



**SÍNTESIS DE NUEVOS GLICÓSIDOS CON
ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y ESTUDIO
DEL MECANISMO DE INHIBICIÓN**

Tesis Doctoral
Isabel García Álvarez

Marzo de 2008



Departamento de
Química Orgánica



Instituto de Química
Orgánica
General

Síntesis de nuevos glicósidos con actividad antitumoral y estudio del mecanismo de inhibición

Memoria que para optar al grado de doctor presenta:
Isabel García Álvarez

Director:

Dr. Alfonso Fernández-Mayoralas Álvarez

Madrid, 10 de Marzo de 2008

*A mis padres,
A Elena y
A Alberto*

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Alfonso Fernández-Mayoralas el haberme dado la oportunidad de entrar en su grupo de investigación; especialmente, quiero agradecerle su comprensión y enseñanzas recibidas, su confianza y constante dedicación a lo largo de estos años.

Me gustaría agradecer al Prof. Manuel Nieto-Sampedro y al Dr. Ernesto Doncel, que han estado involucrados desde un principio en este trabajo, toda la ayuda en la parte de la actividad biológica. Asimismo, quiero agradecer al Prof. Julio San Román, a la Dra. Blanca Vázquez y a Marisa López, su ayuda en el campo de los polímeros.

Agradezco al Dr. Leoncio Garrido su ayuda en el estudio de resonancia magnética nuclear en estado sólido, no sólo en la realización de los experimentos, también a la hora de interpretar los resultados, así como las enseñanzas recibidas.

Asimismo quiero agradecer al Dr. Eduardo García-Junceda y a la Dra. Ágatha Bastida su ayuda y enseñanzas recibidas, especialmente en el campo de biología molecular.

De forma especial me gustaría agradecer a Guillermo Corrales y a Juan Antonio Martínez, los cuales han participado directamente en este trabajo, su ayuda, amabilidad y su apoyo incondicional en momentos difíciles, ha sido una suerte haber podido trabajar con vosotros.

Quiero expresar mi cariño y gratitud a todos los compañeros del laboratorio a lo largo de estos años, especialmente a Carmen, Raquel, Félix, Elisa y Tatiana, por los buenos ratos compartidos, por su forma de ser y sobre todo, por haber estado ahí cuando más lo he necesitado. Igualmente a mis compañeros biólogos, Monste, Juanfran, Isra, Laura y Alex, por vuestra ayuda incondicional y amistad. A todos los que han formado parte del departamento

de QOB durante este tiempo, especialmente, Mario, Ana, Ángela, Tania, Lourdes, Bea, David, Samadi, Conchi, Pablo y Rafa, por los buenos momentos compartidos. Muchas gracias también a todos los compañeros y amigos del IQOG, especialmente Miguel Ángel, Nacho, Aitor y Elena.

Finalmente, quiero agradecer a toda mi familia y amigos el interés y ánimos recibidos para sacar adelante este trabajo; y de un modo especial a mis padres, hermanas y a mi tía Elena, por su comprensión y su ayuda en todo momento.

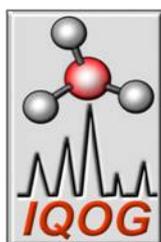
Muchas gracias Alberto, por tu apoyo incondicional y tu forma de ser, por haber estado ahí siempre que te he necesitado.

A todos, gracias

Esta tesis doctoral se ha desarrollado en el departamento de Química Orgánica Biológica del Instituto de Química Orgánica General (CSIC), dentro del programa de doctorado “La Química como Ciencia Multidisciplinar” del departamento de Química Orgánica de la Universidad Autónoma de Madrid.

Ha sido financiada mediante una beca de postgrado I3P y una beca predoctoral del proyecto intramural del CSIC (PIF:200580F0062), por FAES-FARMA S.A. y el Ministerio de Educación y Ciencia (CTQ2004-03523/BQU).

La estancia en la Universidad de Würzburg, Alemania, fue financiada con una beca Marina Bueno para estancias breves, del convenio CSIC-DFG.



Acrónimos y abreviaturas

Ac	Acetilo
Bn	Bencilo
Cbz	Carbobenzoxi
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
Ph	Fenilo
ⁱ Pr	Iso-propilo
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahirofurano
<i>p</i> -TsOH	Ácido <i>p</i> -Toluensulfónico
RMN	Resonancia magnética nuclear
Tr	Tritilo

Índice

Capítulo 1: Introducción y objetivos.....	1
1.1 Introducción.....	3
1.2 Inhibidores naturales y sintéticos de la proliferación de astrocitos.....	6
1.3 Objetivos.....	11
Capítulo 2: Síntesis de glicósidos derivados de Glucosamina.....	15
2.1 Diseño de los compuestos. Elección de los sustituyentes.....	17
2.2 Obtención de glicósidos sustituidos en las posiciones 1 y 2 del anillo de glucosamina.....	22
2.3 Obtención de glicósidos sustituidos en las posición 6 del anillo de glucosamina.....	26
2.3.1 Obtención de glicósidos con una cadena de pentaeritritol.	
2.3.2 Obtención de glicósidos con una cadena de glicerilo.	
2.4 Modificaciones en C-2.....	29
2.4.1 Tratamiento con hidróxido de Bario.	
2.4.2 Empleo del grupo pentenoilo.	
2.4.3 Transacilación.	
2.5 Compuestos con un grupo sulfato en posiciones 3 ó 6.....	32
Capítulo 3: Actividad de los glicósidos como inhibidores del crecimiento de gliomas y melanomas.....	37
3.1 Gliomas y melanomas.....	39
3.2 Resultados y discusión.....	41

Capítulo 4: Estudio del mecanismo de inhibición de los glicósidos antitumorales.....	47
4.1 Introducción y objetivos.....	49
4.1.1 Funciones de los gangliósidos en células tumorales.	
4.1.2 Biosíntesis de gangliósidos.	
4.2 Análisis del patrón de gangliósidos.....	54
4.2.1 Extracción de gangliósidos.	
4.2.2 Análisis y asignación.	
4.3 Análisis de ceramida.....	59
4.4 Efecto de los glicósidos sobre el metabolismo de gangliósidos y ceramida en células tumorales.....	61
4.4.1 Línea celular de melanoma humano A375 incubada en presencia de 1% de suero.	
4.4.2 Línea celular de glioma de rata C6 incubada en presencia de 1% de suero.	
4.4.3 Línea celular de glioma de rata C6 incubada sin suero.	
4.5 RMN de C6 incubadas con los glicósidos inhibidores.....	71
4.6 Discusión: mecanismo de inhibición.....	78
Capítulo 5: Perspectivas. Ensayos <i>in vivo</i> y desarrollo de sistemas poliméricos para la liberación controlada del glicósido antitumoral.....	89
Conclusiones.....	97
Parte experimental.....	101
Apéndice I: Obtención de la enzima lactosilceramida sintasa.....	143
Apéndice II: RMN en estado sólido.....	153

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

Aunque durante mucho tiempo se asignaron a los carbohidratos funciones de reserva energética y estructuras de sostén, hoy se sabe que además están implicados en numerosos procesos biológicos importantes. Este creciente interés por el estudio de los carbohidratos ha conducido al desarrollo de una nueva disciplina conocida como *Glicobiología*.

La gran diversidad estructural de los oligosacáridos, que se expresan en la superficie celular en forma de glicoconjugados¹ (fundamentalmente glicoproteínas² y glicolípidos³), hace que sean excelentes portadores de información.^{4,5,6} Así, pueden actuar como moléculas señales mediadoras de procesos biológicos y marcadores específicos en procesos de reconocimiento de moléculas, microorganismos y células.⁷ En la Figura 1.1 se ilustran algunos de estos procesos. El conocimiento de estas funciones está conduciendo al desarrollo de nuevos fármacos basados en estructuras de carbohidratos.^{8,9}

¹ Allen, H. J.; Kisailus, E. C. En *Glycoconjugates-Composition, Structure and Function*; Marcial Dekker, Nueva York, **1992**.

² Stults, C. L. M.; Sweeley, C. C.; Macher, B. A. en *Methods in Enzymology*; Press, A.; San Diego, **1989**, 167.

³ Gahmberg, C. G.; Tolvanen, M. *TIBS*. **1996**, 21, 308.

⁴ Ernst, B.; Hart, G. W.; Sinaÿ, P., Eds.; *Carbohydrates in Chemistry and Biology*. Wiley-VCH: Weinheim, Germany. **2000**, Vols. 1-4.

⁵ Fraser-Reid, B. O.; Tatsuta, K.; Thiem, J., Eds.; *Glycoscience, Chemistry and Chemical Biology*. Springer: Berlín, Germany. **2001**, Vols. 1-3.

⁶ Los oligosacáridos incorporan mucha más información por unidad de peso que otras biomoléculas como ácidos nucleicos y proteínas. Así, por ejemplo, dos monosacáridos iguales dan lugar a 11 disacáridos diferentes, mientras que dos aminoácidos iguales sólo producen un dipéptido. Del mismo modo, cuatro nucleótidos diferentes originarán 24 tetranucleótidos distintos, mientras que cuatro monosacáridos distintos podrían configurar hasta 35560 tetrasacáridos.

⁷ L. Nelson, D.; M. Cox, M.; Eds. *Lehninger Principles of Biochemistry*. **2006**, 266.

⁸ Koeller, K. M.; Wong, C. H. *Nature Biotechnology*. **2000**, 18, 835-841.

⁹ Wong, C. H., Ed.; *Carbohydrate-based Drug Discovery*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany. **2003**, Vols. 1-4.

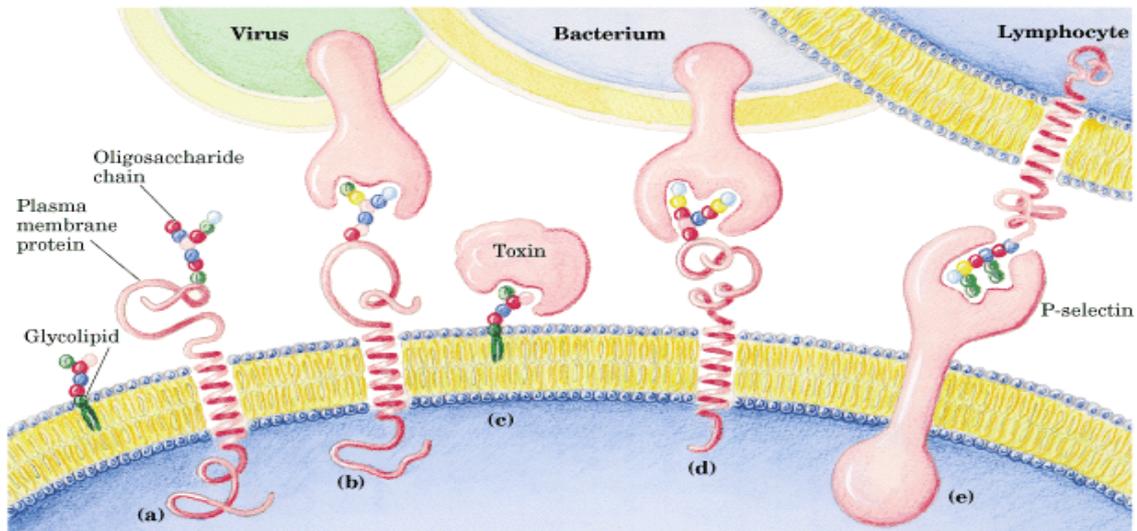


Figura 1.1. Funciones de oligosacáridos de reconocimiento y adhesión en la superficie celular. (a) Oligosacáridos con una determinada estructura, son componentes de glicoproteínas o glicolípidos expuestos en la cara exterior de la membrana plasmática, interaccionan con alta especificidad y afinidad con lectinas del medio extracelular. (b) Virus que infectan células animales, como el virus influenza, se une a glicoproteínas de la superficie celular en la primera fase de la infección. (c) Toxinas bacterianas, como el cólera, se unen a glicolípidos en la superficie antes de entrar en la célula. (d) Algunas bacterias, como *H. Pylori*, se adhieren antes de invadir o infectar células animales. (e) Selectinas (lectinas) de la membrana plasmática en algunas células regulan las interacciones célula-célula, como la interacción de los linfocitos T con las células endoteliales que forman la pared de los capilares durante el proceso de extravasación después de una infección.

Sin embargo, a pesar del esfuerzo dedicado al estudio de estas moléculas, aún no se conocen con profundidad los detalles moleculares de los procesos biológicos en los que participan, en gran parte debido a la complejidad estructural de los oligosacáridos y glicoconjugados que requieren métodos muy sofisticados de análisis, de caracterización y de síntesis. Así, en los carbohidratos existe un elevado número de grupos hidroxilo de reactividad similar, y la formación de enlaces glicosídicos requiere control de la estereoselectividad, todo lo cual conlleva que las rutas de síntesis de oligosacáridos sean largas y complejas. Otra razón, no menos importante, es la dificultad de aislar carbohidratos de fuentes naturales y averiguar su estructura, así como la extensa micro-heterogeneidad de glicoconjugados naturales.

Mientras que las glicoproteínas son los glicoconjugados principales en la mayoría de los tejidos, los glicolípidos predominan en el cerebro de los

vertebrados,¹⁰ y entre éstos los gangliósidos ocupan un lugar relevante. Los gangliósidos tienen como característica estructural la presencia de uno o varios residuos de ácido siálico^{11,12} en la cadena de oligosacárido que se encuentra unida al hidroxilo en posición 1 del lípido, la ceramida. En el residuo de ácido siálico el grupo amino suele estar como *N*-acetilo y en este caso se denomina ácido *N*-acetil-neuramínico (Neu5Ac). Como ejemplo representativo se muestra en la Figura 1.2 la estructura del gangliósido GD1a, el cual posee dos unidades de *N*-acetil-neuramínico.

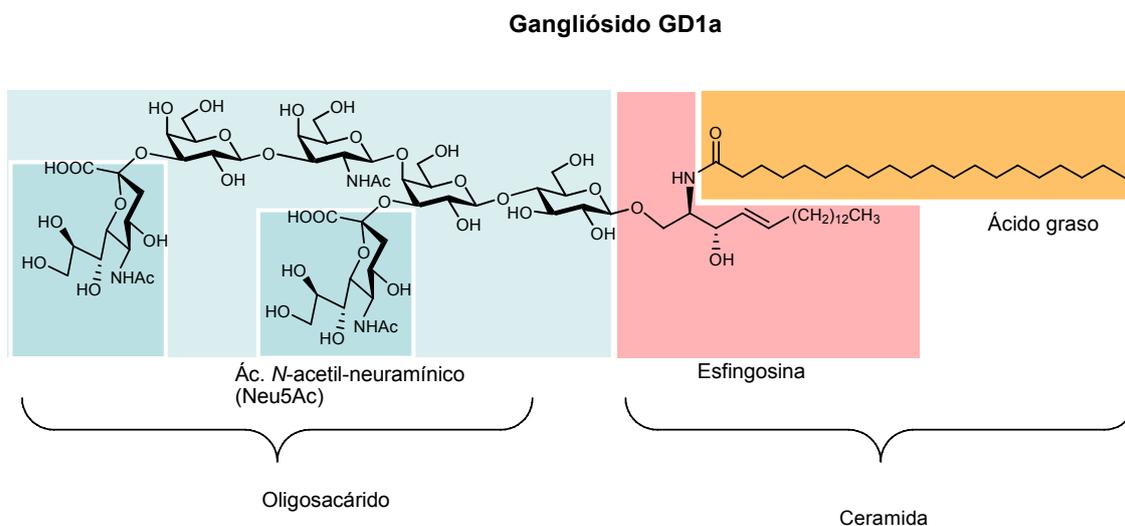


Figura 1.2.

Los gangliósidos se encuentran presentes en la cara exterior de la membrana celular en todo tipo de tejidos, con el esqueleto hidrofóbico de ceramida anclado en la membrana y el residuo hidrofílico de carbohidrato proyectado hacia el medio extracelular. En el sistema nervioso central los gangliósidos juegan un papel importante en determinados eventos y situaciones. Así, ayudan a la estabilización de la vaina de mielina que recubre el axón, esencial para la transmisión nerviosa, mediante la interacción entre la proteína MAG (*myeline-associated glycoprotein*) presente en la mielina y

¹⁰ Ernst, B.; Hart, G. W.; Sinaÿ, P.; Eds. *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part II: Biology of Saccharides*. Wiley-VCH: Weinheim, Germany. **2000**, pp 1013-1027.

¹¹ El nombre de ácido siálico engloba todos los *N* y *O*-acil derivados del ácido neuramínico aislados de fuentes naturales. Estos compuestos también se denominan "ácidos acil-neuramínicos". El ácido *N*-acetil-neuramínico fue aislado por primera vez por A. Gottschalk, y publicado en *Nature*, **1951**, *167*, 845-847.

¹² Stuart T., R.; Horton, D. Eds.; *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press: New York, **1982**, Vol. 40, 132.

gangliósidos de la superficie de los nervios.^{13,14,15,16} También se sabe que los gangliósidos regulan la regeneración axonal después de una lesión,¹⁷ lo cual es objeto de investigación en estudios que tratan sobre la reparación de lesiones medulares. Es conocido que cambios dramáticos en la composición de determinados gangliósidos y su metabolismo están asociados con la transformación oncogénica.^{18,19} Así, determinados gangliósidos se sobreexpresan en células de glioma, el cáncer de cerebro más frecuente en humanos. En este contexto, el trabajo de la presente tesis doctoral se enmarca dentro del estudio de la inhibición de la división de células tumorales mediante moléculas sintéticas cuyo diseño está basado en el papel que juegan los gangliósidos en la proliferación de células neurales.

1.2 INHIBIDORES NATURALES Y SINTÉTICOS DE LA PROLIFERACIÓN DE ASTROCITOS.

Existen dos tipos de células que forman el sistema nervioso central (SNC): neuronas y neuroglía. Las *neuronas*, células excitables, permiten el procesamiento de la información en el cerebro mediante la transmisión de señales eléctricas complejas. La *neuroglía*, también conocida como células gliales, desempeñan la función de soporte mecánico de las neuronas y son fundamentales en el desarrollo de las redes neuronales desde las fases embrionarias, pues juegan el rol de guía y control de las migraciones neuronales en las primeras fases de desarrollo, así como la regulación bioquímica del crecimiento y desarrollo de los axones y dendritas. Son también las encargadas de servir de aislante en los tejidos nerviosos, al conformar las vainas de mielina que protegen y aíslan los axones de las neuronas.

¹³ Pan, B.; Fromholt, S. E.; Hess, E. J.; Crawford, T. O.; Griffin, J. W.; Sheikh, K. A.; Schnaar, R. L. *Exp. Neurol.* **2005**, *195*, 208-217.

¹⁴ Yang, L. J. S.; Zeller, C. B.; Shaper, N. L.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Shapiro, R. E.; Schnaar, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1996**, *93*, 814-818.

¹⁵ Collins, B. E.; Yang, L. J. S.; Mukhopadhyay, G.; Filbin, M. T.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Schnaar, R. L. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1248-1255.

¹⁶ Collins, B. E.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Tropak, M. B.; Roder, J. C. Crocker, P. R.; Schnaar, R. L. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16889-16895.

¹⁷ Vyas, A. A.; Blixt, O.; Paulson, J. C.; Schnaar, R. L. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16305-16310.

¹⁸ Hakomoris, Z. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 97-104.

¹⁹ Birkle, S.; Zeng, G.; Gao, L.; Yu, R. K.; Aubry, J. *Biochimie.* **2003**, *85*, 455-463.

Entre los distintos tipos de células gliales, cabe destacar los astrocitos o células astrogliales, llamados así por su forma estrellada. El número de astrocitos permanece estacionario a lo largo de la edad adulta de los mamíferos,^{20,21} aunque mantienen la capacidad de dividirse. Existen en el cerebro altas concentraciones de polipéptidos con actividad mitogénica para los astrocitos,²² sin embargo las células gliales raramente se dividen excepto a continuación de una lesión. Es posible que en circunstancias normales la actividad mitogénica se halle bloqueada por inhibidores y que, después de una lesión, un descenso en la cantidad de inhibidor permita a los mitógenos expresar su actividad.

La transición de los astrocitos del estado quiescente al estado reactivo posee una gran importancia desde el punto de vista clínico porque da lugar a la formación de la cicatriz glial, que constituye uno de los principales problemas para la recuperación funcional del SNC. Después de una lesión la proliferación de astrocitos precede al crecimiento de los axones e impide su paso a través del área dañada, lo que hace imposible el restablecimiento de la sinapsis²³ (Figura 1.3).

²⁰ Sturrock, R. R. *Adv Cell Neurobiol.* **1982**, 3, 3-33.

²¹ Korr, H. en *Astrocytes* Federoff, S. Vernadakis, A., Ed. Academic Press Ltd., London, **1986**.

²² Nieto-Sampedro, M.; Saneto, R. P.; De Vellis, J.; Cotman, C. W. *Brain Res.* **1985**, 343, 320-328.

²³ Glenn Yiu and Zhigang He. *Nature Reviews. Neuroscience.* **2006**, 7, 617-627.

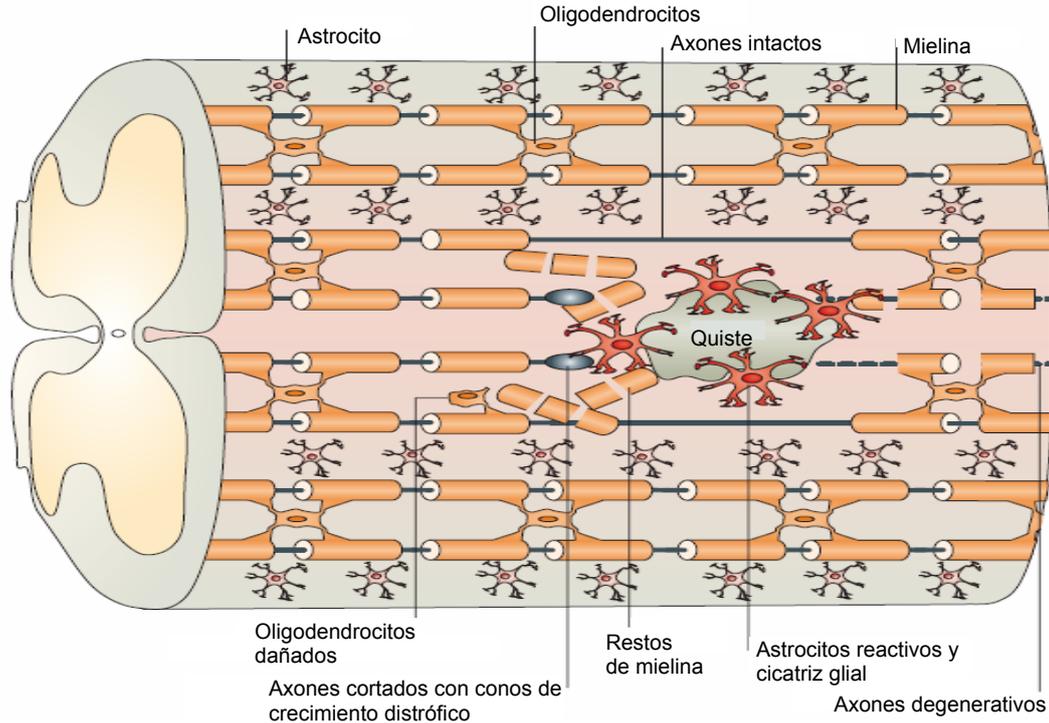


Figura 1.3. Representación esquemática de una lesión de SNC. Este tipo de lesión en adultos a menudo resulta en el corte transversal de fibras nerviosas y lesiones en los tejidos adyacentes. Los extremos de los axones dañados forman conos de crecimiento distrófico que están expuestos al entorno glial dañado. Durante la primera fase de la lesión, inhibidores asociados a mielina de oligodendrocitos intactos y restos de mielina pueden restringir el crecimiento de los axones. La acumulación de células inflamatorias y astrocitos reactivos con el tiempo conduce a la formación de la cicatriz glial, frecuentemente acompañada por un quiste. Este proceso de cicatrización está asociado con un aumento en la liberación de proteoglicanos condroitina sulfato, que pueden limitar una regeneración futura. En conjunto, estos inhibidores del entorno glial del SNC hacen que el medio no sea adecuado para la reparación de los axones.

Dado el interés en el control de la cicatriz glial, y puesto que la mayoría de los tumores del sistema nervioso central son gliomas, resulta de gran importancia la caracterización y purificación de sustancias naturales involucradas en el control de la división de células gliales, así como de moléculas similares a las naturales.

La existencia de inhibidores naturales de la división de astrocitos presentes en extractos de cerebro fue descrita por primera vez por Manuel Nieto-Sampedro.²⁴ Los datos estructurales que se disponían del inhibidor eran escasos y derivaban principalmente de experimentos con anticuerpos específicos. Estos datos indicaban que era de naturaleza glucídica y su epítipo estaba relacionado inmunológicamente con los determinantes antigénicos de

²⁴ Nieto-Sampedro, M. *Science*. 1988, 240, 1784-1786.

los grupos sanguíneos A y Lewis X, aunque también se contemplaba la presencia de residuos de ácido *N*-acetil-neuramínico.^{25,26} A partir de estos datos nuestro grupo de investigación, en colaboración con Nieto-Sampedro, diseñó y sintetizó una serie de tri- y tetrasacáridos que contenían fragmentos de lactosa o lactosamina, con residuos de *L*-fucosa, *N*-acetil-galactosamina, ácido *N*-acetil-neuramínico o un sulfato que mimetizase la presencia del neuramínico. Los compuestos sintéticos se evaluaron como inhibidores de la división de células neurales, algunos de los cuales mostraron actividad frente a células C6 de glioma de rata a concentraciones de micromolar.^{27,28,29,30} En la Figura 1.4 se muestran las estructuras de algunos de los oligosacáridos que mostraron mejor actividad.

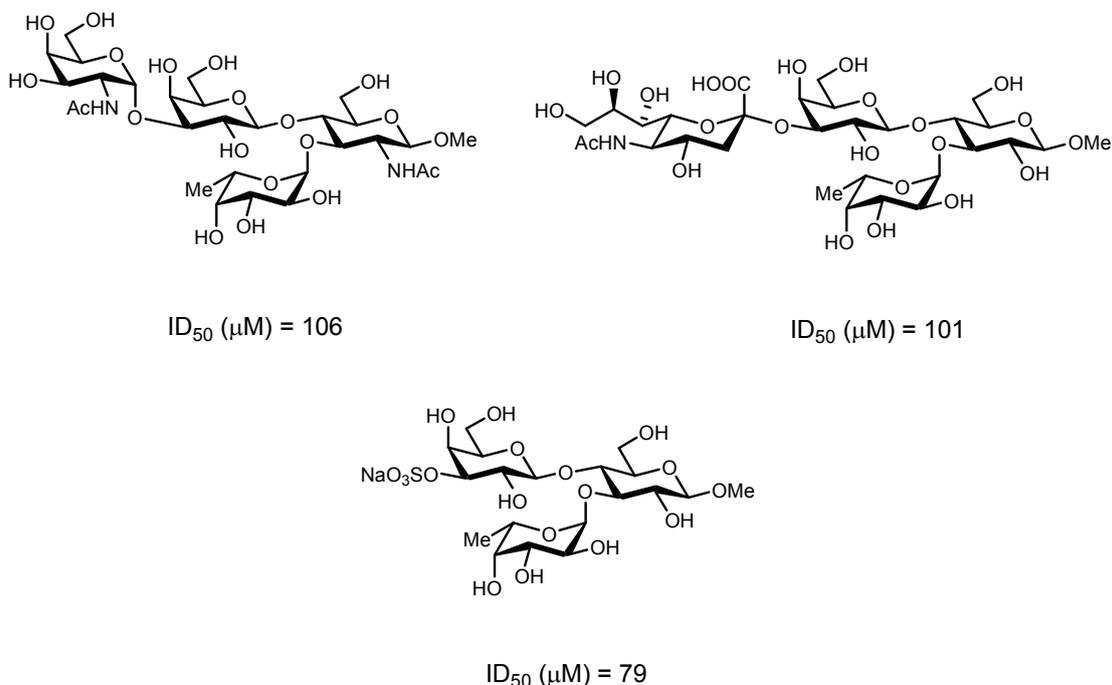


Figura 1.4. Estructura de los oligosacáridos sintéticos y actividad antimitótica en cultivos de líneas de glioma C6 de rata.

²⁵ Nieto-Sampedro, M., Broderick J.T. *J. Neurosci. Res.* **1989**, 22, 28-35.

²⁶ Abad-Rodríguez, J.; Bernabé, M.; Romero-Ramírez, L.; Vallejo-Cremades, L.; Fernández-Mayoralas, A.; Nieto-Sampedro, M. *J. Neurochem.* **2000**, 74, 2547-2556.

²⁷ Santos-Benito, F. F.; Fernández-Mayoralas, A.; Martín-Lomas, M.; Nieto-Sampedro, M. *Carbohydrate Res.* **1992**, 230, 185-190.

²⁸ Santos-Benito, F. F.; Fernández-Mayoralas, A.; Martín-Lomas, M.; Nieto-Sampedro, M. *J. Exp. Med.* **1992**, 176, 915-918.

²⁹ Coterón, J. M.; Kamaljit, S.; Asensio, J. L.; Domínguez-Dalda, M.; Fernández-Mayoralas, A.; Jiménez-Barbero, J.; Martín-Lomas, M.; Abad-Rodríguez, J.; Nieto-Sampedro, M. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 1502-1519.

³⁰ Nieto-Sampedro, M.; Bailon, C.; Fernandez-Mayoralas, A.; Martin-Lomas, M.; Mellstrom, B.; Naranjo, J. R. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* **1996**, 55, 169-177.

Las síntesis de estos compuestos se llevaron a cabo siguiendo los esquemas característicos de las síntesis de oligosacáridos, que implican un elevado número de etapas de protección y desprotección, así como el control de la estereoselectividad en la formación de enlaces glicosídicos. Considerando una posible aplicación clínica de los compuestos, sus síntesis no resultaban prácticas y, por tanto, se llevó a cabo la preparación de una segunda generación de compuestos más simples en los que determinados residuos de monosacáridos fueron reemplazados por cadenas hidroxiladas. De este modo se obtuvieron series de di- y monosacáridos, algunos de los cuales presentaron actividad inhibitoria en cultivo de células de glioma humano U373 (Figura 1.5).³¹

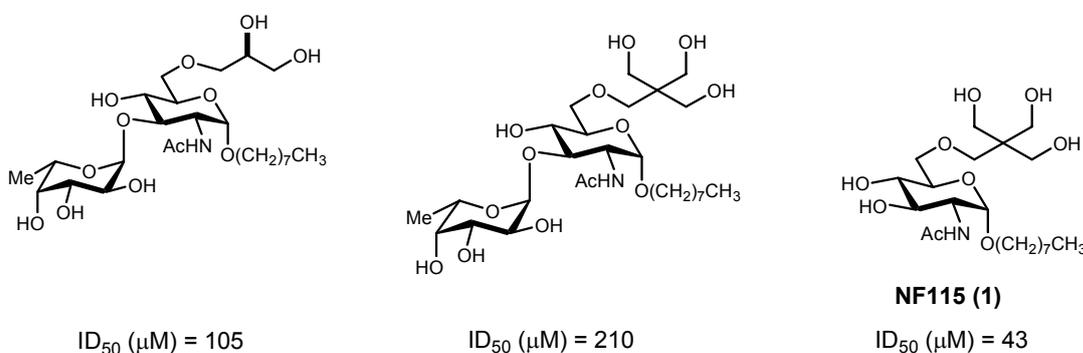


Figura 1.5. Estructura de los glicósidos sintéticos con actividad antimetabólica en cultivos de líneas de glioma U373 humano.

Entre los nuevos compuestos cabe destacar el monosacárido NF115 por su simplicidad y actividad antimetabólica, el cual fue seleccionado para llevar a cabo experimentos in vivo. El efecto in vivo de NF115 sobre el crecimiento de un tumor se probó en ratas Wistar a las que se implantó un tumor neuroectodérmico en el espacio epicraneal.³² En la Figura 6 se muestra el crecimiento del tumor en los grupos de ratas, tratadas con NF115 y control, a lo largo de los días de tratamiento. Se observa como en los controles el tumor creció rápidamente y tuvieron que sacrificarse a los 8 días de tratamiento. En cambio, en las tratadas con NF115 se inhibió el crecimiento del tumor sin observarse reacciones adversas clínicamente significativas.

³¹ Aguilera, B.; Romero-Ramirez, L.; Abad-Rodriguez, J.; Corrales, G.; Nieto-Sampedro, M.; Fernández-Mayoralas, A. *J Med Chem.* **1998**, *41*, 4599-4606.

³² Fernandez-Mayoralas, A.; De La Figuera, N.; Zurita, M.; Vaquero, J.; Abraham, G. A., San Román, J.; Nieto-Sampedro, M. *J Med Chem.* **2003**, *46*, 1286-1288.

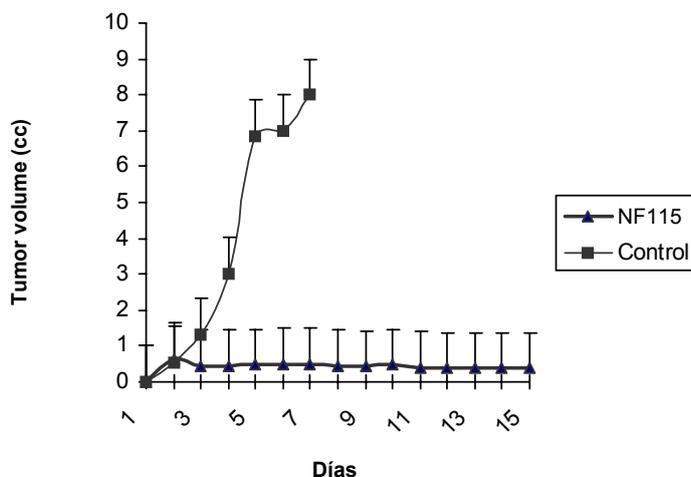
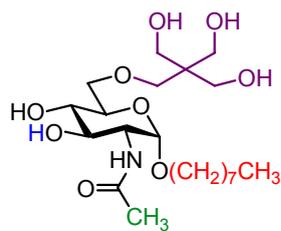


Figura 1.6. Crecimiento de un tumor en ratas tratadas con NF115 y con suero salino (controles).

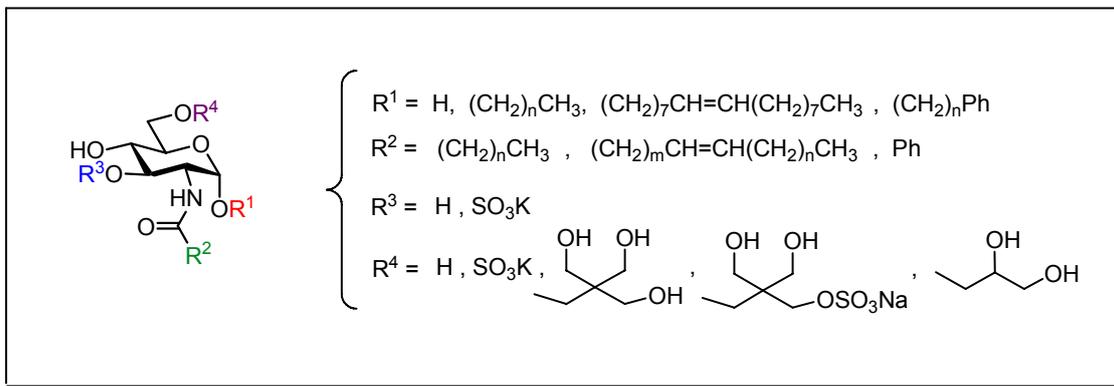
Aun cuando los resultados *in vivo* obtenidos con NF115 fueron muy positivos, era necesario el empleo de una alta dosis de compuesto lo que hacía difícil su aplicación en animales superiores. Por tanto, decidimos obtener una nueva familia de glicósidos sobre la base de la estructura de NF115, con el fin de obtener nuevas moléculas con mejor actividad.

1.3 OBJETIVOS.

Como primer objetivo de este trabajo se propuso la síntesis de una nueva familia de glicósidos en base a la estructura de NF115, con modificaciones en las posiciones 1, 2, 3 y 6 del anillo de glucosamina (Esquema 1.1). El diseño y síntesis de los compuestos se describen y discuten en el capítulo 2.



NF115 (1)



Esquema 1.1.

La actividad antimitótica de los nuevos compuestos sintetizados se ha ensayado en cultivos de glioma de rata (C6), glioma humano (U373) y en melanoma humano (A375). En el capítulo 3 se recogen los resultados y se discuten en función de la relación estructura-actividad.

Asimismo, se propuso conocer el modo de acción de los compuestos que resultasen más activos, sobre la hipótesis de que actuaran alterando el metabolismo de gangliósidos de las células tumorales. El conocimiento del mecanismo de inhibición es una valiosa información para poder diseñar nuevos compuestos con mejores propiedades como fármacos. De este modo, se propuso como objetivo estudiar el patrón de gangliósidos de células de glioma y melanoma cultivadas en presencia y ausencia de los inhibidores, con objeto de conocer si el contenido total de gangliósidos, así como la proporción entre ellos, se ve alterada en células tratadas con los glicósidos. Dentro de este estudio se abordó el clonaje de una glicosiltransferasa de la ruta de biosíntesis de gangliósidos, el enzima lactosilceramida sintasa, con el fin de ensayar la posible inhibición por los compuestos sintéticos. También se registraron los espectros de protón aplicando la técnica de *magic angle spinning* (¹H MAS

RMN) de las células intactas tratadas con los inhibidores, con el fin de conocer el efecto que producen sobre los metabolitos celulares.

En la última parte de esta tesis se iniciaron trabajos dirigidos a la obtención de sistemas de liberación controlada de los glicósidos. Para ello se propuso la preparación de copolímeros formados por componentes monoméricos de glicósidos antitumorales y componentes que modulan el carácter hidrofílico del sistema.

CAPÍTULO 2

SÍNTESIS DE GLICÓSIDOS DERIVADOS DE GLUCOSAMINA

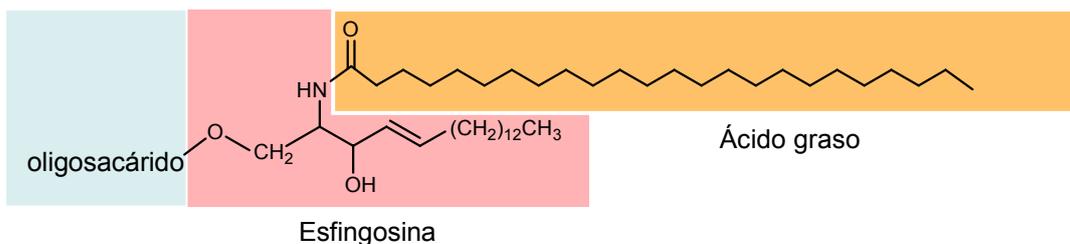
La obtención de nuevos compuestos estructuralmente mucho más simples que el inhibidor natural de la división de células neurales y con propiedades inhibitorias mejores que el glicósido sintético NF115, es el primer objetivo de esta tesis. Las rutas de síntesis de estos compuestos deben permitir acceder a un alto número de compuestos estructuralmente relacionados, de tal modo que de los ensayos biológicos pueda obtenerse información sobre la relación estructura-actividad. Además, la síntesis debe tener lugar en un número reducido de etapas, de manera que pueda ser llevada a cabo en escala de gramos.

A lo largo de este capítulo se muestran y discuten los resultados obtenidos.

2.1 DISEÑO DE LOS COMPUESTOS. ELECCIÓN DE LOS SUSTITUYENTES

Sobre la base de la estructura de NF115 se diseñaron nuevos compuestos que llevarían modificaciones en las posiciones 1, 2, 3 y 6 del anillo de glucosamina. La naturaleza de las modificaciones se concibieron atendiendo a los datos más recientes sobre la estructura del inhibidor natural, la *neurostatina*,³³ el cual es un glicolípido que pertenece a la familia de los gangliósidos. La parte lipófila de los gangliósidos es una ceramida, un residuo que contiene dos cadenas hidrocarbonadas y que presenta un doble enlace en su estructura (Figura 2.1). La parte glucídica es un oligosacárido que contiene una o más unidades del monosacárido ácido *N*-acetil-neuramínico (Neu5Ac), que como tal presenta una carga negativa.

³³ Abad-Rodríguez, J.; Bernabé, M.; Romero-Ramírez, L.; Vallejo-Cremades, L.; Fernández-Mayoralas, A.; Nieto-Sampedro, M. *J. Neurochem.* **2000**, *74*, 2547-2556.



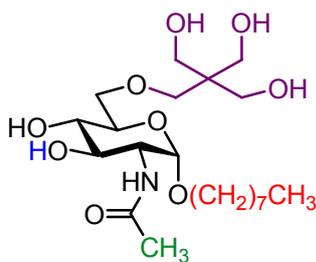
Nombre	Oligosacárido	Estructura
Ceramida ^a	—	—H
Glucosilceramida ^a	● =	
Lactosilceramida ^a	●● =	
Gangliósido GM3	●●◇ =	
Gangliósido GM2	■●◇ =	
Gangliósido GM1	●■●◇ =	
Gangliósido GD1a	●■●◇◇ =	

Glucosa
 Galactosa
 N-acetil-galactosamina
 Ác.N-acetil-neuramínico

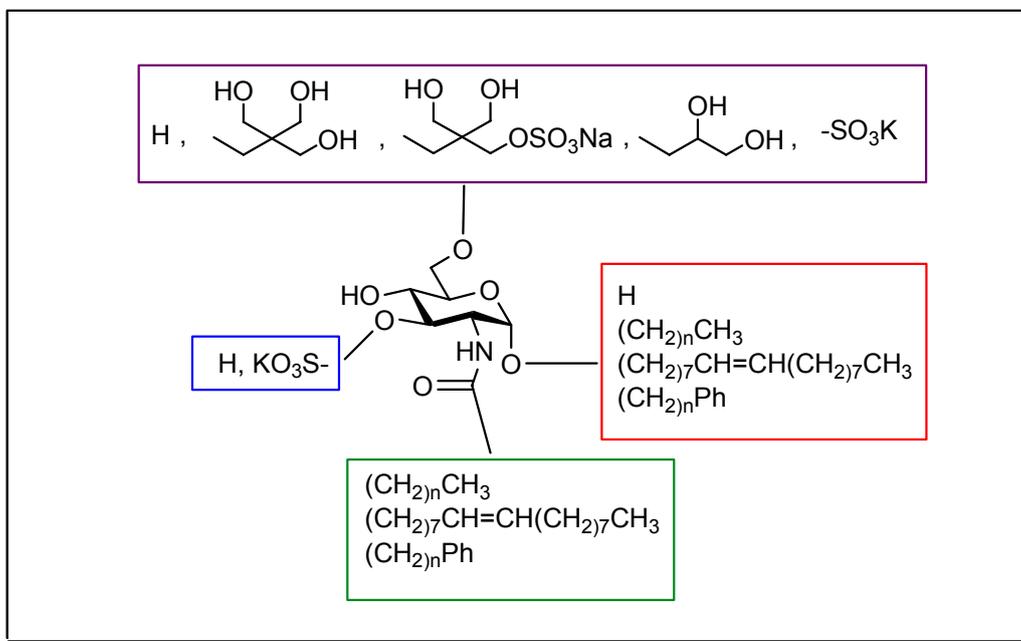
Figura 2.1. Estructura de gangliósidos. El ácido graso unido a la esfingosina puede ser saturado o con un doble enlace, con 16, 18, 22 o 24 átomos de carbono. ^aPrecursores de gangliósidos.

De este modo y combinando los datos de NF115 y la estructura general de los gangliósidos, los nuevos compuestos serán glicósidos derivados de glucosamina (esquema 2.1) con cadenas hidrocarbonadas de longitud variable en posición 1 y que pueden contener un doble enlace en su estructura (derivados del alcohol oleico). Asimismo se prepararán glicósidos con un anillo aromático separado del oxígeno anomérico por 1, 2 ó 4 metilenos. La síntesis de los compuestos con un grupo fenilo se consideró a la vista de un trabajo

publicado recientemente que describe la inhibición del crecimiento de células de glioblastoma humano por glicopiranosídeos de arilos.³⁴ En el grupo amino de la posición 2 se van a introducir también cadenas hidrocarbonadas en forma de amidas de diferente longitud, lo que reforzará el carácter lipófilo de los nuevos compuestos y así se asemejarán más a la ceramida. Grupos alquilo hidroxilados en posición 6, derivados de pentaeritritol y glicerol, intentan mimetizar una unidad de glicósido, con la ventaja de que sus síntesis no requieren la formación de un enlace glicosídico. Finalmente, algunos derivados presentarán un grupo sulfato en posición 6 (o en su sustituyente) y en posición 3, con el fin de evaluar la importancia de la carga negativa, dado que, como se ha mencionado anteriormente, los gangliósidos se caracterizan por tener residuos de ácido neuramínico cargados negativamente.



NF115 (1)



Esquema 2.1.

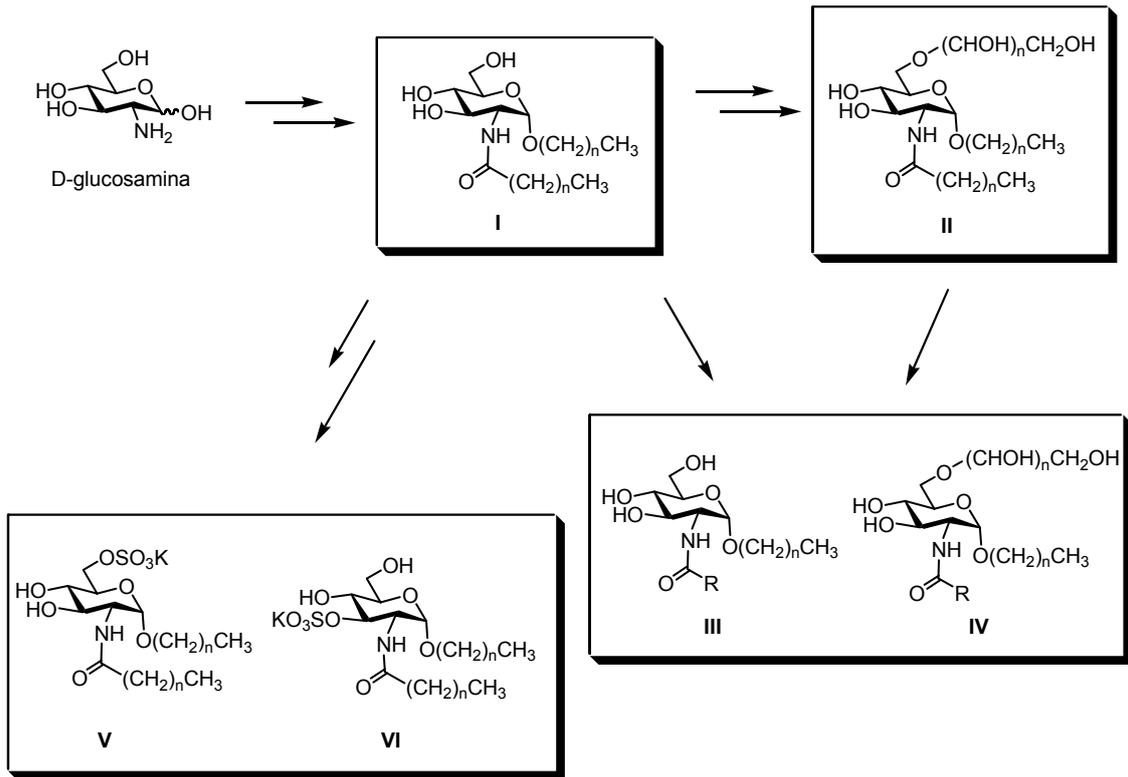
³⁴ Hanessian, S.; Zhan, L.; Bovey, R.; Saavedra, O. M.; Juillerat-Jeanneret, L. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3600-3611.

La reactividad de los grupos funcionales presentes en la glucosamina está bien diferenciada entre sí.³⁵ Así, la posición 1 es el carbono anomérico del monosacárido, sobre el cual puede llevarse a cabo una reacción de glicosidación con diferentes alcoholes. En la posición 2 se encuentra el grupo amino que puede ser acilado selectivamente en presencia del resto de grupos hidroxilo. La posición 6 presenta un hidroxilo primario más reactivo que los hidroxilos secundarios en posiciones 3 y 4. Finalmente las modificaciones sobre el hidroxilo HO-3 pueden realizarse mediante la protección previa de los restantes grupos funcionales.

A continuación se describen las síntesis de los compuestos las cuales se han conseguido mediante rutas sencillas y directas, asequibles para llevar a cabo preparaciones en escala de gramos. En el Esquema 2.2 se muestran las rutas seguidas que comienzan con la preparación de los compuestos modificados en las posiciones 1 y 2 (estructura I). A partir de éstos se obtuvieron los productos con grupos hidroxialquilos en posición 6 (estructura II) y los derivados con grupos sulfatos (estructuras V y VI).

Con objeto de crear diversidad molecular de un modo sencillo, otra vía que se abordó fue la preparación de nuevos compuestos a partir de los productos ya obtenidos I y II, aprovechando la posibilidad de realizar una reacción de transacilación en el grupo amido, y obtener los derivados III y IV. De este modo se hace uso de las modificaciones introducidas en 1 y 6 y no es necesario recorrer la ruta sintética para generar nuevos compuestos transformados en posición 2.

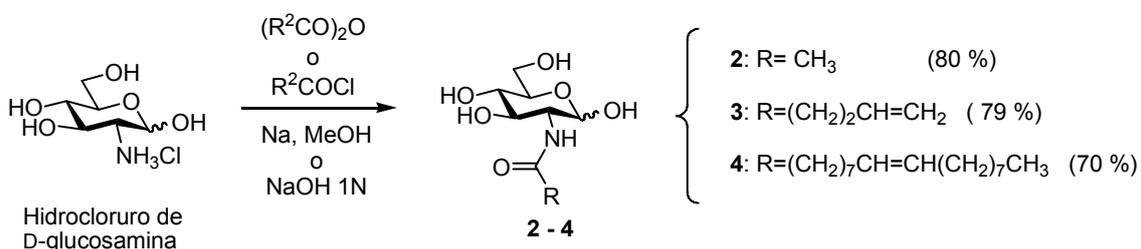
³⁵ Revisión general acerca de la reactividad relativa de los grupos hidroxilo en hidratos de carbono: A. H. Haines. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1976**, 33, 11-109.



Esquema 2.2

2.2 OBTENCIÓN DE GLICÓSIDOS SUSTITUÍDOS EN LAS POSICIONES 1 Y 2 DEL ANILLO DE GLUCOSAMINA.

Mediante acilación del grupo amino de la D-glucosamina con anhídrido acético, cloruro de pent-4-enoilo y cloruro de oleilo, se obtuvieron las correspondientes *N*-acilglucosaminas (**2-4**, esquema 2.3). Dado que se parte del hidrocloreto de glucosamina, la reacción necesita la adición de una base (NaOMe ó NaOH) para su desprotonación y generar la amina libre que es la especie reactiva.



Esquema 2.3

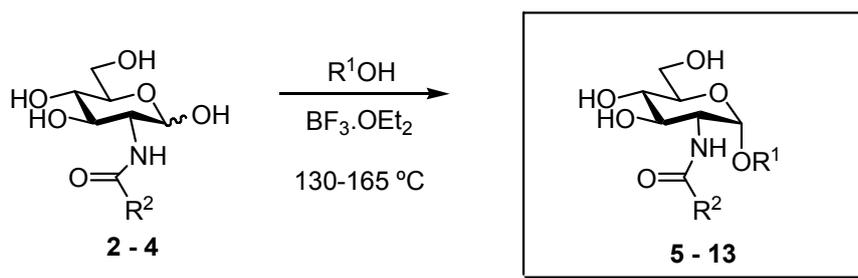
Una vez obtenidos los derivados acilados **2-4**, se llevó a cabo la modificación en posición 1 mediante una glicosidación de Fischer.³⁶ Esta reacción implica el tratamiento de azúcares libres con alcoholes en presencia de un catalizador ácido. La reacción transcurre mediante control termodinámico: en la mezcla final predominan los piranósidos sobre los furanósidos, y los α -glicósidos frente a los β -glicósidos. A pesar de ser el primer método de glicosidación, que fue descrito en el año 1893, es muy útil para la síntesis de glicósidos con alcoholes simples dado que no requiere ningún tipo de protección en los hidroxilos del azúcar. Sin embargo, se paga el precio de obtener rendimientos modestos por lo que suele emplearse en las primeras etapas de la síntesis. Se han realizado muchas modificaciones de la reacción original, el uso de ácidos de Lewis (FeCl₃, BF₃·Et₂O) en lugar de ácidos

³⁶ (a) Fischer, E. *Ber Dtsch. Chem. Ges.* **1893**, 26, 2400-2412. (b) Fischer, E. *Ber Dtsch. Chem. Ges.* **1895**, 28, 1145-1167.

prácticos permite la obtención de piranósidos con buenas selectividades.^{37,38,39,40}

En nuestro caso las reacciones se llevaron a cabo empleando el mismo alcohol a glicosilar como disolvente o adicionando un disolvente polar (acetonitrilo o nitrometano) en presencia de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. En la Tabla 2.1 se recogen las condiciones y resultados obtenidos de las reacciones de **2-4** con los diferentes alcoholes. Los rendimientos oscilaron entre 30-50%, excepto en los casos de los alcoholes de cadena larga hexadecanoico y oleico, que fueron significativamente más bajos. Hay que mencionar también que los derivados de *N*-acilglucosamina no son los compuestos más apropiados sobre los que pueden aplicarse el método de glicosidación de Fischer, ya que las altas temperaturas empleadas pueden dar lugar a la desacilación del grupo amido y consiguientes reacciones secundarias desde la amina generada.

Tabla 2.1. Sustituyentes y rendimiento obtenido para los compuestos 5-13.



Compuesto	R^1	R^2	Rdto. (%)
5	CH_2Ph	CH_3	38
6	$(\text{CH}_2)_2\text{Ph}$	CH_3	49
7	$(\text{CH}_2)_4\text{Ph}$	CH_3	47
8	$(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	CH_3	40
9	$(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$	CH_3	14
10	$(\text{CH}_2)_2\text{Ph}$	$(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{CH}_2$	52
11	$(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$	$(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{CH}_2$	34
12	$(\text{CH}_2)_8\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	CH_3	10
13	$(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	$(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	50

³⁷ Lubineau, A.; Fischer, J-C.; *Synth. Commun.* **1991**, 21, 815-818.

³⁸ Ferrie`res, V.; Bertho, J-N, Plusquellec, D. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2749-2752.

³⁹ Ferrie`res, V.; Bertho, J-N, Plusquellec, D. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1391-1393.

⁴⁰ Ferrie`res, V.; Bertho, J-N, Plusquellec, D. *Carbohydr. Res.* **1998**, 311, 25-35.

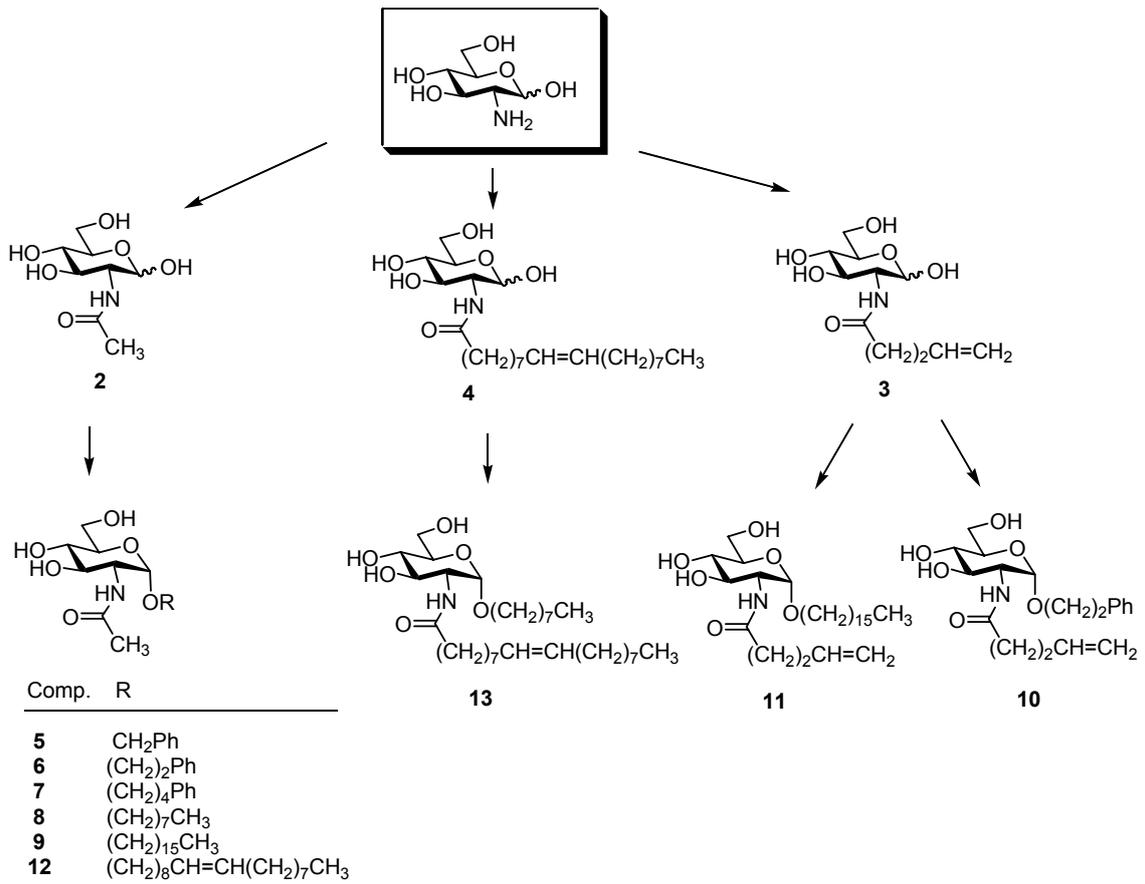
Para el caso del glicósido del alcohol oleico **12**, el cual dio lugar a buenos resultados en los ensayos de actividad antitumoral, como mostraremos más adelante, nos propusimos mejorar el rendimiento probando otros catalizadores ácidos y adicionando disolventes (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Condiciones de reacción para el compuesto **12**.

Entrada	Ácido	Disolvente	Temp.	Tiempo	Rdto
1	BF ₃ ·Et ₂ O (x 1.6)	Alcohol oleico	100 °C	2 h	10%
2	BF ₃ ·Et ₂ O (x 1.6)	Acetonitrilo seco	reflujo	2 h	33%
3	BF ₃ ·Et ₂ O (x 1.6)	Acetonitrilo seco (+ tamiz 4 A)	reflujo	2 h	<1%
4	Amberlita IR-120 (H ⁺)	Acetonitrilo seco	reflujo	2 h	<1%
5	BF ₃ OEt ₂ (x 1.6)	Alcohol oleico	MW: 100 °C	1h	<1%
6	H ₂ SO ₄ -sílice*	Nitrometano	100 °C	4h	38%

Así, cuando se empleó acetonitrilo como disolvente y BF₃·Et₂O como catalizador, a reflujo durante 2 horas, se mejoró el rendimiento (33%) frente a las condiciones iniciales (entradas 2 y 1, respectivamente). Los mejores resultados se obtuvieron empleando nitrometano como disolvente y ácido sulfúrico adsorbido sobre sílice a 100 °C durante 4 horas, dando lugar a **12** con un rendimiento del 38% (entrada 6). Estas condiciones tienen la ventaja adicional de emplear un catalizador más inocuo y manejable que BF₃·Et₂O.

De este modo se obtuvieron los glicósidos **5-13** que se muestran en el esquema 2.4.

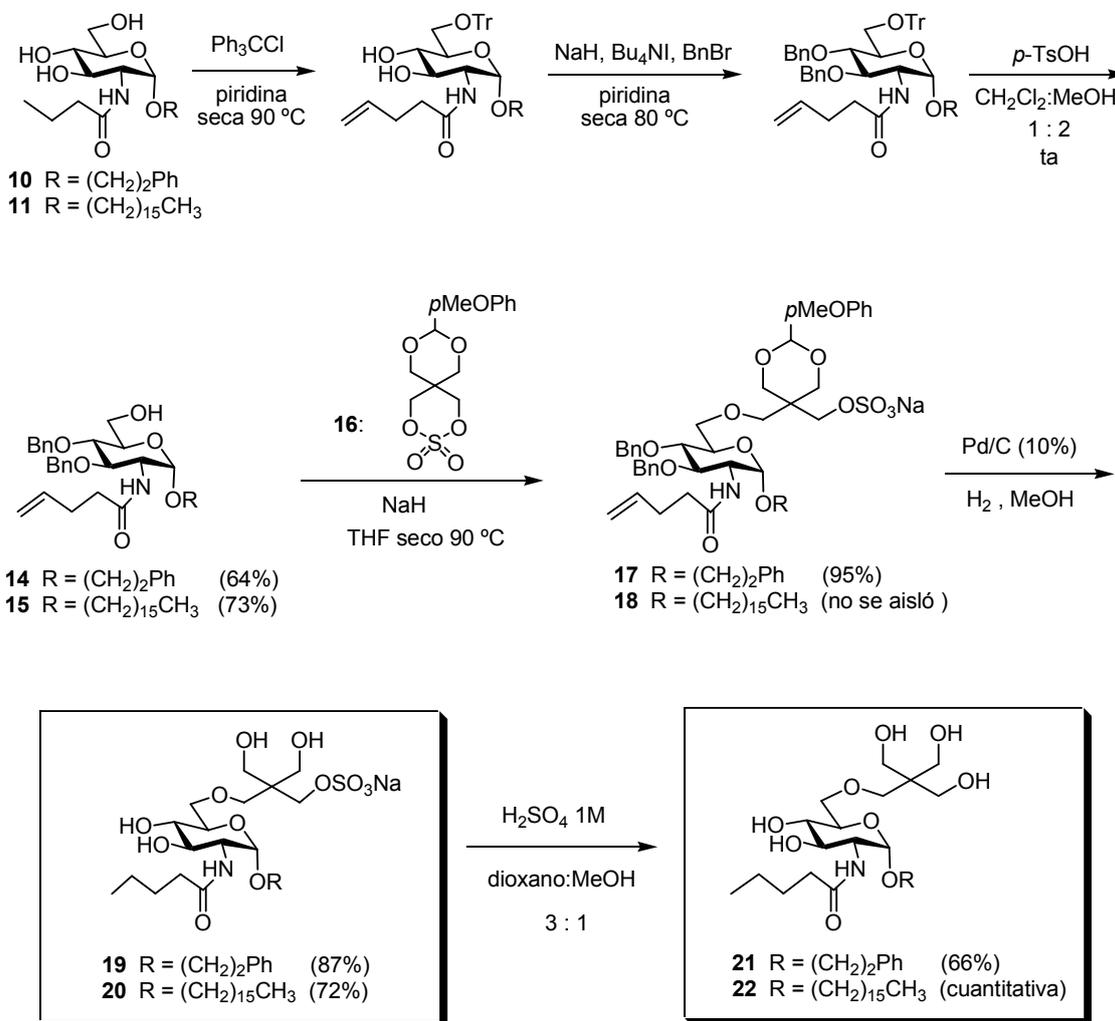


Esquema 2.4

2.3 OBTENCIÓN DE GLICÓSIDOS SUSTITUÍDOS EN LA POSICIÓN 6 DEL ANILLO DE GLUCOSAMINA.

2.3.1 Obtención de los glicósidos con una cadena de pentaeritritol.

Para la síntesis de compuestos con una cadena de pentaeritritol seleccionamos dos glicósidos, entre los ya preparados, uno de ellos con un resto aromático (compuesto **10**) y otro con una cadena hidrocarbonada (compuesto **11**). A partir de **10** y **11** se obtuvieron nuevos glicósidos según la secuencia de reacciones que se muestra en el esquema 2.5.

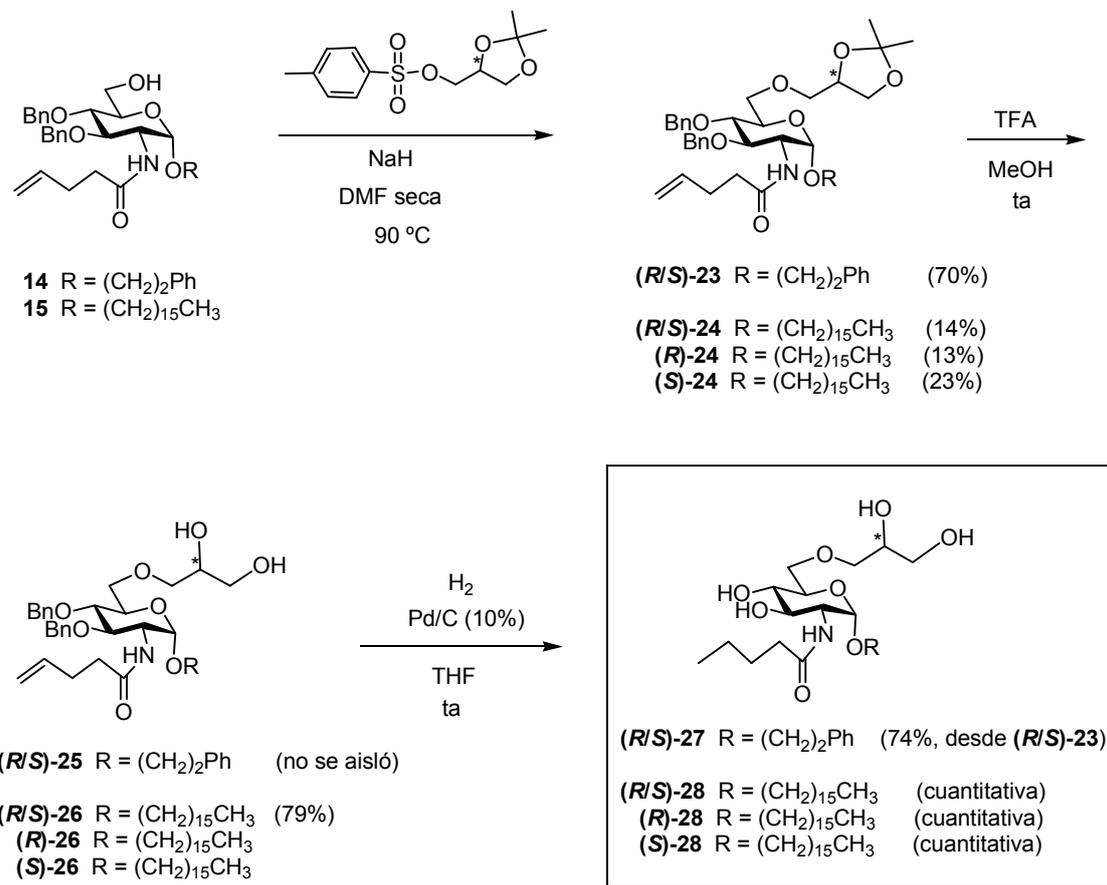


Esquema 2.5

Mediante una protección selectiva del hidroxilo primario HO-6, empleando un grupo voluminoso como es el tritilo, seguida de bencilación del HO-3 y HO-4 y destritilación se obtuvieron los alcoholes **14** y **15**. La alquilación con el sulfato cíclico **16** dio lugar a los intermedios **17** y **18**, que tras hidrogenolisis de los grupos benciliden y bencilo condujeron a los sulfatos **19** y **20**. Por último, la hidrólisis ácida del grupo sulfato dio lugar a los glicósidos **21** y **22**.

2.3.2 Obtención de los glicósidos con una cadena de glicerilo.

De una forma similar a la comentada anteriormente, se obtuvieron los compuestos con una cadena de glicerilo en posición 6 (esquema 2.6).



Esquema 2.6

Partiendo de los intermedios **14** y **15**, se llevó a cabo una alquilación con el tosilato de 2,3-isopropilidenglicerol en el HO-6. Así, se obtuvieron los compuestos **23** y **24** como mezcla equimolecular de epímeros en el carbono C-2 de la cadena de glicerol. Después de hidrólisis ácida e hidrogenolisis se obtuvieron los compuestos finales **27** y **28**. También obtuvimos los epímeros puros **(R)-24** y **(S)-24** por cromatografía en columna, que después de desproteger dieron lugar a los productos finales **(R)** y **(S)-28**.

La configuración *R* en C-2 de la cadena de glicerilo en **(R)-24** se dedujo por alquilación de **14** con el enantiómero puro tosilato de (*R*)-2,3-isopropilidenglicerol, que dio lugar a un compuesto idéntico a **(R)-24**.

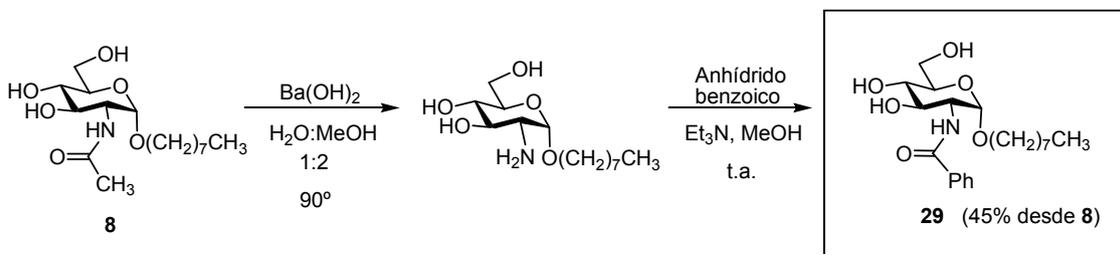
2.4 MODIFICACIONES EN C-2.

Se abordó la modificación del grupo acilo en la posición C-2, de forma que fuera posible obtener nuevos compuestos a partir de aquellos que tuvieran un grupo acilo en esta posición y al mismo tiempo estuvieran sustituidos en la posición anomérica.

Desde un punto de vista sintético, la hidrólisis de un grupo amido siempre es una reacción difícil pues requiere condiciones de reacción drásticas que no siempre son aplicables para algunos derivados de carbohidratos, lo que nos obligó a probar distintos métodos.

2.4.1 Tratamiento con hidróxido de Bario.

En primer lugar, se probó el tratamiento con hidróxido de bario^{41,42} para eliminar el grupo acetilo y obtener la amina libre, e “in situ” tratarla con un agente acilante. La reacción se llevó a cabo sobre el compuesto **8** y se utilizó anhídrido benzoico como agente acilante (Esquema 2.7). El rendimiento global de las dos etapas fue del 45%.



Esquema 2.7

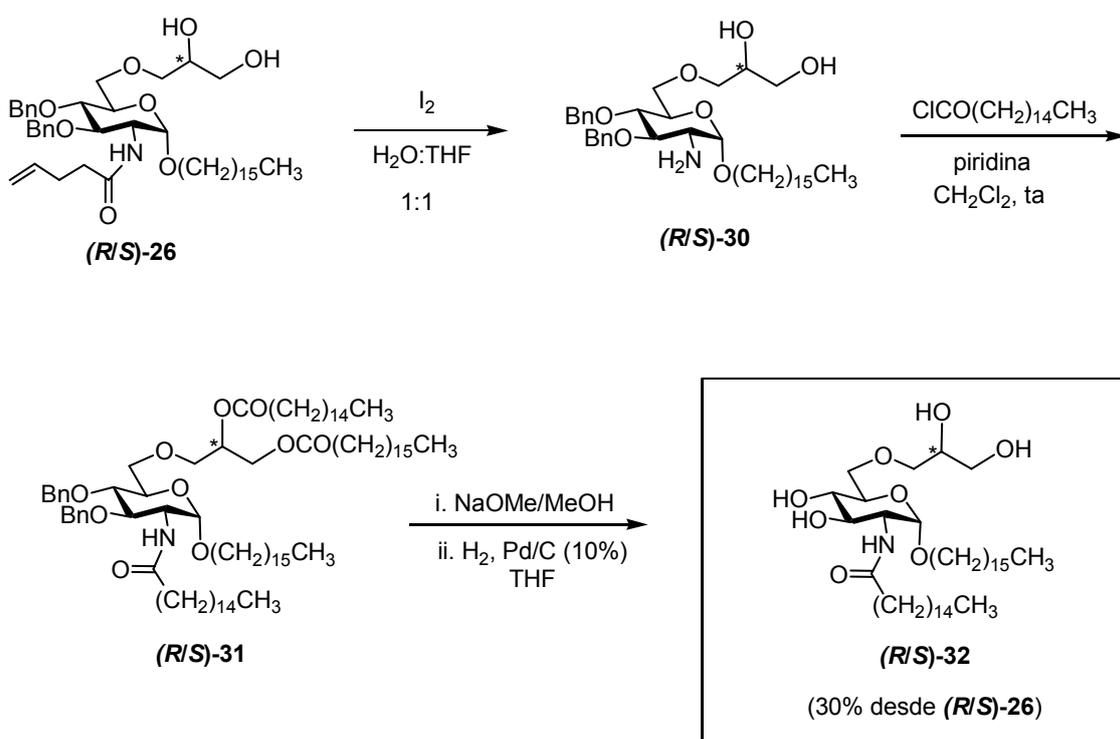
⁴¹ Bai, Y.; Boons, G. J.; Burton, A.; Johnson, M.; Haller, M. J. *Carbohydr. Chem.* **2000**, *19*, 939-958.

⁴² Fujita, S.; Numata, M; Sugimoto, K.; Tomita, K.; Ogawa, T. *Carbohydr. Res.* **1992**, *228*, 347.

2.4.2 Empleo del grupo pentenoilo.

El grupo pent-4-enoilo se ha utilizado para proteger el grupo amino, ya que se puede introducir fácilmente por tratamiento con anhídrido pentenoico, y es estable en muchas condiciones de reacción. Además, se puede eliminar en condiciones suaves dando lugar a la amina libre.⁴³

A partir del intermedio **(R/S)-26**, preparado según se describe en el esquema 2.7, se procedió a eliminar el grupo pentenoilo por tratamiento con yodo (3 equivalentes) y la amina resultante **(R/S)-30** se aciló in situ con cloruro de hexadecanoilo. De esta forma, se obtuvo el compuesto **31**, que tras hidrólisis de los grupos éster dio lugar a **32** (Esquema 2.8) El rendimiento global obtenido por esta ruta fue del 30%.



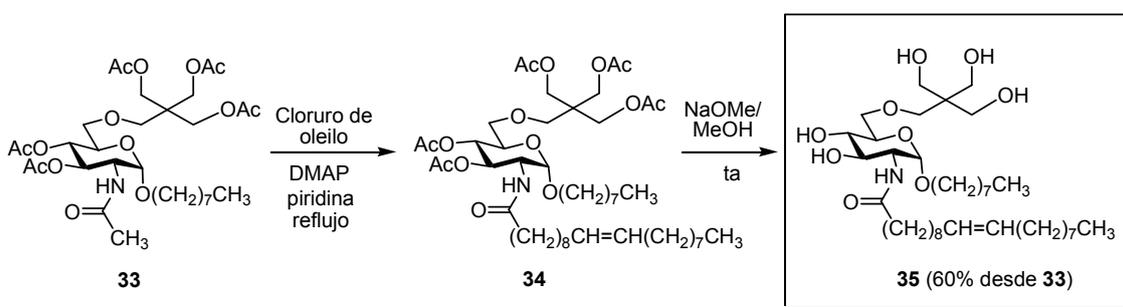
Esquema 2.8

⁴³ Madsen, R., Roberts, C.; Fraser-Reid, B. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7920-7926.

2.4.3 Transacilación.

El método que dio mejores resultados fue la transacilación del grupo amido. La *N*-transacilación, en la que un sustituyente *N*-acilo se reemplaza directamente por otro, se ha descrito en pocos casos, uno de ellos es la transformación de *N*-acetilglucosamina en el derivado *N*-trifluoroacetilo por tratamiento con ácido o anhídrido trifluoroacético a altas temperaturas.⁴⁴ Otro caso es el intercambio del grupo fenilacetilo por un trifluoroacetilo con anhídrido trifluoroacético y DBN (1,5-diazabicyclo(4,3,0)-non-5-eno), donde el fenilacetilo se elimina vía β -eliminación.⁴⁵

Aquí, se ha utilizado un método descrito recientemente⁴⁶ en el que la transacilación se produce en un 2-acetamido-2-deoxy- α -D-glucopiranosido peracetilado en presencia de un cloruro de acilo y DMAP en piridina a reflujo. Aplicado al derivado peracetilado **33**, el tratamiento con cloruro de oleilo en piridina a reflujo, en presencia de DMAP, dio lugar al producto de transacilación **34**, el cual tras desacetilación condujo a **35** (Esquema 2.9). El rendimiento global fue del 60%.



Esquema 2.9

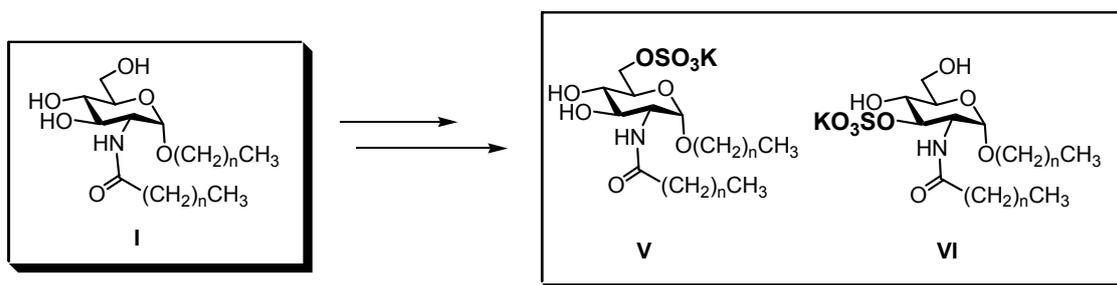
⁴⁴ Nilson, B.; Svensson, S. *Carbohydr. Res.* **1978**, *62*, 377-380.

⁴⁵ Barret, A. G. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **1979**, 1629-1633.

⁴⁶ Li, Y.; Li, C.; Wang, P.; Chu, S.; Guan, H.; Yu, B. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 611-613.

2.5 COMPUESTOS CON UN GRUPO SULFATO EN POSICIONES 3 O 6.

La síntesis de compuestos con un grupo sulfato se realizó con el objetivo de mimetizar el ácido siálico y evaluar la importancia de la carga, como se ha comentado anteriormente. La introducción del grupo sulfato se realizó selectivamente, bien en la posición 3 ó 6 del anillo de glucosa, a partir de compuestos con sustituciones en posiciones 1 y 2, de estructura general I, para obtener los glicósidos tipo V y VI (Esquema 2.10).



Esquema 2.10

Dado que los productos de partida I son trioles, decidimos utilizar un método para proteger selectivamente dos de los grupos hidroxilo, de manera que quede libre el hidroxilo en el que deseamos introducir el grupo sulfato.

Para la protección de dioles en carbohidratos se suelen utilizar grupos acetales,⁴⁷ que son muy accesibles y dan lugar a buenos rendimientos. Los más utilizados son los isopropiliden y benciliden acetales. En el caso de 1,2-dioles de piranosas puede realizarse la protección selectiva de cis- o trans-dioles, en función del reactivo acetalante empleado.

Existen muchos agentes de acetalación para proteger 1,3-dioles,⁴⁸ por ejemplo, en piranosas con configuración D-gluco se puede utilizar 2-metoxipropeno para obtener el acetal entre los hidroxilos HO-4 y HO-6.⁴⁹

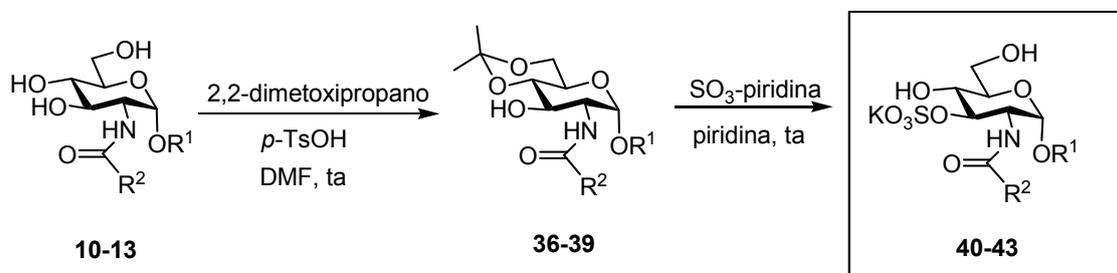
En nuestro caso particular, para introducir un grupo sulfato en la posición 3, se protegió conjuntamente el HO-4 y el HO-6 de forma convencional para

⁴⁷ Calinaud, P.; Gelas, J. en *Preparative Carbohydr. Chemistry*; Hannesian, S., Ed.; Marcel: New York, **1997**, 3-33.

⁴⁸ Cousins, G.; Falshaw, A.; Hoberg, J. O. *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 995-998.

⁴⁹ Wolfrom, M. L.; Diwadkar, A. B.; Gelas, J.; Horton, D. *Carbohydr. Res.* **1974**, 35, 87-96.

1,3-dioles, con dimetoxipropano formando el isopropiliden acetal. Sobre el HO-3 libre se introdujo el grupo sulfato. En la misma etapa se produjo la hidrólisis del grupo acetal obteniéndose el producto deseado sin necesidad de una etapa de desprotección adicional (Esquema 2.11).



PP ^a	PI ^b	PF ^c	R ²	R ¹	Rdto (%) ^d
10	36	40	(CH ₂) ₂ CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ Ph	90
11	37	41	(CH ₂) ₂ CH=CH ₂	(CH ₂) ₁₅ CH ₃	63
12	38	42	CH ₃	(CH ₂) ₈ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	82
13	39	43	(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	(CH ₂) ₇ CH ₃	42

^aProducto de partida, ^bProducto intermedio, ^cProducto final, ^dRendimiento de las dos etapas.

Esquema 2.11

Más interesante es la protección selectiva de un trans-1,2-diol en presencia de un hidroxilo primario libre. Uno de los procedimientos fue descrito por van Boeckel,⁵⁰ utilizando el TIPDS acetal (Figura 2.2), que supone dos etapas, inicialmente se forma el 4,6-O-acetal que con catálisis ácida migra para dar lugar al 3,4-O-acetal deseado. Más recientemente Ley⁵¹ introdujo los diespiroacetales y los diacetales de 2,3-butanodiona (Figura 2.2), que permiten realizar la protección en un solo paso.

⁵⁰ van Boeckel, C. A. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron*. **1985**, 4545-4555.

⁵¹ (a) Hense, A.; Ley, S. V.; Osborn, H. M. I.; Owen, D. R.; Poisson, J. F.; Warriner, S. L.; Wesson, K.E. *J. Chem. Soc., Perkin 1*. 1997, 2023-2031. (b) Ley, S. V.; Baeschlin, D. K.; Dixon, D. J.; Foxtor, A. C.; Ince, S. J.; Priepke, H. W. M.; Reynolds, D. J. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 53-80.

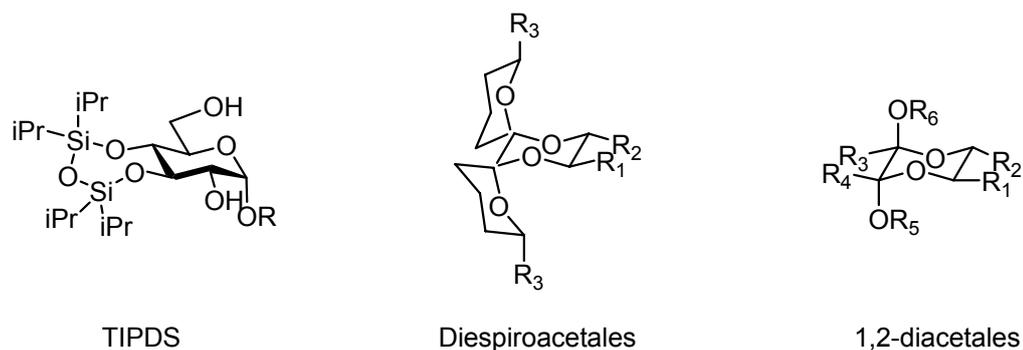
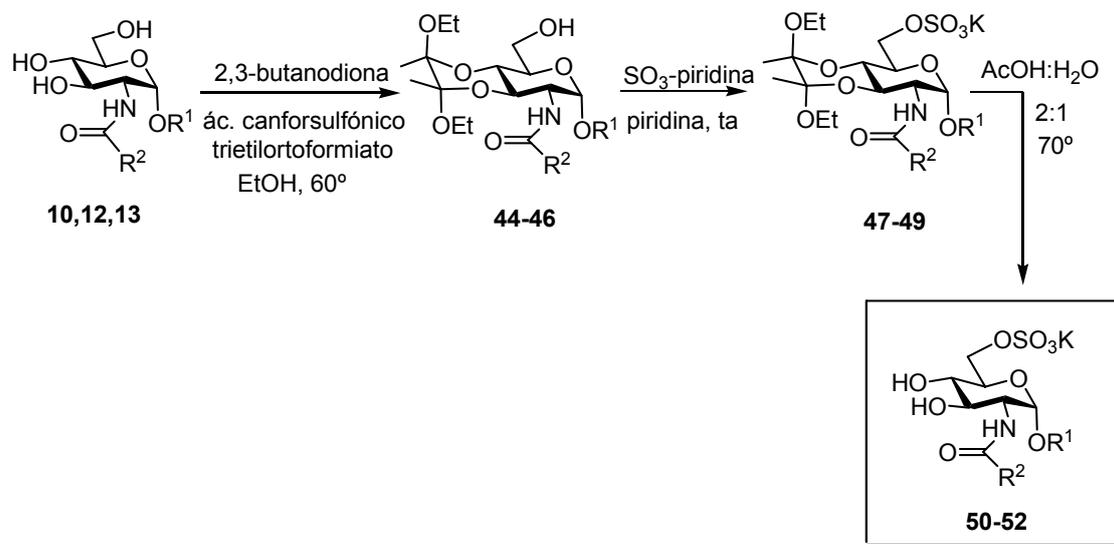


Figura 2.2

Para obtener los glicósidos con un grupo sulfato en la posición 6 se protegieron los hidroxilos HO-3 y HO-4 utilizando el reactivo 2,3-butanodiona, en presencia de ácido canforsulfónico como catalizador y trietilortoformiato en etanol. A continuación se introdujo el grupo sulfato en la posición 6. La eliminación del grupo protector se llevó a cabo por hidrólisis ácida (Esquema 2.12).



PP ^a	PI ^b	PF ^c	R ²	R ¹	Rdto (%) ^d
10	44	50	(CH ₂) ₂ CH=CH ₂	(CH ₂) ₂ Ph	41
12	45	51	CH ₃	(CH ₂) ₈ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	66
13	46	52	(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	(CH ₂) ₇ CH ₃	13

^aProducto de partida, ^bProducto intermedio, ^cProducto final, ^dRendimiento de las dos etapas.

Esquema 2.12

En la figura 2.3 se recogen todos los productos obtenidos y que fueron ensayados como antitumorales, cuyos resultados se describen en el siguiente capítulo.

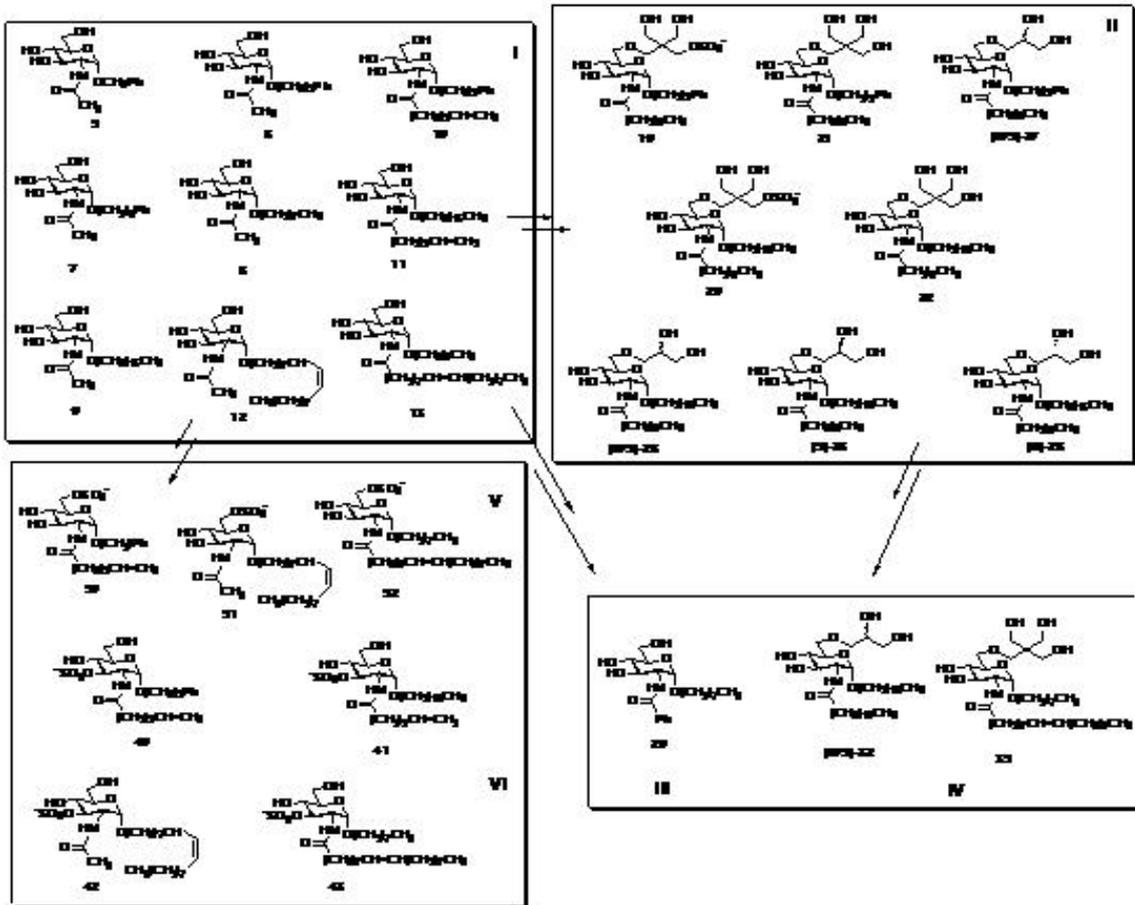


Figura 2.3

CAPÍTULO 3

ACTIVIDAD DE LOS GLICÓSIDOS COMO INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE GLIOMAS Y MELANOMAS

3.1 GLIOMAS Y MELANOMAS.

Un tumor cerebral que se desarrolla a partir de células gliales se denomina glioma. Aproximadamente la mitad de todos los tumores cerebrales primarios y la quinta parte de los tumores de la médula espinal primarios se forman a partir de células gliales. Los gliomas tienden a crecer en los hemisferios cerebrales, aunque también en los nervios ópticos, en la médula espinal y en el cerebelo. Los gliomas se dividen en varios subgrupos dependiendo del origen de las células gliales. El tipo más común de glioma es el astrocitoma, que se desarrolla a partir de los astrocitos.

Los astrocitomas se clasifican dependiendo del grado de malignidad en astrocitomas de bajo o alto grado. La clasificación que hace la WHO (World Health Organization) divide los astrocitomas en cuatro grados, siendo los astrocitomas de grado III y IV los más invasivos.⁵²

Grado I, Astrocitoma Pilocítico.

Grado II, Astrocytoma de Bajo-Grado

Grado III, Astrocitoma Anaplástico.

Grado IV, Glioblastoma Multiforme (GBM o Glioblastoma).

El GBM es el tumor cerebral primario más frecuente en adultos y al mismo tiempo es el más mortal. En Estados Unidos, solo la mitad de los pacientes que reciben el tratamiento estándar sobreviven un año después del diagnóstico. Menos de uno de cada diez sobrevive más de cinco años. En adultos, hay unos 17000 nuevos casos de tumores cerebrales cada año (además, otros tipos de cáncer pueden metastatizar en el cerebro) lo que supone unas 14000 muertes. El tumor cerebral es la tercera causa de muerte por cáncer entre adultos comprendidos entre edades de 20 a 39, y la primera causa en niños y menores de 20 años.⁵³

El tratamiento depende de la localización y del grado del tumor; se aplica cirugía cuando el tumor es accesible y no hay peligro de dañar estructuras

⁵² <http://www.braintumor.org>.

⁵³ Friedman, H. S.; Szalavitz, M. *The DANA Forum on Brain Science*. 2003, 5, 7-18.

vitales. La radioterapia se utiliza para detener el crecimiento del tumor o para hacer que disminuya su tamaño y la quimioterapia destruye las células tumorales que quedan después de la cirugía y la radiación. Cualquier tratamiento o combinación de tratamientos es meramente paliativo y en el mejor de los casos aumenta unas semanas la esperanza de vida⁵⁴.

Como se ha mencionado anteriormente, existen otros tipos de tumores que pueden metastatizar en el cerebro, como es el caso de melanomas. Un melanoma es un cáncer de piel en el que las células de pigmentación empiezan a crecer de forma anormal.

La incidencia del melanoma tanto en España, como en el resto del mundo, se ha triplicado en las últimas décadas. Esta enfermedad representa el 65 por ciento de todas las muertes por cáncer de piel, se trata de un tumor generalmente cutáneo y altamente invasivo por su capacidad de generar metástasis.

La incidencia de metástasis en el sistema nervioso central de pacientes con melanoma varía entre el 10% y el 40% según estudios clínicos y es incluso mayor según estudios de autopsias que revelan que de las muertes por problemas en el sistema nervioso central, más de dos tercios corresponden a pacientes con metástasis de melanoma.^{55,56,57}

En resumen, los gliomas y melanomas son dos tipos de tumores con alto potencial proliferativo y difícil diagnóstico por lo que se hace necesario el desarrollo de nuevos tratamientos.

⁵⁴ Society for Neuroscience. *Brain Facts*. 2006, Fifth Edition.

⁵⁵ Sampson, J. H.; Carter, Jr. J. H.; Friedman, A. H.; Seigler, H. F. *J. Neurosurg.* 1998, 88, 11-20.

⁵⁶ Amer, M.; Al-Sarraf, M.; Vaitkevicius, V. *Surg Gynecol Obstet.* 1979, 149, 687-92.

⁵⁷ Budman, D.; Camacho, E.; Wittes, R. *Eur J Cancer.* 1978, 14, 327-30.

3.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La evaluación in vitro de los glicósidos sintetizados como inhibidores de la división celular se llevó a cabo en el Grupo de Plasticidad Neuronal del profesor M. Nieto-Sampedro del Instituto Cajal (CSIC).

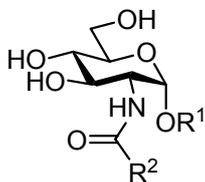
La actividad se ensayó a diferentes concentraciones midiendo la incorporación de timidina tritiada⁵⁸ sobre cultivos de las líneas celulares C6 (glioma de rata), U373 (glioma humano) y A375 (melanoma humano).

Los valores de ID₅₀ que se muestran a continuación indican la concentración de compuesto necesaria para inhibir el crecimiento de las células en un 50%. Cuanto menor es la ID₅₀, mejor es el inhibidor. Hemos seleccionado 50 µM como umbral de actividad, la de NF115.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para los glicósidos sustituidos en las posiciones C-1 y C-2.

⁵⁸ La timidina está presente en el ADN de todos los organismos vivos. Para medir el ciclo celular el procedimiento más habitual es marcar las células con timidina tritiada. Si en un tejido o cultivo en proliferación, añadimos al medio timidina tritiada, las células que estén en período de síntesis, incorporarán dicho marcaje y podremos distinguirlas del resto debido a su radiactividad. Dentro del cultivo o tejido, no todas las células van a la misma velocidad, hay algunas que son más rápidas que otras. Se ha establecido por convenio que todos los cálculos se realicen sobre el 50% de marcaje.

Tabla 1. Inhibición de la división de células de glioma de rata (C6), glioma humano (U373), y melanoma humano (A375) por los glicósidos 5-13, 29. ^aEl doble enlace tiene configuración *cis*.



Comp.	R ¹	R ²	ID ₅₀ (μM)		
			C6	U373	A375
5	CH ₂ Ph	CH ₃	>50	>50	>50
6	(CH ₂) ₂ Ph	CH ₃	>50	>50	>50
7	(CH ₂) ₄ Ph	CH ₃	>50	>50	>50
8	(CH ₂) ₇ CH ₃	CH ₃	>50	>50	>50
9	(CH ₂) ₁₅ CH ₃	CH ₃	13.0±3.7	>50	29.3±5.2
10	(CH ₂) ₂ Ph	(CH ₂) ₂ CH=CH ₂	>50	>50	>50
11	(CH ₂) ₁₅ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH=CH ₂	>50	>50	>50
12	(CH ₂) ₈ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	CH ₃	1.3±0.8	4.6±2.2	4.8±2.7
13	(CH ₂) ₇ CH ₃	(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃	12.0±4.6	13.3±4.1	6.0±1.0
29	(CH ₂) ₇ CH ₃	Ph	>50	>50	>50

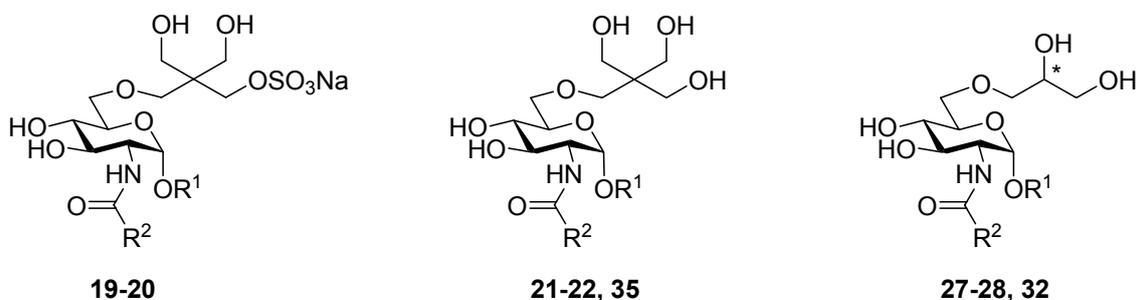
Vemos que los compuestos con un grupo aromático en C-1 (como **5**, **6**, **7** y **10**) o en C-2 (como **29**), no tienen actividad en las líneas celulares ensayadas. Sin embargo, los compuestos con cadenas alifáticas en esas posiciones sí han inhibido el crecimiento de células tumorales, aunque su actividad depende de la longitud de la cadena del sustituyente y de la presencia del doble enlace.

Así, mientras el octil glicósido **8** es inactivo, el derivado **9** con la cadena de 16 carbonos inhibió el crecimiento en células C6 y A375. El glicósido **12**, con una cadena de *N*-oleilo fue el que mostró la mejor actividad de esta serie en todas las líneas celulares ensayadas.

El compuesto **13**, con un sustituyente *N*-oleilo en posición C-2 también es un buen inhibidor, aunque con peores valores de ID₅₀ que **12**.

La actividad de los compuestos sustituidos con una cadena hidroxilada en la posición C-6 se recoge en la Tabla 2.

Tabla 2. Influencia de una cadena alquílica hidroxilada en la posición C-6 de los compuestos. ^a N.D. = no determinado. ^b El doble enlace tiene configuración *cis*.



Comp.	R ¹	R ²	C6	ID ₅₀ (μM)	
				U373	A375
19	(CH ₂) ₂ Ph	(CH ₂) ₃ CH ₃	8.6±5.6	6.7±0.7	9.3±1.7
20	(CH ₂) ₁₅ CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃	11.0±6.0	3.2±0.2	2.3±0.3
21	(CH ₂) ₂ Ph	(CH ₂) ₃ CH ₃	>50	>50	>50
22	(CH ₂) ₁₅ CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃	18.3±7.2	27.3±3.7	>50
27	(CH ₂) ₂ Ph	(CH ₂) ₃ CH ₃	>50	>50	>50
28	(CH ₂) ₁₅ CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃	N.D. ^a	4.6±0.3	3.0±0.5
(R)-28	(CH ₂) ₁₅ CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃	N.D. ^a	4.9±0.6	2.2±0.2
(R)-28	(CH ₂) ₁₅ CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃	N.D. ^a	5.6±1.7	3.4±0.3
32	(CH ₂) ₁₅ CH ₃	(CH ₂) ₁₄ CH ₃	2.6±1.2	3.3±0.8	9.3±0.6
35	(CH ₂) ₇ CH ₃	(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃ ^b	11.9±4.6	20.6±5.2	13.3±3.3

Con estos compuestos observamos el mismo comportamiento que con los sustituidos únicamente en las posiciones 1 y 2, en cuanto al hecho que aquellos con un grupo alquilo en posición 1 fueron mejores inhibidores que los que contienen un grupo fenilo; como indican los valores de ID₅₀ de las parejas de compuestos: **19/20**, **21/22** y **27/28** (Figura 3.1).

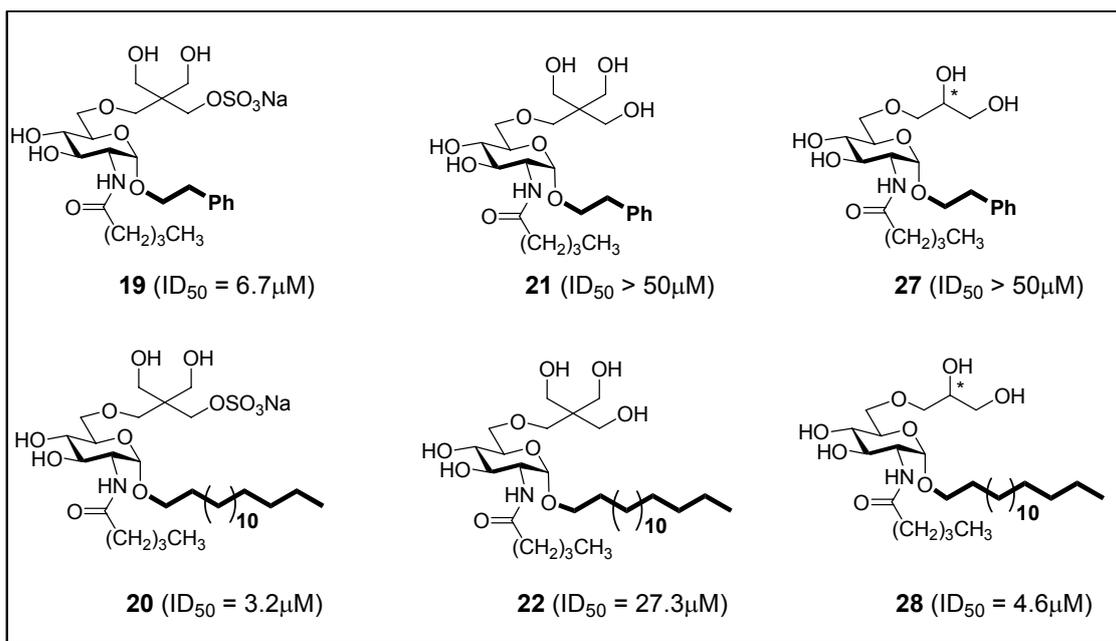


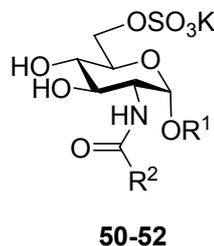
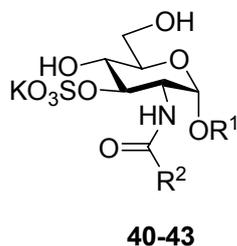
Figura 3.1. Valores de ID_{50} para la línea celular de glioma humano U373.

Es interesante notar que cuando el sustituyente es una cadena de pentaeritritol, la presencia de un grupo sulfato en **19** y **20** mejora la actividad respecto de sus análogos sin sulfato **21** y **22**

En cuanto a la configuración del centro estereogénico de la cadena de glicerilo, parece que no es determinante, ya que los epímeros (*R*)-**28** y (*S*)-**28** muestran valores de ID_{50} similares.

A continuación se estudió la influencia de la posición de un grupo sulfato en C-3 o C-6 en la actividad de los compuestos, que se recoge en la Tabla 3.

Tabla 3. Influencia de un grupo sulfato en la posición C-3 o C-6 de los compuestos.^a El doble enlace tiene configuración *cis*.



Comp.	R ¹	R ²	C6	ID ₅₀ (μM)	
				U373	A375
40	(CH ₂) ₂ Ph	(CH ₂) ₂ CH=CH ₂	>50	>50	>50
41	(CH ₂) ₁₅ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH=CH ₂	22.6±3.7	33.0±3.5	7.2±6.3
42	(CH ₂) ₈ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃ ^a	CH ₃	12.3±0.3	9.6±1.2	2.1±0.6
43	(CH ₂) ₇ CH ₃	(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃ ^a	5.4±2.5	15.6±4.3	16.0±2.0
50	(CH ₂) ₂ Ph	(CH ₂) ₂ CH=CH ₂	>50	>50	>50
51	(CH ₂) ₈ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃ ^a	CH ₃	13.0±3.5	13.0±3.0	0.6±0.3
52	(CH ₂) ₇ CH ₃	(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃ ^a	5.6±1.7	12.6±7.7	15.6±2.8

No hay diferencias significativas entre la actividad de los regiosómeros **40/50**, que contienen un grupo feniletilo en la posición 1 y no mostraron actividad en ninguna de las líneas celulares. En el caso del par de regiosómeros **43/52**, con cadenas hidrofóbicas largas en las posiciones 1 y 2, tienen actividades muy similares, al igual que ocurre para **42/51**, que ambos fueron los más activos de esta familia. Por todo esto, parece que la posición del grupo sulfato no es determinante para la actividad.

Sin embargo, cuando comparamos la actividad del glicósidos **12** (Figura 3.2) con sus análogos sulfatos **42** y **51**, vemos que la carga negativa que aporta grupo sulfato no mejora la actividad en las líneas C6 y U373 de glioma, pero sí aumenta la actividad en la línea A375 de melanoma. Es destacable que el compuesto **51** inhibe el crecimiento de células de melanoma a concentraciones por debajo de micromolar.

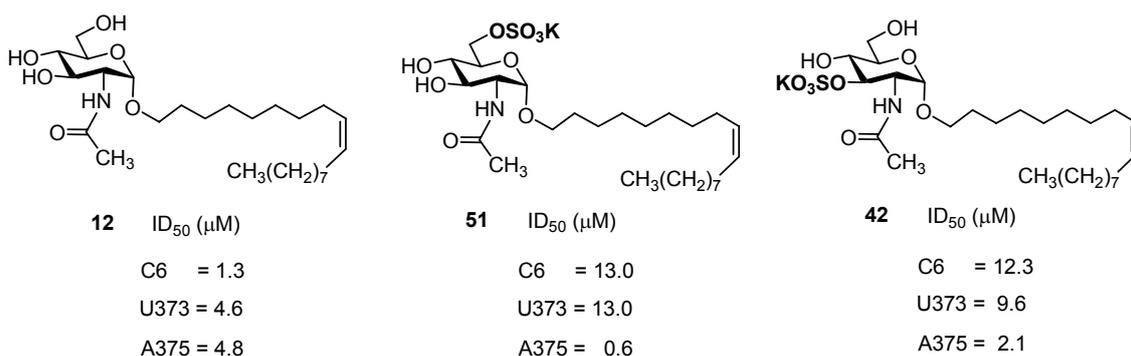


Figura 3.2

Con la introducción de un grupo sulfato, además de mejorar la actividad en melanoma, se ha logrado que los compuestos sean muy solubles en agua. Esto supone una ventaja adicional a la hora de realizar ensayos biológicos, puesto que no es necesario el uso de cosolventes que podrían interferir o resultar tóxicos cuando se quieren hacer ensayos *in vivo*.

Para comprobar si la selectividad de los glicósidos era mayor frente a células tumorales que frente a células normales, se utilizaron células estromales de médula de rata y se cultivaron con los inhibidores que resultaron mejores, **12** y el sulfato análogo **51**. Mientras que el glicósido **12** inhibió el crecimiento de células estromales a concentraciones ligeramente superiores (ID₅₀=10 μM) que en el caso de células tumorales (C6, 1.3 μM; U373, 4.6 μM; A375, 4.8 μM), el compuesto **51** sí fue menos inhibidor del crecimiento de células estromales (ID₅₀=40 μM) que en el caso de células de glioma y melanoma (C6, 13.0 μM; U373, 13.0 μM; A375, 0.6 μM).

A partir de estos resultados podemos concluir que los compuestos más activos contienen un grupo oleilo o una cadena alquílica larga en posición C-1. Un grupo sulfato, independientemente de la posición en la que se encuentre, aumenta la actividad de los compuestos en melanoma. Se han obtenido dos glicósidos análogos muy interesantes con una cadena de oleilo en posición anomérica, **12** y su análogo con un grupo sulfato en posición 6, **51**, con elevada actividad antiproliferativa en gliomas y melanomas.

CAPÍTULO 4

ESTUDIO DEL MECANISMO DE INHIBICIÓN DE LOS GLICÓSIDOS ANTITUMORALES

4.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

Una vez estudiada la actividad de los glicósidos, nos propusimos estudiar el mecanismo de inhibición del crecimiento celular de los compuestos más activos, bajo la hipótesis inicial que actuasen alterando el metabolismo de los gangliósidos.

4.1.1 Funciones de los gangliósidos en células tumorales.

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que contienen al menos un ácido siálico unido a la cadena oligosacáridica. Estas moléculas tienen funciones reguladoras cruciales en procesos fisiológicos normales, como por ejemplo en la embriogénesis, y también en condiciones patológicas, incluyendo el inicio y la progresión tumoral.⁵⁹

Los gangliósidos se desprenden desde la membrana de la célula tumoral al medio en forma de micelas, monómeros y vesículas de membrana. Estos gangliósidos desprendidos son capaces de unirse e interactuar con una gran variedad de proteínas, incluyendo moléculas señales presentes en el microambiente del tumor. Es más, dado que los gangliósidos desprendidos pueden incorporarse en la membrana de las células vecinas del huésped, es posible que estos gangliósidos desprendidos modulen las interacciones entre células del huésped y tumorales.

Hay diversos estudios que sugieren que los gangliósidos asociados a tumores juegan un papel importante en su desarrollo ya que se ha observado que la reducción del contenido de gangliósidos reduce la capacidad de las células para formar tumores. Entre las funciones más relevantes propuestas de los gangliósidos en células tumorales, pueden encontrarse las siguientes:

Gangliósidos como moléculas de adhesión y mediadores de la metástasis. Durante los últimos años diversos estudios han establecido la importancia de las interacciones carbohidrato-proteína como base molecular de

⁵⁹ Hakomoris, Z. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 97-104.

la adhesión y el reconocimiento celular. Algunos gangliósidos antigénicos, que se expresan en determinados tumores, se han identificado como moléculas de adhesión que pueden promover la metástasis, mediante su interacción con proteínas de las células endoteliales que forman la pared de los vasos sanguíneos.

Gangliósidos y angiogénesis. La cantidad de gangliósidos desprendidos al microentorno es mayor desde los tumores que desde tejidos sanos. Este fenómeno determina que los niveles de gangliósidos asociados a tumores sean elevados en suero (hasta 10 micromolar). Se ha especulado con que los cambios en los niveles de gangliósidos en suero pueden estar relacionados con el fenómeno de la angiogénesis tumoral y, por tanto, influenciar la velocidad del crecimiento tumoral mediante un mecanismo todavía no determinado. Aunque los gangliósidos complejos no son angiogénicos por sí mismos, sí son proangiogénicos ya que actúan sinérgicamente con inductores de la angiogénesis, por ejemplo, con prostaglandina E1, factores de crecimiento básicos, y con VEGF.

Gangliósidos como inmunomoduladores. Algunos trabajos apuntan a que los gangliósidos vertidos al microentorno desde las células tumorales, podrían actuar suprimiendo la respuesta inmune contra el tumor, inhibiendo la actividad de diversas células inmunes.

4.1.2 Biosíntesis de gangliósidos.

La biosíntesis de gangliósidos se inicia con la glucosidación de ceramida catalizada por la glucosilceramida transferasa (GlcCer transferasa). En una etapa anterior, la ceramida se genera a partir de esfingosina por acilación del grupo amino con un ácido graso de longitud variable. La diversidad de grupos acilo va a dar lugar a heterogeneidad en la ceramida. A continuación tiene lugar la transferencia de un resto galactosilo desde UDP-galactosa a la glucosilceramida, catalizada por la β -1,4-galactosiltransferasa (lactosilceramida sintasa), como se muestra en la Figura 4.1.

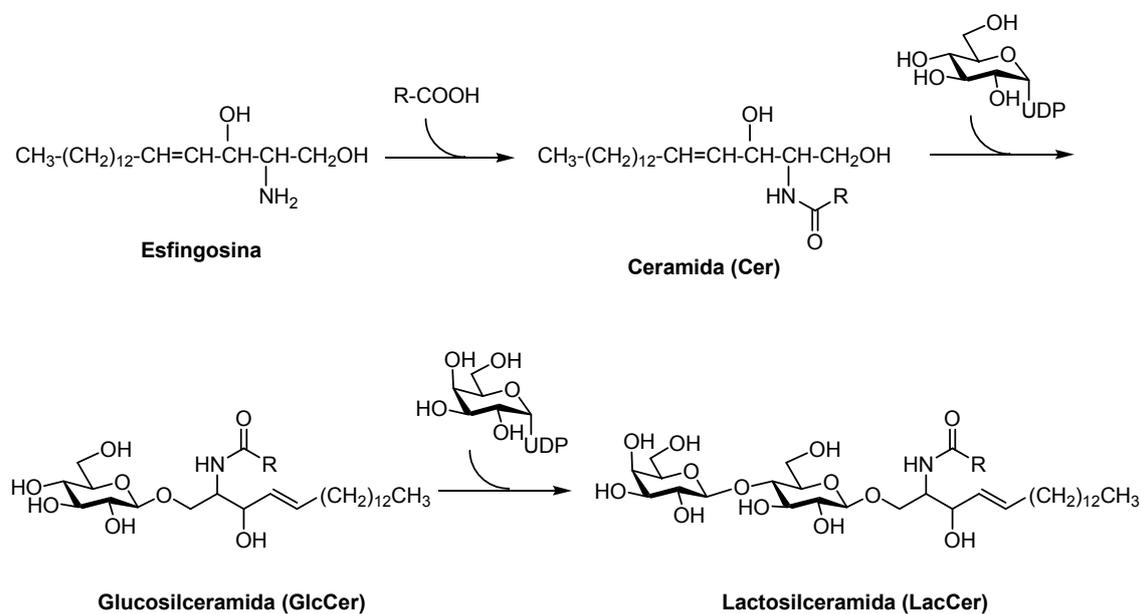
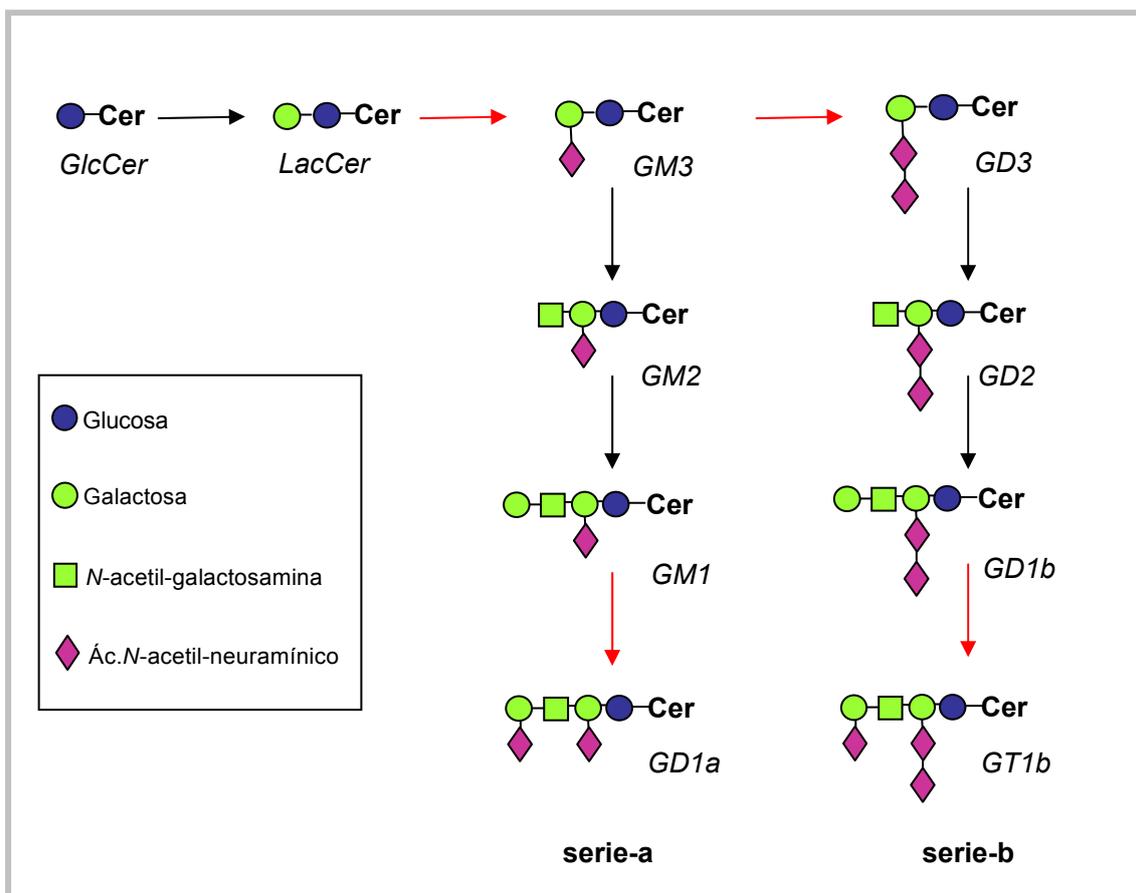


Figura 4.1

La síntesis continúa mediante la acción secuencial de glicosiltransferasas específicas, entre ellas las sialiltransferasas. En el Esquema 4.2 se muestra la biosíntesis de los gangliósidos más relevantes del sistema nervioso central de mamíferos.



Esquema 4.2

Puesto que los gangliósidos juegan un importante papel en el desarrollo y progresión de tumores, y ya que los glicósidos sintéticos más activos en glioma (compuesto **12**) y melanoma (compuesto **51**) tienen una estructura de tipo glicolípido, con un resto de alcohol oleico unido a la *N*-acetilglucosamina, nos planteamos que su modo de acción pudiera estar relacionado con una posible alteración de la ruta de biosíntesis de gangliósidos.

Observando a la estructura de **12** (Figura 4.2), que es muy semejante a la glucosilceramida, pensamos que este compuesto podría actuar en las primeras etapas de la biosíntesis; esto es, sobre la glucosilceramida sintasa o bien sobre lactosilceramida sintasa. Sin embargo, el compuesto **51**, que tiene un grupo sulfato, puede estar actuando en etapas tardías, inhibiendo sialiltransferasas específicas, ya que debido a la carga negativa puede estar mimetizando un residuo de ácido siálico.

Por tanto, pasamos a estudiar el efecto de los glicósidos **12** y **51** en el metabolismo de los gangliósidos en gliomas y melanomas, compuestos que de ahora en adelante denominaremos como GC-22 e IG-20 respectivamente.

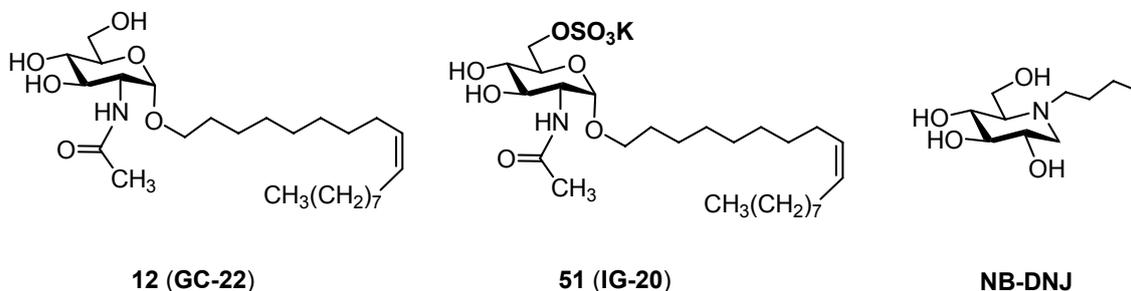


Figura 4.2

Adicionalmente, se utilizó *N*-butildeoxinojirimina (NB-DNJ, Figura 4.2) como referencia, ya que está descrito que este iminoazúcar inhibe el crecimiento de células de melanoma murino.⁶⁰ Estos autores observaron también que NB-DNJ inhibía la actividad de la glucosilceramida sintasa y reducía la síntesis total de gangliósidos. Este iminoazúcar también tiene efecto sobre gliomas y de hecho existe una patente que reivindica su uso para la preparación de medicamentos destinados al tratamiento del cáncer de cerebro.⁶¹

⁶⁰ Guerrero, M.; Ladisch, S. *Cancer Letters*. **2003**, *201*, 31-41.

⁶¹ Seyfried, T. N.; Smith, P. D.; Platt, F. M: Use of Glucosylceramide Synthesis Inhibitors in Brain Cancer Therapy. WO 01/68093 A1. **2001**.

4.2 ANÁLISIS DEL PATRÓN DE GANGLIÓSIDOS.

El análisis de los gangliósidos presentes en las líneas celulares de glioma (C6) y melanoma (A375) se realizó empleando HPLC. En la literatura se han descrito diferentes métodos para separar gangliósidos, el más utilizado es TLC y posterior cuantificación por densitometría óptica. Nosotros decidimos utilizar HPLC porque nos permitió separar y cuantificar los gangliósidos, mediante detección en el rango UV a una longitud de onda de 215 nm, sin necesidad de derivatizar la muestra. Aunque es un procedimiento más largo, debido principalmente a los tiempos de adquisición (2 horas), es también más reproducible que TLC.

La etapa de crecimiento de los cultivos celulares en presencia y ausencia de inhibidores se realizó en el Instituto Cajal (CSIC). Tras lo cual procedimos a poner a punto en nuestro laboratorio un protocolo de extracción y análisis de los gangliósidos.

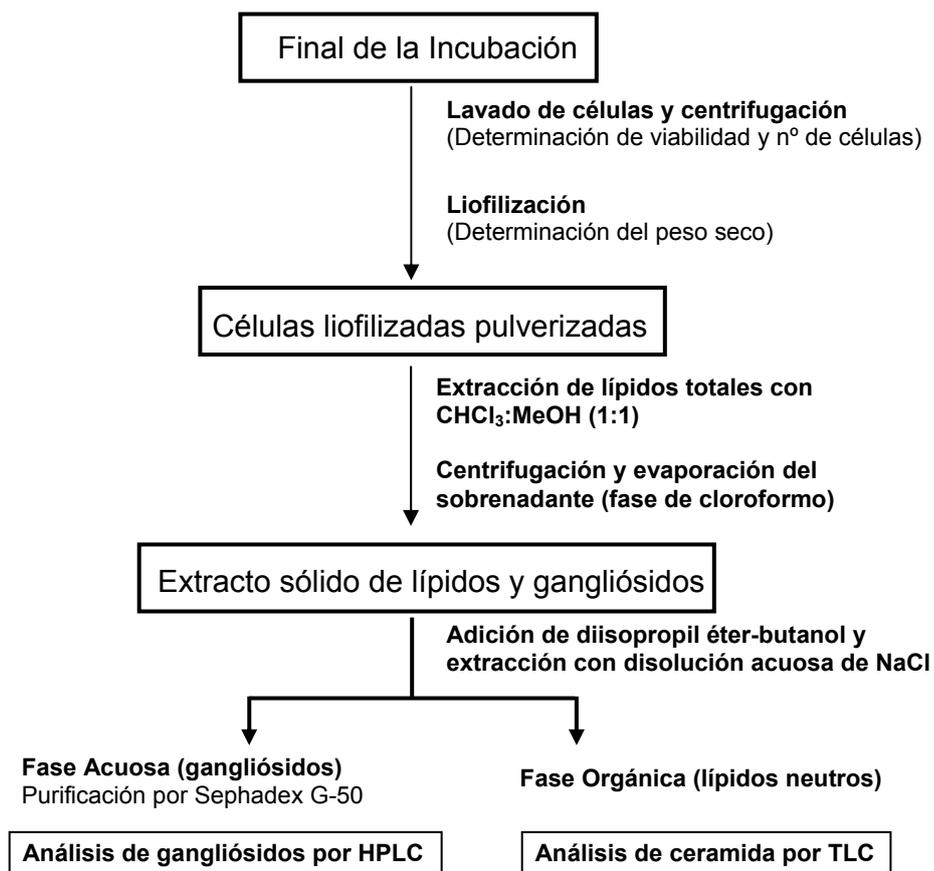
4.2.1 Extracción de gangliósidos.

A partir de los cultivos celulares tratados en ausencia (control) y en presencia de los compuestos de interés (GC-22, IG-20 y NB-DNJ), llevamos a cabo la extracción de los gangliósidos del modo siguiente. Las células se liofilizaron y a partir del extracto de células pulverizado se extrajeron los gangliósidos, siguiendo un procedimiento convencional descrito en la literatura,^{62,63} y que consiste en una primera extracción de lípidos con una mezcla equimolecular de cloroformo-metanol. La disolución clorofórmica se concentró a sequedad y el residuo se disolvió en diisopropil éter-butanol. De esta disolución se extrajeron los gangliósidos (que tienen una o más cargas negativas, dependiendo de las unidades de ácido siálico que contengan) con una disolución acuosa de cloruro sódico. En la fase orgánica quedan lípidos y glicolípidos neutros, que fueron también analizados.

⁶² Ladisch, S.; Gillard, B. *Anal. Biochem.* **1985**, *146*, 220-223.

⁶³ Ladisch, S.; Li, R. *Methods Enzymol.* **2000**, *312*, 135-145.

Por último la fase acuosa que contiene los gangliósidos se purificó utilizando una columna de exclusión molecular (Sephadex G-50), que nos permitió separar los gangliósidos de las sales y otras impurezas de menor tamaño. Los gangliósidos así purificados se analizaron por HPLC. En el Esquema 4.2 se muestra el procedimiento global que utilizamos.



Esquema 4.2

4.2.2 Análisis y asignación.

Para separar y analizar los gangliósidos por HPLC, utilizamos una columna de tipo amino y como fase móvil una mezcla de tampón fosfato sódico y acetonitrilo, siguiendo una elución en gradiente según un método descrito en 1985 muy reproducible,⁶⁴ que se sigue utilizando actualmente sin apenas

⁶⁴ Gazzotti, G.; Sonnino, S.; Ghindoni, R. *Journal of Chromatography*. **1985**, 348, 371-378.

modificaciones. De esta forma, se obtuvieron cromatogramas como el que se muestra en la Figura 4.3.

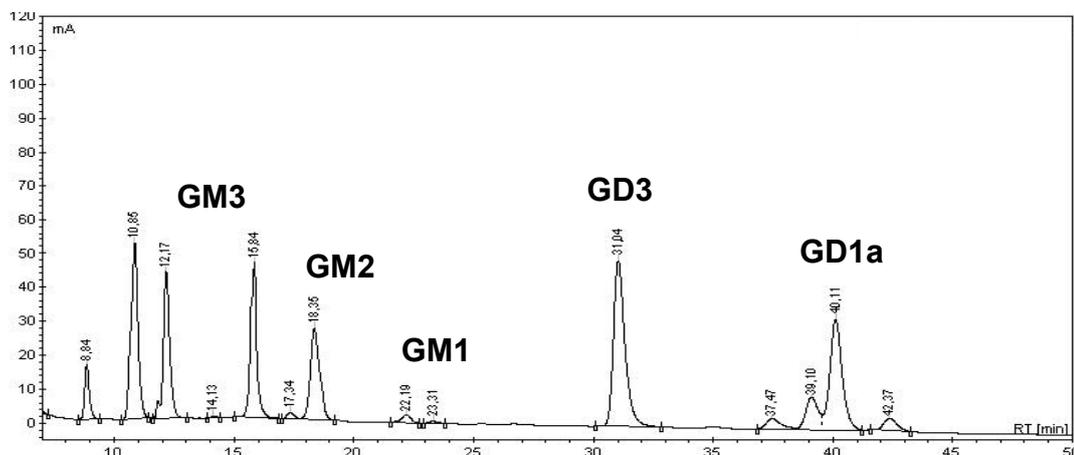


Figura 4.3.

Los picos del cromatograma se asignaron a los distintos gangliósidos utilizando patrones disponibles comercialmente, y también mediante la comparación de sus tiempos de retención con los descritos en la literatura para gangliósidos y que emplean el mismo método de separación.^{65,66,67}

Así, se asignaron los gangliósidos GM3, GM2, GM1, GD3 y GD1a (Tabla 4.1). Debido a que el tipo de ácido graso de la ceramida es variable, existe cierta heterogeneidad en la composición de los gangliósidos. Por este motivo, se han asignado como GM3 el grupo de picos que aparecen entre 11 y 15 minutos, y no a un único pico. Para los otros gangliósidos ocurre lo mismo, de forma que se han asignado los gangliósidos como se muestra en la Tabla 4.1.

⁶⁵ Gazzotti, G.; Sonnino, S.; Ghindoni, R. *Journal of Chromatography*. **1985**, *348*, 371-378.

⁶⁶ Chahlavi, A.; Rayman, P.; L. Richmond, A.; Biswas, K.; Zhang, R.; Vogelbaum, M.; Tannenbaum, C.; Barnett, G.; H. Finke, H. *Cancer Res*. **2005**, *12*, 5428-5438.

⁶⁷ Wagener, R.; Röhn, G.; Schillinger, G.; Schröder, R.; Kobbe, B.; Ernestus, R.-I. *Acta Neurochir*. **1999**, *141*, 1339-1345.

Tabla 4.1. Asignación de gangliósidos por HPLC según los tiempos de retención.

Gangliósido	Estructura abreviada ⁶⁸	Tiempo de retención (min)
GM3	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc} 1 \rightarrow 1 \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{NeuNAc}\alpha 2 \end{array}$	11 – 15
GM2	$\begin{array}{c} \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc} 1 \rightarrow 1 \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{NeuNAc}\alpha 2 \end{array}$	17 – 18
GM1	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc} 1 \rightarrow 1 \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{NeuNAc}\alpha 2 \end{array}$	22 – 24
GD3	$\begin{array}{c} \text{NeuNAc}\alpha 2 \rightarrow 8 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc} 1 \rightarrow 1 \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{NeuNAc}\alpha 2 \end{array}$	30 - 32
GD1a	$\begin{array}{c} \text{NeuNAc}\alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc} 1 \rightarrow 1 \text{Cer} \\ \uparrow \\ \text{NeuNAc}\alpha 2 \end{array}$	38 - 42

Para confirmar la asignación, se recogieron las distintas fracciones correspondientes a los gangliósidos aislados por HPLC y se purificaron utilizando columnas Sek-pak®, de forma que no queden restos de sales fosfato sódico procedentes de la fase móvil, y las muestras así purificadas se analizaron por espectrometría de masas utilizando la técnica MALDI-TOF. En la Tabla 4.2 se recogen las estructuras de los distintos picos eluidos de la columna de HPLC a la vista de las masas moleculares obtenidas.

La estructura de los picos moleculares se ha propuesto atendiendo a los trabajos sobre espectrometría de masas de gangliósidos que aparecen en la literatura.^{69,70,71}

En cuanto a la composición de gangliósidos de las dos líneas celulares utilizadas, C6 (glioma de rata) y A375 (melanoma humano), parece que todos presentan la misma base en la esfingosina (18 carbonos, monoinsaturado), y el resto de ácido graso más frecuente es el palmítico (16 carbonos, saturado).

⁶⁸ Nomenclatura de Svennerholm: Svennerholm, L. *J. Neurochem.* **1963**, *10*, 613-623.

⁶⁹ Dreisewerd, K.; Muthing, J.; Rohlfing, A.; Meisen, I. Zeljka, V.; Peter-Katalinic, Hillenkamp, F.; Berkenkamp, S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4098-4107.

⁷⁰ Ivleva, V.; Sapp, L.; O'Connor, P.; Costello, C. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2005**, *16*, 1552-1560.

⁷¹ Sugiyama, E.; Hara, A.; Uemura, K.; Taketomi, T. *Glycobiology.* **1997**, *7*, 719-724.

Tabla 4.2. Tiempos de retención y estructuras propuestas de gangliósidos a la vista de los picos moleculares observados por MALDI-TOF en modo de iones positivos (para el caso de GM3 también en modo de iones negativos).

T_R (min) ^a	Gangliósido	Tipo de cadenas ^b	m/z teórica	m/z observada
11-15	GM3	d18:1 / C16:0	1175.70 [M+Na] ⁺	1176.047 (+)
		d18:1 / C24:1	1285.81 [M+Na] ⁺	1286.558 (+)
		d18:1 / C16:0	1151.71 [M-H] ⁻	1151.809 (-)
		d18:1 / C24:1	1261.82 [M-H] ⁻	1261.884 (-)
17-18	GM2	d18:1 / C16:0	1382.82 [M+Na] ⁺	1379.021 (+)
22-24	GM1	d18:1 / C18:0	1590.87 [M+2Na-H] ⁺	1591.490 (+)
		d18:1 / C17:1	1574.87 [M+2Na-H] ⁺	1575.590 (+)
30-32	GD3	d18:1 / C16:0	1575.80 [M+6Na-5H] ⁺	1575.790 (+)
38-42	GD1a	d18:1 / C16:0	1897.96 [M+4Na-3H] ⁺	1898.005 (+)

^a T_R : tiempo de retención en HPLC de la fracción recogida y analizada por espectrometría de masas. ^b d/C: Residuo de la base de esfingosina/residuo de ácido graso.

4.3 ANÁLISIS DE CERAMIDA.

El análisis de ceramida se realizó por TLC ya que para estos compuestos la separación por HPLC suponía derivatizar las muestras, lo que puede dar lugar a errores.

Los lípidos se separaron en placas de gel de sílice utilizando como fase móvil cloroformo-metanol-hidróxido amónico y revelando los compuestos con sulfato de cobre en ácido fosfórico y metanol, que es un revelador específico de lípidos. La cuantificación se realizó por densitometría óptica.

Una vez desarrolladas las placas, las bandas que contenían los compuestos de interés se rasparon y los productos se extrajeron para caracterizaron mediante el uso de patrones y por espectrometría de masas.^{72,73} De esta forma se pudieron identificar la ceramida y la glucosilceramida presentes en las muestras. En la Figura 4.4 se muestra un ejemplo de separación de las distintas muestras mediante TLC.

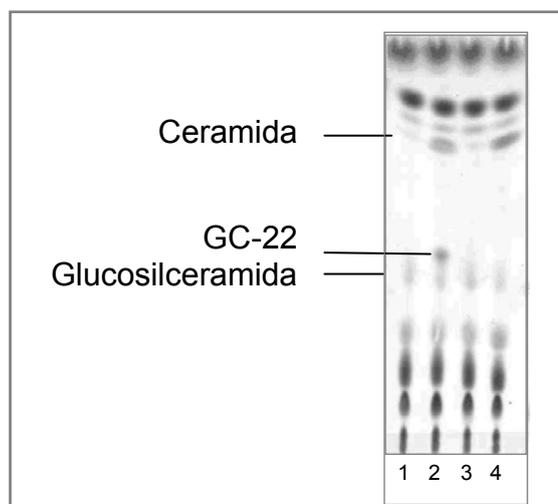


Figura 4.4. (1) C6 control, (2) GC-22 (10 μ M), (3) IG-20 (10 μ M), (4) NB-DNJ (50 μ M).

Cabe destacar que en células tratadas con GC-22, este compuesto se observó en los extractos de lípidos, lo que indica que el glicósido se incorpora al interior de la célula. Éste es un resultado interesante, ya que muchos compuestos que son potenciales fármacos no son capaces de atravesar la

⁷² Fillet, M.; Van Heugen, J. -C.; Servais, A. -C.; De Graeve, J.; Crommen, J. *J. Chromatography A.* **2002**, 949, 225-233.

⁷³ Yoo, H. H.; Son, J.; Kim, D. -H. *J. Chromatography B.* **2006**, 843, 327-333.

bicapa lipídica de las células y alcanzar su diana terapéutica, donde ejercen su acción.

4.4 EFECTO DE LOS GLICÓSIDOS SOBRE EL METABOLISMO DE GANGLIÓSIDOS Y CERAMIDA EN CÉLULAS TUMORALES.

4.4.1 Línea celular de melanoma humano A375 incubada en presencia de 1% de suero.

En primer lugar, se incubaron las células de melanoma humano A375 con los glicósidos GC-22 (10 μ M), IG-20 (10 μ M) y NB-DNJ (50 μ M) durante 48 horas, utilizando 1 % de suero en el medio de cultivo.

Los cromatogramas de HPLC de los extractos de gangliósidos y sus datos se muestran en la Figura 4.5 y en Tabla 4.3 respectivamente.

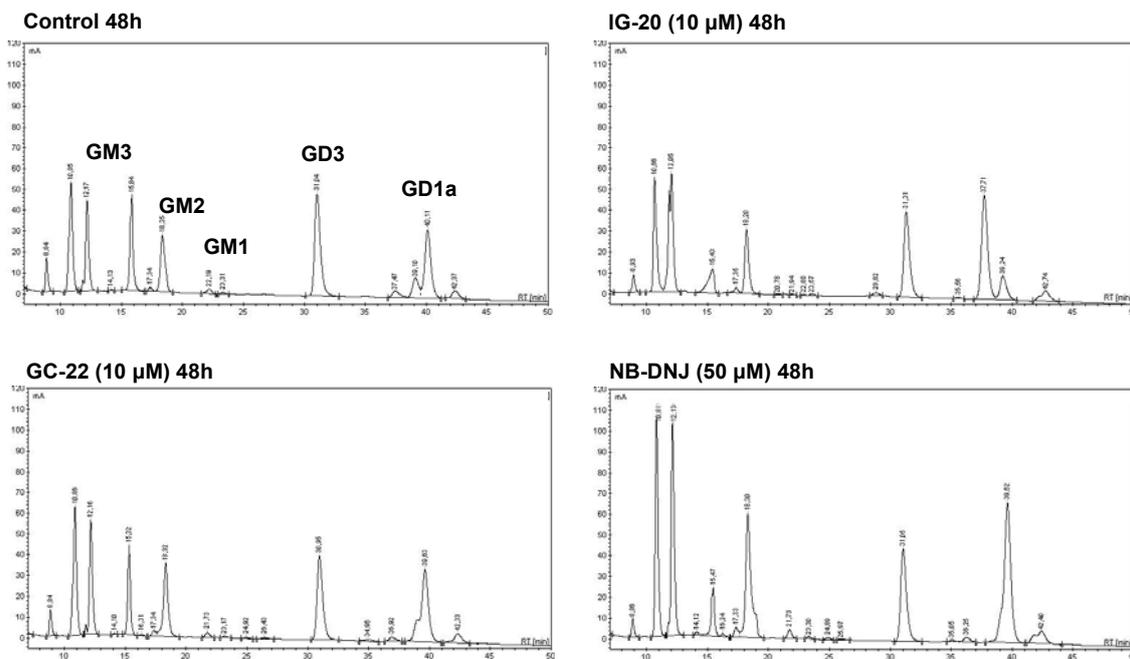


Figura 4.5

Tabla 4.3. Resultados obtenidos para los gangliósidos presentes en células de melanoma humano A375 después de incubarlas durante 48 h en ausencia (control) y presencia de GC-22, IG-20 y NB-DNJ. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos están normalizados para la misma cantidad de células.

Área gangliósidos/mg células (mU*A)							
	Total (relativo al control)	Total	GM3	GM2	GM1	GD3	GD1a
Control	100 %	7.4±1.6	2.8±0.6	0.81±0.17	0.054±0.01	1.5±0.2	2.2±0.7
GC-22	79.3 %	5.9±1.2	2.5±0.7	0.59±0.07	0.05±0.005	1.2±0.1	1.6±0.5
IG-20	93.7 %	6.9±1.4	2.7±0.9	0.96±0.01	0.06±0.004	1.4±0.1	1.8±0.3
NB-DNJ	99.0 %	7.3±0.5	2.9±0.2	1.01±0.22	0.06±0.008	1.7±0.2	2.2±0.2

De los valores de gangliósidos totales puede decirse que el tratamiento con IG-20 y NB-DNJ no produce una reducción significativa. Nos llamó la atención la ausencia de efecto, particularmente de NB-DNJ, ya que está descrito que este iminoazúcar produce una disminución en los niveles de gangliósidos totales en células de melanoma.⁷⁴ Sin embargo esto no ocurre, lo que podría deberse a que en nuestro caso no se ha utilizado la misma línea celular con la que se ensayó el NB-DNJ, y además se ha incubado durante 48 horas en lugar de 96 horas como se ha descrito en la literatura.

Sí se observó un ligero efecto al tratar las células con GC-22, que redujo el contenido global de gangliósidos en un 20%. Si se observan los valores de los gangliósidos analizados, parece que la reducción del total de gangliósidos corresponde a una disminución proporcional de cada uno de ellos.

⁷⁴ Ladisch. Cancer Lett. 2003

En cuanto a los resultados obtenidos para el análisis del lípido ceramida mediante TLC, se muestran en la Figura 4.6.

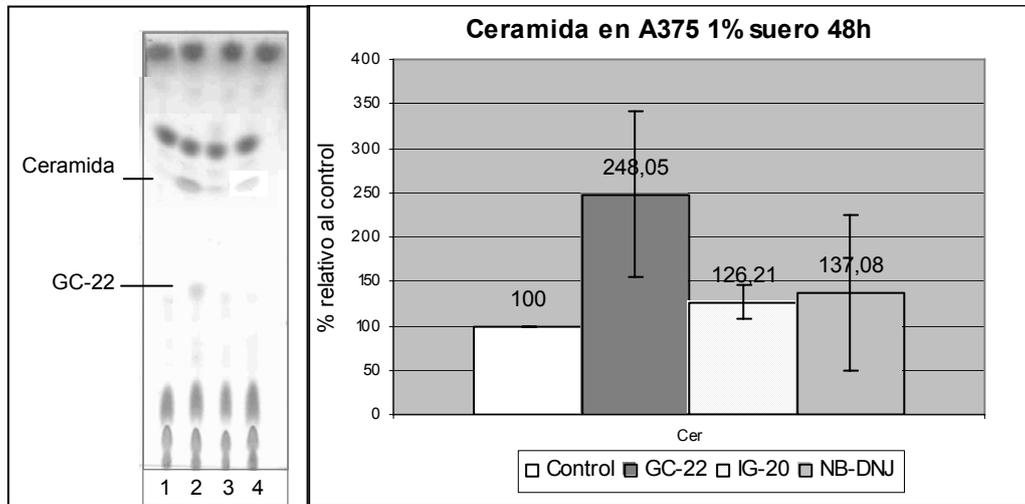


Figura 4.6. Contenido de ceramida en melanoma en presencia de 1% de suero.

No se apreció un efecto significativo en la proporción de ceramida para las células tratadas con IG-20 y NB-DNJ. Sin embargo el GC-22 tiene un efecto de acumulación de ceramida de aproximadamente dos veces respecto del control.

4.4.2 Línea celular de glioma de rata C6 incubada en presencia de 1% de suero.

A continuación pasamos al análisis del patrón de gangliósidos en células de glioma C6, incubadas con los glicósidos durante 48 horas en presencia de 1 % de suero. Los cromatogramas de HPLC de los extractos de gangliósidos y sus datos se muestran en la Figura 4.7 y en Tabla 4.4 respectivamente.

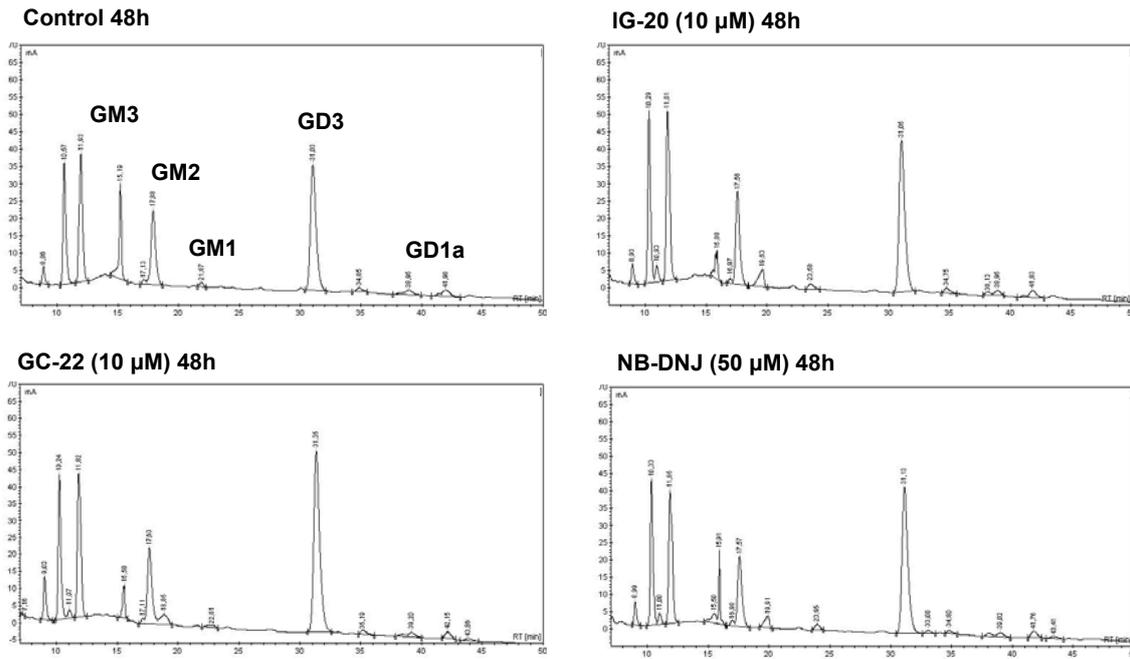


Figura 4.7

Tabla 4.4. Resultados obtenidos para los gangliósidos presentes en células de glioma C6 después de incubarlas durante 48 h en ausencia (control) y presencia de GC-22, IG-20 y NB-DNJ. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos están normalizados para la misma cantidad de células.

	Área gangliósidos/mg células (mU*A)						
	Total (relativo al control)	Total	GM3	GM2	GM1	GD3	GD1a
Control	100 %	3.2±0.8	1.5±0.4	0.43±0.10	0.10±0.003	1.1±0.2	0.14±0.05
GC-22	119.4 %	3.8±0.4	1.6±0.1	0.43±0.07	0.14±0.011	1.5±0.2	0.10±0.01
IG-20	87.33 %	2.8±0.2	1.2±0.1	0.35±0.06	0.12±0.018	1.0±0.03	0.11±0.03
NB-DNJ	114.8 %	3.7±0.4	1.5±0.1	0.44±0.04	0.15±0.016	1.4±0.2	0.11±0.02

Como puede observarse de los valores del total de gangliósidos, no se produjo una reducción significativa en células de glioma C6, más bien un aumento, a excepción de una ligera disminución con IG-20. Hay que observar que las células de glioma se dividen más rápidamente, ya que tienen mayor grado de malignidad que las células de melanoma. Podría ser necesario un tiempo de incubación más prolongado en presencia de los glicósidos para observar un efecto considerable.

Los resultados obtenidos para el análisis de lípidos indican que el contenido de ceramida aumenta tres veces al tratar las células con GC-22 y NB-DNJ (Figura 4.8). No obstante, este resultado hay que tomarlo con cautela ya que las desviaciones estándar de los datos obtenidos por triplicado fueron importantes.

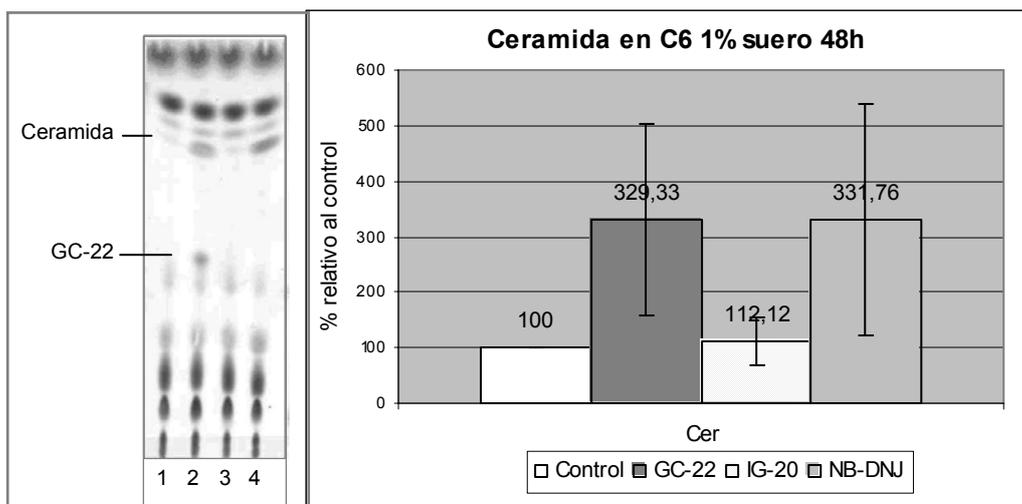


Figura 4.8. Análisis del contenido de ceramida en glioma en presencia de 1% de suero.

4.4.3 Línea celular de glioma de rata C6 incubada sin suero.

Decidimos repetir el experimento con células de glioma, pero sin utilizar suero en el medio de cultivo, de forma que el crecimiento fuera más lento. Así, se trataron con los compuestos en un medio sin suero y durante un tiempo más largo, 96 horas. Los cromatogramas obtenidos por HPLC se muestran en la Figura 4.9 y los resultados en la Tabla 4.5 respectivamente.

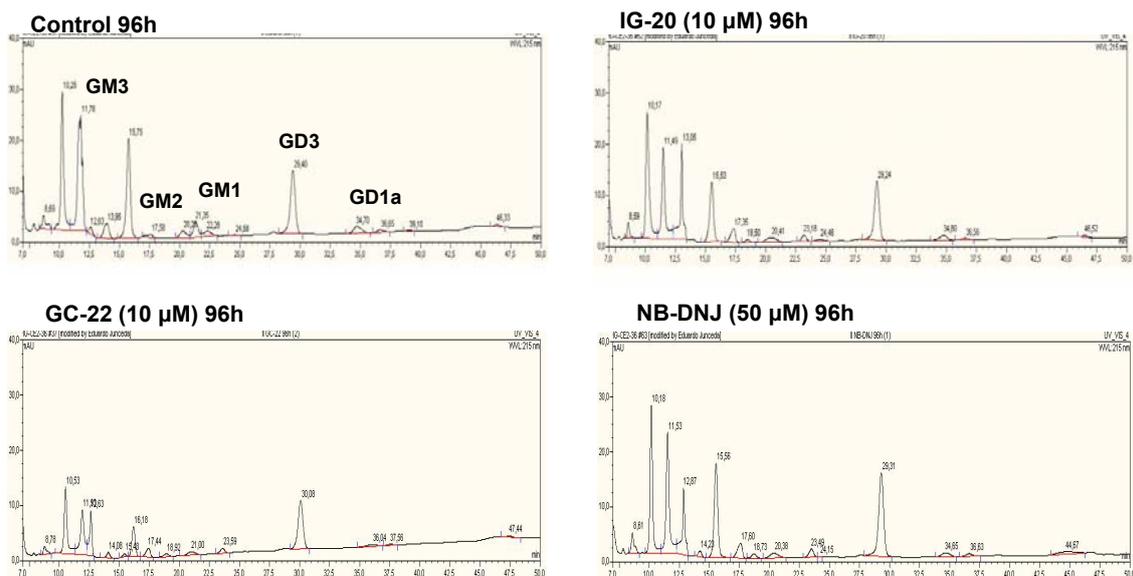


Figura 4.9

Tabla 4.5. Resultados obtenidos para los gangliósidos presentes en células de glioma C6 después de incubarlas sin suero durante 96 h en ausencia (control) y presencia de GC-22, IG-20 y NB-DNJ. Los experimentos se realizaron por duplicado y los datos están normalizados para la misma cantidad de células.

	Área gangliósidos/mg células (mU*A)						
	Total (relativo al control)	Total	GM3	GM2	GM1	GD3	GD1a
Control	100 %	4.4±0.3	2.2±0.2	0.86±0.18	0.10±0.01	0.8±0.01	0.21±0.08
GC-22	56.8 %	2.5±0.3	1.3±0.2	0.27±0.03	0.08±0.003	0.5±0.04	0.25±0.01
IG-20	70.0 %	3.1±0.2	1.8±0.2	0.41±0.05	0.09±0.001	0.7±0.02	0.03±0.01
NB-DNJ	75.2 %	3.3±0.4	1.6±0.1	0.56±0.19	0.09±0.02	0.8±0.01	0.12±0.01

De los tres compuestos ensayados fue una vez más GC-22 el que produjo un efecto más importante, con una reducción cercana al 50% en el total de gangliósidos. Si nos fijamos en los valores detectados de los diferentes gangliósidos en las células tratadas con GC-22, no se observó una disminución particularmente importante en ninguno de los monitorizados. En el caso de IG-20 la disminución en la cantidad relativa de los diferentes gangliósidos también fue más o menos homogénea, excepto en el caso de GD1a, cuyo valor fue siete veces inferior al control. No obstante, este efecto habría que tomarlo con cautela ya que las cantidades producidas de GD1a por las células de glioma C6 son pequeñas y, por tanto, los errores en la integración de los picos asignados a este gangliósido pueden ser importantes (veáse el pico a 37 y 39 minutos en la Figura 4.9, control).

Los resultados obtenidos para el análisis del lípido ceramida mediante TLC, se muestran en la Figura 4.10.

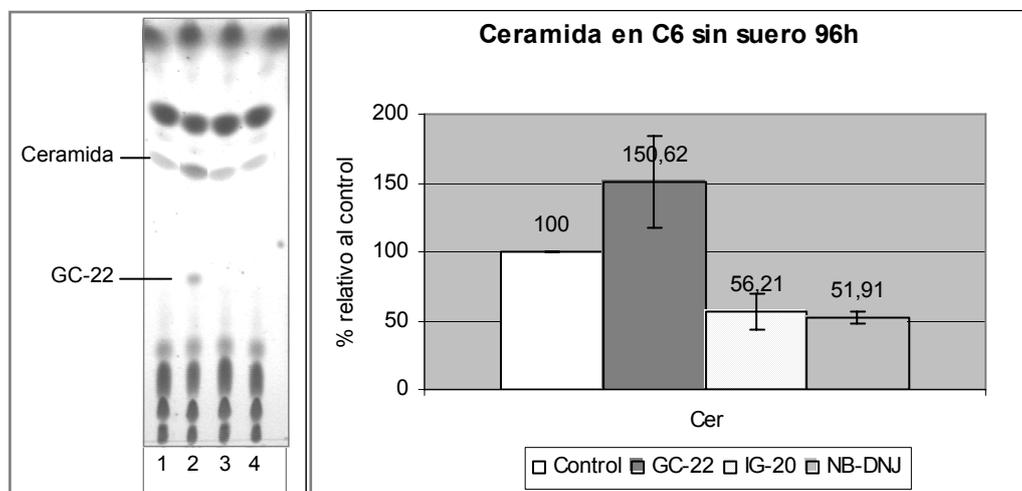


Figura 4.10. Análisis del contenido de ceramida en glioma en ausencia de suero.

En la misma línea de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, GC-22 produjo una acumulación moderada de ceramida (alrededor del 50%). En el caso de IG-20 y NB-DNJ el contenido de ceramida fue similar al control (incluso inferior).

Los resultados del análisis de gangliósidos en las células de glioma y melanoma tratadas con los glicósidos antitumorales, vienen a indicar que el efecto sobre la producción de estas biomoléculas es moderado o inexistente, particularmente cuando las células están en un estado proliferante en presencia de suero al 1%. El glicósido GC-22 fue el que manifestó el efecto más significativo, dando lugar a una reducción de un modo más o menos lineal en todos los gangliósidos monitorizados, lo que apunta a que la inhibición debe tener lugar en alguna de las etapas iniciales, antes de que se produzca el primer gangliósido GM3, es decir, en la síntesis de glucosil y lactosilceramida (Figura 4.11).

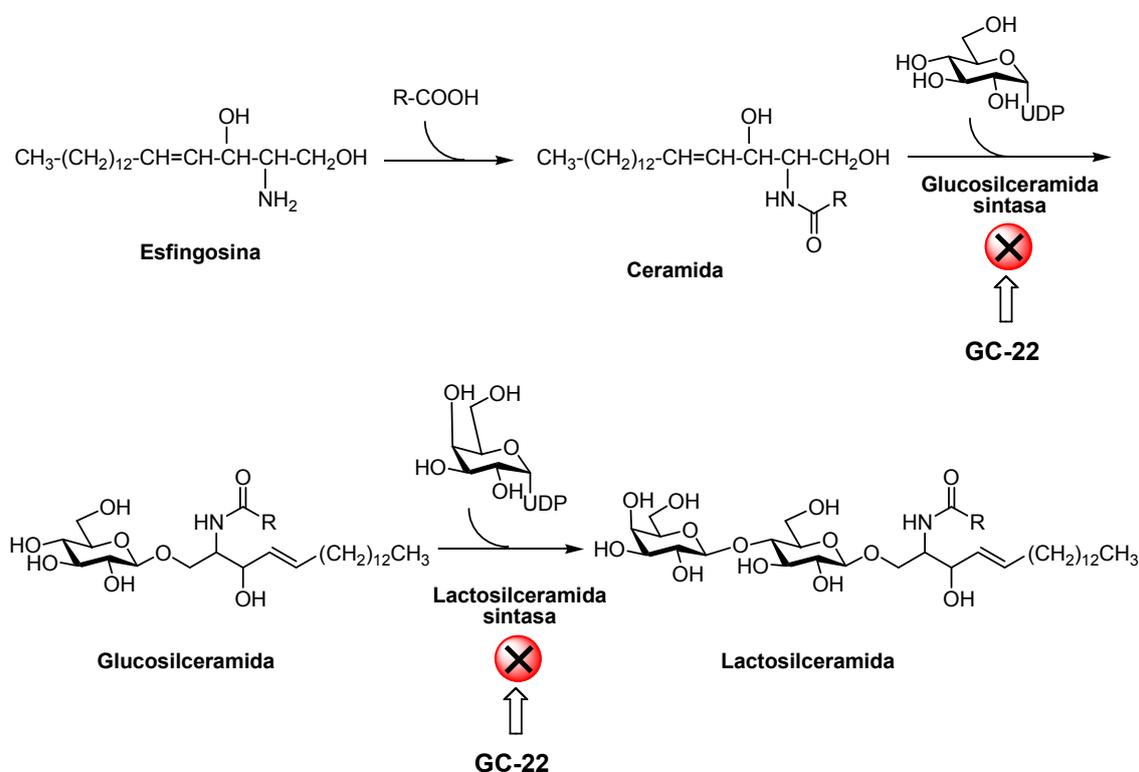


Figura 4.11

En apoyo de este mecanismo puede argumentarse el aumento observado en las cantidades de ceramida cuando las células son tratadas con GC-22, puesto que una posible inhibición de la reacción catalizada por la glucosilceramida sintasa conduciría a un aumento en la concentración de este metabolito. Tampoco es descartable la inhibición parcial de la lactosilceramida sintasa, la siguiente enzima en la ruta de biosíntesis, si bien en ningún

momento se observó la acumulación de glucosilceramida, que sería previsible en el caso que hubiera inhibición de esta enzima. Con el fin de conocer el efecto de los glicósidos sobre la lactosilceramida sintasa, decidimos abordar la obtención de esta enzima utilizando técnicas de biología molecular. Sin embargo, los intentos de obtención de lactosilceramida sintasa, presentados en el APÉNDICE I (página 135), fueron infructuosos.

Dado que no observamos que el tratamiento de las células tumorales con los glicósidos diera lugar a cambios significativos en el metabolismo de gangliósidos que pudiesen explicar la actividad antitumoral, decidimos estudiar posibles cambios en la composición de otros metabolitos mediante el empleo de espectroscopia de resonancia nuclear en estado sólido.

4.5 RMN DE C6 INCUBADAS CON LOS GLICÓSIDOS INHIBIDORES.

Los cambios en el patrón espectral de la resonancia magnética nuclear (RMN) de tumores están siendo utilizados para diagnosticar y predecir la progresión de tumores cerebrales en humanos.^{75,76} Dado el potencial de esta técnica, decidimos estudiar los cambios en la composición de metabolitos en las células tratadas con los antitumorales mediante el empleo de la espectroscopía de RMN en estado sólido. Esta técnica permite realizar el espectro de las células íntegras, de manera que se pueden detectar cambios en la composición de ciertos metabolitos celulares, de forma directa (veáse APÉNDICE II, página).

En colaboración con el Dr. Leoncio Garrido, del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (CSIC), se han obtenido los espectros de ¹H-RMN utilizando la técnica denominada rotación del ángulo mágico o *magic angle spinning* (MAS), aplicando una secuencia de pulsos optimizada para el caso concreto de nuestras suspensiones de células de glioma C6. Esta secuencia tipo CPMG, consta de un pulso de presaturación del H₂O de 5 segundos de duración. A continuación se aplica un pulso de 90° (duración 3.35 μs) seguido a 1 ms de un tren de 30 pulsos de 180° (duración de cada pulso 6.70 μs) espaciados 2 ms (ver Figura 4.12). Con este tren de pulsos, o filtro de T₂, de 60 ms de duración se consigue eliminar de forma satisfactoria las señales correspondientes a los protones de componentes macromoleculares de las células, como son las proteínas y otros, facilitando la detección de metabolitos de bajo peso molecular. Las macromoléculas, debido a su gran tamaño tienen menor movilidad, lo que hace que tengan tiempos de relajación T₂ cortos. Esto no afecta a las señales de metabolitos, que tienen T₂ más largos, ni tampoco a los metabolitos y a otros componentes celulares de bajo peso molecular y con cierta movilidad.

⁷⁵ Howe, F. A.; Opstad, K. S. *NMR Biomed.* **2003**, *16*, 123-131.

⁷⁶ Valverde, D.; R. Quintero, M.; P. Candiota, A.; Badiella, Ll.; E. Cabañas, M; Arús, C. *NMR Biomed.* **2006**, *19*, 223-230.

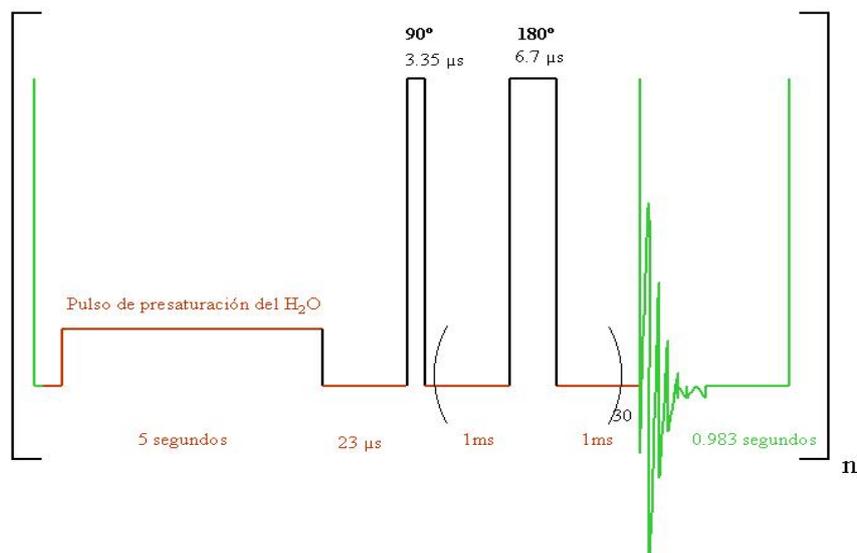


Figura 4.12. Secuencia de pulsos aplicada para obtener los espectros de ^1H -RMN. El número de acumulaciones (n) ha sido 1000.

Del mismo modo que se ha descrito en el apartado anterior, se incubaron células de glioma C6 con los glicósidos de interés, GC-22, IG-20 y NB-DNJ, en presencia de 1% de suero durante 48 horas. Se comprobó que las células eran viables y, a continuación, se lavaron con tampón salino deuterado y centrifugaron para registrar los espectros de RMN de las células íntegras. Se añadió una pequeña cantidad de DDS ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$) como referencia interna. También se registró el espectro de células de glioma C6 incubadas 45 h en ausencia de inhibidores, como control, y se asignaron las señales^{77,78,79} tal y como se muestra en la Figura 4.13.

⁷⁷ Rémy, C.; Arús, C.; Ziegler, A.; Sam Lai, E.; Moreno, A.; Le Fur, Y.; Décorps, M. J. *Neurochem.* **1994**, *2*, 166-179.

⁷⁸ Govindaraju, V.; Young, K.; Maudsley, A. *NMR in Biomedicine.* **2000**, *13*, 129-153.

⁷⁹ Valverde, D.; Quintero, M. R.; Candiota, A. P.; Badiella, L.; Cabañas, M. E.; Arús, C. *NMR in Biomedicine.* **2006**, *19*, 223-230.

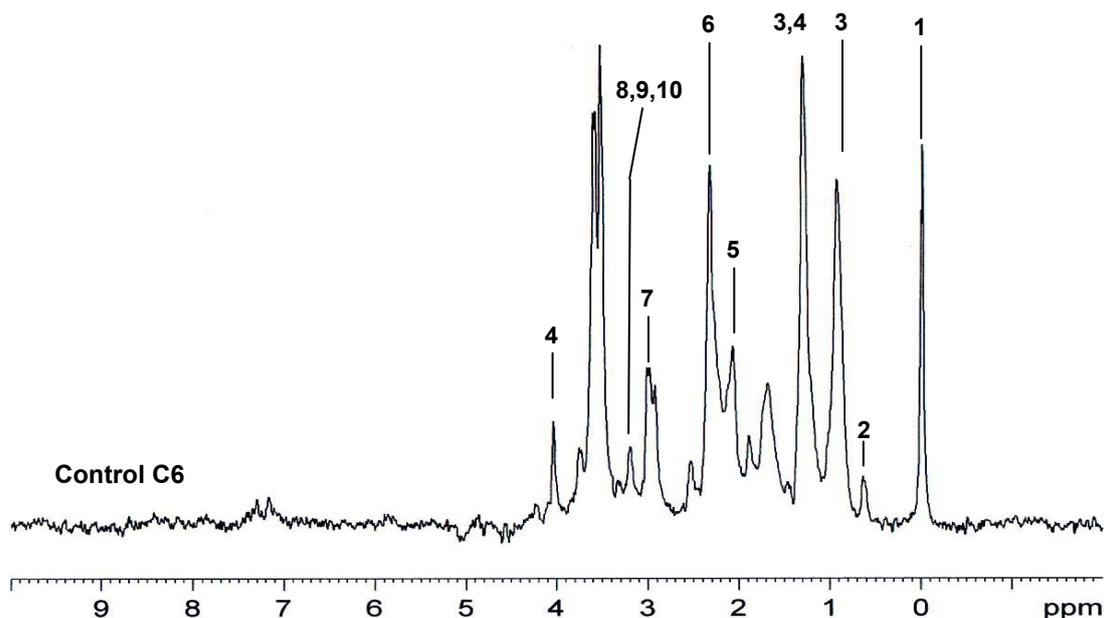


Figura 4.13. ^1H MAS RMN de células C6. La asignación de las señales se realizó del siguiente modo: 1, DDS; 2, metabolitos derivados de CoenzimaA; 3, lípidos móviles; 4, lactato; 5, grupos acetilo; 6, piruvato y metilenos de aminoácidos; 7, creatina; 8, colina; 9, fosfocolina; 10, glicerofosfocolina.

La señal que aparece a campo más alto, a 0.70 ppm, es característica de metabolitos derivados de coenzima A (CoA), y corresponde a los protones de uno de los dos metilos que presenta en su estructura (Figura 4.14).

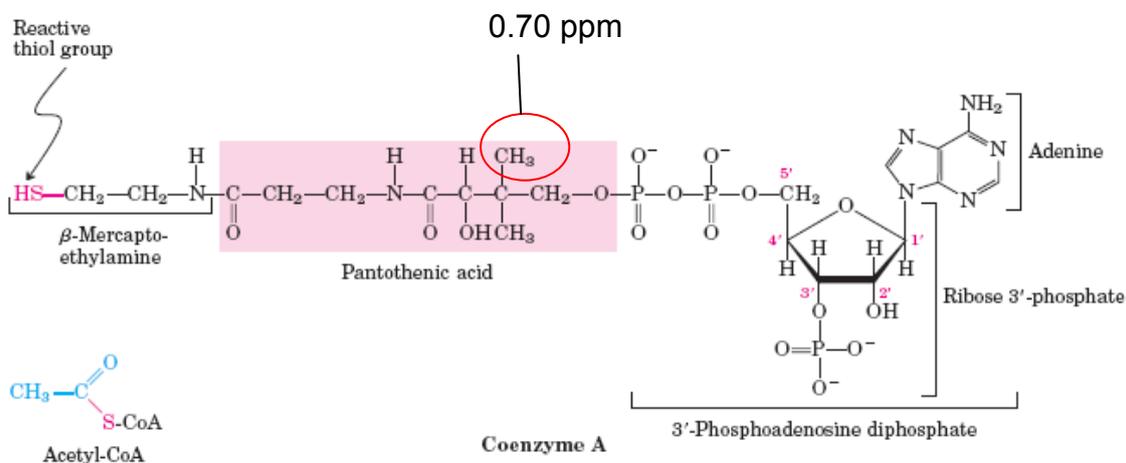


Figura 4.14. Coenzima A (CoA).

En la Figura 4.15 se muestran los espectros obtenidos para el control y para las células tratadas con los glicoconjugados GC-22 (10 μ M), IG-20 (10 μ M) y NB-DNJ (50 μ M).

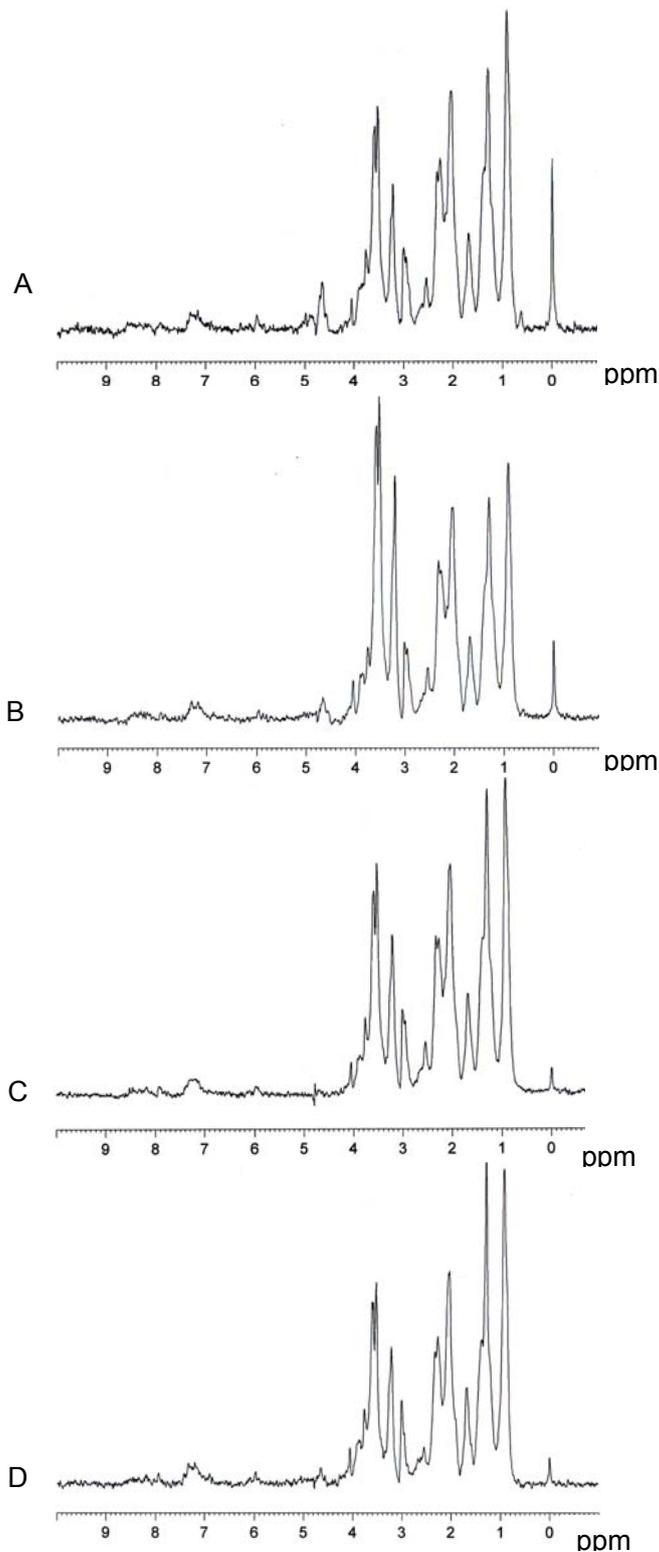


Figura 4.15. Espectros para (A) C6 (control), (B) C6+GC-22, (C) C6+IG-20, (D) C6+NB-DNJ, 45 horas. El número de acumulaciones (n) ha sido 1000.

Una primera comparación de los espectros permite observar que en los casos de células tratadas con los compuestos desaparece la señal de coenzima a 0.7 ppm presente en el control. La presencia de CoA en niveles observables por RMN cabe atribuirse a células que tienen activa la síntesis *de novo* de ácidos grasos.

Dejando aparte la señal asignable a derivados de coenzima, puede decirse que los espectros obtenidos al tratar las células con IG-20 y NB-DNJ son similares al del control. Sin embargo en el espectro de las células tratadas con GC-22 se observa un aumento significativo en la proporción de metabolitos como colina, fosfocolina y glicerofosfocolina.

La señal característica de la colina es un singlete ancho a 3.2 ppm, que incluye las contribuciones de colina libre, fosfatidilcolina y fosfocolina, y a menudo se refiere como “colina total”.^{80,81,82} La colina está implicado en la síntesis de fosfocolina, el constituyente principal de las membranas.

Con objeto de cuantificar el aumento de la colina total, elegimos como señal de referencia el singlete de la creatina a 3.0 ppm, correspondiente a los protones metílicos. Este pico es relativamente estable, no se han observado cambios con la edad,⁸³ por lo que suele utilizarse como concentración de referencia.

De este modo, calculamos la relación entre la intensidad de las señales de colina (3.22 ppm) y de creatina (3.00 ppm) en los espectros obtenidos, y obtuvimos que en el caso de las células tratadas con GC-22 la cantidad de colina era aproximadamente el doble que para el control (Tabla 4.6).

⁸⁰ Tan, J.; Blüml, S.; Hoang, T.; Dubowitz, D.; Mevenkamp, G.; Ross, B. *Magn. Reson. Med.* **1998**, *39*, 1005-1010.

⁸¹ Miller, B. L.; Chang, L.; Booth, R. Erns, T. Cornford, M.; Nikas, D.; McBride, D.; Jenden, D. J. *Life Sci.* **1996**, *58*, 1929-1935.

⁸² Michaelis, T.; Merboldt, K. D.; Bruhn, H.; Hänicke, W.; Frahm, J. *Radiology.* **1993**, *187*, 219-227.

⁸³ Saunders, D.E.; Howe, F. A.; van den Boogart, A.; Griffiths, J. R.; Brown, M. M. *J. Magn. Reson. Imaging.* **1999**, *9*, 711-716.

Tabla 4.6. Relación entre los metabolitos de colina y creatina.

Espectro	Colina total (3.22 ppm)	Creatina (3.00 ppm)	Colina/Creatina
Control	5.39	2.97	1.8
C6 + GC-22	9.01	2.75	3.3
C6 + IG-20	5.95	3.08	1.9
C6 + NB-DNJ	5.02	3.03	1.7

Además, observamos que en las células tratadas con GC-22 se produjo un incremento de la señal correspondiente a los metilenos de lípidos (1.30 ppm) en relación con la de los metilos (0.90 ppm), respecto del control. Para cuantificar este incremento tuvimos en cuenta la concentración de lactato. Dado que el metilo del lactato aparece a 1.30 ppm, al igual que los grupos metileno, fue necesario utilizar la señal del protón de lactato que aparece a 4.0 ppm para conocer su contribución en la señal de 1.30 ppm. Para una misma concentración de lactato, se observó que en el control la relación CH_2/CH_3 fue de 1.1, mientras que en células tratadas con GC-22 fue 1.5.

Con el fin de valorar la reproducibilidad del experimento y obtener espectros de RMN eliminando en mayor medida las señales atribuidas a moléculas relativamente grandes, como lípidos, se realizaron nuevas incubaciones de células de glioma C6 con GC-22 utilizando distintos T2 (ver Figura 4.12), desde 30 hasta 600 milisegundos. Los mejores resultados se obtuvieron con un T2 de 480 ms (Figura 4.16).

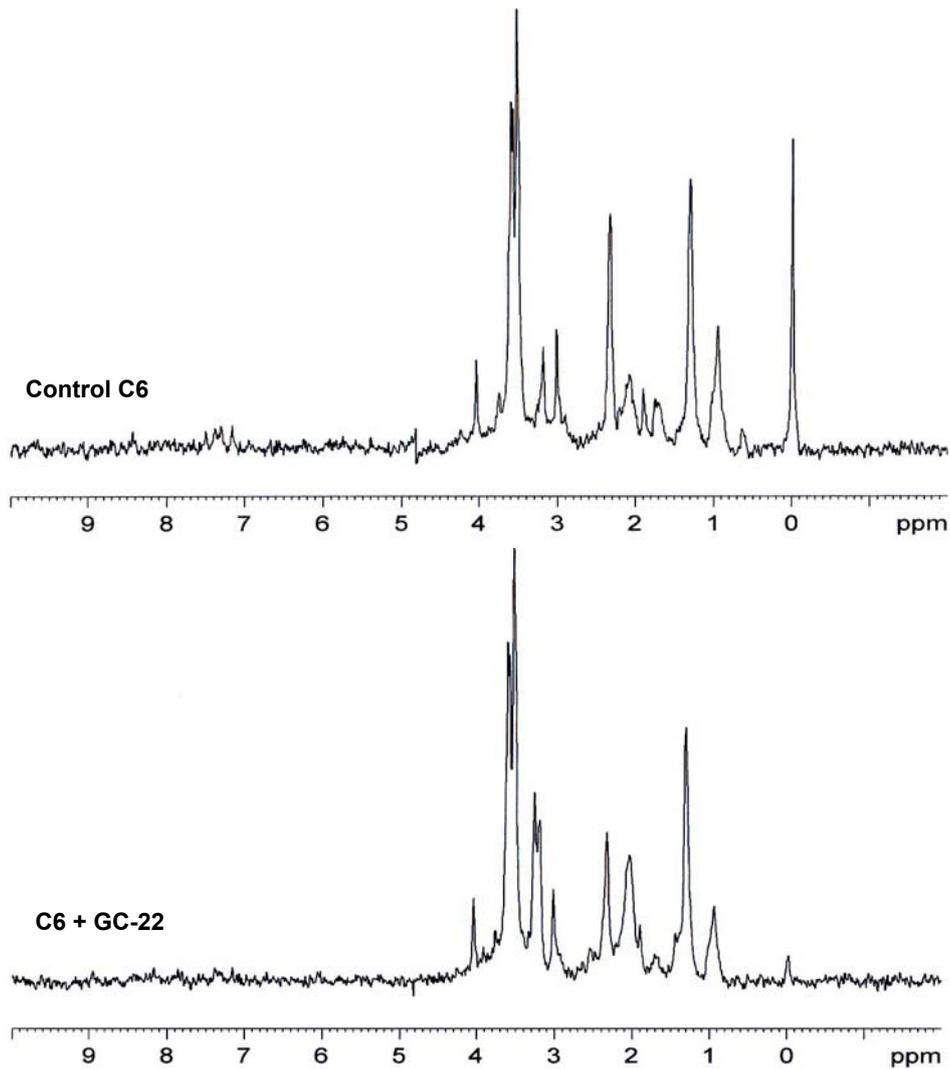


Figura 4.16. Espectros para (A) C6 (control), (B) C6+GC-22. El número de acumulaciones (n) ha sido 1000.

En estos experimentos las diferencias en las señales asignadas a derivados de colina y CoA, entre células tratadas con GC-22 y control fueron todavía más evidentes.

4.6 DISCUSIÓN.

Para poder elaborar una hipótesis que explique los resultados obtenidos es necesario repasar brevemente el metabolismo de ácidos grasos y lípidos y su relación con procesos de apoptosis o muerte celular programada.

La síntesis de novo de ácidos grasos (Figura 4.17) tiene lugar en el citosol y comienza con la transformación de acetil-CoA en malonil-CoA catalizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC). A partir de malonil-CoA, mediante un proceso repetitivo catalizado por la enzima ácido graso sintasa (AGS), crece la cadena en dos carbonos en cada ciclo hasta alcanzar la longitud de 16 carbonos, cuyo producto, el ácido palmítico, abandona el ciclo de síntesis. Los carbonos que van incorporándose provienen de acetil-CoA via malonil-CoA. La enzima AGS es un complejo que tiene siete centros activos diferentes y cataliza en cada ciclo cuatro reacciones distintas que implican una molécula de acil-CoA incrementada en dos carbonos.

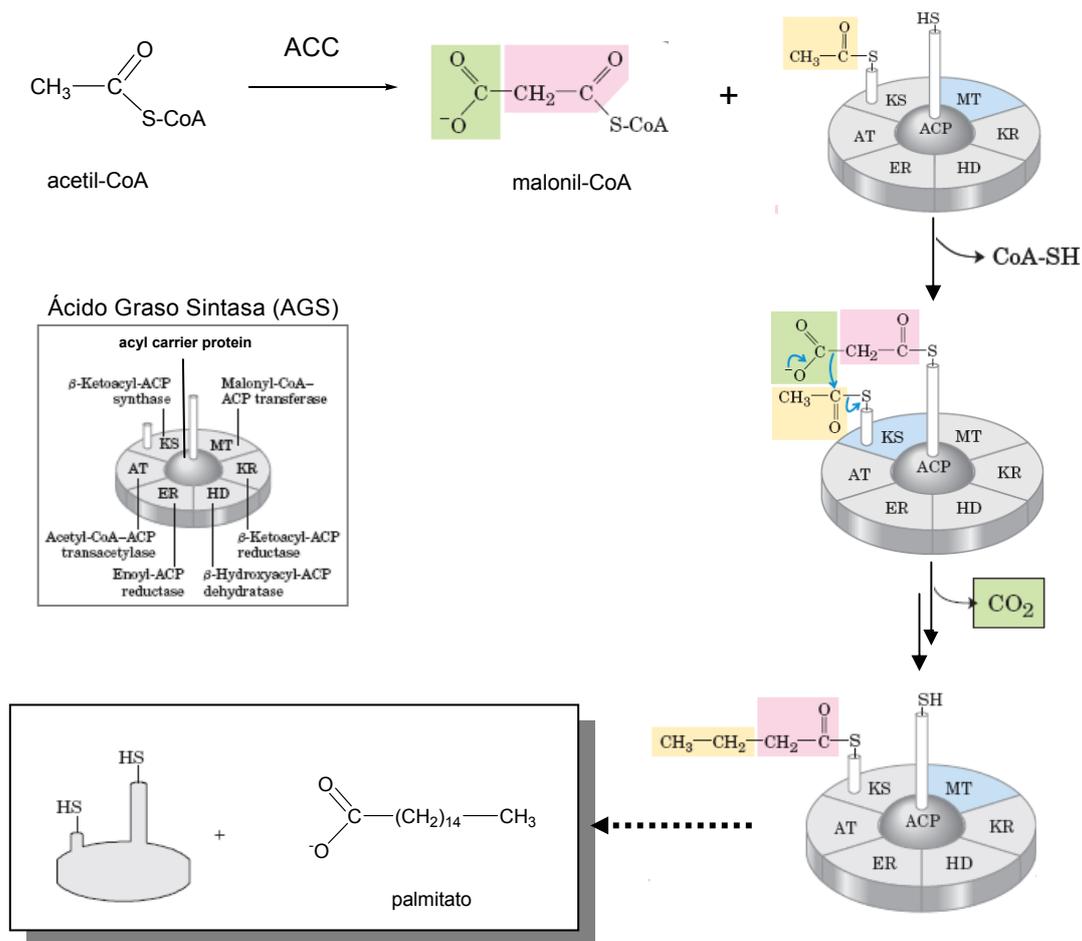


Figura 4.17. Biosíntesis de ácidos grasos

El metabolismo de ácidos grasos está controlado de un modo recíproco, de forma que la síntesis y la degradación se ajustan a las necesidades fisiológicas y no pueden estar activas simultáneamente. Así, en condiciones en que existe una alta actividad de síntesis de ácidos grasos, la concentración de malonil-CoA se eleva. Este metabolito a altas concentraciones bloquea la degradación de ácidos grasos mediante la inhibición de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT 1), necesaria para el transporte de los ácidos grasos desde el citosol a la mitocondria, donde se produce su oxidación (Figura 4.18).

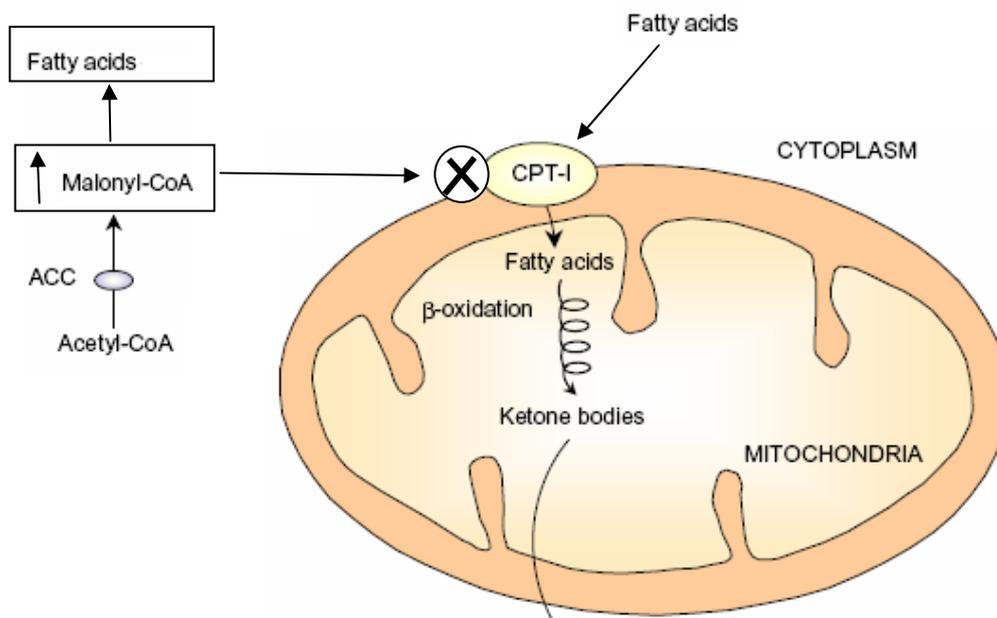


Figura 4.18. Inhibición de la CPT 1 por aumento de los niveles de malonil-CoA.

Es conocido que en la mayoría de los tumores hay un incremento en la síntesis de novo de ácidos grasos, que son necesarios para la formación de membranas lipídicas, ya que las células tumorales se dividen constantemente. Por esta razón, la mayoría de los ácidos grasos sintetizados en células cancerosas están en forma de fosfolípidos, incorporados a la bicapa lipídica. No ocurre así en células normales, que utilizan preferentemente los lípidos procedentes de la dieta para formar las membranas. Esto hace que la síntesis

de novo de ácidos grasos se haya estudiado como una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer.⁸⁴

Por otra parte, los ácidos grasos se emplean para sintetizar lípidos complejos como los esfingolípidos, entre los que destaca la ceramida, que da lugar a los gangliósidos, algunos de los cuales, como ya se comentó, se sobreexpresan durante el desarrollo y progresión de tumores.

Existen cada vez más evidencias que muestran que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos detiene el crecimiento de tumores e induce apoptosis en células cancerosas.^{85,86,87} La mayoría de los estudios se han centrado en sistemas que implican la inhibición de la enzima AGS. Se han propuesto diversos mecanismos para explicar el efecto tumoricida del bloqueo de esta enzima.⁸⁸ Entre ellos cabe destacar el que propone que la inhibición de AGS induce apoptosis mediante la elevación de la concentración de ceramida. La inhibición del enzima AGS en células tumorales, que tienen una elevada actividad lipogénica, conduce a una acumulación de malonil-CoA, el cual al alcanzar ciertos niveles da lugar a la inhibición de CTP 1. La inhibición de CTP 1 conduce a la acumulación de ceramida, a lo que sigue la inducción de una serie de genes preapoptóticos y finalmente la muerte celular.

Actualmente está plenamente admitido el papel de la ceramida como molécula mediadora de apoptosis. La ceramida, que puede generarse bien por hidrólisis de esfingomielina, bien desde la síntesis de novo a partir de esfinganina o esfingosina, cuando se acumula en el interior de la célula desencadena apoptosis. Curiosamente, durante el proceso de apoptosis tienen lugar reacciones que a su vez generan ceramida; como la hidrólisis de esfingomielina procedente de la membrana celular.⁸⁹ Esto puede ser un mecanismo celular necesario para mantener ciertos niveles de ceramida que garanticen la muerte celular.

⁸⁴ A. Menéndez, J.; Lupu, R. *Nature Rev. Cancer*. **2007**, *7*, 763-777.

⁸⁵ Pizer, E. S. *et al. Cancer Res*. **1996**, *56*, 2745-2747.

⁸⁶ Thupari, J.N.; Pinn, M. L.; Kuhajda, F. P. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2001**, *285*, 217-223.

⁸⁷ A. Menéndez, J.; Lupu, R. *Nature Rev. Cancer*. **2007**, *7*, 763-777.

⁸⁸ A. Menéndez, J.; Lupu, R. *Nature Rev. Cancer*. **2007**, *7*, 763-777.

⁸⁹ Huwiler et al. *Biochim. et Biophys. Acta*. **2000**, *1485*, 63-99.

El conocimiento del papel que desempeña la ceramida en el proceso de apoptosis, debido a sus posibles aplicaciones en el tratamiento del cáncer, ha estimulado el estudio de compuestos análogos capaces de intervenir en sus rutas metabólicas y dar lugar a una acumulación de ceramida. También se han estudiado moléculas que mimeticen su acción activando las dianas sobre las que actúa la ceramida endógena e induciendo así apoptosis. En este sentido, cabe destacar algunos trabajos que describen compuestos con características estructurales similares a nuestros glicósidos antitumorales. Así, se ha descrito que el *N*-palmitoil serinol⁹⁰ (**S18**, Figura 4.19) y compuestos de tipo amida con cadenas hidrocarbonadas y grupos hidroxilo^{ref,91} (**B16** y **T18**) indujeron apoptosis en células de neuroblastoma. Entre los compuestos ensayados los más eficientes se caracterizaban por tener al menos dos grupos hidroxilo y una cadena hidrocarbonada de al menos 16 carbonos, que en los más potentes era un resto de tipo oleico (Figura 4.19).

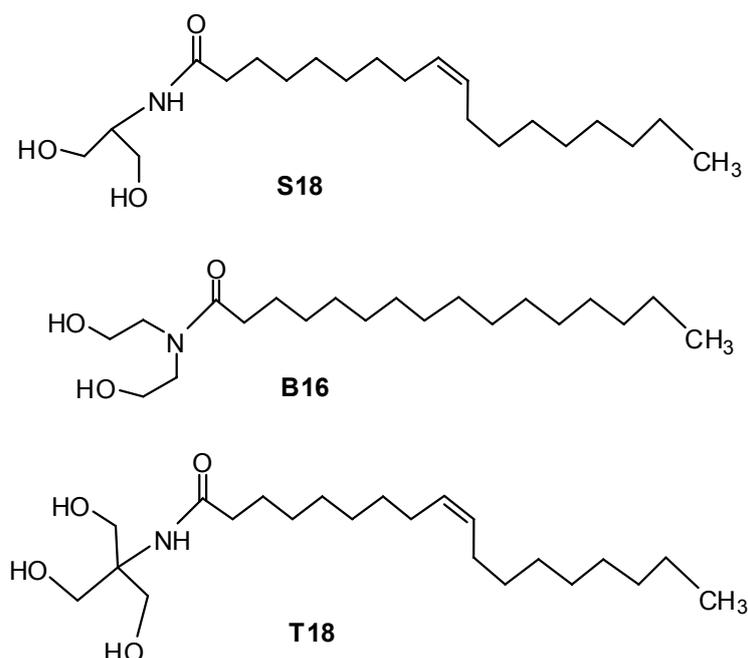


Figura 4.19 Estructuras de análogos de ceramida.

⁹⁰ Bieberich et al. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 177-181.

⁹¹ Bieberich et al. *Cancer Lett.* **2002**, 181, 55-64

Los autores no observaron, sin embargo, una elevación sustancial de ceramida, por lo que propusieron la posibilidad de que los análogos actuaran directamente sobre las dianas proapoptóticas, mimetizando la acción de la ceramida, y que los incrementos moderados de ceramida provengan, al menos en parte, de la hidrólisis de esfingomielina de la membrana celular.

Elementos estructurales que determinan la actividad de estos compuestos, se presentan también en el antitumoral GC-22, lo que sugiere que pueda inducir apoptosis. Los resultados obtenidos por RMN para células de glioma C6 tratadas con GC-22, que muestran un aumento de la señal a 3.20 ppm correspondiente a derivados de colina, principalmente fosfocolina y glicerofosfocolina, apuntan en esa dirección. Se ha descrito que en una fase temprana de muerte celular programada en células de glioma, cuando tiene lugar la fragmentación del ADN, la concentración de fosfocolina y glicerofosfocolina determinadas por ^1H MAS NMR *ex vivo* se ven incrementadas.⁹² Durante el proceso de apoptosis se activa el catabolismo de fosfolípidos mediante una ruta mediada por fosfolipasa, dando lugar a ácidos grasos y glicerofosfocolina mediante la acción consecutiva de fosfolipasa A2 y lisofosfolipasa sobre los fosfolípidos de membrana (Figura 4.20).⁹³

⁹² Valonen et al. *NMR Biomed.* **2005**, *18*, 252-259.

⁹³ Milkevitch et al. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1734*, 1-12.

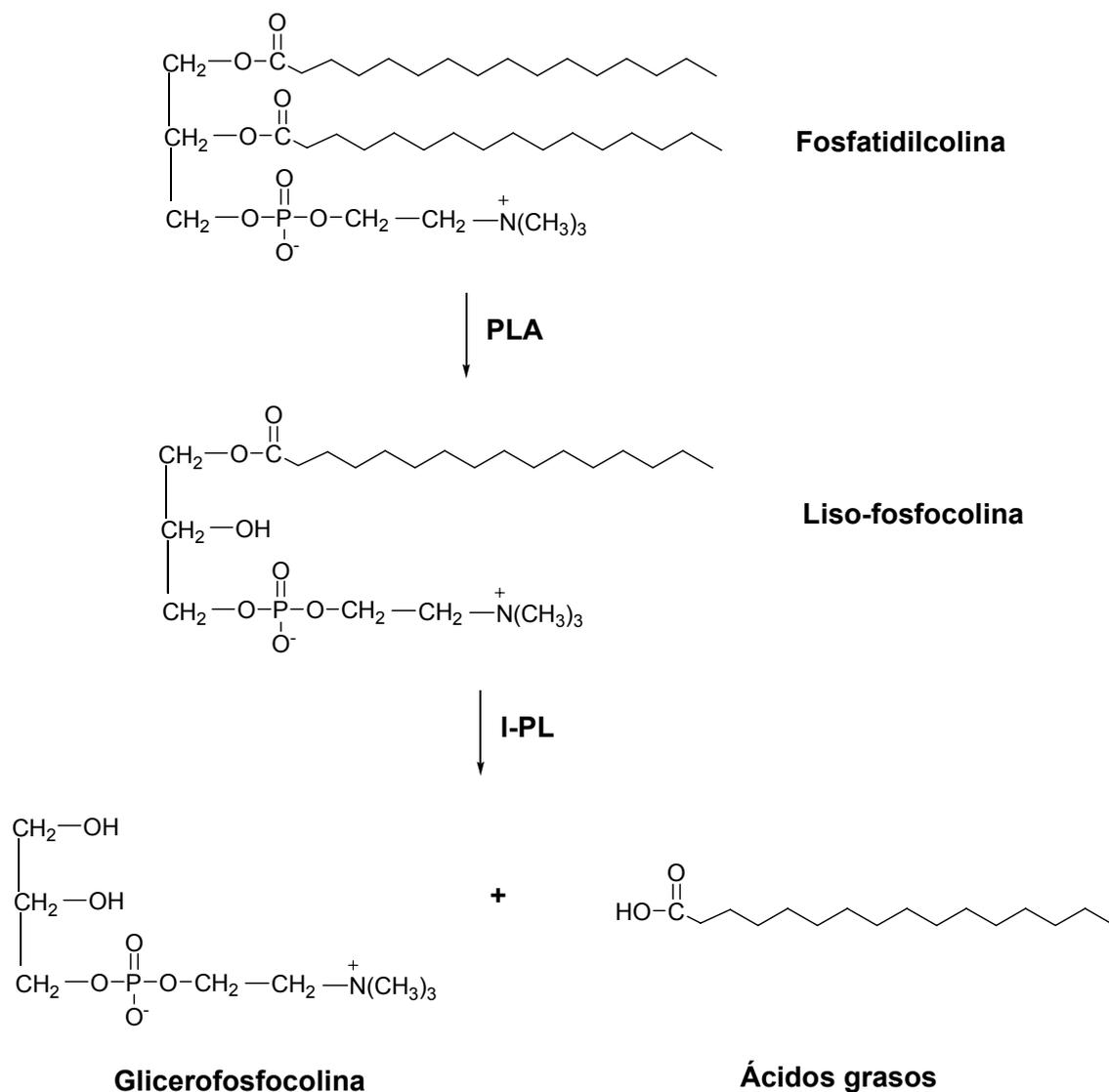


Figura 4.20. Metabolismo de fosfolípidos que da lugar a glicerofosfolina y ácidos grasos.

En los espectros de las células tratadas con GC-22 también se observó un aumento en la intensidad de la señal de metilenos, a 1.30 ppm, en relación con la de los metilos, a 0.9 ppm, comparadas con la relación de estas señales en el control. Se ha sugerido que un incremento en la relación CH_2/CH_3 puede ser indicativo de apoptosis.^{94,95} El incremento de la señal de metilenos es atribuido a la acumulación de lípidos en el citosol, en forma de cuerpos

⁹⁴ Blankenberg, F.G.; Katsikis, P. D.; Storrs, R. W.; Beaulieu, C.; Spielman, D.; Chen, J. Y.; Naumovski, L.; Tait, J.F. *Blood*. **1997**, *89*, 3778-3786.

⁹⁵ Lyng, H.; Sitter, B.; Bathen, T. F.; Jensen, L. R.; Sundfor, K.; Kristensen, G. B.; Gribbestad, I. S. *BMC Cancer*. **2007**, *7*:11.

lipídicos,⁹⁶ como consecuencia de las alteraciones en el metabolismo de lípidos inducidas por la apoptosis. Así, el aumento del catabolismo de los fosfolípidos de membrana, mediante la activación de fosfolipasas, puede producir ácidos grasos libres que son convertidos posteriormente en triacilgliceroles, los cuales se almacenan como cuerpos lipídicos. Por consiguiente, el incremento en la señal de metilenos es también indicativo de que GC-22 promueve apoptosis.

Ahora bien, si GC-22 efectivamente induce apoptosis, es más probable que sea debido a su acción directa sobre las dianas que activan este mecanismo, que porque produzca una acumulación de ceramida como consecuencia de la inhibición de la enzima glucosilceramida sintasa. El análisis de ceramida en células de glioma y melanoma tratadas con GC-22 no mostró que diera lugar a los aumentos de ceramida necesarios para la inducción de apoptosis. En la literatura se han descrito compuestos que inducen apoptosis vía acumulación de ceramida intracelular, sin embargo en estos casos los incrementos de concentración fueron de al menos 3-4 veces respecto a las células no tratadas.⁹⁷ En nuestro caso, los aumentos de ceramida fueron moderados. Además, la disminución en la producción de gangliósidos totales en las células en proliferación (con 1% de suero) fue mínimo cuando se trataron con GC-22 e IG-20 (sólo en el caso de células de melanoma tratadas con GC-22 se produjo una reducción alrededor del 20 % en la producción de gangliósidos). Es decir, en el caso de existir inhibición de la glucosilceramida sintasa, ésta no debe ser suficientemente importante para dar lugar a una acumulación de ceramida que induzca apoptosis.

Otro mecanismo a través del cual pudiese también estar actuando GC-22 es mediante el bloqueo de la síntesis de ácidos grasos, lo que conduciría a una inhibición de la proliferación celular. La señal que aparece a 0.7 ppm en el espectro de resonancia de células de glioma, correspondiente a derivados de CoA es asignable a malonil-CoA ya que, como se ha mencionado anteriormente, en células tumorales este metabolito se encuentra en niveles muy superiores a los existentes en células normales, debido a la elevada actividad lipogénica. En el espectro de células tratadas con GC-22 e IG-20 la

⁹⁶ Hakumaki, J. M.; Kauppinen, R. A. *Trends Biochem Sci.* **2000**, 25, 357-362.

⁹⁷ Bieberich et al. *J. Neurochem.* **1999**, 72, 1040-1049.

señal de malonil CoA desaparece, lo que sugiere que se ha producido la inhibición de la síntesis de ácidos grasos en su primera etapa, catalizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC), de manera que no se produce malonil CoA. En este contexto, un trabajo muy reciente describe el ácido oleico (Figura 4.21) como un potente inhibidor de la lipogénesis en células de glioma C6, y los autores muestran que se debe a la inhibición de la enzima ACC.⁹⁸ Los glicósidos GC-22 e IG-20 contienen un resto de alcohol oleico y fue precisamente la presencia de esta cadena lo que marcó la diferencia en la actividad antiproliferativa de nuestros glicósidos frente a aquellos con cadenas más cortas o saturadas que fueron menos potentes, como se comentó en el capítulo 2. Por tanto, es posible que el GC-22 sea inhibidor de la ACC.

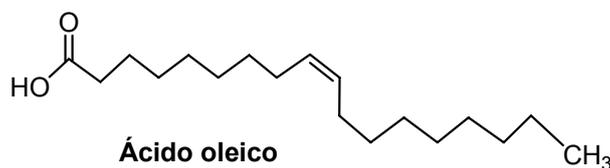


Figura 4.21. Estructura del ácido oleico

En la Figura 4.22 se muestra un esquema que engloba las rutas en las que podría actuar el GC-22.

⁹⁸ Natali, F.; Siculella, L.; Salvati, S.; V. Gnani, S. *Journal of Lipid Research*. **2007**, *48*, 1966-1975.

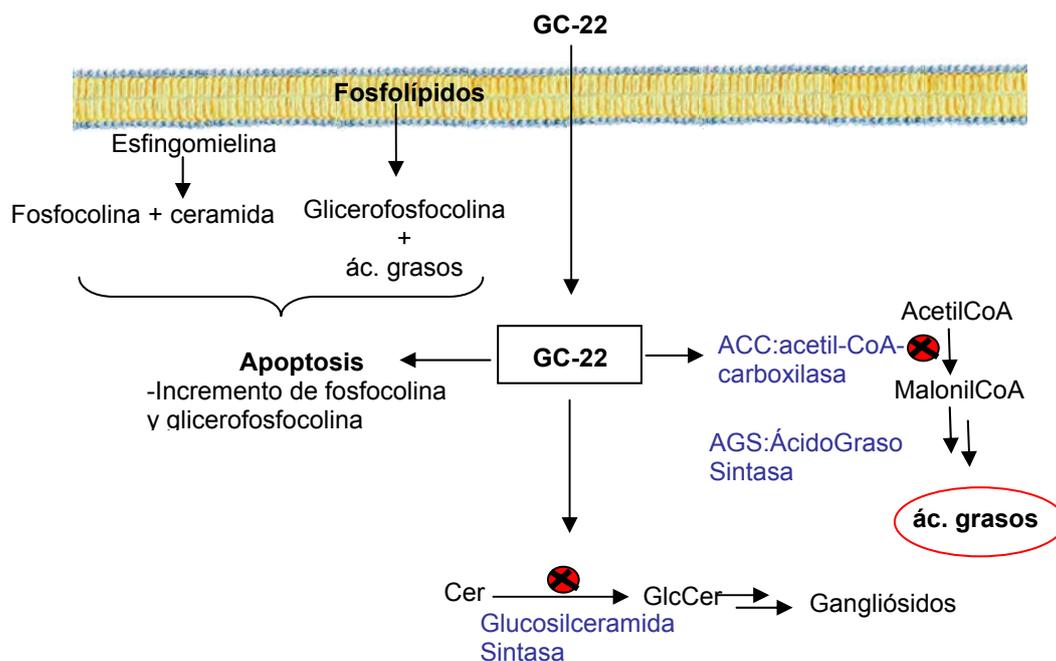


Figura 4.22. Esquema global

Los glicósidos GC-22 e IG-20, que presentaron las mejores actividades antiproliferativas, han mostrado efectos diferentes en cuanto a la producción de gangliósidos y acumulación de ceramida, así como en el aumento de los metabolitos derivados de colina observados por RMN.

Teniendo en cuenta que son dos compuestos análogos, y que únicamente difieren en el grupo sulfato, las diferencias observadas pueden atribuirse a la presencia de la carga negativa. El grupo sulfato hace que IG-20 sea perfectamente soluble en agua, lo cual es una ventaja a la hora de hacer ensayos biológicos, pero por otro lado, puede impedir que el compuesto atraviese la membrana celular. Es importante resaltar que la banda asignable a GC-22 pudo observarse en el análisis por TLC de lípidos extraídos de las células, lo que indica que este compuesto se incorpora al interior de la célula; mientras que en el caso de células tratadas con IG-20 no se detectó la banda asignable a este compuesto. Por tanto, es posible que la actividad antiproliferativa de IG-20 tenga lugar a través de un mecanismo distinto al que acaba de discutirse para GC-22. No es descartable que el grupo sulfato de IG-20 se hidrolice dando lugar a GC-22. Y algunos de los efectos observados al

tratar las células con IG-20 se deban al GC-22 formado, por ejemplo, la desaparición de los metabolitos derivados de coenzima A.

CAPÍTULO 5

PERSPECTIVAS. ENSAYOS *IN VIVO* Y DESARROLLO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DEL GLICÓSIDO ANTITUMORAL

El compuesto GC-22, que presentó los mejores valores de ID₅₀ frente a las líneas celulares de glioma de rata (1.3 µM) y humano (4.6 µM), es un buen candidato para llevar a cabo estudios más avanzados dirigidos al tratamiento de gliomas. Según el mecanismo de acción propuesto, este glicósido podría estar actuando en dianas biológicas muy convenientes para atacar selectivamente células tumorales. En breve se pretende profundizar en el análisis de mecanismos de apoptosis mediante ensayos de fragmentación de ADN, que se realizarán en el grupo del Prof. Nieto-Sampedro.

Por otro lado, su síntesis es muy práctica, implica una sola etapa de reacción entre *N*-acetil-glucosamina y alcohol oleico. Esto supone una ventaja notable frente a NF115, el compuesto de referencia en el planteamiento de esta tesis, cuya síntesis requería siete etapas desde *N*-acetil-glucosamina. No obstante, otro aspecto a abordar de modo inmediato es la optimización y escalado de la síntesis de GC-22, con objeto de iniciar ensayos *in vivo* en modelos experimentales de tumores implantados en ratas y que han sido utilizados anteriormente con NF115, tanto en el grupo de Nieto-Sampedro como en el del Prof. Jesús Vaquero, en la Clínica Puerta de Hierro.

Con vistas a una posible aplicación clínica, uno de los factores que limita la eficacia del tratamiento convencional de enfermedades del sistema nervioso central es la presencia de la barrera hematoencefálica,⁹⁹ que restringe el paso de los fármacos administrados al cerebro. Para conseguir que llegue al cerebro una concentración óptima de agente terapéutico mediante su simple administración, es necesario utilizar dosis elevadas del fármaco, y sólo una fracción de ésta alcanza la diana terapéutica.

En el caso de los gliomas de alto grado, recientemente se han empleado polímeros para la liberación controlada de antitumorales,^{100,101} por ejemplo el Gliadel (Figura 5.1) para la administración de carmustina.¹⁰² Estos polímeros se depositan en la cavidad quirúrgica durante la cirugía y van liberando

⁹⁹ Takakura, Y.; Audus, K. L.; Borchardt, R. T. *Advances in Pharmacology*. **1991**, 22, 137-165.

¹⁰⁰ Brem H. Gabikian, P. J. *Controlled Release*. **2001**, 74, 63-67.

¹⁰¹ Walter, K. A.; Cahan, M. A.; Gur, A.; Tyler, B.; Hilton, J.; Colvin, O. M.; Burger, P. C.; Domb, A. Brem, H. *Cancer Res*. **1994**, 54, 2207-2212.

¹⁰² Pummer, C.; Hollon, T. *Modern Drug Discovery*. **1998**, 30-42.

lentamente el principio activo para tratar la enfermedad residual alrededor del lecho quirúrgico. De este modo, y en combinación con radioterapia, los tratamemientos de gliomas malignos están demostrando altas tasas de respuesta.

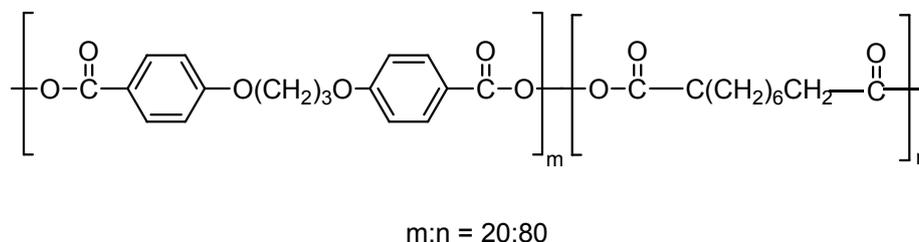


Figura 5.1. Estructura del copolímero Gliadel

En trabajos anteriores con el inhibidor sintético NF115, el grupo del Prof. Julio San Román, del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) del CSIC, preparó sistemas poliméricos para su liberación controlada, en los que el glicósido se encontraba encapsulado físicamente en una matriz polimérica biodegradable: un copolímero de poli(metacritoato de metilo) y poli(ϵ -caprolactona).¹⁰³ Estos discos se implantaron en el cerebro de cerdos adultos mediante craneotomía convencional, en trabajos realizados por el grupo del Prof. Jesús Vaquero. Después de dos meses los animales fueron estudiados por Resonancia Magnética con objeto de verificar posibles alteraciones en el tejido cerebral. Los resultados indicaron perfecta tolerancia al sistema implantado, y una liberación de NF115 en torno al 90%.¹⁰⁴

En esta tesis doctoral hemos iniciado trabajos en colaboración con el grupo del Prof. San Román dirigidos a desarrollar sistemas poliméricos para la administración del glicósido GC-22. Los resultados obtenidos hasta el momento son muy prometedores y se resumen a continuación.

¹⁰³ Abraham, G. A.; Gallardo, A.; San Román, J.; Fernández-Mayoralas, A.; Zurita, M.; Vaquero, J. *J. Biomed. Mat. Res.* **2003**, *64A*, 638-647.

¹⁰⁴ Fernández-Mayoralas, A., de la Figuera, N.; Zurita, M.; Vaquero, J.; Abraham, G. A.; San Román, J.; Nieto-Sampedro, M. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1286-1288.

RESULTADOS PRELIMINARES SOBRE SISTEMAS POLIMÉRICOS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE GC-22.

En el grupo del Instituto ICTP se ha abordado la preparación de sistemas para la liberación controlada de GC-22 basados en polímeros, mediante dos vías. La primera consiste en la preparación de sistemas poliméricos basados en micropartículas parcialmente biodegradables compuestas de poli(metacritato de etilo) y poli(ϵ -caprolactona) (PEMA/PCL), en los que GC-22 se encuentra encapsulado físicamente en los intersticios de las micropartículas. La segunda alternativa para la liberación de GC-22 es el desarrollo de sistemas poliméricos bioactivos, también denominados “fármacos poliméricos”, mediante el anclaje químico reversible del glicósido a cadenas macromoleculares.

Liberación de GC-22 encapsulado físicamente en una matriz polimérica.

A partir de micropartículas compuestas de poli(metacritato de etilo) y poli(ϵ -caprolactona) (PEMA/PCL), se prepararon discos que contenían GC-22 y se estudió la liberación del glicósido en distintos medios, en función del tiempo.¹⁰⁵

Los discos se incubaron a 37 °C en medio de cultivo (DMEM) y fluido sinovial, y se tomaron alícuotas a distintos tiempos, que se analizaron por HPLC para conocer la cantidad de GC-22 liberada al medio. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.2.

¹⁰⁵ López-Donaire, M. DEA. UCM, **2007**, 62-64.

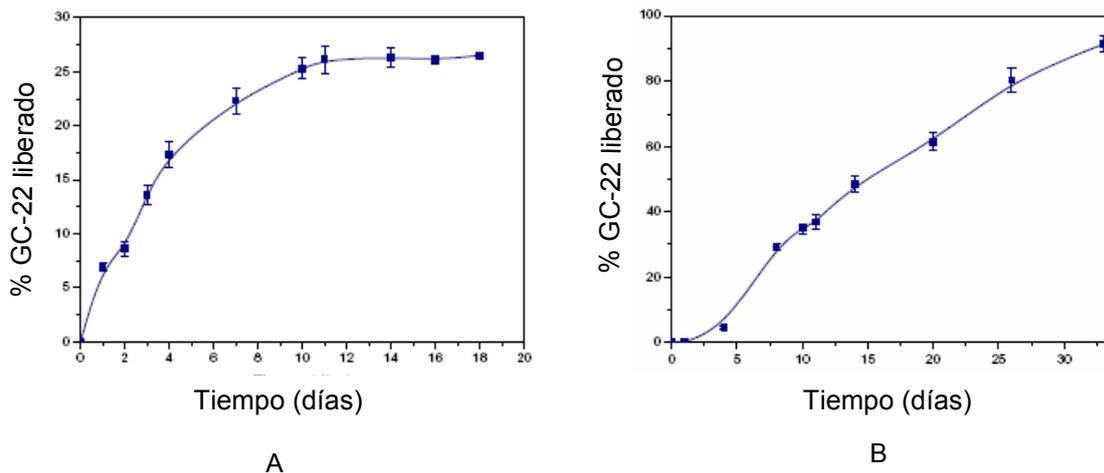


Figura 5.2. Perfil de liberación, en medio de cultivo (A) y fluido sinovial (B), a 37 °C, de GC-22 encapsulado en PEMA/PCL-20.

En ambos casos se produce una liberación lenta y sostenida en el tiempo, si bien en el caso de fluido sinovial la liberación obtenida es mayor, alcanzándose prácticamente el 100% a los 33 días de incubación. A los 14 días en fluido sinovial se liberó el 48% de GC-22 y en medio de cultivo un 26%. Estas diferencias pueden explicarse debido a que el fluido sinovial es más hidrofóbico que el medio de cultivo, y por tanto GC-22 tiene más tendencia a solubilizarse en fluido sinovial.

Preparación de sistemas poliméricos con el inhibidor unido covalentemente.

La preparación de estos polímeros requería la introducción de un éster de metacrilato en algunos de los hidroxilos del glicósido. La estructura química de GC-22 permite llevar a cabo reacciones selectivas sobre el hidroxilo primario HO-6, más reactivo que los hidroxilos secundarios de las posiciones 3 y 4. En este trabajo hemos llevado a cabo la reacción de GC-22 con anhídrido metacrílico catalizada por una lipasa, una clase de enzimas que suelen dar lugar a acilaciones sobre hidroxilos primarios con alta selectividad¹⁰⁶. Entre las

¹⁰⁶ Fernández-Mayoralas, A. *Top. Curr. Chem.* **1997**, 186, 1-20.

posibles lipasas comerciales elegimos Novozym 435, empleada por nuestro grupo con éxito en acilaciones sobre sustratos similares^{107,108} en un disolvente polar como dioxano. La reacción transcurrió limpiamente y en condiciones suaves, dando lugar al éster de metacrilato sobre la posición 6 exclusivamente (compuesto MetGC-22, Figura 5.3), con un 90% de rendimiento.

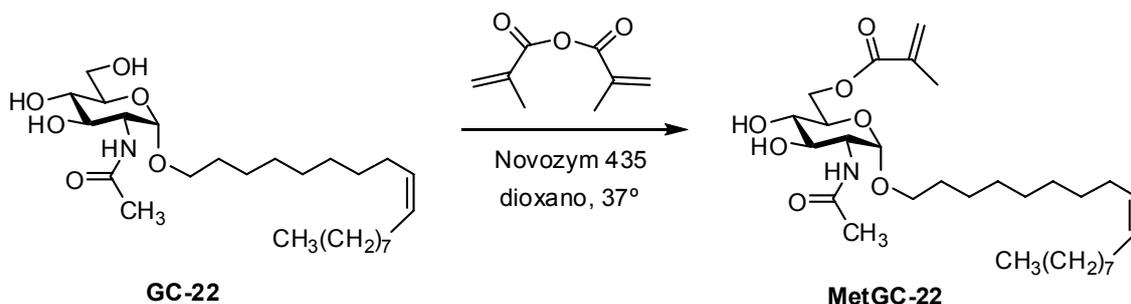


Figura 5.3. Funcionalización de GC-22

La obtención de este monómero permitió la copolimerización con vinilpirrolidona, de forma que se han obtenido los sistemas poliméricos descritos en la Figura 5.4.

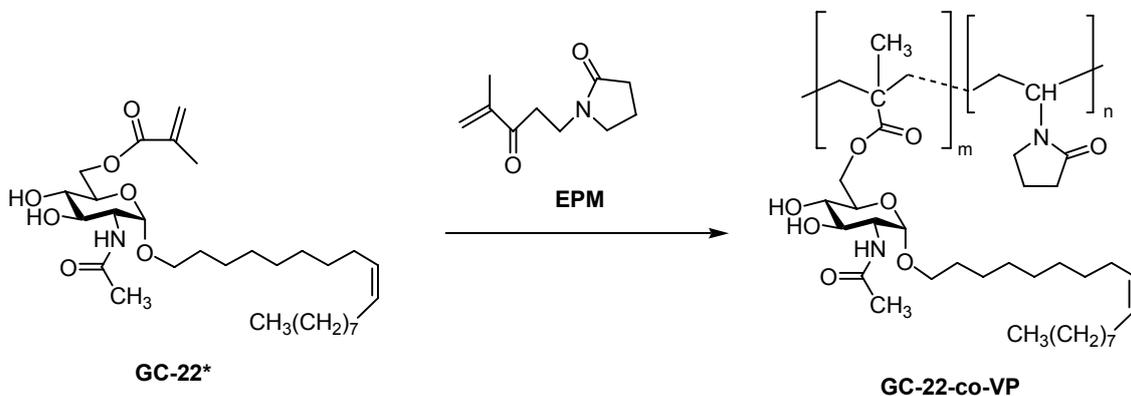


Figura 5.4. Copolímeros derivados de GC-22 y vinilpirrolidona.

¹⁰⁷ de Torres, C.; Fernández-Mayoralas, A. *Tetrahedr. Lett.* **2003**, 44, 2383-2385.

¹⁰⁸ de Torres, C.; Fernández-Mayoralas, A. *Lett. Org. Chem.* **2004**, 1, 173-175.

En un futuro inmediato se estudiará la liberación de GC-22 en diferentes medios, entre ellos se incubarán los copolímeros en presencia de esterasas. De este modo se probará la susceptibilidad a la hidrólisis catalizada por esta clase de enzimas, abundantes en tejido cerebral, del grupo funcional éster que une el glicósido a la cadena polimérica.

CONCLUSIONES

- Se han sintetizado nuevos glicósidos derivados de glucosamina que han sido evaluados como inhibidores del crecimiento de gliomas y melanomas. Los compuestos presentan cadenas hidrocarbonadas de diferente longitud, con o sin un grupo aromático, en posiciones 1 y 2 de la glucosamina. Adicionalmente pueden presentar un grupo alquilo hidroxilado en posición 6 y un grupo sulfato en posiciones 3 ó 6.
- Se ha obtenido información sobre la relación estructura-actividad antitumoral de los glicósidos sintéticos. Cabe destacar que la actividad antimitótica está asociada a la presencia de un grupo oleilo o una cadena alquílica larga en posición C-1 del anillo de glucosamina. Uno de los glicósidos (IG-20) fue capaz de inhibir la división de células de melanoma humano con una ID_{50} por debajo de micromolar. La presencia de un grupo fenilo, por el contrario, dio lugar a una pérdida de la actividad antimitótica.
- Se ha llevado a cabo el estudio del mecanismo de inhibición de los glicósidos antitumorales más activos bajo la hipótesis inicial de que actuaran alterando el metabolismo de gangliósidos. Los resultados mostraron que el glicósido GC-22 reduce ligeramente la producción total de gangliósidos en melanoma y glioma, y conduce a una acumulación de ceramida de forma moderada. Posteriormente, se llevó a cabo el estudio de los metabolitos de células de glioma tratadas con inhibidores, utilizando la técnica de 1H MAS RMN. Los resultados revelaron que GC-22 reduce la concentración de derivados de coenzima A asociados a la síntesis de ácidos grasos y lípidos. También se observó un aumento de la concentración de metabolitos derivados de colina. Los resultados obtenidos sugieren una posible inducción de apoptosis por GC-22.

- Se ha llevado a cabo el clonaje de una glicosiltransferasa específica de la ruta de biosíntesis de gangliósidos, la enzima lactosilceramida sintasa, de *Mus musculus* en *E. coli*, aunque no se logró obtener la proteína en su forma soluble.
- Se ha funcionalizado GC-22 con un grupo metacrilato en posición 6 utilizando una reacción enzimática, lo que ha permitido la preparación de copolímeros hidrosolubles utilizables para la liberación controlada del inhibidor en experimentos *in vivo*.

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y MÉTODOS

TÉCNICAS Y APARATOS

Procedimientos cromatográficos

El seguimiento de las reacciones se ha realizado por cromatografía en capa fina (t.l.c.) utilizando placas de gel de sílice tipo 60 F₂₅₄ de 0.2 mm de espesor (Merk). El análisis de las placas se ha llevado a cabo en una lámpara de UV de 254/365 nm y por revelado con molibdato amónico-Ce(SO₄)₂·H₂O, (50 g de molibdato amónico, 1 g de sulfato cérico (IV), 50 mL de H₂SO₄ concentrado y H₂O hasta 1 L), con H₂SO₄ concentrado en etanol al 5% y con permanganato en agua.

En la mayoría de las reacciones la separación y purificación de los productos obtenidos se ha llevado a cabo mediante cromatografía flash en columna de gel de sílice con un tamaño de partícula de 230-400 mesh (Merk). Los eluyentes empleados se indican en cada caso y las proporciones indican la relación volumen: volumen.

Cromatografía de líquidos (HPLC)

Se ha utilizado un cromatógrafo de líquidos Jasco Pu-2089 Plus, con un detector de ultravioleta Jasco UV-2075 Plus.

Poderes rotatorios ópticos

Los poderes rotatorios ópticos se han determinado en un polarímetro Perkin-Elmer 241 MC, en células de cuarzo de 1 dm, utilizando luz amarilla de sodio, a la temperatura de 20 °C y en los disolventes y concentraciones (g/ 100 mL) indicados en cada caso.

Técnicas espectroscópicas

a) Espectroscopía de ^1H -RMN

Todos los espectros de Resonancia Magnética nuclear (RMN) se han realizado en los espectrómetros Varian de los modelos Gemini-200 (200 MHz), Inova-300 (300 MHz), Inova-400 (400 MHz) y Unity-500 (500 MHz) y en Bruker-300 (300 MHz). En cada caso, junto al disolvente deuterado y la temperatura a la que se ha realizado el espectro, está indicada la frecuencia en la que se ha registrado el mismo. También se indican los desplazamientos químicos en la escala δ (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete; q, quintuplete; m, multiplete), el número de protones (deducidos por integración), el valor de las constantes de acoplamiento J (Hz) y la asignación estructural.

b) Espectroscopía de ^{13}C -RMN

Todos los espectros de Resonancia Magnética nuclear (RMN) se han realizado en los espectrómetros Varian de los modelos Gemini-200 (50 MHz), Inova-300 (75 MHz) e Inova-400 (100 MHz). En cada caso se indican los desplazamientos químicos de las señales en la escala de δ (ppm) y la asignación estructural.

c) Espectroscopía de RMN bidimensional

Los experimentos COSY, HSQC, HMBC y NOESY se han realizado en los espectrómetros Varian de los modelos Inova-300 e Inova-400, empleando la secuencia de pulsos estándar.

d) Espectroscopía infrarroja (IR)

Se utilizó un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum One de rango $240\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$. Se empleó la técnica de dispersión en KBr y formación de pastillas a presión reducida.

e) Espectroscopia de masas (EM)

El equipo utilizado fue un espectrómetro de masas de baja resolución VG 12-1250 mediante inyección directa de la muestra, usando la técnica de impacto electrónico con una energía de 70 eV y mediante Ionización por Electrospray (IES-EM) en un equipo Hewlett Packard – 110 MSD). Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa/carga (m/z).

Análisis elementales

Han sido realizados con un analizador Heraeus CHN-O Rapid, y se expresan en tanto por ciento.

Disolventes

Todos los disolventes anhidros se han preparado mediante técnicas habituales de secado¹⁰⁹ según se indica a continuación:

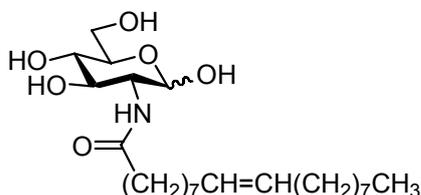
Tetrahidrofurano y tolueno se destilan sobre Na y benzofenona bajo atmósfera de argon, inmediatamente antes de su utilización.

Diclorometano y acetonitrilo se destilan sobre CaH_2 bajo atmósfera de argon inmediatamente antes de su utilización.

¹⁰⁹ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R. En *Purification of Laboratory Chemicals*. Ed. Pergamon Press, 2nd Edition, Nueva York: **1980**.

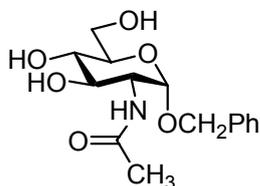
SÍNTESIS DE GLICÓSIDOS

2-Amino-2-desoxi-2-*N*-oleoil- α,β -D-glucopiranososa (4).



Hidrocloruro de D-(+)-glucosamina (10 g, 0.05 mol) se trató con una disolución de NaOH 1N (50 mL) y se añadió, agitando suavemente entre -10 y -15 °C, cloruro de oleilo (85%) (23 mL, 0.06 mol) y disolución NaOH 1N (51 mL) alternativamente, en pequeñas porciones. La mezcla se agitó durante 2 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla se filtró, lavando el precipitado con etanol y éter etílico. El sólido se purificó por cristalización de etanol (2 veces) obteniéndose **4** como un sólido (15.4 g, 70%). P.F.: 159-161 °C. ^1H RMN (300 MHz, DMSO): δ 7.63 (d, <1H, J = 8.1 Hz), 7.48 (d, <1H, J = 7.8 Hz), 6.44 (d, <1H, J = 6.6 Hz), 6.37 (d, <1H, J = 4.6 Hz), 5.4-5.3 (m, 2H), 4.53 (dd, 1H, J = 5.4 Hz, J = 6.6 Hz), 4.41 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 3.7-3.2 (m, 4H), 3.1-3.0 (m, 1H), 2.1-1.9 (m, 7H), 1.5-1.4 (m, 2H), 1.3-1.1 (m, 20H), 0.84 (t, 3H, J = 6.3 Hz). ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 130.37, 130.33, 130.29, 91.32, 72.72, 71.90, 71.17, 61.88, 54.93, 39.36, 35.98, 31.95, 29.86, 29.78, 29.51, 29.46, 29.35, 29.35, 29.27, 29.16, 27.33, 27.26, 25.99, 22.76, 14.61. EM (ES) m/z (calcd 443.3): 444.4 (M+1).

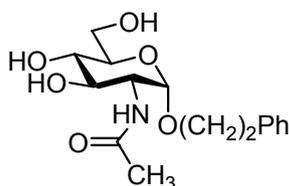
Bencil 2-*N*-acetil-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiránosido (5).



Una mezcla de *N*-acetil-glucosamina (752 mg, 3.39 mmol) y alcohol bencílico (2,80 mL, 27,04 mmol), se calentó bajo atmósfera de argón a 130 °C. A continuación se adicionó BF_3OEt_2 (75 μL) y la mezcla se agitó durante 40 minutos. La reacción evolucionó hasta la formación de un producto mayoritario. La mezcla se enfrió y se eluyó directamente a través de una columna de gel de sílice (diclorometano-metanol 10:0→10:1) obteniéndose **5** como un sólido

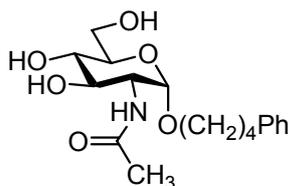
blanco (402 mg, 38%). $[\alpha]_D$: +203° (c 1.12, MeOH). ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 7.4-7.3 (m, 5H, Ar), 5.44 (d, 1H, $J=2.4$ Hz, H-1 α), 4.8-4.7 (m, 2H, CH_2Ph), 4.70 (dd, 1H, $J_{6a,5}=2.2$ Hz, $J_{6a,6b}=12.2$ Hz, H-6a), 4.45 (dd, 1H, $J_{6b,5}=2.4$ Hz, $J_{6b,6a}=12.2$ Hz, H-6b), 3.9-3.8 (m, 2H, H-2 y H-3), 3.7-3.6 (m, 3H, H-5), 3.4-3.3 (m, 1H, H-4), 1.90 (s, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 172.45 (CO), 137.85 (C_{ipso}), 128.24 (Ar), 128.09 (Ar), 127.69 (Ar), 96.40 (C-1), 72.91 (C-5), 71.55 (C-4), 71.26 (C-3), 69.02 (CH_2Ph), 61.58 (C-6), 54.26 (C-2), 21.43 (COCH_3). EM (ES) m/z (calcd 311.2): 312.2 (M+1), 313.2 (M+2). Anal. Calcd para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_6$: C 57.87, H 6.80, N 4.50. Encontrado: C 57.79, H 6.70, N 4.35.

Feniletil 2-*N*-acetil-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (6).



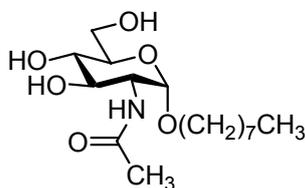
Una mezcla de *N*-acetil-glucosamina (500 mg, 2,26 mmol) y 2-fenil-etanol (1,35 g, 22,60 mmol), se calentó bajo atmósfera de argón a 165 °C. A continuación se adicionó BF_3OEt_2 (50 mL) y la mezcla se agitó a esta temperatura durante 5 minutos. La reacción evolucionó hasta un producto mayoritario. La mezcla de reacción se enfrió y se purificó mediante una columna de gel de sílice (diclorometano-MeOH 10:1) (360 mg, 49%). ^1H RMN (200 MHz, CD_3OD): δ 7.3-7.2 (m, 5H, Ar), 4.74 (d, 1H, $J=3.7$ Hz, H-1 α), 3.9-3.5 (m, 6H, H-6a, H-6b, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, H-2, H-3), 3.4-3.3 (m, 2H, H-4, H-5), 2.88 (t, 2H, $J=6.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 1.89 (s, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (50 MHz, CD_3OD): δ 172.42 (CO), 139.27 (C_{ipso}), 128.84 (Ar), 128.25 (Ar), 126.10 (Ar), 97.28 (C-1), 72.64 (C-5), 71.73 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 71.09 (C-3), 68.47 (C-4), 61.49 (C-6), 54.30 (C-2), 35.66 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 21.56 (CH_3). MS (ES) m/z (calcd 325.2): 326.3 (M+1), 327.2 (M+2). Anal. Calcd para $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_6$: C 59.06, H 7.13, N 4.31. Encontrado: C 59.21, H 6.98, N 4.24.

Fenilbutil 2-*N*-acetil-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (7).



Una mezcla de *N*-acetil-glucosamina (500 mg, 2,26 mmol) y 4-fenil-1-butanol (1,5 mL, 9,73 mmol) se calentó bajo atmósfera de argón a 150 °C. A continuación se adicionó BF₃OEt₂ (50 μ L) y la mezcla se agitó hasta que el azúcar se disolvió totalmente (10 minutos). Durante este tiempo la reacción evolucionó hasta un producto mayoritario. La mezcla se enfrió y se pasó directamente sobre una columna de sílice (diclorometano-metanol 10:1). Se obtuvo **7** como un sólido blanco (380 mg, 47%). P.F.: 161-162 °C. $[\alpha]_D^{25}$: +135° (c 1.04, MeOH). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7.2-7.1 (m, 5H, Ar), 4.73 (d, 1H, *J*=3.4 Hz, H-1 α), 3.8-3.5 (m, 6H, H-6a, H-6b, OCH₂CH₂CH₂CH₂Ph, H-2, H-3), 3.4-3.3 (m, 2H, H-4, H-5), 2.60 (t, 2H, *J*=7.3 Hz, OCH₂CH₂CH₂CH₂Ph), 1.90 (s, 3H, CH₃), 1.7-1.6 (m, 4H, OCH₂CH₂CH₂CH₂Ph). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 172.48 (CO), 142.49 (C_{ipso}), 128.29 (Ar), 128.18 (Ar), 125.62 (Ar), 97.29 (C-1), 72.60 (C-5), 71.64 (C-4), 71.25 (C-3), 67.59 (OCH₂CH₂CH₂CH₂Ph), 61.60 (C-6), 54.40 (C-2), 35.46 (OCH₂CH₂CH₂CH₂Ph), 28.95 (OCH₂CH₂CH₂CH₂Ph), 28.08 (OCH₂CH₂CH₂CH₂Ph), 21.51 (CH₃). MS (ES) *m/z* (calcd 353.2): 354.2 (M+1), 355.2 (M+2). Anal. Calcd para C₁₈H₂₇NO₆: C 61.17, H 7.70, N 3.96. Encontrado: C 60.97, H 7.90, N 3.85.

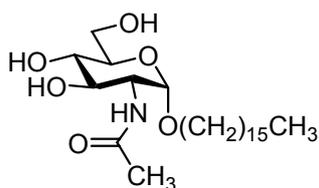
Octil 2-*N*-acetil-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (8).



N-acetil-glucosamina (10,0 g, 45.2 mmol) se disolvió en nitrometano (350 mL) bajo atmósfera de argón. A continuación se añadió octanol (21,3 mL, 135 mmol), se calentó a 100 °C y se adicionó BF₃OEt₂ (0,91 mL, 7.2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 2 horas. Al cabo de este tiempo se enfrió a temperatura ambiente, hasta que se formó un precipitado abundante que se filtró y se purificó por cromatografía en columna de sílice utilizando

como eluyente AcOEt-MeOH (10:1→6:1). Se obtuvo **8** (3.43 g, 40 %) como un sólido blanco. $[\alpha]_D^{25}$: +142° (c 1.05, MeOH). ^1H RMN (200 MHz, CD_3OD): δ 4.74 (d, 1H, $J=3.5$ Hz, H-1 α), 3.9-3.5 (m, 8H, H-2, H-3, H-6a, H-6b, H-5), 3.4-3.3 (m, 5H, H-4, H-3, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 1.94 (s, 3H, COCH_3), 1.6-1.5 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.4-1.3 (m, 12H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 0.87 (t, 3H, $J=6.6$ Hz, $\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$). ^{13}C RMN (50 MHz, CD_3OD): δ 172.42 (CO), 97.27 (C-1), 72.57 (C-5), 71.64 (C-4), 71.24 (C-3), 61.58 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 54.40 (C-6), 48.46 (C-2), 31.85 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 29.37 (), 29.30 (), 29.27 (), 26.13 (), 22.55 (COCH_3), 21.49 ($\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{CH}_3$), 13.29 ($\text{O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$). MS (ES) m/z (calcd 333.2): 334.2 (M+1), 334.2 (M+2). Anal. Calcd para $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{NO}_6$: C 57.64, H 9.37, N 4.20. Encontrado: C 57.55, H 9.08, N 4.21.

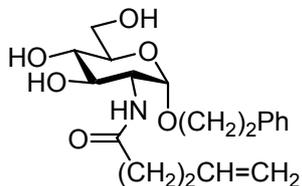
Hexadecanoil 2-*N*-acetil-2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (**9**).



Una mezcla de *N*-acetil-glucosamina (1,00 g, 4,52 mmol) y 1-hexadecanol (5,48 g, 22,60 mmol), se calentó en atmósfera de argón a 160 °C. A continuación se adicionó BF_3OEt_2 (100 mL) y la mezcla se agitó a esta temperatura durante 15 minutos. La reacción evolucionó hasta un producto mayoritario. La mezcla se enfrió, se disolvió en diclorometano (25mL) y se precipitó añadiendo hexano (200 mL). En el sobrenadante quedó la mayor parte del 1-hexadecanol. En el precipitado se obtuvo el producto que se recristalizó disolviéndolo en la mínima cantidad de metanol y añadiendo éter para obtener de **9** (271,9 mg, 14%) como un sólido blanco. P.F.: 159-161 °C. $[\alpha]_D^{25}$: +108° (c 1.01, MeOH). ^1H RMN (200 MHz, CD_3OD): δ 4.86 (d, 1H, $J=3.5$ Hz, H-1 α), 4.0-3.6 (m, 8H, H-2, H-3, H-6a, H-6b, H-5), 3.5-3.4 (m, 3H, H-4, H-3, $\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$), 2.06 (s, 3H, COCH_3), 1.7-1.6 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$), 1.5-1.4 (m, 26H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$), 0.98 (t, 3H, $J=6.2$ Hz, $\text{O}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$). ^{13}C RMN (50 MHz, CD_3OD): δ 173.49 (CO), 98.30 (C-1), 73.57 (C-5), 72.66 (C-4), 72.22 (C-3), 68.84 ($\text{OCH}_2(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$), 62.60 (C-6), 55.41 (C-2), 32.99 (- CH_2 -), 30.72 (- CH_2 -), 30.53 (- CH_2 -), 30.48 (- CH_2 -), 30.40 (- CH_2 -), 27.23 ($\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23.66 (COCH_3), 22.61 ($\text{O}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14.65 ($\text{O}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$). MS (ES) m/z (calcd

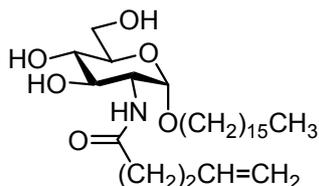
445.3): 446.5 (M+1), 447.5 (M+2). Anal. Calcd para $C_{24}H_{47}NO_6$: C 64.68, H 10.63, N 3.18. Encontrado: C 64.65, H 10.90, N 3.24.

Feniletil 2-amino-2-desoxi-2-N-(pent-4-enoil)- α -D-glucopiranosido (10).



Una mezcla de *N*-pentenoil-glucosamina (7,5 g) y 2-fenil-etanol (20,56 mL), se calentó bajo atmósfera de argón a 100 °C. A continuación se adicionó BF_3OEt_2 (0,75 mL) y la mezcla se agitó a esta temperatura durante 10 minutos. La reacción evolucionó hasta un producto mayoritario. La mezcla de reacción se enfrió a t.a., se lavó con hexano para eliminar el 2-fenil-etanol y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (diclorometano-MeOH 10:1) para obtener **10** (5,50 g, 52 %). $[\alpha]_D$: +131° (c 1.05, MeOH). 1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 7.3-7.1 (m, 5H, Ar), 5.8-5.7 (m, 1H, $CH_2=CHCH_2CH_2CO$), 5.0-4.9 (m, 2H, $CH_2=CHCH_2CH_2CO$), 4.70 (d, 1H, $J=3.4$ Hz, H-1 α), 3.9-3.5 (m, 6H, H-6a, H-6b, H-5, H-4, H-3, H-2), 3.4-3.3 (m, 2H, OCH_2CH_2Ph), 2.9-2.8 (m, 2H, OCH_2CH_2Ph), 2.3-2.1 (m, 4H, $CH_2=CHCH_2CH_2CO$). ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 174.94 (CO), 139.25 (C_{ipso}), 137.19 ($CH_2=CHCH_2CH_2CO$), 128.33 (Ar), 128.27 (Ar), 126.13 (Ar), 114.61 ($CH_2=CHCH_2CH_2CO$), 97.38 (C-1), 72.65 (C-5), 71.69 (C-4), 71.09 (C-3), 68.59 (OCH_2CH_2Ph), 61.46 (C-6), 54.20 (C-2), 35.72 (OCH_2CH_2Ph), 35.10 ($CH_2=CHCH_2CH_2CO$), 29.65 ($CH_2=CHCH_2CH_2CO$). MS (ES) m/z (calcd 365.2): (M+1), (M+2). Anal. Calcd para $C_{19}H_{27}NO_6$: C 62.45, H 7.45, N 3.83. Encontrado: C 62.60, H 7.75, N 3.91.

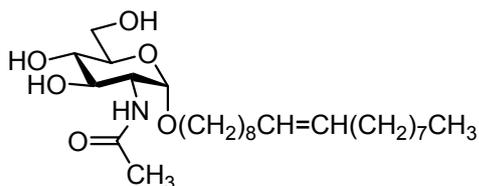
Hexadecanoil 2-amino-2-desoxi-2-N-(pent-4-enoil)- α -D-glucopiranosido (11).



N-pentenoil-glucosamina (7 g) y hexadecanol (32,47 g) se calentaron bajo atmósfera de argón a 120 °C. A continuación se adicionó BF_3OEt_2 (0,64 mL) y

la mezcla se agitó a esta temperatura durante 30 minutos (en este tiempo el producto de partida se disolvió y la mezcla de reacción adquirió un color negro). La reacción evolucionó hasta un producto mayoritario. La mezcla se dejó enfriar a t.a. y **11** se aisló mediante cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-MeOH, 1:0 → 10:1) y posteriormente se recristalizó de metanol (4,40 g, 34%). P.F.: 160-166 °C. [α]_D: +99° (c 1.03, MeOH). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 6.0-5.8 (m, 1H, CH₂=CHCH₂CH₂CO), 5.1-4.8 (m, 2H, CH₂=CHCH₂CH₂CO), 4.79 (d, 1H, J=3.9 Hz, H-1α), 3.9-3.6 (m, 4H, H-6a, H-6b, H-3, H-2), 3.4-3.3 (m, 4H, OCH₂(CH₂)₁₄CH₃, H-5, H-4), 2.4-2.3 (m, 4H, CH₂=CHCH₂CH₂CO), 1.7-1.6 (m, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.4-1.3 (m, 26H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 0.92 (t, 3H, J=5.9 Hz, O(CH₂)₁₅CH₃). MS (ES) m/z (calcd 485.3): 486.3 (M+1). Anal. Calcd para C₂₇H₅₁NO₆: C 66.77, H 10.58, N 2.88. Encontrado: C 66.57, H 10.48, N 2.70.

Oleil 2-amino-2-N-acetil-2-desoxi-α-D-glucopiranosido (**12**).



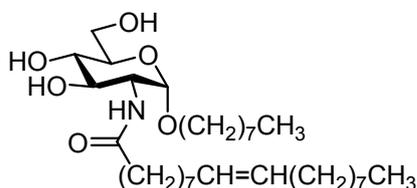
Una mezcla de *N*-acetil-glucosamina (1 g, 4.52 mmol) y alcohol oleico (85%) (6 mL) se calentó bajo atmósfera de argón a 100 °C. A continuación se adicionó BF₃OEt₂ (100 μL) y la mezcla se agitó durante 2 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el producto se aisló mediante una columna de gel de sílice (AcOEt-MeOH 10:0→10:1), obteniéndose **12** puro (200 mg, 10%). [α]_D: +103.1° (c 0.95, MeOH). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 5.4-5.3 (m, 2H, O(CH₂)₈CH=CH(CH₂)₇CH₃), 4.74 (d, 1H, J=3.5 Hz, H-1), 3.9-3.8 (m, 2H, H-2, H-6a), 3.7-3.5 (m, 4H, OCH₂, H-6b, H-3, H-5), 3.4-3.3 (m, 2H, OCH₂, H-4), 2.0-1.9 (m, 4H, O(CH₂)₇CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃), 1.94 (s, 3H, COCH₃), 1.6-1.5 (m, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₆CH=CH(CH₂)₇CH₃), 1.3-1.2 (m, 22H, OCH₂CH₂(CH₂)₅CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃), 0.86 (t, 3H, J=7.2 Hz, CH₂CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 172.41 (CO), 129.70 (CH=CH), 129.66 (CH=CH), 97.29 (C-1), 72.55 (C-5), 71.65 (C-3), 71.22 (C-4), 67.79 (OCH₂), 61.56 (C-6), 54.39 (C-2), O(CH₂)₇CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃, 32.07, 31.92-

28.33, (OCH₂(CH₂)₆CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₄CH₂CH₂CH₃), 27.00 (CH₂CH=CHCH₂), 26.10 (CH₂CH₂CH₃), 23.7 (COCH₃), 13.33 (CH₂CH₃). MS (ES) m/z (calcd 471.4): 472.4 (M+1), 473.4 (M+2). Anal. Calcd para C₂₆H₄₉NO₆: C 66.21, H 10.47, N 2.97. Encontrado: C 65.99, H 10.31, N 2.84.

N-acetil-glucosamina (500 mg, 2.26 mmol) y alcohol oleico (85%) (4.1 mL, 11.3 mmol) se disolvieron en nitrometano (2 mL) bajo atmósfera de argon. A continuación se adicionó H₂SO₄ adsorbido sobre sílice (50 mg) y la mezcla se agitó a 100 °C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el producto se aisló mediante una columna de gel de sílice (AcOEt-MeOH 10:0→10:1), obteniéndose **12** puro (405 mg, 38%).

Preparación de H₂SO₄ adsorbido sobre sílice: a 10 g de sílica gel (200-325 mesh) en éter etílico (50 mL) se añadió H₂SO₄ conc. (3 mL) lentamente y con agitación. Se eliminó el disolvente a presión reducida y la sílice se secó durante 3 horas a 60 °C a una presión de 2-4 mbar.

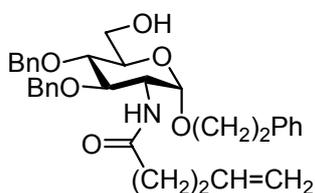
Octil 2-amino-2-desoxi-2-*N*-(oleoil)- α -D-glucopiranosido (**13**).



Una mezcla de **12** (500 mg, 1.13 mmol) y octanol (0.89 mL, 5.63 mmol) se calentó a 110 °C bajo atmósfera de argon, y se añadió BF₃OEt₂ (30 μ L, 0.23 mmol). Se agitó a esta temperatura durante 5 minutos y a continuación se dejó enfriar a t.a. La mezcla se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt-MeOH, 1:0→10:1), obteniéndose **13** (308 mg, 50%). $[\alpha]_D^{25}$: +85.1° (c 1.37, MeOH). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 5.4-5.3 (m, 2H, CH=CH), 4.78 (d, 1H, *J*=3.4 Hz, H-1 α), 3.9-3.5 (m, 5H, H-6a, H-6b, H-2, H-3, H-5), 3.4-3.3 (m, 3H, H-4, OCH₂), 2.3-2.2 (m, 2H, COCH₂), 2.1-2.0 (m, 4H, CH₂CH=CHCH₂), 1.7-1.5 (m, 4H, COCH₂CH₂, OCH₂CH₂), 1.3-1.2 (m, 30H, -CH₂-, OCH₂CH₂(CH₂)₅CH₃), 0.9-0.8 (m, 6H, 2 x CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 178.61 (CO), 130.90 (CH=CH), 130.81 (CH=CH), 98.44 (C-1), 73.78 (C-5), 72.70 (C-4), 72.47 (C-3), 69.02 (OCH₂), 62.78 (C-6), 55.53 (C-2), 37.10

(COCH₂), 33.11 (CH₂CH=CHCH₂), 33.10 (CH₂CH=CHCH₂), 30.92 (-CH₂-), 30.88 (-CH₂-), 30.83 (-CH₂-), 30.67 (-CH₂-), 30.54 (-CH₂-), 30.50 (-CH₂-), 30.47 (-CH₂-), 30.39 (-CH₂-), 30.36 (-CH₂-), 30.29 (-CH₂-), 28.23 (-CH₂-), 28.20 (-CH₂-), 27.43 (OCH₂CH₂), 27.16 (COCH₂CH₂), 23.79 (CH₂CH₃), 23.70 (CH₂CH₃), 14.52 (CH₃), 14.50 (CH₃). MS (ES) m/z (calcd 555.4): 556.5 (M+1). Anal. Calcd para C₃₂H₆₁NO₆: C 69.15, H 11.06, N 2.52. Encontrado: C 69.06, H 11.31, N 2.80.

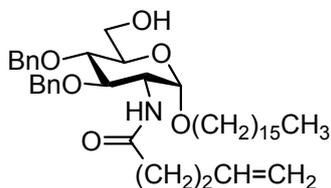
Feniletil 2-amino-3,4-di-O-benzil-2-desoxi-2-N-(pent-4-enoil)-α-D-glucopiranosido (14).



Una solución de **10** (1.20 g, 3.31 mmol) en piridina (7.5 mL) se calentó a 75 °C bajo atmósfera de argón, y se añadió cloruro de trifenilmetilo (2.77 g, 9.93 mmol). Se agitó a esta temperatura durante 30 minutos y a continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró. La mezcla se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt-MeOH, 1:0→10:1), obteniéndose un residuo (2 g) que se disolvió en THF anhidro (18 mL) y se enfrió a 0 °C. A continuación se añadió NaH (253 mg, 10.56 mmol) bajo atmósfera de argón y se agitó durante 15 min, hasta que se llegó a t.a. Cuando cesó la emisión de H₂, se añadió yoduro de tetrabutilamonio (0.60 g, 1.62 mmol) y bromuro de bencilo (0.87 mL, 6.92 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 2 h, y se dejó enfriar a t.a. Se añadió MeOH (0.5 mL) para eliminar el exceso de NaH. A continuación, se adicionó CH₂Cl₂ (100 mL) y se lavó con H₂O (40 mL x 3). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró obteniéndose un residuo marrón que se disolvió en una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (1:2, 40 mL) y se trató con ácido *p*-toluensulfónico (160 mg, 0.84 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 3 h, se neutralizó con trietilamina y se eliminó el disolvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt-hexano, 1:1), obteniéndose **14** (64% las tres etapas). como un sólido blanco después de cristalización de AcOEt (mínima cantidad) y hexano. [α]_D: +73.1° (c 1.00, MeOH). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ

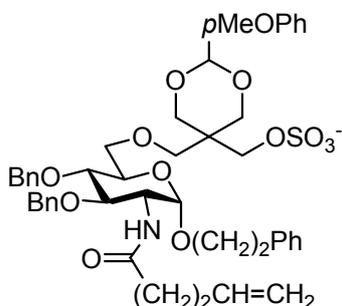
7.6-7.2 (m, 15H, Ar), 5.8-5.7 (m, 1H, CH₂=CH), 4.8-4.6 (m, 2H, CH₂=CH), 5.0-4.9 (m, 5H, H-1, 2 x CH₂Ph), 4.10 (dd, 1H, *J*=10.5 Hz, *J*=3.9 Hz, H-6a), 3.9-3.5 (m, 6H, H-6b, H-5, H-3, H-2, OCH₂), 3.5-3.4 (m, 1H, H-4), 2.92 (t, 2H, *J*=6.3 Hz, CH₂Ph), 2.3-2.2 (m, 4H, CH₂=CHCH₂CH₂CO). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 175.32 (CO), 140.45, 140.09, 139.81 (3 x C_{ipso}), 138.27 (CH=CH₂), 130.1-127.4 (Ar), 115.83 (CH=CH₂), 98.67 (C-1), 81.47 (C-4), 79.57 (C-3), 75.82 (CH₂Ph), 75.75 (CH₂Ph), 73.16 (C-5), 69.66 (OCH₂), 62.02 (C-6), 54.60 (C-2), 36.88 (OCH₂CH₂Ph), 36.35 (COCH₂), 30.79 (COCH₂CH₂=CHCH₂).

Hexadecanoil 2-amino-3,4-di-O-bencil-2-desoxi-2-N-(pent-4-enoil)-α-D-glucopiranosido (15).



Se hizo reaccionar **11** en condiciones similares a las descritas para **10**, para obtener **15** (73%). [α]_D: +49.9° (c 1.00, MeOH). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7.4-7.3 (m, 10H, Ar), 5.8-5.7 (m, 1H, CH₂=CH), 5.4-5.3 (m, 2H, CH₂=CH), 5.1-4.7 (m, 5H, H-1α, H-6a, H-6b, H-3, H-2), 3.8-3.6 (m, 8H,), 2.4-2.1 (m, 4H, CH₂=CHCH₂CH₂CO), 1.6-1.5 (m, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 1.3-1.2 (m, 26H, OCH₂CH₂(CH₂)₁₃CH₃), 0.9-0.8 (t, 3H, *J*= 6.1 Hz, O(CH₂)₁₅CH₃).

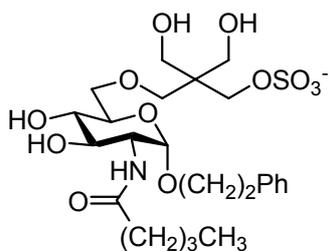
Feniletil 2-amino-3,4-di-O-bencil-2-desoxi-6-O-[2,2-(O, O'-p-metoxibenciliden)-bis(hidroximetil)-3-hidroxi-3-O-(oxo-sulfonil)propil]-2-N-(pent-4-enoil)-α-D-glucopiranosido (17).



Se disolvió **14** (850 mg, 1.56 mmol) en una mezcla de THF (34 mL) y DMF (3 mL) y se añadió NaH (77 mg, 3.21 mmol) bajo Ar, agitando durante 10 min. Cuando cesó la emisión de H₂, se añadió el sulfato cíclico **16** (761 mg, 2.41

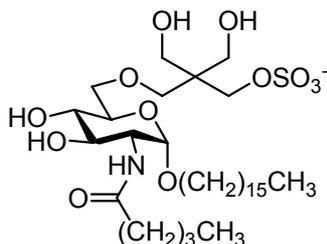
mmol). La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 80 min, después se dejó enfriar a t.a. Se añadió metanol (0.5 mL) para eliminar el exceso de NaH y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt-MeOH, 1:0→10:1) para dar **17** (1.31, 95%). $[\alpha]_D$: +61.34° (c 1.00, MeOH). ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 7.88 (s, 1H, NH), 7.3-7.2 (m, 15H, Ar), 7.1-7.0 (m, 2H, Ar), 6.77 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, Ar), 5.8-5.6 (m, 1H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.23 (s, 1H, $\text{CH}-p\text{MeOPh}$), 4.9-4.5 (m, 12 H, OCH_2C , H-1, $\text{CH}_2=\text{CH}$, $2\times\text{CH}_2\text{Ph}$), 4.27 (s, 2H), 4.0-3.9 (m, 2H), 3.8-3.7 (m, 1H), 3.6-3.2 (m, 6H), 2.9-2.8 (m, 3H), 2.7-2.6 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.2-2.1 (m, 4H, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$).

Feniletil 2-amino-2-desoxi-6-O-[2,2-bis(hidroximetil)-3-hidroxi-3-O-(oxo-sulfonil)propil]-2-N-pentanoil- α -D-glucopiranosido (19**).**



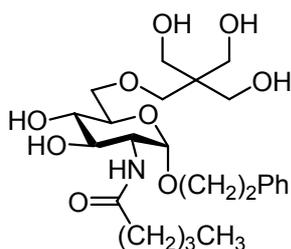
Se disolvió **17** (310 mg, 0.35 mmol) en metanol (14 mL) y se añadió Pd/C al 10% (150 mg). La suspensión se agitó bajo atmósfera de H_2 durante 3 h. Después de este tiempo, la disolución se filtró sobre Celite[®] y se lavó con AcOEt. Se eliminó el disolvente para obtener **19** (180 mg, 87%). $[\alpha]_D$: +77° (c 1.39, MeOH). ^1H RMN (200 MHz, CD_3OD): δ 7.3-7.2 (m, 5H, Ar), 4.74 (d, 1H, $J=3.5$ Hz, H-1), 4.1 (s, 2H, OCH_2C -), 3.9-3.8 (m, 2H), 3.6-3.3 (m, 12H), 2.89 (t, 2H, $J=7.1$ Hz, CH_2Ph), 2.18 (t, 2H, $J=7.9$ Hz, COCH_2), 1.6-1.5 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.4-1.2 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.91 (t, 3H, $J=7.5$ Hz, CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 176.80 (CO), 140.42 (C_{ipso}), 130.00-127.27 (Ar), 98.48 (C-1), 72.81, 72.59, 72.10, 71.68, 71.50, 69.88, 68.15, 62.47, 62.38, 55.13, 46.57 (C-pentaeritritol), 36.83 (CH_2Ph), 36.74 (COCH_2), 29.06 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 23.31 (CH_2CH_3), 14.19 (CH_3). MS (ES) m/z (calcd 587.2): 605.2, 604.2. Anal. Calcd para $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{NNaO}_{12}\text{S}$: C 49.06, H 6.52, N 2.38, S 5.46. Encontrado: C 48.87, H 6.80, N 2.31, S 5.29.

Hexadecanoil 2-amino-2-desoxi-6-O-[3-hidroxi-2,2-bis(hidroximetil)-3-O-(oxo-sulfonil)propil]-2-N-pentanoil- α -D-glucopiranosido (20).



Se hizo reaccionar **15** en las mismas condiciones que las descritas para **14**, y se obtuvo **18** (87%). Se disolvió **18** (550 mg, 0.55 mmol) en una mezcla de metanol-AcOEt, 8:1 (45 mL) y se añadió Pd/C al 10% (230 mg). La suspensión se agitó bajo atmósfera de H₂ durante 3 h. A continuación, se filtró sobre Celite[®] y se lavó con AcOEt. Se eliminó el disolvente y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-MeOH, 5:1) obteniéndose **20** (280 mg, 72%). [α]_D: +78.6° (c 1.03, MeOH). ¹H RMN (200 MHz, CD₃OD): δ 4.77 (d, 1H, *J*=3.5 Hz, H-1), 4.06 (s, 2H, OCH₂C-), 3.90 (dd, 1H, *J*=3.5 Hz, *J*=10.6 Hz, H-2), 3.8-3.4 (m, 11H), 2.26 (t, 2H, *J*=7.5 Hz, COCH₂), 1.7-1.2 (m, 32H, -CH₂-), 1.0-0.8 (m, 6H, 2 x CH₃). MS (ES) *m/z* (calcd 707.3): 724.3, 725.3. Anal. Calcd para C₃₂H₆₂NNaO₁₂S: C 54.29, H 8.83, N 1.98, S 4.53. Encontrado: C 54.50, H 8.79, N 2.04, S 4.60.

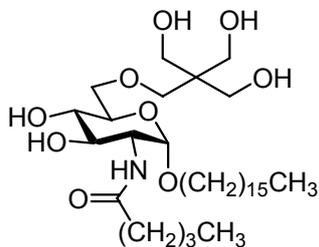
Feniletil 2-N-pentanoil-2-amino-2-desoxi-6-O-(2,2-bis(hidroximetil)-3-hidroxipropil)- α -D-glucopiranosido (21).



Se disolvió **19** (180 mg, 0.31 mmol) en una mezcla de dioxano-metanol (3:1, 12 mL) y se añadió una disolución de H₂SO₄ 1M (30 μ L). La mezcla de reacción se agitó 7 h y a continuación se neutralizó adicionando una disolución saturada de NaHCO₃. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-metanol, 5:1) obteniéndose **21** (95 mg, 66%). [α]_D: +89° (c 0.82, MeOH). ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 7.2-7.1 (m, 5H, Ar), 4.74 (d, 1H, *J*= 3.5 Hz, H-1), 3.8-3.2 (m, 16H), 2.8-2.7 (t, 2H, *J*=5.9

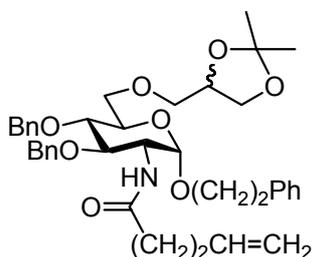
Hz, CH₂Ph), 2.1-2.0 (t, 2H, $J=7.7$ Hz, COCH₂), 1.4-1.3 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 1.2-1.0 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.72 (t, 3H, $J=7.1$ Hz, CH₃). ¹³C RMN (50 MHz, CD₃OD): δ 176.65 (CO), 140.42 (C_{ipso}), 130.05 (2xAr), 129.47 (2xAr), 127.34 (Ar), 98.58 (C-1), 72.66 (2C), 72.40, 72.34, 71.90, 69.96, 63.20 (2C), 55.35, 46.99 (C-pentaeritritol), 36.94 (CH₂Ph), 36.77 (COCH₂), 29.12 (CH₂CH₂CH₃), 23.38 (CH₂CH₃), 14.24 (CH₃). MS (ES) m/z (calcd 485.3): 486.3 (M+1). Anal. Calcd para C₂₄H₃₉NO₉: C 59.36, H 8.10, N 2.88. Encontrado: C 59.51, H 8.23, N 3.01.

Hexadecanoil 2-amino-2-desoxi-2-N-pentanoil-6-O-(2,2-bis(hidroximetil)-3-hidroxipropil)-α-D-glucopiranosido (22).



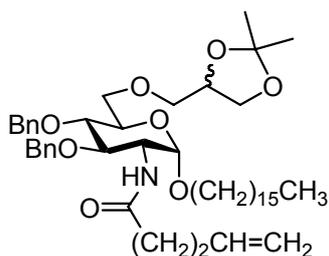
Se disolvió **20** (147 mg, 0.21 mmol) en una mezcla de dioxano-metanol (1:1, 4 mL) y se añadió una disolución de H₂SO₄ 1M (30 μL). La mezcla de reacción se agitó 20 h y a continuación se neutralizó adicionando una disolución saturada de NaHCO₃. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂.metanol, 10:1→5:1) obteniéndose **22** (126 mg, 100%). [α]_D: +108° (c 1.01, MeOH). ¹H RMN (200 MHz, CD₃OD): δ 4.77 (d, 1H, $J=3.5$ Hz, H-1), 3.86 (dd, 1H, $J=3.5$ Hz, $J=10.6$ Hz, H-2), 3.8-3.3 (m, 13H), 2.24 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, COCH₂), 1.7-1.2 (m, 32H, -CH₂-), 1.1-0.9 (m, 6H, 2xCH₃). MS (ES) m/z (calcd 605.5): 606.3 (M+1), 607.5 (M+2). Anal. Calcd para C₃₂H₆₃NO₉: C 63.44, H 10.48, N 2.31. Encontrado: C 63.70, H 10.52, N 2.34.

Feniletil 2-amino-3,4-di-O-bencil-2-desoxi-6-O-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-(*R/S*)-ilmetil)-2-*N*-(pent-4-enoil)- α -D-glucopiranosido ((*R/S*)-23).



Una disolución de **14** (100 mg, 0.18 mmol) en DMF anhidra (1.53 mL) se trató con NaH (18 mg, 0.75 mmol) bajo Ar, y se agitó 10 min. Cuando cesó la producción de H₂, se añadió (*R/S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ilmetil *p*-toluensulfonato (761 mg, 2.41 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 80 min, y después se dejó enfriar a t.a. Se adicionó metanol (0.5 mL) para neutralizar el exceso de NaH. Se eliminó el disolvente y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt-metanol, 2:1) obteniéndose (***R/S***-23 (85 mg, 70%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.4-7.2 (m, 13H, Ar), 7.2-7.1 (m, 2H, Ar), 5.8-5.7 (m, 1H, CH=CH₂), 5.0-4.6 (m, 7H, CH=CH₂, H-1, 2 x CH₂Ph), 4.4-3.9 (m, 3H), 3.8-3.4 (m, 10H), 2.9-2.8 (m, 2H, OCH₂CH₂Ph), 2.2-1.9 (m, 4H, COCH₂CH₂), 1.58 (s, 6H, 2 x CH₃).

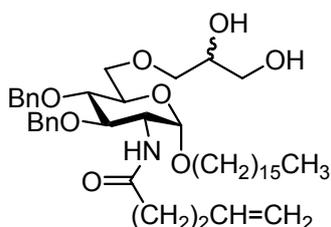
Hexadecanoil 2-amino-3,4-di-O-bencil-2-desoxi-6-O-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-(*R/S*)-ilmetil)-2-*N*-(pent-4-enoil)- α -D-glucopiranosido ((*R/S*)-24).



A una solución de **15** (1 g, 1.50 mmol) en DMF anhidra (12 mL) se añadió NaH (200 mg, 8.33 mmol), agitando bajo Ar durante 10 min. Cuando cesó la emisión de H₂, se añadió (*R/S*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-ilmetil *p*-tolueesulfonato (1.3 g, 4.54 mmol). La mezcla de reacción se agitó 90 °C durante 30 min y después se enfrió a t.a. Se adicionó metanol (0.5 mL) para neutralizar el exceso de NaH. Se eliminó el disolvente y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt, 3:2) obteniéndose (**S**)-24 (160 mg), (**R**)-24 (150 mg) y

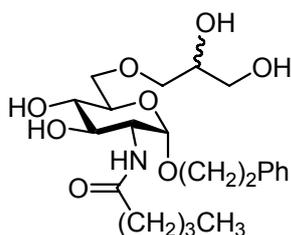
(R/S)-24 (260 mg). ^1H RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 7.3-7.1 (m, 10H, Ar), 5.8-5.7 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.4-4.5 (m, 8H, $\text{CH}=\text{CH}_2$, H-1, 2 x CH_2Ph), 3.5-3.3 (m, 12H), 2.3-2.1 (m, 4H), 1.6-0.9 (m, 37H, $-\text{CH}_2-$, CH_3).

Hexadecanoil 2-amino-3,4-di-O-bencil-2-desoxi-6-O-(2-(R/S),3-dihidroxiopropil)-2-N-(pent-4-enoil)- α -D-glucopiranosido ((R/S)-26).



A una disolución de **(R/S)-24** (520 mg, 0.67 mmol) en metanol (5 mL) se añadió ácido trifluoroacético (7.4 μL , 0.1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a t.a. Después de este tiempo se eliminó el disolvente y el residuo (580 mg) se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt, 1:1 \rightarrow 0:1) para dar **(R/S)-26** (389 mg, 79%). ^1H RMN (200 MHz, CD_3OD): δ 7.5-7.3 (m, 10H, Ar), 5.9-5.8 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5.2-4.7 (m, 9H, $\text{CH}=\text{CH}_2$, H-1, 2 x CH_2Ph), 4.3-4.2 (m, 1H), 3.9-3.4 (m, 10H), 2.5-2.3 (m, 4H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 1.7-1.3 (m, 28H, $-\text{CH}_2-$ cadenas alifáticas), 0.92 (t, 3H, $J=6.7$ Hz, CH_3).

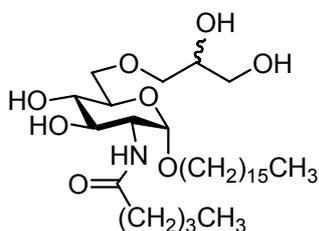
Feniletil 2-amino-2-desoxi-6-O-(2-(R/S),3-dihidroxiopropil)-2-N-pentanoil- α -D-glucopiranosido ((R/S)-27).



Una disolución de **(R/S)-23** (82 mg, 0.12 mmol) en metanol (2 mL) se trató con ácido trifluoroacético (5 μL , 0.07 mmol) y se agitó a t.a. durante 2 h. Pasado este tiempo se eliminó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt, 1:1) (78 mg). A continuación, se disolvió en metanol (10 mL), se añadió Pd/C al 10% (35 mg) y se agitó bajo H_2 durante 3 h. Pasado este tiempo, la disolución se filtró sobre Celite[®] y el filtrado

se concentró para obtener **(R/S)-27** (41 mg, 74%). $[\alpha]_D$: +97.5° (c 1.02, MeOH). ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 7.4-7.1 (m, 5H, Ar), 4.77 (d, 1H, $J=3.8$ Hz, H-1), 3.9-3.3 (m, 13H), 2.89 (t, 2H, $J=7.0$ Hz, CH_2Ph), 2.17 (t, 2H, $J=8.1$ Hz, COCH_2), 1.6-1.5 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.4-1.3 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.92 (t, 3H, $J=7.9$ Hz, CH_3). MS (ES) m/z (calcd 441.2): 442.3 (M+1), 443.3 (M+2). Anal. Calcd para $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{NO}_8$: C 59.85, H 8.04, N 3.31.

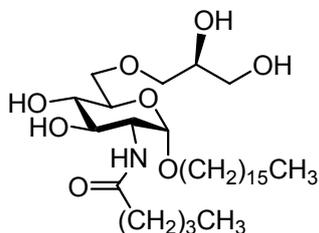
Hexadecanoil 2-amino-2-desoxi-6-O-(2-(R/S),3-dihidroxiopropil)-2-N-pentanoil- α -D-glucopiranosido ((R/S)-28).



Una disolución de **(R/S)-26** (260 mg, 0.33 mmol) en metanol (18 mL) se trató con ácido trifluoroacético (13 μL) y Pd/C al 10% (97 mg). La suspensión se agitó bajo H_2 durante 2.5 h. Pasado este tiempo, la disolución se filtró a través de Celite[®], y el filtrado se concentró obteniéndose **(R/S)-28** (190 mg, 100%) como un sólido blanco. PF: 91-97 °C. $[\alpha]_D$: +82° (c 1, MeOH). ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 4.97 (d, 1H, $J=3.7$ Hz, H-1), 4.05 (dd, 1H, $J=11.0$ Hz, $J=3.5$ Hz, H-2), 4.0-3.8 (m, 6H), 3.8-3.5 (m, 6H), 2.44 (t, 2H, $J=6.2$ Hz, COCH_2), 1.8-1.7 (m, 4H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.6-1.4 (m, 28H, $-\text{CH}_2$ -cadena alifática), 1.2-1.0 (m, 6H, 2 x CH_3). MS (ES) m/z (calcd 561.4): 562.3 (M+1), 563.3 (M+2). Anal. Calcd para $\text{C}_{30}\text{H}_{59}\text{NO}_8$: C 64.14, H 10.59, N 2.49. Encontrado: C 64.31, H 10.78, N 2.62.

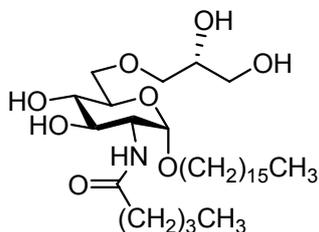
Los compuestos **(R)-28** y **(S)-28** se prepararon a partir de **(R)-26** y **(S)-26** respectivamente, siguiendo el mismo procedimiento que el descrito arriba para la obtención de **(R/S)-28** a partir de **(R/S)-26**.

(S)-Hexadecanoil 2-amino-2-desoxi-6-O-(2,3-dihidroxiopropil)-2-N-pentanoil- α -D-glucopiranosido ((S)-28).



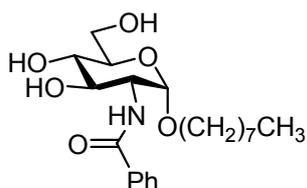
(100%). $[\alpha]_D$: +50° (c 0.93, MeOH). ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 4.97 (d, 1H, $J=3.7$ Hz), 4.05 (dd, 1H, $J=11.0$ Hz, $J=3.5$ Hz), 4.0-3.8 (m, 6H), 3.8-3.5 (m, 6H), 2.44 (t, 2H, $J=6.2$ Hz), 1.8-1.7 (m, 4H), 1.6-1.4 (m, 28H), 1.2-1.0 (m, 6H). MS (ES) m/z (calcd 561.4): 562.3 (M+1), 563.3 (M+2). Anal. Calcd para $\text{C}_{30}\text{H}_{59}\text{NO}_8$: C 64.14, H 10.59, N 2.49. Encontrado: C 64.31, H 10.80, N 2.61.

(R)-Hexadecanoil 2-amino-2-desoxi-6-O-(2,3-dihidroxiopropil)-2-N-pentanoil- α -D-glucopiranosido ((R)-28).



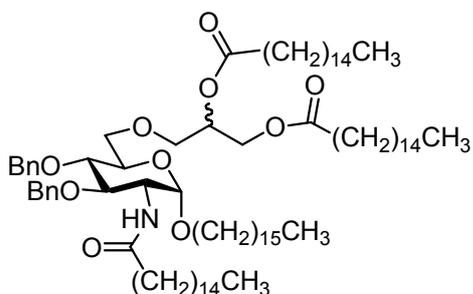
(100%). Mp 91-97 °C. $[\alpha]_D$: +82° (c 1, MeOH). ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 4.97 (d, 1H, $J=3.7$ Hz), 4.05 (dd, 1H, $J=11.0$ Hz, $J=3.5$ Hz), 4.0-3.8 (m, 6H), 3.8-3.5 (m, 6H), 2.44 (t, 2H, $J=6.2$ Hz), 1.8-1.7 (m, 4H), 1.6-1.4 (m, 28H), 1.2-1.0 (m, 6H). MS (ES) m/z (calcd 561.4): 562.3 (M+1), 563.3 (M+2). Anal. Calcd para $\text{C}_{30}\text{H}_{59}\text{NO}_8$: C 64.14, H 10.59, N 2.49. Encontrado: C 64.12, H 10.81, N 2.70.

Octil 2-amino-2-*N*-benzoil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido (29).



Una disolución de **8** (400 g, 1.2 mmol) en H₂O-metanol (1:2, 6 mL) se calentó a 90 °C y se añadió Ba(OH)₂ (568 mg, 1.80 mmol). La mezcla se agitó a 90 °C durante 37 h. Pasado este tiempo se dejó enfriar a t.a. y se neutralizó burbujando CO₂ hasta pH 7. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró para dar un crudo amarillo (750 mg), que se disolvió en metanol (9 mL) y se trató con trietilamina (166 μ L, 1.2 mmol) y anhídrido benzoico (299 mg, 1.32 mmol) agitando a t.a. durante 3 h. Se eliminó el disolvente, se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-metanol, 6:1) y se cristalizó de metanol para dar **29** (211 mg, 45% los dos pasos). $[\alpha]_D$: +116° (c 1.09, MeOH). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7.9-7.8 (m, 2H, Ar), 7.5-7.4 (m, 3H, Ar), 4.95 (d, 1H, *J*=3.4 Hz, H-1), 4.1-3.6 (m, 6H, H-2, H-3, H-4, H-5, H6a, H6b), 3.5-3.4 (m, 2H, OCH₂), 1.6-1.5 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.4-1.1 (m, 10 H, OCH₂CH₂(CH₂)₅CH₃), 0.86 (t, 3H, *J*=7.1 Hz, CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 170.12 (CO), 133.92 (C_{ipso}), 130.7-129.4 (Ar), 98.33 (C-1), 73.78 (C-5), 72.61 (C-3), 72.42 (C-4), 68.93 (OCH₂), 62.77 (C-6), 58.28 (C-2), 32.92-27.31 (-CH₂-), 23.7 (CH₂CH₃), 14.42 (CH₃). MS (ES) *m/z* (calcd 395.2): 396.3 (M+1), 397.2 (M+2). Anal. Calcd para C₂₁H₅₃NO₆: C 63.78, H 8.41, N 3.54. Encontrado: C 63.55, H 8.32, N 3.80.

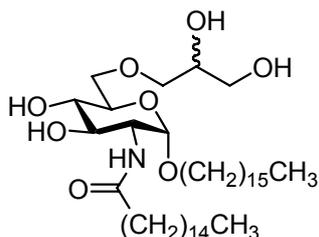
Hexadecanoil 2-amino-3,4-di-*O*-bencil-2-desoxi-2-*N*-(hexadecanoil)-6-*O*-(2-*R/S*),3-dihexadecanoilpropil)- α -D-glucopiranosido ((*R/S*)-31).



Se trató una disolución de (*R/S*)-**26** (389 mg, 0.52 mmol) en H₂O-THF (1:1, 3.6 mL) con I₂ (532 mg, 2.10 mmol), agitando a t.a. durante 15 min. Pasado este

tiempo se añadió tiosulfato sódico (774 mg, 3.12 mmol) y la mezcla se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt-metanol, 1:3:0→0:1:0→0:10:1) (202 mg), se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro (3 mL) y se añadió piridina anhidra (25 µL, 0.30 mmol) y cloruro de palmitoilo (190 µL, 0.60 mmol). La mezcla se agitó bajo Ar durante 1.5 h. A continuación, se evaporó el disolvente y el residuo (360 mg) se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexane-AcOEt 2:1) para dar **(R/S)-31** (193 mg, 30%). ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7.4-7.3 (m, 10H, Ar), 5.85 (d, 1H, *J*= 8.8 Hz), 5.30 (s, 4H, 2 x CH₂Ph), 4.77 (d, 1H, *J*=4.3 Hz, H-1), 4.2-4.0 (m, 3H), 3.8-3.4 (m, 9H), 2.4-2.2 (m, 6H, 3 x COCH₂), 1.6-1.2 (m, 106H, -CH₂-cadenas alifáticas), 0.9-0.8 (m, 12H, 4 x CH₃). MS (ES) *m/z* (calcd 1372.1): 1372.9 (M), 1373.9 (M+1), 1374.8 (M+2).

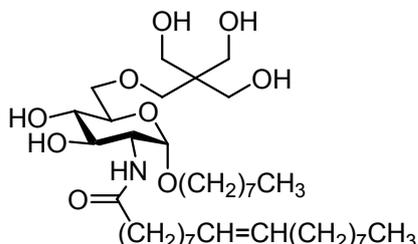
Hexadecanoil 2-amino-2-desoxi-2-*N*-(hexadecanoil)-6-*O*-(2-(*R/S*),3-dihidroxiopropil)-α-*D*-glucopiranosido ((*R/S*)-32).



Se disolvió **(R/S)-31** (182 mg, 0.20 mmol) en THF (2 mL) y se añadió Pd/C al 10% (91 mg). La suspensión se agitó bajo H₂ durante 2.5 h. Pasado este tiempo, la mezcla se filtró a través de Celite[®]. Se eliminó el disolvente y se obtuvo un residuo (240 mg, 0.10 mmol) que se disolvió en NaOMe en metanol 0.1 M (10 mL), se agitó a t.a. durante 1 h. Pasado este tiempo la mezcla se neutralizó con Amberlita (IR-120), se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-metanol, 7:0→7:1) para dar **(R/S)-32** (115 mg, 79%). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 4.63 (d, 1H, *J*=3.7 Hz, H-1), 3.78 (dd, 1H, *J*=4.0 Hz, *J*=10.3 Hz, H-2), 3.7-3.6 (m, 4H), 3.5-3.2 (m, 8H), 2.1-2.0 (m, 2H, COCH₂), 1.5-1.4 (m, 4H, 2 x OCH₂CH₂), 1.2-1.0 (m, 50H, -CH₂-cadenas alifáticas), 0.7-0.6 (m, 6H, 2 x CH₃). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃-CD₃OD, 10:1): δ 175.22 (CO), 97.61 (C-1), 73.15, 72.89, 72.19, 71.30, 71.13, 70.82, 70.37, 68.45, 63.52, 36.76 (COCH₂), 32.17-26.05 (-CH₂-), 22.91 (CH₂CH₃), 22.90 (CH₂CH₃), 11.22 (CH₃), 11.20 (CH₃). MS (ES) *m/z* (calcd

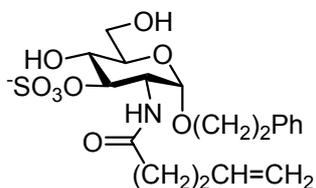
715.6): 716.5 (M+1). Anal. Calcd para $C_{41}H_{81}NO_8$: C 68.77, H 11.40, N 1.96. Encontrado: C 69.02, H 11.56, N 2.07.

Octil 2-amino-2-desoxi-6-O-[2,2-bis(hidroximetil)-3-hidroxiopropil]-2-N-oleoil- α -D-glucopiranosido (35).



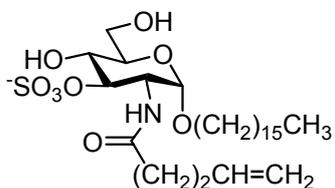
Se disolvió **1** (210.2 mg, 0.46 mmol) en piridina anhidra (2 mL) y se añadió anhídrido acético (2 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 12 h, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt-hexano, 2:1) para dar un sólido blanco (313 mg) que se disolvió en piridina anhidra (5 mL) y se trató con cloruro de oleilo al 85% (0.47 mL, 1.40 mmol) y dimetilaminopiridina (4.5 mg, 0.03 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 h, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt, 2:1→1:1) para dar un sólido blanco (241 mg), que se disolvió en metanol (30 mL) y se trató con una disolución de NaOMe en metanol (1M, 8 mL), agitando a t.a. durante 2 h. Pasado este tiempo, la disolución se neutralizó con Amberlita (IR-120), se filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH_2Cl_2 -metanol, 10:1) para dar **35** (172 mg, 54%). $[\alpha]_D$: +69.7° (c 0.96, MeOH). 1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 5.4-5.3 (m, 2H, CH=CH), 4.78 (d, 1H, $J=4.0$ Hz, H-1), 3.86 (dd, 1H, $J=4.1$ Hz, $J=10.6$ Hz, H-2), 3.7-3.3 (m, 15H), 2.23 (t, 2H, $J=7.0$ Hz, $COCH_2$), 2.1-1.9 (m, 4H, $CH_2CH=CHCH_2$), 1.6-1.5 (m, 4H, $COCH_2CH_2$, OCH_2CH_2), 1.3-1.2 (m, 30H, $-CH_2-$ cadenas alifáticas), 0.9-0.8 (m, 6H, 2 x CH_3). MS (ES) m/z (calcd 673.5): 674.5 (M+1), 675.5 (M+2). Anal. Calcd para $C_{37}H_{71}NO_9$: C 65.94, H 10.62, N 2.08. Encontrado: C 65.81, H 10.70, N 1.97.

Feniletil 2-amino-2-desoxi-2-*N*-(pen-4-enoil)-3-*O*-(oxo-sulfonil)- α -D-glucopiranosido (40).



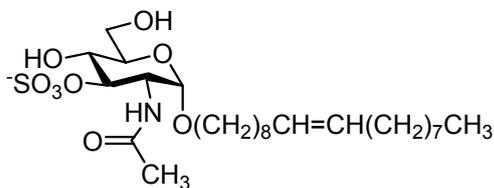
Se disolvió **10** (150 mg, 0.41 mmol) en DMF anhidra (2.5 mL) y se trató con 2,2-dimetoxipropano (0.46 mL, 2.05 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico (10 mg). La mezcla se agitó a t.a. durante 2 h, se neutralizó con trietilamina y se concentró para dar un residuo (166 mg) que se disolvió en piridina anhidra (11 mL). A continuación se añadió el complejo SO₃-piridina (1.3 g, 8.20 mmol), y se agitó a t.a. bajo Ar durante 1.5 h. Pasado este tiempo, la mezcla se concentró, el residuo se disolvió en metanol-H₂O (2:1, 5 mL), se neutralizó con una disolución de KOH 0.5 M y se concentró. El residuo se extrajo con metanol, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-metanol, 6:1) para dar **40** (178.8 mg, 90%). [α]_D: +82.4° (c 1.19, MeOH). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7.4-7.1 (m, 5H, Ar), 5.9-5.7 (m, 1H, CH₂=CH), 5.05 (dd, 1H, *J*_{Gem}=2.0 Hz, *J*=16.9 Hz, CH₂=CH), 4.97 (dd, 1H, *J*_{Gem}=2.0 Hz, *J*=10.0 Hz, CH₂=CH), 4.87 (d, 1H, *J*=3.9 Hz, H-1), 4.48 (dd, 1H, *J*=10.7 Hz, *J*=10.7 Hz, H-3), 4.0-3.9 (m, 2H, H6a, H6b), 3.8-3.4 (m, 4H, H-5, H-4, OCH₂), 3.20 (dd, 1H, *J*=7.3 Hz, *J*=15.1 Hz), 2.91 (t, 2H, *J*=6.8 Hz, CH₂Ph), 2.3-2.2 (m, 2H, CH₂=CHCH₂), 1.31 (t, 2H, *J*=7.3 Hz, COCH₂). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 175.62 (CO), 140.43 (C_{ipso}), 138.32 (CH₂=CH), 130.1-115.8 (Ar), 98.32 (C-1), 79.81 (C-3), 73.89, 70.79, 69.92, 62.26, 54.05, 36.90 (COCH₂), 36.42 (CH₂Ph), 30.67 (CH₂=CHCH₂). MS (ES) *m/z* (calcd 483.1): 484.1 (M+1). Anal. Calcd para C₁₉H₂₆KNO₉S: C 47.19, H 5.42, N 2.90, S 6.63. Encontrado: C 47.05, H 5.36, N 2.86, S 6.54.

Hexadecanoil 2-amino-2-desoxi-2-*N*-oleoil-3-*O*-(oxo-sulfonil)- α -D-glucopiranosido (41).



11 (60 mg, 0.12 mmol) se hizo reaccionar en las mismas condiciones que las descritas para **10** para dar **41** (47 mg, 63%). $[\alpha]_D$: +62.3° (c 1.28, MeOH). ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 5.9-5.8 (m, 1H, $\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}$), 5.08 (dd, 1H, $J_{\text{Gem}}=1.9$ Hz, $J=17.0$ Hz, $\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}$), 4.98 (dd, 1H, $J_{\text{Gem}}=1.9$ Hz, $J=10.2$ Hz, $\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}$), 4.90 (d, 1H, $J=3.6$ Hz, H-1), 4.50 (dd, 1H, $J=8.3$ Hz, $J=10.9$ Hz, H-3), 3.95 (dd, 1H, $J=3.6$ Hz, $J=10.7$ Hz, H-2), 3.8-3.6 (m, 5H), 3.4-3.3 (m, 1H), 2.4-2.3 (m, 4H, COCH_2CH_2), 1.7-1.6 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.4-1.1 (m, 26H, $-\text{CH}_2$ -cadena alifática), 0.90 (t, 3H, $J=7.0$ Hz, CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 175.84 (CO), 138.23 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}$), 115.80 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}$), 98.23 (C-1), 79.85 (C-3), 73.65, 70.81, 69.10, 62.26, 55.27, 54.07, 36.44 (COCH_2), 33.1-27.3 ($-\text{CH}_2-$), 23.72 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$), 14.47 (CH_3). MS (ES) m/z (calcd 603.0): 604.0 (M+1). Anal. Calcd para $\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{KNO}_9\text{S}$: C 53.70, H 8.35, N 2.32, S 5.31. Encontrado: C 53.81, H 8.31, N 2.44, S 5.39.

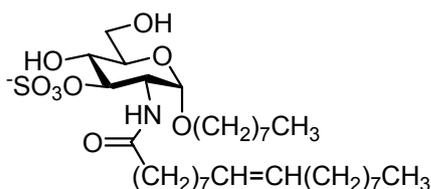
Oleoil 2-*N*-acetamido-2-desoxi-3-*O*-(oxo-sulfonil)- α -D-glucopiranosido (42).



12 (76 mg, 0.16 mmol) se hizo reaccionar en las mismas condiciones que las descritas para **10** para dar **42** (82.1 mg, 82%). $[\alpha]_D$: +39.4° (c 0.89, MeOH). ^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 5.4-5.3 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\underline{\text{C}}\text{H}$), 4.48 (d, 1H, $J=3.2$ Hz, H-1), 4.48 (dd, 1H, $J=10.7$ Hz, $J=11.0$ Hz, H-3), 3.96 (dd, 1H, $J=3.7$ Hz, $J=10.7$ Hz, H-2), 3.8-3.5 (m, 4H), 3.4-3.3 (m, 2H), 2.0-1.9 (m, 7H), 1.6-1.5 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.3-1.2 (m, 22H, $-\text{CH}_2-$), 0.90 (t, 3H, $J=7.1$ Hz, CH_3). ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 173.69 (CO), 130.84 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 130.81 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}$), 98.32 (C-1),

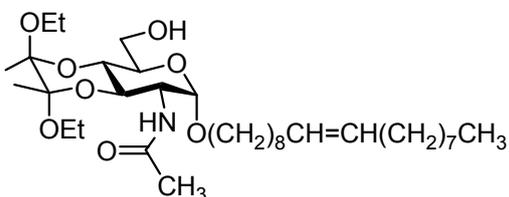
80.03 (C-3), 73.64, 70.85, 69.15, 62.26, 54.10, 33.57 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 33.02 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 30.9-27.3, 23.70 ($\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22.87 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$), 14.46 (CH_3). MS (ES) m/z (calcd 589.3): 590.2 (M+1). Anal. Calcd para $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{KNO}_9\text{S}$: C 52.94, H 8.20, N 2.37, S 5.44. Encontrado: C 53.10, H 8.35, N 2.62, S 5.60.

Octyl 2-N-oleoyl-2-amino-2-desoxy-3-O-(oxo-sulphonyl)- α -D-glucopyranoside (43).



13 (145 mg, 0.26 mmol) se hizo reaccionar en las mismas condiciones que las descritas para **10** para dar **43** (77.2 mg, 42%). $[\alpha]_D$: +43.6° (c 2.01, MeOH). ^1H RMN (200 MHz, CD_3OD): δ 5.4-5.3 (m, 2H, CH=CH), 4.87 (d, 1H, $J=3.7$ Hz, H-1), 4.6-4.4 (m, 1H, H-3), 3.9-3.3 (m, 7H), 2.3-2.2 (m, 6H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}=\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$, COCH_2), 1.6-1.1 (m, 34H, $-\text{CH}_2$ -cadenas alifáticas), 1.0-0.8 (m, 6H, 2 x CH_3). ^{13}C RMN (50 MHz, CD_3OD): δ 176.55 (CO), 130.88 ($\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$), 130.80 ($\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}$), 98.18 (C-1), 79.78 (C-3), 73.80, 70.91, 69.15, 62.40, 54.26, 33.14 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$), 33.10 ($\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 31.0-27.0 ($-\text{CH}_2$ -cadenas alifáticas), 23.84 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$), 23.80 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$), 14.54 (CH_3), 14.50 (CH_3). MS (ES) m/z (calcd 673.4): 674.3 (M+1). Anal. Calcd para $\text{C}_{32}\text{H}_{60}\text{KNO}_9\text{S}$: C 57.03, H 8.97, N 2.08, S 4.76. Encontrado: C 57.31, H 9.13, N 2.18, S 5.03.

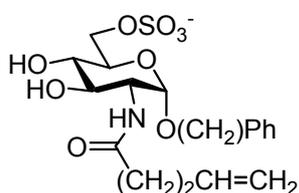
Oleoil 2-N-acetamido-2-desoxi-3,4-O-(2,3-dietoxi-but-2,3-di-il)-6-O-(oxo-sulfonil)- α -D-glucopiranosido (48).



Una disolución de **12** (100 mg, 0.21 mmol) en etanol (1.5 mL) se trató con 2,3-butanodiona (41 μL , 0.47 mmol), ácido canforsulfónico (10 mg, 0.04 mmol) y trietilortoformiato (0.23 mL, 1.4 mmol) bajo Ar. La mezcla se agitó a 60 °C durante 3.5 h. Después de enfriar, la mezcla se neutralizó con trietilamina, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-

AcOEt, 1:1→0:1) para dar un sólido (98 mg), que se disolvió en piridina anhidra (5 mL). Se añadió el complejo SO₃-piridina (509 mg, 3.20 mmol), agitando a t.a. bajo Ar durante 1 h. Pasado este tiempo, la mezcla se concentró y el residuo se disolvió en metanol-H₂O (2:1, 7 mL), se neutralizó con una disolución de KOH 0.5 M y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-metanol, 6:1) para dar **48** (95 mg, 61%). ¹H RMN (200 MHz, CD₃OD): δ 5.4-5.3 (m, 2H, CH=CH), 4.83 (d, 1H, *J*=3.4 Hz, H-1), 4.6-4.4 (m, 2H), 4.3-3.4 (m, 8H), 2.2-2.0 (m, 7H, CH₂CH=CHCH₂, COCH₃), 1.6-1.2 (m, 36H, -CH₂-), 1.0-0.9 (m, 3H, CH₃).

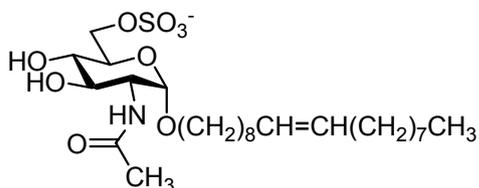
Oleoil 2-*N*-acetil-2-desoxi-6-*O*-(oxo-sulfonil)-α-D-glucopiranosido (50**).**



Una disolución de **10** (150 mg, 0.41 mmol) en etanol (3 mL) se trató con 2,3-butanodiona (82 μL, 0.93 mmol), ácido canforsulfónico (20 mg, 0.09 mmol) y trietilortoformiato (0.46 mL, 2.8 mmol) bajo Ar. La mezcla se agitó durante 3 h a 60 °C. Después de enfriar, la mezcla se neutralizó con trietilamina y se concentró para dar un residuo (507 mg) que se disolvió en piridina anhidra (10 mL) y se trató con el complejo SO₃-piridina (1.3 g, 8.20 mmol), agitando a t.a. bajo Ar durante 1 h. Pasado este tiempo, la mezcla se concentró, el residuo se disolvió en metanol-H₂O (2:1, 7 mL), se neutralizó con una disolución de KOH 0.5 M y se concentró. El residuo se extrajo con metanol, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-metanol, 6:1) para dar un sólido. El sólido se disolvió en una mezcla de ácido acético-H₂O (2:1, 20 mL), y se agitó a 70 °C durante 3 h. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-metanol, 10:1→4:1) para dar **50** (80 mg, 41%, las tres etapas). [α]_D: +89.5° (c 1.10, MeOH). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7.3-7.2 (m, 5H, Ar), 5.8-5.7 (m, 1H, CH₂=CH), 5.0-4.9 (m, 2H, CH₂=CH), 4.67 (d, 1H, *J*=3.9 Hz, H-1), 4.1-4.0 (m, 2H, CH₂Ph), 3.9-3.8 (m, 1H), 3.8-3.6 (m, 2H), 3.5-3.4 (m, 1H), 3.4-3.3 (m, 2H), 2.83 (t, 2H, *J*=5.9 Hz), 2.2-2.1 (m, 4H, COCH₂CH₂). MS (ES) m/z (calcd

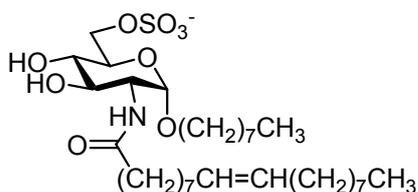
483.1): 484.0 (M+1). Anal. Calcd para C₁₉H₂₆KNO₉S: C 47.19, H 5.42, N 2.90, S 6.63. Encontrado: C 46.97, H 5.31, N 2.80, S 6.58.

Oleoil 2-*N*-acetil-2-amino-2-desoxi-6-*O*-(oxo-sulfonil)- α -D-glucopiranosido (51).



Se disolvió **48** (79 mg, 0.11 mmol) en una mezcla de ácido acético-H₂O (2:1, 10 mL) y se agitó a 65 °C durante 3 h. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-metanol, 5:1→4:1) para dar **51** (42 mg, 66%). [α]_D: +69.0° (c 1.18, MeOH). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 5.4-5.3 (m, 2H, CH=CH), 4.76 (d, 1H, *J*=3.4 Hz, H-1), 4.26 (dd, 1H, *J*=2.4 Hz, *J*=11.0 Hz, H-2), 4.18 (dd, 1H, *J*=5.6 Hz, *J*=10.7 Hz, H-6a), 3.89 (dd, 1H, *J*=3.7 Hz, *J*=10.7 Hz, H-6b), 3.8-3.6 (m, 4H, H-2, H-3, H-5, OCH₂), 3.4-3.3 (m, 2H, OCH₂, H-4), 2.0-1.9 (m, 7H, CH₂CH=CHCH₂, COCH₃), 1.6-1.5 (m, 2H, OCH₂CH₂), 1.3-1.2 (m, 22H, -CH₂-), 0.90 (t, 3H, *J*=6.8 Hz, CH₃). MS (ES) *m/z* (calcd 589.3): 590.3 (M+1). Anal. Calcd para C₂₆H₄₈KNO₉S: C 52.94, H 8.20, N 2.37, S 5.44. Encontrado: C 52.86, H 8.19, N 2.40, S 5.31.

Octil 2-amino-2-desoxi-2-*N*-oleoil-6-*O*-(oxo-sulfonil)- α -D-glucopiranosido (52).



Se disolvió **13** (250 mg, 0.45 mmol) en etanol (3.2 mL) y se trató con 2,3-butanodiona (87 μ L, 0.99 mmol), ácido canforsulfónico (21 mg, 0.09 mmol) y trietilorfoformiato (0.49 mL, 3.0 mmol) bajo Ar. La mezcla se agitó durante 3 h a 70 °C. Después de enfriar, la mezcla se neutralizó con trietilamina y se concentró. El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt, 2:1) para dar un residuo (121 mg) que se disolvió en piridina anhidra (5 mL) y se trató con el complejo SO₃-piridina (552 mg, 3.46 mmol),

agitando a t.a. bajo Ar durante 1 h. Pasado este tiempo, la mezcla se concentró, el residuo se disolvió en metanol-H₂O (2:1, 7 mL), se neutralizó con una disolución de KOH 0.5 M y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-metanol, 8:1) para dar un sólido (116 mg) que se disolvió en una mezcla de ácido acético-H₂O (2:1, 20 mL) y se agitó a 70 °C durante 3 h. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂-metanol, 10:1→4:1) para dar **52** (80 mg, 13%, las tres etapas). $[\alpha]_D$: +70.3° (c 0.86, MeOH). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 5.4-5.3 (m, 2H, CH=CH), 4.76 (d, 1H, *J*=3.9 Hz, H-1), 4.26 (dd, 1H, *J*=2.4 Hz, *J*=10.8, H-6a), 4.18 (dd, 1H, *J*=5.7 Hz, *J*=10.8 Hz, H-6b), 3.88 (dd, 1H, *J*=3.9 Hz, *J*=10.8 Hz, H-2), 3.8-3.7 (m, 3H), 3.4-3.3 (m, 2H), 2.3-2.2 (m, 2H, COCH₂), 2.0-1.9 (m, 4H, CH₂CH=CHCH₂), 1.6-1.5 (m, 4H, COCH₂CH₂, OCH₂CH₂), 1.3-1.2 (m, 30H, -CH₂-cadenas alifáticas), 0.9-0.8 (m, 6H, 2 x CH₃). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 176.62 (CO), 131.43 (CH=CH), 130.37 (CH=C_H), 98.36 (C-1), 72.43, 72.14, 71.72, 69.05, 68.30, 55.36 (C-2), 37.04 (COCH₂), 33.11 (CH₂CH=CHCH₂), 33.07 (CH₂CH=CHCH₂), 30.9-27.2 (-CH₂-), 23.80 (CH₂CH₃), 23.75 (CH₂CH₃), 14.50 (CH₃), 14.48 (CH₃). MS (ES) *m/z* (calcd 673.3): 673.4 (M+1), 673.5 (M+2). Anal. Calcd para C₃₂H₆₀KNO₉S: C 57.03, H 8.97, N 2.08, S 4.76. Encontrado: C 56.95, H 8.94, N 1.99, S 4.90.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

ENSAYOS ANTIPROLIFERATIVOS

Equipamiento

Laboratorio para cultivo de tejidos.

Áreas no estériles para trabajar con radiactividad.

Contador de centelleo Microβ para placas multipocillos.

Reactivos

Placas de 96 pocillos (Falcon, referencia: Microtesttm 96).

Dulbecco's modified Eagle's médium: DMEM (Sigma, referencia: D-7777).

Suero fetal bovino:FCS (Linus, referencia: S01805).

Timidina tritiada (Amersham, referencia: TRK120).

Dodecil sulfato sódico: SDS (Merck, referencia: 13760).

Líquido de Centelleo (Nat. Diagnostics, referencia: Ecoscinttm -A).

Disoluciones

Tampón fosfato (PBS) 15 mM, 140 mM NaCl, pH 7.6

SDS 0.05%

Medios de cultivo óptimos para cada tipo celular

DMEM.

DMEM + 10% suero fetal bovino (FCS).

Procedimiento

Para los ensayos antiproliferativos, se utilizaron placas de 96 pocillos, en las que se sembraron inicialmente entre $8-10^4$ células por pocillo. Las células se sembraron resuspendidas en DMEM + 10% FCS en un volumen final de 100 μ L. Se mantuvieron a 37 °C en un incubador de CO₂ al 5% durante 6 horas, para dejar que las células se adhieran a la placa. Pasado este tiempo, se cambió el medio por DMEM sin suero (volumen final: 100 μ L/pocillo) y se incubaron a 37 °C al 5% de CO₂ entre 24-36 horas, para detener el ciclo celular. Por último, se retiró el medio y se adicionó DMEM + 1% FCS que contenía el glicósido sintético, en concentraciones decrecientes de un orden de magnitud disuelto en el medio de cultivo (por triplicado). Como controles se utilizaron pocillos con cada uno de los medios mencionados. Para el control de máxima incorporación las células fueron resuspendidas en medio de cultivo fresco, para la incorporación basal se mantuvieron las células en medio sin nutrientes. Las células se incubaron con los glicósidos 24 horas a 37 °C y 5% CO₂.

Medida de la actividad antiproliferativa por incorporación de timidina tritiada.

Pasado el tiempo de incubación de las células con los glicósidos, se retiró el medio y se lavaron con DMEM sin suero. A continuación se sustituyó por 100 μ L de DMEM suplementado con timidina tritiada (T³), 0.5 μ Ci por pocillo. Se incubaron 6 horas a 37 °C en zona de cultivos para muestras radioactivas. Se eliminó el medio por succión y se lavaron los cultivos con PBS (x 2) para eliminar el isótopo libre. Se añadió SDS 0.05% (25 μ L / pocillo) y líquido de centellero (200 μ L / pocillo) y se midió la radiactividad (lectura de desintegraciones por minuto) de cada placa en un contador de centelleo Micro β .

Análisis de Resultados

En esta parte del trabajo, la actividad estudiada es la capacidad de inhibir la división celular en cultivo. Para calcular el porcentaje de inhibición se aplicó la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - 100(X - B) / (A - B)$$

Donde:

A = Control de máxima incorporación

B = Control de incorporación basal

X = Incorporación de muestra tratada

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

ANÁLISIS DE GANGLIÓSIDOS Y CERAMIDA DE CÉLULAS C6 (GLIOMA DE RATA) Y A375 (MELANOMA HUMANO).

Disoluciones

Tampón fosfato (PBS) 15 mM, 140 mM NaCl, pH 7.6

Disoluciones madre 10 mM de los glicósidos en metanol (GC-22) y agua (IG-20 y NB-DNJ): se disolvió el glicósido correspondiente y las disoluciones se pasaron a través de un filtro de 0.22 micras para su esterilización. Se hizo una dilución de éstas con medio DMEM, y se añadieron 30 mL al cultivo celular, siendo la concentración final de compuesto 10 μ M (GC-22 y IG-20) o 50 μ M (NB-DNJ).

Reactivos

Tripsina

Trypan-blue ®

Medios de cultivo

Siempre se utilizó suero inactivado, que se añadió al medio junto con antibiótico.

El medio de cultivo utilizado fue DMEM (D777, Sigma, con 4.5 g/L glucosa) con bicarbonato sódico (3.7 g) a pH 7.2 estéril.

Procedimiento general de incubación de células con glicósidos.

Se partió de células C6 crecidas a 37 °C en atmósfera de CO₂ que formaban monocapa. Se eliminó el medio de cultivo, se lavó 2 veces con tampón PBS (10 mL) y se añadió PBS y tripsina (10x) (10 mL) para resuspender las células. A continuación se añadió medio de cultivo con 10% de FCS y se incubó a 37 °C durante 1 min para bloquear la acción de la tripsina. La suspensión se centrifugó (1000 rpm, 5 min) y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 5 mL de PBS, se contaron (5×10^8) y se trataron con Trypan-blue ® para medir su viabilidad (96.5 %).

Se sembraron las células (4×10^7), se añadió medio DMEM + 10% de suero y se incubaron durante 6 horas. Pasado este tiempo, se cambió el medio, se añadió medio sin suero y se incubaron durante 24 horas.

Se añadió medio de cultivo (con suero al 1%, o en ausencia de suero, dependiendo del experimento) como control; o bien, medio de cultivo que contenía los compuestos (30 mL) (concentración final GC-22=10 µM, IG-20=10 µM, NB-DNJ=50 µM).

Al cabo de 48 ó 96 horas se recogieron los experimentos (en este último caso se realizó un cambio del medio de cultivo a las 48 horas, se retiró el medio mediante succión y se repuso con medio fresco, que contenía los compuestos).

Se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS (15 mL x 2). A continuación se añadió PBS (9 mL) y tripsina (1 mL) y se incubó a 37 °C durante 1 min. Pasado este tiempo se añadió medio con suero (10 mL), se resuspendieron las células y se centrifugaron (1000 rpm, 5 min). Se lavaron con PBS (5 mL) para eliminar la tripsina y se tomó una alícuota que se tiñó con trypan blue para medir la viabilidad (en torno al 95%) y se contó el número de células. Por último, las células se centrifugaron nuevamente y se liofilizaron.

Extracción de gangliósidos y ceramida¹¹⁰.

Las células liofilizadas se extrajeron con 2.5 mL de CHCl₃: MeOH 1:1 (x 2) y se incubaron a 4 °C ON (*Over Night*).

Se centrifugaron a 2000 g, 4 °C, durante 5 minutos para eliminar el material insoluble. El extracto de lípidos se concentró a sequedad (en el rotavapor, sin calentar). Se añadió 1 mL de: diisopropil éter: 1-butanol, 6:4 y se extrajo con 0.5 mL de disolución acuosa de NaCl al 0.1 % (x 2).

Se juntaron las fases acuosas (contienen los gangliósidos) y se liofilizó. Se pesó la cantidad de gangliósidos obtenida.

Purificación de gangliósidos.

Se preparó una columna con resina "Sephadex G-50" para purificar los gangliósidos por exclusión molecular:

0.8 mg de resina + 15 mL de H₂O, se equilibró a 90 °C durante 3 horas (sin agitación). Se puso a vacío para eliminar las burbujas, se cargó en la columna y se compactó (7 mL de resina). Se pasaron 70 mL de agua (10 veces el volumen de la columna) y se cargó con una muestra de gangliósidos disuelta en 0.5 mL de H₂O.

Se recogieron los gangliósidos de la columna pasando H₂O a flujo constante, en tubos eppendorf de 1.5 mL cada uno. Se recogieron 5 eppendorf y se juntaron las fracciones 2-5, y se liofilizaron.

Se pesaron los gangliósidos después de purificar y se observó que el rendimiento de la purificación con Sephadex era bastante alto (se obtenía casi lo mismo).

¹¹⁰ Ladisch, Cancer Letters, 201 (2003) 31-40

Análisis de gangliósidos por HPLC

Los gangliósidos puros se disolvieron en 200 μ L de MeOH y se analizaron por HPLC. Se utilizó una columna Kromasil-NH₂ de longitud 250 mm, 4.6 mm de diámetro interno y 5 μ m de diámetro de partícula. La separación cromatográfica se realizó a 20 °C empleando un gradiente de la siguiente mezcla de disolventes: disolvente A, acetonitrilo-tampón fosfato sódico 5 mM, pH 5.6 (83:17); disolvente B, acetonitrilo-tampón fosfato sódico 20 mM, pH 5.6 (1:1). El programa de elución en gradiente fue el siguiente: 7 minutos con disolvente A; 53 minutos con un gradiente lineal desde A hasta una mezcla de A-B (66:34); 20 minutos con un gradiente desde A-B (66:34) hasta A-B (36:64). El análisis completo requiere 80 min. La velocidad de flujo fue 1 mL/min y el perfil de la elución se monitorizó por detección de la absorbancia a 215 nm. Antes de realizar un nuevo análisis la columna se lavó con disolvente B durante 10 min y se equilibró con disolvente A durante 15 min, con el objetivo de eliminar los contaminantes más polares.

Análisis de ceramida por TLC.

Las células liofilizadas se extrajeron con 2.5 mL de CHCl₃: MeOH 1:1 (x 2) y se incubaron a 4 °C ON (Over Night).

Se centrifugaron a 2000 g, 4 °C, durante 5 minutos para eliminar el material insoluble.

El extracto de lípidos se concentró a sequedad (en el rotavapor, sin calentar).

Se añadió 1 mL de: diisopropil éter: 1-butanol, 6:4 y se extrajo con 0.5 mL de disolución acuosa de NaCl al 0.1 % (x 2).

La fase orgánica se concentró y se disolvió en 300 μ L de cloroformo:metanol, 1:1. Para el análisis por TLC se utilizaron placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck) (9 x 2.5 cm). La fase móvil utilizada fue cloroformo-metanol-NH₄OH (25%), 40:10:1.¹¹¹ La ceramida y otros lípidos se revelaron con una disolución de CuSO₄ (10%) en H₃PO₄ (8%) y metanol (5%), calentando a 200 °C durante 1.5 min.

¹¹¹ Signorelli, P.; Hanunn, Y. A. *Methods Enzymol.* **2002**, 345, 275-294.

La cuantificación de ceramida se realizó utilizando un fotodocumentador GeneGenius de Syngene LTD mediante densitometría con un software Gen Tools 3.07 para el tratamiento de datos.

4.4.1 Incubación de células A375 con GC-22, IG-20 (10 μ M) y NB-DNJ (50 μ M) durante 48 horas (por triplicado).

Experimento	Nº cél/viabilidad	Células liofilizadas(mg)	GLs (mg)	GLs puros (mg)
CONTROL	4.7 x 10 ⁷ / 90%	19.8	2.1	2.2
GC-22 (10 μ M)	4.1 x 10 ⁷ / 90%	18.7	1.6	1.9
IG-20 (10 μ M)	2.5 x 10 ⁷ / 90%	14.7	1.6	1.8
NB-DNJ (50 μ M)	4.0 x 10 ⁷ / 85%	25.0	2.3	2.3

4.4.2 Incubación de células C6 con GC-22, IG-20 (10 μ M), NB-DNJ (50 μ M) en medio con 1% suero durante 45 h y 48 h (por triplicado).

Experimento	Nº cél/viabilidad	Células liofilizadas(mg)	GLs (mg)	GLs puros (mg)
CONTROL	8.2x 10 ⁷ / 72%	21.6	2.9	3.2
GC-22 (10 μ M)	1.6 x 10 ⁸ / 99%	19.6	2.9	3.1
IG-20 (10 μ M)	1.0x 10 ⁸ / 98%	23.0	3.2	3.4
NB-DNJ (50 μ M)	9.9 x 10 ⁷ / 99%	19.6	3.0	3.4

4.4.3 Incubación de células C6 con GC-22, IG-20 (10 μ M) y NB-DNJ (50 μ M) durante 96 horas en medio libre de suero (por duplicado).

Experimento	Nº cél/viabilidad	Células liofilizadas(mg)	GLs (mg)	GLs puros (mg)
CONTROL	4.1 x 10 ⁷ / 90%	14.9 mg	2.7 mg	3.6 mg
GC-22 (10 μ M)	3.6 x 10 ⁷ / 82%	14.4 mg	1.8 mg	2.3 mg
IG-20 (10 μ M)	6.2 x 10 ⁷ / 89%	17.5 mg	2.7 mg	3.2 mg
NB-DNJ (50 μ M)	3.6 x 10 ⁷ / 93%	17.8 mg	3.2 mg	3.4 mg

RMN DE CÉLULAS DE GLIOMA C6 INCUBADAS CON GLICÓSIDOS INHIBIDORES.

Materiales y métodos

Los espectros de ^1H -RMN se realizaron con un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker AvanceTM 400WB dotado de un imán superconductor de boca ancha (89 mm) que opera a 9.4 Teslas (la frecuencia de resonancia del protón correspondiente es 400.14 MHz). El espectrómetro es de banda ancha, con dos canales y ofrece gran estabilidad y control de la amplitud y fase de los pulsos de radiofrecuencia (rf). La potencia de los amplificadores de rf es de 1 kW. Se utilizó una sonda de banda ancha para rotors de 4 mm de diámetro (el volumen de muestra es aproximadamente de 80 μl).

Disoluciones

Se utilizó PBS deuterado (tampón fosfato sódico 25 mM, 1% NaCl, pD = 7.4) y una disolución de DDS ($(\text{CH}_3)_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$) 10 mM en D_2O como referencia interna en los espectros de RMN.

Incubación de células C6 con los glicósidos y detección por RMN

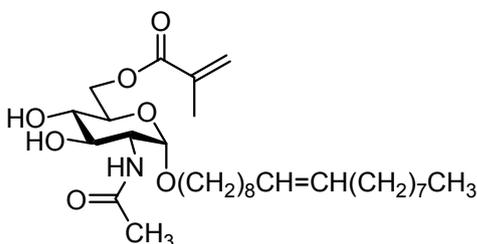
Las células se incubaron como se ha descrito en el apartado anterior en ausencia y en presencia de GC-22 (10 μM), IG-20 (10 μM) y NB-DNJ (50 μM) a 37 °C durante 45 h. Pasado este tiempo, se lavaron con PBS y se midió la viabilidad. Finalmente se lavaron dos veces con PBS deuterado y se trasvasaron a un rotor de zirconio (ZrO_2) de 80 μl . Se añadió disolución 10 mM de DDS en PBS deuterado y el rotor se introdujo en el espectrómetro de RMN para registrar el espectro.

CAPÍTULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

SÍNTESIS DEL MONÓMERO DE GC-22

Oleil 2-amino-2-*N*-acetil-2-desoxi-6-metilmetacril- α -D-glucopiranosido (GC-22*).



Una mezcla de GC-22 (1.02 g, 2.16 mmol) se disolvió en dioxano seco (43.3 mL) y se añadió lipasa antártica Novozym 435 y anhídrido metacrílico (1.61 mL, 10.81 mmol). La mezcla se incubó a 37 °C y se agitó a 150 rpm durante 40 h. La mezcla de reacción se concentró y se obtuvo un sólido blanco (2.83 g) que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt, 1:2→0:1) para dar el monómero GC-22* (1.40 g, 89%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.4-6.3 (d, 1H, *J*=7.5 Hz, NH), 6.11 (s, 1H, COC=CH₂), 5.52 (s, 1H, COC=CH₂), 5.4-5.3 (m, 2H, O(CH₂)₈CH=CH(CH₂)₇CH₃), 4.72 (d, 1H, *J*=3.5 Hz, H-1), 4.5-4.3 (m, 4 H, H-6a, H-6b, OH (x 2)), 4.1-3.9 (dt, 1H, H-2), 3.8-3.7 (m, 1H, H-5), 3.7-3.6 (m, 2H, H-3, OCH₂), 3.5-3.3 (m, 2H, H-4, OCH₂), 2.1-1.9 (m, 7H, COCH₃, O(CH₂)₇CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃), 1.90 (s, 3H, COCCH₃), 1.6-1.5 (m, 2H, OCH₂CH₂(CH₂)₆CH=CH(CH₂)₇CH₃), 1.3-1.2 (m, 22H, OCH₂CH₂(CH₂)₅CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃), 0.85 (t, 3H, *J*=6.6 Hz, CH₂CH₃). ¹³C RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 171.7 (NHCO), 167.5 (OCO), 135.9 (COC=CH₂), 129.9 (O(CH₂)₈CH=CH(CH₂)₇CH₃), 129.7 (O(CH₂)₈CH=CH(CH₂)₇CH₃), 126.0 (COC=CH₂), 97.1 (C-1), 73.2 (C-3), 71.0 (C-4), 69.8 (C-5), 67.9 (OCH₂), 63.9 (C-6), 53.4 (C-2), 29.7-29.1

(OCH₂CH₂(CH₂)₅CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₄CH₂CH₂CH₃), 27.1 (CH₂CH=CHCH₂),
26.1 (CH₂CH₂CH₃), 23.2 (CH₂CH₂CH₃), 22.6 (COCH₃), 18.2 (COCCH₃), 14.1
(CH₂CH₃).

APÉNDICE I

OBTENCIÓN DE LA ENZIMA LACTOSILCERAMIDASINTASA

APÉNDICE I: OBTENCIÓN DE LA ENZIMA LACTOSILCERAMIDA SINTASA.

Debido a la que la estructura del glicósido GC-22 tiene cierta similitud con la glucosilceramida, y puesto que inhibe la síntesis total de gangliósidos en glioma (C6 sin suero), nos planteamos la posibilidad de que GC-22 actuase como inhibidor o bien como aceptor trampa¹¹² de la lactosilceramida sintasa, enzima que cataliza la galactosilación de glucosilceramida. Así, nos propusimos obtener la enzima β -1,4-galactosiltransferasa (lactosilceramida sintasa), que no se encuentra disponible comercialmente, por lo que decidimos obtenerla en el laboratorio utilizando técnicas de biología molecular.

1. Expresión heteróloga de proteínas.

La tecnología de ADN recombinante ha revolucionado las estrategias para la producción de proteínas. Debido a que su genoma está bien estudiado y a una variedad de herramientas disponibles para la manipulación genética, *Escherichia coli* sigue siendo el organismo más utilizado para producir proteínas recombinantes.¹¹³ Esta bacteria tiene pequeño tamaño, carencia de patogeneidad para cualquier organismo común y facilidad de cultivo bajo condiciones de laboratorio (en las condiciones óptimas de crecimiento de 37 °C un medio rico en oxígeno y nutrientes, un cultivo de un pequeño número de bacterias se divide exponencialmente).

Existen disponibles numerosos sistemas de expresión que permiten niveles altos o bajos de expresión de proteínas en una variedad de organismos procariotas y eucariotas.¹¹⁴ Sin embargo, a pesar del desarrollo de la tecnología de expresión, existen obstáculos importantes. La expresión de proteínas recombinantes a menudo da lugar a formas inactivas y con plegamientos incorrectos de proteínas en forma de agregados y ocurre frecuentemente cuando proteínas de organismos eucariotas, que presentan

¹¹² Aceptor trampa:

¹¹³ Chou, C. P. *Applied Microbiology and Microtechnology*. **2007**, 76, 521-532.

¹¹⁴ Hartley, J. L. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, 17, 359-366.

puentes disulfuro, modificaciones post-translacionales o proteínas multiméricas se expresan en insectos o sistemas bacterianos.^{115,116} En algunos casos la expresión en *E. coli* produce agregados conocidos como cuerpos de inclusión, que son estructuras densas de polipéptidos plegados incorrectamente. Algunas veces es debido al entorno reductor del citoplasma de *E. coli* que impide la formación de puentes disulfuro. Otra razón, es que la maquinaria celular de *E. coli* es incapaz de manejar los elevados niveles de expresión que hay durante la producción de proteínas recombinantes.

La optimización de la expresión de una proteína para su obtención en forma soluble suele ser la estrategia a elegir cuando se quiere obtener una proteína activa. Aunque se han desarrollado muchos sistemas de expresión y condiciones de cultivo para evitar la formación de cuerpos de inclusión, muchas veces es un hecho común e inevitable.

2. Clonaje y expresión.

Se ha clonado el enzima lactosilceramida sintasa (B4GalT6) de *Mus musculus* (94 % de homología con la humana), en *E. coli*. Este enzima es una glicosiltransferasa de tipo II, que tiene forma globular (región hidrofílica) y un fragmento transmembrana (región hidrofóbica) con el que se ancla a la membrana plasmática.

La proteína tiene 382 aminoácidos (44759 Da) y la región transmembrana está codificada por los aminoácidos comprendidos entre el 16 y el 35. Decidimos clonar únicamente el dominio soluble, que es donde se localiza el centro activo, por lo que el clonaje se realizó desde el aminoácido 36 hasta el 382.

Esta proteína tiene 8 posibles sitios de glicosidación (aa: 71, 75, 83, 84, 99, 122, 307, 367) y 2 posibles puentes disulfuro (108-152, 223-242).

¹¹⁵ Fahnert, B.; Lilie, H.; Neubauer, P.; en *Inclusion Bodies: Formation and Utilization*. Springer, New York, **2004**.

¹¹⁶ Bowden, G. A.; Paredes, A. M.; Georgiou, G. *Biotechnology*. **1991**, 9, 725-730.

Para la obtención de esta proteína, adquirimos el clon IRAVp968G0226D que contenía el gen codificante¹¹⁷ para B4GalT6, que se amplificó de manera específica mediante PCR y se clonó en el vector pGem utilizando como hospedador *E. coli* DH5 α . Se comprobó que la secuencia del gen introducido era la esperada y se realizó el subclonaje en el vector de expresión pET-28b(+) utilizando como hospedador *E. coli* BL21(DE3) (Figura 1).

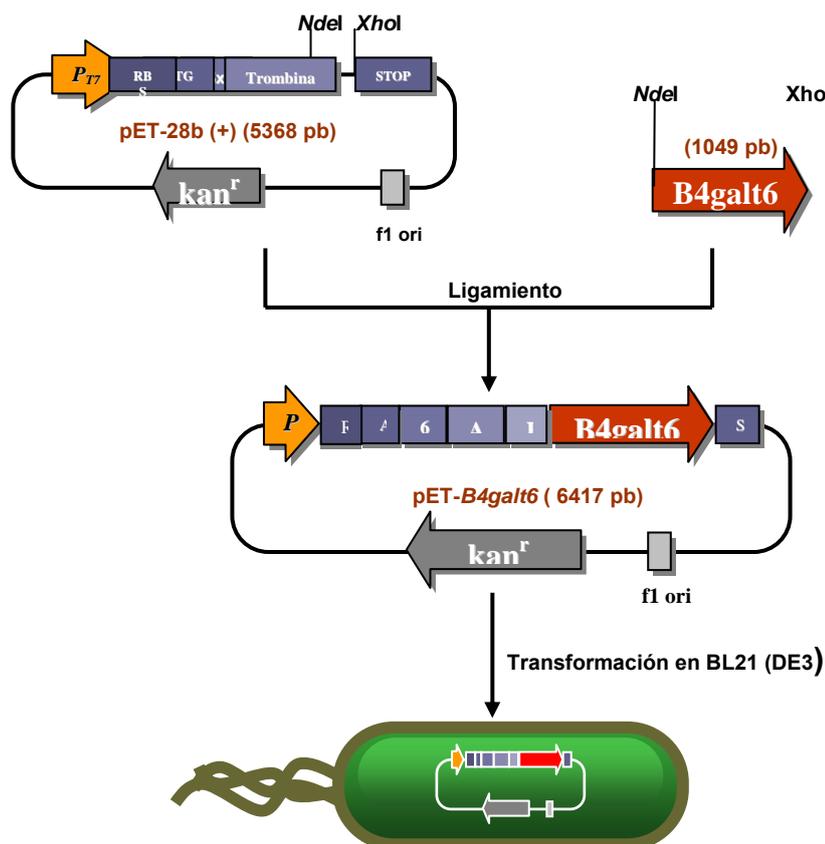


Figura 1. Esquema de la construcción pET-b4galt6.

¹¹⁷ El clon adquirido contenía la secuencia de ADNc que codificaba para la proteína. ORF: "Open Reading Frame" o marco de lectura abierto, es la secuencia de tripletes entre el codon de iniciación (frecuentemente AUG, que codifica para el aminoácido metionina) y el de terminación, que es un codon sin sentido, y que puede ser la región codificadora de una proteína. ADN complementario: es ADN sintetizado a partir de ARN mensajero en una reacción catalizada por la transcriptasa inversa. Se utiliza para clonar genes eucariotas en procariotas.

La expresión de la proteína inducida por IPTG nos permitió una sobreexpresión de la glicosiltransferasa recombinante, aunque no en la fracción de proteína soluble, si no como cuerpos de inclusión (Figura 2)

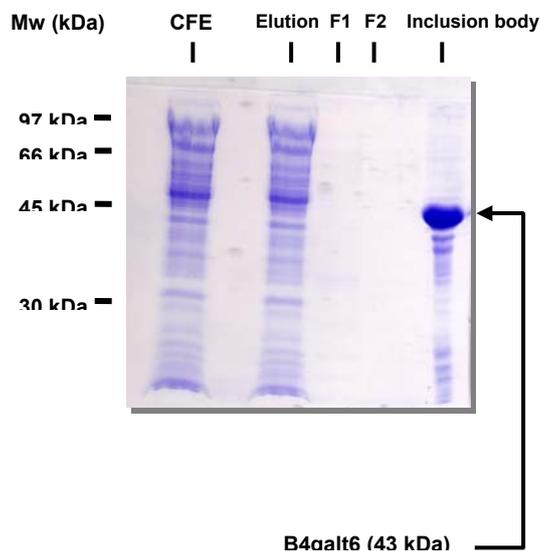


Figura 2. SDS-PAGE de la sobreexpresión y purificación del enzima b4galt6. El gel es del 13 % acrilamida/bisacrilamida. (1) Marcador de pesos moleculares, (2) Blanco de expresión de una cepa de E. coli BL21 transformada con pET-28b(+), (3) Fracción soluble de la b4galt6 (4) Purificación de la b4galt6 por IMAC, (4) Cuerpos de inclusión.

Se probaron otras condiciones de expresión de la proteína con el objetivo de obtenerla en su forma soluble, como realizar su expresión a menor temperatura, induciendo a una OD mayor, pero esto no dio resultado.

Debido a que no fue posible obtener la glicosiltransferasa específica en nuestro laboratorio, en su forma soluble, una posible opción futura sería intentar expresarla mediante el uso de chaperonas o utilizar como aproximación una enzima análoga para realizar los estudios de inhibición.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LA ENZIMA LACTOSILCERAMIDA SINTASA

Materiales

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Escherichia coli* DH5 α y BL21 (DE3) adquiridas en Promega y la cepa de *Escherichia coli* DH10B que contenía el ORF con el gen B4galt6 de *Mus musculus* utilizado para la amplificación de este gen, adquirida en RZPD.

El plásmido pGEM-T Easy fue adquirido en Promega y el plásmido pET-28b(+) en Novagen.

Los cebadores de PCR fueron adquiridos en Isogen.

Los enzimas que se han utilizado:

- EcoTaqPlus T4-DNA polimerasa (MBI Fermentas).
- Enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I (MBI Fermentas) y para su uso se han seguido las instrucciones del fabricante.
- Lisozima (USB Corporation).
- DNasa (Roche).

Los componentes de los medios de cultivo fueron adquiridos en Pronadisa.

La resina de Ni⁺²-agarosa fue suministrada por Hispanagar.

La purificación de fragmentos de DNA a partir de bandas de gel de agarosa se realizó con el kit Perfectprep[®] Gel Cleanup de Eppendorf. Para la obtención de plásmidos a partir de cultivos bacterianos se usó el kit GenElute[™] Plasmid Miniprep de Sigma.

La cuantificación de DNA y proteínas en geles de agarosa y poliacrilamida se realizó utilizando un fotodocumentador GeneGenius de Syngene LTD mediante densitometría.

Los ensayos espectrofotométricos se realizaron en un espectrofotómetro VIS-UV SPECTRAMax-384 PLUS de Molecular Devices. Los cultivos celulares se incubaron en un agitador orbital termostatzado Lab-Shacker de Adolf Kühner AG.

La secuenciación del gen B4galt6 se realizó en el Centro de Secuenciación de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

*Las técnicas generales para el tratamiento de DNA (PCR, clonaje, ligamiento, transformación, etc) se realizaron según se describen en protocolos estándar.*¹¹⁸

Amplificación y clonaje del gen B4galt6 de Mus musculus.

El DNA molde se obtuvo lisando 10 μ L de un cultivo O/N de DH10B con 20 μ L de Colony Lysis Buffer (Tris-HCl 20 mM, 1% Tritón X, EDTA 2 mM, pH 8.5), o bien a partir de plásmido purificado a partir de un cultivo O/N de DH10B. La amplificación por PCR se realizó empleando primers específicos (N-terminal incluyendo diana de restricción para el enzima *Nde*I: TATAACCATATGCCAGGCATCGCCAACACG y C-terminal incluyendo diana de restricción para el enzima *Xho*I: TTCTACTCGAGTTAATAGTCTTCAATTGG) en reacciones de 10 μ L que contenían: 0.1 μ L del plásmido puro, 1 μ L Buffer 10x (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8.3), MgCl (1 μ L, 5 mM), dNTPs (1 μ L, 200 μ M), EcoTaqPlus Pol. (0.5 μ L, 2,5 U), primers específicos (0.1 μ L, 1 μ M). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización 1 min a 94 °C; annealing 1 min a 55 °C; elongación 2 min a 72 °C durante 25 ciclos. El producto de amplificación se purificó y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Se digirieron el vector pGEM-T Easy y el inserto b4galt6 amplificado (PCR) con los enzimas *Nde*I y *Xho*I y se realizó el ligamiento de extremos cohesivos (poner condiciones). La mezcla de ligamiento se transformó en la cepa DH5 α de *E. coli* y se analizaron las colonias transformantes mediante PCR. Se creció un preinóculo con una de las colonias positivas DH5 α /pGEM-b4galt6 y se purificó el plásmido (se chequeó por corte con PCR) y se secuenció una de las colonias positivas, comprobando que no tenía mutaciones. Se cortó el plásmido (doble digestión) y el inserto b4galt6 se purificó de gel de agarosa. Se digirió el vector pET-28b(+) con los enzimas *Nde*I y *Xho*I y se realizó el ligamiento de extremos cohesivos. La mezcla de ligamiento se transformó en la cepa DH5 α de *E. coli* y

¹¹⁸ Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, F., (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

se analizaron las colonias transformantes mediante PCR. Se creció un preinóculo con una de las colonias positivas DH5 α /pET-28b(+)-b4galT6 y se purificó el plásmido (se chequeó por corte con PCR). Se transformó en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* y se analizaron las cepas transformantes mediante PCR.

Condiciones de expresión de la enzima B4GalT6.

Se creció un preinóculo de BL21/pET-28b(+)-b4galT6 en 5 mL de medio Luria-Bertani (LB) con kanamicina (250 μ g/ml) a 37 °C O/N y se inoculó un 1% en un cultivo de 200 mL donde se indujo la expresión de B4GalT6 con isopropil β -D tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM a una OD_{600nm} de 0.5. Los cultivos permanecieron a 30 °C O/N y posteriormente se centrifugaron 10 min a 10.000 xg. Para la obtención de extracto crudo se resuspendieron los pellets en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 (6.4 mL/200 mL cultivo). A continuación se trataron con una disolución de lisozima en EDTA (1.5 mg de lisozima en 0.8 mL EDTA) y se incubó agitando a t.a. durante 1 hora, para romper las células. Pasado este tiempo, la mezcla se incubó con agitación a 4 °C ON. La mezcla se sonicó para completar la lisis de las células y se trató con una disolución de MgCl y DNasa en H₂O (25 μ L, 3.5 μ L por mL de mezcla): MgCl en H₂O (0,3 mg/ml) y DNasa (3 μ g/ μ L de la disolución de MgCl anterior). Se agitó a 4 °C durante 30 minutos, se centrifugó 30 min a 10.000 xg a 4 °C y se precipitaron los ácidos nucleicos con estreptomycin sulfato (1%). Después de centrifugar 30 min a 10.000 x g a 4 °C se recoge el sobrenadante que contiene el extracto crudo de proteínas y en el precipitado quedan los cuerpos de inclusión.

Expresión de la proteína en otras condiciones

Se creció un preinóculo de BL21/pET-28b(+)-b4galT6 en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) con kanamicina (250 μ g/ml) a 37 °C O/N y se inoculó un 1% en un cultivo de 200 ml donde se indujo la expresión de B4GalT6 con isopropil β -D tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM a una OD_{600nm} de 0.8. Los cultivos permanecieron a 25 °C O/N y posteriormente se centrifugaron y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para obtener la proteína B4GalT6.

APÉNDICE II

RMN EN ESTADO SÓLIDO

APÉNDICE II: RMN EN ESTADO SÓLIDO.

Hasta hace tres décadas registrar espectros de RMN de sistemas muy viscosos o sólidos y obtener información estructural a partir de ellos, no era factible con la instrumentación y métodos disponibles. Con los avances tecnológicos han surgido nuevas aplicaciones de RMN que hacen que esta técnica sea imprescindible en muchos campos de investigación.¹¹⁹

El fenómeno de la RMN aparece cuando ciertos núcleos con momento angular distinto de cero se introducen en el seno de un campo magnético muy intenso (B_0), provocándose la ruptura de la degeneración de los niveles de energía del núcleo.

El momento angular de un núcleo está cuantizado:

$$L = \hbar I$$

siendo el valor de I múltiplo de $\frac{1}{2}$. Cuando un núcleo con espín I interacciona con un campo magnético B_0 presenta $2I + 1$ niveles separados entre sí por un mismo valor de energía:

$$\Delta E = \mu B_0 / I$$

donde μ representa el momento magnético nuclear expresado por:

$$\mu = \gamma h I / 2\pi$$

siendo γ la relación giromagnética, constante para un núcleo determinado y h la constante de Planck. Para el caso más sencillo, un protón con $I = \frac{1}{2}$, el dipolo magnético se puede alinear paralela o antiparalelamente con el campo magnético externo. Este alineamiento corresponde a los niveles de energía inferior y superior. El nivel más bajo de energía tiende a poblarse preferentemente según una distribución de Boltzman, lo que origina un exceso neto de espines nucleares alineados en dirección paralela comparados a la orientación antiparalela. Este exceso de población da lugar a una magnetización neta en la dirección del campo aplicado, representada por el vector **M**. La observación experimental de la magnetización requiere una perturbación del sistema, que se consigue aplicando un campo magnético oscilatorio B_1 (pulso de radiofrecuencia) perpendicularmente al campo externo y mucho más pequeño que éste. Cuando la energía que proporciona el pulso

¹¹⁹ Leoncio Garrido. *Rev. Plásticos Modernos*. **2002**, 83, 485-489.

es igual a la diferencia en energía entre los dos niveles, se produce la absorción de energía y el salto de un espín nuclear del nivel más bajo al más alto. Esta frecuencia se denomina frecuencia de Larmor o frecuencia de resonancia, ν_0 , y es directamente proporcional al campo magnético aplicado:

$$\nu_0 \text{ (en Hz)} = \Delta E / h = \gamma B_0 / 2\pi$$

Después de la perturbación, el sistema vuelve al equilibrio con el entorno (*lattice*) mediante un proceso de relajación de primer orden caracterizado por un tiempo T_1 , tiempo de relajación longitudinal. En promedio, un núcleo no permanece en un nivel de energía por un tiempo superior a T_1 , así que se puede estimar el ancho mínimo de un pico de resonancia a partir del principio de incertidumbre de Heisenberg:

$$\Delta E \Delta t \geq h \equiv (h \nu_{1/2}) T_1 \geq h \rightarrow \nu_{1/2} \geq 1 / T_1$$

Donde $\nu_{1/2}$ representa la anchura del pico a la mitad de su altura. Experimentalmente la anchura de los picos es superior al calculado con la ecuación anterior. Esto se debe a que existen varios tipos de interacciones entre el conjunto de espines del sistema y estas interacciones dependen de la orientación microscópica de los átomos o moléculas en el campo magnético.

La interacción directa de los espines nucleares con el campo magnético externo es conocida como la interacción Zeeman y da lugar al espectro de absorción de RMN. Sin embargo, las propiedades del conjunto están determinadas por el Hamiltoniano:

$$H = H_Z + H_D + H_\delta + H_J + H_Q + H_{rf}$$

donde H_Z representa la interacción Zeeman, H_D la interacción dipolar (homo- y hetero-nuclear), H_δ es la interacción del desplazamiento químico, H_J es la interacción asociada con el acoplamiento electrón-espín nuclear, H_Q es la interacción cuadrupolar para núcleos con espín nuclear $I > 1/2$, y H_{rf} es la interacción con el campo oscilante aplicado.

En sistemas con gran movilidad molecular, como ocurre en el caso de RMN en disolución, las contribuciones de H_D y H_Q se promedian a un valor cero dentro del tiempo de medida. Esto no ocurre en el caso de sistemas sólidos o muy viscosos, donde además, la anisotropía del desplazamiento químico contribuye al ensanchamiento de los picos de RMN y enmascara la información asociada a cada uno de ellos. Las principales diferencias entre las propiedades de RMN en disolución y en estado sólido se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades de RMN de compuestos en disolución y en estado sólido.

Propiedad de RMN sólido	Disolución	Estado sólido
Tiempo de relajación longitudinal, T_1	< 5 s	> 5 s
Tiempo de relajación transversal, T_2	10^{-2} - 1 s	< 10^{-3}
Interacción dipolar, H_D	≈ 0	> varios kHz
Interacción cuadrupolar, H_Q	≈ 0	de kHz a MHz
Anisotropía de δ	≈ 0	< 100 ppm

En un experimento de RMN en estado sólido, los núcleos presentan una interacción dipolar entre ellos que no se observa cuando están en disolución. La reducción de movilidad molecular en sólidos impide que la interacción dipolo-dipolo (H_D) se promedie a cero. Como la frecuencia de resonancia de un núcleo depende del campo magnético que experimenta, y puesto que el campo local varía apreciablemente de un punto a otro de la muestra debido a la influencia de los espines vecinos, hay una dispersión significativa en las frecuencias de resonancia, lo cual origina un pico cuya anchura es varios órdenes de magnitud superior a la que se observa en líquidos. La interacción dipolar que origina el ensanchamiento del espectro de RMN tiene un componente geométrico y otro asociado a los espines del sistema:

$$H_D = f(\theta; I_1, I_2)$$

Así, la contribución de la interacción dipolar se puede minimizar manipulando el factor de dependencia geométrica, mediante rotación mecánica de la muestra, o modulando la respuesta del sistema de espines con una secuencia de pulsos específica. En el primer caso, la rotación mecánica de una muestra cilíndrica sobre su eje axial a un ángulo β con respecto a la dirección del campo magnético externo hace que la función angular ($\langle 1 - 3 \cos^2 \theta_{12} \rangle$) sea igual a cero, cuando β es igual a 54.74° . Este ángulo se conoce como “ángulo mágico” y la técnica se denomina rotación del ángulo mágico o *magic angle spinning* (MAS).

La técnica de MAS es capaz de conseguir una reducción significativa en el grado de ensanchamiento de un pico, sobre todo en el caso de sistemas de espines aislados.

En el caso de suspensiones celulares o tejidos, el ensanchamiento de los picos observado en el espectro es debido a la naturaleza semi-sólida de las muestras, que presentan interacciones dipolo-dipolo, anisotropía del desplazamiento químico (*chemical shift anisotropy*, CSA) y, además, diferencias locales en la susceptibilidad magnética. Con MAS se reduce el ensanchamiento de picos debido a los componentes isotrópicos de la susceptibilidad magnética y CSA.^{120,121} Así, se mejora la resolución de los espectros de ¹H-RMN de tejidos, membranas y otras muestras biológicas.^{122,123,124}

Otra característica de los espectros de muestras biológicas es la presencia de la señal del agua, que domina el espectro. Se han estudiado varios métodos para suprimir la señal del agua.¹²⁵ En nuestro caso se utilizó la presaturación por radiación continua con un pulso débil, que permitió el análisis de metabolitos presentes en células de glioma C6.

En este trabajo se han obtenido los espectros de ¹H-RMN utilizando MAS y aplicando una secuencia de pulsos optimizada para el caso concreto de nuestras suspensiones de células de glioma C6.

En la Tabla 2 se recogen algunas señales correspondientes a metabolitos que se encuentran presentes en el cerebro y en concreto en células C6.^{126,127,128}

¹²⁰ Maricq, M. M.; Waugh, J. S. *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 3300-3316.

¹²¹ VaderHart, D. L.; Earl, W. L.; Garroway, A. N. *J. Magn. Reson.* **1981**, *44*, 361-401.

¹²² Cheng, L. L.; Lean C. L., C.; Bogdanova, A.; Wright, S. C. Jr.; Ackerman J. L.; Brady, J.; Garrido, L. *Magn. Reson. Med.* **1996**, *36*, 653-658.

¹²³ Gross, D.; Bertuzzi, F.; Cerasi, E.; Melloul, D. *J. Magn. Reson. B.* **1995**, *106*, 187-190.

¹²⁴ Volke, F., Pampel, A. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 1960-1965.

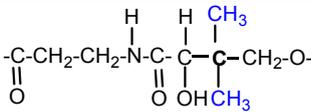
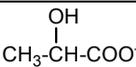
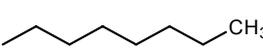
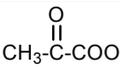
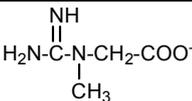
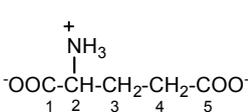
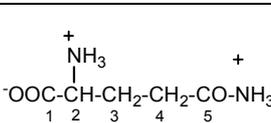
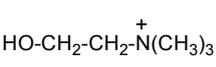
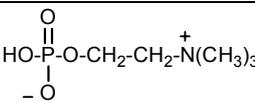
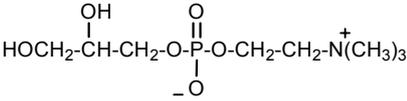
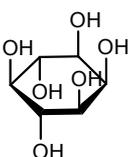
¹²⁵ Warschawski, E.; Devaux, F. *J. Magn. Reson. B.* **1995**, *106*, 76-79.

¹²⁶ Rémy, C.; Arús, C.; Ziegler, A.; Sam Lai, E.; Moreno, A.; Le Fur, Y.; Décorps, M. *J. Neurochem.* **1994**, *2*, 166-179.

¹²⁷ Govindaraju, V.; Young, K.; A. Maudsley, A. *NMR Biomed.* **2000**, *13*, 129-153.

¹²⁸ Valverde, D.; Quintero, M. R.; Candiota, A. P.; Badiella, L.; Cabañas, M. E.; Arús, C. *NMR in Biomedicine.* **2006**, *19*, 223-230.

Tabla 1. Estructuras químicas de metabolitos observables en el cerebro de mamíferos por ¹H RMN.

Metabolito	Estructura ^a	Grupo químico	ppm
CoA		CH ₃	0.73,0.87
Lactato (Lac)		β-CH ₃	1.32
Lípidos		CH ₃ CH ₂	0.90 1.30
Acetato		CH ₃	1.90
Piruvato		CH ₃	2.35
Creatina (Cr)		N-CH ₃ N-CH ₂	3.04 3.93
Glutamato		² CH ³ CH ₂ ⁴ CH ₂	3.74 2.04,2.12 2.33,2.35
Glutamina		² CH ³ CH ₂ ⁴ CH ₂	3,76 2.14,2.12 2.44,2.46
Colina (Cho)		N-(CH ₃) ₃ O-CH ₂ CH ₂ -N	3.19 3.50-4.05
Fosfocolina (PC)		N-(CH ₃) ₃ O-CH ₂ CH ₂ -N	3.22 3.60-4.24
Glicerofosfocolina (GPC)		N-(CH ₃) ₃ O-CH ₂ CH ₂ -N	3.24 3.70-4.34
Mioinositol (mi)		H-1,3 H-2 H-5 H-4,6	3.55/3.53 4.06 3.29 3.61

^a Estructura del ácido pantoténico que aparece en el coenzima A.