled at 0 °C, a solution of oleyl alcohol **1** (1 g, 3.73 mmol) in Pyr (1.38 ml) and DCM (3.3 ml) is slowly added. The resulting solution is allowed to warm to 5-7 °C and stirred for 40 min. Then, the reaction mixture is cooled again to 0 °C and a solution of **20** (552 mg, 4.85 mmol) in Pyr (1.52 ml) is added dropwise. The reaction mixture is stirred at 5-7 °C for additional 4 h. Afterwards, the reaction is quenched by addition of H₂O (0.6 ml) and stirred at r.t. for 1 h. The resulting mixture is placed in a separatory funnel and washed with 5 ml of the following solutions: H₂O:MeOH (1:1), citric acid (10%): MeOH (1:1) and H₂O:MeOH (1:1). The resulting organic phase is dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The silica gel column chromatography of the crude product eluting with HCCl₃, HCCl₃:MeOH (9:1) and HCCl₃:MeOH:NH₃ (8:2:0.2) allowed the isolation of **24** (102 mg, 6 %)

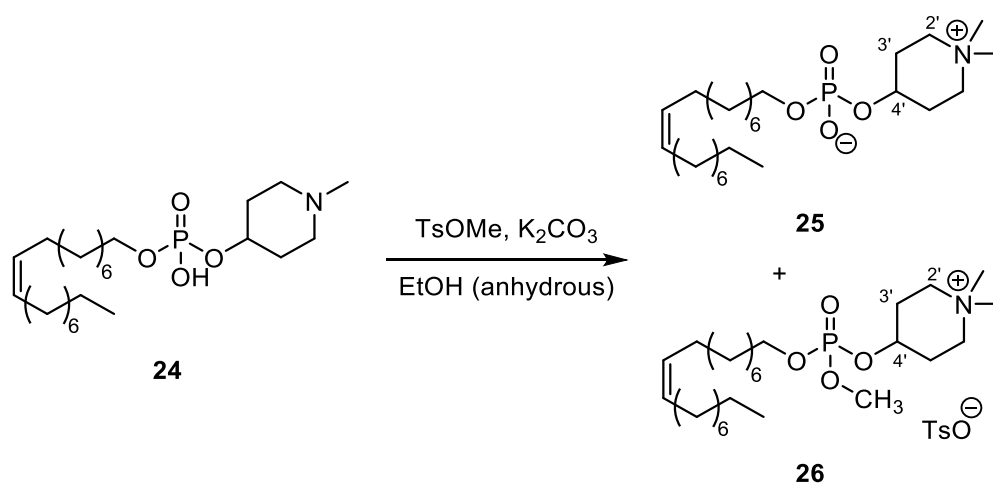
N-methylpiperidin-4-yl oleyl hydrogenphosphate, 24:

IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3396, 3005, 2924, 2852, 1635, 1485, 1489, 1458, 1219, 1037, 995, 890.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.38-5.29 (2H, m, H 9 and 10), 4.43 (1H, m, H-4'), 3.84 (2H, q, $J = 8$ Hz, H-1), 3.22 (4H, m, H-2' and 6'), 2.66 (3H, s, N-Me), 2.21-2.01 (4H, m, H-3' and 5'), 1.62 (2H, m, H-2, 8 and 11), 1.26 (22H, m, H 3-7 and 12-17), 0.87 (3H, t, $J = 8$ Hz, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 130.2 and 130.0 (C-9 and 10), 65.8 (C-4'), 65.7 (C-1), 50.6 (C-2' and 6'), 43.6 (-NMe), 32.7-26.90 (C 2-8, 11-16, 3' and 5'), 22.8 (C-17), 14.3 (C-18).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₂₄H₄₈NO₄PNa⁺: 468.32132 uma; found 468.3209 uma.

Methylation reaction of 24 with TsOMe: 25

To a solution of **24** (89 mg, 0.20 mmol) in anhydrous EtOH (2.2 ml), K_2CO_3 (24 mg, 0.17 mmol) is added. To the resulting solution, TsOMe (41 μl , 0.27 mmol) is added and the reaction mixture is stirred at 60 °C for 1h and additional 30 min at r.t.. Then, the reaction is filtered and evaporated under vacuum. The crude product is purified by silica gel column chromatography eluting with HCCl_3 , HCCl_3 :MeOH (9:1), HCCl_3 :MeOH:H₂O (85:15:1.5) and (65:30:5) obtaining **26** (67 mg, 52 %) and an enriched fraction of **25**, that is purified by column chromatography packed with Sephadex LH-20 eluting with HCCl_3 :MeOH (1:1), resulting **25** (16 mg, 15 %).

***N,N*-dimethylpiperidin-4-yl oleyl phosphate, 25:**

IR (film, cm^{-1}): 3398, 2924, 2852, 1653, 1465, 1217, 1035, 920, 860, 684, 569.

¹H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 5.33 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H-9 and 10), 4.39 (1H, m, H-4'), 3.73 (2H, m, H-1), 3.63 (4H, m, H-2' and 6'), 3.28 (6H, s, N- Me_2), 2.08-1.97 (4H, m, H-3' and 5'), 1.54 (2H, m, H-2), 1.26 (24H, m, H 3-7 and 11-17), 0.87 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, H-18).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3): 129.9 and 129.7 (C-9 and 10), 65.5 (C-1), 65.1 (C-4'), 59.0 (C-2' and 6'), 53.6 and 49.7 (-N Me_2), 32.6-25.4 (C 2-8, 11-16, 3' and 5'), 22.6 (C-17), 14.1 (C-18).

HRMS (ESI): Calcd. for $(\text{M}+\text{H}^+)$ $\text{C}_{25}\text{H}_{51}\text{NO}_4\text{P}^+$: 460.35502 uma; found 460.3550 uma.

HMBC and HSQC: see *Bidimensional tables*.

(*N,N*-dimethylpiperidin)-4-yl methyl oleyl phosphate, 26:

IR (film) ν_{\max} cm^{-1} : 3460, 2924, 2855, 1653, 1463, 1267, 1215, 1122, 1035, 815, 684.

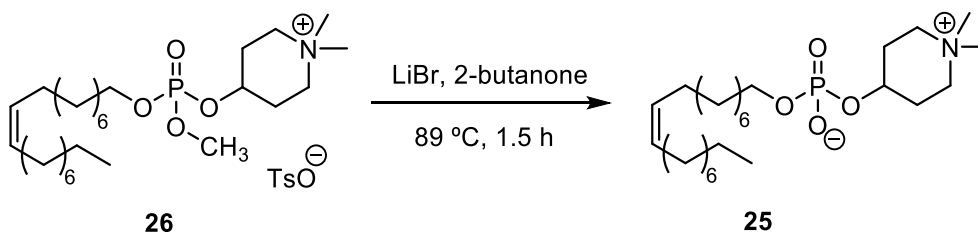
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7.70 (2H, d, $J = 8$ Hz, H-2'' and 6''), 7.13 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H-3'', 5''), 5.36-5.30 (2H, m, H-9 and 10), 4.57 (1H, m, H-4'), 3.98 (2H, m, H-1), 3.70 (3H, d, $J = 12$ Hz, POMe), 3.56 and 3.37 (2H, m each, H-2' and 6'), 3.36 and 3.22 (6H, s each, NMe₂), 2.31 (3H, s, PhMe), 2.23 and 2.00 (2H, m each, 3' and 5'), 1.62 (2H, m, H-2), 1.26 (26H, m, H 3-8 and 11-17), 0.87 (3H, t, $J = 6.5$ Hz, H-18).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 142.6 (C-1''), 139.9 (C-4''), 129.9 and 129.7 (C-9 and 10), 128.9 (C-3'' and 5''), 125.8 (C-2'' and 6''), 68.6 (C-4'), 68.4 (C-1), 58.1 (C-2' and 6'), 54.5 (POMe, d), 53.9 and 49.7 (NMe₂), 32.5-25.3 (C 2-8 and 11-16), 26.4 (C-3' and 5'), 22.6 (C-17), 21.2 (PhMe), 14.1 (C-18).

HRMS (ESI): Calcd. for (Cationic part $^+$) $\text{C}_{26}\text{H}_{53}\text{NO}_4\text{P}^+$: 474.37068 uma; found 474.3706 uma.

HMBC and HSQC: see *Bidimensional tables*.

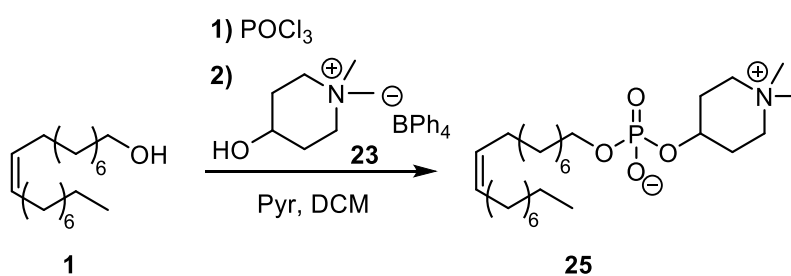
Demethylation of 26 with LiBr: 25



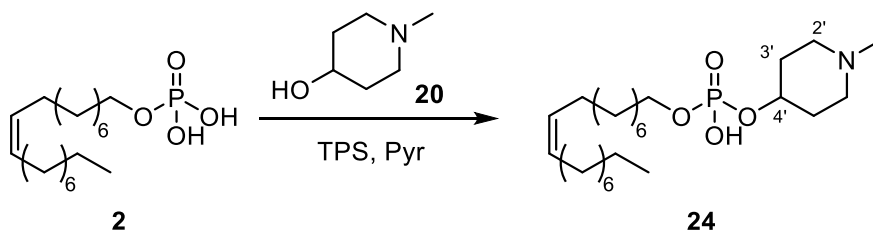
To a solution of tosylate salt **26** (26 mg, 0.055 mmol) in 2-butanone (165 μl), LiBr (16 mg, 0.11 mmol) was added at once. The resulting mixture was heated at 89 °C for 1.5 h. Then, the reaction mixture was diluted in HCCl_3 and one drop of H_2O was added. The resulting mixture was homogenized with the minimum amount of MeOH required and

the resulting suspension was directly filtered on a short silica gel plug eluting with $\text{HCCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5) to afford **25** (25 mg) in quantitative yield.

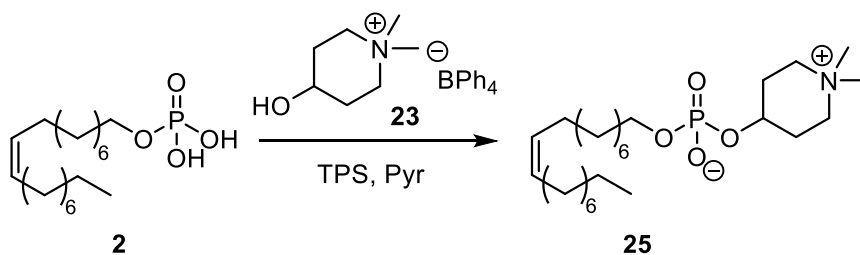
Reaction of 10 with 23: 25



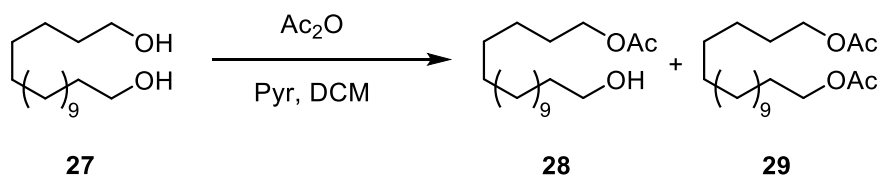
To a solution containing POCl_3 (0.28 ml, 2.97 mmol) in DCM (1.5 ml) cooled at 0 °C, a solution of oleyl alcohol **1** (724 mg, 2.70 mmol) dissolved in DCM (6 ml) is added dropwise. Once the addition was completed, the reaction is stirred at 0 °C for additional 24 h. Afterwards, pyridine (1.7 ml) was added, followed by addition of solid piperidinium salt **23** (2.55 g, 5.64 mmol) at once. The resulting reaction mixture was stirred at r.t. for additional 48 h. The reaction is quenched by addition of H_2O (1 ml). The resulting mixture was stirred for 1 h and then, evaporated under vacuum adding $\text{PhCH}_3:\text{EtOH}$ (1:1) still is completely dried. The crude mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with: $\text{HCCl}_3:\text{MeOH}$ (6:4) and $\text{HCCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_3$ (65:30:5) resulting **25** (82 mg, 6 %).

Reaction of 2 with 20: 24

To a solution of **2** (127 mg, 0.36 mmol) in pyridine (2.1 ml), it was subsequently added TPS (140 mg, 0.46 mmol) and piperidine **20** (42 mg, 0.36). The resulting solution was heated for 1 h at 70 °C and then, it was stirred for additional 16 h at r.t. Afterwards, it was added 0.5 ml H₂O and the resulting mixture was stirred for 40 min. The reaction was evaporated under reduced pressure and the crude reaction product was purified by silica gel column chromatography eluting with HCl₃, HCl₃:MeOH (9:1) and HCl₃:MeOH:NH₃ (8:2:0.2) allowing the isolation of **24** (41 mg, 26 %)

Reaction of 2 with 23: 25

To a solution of **2** (85 mg, 0.24 mmol) in pyridine (1.4 ml), it was subsequently added TPS (94 mg, 0.31 mmol) and piperidine **20** (28 mg, 0.24). The resulting solution was heated for 1 h at 70 °C and then, it was stirred for additional 16 h at r.t. Afterwards, it was added 0.3 ml H₂O and the resulting mixture was stirred for 40 min. The reaction was evaporated under reduced pressure and the crude reaction product was purified by silica gel column chromatography eluting with HCl₃, HCl₃:MeOH (9:1) and HCl₃:MeOH:H₂O (8:2:0.2) allowing the isolation of **24** (24 mg, 22 %).

Acetylation of 27: 28 and 29

To a solution of diol **27** (1.19 g, 4.6 mmol) in DCM (30 ml) and pyridine (15 ml), Ac₂O (0.43 ml, 4.6 mmol) was slowly added. The resulting reaction solution was stirred for 12 h at r.t. Afterwards, it was added H₂O, extracted with EtOAc and the organic phase was washed with HCl (2 M), NaHCO₃ (6 %) and NaCl (sat.). The combined organic extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude reaction product was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (85:15) obtaining **128** (1.13 g, 82 %) and **29** (65 mg, 5 %).

1,16-hexadecanediol monoacetate, 28:

IR (film) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 2926, 2855, 1742, 1465, 1383, 1365, 1240, 1037, 723.

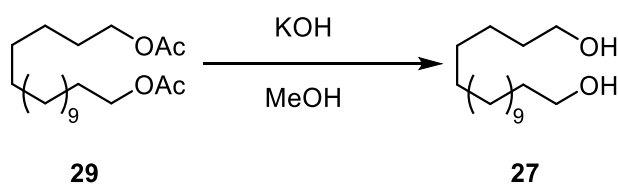
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 4.03 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, H-16), 3.60 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H-1), 2.02 (3H, s, -OAc), 1.69-1.23 (28H, m).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 171.3 (-OOCCH₃), 64.7 (C-1), 63.0 (C-16), 32.8-25.7 (C-2-15), 21.0 (-OAc).

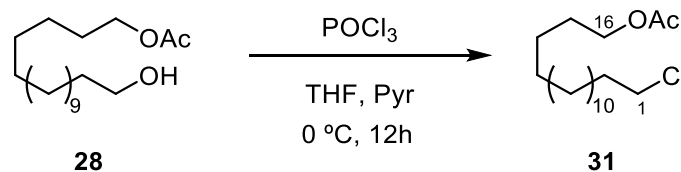
1,16-hexadecanediol diacetate, 29:

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 4.05 (4H, t, $J = 6.6$ Hz, H-1 and 16), 2.02 (6H, s, -OOCCH₃), 1.61 (4H, m, H-2 and 15), 1.25 (28H, m).

Hydrolysis of 29: 27



To a solution of diol **29** (0.428 g, 1.25 mmol) in MeOH (5 ml), KOH was added and the resulting solution was stirred at r.t. for 12 h. The resulting suspension was diluted in H₂O and stirred for 10 min. The resulting mixture was extracted with DCM. The combined organic extracts were washed with NaCl (sat.). The combined organic extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. Obtaining a white solid corresponding to diol **27** (320 mg, 99 %).

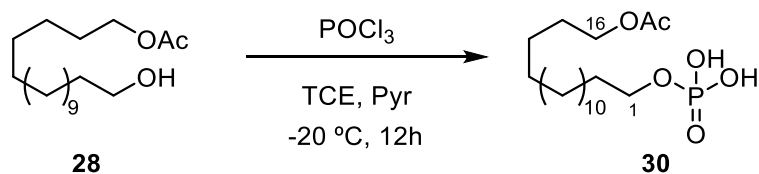
Reaction of 28 with POCl₃: 31

To a solution of **28** (420 mg, 1.40 mmol) in anhydrous THF (2.3 ml) and cooled at 0 °C, it was added pyridine (220 μ l, 2.77 mmol) and dropwise 134 μ l (0.51 mmol) of freshly distilled POCl₃. The resulting solution was stirred for 12 h at 0 °C. Afterwards, a few drops of Na₂CO₃ (6%) were added and the reaction was stirred for additional 10 min. Then, HCl 2 M was carefully added to adjust the acidity of the reaction mixture to pH=2 and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with H₂O and evaporated under vacuum resulting **31** (432 mg, 97 %).

1-acetoxy-16-chlorohexadecane, 31:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 4.05 (2H, t, J = 8.0 Hz, H-1), 3.53 (2H, m, H-16), 2.04 (3H, s, -OOCH₃), 1.77-1.11 (22H, m).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 171.2 (-OOCCH₃), 64.6 (C-1), 45.2 (C-16), 32.6-22.6 (C 2-15), 21.0 (-OOCCH₃).

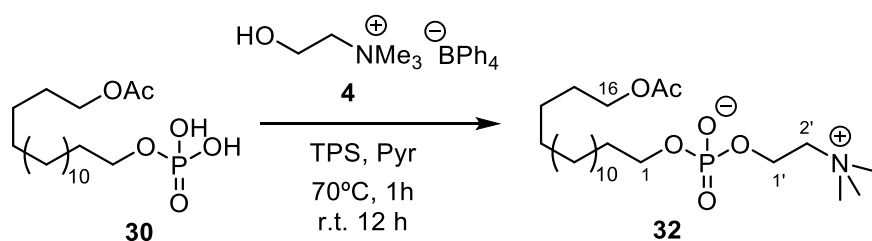
Reaction of 28 with POCl₃: 30

To a solution of **28** (138 mg, 0.46 mmol) in anhydrous TCE (2.3 ml) and cooled at -20 °C, it was added pyridine (77 μ l, 0.97 mmol) and slowly 47 μ l (0.51 mmol) of freshly distilled POCl₃. The resulting solution was stirred for 12 h at -20 °C. Afterwards, a few drops of Na₂CO₃ (6%) were added and the reaction was stirred for additional 10 min. Then, HCl 2M was carefully added to adjust the acidity of the reaction mixture to pH=2 and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with H₂O and evaporated under vacuum resulting **30** (162 mg, 93 %).

16-acetoxyhexadecan-1-yl dihydrogenphosphate, 30:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 4.02 (2H, t, J = 8 Hz, H-16), 3.91 (2H, m, H-1), 2.03 (3H, s, -OAc), 1.77-1.11 (22H, m).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 171.2 (-OOCCH₃), 66.6 (C-1), 64.6 (C-16), 32.6-22.6 (C 2-15), 21.0 (-OOCCH₃).

Esterification reaction of 30 with 4: 32

To a solution of **30** (162 mg, 0.42 mmol) in pyridine (3.2 ml), 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride, TPS (141 mg, 0.46 mmol) and recrystallized choline tetraphenylborate **4** (181 mg, 0.42 mmol) were added at once. The resulting mixture is heated at 70°C for 1 h followed by stirring at r.t. for 12 h. Then, H₂O was added and evaporated under vacuum. The crude reaction product was purified by silica gel column chromatography eluting with CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1) and CHCl₃:MeOH: H₂O (65:30:5) obtaining **32** (80 mg, 41%).

16-acetoxyhexadecyl-1-phosphocholine, 32:

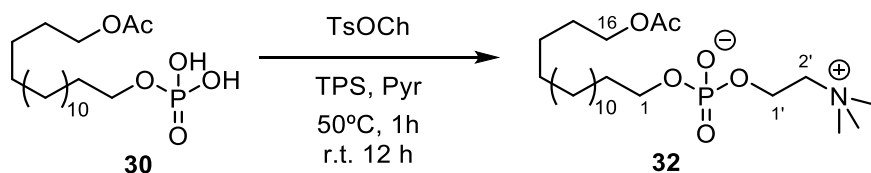
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 4.42 (2H, m, H-1'), 4.04 (2H, t, *J* = 8 Hz, H-16), 3.90 (2H, m, H-2'), 3.60 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H-1), 3.44 (9H, bs, NMe₃), 2.04 (3H, s, -OAc), 1.61 (4H, m, H-2 and 15), 1.25 (24H, H 3-14).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 171.1 (-OOCCH₃), 66.8 (C-2'), 64.6 (C-16), 62.6 (C-1), 59.9 (C-1'), 54.4 (NMe₃), 30.5-29.0 (C-2 and 4-14), 25.8 (C-3), 21.0 (-OOCCH₃).

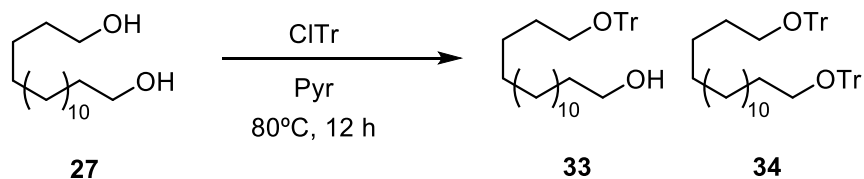
HRMS (ESI): Calcd. for C₂₃H₄₉O₆NP⁺ (M+H⁺): 466.32920 uma; found: 466.3290 uma.

HMBC and HSQC: see *Bidimensional tables*.

Esterification reaction of 30 with choline tosylate: 32



To a solution of **30** (250 mg, 0.65 mmol) in pyridine (4.9 ml), 2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl chloride, TPS (217 mg, 0.65 mmol) and choline tosylate (179 mg, 0.65 mmol) were added at once. The resulting mixture is heated at 50 °C for 1 h followed by stirring at r.t. for 12 h. Then, H₂O was added and evaporated under vacuum. The crude reaction product was purified by silica gel column chromatography eluting with CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1) and CHCl₃:MeOH: H₂O (65:30:5) obtaining **32** (36 mg, 12%).

Protection of diol **27 as tritylether: **33** and **34****

To a solution of **27** (2.0 g, 4.76 mmol) in pyridine (35 ml), trityl chloride (1.33 g, 4.76 mmol) was added at once and the resulting mixture was heated at 80 °C for 12 h. After that time, it was added ice and the mixture was extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed with HCl (2 M), NaHCO₃ (6 %) and NaCl (sat.), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude product was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (92:8) **33** (1.70 g, 71 %) and **34** (221 mg, 6%)

16-trityloxyhexadecan-1-ol, 33:

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3338, 3057, 2927, 2853, , 1489, 1448, 1070, 744, 705, 632.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7.48-7.19 (15H, m, Ph₃C-O), 3.65 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H-1), 3.05 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H-16), 1.59 (4H, m, H 2 and 15), 1.26 (24H, m, H-3 to 14).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 144.4 (C-1'), 128.6 (C-3'' and 5'), 127.6 (C-2' and 6'), 126.7 (C-4'), 86.2 (Ph₃C-O), 63.6 (C-16), 62.9 (C-1), 32.7-25.7 (C-3 to 15).

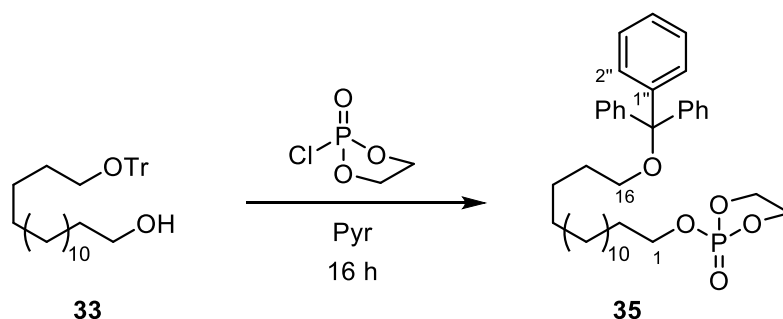
HRMS (ESI): Calcd for (M+Na⁺) C₃₅H₄₈O₂+Na⁺: 523.35520 uma; found 523.3546 uma.

1,16-ditritylhexadecane, 34:

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3059, 2903, 2853, 1597, 1493, 1219, 2070, 899, 744, 705, 632.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7.51-7.15 (30H, m, Ph₃C-O), 3.07 (4H, t, *J* = 6.6 Hz, H 1 and 16), 1.62 (4H, m, H 2 and 15), 1.28 (24H, m, H-3 to 14).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 144.5 (C-1''), 128.7 (C-3'' and 5''), 127.7 (C-2'' and 4''), 126.8 (C-4''), 86.2 (Ph₃C-O), 63.7 (C-1 and 16), 30.9-26.3 (C-3 to 15).

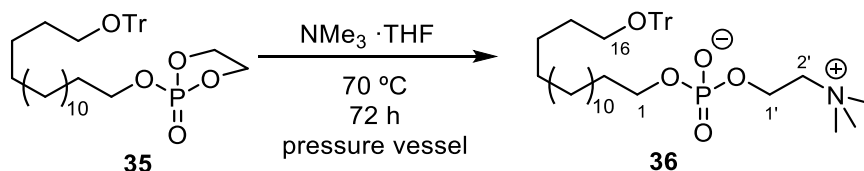
Preparation of phospholane 35 from 33

To a solution of **33** (1 g, 2.00 mmol) in pyridine (10 ml) at 0 °C, 2-chloro-2-oxa-1,3,2-dioxaphospholane (1.1 ml, 12 mmol) was added dropwise. The resulting mixture was stirred at that temperature for 16 h. After that time, solvent was evaporated under vacuum obtaining **35** that was used immediately in the next reaction: phospholane ring-opening by NMe₃.

2-(16-trityloxyhexadecyloxy)-1,3,2-dioxaphospholane -2-oxide, 35:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7.46-7.19 (15H, m, Ph₃C-O), 4.42 and 4.35 (2H, m each, PO-CH₂-CH₂-O), 4.15 (2H, m, H-1), 3.03 (2H, t, *J* = 8 Hz, H-16), 1.69 (2H, m, H-2), 1.61 (2H, m, H-15), 1.23 (24H, m, H 3-14).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 144.5 (C-1''), 128.7 (C-3'' and 5''), 127.6 (C-2'' and 6'') and 126.8 (C-4''), 86.2 (OCPh₃), 69.2 (C-1), 65.9 (PO-CH₂-CH₂-O), 63.7 (C-16), 30.4 (C-2), 30.3 (C-15), 30.0-25.3 (C 3-14).

Reaction of 35 with NMe₃: 36

To the phospholane derivative **35** (1.0 g, 1.6 mmol) placed in a pressure vessel, a NMe₃ solution 1.0 M in THF (7 ml) was added. The vessel was closed and heated at 70 °C for 72 h. Afterwards, the reaction is evaporated under vacuum and the crude mixture is purified by silica gel column chromatography eluting with CHCl₃:MeOH (9:1) and CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5) affording **36** (55 mg, 5 %).

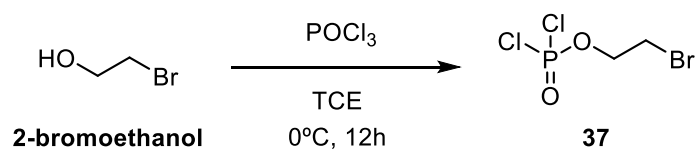
16-trityloxyhexadecyl-1-phosphocholine, 36:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 7.38-7.21 (15H, m, Ph₃C-O), 4.02 (2H, bs, H-1'), 3.60 (2H, q, *J* = 6.6 Hz, H-1), 3.49 (2H, m, H-2'), 3.12 (9H, s, Me₃N-), 2.93 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H-16), 1.58-1.49 (2H, m, H-15), 1.49-1.40 (2H, m, H-2), 1.34-1.08 (24H, m, H-3 to 15).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 144.1 (C-1''), 128.8 (C-3'' and 5''), 127.7 (C-2'' and 6''), 126.9 (C-4''), 85.7 (O-CPh₃), 65.4 (C-2'), 64.1 (C-1), 62.8 (C-16), 58.3 (C-1'), 53.1 (Me₃N), 30.5 (C-2), 29.2 (C-15), 29.1-25.5 (C-3 to 14).

HRMS (ESI): Calcd. for C₄₀H₆₁O₅NP⁺ (M+H⁺): 666.42819 uma; found: 666.4271 uma.

HMBC and HSQC: see *Bidimensional tables*.

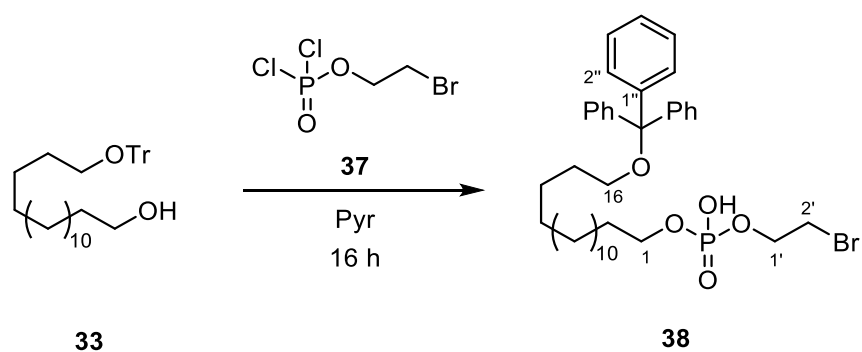
Preparation of 2-bromoethyldichlorophosphane: 37

To a solution of POCl₃ (475 mg, 3.61 mmol) in 1,1,2-trichloroethylene (TCE, 0.3 ml) cooled at 0 °C, 2-bromoethanol was added dropwise. The reaction was stirred at r.t. for 12 h. After that time, toluene (4.5 ml) was added and the solution was evaporated at 40 °C under vacuum to afford **37** (777 mg, 87 %), that was used immediately in the next reaction.

2-bromoethyldichlorophosphate, 37:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 4.50 (2H, m, H-1), 3.61 (2H, m, H-2).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ/ppm: 68.3 (C-1, d, *J* = 6.0 Hz), 28.1 (C-2, d, *J* = 9.0 Hz).

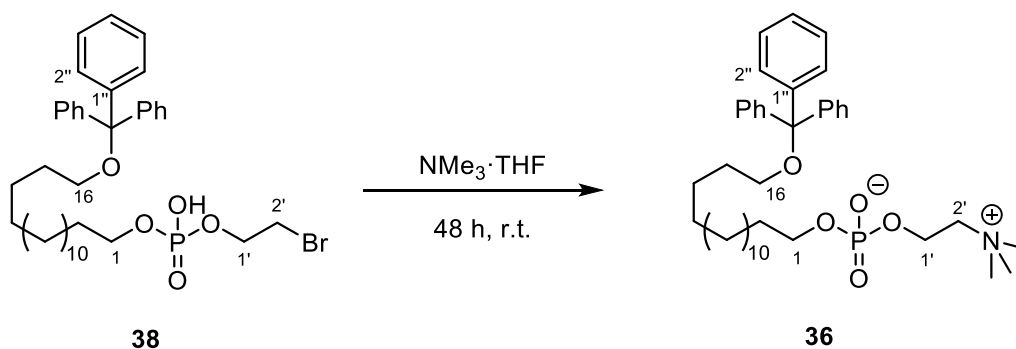
Reaction of 33 with 37: 38

To a solution of immediately before prepared **37** in TCE (4 ml) cooled at 0 °C, a solution of hydroxyderivative **33** (1.5 g, 3.00 mmol) in TCE (4.9 ml) and Et₃N (1 ml) was added slowly meanwhile an argon current is passed through the flask atmosphere for removing the HCl (g) generated. The resulting solution was stirred at r.t. for 20 h. After that time, pyridine (722 μl, 8.99 mmol) and ice were sequentially added and the reaction was stirred for additional 1 h. Then, HCl 2 M was slowly added to acidulate still pH = 2. The resulting mixture was placed in a separatory funnel and the organic layer is separated and neutralized by addition of aqueous Ba(OAc)₂ (10%). The resulting organic phase was evaporated under reduced pressure to afford **38** that was used in the next reaction without further purification.

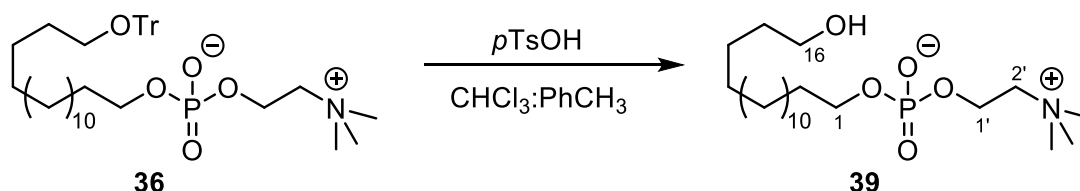
2-bromoethyl (16-(trityloxy)hexadecyl) hydrogenphosphate, 38:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7.45-7.21 (15H, m, O-CPh₃), 4.34 (2H, m, H-1'), 4.11 (2H, m, H-1), 3.55 (2H, m, H-2'), 3.03 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, H-16), 1.70 (2H, m, H-15), 1.61 (2H, m, H-2), 1.26 (24H, m).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 144.5 (C-1''), 128.7 (C-3'' and 5''), 127.6 (C-2'' and 6''), 126.7 (C-4''), 86.2 (O-CPh₃), 68.7 (C-1), 67.2 (C-1'), 63.6 (C-16), 29.5 (C-2'), 32.6-25.3 (C 2-15).

Reaction of 38 with NMe₃: 36

Compound **38** (100 mg, 0.145 mmol) was placed in a round-bottomed flask and a solution of NMe₃ 1.0 M in THF (2 ml) was added. The resulting solution was stirred at r.t. for 48 h. After that time, a white solid appeared in suspension and the reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The crude reaction product was purified by silica gel column chromatography eluting with CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1 to 8:2) and CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5) to afford **36** (70 mg, 72 %).

Reaction of 36 with *p*-TsOH: 39

To a solution of **36** (55 mg, 0.083 mmol) in CHCl_3 : PhCH_3 (1.1 ml, 9:1), *p*TsOH (13.8 mg, 0.072 mmol) was added and the resulting mixture was stirred for 4 h at r.t. Then, H_2O (1 drop) was added and the resulting mixture was homogenized with the minimum amount of MeOH and directly purified by silica gel column chromatography eluting with CHCl_3 :MeOH (9:1 to 8:2) and CHCl_3 :MeOH: H_2O (65:30:5) to afford **39** (31 mg, 89 %).

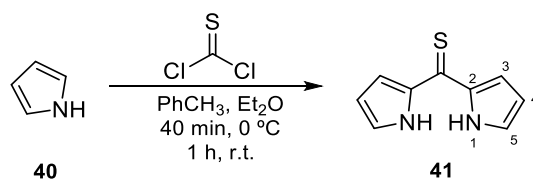
16-hydroxyhexadecyl-1-phosphocholine, 39:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ /ppm: 4.20 (2H, m, H-1'), 3.79 (2H, m, H-1), 3.58 (2H, m, H-2'), 3.36 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-16), 3.12 (9H, s, Me_3N -), 1.53 (2H, m, H-2), 1.38 (2H, m, H-15), 1.23 (24H, m, H-3 to 14).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ /ppm: 65.5 (C-1), 65.0 (C-2'), 60.7 (C-16), 59.1 (C-1'), 53.1 (Me_3N), 32.5 (C-15), 30.1 (C-2), 29.0-25.2 (C 3-14).

HRMS (ESI): Calcd. for $(\text{M}+\text{H}^+)$: 424.58276 uma; found: 424.31864 uma

HMBC and HSQC: see *Bidimensional tables*.

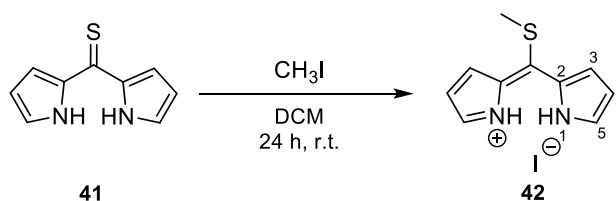
Reaction of 40 with thiophosgene: 41

To a solution of thiophosgene (32 ml, 4.2 mmol) in toluene (10 ml) cooled at 0 °C, a pyrrole **40** (605 mg, 8.4 mmol) solution in Et₂O (15 ml) also cooled at 0 °C was added dropwise. The resulting solution was stirred at 0 °C for additional 40 min and then, 10 % aqueous MeOH (12 ml) was slowly added. The resulting mixture was stirred at r.t. for 1 h. The resulting mixture was evaporated under reduced pressure in fumehood. The crude reaction mixture was dissolved in PhCH₃:CHCl₃ (9:1) and was purified in neutral alumina column chromatography eluting isocratically to obtain **41** (420 mg, 57 %).

Bis-(1*H*-pyrrol-2-yl)-methanethione, 41:

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 9.78 (2H, b.s., 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).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 193.1 (-C=S), 138.1(C-2), 127.6 (C-5), 114.7 (C-3), 112.4 (C-4).

Methylation of 41: 42

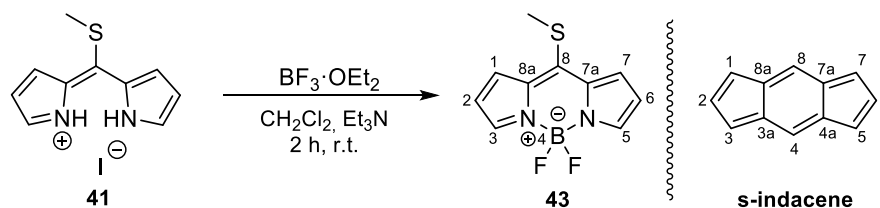
To a solution of **41** (285 mg, 1.62 mmol) in DCM (4.8 ml), CH_3I (250 μl) was added slowly. The resulting mixture was stirred at r.t. for 24 h. After that time, the reaction was evaporated under reduced pressure to result **42** that was used in the next reaction without further purification.

2-[methyl sulfanyl-(1H-pyrrol-2-yl)-methylene]-2H-pyrrolonium iodide, 42:

IR (film) ν_{max} cm^{-1} : 3111, 1549, 1435, 1338, 1045.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 12.03 (2H, bs, $\underline{\text{H-N}}$), 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, SCH_3).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 163.7 ($-\underline{\text{CSMe}}$), 139.7 (C-5), 130.6 (C-2), 129.8 (C-3), 117.7 (C-4), 22.7 ($\text{CH}_3\text{-S-}$)

Reaction of 41 with BF₃·OEt₂ 43

To a solution of **41** (690 mg, 2.17 mmol) in DCM (16.1 ml), Et₃N (505 μ l, 3.64 mmol) was added and the resulted mixture was stirred at r.t. for 40 min, then BF₃·OEt₂ (413 μ l, 3.26 mmol) was added and the resulting solution was stirred for additional 2 h. The mixture was carefully evaporated under reduced pressure followed by purification in a silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (9:1) isolating **43** (470 mg, 91 %).

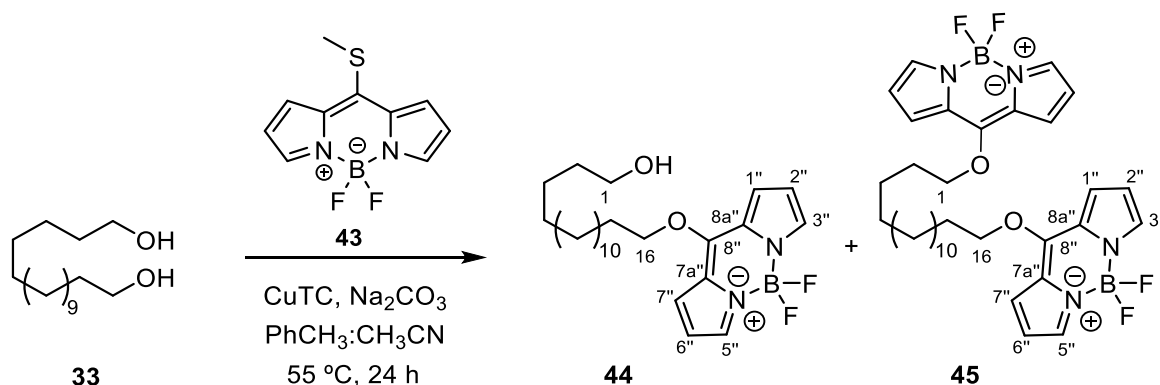
8-(thiomethyl)-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, 43:

UV (EtOH) (λ max/nm): 490

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7.79 (2H, bs, H-3 and 5), 7.42 (2H, d, J = 4.2 Hz, H-1 and 7), 6.53 (2H, d, J = 4.2 Hz, H-2 and 6), 2.91 (3H, s, -SCH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 154.0 (C-8), 141.6 (C-3 and 5), 134.1 (C-8a and 7a), 127.8 (C-2 and 6), 118.1 (C-1 and 7), 20.7 (CH₃-S).

HMBC and HSQC: see *Bidimensional tables*.

Reaction of 33 with BODIPY 43: 44

To a solution of **42** (143 mg, 0.6 mmol) in CH_3CN (2 ml) placed in a Schlenk flask, CuTC (463 mg, mmol) and Na_2CO_3 (725 mg, mmol) were added and the resulting mixture was stirred for 20 min at r.t.. Then, a solution of 1,16-hexadecanediol (150 mg, 0.6 mmol) in CH_3CN (5 ml) and PhCH_3 (3 ml) was added. The resulting reaction mixture was stirred for 24 h at 55 °C. The resulting solution was evaporated under vacuum and the crude reaction product was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (8:2) to afford **44** (147 mg, 55%), **45** (73 mg, 19%) and unreacted starting materials **33** and **42**.

16-(4,4-difluoro-4bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yloxy)-1-hexadecanol, 44:

IR (film) ν_{max} cm^{-1} : 3048, 2952, 2928, 2855, 1740, 1549, 1245, 960.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7.73 (2H, m, H-3'' and 5''), 7.34 (2H, d, $J = 4.1$ Hz, H-1'' and 7''), 6.52 (2H, dd, $J = 4.1$ and 1.8 Hz, H-2'' and 6''), 4.69 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-16), 3.63 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, H-1), 1.96 (2H, m, H-15), 1.54 (4H, m, H-2 and 14), 1.27 (22H, m).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 161.5 (C-8''), 139.0 (C-3'' and 5''), 126.2 (C-7a'' and 8a''), 125.1 (C-1'' and 7''), 116.2 (C-2'' and 6''), 75.3 (C-16), 63.1 (C-1), 32.8 (C-2), 30.9-29.1 (C 4-15), 25.7 (C-3).

HRMS (ESI): Calcd. for $(\text{M}+\text{Na}^+)$ $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}^+$: 471.2970 uma; found: 471.2971 uma.

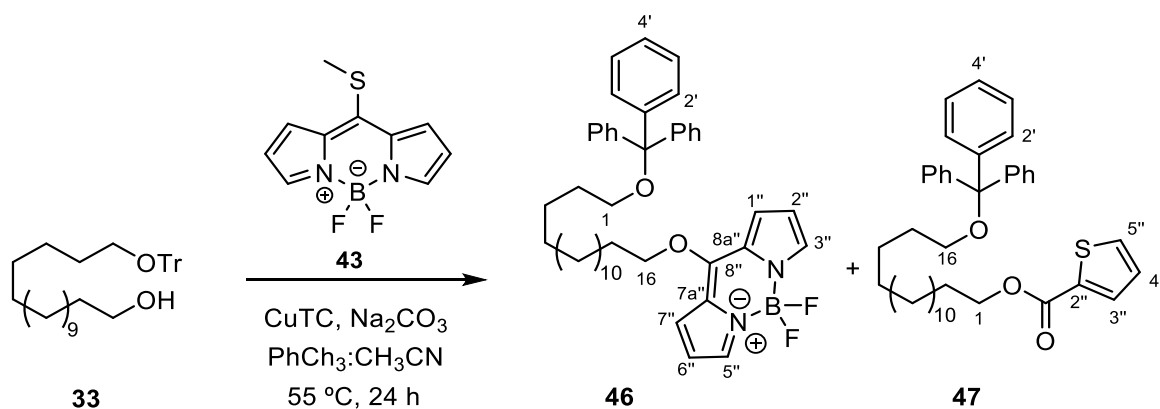
HMBC and HSQC see *Bidimensional tables*.

1,16-bis(4,4-difluoro-4bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yloxy)hexadecane, 45:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7.73 (4H, m, H-3'' and 5''), 7.32 (4H, m, H-1'' and 7''), 6.52 (4H, m, H-2'' and 6''), 4.69 (4H, t, *J* = 6.4 Hz, H-1 and 16), 1.95 (2H, m, H-2 and 15), 1.28 (28H, m).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 161.5 (C-8''), 139.0 (C-3'' and 5''), 126.2 (C-7a'' and 8a''), 125.1 (C-1'' and 7''), 116.2 (C-2'' and 6''), 75.4 (C-1 and 16), 29.6-25.8 (C 2-15).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+H⁺) C₃₄H₄₅B₂F₄N₈O₂⁺: 639.3665 uma; found: 639.3662 uma.

Reaction of 33 with BODIPY 43: 46

To a solution of **43** (536 mg, 2.25 mmol) in CH₃CN (1 ml), thiofene-2-carboxylate CuTC (358 mg, 1.84 mmol) and **33** (537 mg, 1.07 mmol) dissolved in CH₃CN (4 ml) and PhCH₃ (2.5 ml) were subsequently added and the resulting mixture was stirred for 15 mins at r.t.. After that time, Na₂CO₃ (195 mg, 1.07 mmol) was added and the reaction was heated at 55 °C for 24 h. Then, the reaction was evaporated under reduced pressure and the crude reaction product was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (9:1) to afford **46** (687 mg, 93 %) and **47** (69 mg, 5 %).

16-(4,4-difluoro-4bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yloxy)-1-trityloxyhexadecane, 46:

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 2956, 2931, 2855, 1727, 1551, 1411, 1285, 968.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7.70 (2H, m, H-3'' and 5''), 7.42-7.15 (15H, m, Ph₃CO), 7.30 (2H, d, *J* = 4.1 Hz, H-1'' and 7''), 6.48 (2H, dd, *J* = 4.1 and 2.0 Hz, H-2'' and 6''), 4.65 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, H-16), 3.01 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, H-1), 1.95 (2H, m, H-15), 1.58 (2H, quin, *J* = 7.8 Hz, H-2), 1.50 (2H, m, H-14), 1.26 (22H, m).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 161.5 (C-8''), 144.5 (C-1'), 139.0 (C-3'' and 5''), 128.9 (C-3' and 5'), 127.6 (C-2' and 6'), 126.7 (C-4'), 126.2 (C-7a'' and 8a''), 125.1 (C-1'' and 7''), 116.2 (C-2'' and 6''), 86.2 (O-CPh₃), 75.4 (C-16), 63.7 (C-1), 30.0 (C-2), 26.3 (C-3), 25.8 (C-14) 29.6-29.1 (C 4-13 and 15).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+H⁺) C₄₄H₅₄BF₂N₂O₂⁺: 691.4264 uma; found: 691.4259 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

16-(trityloxy)hexadecyl tiophene-2-carboxylate, 47:

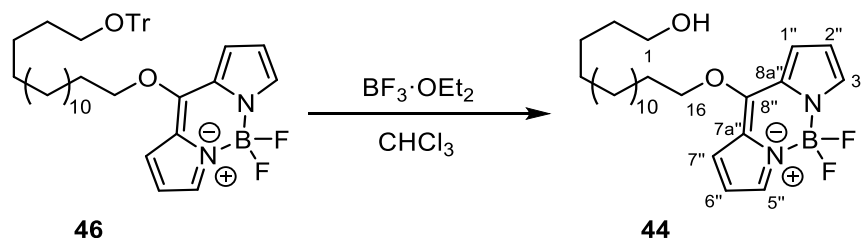
IR (film) ν_{\max} cm^{-1} : 2960, 2929, 2858, 1748, 1727, 1553, 1252, 1110.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7.77 (1H, dd, $J = 3.8$ and 1.2 Hz, H-3''), 7.50 (1H, dd, $J = 5.0$ and 1.2 Hz, H-5''), 7.05 (1H, dd, $J = 5.0$ and 3.8 Hz, H-4''), 7.43-7.17 (15H, m, $\text{Ph}_3\text{CO-}$), 4.26 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-1), 3.01 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, H-16), 1.71 (2H, quin, $J = 7.6$ Hz, H-2), 1.59 (2H, quin, $J = 7.0$ Hz, H-15), 1.22 (24H, m, H 3-14).

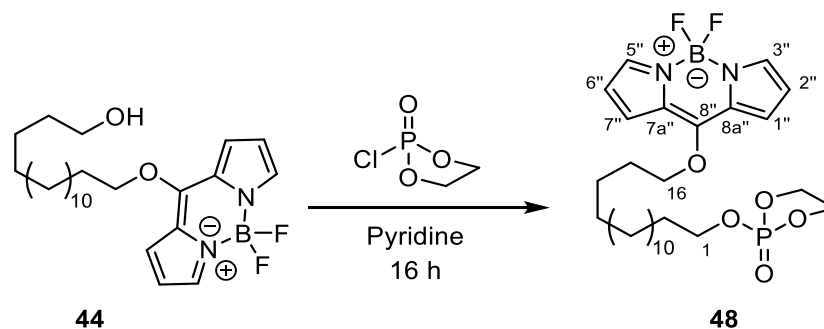
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 162.3 (C=O), 144.5 (C-1'), 134.1 (C-2''), 133.2 (C-3''), 132.1 (C-5''), 128.6 (C-3' and 5'), 127.7 (2' and 6'), 127.9 (C-4''), 126.8 (C-4'), 86.2 (OCPh_3), 65.3 (C-1), 63.7 (C-16), 30.0-25.9 (C 2-15).

HRMS (ESI): Calcd. for $(\text{M}+\text{H}^+)$ $\text{C}_{40}\text{H}_{51}\text{O}_3\text{S}^+$: 611.3553 uma; found: 611.3559 uma.

Deprotection of 46 with $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$: 44



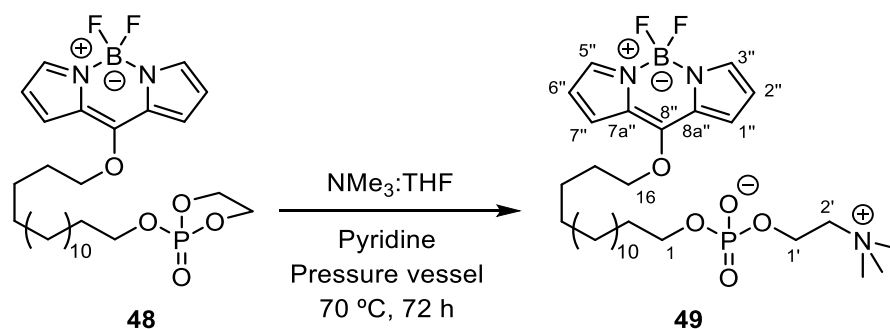
To a solution of **46** (481 mg, 0.70 mmol) in CHCl_3 (7.8 ml) cooled at 0°C , $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (84 μl , 0.007 mmol) was slowly added. The resulting solution was stirred at that temperature for 15 min and additional 30 min at r.t.. Then, the reaction was cooled to 0°C and $\text{H}_2\text{O}:\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:2:1) was added, the organic phase was separated and the aqueous phase was extracted twice with CHCl_3 . The combined organic extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The crude reaction product was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (7:3) resulting **44** (290 mg, 93 %).

Preparation of phospholane 48 from 44

To a solution of **44** (214 mg, 0.48 mmol) in pyridine (2.5 ml) cooled at 0 °C, 2-chloro-2-oxa-1,3,2-dioxaphospholane (264 μ l, 2.88 mmol) was slowly added. The resulting solution was stirred at that temperature for 16 h. After that time, the reaction was evaporated under vacuum obtaining **48** that was used immediately in the next reaction without further purification.

2-(16-(4,4-difluoro-4bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yloxy)hexadecyloxy)-1,3,2-dioxaphospholane-2-oxyde, 48:

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7.73 (2H, m, H-3'' and 5''), 7.34 (2H, d, $J = 4.1$ Hz, H-1'' and 7''), 6.52 (2H, dd, $J = 4.1$ and 1.8 Hz, H-2'' and 6''), 4.69 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-16), 4.41 and 4.35 (4H, m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.14 (2H, q, $J = 4.1$ Hz, H-1), 1.96 (2H, m, H-15), 1.69 (2H, m, H-2), 1.56 (2H, m, H-14), 1.27 (24H, m).

Reaction of 48 with NMe₃: 49

To the previously synthesized phospholane derivative **48** (266 mg, 0.48 mmol), a solution of NMe₃ 1.0 M in THF was added. The pressure vessel was closed and heated at 70 °C for 72 h. After that time, the reaction was evaporated under vacuum. The purification of the crude reaction mixture by silica gel column chromatography eluting with CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1) and CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5) obtaining **49** (14 mg, 5 %).

16-(4,4-difluoro-4bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yloxy)hexadecylphosphocholine, 49:

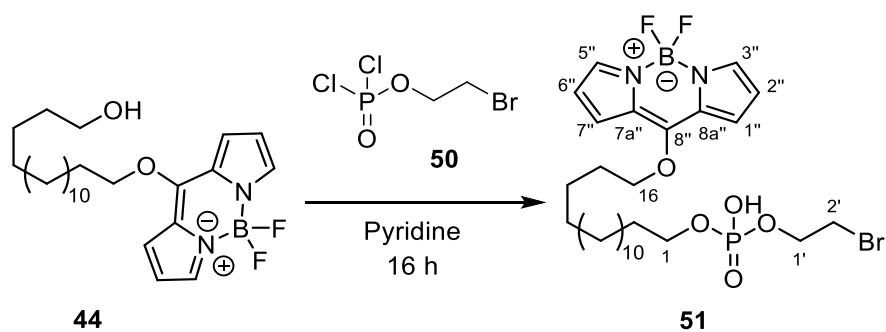
UV (EtOH) (λ max/nm): 444

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 7.80 (2H, s, H-3'' and 5''), 7.56 (2H, d, J = 4.0 Hz, H-1'' and 7''), 6.63 (2H, dd, J = 4.0 and 2.1 Hz, H-2'' and 6''), 4.84 (2H, t, J = 6.5 Hz, H-16), 4.01 (2H, m, H-1'), 3.59 (2H, q, J = 6.5 Hz, H-1), 3.51 (2H, m, H-2'), 3.34 (9H, s, NMe₃), 1.91 (2H, m, H-15), 1.46 (4H, m, H-2 and 14), 1.19 (22H, m, H 3-13).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ /ppm: 161.4 (C-8''), 138.8 (C-3'' and 5''), 125.7 (C-1'' and 7''), 125.6 (C-7a'' and 8a''), 116.4 (C-2'' and 6''), 76.0 (C-16), 65.5 (C-2'), 63.9 (C-1), 58.2 (C-1'), 53.1 (NMe₃), 31.3-25.5 (C 2-14), 25.3 (C-15).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+H⁺) C₃₀H₅₁¹⁰BF₂N₃O₅P⁺: 613.37365 uma; found: 613.3731 uma.

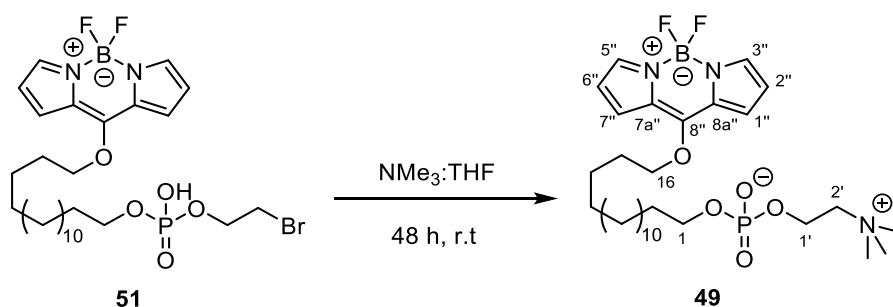
HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

Reaction of 44 with 50: 51

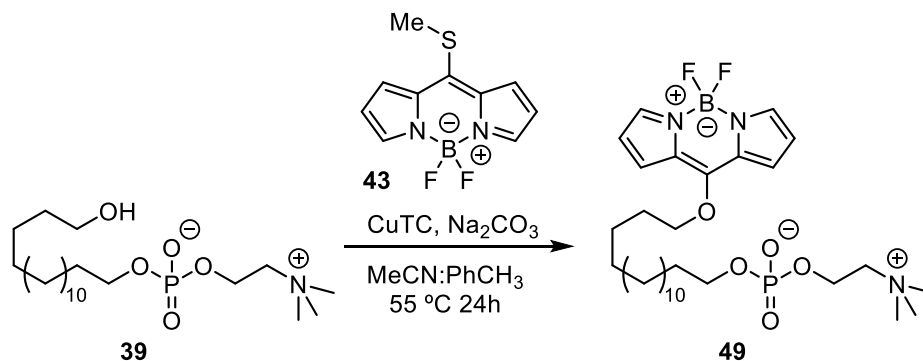
To a solution of immediately before prepared **50** in TCE (1 ml) cooled at 0 °C, a solution of hydroxyderivative **44** (476 mg, 0.75 mmol) in TCE (1.3 ml) and Et₃N (250 μl) was added slowly meanwhile an argon current is passed through the flask atmosphere for removing the HCl (g) generated. The resulting solution was stirred at r.t. for 20 h. After that time, pyridine (181 μl, 2.25 mmol) and ice were sequentially added and the reaction was stirred for additional 1 h. Then, HCl 2 M was slowly added to acidulate still pH = 2. The resulting mixture was placed in a separatory funnel and the organic layer is separated and neutralized by addition of aqueous Ba(OAc)₂ (10%). The resulting organic phase was evaporated under reduced pressure to afford an oil that was redissolved in acetone and the crystallization at -14 °C allow the obtention of product **51**.

2'-bromoethyl 16-(4,4-difluoro-4bora-3a,4a-diaza-s-indacen-8-yloxy) hexadecyl hydrogenphosphate, 51:

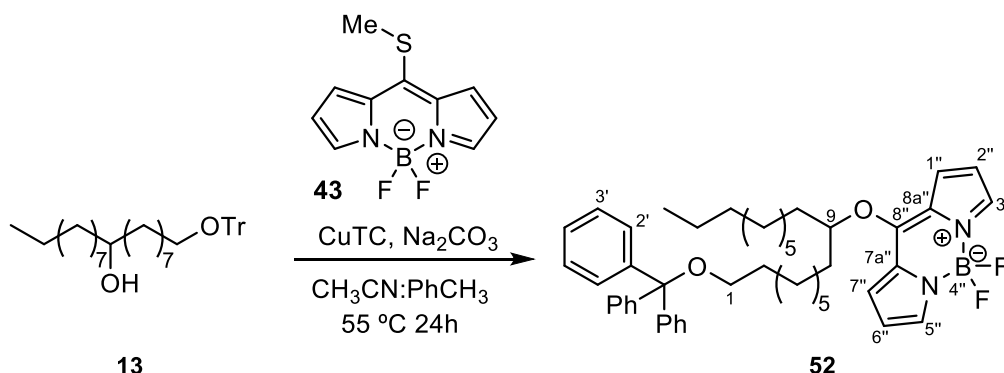
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 7.72 (2H, m, H-3'' and 5''), 7.34 (2H, d, *J* = 3.8 Hz, H-1'' and 7''), 6.51 (2H, m, H-2'' and 6''), 4.68 (2H, t, *J* = 6.2 Hz, H-16), 4.45 (2H, m, H-1'), 4.25 (2H, m, H-1), 3.53 (2H, m, H-2'), 1.94 (2H, m, H-15), 1.68 (4H, m, H-2), 1.25 (24H, m).

Reaction of 51 with NMe₃: 49

Compound **51** (315 mg, 0.496 mmol) was placed in a round-bottomed flask and a solution of NMe₃ 1.0 M in THF (6.8 ml) was added. The resulting solution was stirred at r.t. for 48 h. After that time, a white solid appeared in suspension and the reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The crude reaction product was purified by silica gel column chromatography eluting with CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1 to 8:2) and CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5) obtaining **49** (12 mg, 4 %).

Reaction of 39 with fluorophore 43: 49

To a solution of **39** (15 mg, 0.035 mmol) in MeCN:PhCH₃ (1.56 ml, 2:1), BODIPY **43** (27 mg, 0.110 mmol), CuTC (20 mg, 0.105 mmol) and Na₂CO₃ (11 mg, 0.103 mmol) were added. The resulting mixture was heated at 55 °C for 24 h. Then, the reaction was cooled to r.t. and solvent was evaporated under vacuum. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with CHCl₃, CHCl₃:MeOH (9:1 to 8:2) and CHCl₃:MeOH:H₂O (65:30:5) to afford unreacted starting material **39** (8 mg) and an enriched fraction of **49**, that is purified again by Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃:MeOH, 9:1), isolating **49** (9.9 mg, 46 %).

Reaction of 13 with fluorophore 43: YY52

To a solution of **43** (253 mg, 1.05 mmol) in MeCN (1.1 ml), it was fastlly added CuTC (167 mg, 0.86 mmol) and a solution of **13** (218 mg, 0.43 mmol) in CH₃CN (2.4 ml). The resulting mixture was stirred at r.t. for 5 min. Afterwards, it was added Na₂CO₃ (90 mg, 0.86 mmol). The resulting reaction mixture was heated at 55 °C for 24 h. Then, the reaction was evaporated under reduced pressure and the crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (97:3) resulting **52** (26 mg, 53 %) and recovering starting material **13** and fluorophore **43**.

9-O-(4,4,-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenyl)-1-trityloxyoctadecane, 53:

UV (EtOH) (λ max/nm): 441

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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, m, 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).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 161.4 (C-8''), 144.5 (C-1'), 138.8 (C-3'' and 5''), 128.7 (C-3' and 5'), 127.6 (C-2' and 6'), 126.7 (C-4'), 126.2 (C-7a'' and 8a''), 125.1 (C-1'' and 7''), 116.1 (C-2'' and 6''), 86.5 (O-CPh₃), 72.0 (C-9), 63.7 (C-1), 37.5-22.6 (C 2-8 and 10-17), 14.1 (C-18).

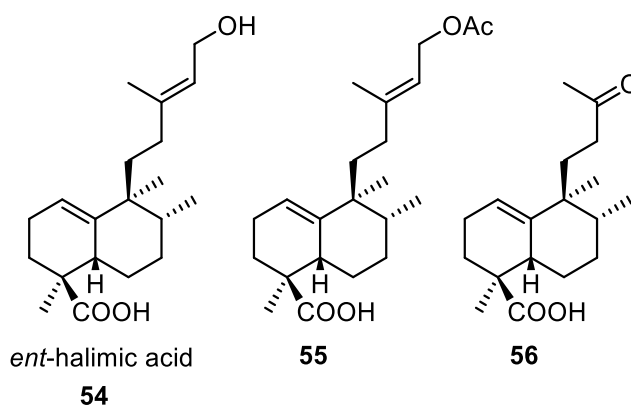
HRMS (ESI): Calcd. for (M+H⁺): C₄₇H₆₀BF₂N₂O₂⁺ 733.4716 uma; found: 733.4717 uma.

Ent-halimic acid extraction: 54

The *Halimium viscosum* plant was collected in Terradillos (Salamanca) in July 2019 and allowed to air drying for two weeks. Once it has dried, it was finely chopped, and the woody parts of the plant were discarded.

For the extraction of *ent*-halimic acid, 1.4 kg of the plant prepared as described before, were weighed and placed in an Erlenmeyer flask with 6 l of EtOAc and was stirred for 48 h. The ethyl acetate extract was filtered and evaporated, obtaining 147.1 g of extract, 10.5% (m/m of dry plant)

Purification of the plant extract was afforded taking 125 g of the ethyl acetate plant extract and chromatographed on 700 g of silica gel, eluting with Hex:EtOAc (9:1) and applying a polarity gradient. Finally, two major fractions were isolated: a fraction corresponding to *ent*-halimic acid **54** and its acetyl derivative **55** in a 1:2 ratio and the methylketone of *ent*-halimic acid, **56**.



15-hydroxy-ent-halima-1(10),13E-dien-18-oic acid, 54:

$[\alpha]_D^{20} = +62.4$ (*c* 0.40, CHCl₃)

IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3420, 2961, 2926, 2872, 2635, 1701, 1689, 1457, 1379, 1262, 1233.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.37 (2H, m, H-1,H-14), 4.12 (2H, d, *J* = 8 Hz, H-15), 2.67 (1H, m, H-5), 2.16-1.14 (13H, m), 1.66 (3H, s, H-16), 1.13 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, s, H-20), 0.80 (3H, d, *J* = 8.0 Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 119.8 (C-1), 22.7 (C-2), 30.7 (C-3), 44.6 (C-4), 38.7 (C-5), 23.1 (C-6), 30.1 (C-7), 38.0 (C-8), 42.9 (C-9), 141.2 (C-10), 37.5 (C-11), 33.8 (C-12), 140.9 (C-13), 122.8 (C-14), 59.2 (C-15), 16.4 (C-16), 15.6 (C-17), 184.2 (C-18), 19.7 (C-19), 22.1 (C-20).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₂₀H₃₂O₃Na: 343.2244 uma; found 343.2244 uma.

15-acetoxy-ent-halima-1(10),13E-dien-18-oic acid, 55:

$[\alpha]_D^{20} = +47.0$ (*c* 0.50, CHCl₃).

IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3284, 2931, 2878, 2651, 1730, 1667, 1446, 1371, 1267, 1233.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.34-5.23 (2H, m, H-1,H-14), 4.56 (2H, d, *J* = 7.2 Hz, H-15), 2.66-2.62 (1H, m, H-5), 2.16-1.14 (13H, m), 2.04 (3H, s, -OOCCH₃), 1.68 (3H, s, H-16), 1.24 (3H, s, H-19), 0.90 (3H, s, H-20), 0.80 (3H, d, *J* = 8.0 Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 117.5 (C-1), 22.8 (C-2), 30.5 (C-3), 44.6 (C-4), 38.5 (C-5), 22.9 (C-6), 29.7 (C-7), 38.7 (C-8), 42.8 (C-9), 143.6 (C-10), 37.5 (C-11), 34.0 (C-12), 141.2 (C-13), 119.8 (C-14), 61.6 (C-15), 16.7 (C-16), 15.6 (C-17), 183.8 (C-18), 21.1 (C-19), 22.7 (C-20), 171.3 (CH₃COO-), 22.4 (CH₃COO-).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₂₂H₃₂O₄Na: 385.4996 uma; found: 385.4992 uma.

13-oxo-14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-18-oic acid, 56:

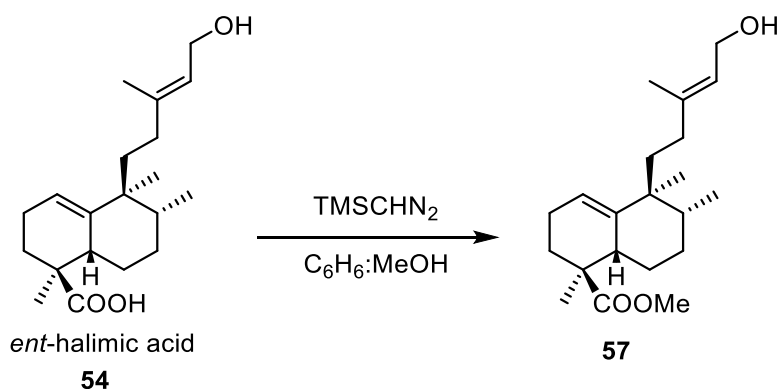
$[\alpha]_D^{20} = +77.9$ (*c* 0.34, CHCl₃).

IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3051, 2982, 2874, 1713, 1693, 1643, 1518, 1454, 1379, 1281.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.33 (1H, t, *J* = 3.8 Hz, H-1), 2.60 (1H, m, H-5), 2.21-0.81 (14H, m), 2.12 (3H, s, H-16), 1.15 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-20), 0.81 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 120.2 (C-1), 23.3 (C-2), 29.7 (C-3), 44.6 (C-4), 37.8 (C-5), 23.5 (C-6), 28.6 (C-7), 39.06 (C-8), 42.6 (C-9), 141.0 (C-10), 32.2 (C-11), 38.8 (C-12), 210.6 (C-13), 29.7 (C-16), 15.5 (C-17), 184.5 (C-18), 21.0 (C-19), 22.0 (C-20).

HRMS (ESI): Calcd for (M+Na⁺) C₁₈H₂₈O₃Na⁺ 315.1931 uma; found 315.1937 uma.

Ent-halimic acid esterification: 57

To a solution of *ent*-halimic acid **54** (13.3 g, 42.01 mmol) in 108 ml of C₆H₆:MeOH (1:1) at r.t. TMSCHN₂ 2 M in Et₂O (25 ml, 54 mmol) was added. The resulting solution was stirred and monitored by TLC until no starting material was observed. Then, the solvent was evaporated affording **57** (13.7 g, 100%).

Methyl 15-hydroxy-*ent*-halima-1(10),13*E*-dien-18-oate, 57:

$[\alpha]_D^{22} = +57.7$ (c 1.25, CHCl₃).

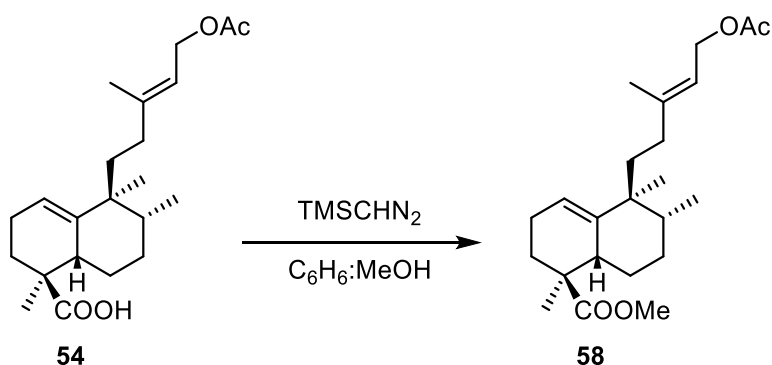
IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3410, 1730, 1465, 1379, 1258, 1197, 1114, 1081, 1003.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.46 (1H, t, *J* = 6.9 Hz, H-14), 5.36 (1H, s, H-1), 4.14 (2H, d, *J* = 6.9 Hz, H-15), 3.63 (3H, s, COOCH₃), 2.73-2.52 (1H, m, H-5), 1.67 (3H, s, H-16), 2.35-1.11 (13H, m), 1.10 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, s, H-20), 0.83 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-17).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 178.4 (C-18), 141.2 (C-10), 140.5 (C-13), 122.8 (C-14), 119.7 (C-1), 59.3 (C-15), 51.4 (COOCH₃), 44.5 (C-4), 42.5 (C-9), 38.5 (C-8), 38.4 (C-5), 37.9 (C-11), 33.8 (C-12), 30.5 (C-3), 30.1 (C-7), 22.8 (C-6), 22.6 (C-2), 22.4 (C-20), 19.9 (C-19), 16.3 (C-16), 15.5 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M⁺-HOH) C₂₁H₃₃O₂-H₂O: 317.2475 uma; found: 317.2472 uma.

HMBC and HSQC see *Bidimensional tables*.

Esterification of acetyl *ent*-halimic acid 55: 58

To a solution of **55** (4.7 g, 12.9 mmol) in 36 ml of C₆H₆:MeOH (1:1) at r.t., TMSCHN₂ 2 M in Et₂O (6.8 ml, 13.6 mmol) was added and stirred until no starting material was observed by TLC. Then, the solvent is evaporated affording **58** (4.8 g, 100 %).

Methyl 15-acetoxy-*ent*-halima-1(10),13*E*-dien-18-oate, 58:

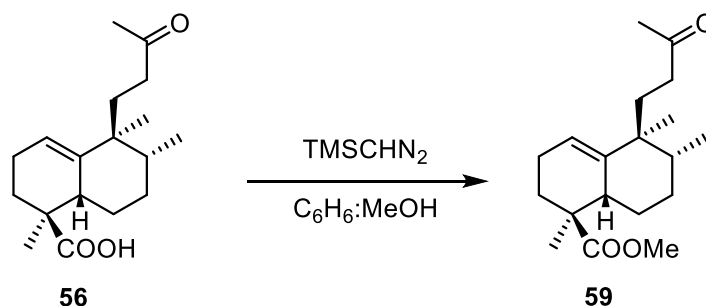
$[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +51.1$ (*c* 1.2, CHCl₃)

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 2918, 2874, 2849, 1732, 1437, 1379, 1234, 1165, 1115

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.34 (2H, m, H-1, H-14), 4.58 (2H, d, *J*=7 Hz, H-15), 3.65 (3H, s, COOCH₃), 2.70-2.61 (1H, m, H-5), 2.06 (3H, s, -OOCCH₃), 1.71 (3H, s, Me-16), 2.13-1.22 (13H, m), 1.12 (3H, s, Me-19), 0.91 (3H, s, Me-20), 0.84 (3H, d, *J* = 7 Hz, Me-17);)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 178.5 (C-18), 171.2 (-OOCCH₃), 143.7 (C-10), 141.2 (C-13), 119.8 (C-14), 117.5 (C-1), 61.5 (C-15), 51.7 (COOCH₃), 44.9 (C-4), 42.8 (C-9), 38.4 (C-5), 38.4 (C-8), 37.5 (C-11), 34.0 (C-12), 30.7 (C-3), 29.7 (C-7), 22.9 (C-6), 22.8 (C-2), 22.5 (C-20), 21.2 (-OOCCH₃), 21.1 (C-19), 16.7 (C-16), 15.6 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₂₃H₃₆O₄Na⁺: 399.2506 uma; found 399.2495 uma.

Esterification of methylketone 56: 59

Methylketone **56** (1.24 g, 4.23 mmol) was dissolved in 10.5 ml of C₆H₆:MeOH (1:1) at r.t. and a solution of TMSCHN₂ 2 M in Et₂O (2.3 ml, 4.6 mmol) was added. The resulting solution was stirred at r.t. still full conversion is observed by TLC. Then, the solvent was evaporated to afford **59** (1.3 g, 100 %).

Methyl 13-oxo-14,15-dinor-*ent*-halim-1(10)-en-18-oate, 59:

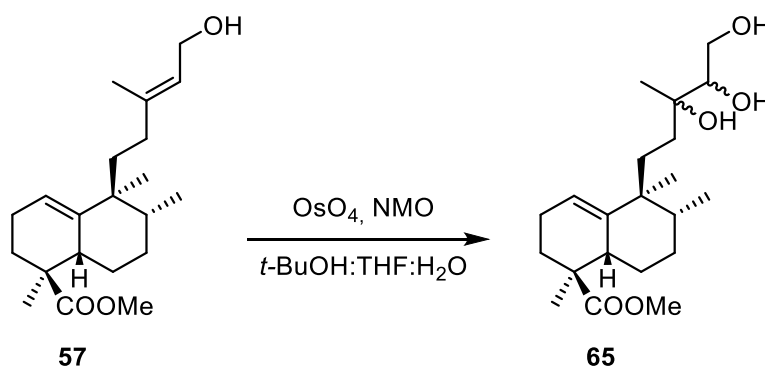
$[\alpha]_D^{22} = +101.6$ (c 1.25, CHCl₃).

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3060, 2948, 1742, 1729, 1475, 1379, 1358, 1257, 1184, 1114, 1003.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.29 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-1), 3.63 (3H, s, -COOCH₃), 2.60 (1H, d, $J = 12.6$ Hz, H-5), 2.12 (3H, s, H-16), 2.35-1.21 (13H, m), 1.09 (3H, s, H-19), 0.84 (3H, s, H-20), 0.78 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 210.2 (C-13), 178.3 (C-18), 141.1 (C-10), 120.1 (C-1), 51.6 (COOCH₃), 44.8 (C-4), 42.6 (C-9), 39.0 (C-8), 38.9 (C-12), 38.1 (C-5), 32.4 (C-11), 29.9 (C-16), 29.7 (C-3), 28.5 (C-7), 23.2 (C-6), 23.0 (C-2), 22.1 (C-20), 21.1 (C-19), 15.5 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M-H⁺) C₁₉H₃₁O₃: 307.2268 uma; found: 307.2269 uma.

Cis-hydroxylation of 57: 65

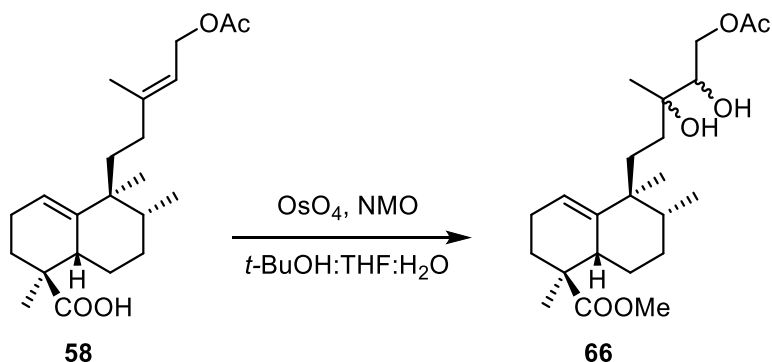
To a solution of **57** (2.1 g, 6.3 mmol) in *t*-BuOH:THF:H₂O (64 ml, 7:2:1), NMO (2.52 g, 18.6 mmol) and OsO₄ (2.5 % solution in *t*-BuOH, 0.41 ml) were added and the resulting solution was stirred at r.t. for 24 h. Afterwards, a saturated solution of Na₂SO₃ (37 ml) was added and the mixture was stirred for additional 30 mins. The resulting mixture was extracted in EtOAc and the combined organic extracts were washed with Na₂S₂O₃ (10%), HCl 2 M, H₂O and NaCl (sat.), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum resulting **65** (2.2 g, 98 %).

Methyl 13,14,15-trihydroxy-*ent*-halim-1(10)-en-18-oate, 65:

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3443, 2941, 1730, 1459, 1381, 1238, 1197, 1111, 1080, 1003.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.32-5.15 (1H, m, H-1'), 3.80-3.52 (3H, m, H-14 and 15), 3.61 (3H, s, COOCH₃), 2.35-1.13 (14H, m), 1.10/1.07 (3H, s, H-16), 1.06/1.05 (3H, s, H-19), 0.89/0.87 (3H, s, H-20), 0.74 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, H-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+H⁺) C₂₁H₃₇O₅⁺: 369.2636 uma; found: 369.2635 uma.

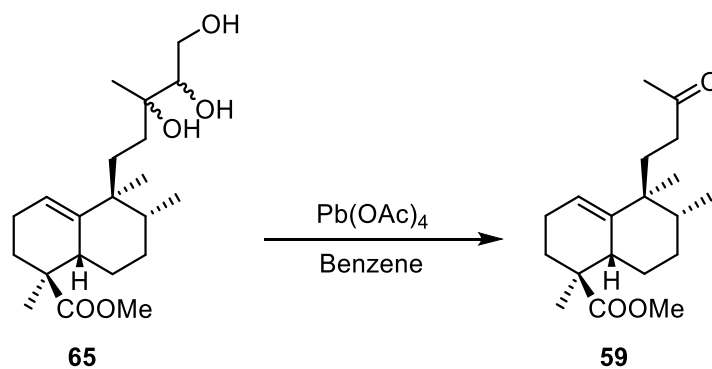
Cis-hydroxylation of 58: 66

To a solution of **58** (2.9 g, 8.7 mmol) in *t*-BuOH:THF:H₂O (84 ml, 7:2:1), NMO (3.40 g, 36.2 mmol) and OsO₄ (2.5 % solution in *t*-BuOH, 0.57 ml) were added and the resulting solution was stirred at r.t. for 24 h. Afterwards, a saturated solution of Na₂SO₃ (51 ml) was added and the mixture was stirred for additional 30 mins. The resulting mixture was extracted in EtOAc and the combined organic extracts were washed with Na₂S₂O₃ (10%), HCl 2 M, H₂O and NaCl (sat.), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum resulting **66** (3.3 g, 92 %).

Methyl 15-acetoxy-13,14-dihydroxy-*ent*-halim-1(10)-en-18-oate, 66:

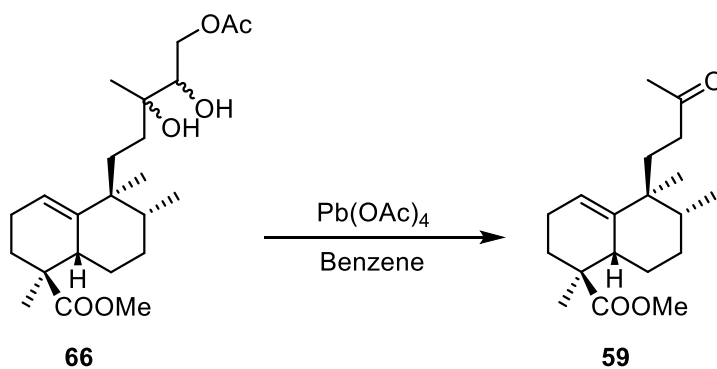
IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3466, 2941, 1730, 1456, 1387, 1238, 1229, 1197, 1117, 1082.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.27 (1H, m, H-1), 4.31/3.65 (3H, m, H-14 and 15), 3.77/3.63 (3H, s, COOCH₃), 2.04 (3H, m, CH₃COO-), 1.12/1.11 (3H, s each, H-16), 1.09 (3H, s, H-19), 0.86 (3H, s, H-20), 0.67 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-17).

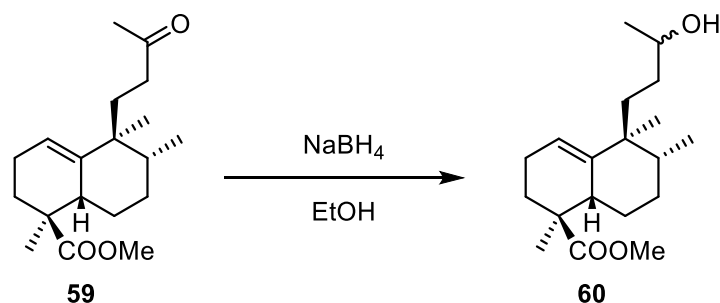
Oxidative cleavage of glycol 65 with LTA: 59

In a topaz round bottom flask, **65** (2.76 g, 7.50 mmol) was dissolved in benzene (51 ml) and to the resulting solution, LTA (5.97 g, 13.50 mmol) was added and stirred for 45 min at r.t. The reaction mixture was filtered over Celite washing with EtOAc. The resulting solution was washed with Na_2CO_3 (6 %), H_2O and NaCl (sat.). The combined organic extracts were dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography (Hex:EtOAc, 9:1) resulting **59** (1.92 g, 90 %).

Oxidative cleavage of glycol **66 with LTA: **59****



In a topaz round bottom flask, **66** (4.11 g 10.00 mmol) was dissolved in benzene (68 ml) and to the resulting solution, LTA (7.98 g, 18.00 mmol) was added and stirred for 45 min at r.t. The reaction mixture was filtered over Celite washing with EtOAc. The resulting solution was washed with Na₂CO₃ (6 %), H₂O and NaCl (sat.). The combined organic extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography (Hex:EtOAc, 9:1) resulting **59** (2.69 g, 95 %).

Reduction of 59 with NaBH₄: 60

To a solution of ketone **59** (1.03 g, 3.36 mmol) in absolute EtOH (20 ml) and cooled at 0 °C, a suspension of NaBH₄ (127 mg, 3.36mmol) in absolute EtOH (10 ml) was added slowly. After that, the resulting reaction mixture was stirred at r.t. until full conversion was observed by TLC. Then, the reaction was acidulated with HCl 2 M, and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with NaCl (sat.), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure to afford **60** (1.00 g, 97 %).

Methyl 13-hydroxy-14,15-dinor-*ent*-halim-1(10)-en-18-oate, 60:

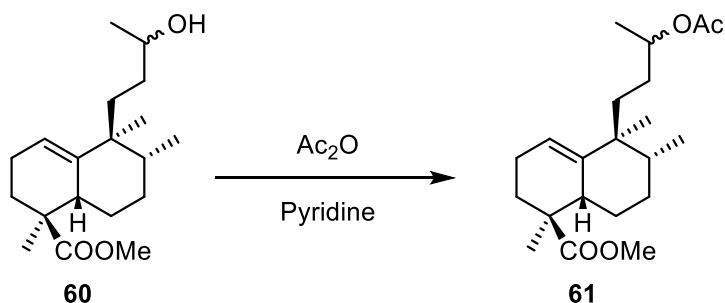
IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3447, 3051, 1730, 1451, 1376, 1250, 1193, 912, 810.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.27 (1H, m, H-1), 3.87 (1H, m, H-13), 3.64/3.63 (3H, s, COOCH₃), 2.66 (1H, m, H-5), 1.18/1.14 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-16), 1.10 (3H, s, H-19), 2.30-1.00 (13H, m), 0.85 (3H, s, H-20), 0.79 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 179.2 (C-18), 142.0/141.8 (C-10), 119.8 (C-1), 68.5/68.0 (C-13), 51.8 (COOCH₃), 45.0 (C-4), 43.3/43.1 (C-9), 39.4/39.2 (C-8), 38.0/37.9 (C-5), 34.2 (C-12), 33.4/33.1 (C-11), 29.7/29.2 (C-3), 29.1/28.9 (C-7), 24.5 (C-16), 23.9/23.7 (C-6), 23.4/23.2 (C-2), 22.7 (C-20), 22.4 (C-19), 15.5 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M⁺) C₁₉H₃₂O₃⁺: 308.2351 uma; found: 308.2347 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

Acetylation of 60 with Ac₂O: 61

To a solution of hydroxyderivative **60** (1.00 g, 3.24 mmol) in pyridine (5 ml) it was added Ac₂O (5 ml) and the resulting solution was stirred at r.t. for 12 h. After that time, ice was added and the resulting solution was extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with HCl 2 M, NaHCO₃ (6%), H₂O and NaCl (sat.). The resulting organic extract was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum yielding **61** (1.10 g, 97 %).

Methyl 13-acetoxy-14,15-dinor-*ent*-halim-1(10)-en-18-oate, 61:

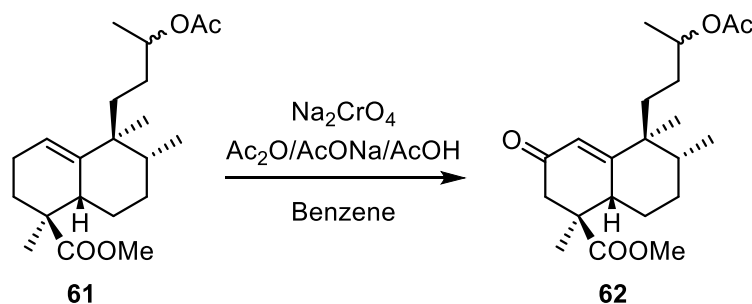
IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3521, 3450, 3054, 2951, 1737, 1458, 1380, 1243, 1194, 807.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.32 (1H, m, H-1), 4.83 (1H, m, H-13), 3.64 (3H, s, COOCH₃), 2.52 (1H, m, H-5), 2.04 (3H, s, CH₃COO), 1.89-1.20 (14 H, m), 1.21 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-16), 1.11 (3H, s, H-19), 0.88 (3H, s, H-20), 0.80 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 178.5 (C-18), 170.8/170.4 (CH₃COO-), 141.1/141.0 (C-10), 119.1 (C-1), 72.0/71.7 (C-13), 51.7 (-COOCH₃), 44.9 (C-4), 42.7 (C-9), 39.1/38.8 (C-8), 38.3 (C-5), 34.7/34.6 (C-11), 31.9 (C-12), 30.4 (C-3), 28.7 (C-7), 23.3 (C-6), 23.1 (C-2), 22.3 (C-20), 21.4 (CH₃COO-), 21.2 (C-19), 20.1/20.0 (C-16), 15.6 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for M⁺ C₂₁H₃₄O₄⁺: 350.2457 uma; found: 350.2462 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

Oxidation of 61 with Na₂CrO₄: 62

To a solution of hydroxyderivative **61** (1.10 g, 3.14 mmol) in benzene (20 ml), Ac₂O (8.2 ml, 83 mmol), AcOH (4.3 ml, 75 mmol) and AcONa (672 mg, 8.2 mmol) were added. To the resulting solution, Na₂CrO₄ (914 mg, 5.65 mmol) was added and was stirred at 55 °C for 24 h. After that time, it was added ice and water to the reaction mixture and the resulting suspension was extracted with Et₂O. The combined organic extracts were washed with Na₂CO₃ (10 %), H₂O and NaCl (sat.). The resulting organic extract was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (85:15) resulting **62** (641 mg, 56 %).

Methyl 13-acetoxy-2-oxo-14,15-dinor-*ent*-halim-1(10)-en-18-oate, 62:

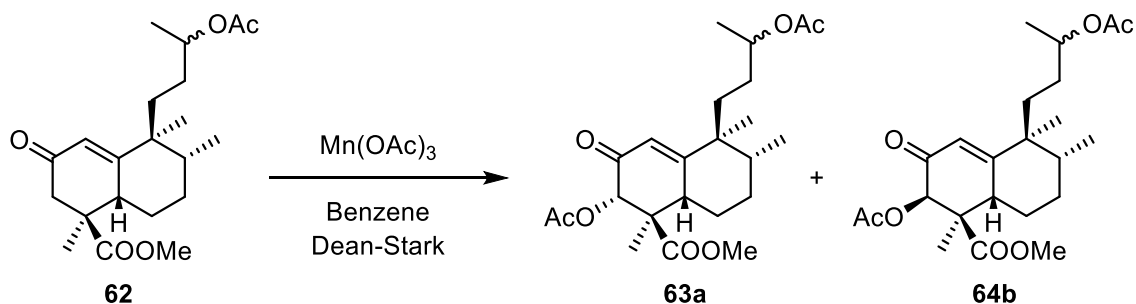
IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 2951, 2935, 1734, 1672, 1612, 1457, 1370, 1248, 1169, 911, 809.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.82/5.81 (1H, s, H-1), 4.85 (1H, m, H-13), 3.64/3.63 (3H, s each, COOCH₃), 2.99 (1H, dd, $J = 12.1$ and 4.8 Hz, H-5), 2.69 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H_A-3), 2.27 (2H, d, $J = 16.4$ Hz, H_B-3), 2.15-0.90 (10H, m), 2.03 (3H, s, CH₃COO), 1.22 (3H, s, H-19), 1.20 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-16), 0.97 (3H, s, H-20), 0.80 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 197.0 (C-2), 176.7 (C-18), 170.8 (COOCH₃), 169.3/168.9 (C-10), 125.1 (C-1), 71.4/71.1 (C-13), 52.4 (CH₃COO), 46.3 (C-4), 45.1/44.9 (C-9), 43.3/43.0 (C-3), 40.9 (C-5), 40.3 (C-8), 34.9/34.5 (C-11), 30.3 (C-12), 28.3 (C-7), 23.5 (C-6), 22.0 (C-20), 21.4 (CH₃COO), 21.3 (C-19), 20.1/19.9 (C-16), 15.8 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M⁺) C₂₁H₃₂O₅⁺: 364.2250 uma; found: 364.2245 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

Acetoxylation of 62 with Mn(OAc)₃: 63

To a solution of **62** (527 mg, 1.45 mmol) in benzene (56 ml), $\text{Mn(OAc)}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.96 g, 7.32 mmol) was added and the resulting mixture was refluxed in a Dean-Stark apparatus for 19 h. After that time, the reaction was filtered over Celite and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (8:2) resulting **63** (374 mg, 61 %).

Methyl 3(S)13(R,S)-diacetoxy-2-oxo-14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-18-oate, 63a:

IR (film) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 2952, 2874, 1749, 1698, 1607, 1458, 1374, 1241, 1111, 912.

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 5.96 (1H, s, H-1), 5.36 (1H, s, H-3), 4.82 (1H, m, H-13), 3.73 (3H, s, COOCH_3), 3.18 (1H, m, H-5), 2.14 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO}_{\text{Ring}}$), 2.06/2.04 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO}_{\text{Chain}}$), 2.11-1.10 (9H, m), 1.28 (3H, s, H-19), 1.22 (3H, d, $J = 6.0 \text{ Hz}$, H-16), 1.04 (3H, s, H-20), 0.82 (6H, d, $J = 7.0 \text{ Hz}$, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 191.7 (C-2), 174.5 (COOCH_3), 173.3 (CH_3COO), 170.7 (CH_3COO), 167.3 (C-10), 123.0 (C-1), 78.1 (C-3), 71.0 (C-13), 52.7 (COOCH_3), 50.4 (C-4), 43.8 (C-9), 42.1 (C-5), 36.6/36.3 (C-8), 36.1/36.0 (C-11), 30.2 (C-12), 26.5 (C-7), 22.7 (C-20), 21.4 (C-6), 21.4 (CH_3COO), 20.6 (CH_3COO), 20.1 (C-16), 15.5 (C-17), 10.7 (C-19).

HRMS (ESI): Calcd. for $(\text{M}+\text{H}^+)$ $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{O}_7^+$ 423.2383 uma; found: 423.2379 uma.

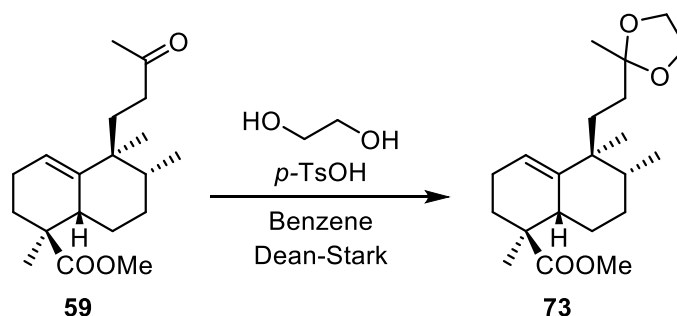
Methyl 3(R)13(R,S)-diacetoxy-2-oxo-14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-18-oate, 63b:

IR (film) ν_{\max} cm^{-1} : 2959, 1733, 1697, 1459, 1370, 1242, 915, 803.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 5.83 (1H, s, H-1), 5.66/5.64 (1H, s, H-3), 4.82 (1H, m, H-13), 3.62 (3H, s, COOCH_3), 3.18 (1H, m, H-5), 2.20 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO}_{\text{Ring}}$), 2.03/2.02 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO}_{\text{Chain}}$), 2.25-0.80 (9H, m), 1.21 (3H, s, H-19), 1.18 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 0.99 (3H, s, H-20), 0.82 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-17).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 190.7 (C-2), 176.0 (C-18), 173.3 (CH_3COO), 170.6 (CH_3COO), 167.1 (C-10), 124.0 (C-1), 74.2 (C-3), 70.9 (C-13), 52.3 (COOCH_3), 51.8 (C-4), 45.2 (C-9), 42.0 (C-5), 41.1/41.0 (C-8), 34.3/34.1 (C-11), 30.4 (C-12), 28.7 (C-7), 21.8 (C-20), 21.4 (C-6), 21.3 (CH_3COO), 20.7 (CH_3COO), 20.0 (C-16), 19.9 (C-19), 15.8 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M^+) $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_7^+$ 422.2305 uma; found: 422.2309 uma.

Protection of methylketone **59 as 1,3-dioxolane: **73**.**

To a solution of **59** (1.75 g, 5.66 mmol) in benzene (60 ml), ethylene glycol (5.69 ml, 66.2 mmol) and *p*TsOH (10 mg, 0.05 mmol) were added. The resulting mixture was heated in a Dean-Stark apparatus at reflux temperature for 20 h. After cooling the mixture to r.t., EtOAc was added and placed in a separatory funnel. The organic phase was washed with Na₂CO₃ (6 %) and NaCl (sat.), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated yielding **73** (1.97, 99%).

Methyl 13-ethylendioxy-14,15-dinor-*ent*-halim-1(10)-en-18-oate, **73:**

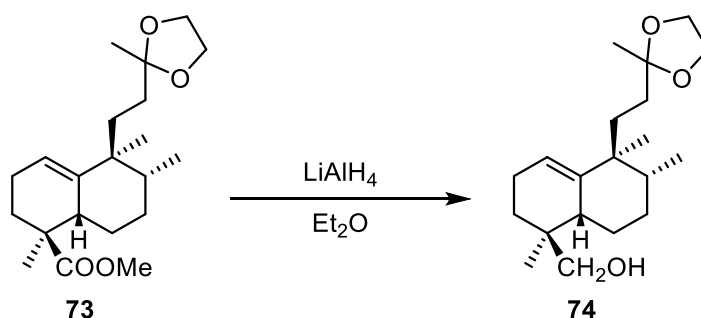
$[\alpha]_D^{22} = +49.4$ (c 1.1, CHCl₃).

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3071, 2934, 1732, 1457, 1380, 1355, 1255, 1162, 1116, 842.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.31 (1H, dt, *J* = 3.8 and 1.6 Hz, H-1), 3.94 (4H, s, -OCH₂CH₂O-), 3.65 (3H, s, COOCH₃), 2.66 (1H, d, *J* = 12.6 Hz, H-5), 1.33 (3H, s, H-16), 2.10-1.27 (13H, m), 1.11 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, s, H-20), 0.80 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 178.2 (C-18), 141.0 (C-10), 119.6 (C-1), 110.4 (C-13), 65.5 (-OCH₂CH₂O-), 51.5 (COOCH₃), 44.7 (C-4), 42.3 (C-9), 38.4 (C-5), 38.1 (C-8), 33.0 (C-12), 30.5 (C-3), 29.5 (C-11), 28.2 (C-7), 23.5 (C-16), 22.7 (C-2), 22.6 (C-6), 22.3 (C-20), 19.7 (C-19), 15.5 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M⁺) C₂₁H₃₄O₄⁺: 350.2457; found: 350.2453.

Reduction of methylester **73 with LiAlH₄: **74****

To a solution of methylester **73** (1.50 g, 4.29 mmol) in Et₂O (4.3 ml) cooled at 0 °C, LiAlH₄ (80 mg, 2.11 mmol) was added and the reaction was stirred for 35 min at r.t. still no starting material is observed by TLC. Then, the reaction mixture is cooled again to 0 °C and a mixture of Et₂O:H₂O (95:5) was added slowly to quench the hydride excess. After that, anhydrous Na₂SO₄ is added to dry the solution, then, filtered and concentrated in rotavapor yielding **74** (1.37 g, 99 %)

13-ethylendioxy-14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-18-ol, **74:**

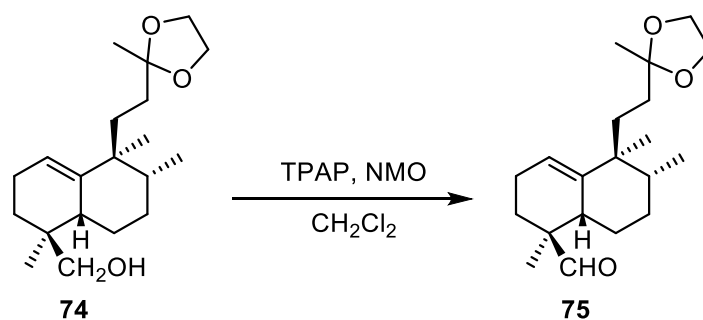
$[\alpha]_D^{22} = +81.0$ (c 0.84, CHCl₃).

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3448, 3071, 2934, 1456, 1378, 1052, 842.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.29 (1H, t, $J = 3.7$ Hz, H-1), 3.94 (4H, s, -OCH₂CH₂O-), 3.44 (1H, dd, $J = 10.9$ and 5.6 Hz, H_A-18), 3.23 (1H, dd, $J = 10.9$ and 7.6 Hz, H_B-18), 2.28 (1H, m, H-5), 1.27 (3H, s, Me-16), 2.13-1.10 (13H, m), 0.87 (3H, s, H-19), 0.85 (3H, s, H-20), 0.80 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 141.3 (C-10), 120.0 (C-1), 110.6 (C-13), 69.2 (C-18), 64.6 and 64.5 (-OCH₂CH₂O-), 43.1 (C-9), 39.8 (C-5), 36.7 (C-8), 36.2 (C-4), 33.8 (C-12), 32.3 (C-3), 29.4 (C-11), 28.5 (C-7), 24.1 (C-6), 23.6 (C-16), 22.6 (C-2), 21.9 (C-19), 21.8 (C-20), 15.6 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M⁺) C₂₀H₃₄O₃⁺: 322.2508; found: 322.2516.

Oxidation of 74 with TPAP: 75

To a solution of **74** (580 mg, 1.80 mmol) in DCM (19.2 ml), TPAP (31 mg, 0.096 mmol), NMO (832 mg, 6.16 mmol) and molecular sieves (1.3 g) were added. The resulting mixture was stirred for 40 min at r.t. After that, the solution was filtered over a silica gel and Celite plug washing with DCM and EtOAc. Finally, after vacuum concentration resulted **75** (570 mg, 99 %).

13-ethylendioxy-14,15-dinor-*ent*-halim-1(10)-en-18-al, 75:

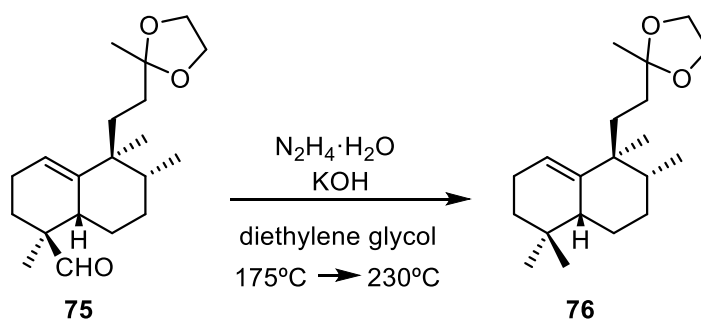
$[\alpha]_D^{22} = +54.7$ (c 1.0, CHCl₃).

IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3051, 2934, 2699, 1722, 1457, 1378, 1265, 1225, 1102, 1056, 951, 842.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 9.52 (1H, s, H-18), 5.34 (1H, t, $J = 3.8$ Hz, H-1), 3.93 (4H, s, -OCH₂CH₂O-), 2.45 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-5), 2.10-1.22 (13H, m), 1.32 (3H, s, H-16), 0.96 (3H, s, H-19), 0.89 (3H, s, H-20), 0.81 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-17).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 206.3 (C-18), 140.8 (C-10), 120.3 (C-1), 110.4 (C-13), 64.5 (-OCH₂CH₂O-), 47.7 (C-4), 42.7 (C-9), 38.8 (C-5), 35.8 (C-8), 33.4 (C-12), 32.9 (C-11), 28.4 (C-3), 27.5 (C-7), 23.6 (C-16), 23.0 (C-6), 22.2 (C-2), 22.2 (C-20), 17.4 (C-19), 15.5 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M⁺) C₂₀H₃₂O₃⁺: 322.2351; found: 322.2356.

Huang-Minlon reduction of 75: 76

To a solution of **75** (400 mg, 6.25 mmol) in diethylene glycol (15.8 ml), KOH (528 mg, 9.40 mmol), $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 85 % (2.05 ml, 42.3 mmol) were added. The resulting mixture was heated at 175 °C for 20h and 30 min. After that, the reflux condenser was removed for 20 mins and then, the reaction was heated for additional 3 h and 30 min at 230 °C. Afterwards, the reaction was cooled to r.t. and H_2O (20 ml) and HCl 2 M (7.5 ml) were added. The resulting mixture was extracted with EtOAc, washed with NaCl (sat.), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and concentrated under vacuum to afford **76** (460 mg, 92 %).

13-ethylenedioxy-14,15-dinor-ent-halim-1(10)-ene, 76:

$[\alpha]_D^{22} = +61.5$ (c 1.1, CHCl_3).

IR (film) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3045, 2930, 2871, 1450, 1378, 1360, 1218, 1131, 1056, 842.

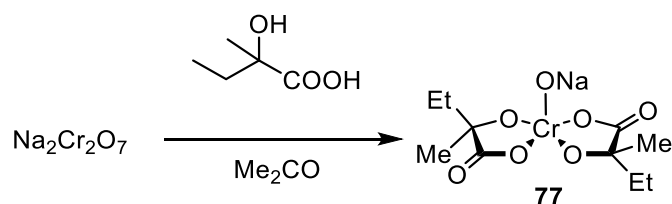
$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 5.29 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-1), 3.91 (4H, m, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 2.00-1.09 (14H, m), 1.30 (3H, s, H-16), 0.87 (6H, s, H-19 and 20), 0.82 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-17).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 141.5 (C-10), 119.8 (C-1), 110.6 (C-13), 64.5 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 43.1 (C-5), 42.6 (C-9), 39.3 (C-8), 33.5 (C-3), 33.3 (C-12), 32.0 (C-11), 31.4 (C-4), 29.1 (C-7), 28.2 (C-16), 26.0 (C-19), 23.7 (C-18), 23.6 (C-2), 23.1 (C-6), 22.3 (C-20), 15.7 (C-17).

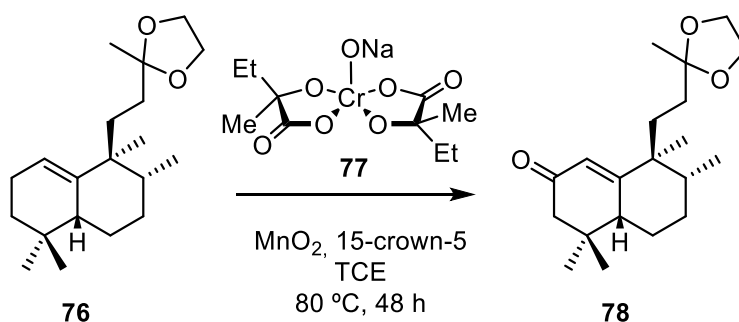
HRMS (ESI): Calcd. for (M^+) $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3^+$: 306.2559; found: 306.2556.

HMBC and HSQC see *Bidimensional tables*.

Preparation of Cr^V complex: 77



To a solution of 2-hydroxy-2-methylbutyric acid (2.12 g, 20.4 mmol) in acetone (27 ml), anhydrous $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (898 mg, 3.43 mmol) was added. The resulting solution was stirred at 25 °C for 26 h. After that time, 68 ml Hexane was added obtaining separating an oily product corresponding to the Cr(V) complex. The collected oily crude product was washed twice with 3.4 ml hexane. The resulting reddish-brown product was evaporated under vacuum and the residue was dissolved in acetone (2.4 ml) and let it crystalize for 12 h. After washing the crystals obtained with small fractions of acetone, resulted **77** (730 mg, 37 %).

Oxidation of 76 with 77: 78

The unsaturated compound **76** (70 mg, 0.226 mmol) was dissolved in 1,1,2-trichloroethylene (TCE, 18.6 ml) and 15-crown-5 (186 μl). To the resulting solution, Cr^V complex **77** (730 mg, 2.26 mmol) and MnO₂ (394 mg, 4.52 mmol) were added at once and the reaction mixture was heated at 80 °C for 48 h. After that time, the reaction was allowed to cool down to r.t. and is filtered in a silica gel plug eluting with Hex:EtOAc (1:1). The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (9:1) obtaining **78** (51 mg, 71 %) and **76** (10 mg, 14 %).

13-ethylendioxy-14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-2-one, 78:

$[\alpha]_D^{22} = +107.5$ (1.0, CHCl₃).

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3048, 2967, 2930, 1870, 1689, 1451, 1380, 1358, 1216, 1131, 1055, 811.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.83 (3H, s, H-1), 3.90 (4H, m, OCH₂CH₂O), 3.28 (1, d, $J = 8.0$ Hz, H_A-3), 3.05 (1H, d; $J = 8.0$ Hz, H_B-3), 2.21 (1H, dd, $J = 12.0$ and 4.0 Hz, H-5), 1.78 (1H, m, H-8), 2.10-1.35 (8H, m), 1.28 (3H, s, H-16), 0.99 (6H, s, H-19 and 20), 0.96 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 199.7 (C-2), 169.9 (C-10), 124.4 (C-1), 109.9 (C-13), 64.6 (OCH₂CH₂O), 48.6 (C-3), 45.0 (C-5), 44.6 (C-9), 40.4 (C-8), 34.5 (C-4), 33.7 (C-12), 33.2 (C-11), 28.4 (C-16), 28.3 (C-7), 25.9 (C-18), 23.8 (C-6), 23.7 (C-19), 21.5 (C-20), 15.6 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+H⁺) C₂₀H₃₃O₃⁺: 321.2330 uma; found: 320.2335 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

3R-acetoxy-13-ethylendioxy-14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-2-one, 80:

$[\alpha]_D^{22} = +138.2$ (0.90, CHCl₃).

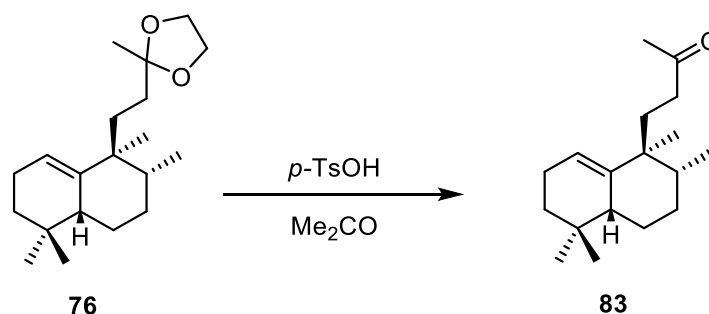
IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 2964, 2871, 1742, 1690, 1461, 1374, 1233, 1131, 1045, 942.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.81 (1H, s, H-1), 5.31 (1H, s, H-3), 3.90 (4H, m, OCH₂CH₂O), 2.20 (3H, s, CH₃COO), 2.20-0.8 (10H, m), 1.28 (3H, s, H-16), 1.02 (3H, s, H-18), 1.00 (3H, s, H-20), 0.97 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 193.3 (C-2), 170.7 (CH₃COO), 169.2 (C-10), 122.9 (C-1), 109.8 (C-13), 77.7 (C-3), 64.6 (OCH₂CH₂O), 47.5 (C-5), 45.0 (C-9), 41.8 (C-8), 38.4 (C-4), 33.9 (C-12), 32.5 (C-11), 28.9 (C-7), 24.9 (C-6), 23.7 (C-16), 24.0 (C-18), 22.4 (C-19), 21.3 (C-20), 20.8 (CH₃COO), 15.6 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₂₂H₃₄O₅Na⁺: 401.2304 uma; found: 401.2309 uma.

Deprotection of 76 with *p*-TsOH: 83



To a solution of **76** (1.53 g, 5.01 mmol) in acetone (25 ml), *p*TsOH (97.5 mg, 0.51 mmol) was added at once and the resulting solution was stirred at r.t for 12 h. After that, H_2O was added and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with NaHCO_3 (6 %), H_2O and NaCl (sat.), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum to afford **83** (1.27 g, 97 %).

14,15-dinor-*ent*-halim-1(10)-en-13-one, 83:

$[\alpha]_D^{22} = +65.0$ (1.1, CHCl_3).

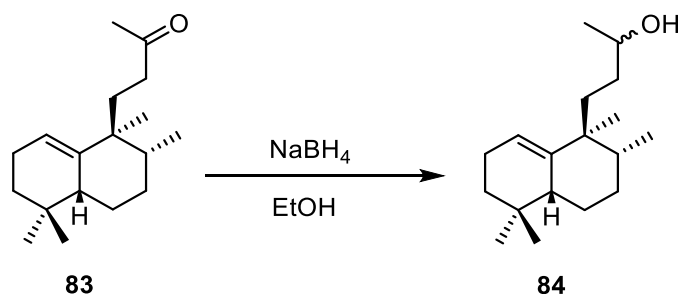
IR (film) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 2927, 1720, 1467, 1380, 1054, 827.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 5.31 (1H, m, H-1), 2.11 (3H, s, H-16), 2.25-1.08 (14H, m), 0.85 (6H, s, H-19 and 20), 0.81 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, $J = 7.0$ Hz, H-17).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 209.9 (C-13), 141.2 (C-10), 120.2 (C-1), 43.3 (C-5), 42.5 (C-9), 39.1 (C-8), 39.0 (C-12), 33.2 (C-11), 32.3 (C-3), 31.3 (C-4), 30.0 (C-16), 29.0 (C-7), 28.0 (C-19), 25.8 (C-18), 23.5 (C-6), 23.1 (C-2), 22.3 (C-20), 15.6 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M^+) $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}^+$: 262.2297; found: 262.2266.

HMBC and HSQC see *Bidimensional tables*.

Reduction of **83 with NaBH₄: **84****

Methylketone **83** (1.42 g, 5.42 mmol) was dissolved in EtOH (45 ml) and it was cooled down to 0 °C. To that solution, a suspension of NaBH₄ (206 mg, 21.7 mmol) in EtOH (10 ml) was added slowly. The resulting mixture was allowed to react at r.t. still full conversion is observed by TLC. Then, it was added HCl 2 M and extracted in EtOAc, washed with NaCl (sat.), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum to afford hydroxyderivative **84** (1.40 g, 98 %).

14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-13-ol, **84:**

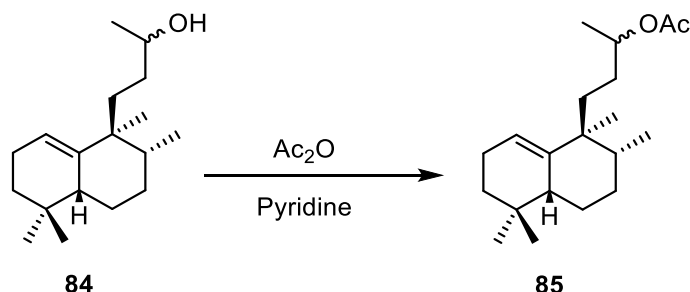
IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 3380, 2921, 1462, 1373, 1052, 1018, 834.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.30 (1H, m, H-1), 3.71 (1H, m, H-13), 2.07-1.03 (12H, m), 1.17 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 0.89 (3H, s, H-20), 0.88/0.86 (3H, s, H-19), 0.82 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-17).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 141.6 (C-10), 119.7/119.6 (C-1), 69.1/69.0 (C-13), 43.3/43.2 (C-5), 42.8/42.6 (C-9), 39.1/39.0 (C-8), 35.0/34.8 (C-12), 33.9/33.8 (C-11), 33.4/33.3 (C-3), 31.4/31.3 (C-4), 29.1/29.0 (C-7), 28.2/28.1 (C-19), 26.0/25.9 (C-18), 23.6 (C-2), 23.5 (C-16), 23.1 (C-6), 22.5/22.4 (C-20), 15.6 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M⁺) C₁₈H₃₂O⁺: 264.2453 uma; found: 264.2460 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

Acetylation of 84 with Ac₂O: 85

To a solution of hydroxyderivative **84** (810 mg, 3.06 mmol) in pyridine (12.0 ml) was added Ac₂O (12.0 ml) and the resulting solution was stirred at r.t. for 8 h. After that, it was added ice and the mixture was extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with HCl 2 M, NaHCO₃ (6%), H₂O and NaCl (sat.). The resulting solution was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under reduced pressure to afford **85** (919 mg, 98 %).

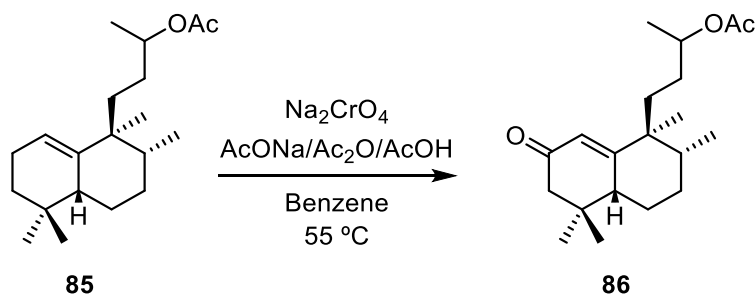
14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-13-yl acetate, 85:

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 2926, 1745, 1463, 1380, 1367, 1241, 1031, 923, 838.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.30 (1H, t, J = 3.9 Hz, H-1), 4.81 (1H, m, H-13), 2.01 (3H, s, CH₃COO-), 2.00-1.05 (12H, m), 1.18 (3H, d, J = 6.3 Hz, H-16), 0.87 (3H, s, H-20), 0.86 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 170.8 (CH₃COO-), 141.5/141.4 (C-10), 119.9/119.8 (C-1), 71.9/71.7 (C-13), 43.4/43.3 (C-5), 42.8 (C-9), 39.2/39.1 (C-8), 35.0 (C-11), 34.3/34.2 (C-3), 31.4 (C-4), 30.0 (C-12), 29.2 (C-7), 29.1 (C-19), 26.1 (C-18), 23.6 (C-2), 23.1 (C-6), 22.3 (C-16), 21.4 (CH₃COO-), 20.0 (C-20), 15.6 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₂₀H₃₄O₂Na⁺: 329.2451 uma; found: 329.2449 uma.

Oxidation of 85 with Na₂CrO₄: 86

To a solution of **85** (807 mg, 2.63 mmol) in benzene (18.9 ml), Na₂CrO₄ (766 mg, 4.73 mmol), anhydrous AcONa (571 mg, 6.96 mmol), Ac₂O (7.51 ml, 7.95 mmol) and AcOH (3.76 ml, 65.9 mmol) were added. The resulting mixture was heated at 55 °C for 20 h. Then, it was added ice and extracted in Et₂O. The combined organic extracts were washed with Na₂CO₃ (10%), H₂O and NaCl (sat.), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (85:15) to afford **86** (818 g, 97 %).

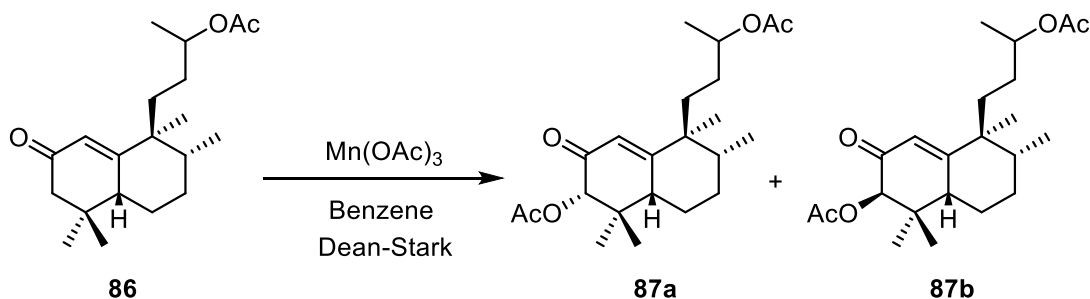
13-acetoxy-14,15-dinor-*ent*-halim-1(10)-en-2-one, 86:

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 2954, 2877, 1742, 1669, 1441, 1388, 1245, 1056, 840.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.82 (1H, s, H-1), 4.79 (1H, m, H-13), 2.30/2.28 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H_A-3), 2.19-1.04 (11H, m), 2.01 (3H, s, CH₃COO-), 1.17 (3H, d, $J = 4.0$ Hz, H-16), 1.00/0.98 (6H, s, H-19 and 20), 0.96 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, d, $J = 4.0$ Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 199.7/199.6 (C-2), 170.7/170.5 (CH₃COO-), 169.5 (C-10), 124.5 (C-1), 71.1 (C-13), 48.6/48.5 (C-3), 45.2/45.1 (C-5), 44.7 (C-9), 40.2/40.1 (C-8), 34.8/34.7 (C-11), 34.5 (C-4), 30.6 (C-12), 28.4/28.3 (C-19), 28.2 (C-7), 25.8 (C-18), 23.8 (C-6), 21.4 (CH₃COO-), 21.3 (C-20), 20.0 (C-16), 15.6 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+H⁺) C₂₀H₃₃O₃⁺: 321.2424 uma; found: 321.2421 uma.

Acetoxylation of 86 with Mn(OAc)₃: 87

To a solution of **213** (480 mg, 1.50 mmol) in benzene (72 ml), Mn(OAc)₃·2H₂O (2.20 g, 8.21 mmol) was added and heated at 130 °C in a Dean-Stark apparatus for 16 h. After that time, the reaction was cooled down, filtered through a silica gel plug washing with EtOAc and the resulting solution was concentrated under vacuum. The crude reaction mixture was purified by column chromatography eluting with Hex:EtOAc (8:2) obtaining a mixture containing the C-3 epimers **87** (380 mg, 67 %).

3S,13-acetoxy-14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-2-one, 87a:

IR (film) ν_{max} cm⁻¹: 2964, 2875, 1742, 1687, 1373, 1235, 1225, 1052, 953, 832.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.95 (1H, s, H-1), 5.10 and 5.09 (1H, s, H-3), 4.81 (1H, m, H-13), 2.5-0.85 (10H, m), 2.21 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO}_{\text{Ring}}$), 2.04 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO}_{\text{Chain}}$), 1.20 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 1.08 (3H, s, H-19), 1.03 (3H, s, H-20), 0.87 (3H, s, H-18), 0.85 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-17).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 193.4 (C-2), 170.8/170.7 (CH_3COO^-), 168.2 (C-10), 123.1 (C-1), 81.2 (C-3), 71.1 (C-13), 45.1 (C-5), 43.7 (C-9), 39.5 (C-4), 36.7/36.6 (C-8), 36.1 (C-11), 30.3 (C-12), 27.0 (C-7), 24.4 (C-18), 22.8 (C-20), 21.4/21.3 (CH_3COO^-), 21.4 (C-19), 20.1 (C-16), 19.9 (C-6), 15.8 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₂₂H₃₄O₅Na⁺: 401.2299 uma; found 401.2296 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

3*R*,13-acetoxy-14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-2-one, 87b:

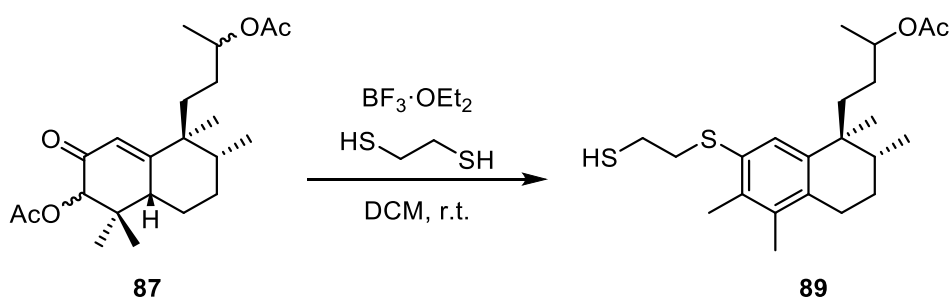
IR (film) ν_{\max} cm^{-1} : 2964, 2875, 1742, 1687, 1373, 1235, 1225, 1052, 953, 832.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 5.82 (1H, s, H-1), 5.31 (1H, s, H-3), 4.81 (1H, m, H-13), 2.21 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO}_{\text{Ring}}$), 2.04 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO}_{\text{Chain}}$), 1.20 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 1.04 (3H, s, H-18), 1.03 (3H, s, H-20), 1.00 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-17).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 193.3 (C-2), 170.8/170.5 ($\text{CH}_3\text{COO}-$), 168.2 (C-10), 123.0 (C-1), 77.6 (C-3), 71.0 (C-13), 45.2 (C-5), 43.9 (C-9), 39.6 (C-4), 36.7 (C-8), 36.0 (C-11), 30.7 (C-12), 28.9 (C-7), 24.9 (C-6), 24.0 (C-18), 22.9 (C-20), 21.4 and 20.8 ($\text{CH}_3\text{COO}-$), 19.9 (C-16), 16.0 (C-19), 15.4 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for $(\text{M}+\text{Na}^+)$ $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_5\text{Na}^+$: 401.2299 uma; found 401.2296 uma.

HMBC and HSQC see *Bidimensional tables*.

Reaction of 87 with 1,2-ethanedithiol at r.t.: 89

To a solution of **87** (140 mg, 0.36 mmol) in DCM (7.2 ml), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (41 μl , 0.324 mmol) and 1,2-ethanedithiol (0.15 ml, 1.77 mmol) were added at 0 °C. The resulting reaction mixture was allowed to warm to r.t. and it was stirred for additional 20 h at this temperature. After that time, it was added NaHCO_3 (6%), extracted with Et_2O and the combined organic extracts were washed with NaCl (sat.), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (9:1) to afford **89** (123 mg, 87%).

Compound 89:

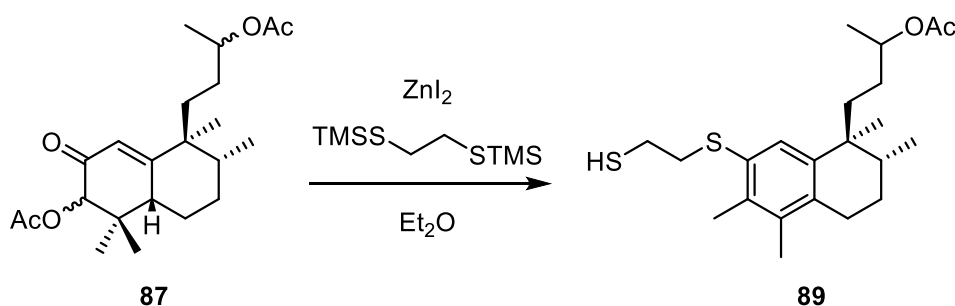
IR (film) ν_{\max} cm^{-1} : 2961, 2925, 1738, 1460, 1381, 1362, 1242, 1035, 830.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 7.27 (1H, s, H-1), 4.80 (1H, m, H-13), 3.20-3.50 (6H, m, H-6 and $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.43/2.42 (3H, s, H-19), 2.15 (3H, s, H-18), 2.04/2.02 (3H, s, OOCCH_3), 1.16/1.15 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 1.12 (3H, s, H-20), 0.95/0.93 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-17).

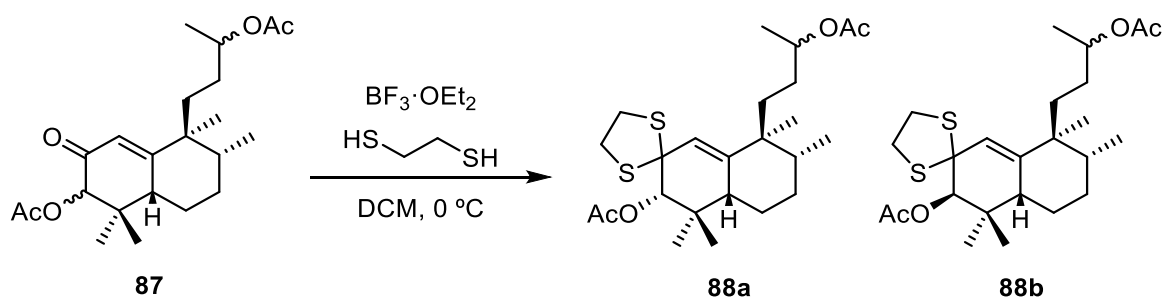
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 170.7 (OOCCH_3), 142.2 (C-10), 135.8 (C-5), 135.5 (C-4), 135.3 (C-3), 130.4 (C-2), 129.3 (C-1), 71.5 (C-13), 40.1/40.0 (C-9), 39.2/39.0 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 35.5/35.3 (C-11), 32.8/32.7 (C-8), 30.6/30.5 (C-12), 27.4/27.3 (C-7), 25.9 (C-16), 24.3/24.2 (C-6), 21.5/21.4 (OOCCH_3), 20.0/19.9 (C-20), 17.5/17.4 (C-19), 16.1 (C-17), 16.0/15.9 (C-18).

HMBC and HSQC see *Bidimensional tables*.

Reaction of 87 with ZnI_2 : 89



To a solution of **87** (36.6 mg, 0.097 mmol) in Et₂O (1 ml), ZnI_2 (2.1 mg, 0.007 mmol) was added and the resulting reaction mixture was cooled at -20 °C. Then, 1,2-bis(trimethylsilyl)ethanedithiol (0.12 ml, 0.194 mmol) was added. The reaction was stirred at r.t. for 12 h. Afterwards H₂O was added to the reaction mixture and it was extracted with Et₂O. The combined organic extracts were washed with NaCl (sat.), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated under vacuum. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (9:1) to afford **89** (36 mg, 93 %).

Reaction of **87 with 1,2-ethanedithiol at 0°C: **88****

To a solution of **87** (150 mg, 0.40 mmol) in DCM (8.0 ml), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (59 μl , 0.48 mmol) was added at 0 °C and it was allowed to react at that temperature for 1 h 15 min. After that time, it was added 1,2-ethanedithiol (320 μl , 3.90 mmol) and the reaction was stirred at 0 °C for additional 20 h. Then, NaHCO_3 (6%) was added and the resulting mixture was extracted with Et_2O . The combined organic extracts were washed with NaCl (sat.), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered and evaporated under vacuum. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (9:1) to afford **88** (27 mg, 15%) and recovering the starting material mixture **87** (106 mg, 70 %).

2-(1,3-dithiolan-2-yl)-14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-3S,13(R,S)-diol diacetate, **88a:**

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 5.50 (1H, s, H-1), 5.15/5.13 (1H, s, H-3), 4.82 (1H, m, H-13), 3.28/3.19 (4H, m, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2.12 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO}_{\text{Ring}}$), 2.04 (3H, s, $\text{CH}_3\text{COO}_{\text{Chain}}$), 1.20 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 1.02 (3H, s, H-18), 1.01 (3H, s, H-20), 0.96 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-17).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 170.8/170.5 (CH_3COO -), 140.8 (C-10), 125.9 (C-1), 81.1 (C-3), 71.5 (C-13), 68.5 (C-2), 42.8 (C-5), 42.5 (C-9), 39.9 ($-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 38.3 (C-8), 37.5 (C-4), 34.7 (C-11), 30.4 (C-7), 28.4 (C-12), 27.4 (C-18), 22.7 (C-20), 22.6 (C-6), 22.5 (C-19), 21.4/21.1 (CH_3COO), 20.0 (C-16), 15.6 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for $(\text{M}+\text{Na}^+)$ $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{S}_2\text{Na}^+$:477.2104 uma; found 477.2101 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

2-(1,3-dithiolan-2-yl)-14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-3 α ,13(R,S)-diol, 90:

IR (film) ν_{\max} cm^{-1} : 3428, 2928, 2912, 1875, 1467, 1382, 1062, 910, 812.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 5.59 (1H, m, H-1), 3.71 (1H, m, H-13), 3.62 (1H, m, H-3), 3.46-3.17 (4H, m, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 2.70 (1H, m, $-\text{OH}$), 2.06-1.12 (10H, m), 1.19 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-16), 1.05 (3H, s, H-19), 0.98 (3H, s, H-20), 0.82 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-17), 0.77 (3H, s, H-18).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 141.1 (C-10), 126.6 (C-1), 80.6 (C-3), 72.3 (C-2), 68.8/68.7 (C-13), 43.3/43.2 (C-5), 42.0 and 38.4 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}$) 41.9 (C-9), 38.9 (C-4), 36.9/36.8 (C-8), 36.1/35.9 (C-11), 33.8 (C-7), 27.5 (C-12), 25.4 (C-19), 23.8/23.5 (C-16), 23.2/23.1 (C-20), 20.1 (C-6), 16.0 (C-17), 15.8 (C-18).

HRMS (ESI): Calcd. for $(\text{M}+\text{Na}^+)$ $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{S}_2\text{Na}^+$: 393.1898 uma; found 393.1993 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

2-(1,3-dithiolan-2-yl)-14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-3 β ,13(R,S)-diol, 91:

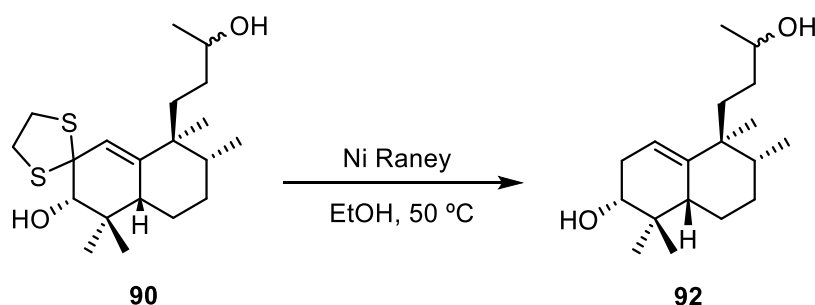
IR (film) ν_{\max} cm^{-1} : 3418, 2921, 2908, 1871, 1447, 1389, 1060, 912, 810.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 5.48 (1H, m, H-1), 3.86 (1H, m, H-3), 3.74 (1H, m, H-13), 3.45-3.19 (4H, m, $-\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}-$), 2.20-1.10 (10H, m), 1.17 (3H, m, H-16), 1.01 (3H, s, Me-18), 0.96 (3H, s, Me-20), 0.86 (3H, s, H-19), 0.82 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-17).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ/ppm : 141.7 (C-10), 126.0/125.9 (C-1), 77.3 (C-3), 72.4 (C-2), 68.8/68.7 (C-13), 45.0 (C-5), 43.2 (C-9), 40.1 (C-8), 41.7 and 38.8 ($\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 37.6 (C-4), 34.3 (C-11), 33.7 (C-12), 29.2 (C-7), 24.5 (C-18), 24.0 (C-6), 23.5 (C-16), 23.1/23.0 (C-19), 21.9/21.8 (C-20), 15.6/15.5 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for $(\text{M}+\text{Na}^+)$ $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2\text{S}_2\text{Na}^+$: 393.1898 uma; found: 393.1895 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

Reduction of 90 with Ni (Raney): 92

To a suspension of Ni Raney (879 mg, 14.97 mmol) in EtOH, a solution of dithiolane **90** (36 mg, 0.097 mmol) in EtOH (4.9 ml) was added. The resulting mixture was heated at 50 °C for 1 h and 15 min. After that time, the reaction was cooled to r.t. and filtered through a silica gel plug eluting with EtOH and EtOAc. The resulting solution was evaporated to result the reduction product **92** (26 mg, 99 %).

14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-3 α ,13(R,S)-diol, 92:

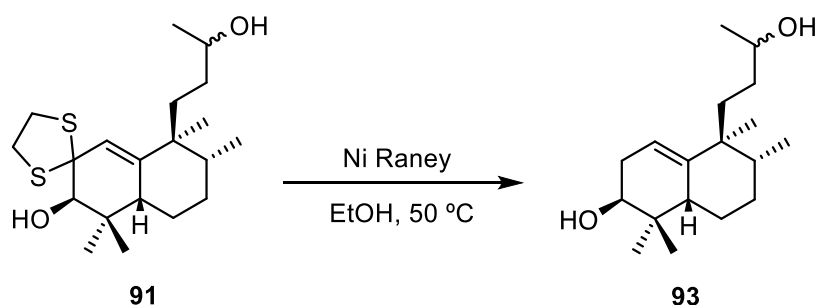
IR (film) ν_{\max} cm⁻¹: 3360, 2914, 2873, 2851, 1457, 1386, 1059, 811.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 5.26 (1H, m, H-1), 3.71 (1H, m, H-13), 3.38 (1H, m, H-3), 2.34-1.08 (12H, m), 1.18 (3H, d, J = 6.1 Hz, H-16), 0.97 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-20), 0.82 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-17), 0.80 (3H, s, H-19).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 141.8 (C-10), 117.2 (C-1), 75.2 (C-3), 68.9 (C-13), 43.7 (C-5), 42.3 (C-9), 37.8 (C-8), 37.0 (C-4), 35.4 (C-11), 33.8 (C-12), 31.4 (C-2), 29.7 (C-7), 28.4 (C-6), 25.3 (C-18), 23.7 (C-16), 23.1 (C-20), 15.8 (C-19), 15.7 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M+Na⁺) C₁₈H₃₂O₂Na⁺: 303.2300 uma; found: 303.2296 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

Reduction of 91 with Ni (Raney): 93

To a suspension of Ni Raney (738 mg, 12.58 mmol) in EtOH, a solution of dithiolane **91** (30 mg, 0.081 mmol) in EtOH (4.1 ml) was added. The resulting mixture was heated at 50 °C for 1 h and 15 min. After that time, the reaction was cooled to r.t. and filtered through a silica gel plug eluting with EtOH and EtOAc. The resulting solution was evaporated to result the reduction product **93** (21 mg, 96 %).

14,15-dinor-ent-halim-1(10)-en-3 β ,13(R,S)-diol, **93**:

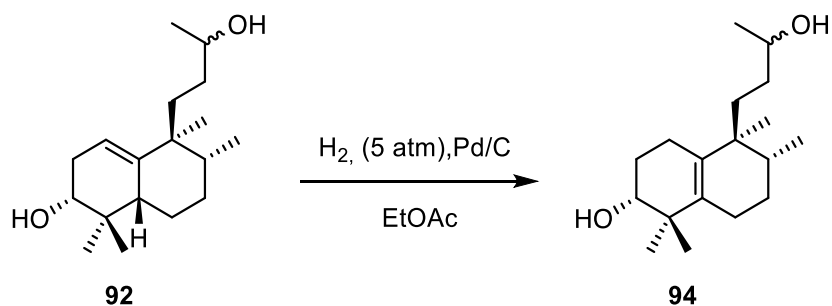
IR (film) ν_{\max} cm^{-1} : 3354, 2937, 2875, 2851, 1451, 1381, 1046, 910, 812.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 5.20 (1H, m, H-1), 3.78-3.69 (1H, m, H-13), 3.52 (1H, m, H-3), 2.42-1.10 (12H, m), 1.17 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-16), 0.93 (3H, s, H-18), 0.90 (3H, s, H-20), 0.89 (3H, s, H-19), 0.82 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-17).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 141.9/141.7 (C-10), 116.8 (C-1), 73.0 (C-3), 68.7/68.5 (C-13), 42.9 (C-9), 39.1 (C-5), 39.0 (C-8), 36.2 (C-4), 34.8/34.2 (C-11), 33.8/33.5 (C-12), 31.7/31.6 (C-2), 28.8/28.7 (C-7), 24.0 (C-16), 23.2 (C-18), 23.0 (C-20), 22.7 (C-6), 22.4 (C-19), 15.7 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for $(\text{M}+\text{Na}^+)$ $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2\text{Na}^+$: 303.2300 uma; found: 303.2303 uma.

HMQC and HMBC: see *Bidimensional tables*.

Hydrogenation of 92 with Pd/C: 94

Compound **92** (10 mg, 0.036 mmol) was placed in a vessel and dissolved in EtOAc (1 ml) containing Pd/C (25% mol/mol). The vessel was fixed in a hydrogenation apparatus, it was flushed with H₂ and adjusted the pressure to 5 atm. The reaction was stirred at 5 atm and at r.t. for 72 h. After that time, the reaction was filtered over Celite and the resulting solution was evaporated yielding **94** (10 mg, 100 %).

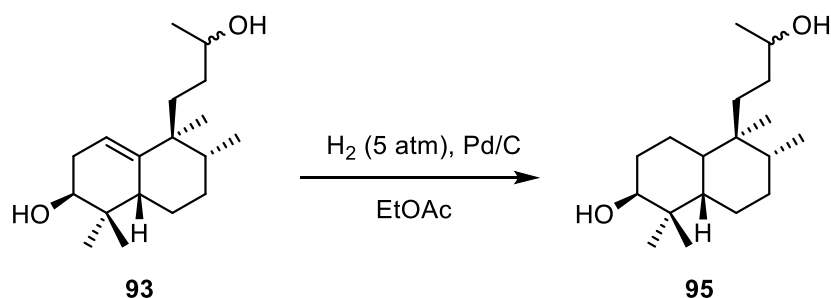
14,15-dinor-ent-halim-5(10)-en-3 α ,13(R,S)-diol, 94:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 3.73 (1H, m, H-13), 3.45 (1H, m, H-3), 2.19-1.17 (13H, m), 1.20 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-16), 1.04 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, s, H-18), 0.84 (3H, d, $J = 8.0$ Hz, H-17), 0.83 (3H, s, H-20).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 136.0 (C-5), 131.5 (C-10), 76.0 (C-3), 68.7 (C-13), 40.1 (C-9), 39.6 (C-4), 33.4/33.3 (C-12), 33.1 (C-8), 31.7 (C-11), 27.1 (C-7), 26.9 (C-6), 25.3 (C-1), 24.9 (C-18), 23.8 (C-2), 23.2 (C-16), 20.9 (C-20), 19.9 (C-19), 15.7 (C-17).

HRMS (ESI): Calcd. for (M-H)⁺ C₁₈H₃₁O₂⁺: 279.2330 uma; found: 279.2336 uma.

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

Hydrogenation of 93 with Pd/C 95

Compound **93** (14 mg, 0.049 mmol) was placed in a vessel and dissolved in EtOAc (1 ml) containing Pd/C (25% mol/mol). The vessel was fixed in a hydrogenation apparatus, it was flushed with H₂ and adjusted the pressure to 5 atm. The reaction was stirred at 5 atm and r.t. for 72 h. After that time, the reaction was filtered over Celite and the resulting solution was evaporated. The crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOA (6:4) recovering starting material **93** (10 mg,) and the hydrogenation product **95** (4 mg, 28 %)

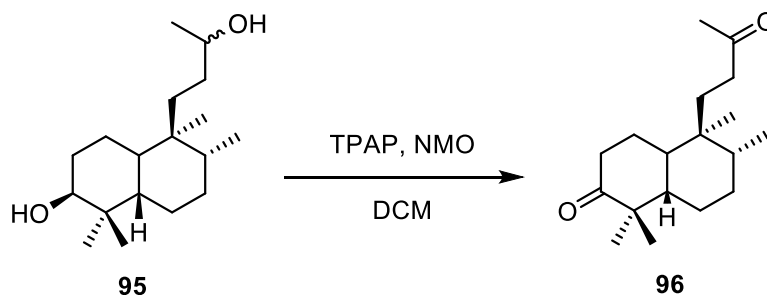
14,15-dinor-ent-halima-3 α ,13(R,S)-diol, 95:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 3.72 (1H, m, H-13), 3.38 (1H, m, H-3), 2.40-1.20 (14H, m), 1.21/1.20 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-16), 0.97 (3H, s, H-18), 0.90/0.89 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-17), 0.87 (3H, s, H-19), 0.84/0.83 (3H, s, H-20).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 76.7 (C-3), 69.1 (C-13). 39.6 (C-8), 38.3/38.1 (C-10). 37.8 (C-9), 36.9 (C-4), 33.5/33.4 (C-5), 33.2 (C-12). 29.7/29.4 (C-2), 29.1 (C-11), 28.9 (C-7), 27.9/27.8 (C-6), 26.2 (C-18). 25.2/25.1 (C-20), 23.7/23.6 (C-16), 20.7 (C-19), 19.4/19.2 (C-1), 14.1 (C-17).

HMBC and **HSQC** see *Bidimensional tables*.

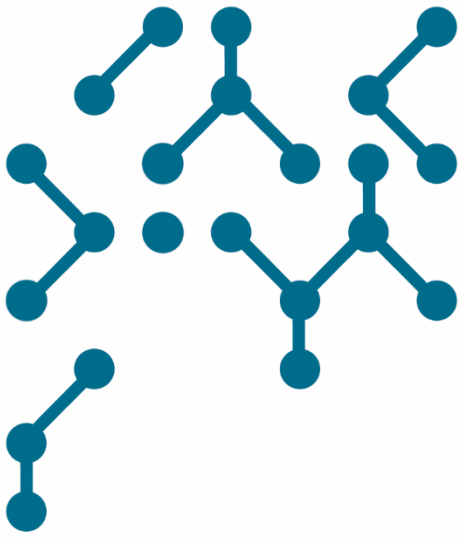
Oxidation of 95 with TPAP: 96



To a solution of diol **95** (4 mg, 0.014 mmol) in DCM (1 ml), it was added 3 Å molecular sieves, TPAP (1 mg, 0.003 mmol) and NMO (10 mg, 0.085 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at r.t. for 45 min. After that, the reaction mixture was filtered over Celite, evaporated under vacuum and the crude reaction mixture was purified by silica gel column chromatography eluting with Hex:EtOAc (9:1) resulting compound **96** (4 mg, 100 %).

14,15-dinor-*ent*-halima-3,13-dione, 96:

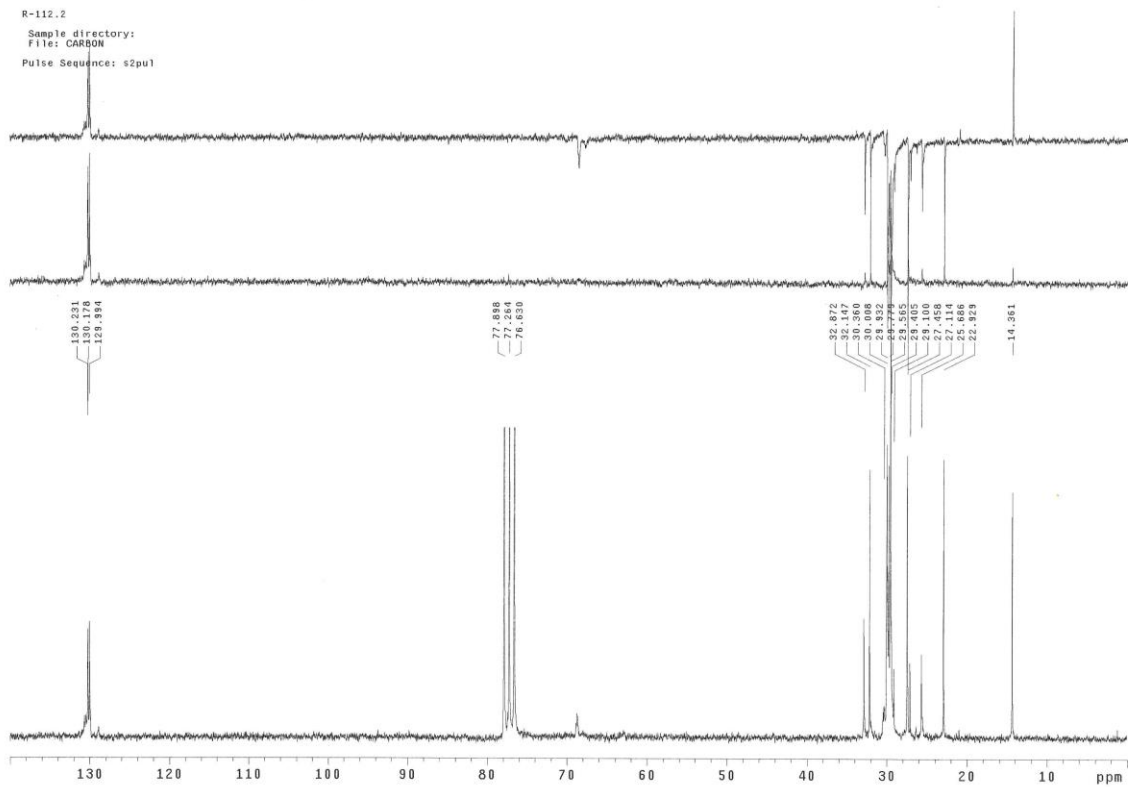
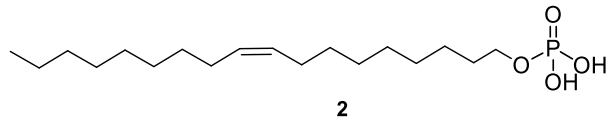
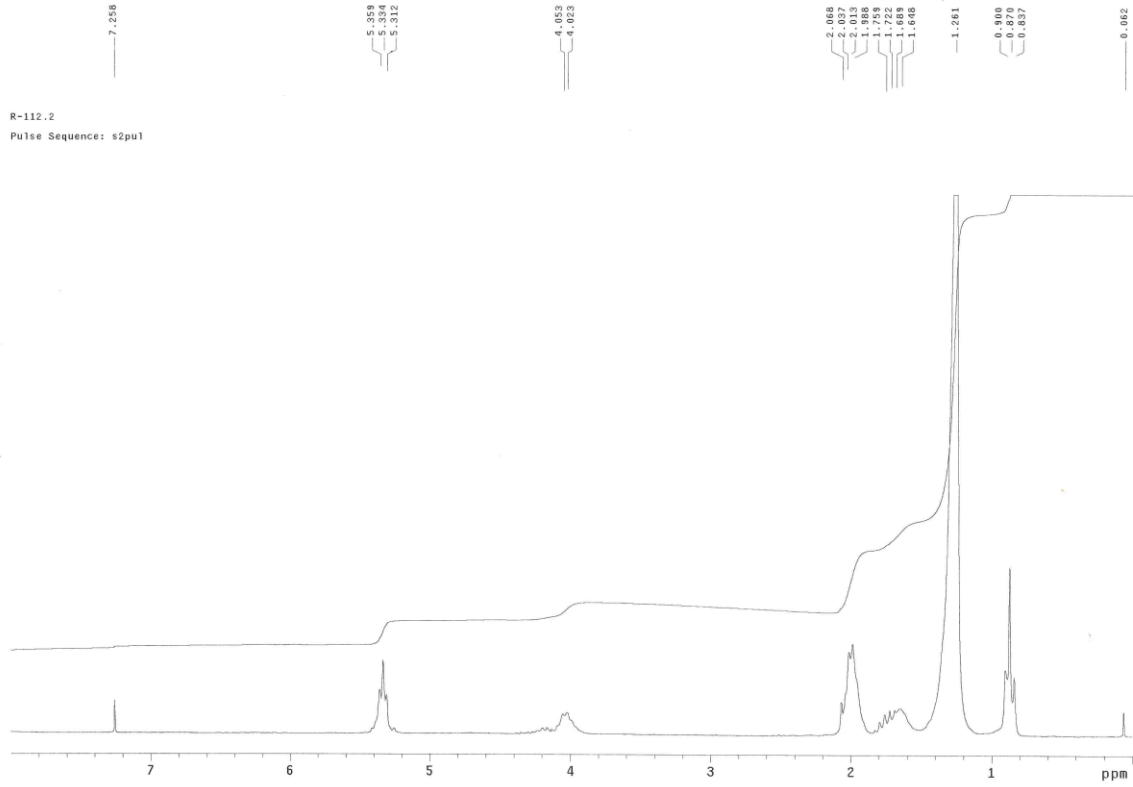
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ/ppm: 2.57-1.2 (14H, m), 2.17 minor/2.15 major (3H, s, H-16), 1.29 minor/1.28 major (3H, s, H-19), 1.05 major/0.98 minor (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-17), 0.97 major/0.91 minor (3H, s, H-18).



Espectroscopía

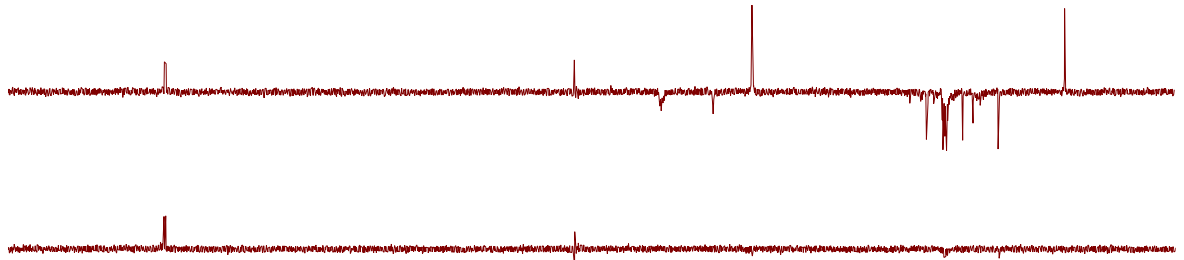
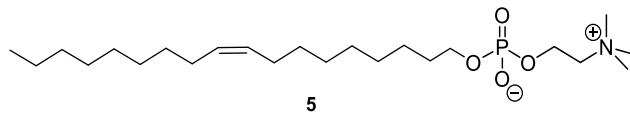
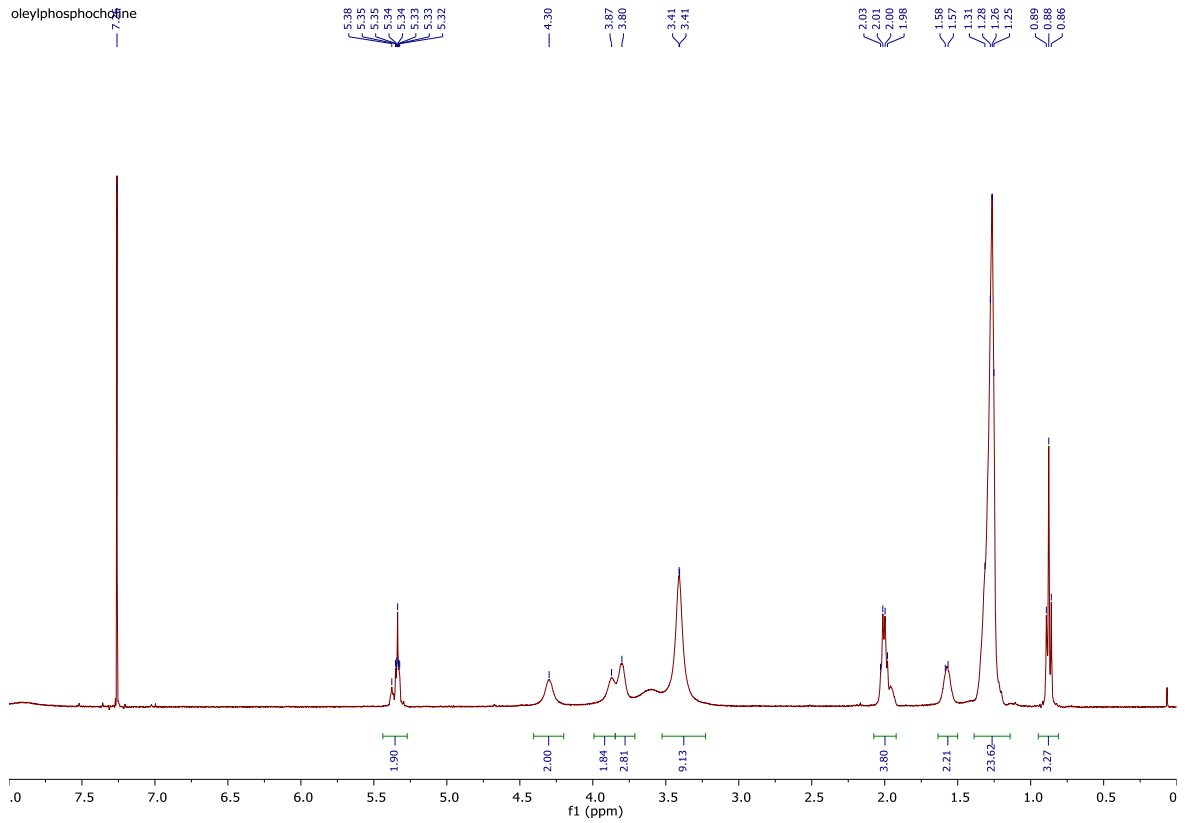
Spectroscopy



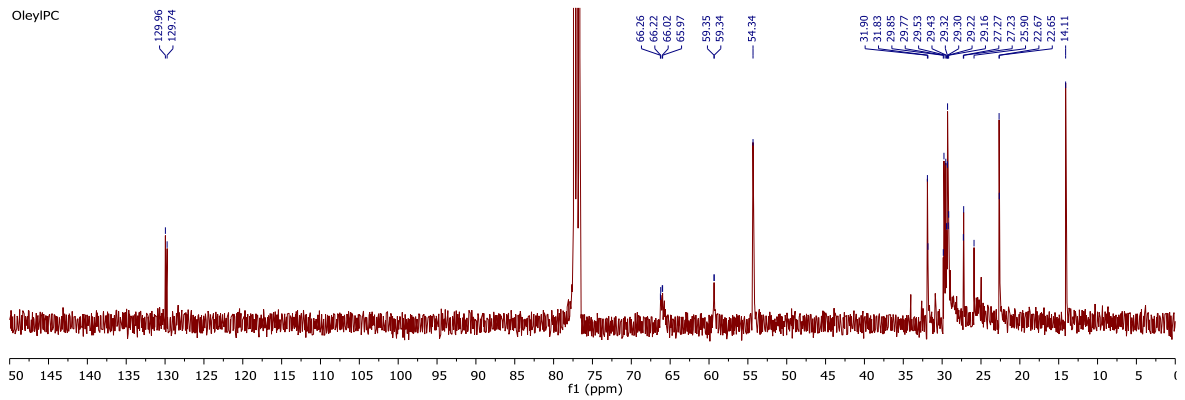


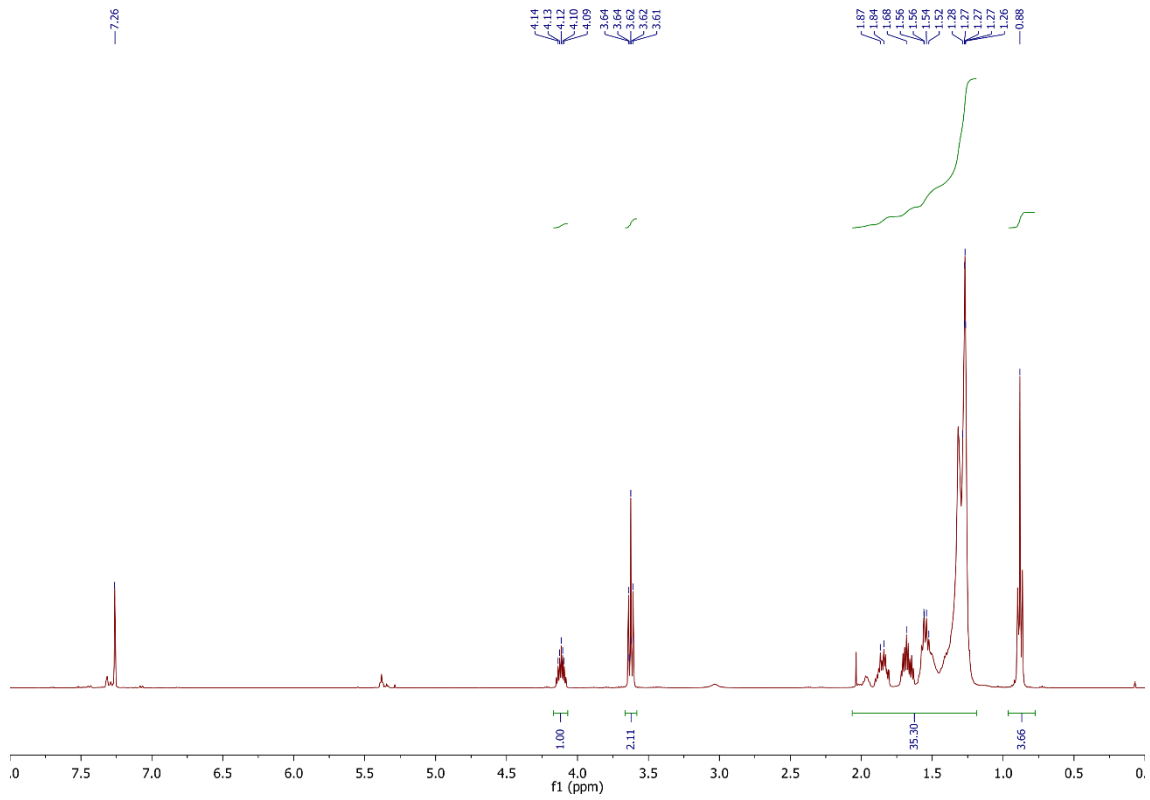
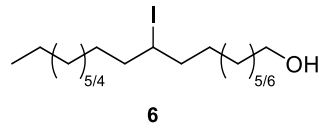
| Espectroscopía

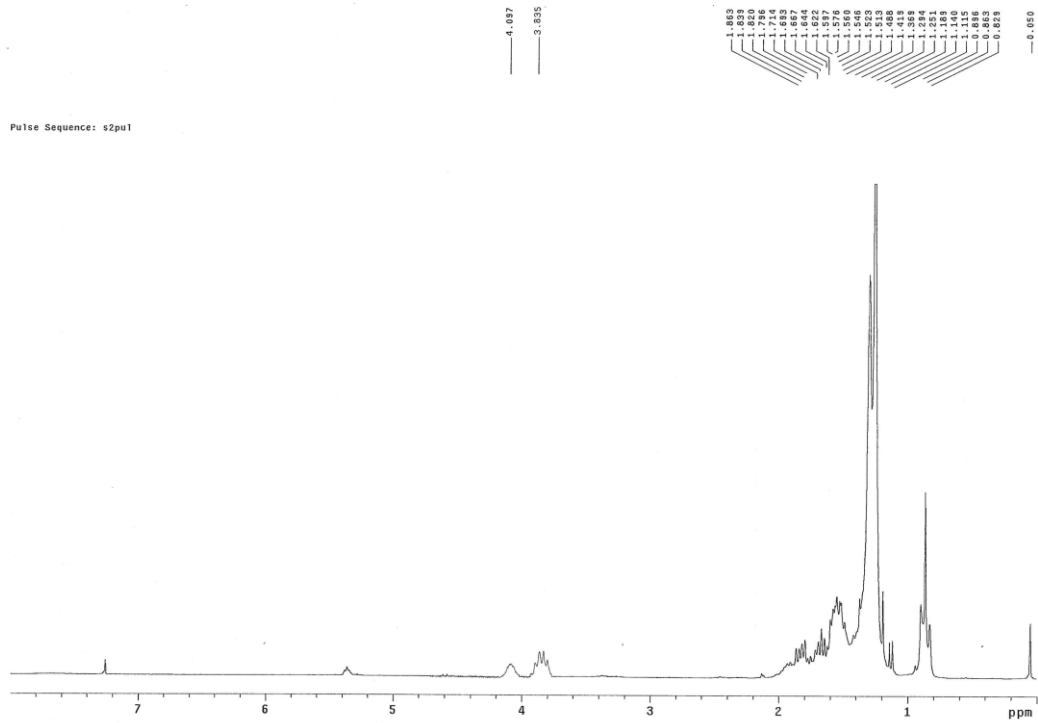
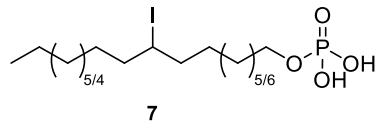
oleylphosphocholine

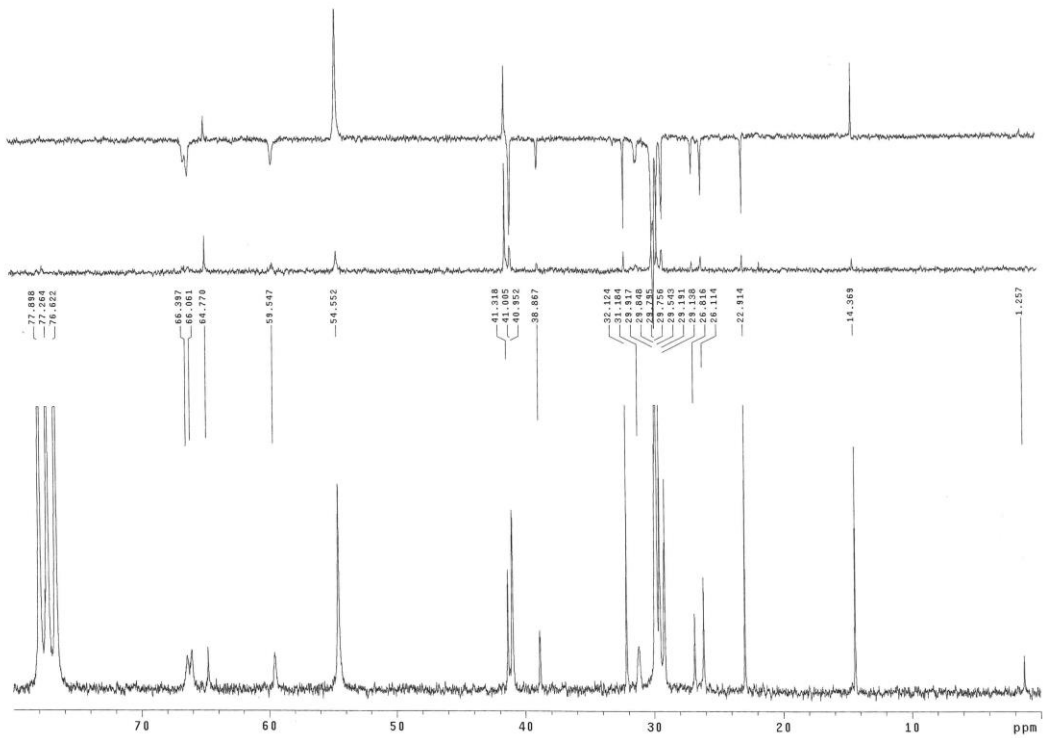
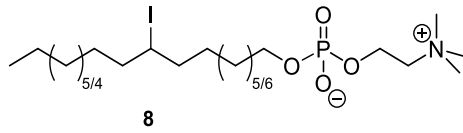
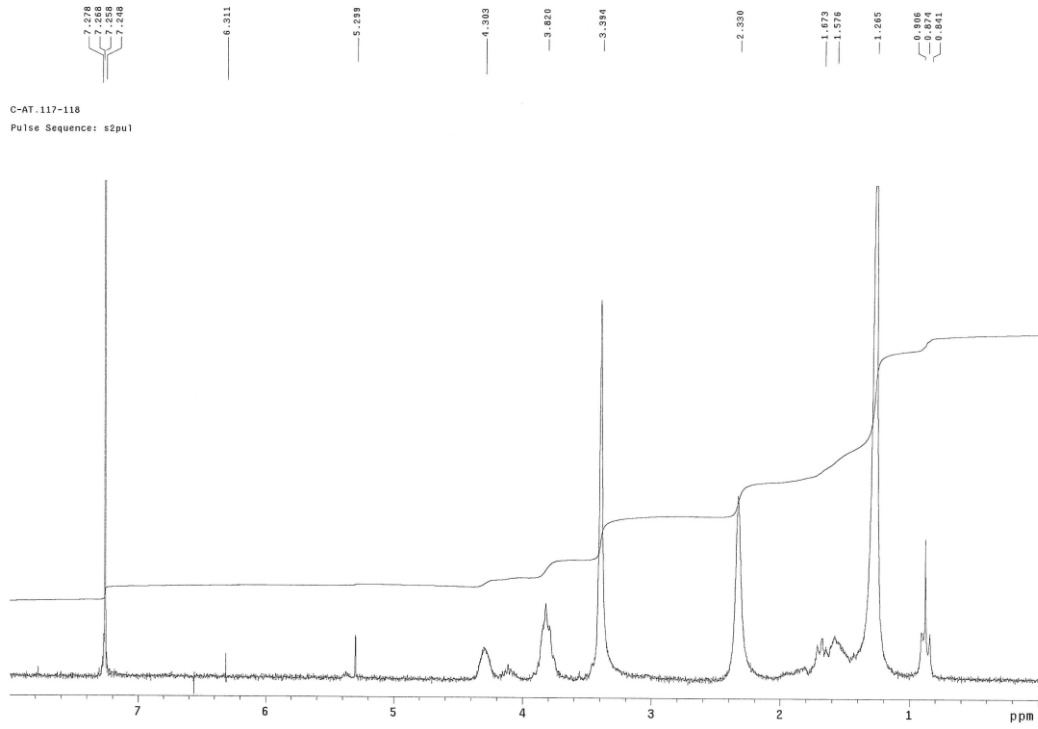


OleylPC

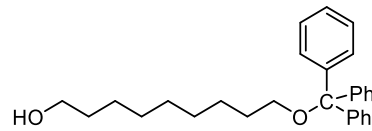
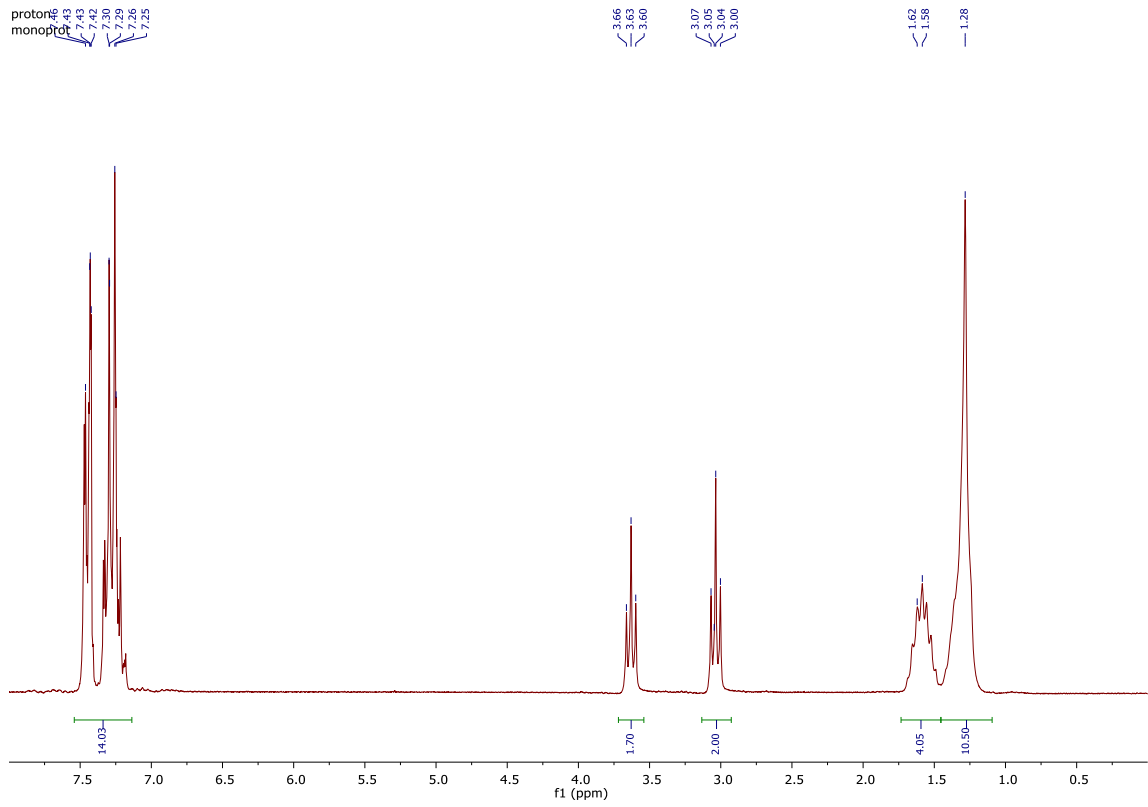








| Espectroscopía



10

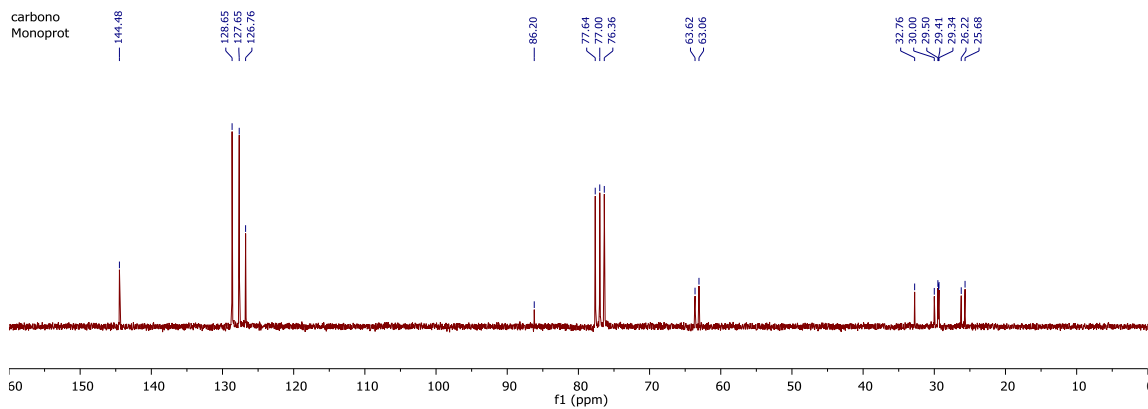
dept

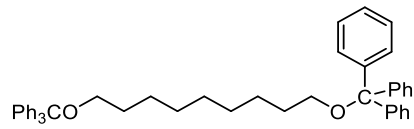
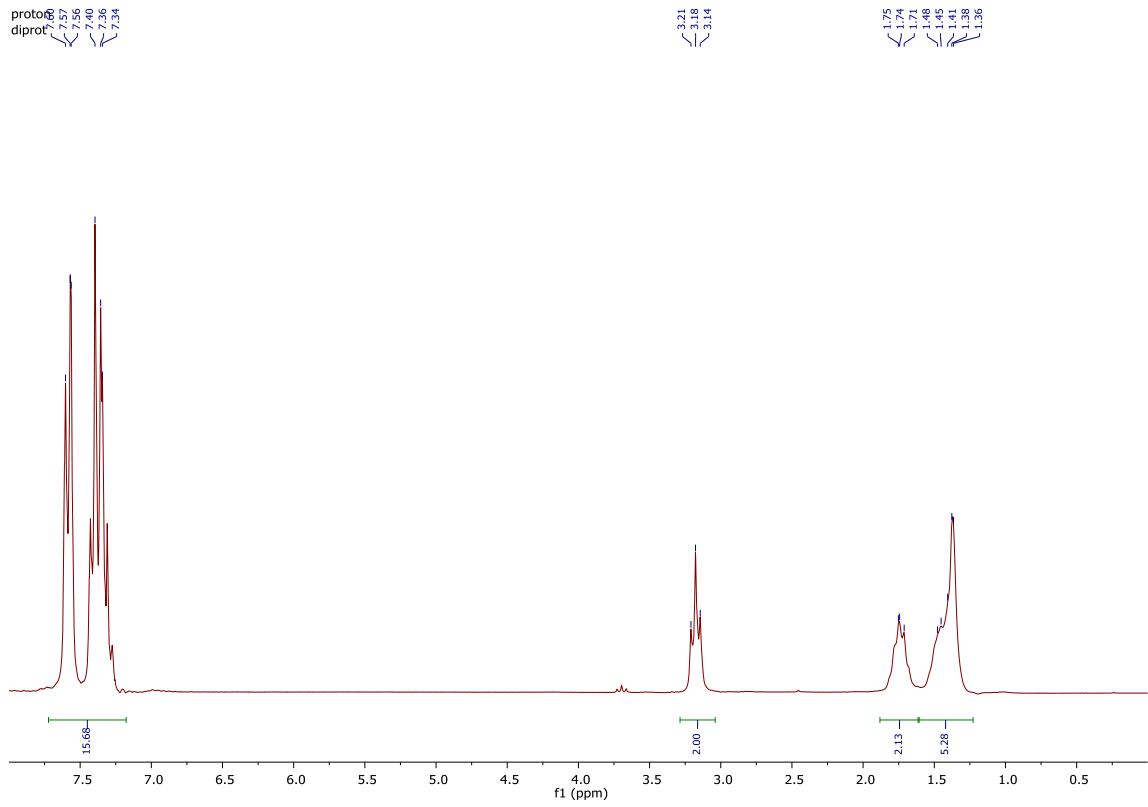


dept

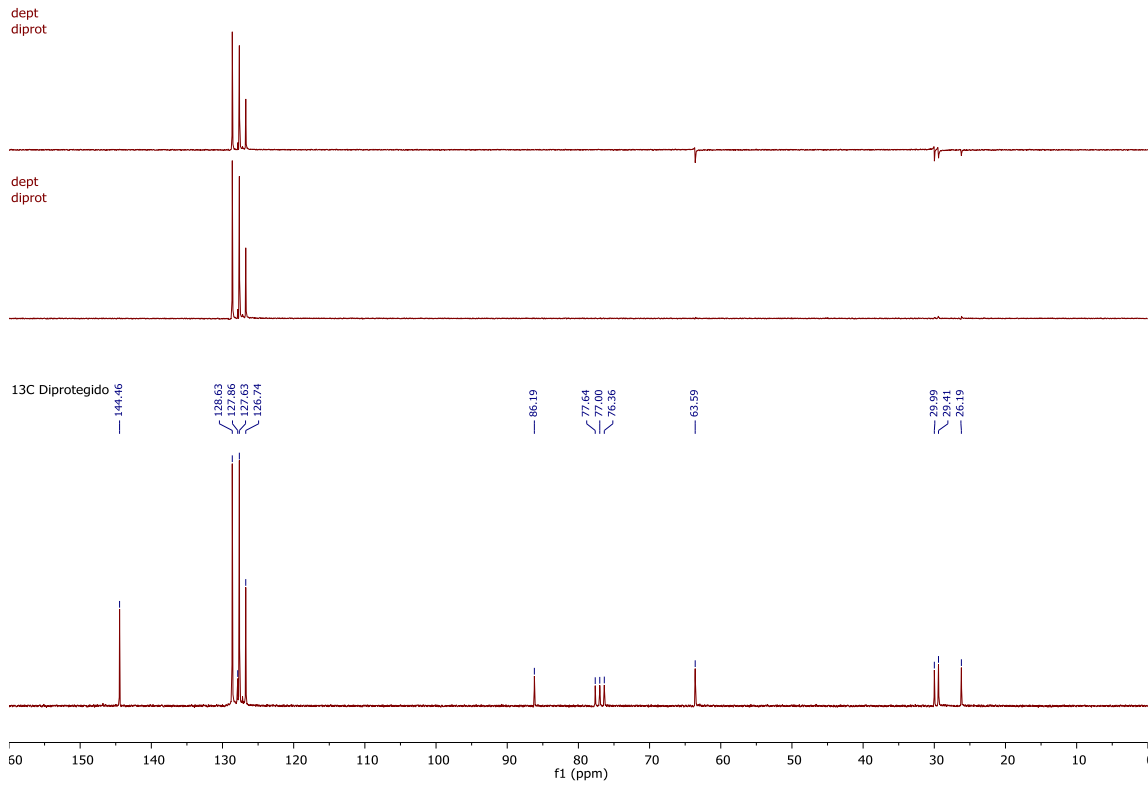


carbono
Monoprot

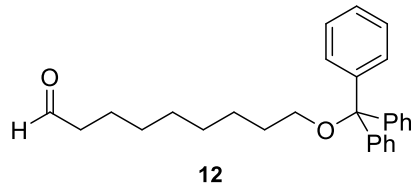
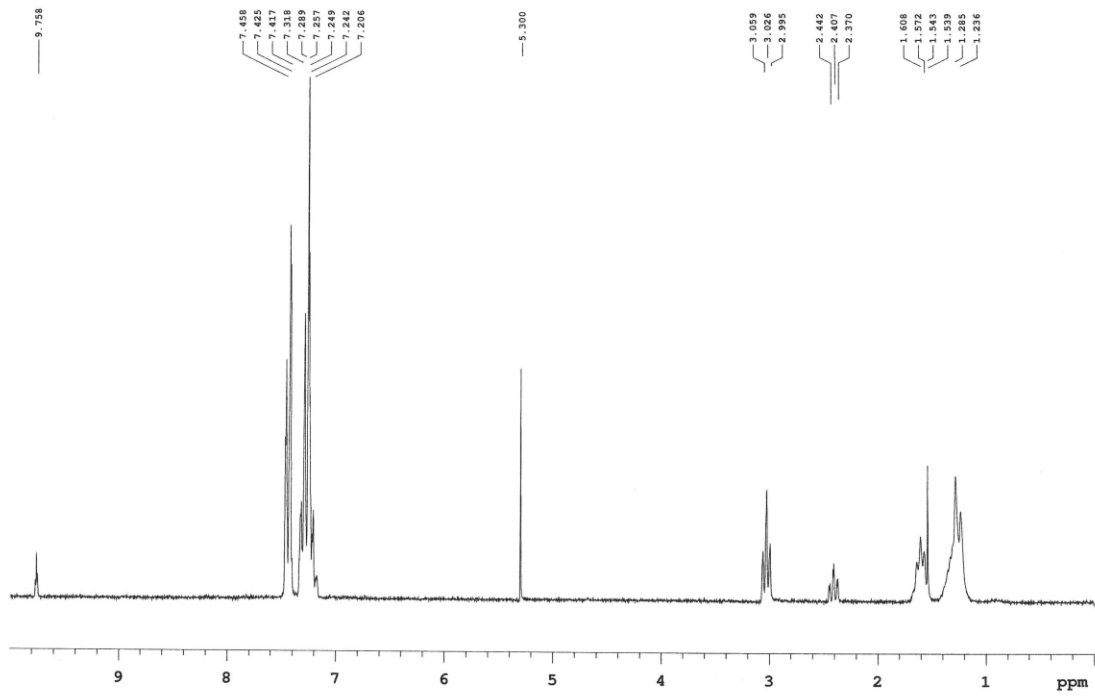




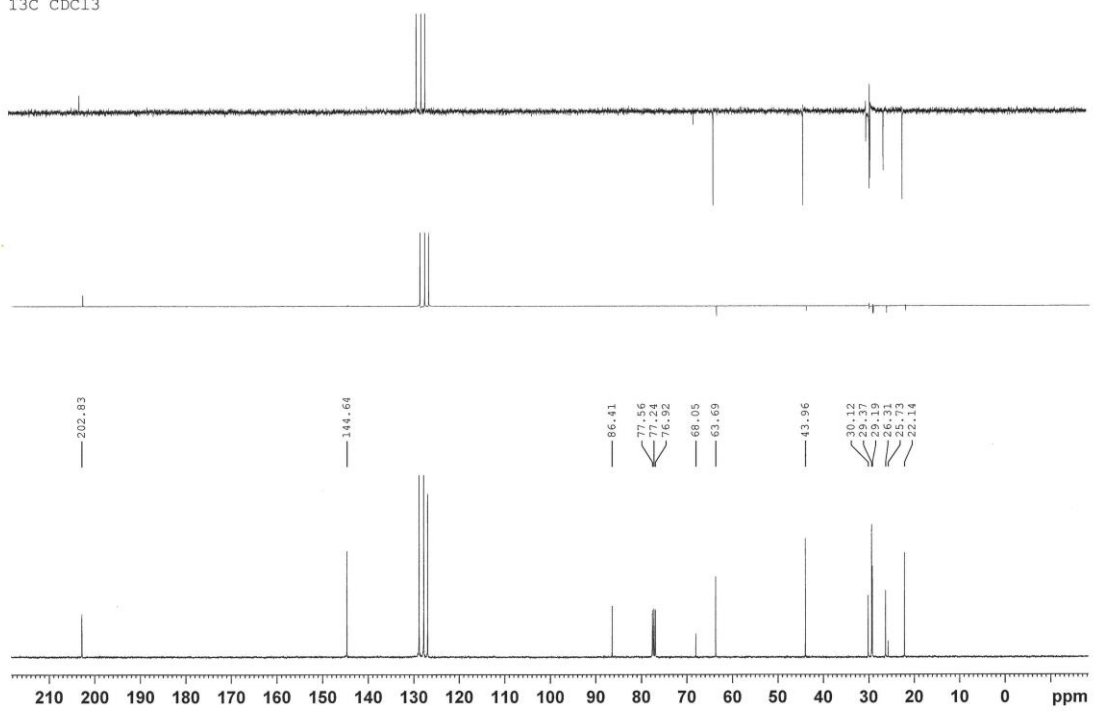
11

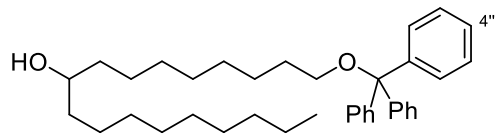
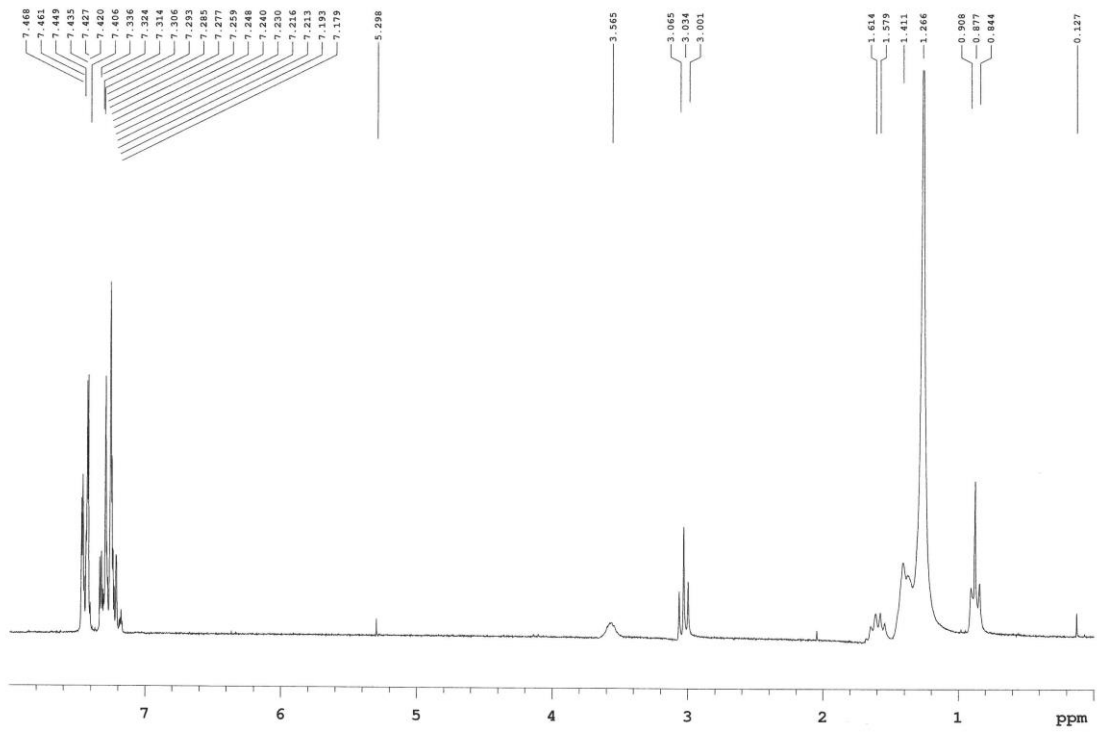


| Espectroscopía

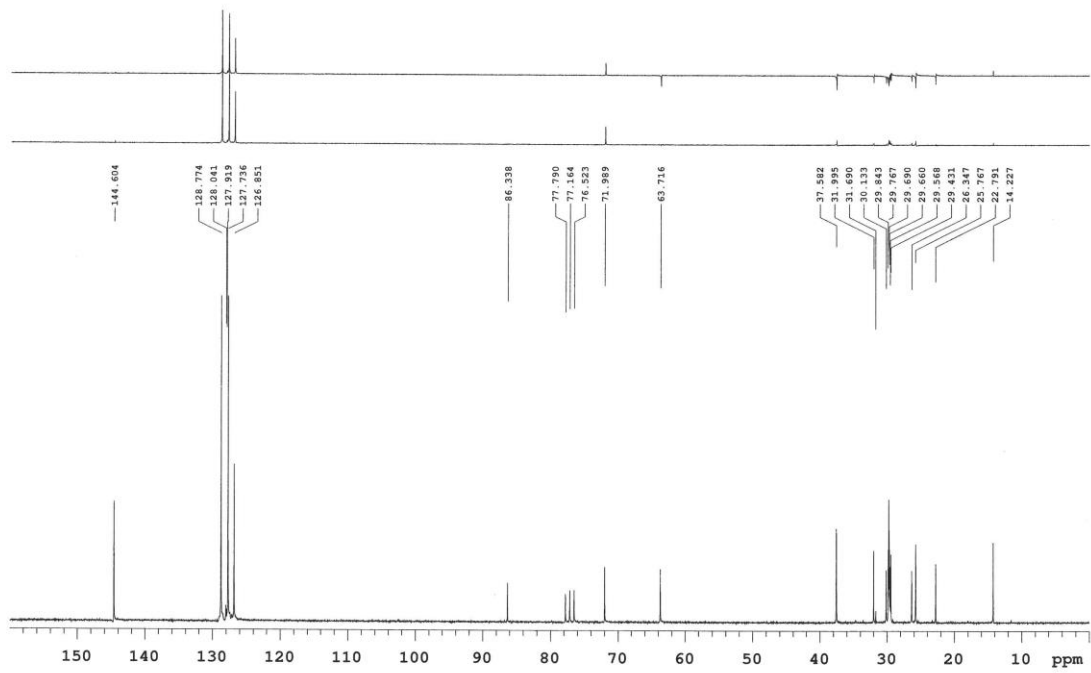


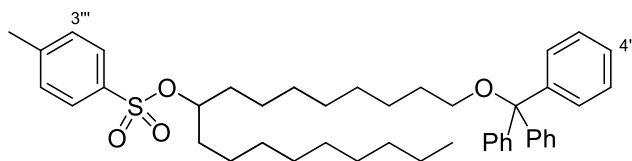
Nacho C. DJ 40-56
13C CDCl3



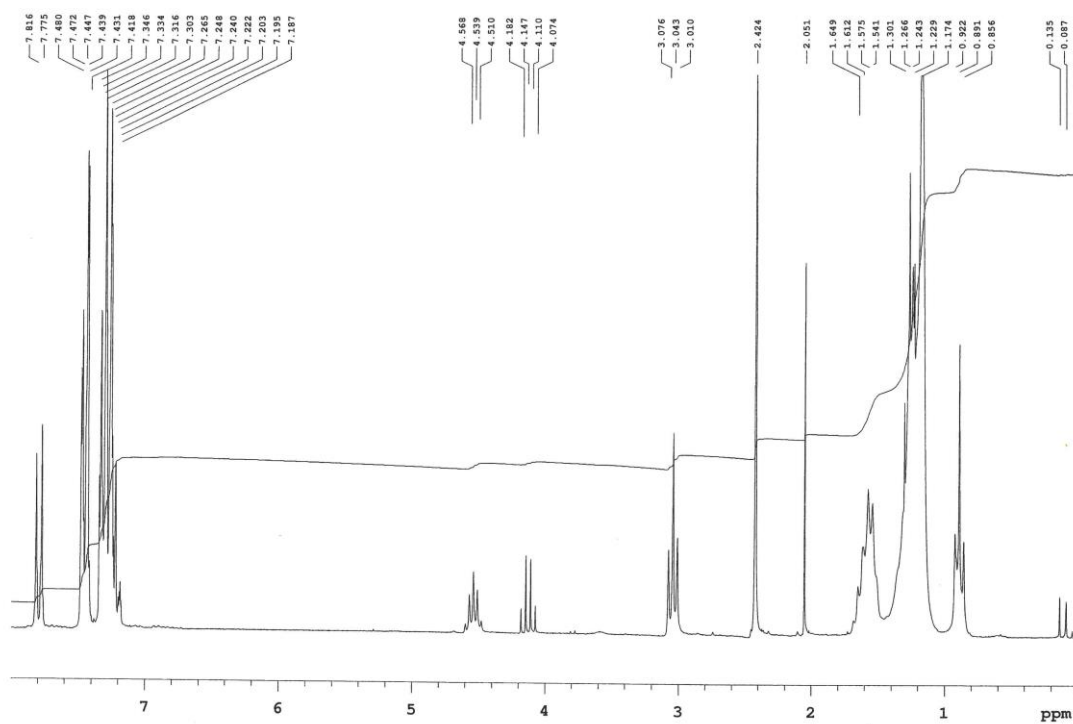


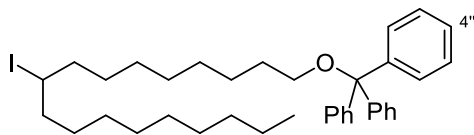
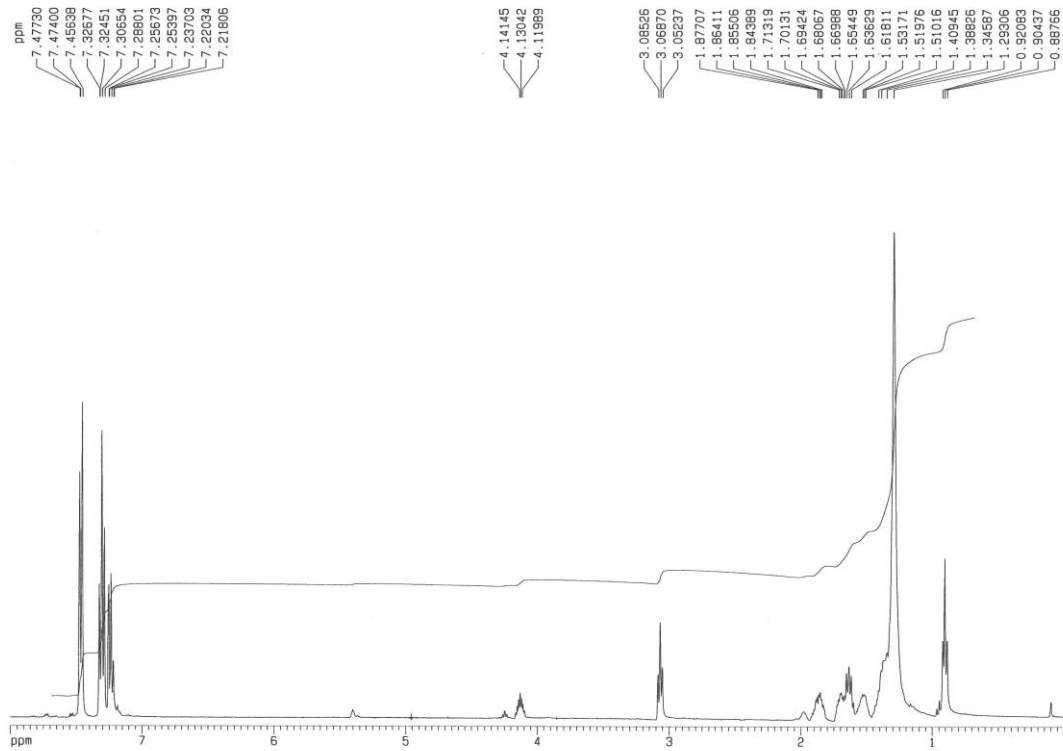
13



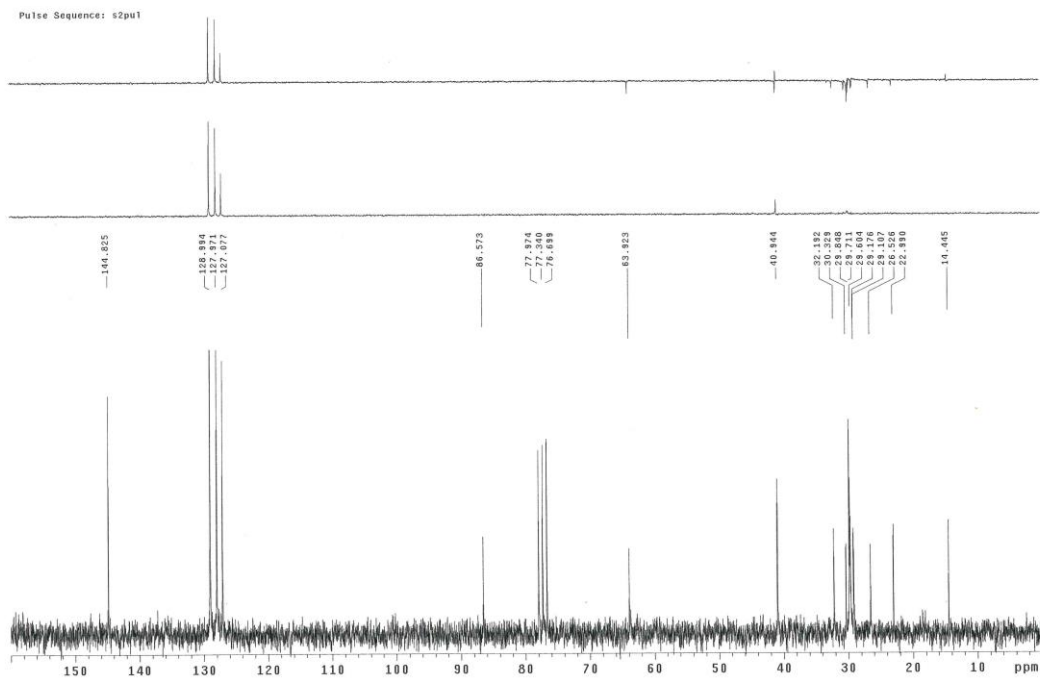


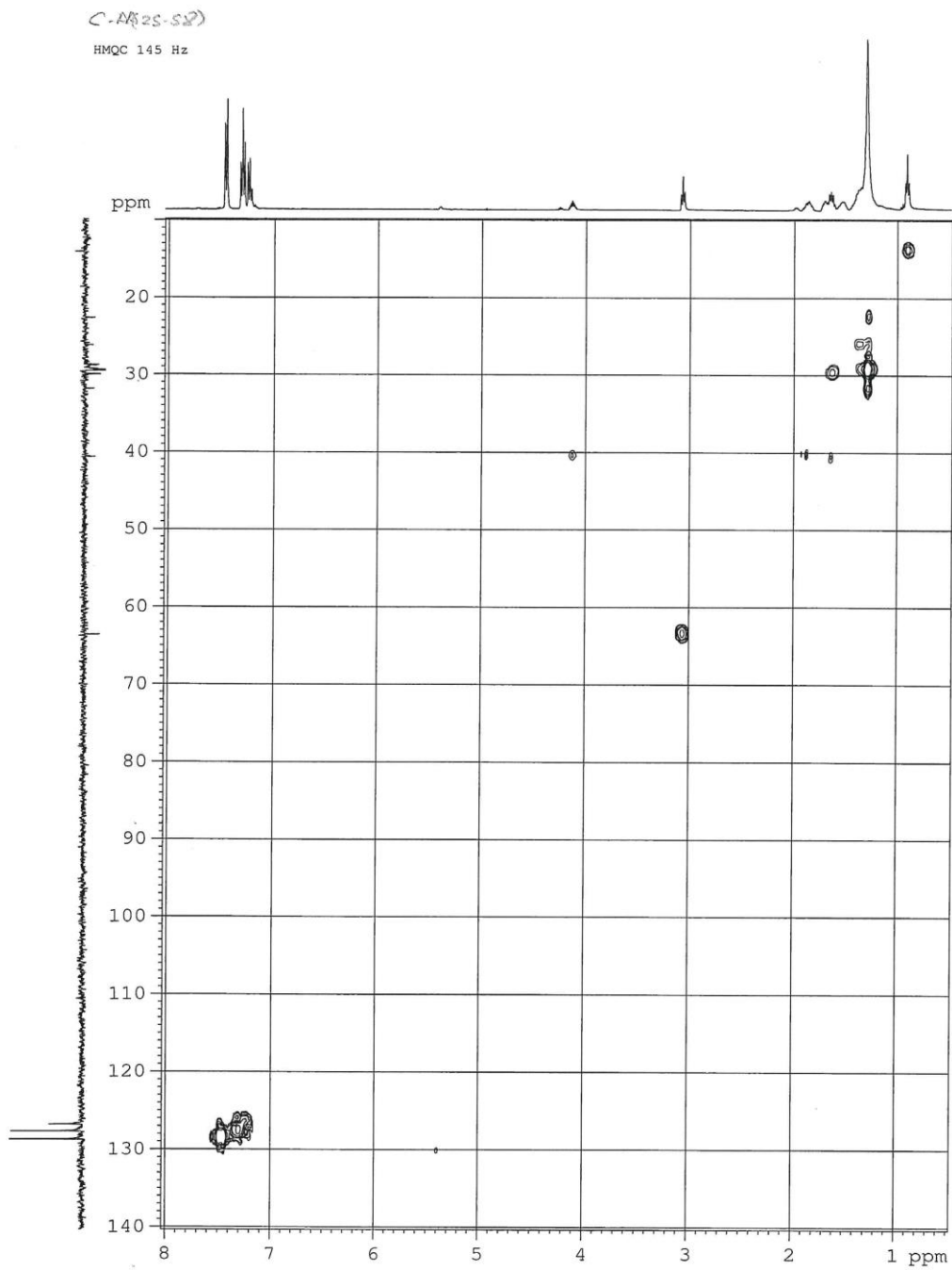
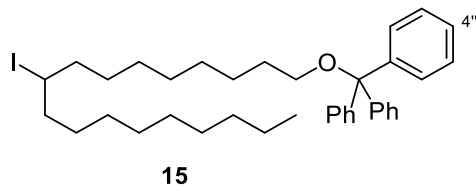
14



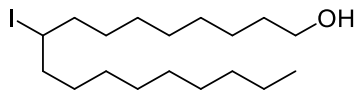
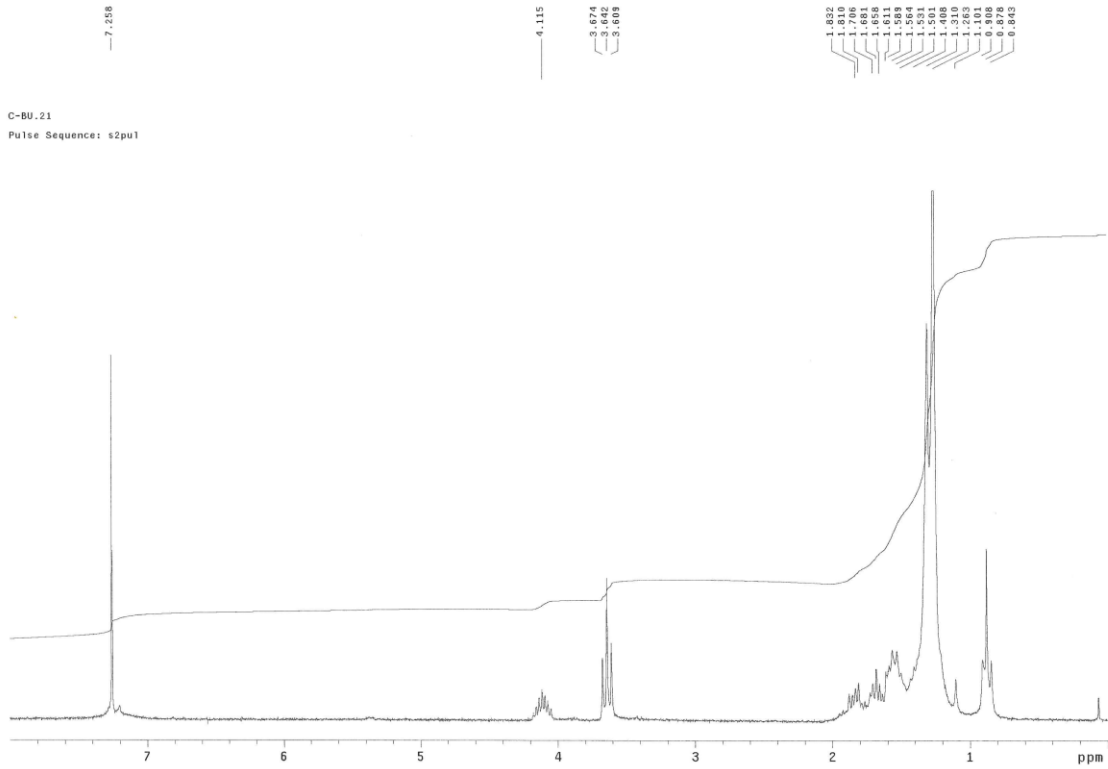


15



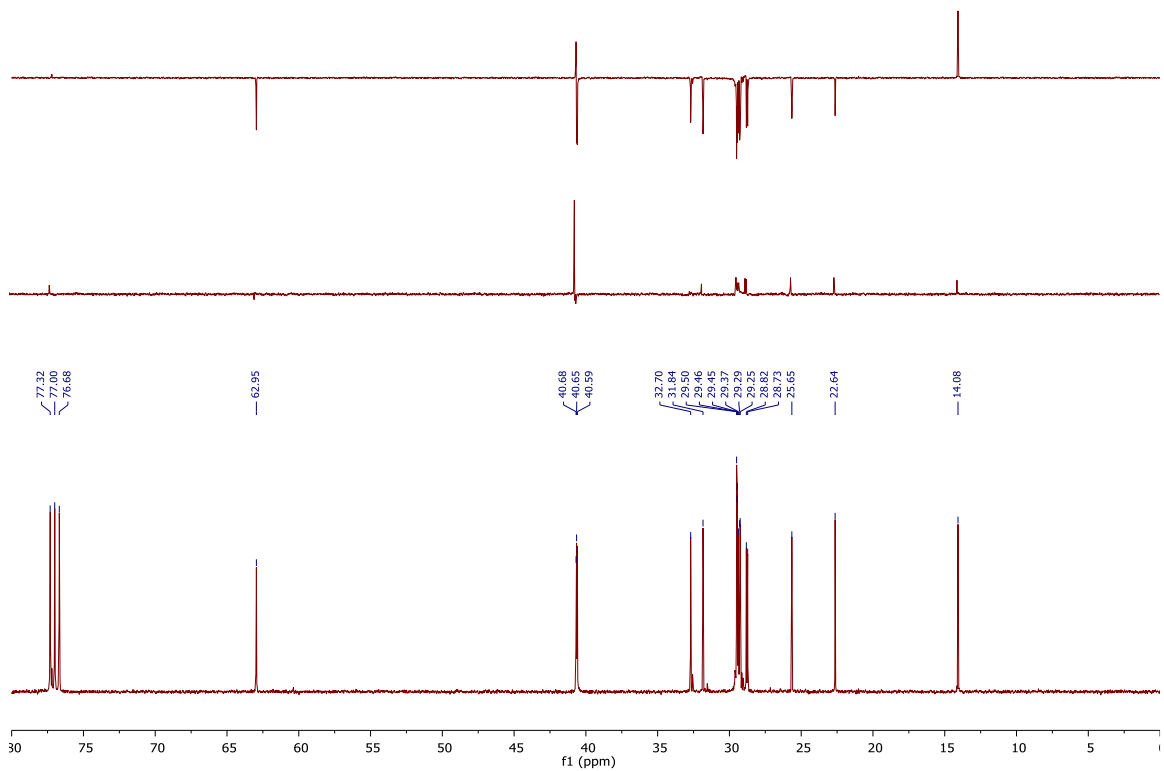


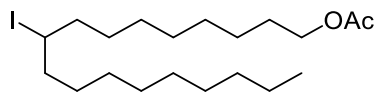
| Espectroscopía



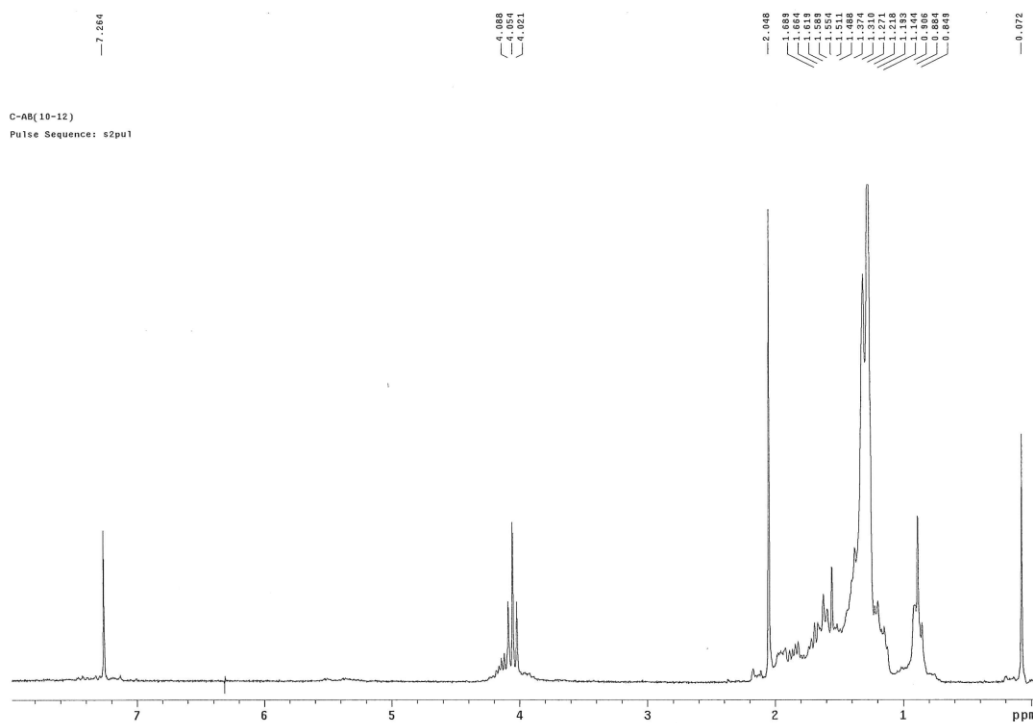
16

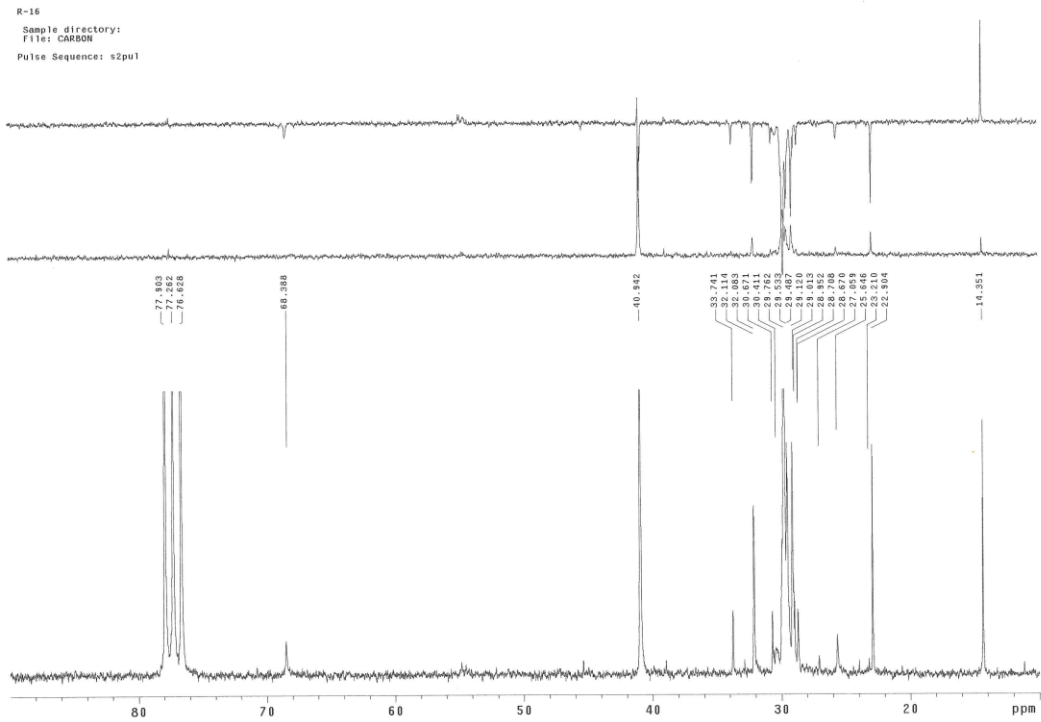
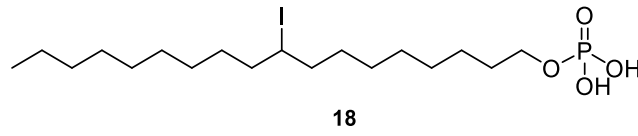
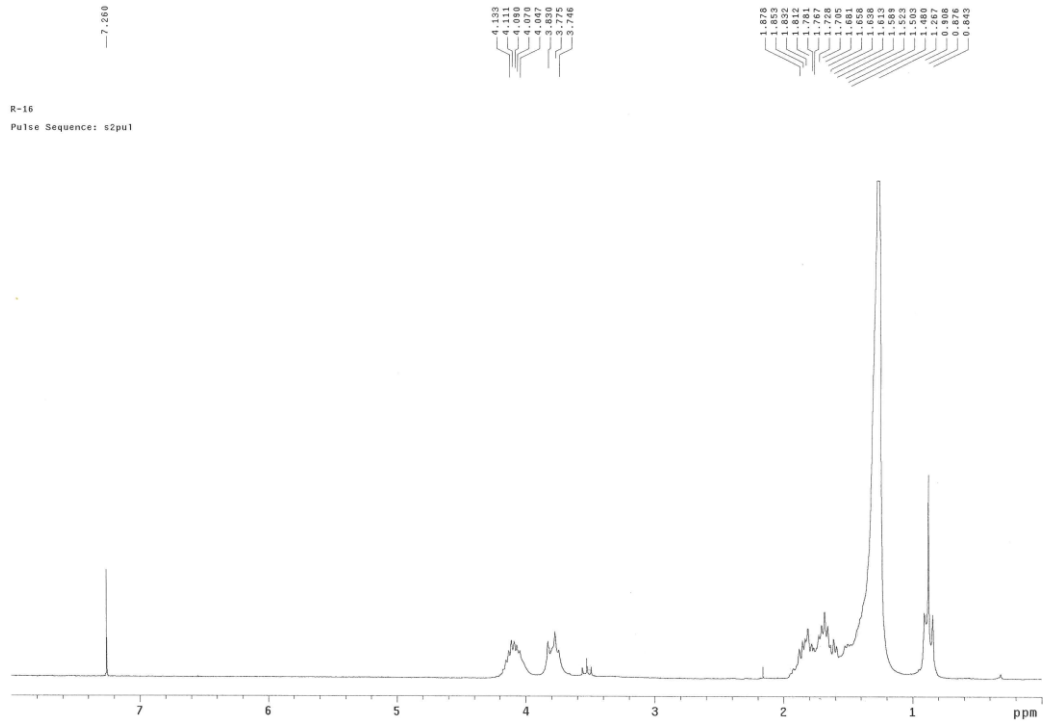
rmn-0441.3.fid

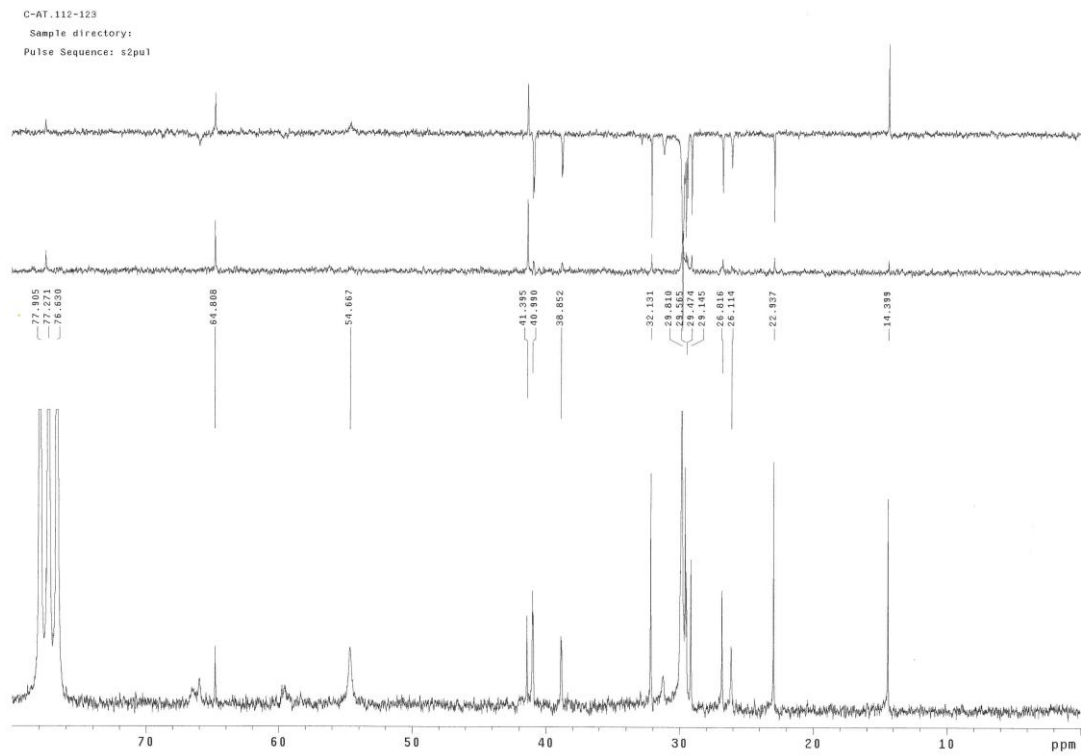
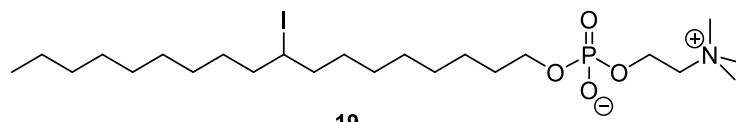
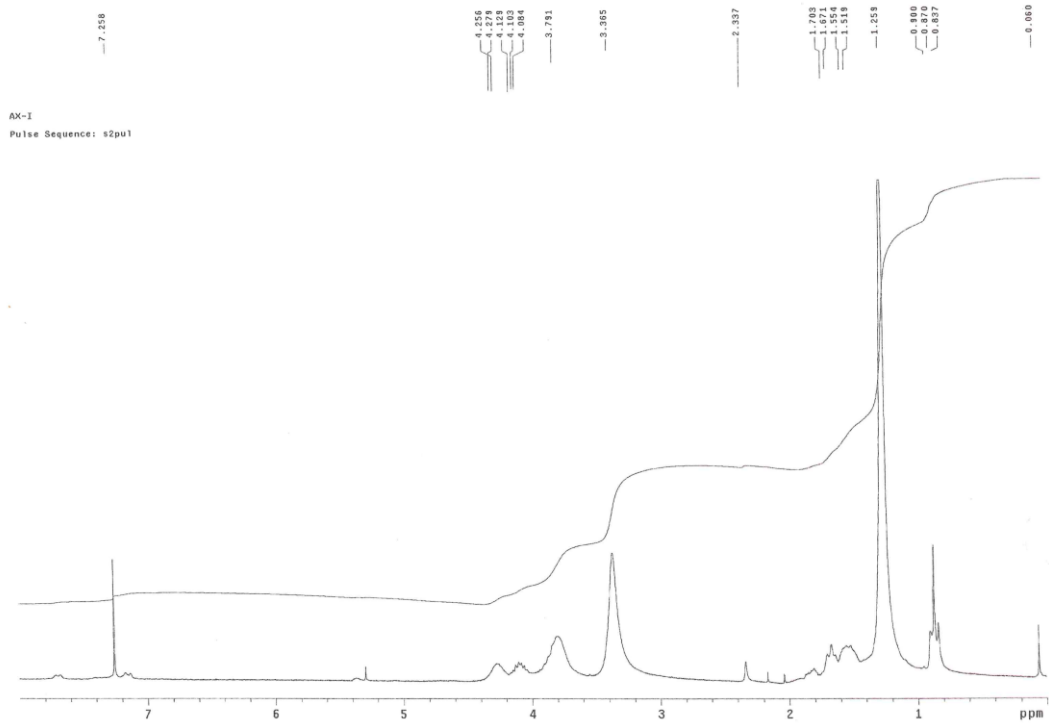


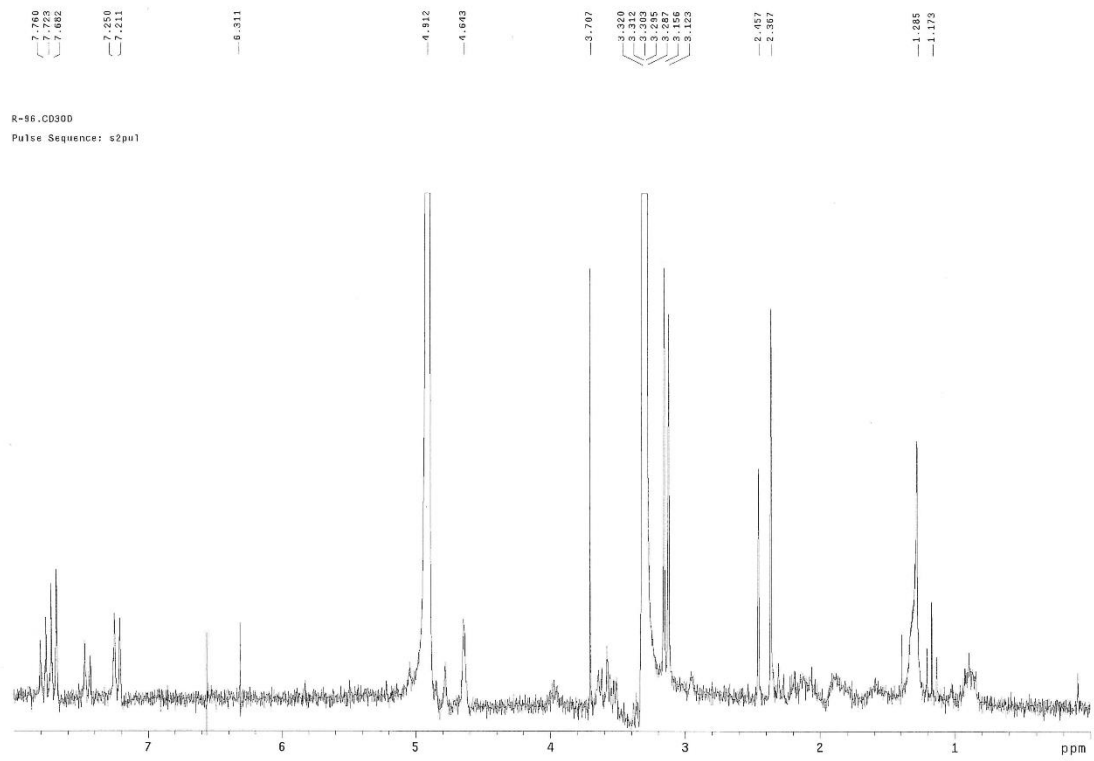
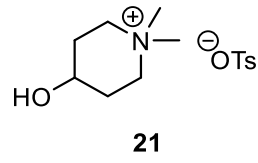


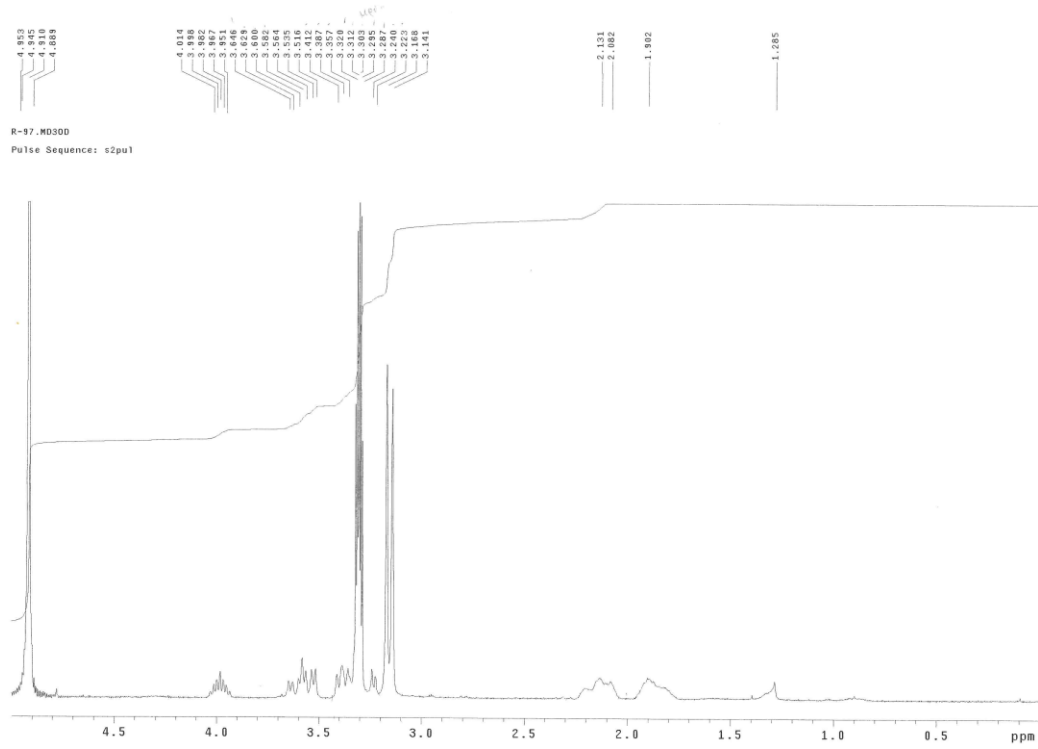
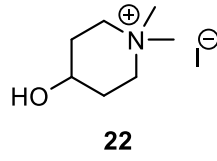
17

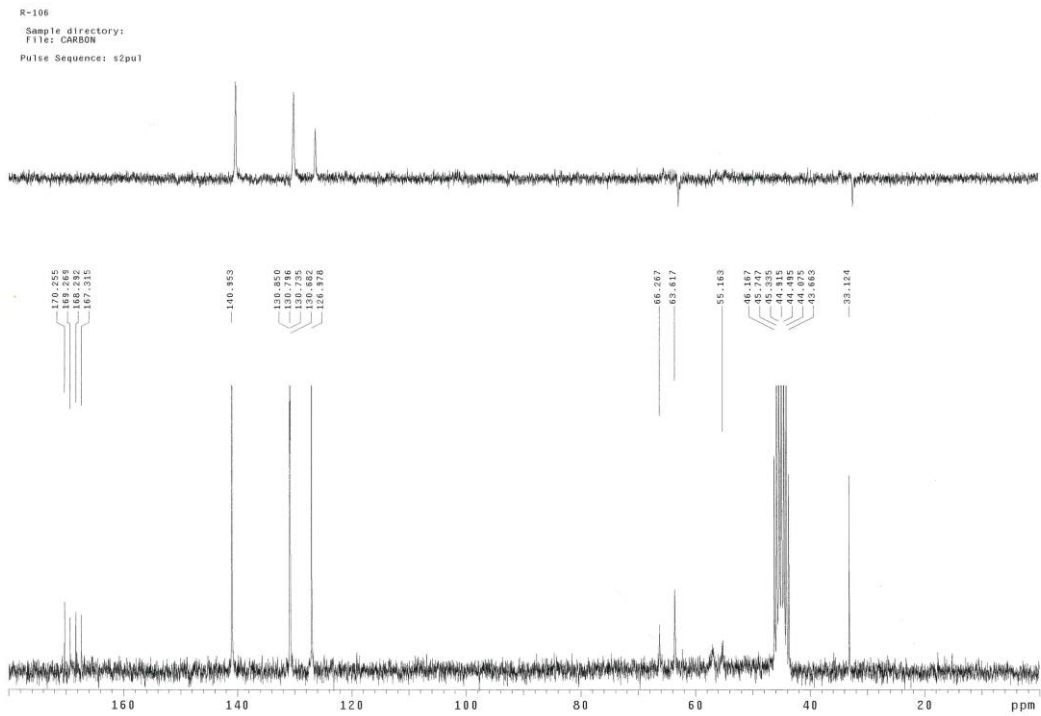
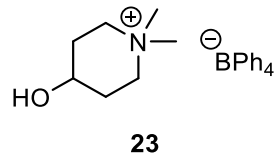
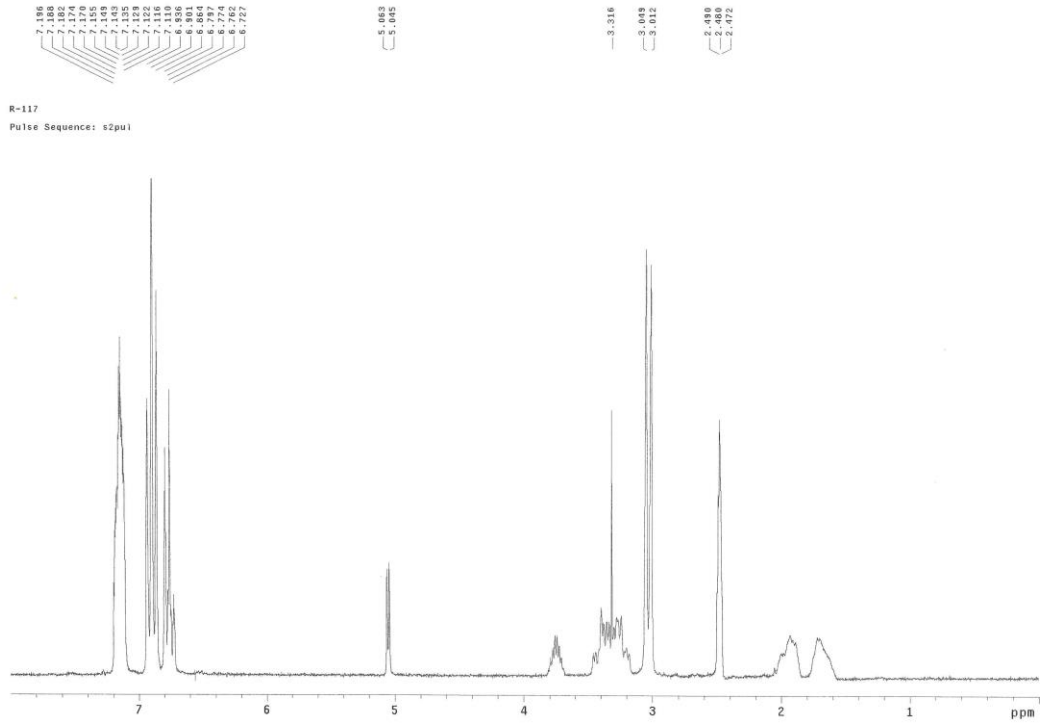




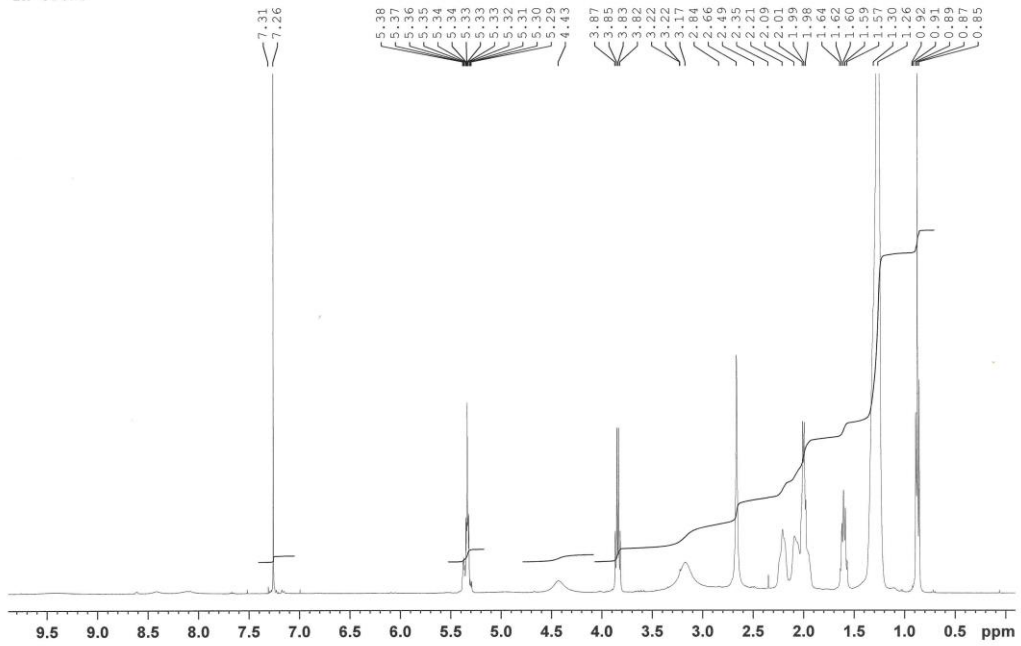






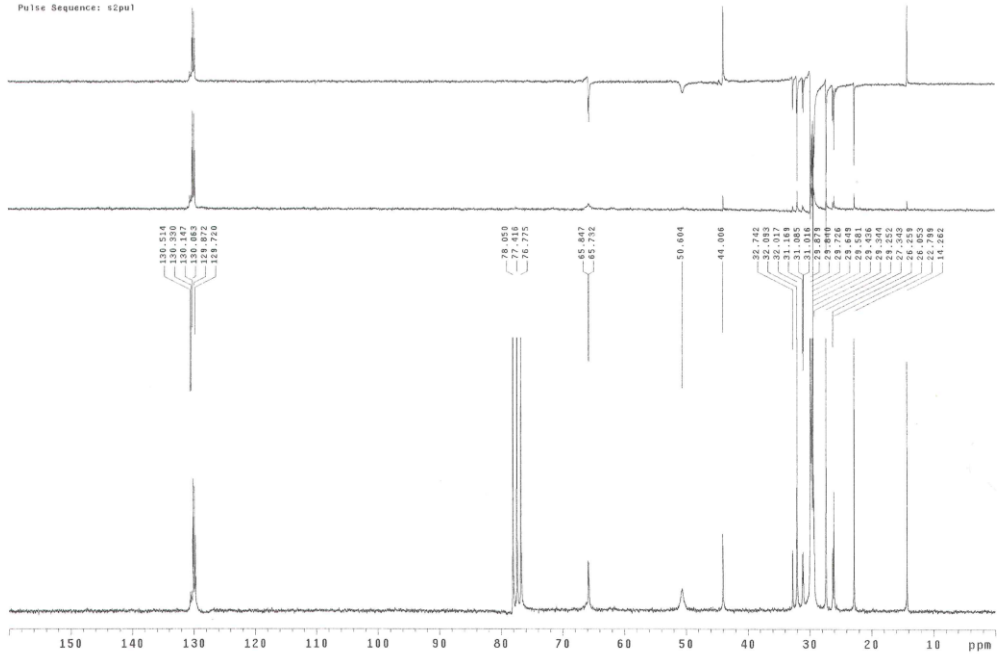


¹H CDC13

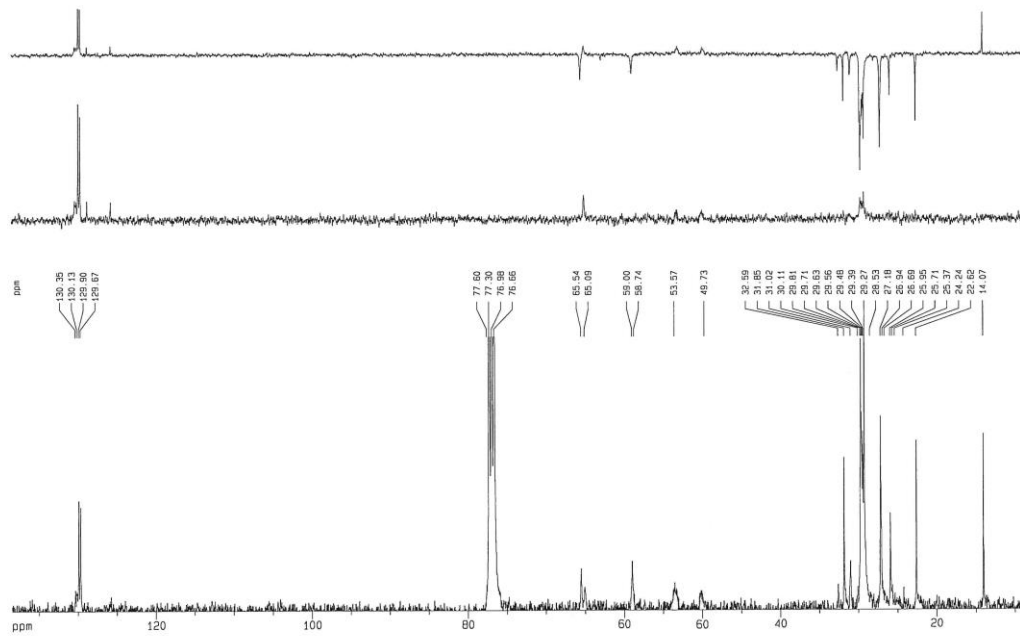
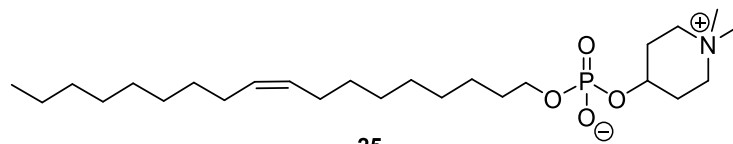
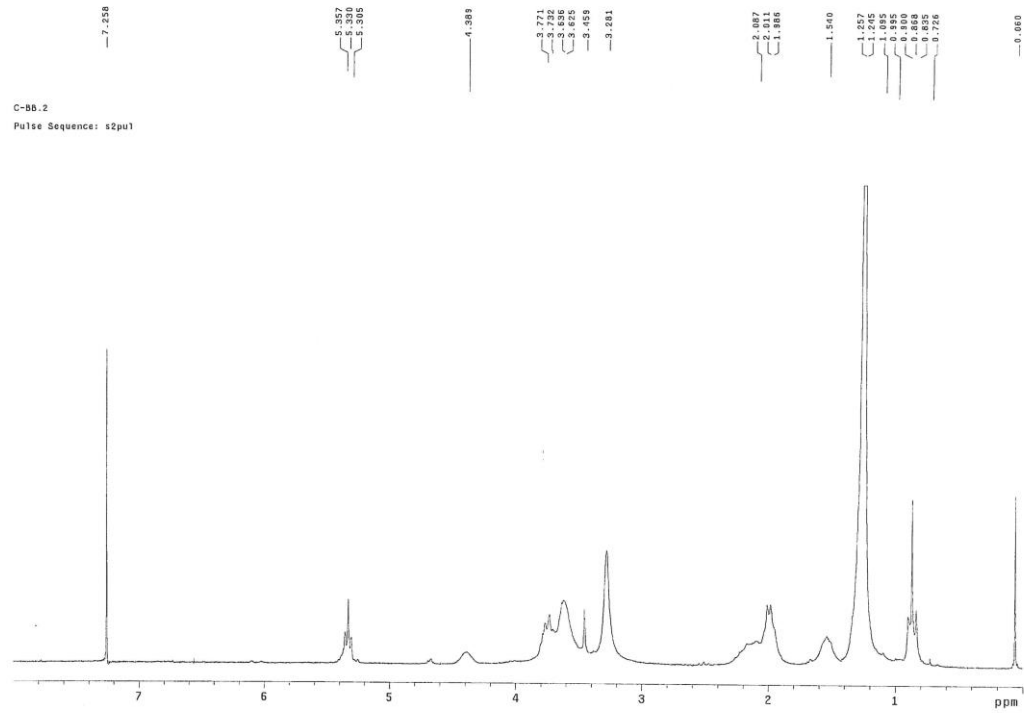


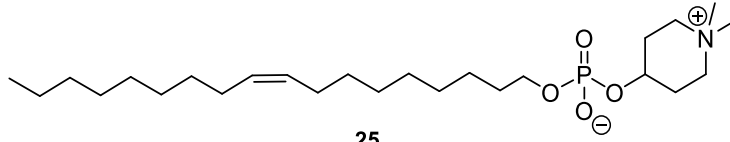
24

C-AZ-47-59
 Sample directory:
 Pulse Sequence: s2pul

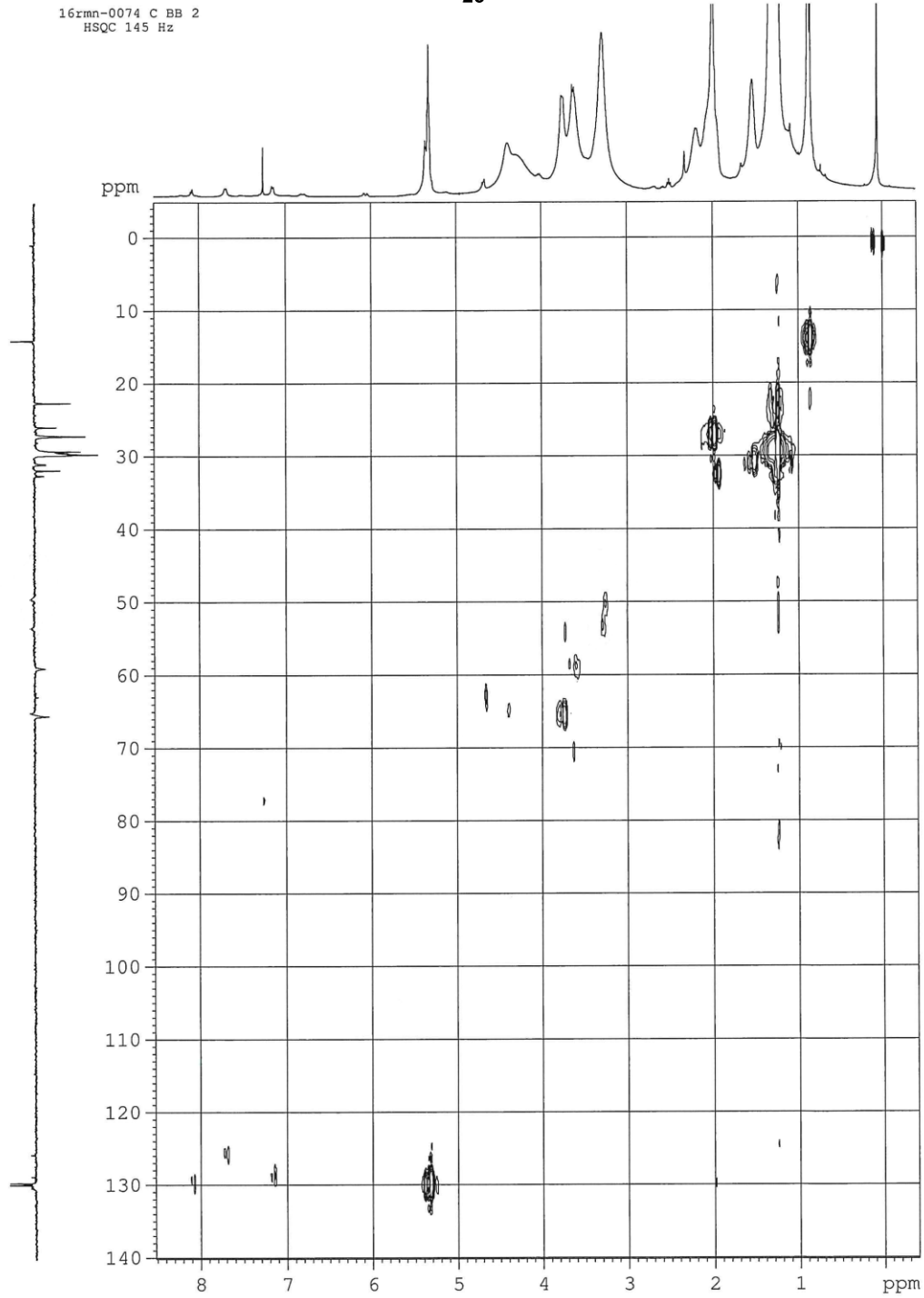


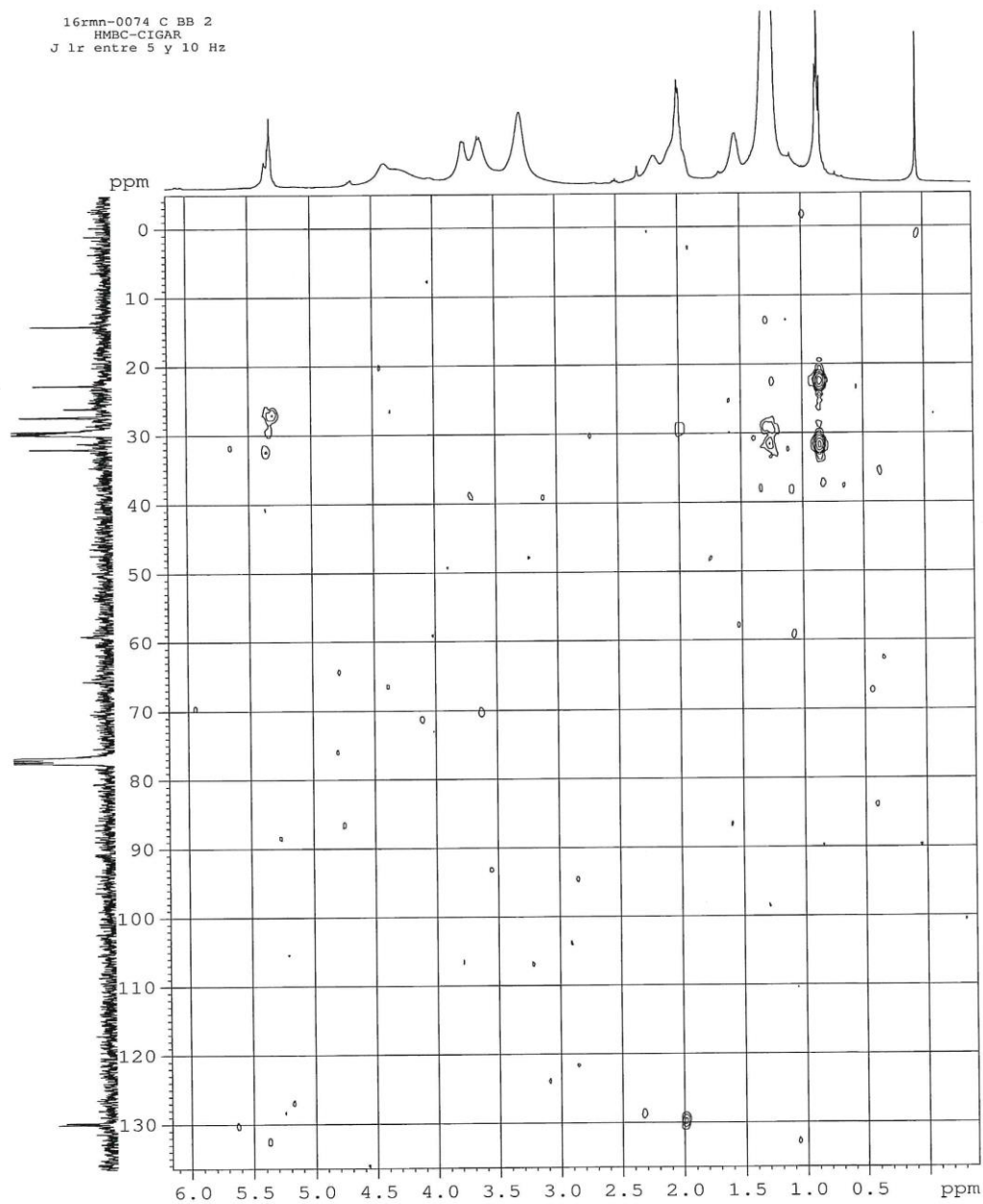
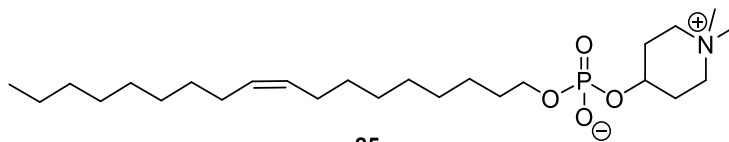
| Espectroscopía

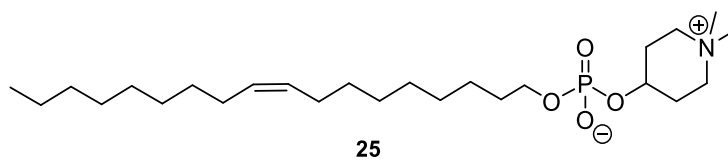




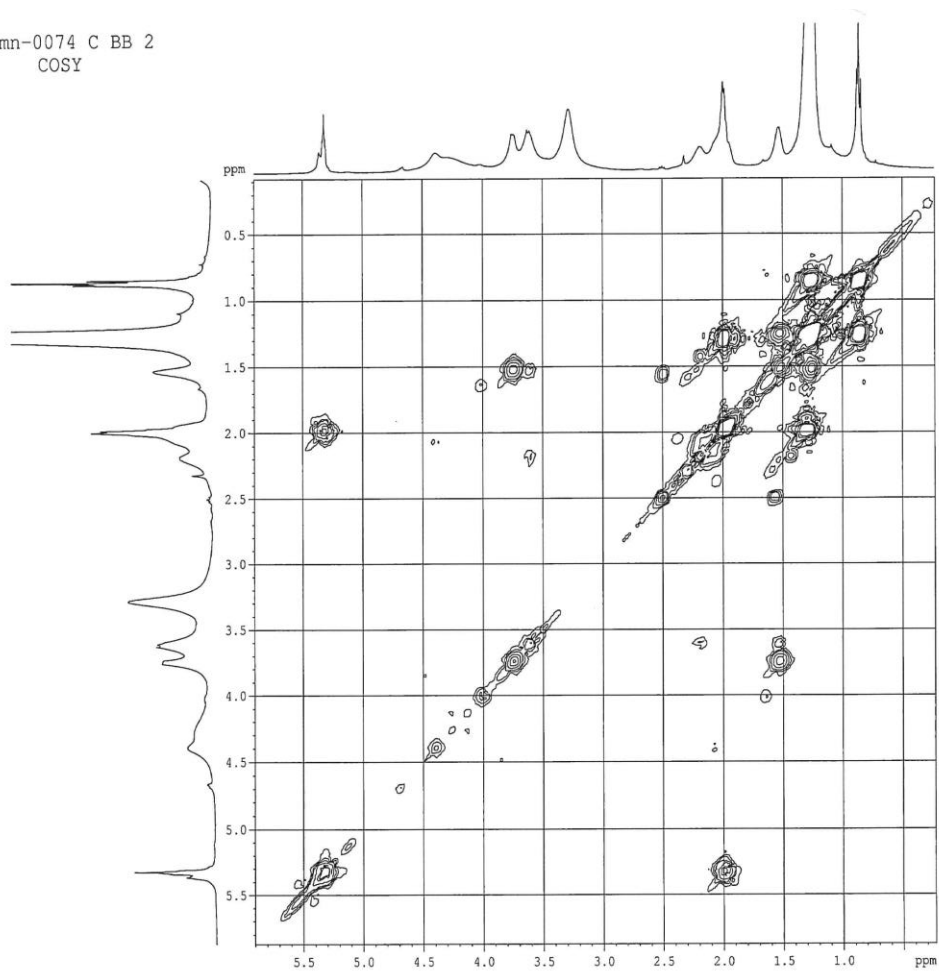
25



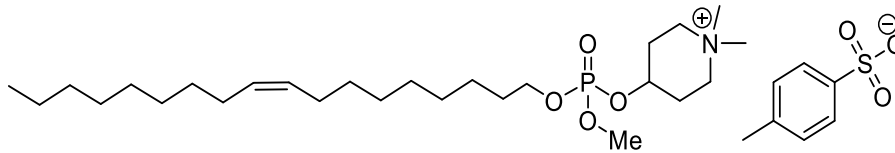
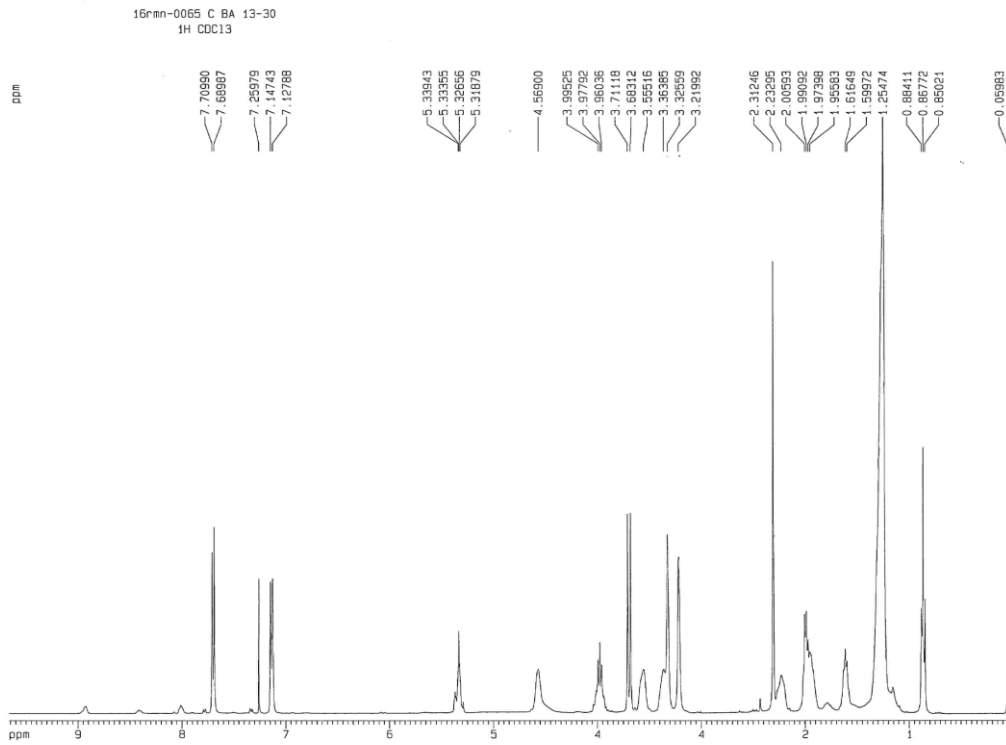




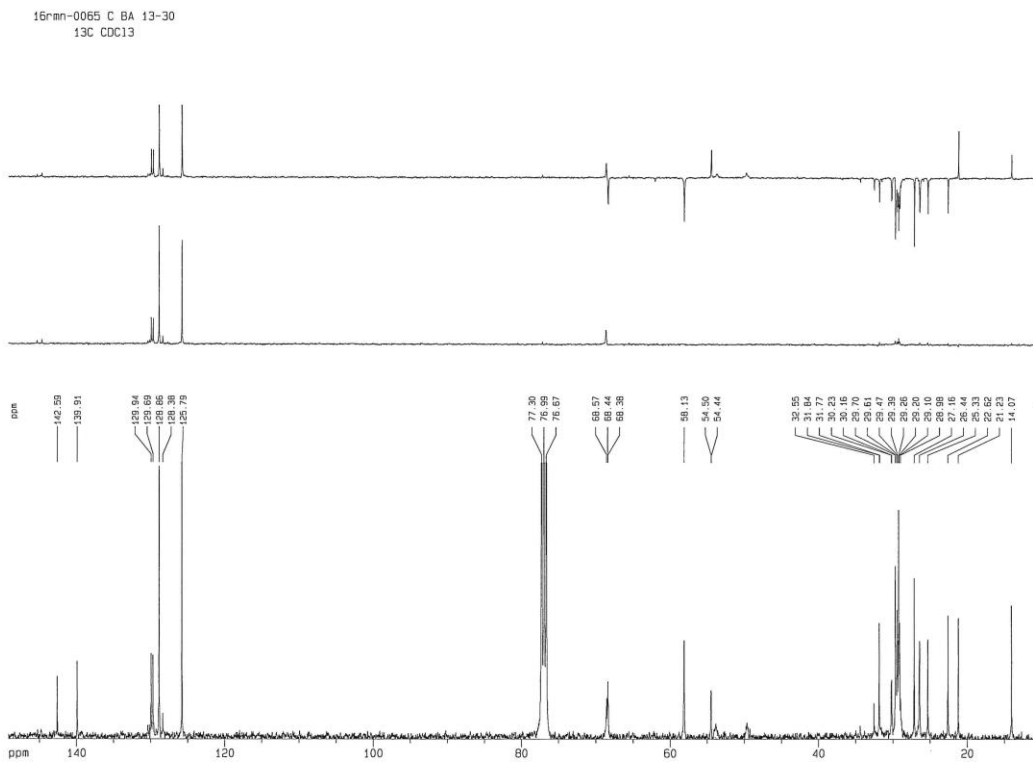
16rnm-0074 C BB 2
COSY

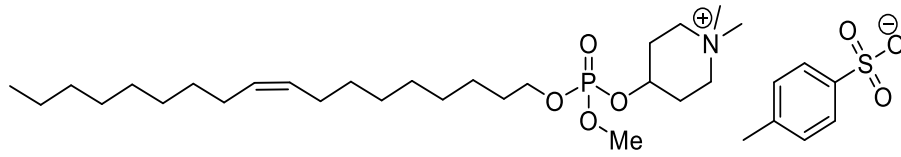


| Espectroscopía

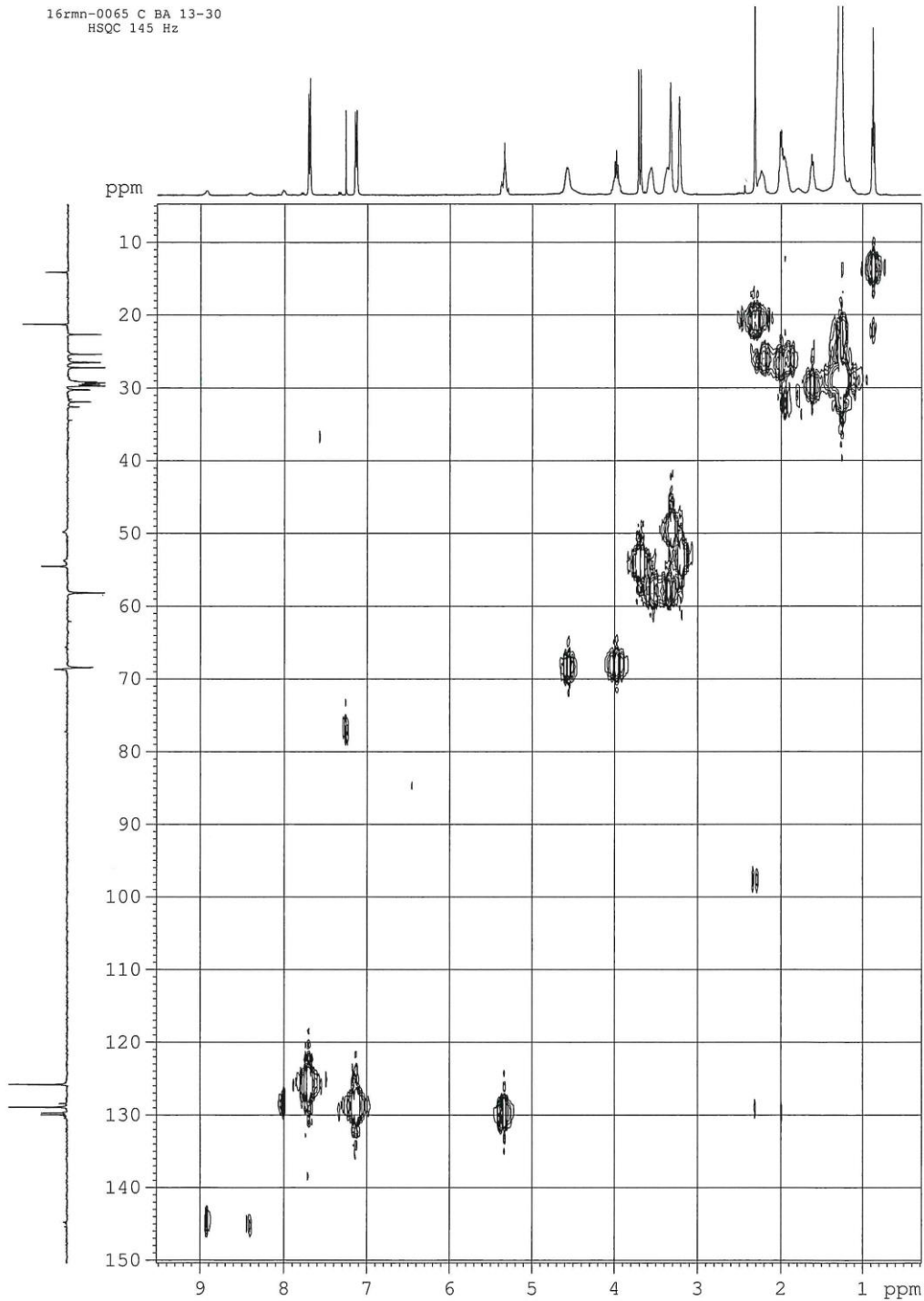


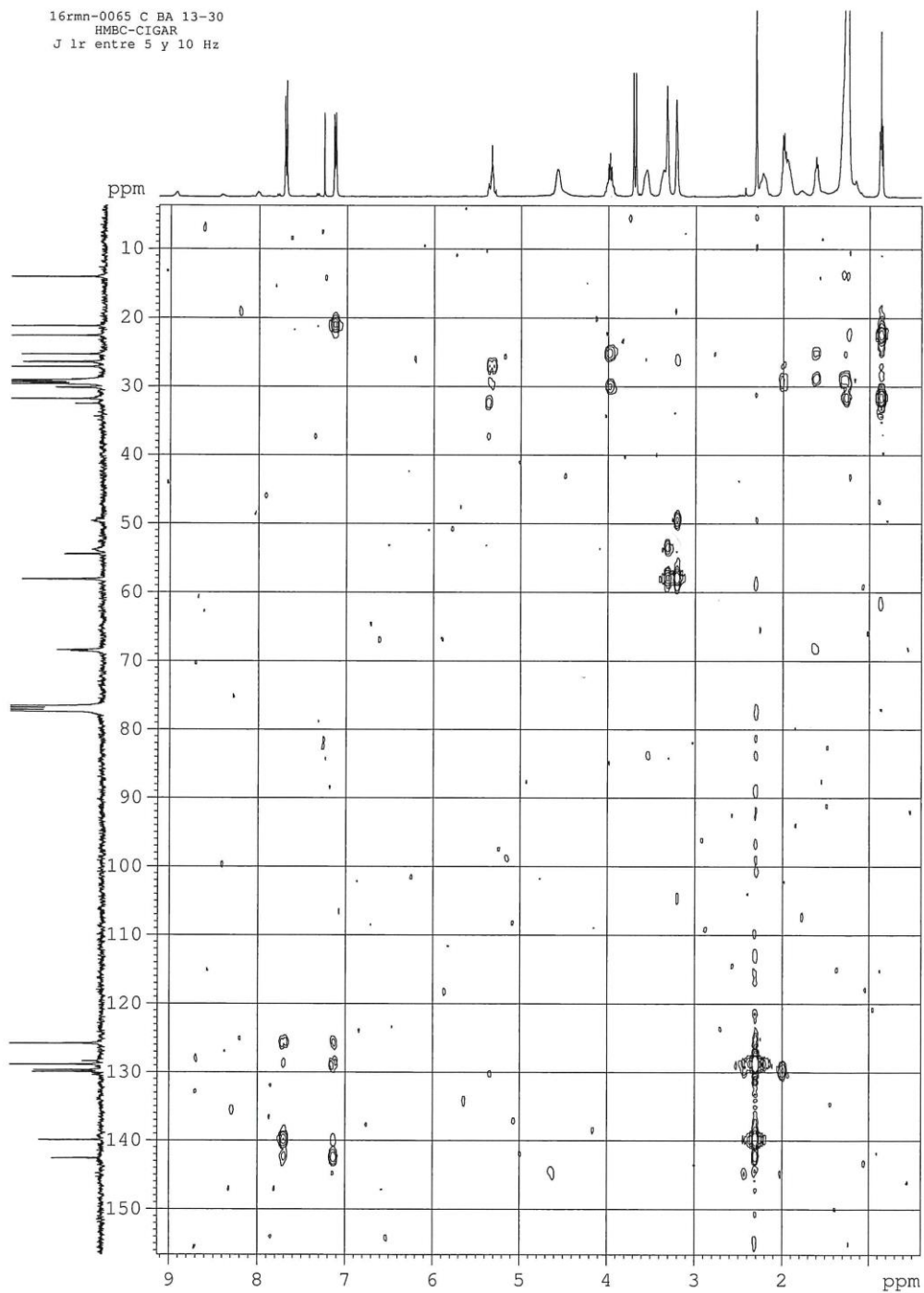
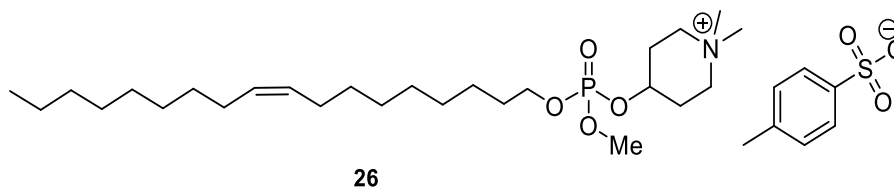
26

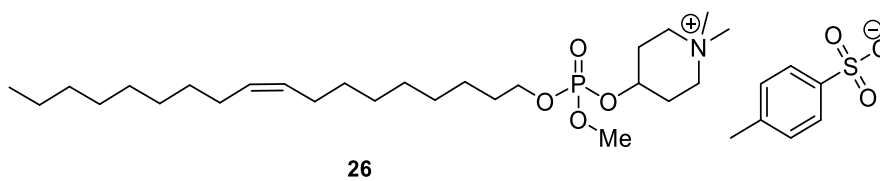




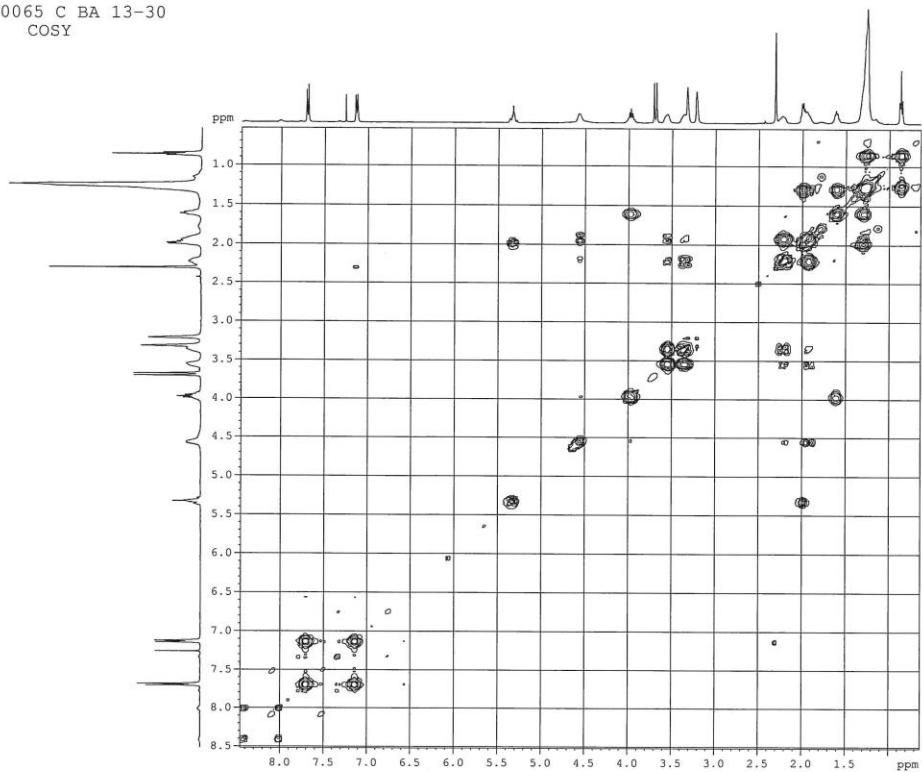
26

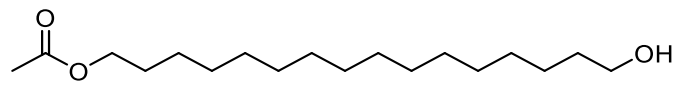
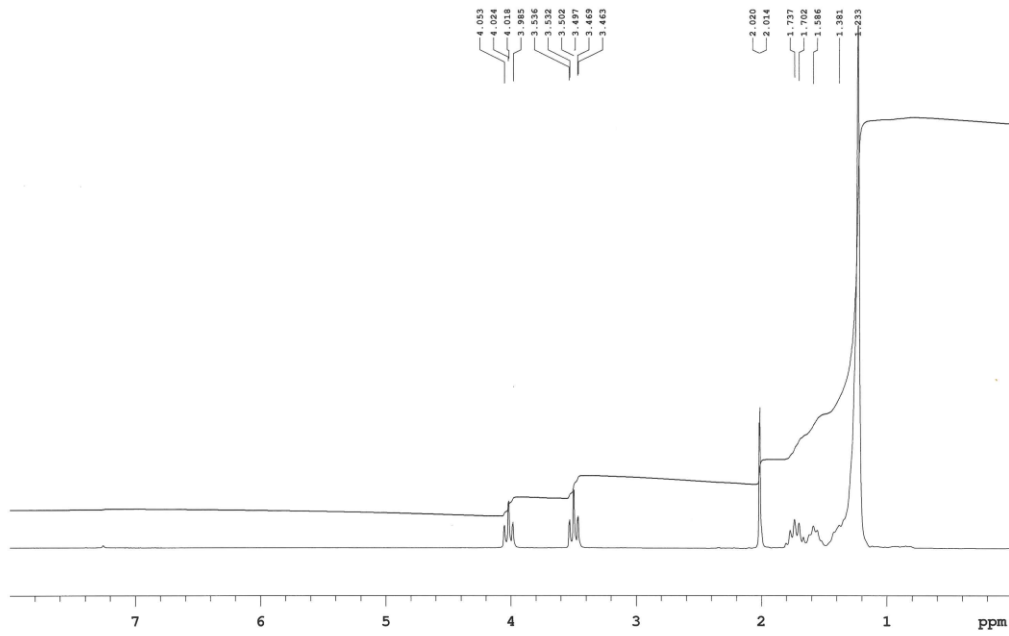




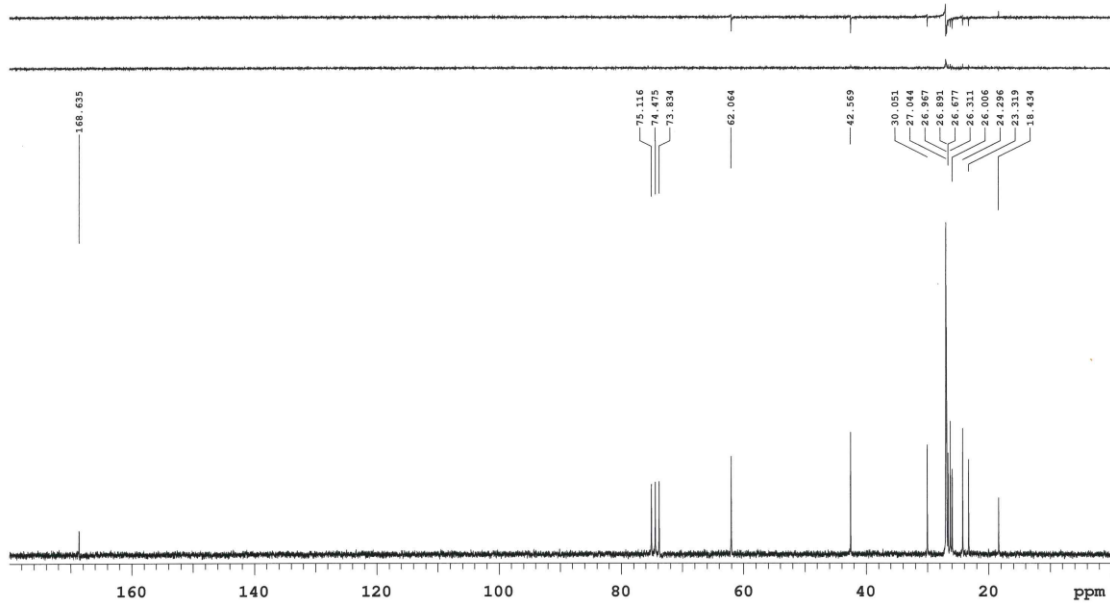


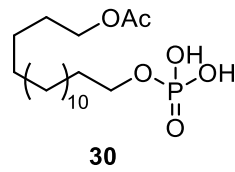
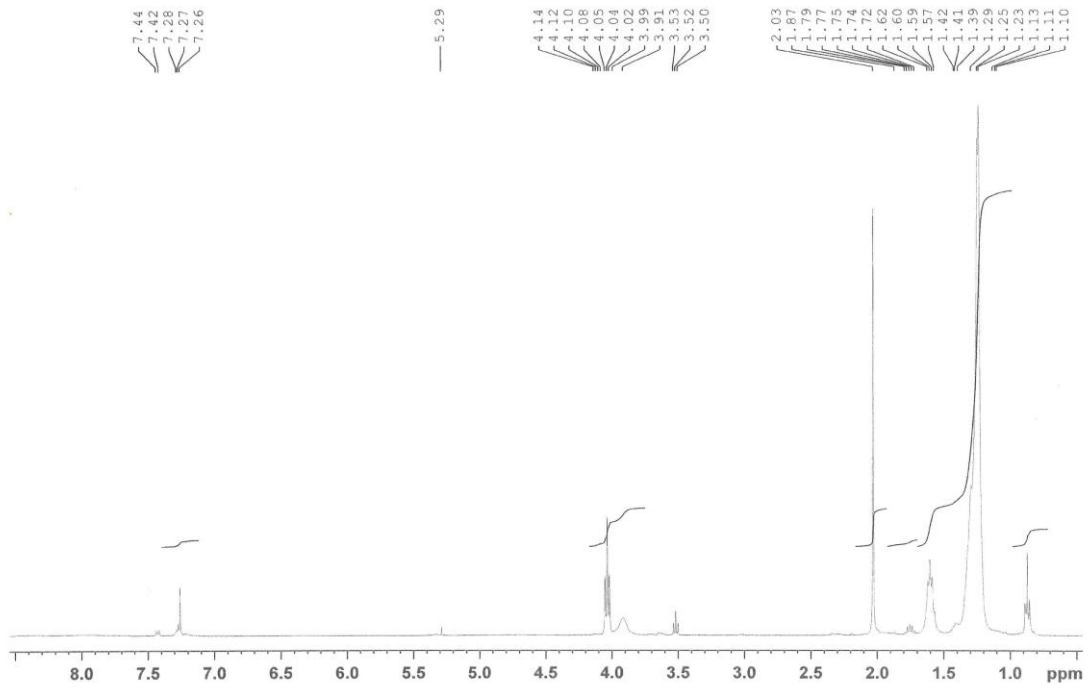
16zmn-0065 C BA 13-30
COSY



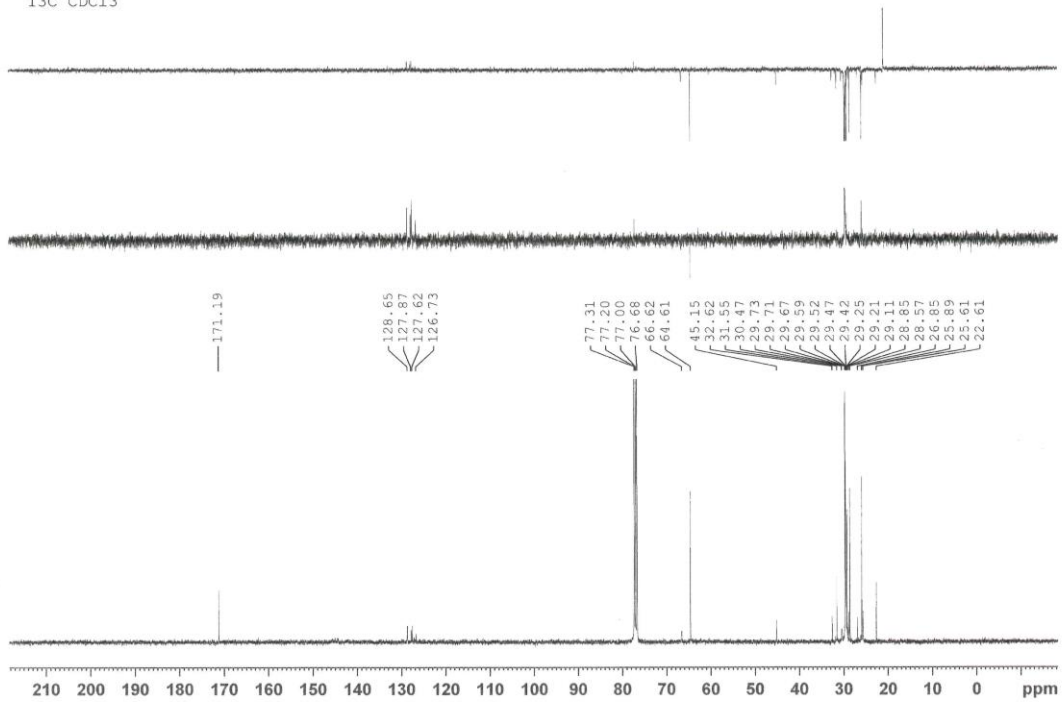


28



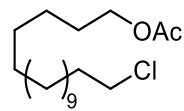
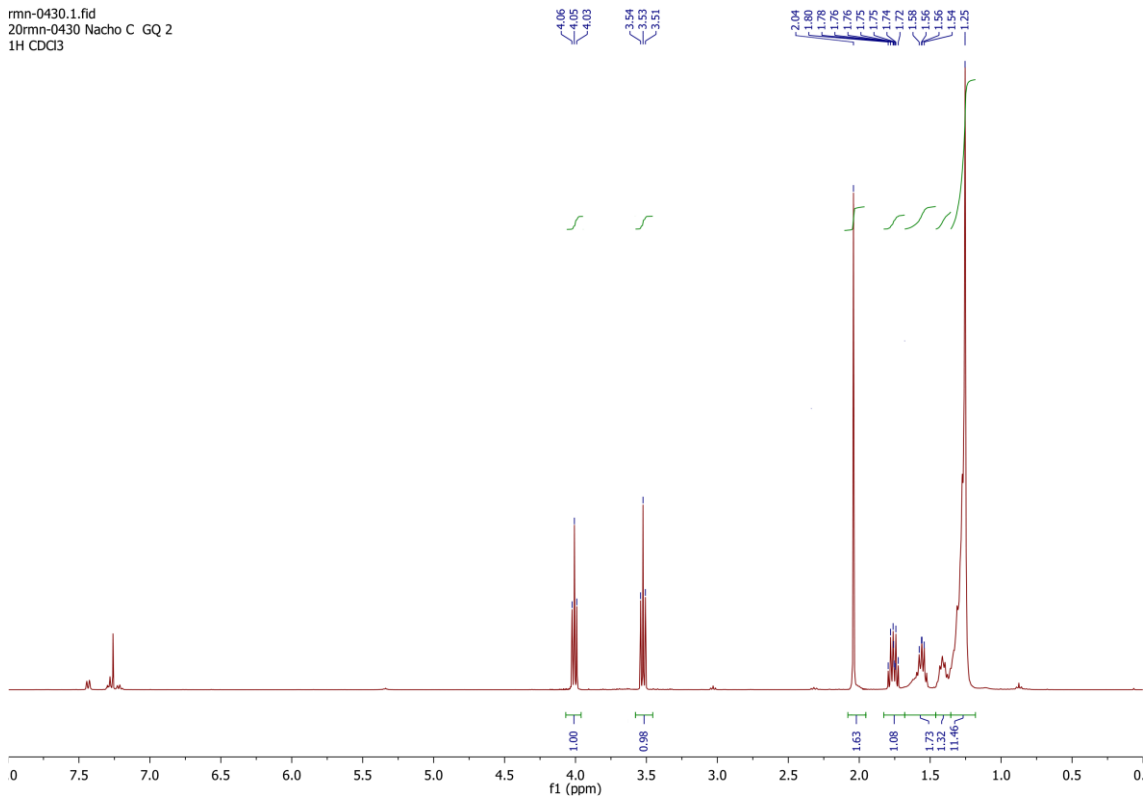


19rmn-0343 Nacho 308-A
 13C CDC13

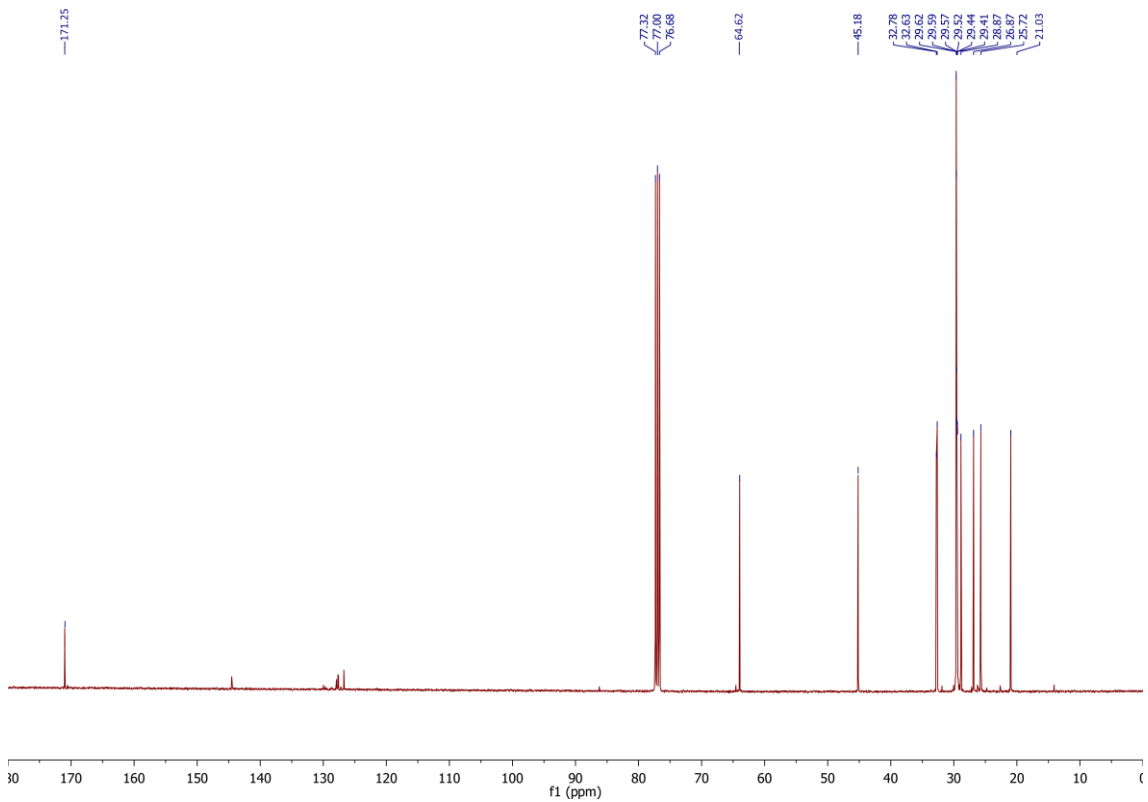


| Espectroscopía

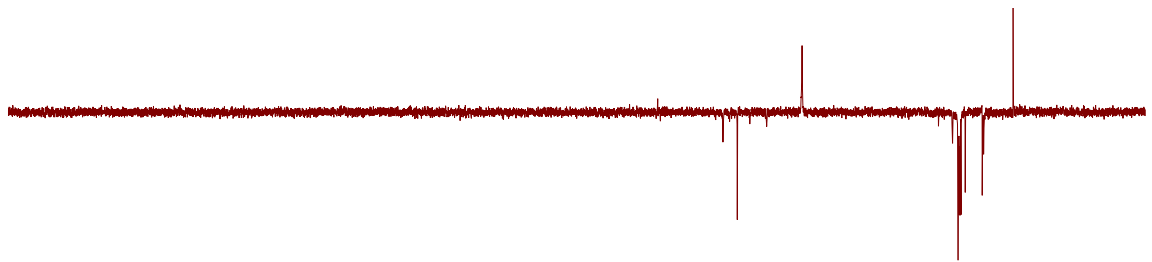
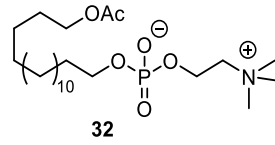
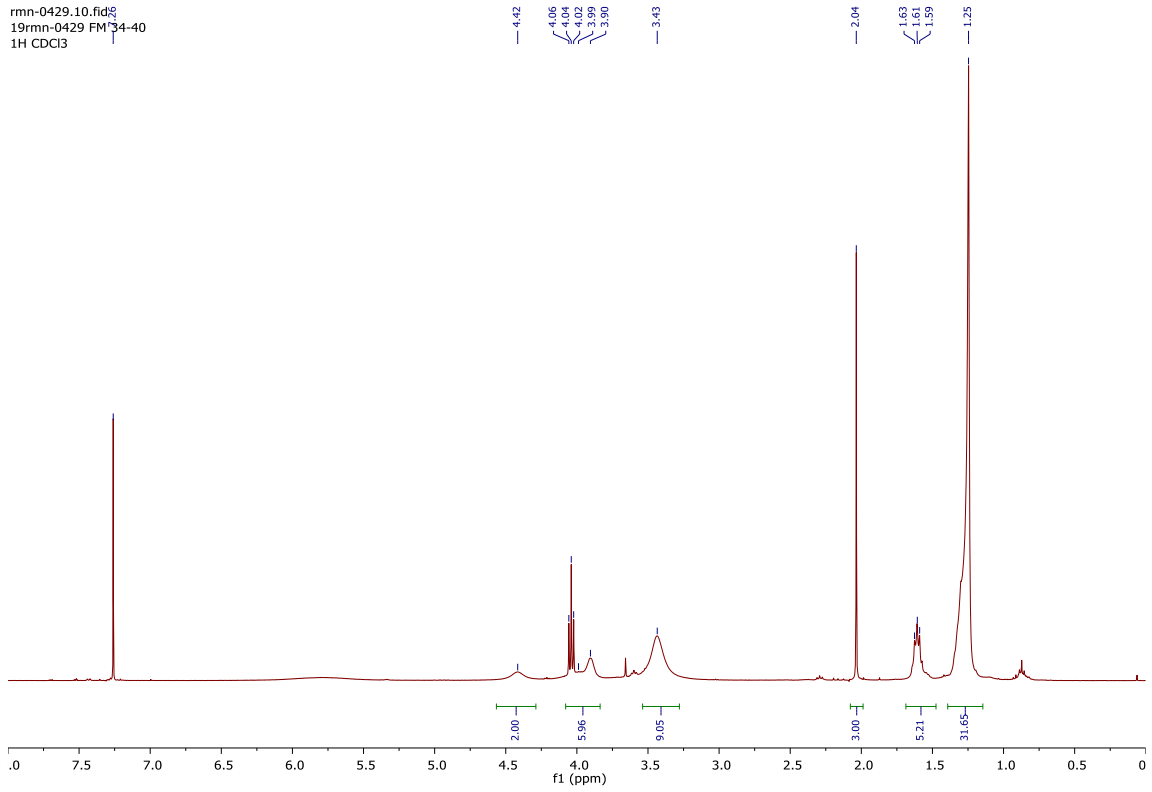
rmn-0430.1.fid
20rmn-0430 Nacho C GQ 2
1H CDCl3



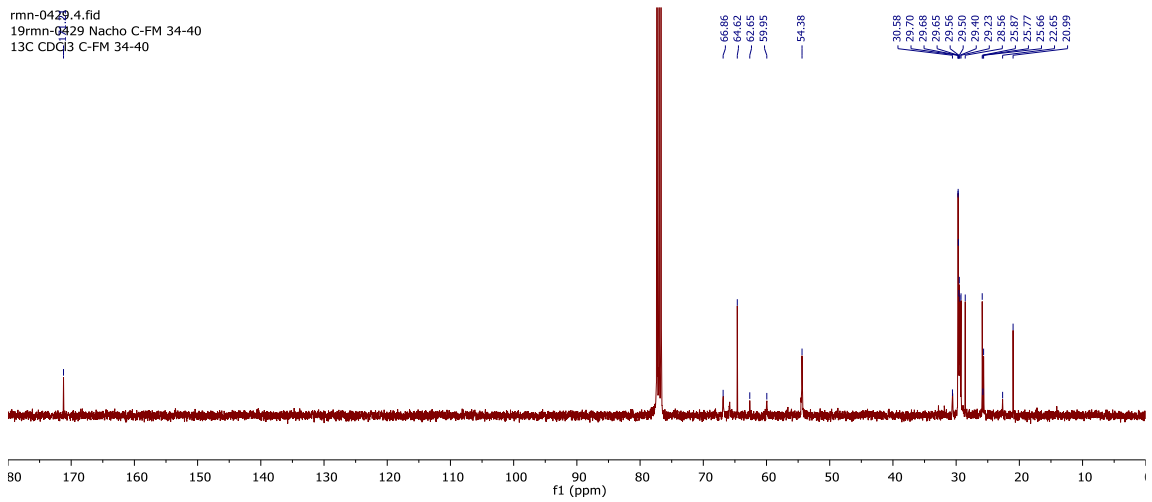
31

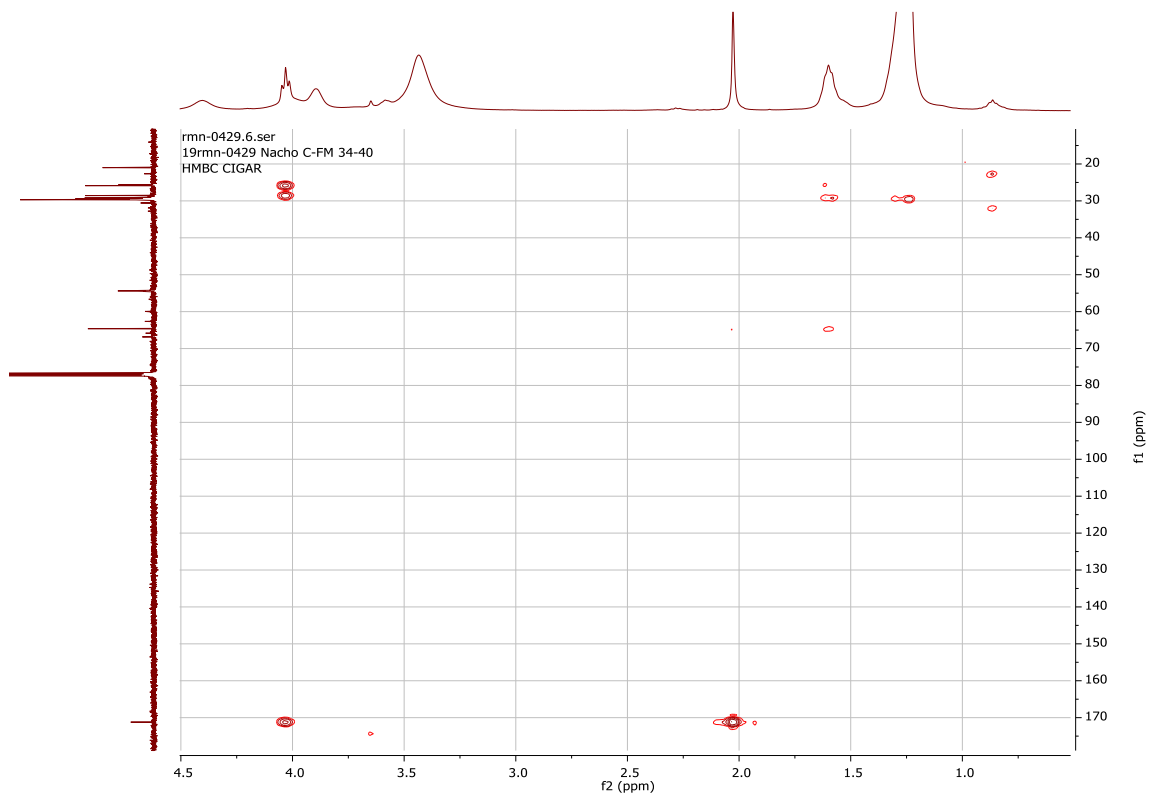
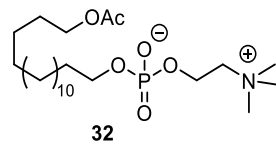
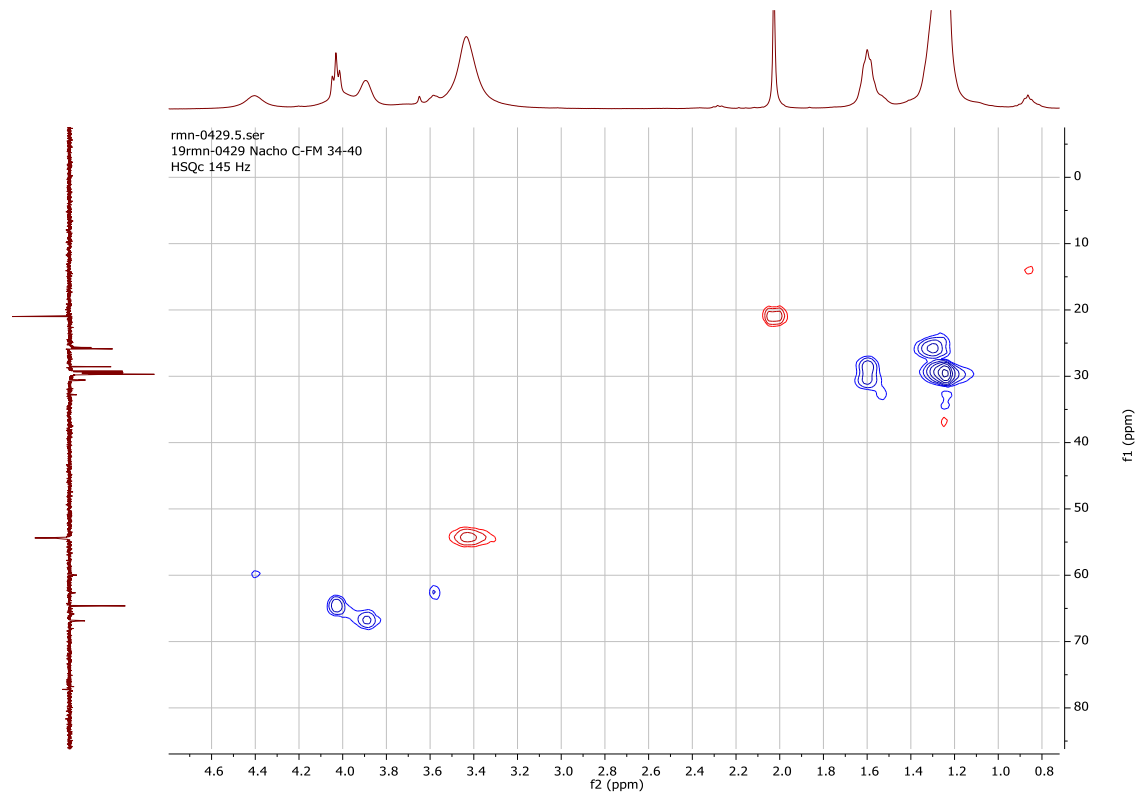


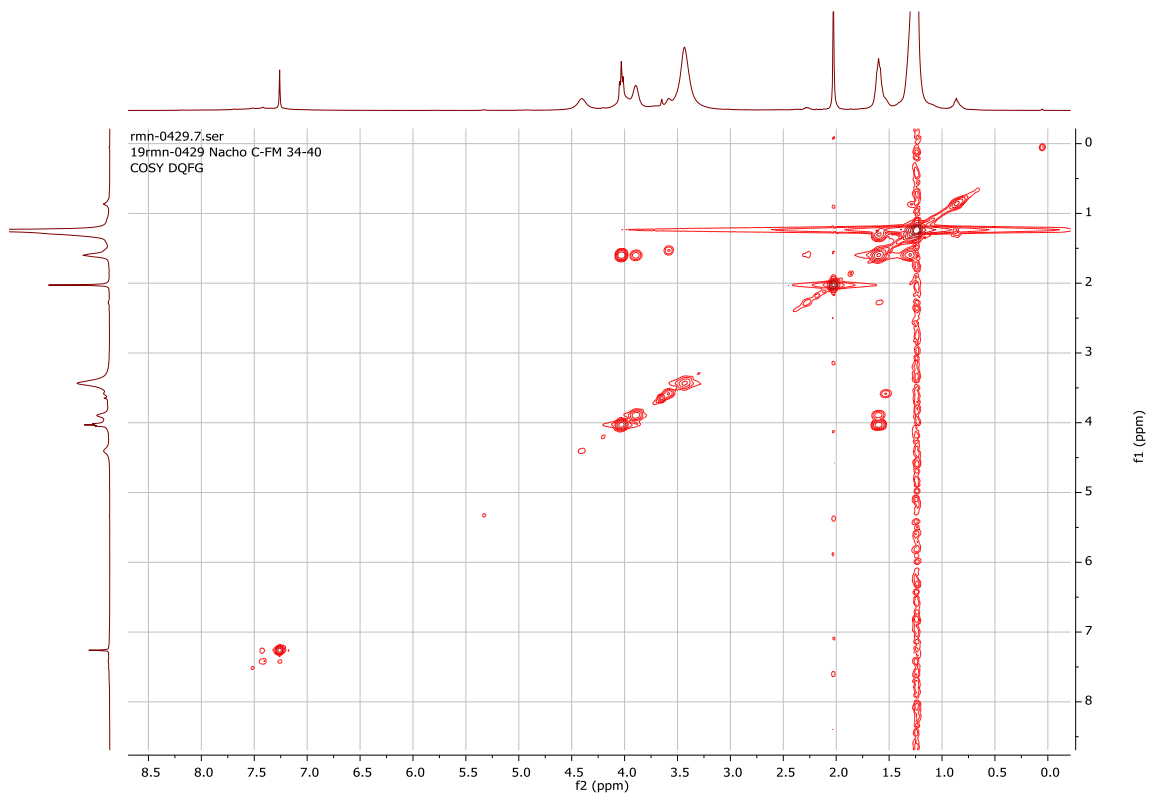
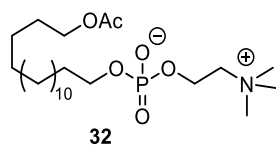
rmn-0429.10.fid
 19rmn-0429 FM 34-40
 1H CDCl3



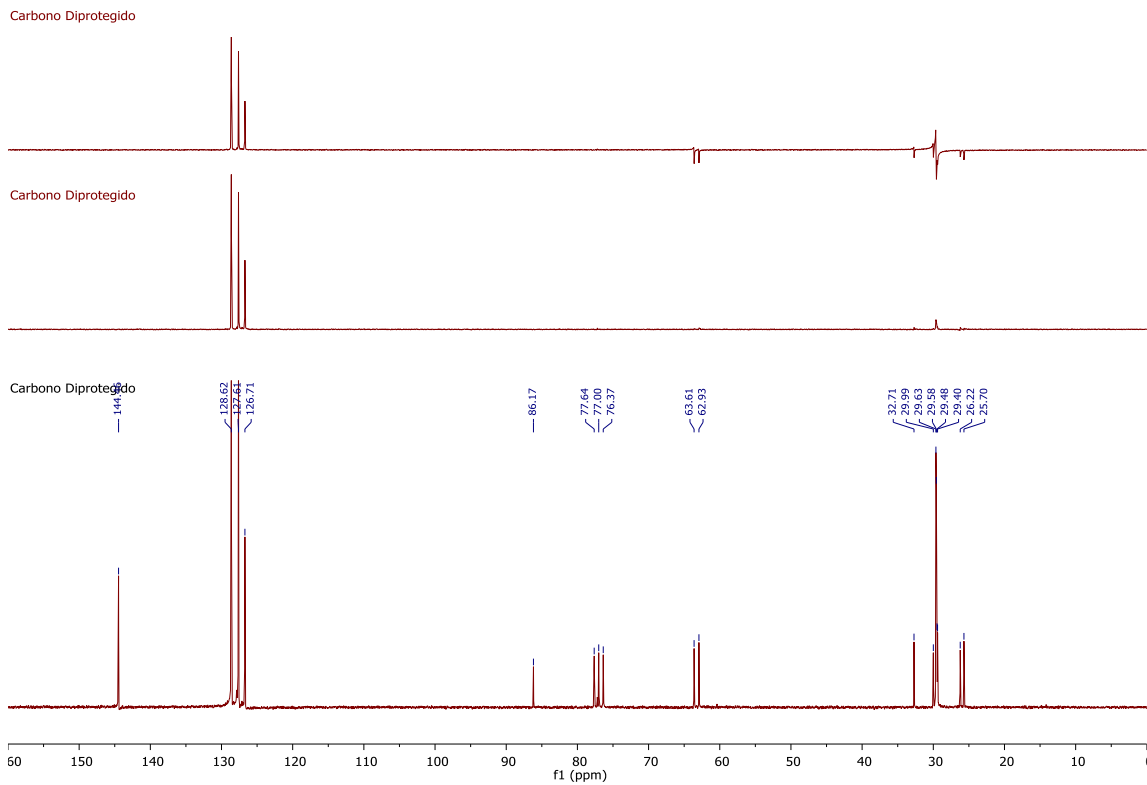
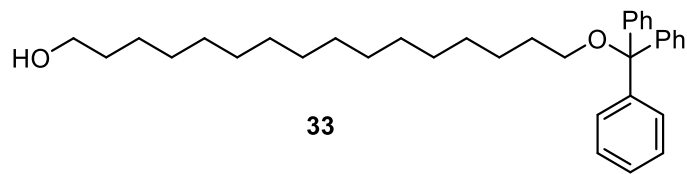
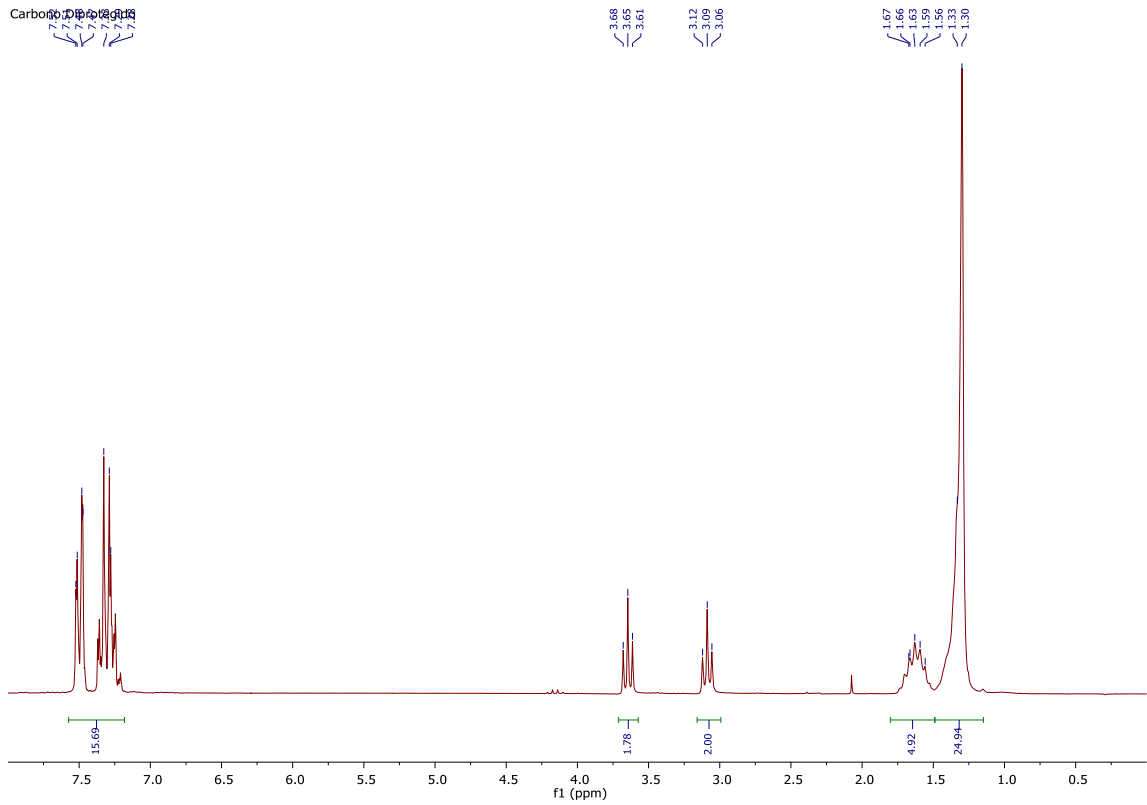
rmn-0429.4.fid
 19rmn-0429 Nacho C-FM 34-40
 13C CDCl3 C-FM 34-40

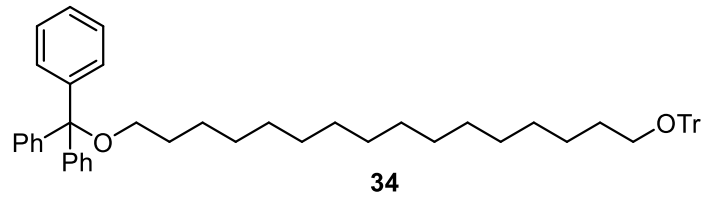
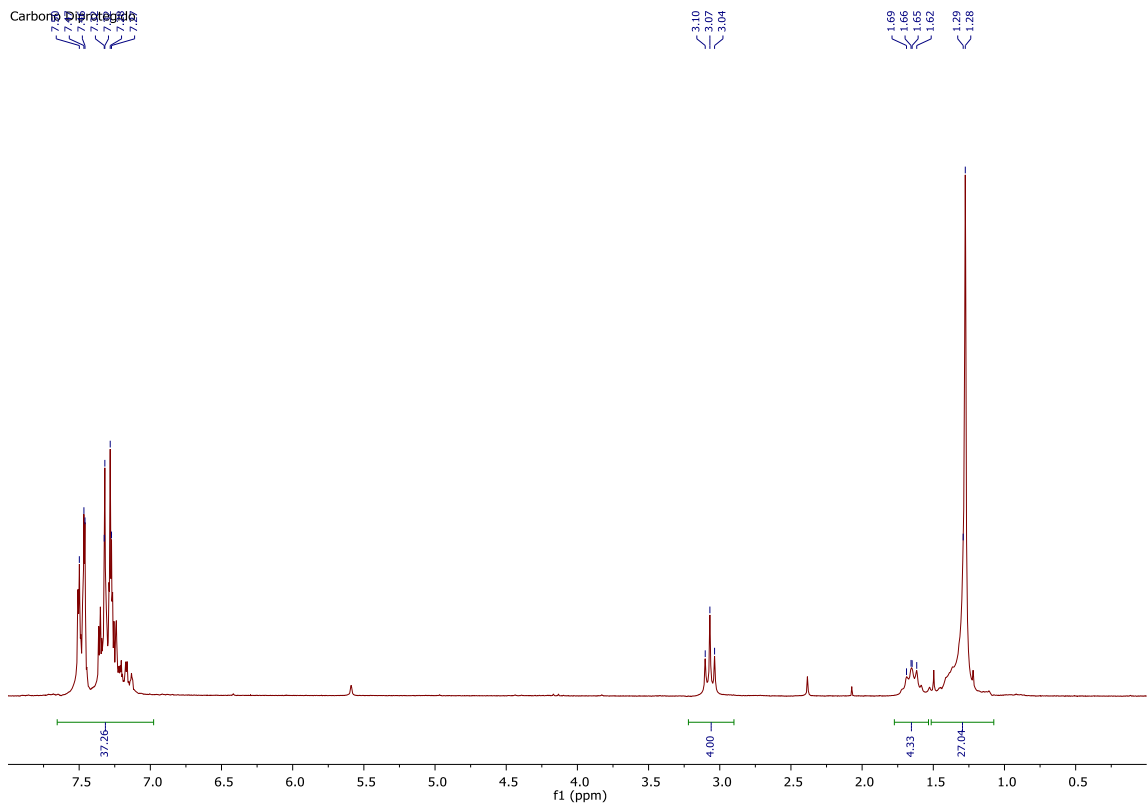






| Espectroscopía





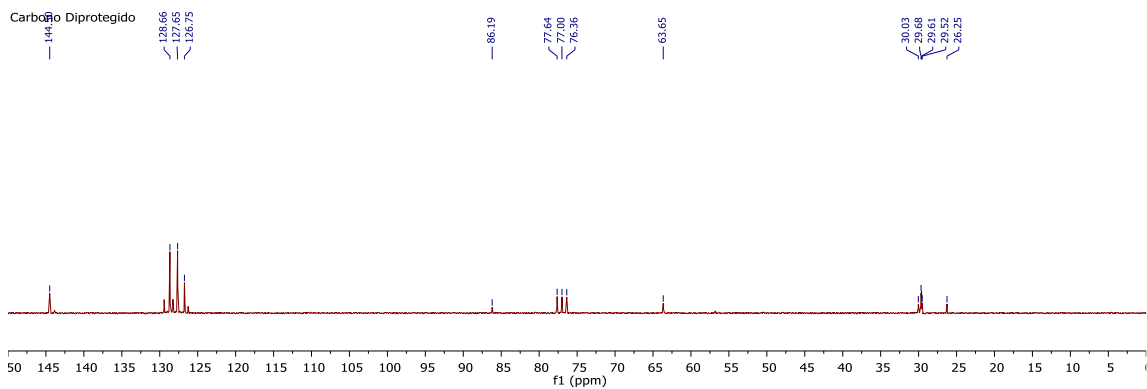
Carbóno Diprotégido

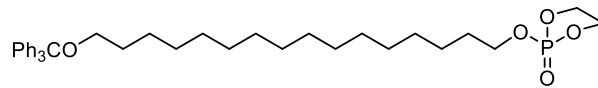
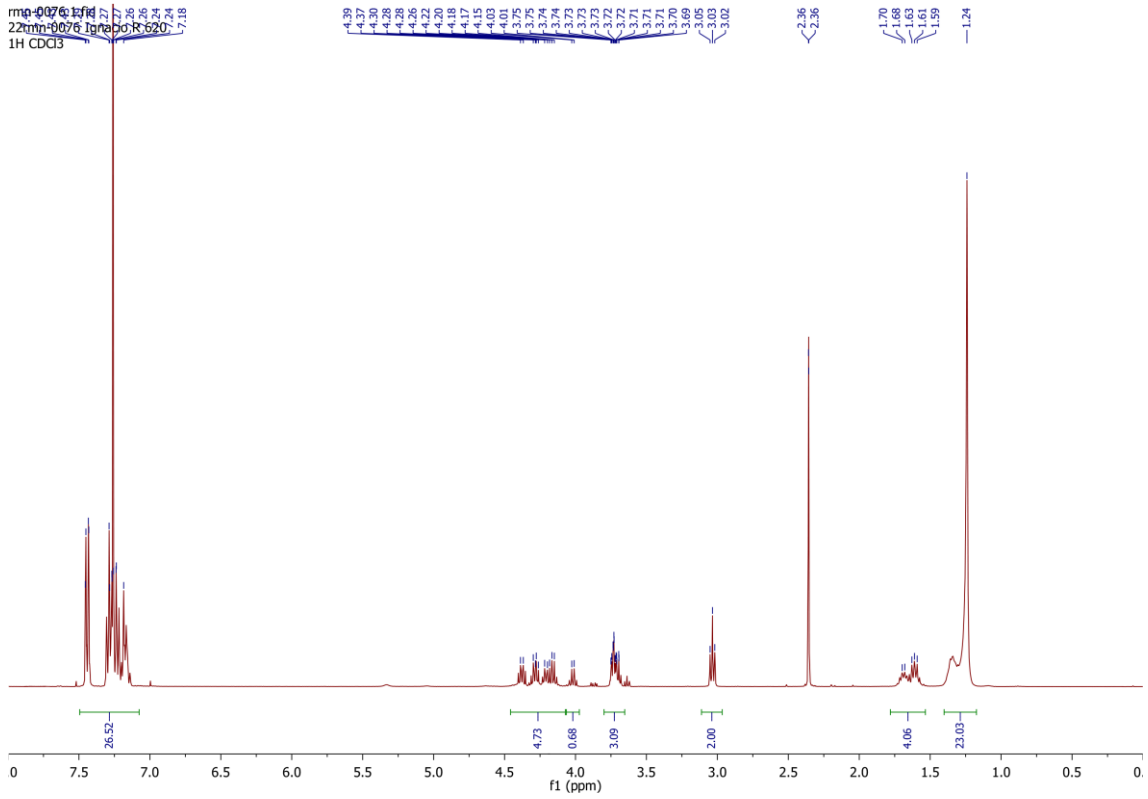


Carbóno Diprotégido

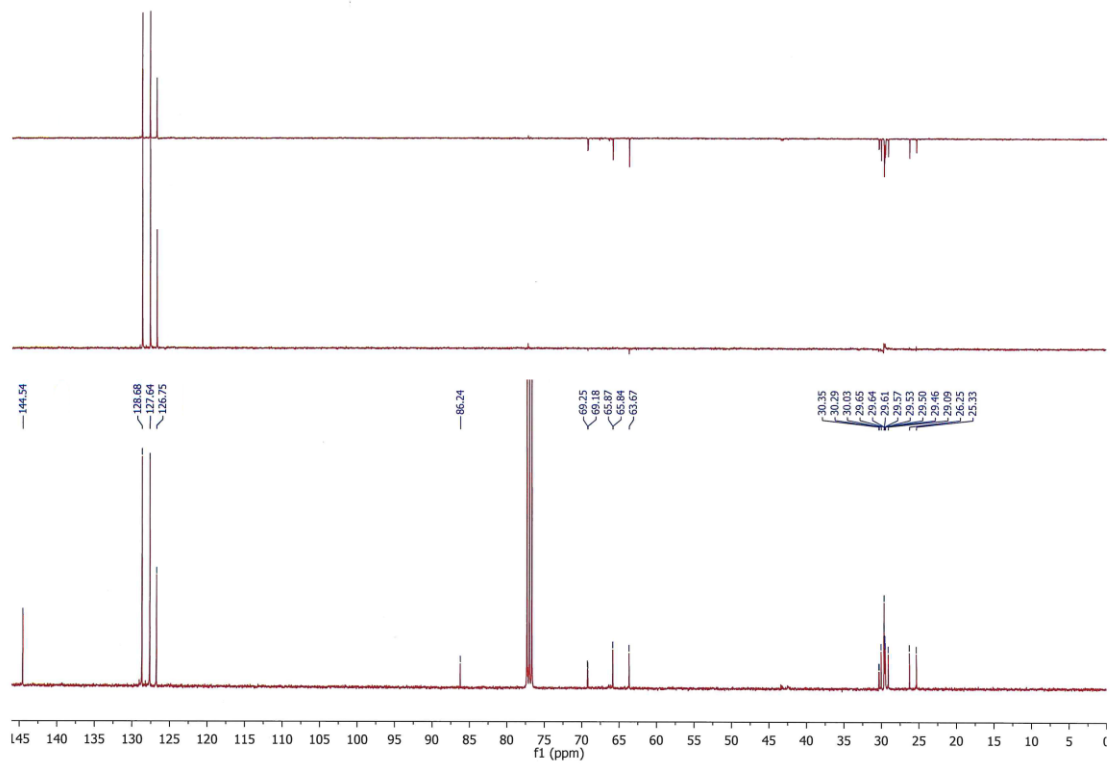


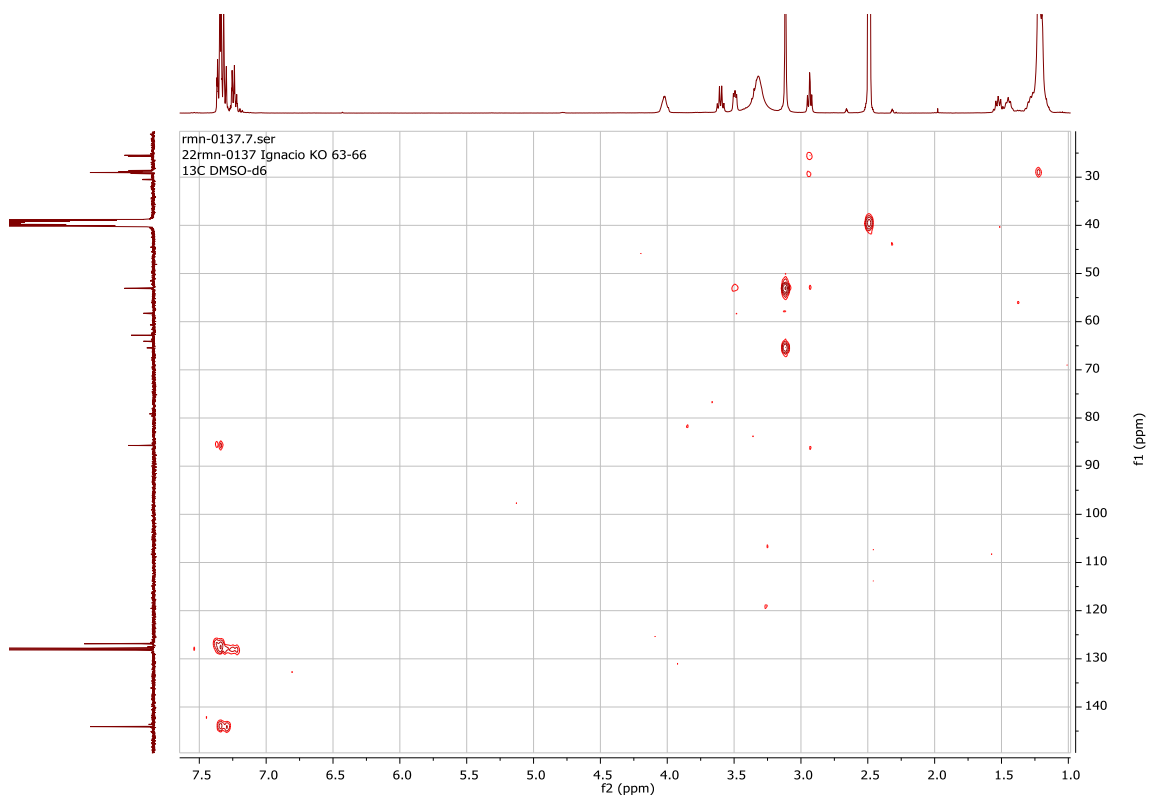
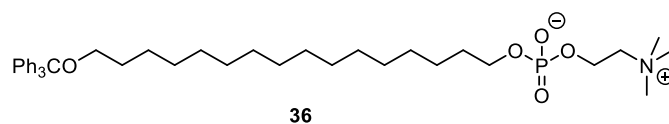
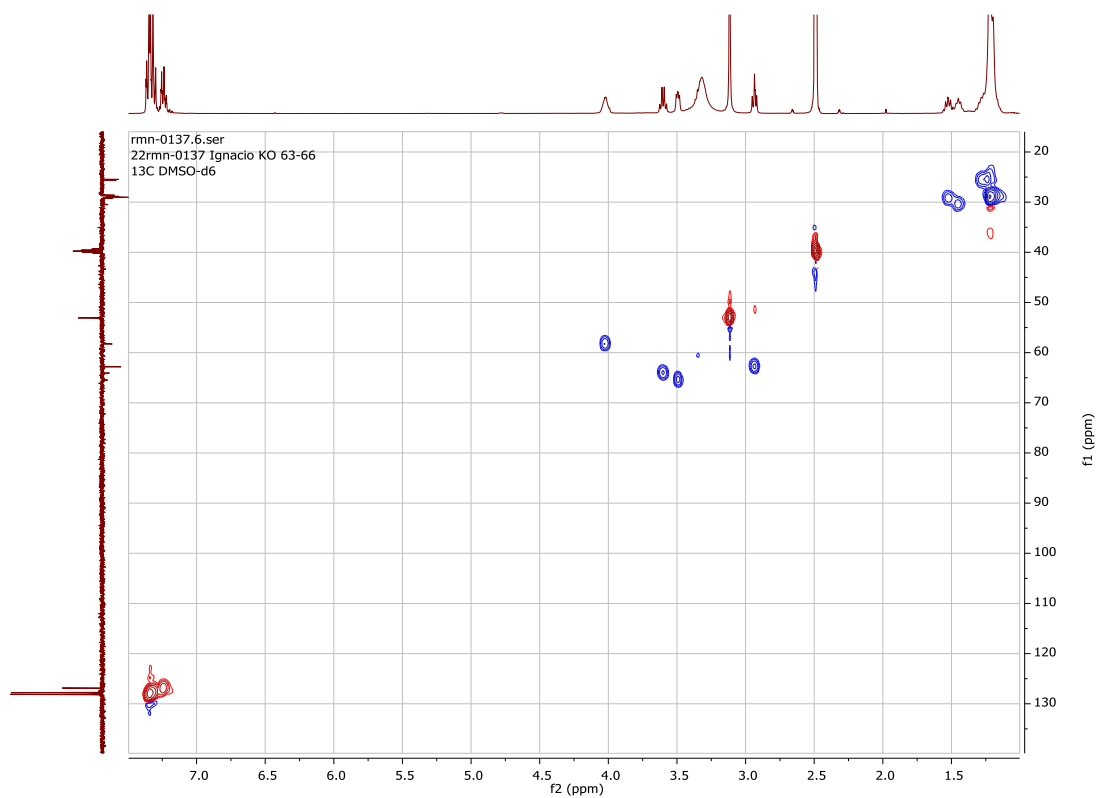
Carbóno Diprotégido

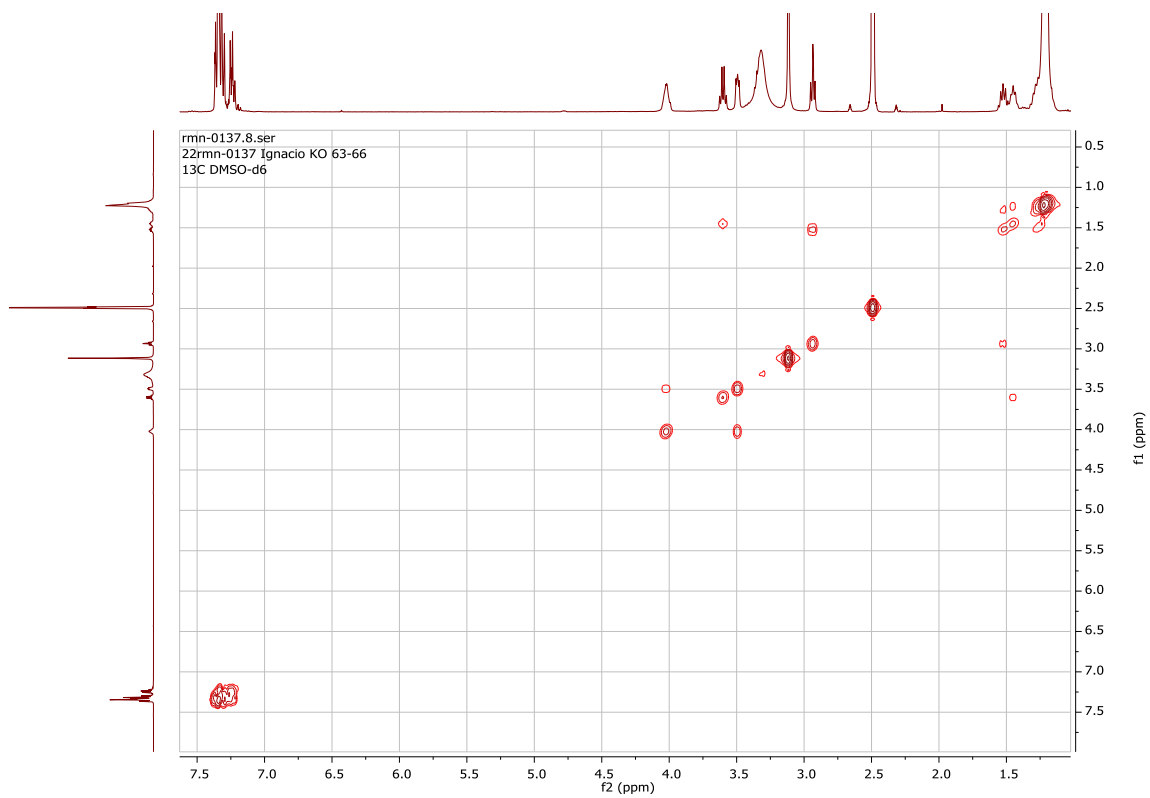
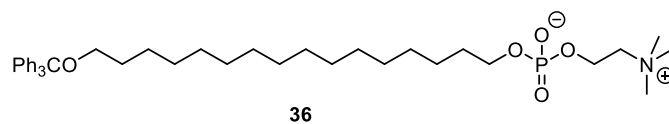




35

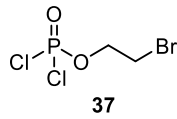
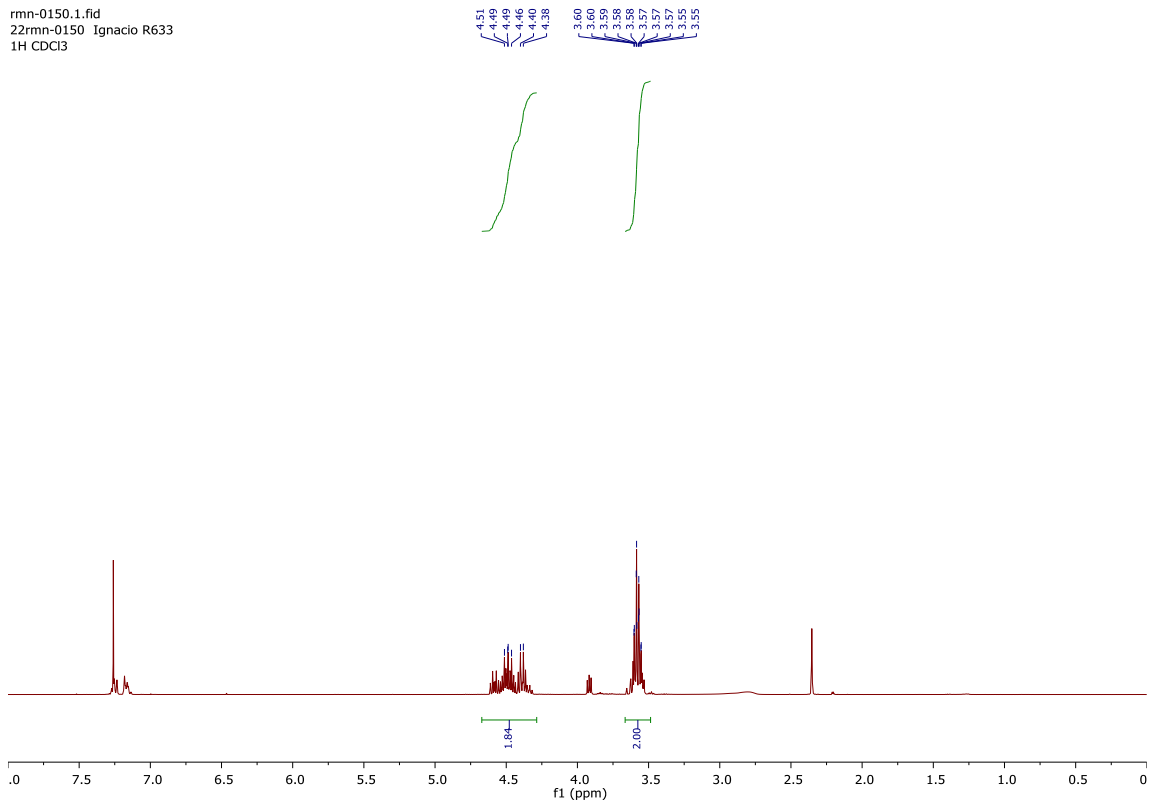






| Espectroscopía

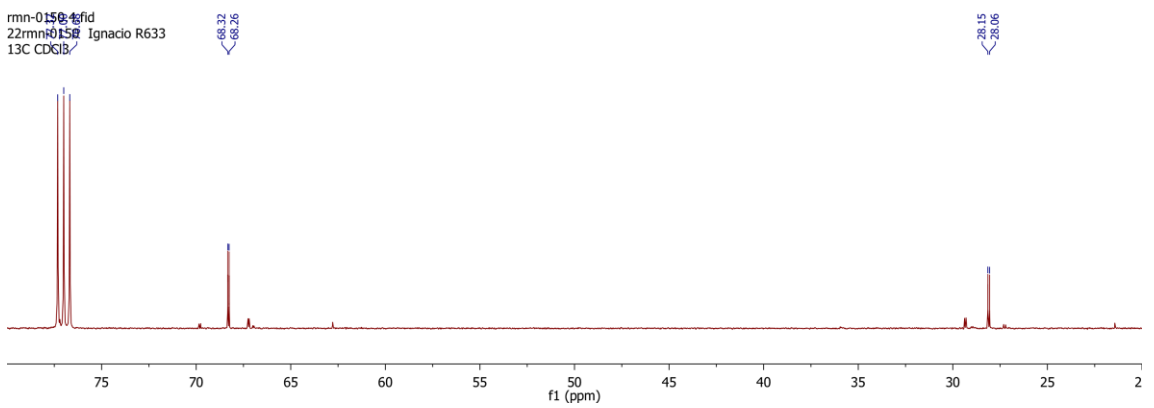
rmn-0150.1.fid
22rmn-0150 Ignacio R633
1H CDCl3

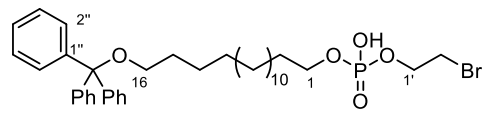
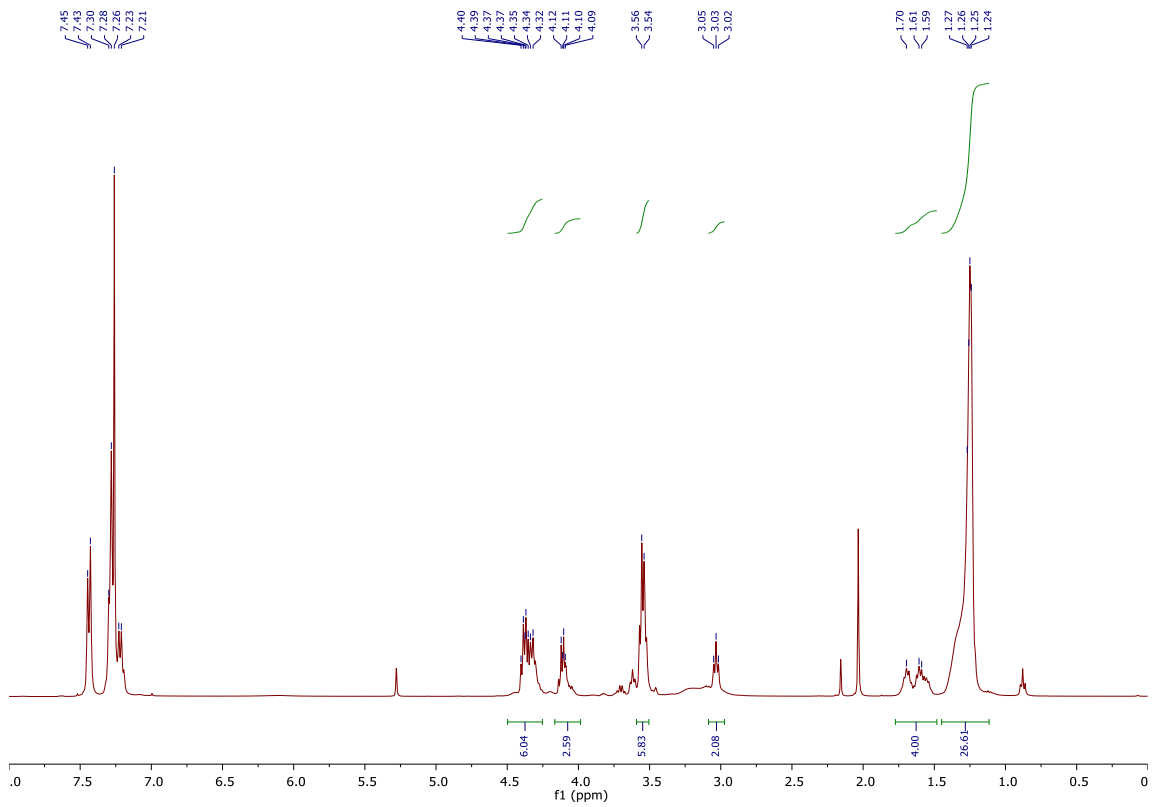


rmn-0150.3.fid



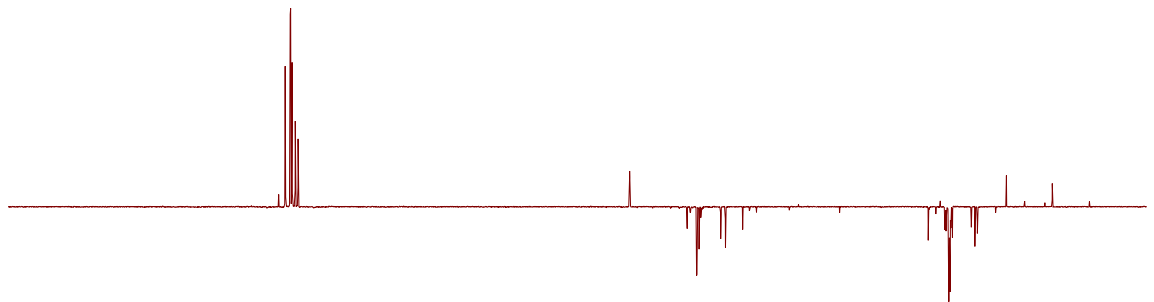
rmn-0150.4.fid
22rmn-0150 Ignacio R633
13C CDCl3



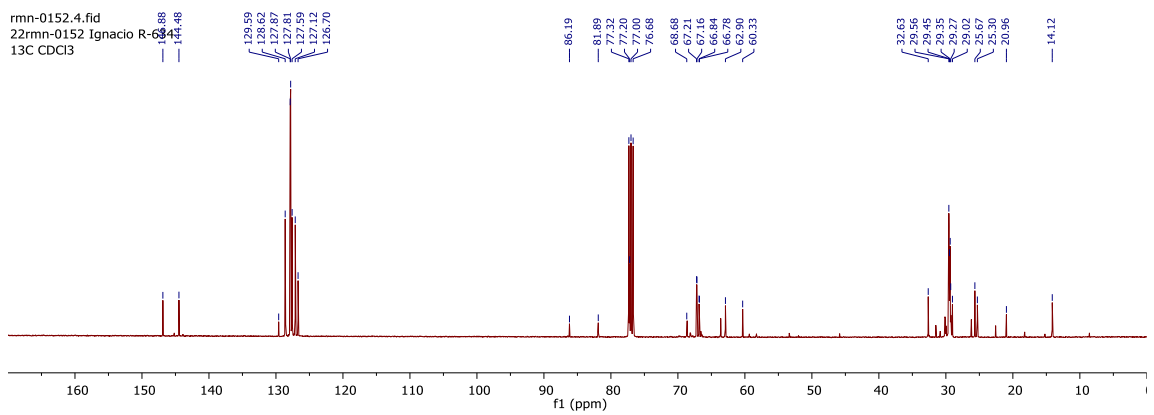


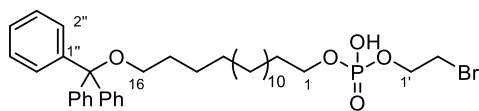
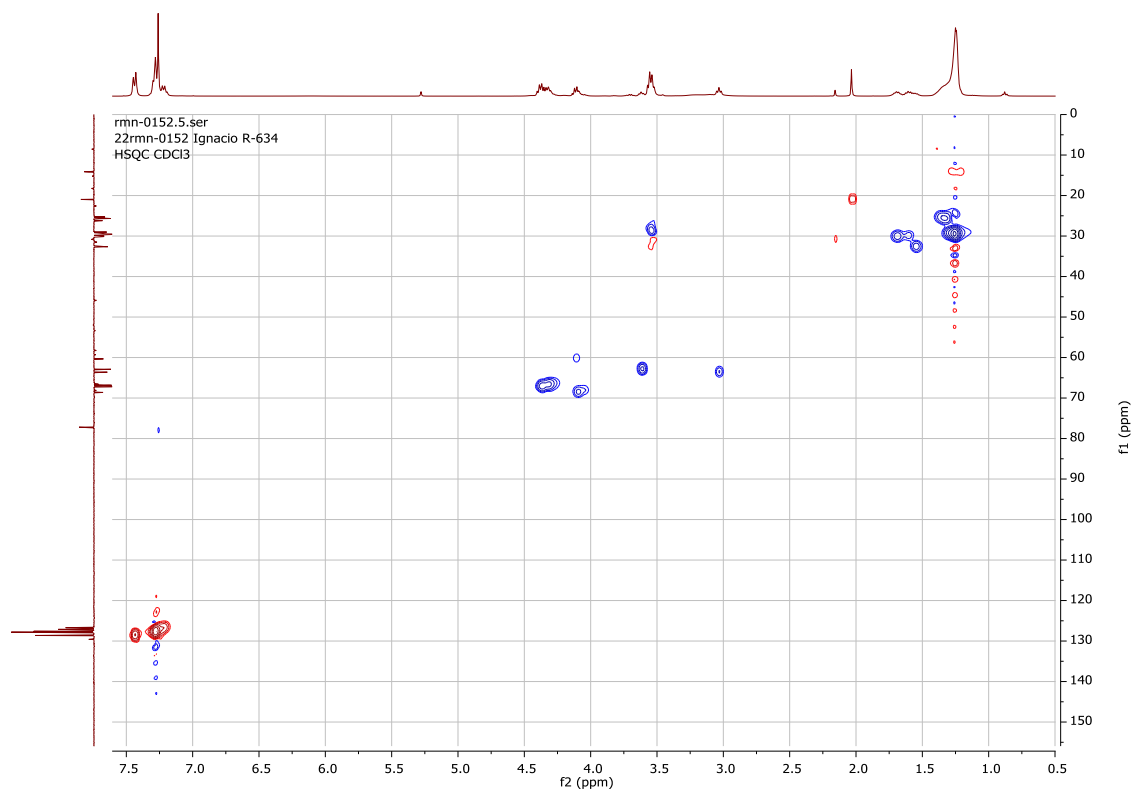
38

rmn-0152.3.fid

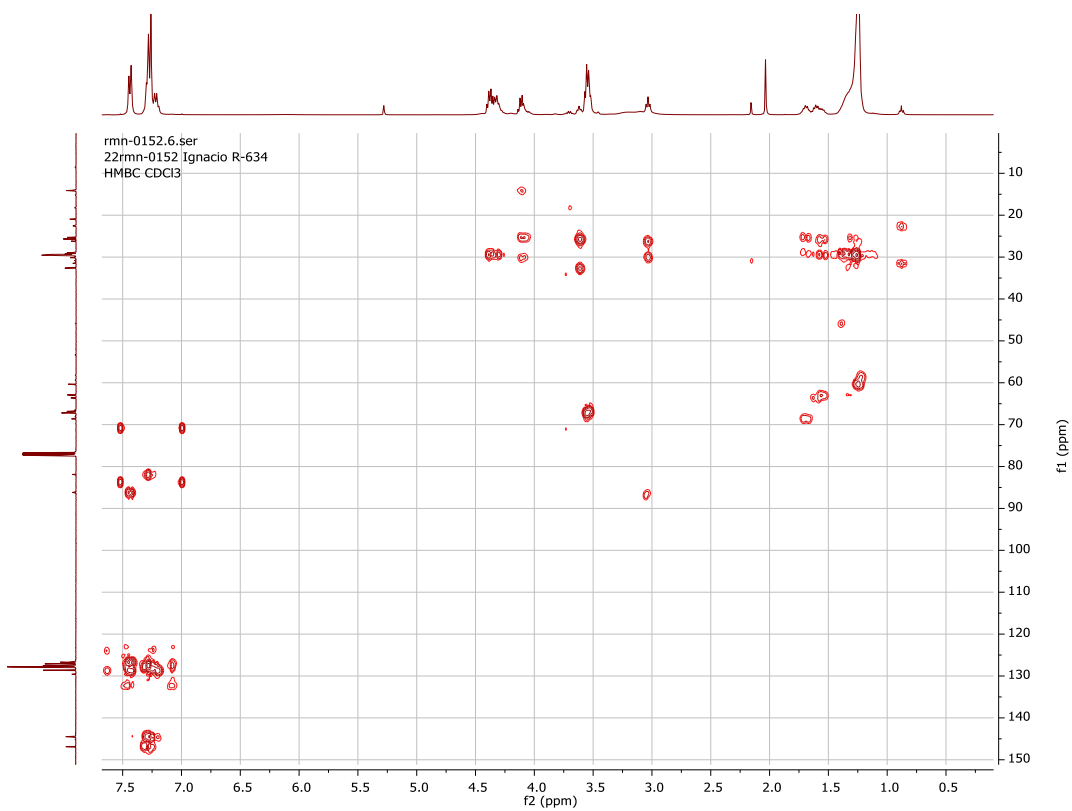


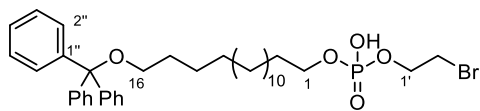
rmn-0152.4.fid
22rmn-0152 Ignacio R-684
13C CDCl3



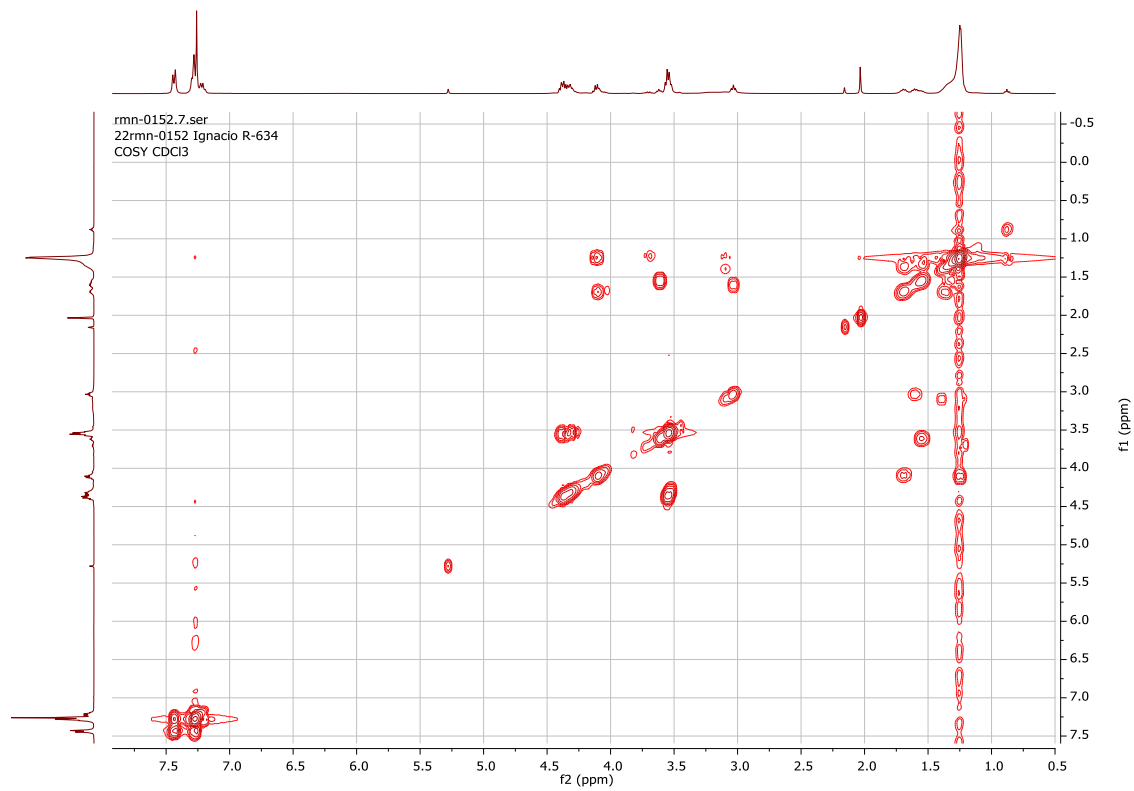


38



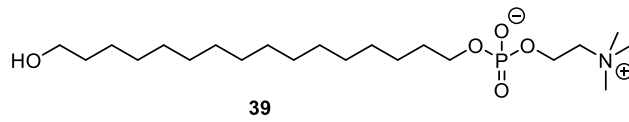
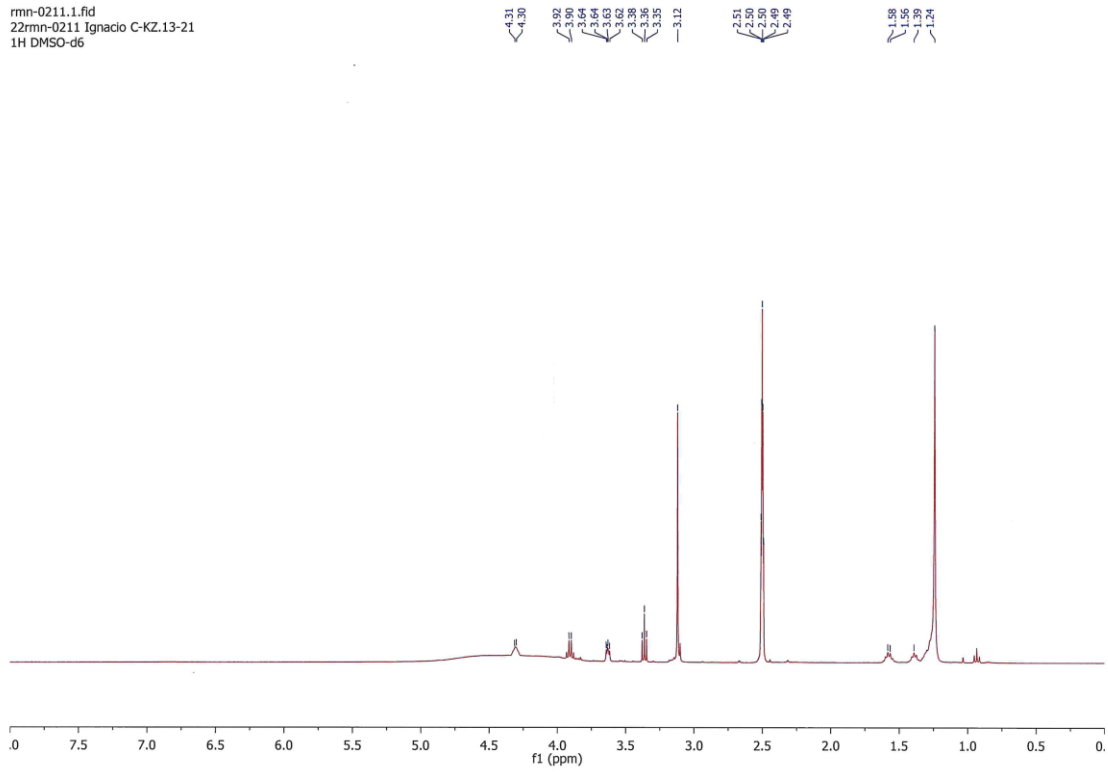


38

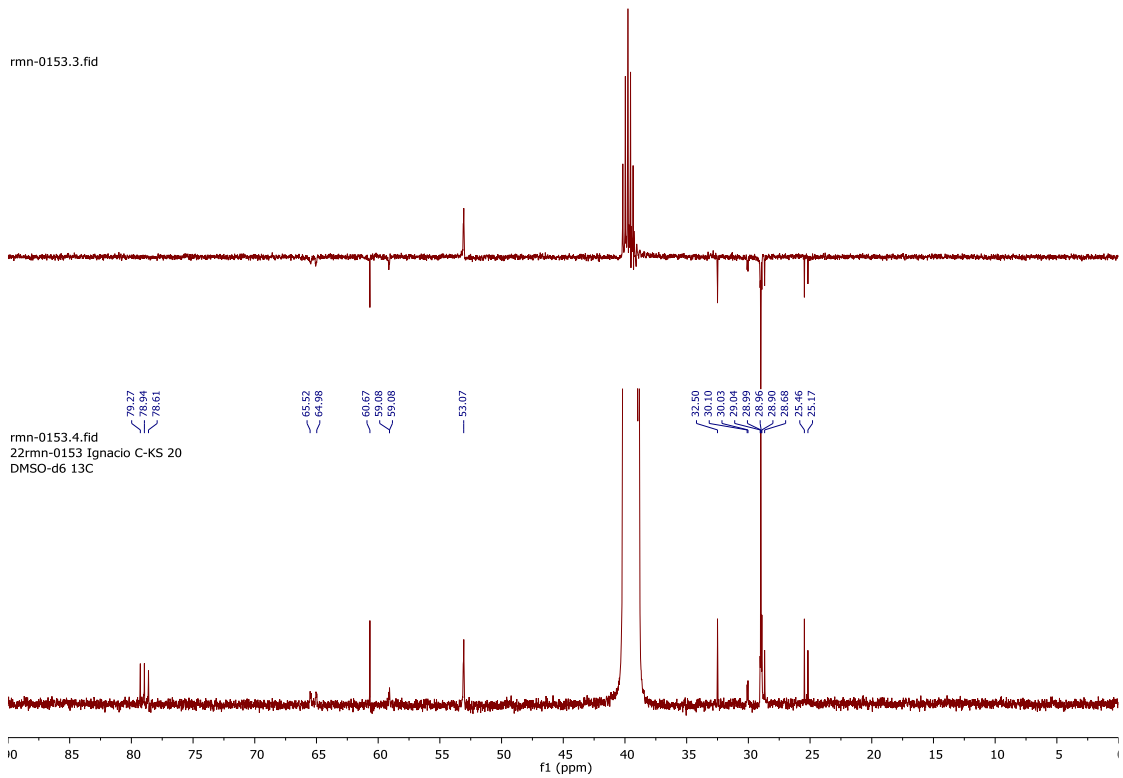


| Espectroscopía

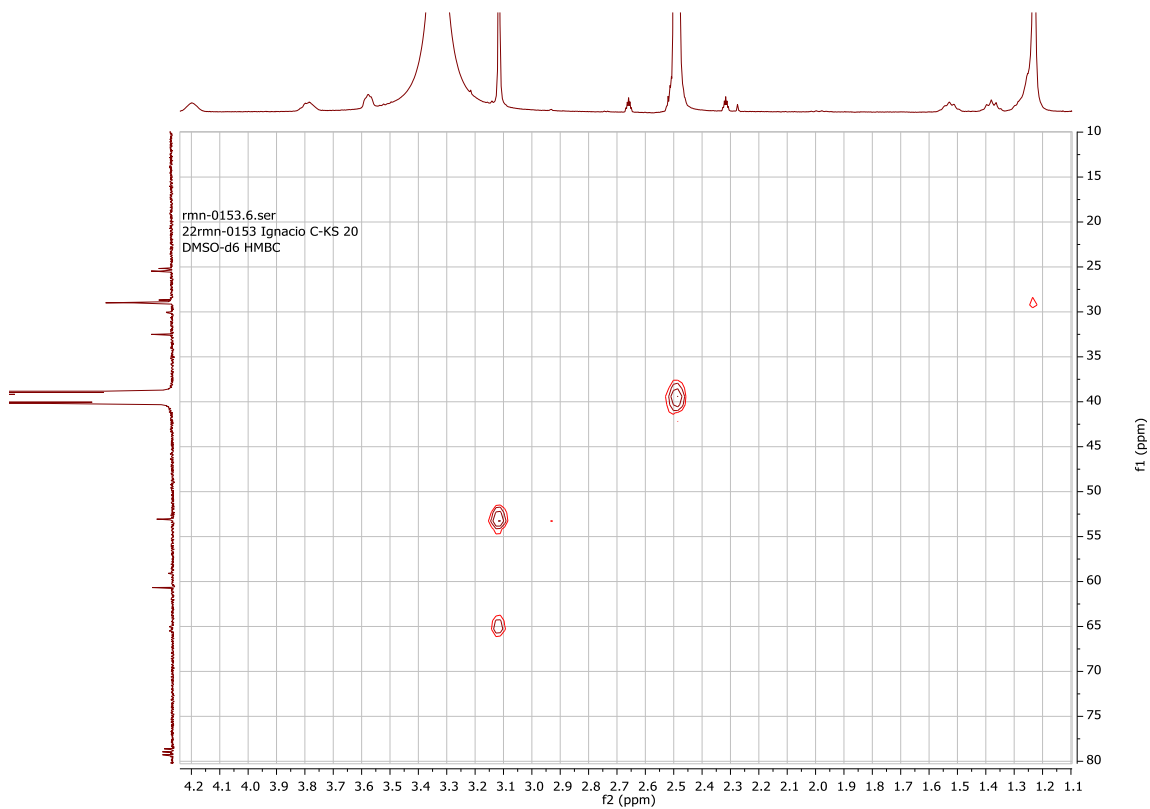
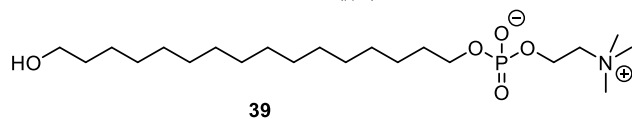
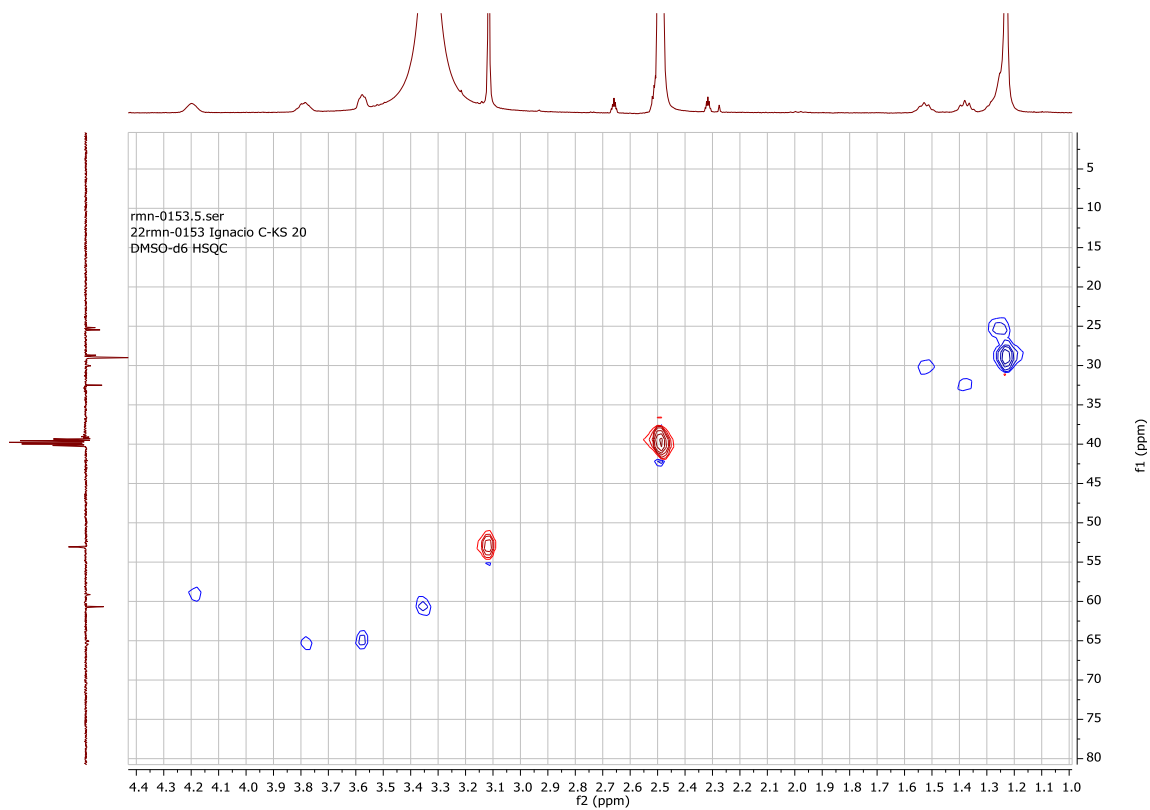
rmn-0211.1.fid
22rmn-0211 Ignacio C-KZ.13-21
1H DMSO-d6

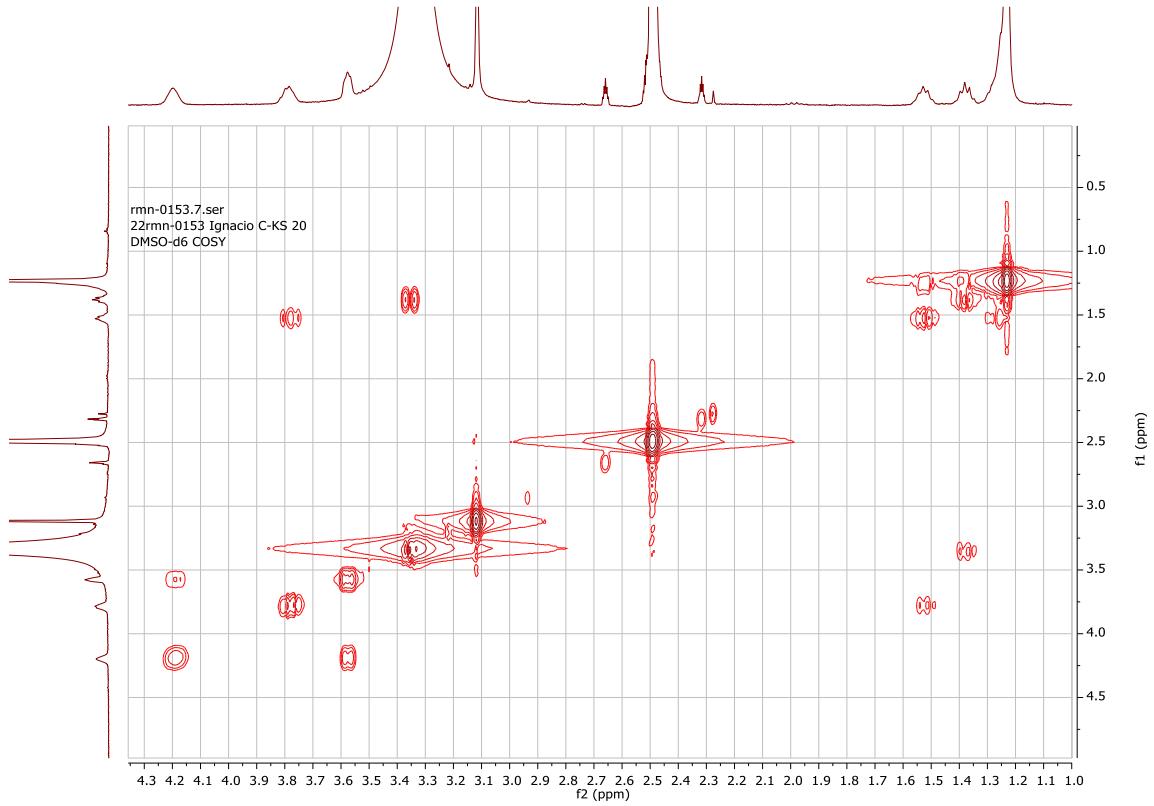
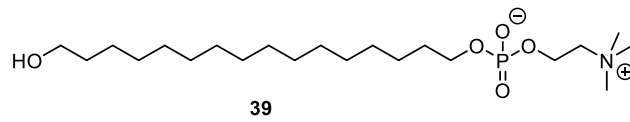


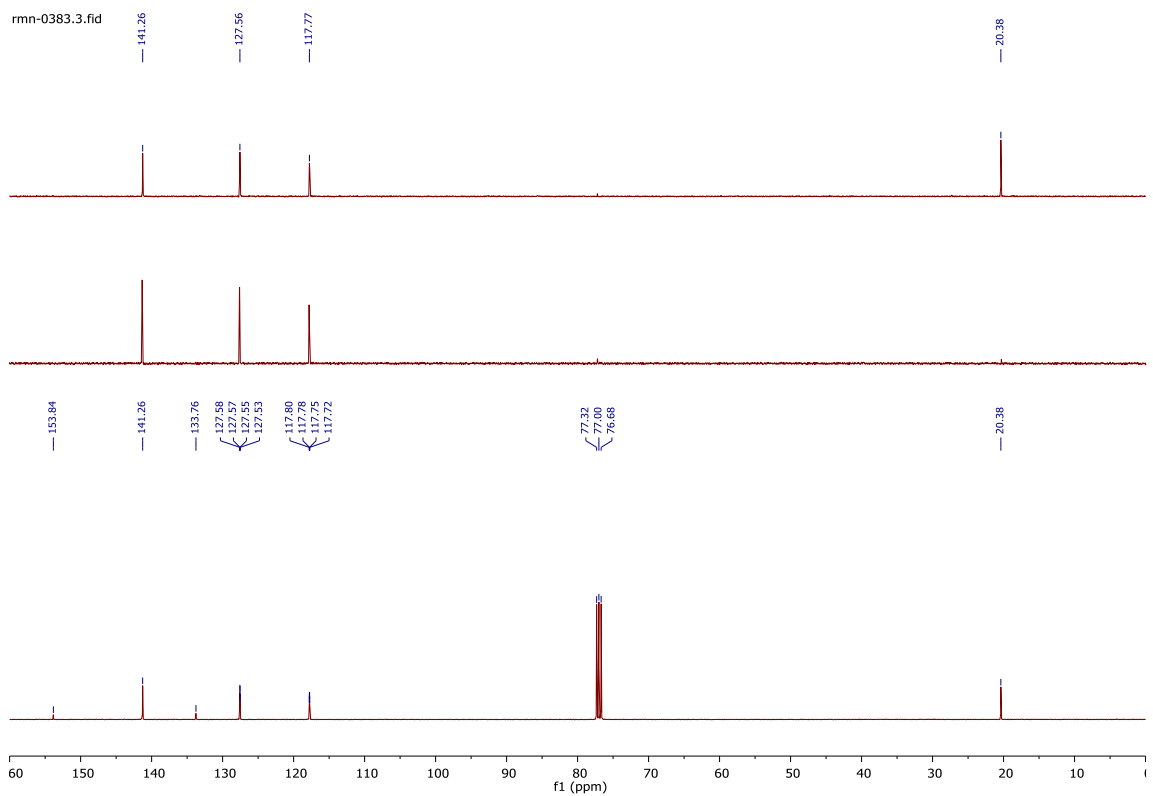
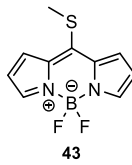
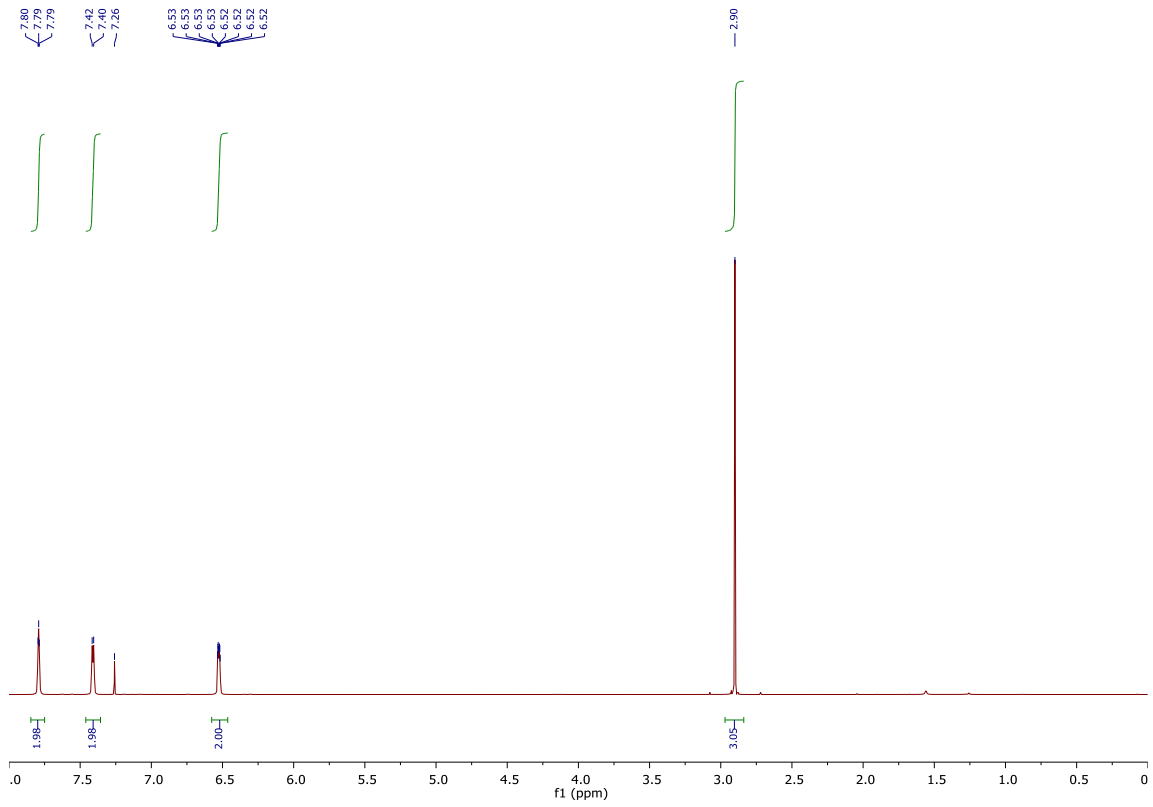
rmn-0153.3.fid

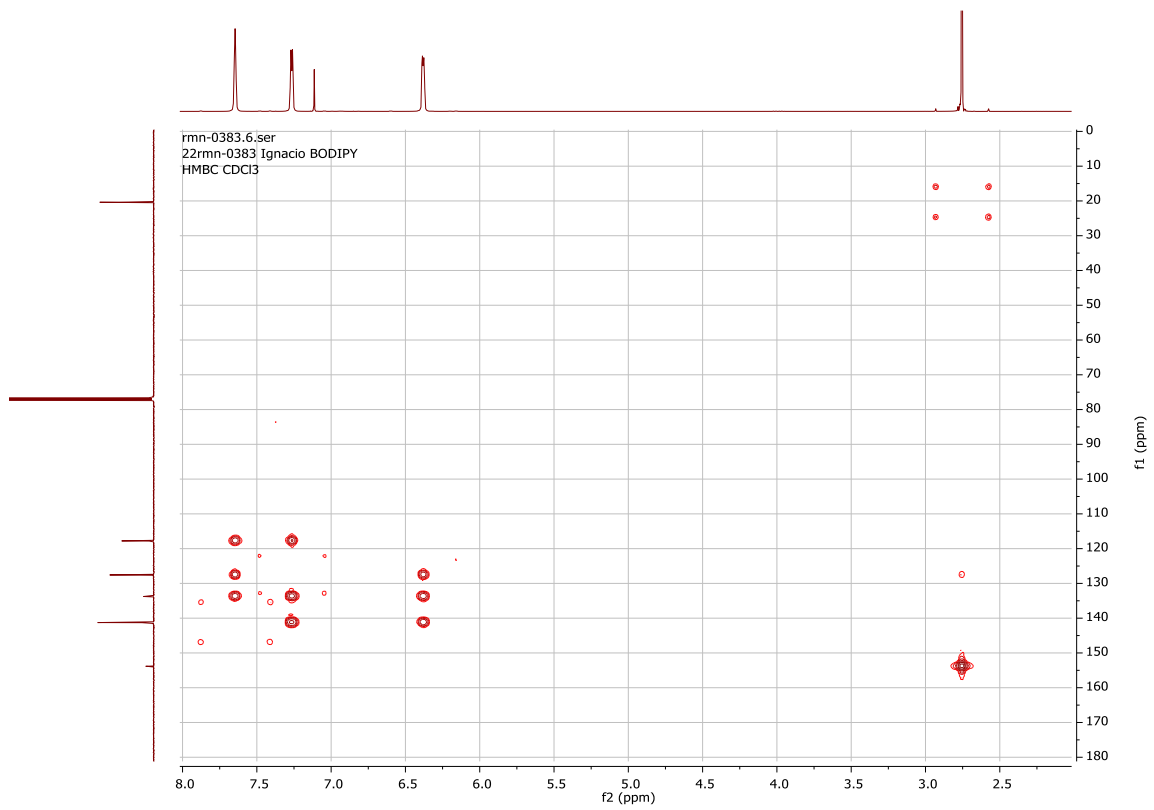
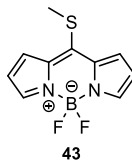
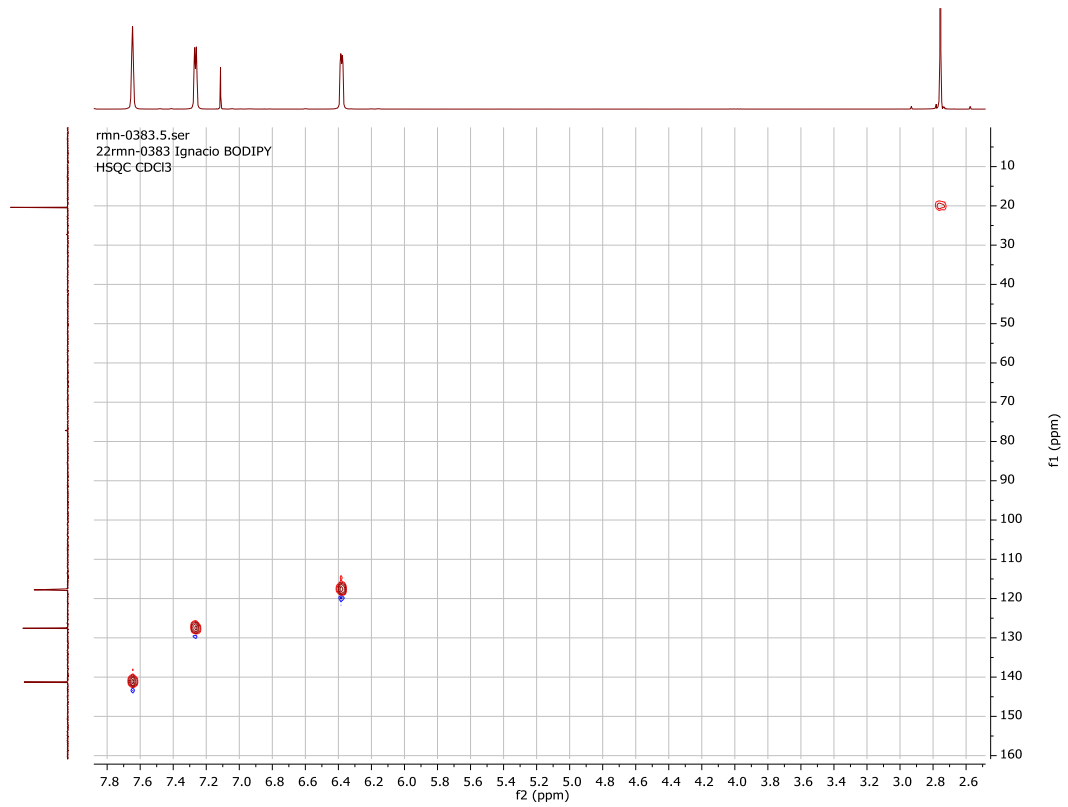


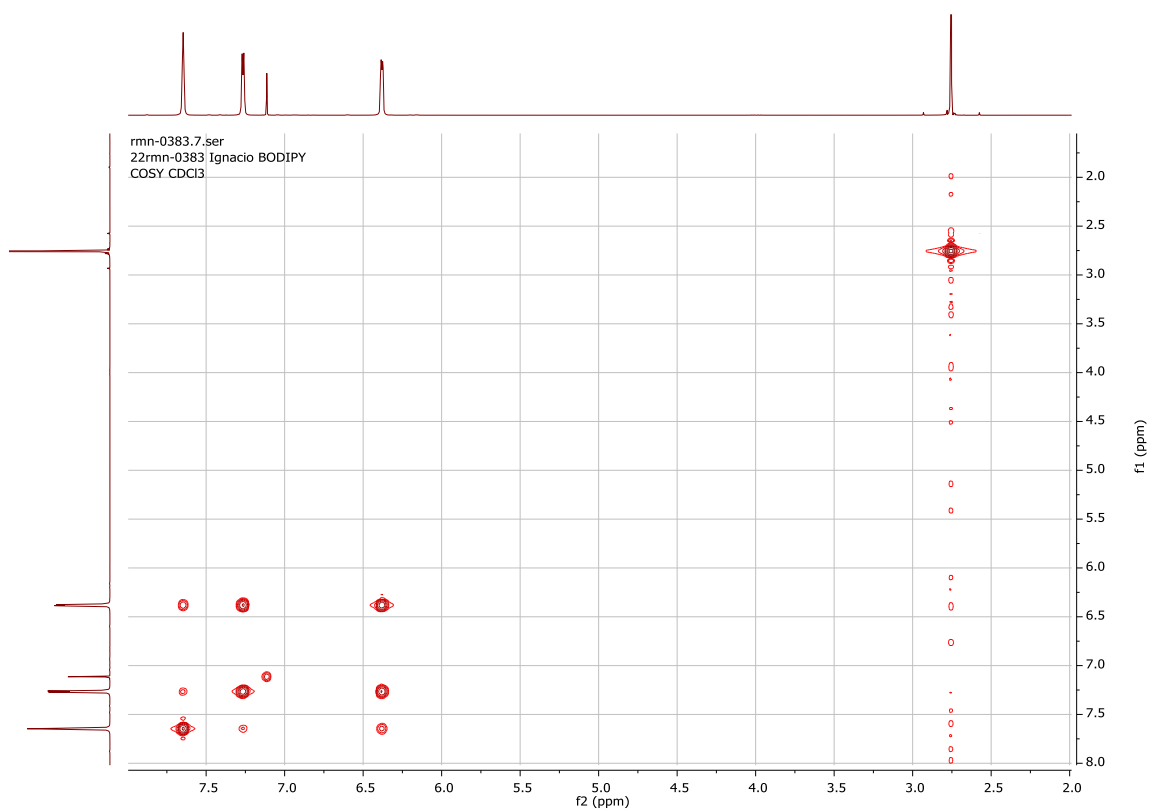
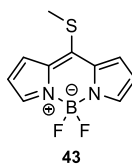
rmn-0153.4.fid
22rmn-0153 Ignacio C-KS 20
DMSO-d6 13C

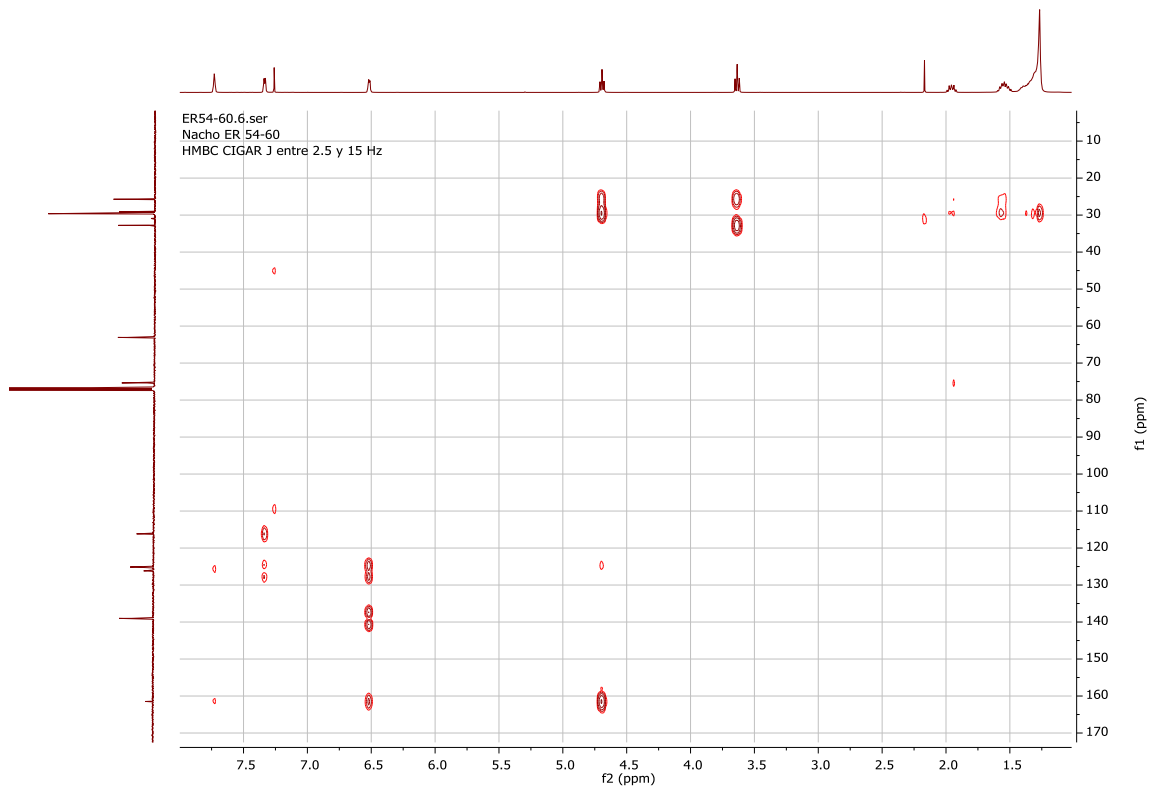
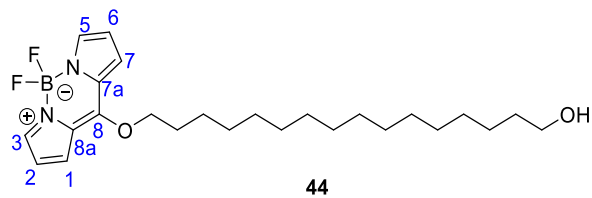
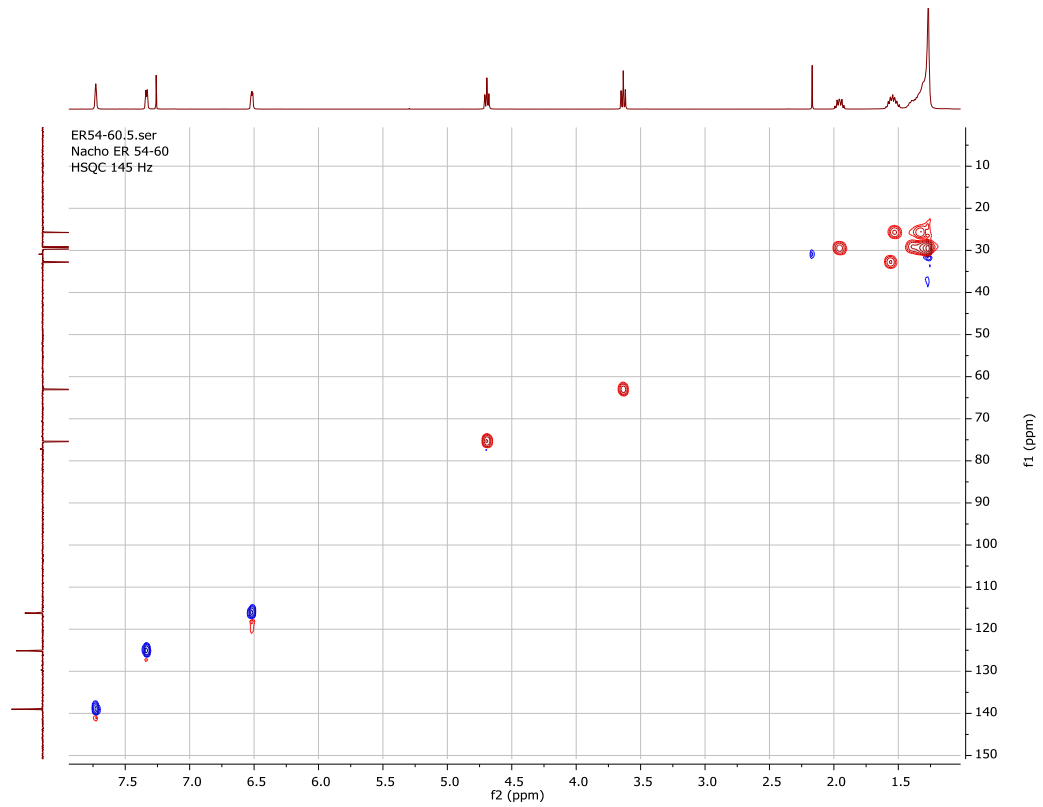




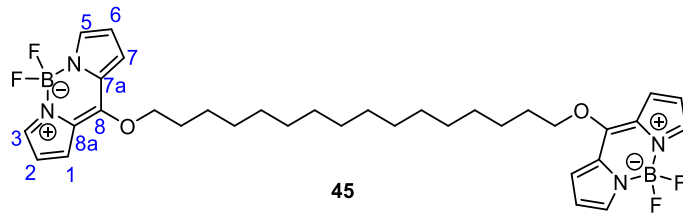
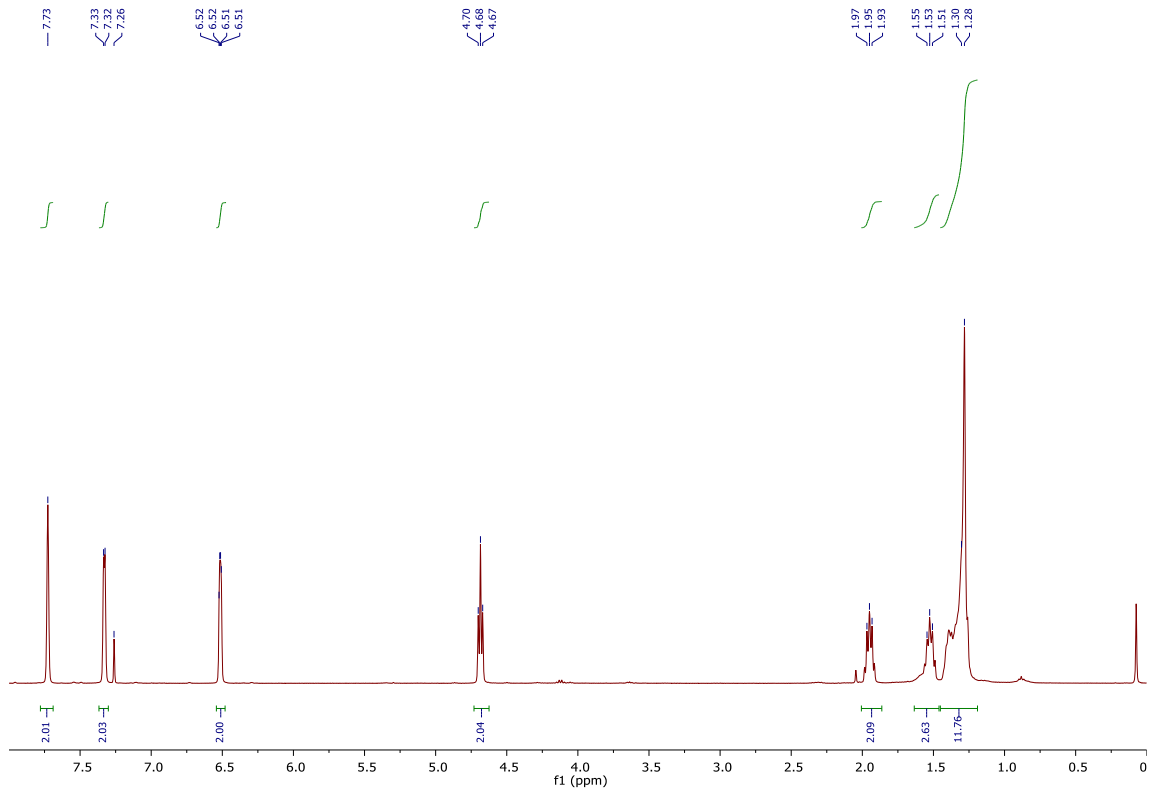




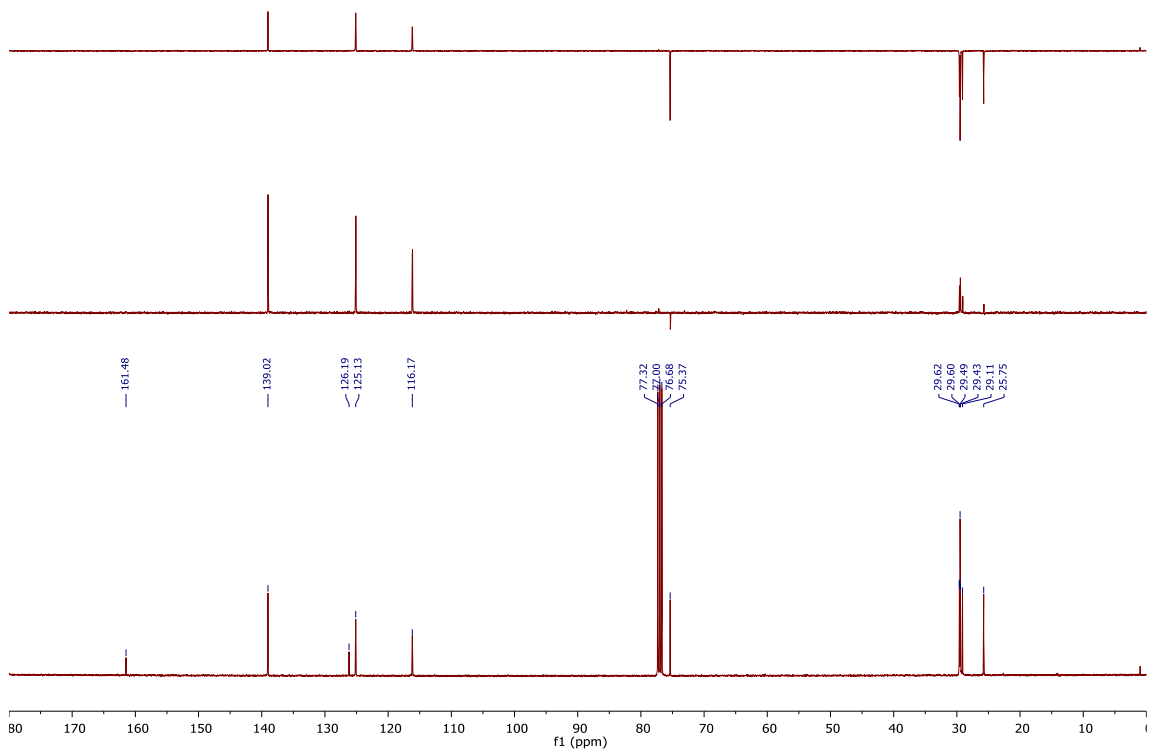


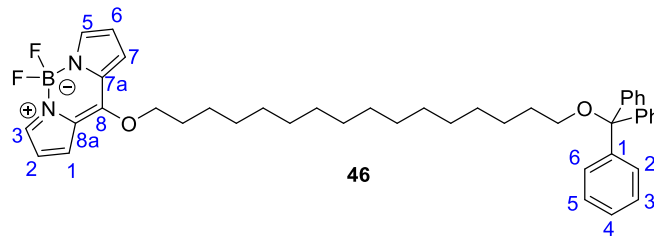
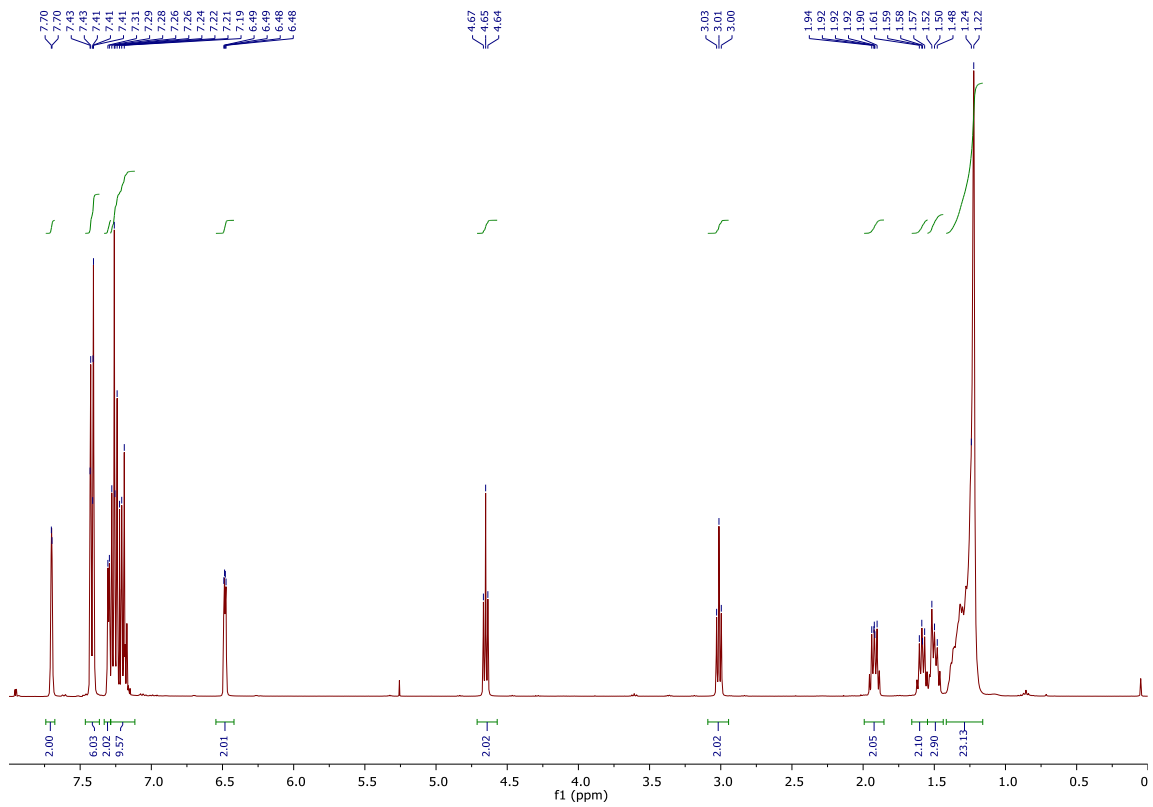


| Espectroscopía

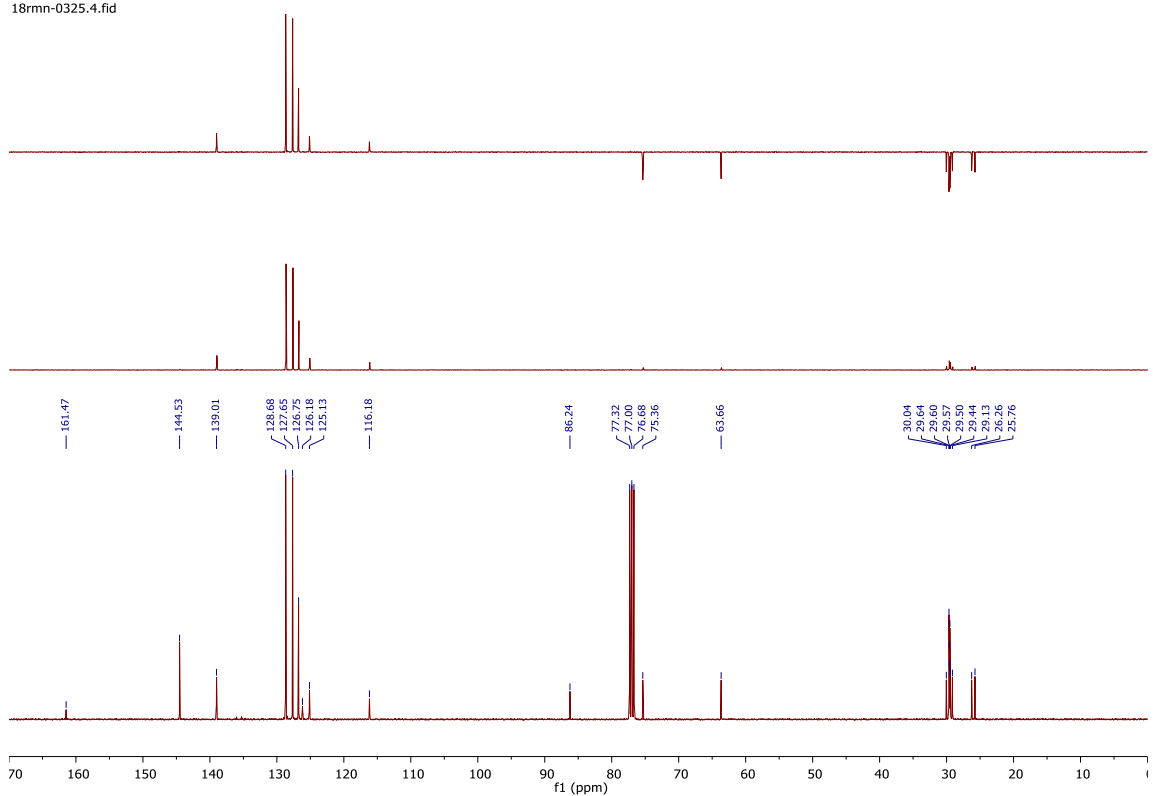


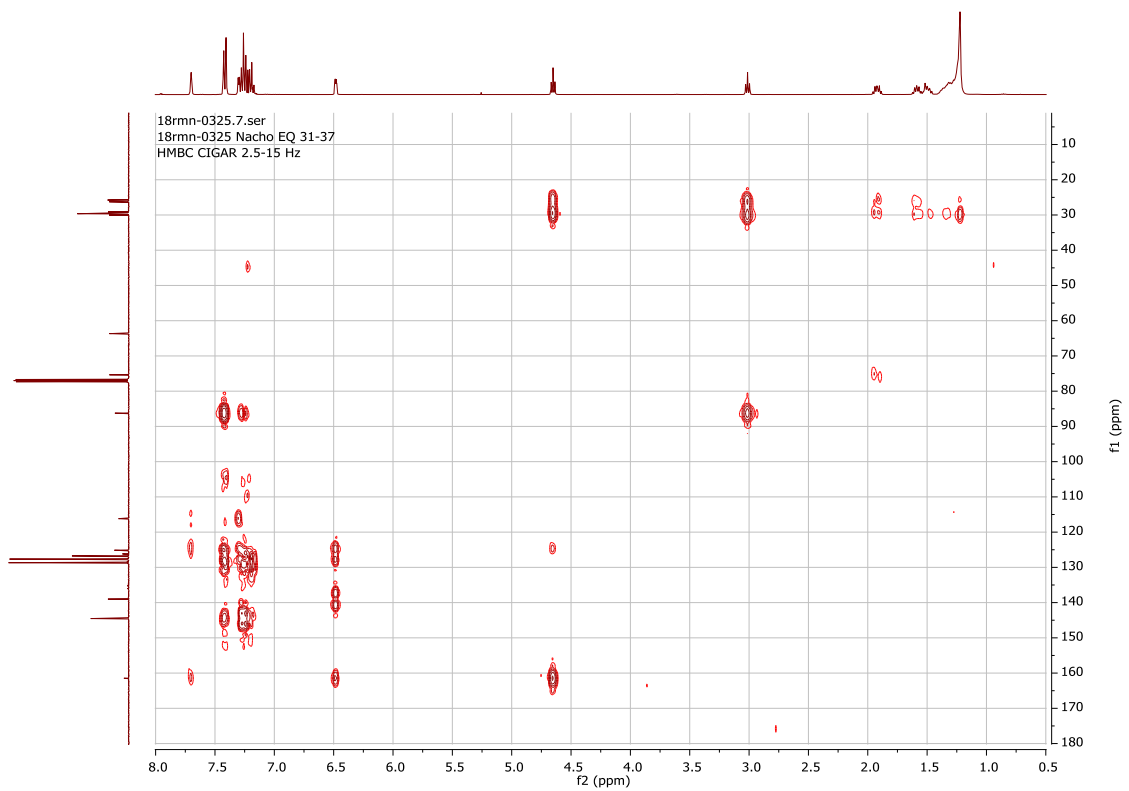
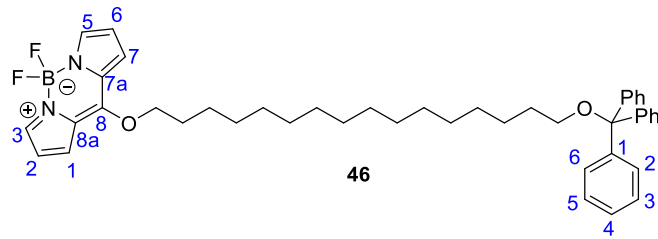
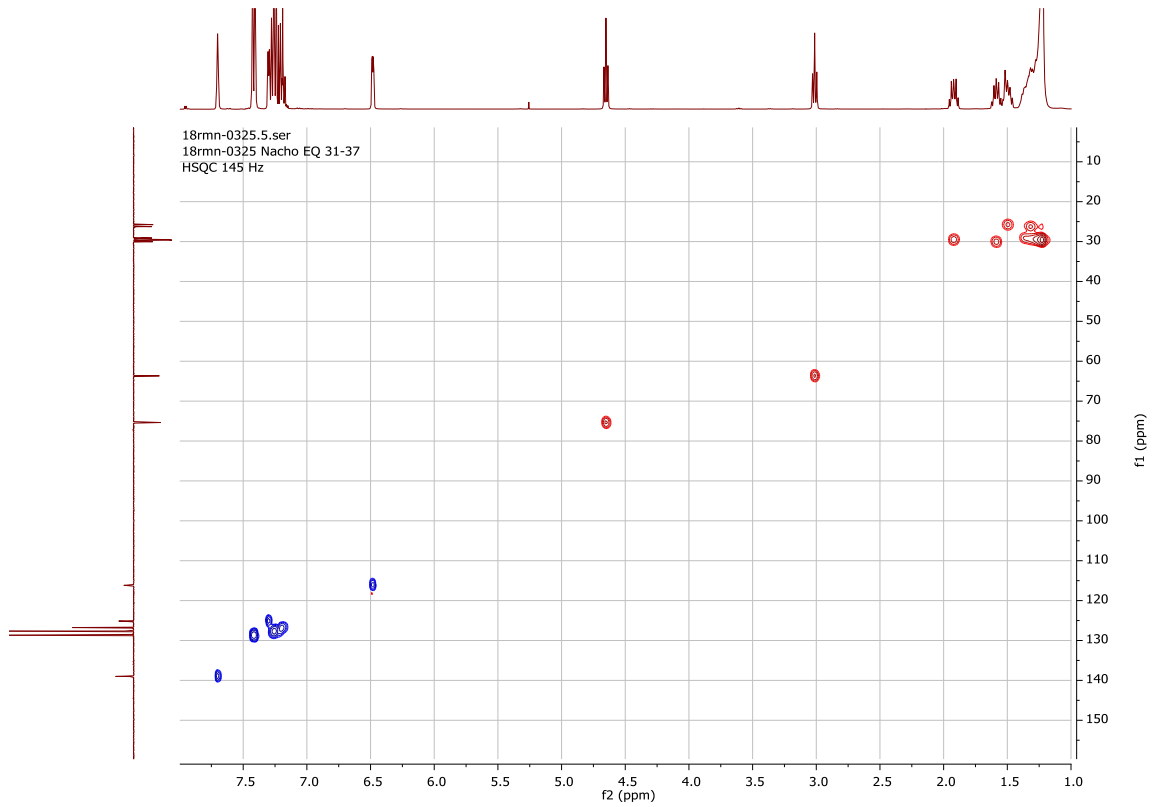
rmn-0664.3.fid

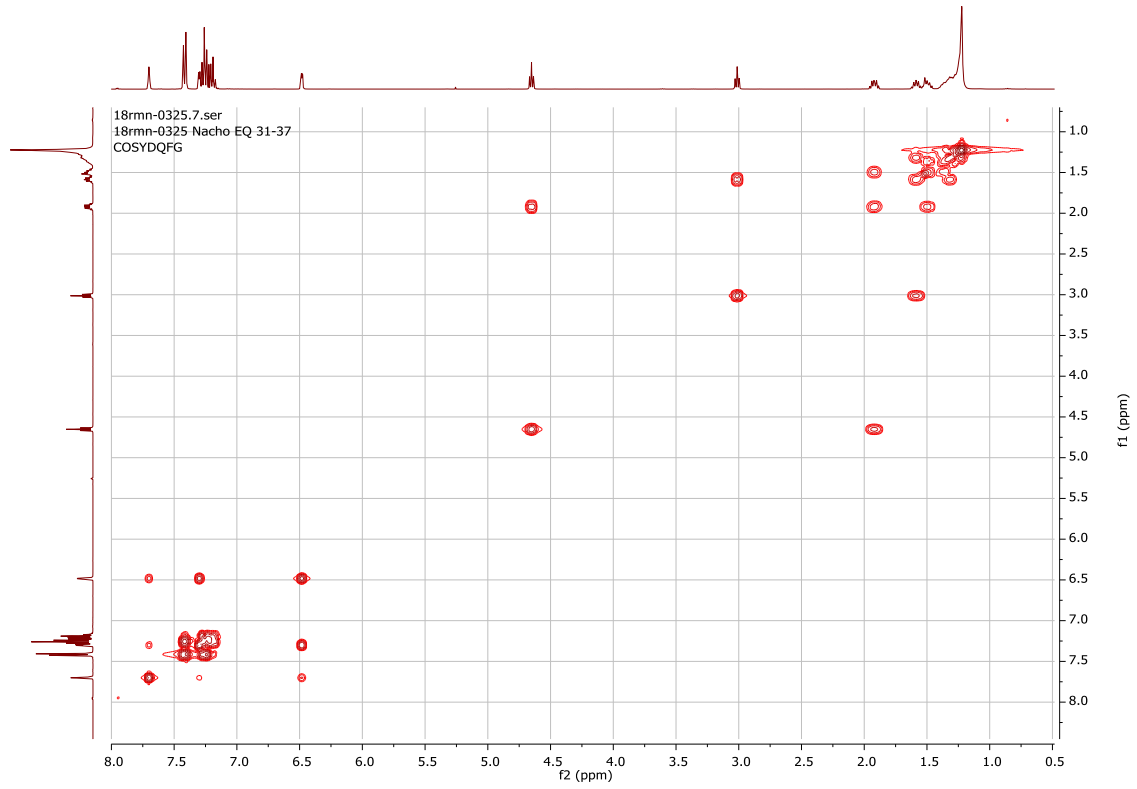
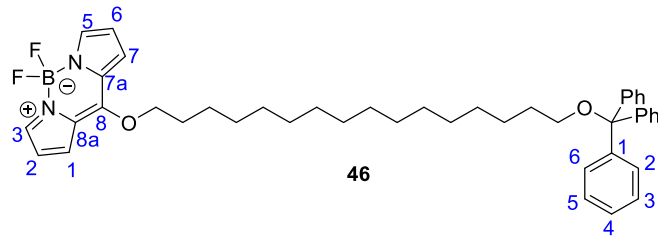




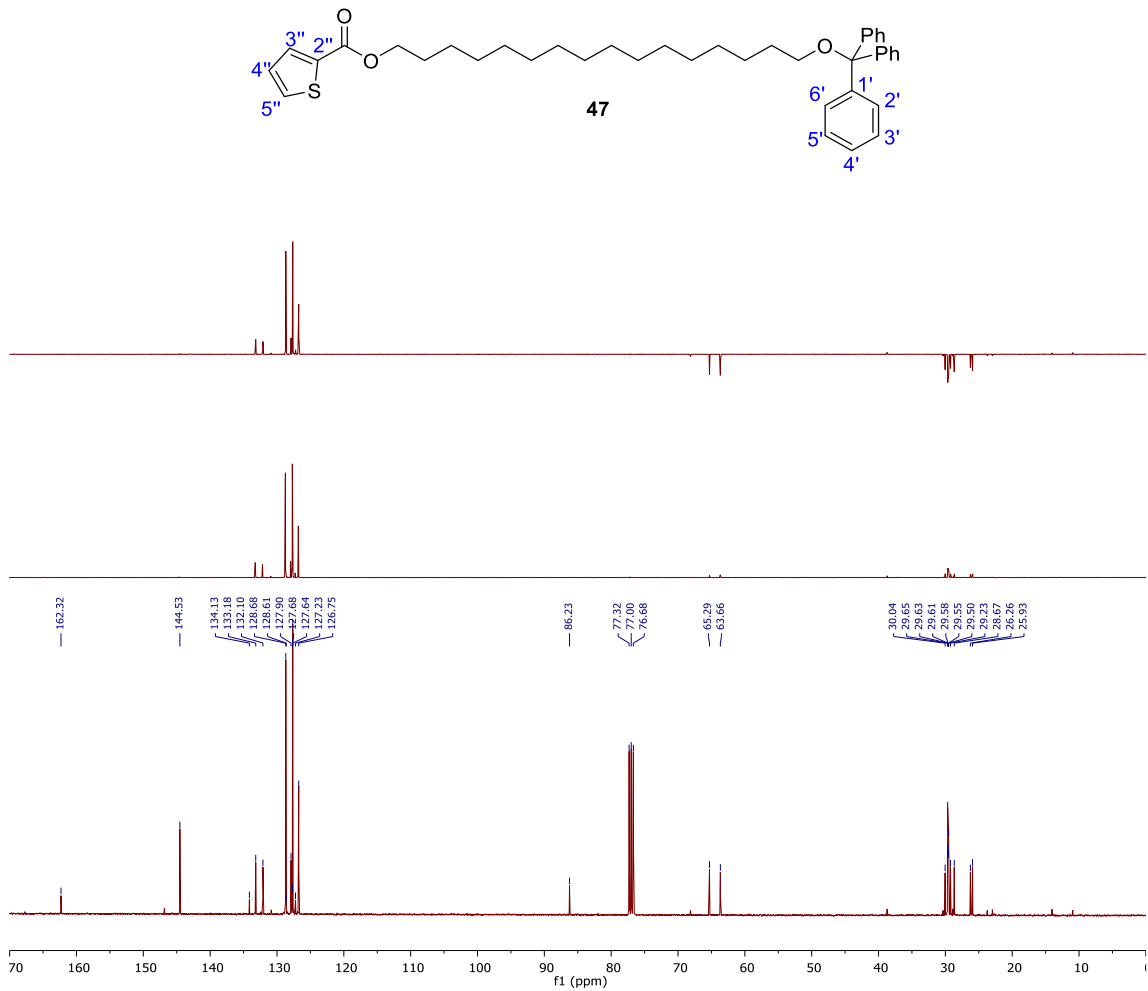
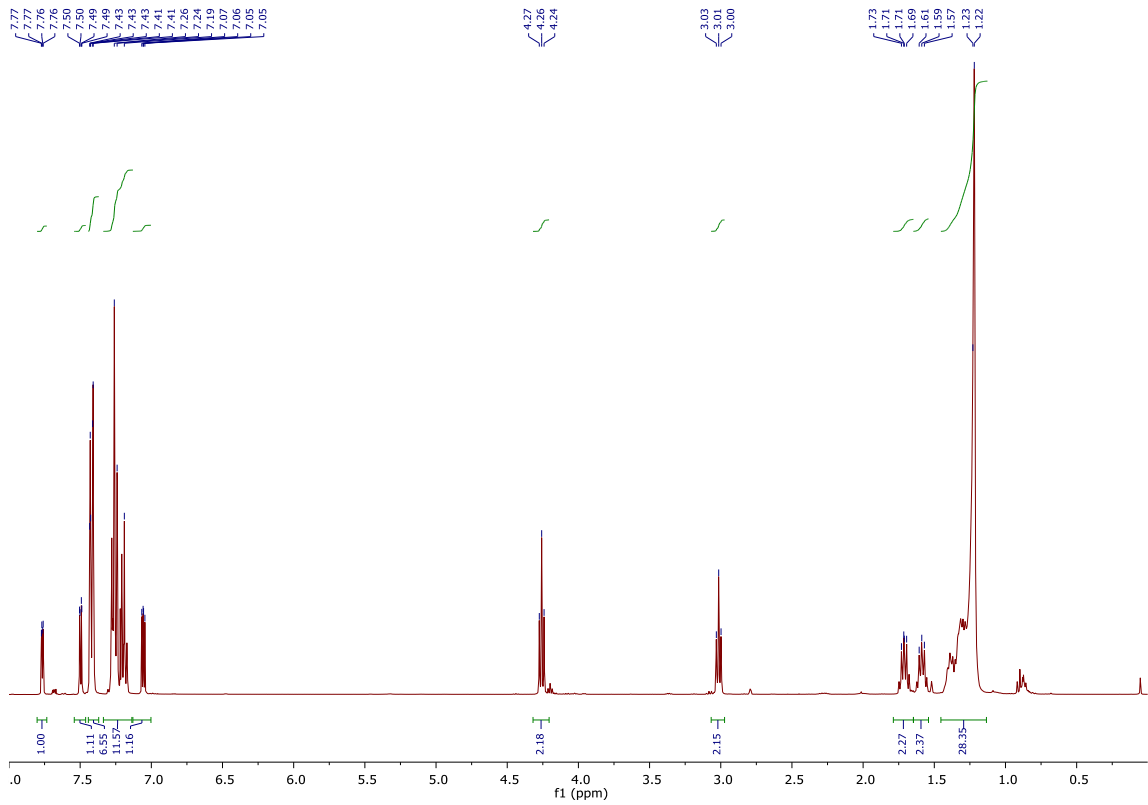
18mn-0325.4.fid

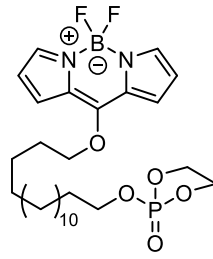




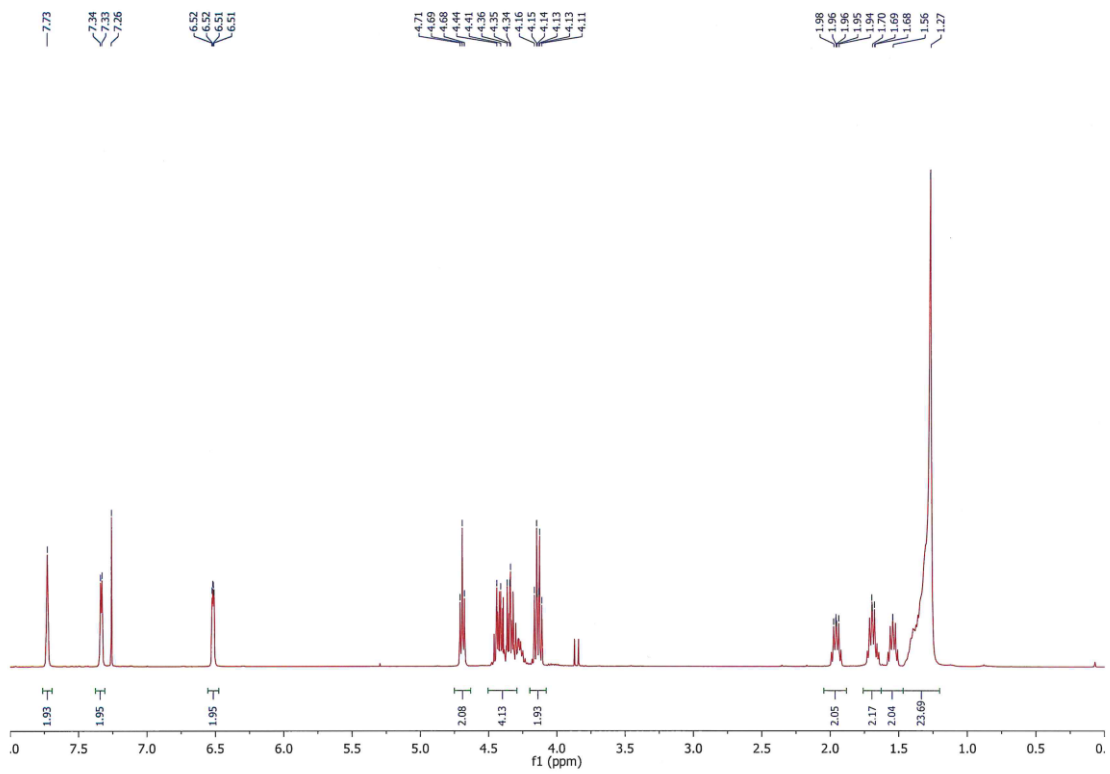


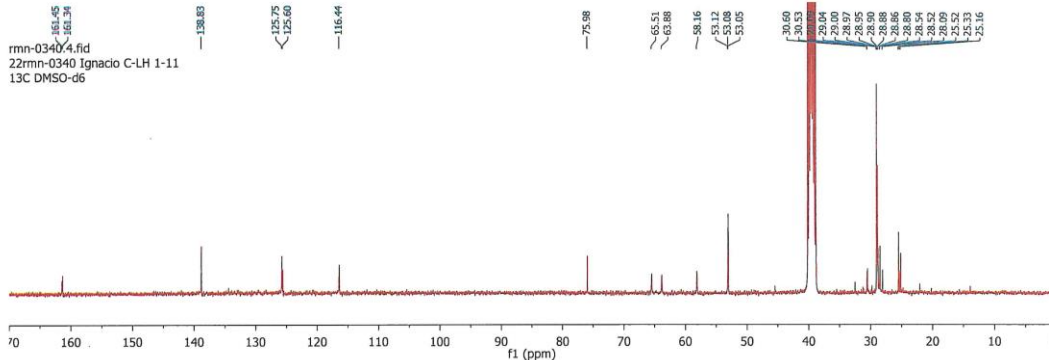
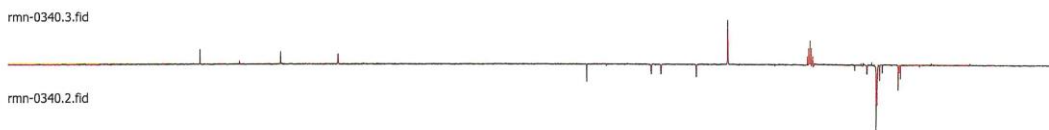
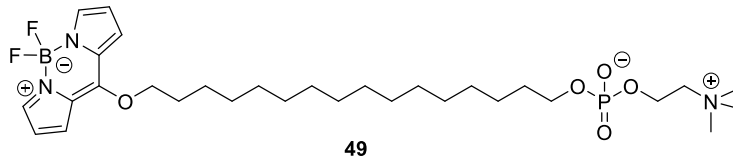
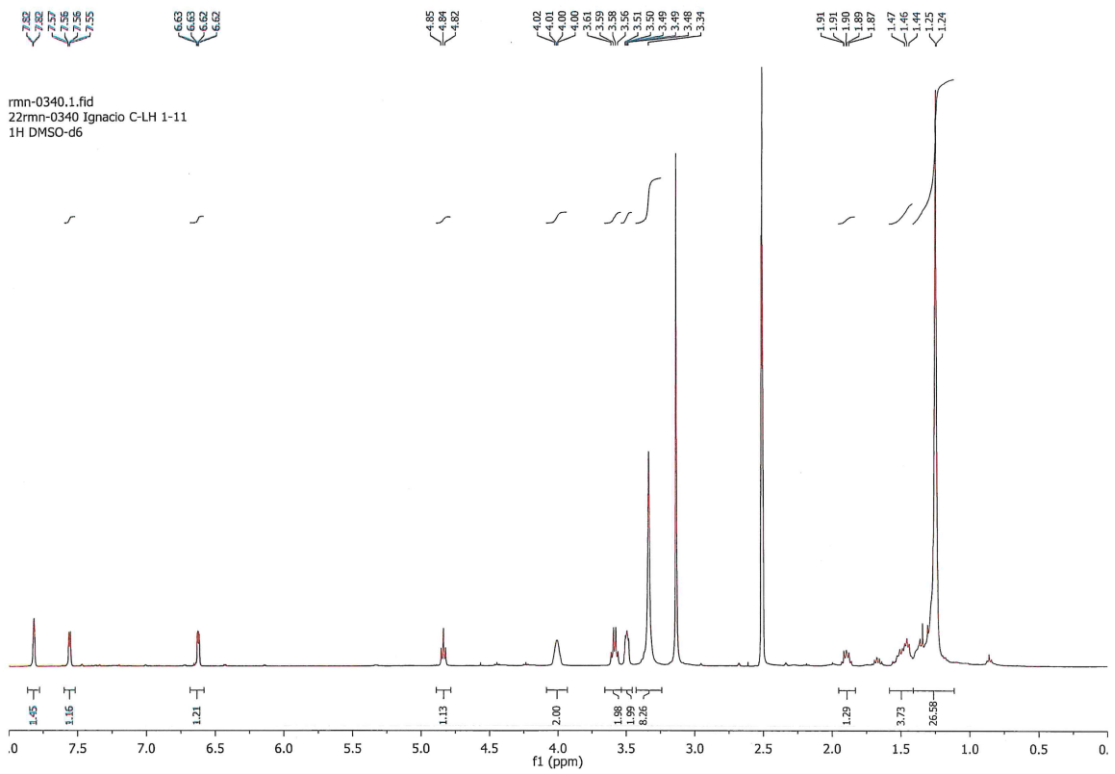
| Espectroscopía

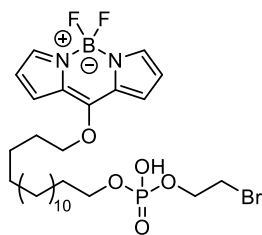




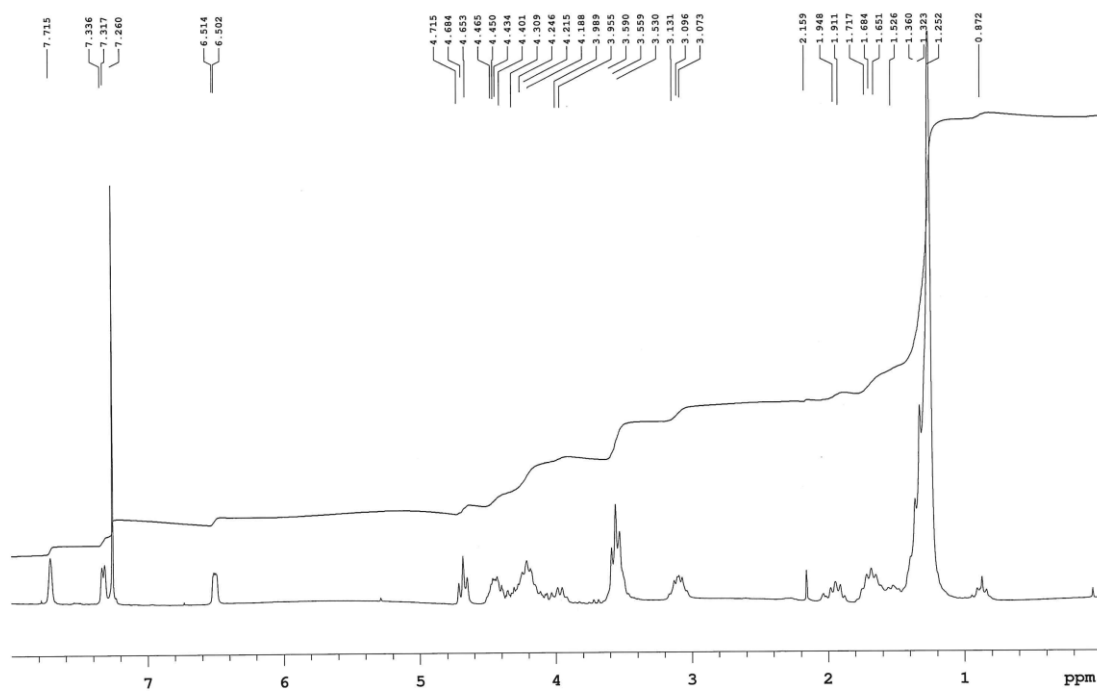
48



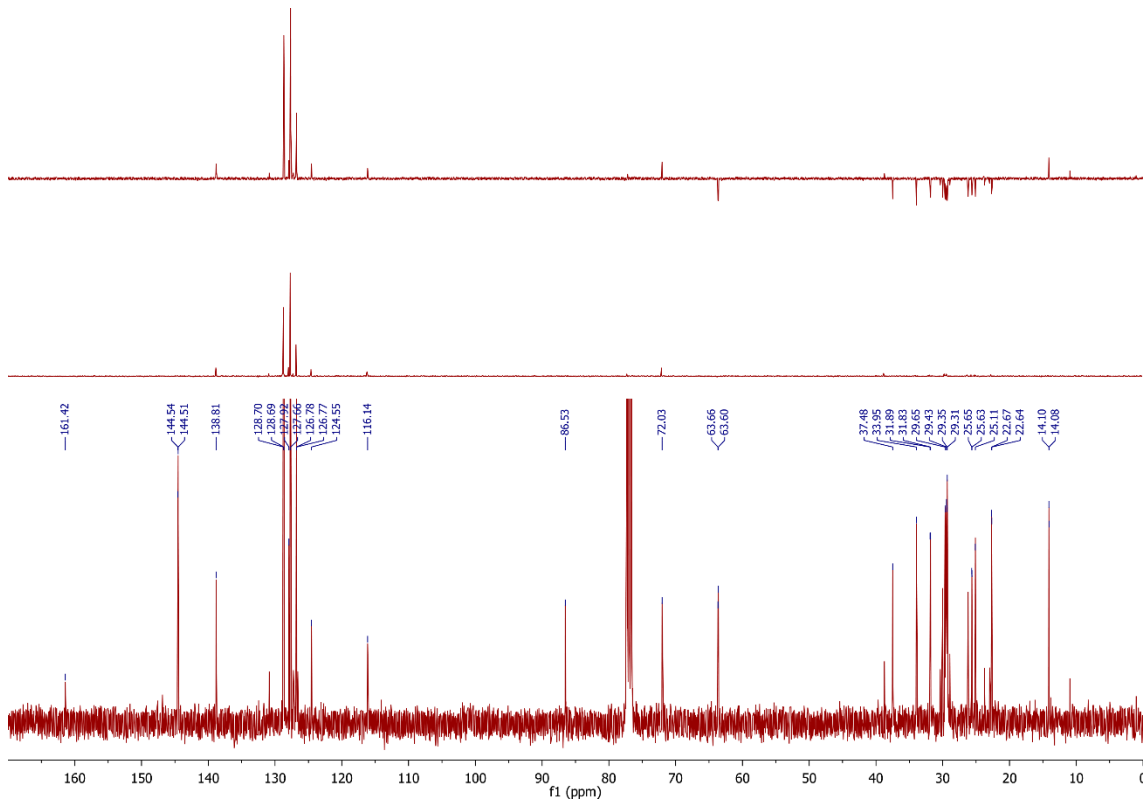
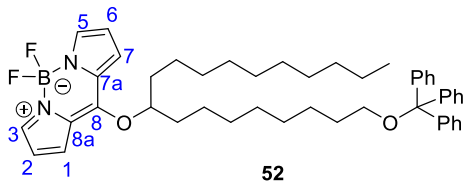
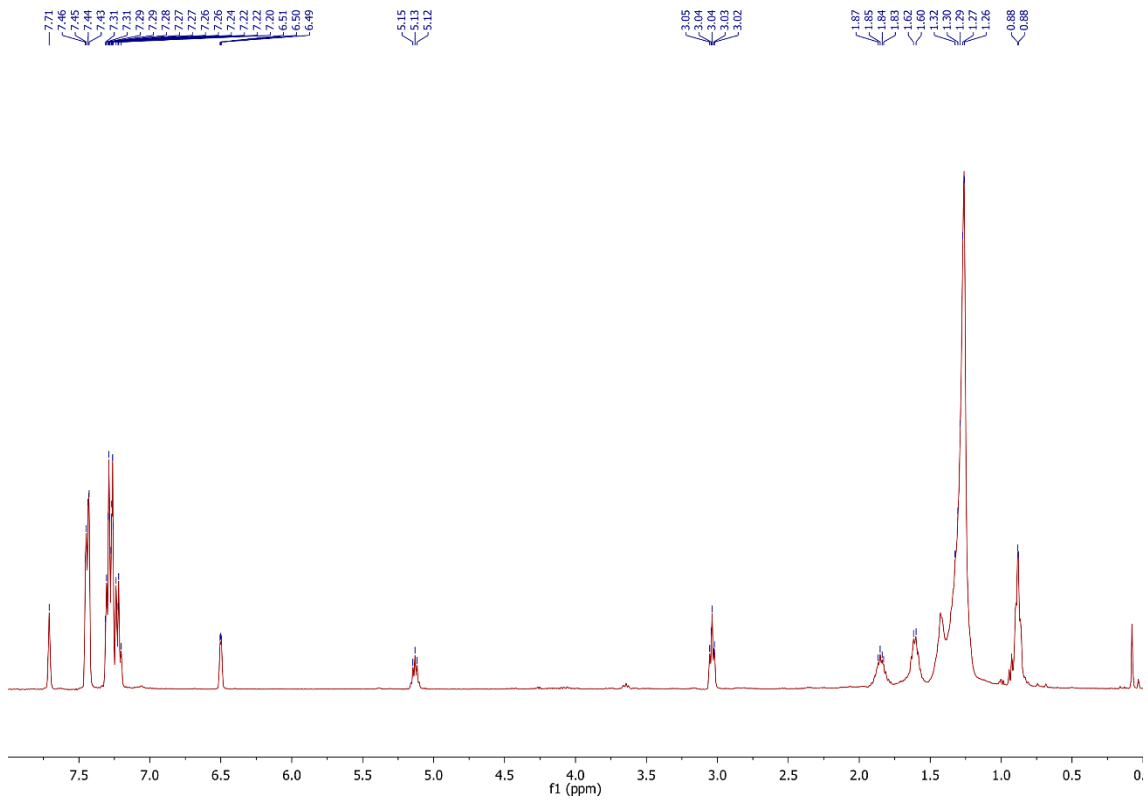


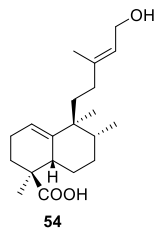
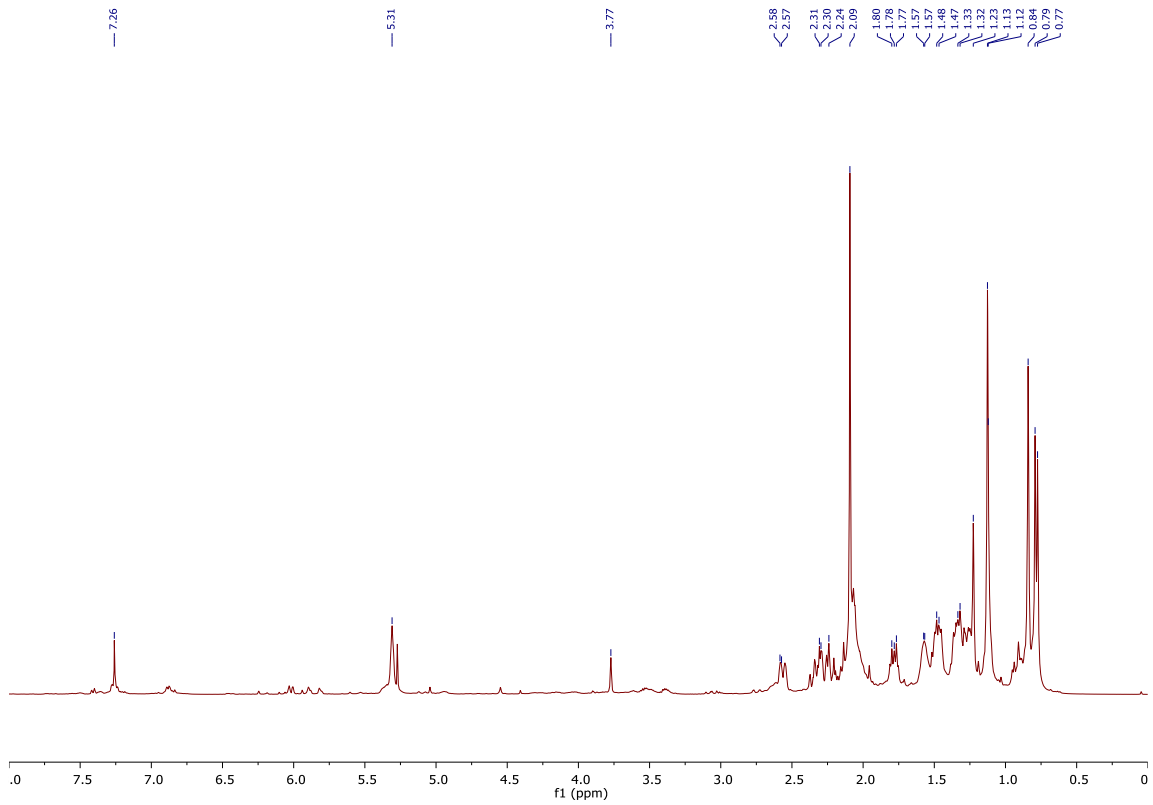


51



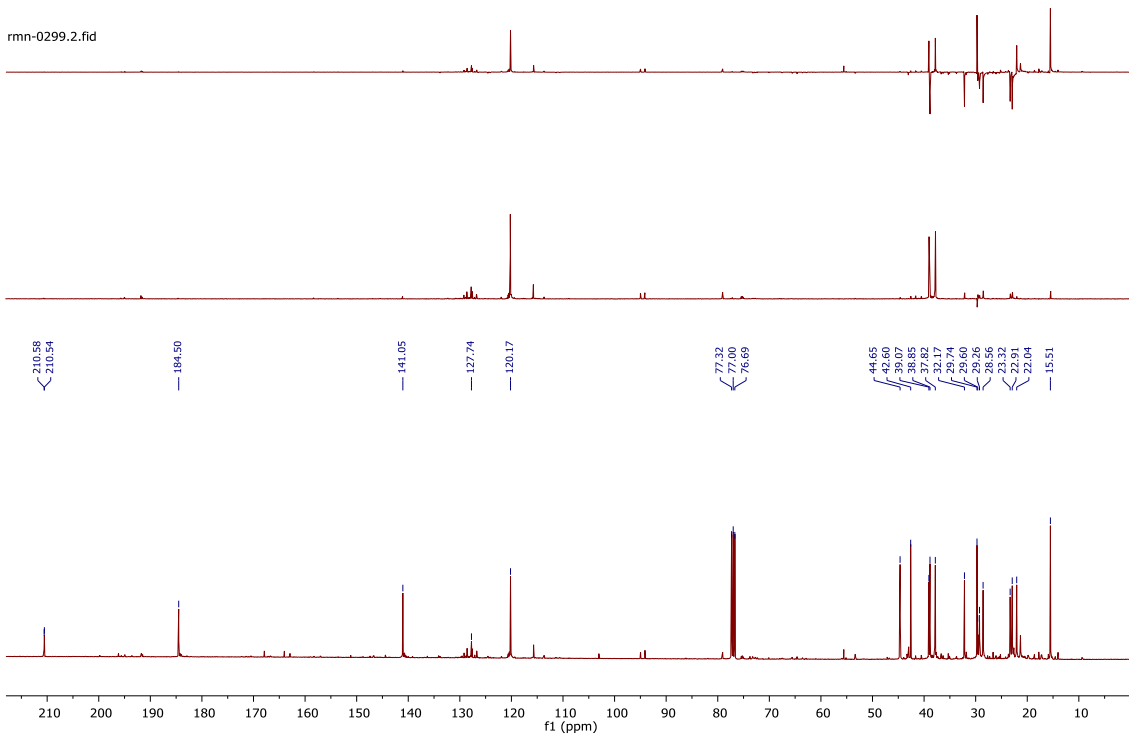
| Espectroscopía



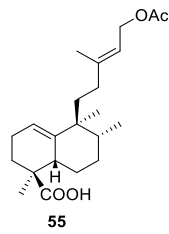
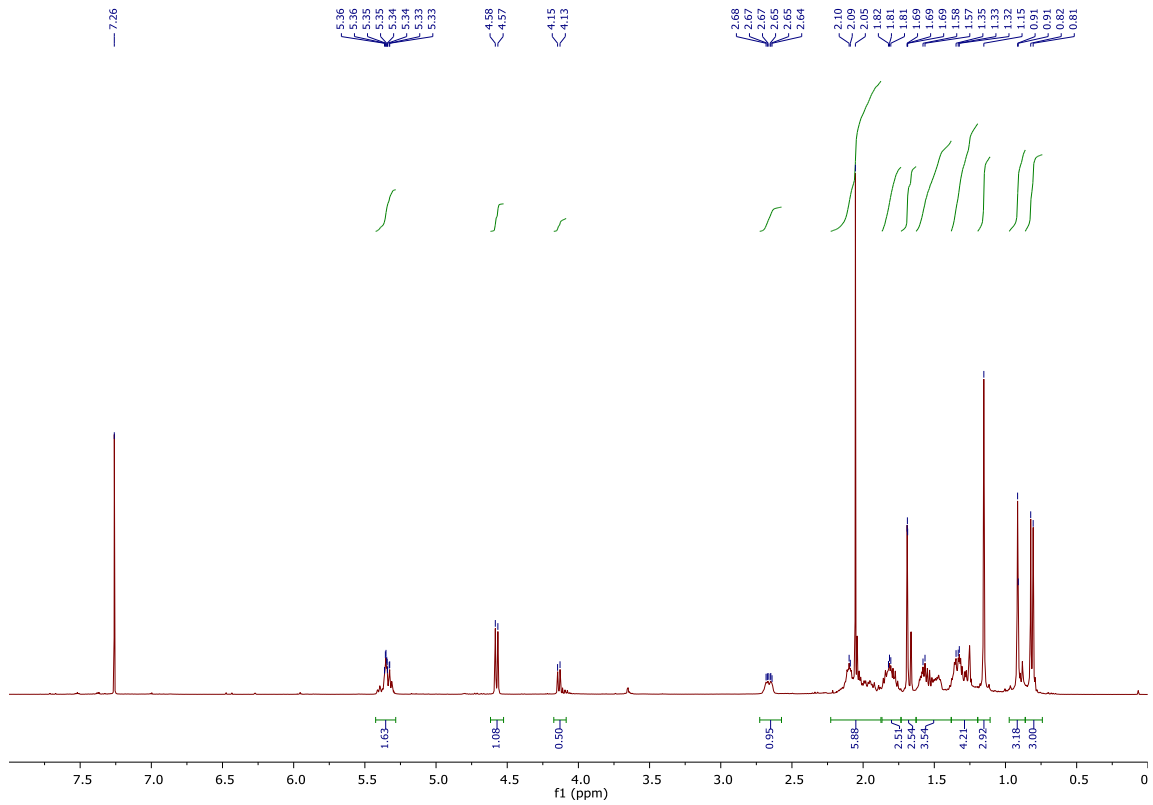


rmn-0299.3.fid

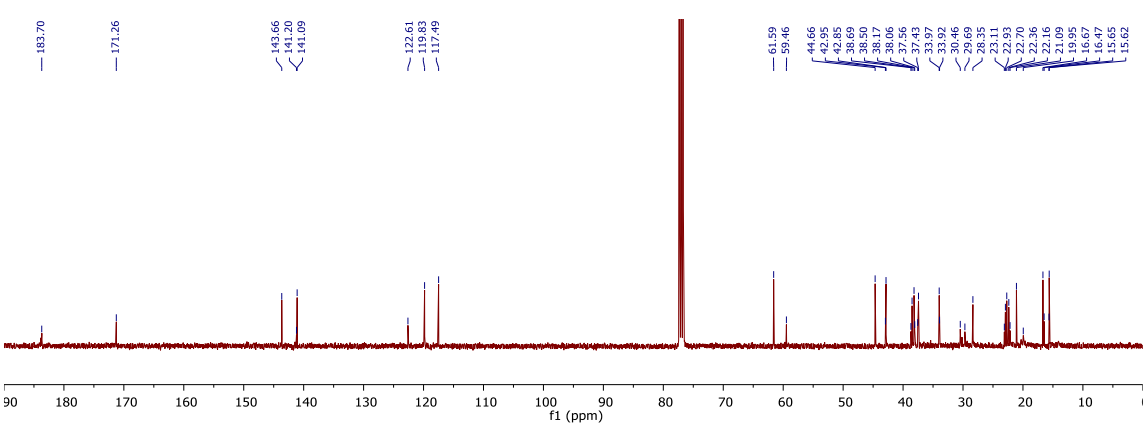
rmn-0299.2.fid

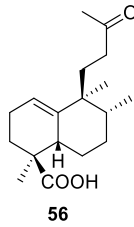
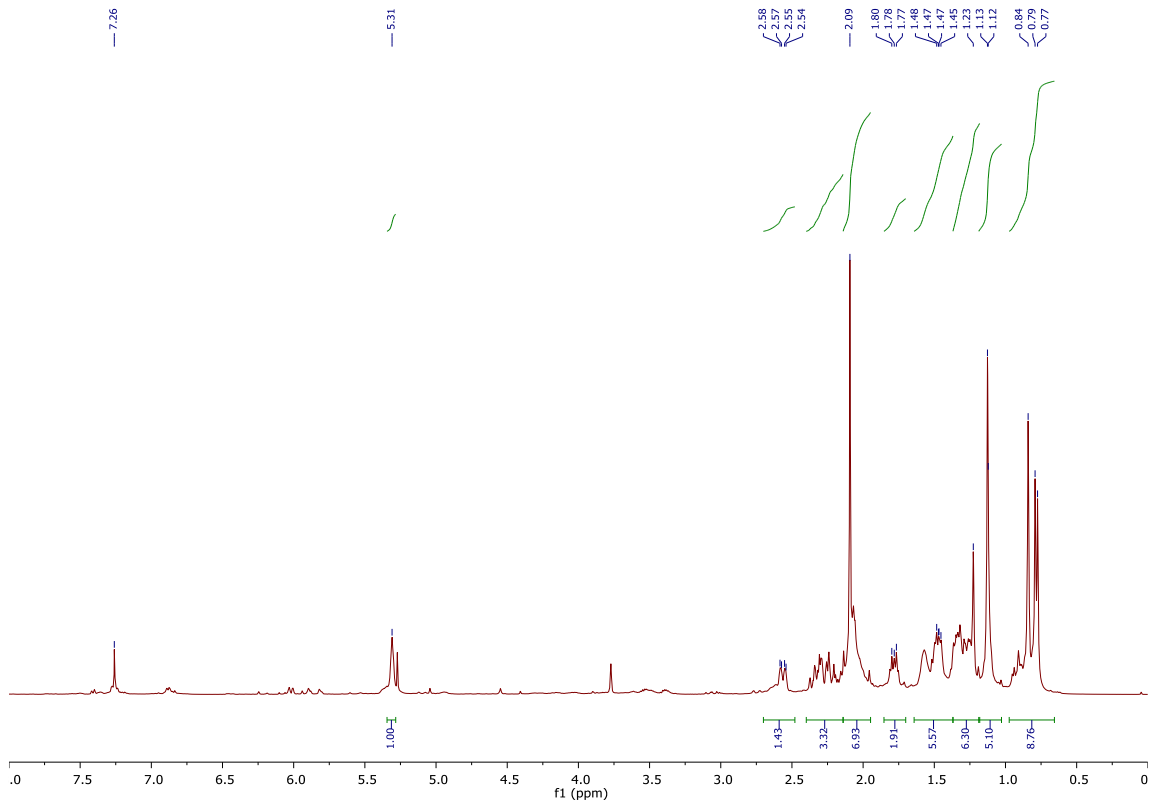


| Espectroscopía



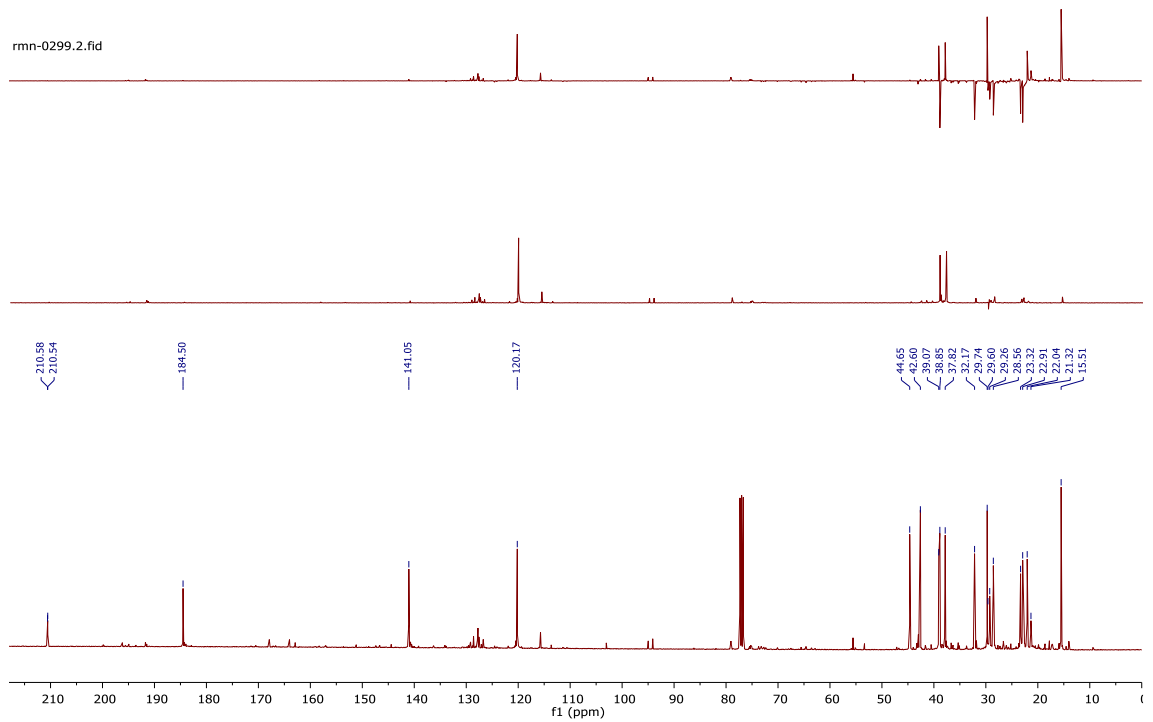
rmn-0300.3.fid





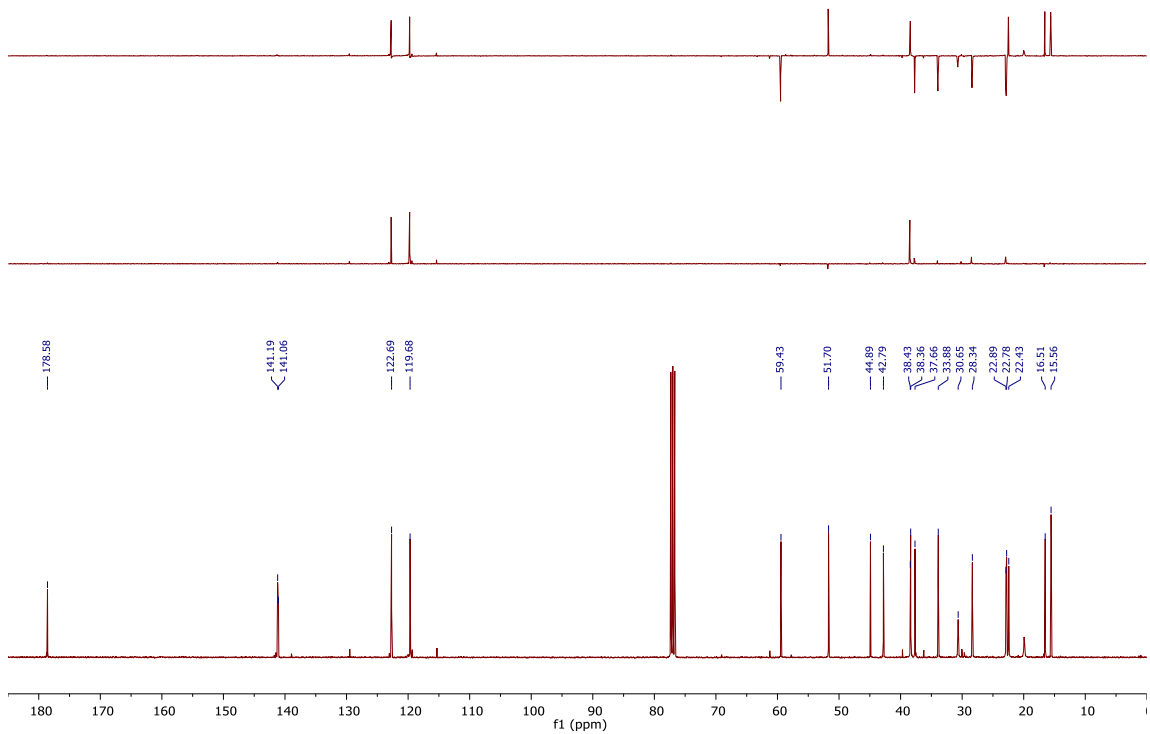
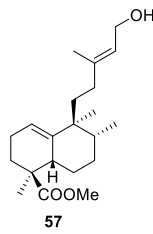
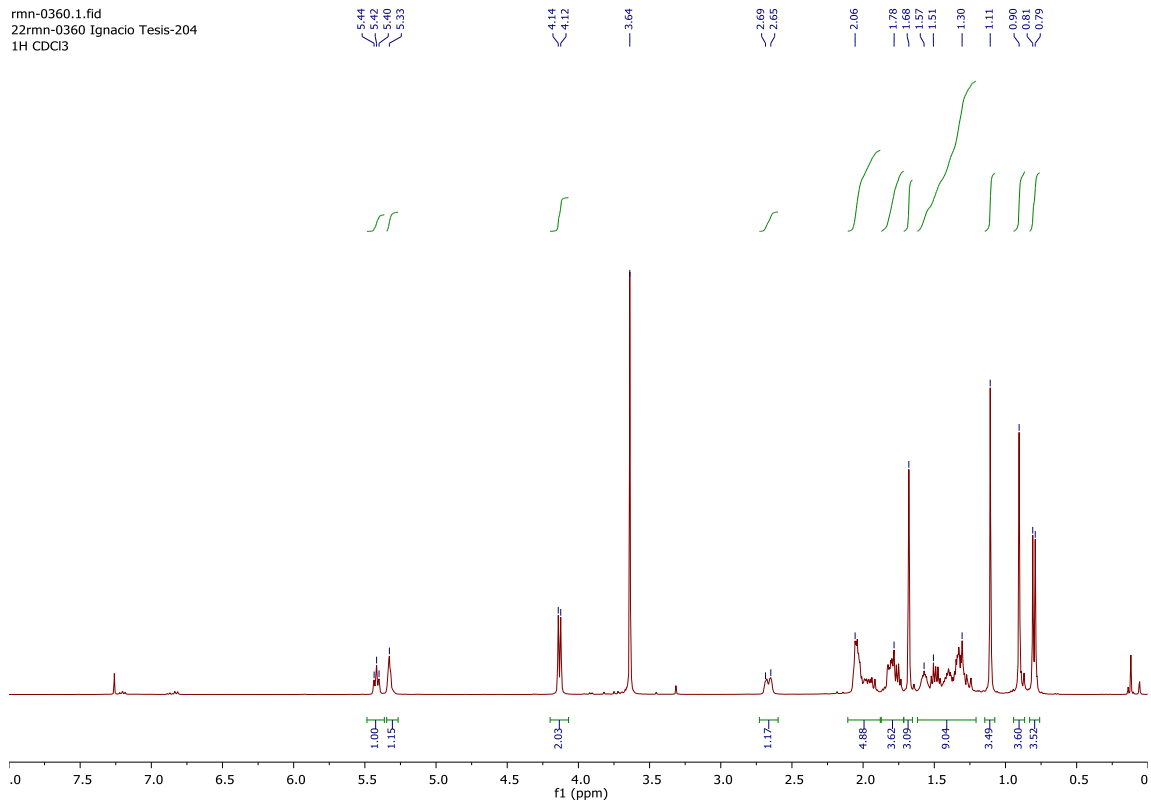
rmn-0299.3.fid

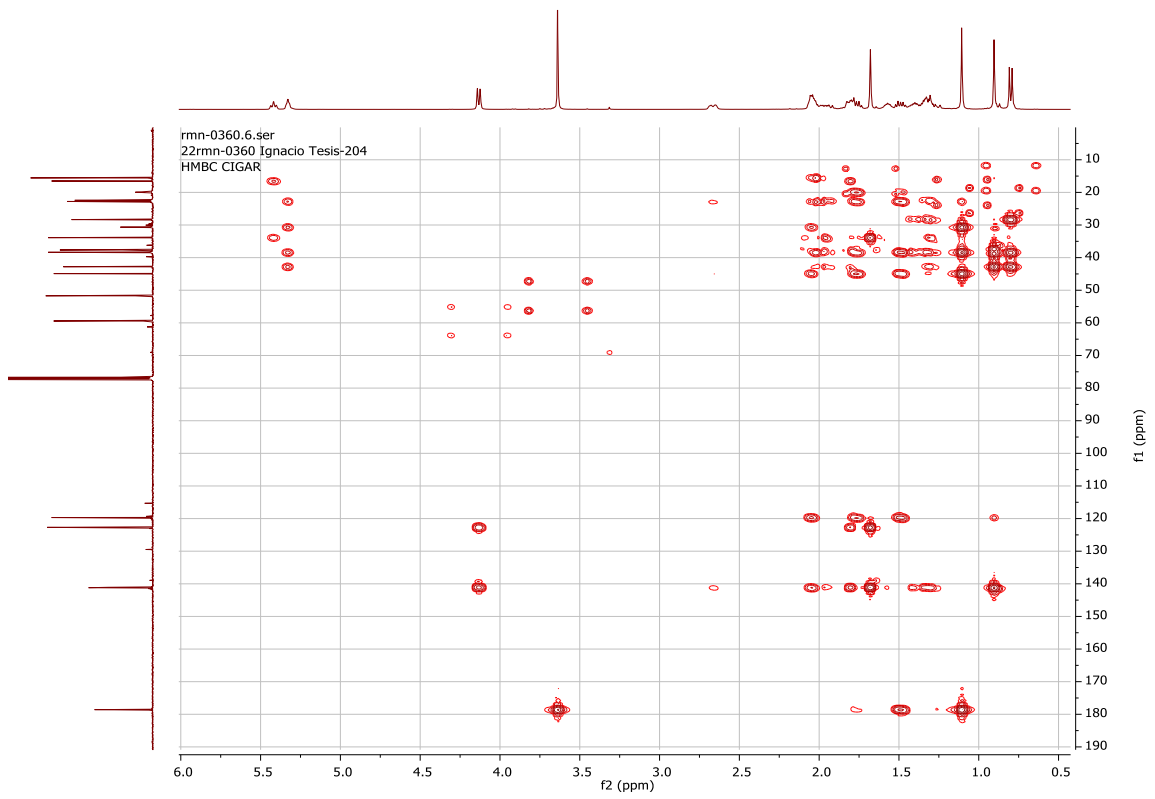
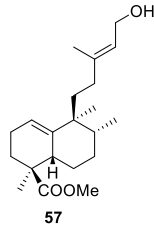
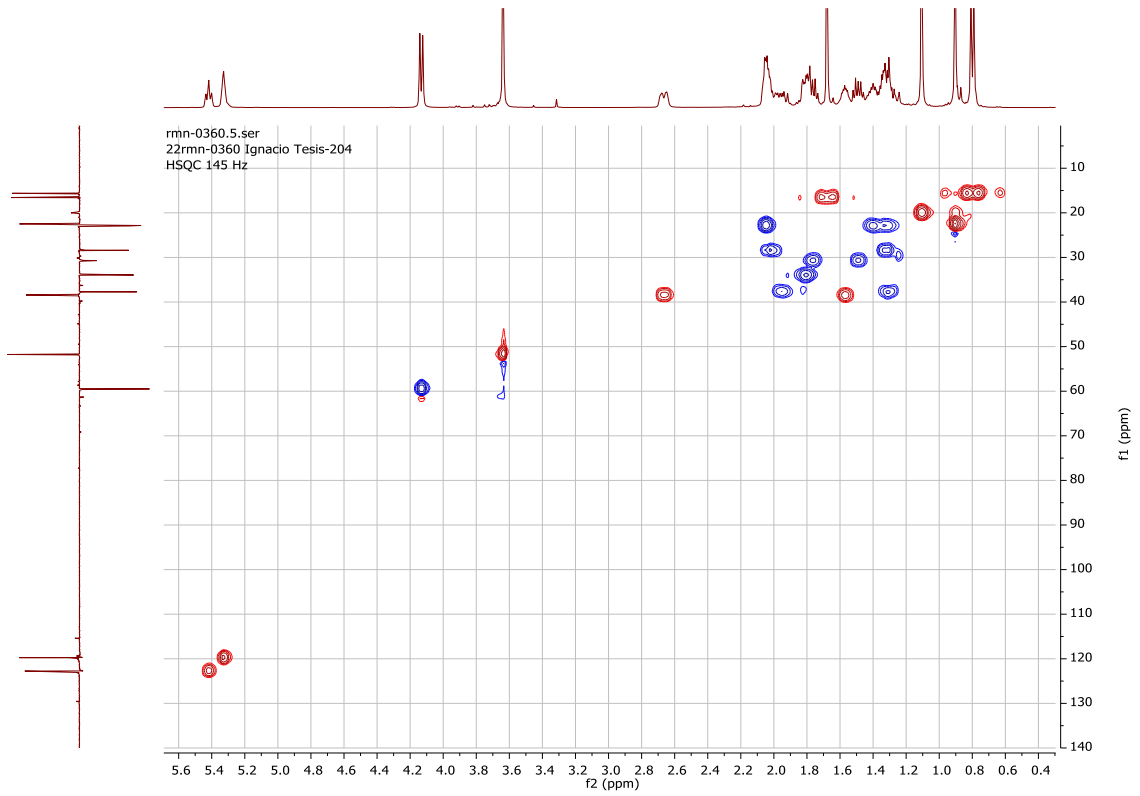
rmn-0299.2.fid

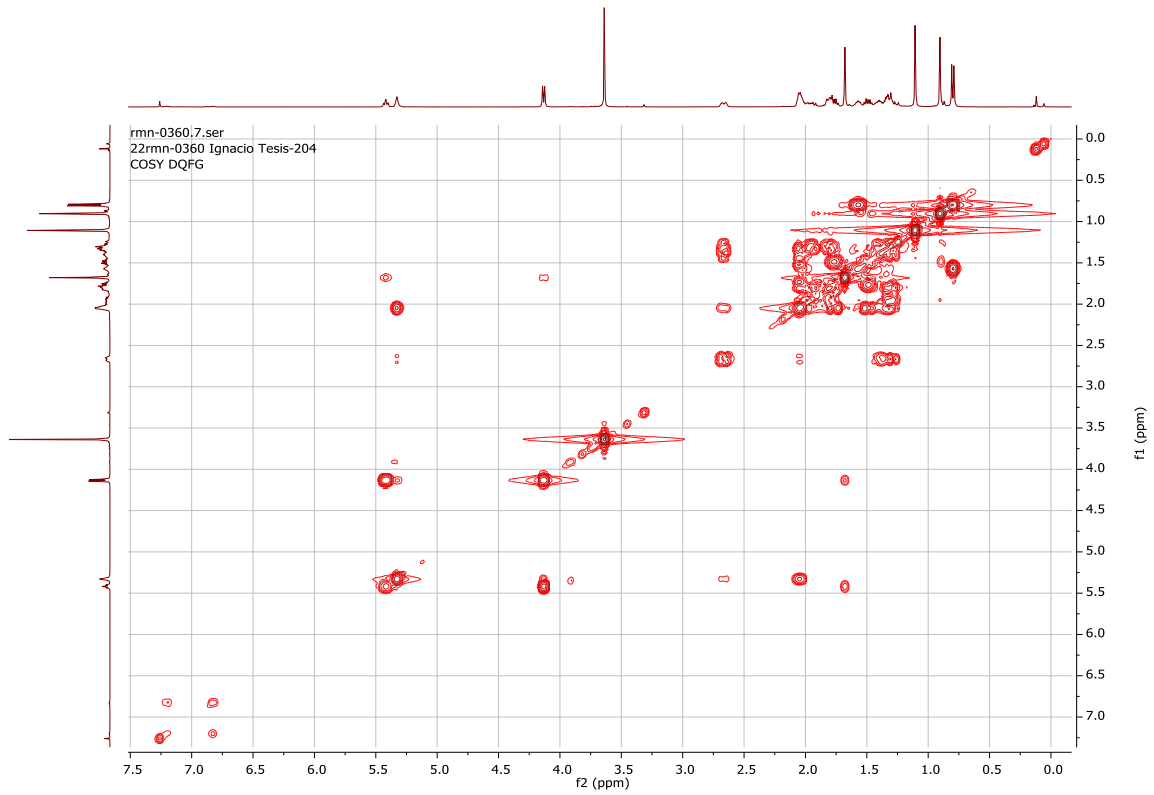
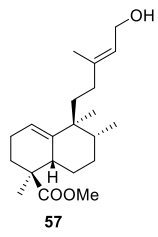


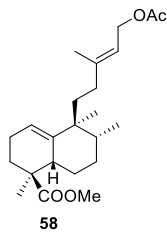
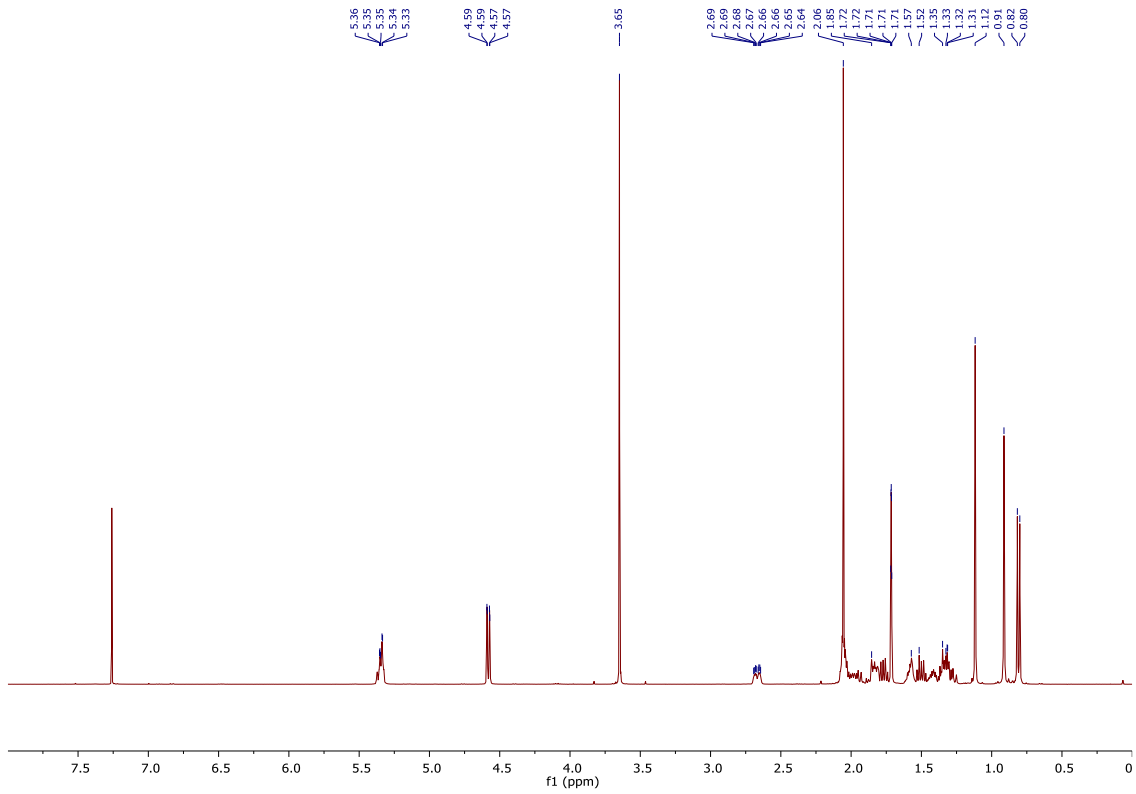
| Espectroscopía

rmn-0360.1.fid
22rmn-0360 Ignacio Tesis-204
1H CDCl3



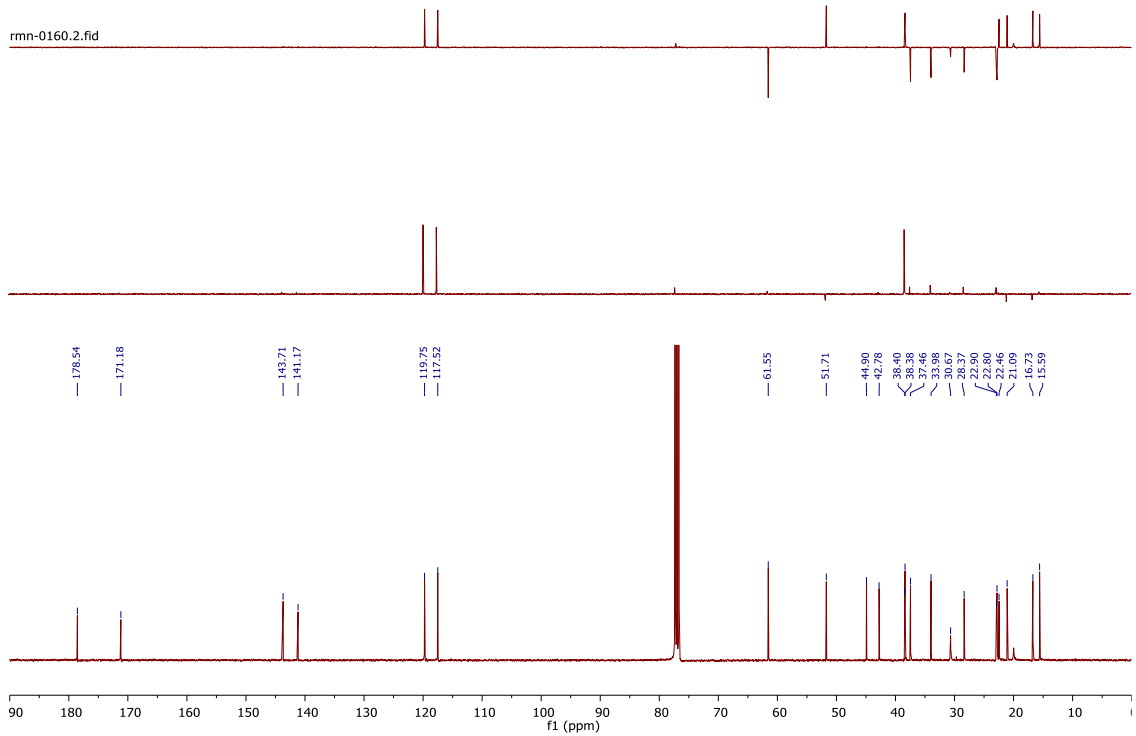


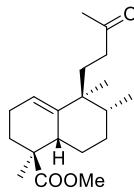
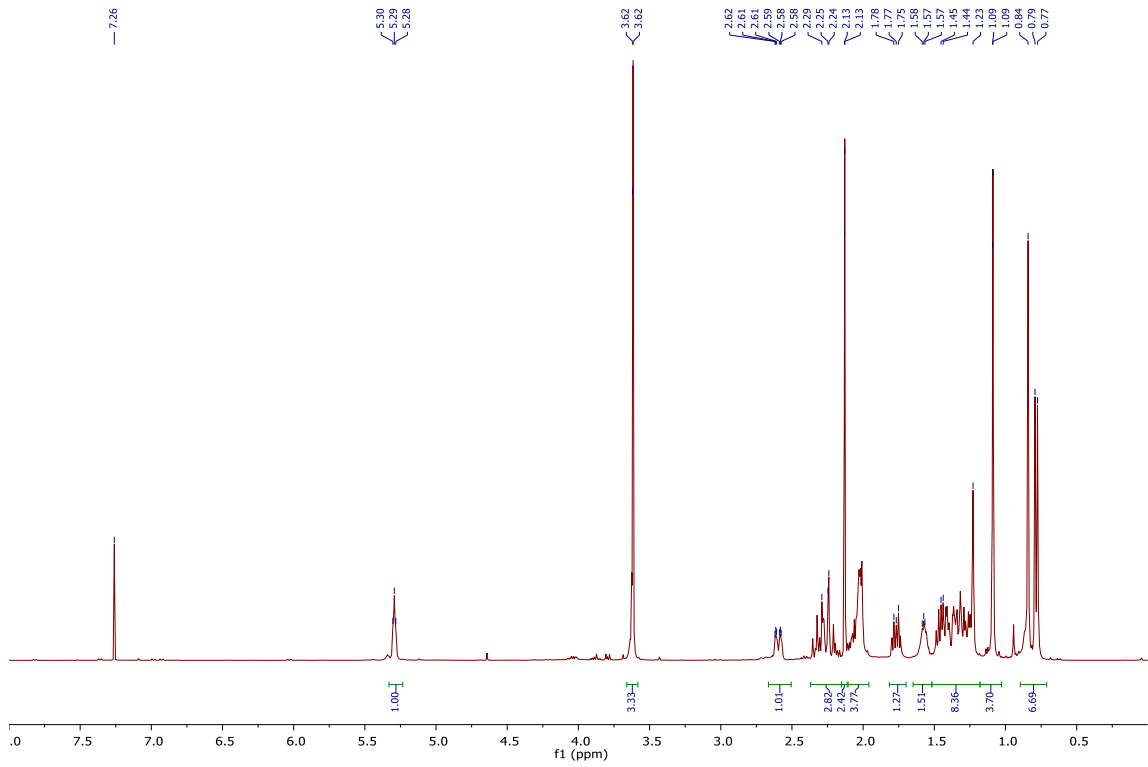




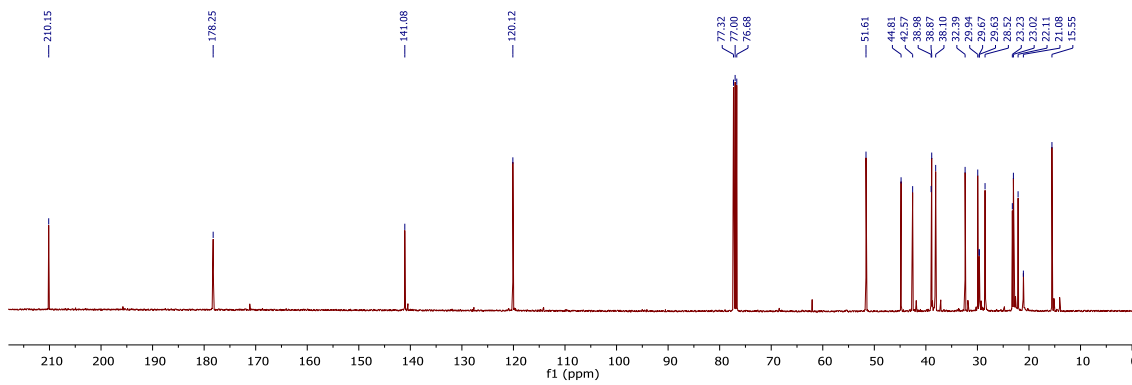
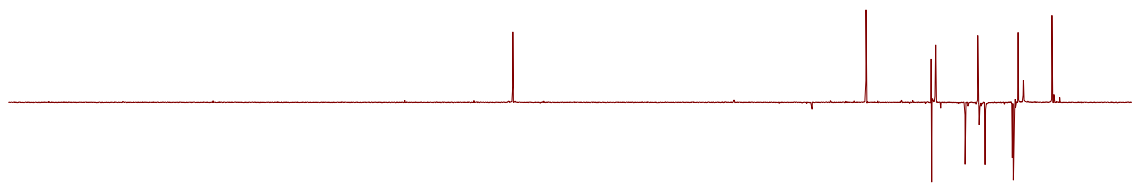
rmn-0160.3.fid

rmn-0160.2.fid

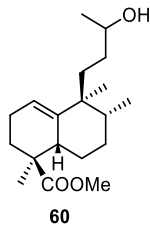
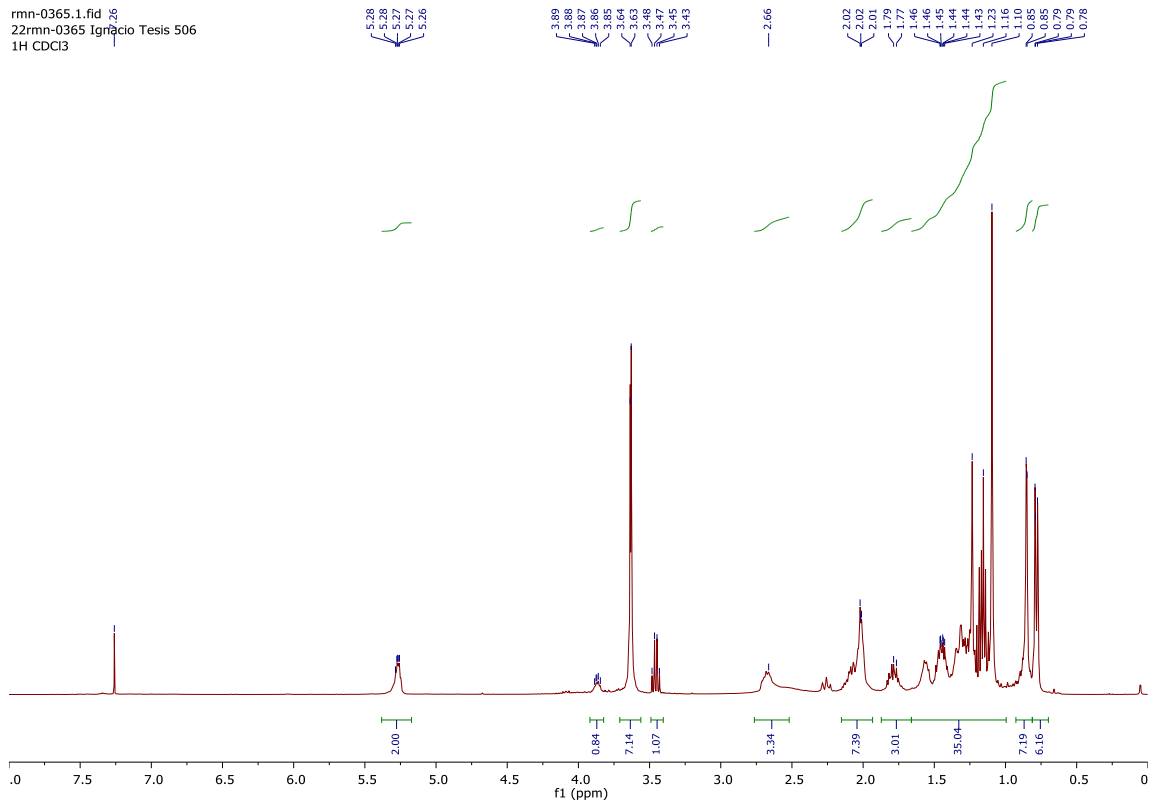




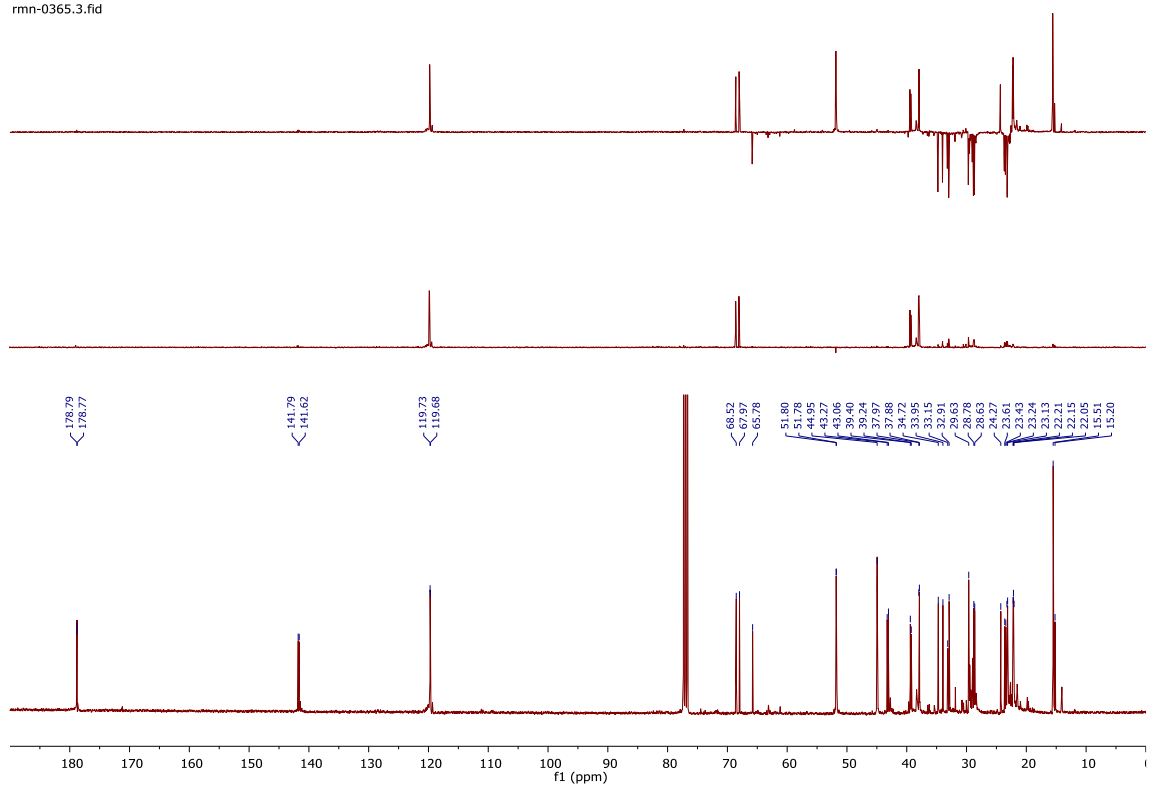
59

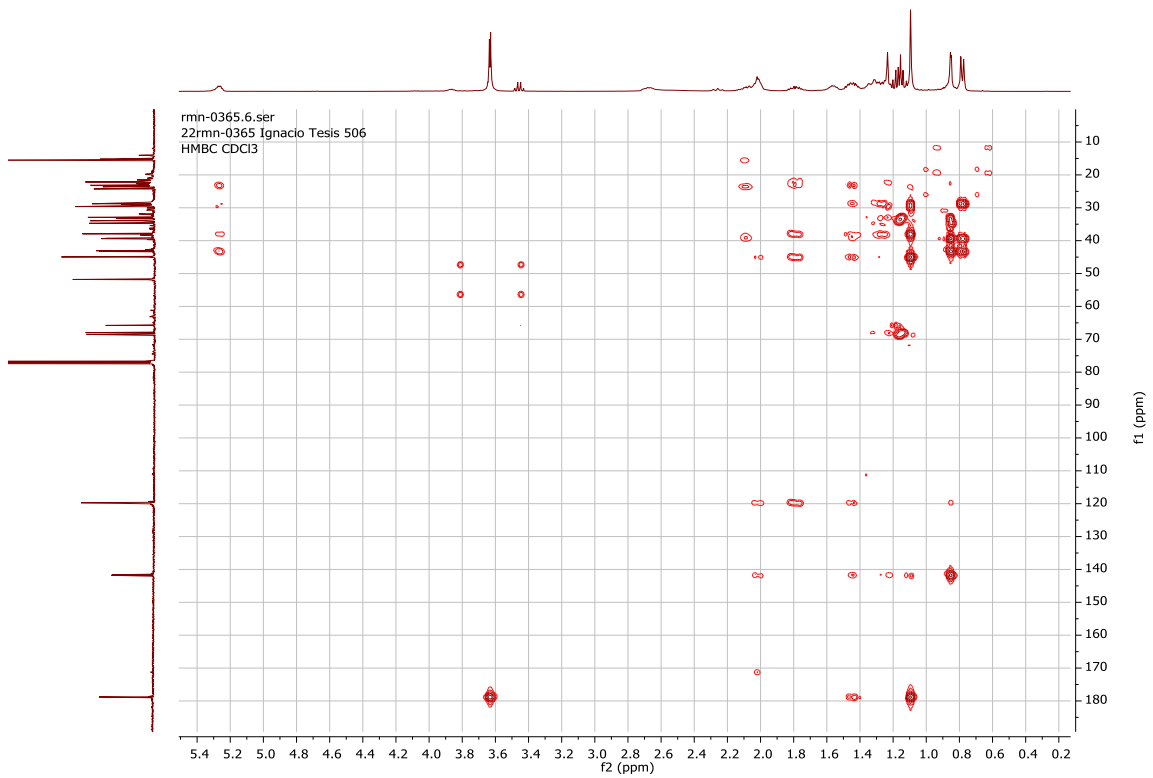
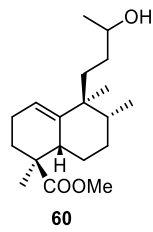
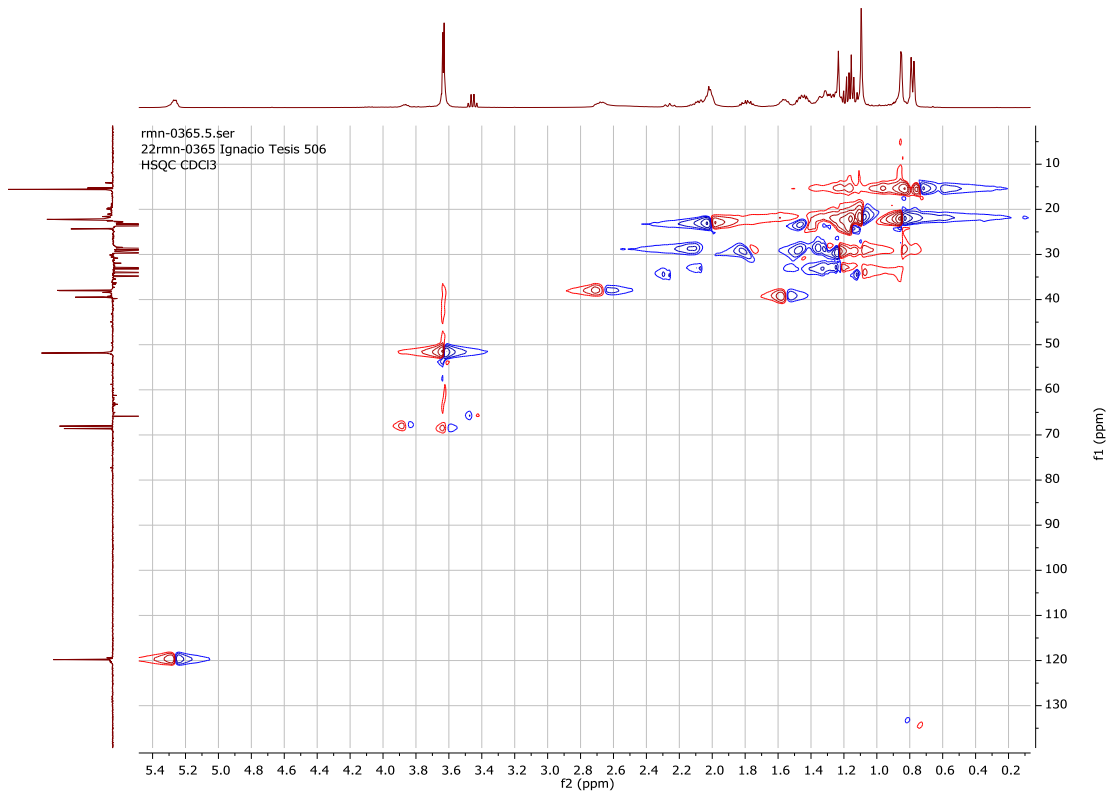


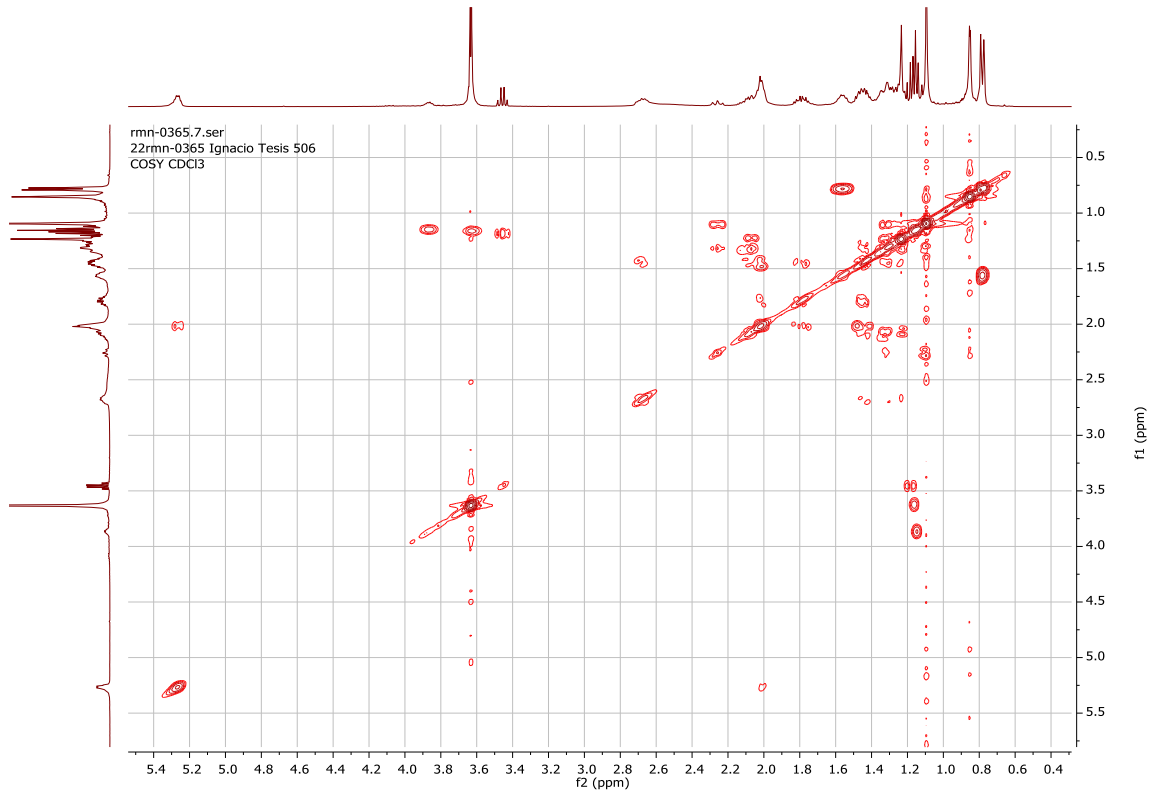
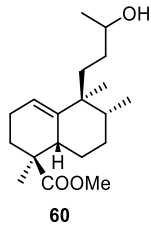
rmn-0365.1.fid
22rmn-0365 Ignacio Tesis 506
1H CDCl3



rmn-0365.3.fid

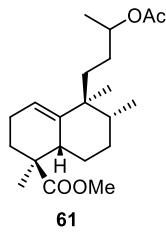
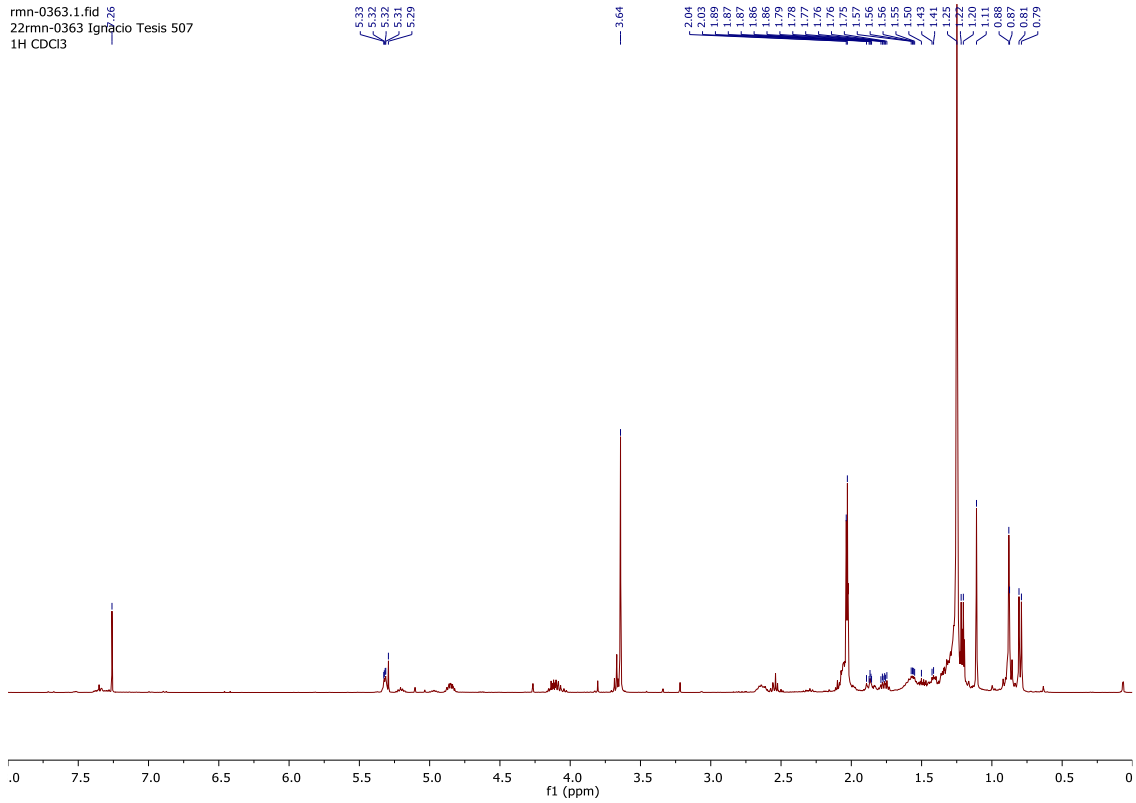




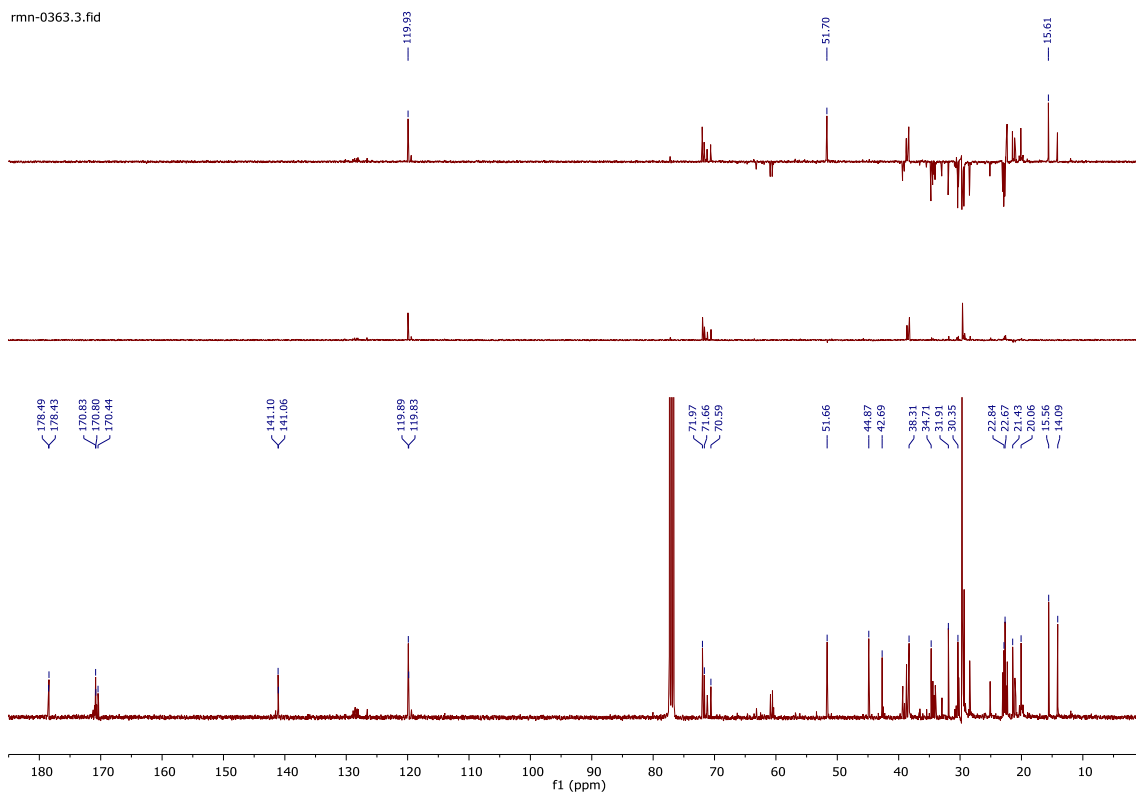


| Espectroscopía

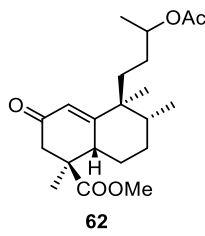
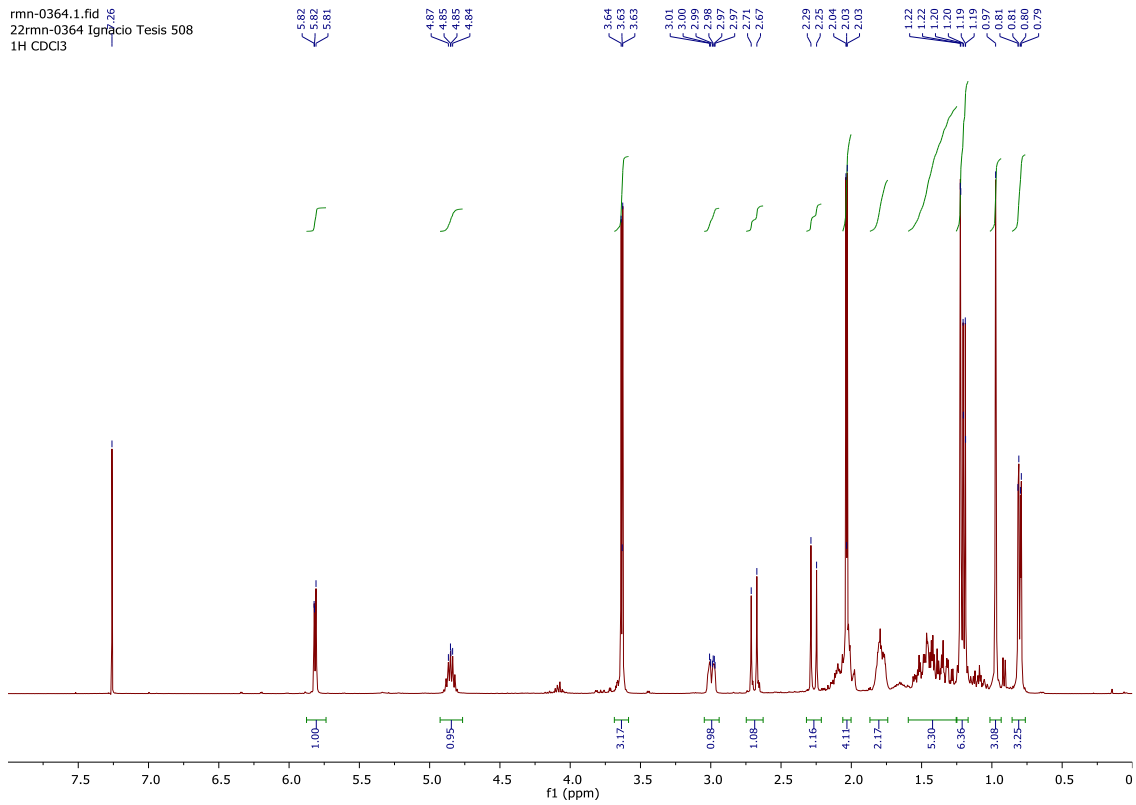
rmn-0363.1.fid
22rmn-0363 Ignacio Tesis 507
1H CDCl3



rmn-0363.3.fid

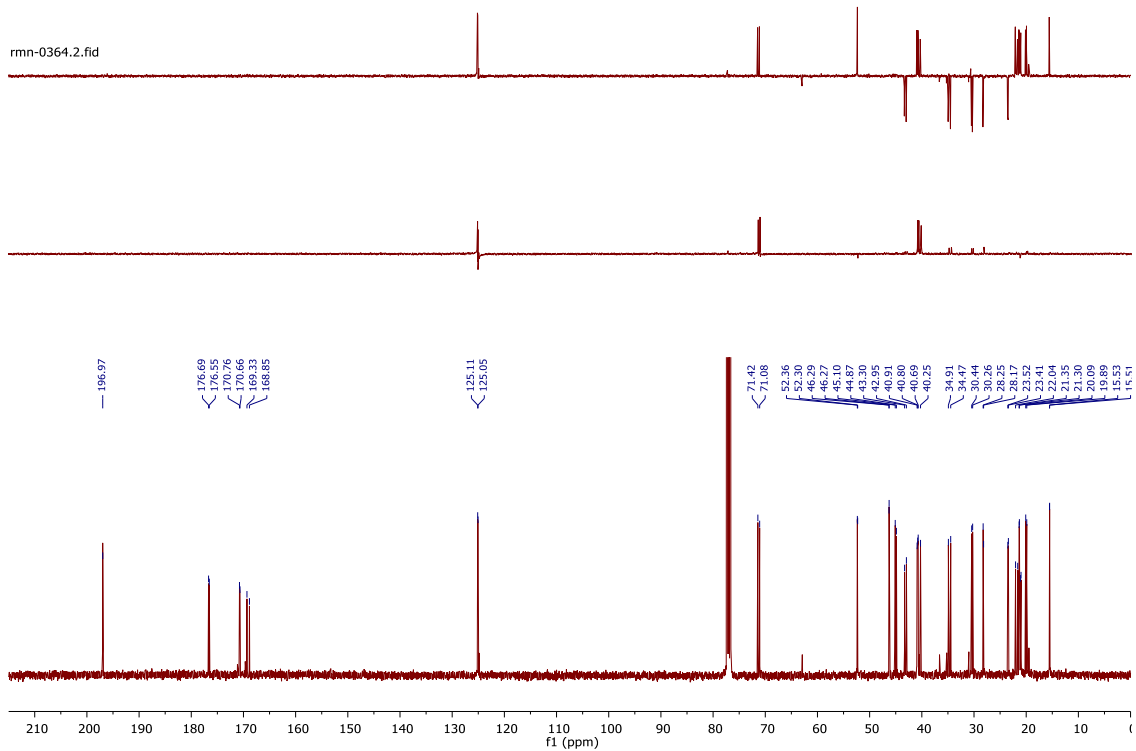


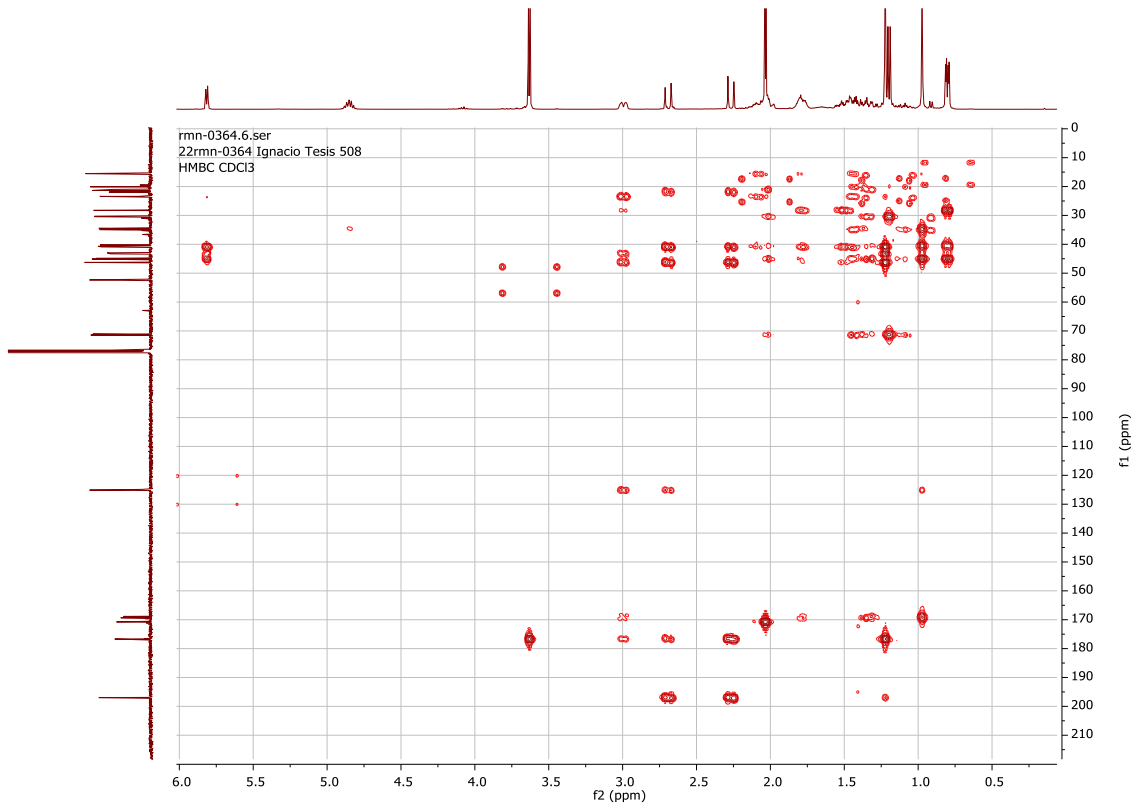
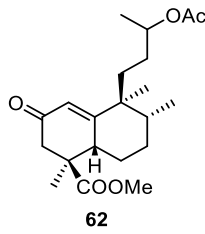
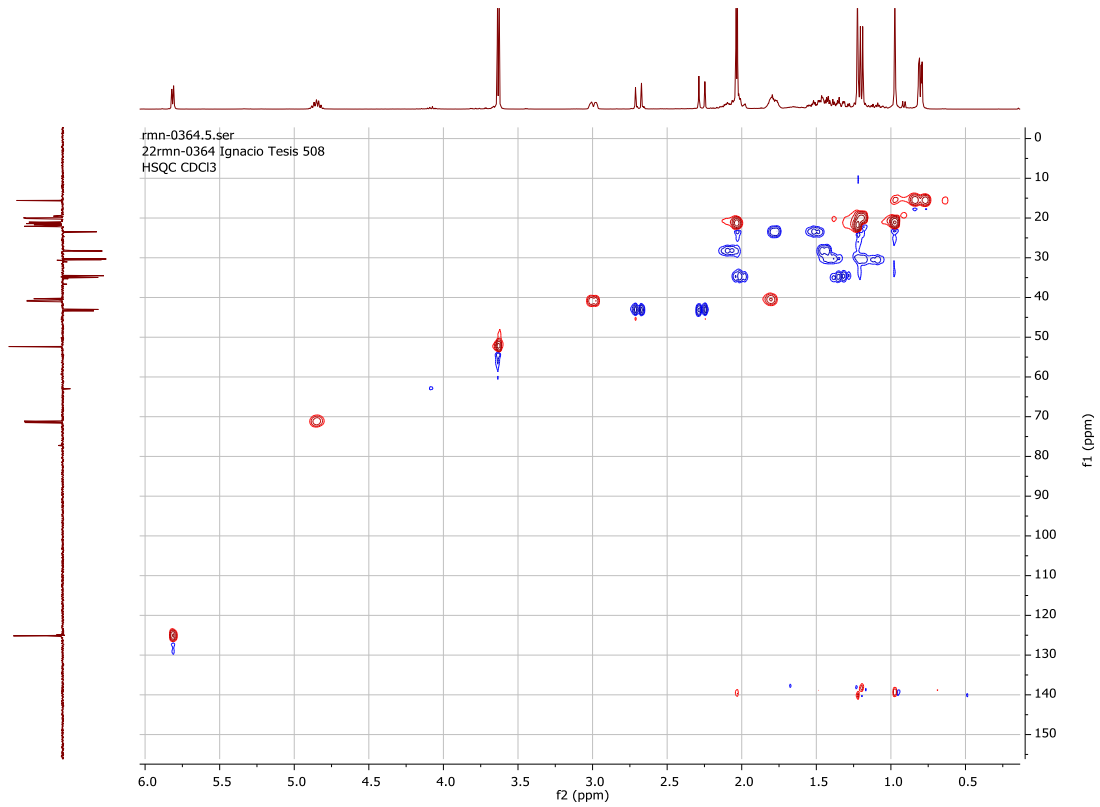
rmn-0364.1.fid
22rmn-0364 Ignacio Tesis 508
1H CDCl3

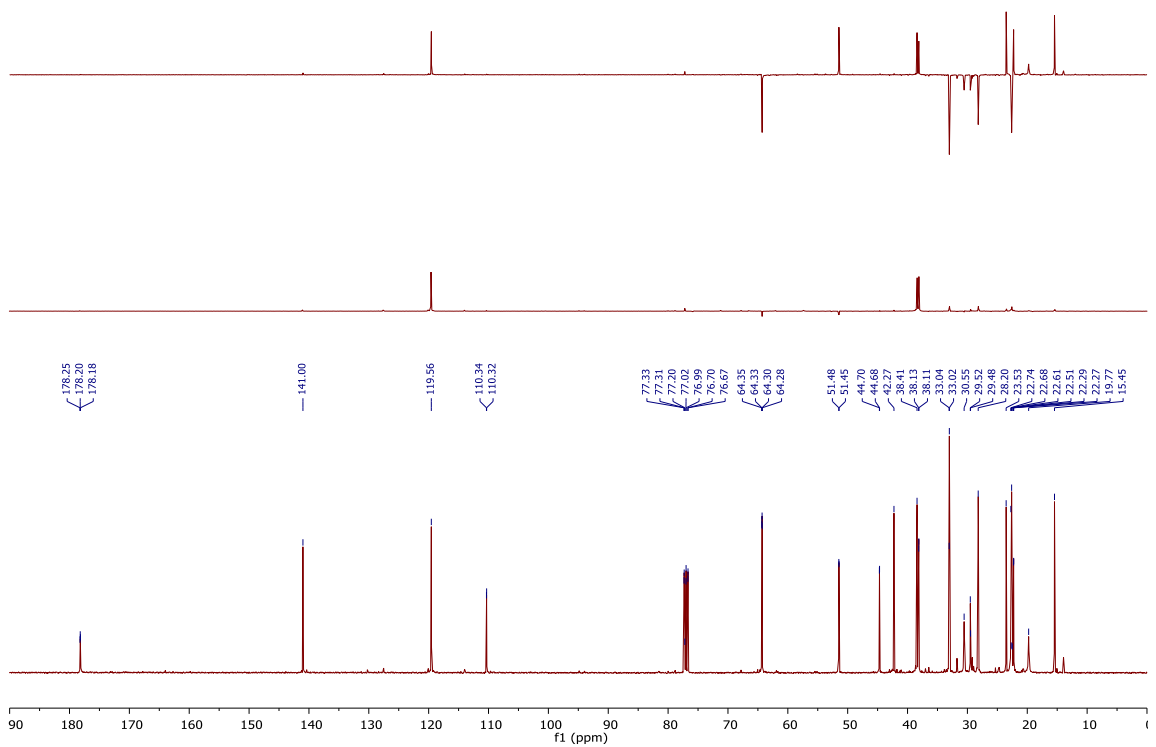
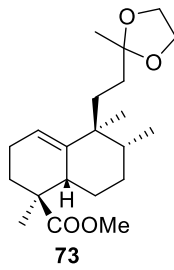
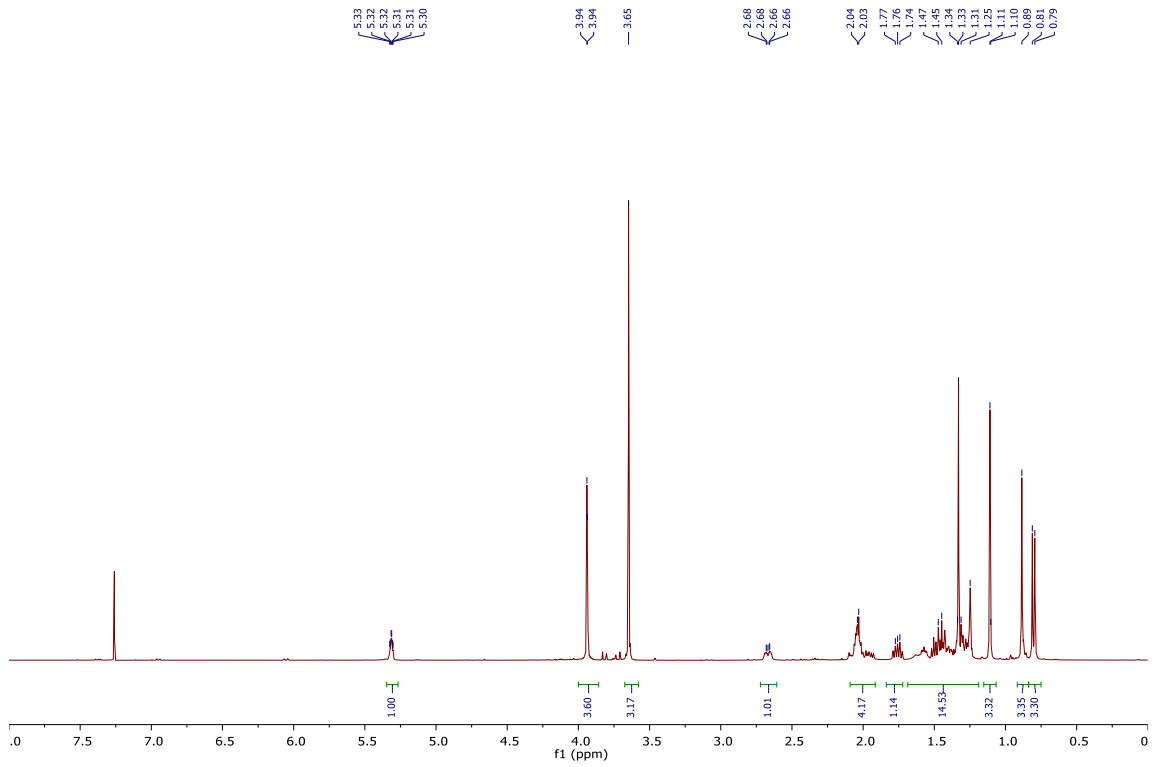


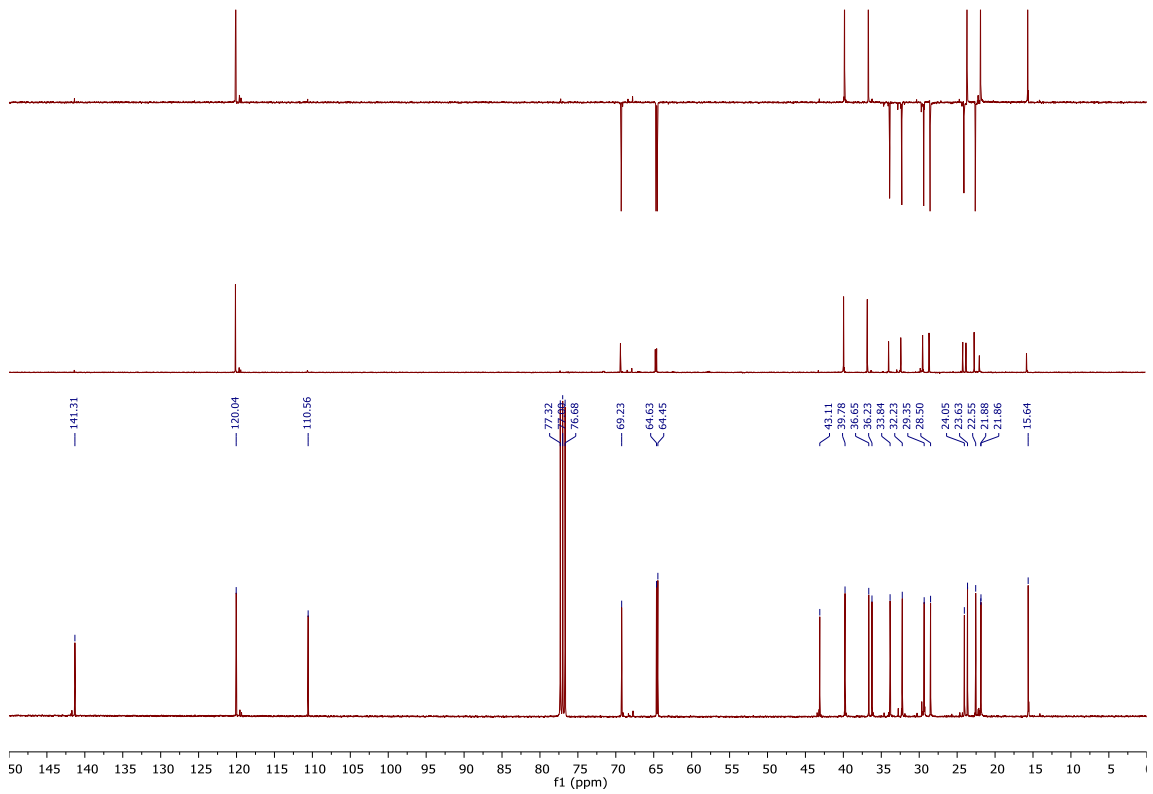
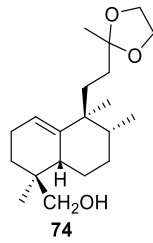
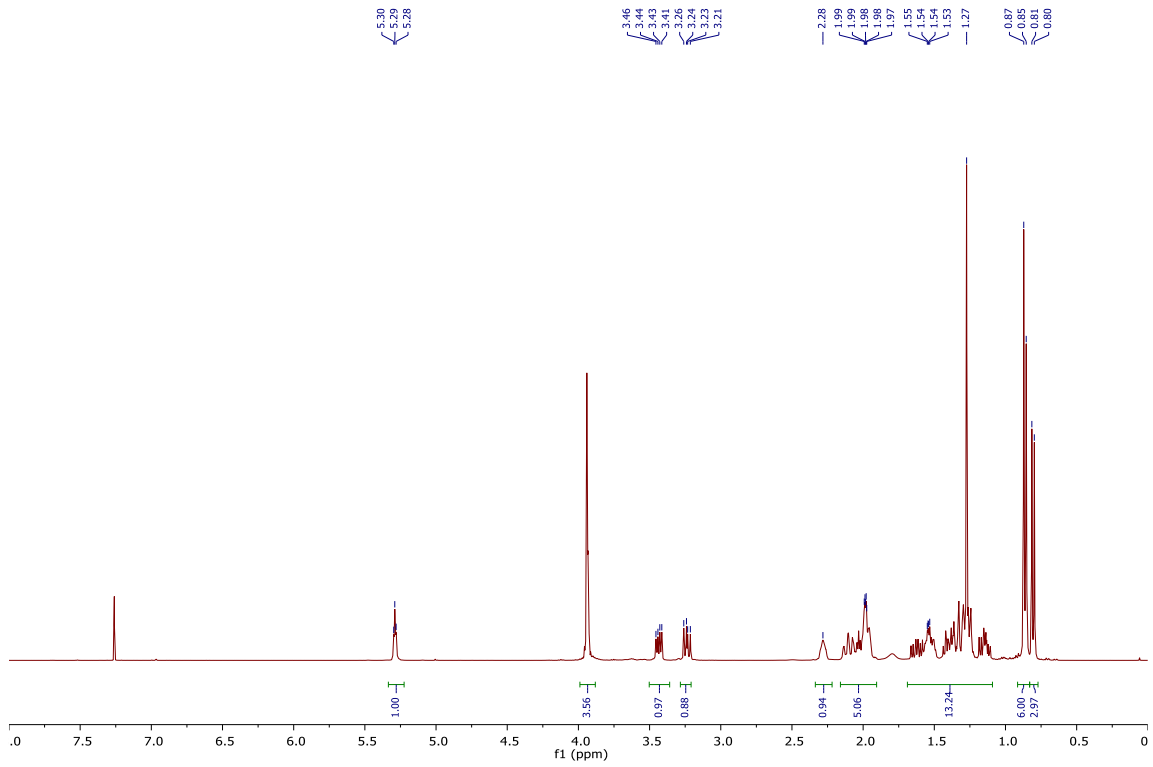
rmn-0364.3.fid

rmn-0364.2.fid

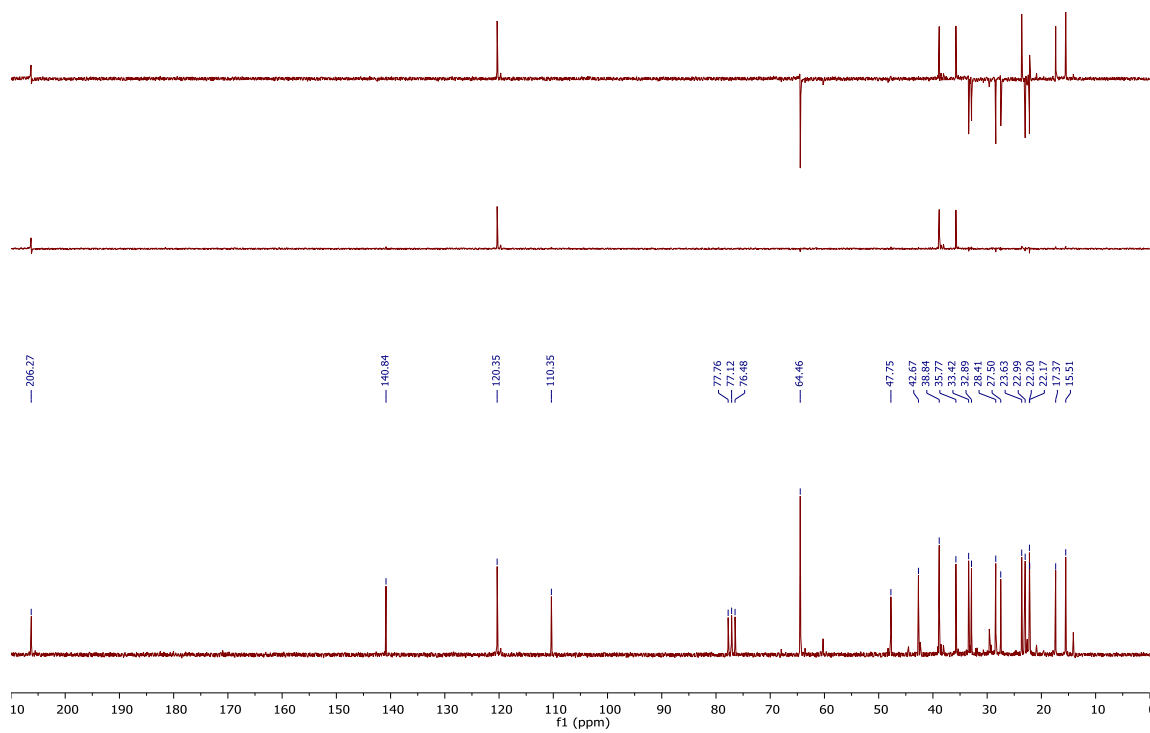
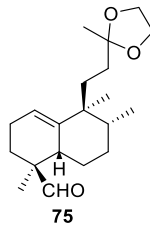
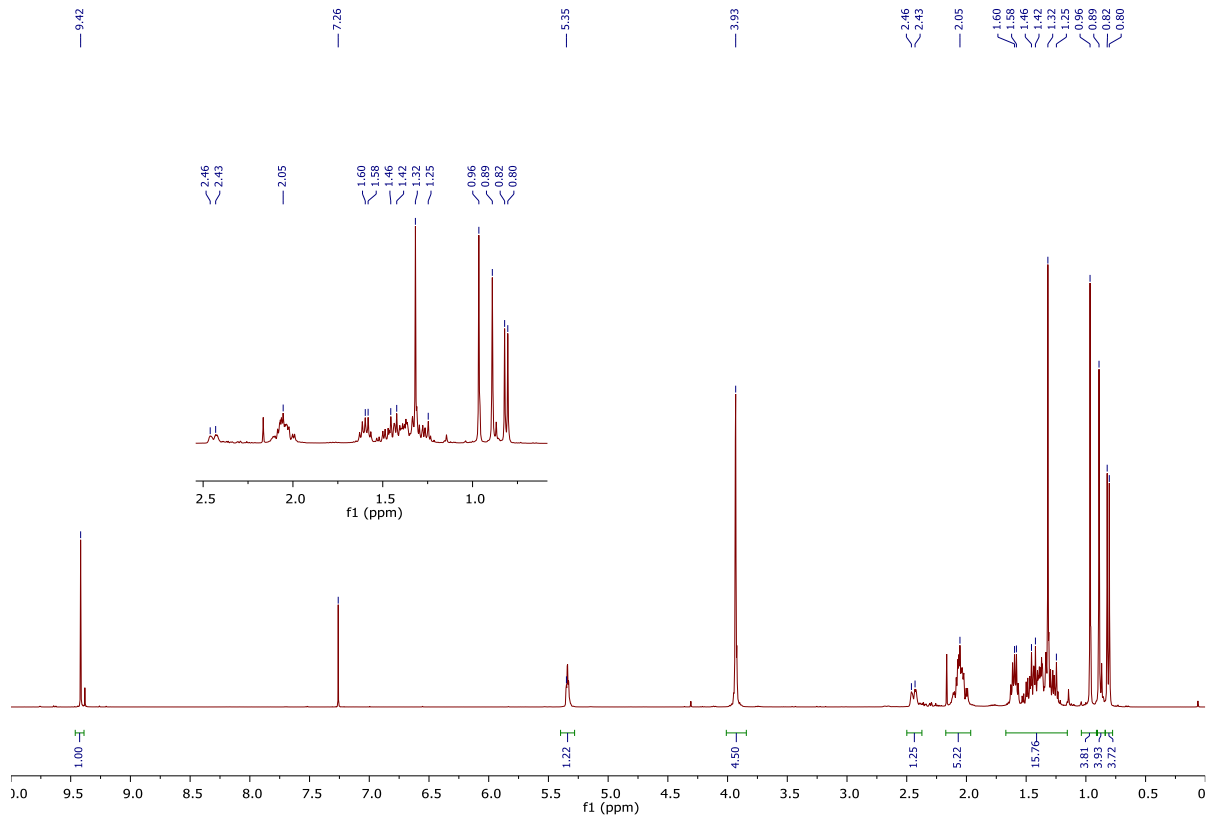




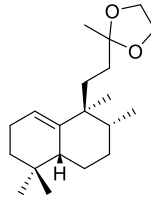
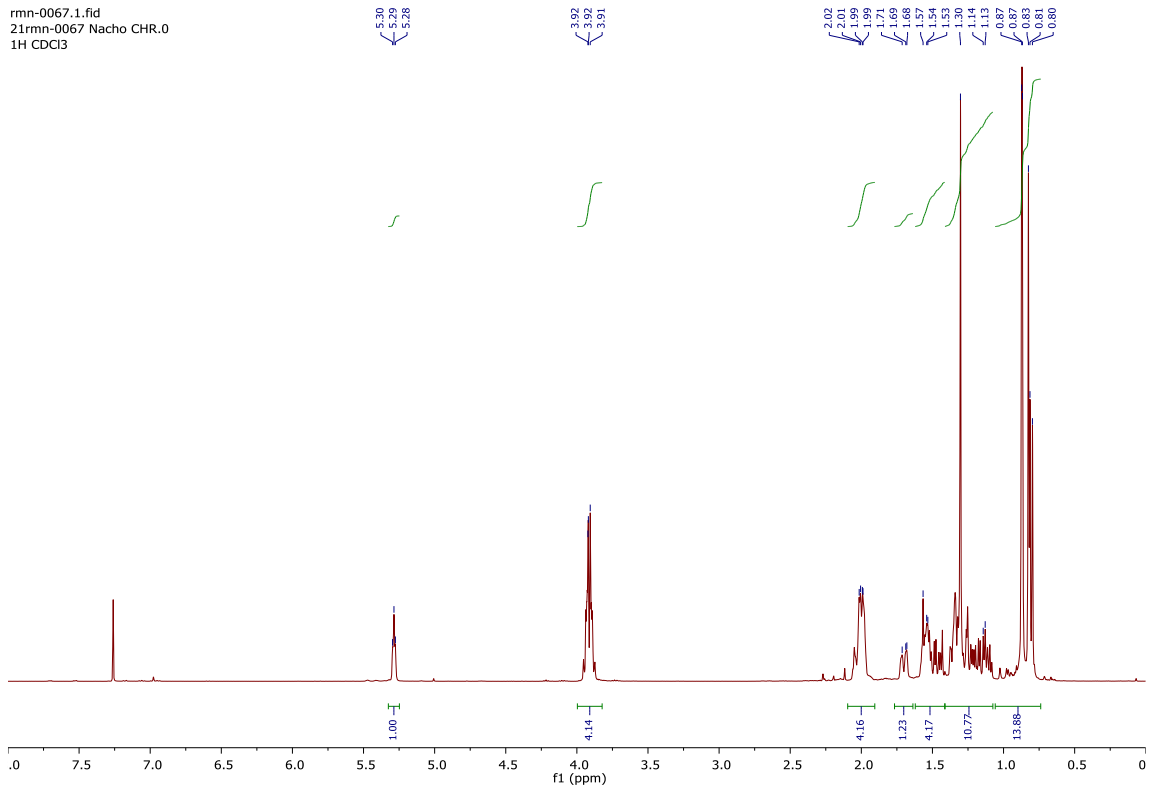




| Espectroscopía

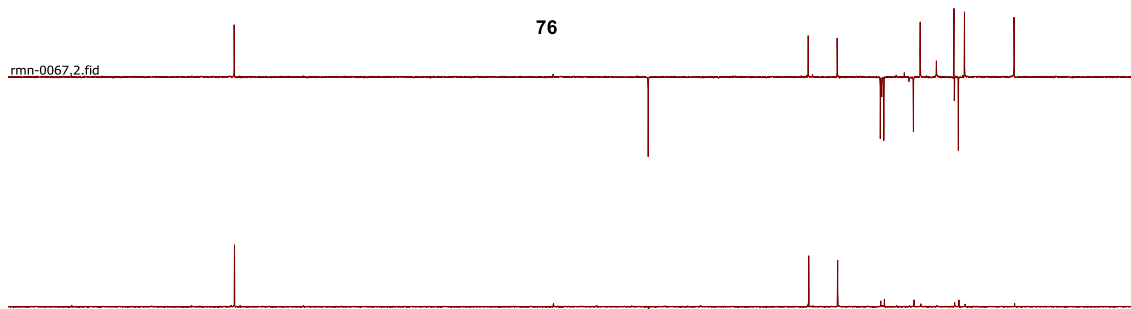


rmn-0067.1.fid
21rmn-0067 Nacho CHR.0
1H CDCl3

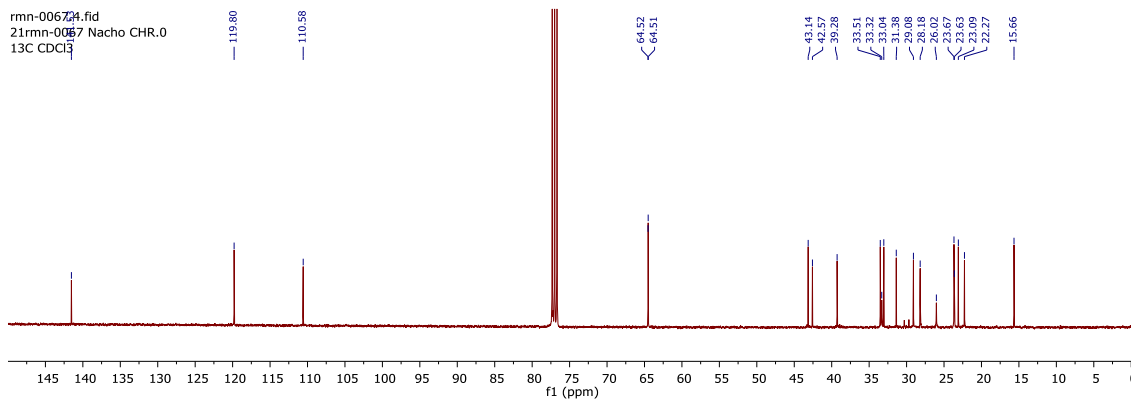


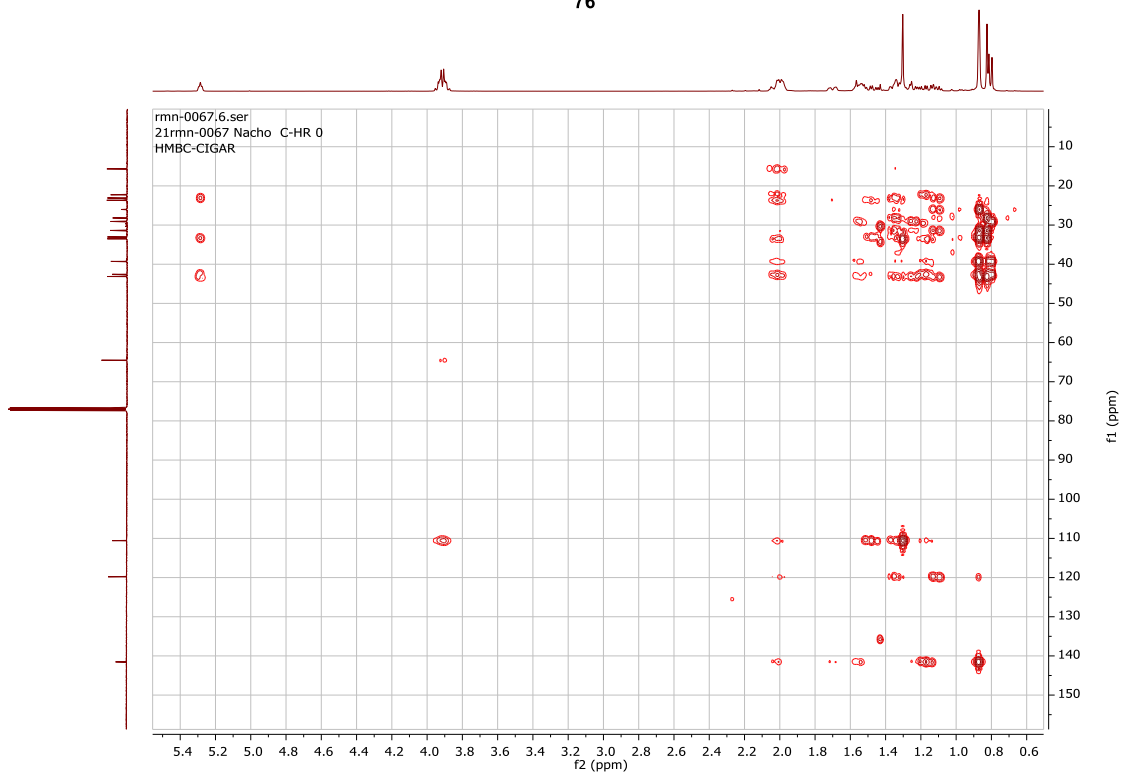
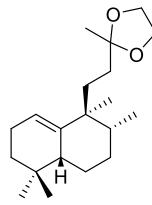
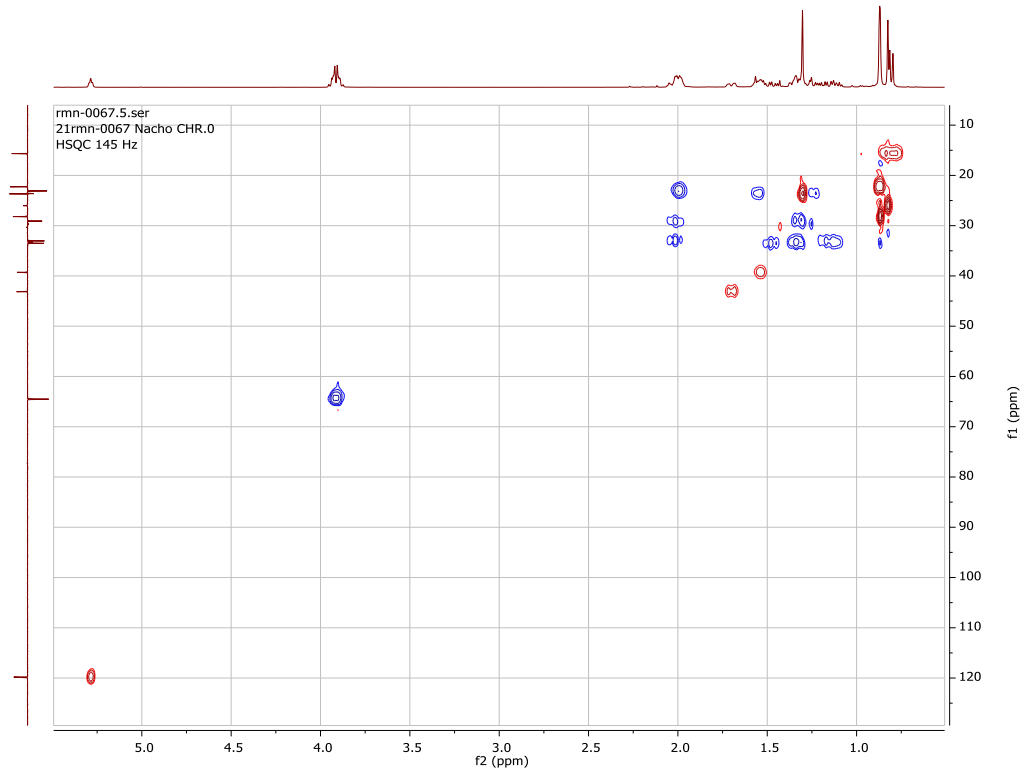
rmn-0067.3.fid

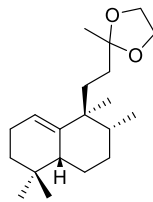
rmn-0067.2.fid



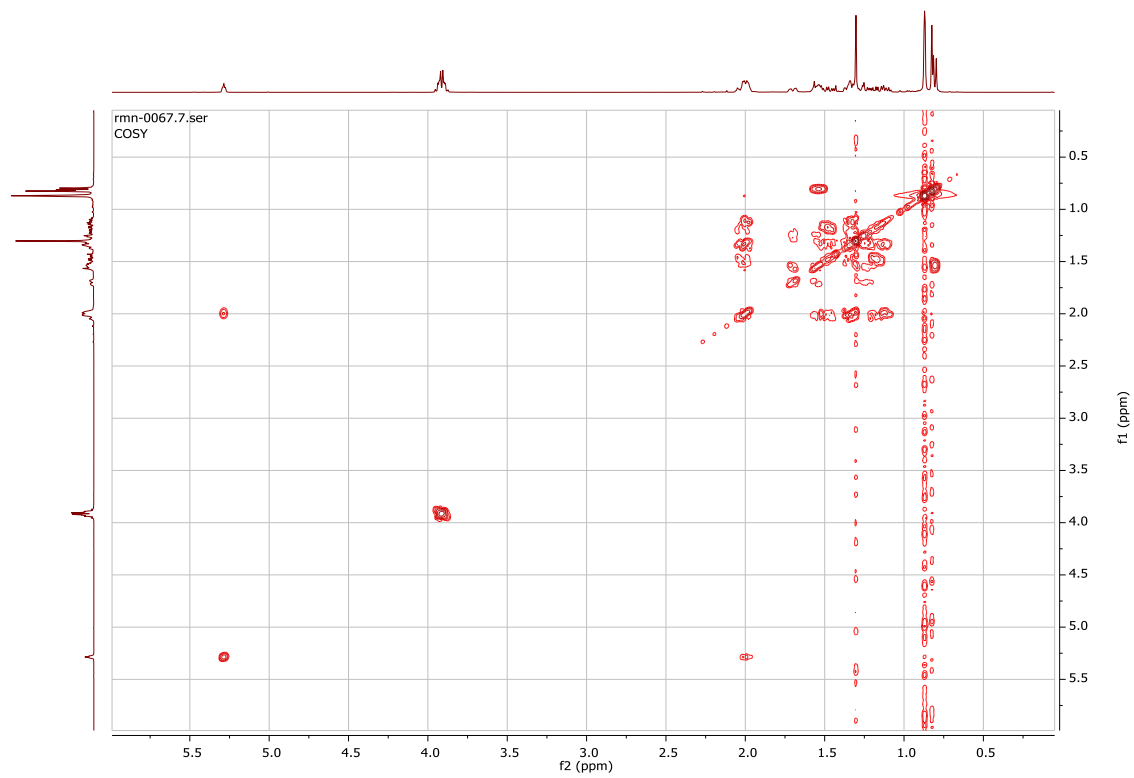
rmn-0067.4.fid
21rmn-0067 Nacho CHR.0
13C CDCl3





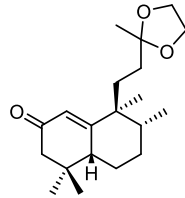
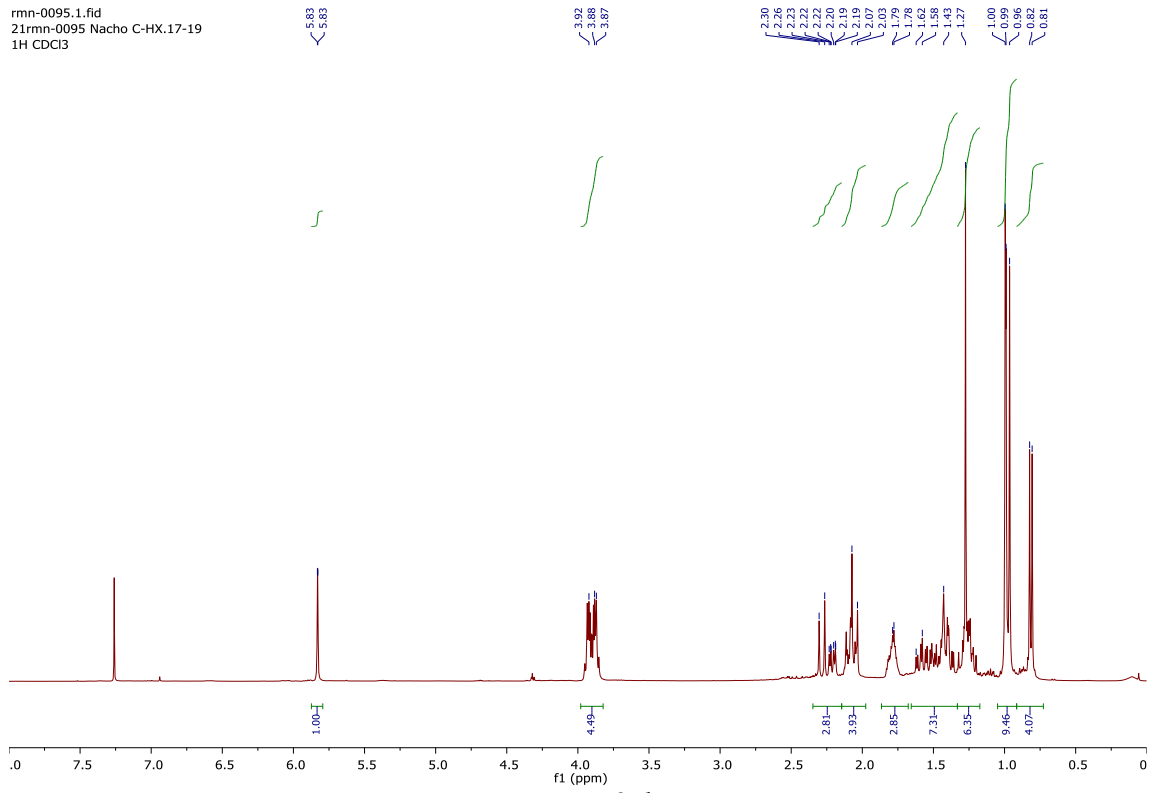


76



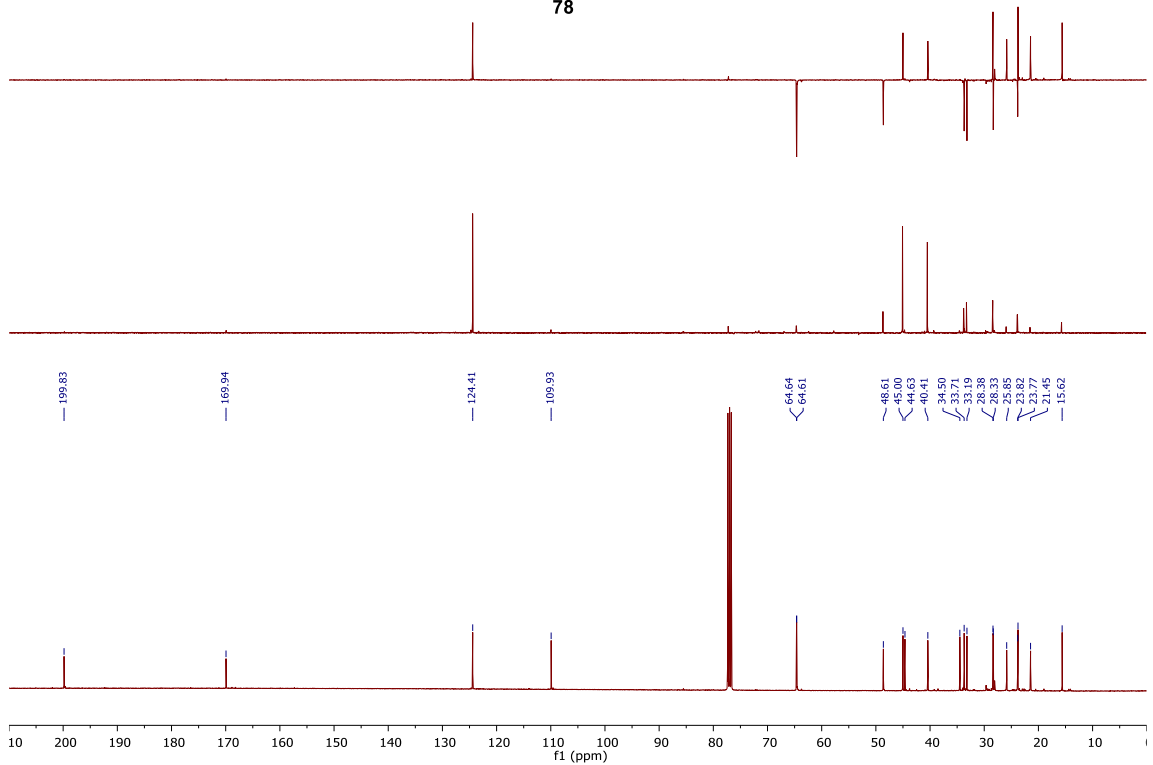
| Espectroscopía

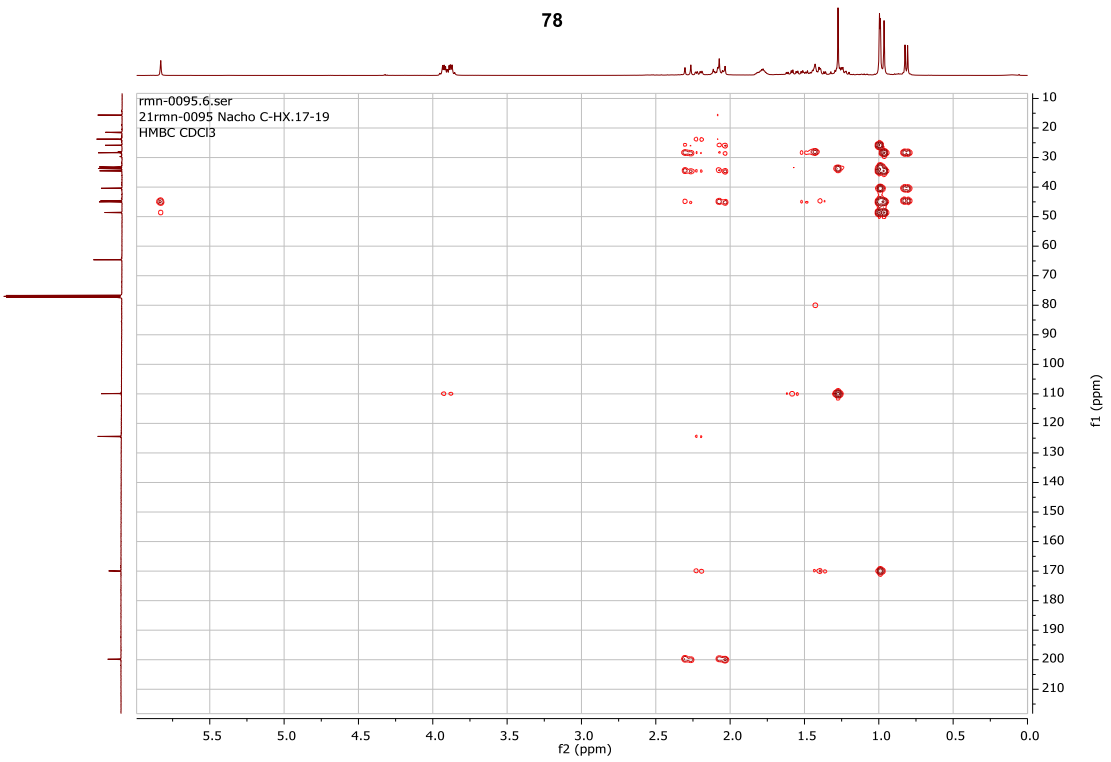
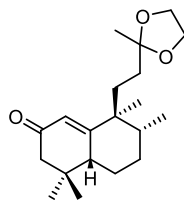
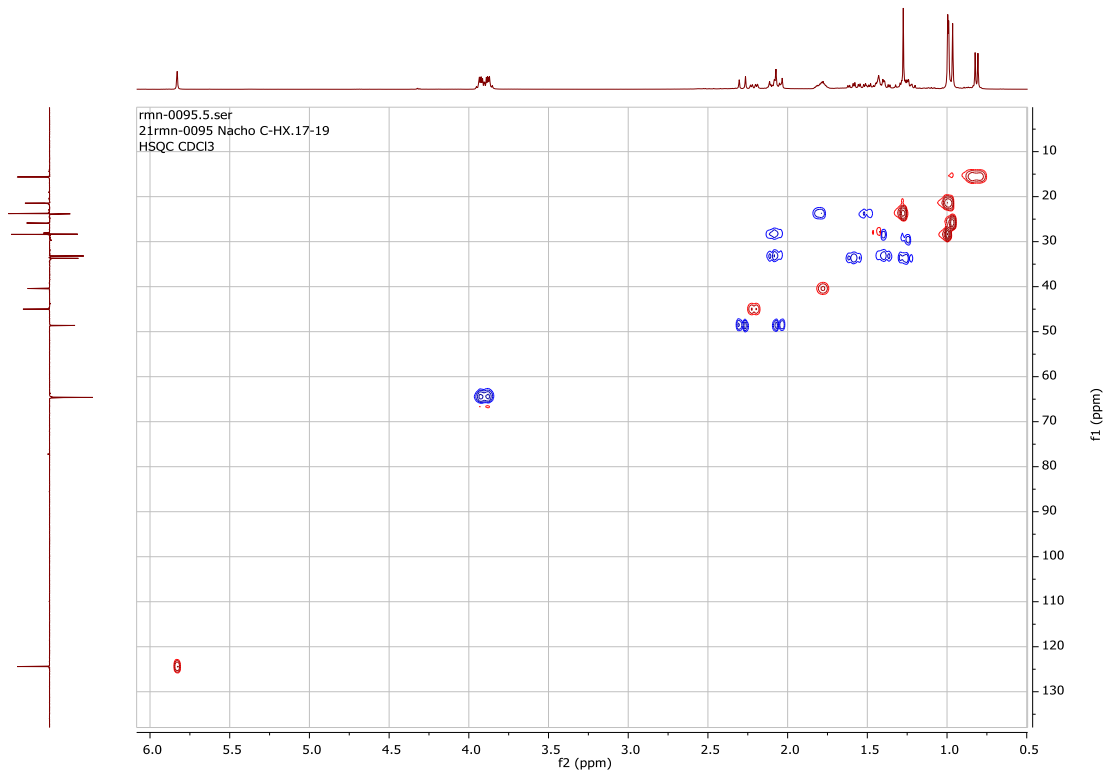
rmn-0095.1.fid
21rmn-0095 Nacho C-HX.17-19
1H CDCl3

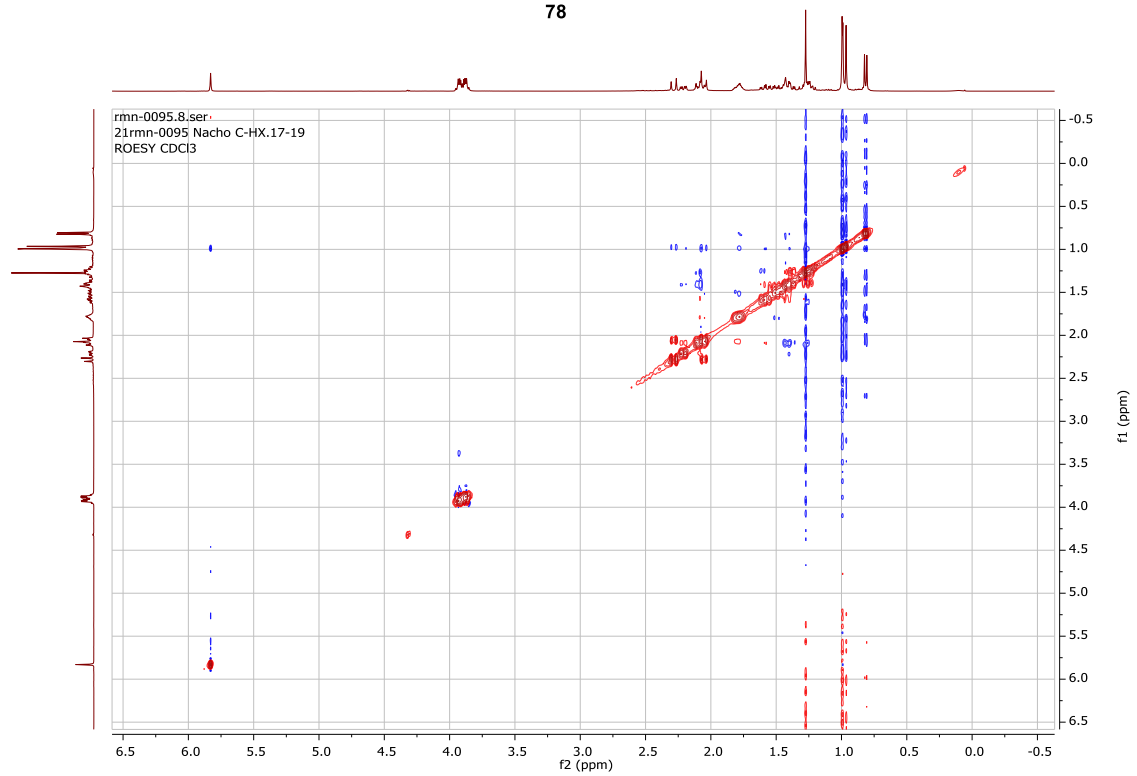
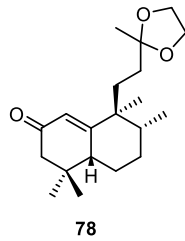
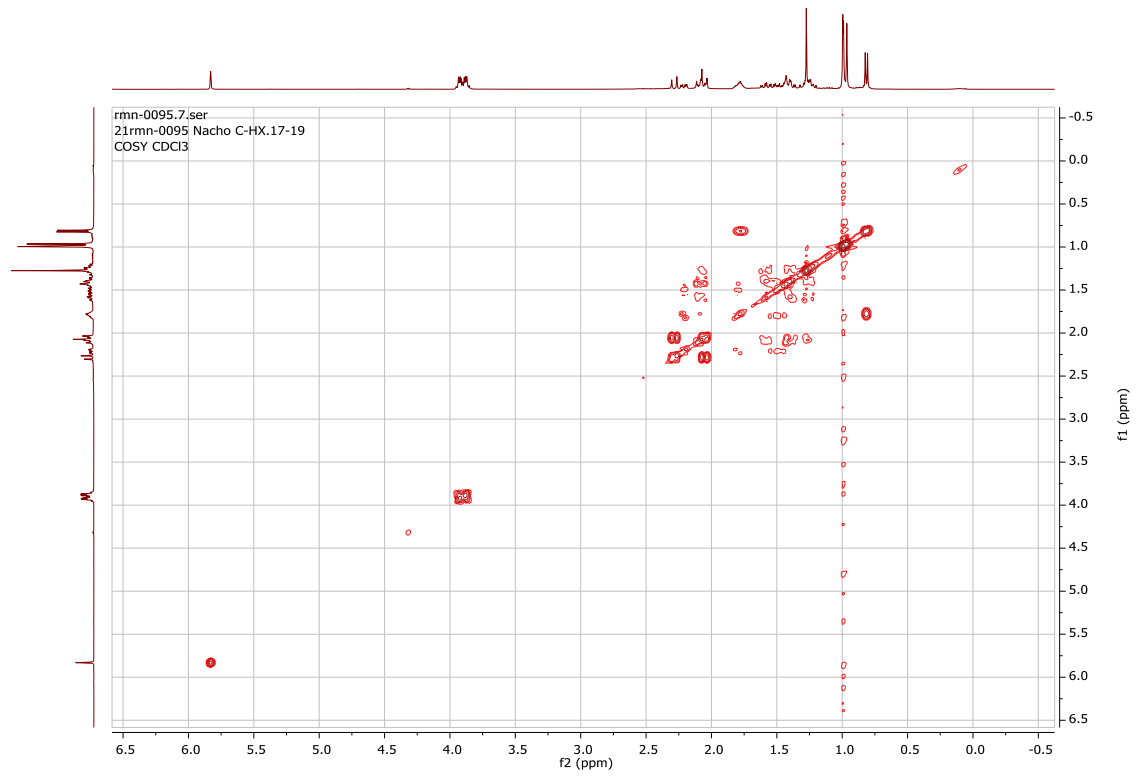


78

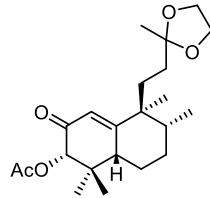
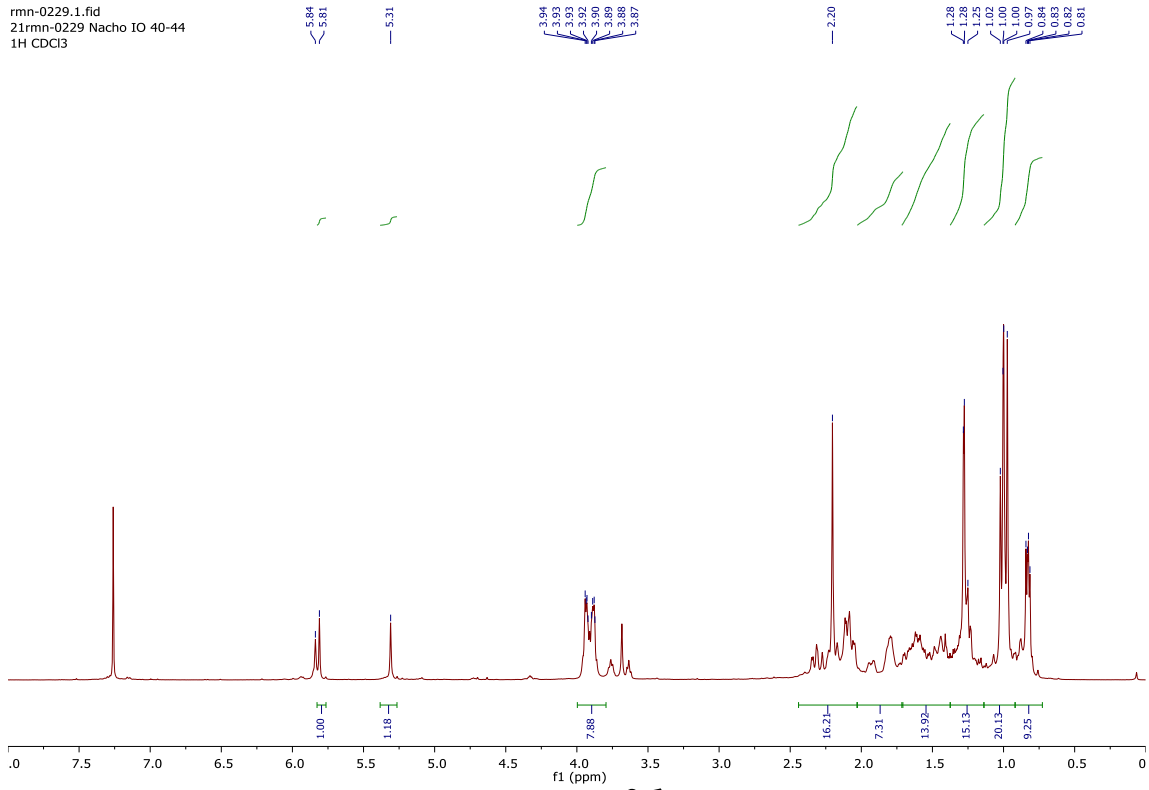
rmn-0095.3.fid



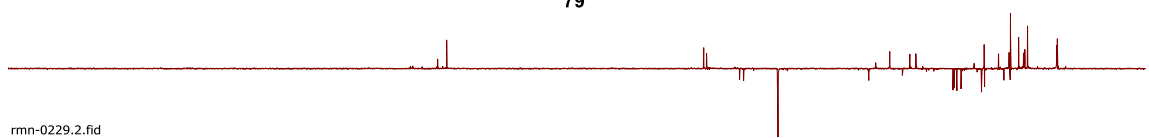




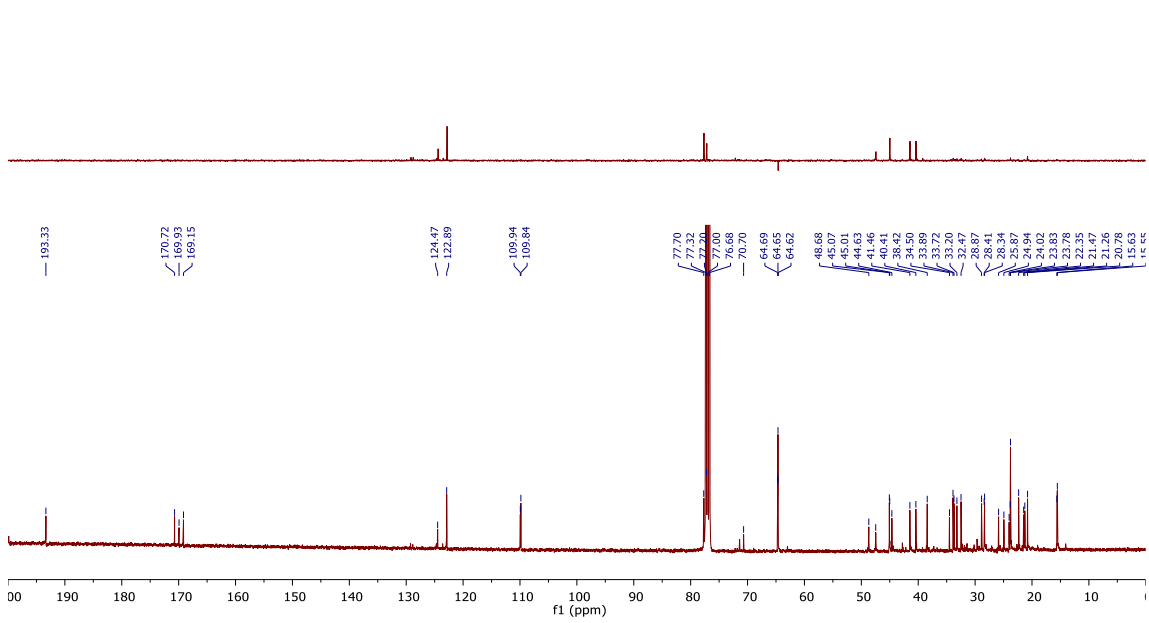
rmn-0229.1.fid
 21rmn-0229 Nacho IO 40-44
 1H CDCl3

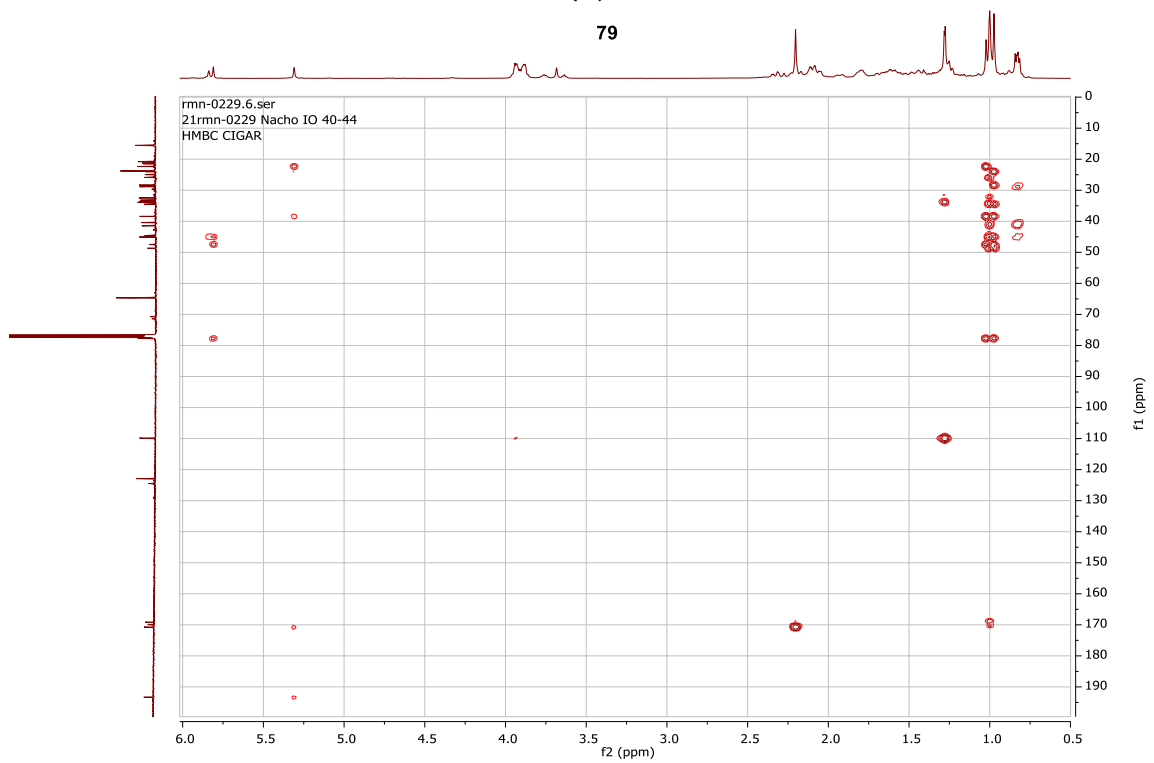
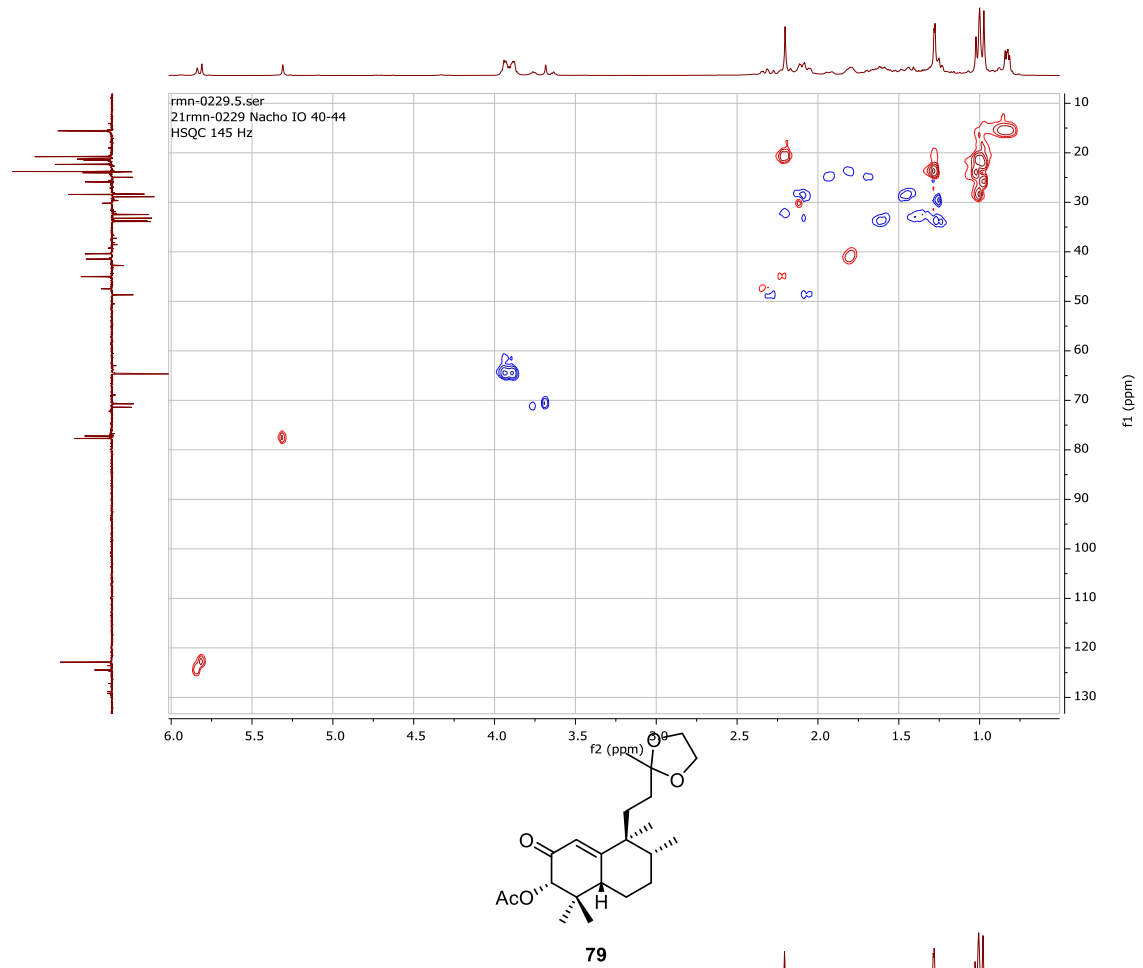


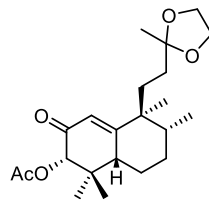
rmn-0229.3.fid



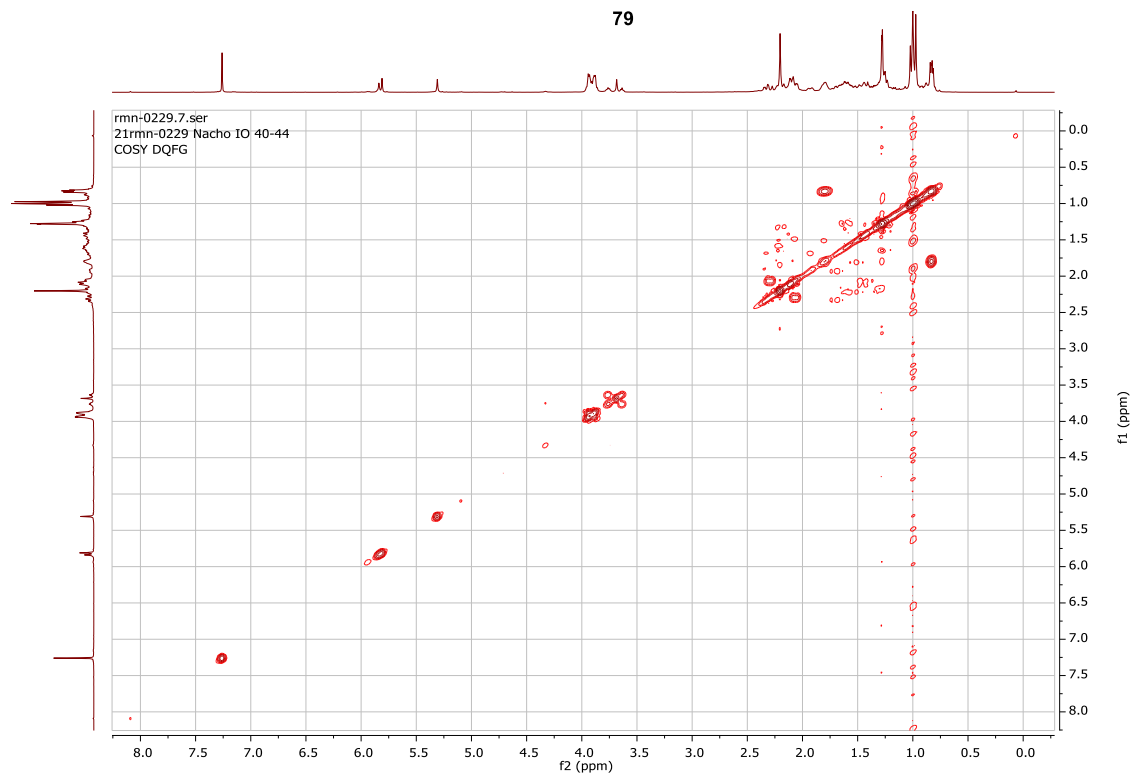
rmn-0229.2.fid





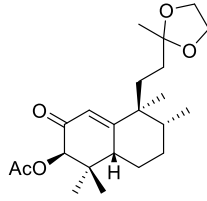
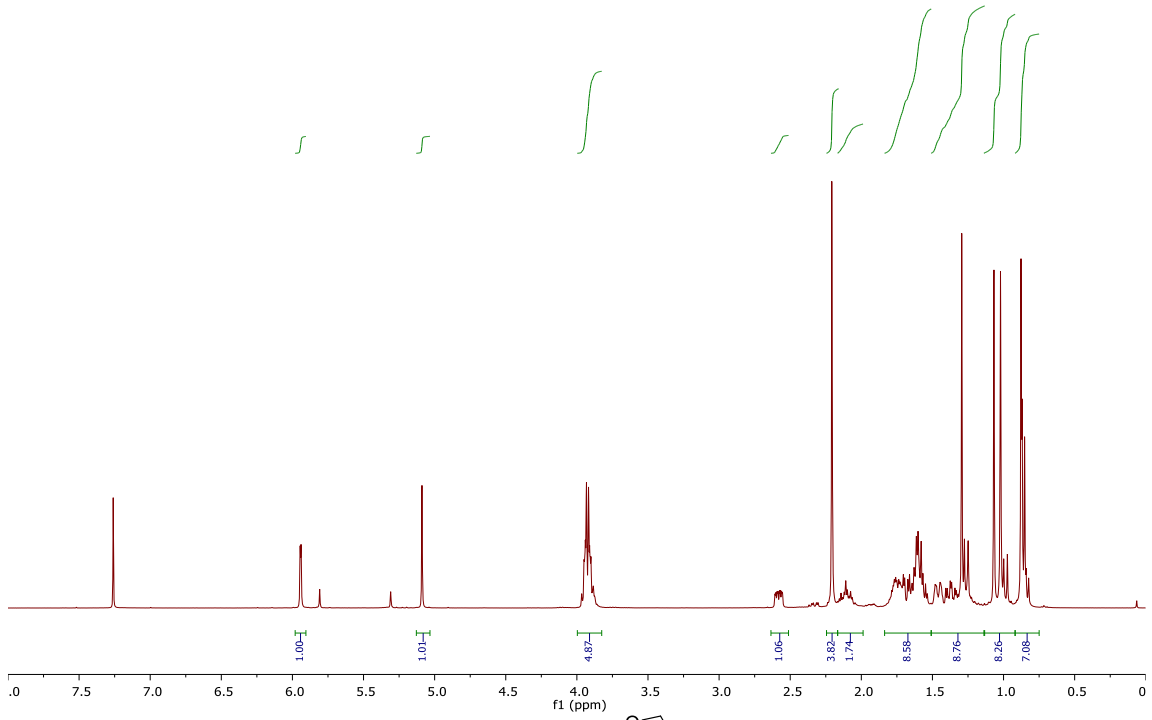


79



| Espectroscopía

rmn-0177.1.fid
21rmn-0177 Nacho C-IL 32-38
1H CDCl3



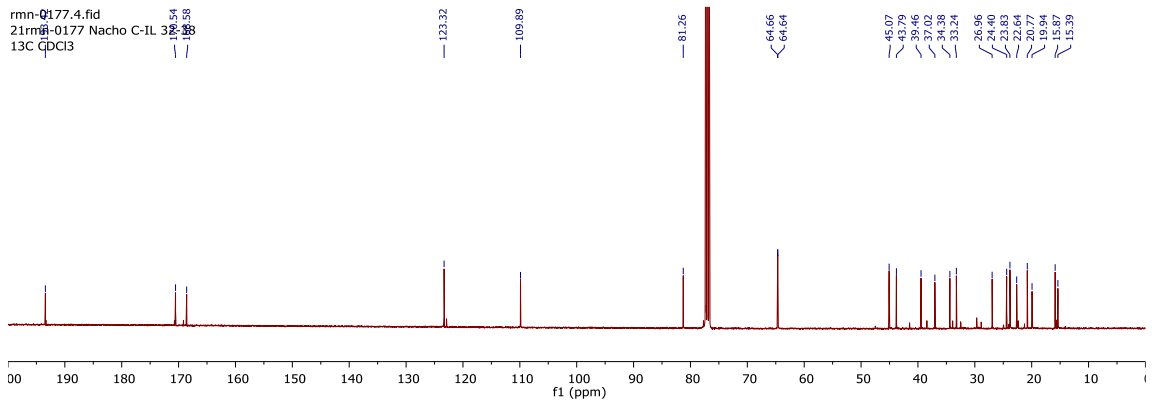
80

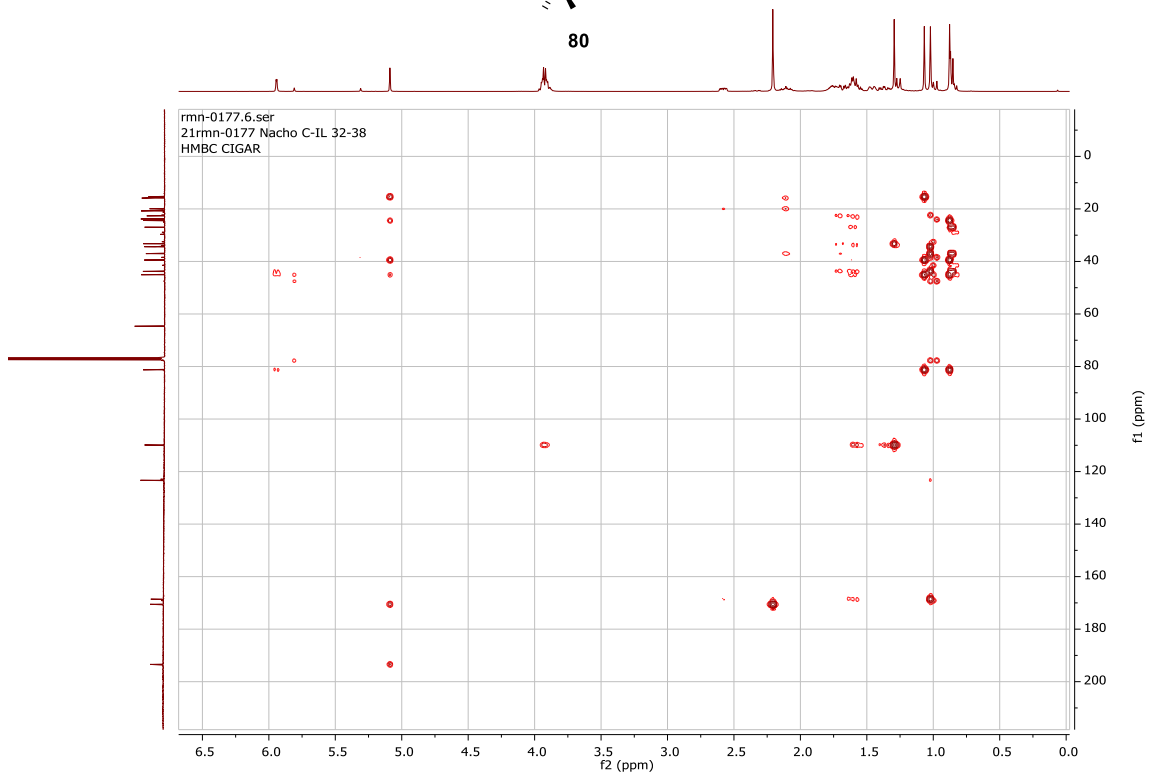
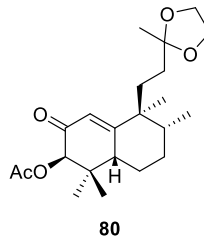
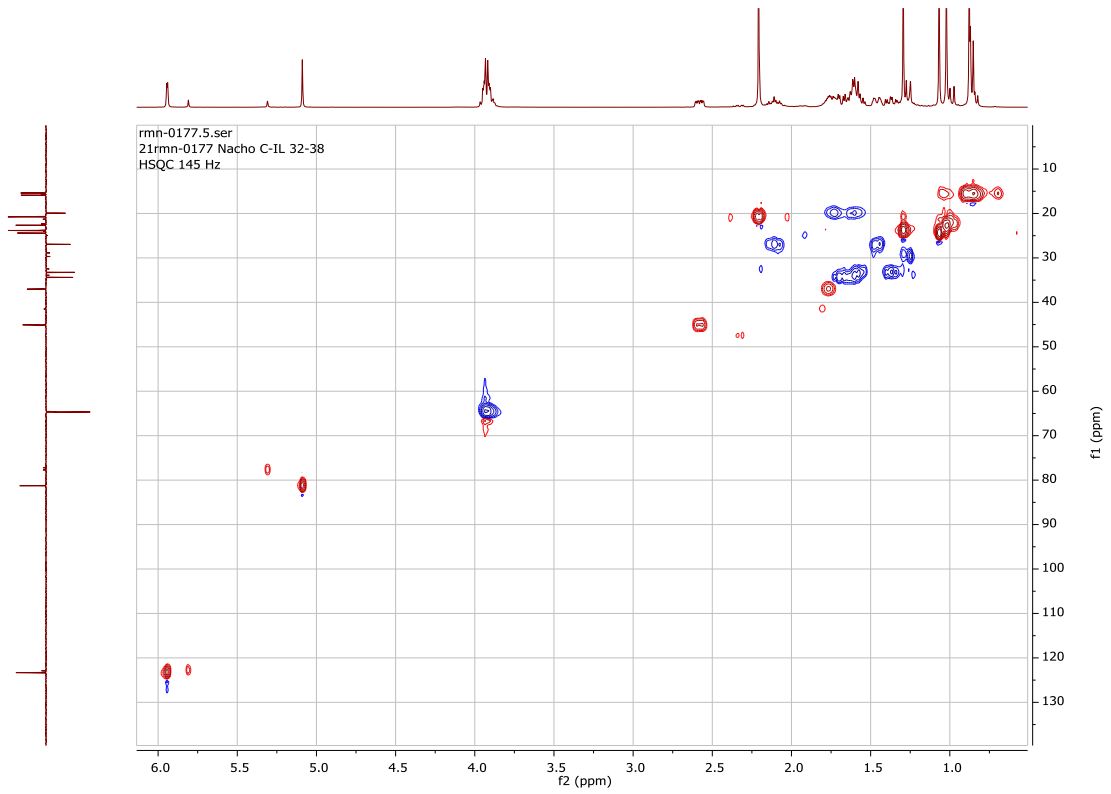
rmn-0177.3.fid

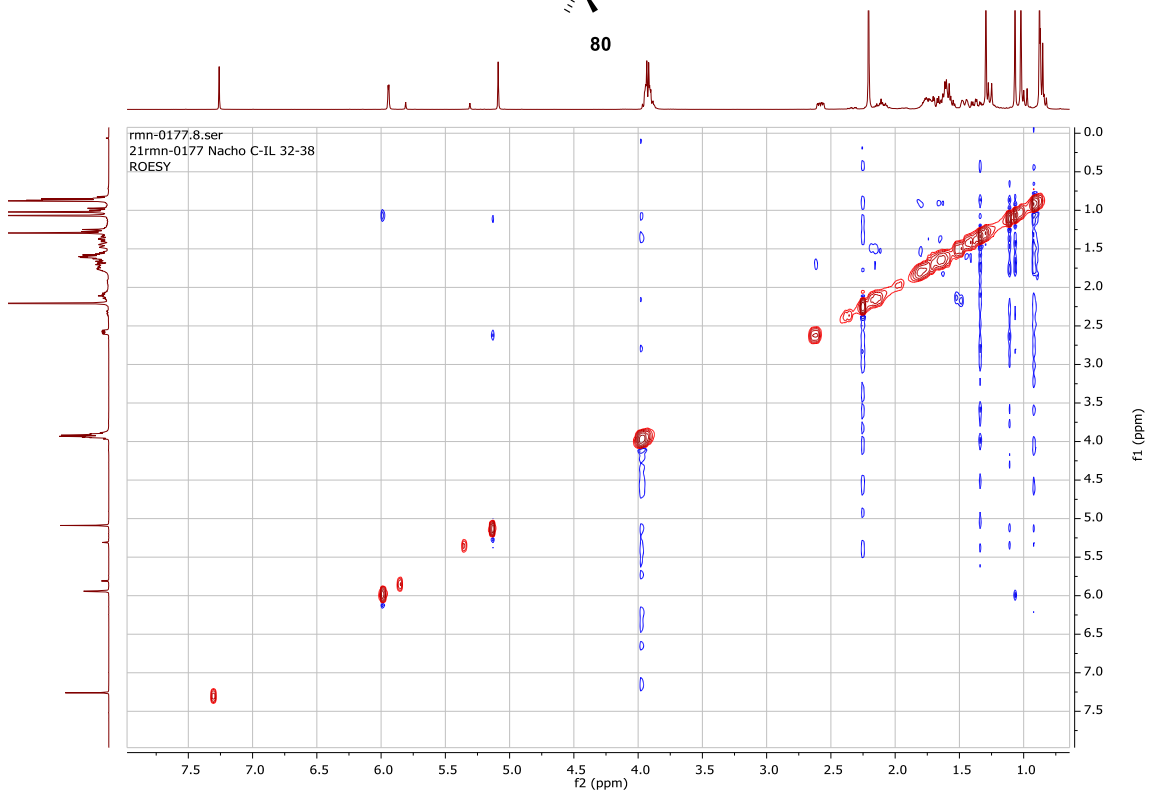
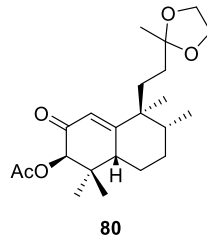
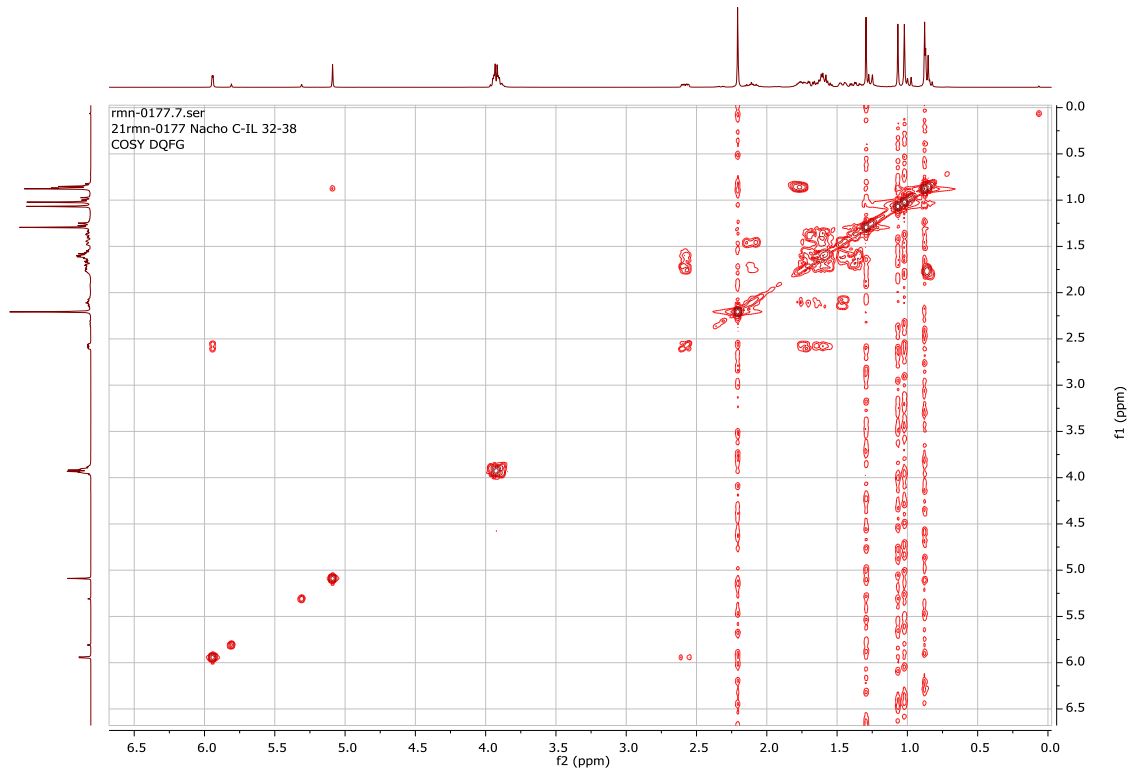
rmn-0177.2.fid

rmn-0177.4.fid

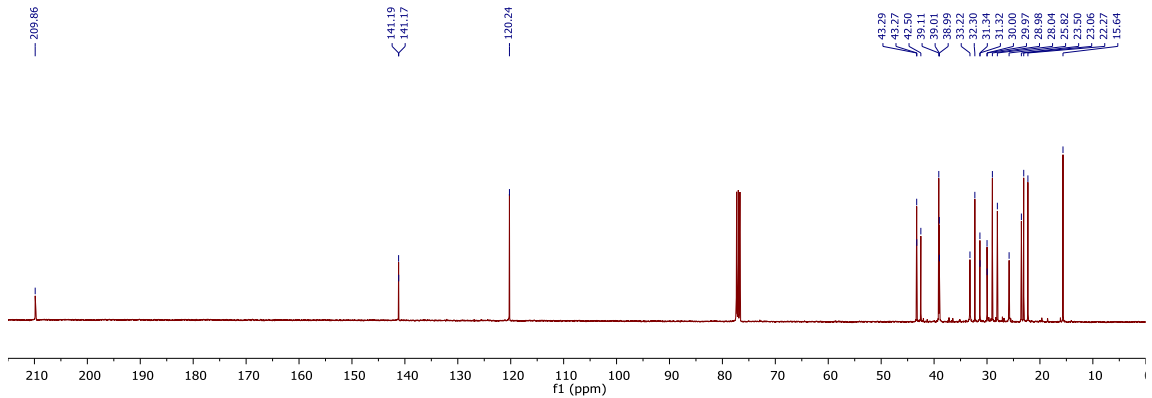
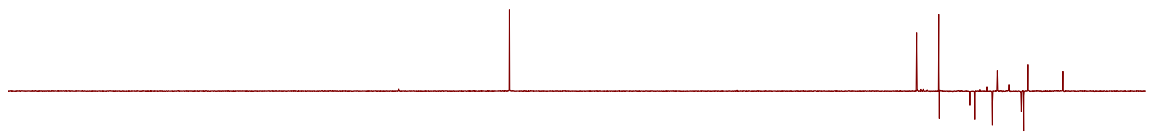
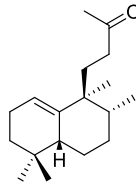
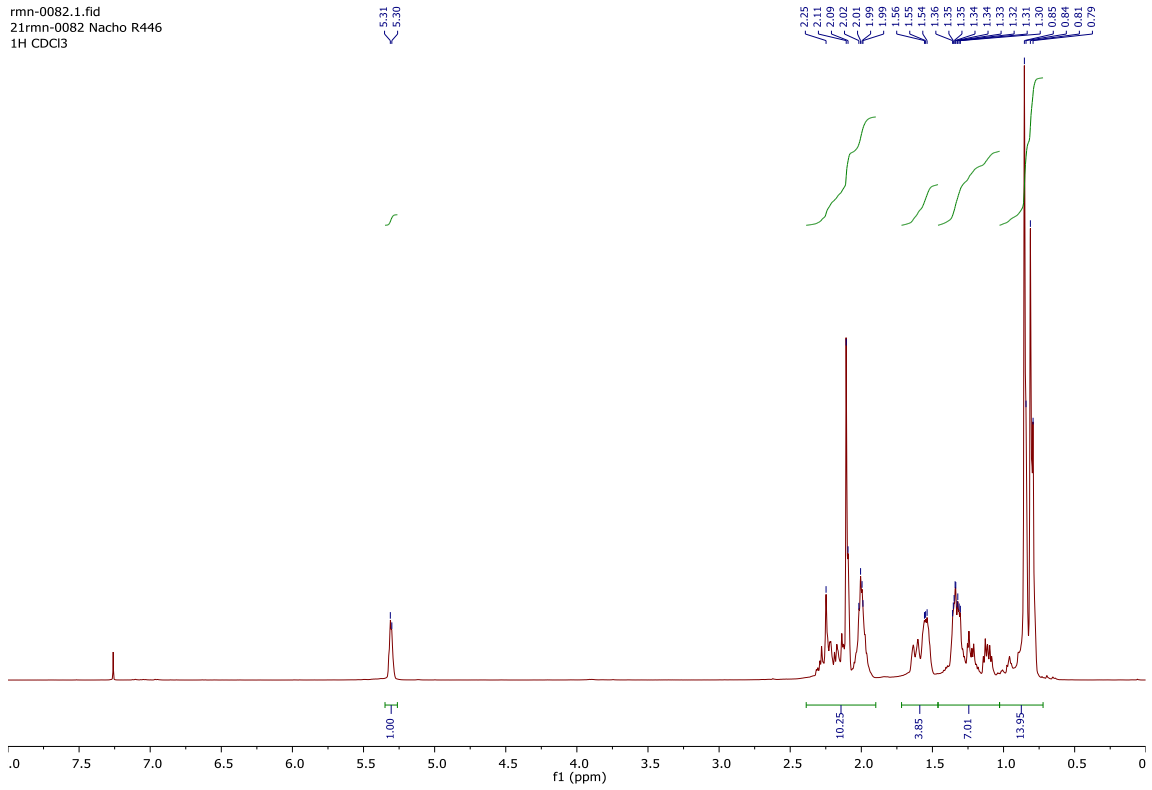
21rmn-0177 Nacho C-IL 32-38
13C CDCl3

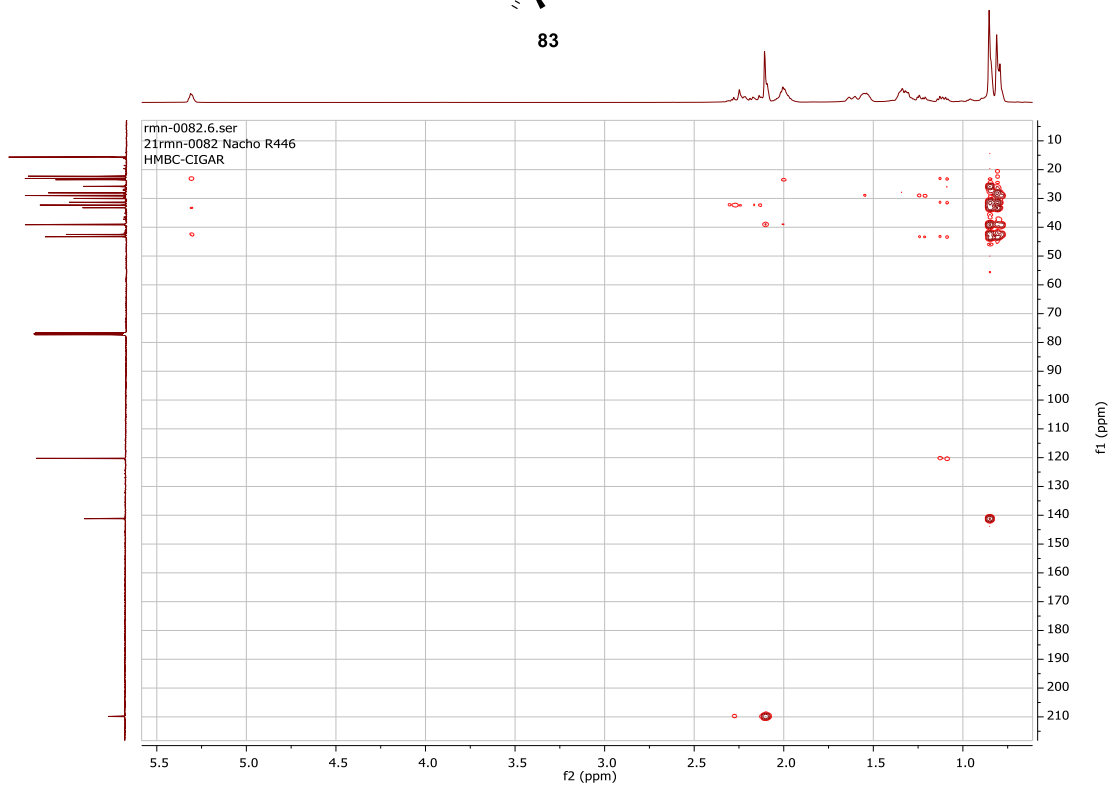
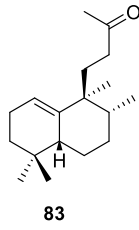
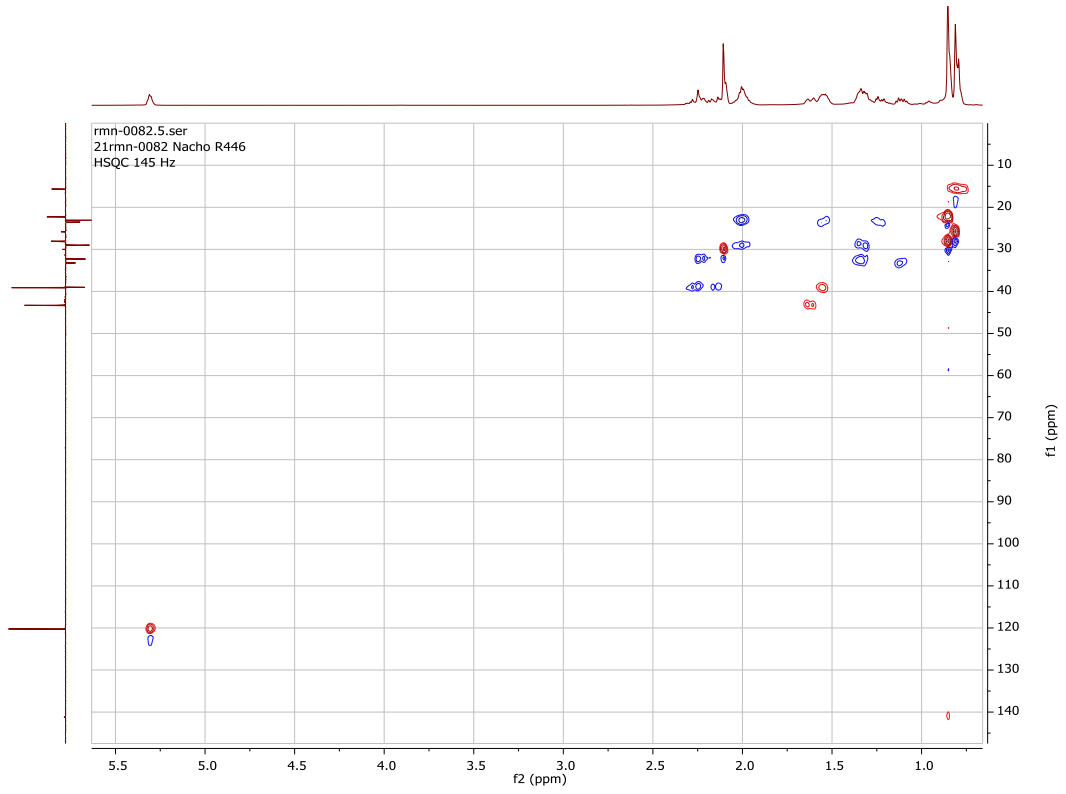




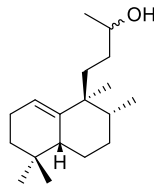
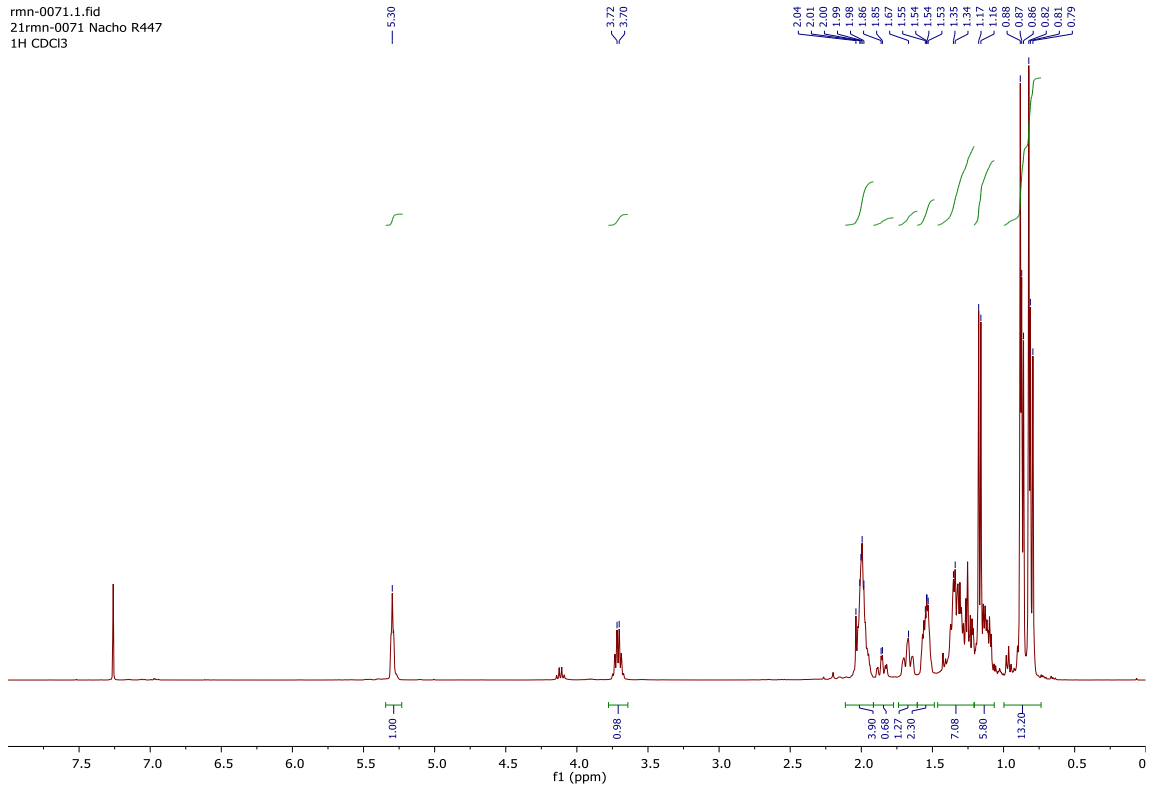


rmn-0082.1.fid
21rmn-0082 Nacho R446
1H CDCl3



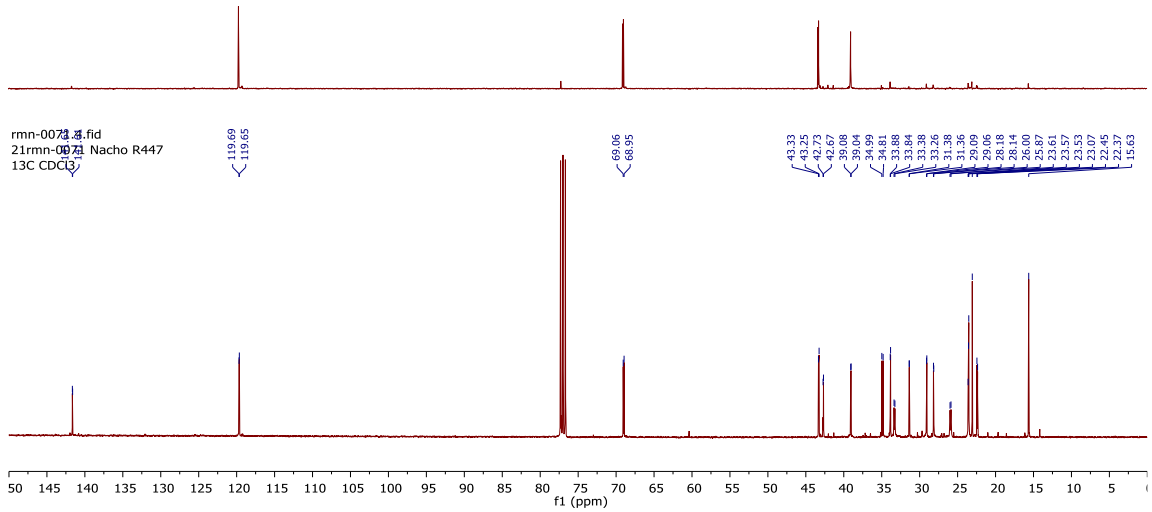


rmn-0071.1.fid
21rmn-0071 Nacho R447
1H CDCl3

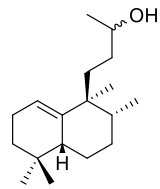
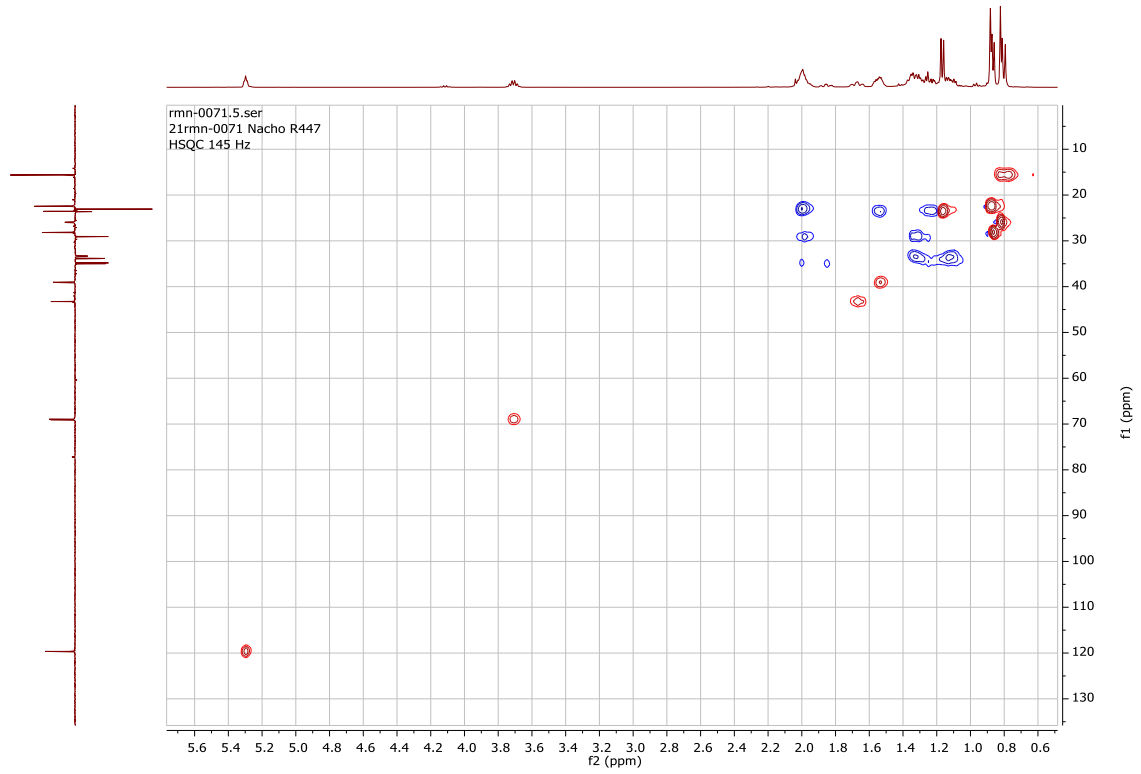


rmn-0071.3.fid

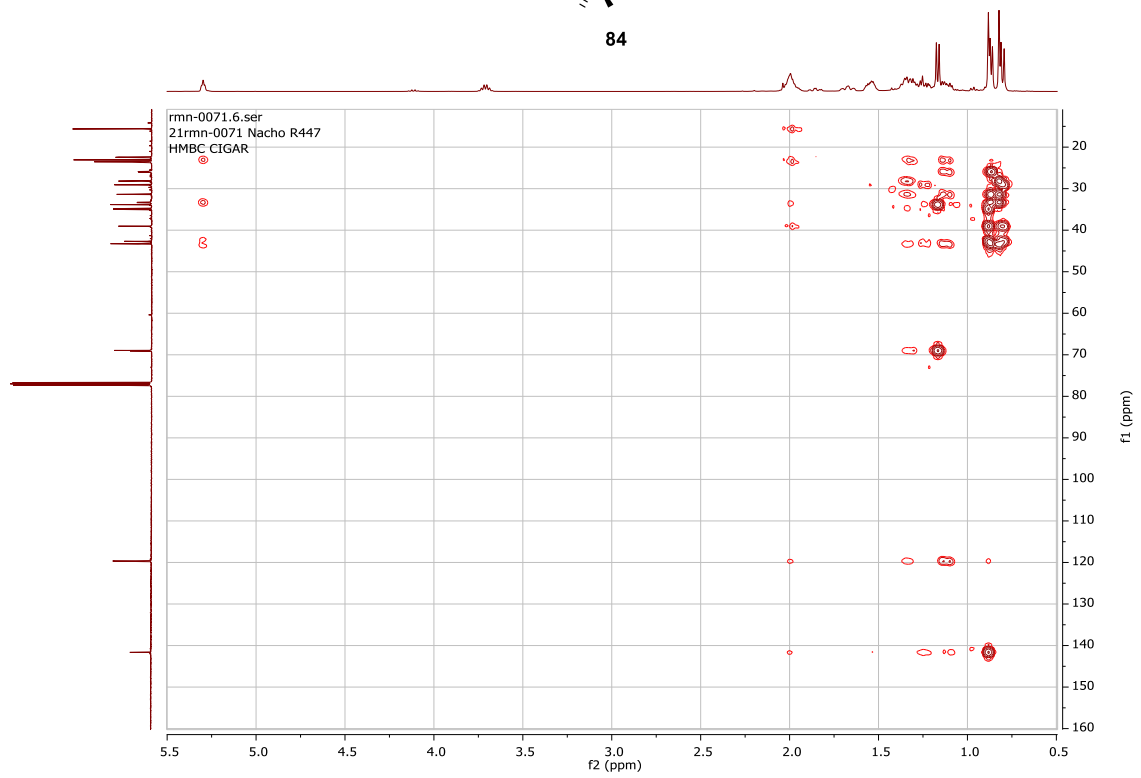
rmn-0071.2.fid

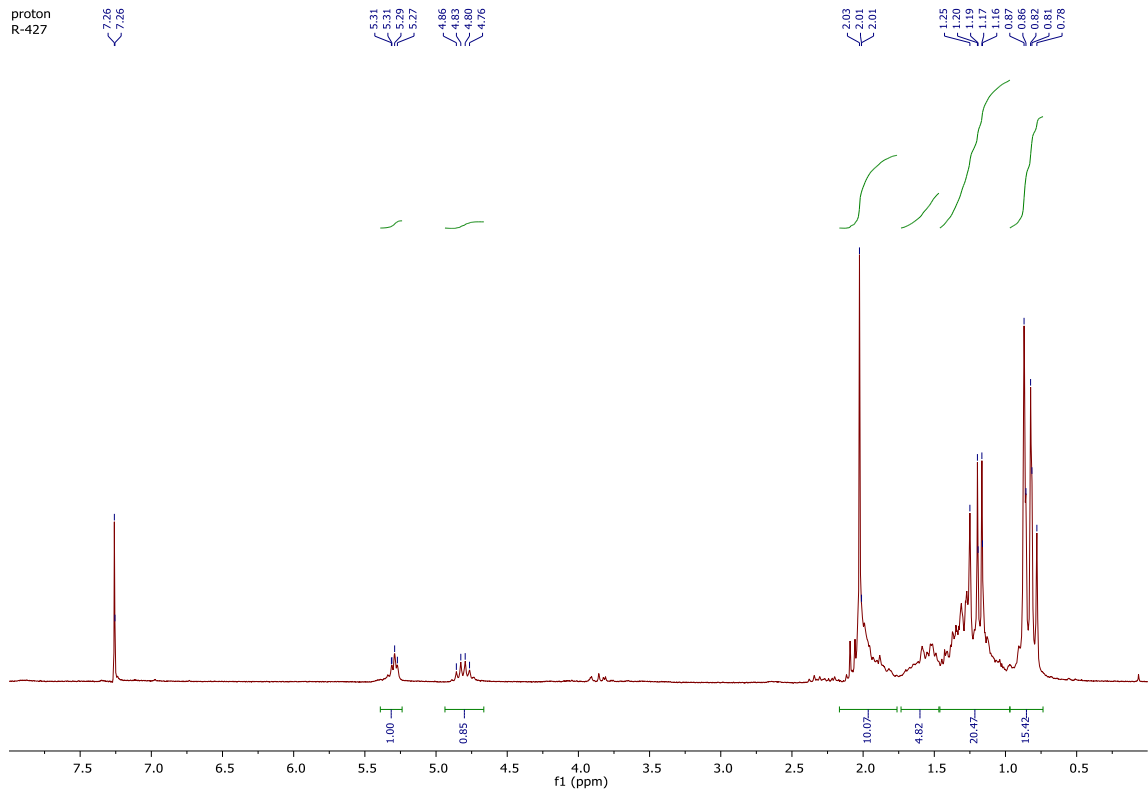


rmn-0071.4.fid
21rmn-0071 Nacho R447
13C CDCl3

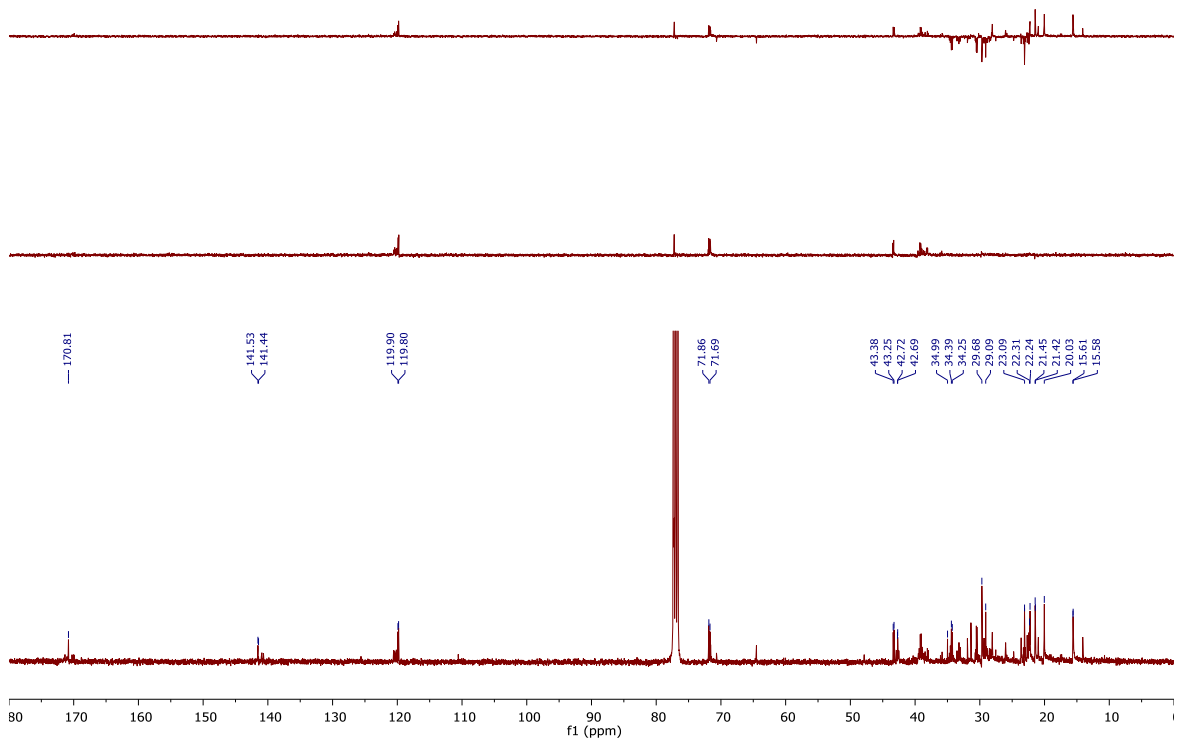


84



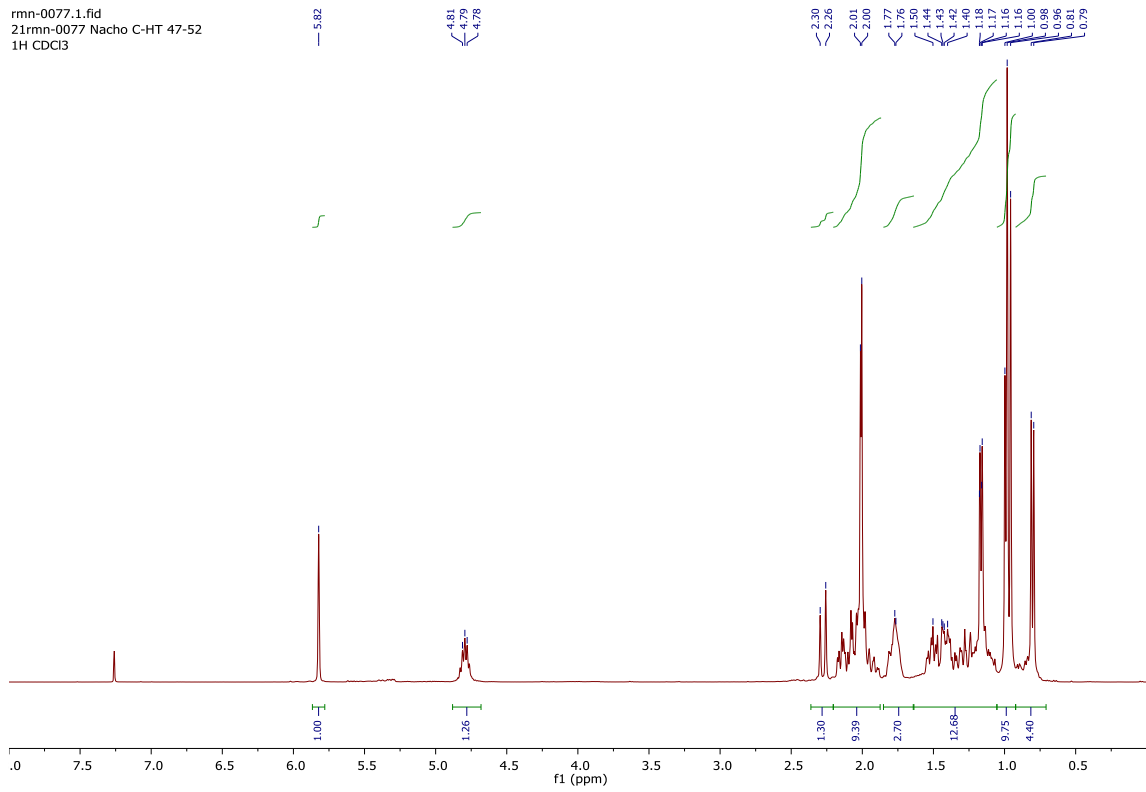


rmn-0359.3.fid



| Espectroscopía

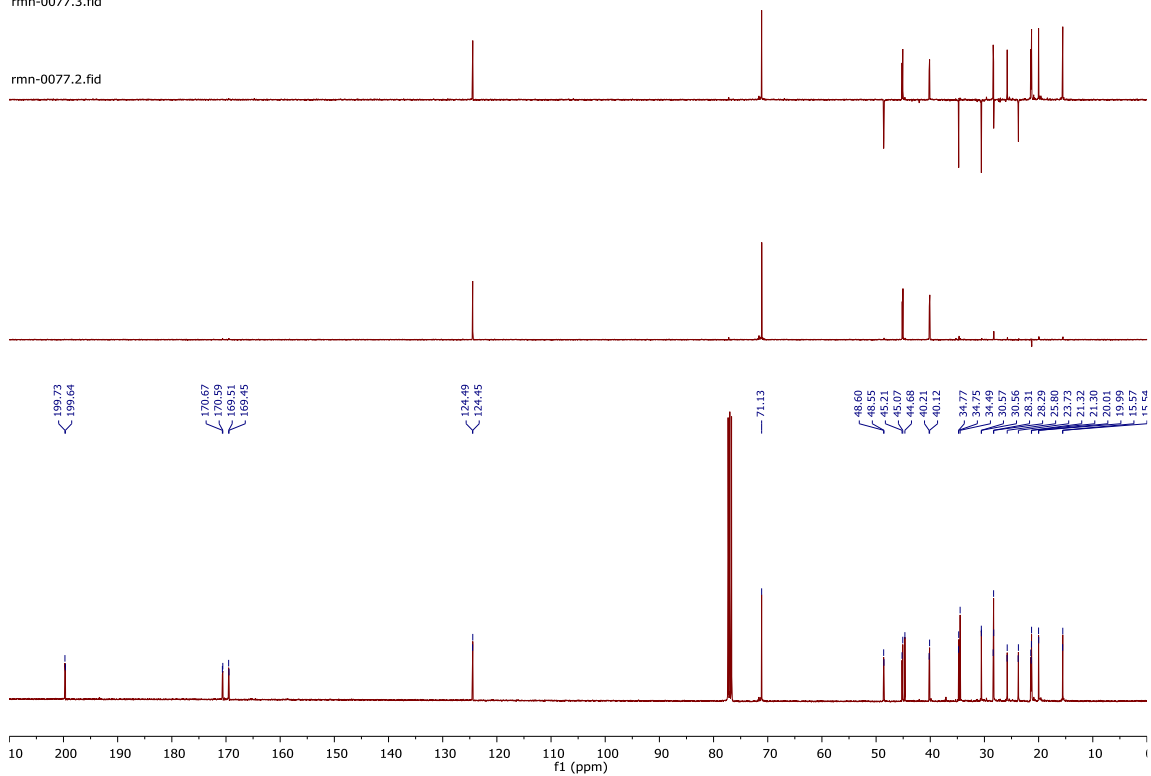
rmn-0077.1.fid
21rmn-0077 Nacho C-HT 47-52
1H CDCl3

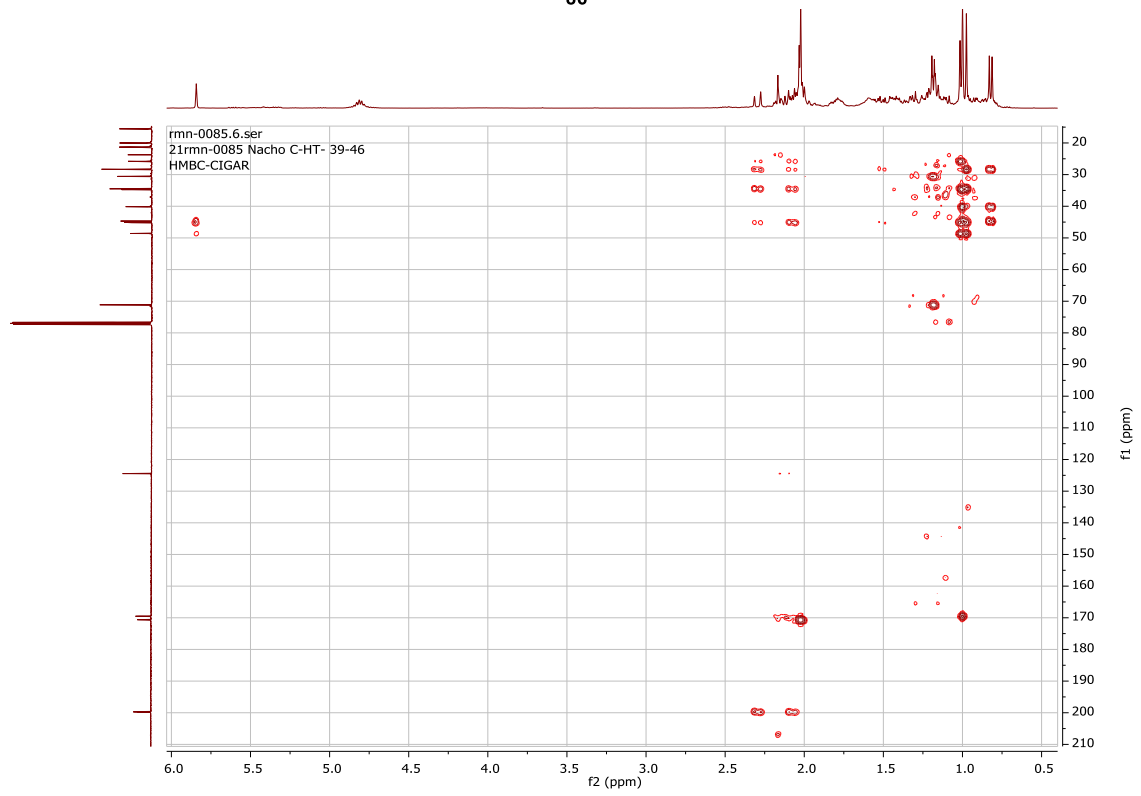
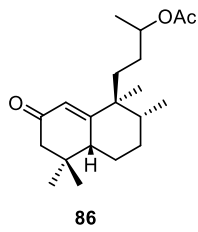
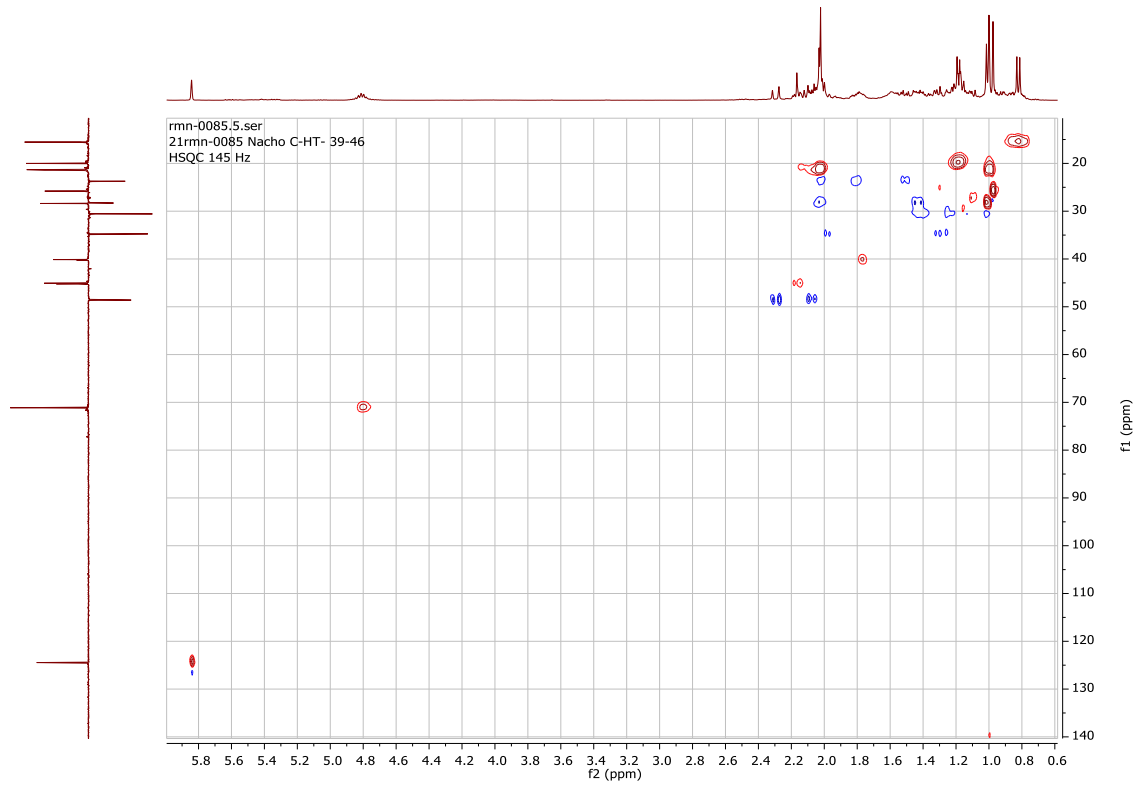


86

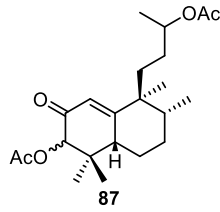
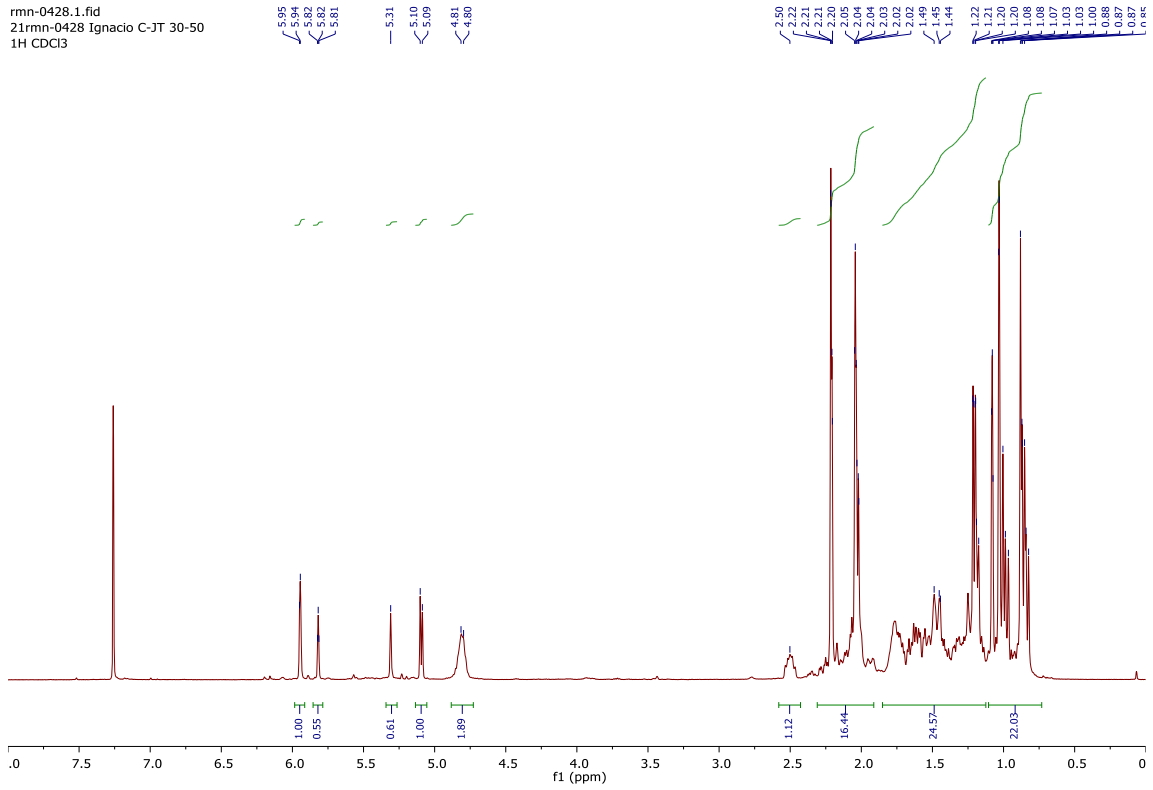
rmn-0077.3.fid

rmn-0077.2.fid



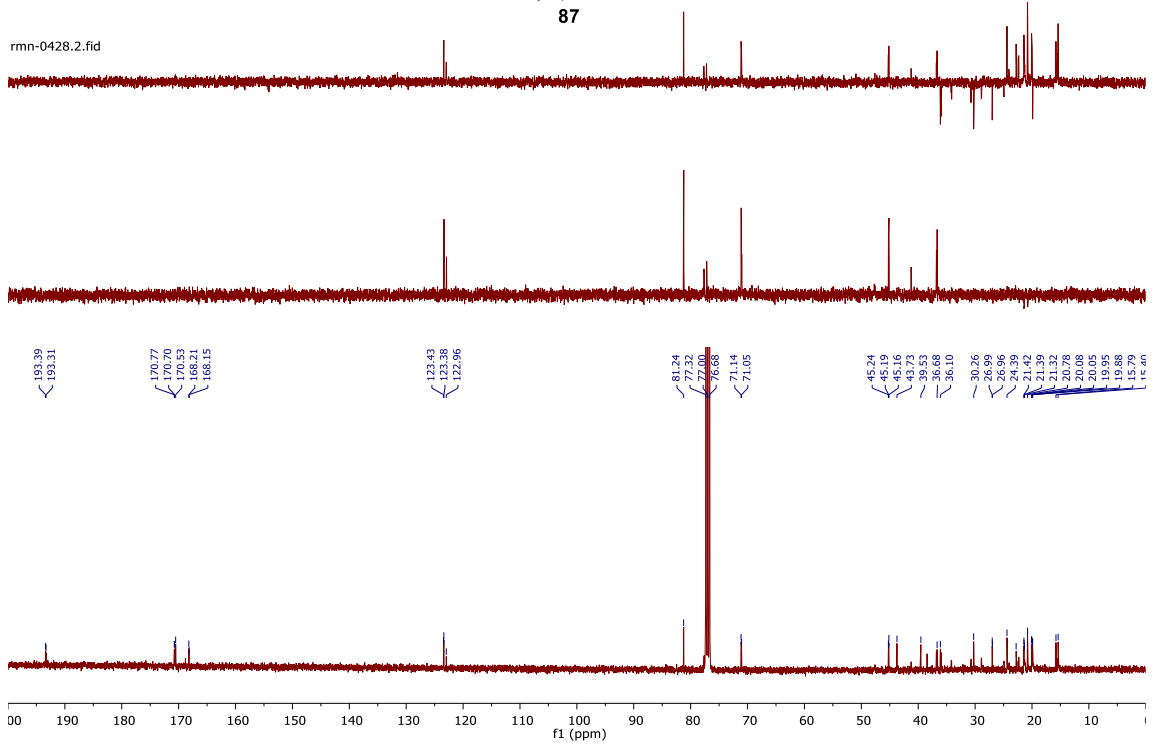


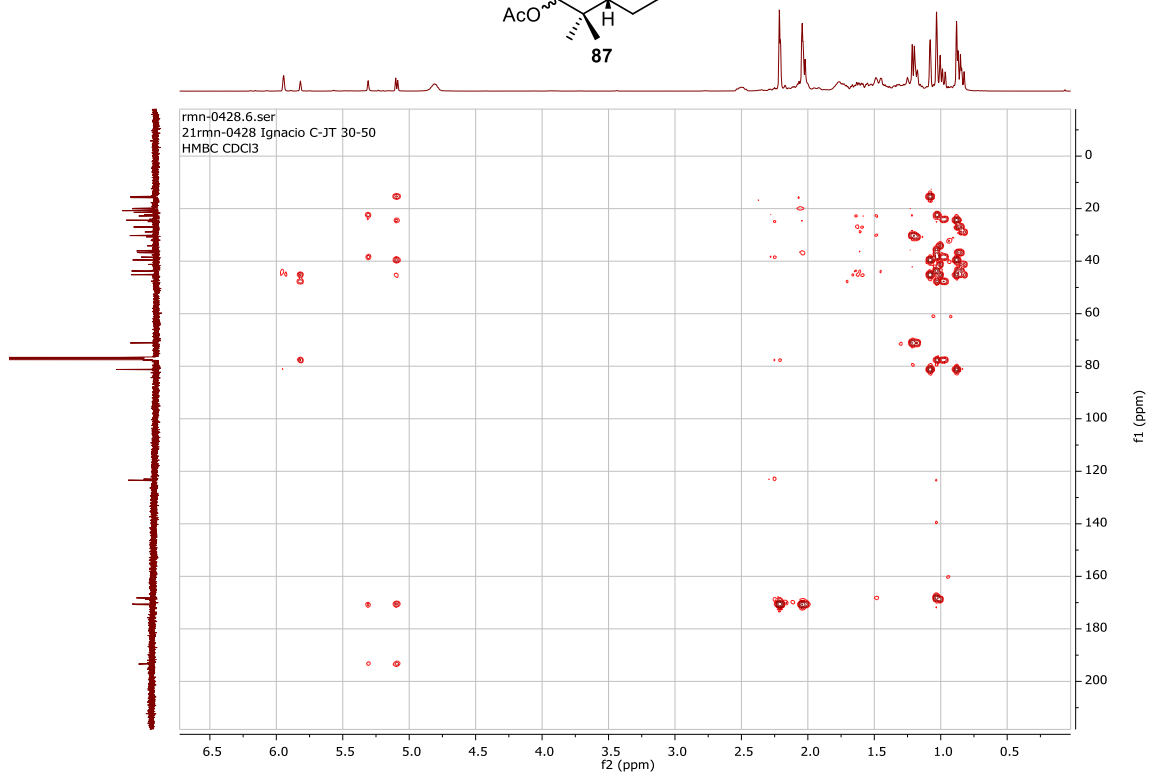
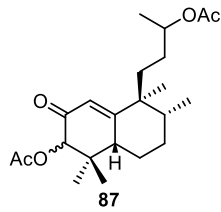
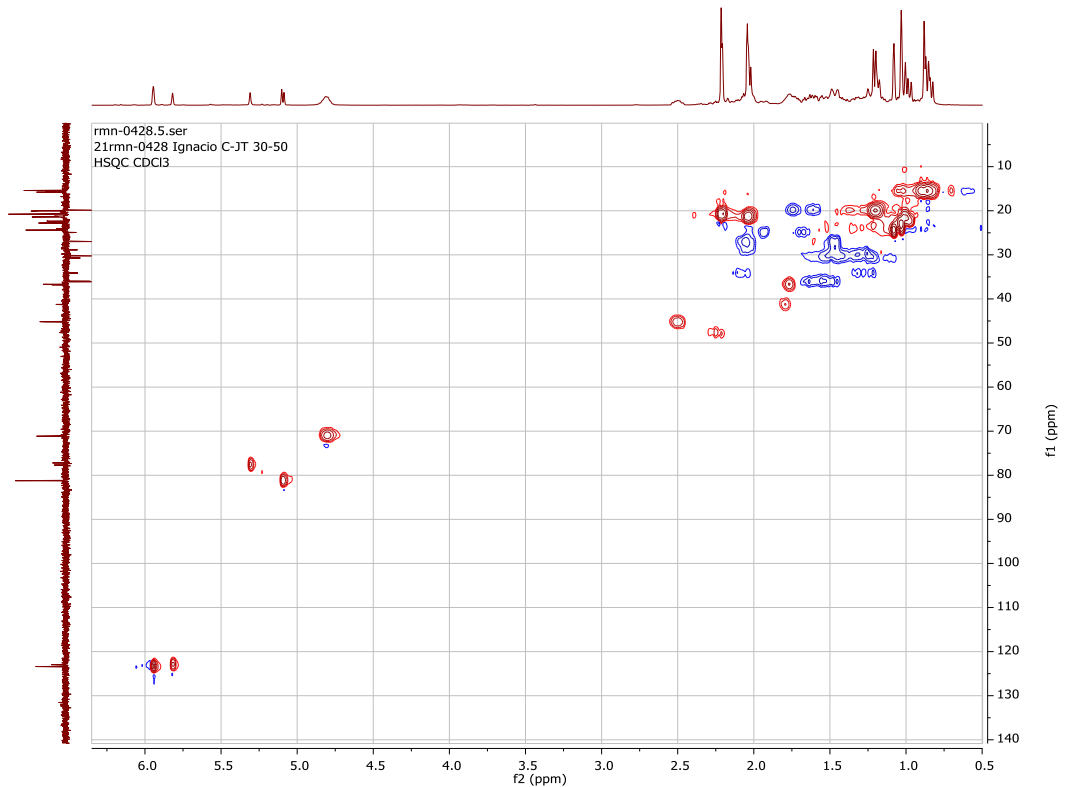
rmn-0428.1.fid
21rmn-0428 Ignacio C-JT 30-50
1H CDCl3

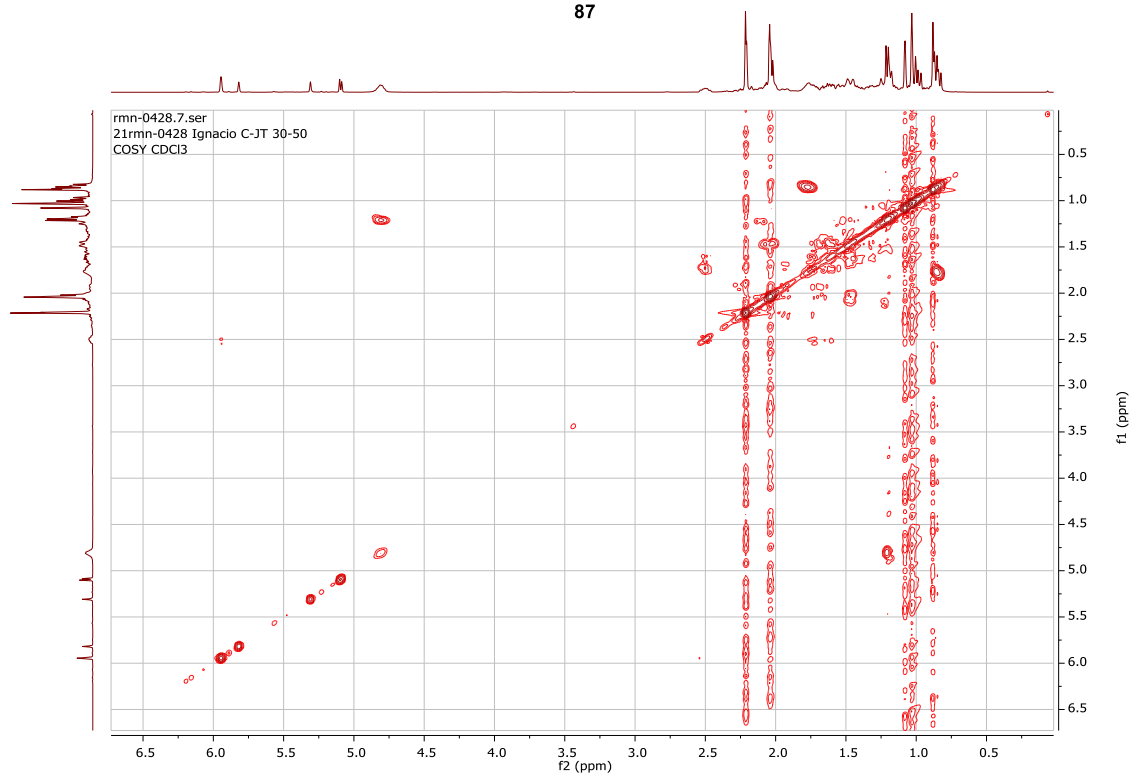
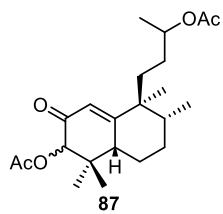


rmn-0428.3.fid

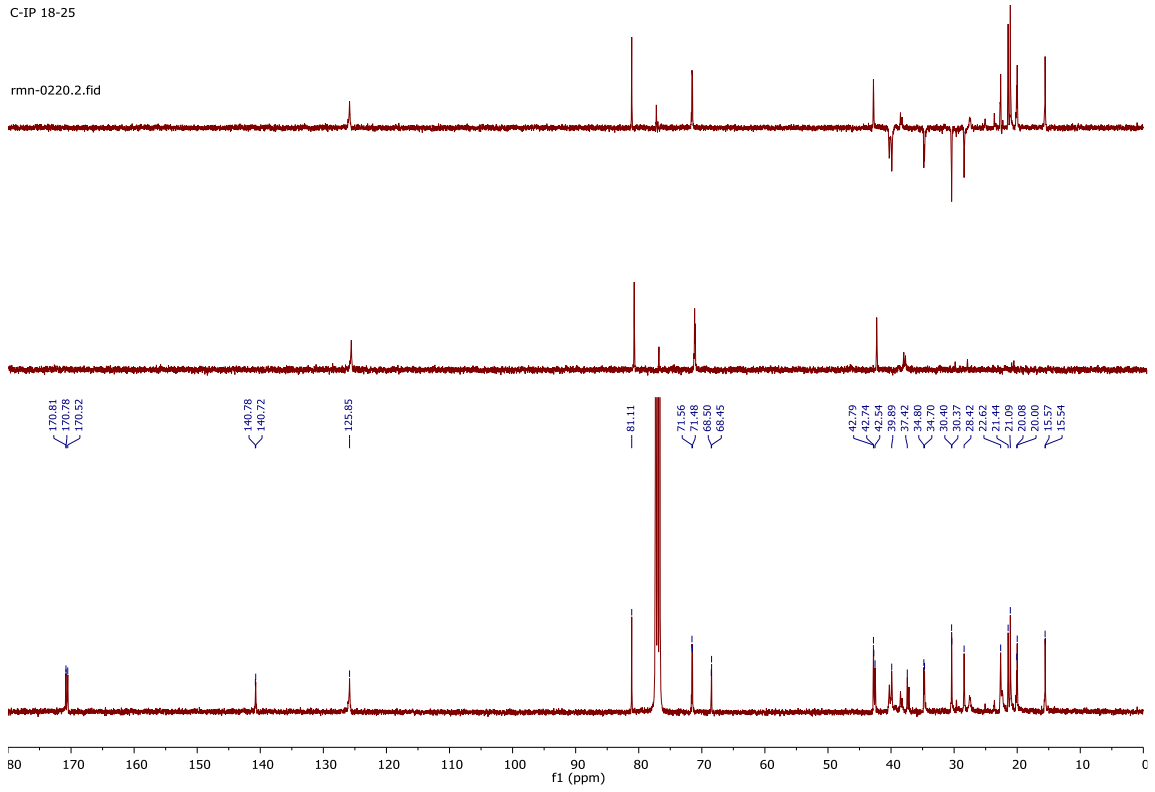
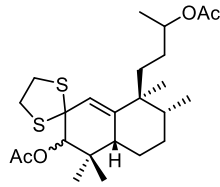
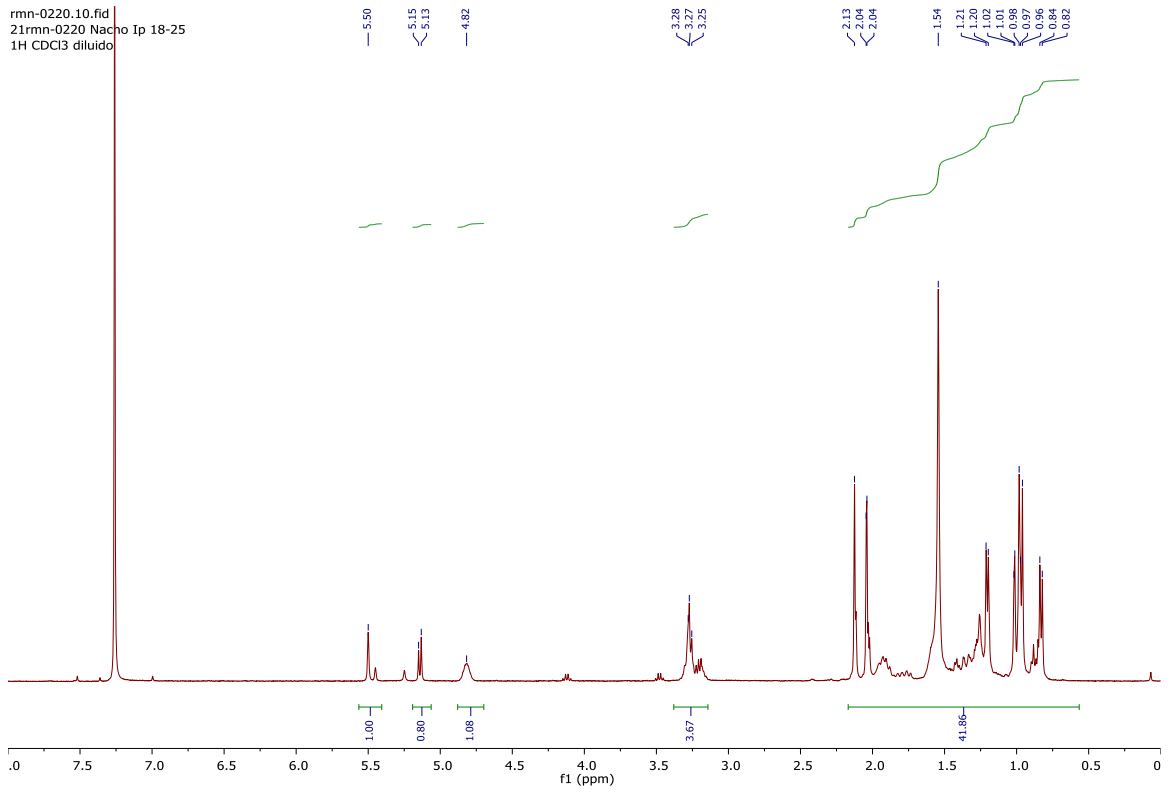
rmn-0428.2.fid

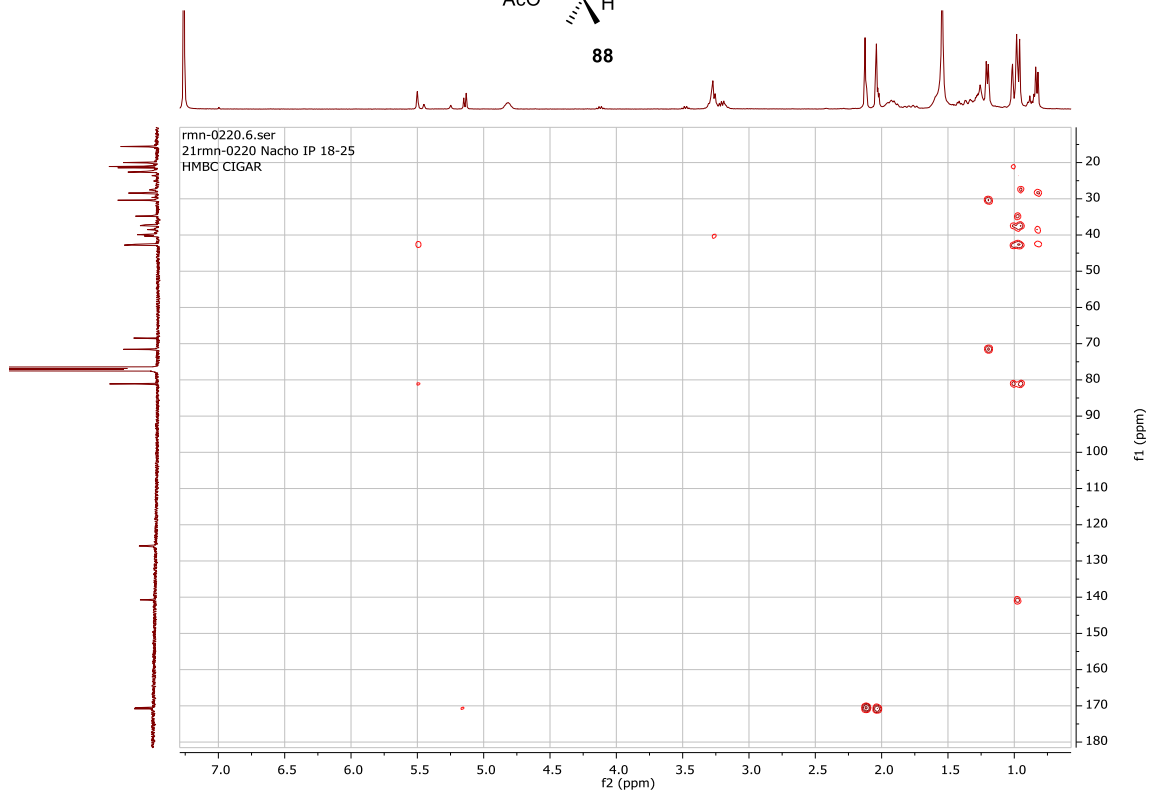
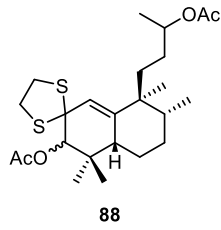
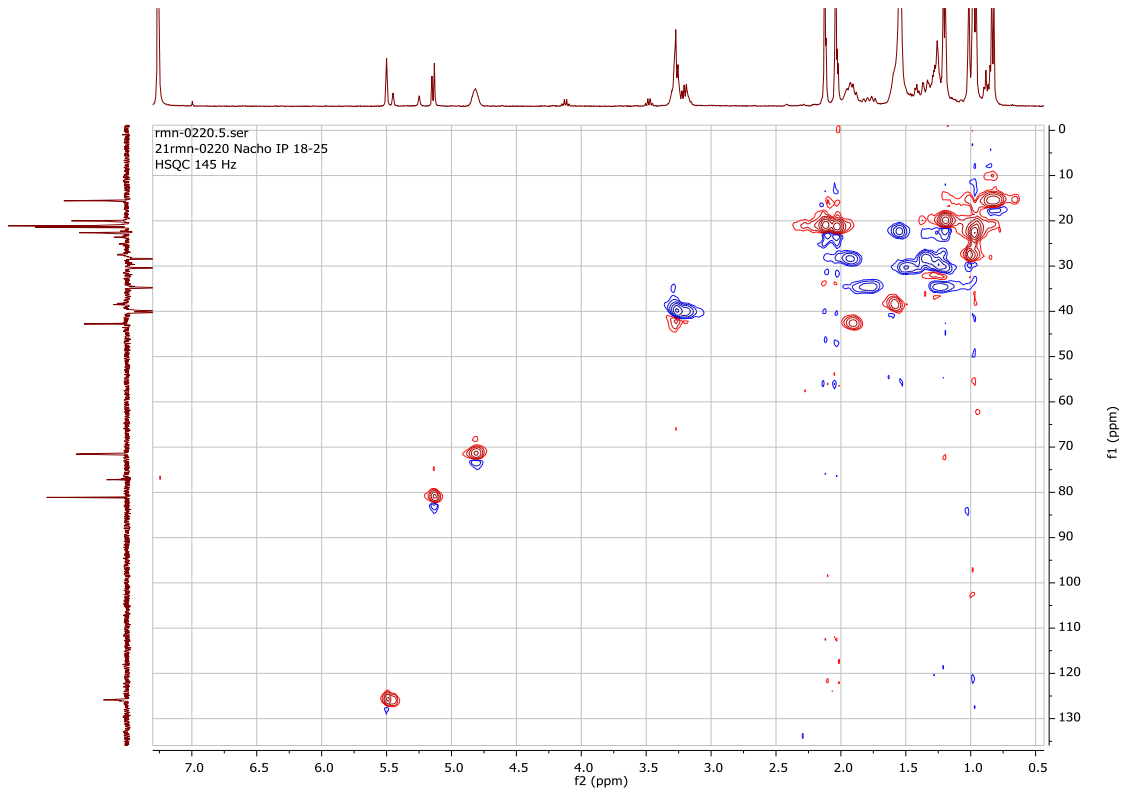


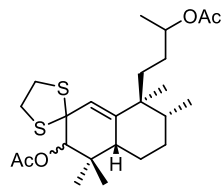




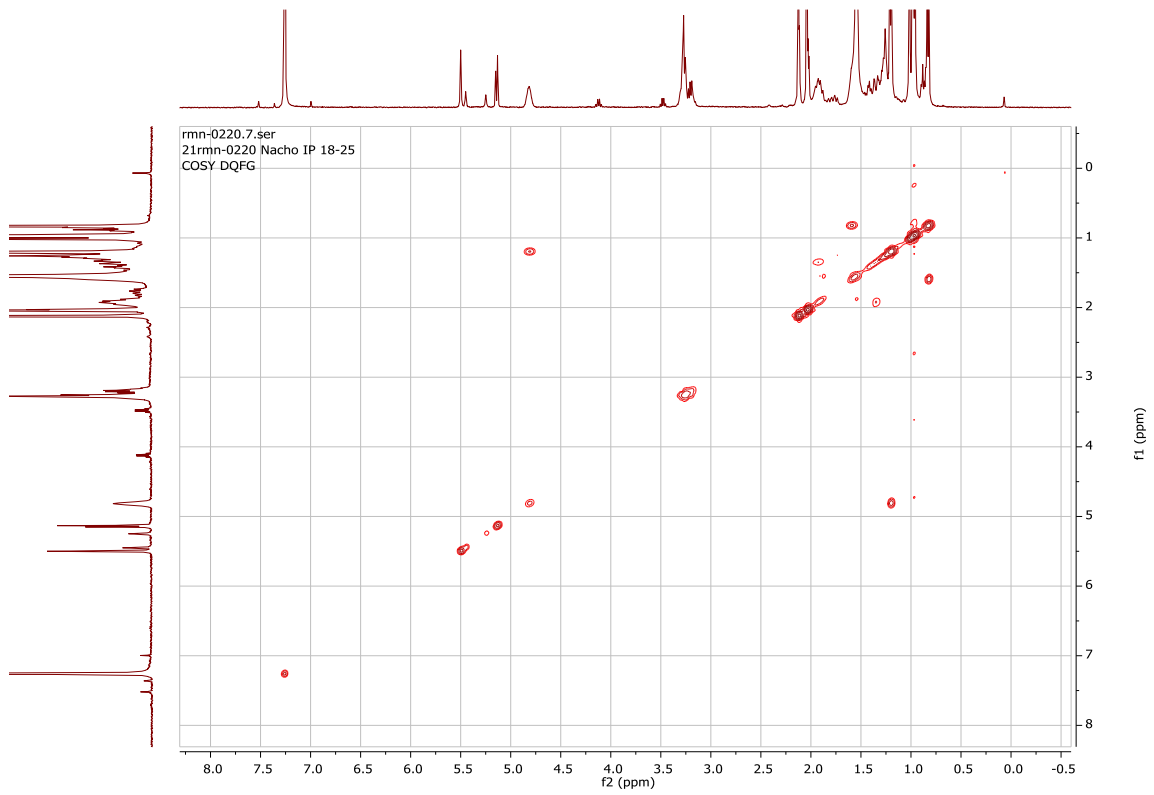
| Espectroscopía

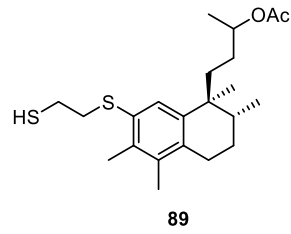
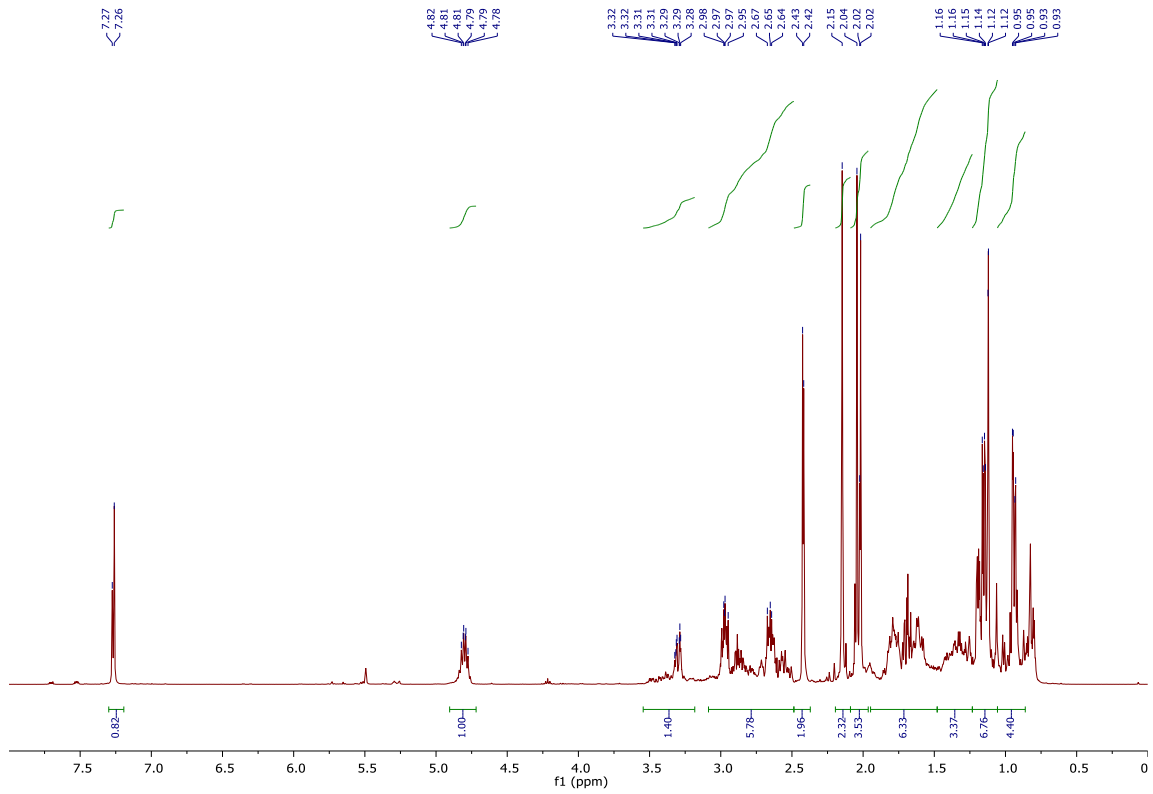






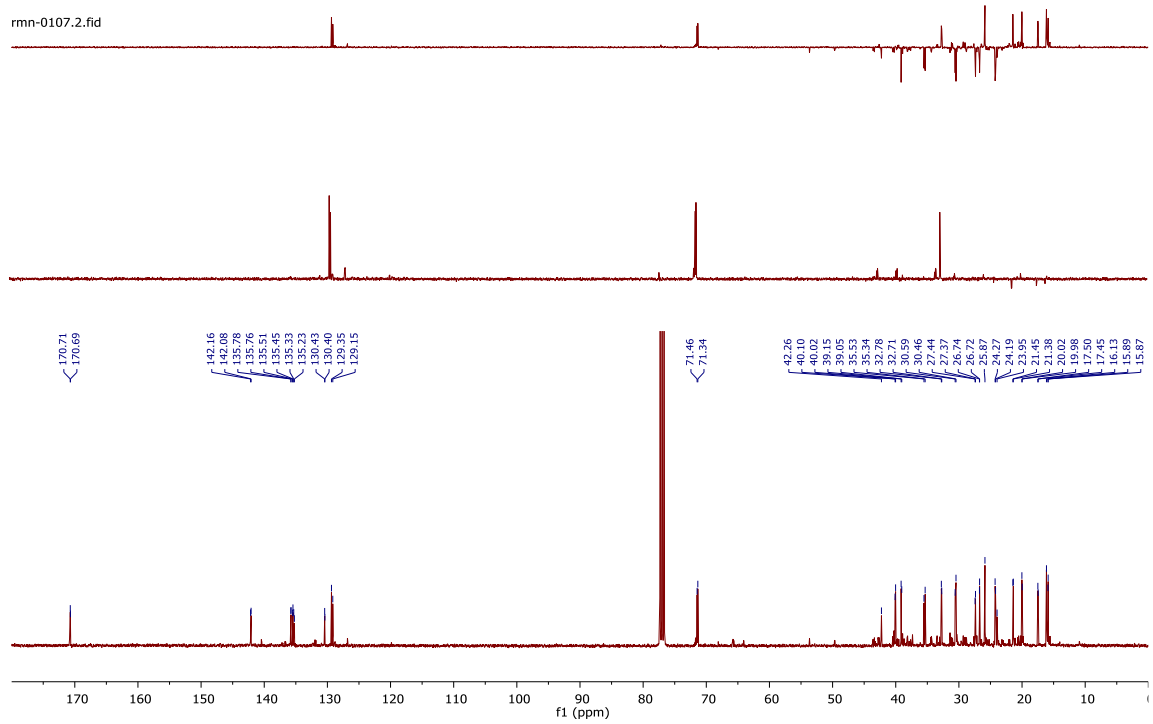
88

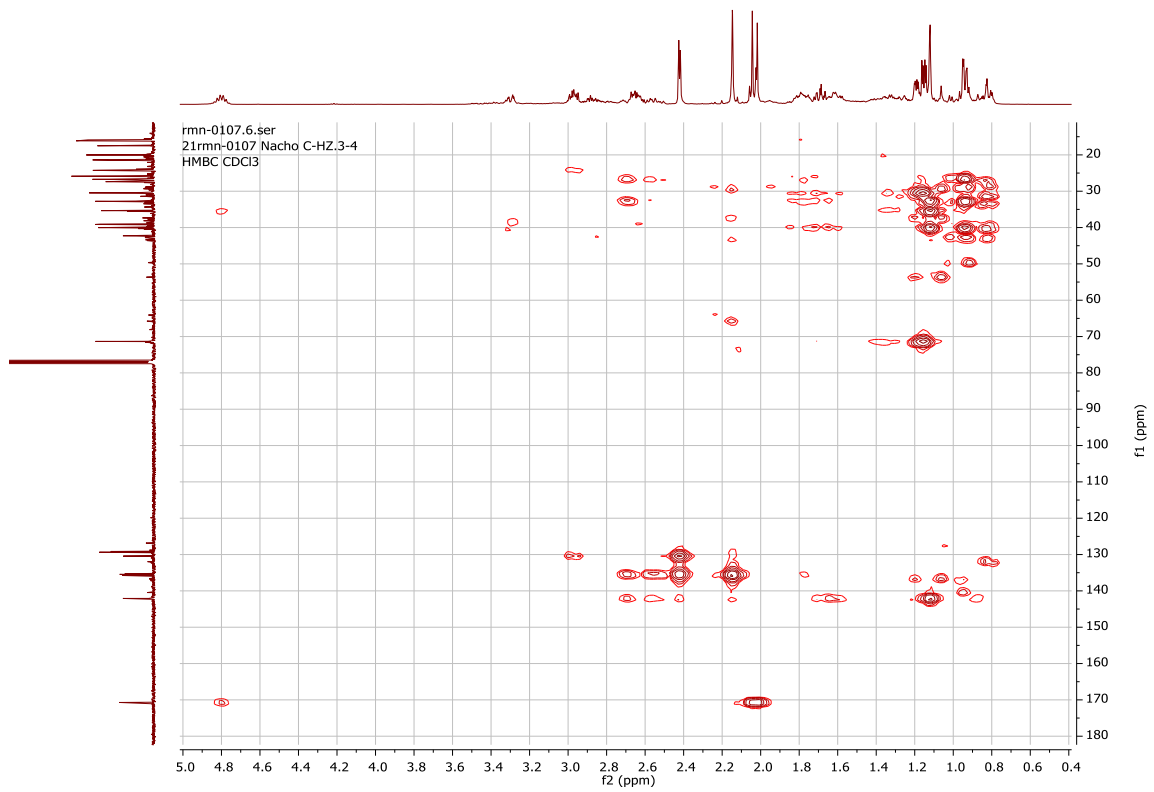
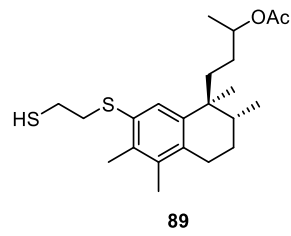
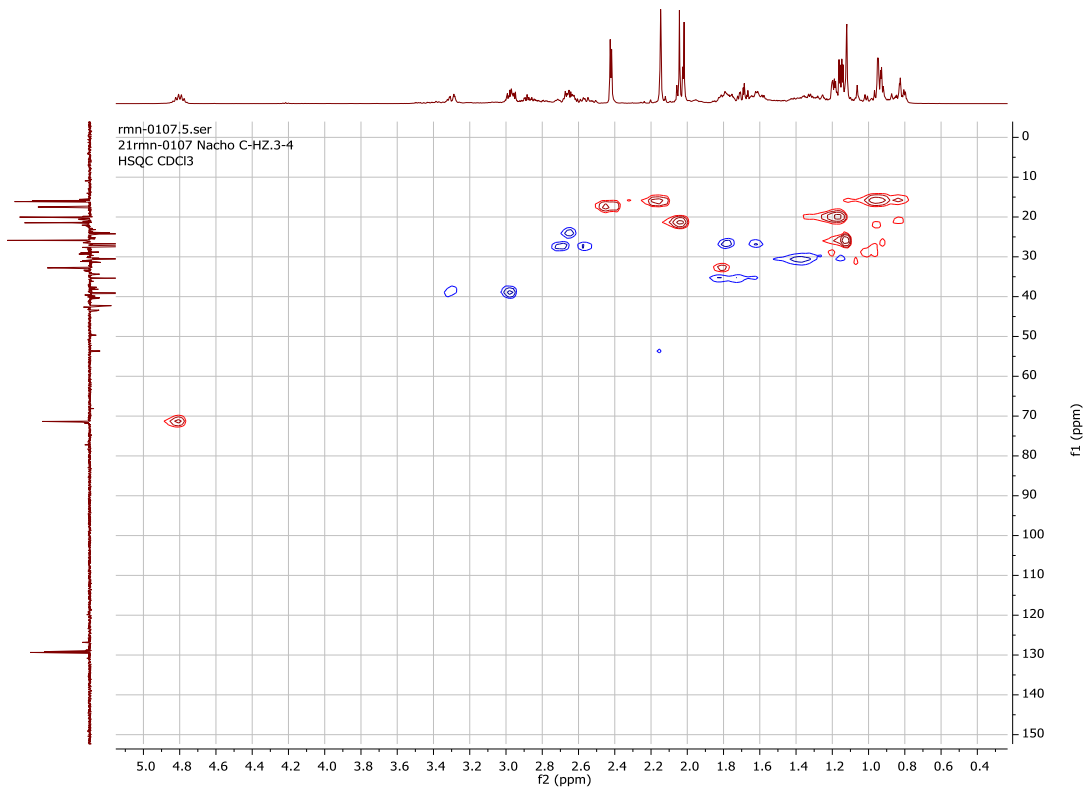


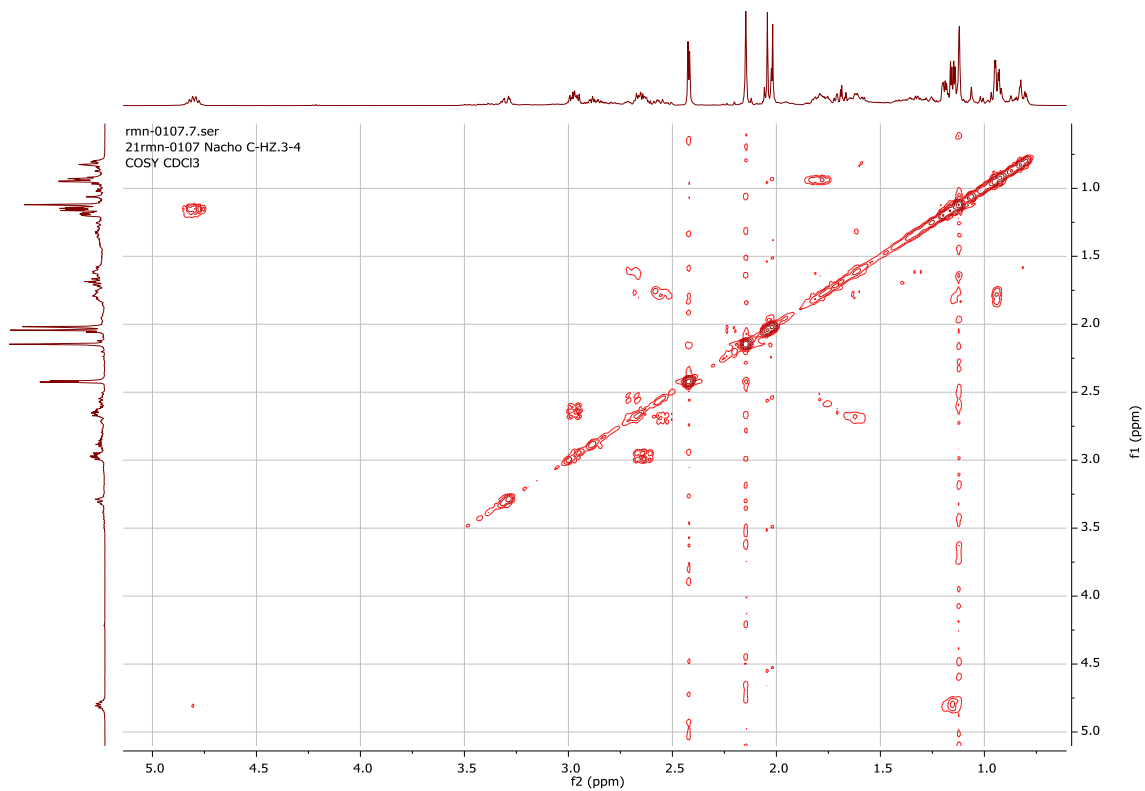
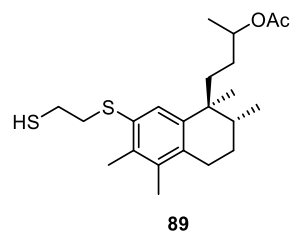


rmn-0107.3.fid

rmn-0107.2.fid

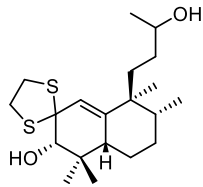
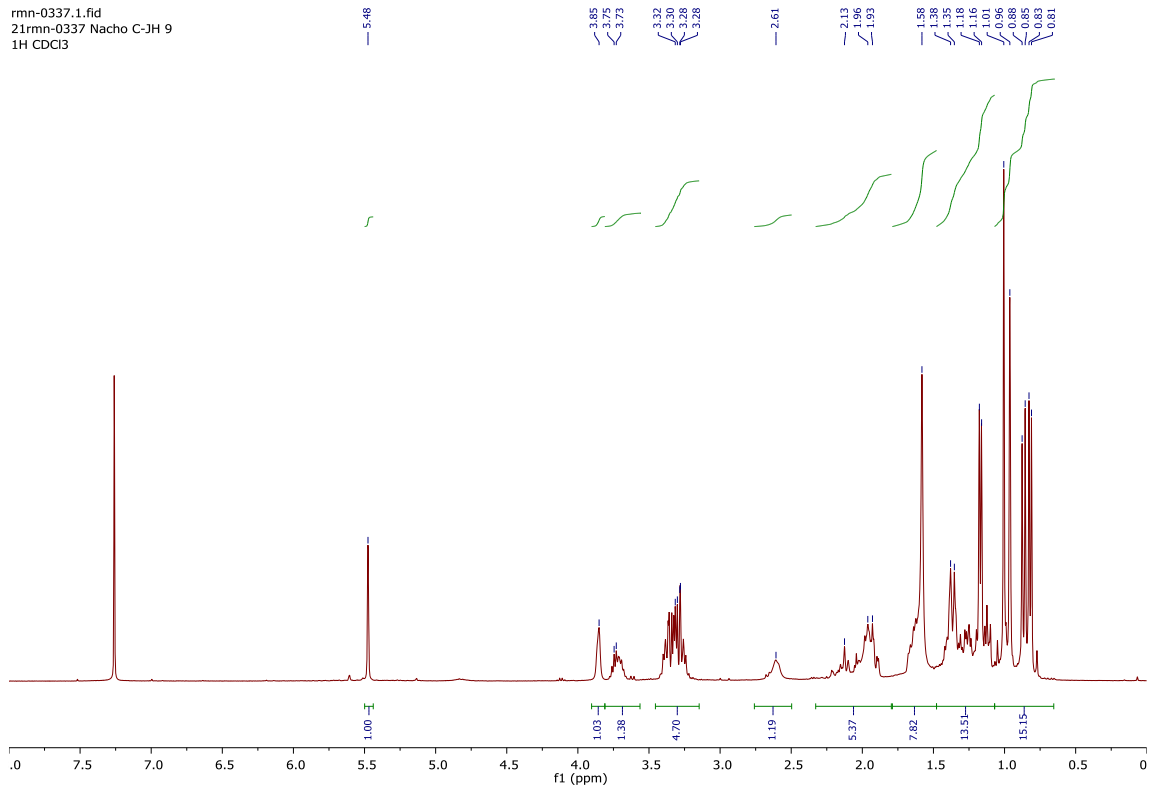






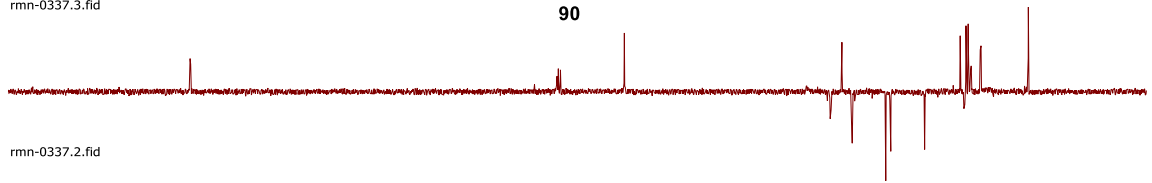
| Espectroscopía

rmn-0337.1.fid
21rmn-0337 Nacho C-JH 9
1H CDCl3

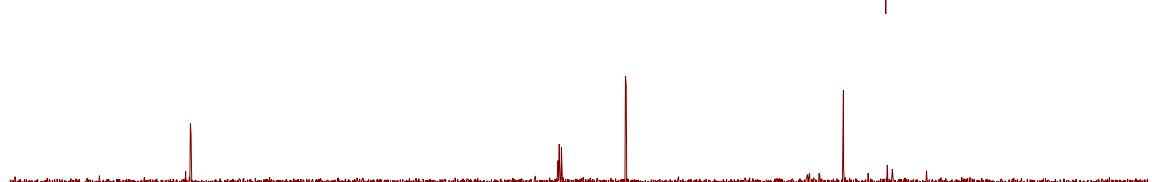


90

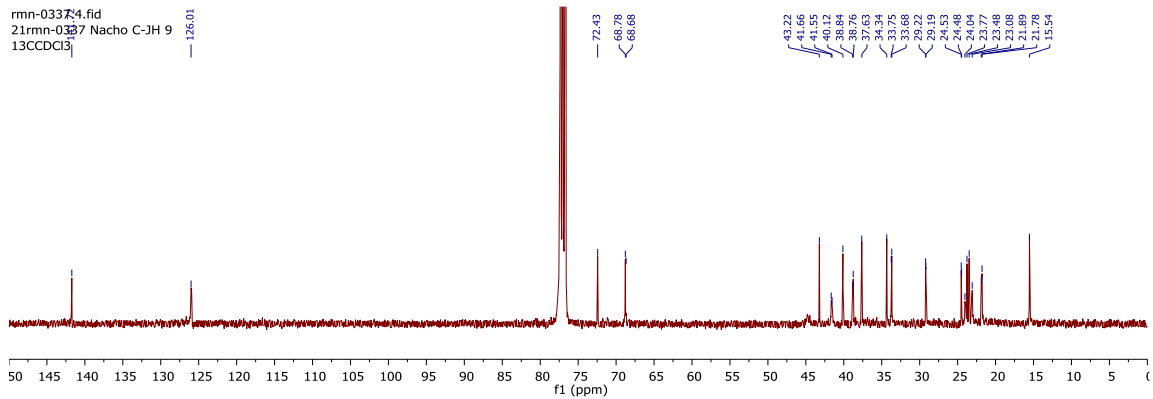
rmn-0337.3.fid

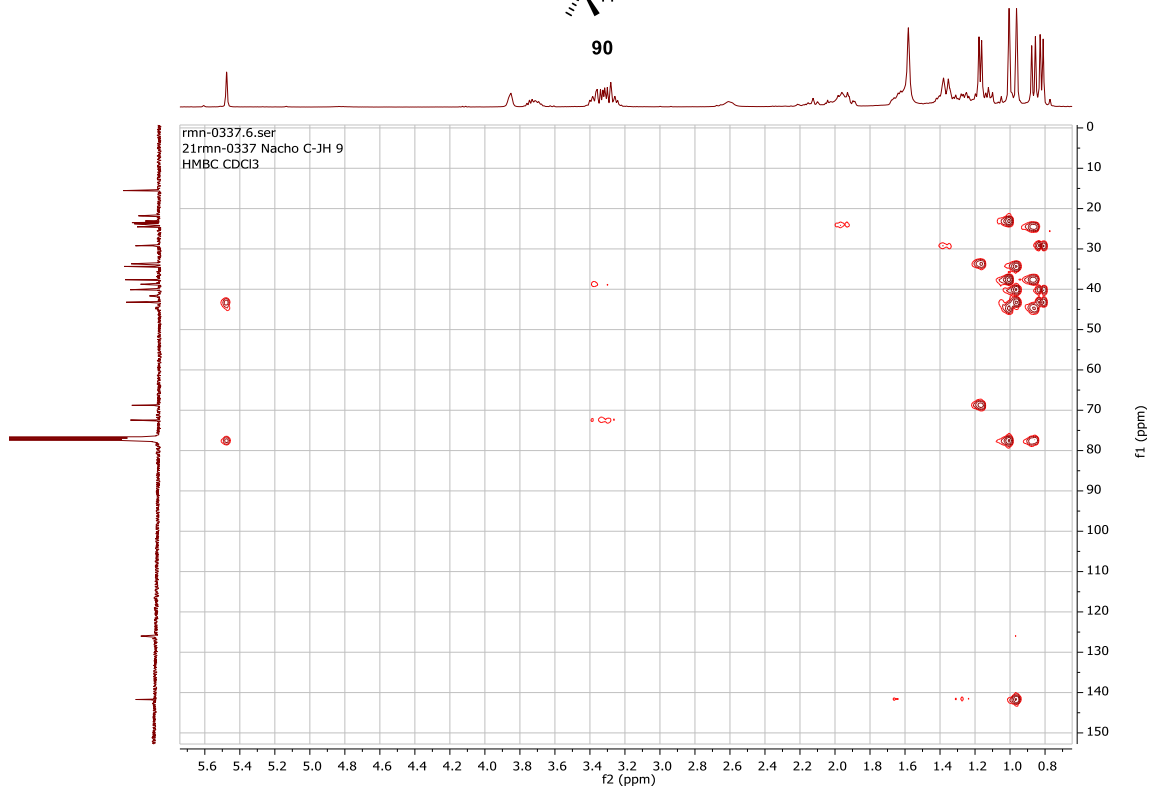
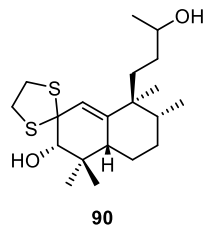
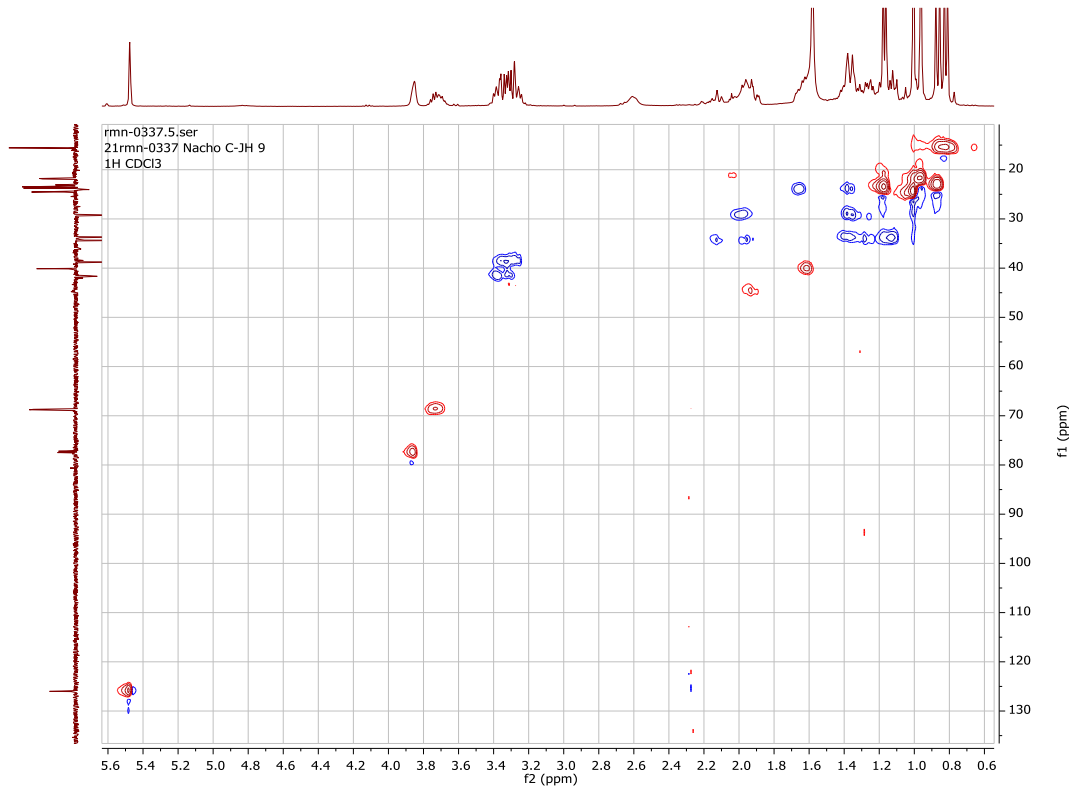


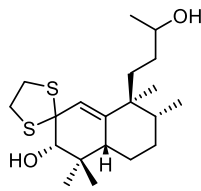
rmn-0337.2.fid



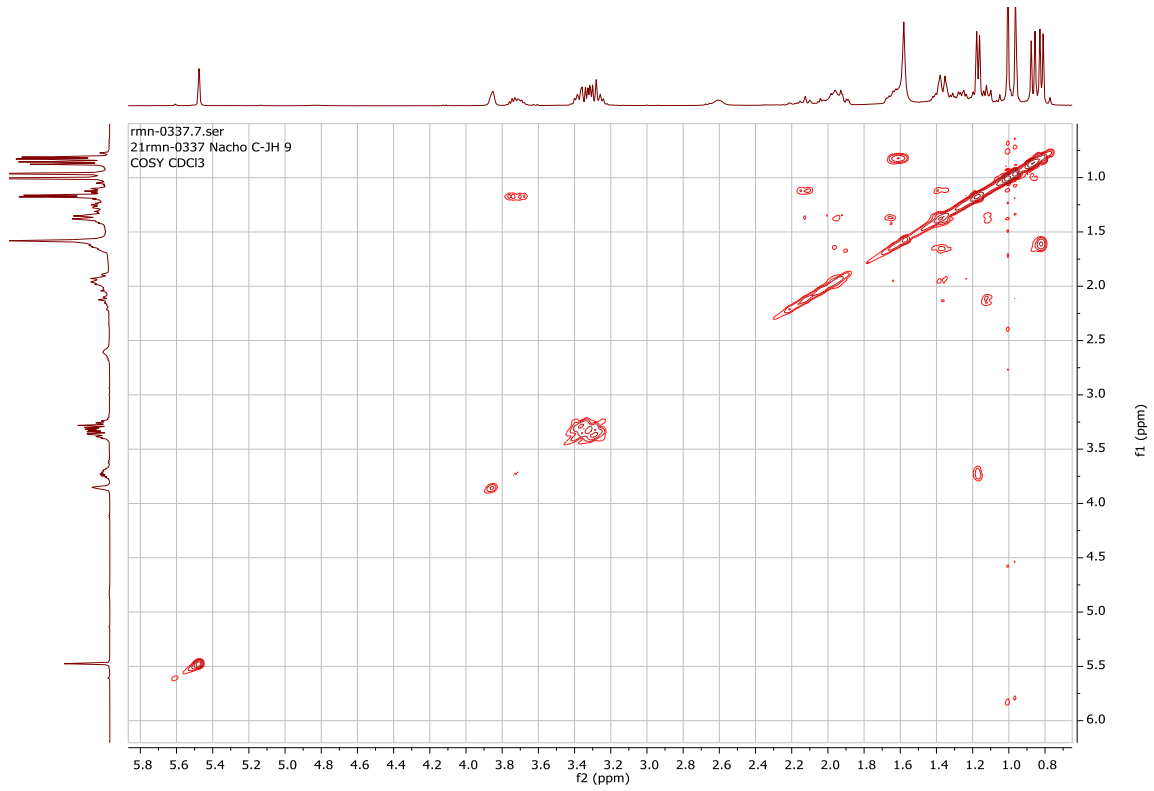
rmn-0337.4.fid
21rmn-0337 Nacho C-JH 9
13CCl3



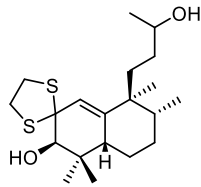
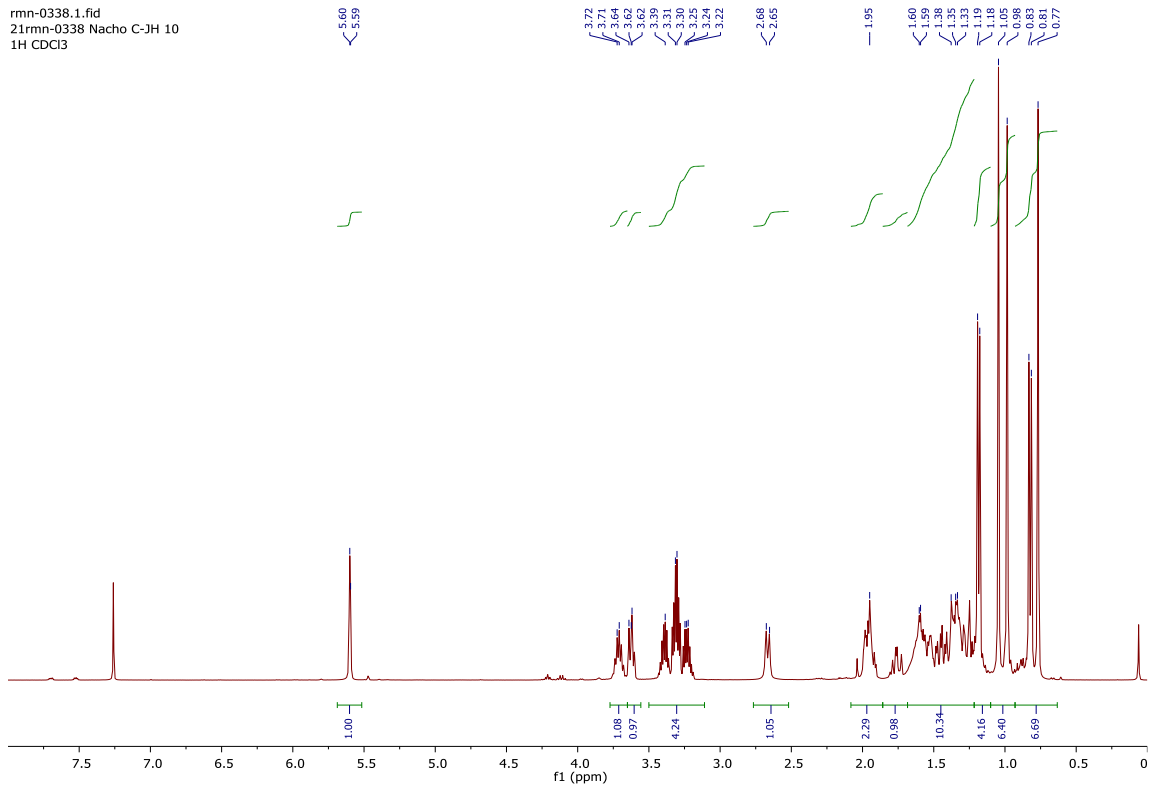




90



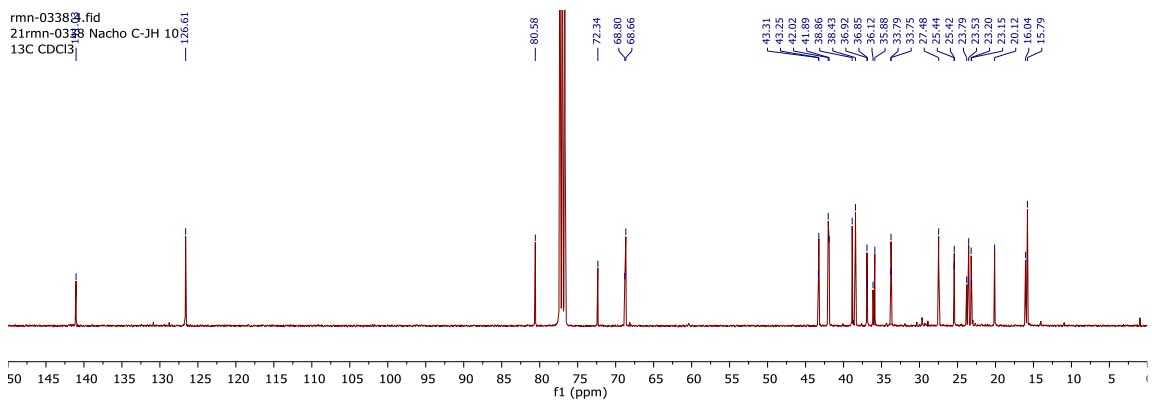
rmn-0338.1.fid
 211rmn-0338 Nacho C-JH 10
 1H CDCl₃

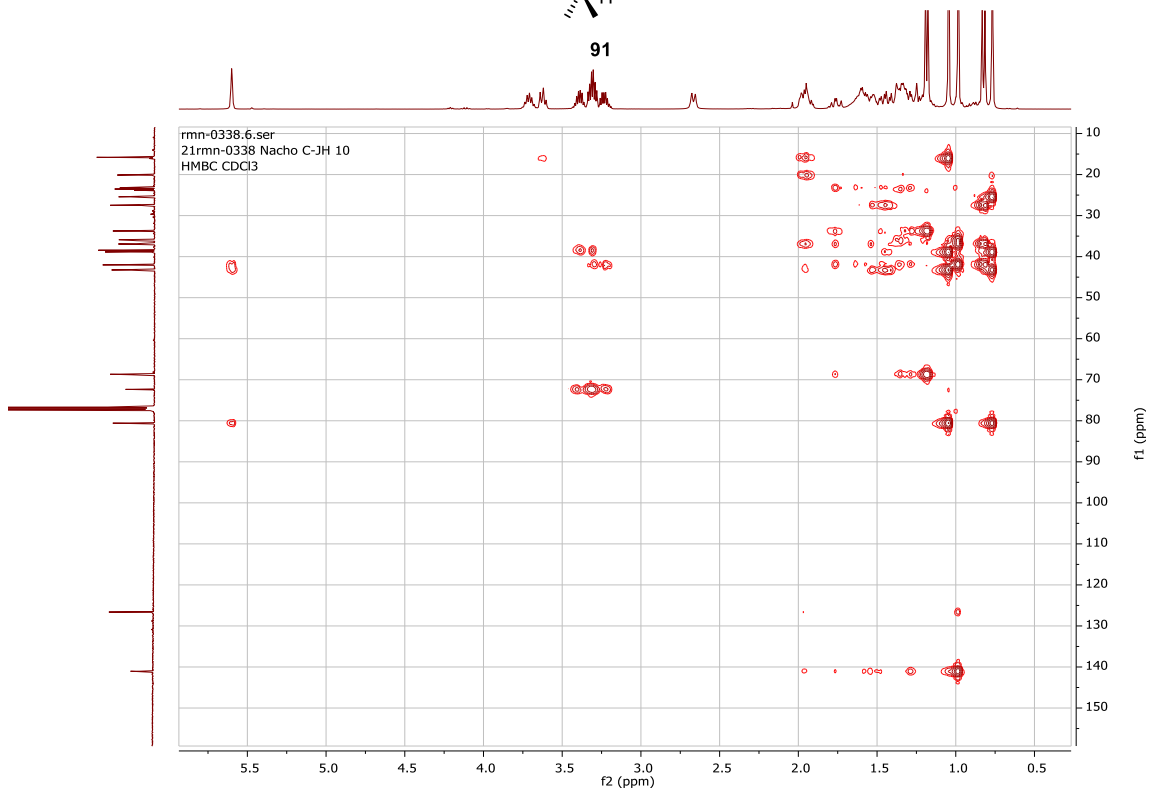
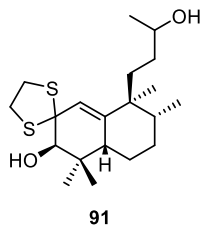
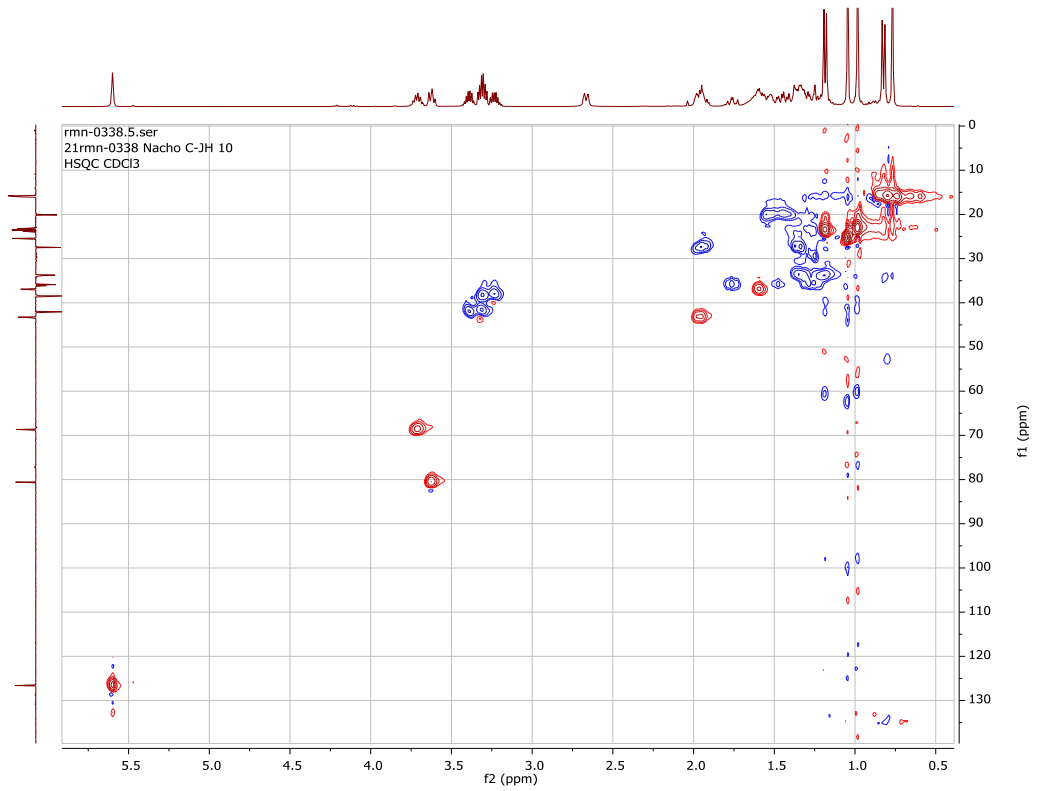


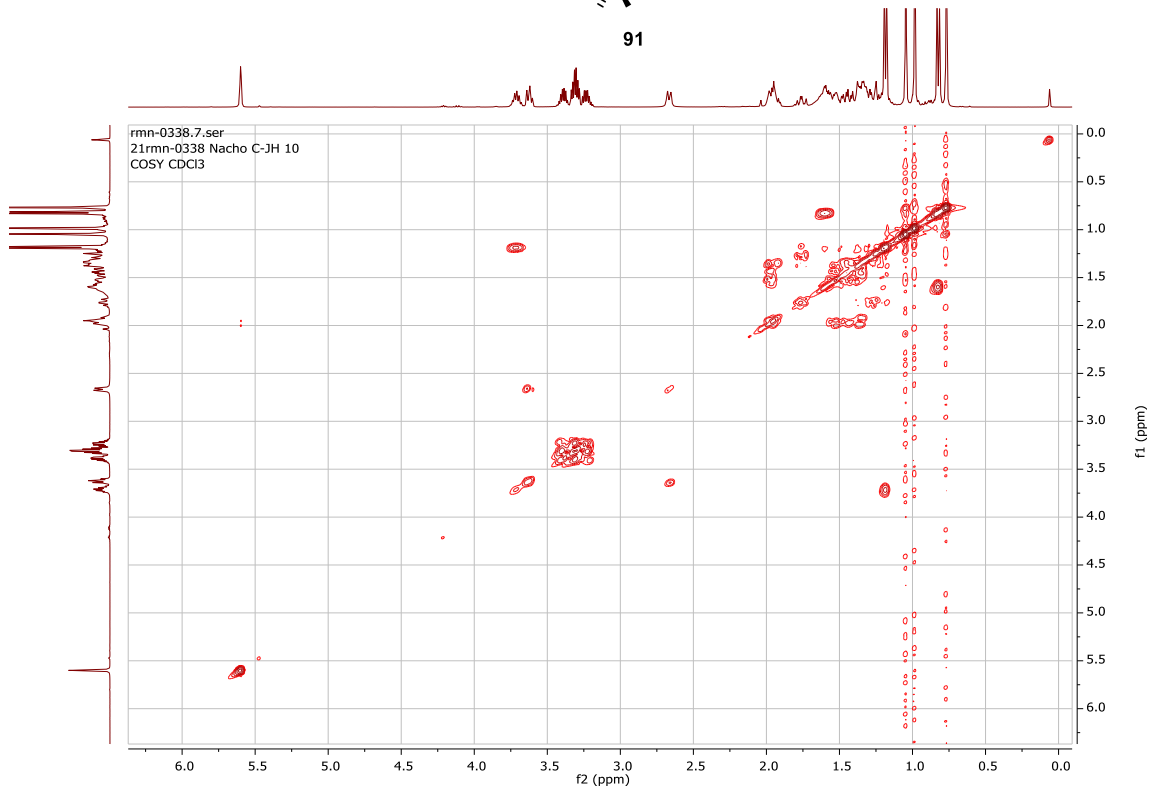
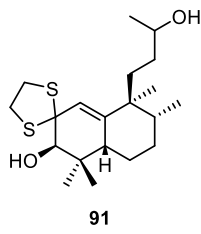
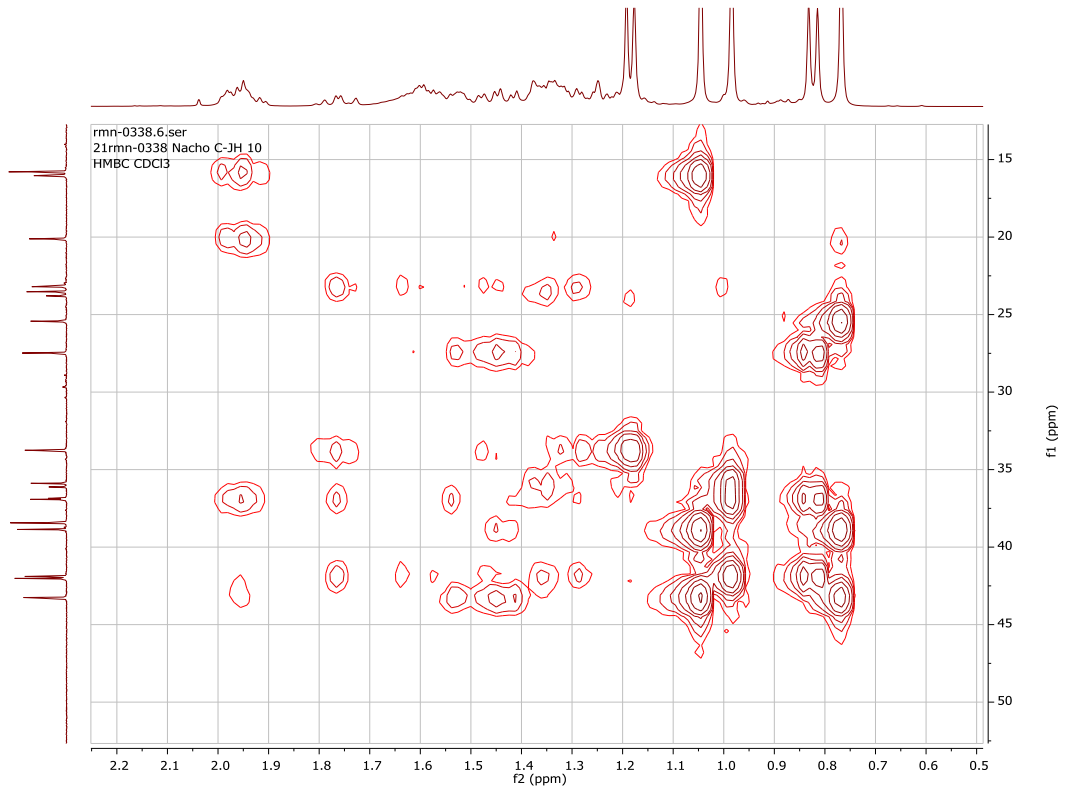
rmn-0338.3.fid

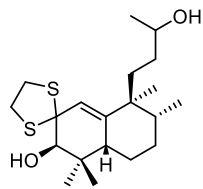
rmn-0338.2.fid

rmn-0338.3.fid
 211rmn-0338 Nacho C-JH 10
 13C CDCl₃

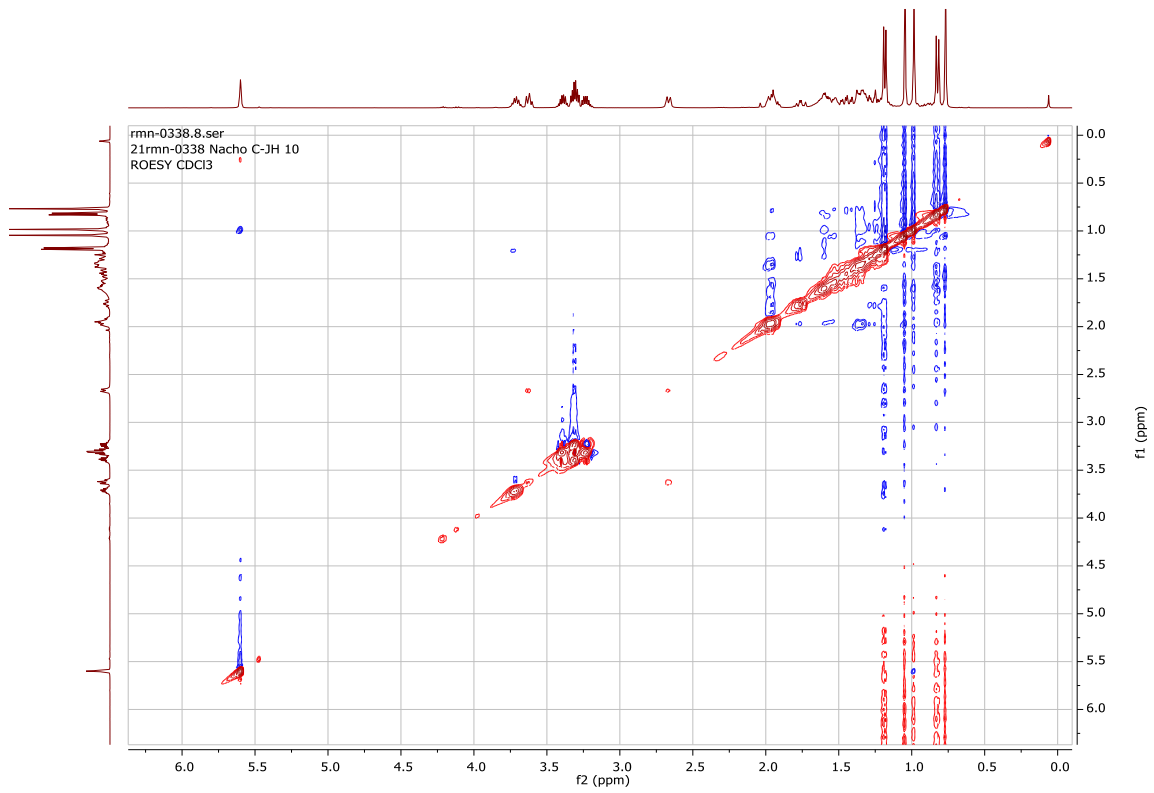




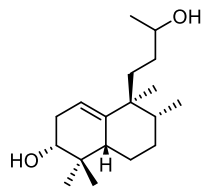
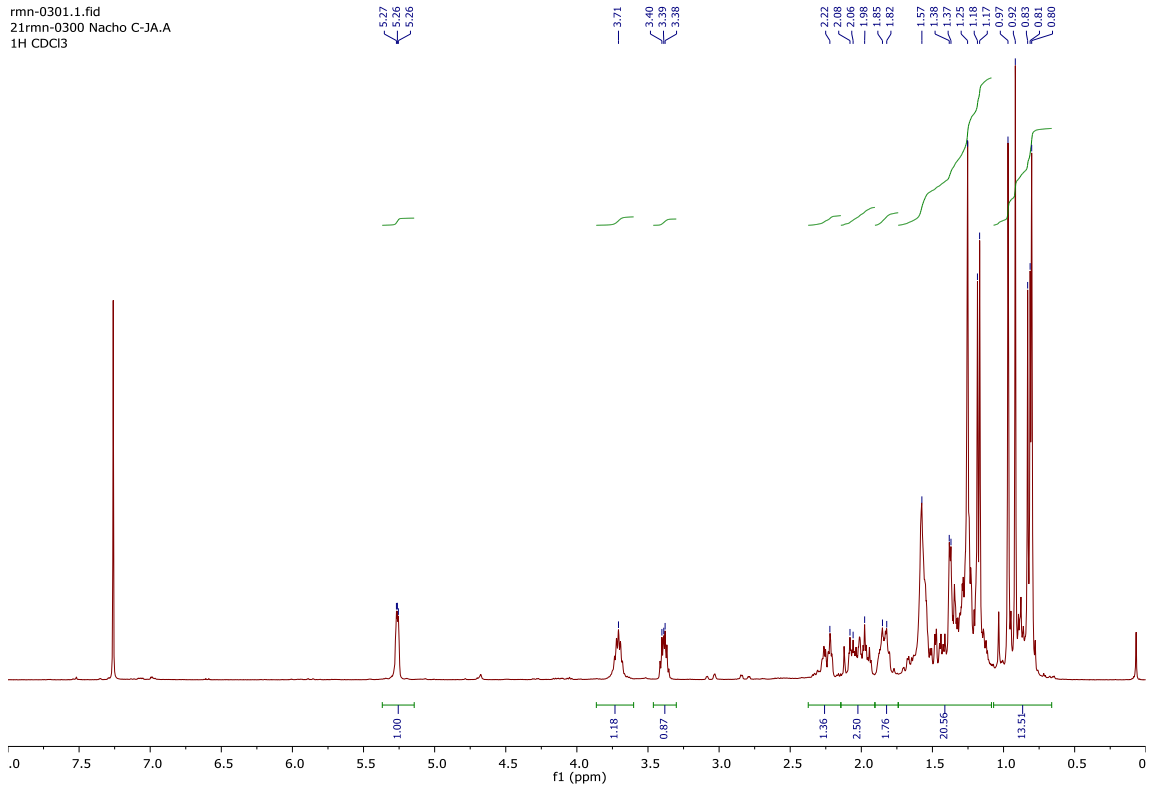




91



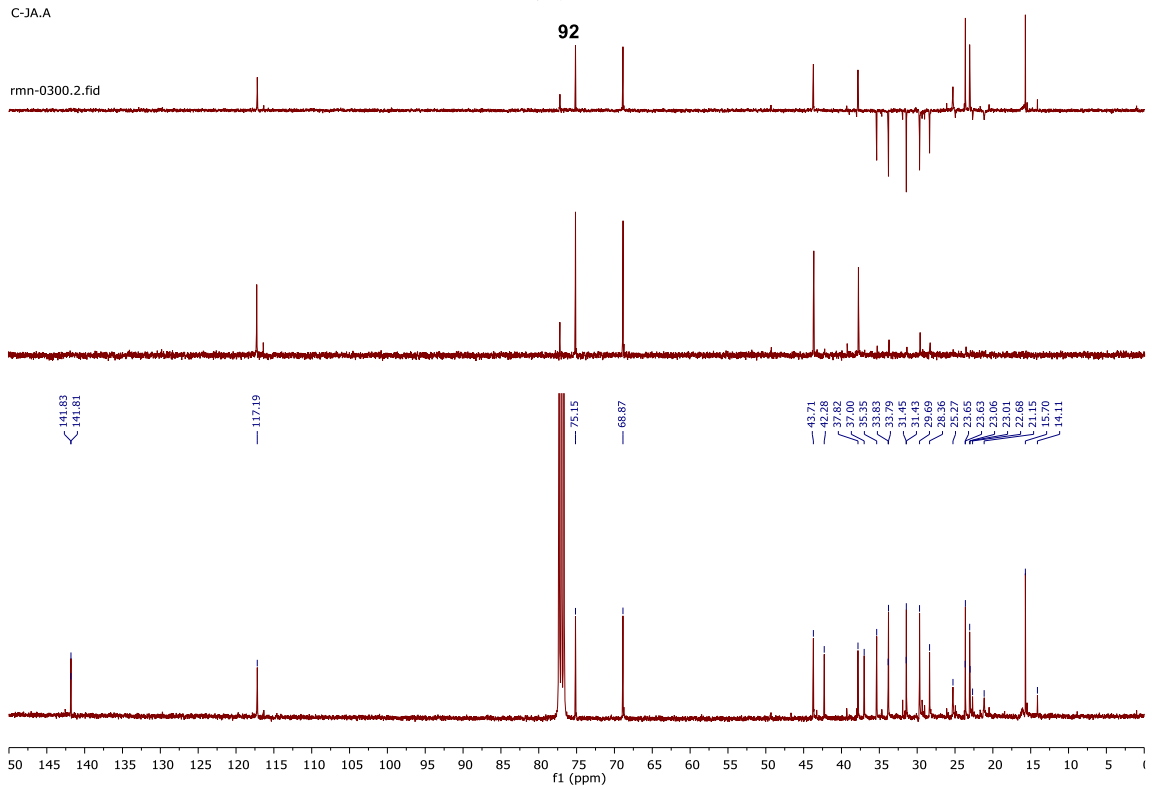
rmn-0301.1.fid
21rmn-0300 Nacho C-JA.A
1H CDCl3

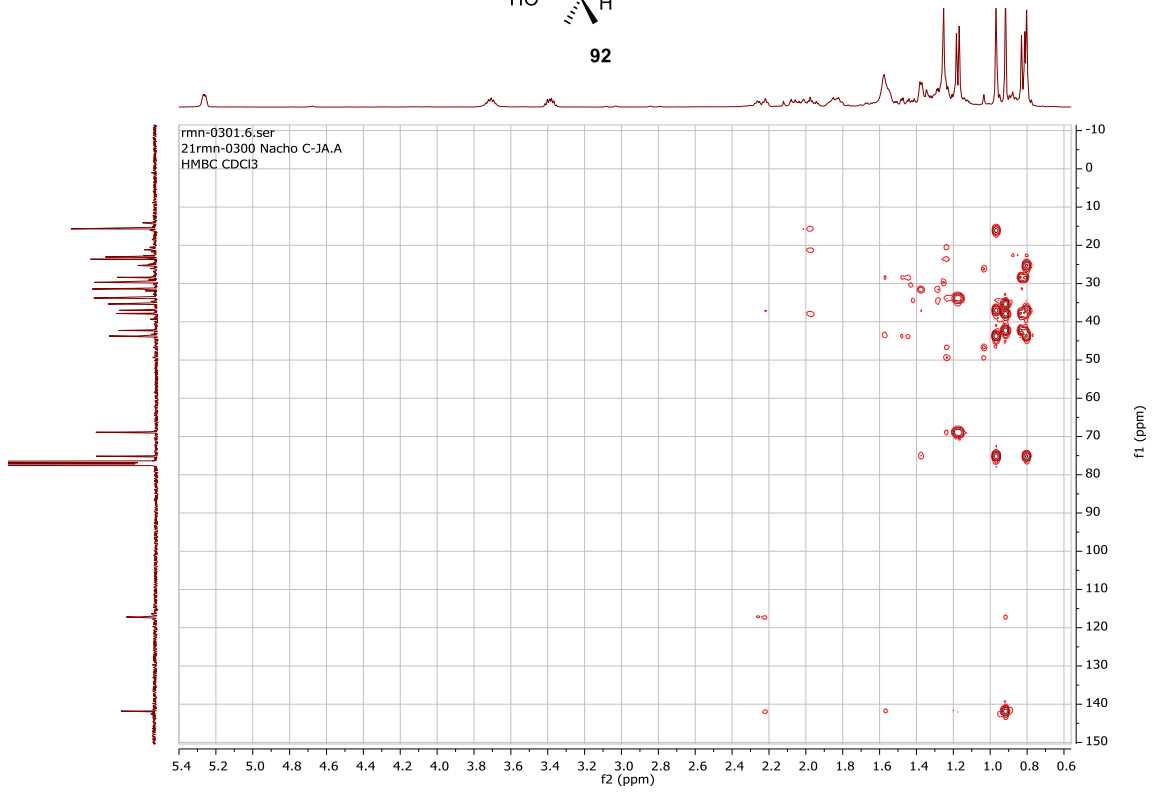
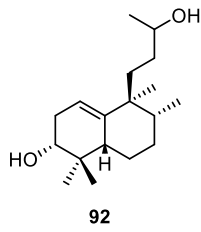
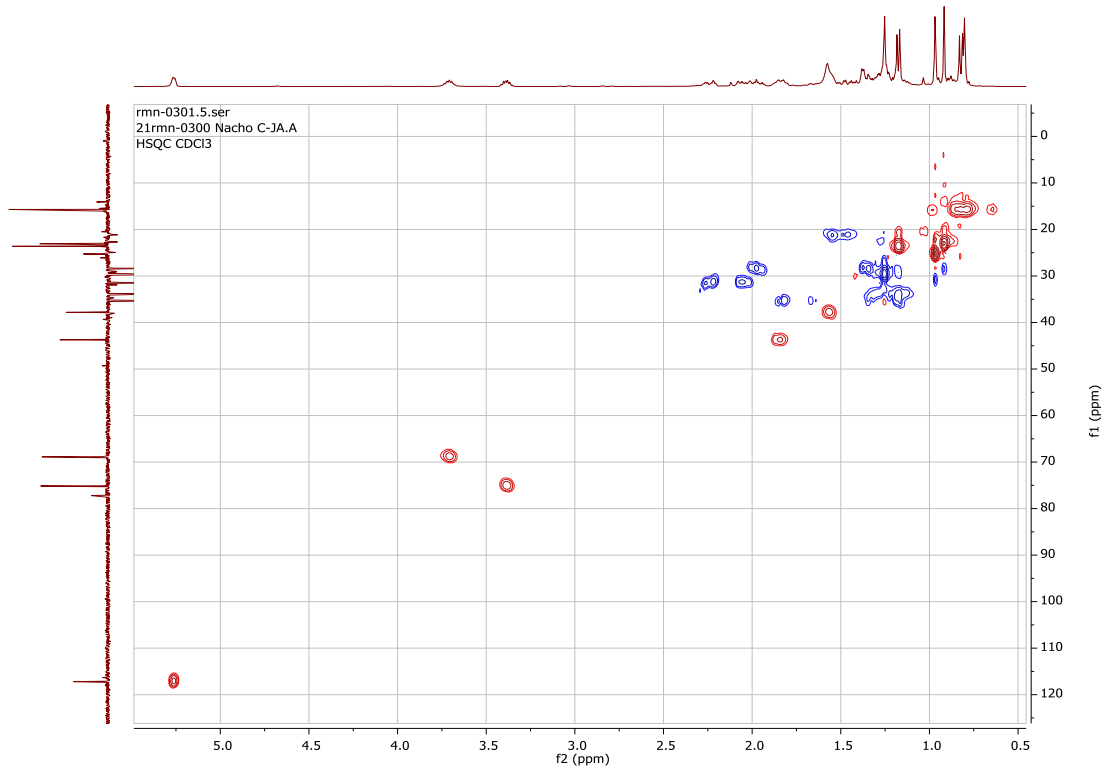


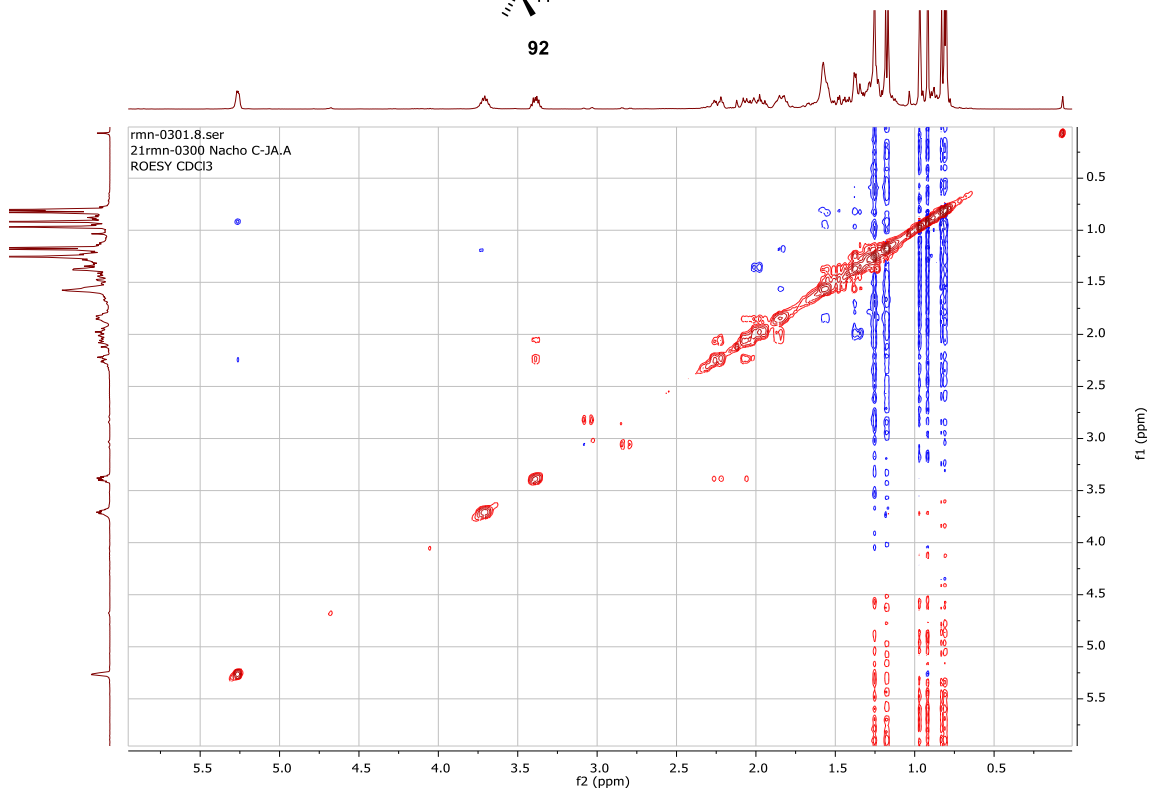
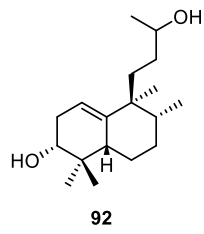
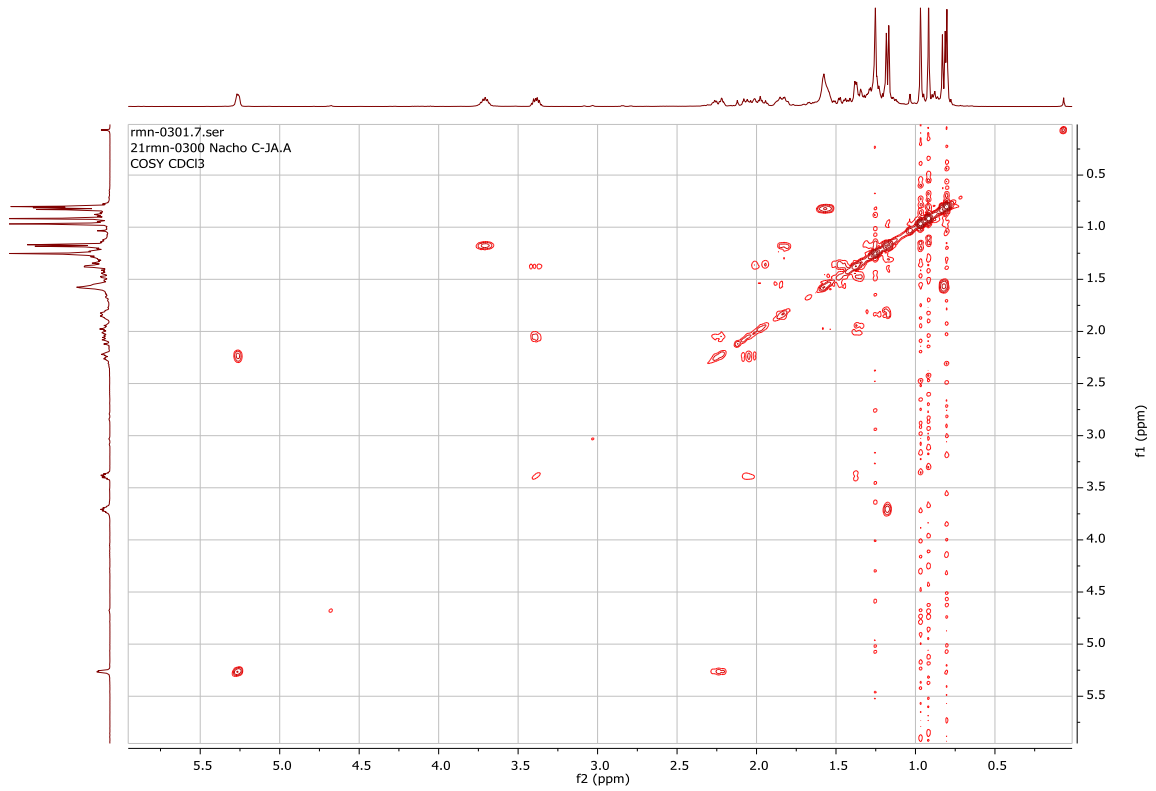
92

C-JA.A

rmn-0300.2.fid

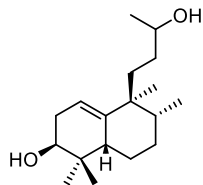
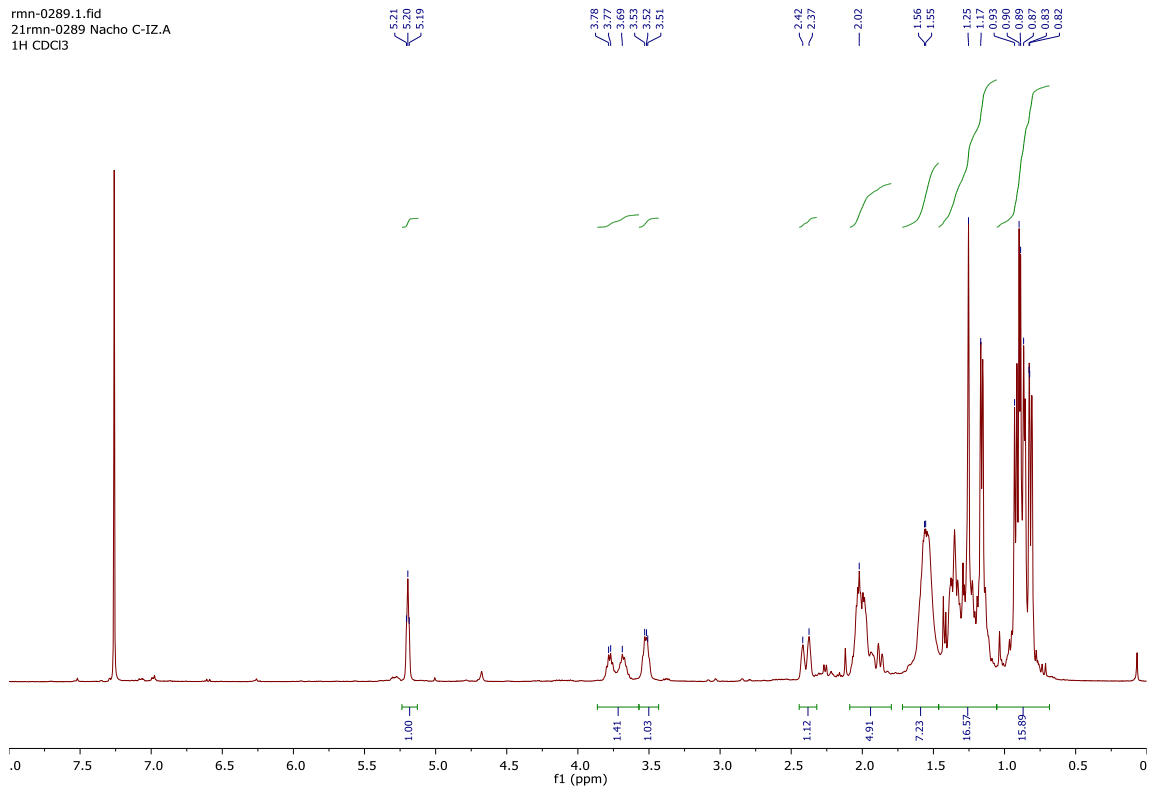






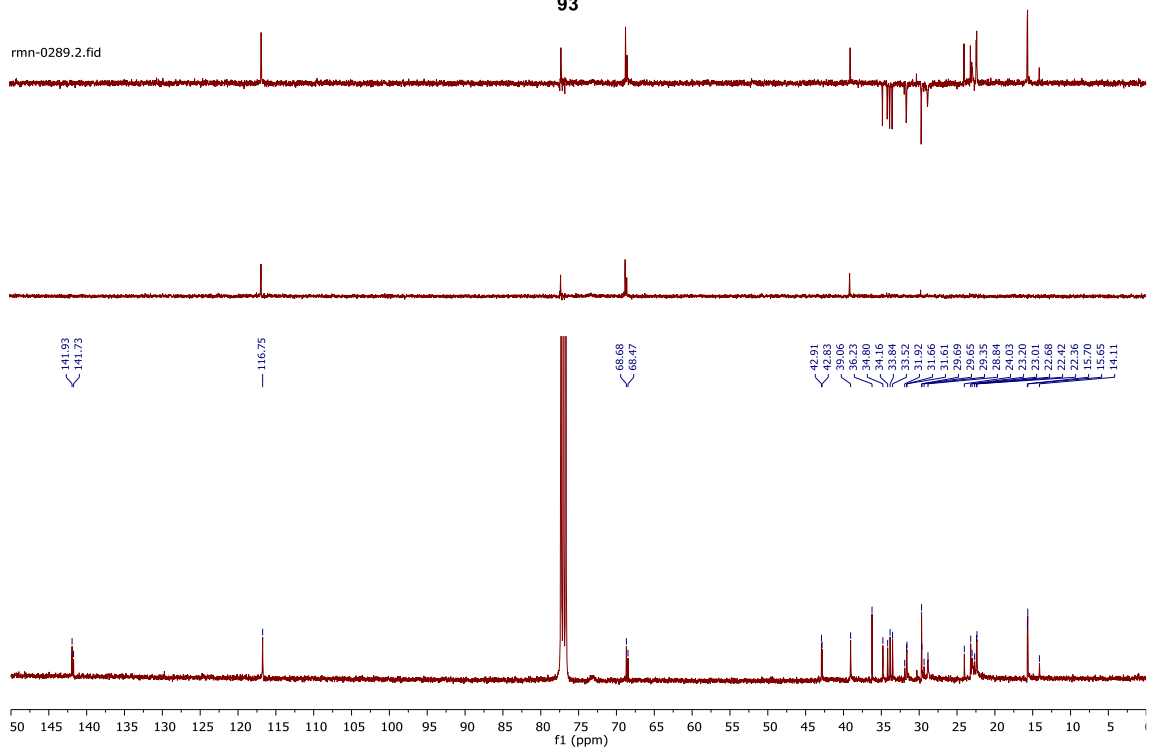
| Espectroscopía

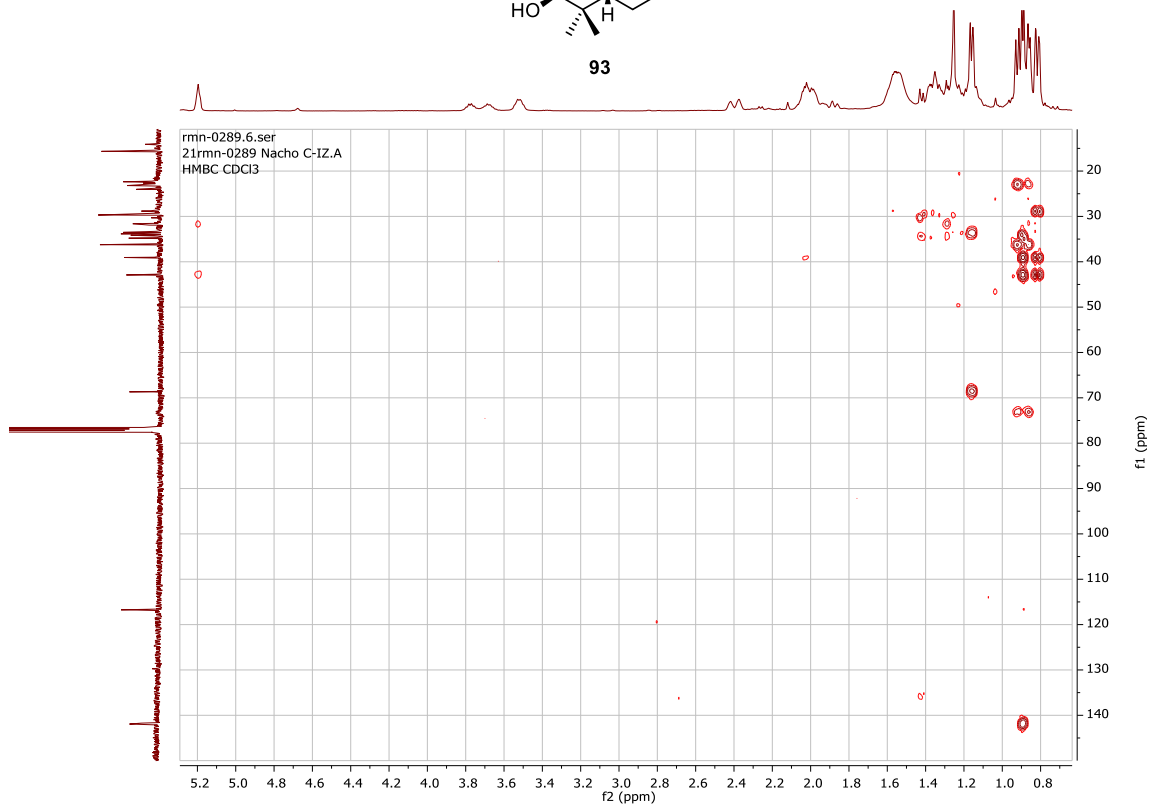
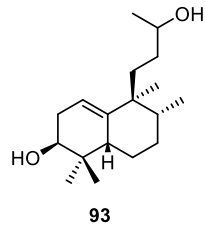
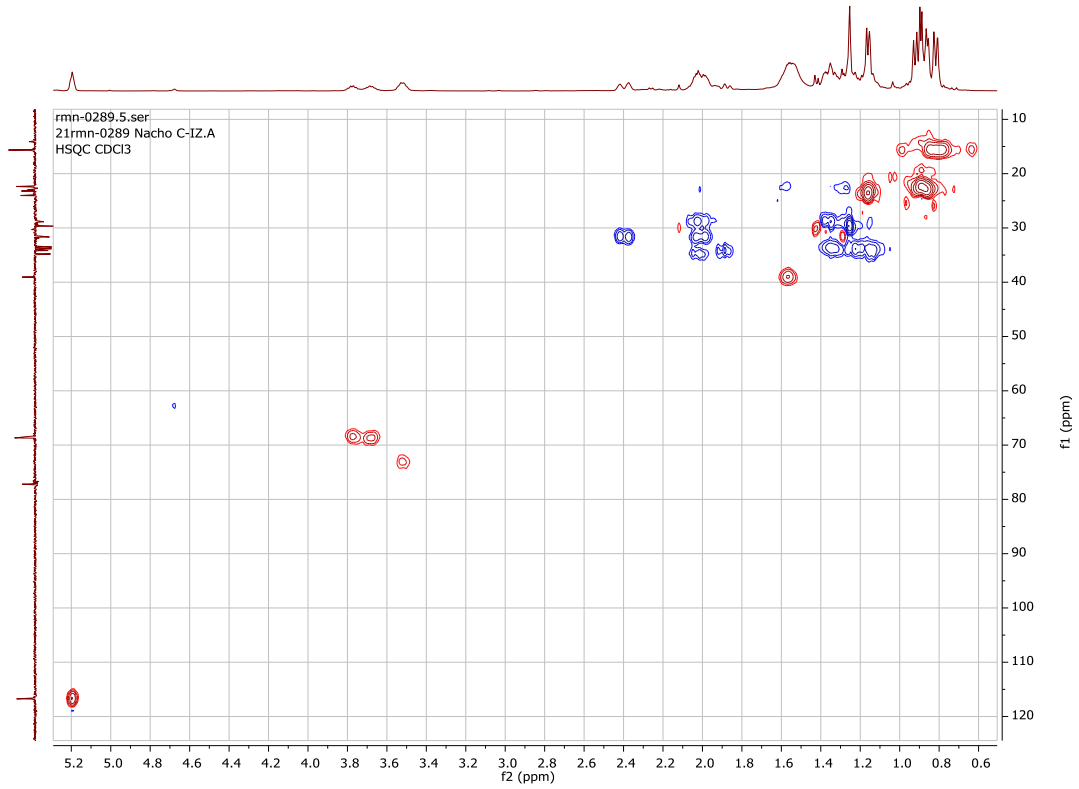
rmn-0289.1.fid
21rmn-0289 Nacho C-IZ.A
1H CDCl3

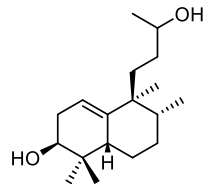


C-IZ.A

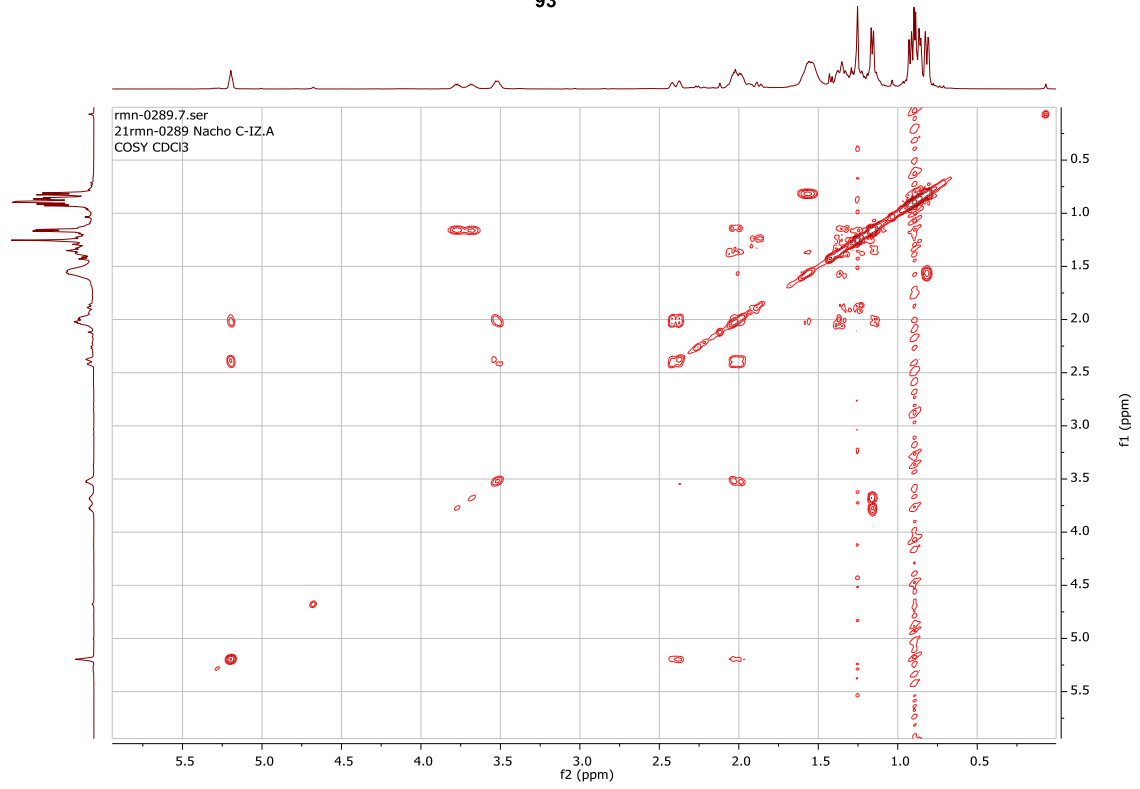
rmn-0289.2.fid



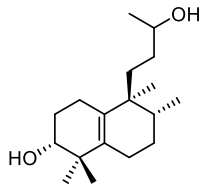
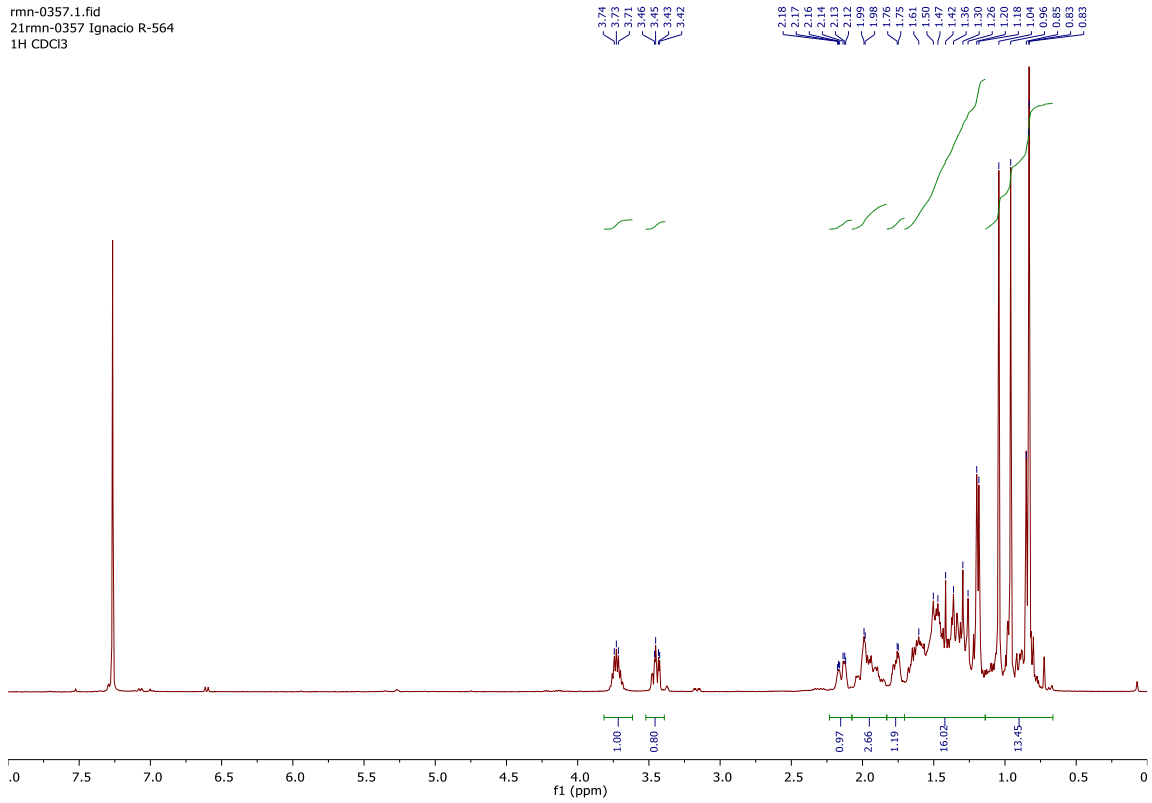




93



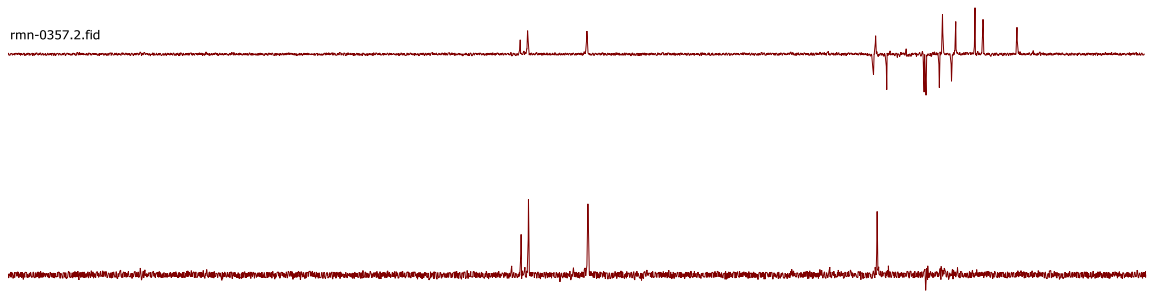
rmn-0357.1.fid
 211rmn-0357 Ignacio R-564
 1H CDCl3



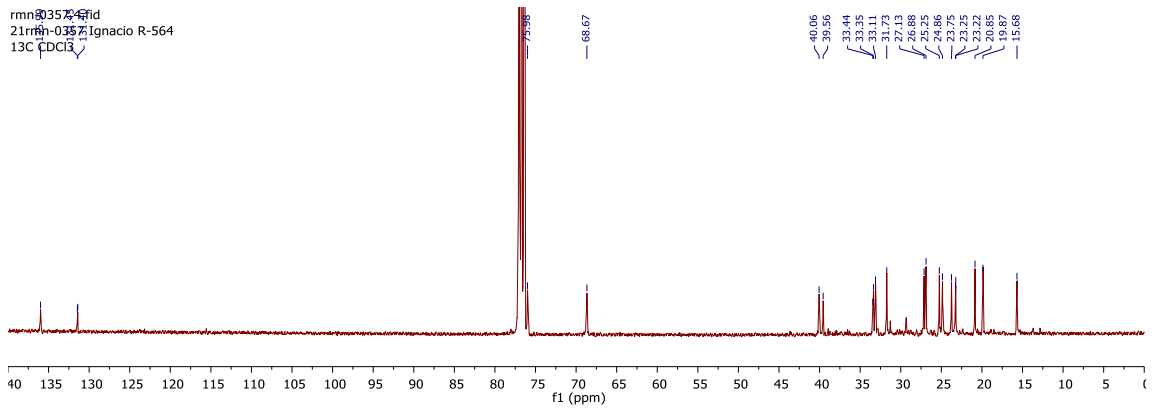
94

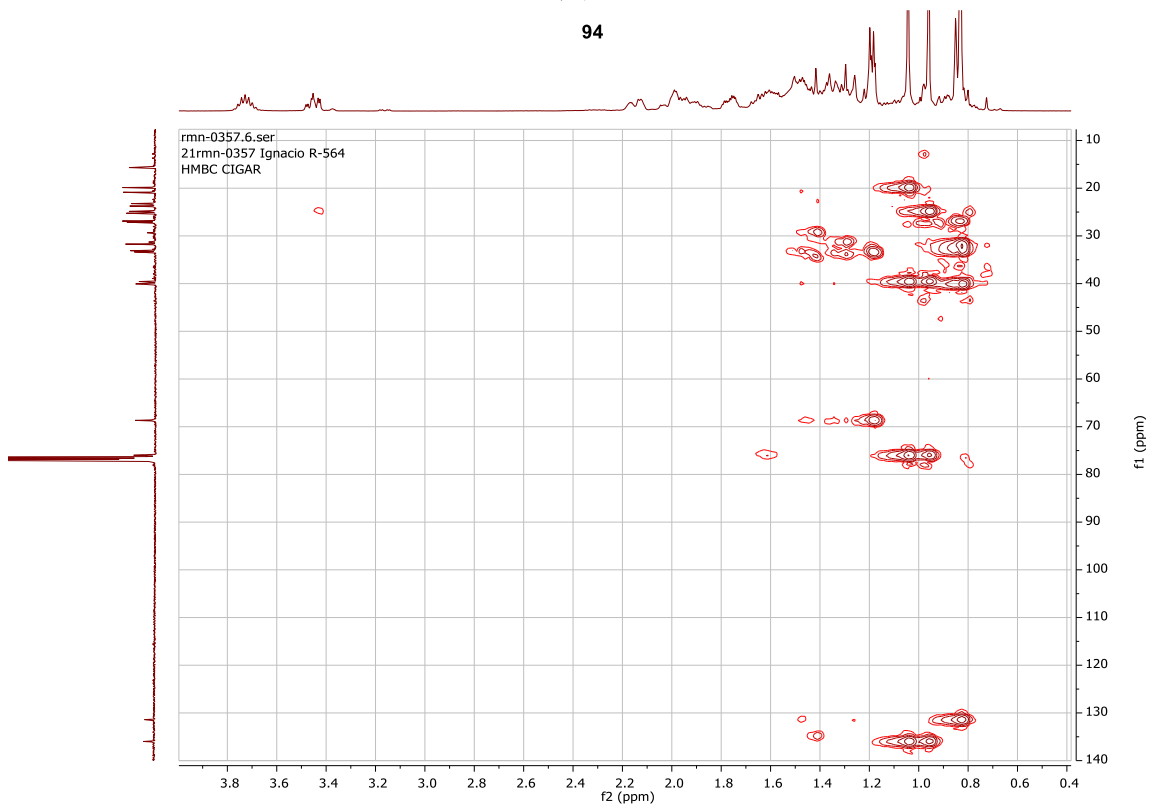
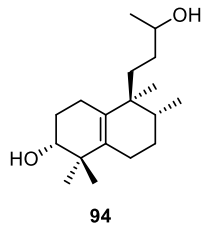
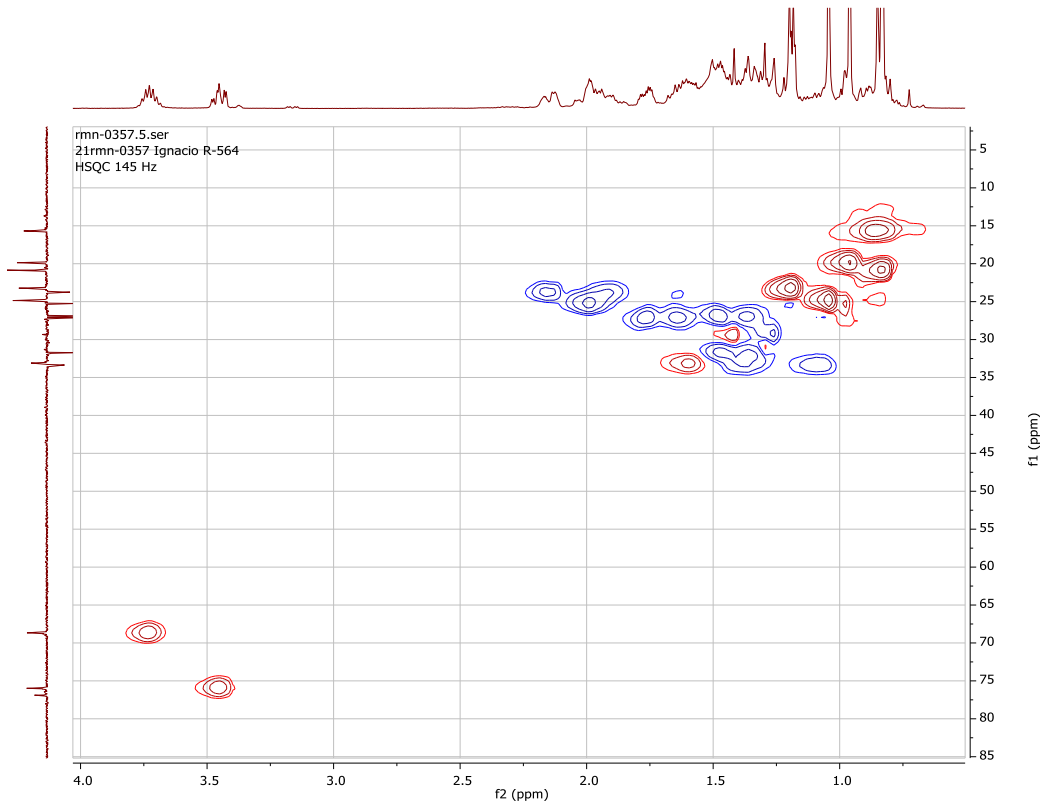
rmn-0357.3.fid

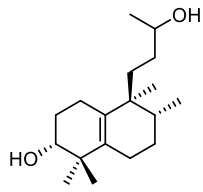
rmn-0357.2.fid



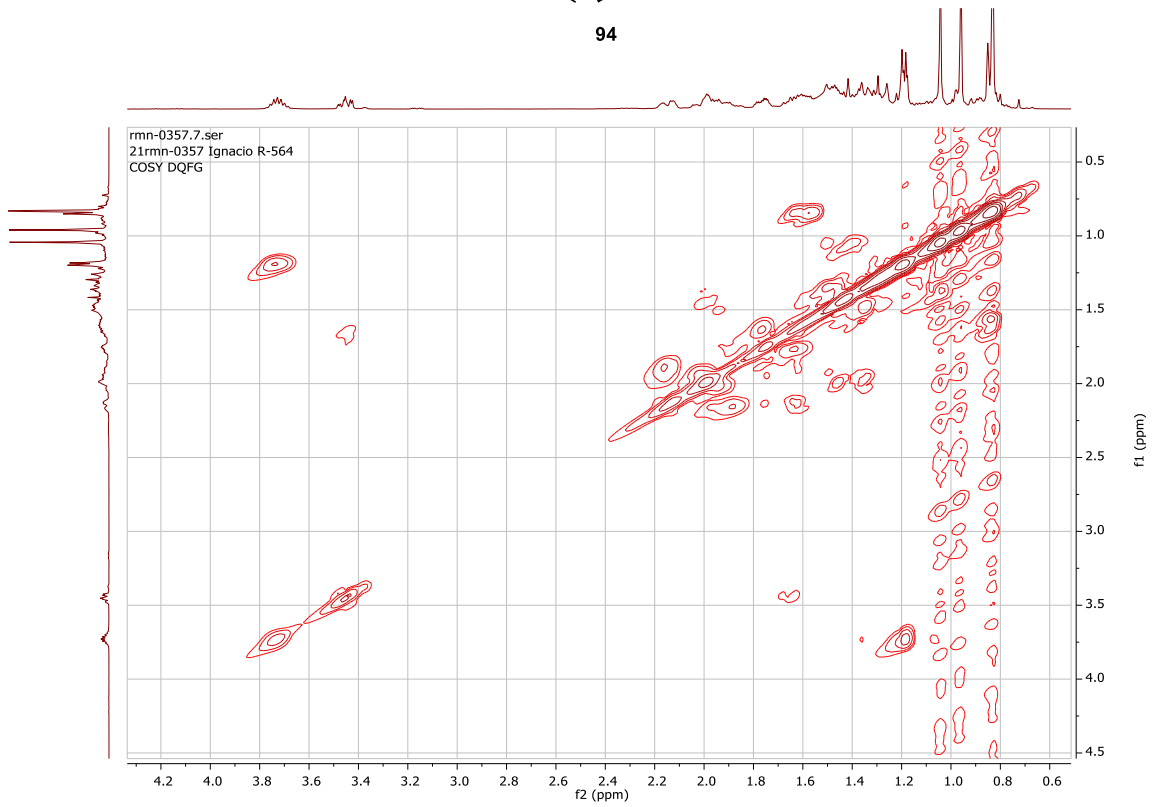
rmn-0357.4.fid
 211rmn-0357 Ignacio R-564
 13C CDCl3





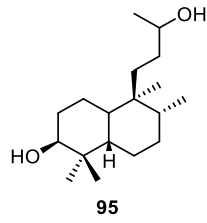
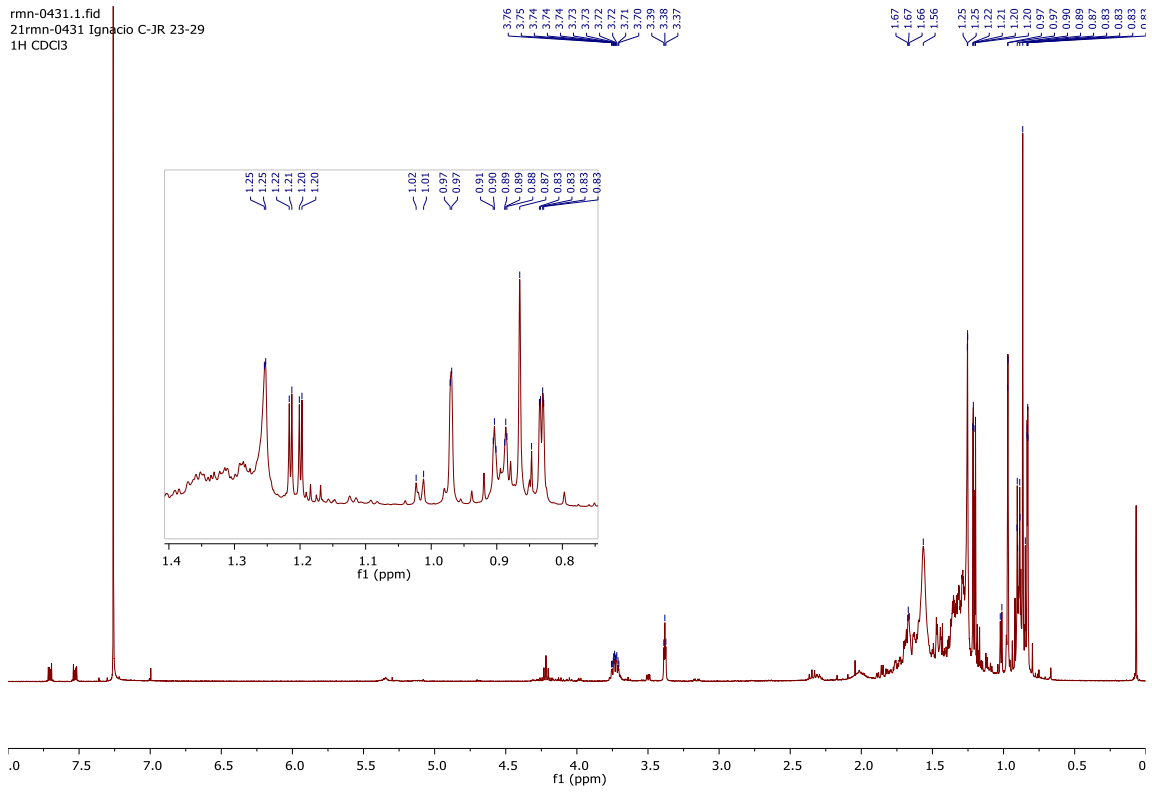


94



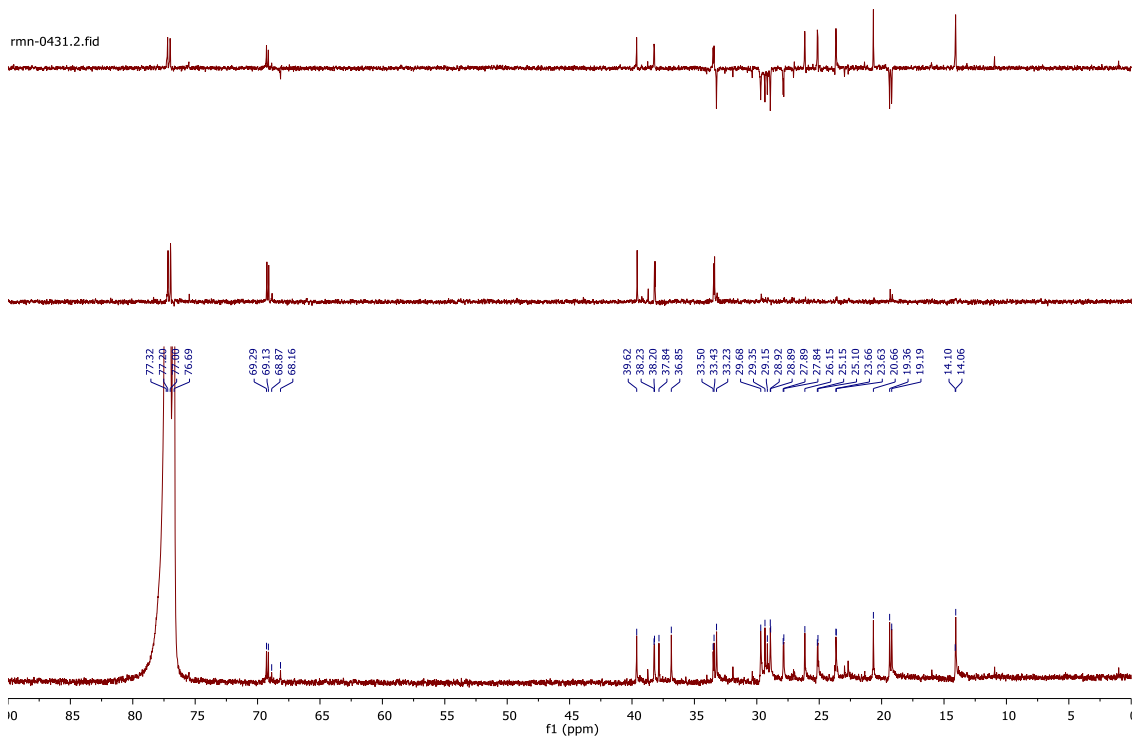
| Espectroscopía

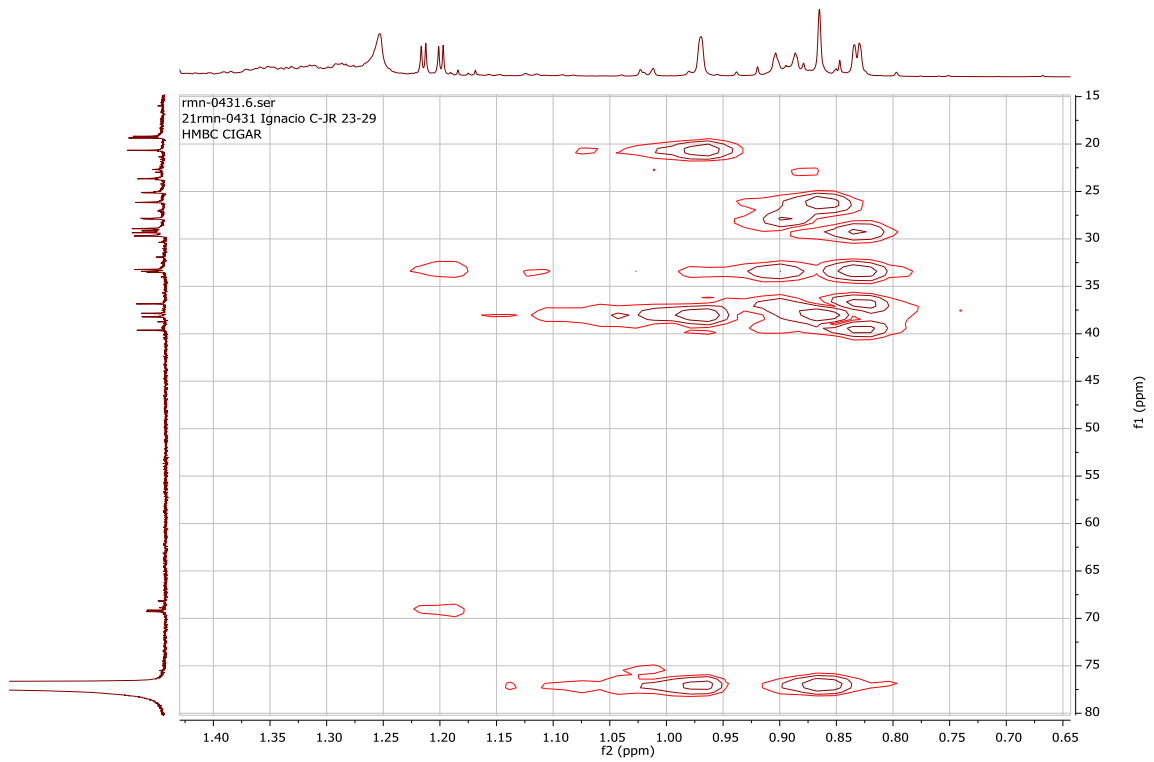
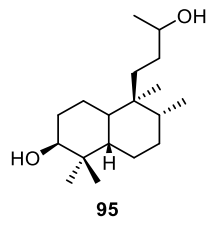
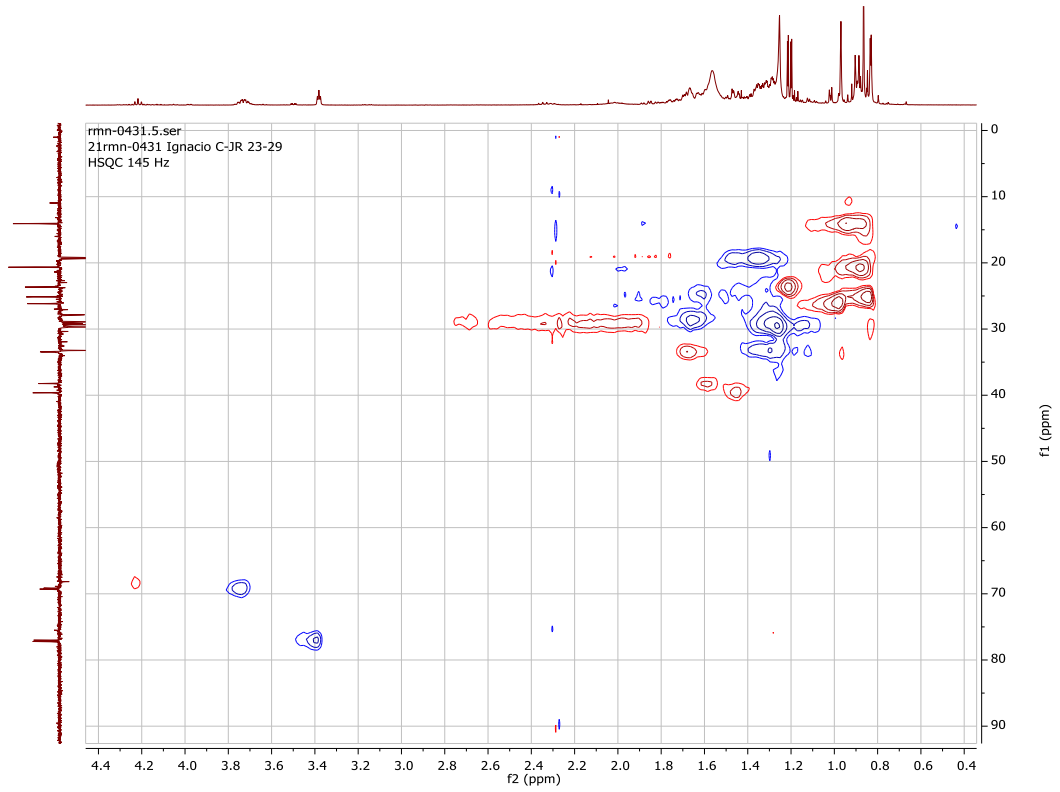
rmn-0431.1.fid
21rmn-0431 Ignacio C-JR 23-29
1H CDCl3

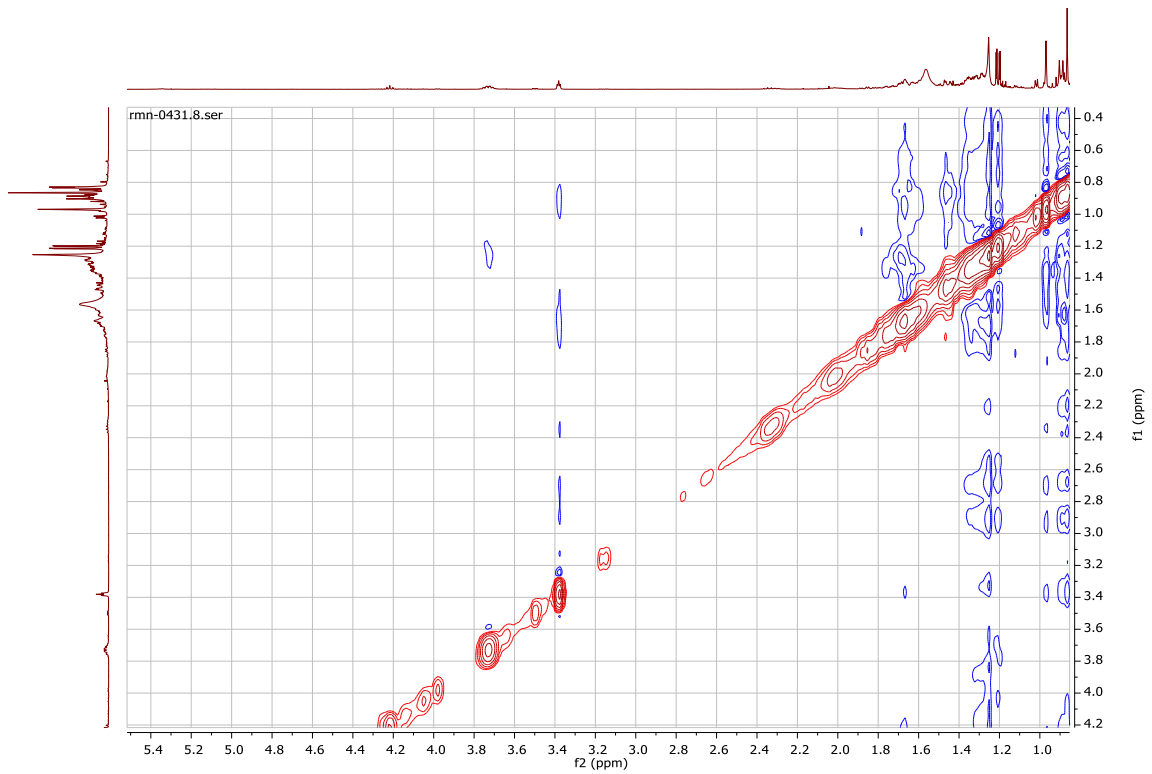
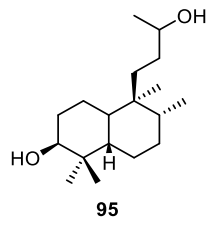
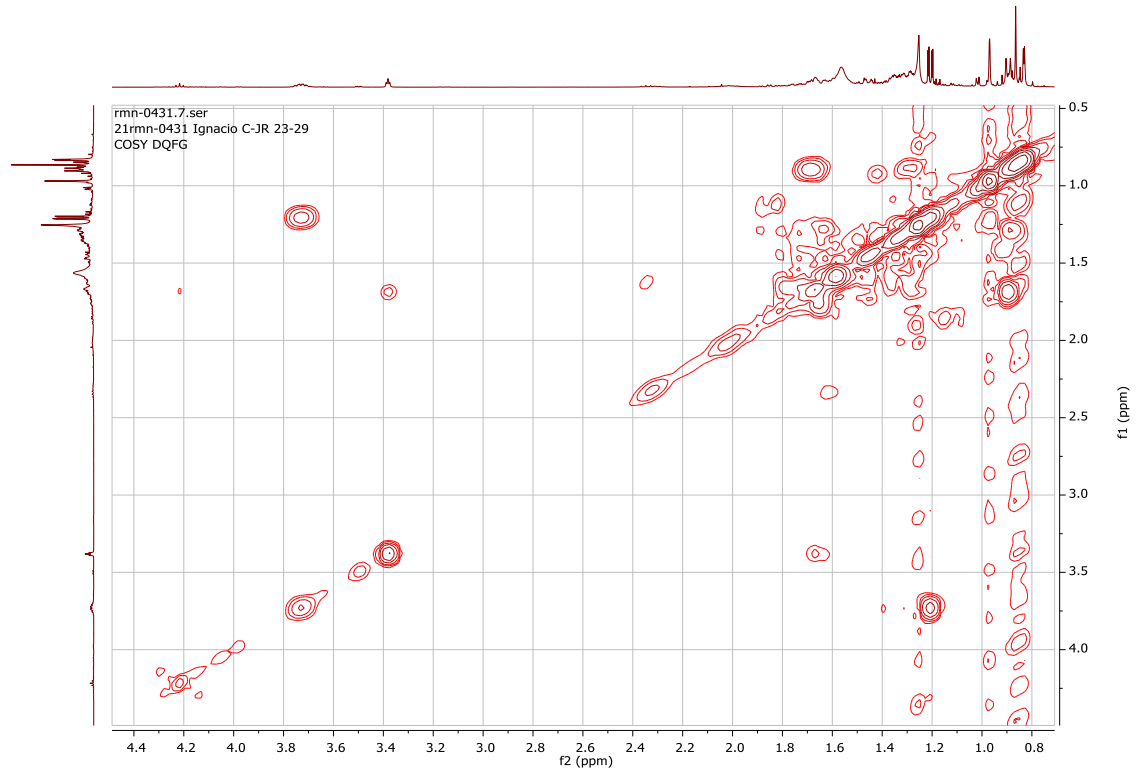


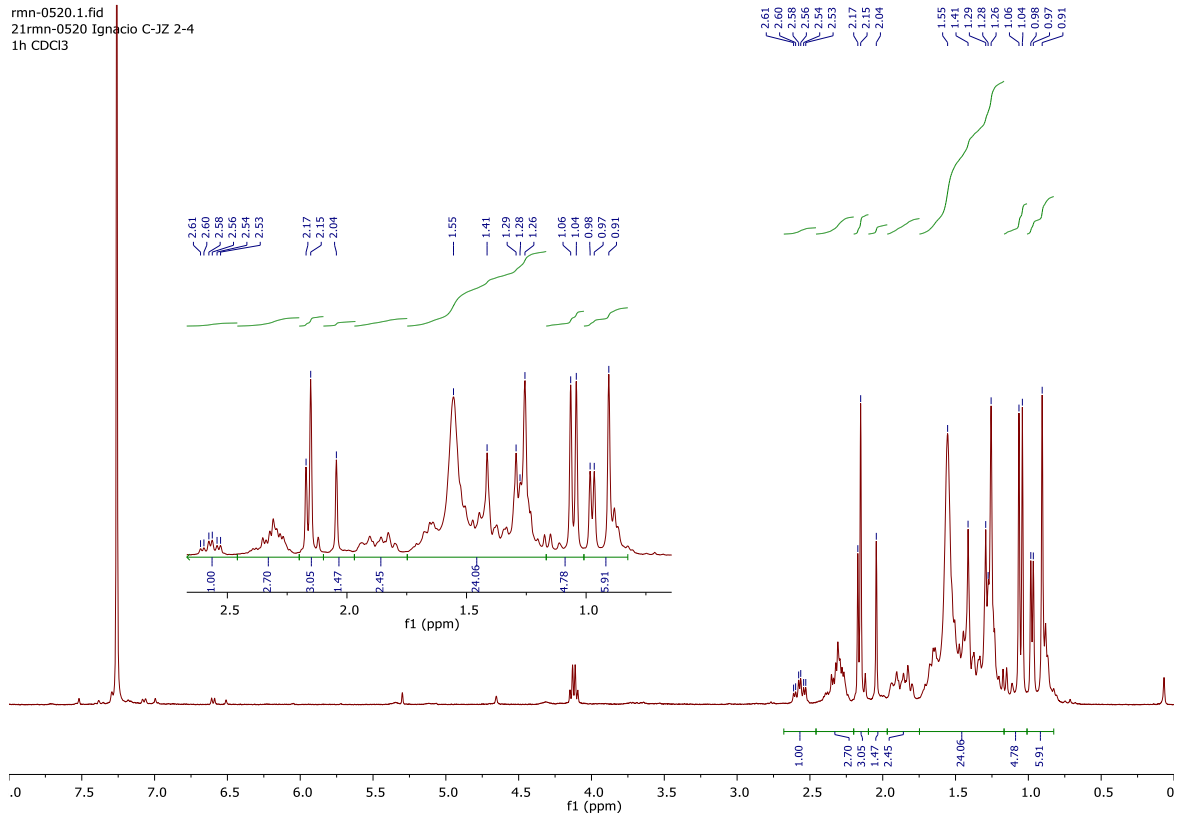
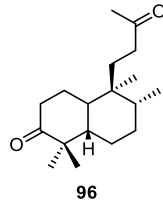
rmn-0431.3.fid

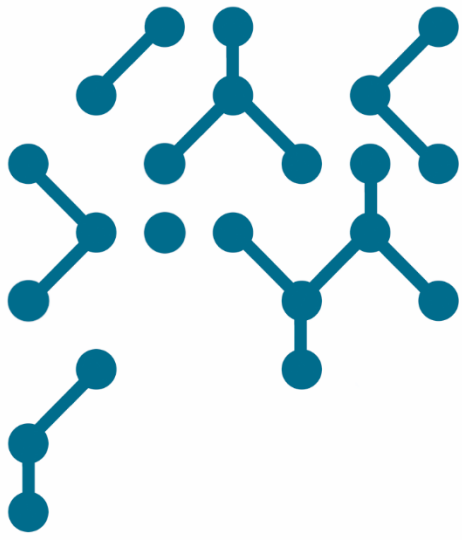
rmn-0431.2.fid











Tablas de RMN ^{13}C

^{13}C NMR Tables



Relación de moléculas y tabla en la que se recoge su espectro de RMN ¹³C

<i>nº de molécula</i>	Tabla RMN ¹³ C
2	1
3	3
4	4
5	1
6	10
7	10
8	1
10	2
11	2
12	2
13	2
15	3
16	3
18	3
19	3
23	4
24	4
25	4
26	4
28	5
30	5
31	5
32	5
33	6
34	6
35	10
36	10
38	10
39	10
44	9
46	8
47	8
49	9

<i>nº de molécula</i>	Tabla RMN ¹³ C
54	11
55	11
56	12
57	11
58	11
59	12
60	19
61	19
62	20
63	20
64	20
73	12
74	12
75	13
76	13
78	18
79	18
80	18
83	13
84	13
85	14
86	14
87a	14
87b	14
88a	15
88b	15
89	15
90	16
91	16
92	16
93	16
94	17
95	17

Tabla RMN ¹³C - 1

C/nº	2	5	8	
1	68.3	66.2	66.1	66.1
2	32.9	31.9	29.9	29.9
3	25.7	25.9	26.1	26.1
4-6			29.9-29.1	29.9-29.1
4-8	32.1-27.1	31.9-29.3		
7			26.8	
8			41.3*	26.8
9	130.2*	130.0*	41.4	41.3*
10	130.0*	129.7*	41.0*	41.4
11			26.8	41.0*
12				26.8
11-15	32.1-27.1	31.9-29.3		
12-15			29.9-29.1	66.1
16	32.1	32.1	32.1	29.9
17	22.9	22.6	22.9	26.1
18	14.4	14.1	14.4	29.9-29.1
1'		59.3	59.5	29.9-29.1
2'		66.0	66.4	32.1
NMe ₃		54.3	54.5	22.9

*Los valores pueden interconvertirse

Tabla RMN ¹³C - 2

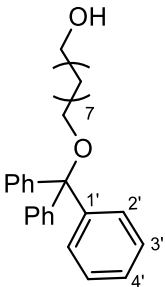
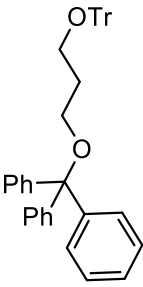
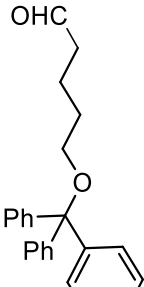
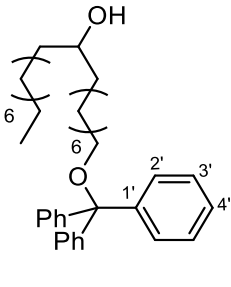
				
C/nº	10	11	12	13
1	63.1	63.1	202.8	63.6
2	30.0	30.0	68.1	
2-8				37.5-25.6
3			44.0	
3-7	29.5-25.7	26.2		
3-8			30.1-22.1	
4-6		29.4		
8	32.8	30.0		
9	63.6	63.1	63.7	72.0
10-16				37.5-25.6
17				22.7
18				14.1
1'	144.5	144.5	144.6	144.5
2' and 6'	127.7	127.9	127.7	127.6
3' and 5'	128.7	128.6	128.8	128.7
4'	126.8	126.8	126.8	126.7
CPh₃	86.2	86.2	86.4	86.2

Tabla RMN ¹³C - 3

C/nº	15	16	18	19
1	63.6	63.2	68.4	66.1
2		32.9	32.9	29.9-29.1
2-7	31.9-26.2			
3				26.1
3-7		29.8-26.0	29.8-26.0	
4-6				29.9-29.1
7-11				29.9-29.1
8	40.7	40.7	40.8	41.3/41.0
9	40.8	40.8	40.9	41.4
10	40.7	40.7	40.8	41.3/41.0
10-16	31.9-26.2			
11-15		29.8-26.0	29.8-26.0	
12-15				29.9-29.1
16		32.1	32.1	32.1
17	22.7	22.9	22.9	22.9
18	14.1	14.3	14.3	14.4
1''	144.5			
2'' and 6''	127.6			
3'' and 5''	128.7			
4''	126.7			
CPh ₃	86.2			
1'				59.5
2'				66.4
NMe ₃				54.5

Tabla RMN ¹³C - 4

C/nº	23	24	25	26
1		65.7	65.5	68.4
2	63.6	32.7-26.9		
2-8			32.6-25.4	32.5-25.3
3	33.1			
4	66.3			
5	33.1			
6	63.6			
9		130.2 and	129.9 and	129.9 and
10		130.0	129.7	129.7
11-16		32.7-26.9	32.6-25.4	32.5-25.3
17		22.8	22.6	22.6
18		14.3	14.1	14.1
1'	169.8 and 167.8			
2'-6'	130.8	50.6	59.0	58.1
3'-5'	141.0	32.7-26.9	32.6-25.4	26.4
4'	127.0	65.4	65.1	68.6
NMe ₂	56.5 and 55.2		53.6 and 49.7	53.9 and 49.7
NeMe		43.6		
MeOP				54.5
1''				142.6
2''-6''				125.8
3''-5''				128.9
4''				139.9
MePh				21.2

Tabla RMN ¹³C - 5

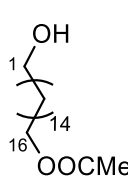
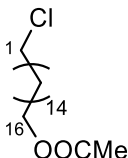
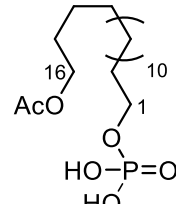
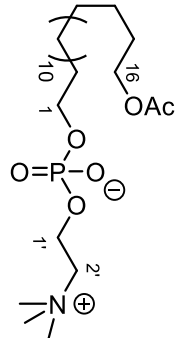
				
C/nº	28	31	30	32
1	64.7	64.6	66.6	62.6
2-15	32.8-25.7	32.6-22.6	32.6-22.6	
2				30.5-29.0
3				25.8
4-14				30.5-29.0
4-8				
16	63.0	45.2	64.6	64.6
MeCOO	21.0	21.0	21.0	21.0
MeCOO	171.3	171.2	171.2	171.1
1'				59.9
2'				66.8
NMe₃				54.4

Tabla RMN ¹³C - 6

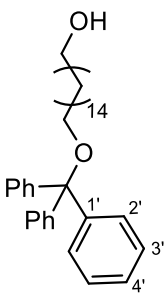
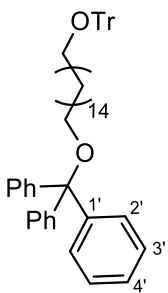
		
C/nº	33	34
1	62.9	63.7
3-15	32.7-25.7	30.9-26.3
16	63.6	63.7
1'	144.4	144.5
2'-6'	127.6	127.7
3'-5'	128.6	128.7
4'	126.7	126.8
Ph ₃ CO	86.2	86.2

Tabla RMN ¹³C - 7

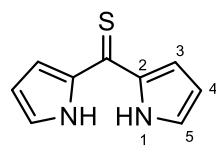
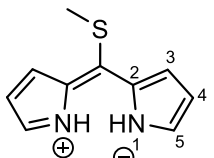
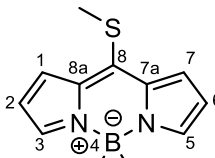
			
C/nº	41	42	43
1			118.1
2	138.1	130.6	127.8
3	114.7	129.8	141.6
4	112.4	117.7	
5	127.6	139.7	141.6
6			127.8
7			118.1
7a and 8a			134.1
8			154.0
-C=S	193.1		
-CSMe		163.7	
Me-S		22.7	20.7

Tabla RMN ¹³C - 8

C/nº	46	47
1	63.7	65.3
2	30.0	
2-15		30.0-25.9
3	26.3	
4-13	29.3-29.1	
14	25.8	
15	29.3-29.1	
16	75.4	63.7
1'	144.5	144.5
2'-6'	127.6	127.7
3'-5'	128.9	128.6
4'	126.7	126.8
1''	125.1	
2''	116.2	134.1
3''	139.0	133.2
4''		127.9
5''	139.0	132.1
6''	116.2	
7''	125.1	
7''a / 8''a	126.2	
8''	161.5	
Ph ₃ C-O	86.2	86.2
C=O		162.3

Tabla RMN ¹³C - 9

C/nº	44	49
1	63.1	63.9
2	32.8	
2-14		31.3
3	25.7	
4-15	30.9-29.1	
15		25.3
16	75.3	76.0
1'		58.2
2'		65.5
NMe ₃		53.1
1''	125.1	125.7
2''	116.2	116.4
3''	139.0	138.8
5''	139.0	138.8
6''	116.2	116.4
7''	125.1	125.7
7a'' and 8a''	126.2	125.6
8''	161.5	161.4

Tabla RMN ¹³C - 10

C/nº	35	36	38	39
1	69.2	64.1	68.7	65.5
2	30.4	30.5		30.1
2-15			32.6-25.3	
3-14	30.0-25.3	29.1-25.5		29.0-25.2
15	30.3	29.2		32.5
16	63.7	62.8	63.6	60.7
1''	144.5	144.1	144.5	
2''	127.6	127.7	127.6	
3''	128.7	128.8	128.7	
4''	126.8	126.9	126.7	
5''	128.7	128.8	128.7	
6''	127.6	127.7	127.6	
OCP ₃	86.2	85.7	86.2	
1'	65.9	58.3	67.2	59.1
2'	65.9	65.4	29.5	65.0
NMe ₃		53.1		53.1

Tabla RMN ¹³C - 11

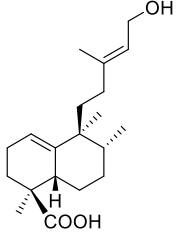
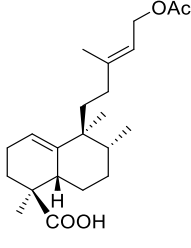
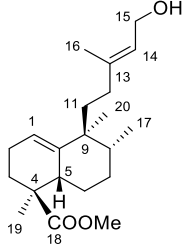
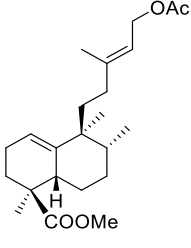
				
C/nº	54	55	57	58
1	119.8	117.5	119.6	117.5
2	22.7	22.8	22.7	22.8
3	30.7	30.5	30.6	30.7
4	44.6	44.6	44.8	44.9
5	38.7	38.5	38.3	38.4
6	23.1	22.9	22.9	22.9
7	30.1	29.7	30.0	29.7
8	38.0	38.7	38.3	38.4
9	42.9	42.8	42.7	42.8
10	141.2	143.6	141.2	143.7
11	37.5	37.5	37.7	37.5
12	33.8	34.0	33.8	34.0
13	140.9	141.2	140.6	141.2
14	122.8	119.8	122.8	119.8
15	59.2	61.6	59.2	61.5
16	16.4	16.7	16.4	16.7
17	15.6	15.6	15.4	15.6
18	184.2	183.8	178.4	178.5
19	19.7	21.1	19.9	21.1
20	22.1	22.7	22.3	22.5
COOMe			51.5	51.7
MeCOO		171.2	-	171.2
MeCOO		21.4		21.4

Tabla RMN ¹³C - 12

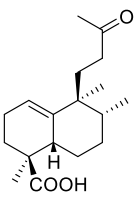
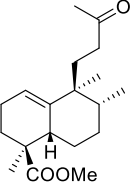
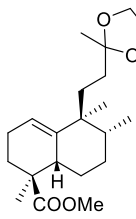
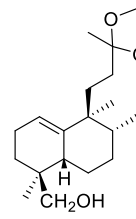
				
C/nº	56	59	73	74
1	120.2	120.1	119.6	120.0
2	23.3	23.0	22.7	22.6
3	29.7	29.7	30.5	32.3
4	44.6	44.8	44.7	36.2
5	37.8	38.1	38.4	38.9
6	23.5	23.2	22.6	24.1
7	28.6	28.5	28.2	28.5
8	39.1	39.0	38.1	36.7
9	42.6	42.6	42.3	43.1
10	141.0	141.1	141.0	141.3
11	32.2	32.4	29.5	29.4
12	38.8	38.9	33.0	33.8
13	210.6	210.2	110.4	110.6
16	29.7	29.9	23.5	23.6
17	15.5	15.6	15.5	15.6
18	184.5	178.3	178.2	69.2
19	21.0	21.1	19.7	21.9
20	22.0	22.1	22.3	21.8
COOMe		51.6	51.5	
OC ₂ H ₄ O			65.5	64.6/64.5

Tabla RMN ¹³C - 13

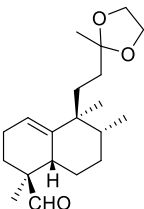
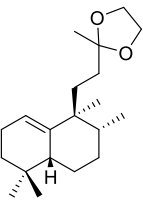
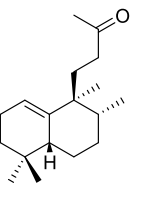
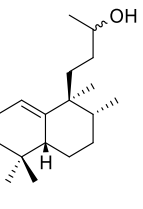
				
C/nº	75	76	83	84
1	120.3	119.8	120.2	119.7/119.6
2	22.2	23.6	23.1	23.6
3	28.4	33.5	32.3	33.4/33.3
4	47.7	31.4	31.3	31.4/31.3
5	38.8	43.1	43.3	43.3/43.2
6	23.0	23.1	23.5	23.1
7	27.5	29.1	29.0	29.1/29.0
8	35.8	39.3	39.1	39.1/39.0
9	42.7	42.6	42.5	42.8/42.6
10	140.8	141.5	141.2	141.6
11	32.9	32.0	33.2	33.9/33.8
12	33.4	33.3	39.0	35.0/34.8
13	110.4	110.6	209.9	69.1/69.0
16	23.6	28.2	30.0	23.5
17	15.5	15.7	15.6	15.6
18	206.3	23.7	25.8	26.0/25.9
19	17.4	26.0	28.0	28.2/28.1
20	22.2	22.3	22.3	22.5/22.4
COOMe				
OC₂H₄O	64.5	64.5		

Tabla RMN ¹³C - 14

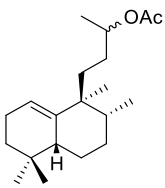
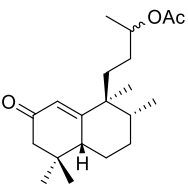
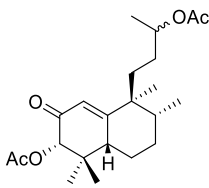
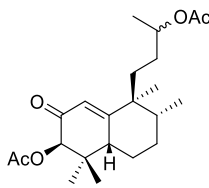
				
C/nº	85	86	87a	87b
1	119.9/119.8	124.5	123.1	123.0
2	23.6	199.7/199.6	193.4	193.3
3	34.3/34.2	48.6/48.5	81.2	77.6
4	31.4	34.5	39.5	39.6
5	43.4/43.3	45.2/45.1	45.1	45.2
6	23.1	23.8	19.9	24.9
7	29.2	28.2	27.0	28.9
8	39.2/39.1	40.2/40.1	36.7/36.6	36.7
9	42.8	44.7	43.7	43.9
10	141.5/141.4	169.5	168.2	168.2
11	35.0	34.8/34.7	36.1	36.0
12	30.0	30.6	30.3	30.7
13	71.9/71.7	71.1	71.1	71.0
16	22.3	20.0	20.1	19.9
17	15.6	15.6	15.8	15.4
18	26.1	25.8	24.4	24.0
19	29.1	28.4/28.3	21.4	16.0
20	20.0	21.3	22.8	22.9
MeCOO	21.4	21.4	21.4/21.3	21.4/20.8
MeCOO	170.8	170.7/170.5	170.8/170.7	170.8/170.5

Tabla RMN ¹³C - 15

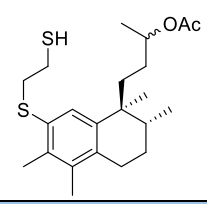
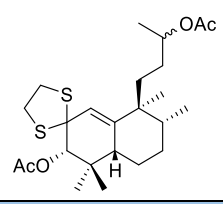
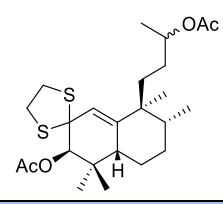
			
C/nº	89	88a	88b
1	129.3	125.9	125.9
2	130.4	68.5	68.5
3	135.3	81.1	77.3
4	135.5	37.5	37.2
5	135.8	42.8	42.8
6	24.3/24.2	22.6	22.6
7	27.4/27.3	30.4	30.7
8	32.8/32.7	38.3	38.3
9	41.1/41.0	42.5	42.5
10	142.2	140.8	140.8
11	35.5/35.3	34.7	34.8
12	30.6/30.5	28.4	28.4
13	71.5	71.5	71.6
16	25.9	20.0	20.0
17	16.1	15.7	15.6
18	16.0/15.9	27.4	23.5
19	17.5/17.4	22.5	22.5
20	20.0/19.9	22.7	22.7
MeCOO	21.5/21.4	21.4/21.1	21.4/21.1
MeCOO	170.7	170.8/170.5	170.8/170.5
SC₂H₄S	39.2/39.0	39.9	39.9

Tabla RMN ¹³C - 16

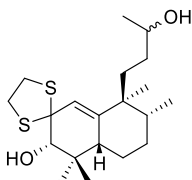
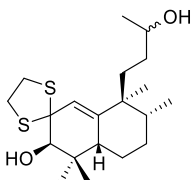
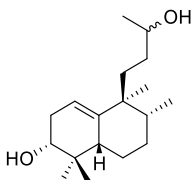
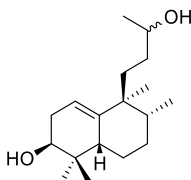
				
C/nº	90	91	92	93
1	126.6	126.0/125.9	117.2	116.8
2	72.3	72.4	31.4	31.7/31.6
3	80.6	77.3	75.2	73.0
4	38.9	37.6	37.0	36.2
5	43.3/43.2	45.0	43.7	39.1
6	20.1	24.0	28.4	22.7
7	33.8	29.2	29.7	28.8/28.7
8	36.9/36.8	40.1	37.8	39.0
9	41.9	43.2	42.3	42.9
10	141.1	141.7	141.8	141.9/141.7
11	36.1/35.9	34.3	35.4	34.8/34.2
12	27.5	33.7	33.8	33.8/33.5
13	68.8/68.7	68.8/68.7	68.9	68.7/68.5
16	23.8/23.5	23.5	23.7	24.6
17	16.0	15.6	15.7	15.7
18	15.8	24.5	25.3	23.2
19	25.4	23.1/23.0	15.9	22.4
20	23.2/23.1	21.9/21.8	23.1	23.0
<u>OC₂H₄S</u>	42.0 and 38.4	41.7 and 38.8		

Tabla RMN ¹³C - 17

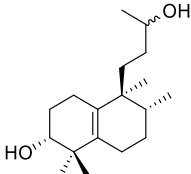
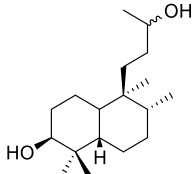
		
C/nº	94	95
1	25.3	19.4/19.2
2	23.8	29.7/29.4
3	76.0	76.7
4	39.6	36.9
5	136.0	33.5/33.4
6	26.9	27.9/27.8
7	27.1	28.9
8	33.1	39.6
9	40.1	37.8
10	131.5	38.3/38.1
11	31.7	29.1
12	33.4/33.3	33.2
13	68.7	69.1
16	23.2	23.7/23.6
17	15.7	14.1
18	24.9	26.2
19	19.9	20.7
20	20.9	25.2/25.1
COOMe		
OC ₂ H ₄ O		

Tabla RMN ¹³C - 18

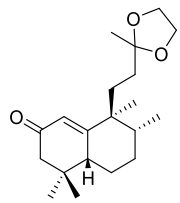
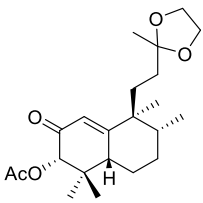
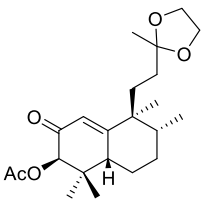
			
C/nº	78	79	80
1	124.4	123.3	122.9
2	199.7	193.4	193.3
3	48.6	81.3	77.7
4	34.5	39.5	38.4
5	45.0	45.1	47.5
6	23.8	23.8	24.9
7	28.3	27.0	28.9
8	40.4	30.7	41.8
9	44.6	43.8	45.0
10	169.9	170.5	169.2
11	33.2	33.2	32.5
12	33.7	34.4	33.9
13	109.9	109.9	109.8
16	28.4	19.9	23.7
17	15.6	15.7	15.6
18	25.9	24.4	24.0
19	23.7	15.9	22.4
20	21.5	22.6	21.3
OC₂H₄O	64.6	64.7/64.6	64.6
MeCOO		20.8	20.8
MeCOO		168.6	170.7

Tabla RMN ¹³C - 19

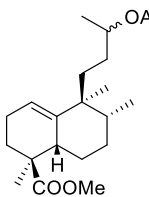
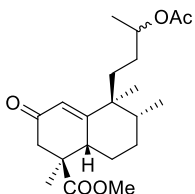
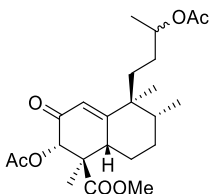
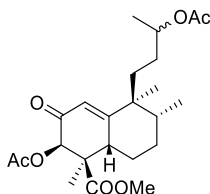
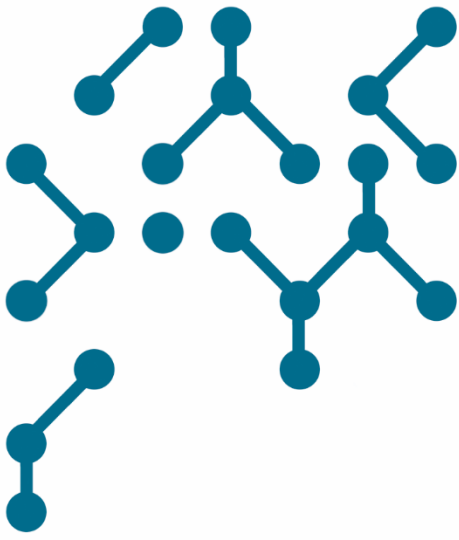
		
C/nº	60	61
1	119.7	120.2
2	23.2/23.4	23.0/23.1
3	29.2/29.7	30.4
4	45.1	45.0
5	38.1/38.2	38.3
6	23.7/23.9	23.2/23.3
7	28.9/29.1	28.7
8	39.6/39.7	38.8/39.1
9	43.3/43.5	42.8/43.0
10	141.8/142.0	141.3/141.4
11	33.1/33.4	34.6/34.9
12	34.2	30.5/30.7
13	68.2/68.7	71.8/72.2
16	24.5	20.1/20.2
17	16.0	15.7
18	179.2	178.4/178.5
19	22.4	22.5
20	22.7	22.6
COOMe	51.9	51.8/51.9
MeCOO		170.9
MeCOO		21.5

Tabla RMN ¹³C - 20

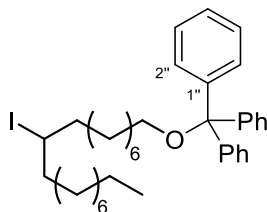
			
C/nº	62	63	64
1	125.3	124.9	124.3
2	197.4	191.5	191.0
3	43.3/43.0	77.3/77.7	74.5/74.7
4	46.5	51.6	50.6
5	41.1	44.0/ 43.7	44.4/44.1
6	23.5	23.4	24.4
7	28.3	30.0	29.0
8	40.4	42.0/41.9	41.4/41.3
9	45.2/45.4	46.2	45.4/45.3
10	169.2/169.6	167.1/167.0	166.7/166.4
11	34.7/35.0	34.7/34.3	34.5/34.4
12	30.3	30.3	30.8
13	71.4/71.6	71.3	71.4
16	20.2/20.3	20.4	20.2
17	15.8	15.6	15.7
18	176.6	173.2 y 173.1	174.7/174.4
19	21.1	19.4	19.2
20	21.9	21.9	21.6
COOMe	52.4	52.6	52.6
MeCOO	170.8	170.6/170.5	170.8/170.9
MeCOO	21.6	21.2/21.1	21.0/21.5



Tablas bidimensionales

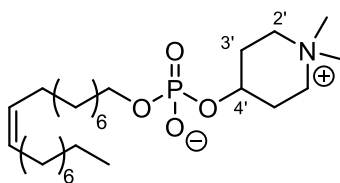
Bidimensional tables





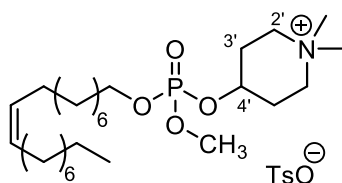
15

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	63.6	3.11 (2H, t, $J = 6.5$ Hz)	O <u>C</u> Ph ₃
2			
2-7	31.9-26.2		
2-8		2.00-1.29 (14H, m)	
8	40.7		
9	40.8	4.13 (1H, m)	
10	40.7		
10-17	31.9-26.2	2.00-1.29 (16H, m)	
17	22.7		
18	14.1	0.90 (3H, t, $J = 6.7$ Hz)	
1''	144.5		
2'' and 6''	127.6	7.47 (6H, d, $J = 8.4$ Hz)	3'',5''
3'' and 5''	128.7	7.33-7.21 (6H, m)	4'',3'',5''
4''	126.7	7.33-7.21 (3H, m)	1'',2'',6''
<u>C</u> Ph ₃	86.2		1'',1



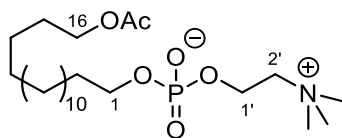
25

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	65.5	3.73 (2H, m)	
2-8	32.6-25.4		
2 and 8		1.54 (4H, m)	
3-7		1.26 (10H, m)	
9 and 10	129.9 and 129.7	5.33 (2H, t, $J = 6.0$ Hz))	8, 11
11-17	32.6-25.4	1.26 (14H, m)	18
17	22.6		
18	14.1	0.87 (3H, t, $J = 6.6$ Hz)	16, 17
2'-6'	59.0	3.63 (4H, m)	3', 5'
3'-5'	32.6-25.4	2.08-1.97 (4H, m)	
4'	65.1	4.39 (1H, m)	
<u>NMe₂</u>	53.6 and 49.7	3.28 (6H, s)	



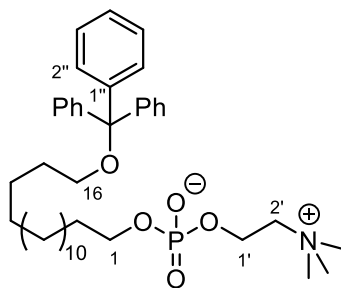
26

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	68.4	3.98 (2H, m)	2
2		1.62 (2H, m)	1
2-8	32.5-25.3		
3-8		1.26 (12H, m)	
4			
5			
6			
9 and 10	129.9 and 129.7	5.36-5.30 (2H, m)	
11-16	32.5-25.3		
11-17		1.26 (14H, m)	
17	22.6		
18	14.1	0.87 (3H, t, $J = 6.5$ Hz)	
1'			
2'-6'	58.1	3.56 and 3.37 (2H, m each)	<u>NMe₂</u>
3'-5'	26.4	2.23 and 2.00 (2H, m each)	
4'	68.6	4.57 (1H, m)	
<u>NMe₂</u>	53.9 and 49.7	3.36 and 3.22 (6H, s each)	2', 6', <u>NMe</u>
<u>MeOP</u>	54.5	3.70 (3H, d, $J = 12$ Hz)	
1''	142.6		3'', 5'', 2'', 6''
2''-6''	125.8	7.70 (2H, d, $J = 8$ Hz)	4''
3''-5''	128.9	7.13 (2H, d, $J = 7.8$ Hz)	4''
4''	139.9		2'', 6'', <u>MePh</u>
<u>MePh</u>	21.2	2.31 (3H, s)	4''



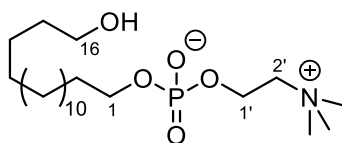
32

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	62.6	3.60 (2H, t, $J = 6.5$ Hz)	2, MeCOO
2	30.5-29.0		1
2 and 15		1.61 (4H, m)	
3	25.8		
3-14		1.25 (24H)	
4-14	30.5-29.0		
4-8			
16	64.6	4.04 (2H, t, $J = 8$ Hz)	
MeCOO	21.0	2.04 (3H, s)	MeCOO
MeCOO	171.1		MeCOO
1'	59.9	4.42 (2H, m)	
2'	66.8	3.90 (2H, m)	
NMe₃	54.4	3.44 (9H, bs)	



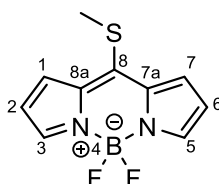
36

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	64.1	3.60 (2H, q, $J = 6.6$ Hz)	
2	30.5	1.49-1.40 (2H, m)	
3-14	29.1-25.5	1.34-1.08 (24H, m)	
15	29.2	1.58-1.49 (2H, m)	
16	62.8	2.93 (2H, t, $J = 6.5$ Hz)	
1' and 2'			
1''	144.1	7.38-7.21 (15H, m)	3'', 5''
2''	127.7		4'', 3'', 5''
3''	128.8		1'', 2'', 6''
4''	126.9		
5''	128.8		4'', 3'', 5''
6''	127.7		4'', 3'', 5''
OCPH ₃	85.7	7.38-7.21 (15H, m)	Ph3CO
1'	58.3	4.02 (2H, bs)	2', NMe ₃
2'	65.4	3.49 (2H, m)	NMe ₃
NMe ₃	53.1	3.12 (9H, s)	2'



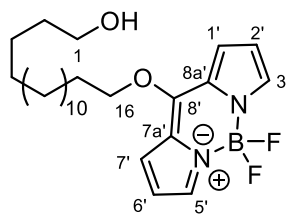
39

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	65.5	3.79 (2H, m)	
2	30.1	1.53 (2H, m)	
3-14	29.0-25.2	1.23 (24H, m)	
15	32.5	1.38 (2H, m)	
16	60.7	3.36 (2H, t, $J = 6.5$ Hz)	
1'	59.1	4.20 (2H, m)	
2'	65.0	3.58 (2H, m)	NMe ₃
NMe ₃	53.1	3.12 (9H, s)	2'



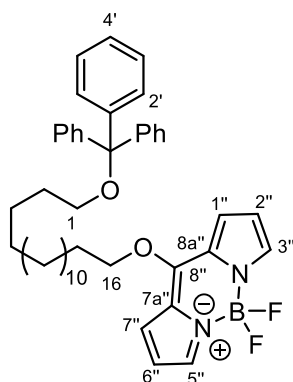
43

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1 and 7	118.1	7.42 (2H, d, $J = 4.2$ Hz)	3, 5
2 and 6	127.8	6.53 (2H, d, $J = 4.2$ Hz)	1, 3, 5, 7
3 and 5	141.6	7.79 (2H, bs)	2, 6
7a and 8a	134.1		1, 2, 6, 7
8	154.0		2, 3, 5, 6
Me-S	20.7	2.91 (3H, s)	



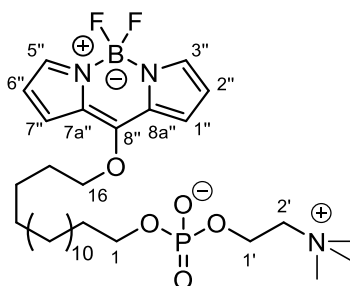
44

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	63.1	3.63 (2H, t, $J = 6.6$ Hz)	
2	32.8	1.54 (4H, m)	1
3	25.7		1
3-13		1.27 (24H, m)	
4-15	30.9-29.1		
14		1.54 (2H, m)	
15		1.96 (2H, m)	16
16	75.3	4.69 (2H, t, $J = 6.4$ Hz)	15, 8''
1'			
2'			
NMe ₃			
1'' and 7''	125.1	7.34 (2H, d, $J = 4.1$ Hz)	2'', 6'', 8''a, 7''a
2'' and 6	116.2	6.52 (2H, dd, $J = 4.1$ and 1.8 Hz)	1'', 3'', 5'', 7''
3'' and 5''	139.0	7.73 (2H, m)	2'', 6'', 1'', 7''
7a'' and 8a''	126.2		2'', 6'', 1'', 7''
8''	161.5		16, 2'', 6''



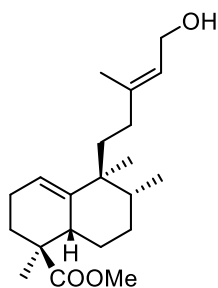
46

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	63.7	3.01 (2H, t, $J = 6.6$ Hz)	<u>O</u> CPh ₃
2	30.0	1.58 (2H, quin, $J = 7.8$ Hz)	
3	26.3		
3-13		1.26 (22H, m)	
4-13	29.3-29.1		
14	25.8	1.50 (2H, m)	
15	29.3-29.1	1.95 (2H, m)	16
16	75.4	4.65 (2H, t, $J = 6.3$ Hz)	8'', 7''a, 8''a, 15
1'	144.5	7.42-7.15 (15H, m)	2', 6'
2'-6'	127.6		3', 4', 5'
3'-5'	128.9		2', 4', 6'
4'	126.7		2', 3', 5', 6'
Ph ₃ C-O	86.2		1, 3', 5'
1'' and 7''	125.1	7.30 (2H, d, $J = 4.1$ Hz)	16, 2'', 3'', 5'', 6''
2'' and 6''	116.2	6.48 (2H, dd, $J = 4.1$ and 2.0 Hz)	1'', 7''
3'' and 5''	139.0	7.70 (2H, m)	1'', 2'', 6'', 7''
7''a and 8''a	126.2		16, 2'', 6''
8''	161.5		16, 2'', 3'', 5'', 6''



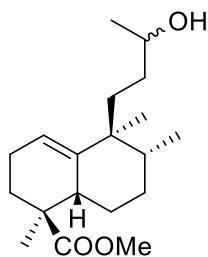
49

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	63.9	3.59 (2H, q, $J = 6.5$ Hz)	2
2 and 14	31.3	1.46 (4H, m)	
3 and 13		1.19 (22H, m)	
15	25.3	1.91 (2H, m)	
16	76.0	4.84 (2H, t, $J = 6.5$ Hz)	8'', 15, 14
1'	58.2	4.01 (2H, m)	
2'	65.5	3.51 (2H, m)	NMe ₃ , 1'
NMe ₃	53.1	3.34 (9H, s)	
1'' and 7''	125.7	7.56 (2H, d, $J = 4.0$ Hz)	16, 2'', 3'', 5'', 6''
2'' and 6''	116.4	6.63 (2H, dd, $J = 4.0$ and 2.1 Hz)	1'', 7''
3'' and 5''	138.8	7.80 (2H, s)	1'', 2'', 6'', 7''
7a'' and 8a''	125.6		16, 2'', 6''
8''	161.4		16, 2'', 3'', 5'', 6''



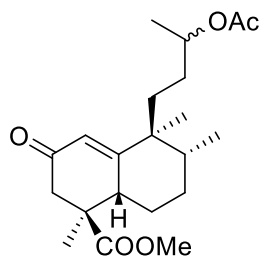
57

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	119.6	5.36 (1H, s)	2, 3, 8, 9
2	22.7		
3	30.6		
4	44.8		
5	38.3	2.73-2.52 (1H, m)	1, 4, 6, 10, 18
6	22.9		
7	30.0		
8	38.3		
9	42.7		
10	141.2		
11	37.7		
12	33.8		
13	140.6		
14	122.8	5.46 (1H, t, $J = 6.9$ Hz)	12, 15
15	59.2	4.14 (2H, d, $J = 6.9$ Hz)	13, 14
16	16.4	1.67 (3H, s)	12, 13, 14
17	15.4	0.83 (3H, d, $J = 6.9$ Hz)	5, 7, 9
18	178.4	-	
19	19.9	1.10 (3H, s)	3, 4, 5, 18
20	22.3	0.89 (3H, s)	9, 10, 11
COOMe	51.5	3.63 (3H, s)	18



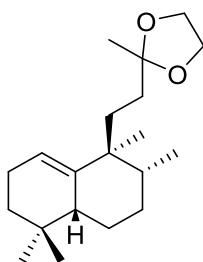
60

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	119.7	5.27 (1H, m)	2, 3, 20
2	23.2/23.4		
3	29.2/29.7		
4	45.1		
5	38.1/38.2	2.66 (1H, m)	
6	23.7/23.9		
7	28.9/29.1		
8	39.6/39.7		
9	43.3/43.5		17, 20
10	141.8/142.0		20
11	33.1/33.4		12, 20
12	34.2		11, 16
13	68.2/68.7	3.87 (1H, m)	16
16	24.5	1.18/1.14 (3H, d, $J = 6.4$ Hz)	12, 13
17	16.0	0.79 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	5, 7, 9
18	179.2		COOMe, 19
19	22.4	1.10 (3H, s)	
20	22.7	0.85 (3H, s)	9, 10, 11
COOMe	51.9	3.64/3.63 (3H, s)	18, 19



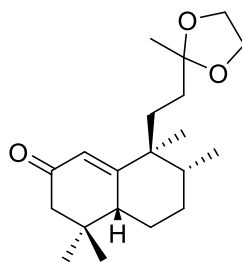
62

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	125.3	5.82/5.81 (1H, s)	3, 8, 9
2	197.4		3, 19
3	43.3/43.0	2.69 (1H, d, $J = 16.4$ Hz) , 2.27 (2H, d, $J = 16.4$ Hz)	1, 2, 4, 5, 18, 19
4	46.5		
5	41.1	2.99 (1H, dd, $J = 12.1, 4.8$ Hz)	1, 3, 4, 7, 6, 10, 18
6	23.5		
7	28.3		
8	40.4		
9	45.2/45.4		17, 20
10	169.2/169.6		20
11	34.7/35.0		12, 20
12	30.3		11, 16
13	71.4/71.6	4.85 (1H, m)	11
16	20.2/20.3	1.20 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	12, 13
17	15.8	0.80 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	5, 7, 9
18	176.6		COOMe, 19
19	21.1	1.22 (3H, s)	2, 3, 4, 5
20	21.9	0.97 (3H, s)	9, 10, 11
COOMe	52.4	3.64/3.63 (3H, s)	18
MeCOO	170.8		13, MeCOO
MeCOO	21.6	2.03 (3H, s)	MeCOO



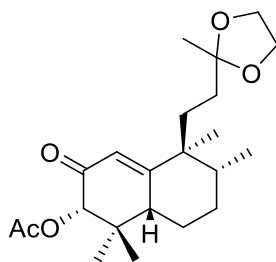
76

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	119.8	5.29 (1H, t, $J = 3.6$ Hz)	3, 5, 6, 9
2	23.6		
3	33.5		
4	31.4		
5	43.1		18, 19
6	23.1		
7	29.1		
8	39.3		
9	42.6		20
10	141.5		20
11	32.0		20
12	33.3		16
13	110.6		OC ₂ H ₄ O, 16
16	28.2	1.30 (3H, s)	12, 13
17	15.7	0.80 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	7, 8, 9
18	23.7	0.82 (3H, s)	3, 4, 5
19	26.0	0.87 (3H, s)	3, 4, 5
20	22.3	0.87 (3H, s)	1, 8, 9, 10
OC ₂ H ₄ O	64.5	3.91 (4H, m)	OC ₂ H ₄ O, 13



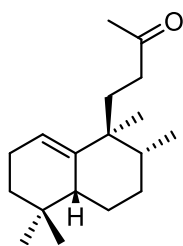
78

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	124.4	5.83 (3H, s)	20
2	199.7		18
3	48.6	3.28 (1, d, $J = 8.0$ Hz,) and 3.05 (1H, d; $J = 8.0$ Hz)	1, 5, 18, 19
4	34.5		
5	45.0	2.21 (1H, dd, $J = 12.0, 4.0$ Hz)	1, 18, 19
6	23.8		
7	28.3		
8	40.4	1.78 (1H, m)	
9	44.6		17, 20
10	169.9		20
11	33.2		
12	33.7		
13	109.9		OC ₂ H ₄ O, 16
16	28.4	1.28 (3H, s)	12, 13
17	15.6	0.82 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	
18	25.9	0.96 (3H, s)	2, 3, 4
19	23.7	0.99 (6H, s)	3, 4, 18
20	21.5	0.99 (6H, s)	1, 8, 9, 10
OC ₂ H ₄ O	64.6	3.90 (4H, m)	OC ₂ H ₄ O



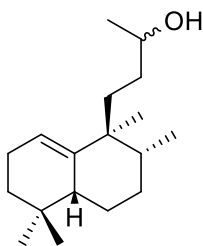
79

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	123.3	5.95 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	20
2	193.4		18
3	81.3	5.09 (1H, s)	1, 5, 18, 19
4	39.5		
5	45.1	2.59 (1H, ddd, $J = 12.4, 5.9, 2.4$)	1, 18, 19
6	23.8		
7	27.0		
8	30.7		
9	43.8		17, 20
10	170.5		20
11	33.2		
12	34.4		
13	109.9		OC ₂ H ₄ O, 16
16	19.9	1.29 (3H, s)	12, 13
17	15.7	0.86 (3H, d, $J = 7.1$ Hz)	
18	24.4	0.88 (3H, s)	2, 3, 4
19	15.9	1.07 (3H, s)	3, 4, 18
20	22.6	1.02 (3H, s)	1, 8, 9, 10
OC ₂ H ₄ O	64.7/64.6	3.93 (4H, m, OCH ₂ CH ₂ O)	OC ₂ H ₄ O



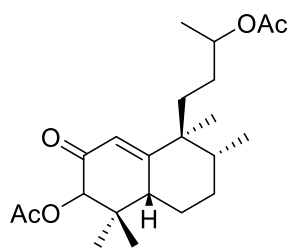
83

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	120.2	5.31 (1H, m)	9, 11, 20
2	23.1		
3	32.3		
4	31.3		
5	43.3		18, 19
6	23.5		
7	29.0		
8	39.1		
9	42.5		20
10	141.2		20
11	33.2		20
12	39.0		16
13	209.9		16
16	30.0	2.11 (3H, s)	12, 13
17	15.6	0.80 (3H, $J = 7.0$ Hz)	7, 8, 9
18	25.8	0.81 (3H, s)	3, 4, 5
19	28.0	0.85 (3H, s)	3, 4, 5
20	22.3	0.85 (3H, s)	1, 8, 9, 10



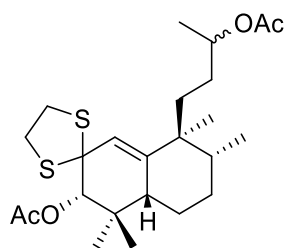
84

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	119.7/119.6	5.30 (1H, m)	20
2	23.6		
3	33.4/33.3		
4	31.4/31.3		
5	43.3/43.2		18, 19
6	23.1		
7	29.1/29.0		
8	39.1/39.0		
9	42.8/42.6		20
10	141.6		20
11	33.9/33.8		20
12	35.0/34.8		16
13	69.1/69.0	3.71 (1H, m)	
16	23.5	1.17 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	11, 13
17	15.6	0.80 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	7, 8, 9
18	26.0/25.9	0.88/0.86 (3H, s)	3, 4, 5, 19
19	28.2/28.1	0.88/0.86 (3H, s)	3, 4, 5, 18
20	22.5/22.4	0.89 (3H, s)	8, 9, 12



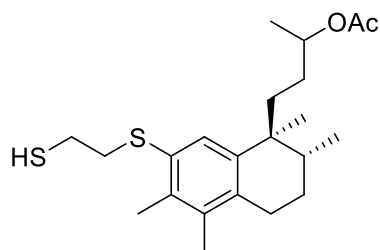
87

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	123.1	5.95 (1H, s)	5, 20
2	193.4		18
3	81.2	5.10 and 5.09 (1H, s)	2, 4, 5, 18, MeCOO
4	39.5		18, 19
5	45.1		1, 3, 18, 19
6	19.9		
7	27.0		17
8	36.7/36.6		
9	43.7		17, 20
10	168.2		20
11	36.1		17
12	30.3		16
13	71.1	4.81 (1H, m)	16
16	20.1	1.20 (3H, d, $J = 6.7$ Hz)	12, 13
17	15.8	0.85 (3H, d, $J = 7.1$ Hz)	7, 9, 11
18	24.4	0.87 (3H, s)	3, 4, 5
19	21.4	1.08 (3H, s)	3, 4, 5, MeCOO
20	22.8	1.03 (3H, s)	1, 8, 9, 10
MeCOO	21.4/21.3	2.21 (3H, s) and 2.04 (3H, s)	1, MeCOO
MeCOO	170.8/170.7		3



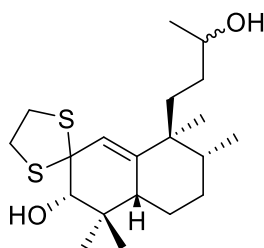
88

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	125.9	5.50 (1H, s)	9
2	68.5		
3	81.1	5.15/5.13 (1H, s)	18, 19
4	37.5		18, 19
5	42.8		
6	22.6		
7	30.4		
8	38.3		
9	42.5		1, 17, 20
10	140.8		19
11	34.7		20
12	28.4		16
13	71.5	4.82 (1H, m)	16
16	20.0	1.20 (3H, d, $J = 6.7$ Hz)	12, 13
17	15.7	0.83 (3H, d)	8, 9, 12
18	27.4	1.02 (3H, s)	3, 4, 5
19	22.5	0.96 (3H, s)	3, 4, 5, 18
20	22.7	1.01 (3H, s)	9, 11
<u>Me</u> COO	21.4/21.1	2.12 (3H, s, ring), 2.04 (3H, s, chain)	Me <u>C</u> OO, 3
<u>Me</u> COO	170.8/170.5		
<u>SC</u> ₂ H ₄ S	39.9	3.28/3.19 (4H, m)	<u>SC</u> ₂ H ₄ S



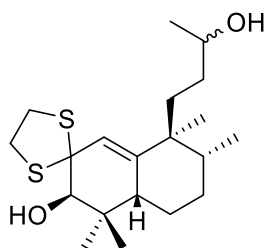
89

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	129.3	7.27 (1H, s)	
2	130.4		19
3	135.3		19
4	135.5		18
5	135.8		1, 6, 7
6	24.3/24.2	3.20-3.50 (2H, m)	1
7	27.4/27.3		6
8	32.8/32.7		6, 20
9	41.1/41.0		1, 17, 20
10	142.2		2, 20
11	35.5/35.3		13
12	30.6/30.5		13
13	71.5	4.80 (1H, m)	16
16	25.9	1.16/1.15 (3H, d, $J = 6.5$ Hz)	13
17	16.1	0.95/0.93 (3H, d, $J = 6.4$ Hz)	
18	16.0/15.9	2.15 (3H, s)	
19	17.5/17.4	2.43/2.42 (3H, s)	2
20	20.0/19.9	1.12 (3H, s)	10
MeCOO	21.5/21.4	2.04/2.02 (3H, s)	MeCOO
MeCOO	170.7		13
SC ₂ H ₄ S	39.2/39.0	3.20-3.50 (4H, m)	



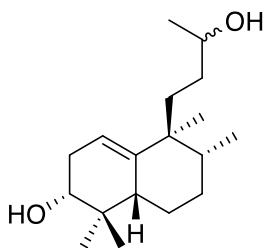
90

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	126.6	5.59 (1H, m)	3, 5, 20
2	72.3		SC ₂ H ₄ S
3	80.6	3.62 (1H, m)	1, 18, 19
4	38.9		
5	43.3/43.2		1, 18, 19
6	20.1		
7	33.8		
8	36.9/36.8		
9	41.9		17, 20
10	141.1		20
11	36.1/35.9		
12	27.5		16
13	68.8/68.7	3.71 (1H, m)	16
16	23.8/23.5	1.19 (3H, d, $J = 6.1$ Hz)	13, 12
17	16.0	0.82 (3H, d, $J = 6.9$ Hz)	7, 8, 9
18	15.8	0.77 (3H, s)	4, 5, 19
19	25.4	1.05 (3H, s)	4, 5, 18
20	23.2/23.1	0.98 (3H, s)	8, 9, 10, 11
SC ₂ H ₄ S	42.0 and 38.4	3.46-3.17 (4H, m, -SCH ₂ CH ₂ S-)	SC ₂ H ₄ S



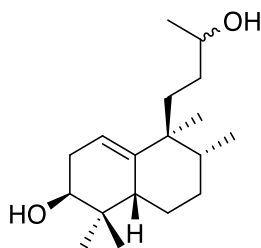
91

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	126.0/125.9	5.48 (1H, m)	3, 5, 20
2	72.4		SC ₂ H ₄ S
3	77.3	3.86 (1H, m)	1, 18, 19
4	37.6		
5	45.0		1, 18, 19
6	24.0		
7	29.2		
8	40.1		
9	43.2		17, 20
10	141.7		20
11	34.3		
12	33.7		16
13	68.8/68.7	3.74 (1H, m)	16
16	23.5	1.17 (3H, d, $J = 6.1$ Hz)	13, 12
17	15.6	0.82 (3H, d, $J = 6.9$ Hz)	7, 8, 9
18	24.5	1.01 (3H, s)	4, 5, 19
19	23.1/23.0	0.86 (3H, s)	4, 5, 18
20	21.9/21.8	0.96 (3H, s)	8, 9, 10, 11
SC ₂ H ₄ S	41.7 and 38.8	3.45-3.19 (4H, m)	SC ₂ H ₄ S



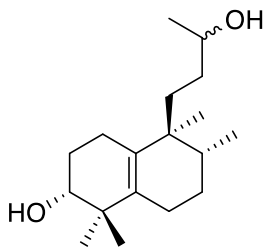
92

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	117.2	5.26 (1H, m)	20
2	31.4		
3	75.2	3.38 (1H, m)	18, 19
4	37.0		
5	43.7		
6	28.4		
7	29.7		
8	37.8		
9	42.3		
10	141.8		20
11	35.4		
12	33.8		
13	68.9	3.71 (1H, m)	16
16	23.7	1.18 (3H, d, $J = 6.1$ Hz)	12, 13
17	15.7	0.82 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	6, 8, 9
18	25.3	0.97 (3H, s)	4, 5
19	15.9	0.80 (3H, s)	4, 5, 18
20	23.1	0.92 (3H, s)	8, 9, 11



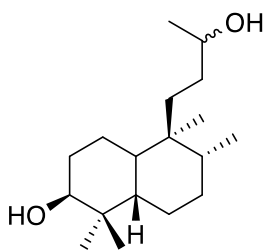
93

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	116.8	5.20 (1H, m)	2, 9
2	31.7/31.6		
3	73.0	3.52 (1H, m,)	18, 19
4	36.2		
5	39.1		
6	22.7		
7	28.8/28.7		
8	39.0		17, 20
9	42.9		17, 20
10	141.9/141.7		20
11	34.8/34.2		
12	33.8/33.5		
13	68.7/68.5	3.78-3.69 (1H, m)	16
16	24.6	1.17 (3H, d, $J = 6.1$ Hz)	12, 13
17	15.7	0.82 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	6, 8, 9
18	23.2	0.93 (3H, s)	3
19	22.4	0.89 (3H, s)	10
20	23.0	0.90 (3H, s)	8, 9, 11



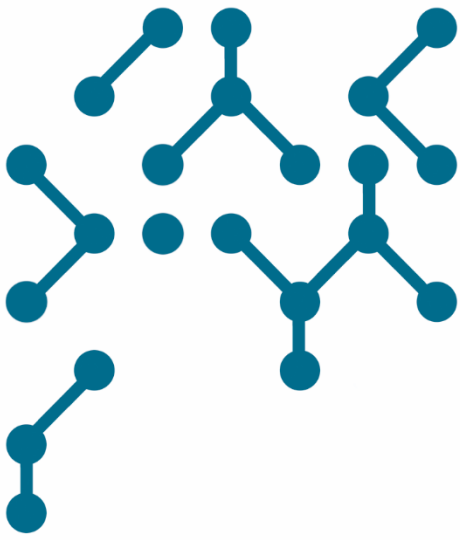
94

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	25.3	5.20 (1H, m)	
2	23.8		
3	76.0	3.45 (1H, m)	1, 18, 19
4	39.6		18, 19
5	136.0		18, 19
6	26.9		
7	27.1		
8	33.1		
9	40.1		
10	131.5		20
11	31.7		
12	33.4/33.3		
13	68.7	3.73 (1H, m)	16
16	23.2	1.20 (3H, d, $J = 8.0$ Hz)	12, 13
17	15.7	0.84 (3H, d, $J = 8.0$ Hz)	6, 8, 9
18	24.9	0.96 (3H, s)	3, 4, 5
19	19.9	1.04 (3H, s)	4, 5
20	20.9	0.83 (3H, s)	8, 9, 11



95

C/nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	19.4/19.2		
2	29.7/29.4		
3	76.7	3.38 (1H, m)	18, 19
4	36.9		
5	33.5/33.4		
6	27.9/27.8		
7	28.9		
8	39.6		20
9	37.8		
10	38.3/38.1		18
11	29.1		
12	33.2		
13	69.1	3.72 (1H, m)	
16	23.7/23.6	1.21/1.20 (3H, d, $J = 6.7$ Hz)	11, 13
17	14.1	0.90/0.89 (3H, d, $J = 6.7$ Hz)	6, 8, 9
18	26.2	0.97 (3H, s)	5, 10, 19
19	20.7	0.87 (3H, s)	9, 10, 18
20	25.2/25.1	0.84/0.83 (3H, s)	10, 11, 12



Conclusions

Conclusions



1.- In this work the synthesis of a series of alkylphosphocholines analogues of miltefosine and perifosine has been carried out.

1.1.- Analogues of miltefosine and perifosine with unsaturations or differently functionalized lipidic chains containing heteroatoms or fluorophores in the C9 or C16 positions of the alkyl chain have been synthesized: **5**, **8**, **19**, **25**, **32**, **36**, **39** and **49** (Figure 28). An advanced intermediate for the synthesis of **53** has also been prepared.

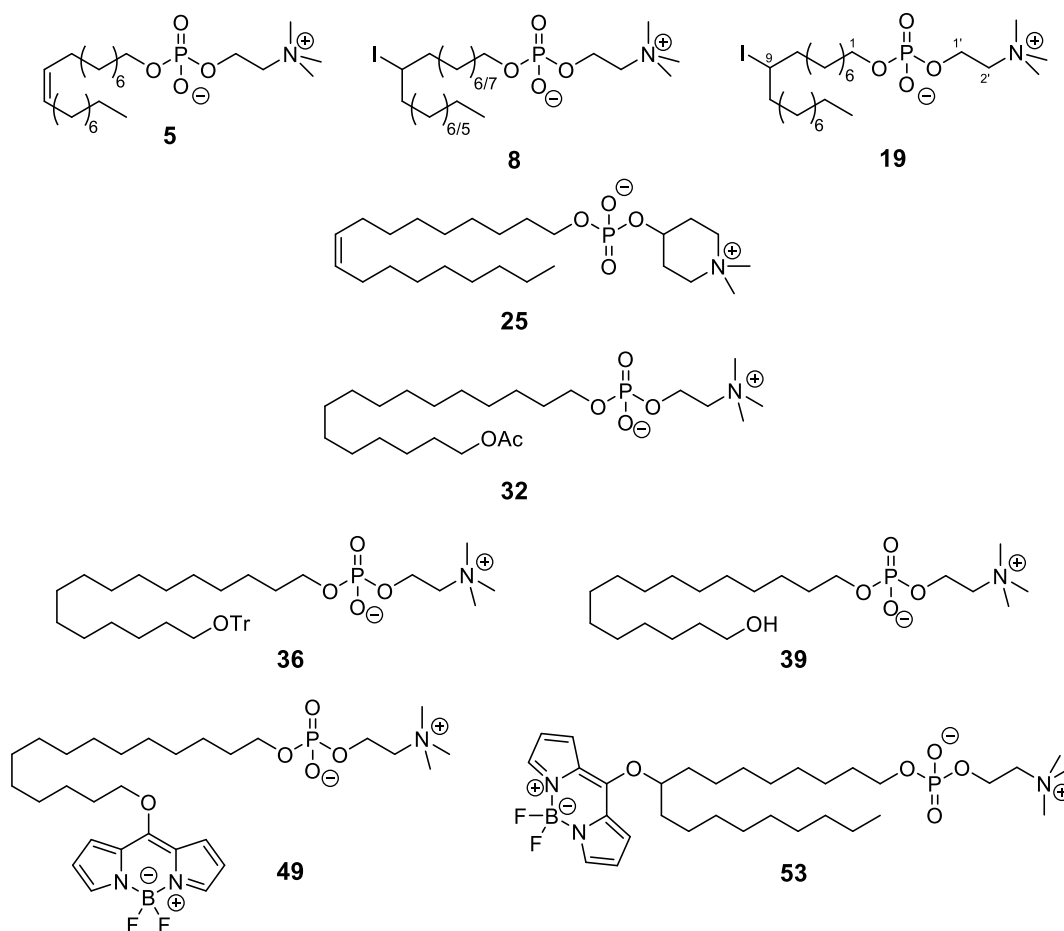


Figure 28. Alkylphosphocholines (APCs) **5**, **8**, **19**, **25**, **32**, **36**, **39**, **49** and **53**.

1.2.- The unsaturated miltefosine analogue **5** was synthesized from oleyl alcohol by using a reaction sequence whereby the corresponding dihydrogenphosphate derivative is firstly prepared and *then*, choline tetraphenylborate **4** is added *in situ*. Therefore, the introduction of the polar head is carried out in a *one pot* process.

1.3.- For the synthesis of the unsaturated analogue of perifosine **25** from oleyl alcohol, three different strategies were tested. In the first approach (Route A), the *N*-methylpiperidine derivative is used as an intermediate and, finally, this compound is methylated with methyl tosylate. In the second approach (Route B), the dihydrogenphosphate derivative is used as an intermediate. The third approach (Route C) consists in the introduction of the polar head in a single step. The best results are obtained in the second strategy (Route B), with an overall yield of 21%.

1.4- Due to the solubility problems encountered in the synthesis of the perifosine analogue **25**, it was necessary to prepare the appropriate 4-hydroxy-*N,N*-dimethylpiperidinium salt beforehand. For this purpose, 4-hydroxy-*N,N*-dimethylpiperidinium tetraphenylborate **23** was synthesized and characterized for the first time.

1.5.- From the two-step synthesis of unsaturated derivative of perifosine **25** (Route A), in the process of methylation of the hydrogenphosphate intermediate **24** with methyl tosylate, a mixture of the desired unsaturated perifosine analogue **25** and the tosylate salt of the triester **26**, resulting from the methylation of the piperidine and the phosphate group, is obtained. Moreover, this salt **26** is quantitatively transformed into **25** by treatment of **26** with lithium bromide.

1.6.- The synthesis of the iodinated analogue **8** was carried out from the unsaturated analogue of miltefosine **5** by addition of phosphorus triiodide. The biological interest of these compounds conduct to the synthesis of the iodinated analogue at C9, **3**. In the preparation of **19**, the alkyl chain is first functionalized and then the polar head is introduced.

1.7.- Miltefosine analogues **32**, **36** and **39** with acetoxy, trityl or hydroxyl group at the end of the carbon chain were synthesized using 1,16-hexadecanediol as starting material.

1.8.- The analogue **5** with an acetoxy function at C16 is obtained from the monoacetyl derivative **28** by a one-step reaction in moderate yield, or by passing through the dihydrogenphosphate **30** as an intermediate, in this case in a good overall yield (32%).

1.9.- In the synthesis of the trityl derivative **36** two procedures were tested. Firstly, the synthesis of the dioxaphospholane derivative as an intermediate was carried out and, once is obtained, this phospholane was treated with trimethylamine to obtain the desired trityl derivative **36** in low yield. In contrast, the reaction whereby the corresponding bromoethyldichlorophosphate **38** was used as an intermediate, followed by reaction with trimethylamine, leads to **36** in good yield (51%).

1.10.- The synthesis of the 16-hydroxy derivative **39** cannot be carried out from its corresponding acetyl derivative **32** due to solubility problems. So, compound **39** is obtained from its corresponding trityl derivative **36** by deprotection reaction in acid medium in excellent yield.

1.11.- The fluorescent compound BODIPY **43** has been chosen as fluorophore (8-Alkyloxy-BODIPY) in the synthesis of the fluorescent analogues.

To obtain the fluorescent derivative **49**, two different strategies were tested. Firstly, introducing the BODIPY fluorophore and then elaborating the polar head. On the other hand, a reverse order strategy is followed, namely, incorporating the polar head and finally introducing the fluorophore in the suitably functionalized phosphocholine.

In the first case, the incorporation of the polar head into the fluorescent hydroxyderivative **44**, using phospholane intermediate **48** and also the bromoethylchlorophosphate intermediate **51**, leads to the desired product **49** but in low yield.

The obtention of **49** is better performed when the hydroxyderivative **39** is used as an intermediate, in this case the fluorophore is incorporated in the last stage of the synthesis once the alkylphosphocholine is formed in the lipid.

1.12.- In the study carried out about the fluorescent characteristics of **43**, the alkoxy-BODIPY **49** and compound **52**, it has been verified that in alkylphosphocholine **49** and compound **52** a hypsochromic shift is produced compared with the absorption maxima found in BODIPY **43**, but the fluorescence and good molar extinction coefficients are maintained.

2.- A summary of the published work on natural halimane skeleton diterpenes, published by our group in Natural Product Reports in 2018, has been incorporated.

In addition, the reviews and bibliographic work that collect the halimane-skeleton compounds containing the MCA (methylene-cycloalkylacetate) fragment, detected as potential pharmacophore for neurotrophic activity, increasing the neurite outgrowth, have been also incorporated. Besides, It was also attached the corresponding work on natural halimane diterpenes with antibacterial activity and potential use as new antibiofilm agents.

These studies led to perform biological tests with several natural and synthetic halimanes (**53-63**)

3.- The biological tests as antitumoural agents were carried out with the synthesized APCs **5, 8, 19, 25, 32, 36, 39** and **49**. These biological evaluations were performed by Dr. Faustino Mollinedo at the CIB-CSIC in Madrid.

The tests indicate that the unsaturated perifosine analogue **25** shows good antitumour activity, however, neither the unsaturated miltefosine analogue **5**, nor the iodinated analogues **8** and **19** show antitumour activity in the evaluated cell-lines. The analogues functionalized at the end of the lipidic chain **32, 36, 39** and **49** are also not active against the cell-lines tested.

The antitumour activity of the unsaturated analogues **5** and **25**, miltefosine and perifosine analogues respectively, is enhanced when the lipidic chain is esterified to *N,N*-phosphodimethylpiperidinium against phosphocholine as the polar head.

Thus, the studies will continue exploring the perifosine analogues as antitumour agents.

4.- The unsaturated perifosine **25** analogue has been tested as an antileishmanial agent by evaluating its ability to sequester the cell cycle in in vitro assays of *Leishmania major* cultures.

The activity of the perifosine analogue **25** is comparable in potency to edelfosine and, in the assays performed, it has much higher potency than miltefosine, the current marketed antileishmanial drug for clinical and veterinary use. Analogue **25** arrests the cell cycle of *L. major* in sub G0/G1 phase, causes a decrease in motility and favours the disintegration of the cell aggregates formed by the parasite.

For this reason, studies of the antiparasitic capacity of this analogue will be continued and further APC analogues, especially perifosine ones, will be evaluated to complete the SAR studies of antiparasitic activity.

5.- A total of 11 natural and synthetic compounds (**54-64**) with halimane backbone have been prepared for biological testing as nematocides (**54-59**) and as neurotrophic agents (**54-64**). (Figure 29)

5.1.- The biological evaluations of antiparasitic agents were carried out by Prof. Dr. Julio López Aban, Department of Animal Biology, Ecology, Parasitology, Edaphology and Agricultural Chemistry (Facultad de Farmacia, Unviersidad de Salamanca).

None of the compounds evaluated (**54-59**) showed significant activity as antiparasitic against *Strongyloides venezuelensis*.

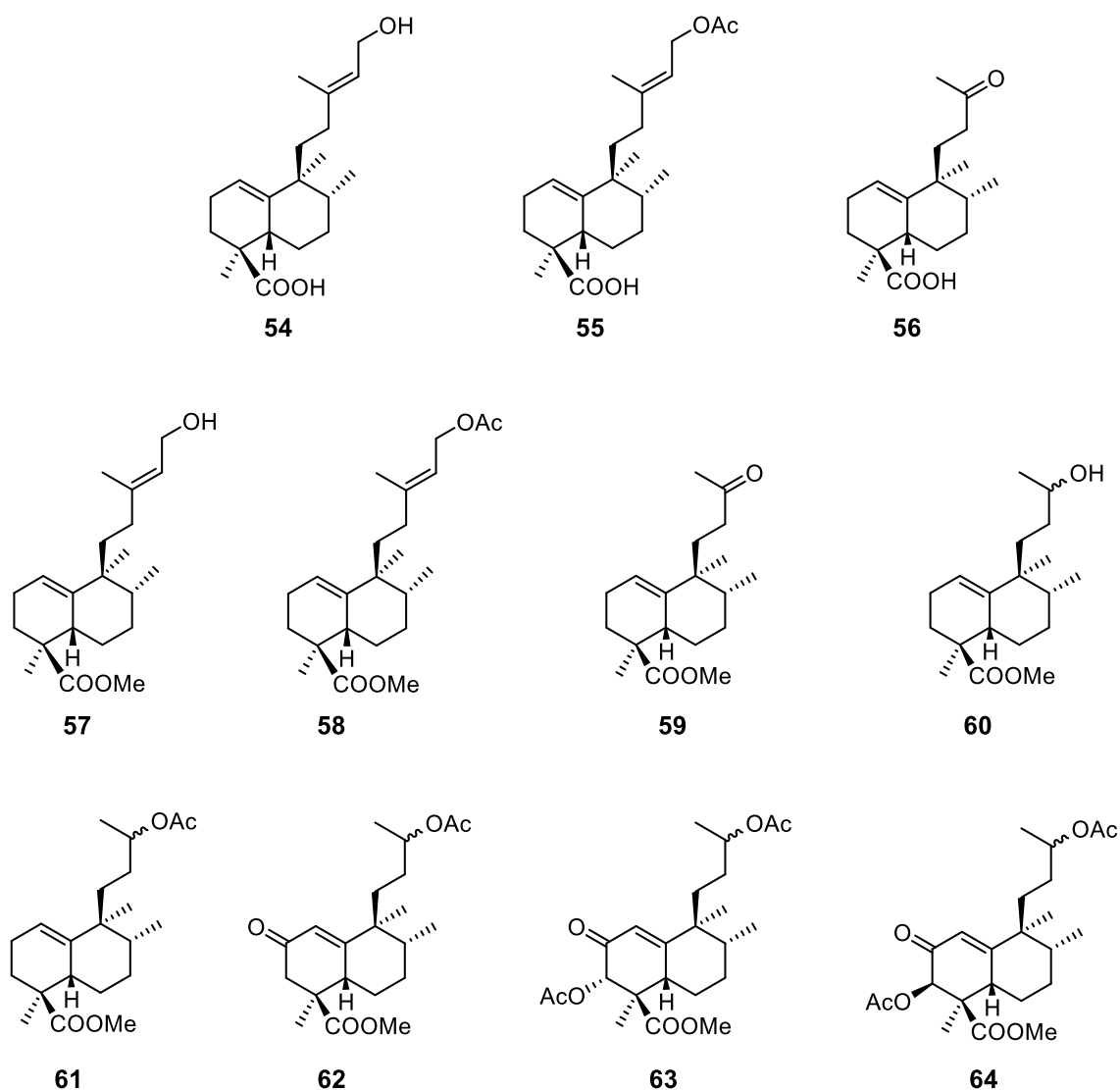


Figure 29. Natural and synthetic halimane diterpenoids evaluated as antiparasitic and neurotrophic agents.

5.2.- The MCA (methylen-cycloalkylacetate) fragment, which has been identified as a pharmacophore of new neurotrophic compounds, is present in compounds **54-64**, and because of that, they were evaluated to find if they show activity as neurotrophic agents.

Biological evaluations of the compounds were performed in P12 cells at the INCyL (Instituto de Neurociencias de Castilla y León) by Prof. Dr. Juan Carlos Arévalo, revealing that none of the compounds evaluated (**54-64**) show neurite differentiating activity, not being neurotrophic agents.

6.- Starting from *ent* halimic acid **54** as starting material, it was carried out a synthetic approach to diterpenolides tessmannolide-type and secochiliotrinolide-type; two γ -hydroxybutenolides with 3,4-secohalimane skeleton epimers at C10. For the synthesis of these compounds, two milestones can be found: the incorporation of the γ -hydroxybutenolides fragment and the ring-A cleavage.

In the synthetic route that has been performed, firstly the side-chain degradation was carried out, until an appropriated 14,15-dinorderivative, **98** is obtained and then, the γ -hydroxybutenolide can be incorporated. Afterwards, the reduction of the methoxycarbonyl of C18 and functionalization of C3, necessary for the ring-A cleavage, is carried out.

In this work, it was achieved the synthesis of the epimeric mixture at C10 of the advanced intermediate 14,15-dinor-*ent*-halim-3,13-diol **95** (Figure 30)

7.- The hydrogenation of $\Delta^{1(10)}$ from the halimane skeleton has been carried out for the first time. This reaction is only achieved by catalytic hydrogenation ($H_2/Pd-C$) under pressure (5 atm), with moderate yield.

8.- In a first attempt to resolve the mixture of synthesized C10 epimers, the 14,15-dinor-*ent*-halim-3,13-dione **96** was prepared, which turned out to be highly unstable.

9.- Once given the difficulties encountered in the hydrogenation of the $\Delta^{1(10)}$ double bond and the opening of the ring-A, in subsequent work it is necessary to consider the possibility of first breaking the ring-A and then, proceeding to the reduction of the $\Delta^{1(10)}$ double bond.

Índice de moléculas

Molecular index

