

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química
(UPV-CSIC)

Departamento de Química



*Síntesis de Derivados Fotoactivos de Ácidos Biliares para
Aplicaciones Biológicas*

TESIS DOCTORAL

Jana Rohacova

Valencia 2010

D. Miguel Ángel Miranda Alonso, Catedrático de Química de la Universidad Politécnica de Valencia y Dña. M^a Luisa Marín García, Profesora Titular de la Universidad Politécnica de Valencia,

CERTIFICAN: que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Síntesis de Derivados Fotoactivos de Ácidos Biliares para Aplicaciones Biológicas**” ha sido desarrollada por Jana Rohacova, bajo su dirección, en el Instituto Universitario Mixto de Tecnología Química (UPV-CSIC) de la Universidad Politécnica de Valencia.

Miguel A. Miranda Alonso

M^a Luisa Marín García

Agradecimientos

La vida es un camino largo y un doctorado es tan sólo una corta etapa. Aun así, tuve tiempo suficiente para conocer a muchas personas de las cuales me acordaré toda la vida. Estas personas me han ayudado y apoyado, incluso en ocasiones me han criticado, pero siempre han estado a mi lado. Quisiera que en estas líneas se reflejara mi más sincero agradecimiento para todos ellos.

Muchísimas gracias a todos!

Poděkování

Život je běh na dlouhou trať a doktorát je s ním nesrovnatelně krátký. Přesto jsem měla příležitost poznat mnoho osob, na které budu vzpomínat jen v dobrém. Na ty, kteří mne podporovali a pomáhali, občas i kritizovali, ale vždy stáli při mně. Ráda bych jim těmito řádky vyjádřila mé upřímné poděkování.

Všem mnohokrát děkuji!

Índice

Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Ácidos Biliares.....	1
1.2. Fisiología de los Ácidos Biliares y Circulación Enterohepática.....	3
1.3. Alteraciones en la Circulación Enterohepática y Enfermedades Hepatobiliares	8
1.4. Análisis de la Situación	10
Capítulo 2. Objetivos / Aims	13
Capítulo 3. Síntesis de Derivados Fotoactivos de los Ácidos Biliares	15
3.1. Introducción.....	15
3.2. Derivados Fotoactivos de Ácido Cólico.....	17
3.2.1. Aminofluoresceína	17
3.2.2. Transformación de Ácido Cólico en los 3 α -, 3 β -, 7 α -, 7 β - Aminoderivados	19
3.2.3. Nitrobenzofurazano.....	21
3.2.4. Dansilo	23
3.2.5. Carprofeno	24
3.2.6. Aminoftalimida	25
3.2.7. Bimano.....	26
3.2.8. Otros Ácidos Biliares con Nitrobenzofurazano	27
3.3. Conclusiones.....	29
Capítulo 4. Propiedades Fotofísicas de los Derivados Fotoactivos de los Ácidos Biliares	31
4.1. Introducción.....	31
4.2. Caracterización Fotofísica de los Derivados Sintetizados	33
4.2.1. Derivados de Aminofluoresceína	33
4.2.2. Derivados de Nitrobenzofurazano	38
4.2.3. Derivados de Dansilo.....	42
4.2.4. Otros Derivados Fotoactivos de Ácido Cólico.....	46
4.3. Conclusiones.....	48

Capítulo 5. Interacciones de los Derivados Fotoactivos de los Ácidos Biliares con Proteínas	51
5.1. Introducción.....	51
5.2. Interacciones de los Ácidos Biliares con Albúmina Sérica Humana	53
5.2.1. Derivados de Nitrobenzofurazano	54
5.2.2. Derivados de Dansilo	66
5.3. Conclusiones.....	74
Capítulo 6. Medidas de Transporte en Modelos Celulares	77
6.1. Introducción.....	77
6.2. Aplicación de Citometría de Flujo con los Derivados Sintetizados	78
6.2.1. Derivado de Aminofluoresceína.....	78
6.2.2. Derivados de Nitrobenzofurazano	80
6.2.3. Derivados de Dansilo.....	84
6.3. Conclusiones.....	86
Capítulo 7. Parte Experimental	89
7.1. Instrumentación.....	89
7.2. Materiales y Métodos	90
Capítulo 8. Referencias Bibliográficas.....	123
Conclusiones Generales / Conclusions.....	133
Resúmenes	137
Anexo I. Espectros de ¹H RMN	
Anexo II. Publicaciones Derivadas de la Presente Tesis Doctoral	

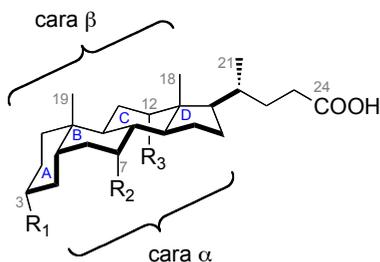
Capítulo 1

Introducción

1.1. Ácidos Biliares

Los ácidos biliares (BAs) son una familia de esteroides sintetizados en los hepatocitos del hígado durante el catabolismo del colesterol.^[1]

La estructura común a todos los BAs consta de dos partes principales (Figura 1.1): un núcleo rígido de esteroide y una cadena alifática corta; existen además dos metilos angulares C-18 y C-19. El núcleo de esteroide está formado por tres ciclohexanos (anillos A, B y C) y un ciclopentano (anillo D). Su característica más singular respecto a otros esteroides naturales es la fusión *cis* entre los anillos A y B. Desde el punto de vista de su polaridad, los BAs presentan un carácter anfifílico, ya que su cara β es hidrofóbica y su cara α es hidrofílica.^[2]



$R_1=R_2=R_3=OH$: Ácido cólico (ChA)

$R_1=R_2=OH$, $R_3=H$: Ácido quenodesoxicólico (CdcA)

$R_1=R_3=OH$, $R_2=H$: Ácido desoxicólico (DcA)

$R_1=OH$, $R_2=R_3=H$: Ácido litocólico (LcA)

Figura 1.1: Estructuras de los ácidos biliares más importantes.

Los ácidos cólico (ChA) y quenodesoxicólico (CdcA) se denominan ácidos biliares primarios y pueden existir en forma libre, pero mayoritariamente (más del 90%) se encuentran conjugados con aminoácidos como la glicina o la taurina. Estos conjugados de ácidos biliares juegan un papel importante en la digestión y absorción de grasas. A partir de los ácidos biliares primarios se forman, por un proceso metabólico natural, los ácidos biliares secundarios: el ácido desoxicólico (DcA) y el ácido litocólico (LcA), respectivamente.

Biosíntesis de Ácidos Biliares Primarios

Los BAs primarios se biosintetizan en los hepatocitos pericentrales del hígado a partir del colesterol. Es un proceso complejo multienzimático en el cual el colesterol - una molécula insoluble en agua, sin carga, que forma parte de la

membrana - es convertido en ácido biliar, una molécula anfifílica, soluble en agua a pH fisiológico y que actúa como detergente.

Se han descrito diferentes rutas para la transformación del colesterol en los dos ácidos biliares primarios, la ruta clásica y la alternativa. La ruta clásica conduce a la formación de ácido cólico; la enzima limitante de la velocidad es la colesterol-7-alfa-hidroxilasa (CYP7A1), expresada únicamente en los hepatocitos del hígado.^[3-4] Por otra parte, la ruta alternativa finaliza en la producción de ácido quenodesoxicólico y se lleva a cabo principalmente en las membranas internas mitocondriales. La ruta clásica es la predominante y explica que aproximadamente el 50% de la reserva total de BAs en humanos consista en ácido cólico, mientras que el ácido quenodesoxicólico represente aproximadamente el 30%.^[5]

Tras su biosíntesis y antes de abandonar los hepatocitos, los BAs se conjugan con taurina (Tau) o glicina (Gly) en los peroxisomas (orgánulos citoplasmáticos que contienen oxidasas y catalasas).^[6] Así conjugados se convierten en ácidos fuertes, $pK_a(\text{Gly}) \sim 4-5$, $pK_a(\text{Tau}) < 2$,^[7] de forma que están completamente ionizados en el intervalo de valores de pH presentes durante la digestión.

Propiedades Bioquímicas de los Ácidos Biliares

Los BAs conjugados poseen una alta solubilidad en agua, junto con una baja capacidad de difusión a través de las membranas celulares del intestino. Esto permite conseguir una concentración suficientemente alta (concentración micelar crítica) para formar micelas,^[7-10] que se mezclan con los lípidos (lecitina, glicéridos) durante la digestión, formando micelas mixtas (Figura 1.2).

La forma de las micelas en general es cilíndrica, pero puede llegar a ser esférica dependiendo de la proporción lípido-BA; su superficie está cargada negativamente. A su vez, las micelas son transportadoras de lípidos y vitaminas liposolubles a lo largo del tracto gastrointestinal.^[11] Por ejemplo, la solubilidad del colesterol en agua ($\sim 1 \text{ nM}$) se puede incrementar hasta un millón de veces en presencia de micelas de ácidos biliares.^[12-13]

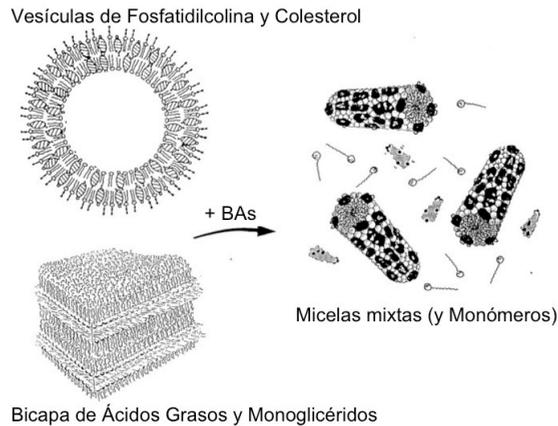


Figura 1.2: Conversión de vesículas o bicapas lipídicas en micelas cilíndricas mixtas.

Citotoxicidad

Los BAs son citotóxicos cuando su concentración se incrementa hasta niveles anormalmente elevados, tanto intracelular como extracelularmente. La citotoxicidad de BAs depende de su estructura siendo proporcional a la hidrofobicidad.^[14-15]

Hasta ahora, la toxicidad intracelular atribuida a BAs conjugados fue establecida con certeza sólo para células de hepatocitos. Así, cuando su concentración supera su capacidad de unión a proteínas del citosol, los BAs entran en otros orgánulos, posiblemente interfiriendo con su actividad y dañando la membrana canalicular. En el hepatocito, la acumulación de BAs conduce a daño mitocondrial y finalmente a apoptosis o necrosis.^[16-17]

1.2. Fisiología de los Ácidos Biliares y Circulación Enterohepática

Durante una comida, los BAs se liberan de la vesícula biliar y del hígado al intestino delgado superior, pasan a lo largo del intestino delgado y se reabsorben en el epitelio del intestino delgado inferior hacia la sangre portal, regresando de nuevo al hígado. Este proceso de secreción y reabsorción es conocido como circulación enterohepática y puede tener lugar hasta diez veces al día.^[18-19]

El proceso desde la síntesis de BAs hasta la excreción pasando por la circulación enterohepática está estrictamente regulado por un complejo acuerdo de bombas químicas rápidas y otras mecánicas más lentas, la vesícula biliar y el

intestino delgado. Los hepatocitos, el único lugar donde se sintetizan nuevos BAs, son los responsables del mantenimiento de la reserva que en un adulto es entre 2 y 3 g, reemplazando con ello los 0.6 g perdidos por excreción al día. En la Figura 1.3 se muestra resumida la circulación enterohepática; las etapas más importantes están descritas brevemente a continuación en los siguientes apartados.

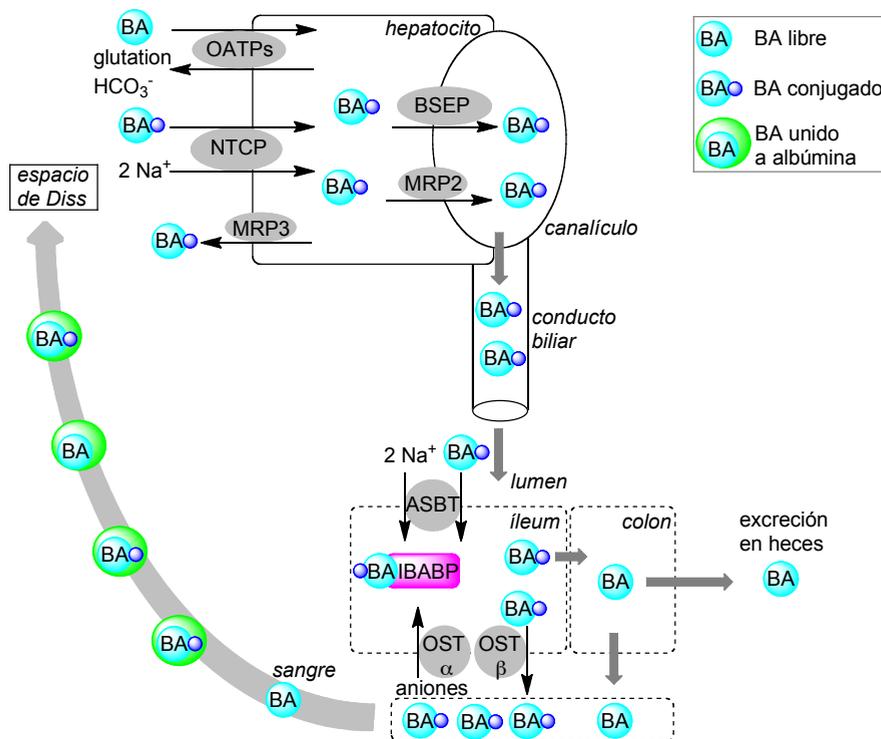


Figura 1.3: Circulación enterohepática.

Eflujo de los Hepatocitos

El comienzo de la circulación enterohepática se considera la entrada de los BAs al canalículo (red de espacios intracelulares con un ciego final en la zona pericentral). Los BAs son exportados a la bilis por la proteína exportadora de sales biliares (BSEP).^[20-22] Inicialmente se forman vesículas pero en condiciones de concentración supramicelar de BAs, las vesículas se transforman en micelas mixtas^[23] junto con el colesterol de las membranas (Figura 1.2, p. 3). De forma minoritaria los BAs (sobre todo los BAs 3α -sulfatados y -glucurónidos) son también

excretados a la bilis por una proteína menos específica, la proteína relacionada con la resistencia a múltiples fármacos MRP2.^[24-26]

Secreción de Bilis

La secreción de bilis está dividida en dos componentes, la fracción dependiente de los BAs (30 - 60%) y la fracción independiente de BAs asociada con la secreción biliar de glutationes y solutos inorgánicos.^[27] Considerando el componente BA-dependiente, la secreción de BAs al canalículo podría causar daño a la membrana canalicular; sin embargo, la presencia de BAs en el canalículo estimula al mismo tiempo la secreción de fosfolípidos y probablemente del colesterol que impide este proceso. Así, la presencia de estas moléculas protege contra los efectos tóxicos de los BAs.^[28] La proteína responsable de la secreción de fosfolípidos fue identificada como miembro de la familia de genes resistentes a múltiples fármacos MDR3^[29-30] y su deficiencia, en el hombre, conduce a colestasis intrahepática progresiva.^[31]

Transporte a través de los Enterocitos

La reabsorción de los BAs en el lumen intestinal representa la etapa determinante del tamaño de la reserva de BAs. Primero ocurre en el íleo y el paso inicial incluye la captación por el transportador apical de sales biliares dependiente de sodio (ASBT)^[32] que tiene más afinidad por el ácido quenodesoxicólico que por el taurocolato.^[33]

Tal como se había mencionado para el caso de los hepatocitos, es muy poco probable que los BAs atraviesen los enterocitos como monómeros libres, y el transporte intracelular es mediado por la proteína intestinal de unión a los ácidos biliares (IBABP),^[34] una proteína pequeña que se encuentra citoplasmáticamente ligada al ASBT y que une los BAs (en proporción BA:IBABP 2:1) inmediatamente después de su entrada a la célula.^[35]

Finalmente el eflujo de BAs desde el enterocito a la sangre portal es mediado por la proteína transportadora heteromérica de solutos (OST).

Colon

Los BAs que sufren absorción en el íleo terminal regresan al hígado a través de la sangre portal prácticamente inalterados. No obstante, una parte de los BAs entra en el colon. Ahí se encuentra con una gran población microbiana que los desconjuga y oxida los grupos hidroxilo conduciendo a la formación de BAs secundarios libres (Figura 1.4), los BAs mayoritarios en las heces.

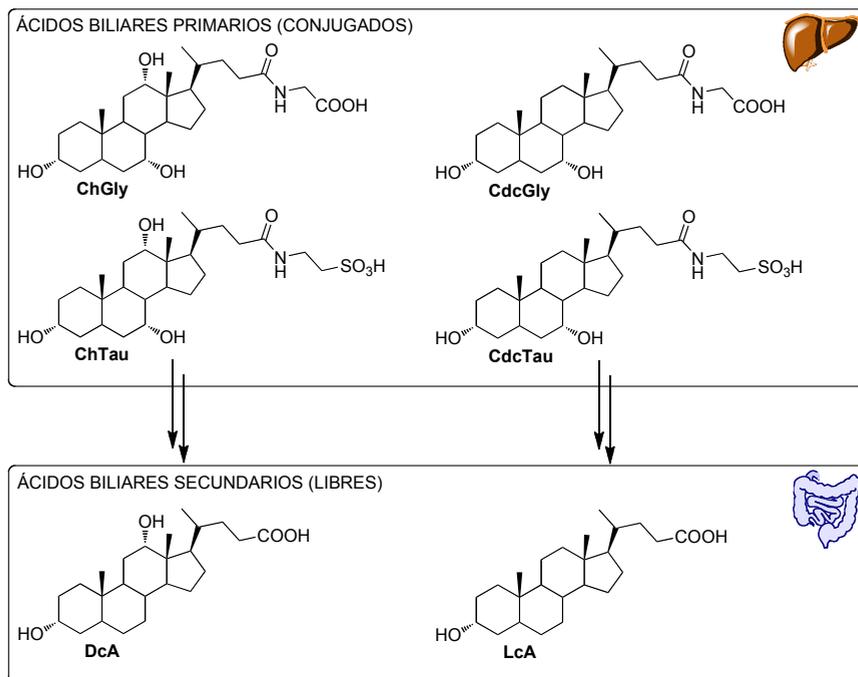


Figura 1.4: Metabolismo de los ácidos biliares.

La desconjugación es mediada por la hidrolasa de sales biliares y proporciona glicina y taurina como fuente celular de carbono, nitrógeno y azufre para la flora microbiana. Esta desconjugación implica a su vez el aumento de pK_a de los BAs limitando su ionización y permitiendo su captación pasiva.

La deshdroxilación de BAs en la posición C-7 es la transformación bacteriana más importante, formando rápidamente BAs secundarios y requiere de BAs desconjugados. La enzima específica responsable de esta transformación es la 7 α -deshidroxilasa, que transforma el ácido cólico (ChA) en el desoxicólico (DcA) y el ácido quenodesoxicólico (CdcA) en el litocólico (LcA). Estos BAs

secundarios son lipofílicos y atraviesan el colon pasivamente por difusión, entrando al suministro de sangre para regresar al hígado.

Los BAs que no se absorben desde colon se eliminan en las heces y la eliminación fecal está balanceada por la biosíntesis de nuevos BAs a partir de colesterol.

Transporte a través de la Sangre Portal

Los BAs regresan hasta el hígado a través de la sangre portal donde su concentración oscila entre 20 y 50 μM . En el plasma, los BAs circulan en su mayor parte unidos a la albúmina sérica humana. Alrededor del 60 - 80% de los ácidos trihidroxi-biliares y prácticamente todos los ácidos dihidroxi-biliares (> 95%) están unidos a la albúmina. No obstante, se ha demostrado también cierta afinidad a lipoproteínas de alta densidad.^[36]

Captación Hepática

Los BAs unidos a proteína en el plasma entran al espacio de Diss y allí ocurre la disociación de los BAs de la albúmina gracias a los cambios conformacionales que ésta sufre cuando se produce el contacto con la membrana basolateral de los hepatocitos.^[37] Los BAs son captados e introducidos en los hepatocitos por el polipéptido cotransportador de taurocolato sódico (NTCP) y los polipéptidos de transporte de aniones orgánicos (OATP).^[38-40]

El NTCP^[41] es una proteína que transporta tanto los BAs conjugados como no conjugados; sin embargo alrededor del 75% de la captación de taurocolato por los hepatocitos depende de NTCP.^[42-43]

En cuanto al conjunto de miembros de la familia de polipéptidos de transporte de aniones orgánicos (OATP),^[38] éstos son independientes de la concentración de sodio y muestran una extensa especificidad, transportando BAs no conjugados y otros aniones orgánicos como toxinas fisiológicas o xenobióticos.

Los BAs que llegan de nuevo al hígado por la vena portal, se reencuentran con nuevos ácidos biliares primarios, y se reconjugan con la glicina o la taurina y almacenan en la vesícula biliar en concentraciones extremadamente elevadas (> 300 mM).

Los BAs son normalmente liberados con gran eficiencia de la sangre pero en circunstancias de colestasis, cuando el traspaso de BAs a través de los

hepatocitos así como la secreción a la bilis están impedidos, los BAs pueden ser secretados desde los hepatocitos a la sangre.^[44] Hay evidencia de que la proteína relacionada con resistencia a múltiples fármacos 3 (MRP3), un transportador basolateral con baja expresión en hepatocito normal, puede transportar ácido glicocólico pero no los tauro- conjugados.^[45]

Transporte a través de los Hepatocitos

Los detalles del transporte intracelular de BAs a través de los hepatocitos están poco claros. Varios grupos de investigación demostraron una gran importancia de pequeños orgánulos en ese transporte, como por ejemplo el retículo endoplasmático liso, el aparato de Golgi^[46] o el citoplasma.^[47] Otros autores han descrito que la enzima 3alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa tiene una función clave en el transporte a través de los hepatocitos.^[48-49] Sea cual sea el mecanismo, los BAs entran al canalículo biliar para empezar un nuevo ciclo de la circulación enterohepática.

1.3. Alteraciones en la Circulación Enterohepática y Enfermedades Hepatobiliares

A lo largo de la circulación enterohepática pueden aparecer ciertas disfunciones como, por ejemplo, alteraciones en el movimiento entre órganos, alteraciones en la formación de BAs, disfunciones en el transporte a través de la membrana o alteraciones que involucran la desconjugación bacteriana o la deshidroxilación.^[50] A continuación, se describe la más importante de todas ellas, la colestasis.

Colestasis

El término colestasis comprende todas las situaciones en las cuales existe una alteración en el flujo normal de la bilis desde el polo canalicular del hepatocito hasta el duodeno.^[51] Por ello, cualquiera que sea su causa, se asocia a un aumento de las concentraciones de compuestos que son normalmente excretados en la bilis, tales como los ácidos biliares, la bilirrubina y las enzimas fosfatasa alcalina y otras. Además, como consecuencia de la retención de compuestos potencialmente tóxicos dentro del hepatocito puede producirse la necrosis de

estas células. La colestasis extrahepática (que ocurre fuera del hígado) puede ser provocada principalmente por tumores, estenosis, quistes, diverticulitis u otro daño en las vías biliares. Asimismo, la colestasis intrahepática (que ocurre dentro del hígado) puede ser causada por sepsis, abscesos bacterianos, fármacos, alimentación por vía intravenosa, linfoma, tuberculosis, sarcoidosis o amiloidosis, entre otros.

Desde el punto de vista mecánico, la colestasis puede suceder principalmente por alteración de la secreción de la bilis por el hepatocito; obstrucción de ductos biliares intrahepáticos, u obstrucción de los ductos biliares extrahepáticos. Estos mecanismos se pueden ver ilustrados en la Figura 1.5.

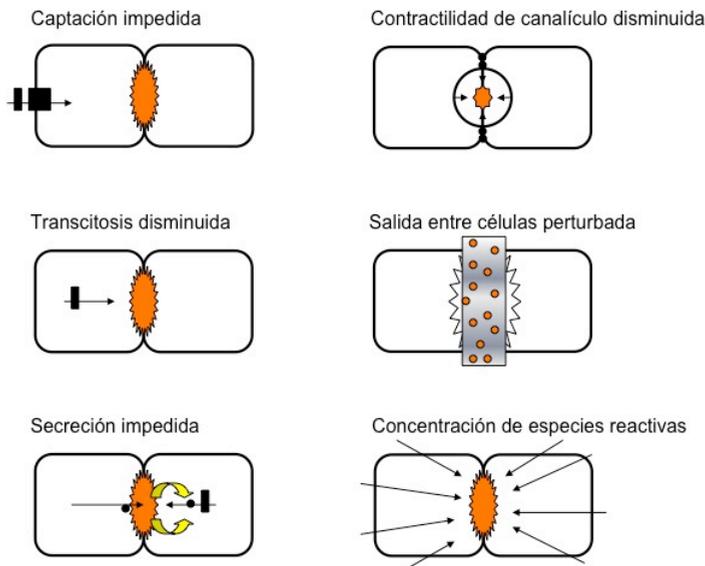


Figura 1.5: Seis posibles mecanismos de colestasis hepatocelular.

La formación normal de la bilis depende de distintos sistemas transportadores de membrana a lo largo de la ruta enterohepática en hepatocitos, colangiocitos y enterocitos.^[52-53] Las mutaciones hereditarias de genes de transportadores de los BAs o la exposición a lesión colestásica (por ejemplo fármacos, hormonas, obstrucción/destrucción biliar) tienen como resultado una función reducida del sistema transportador hepatobiliar que desempeña un papel importante en la patogénesis de la colestasis. Además de los cambios genéticos o adquiridos en los transportadores, pueden estar involucrados otros mecanismos

como la alteración de la polaridad celular, perturbación en la salida entre células y cambios en el citoesqueleto (Figura 1.5).^[54]

En general, los defectos adquiridos conducen a diferentes variantes de colestasis, como pueden ser la colestasis obstructiva, colestasis inducida por inflamación o colestasis inducida por fármacos.

Hasta ahora, el único “fármaco” aprobado para tratar los desordenes colestásicos es el ácido ursodesoxicólico ($3\alpha\text{-OH}$, $7\beta\text{-OH}$)^[55-57] que además de sus efectos anti-colestásicos también tiene otros efectos beneficiosos como disolver cálculos biliares y proteger las células de los efectos dañinos de otros BAs.^[58]

Algunos fármacos o sus metabolitos pueden causar colestasis inhibiendo la expresión y función de los transportadores hepatocelulares.^[59] Algunos fármacos pueden *cis*-inhibir directamente BSEP, el exportador de BAs ATP-dependiente, de manera competitiva (por ejemplo ciclosporina, rifampina, bosentan, troglitazona y glibenclamida).^[21,60-61] Además, algunas hormonas como los metabolitos de estrógeno o progesterona son capaces de *trans*-inhibir indirectamente la función de BSEP después de su secreción a la bilis *vía* MRP2.^[21] La inhibición de MRP2 por fármacos, como el antibiótico fusidato, puede conducir también a colestasis e ictericia.^[62] La secreción de fosfolípidos por MDR3 puede ser impedida por verapamilo, ciclosporina A y vinblastina, ya que ensayos *in vitro* han demostrado que estos compuestos son transportados por MDR3.^[63] Por último, las variaciones genéticas de transportadores pueden predisponer a la colestasis inducida por fármacos y esteroides. Todos los fármacos mencionados (y muchos más) que manifiestan efectos colestásicos se denominan hepatotóxicos.^[64]

1.4. Análisis de la Situación

Tal como se ha comentado, la circulación enterohepática es un ciclo complejo y en cada fase de la misma pueden ocurrir gran variedad de alteraciones. Es importante desde el punto de vista farmacológico y biológico comprender y establecer los mecanismos que están relacionados con toda esta problemática. La complejidad morfológica del hígado, la complejidad biológica del transporte transcelular, así como el conjunto de la circulación enterohepática de

ácidos biliares son objeto de investigación durante las últimas décadas.^[65-66] Existe una gran variedad de modelos celulares y últimamente se ha recurrido al uso de compuestos fluorescentes como herramienta. Así, los ácidos biliares modificados con un fluoróforo unido covalentemente se mostraron útiles para estudiar aspectos característicos del transporte de hepatocitos, enterocitos y colangiocitos.^[67-69] Por lo tanto, parecen muy prometedores para realizar estudios relacionados con la circulación enterohepática.

Por otra parte, la aparición de problemas relacionados con la hepatotoxicidad inducida por fármacos suele implicar su retirada del mercado. El desarrollo de un nuevo fármaco supera los doce años de investigación, requiere una inversión elevada e implica que finalmente sólo una de cada 10.000 moléculas investigadas será comercializada. Entre las etapas por las que pasa el desarrollo de nuevos fármacos hay que tener en cuenta la minimización de efectos no deseados como hepatotoxicidad y sería conveniente detectarla en los primeros ensayos pre-clínicos; sin embargo, estos tipos de toxicidad a largo plazo son difíciles de anticipar y su predicción se basa casi exclusivamente en experimentos con animales. Estos experimentos presentan multitud de inconvenientes: son caros, no recomendables desde el punto de vista ético y, además, sus resultados no siempre son extrapolables a humanos. Ante esta situación surge la necesidad de desarrollar sistemas *in vitro* que permitan predecir la toxicidad a largo plazo de nuevos fármacos en humanos. Con este fin, se requieren nuevos métodos y buenas herramientas capaces de analizar el potencial colestásico de fármacos. Hasta ahora, para identificar efectos colestásicos existen diversos métodos *in vitro* que se basan en modelos celulares, como por ejemplo el uso de hepatocitos suspendidos, aislados o en cultivo de “sandwich”. La estrategia más común para su evaluación se basa en el uso de derivados de ácidos biliares, o bien marcados isotópicamente o bien derivados fluorescentes.^[70-77]

Aunque los resultados obtenidos con ácidos biliares marcados isotópicamente son muy alentadores, presentan el inconveniente de su precio y dificultad de manejo. Por ello parece más interesante poner a punto nuevos métodos que permitan el empleo de derivados fluorescentes en técnicas capaces de predecir el potencial colestásico de nuevos fármacos.

Capítulo 2

Objetivos

Objetivos

Tal como se ha comentado en la introducción, la circulación enterohepática es un proceso muy complejo y cada vez más se recurre al uso de nuevas técnicas, más precisas, rápidas e innovadoras para su estudio. En este contexto, se plantea el empleo de derivados fluorescentes de ácidos biliares para aclarar y aportar nueva luz a diferentes procesos relacionados con la circulación enterohepática. Para lograr este propósito, se plantean los siguientes objetivos concretos de la presente tesis doctoral:

1. Sintetizar derivados fluorescentes de los ácidos biliares empleando fluoróforos comerciales que alteren lo menos posible la estructura del ácido biliar. Se empleará principalmente el ácido cólico para la síntesis, por ser el ácido biliar más abundante.
2. Caracterizar fotofísicamente los derivados de los ácidos biliares y determinar sus propiedades en estado fundamental (absorción), en estado excitado singlete (utilizando técnicas de fluorescencia en estado estacionario y en tiempo resuelto) y en estado excitado triplete (mediante fotólisis de destello láser).
3. Estudiar las interacciones de los derivados de ácidos biliares con albúmina sérica humana, uno de los transportadores principales de los ácidos biliares a través de la sangre portal.
4. Estudiar el comportamiento de algunos derivados con modelos celulares con objeto de anticipar efectos colestásicos de fármacos. En concreto, poner a punto ensayos con células de hepatocitos utilizando la técnica de citometría de flujo para monitorizar la captación hepática de derivados de ácidos biliares y la influencia de fármacos en la misma.

Aims

The enterohepatic circulation is a very complex process; hence more and more precise, fast and innovative techniques are required to understand every single step. In this context, we propose the use of fluorescent bile acid derivatives to gain some insight into different processes related to the enterohepatic circulation. The following specific goals will be addressed in the present doctoral thesis:

1. To synthesize fluorescent bile acid derivatives employing commercial fluorophores that produce minimal alteration in the structure of the bile acid. Cholic acid will mainly be used as bile acid, since it is the most abundant.
2. To characterize the photophysical properties of the synthesized bile acid derivatives. Specifically, to determine their properties in the ground state (absorption), in the singlet excited state (steady state and time resolved fluorescence) and also in the triplet excited state (by means of laser flash photolysis).
3. To investigate the interactions of the bile acid derivatives with human serum albumin, one of their principal carriers in portal blood.
4. To examine the potential of some of the fluorescent bile acid derivatives with cellular models to predict drug cholestatic effects. Specifically, to optimize flow cytometry experiments with hepatocytes to monitor hepatic uptake of the bile acid derivatives and its alteration in the presence of cholestatic drugs.

Capítulo 3

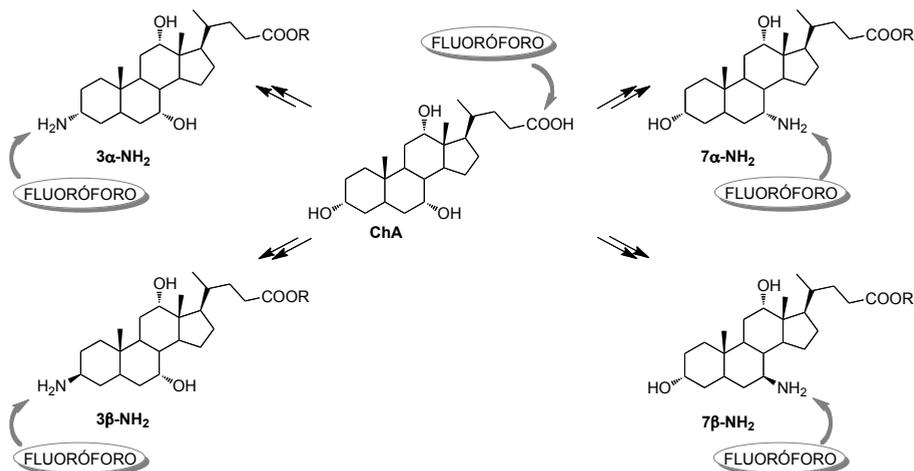
Síntesis de Derivados Fotoactivos de los Ácidos Biliares

3.1. Introducción

Tal como se ha comentado en los objetivos, en la síntesis se utilizará principalmente ácido cólico como ácido biliar. Éste dispone de tres grupos hidroxilo (en posiciones C-3, C-7 y C-12) y un grupo carboxílico; por lo tanto, su estructura permite sintetizar una familia amplia de derivados, más aún si tenemos en cuenta una estereoquímica definida de cada grupo hidroxilo. La reactividad del ácido cólico está ampliamente descrita, lo que nos permitirá utilizar este conocimiento para derivatizar el ácido cólico según los objetivos planteados.

Así, el grupo ácido presente en la molécula de ácido biliar podría ser conjugado con un fluoróforo dando lugar a un éster o amida para conseguir derivados fluorescentes. Sin embargo, cabe destacar que el grupo ácido es fundamental en el transporte de ácidos biliares ya que permanece ionizado y permite su solubilidad en agua a pH fisiológico.

Por otra parte, para conjugar selectivamente los fluoróforos elegidos con un grupo hidroxilo sería más conveniente transformar éste previamente en un grupo amina, ya que la formación de aminas secundarias o amidas está más favorecida que la formación de éteres o ésteres; también requiere de unas condiciones experimentales más suaves que la formación de éteres y, por último conduce a productos más estables (amidas). Con esta idea se ha planteado preparar derivados de ácido cólico convirtiendo regioselectivamente uno de sus grupos hidroxilo en amina con una configuración definida (α o β) en las posiciones C-3 ó C-7 para, posteriormente, llevar a cabo la conjugación con el fluoróforo elegido. Desde un primer momento se descartó el hidroxilo en C-12 por ser mucho menos reactivo que los de C-3 y C-7. En el Esquema 3.1 se muestran las diferentes estrategias mencionadas para derivatizar el ácido cólico.



Esquema 3.1: Estrategias propuestas.

De los fluoróforos disponibles comercialmente se han elegido los siguientes: 4-aminofluoresceína (amF), 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD), dansilo (Dns), carprofeno (Cpf), 3-aminoftalimida (aFt) y bimano (Bm); sus estructuras se muestran en la Figura 3.1. El único fluoróforo que se conjugó con el grupo carboxílico del ácido cólico fue 4-aminofluoresceína, el resto de los fluoróforos fueron conjugados en las posiciones C-3 o C-7 del anillo de esteroide.

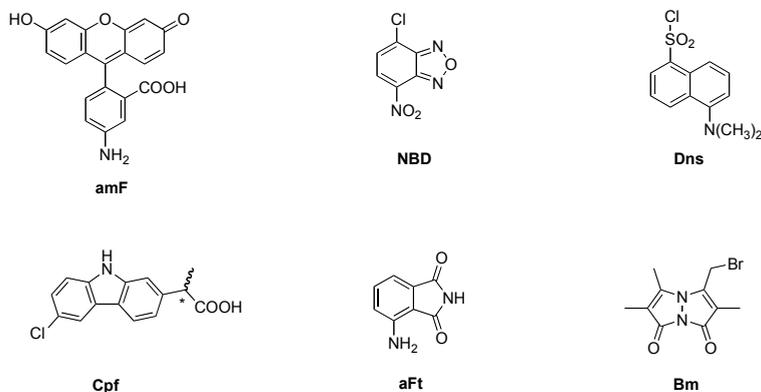


Figura 3.1: Fluoróforos empleados.

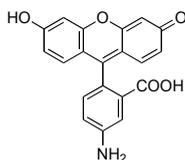
Existen antecedentes en la bibliografía de derivados fluorescentes de ácidos biliares que fueron empleados para aplicaciones biológicas (como por ejemplo microscopía, ensayos con células) o utilizados en química supramolecular^[78] como sensores aprovechando la conformación rígida de la

molécula. Por ello, algunos de los derivados fluorescentes sintetizados no serán nuevos.

3.2. Derivados Fotoactivos de Ácido Cólico

En primer lugar se describe la ruta sintética utilizada en la preparación del derivado de ácido cólico con aminofluoresceína. A continuación, en el siguiente apartado se describe la ruta que permite obtener los intermedios del ácido cólico que poseen los grupos amino en las posiciones 3α , 3β , 7α o 7β utilizados para la conjugación con NBD y Dns. Finalmente se describen las rutas sintéticas que se pusieron a punto para la conjugación del ácido cólico con el resto de los fluoróforos.

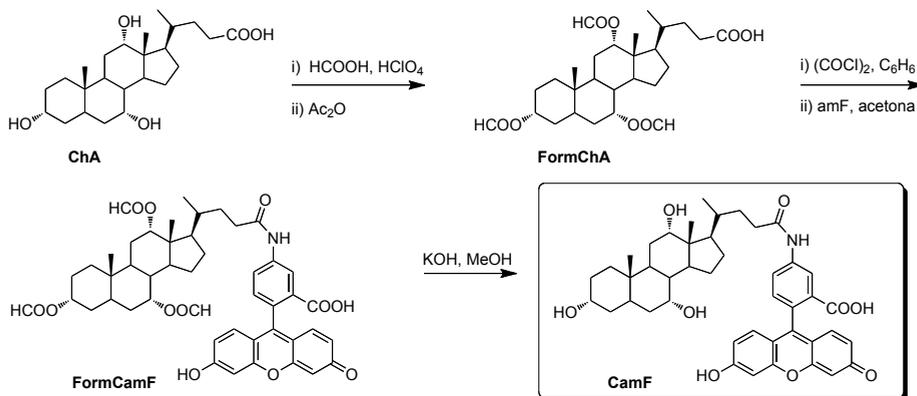
3.2.1. Aminofluoresceína (amF)



Tal como se ha comentado, parece importante mantener el grupo carboxílico libre para que la solubilidad del ácido cólico en agua a pH fisiológico esté asegurada. Sin embargo, con objeto de comenzar los ensayos con células (como se comentará más adelante), resultó interesante disponer rápidamente de un derivado fluorescente, por lo que se optó por utilizar 4-aminofluoresceína, un fluoróforo bien conocido, y conjugarlo con el grupo carboxílico del ácido cólico. El compuesto final que se obtuvo está descrito y es conocido como colilamidofluoresceína (CamF).^[72,79-80]

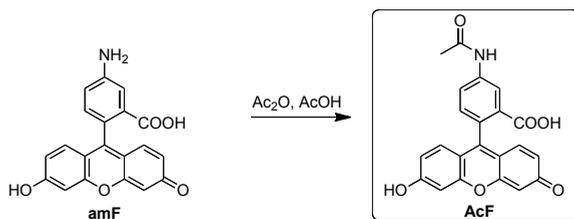
Brevemente, la ruta sintética descrita para su preparación se basó en la condensación de la 4-aminofluoresceína comercial con el ácido cólico utilizando EDC (*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida) como agente activador, en tampón piridina-HCl. No obstante, de esta forma se obtenían productos secundarios, debido a la presencia de dos grupos carboxilo y varios hidroxilos potencialmente reactivos. Por ello, propusimos una nueva ruta, que se muestra en el Esquema 3.2. Ésta se basó en la protección inicial de los grupos hidroxilo del ácido cólico como los correspondientes formiatos (**FormChA**); a continuación, la

activación del grupo carboxílico con cloruro de oxalilo permitió obtener el cloruro de ácido, que seguidamente se condensó con aminofluoresceína para formar la correspondiente amida (**FormCamF**). La posterior desprotección de los formiatos por medio de una hidrólisis básica condujo al derivado deseado **CamF**. El rendimiento global de la secuencia así optimizada fue del 49%.



Esquema 3.2: Síntesis de CamF.

Con objeto de ser utilizado como referencia para la caracterización fotofísica, se preparó un compuesto modelo. El compuesto modelo acetilaminofluoresceína (**AcF**) mucho más sencillo, se sintetizó en una sola etapa por acetilación de aminofluoresceína (Esquema 3.3).



Esquema 3.3: Síntesis de AcF.

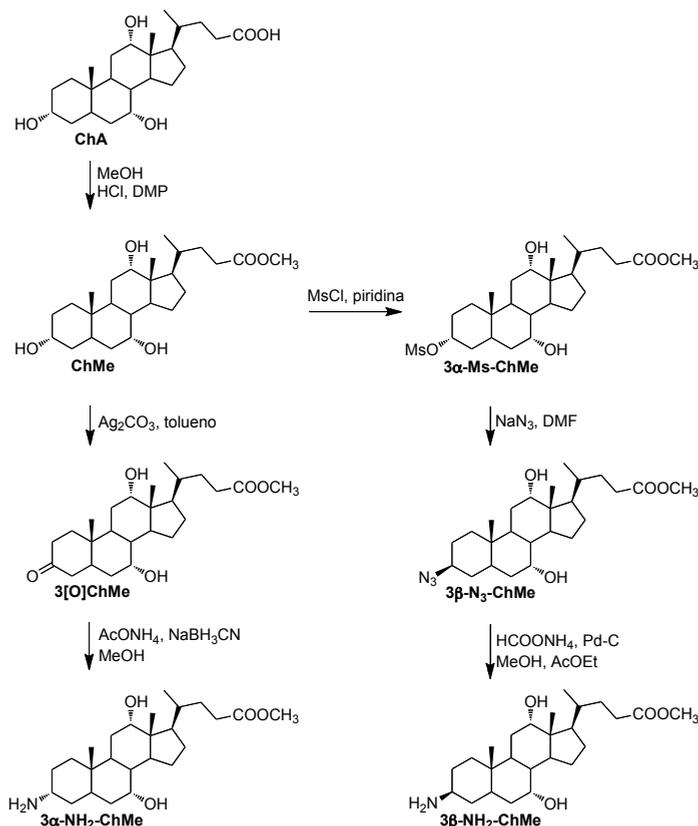
3.2.2. Transformación de Ácido Cólico en los 3 α -, 3 β -, 7 α -, 7 β -Aminoderivados

Para la conjugación de diferentes fluoróforos selectivamente en las posiciones 3 α , 3 β , 7 α o 7 β del ácido cólico se consideró conveniente transformarlo en los correspondientes aminointermedios que posteriormente se conjugarían directamente con el fluoróforo que dispusiera del grupo funcional adecuado.

Así pues, partiendo de ácido cólico se puede preparar una familia de intermedios versátiles que permitan la conjugación con otros fluoróforos. Aprovechando algunas de las reacciones descritas para el ácido cólico o introduciendo pequeñas modificaciones y combinándolas hemos optimizado otra nueva secuencia. La conversión del ácido cólico en los C-3 y C-7 aminoderivados se muestra en los Esquemas 3.4a y 3.4b, respectivamente.

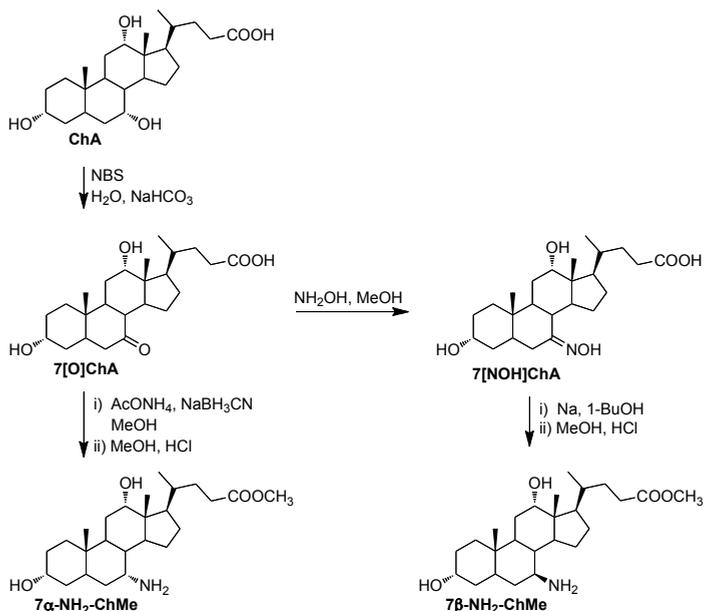
La secuencia sintética comenzó con la protección del grupo carboxílico en forma de éster metílico (**ChMe**) (Esquema 3.4a). A continuación, se llevó a cabo la oxidación regioselectiva del grupo hidroxilo en C-3 utilizando Ag₂CO₃ sobre Celite® (**3[O]ChMe**).^[81] El grupo carbonilo resultante se convirtió estereoselectivamente en el 3 α -amino (**3 α -NH₂-ChMe**) por medio de una aminación reductiva, utilizando NaBH₃CN como agente reductor y CH₃COONH₄ como fuente de amoniacó. El rendimiento global de las tres etapas para obtener este primer intermedio fue del 47%.

El derivado 3 β -amino se preparó en tres etapas a partir de **ChMe** (Esquema 3.4a). En primer lugar el grupo hidroxilo de C-3 se convirtió en un grupo mesilato (**3 α -Ms-ChMe**) y después se sometió a una sustitución con NaN₃ por un mecanismo de S_N2 (**3 β -N₃-ChMe**). La reducción de la azida resultante utilizando Pd-C como catalizador y HCOONH₄ como fuente de hidrógeno condujo a **3 β -NH₂-ChMe**. El rendimiento global de esta secuencia fue del 34%.

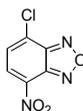

 Esquema 3.4a: Síntesis de los 3-NH₂ intermedios.

Para preparar los intermedios con el grupo amino en posición C-7 se realizó primero la oxidación regioselectiva del grupo hidroxilo en C-7 a partir de ChA, utilizando NBS (Esquema 3.4b).^[82] La aminación reductiva de **7[O]ChA** seguida de esterificación en MeOH/HCl condujo a **7α-NH₂-ChMe** con un rendimiento global de las dos etapas del 24%.

Finalmente, para obtener el 7β-diastereoisómero, **7[O]ChA** se convirtió en la correspondiente 7-oxima (**7[NOH]ChA**) por reacción con hidroxilamina; la posterior reducción utilizando sodio en 1-BuOH,^[83] seguida por esterificación, dio una mezcla (30:70) de **7α-** y **7β-NH₂-ChMe**, que no pudo ser resuelta en esta etapa. El rendimiento global de esta secuencia fue del 33%. La separación de los dos isómeros se llevó a cabo sin dificultad tras la conjugación con el fluoróforo.

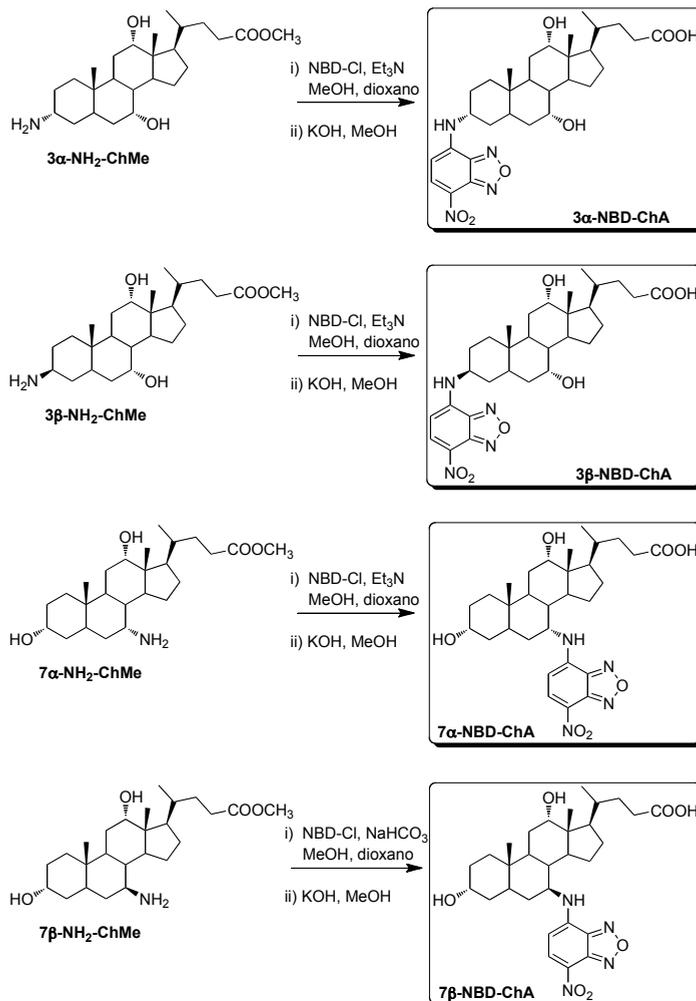

 Esquema 3.4b: Síntesis de los 7-NH₂ intermedios.

3.2.3. Nitrobenzofurazano (NBD)



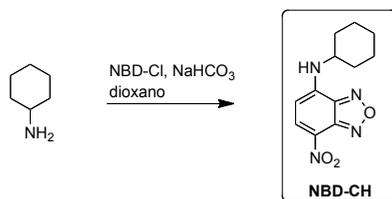
El 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (conocido como nitrobenzofurazano) es un fluoróforo pequeño (comercial en forma de 4-cloruro) que reacciona con aminas por un mecanismo de S_NAr. Además, existen varios derivados fluorescentes de ácidos biliares descritos que poseen este fluoróforo unido, bien a un grupo amino^[83] o bien a un grupo ácido carboxílico.^[84] A pesar de estar descritos, existían muy pocos detalles acerca de sus propiedades fotofísicas por lo que su preparación permitió realizar un estudio exhaustivo de los mismos.

Así, la conjugación de **3α-**, **3β-**, **7α-** y **7β-NH₂-ChMe** con cloruro de NBD condujo a **3α-**, **3β-**, **7α-** y **7β-NBD-ChMe** (con rendimientos moderados del 20 - 60%), los cuales tras desprotección final por medio de una hidrólisis básica se transformaron en los compuestos deseados **3α-**, **3β-**, **7α-** y **7β-NBD-ChA** (Esquema 3.5).



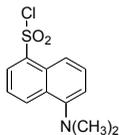
Esquema 3.5: Síntesis de los derivados de ácido cólico con NBD.

Se preparó además un compuesto modelo, que contenía únicamente el fluoróforo NBD y un anillo de ciclohexilo (**NBD-CH**) que sería utilizado en los estudios con proteínas. Éste se sintetizó en una sola etapa conjugando el NBD con ciclohexilamina en presencia de una base, con un rendimiento del 75% (Esquema 3.6).

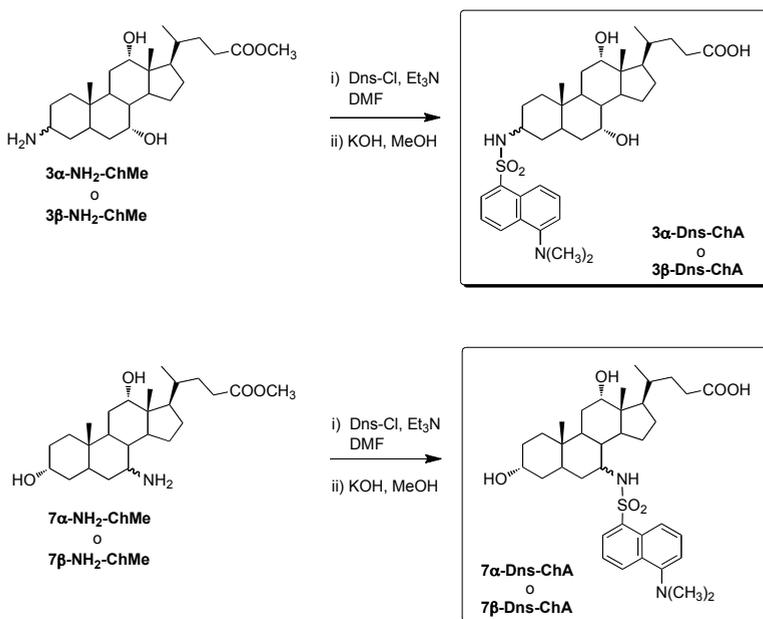


Esquema 3.6: Síntesis del compuesto modelo NBD-CH.

3.2.4. Dansilo (Dns)

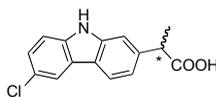


El fluoróforo dansilo es un derivado de naftaleno que posee un grupo sulfonilo en posición 1 y un grupo dimetilamino en la posición 5 (comercial en forma de cloruro de sulfonilo). Éste se puede utilizar para derivatizar los aminointermedios sintetizados previamente (apartado 3.2.2., p. 19) formando las correspondientes sulfonamidas que, en general, son compuestos estables frente a la hidrólisis básica posterior. Así, la conjugación de **3 α -**, **3 β -**, **7 α -** y **7 β -NH₂-ChMe** con cloruro de dansilo condujo a **3 α -**, **3 β -**, **7 α -** y **7 β -Dns-ChMe** (con rendimientos del 40 - 70%), que tras desprotección final por hidrólisis básica proporcionaron los compuestos deseados **3 α -**, **3 β -**, **7 α -** y **7 β -Dns-ChA** (Esquema 3.7).



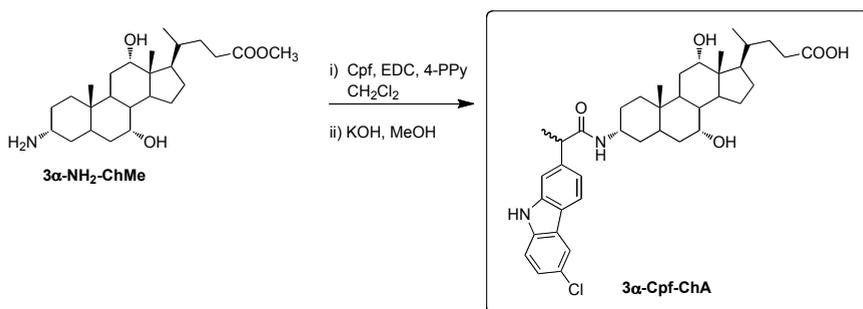
Esquema 3.7: Síntesis de los derivados de ácido cólico con Dns.

3.2.5. Carprofeno (Cpf)



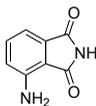
El carprofeno es un ácido 2-arilpropiónico perteneciendo a una familia de fármacos antiinflamatorios no esteroideos. Tiene un carbono asimétrico, por lo que se puede encontrar en dos formas enantioméricas. Sus propiedades fotofísicas son bien conocidas y fueron descritas en nuestro grupo de investigación.^[85-87] Con objeto de unirlo al ácido cólico se pensó utilizar el grupo ácido carboxílico de Cpf y el grupo amino de los derivados del ácido cólico lo que daría lugar a uniones amida que son estables frente a la hidrólisis básica posterior que sería necesaria para desproteger el éster metílico del ácido cólico. Teniendo en cuenta que el carprofeno enantioméricamente puro no se encuentra disponible comercialmente se pensó utilizarlo como mezcla racémica y proceder tras la unión con el ácido cólico a la separación de diastereómeros.

Se decidió emplear sólo el derivado 3 α -amino del ácido cólico. Así, la conjugación de 3 α -NH₂-ChMe con el Cpf racémico se llevó a cabo con EDC, un agente activador del grupo carboxílico, y 4-pirrolidinopiridina (4-PPy) como catalizador obteniendo el 3 α -Cpf-ChMe. Tras una hidrólisis básica se consiguió el producto final 3 α -Cpf-ChA como mezcla de diastereómeros (Esquema 3.8) con un rendimiento global del 15%.



Esquema 3.8: Síntesis de 3 α -Cpf-ChA.

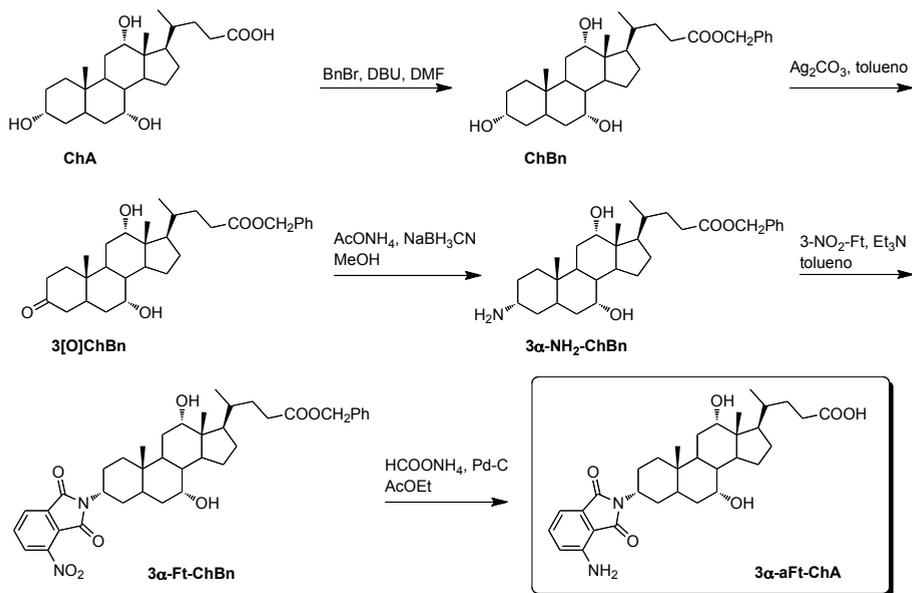
3.2.6. Aminoftalimida (aFt)



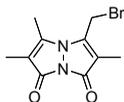
El fluoróforo 3-aminoftalimida posee un grupo amino en el anillo de fenilo que lo convierte, a diferencia de otros derivados de la familia de ftalimidas, en fluorescente. Este fluoróforo así no es comercial pero su precursor, el anhídrido 3-nitro-ftálico, sí lo es.

En un primer momento, se pensó en conjugar este cromóforo directamente con los amino-intermedios del ácido cólico preparados previamente. A continuación, se llevaría a cabo la reducción del grupo nitro por hidrogenación catalítica y la hidrólisis básica final daría lugar a los derivados deseados. Sin embargo, el grupo imida no resultó suficientemente estable frente a la hidrólisis básica por lo que se tuvo que recurrir a un grupo protector diferente del ácido carboxílico del ChA. Tras varios intentos se optó por emplear el éster bencílico como grupo protector (cuya desprotección se efectúa por hidrogenación catalítica). Así se pudo realizar la desprotección del bencilo y la reducción del grupo nitro de la ftalimida simultáneamente en la última etapa. Como en el caso del carprofeno, con este fluoróforo finalmente se optó por preparar solamente el derivado 3α del ácido cólico por medio de la secuencia completa que se muestra en el Esquema 3.9.

La secuencia comenzó con la protección del grupo carboxílico como éster bencílico (**ChBn**). A continuación, se realizó la oxidación regioselectiva del grupo hidroxilo en C-3 empleando Ag_2CO_3 soportado sobre Celite[®] (**3[O]ChBn**). El grupo carbonilo resultante se convirtió en un grupo amino por aminación reductiva, utilizando NaBH_3CN como agente reductor y $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ como fuente de amoníaco, proporcionando el grupo amino en posición 3α (**$3\alpha\text{-NH}_2\text{-ChBn}$**), conteniendo 10% de β -epímero. A continuación, éste se condensó con el anhídrido 3- NO_2 -ftálico (3- NO_2 -Ft), en presencia de una base, proporcionando el **$3\alpha\text{-Ft-ChBn}$** . Éste se sometió a una hidrogenación catalítica que provocó la reducción del grupo nitro y la desprotección simultánea del éster, llegando así al producto final (**$3\alpha\text{-aFt-ChA}$**). El rendimiento global de esta síntesis (5 etapas) fue del 26%.

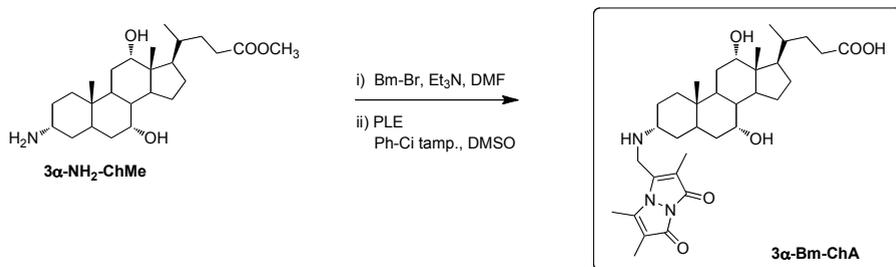

 Esquema 3.9: Síntesis de 3 α -aFt-ChA.

3.2.7. Bimano (Bm)



El bimano es un derivado de diimida que se utiliza habitualmente para marcaje y detección de tioles (en neuropéptidos, hemoglobina, etc.).^[88-89] No obstante, también podría ser empleado como fluoróforo que formara una amina secundaria con cualquiera de los intermedios 3 α , 3 β , 7 α o 7 β -amino del ácido cólico preparados anteriormente. Como en el caso anterior, con la ftalimida, el bimano es inestable en condiciones básicas, lo que impide usar el éster metílico como grupo protector. Sin embargo, un intento empleando el éster bencílico como grupo protector del ácido cólico resultó infructuoso debido a la ruptura del bimano durante la hidrogenación final. Así pues optamos de nuevo por el éster metílico como grupo protector que posteriormente se desprotegería recurriendo a una hidrólisis enzimática. En el caso de este fluoróforo se pensó de nuevo en preparar sólo un ejemplo representativo, así escogimos el 3 α -NH₂-ChMe (Esquema 3.10), como en casos anteriores.

La conjugación de bromobimano con el amino derivado (**3 α -NH₂-ChMe**) en presencia de una base condujo a **3 α -Bm-ChMe** que se sometió, a continuación, a una hidrólisis enzimática utilizando la esterasa porcina de hígado (PLE) en tampón fosfato-citrato (pH 5 - 5.5)^[90] para obtener el producto final **3 α -Bm-ChA**. El rendimiento de estos dos pasos fue del 22%.

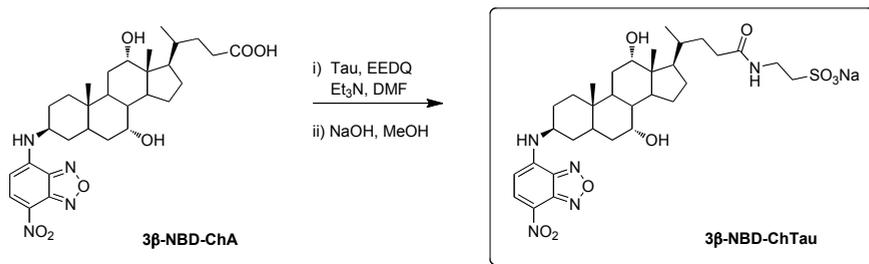


Esquema 3.10: Síntesis de 3 α -Bm-ChA.

3.2.8. Otros Ácidos Biliares con Nitrobenzofurazano

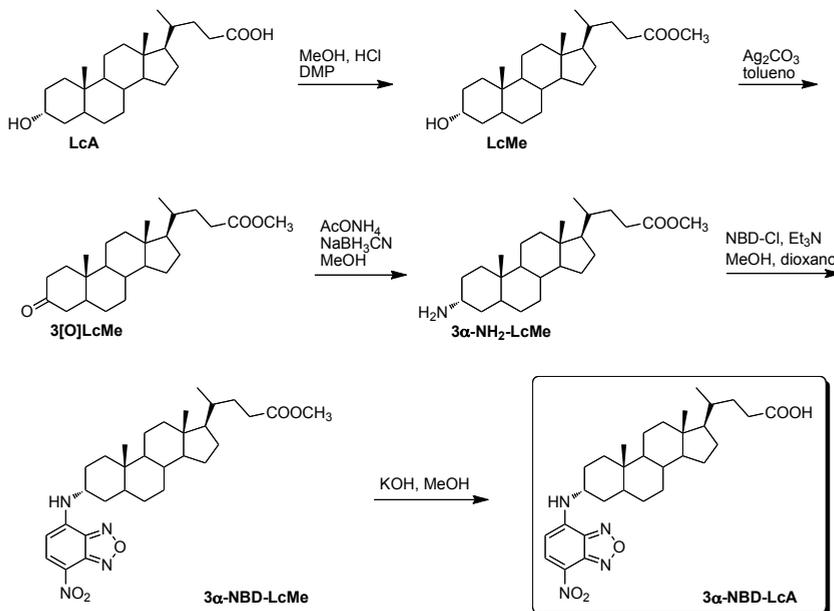
Además de los cinco derivados preparados empleando el fluoróforo nitrobenzofurazano (apartado 3.2.3., p. 21) se pensó en preparar derivados de otros ácidos biliares con el mismo fluoróforo. Estos resultarían útiles para completar los estudios de interacción con proteínas del capítulo posterior. En concreto, se eligieron dos: un derivado de taurocolato (**3 β -NBD-ChTau**), ya que es uno de las formas del ácido cólico más abundantes en el cuerpo y por otro lado un derivado de ácido litocólico (**3 α -NBD-LcA**), por ser el más hidrofóbico y tóxico.

El derivado fluorescente del ácido taurocólico, **3 β -NBD-ChTau**, se sintetizó en una etapa a partir de **3 β -NBD-ChA** según el método descrito para la transformación de ácidos biliares naturales en conjugados con taurina utilizando EEDQ (2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina) como agente activador, con un rendimiento del 68% (Esquema 3.11).^[91]



Esquema 3.11: Síntesis de 3β-NBD-ChTau.

El derivado **3α-NBD-LcA** se preparó a partir del ácido litocólico utilizando una estrategia idéntica a la empleada para el ácido cólico (Esquema 3.12), con un rendimiento global del 17%.



Esquema 3.12: Síntesis de 3α-NBD-LcA.

3.3. Conclusiones

Se han preparado derivados fluorescentes del ácido cólico empleando diferentes fluoróforos, concretamente aminofluoresceína, nitrobenzofurazano, dansilo, carprofeno, aminoftalimida y bimano. Como caso único, la aminofluoresceína se unió por el grupo carboxílico del ácido cólico. Por otra parte, se optimizaron las rutas sintéticas que permitieron obtener amino derivados de ácido cólico regio- y estereoselectivamente en las posiciones 3α , 3β , 7α y 7β . Estos intermedios resultaron muy versátiles ya que pudieron ser conjugados con los fluoróforos mencionados. Se emplearon los cuatro amino intermedios para preparar los derivados con nitrobenzofurazano y dansilo. En el resto de los casos, carprofeno, aminoftalimida y bimano optamos por preparar tan sólo un ejemplo, eligiendo el 3α isómero.

La estructura de cada fluoróforo fue determinante en la elección de grupo protector del ácido cólico, habitualmente la primera etapa de la secuencia sintética. En la mayoría de los casos se empleó el éster metílico, cuya desprotección final se llevó a cabo por medio de una hidrólisis básica (nitrobenzofurazano, dansilo y carprofeno); en cambio, la desprotección en condiciones enzimáticas suaves tuvo que ser empleada en el caso del fluoróforo bimano. En el caso de la aminoftalimida se empleó otro grupo protector, el éster bencílico que resultó muy apropiado, ya que la desprotección se realizó a la vez con la reducción del grupo nitro del fluoróforo en la última etapa.

Adicionalmente, se prepararon dos compuestos modelo más sencillos, un representante de aminofluoresceína, poseyendo el grupo acetamida para imitar el derivado colil-amidofluoresceína y otro representante de nitrobenzofurazano poseyendo un ciclohexilo para imitar la parte esteroide de los derivados NBD-ácido cólico. Éstos se sintetizaron con el fin de utilizarlos en aplicaciones posteriores (detalladas en los Capítulos 4 y 5).

Finalmente, para estudios de interacciones con proteínas (Capítulo 5) se prepararon dos derivados fluorescentes más de otros ácidos biliares. En concreto, el derivado del taurocolato con nitrobenzofurazano en posición 3β y el derivado del ácido litocólico con el fluoróforo nitrobenzofurazano en posición 3α .

Capítulo 4

Propiedades Fotofísicas de los Derivados Fotoactivos de los Ácidos Biliares

4.1. Introducción

La fotoquímica comprende el estudio de las reacciones químicas producidas por la luz, mientras que el término fotofísica se utiliza para describir procesos de relajación no reactivos tras absorción de un fotón. Procesos no reactivos incluyen los caminos radiativos (con luminiscencia) y no radiativos (sin emisión de luz).^[92]

La absorción de un fotón de luz de suficiente energía, generalmente radiación visible VIS (700 - 400 nm) y ultravioleta UV (400 - 200 nm), puede llevar a una molécula a un estado electrónico excitado que no es habitualmente una especie estable. Tras su tiempo de vida característico (que puede variar de femtosegundos a horas), la molécula excitada o bien se relajará a su precursor de estado fundamental o bien sufrirá una transformación química.

Los procesos competitivos que ocurren entre la absorción y emisión de luz se suelen ilustrar gráficamente con el diagrama de Jablonski (Figura 4.1).^[93] Tras la absorción de luz, un fluoróforo es generalmente excitado desde su estado fundamental (S_0) a uno de los niveles vibracionales más altos de los estados excitados S_1 o S_n . Salvo en algunas raras excepciones, la molécula se relaja rápidamente al S_1 . Este proceso se denomina **conversión interna** (CI) y ocurre generalmente en un tiempo de 10^{-12} segundos o menos. En disolución, a este proceso le sigue una **relajación vibracional** (RV) hasta el nivel vibracional más bajo de este estado electrónico. La pérdida de energía por procesos no radiativos está generalmente acompañada por desprendimiento de calor o transferencia del exceso de energía por colisiones (con el disolvente). En el estado excitado singlete, el electrón en el orbital de mayor energía se encuentra con el espín contrario al electrón del orbital de salida, consecuentemente la vuelta al estado fundamental es un proceso permitido y ocurre rápidamente con emisión de un fotón. Este proceso se denomina **fluorescencia** (F) y ocurre desde el nivel vibracional más bajo de S_1 . Un tiempo de vida típico de un estado excitado singlete es de 10^{-8} a 10^{-10} segundos (en ausencia de otros procesos). Las moléculas en el estado S_1 pueden también sufrir una conversión de espín al estado triplete T_n . La conversión de S_1 al T_n se llama **cruce intersistemas** (CIS) y la emisión desde T_1 se denomina **fosforescencia** (P). La transición de T_1 al estado fundamental está prohibida, lo que resulta en una disminución de la

constante de velocidad de la emisión del triplete respecto a la de fluorescencia (el tiempo de vida medio del estado excitado triplete es de 10^{-3} a 1 segundo).

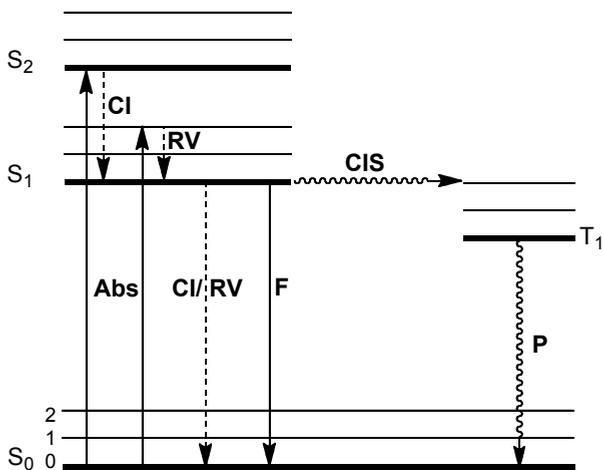


Figura 4.1: Diagrama de Jablonski.

Desde los estados excitados, pueden ocurrir numerosos procesos como por ejemplo transferencia de energía, transferencia electrónica, transferencia de protón, formación de excíplejo o excímero, desactivación, interacciones con el disolvente, etc.

Las energías de los estados excitados singlete y triplete más bajos (relativas al estado fundamental) se pueden obtener de la banda de longitud de onda más larga de la fluorescencia y fosforescencia, respectivamente. Esta banda se denomina 0,0 para indicar una transición entre los niveles vibracionales más bajos de los estados. La distancia entre las bandas de absorción y emisión 0,0 en una molécula se llama desplazamiento de Stokes. Cuando el estado excitado posee una geometría similar a la del estado fundamental normalmente se observa un desplazamiento de Stokes pequeño.

El rendimiento cuántico se define como el número de moléculas que participan en un proceso fotofísico dado dividido por el número de fotones absorbidos. El intervalo de rendimiento cuántico se encuentra entre cero y uno para procesos inducidos por un solo fotón.

4.2. Caracterización Fotofísica de los Derivados Sintetizados

La caracterización fotofísica de estos compuestos es importante, ya que cualquiera que sea su aplicación en una técnica basada en fluorescencia, medidas de tiempo de vida o en estado excitado triplete, el conocimiento de estos datos puede permitir seleccionar condiciones experimentales y facilitar el diseño de experimentos. En primer lugar, se describen las propiedades fotofísicas de los derivados de fluoresceína. A continuación, en los siguientes apartados se detallan las propiedades fotofísicas de los derivados de nitrobenzofurazano y dansilo, respectivamente. Finalmente, se describen las propiedades fotofísicas más relevantes de los productos resultantes de la conjugación del ácido cólico con el resto de los fluoróforos.

Como disolvente orgánico se escogió en la mayoría de los casos etanol por la buena solubilidad de los compuestos y también por su compatibilidad con células (en cantidades razonables). Además, se determinaron las propiedades fotofísicas en medio acuoso, en tampón fosfato-salino (PBS), ya que el ácido cólico es soluble en agua a pH fisiológico.

4.2.1. Derivados de Aminofluoresceína

Aminofluoresceína es un derivado de la familia de los xantenos, colorantes cuya fotofísica es bien conocida y está exhaustivamente descrita; por ello, el comportamiento de CamF debía ser bastante similar a su cromóforo fluoresceína.^[94-98] No obstante, se utilizó el compuesto modelo, AcF, para comparar las propiedades fotofísicas. En la Figura 4.2 se muestran los dos derivados de la 4-aminofluoresceína de los que se estudiaron sus propiedades fotofísicas.

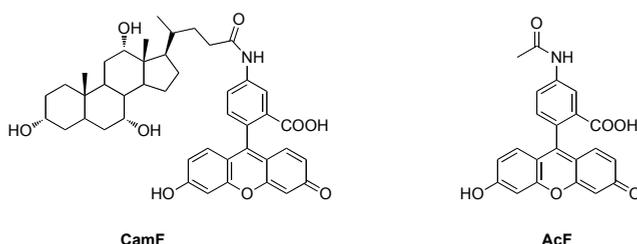
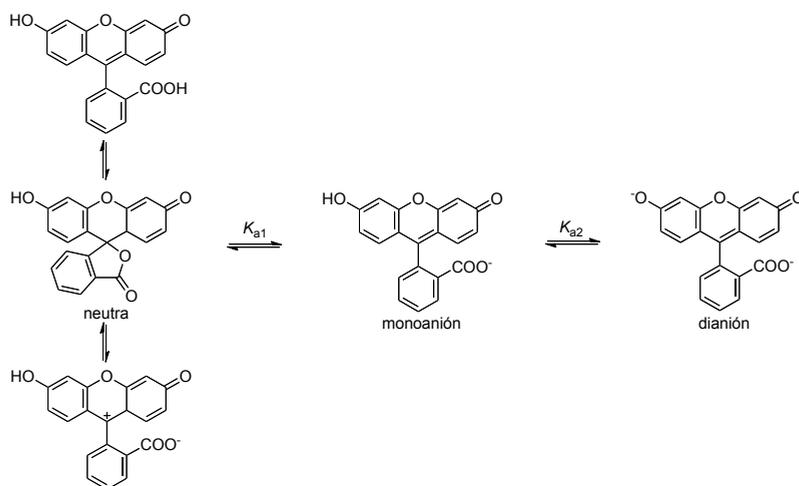


Figura 4.2: Derivados de 4-aminofluoresceína estudiados.

El cromóforo, fluoresceína, puede existir en diferentes formas protonadas, además, la forma neutra de la molécula se puede encontrar en tres formas tautoméricas, indicadas en el Esquema 4.1.



Esquema 4.1: Diferentes especies de fluoresceína presentes en disolución.

En medio acuoso, el espectro de absorción de CamF muestra una clara dependencia del pH, ya que a partir de pH ca. 4 hasta pH más básicos, el CamF empieza a formar los correspondientes monoanión y dianión. De hecho, las intensidades relativas de absorción a 450 y 490 nm experimentan un cambio drástico a lo largo de la escala de pH (Figura 4.3). Se pudo estimar el pK_a del dianión a partir del espectro de absorbancia *versus* pH, siendo ~ 6.5 . Este valor es muy parecido al descrito para la fluoresceína (6.36).^[99]

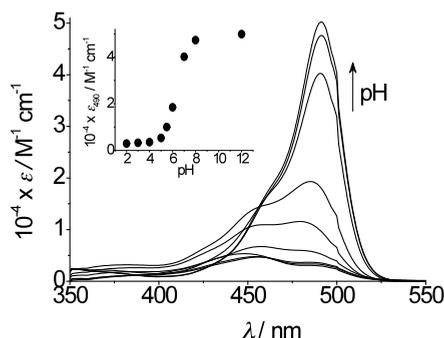


Figura 4.3: Cambios en el espectro de absorción de CamF (16 μM) en tampón Mcllvaine en función del pH (entre 2 y 12); Insert: curva de valoración.

Por otro lado, el espectro de CamF en etanol muestra la banda de absorción con dos máximos a 454 y 481 nm (Figura 4.4). Además, en aire se observó el efecto del CO_2 atmosférico que provocó una protonación parcial del cromóforo y en consecuencia una disminución en la absorción. Este tipo de efecto, descrito ya para la fluoresceína en otros disolventes,^[100-101] se confirmó con experimentos paralelos bajo atmósfera de O_2 y CO_2 (Figura 4.4).

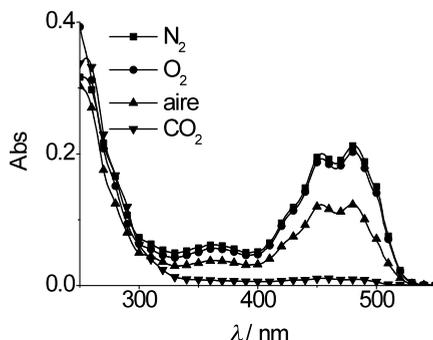


Figura 4.4: Espectro de absorción de CamF (20 μM) en EtOH bajo diferentes condiciones.

El espectro de fluorescencia de CamF en etanol, bajo N_2 , muestra el máximo a 515 nm. Esta emisión proviene de la banda de longitud de onda más larga ($\lambda > 470$ nm) que corresponde al dianión, como se pudo comprobar con el espectro de excitación (Figura 4.5).

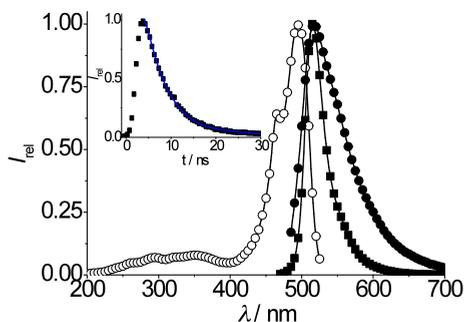


Figura 4.5: Espectros normalizados de excitación (\circ); emisión del monoanión, $\lambda_{\text{exc}}=480$ nm (\bullet); emisión del dianión, $\lambda_{\text{exc}}=500$ nm (\blacksquare) de CamF en EtOH bajo N_2 ; Insert: desaparición de fluorescencia registrada a 515 nm.

Del cruce de las bandas normalizadas de excitación y emisión se estimó la energía de singlete (E_{0-0}) que resultó de 57 kcal mol^{-1} . El desplazamiento de Stokes para los mismos máximos fue de 820 cm^{-1} . El rendimiento cuántico de

fluorescencia de CamF en etanol, bajo N_2 , fue de 0.67. Es bien conocido que los derivados amida de aminofluoresceína son altamente fluorescentes mientras que la aminofluoresceína sola no es fluorescente ($\phi = 0.03$) debido a la autodesactivación intramolecular.^[102] Así pues, el comportamiento de CamF se puede atribuir a la naturaleza del enlace amida entre la aminofluoresceína y el ácido cólico. Este hecho se confirmó determinando las propiedades fotofísicas de acetilaminofluoresceína (AcF) que resultaron prácticamente idénticas a las del CamF.

Las medidas de fluorescencia en tiempo resuelto permitieron determinar el tiempo de vida del estado singlete de CamF (Insert de la Figura 4.5). El ajuste monoexponencial proporcionó un valor de 4.8 ns; el tiempo de vida del singlete del compuesto relacionado AcF fue parecido, de 4.9 ns.

En comparación con el estado excitado singlete, no existe información sobre el estado triplete, quizá debido a que se espera un rendimiento cuántico bajo de cruce intersistemas ya que $\phi_F = 0.67$ ($0 < \phi_{CIS} < 0.3$). Sin embargo, se realizaron experimentos de fotólisis de destello láser (FDL) de CamF en etanol en condiciones anaeróbicas utilizando 355 nm como fuente de excitación (abs ca. 0.4). La Figura 4.6 muestra el espectro obtenido, con una banda ancha centrada a ca. 520 nm extendiéndose hasta 600 nm.

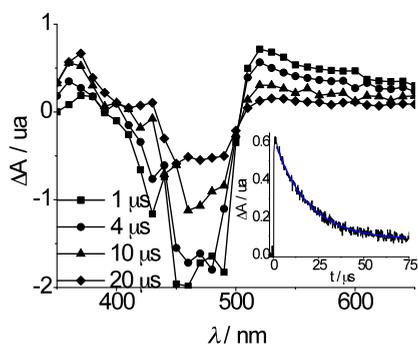


Figura 4.6: Espectro de absorción transitoria ($\lambda_{exc}=355$ nm) de CamF en EtOH bajo N_2 a diferentes tiempos tras el pulso del láser; Insert: desaparición de la señal registrada a 540 nm.

A esta especie transitoria que se desactivaba eficientemente con oxígeno le corresponde una desaparición de primer orden, con un tiempo de vida de 19.5 μs (Insert de la Figura 4.6). Por lo tanto, esta especie transitoria fue asignada al triplete de CamF. La señal centrada a 360 nm fue atribuida a un tautómero de

CamF, teniendo en cuenta su crecimiento lento y largo tiempo de vida. Además de las bandas positivas, se observó también una banda negativa entre 400 y 500 nm. Esta banda fue atribuida al blanqueo de la especie del estado fundamental, que absorbe en la misma región de longitud de onda. Ésta corresponde a la forma desprotonada, que predomina a pH neutro o básico y parece ser la única forma fotoactiva del cromóforo. Los mismos resultados fueron obtenidos en experimentos similares con AcF, observando una especie transitoria con el máximo a 520 nm y con un tiempo de vida de 21 μ s.

En otra serie de experimentos de FDL de CamF, pero utilizando 308 nm como fuente de excitación, se observó un espectro de absorción transitoria con una forma muy similar a la del espectro de absorción, con dos máximos centrados a 460 y 480 nm. La desaparición de la señal a 480 nm fue monoexponencial con un tiempo de vida muy largo, de 0.5 ms (Figura 4.7).

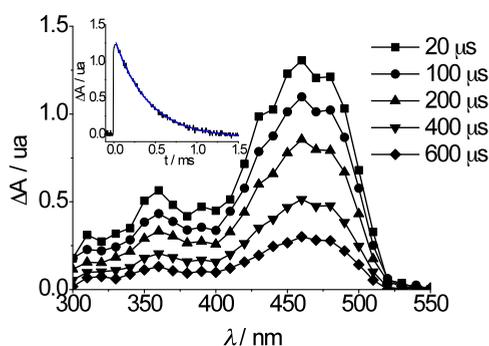


Figura 4.7: Espectro de absorción transitoria ($\lambda_{exc}=308$ nm) de CamF en EtOH bajo N_2 ; Insert: desaparición de la señal registrada a 480 nm.

Esta especie no se desactivaba en presencia de O_2 por lo que no se trataba de un estado excitado triplete. Esta observación podría estar relacionada con el fenómeno del ciclo de Förster.^[103] Es conocido que algunos derivados sufren una rápida y eficiente desprotonación en estado excitado,^[104] cuyo pK_a del estado excitado (pK_a^*) es diferente al del estado fundamental. Para este tipo de derivados se ha descrito que la excitación tiene cierto efecto sobre el pK_a (ca. ± 0.2 unidades),^[99,105] que es difícil determinar, ya que los espectros de absorción y emisión de mono y dianión se solapan.

4.2.2. Derivados de Nitrobenzofurazano

Muchos compuestos fluorescentes con esqueleto de benzofurazano han sido utilizados en bioanálisis,^[106-107] ya que presentan coeficientes de absorción molar y rendimientos cuánticos de fluorescencia altos. Además, siendo una molécula pequeña, altera mínimamente la estructura del compuesto original. En la Figura 4.8 se indica toda la familia de derivados de NBD sintetizados y estudiados fotofísicamente.

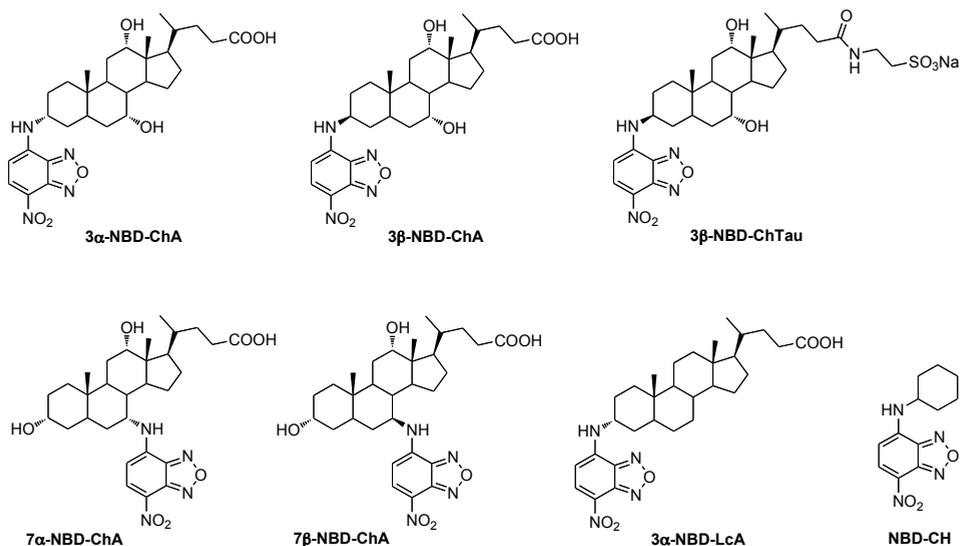


Figura 4.8: Familia de derivados de NBD estudiados.

El espectro de absorción de los derivados de NBD en EtOH muestra un máximo principal en la zona visible, ca. 470 nm (Tabla 4.1 y Figura 4.9a).

Tabla 4.1: Propiedades fotofísicas de los derivados de NBD.

	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm} (10^{-3} \times \epsilon_{\text{max}} / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$		$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$		$\tau_{\text{S}} / \text{ns}$
	EtOH	PBS	EtOH	PBS	EtOH
3α-NBD-ChA	471 (25.1)	494 (27.7)	532	555	5.8
3β-NBD-ChA	467 (20.6)	484 (27.9)	533	545	6.0
3β-NBD-ChTau	467 (18.0)	483 (24.9)	534	545	5.9
7α-NBD-ChA	468 (19.0)	490 (26.4)	527	539	6.5
7β-NBD-ChA	476 (24.5)	498 (20.5)	535	547	7.0
3α-NBD-LcA	470 (25.6)	- [#]	533	535	7.3
NBD-CH	469 (25.9)	493 (30.8)	531	549	5.8

[#] no determinado

La posición de dicho máximo depende del disolvente y manifiesta un desplazamiento hipsocrómico con el aumento de hidrofobicidad, mostrando una diferencia de más de 20 nm entre CH₃CN y PBS (Figura 4.9b).

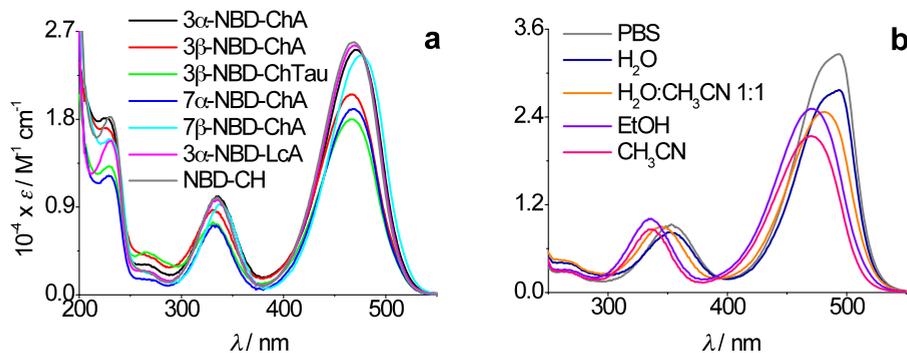


Figura 4.9: a) Espectro de absorción de los derivados de NBD en EtOH. b) Espectro de absorción de 3 α -NBD-ChA en diferentes disolventes.

Los espectros de emisión de los derivados de NBD en EtOH mostraron fluorescencia verde, con el máximo centrado a ca. 535 nm (Tabla 4.1). De nuevo, se puede observar el efecto de la hidrofobicidad en la posición del máximo de emisión (desplazamiento hacia el azul con el aumento de hidrofobicidad), y más todavía en el rendimiento cuántico de fluorescencia que aumenta con la hidrofobicidad (Figura 4.10 y Tabla 4.2). Los rendimientos cuánticos de fluorescencia están resumidos en la Tabla 4.2, siendo más altos en CH₃CN ($\phi \sim 0.65$), mientras que en medio acuoso, los derivados prácticamente no son fluorescentes ($\phi \sim 0.04$).

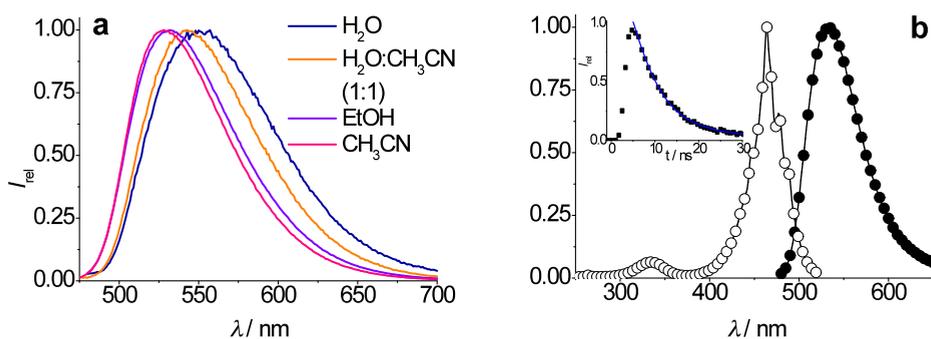


Figura 4.10: a) Espectros normalizados de emisión de 3 α -NBD-ChA en diferentes disolventes. b) Espectros normalizados de excitación (○) y emisión (●) de 3 α -NBD-ChA en EtOH, $\lambda_{\text{exc}}=470$ nm; Insert: desaparición de fluorescencia registrada a 530 nm.

Tabla 4.2: Rendimientos cuánticos de fluorescencia de los derivados de NBD.

	ϕ_F			
	CH ₃ CN	EtOH	H ₂ O	PBS
3 α -NBD-ChA	0.60	0.43	0.039	0.036
3 β -NBD-ChA	0.55	0.41	0.040	0.043
3 β -NBD-ChTau	0.66	0.41	0.044	0.042
7 α -NBD-ChA	0.66	0.45	0.042	0.039
7 β -NBD-ChA	0.52	0.44	0.041	0.042
3 α -NBD-LcA	-#	0.43	-#	-#
NBD-CH	0.67	0.43	0.044	0.041

no determinado

Se determinó la energía de singlete a partir del cruce de los espectros de excitación y emisión normalizados; los valores estimados en EtOH fueron de ~ 58 kcal mol⁻¹ para todos ellos, mientras que en PBS fueron ligeramente más pequeños, de ~ 56 kcal mol⁻¹. Respecto al tiempo de vida de singlete, estos compuestos en disolventes orgánicos polares mostraron un tiempo de vida de ca. 6 ns, mientras que en medio acuoso dicho tiempo disminuyó a menos de 1 ns. La presencia de oxígeno no tuvo ningún efecto significativo en la fluorescencia.

Al contrario de lo que ocurre con las propiedades del estado excitado singlete de los derivados de NBD, el comportamiento fotofísico del triplete ha recibido mucha menos atención. Hasta ahora, sólo se había observado la especie triplete para algunos compuestos similares.^[108] No obstante, con objeto de aclarar la contribución del cruce intersistemas a los procesos fotofísicos, se realizaron experimentos de fotólisis de destello láser para los derivados de NBD. Experimentos adicionales se realizaron también con el compuesto modelo NBD-CH, ya que su comportamiento se mostró bastante similar al de los derivados NBD-ChA. El espectro de absorción transitoria de los derivados de NBD en EtOH (abs ca. 0.3 - 0.4) se obtuvo tras FDL bajo atmósfera de N₂ ($\lambda_{exc} = 308$ nm). La Figura 4.11a muestra el espectro obtenido para 3 β -NBD-ChA; resultados similares se obtuvieron para otros isómeros. Esta especie transitoria muestra su máximo a ca. 390 nm y una pequeña banda complementaria a 530 nm. La desaparición de la señal correspondiente a 390 nm se ajustó con una ecuación biexponencial, proporcionando un tiempo de vida de 12 μ s y otro residual, que podría deberse a la formación de un fotoproducto (Insert de la Figura 4.11a).

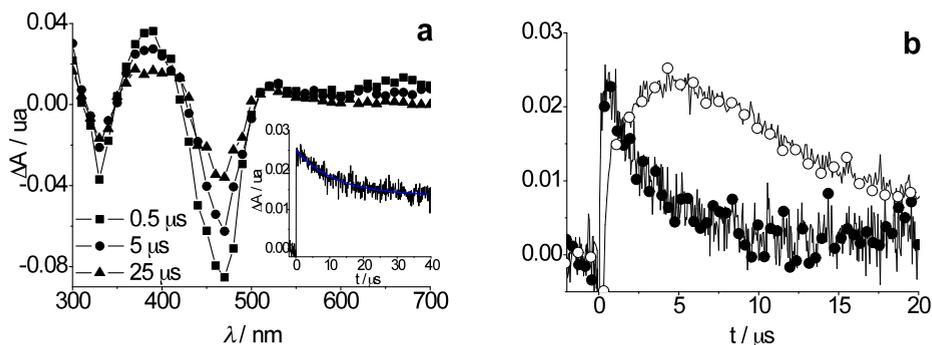


Figura 4.11: a) Espectro de absorción transitoria de 3β-NBD-ChA en EtOH bajo N₂, a diferentes tiempos tras el pulso de láser; Insert: desaparición de la señal registrada a 390 nm. b) Desaparición del triplete de NBD-CH a 400 nm (●) y formación del triplete de β-caroteno a 510 nm (○).

Para determinar la naturaleza de la especie de tiempo corto, se realizaron experimentos adicionales utilizando O₂ y β-caroteno como desactivadores con el compuesto modelo NBD-CH. Esta especie transitoria se desactivaba eficientemente con oxígeno. El mismo efecto tuvo el β-caroteno: el tiempo de vida de la señal se acortaba con concentraciones crecientes de β-caroteno. A pesar de que el β-caroteno presenta $\phi_{\text{CIS}} = 0$ ^[109] y se observó la formación de su triplete a 510 nm (Figura 4.11b) por transferencia de energía; por ello se asignó la especie transitoria de 390 nm al estado excitado triplete de los compuestos NBD-CH.

Los derivados de NBD resultaron ser inestables durante los experimentos de FDL. De hecho, está descrito que algunos derivados de furazano sufren fotorreacción tras ser irradiados con luz UV, dando lugar a los correspondientes nitrilos o carbamatos N-sustituídos.^[110-111] En cambio, los experimentos en el fluorímetro no provocaron descomposición.

4.2.3. Derivados de Dansilo (Dns)

Tal como se comentó en el caso del cromóforo NBD, también los compuestos fluorescentes con cromóforo dansilo han sido utilizados en bioanálisis.^[106,112] En la Figura 4.12 se muestra toda la familia de derivados de Dns sintetizados y estudiados fotofísicamente.

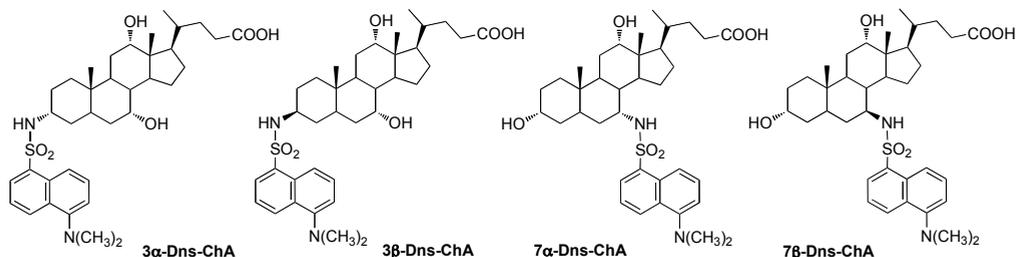


Figura 4.12: Familia de derivados de Dns estudiados.

El espectro de absorción de los cuatro derivados en EtOH mostró máximos en la zona UV, concretamente a 250 y 335 nm (en la Figura 4.13a se muestra un ejemplo representativo); en PBS se observó un ligero desplazamiento de los máximos a 245 y 330 nm, respectivamente. Los derivados de Dns en EtOH exhibieron fluorescencia verde con el máximo centrado a ca. 505 nm y, al contrario de lo que ocurre con la absorción en PBS (efecto hipsocrómico), el máximo de emisión sufre un efecto batocrómico (40 - 50 nm), como se puede ver en la Figura 4.13b y en la Tabla 4.3. La banda responsable de la fluorescencia es la de ca. 335 nm del espectro UV-Vis, como se pudo comprobar con el espectro de excitación (en EtOH) en la Figura 4.13b.

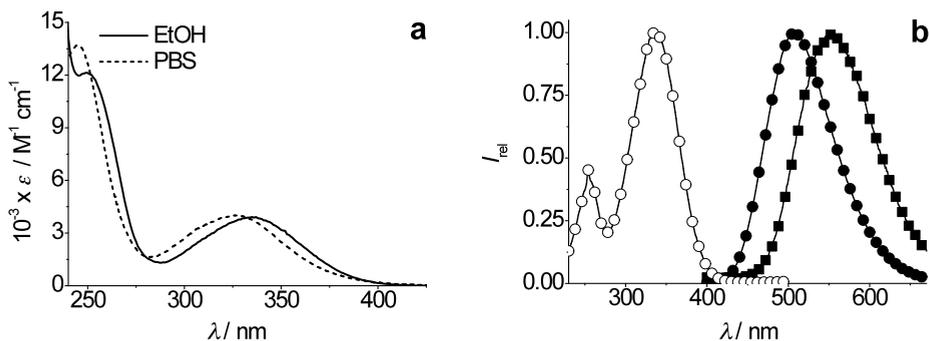


Figura 4.13: a) Espectro de absorción de 3 α -Dns-ChA en diferentes disolventes. b) Espectros normalizados de 3 α -Dns-ChA: excitación en EtOH (\circ); emisión en EtOH (\bullet), λ_{exc} =335 nm; emisión en PBS (\blacksquare), λ_{exc} =330 nm.

Tabla 4.3: Propiedades fotofísicas de los derivados de Dns.

	$\epsilon_{\max} / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$		$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$	
	EtOH	PBS	EtOH	PBS
3 α -Dns-ChA	3900	3990	509	553
3 β -Dns-ChA	3920	4175	508	551
7 α -Dns-ChA	3780	4090	501	540
7 β -Dns-ChA	4290	4460	504	542

Del cruce de los espectros normalizados de excitación y emisión correspondientes se calculó la energía de singlete, siendo para los cuatro derivados de ca. 68 kcal mol⁻¹. Todos los compuestos de Dns presentan un desplazamiento de Stokes muy grande, ca. 10.000 cm⁻¹ en etanol.

La emisión de fluorescencia en etanol disminuyó en presencia de oxígeno (ver Figura 4.14a para un ejemplo representativo). Aplicando la ecuación de Stern-Volmer para un proceso fotofísico de desactivación intermolecular:

$$I_0 / I = 1 + K_{\text{SV}} [\text{O}_2] = 1 + k_q \tau_0 [\text{O}_2] \quad (\text{Ec. 1})$$

se determinó la constante de Stern-Volmer, K_{SV} , para los cuatro derivados en EtOH que fue de ca. 230 M⁻¹, proporcionando las constantes de desactivación por oxígeno del orden de 10¹⁰ M⁻¹ s⁻¹ (Tabla 4.4), siendo del orden de la constante de difusión.^[109]

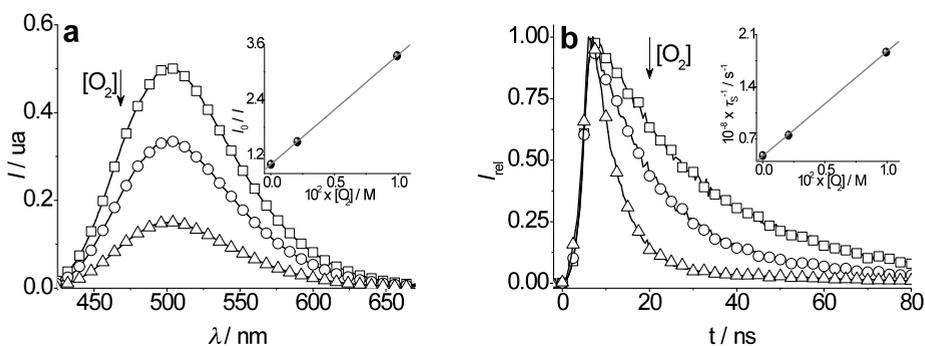


Figura 4.14: a) Espectro de emisión, $\lambda_{\text{exc}}=335$ nm; b) Trazas de desaparición de fluorescencia, $\lambda_{\text{exc}}=337$ nm, de 7 α -Dns-ChA (20 μM) en EtOH a diferentes concentraciones de oxígeno (\square N₂, \circ aire, \triangle O₂); Insert: Ajuste de Stern-Volmer correspondiente a este proceso.

Simultáneamente se realizaron experimentos en tiempo resuelto para establecer el mecanismo de esta desactivación. La disminución de tiempo de vida de singlete en presencia de oxígeno (Figura 4.14b) proporcionó constantes de desactivación del mismo valor, ca. $(1.31 - 1.98) \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, por lo que esta desactivación resultó ser de carácter dinámico.

Tabla 4.4: Propiedades fotofísicas de los derivados de Dns (EtOH) a diferentes concentraciones de O_2 .

	ϕ_F (τ_S / ns)			$10^{-10} \times k_{qO_2} / \text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	N_2	aire	O_2	
3 α -Dns-ChA	0.38 (19.9)	0.25 (13.7)	0.11 (5.5)	1.20
3 β -Dns-ChA	0.40 (20.2)	0.27 (12.7)	0.12 (4.1)	1.20
7 α -Dns-ChA	0.46 (20.9)	0.31 (13.3)	0.14 (5.4)	1.14
7 β -Dns-ChA	0.42 (19.5)	0.29 (12.8)	0.13 (4.4)	1.14

Experimentos de FDL de los derivados de Dns en etanol mostraron una banda centrada a ca. 400 nm, con un tiempo de vida muy largo, que no se desactivó en presencia de oxígeno por lo que no correspondía al triplete (Figura 4.15).

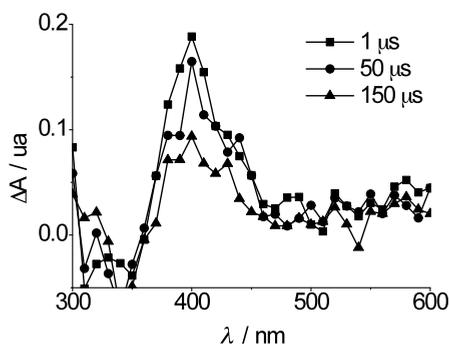


Figura 4.15: Espectro de absorción transitoria, $\lambda_{exc}=355 \text{ nm}$, de 7 α -Dns-ChA en EtOH:CCl₄ (9:1) bajo aire a diferentes tiempos tras el pulso.

Es conocido que las estructuras naftalénicas dan lugar a cationes radicales,^[113] y también han sido descritos cationes radicales para dansilo,^[114-115] por lo que podría tratarse de un intermedio de este tipo. Por otra parte se realizaron experimentos de fluorescencia en presencia de un buen aceptor de electrones, como el CCl₄. Concentraciones crecientes de CCl₄ provocaron tanto

una disminución de la emisión como un acortamiento del tiempo de vida del singlete (Figura 4.16).

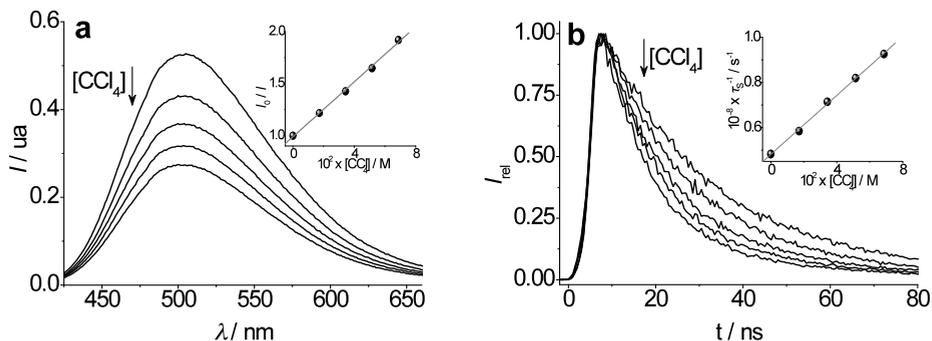
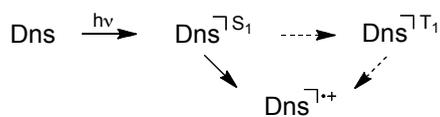


Figura 4.16: a) Espectro de emisión, $\lambda_{exc}=335$ nm b) Trazas de desaparición de la fluorescencia, $\lambda_{exc}=337$ nm, de 7 α -Dns-ChA (25 μ M) en EtOH, bajo N₂ a diferentes concentraciones de CCl₄ (17-69 mM); Insert: Ajuste de Stern-Volmer correspondiente a este proceso.

La constante de Stern-Volmer para la desactivación por CCl₄ fue de ca. 13 M⁻¹, y de ahí se calculó la constante de desactivación siendo de 6 × 10⁸ M⁻¹ s⁻¹. Esto sería compatible con la naturaleza de este catión radical, formándose a partir del estado excitado singlete:



4.2.4. Otros Derivados Fotoactivos de Ácido Cólico

Tal como se había mencionado al comienzo de este capítulo, los siguientes derivados de ácido cólico 3α -Cpf-ChA, 3α -aFt-ChA y 3α -Bm-ChA (Figura 4.17), fueron caracterizados fotofísicamente, limitándose el estudio a sus propiedades más importantes.

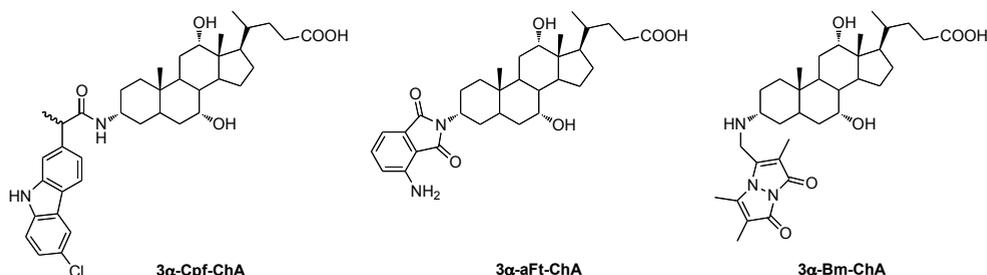


Figura 4.17: Otros derivados fluorescentes de ácido cólico.

Carprofeno-Ácido Cólico

El espectro de absorción en etanol o PBS de la mezcla de diastereómeros 3α -(S)-Cpf-ChA y 3α -(R)-Cpf-ChA muestra una banda estructurada con el máximo principal a 300 nm, con un pequeño hombro con máximos a 330 y 345 nm (Figura 4.18a). La emisión mostró dos máximos a 355 y 370 nm que provienen de la banda de absorción de 300 nm como se puede ver en el espectro de excitación (Figura 4.18b); en PBS se observó un ligero cambio y disminución del primer máximo de fluorescencia. La energía de singlete fue idéntica en ambos disolventes, de 83 kcal mol^{-1} . Las propiedades fotofísicas obtenidas fueron similares a las del éster metílico del carprofeno, publicadas previamente en el grupo de investigación.^[85]

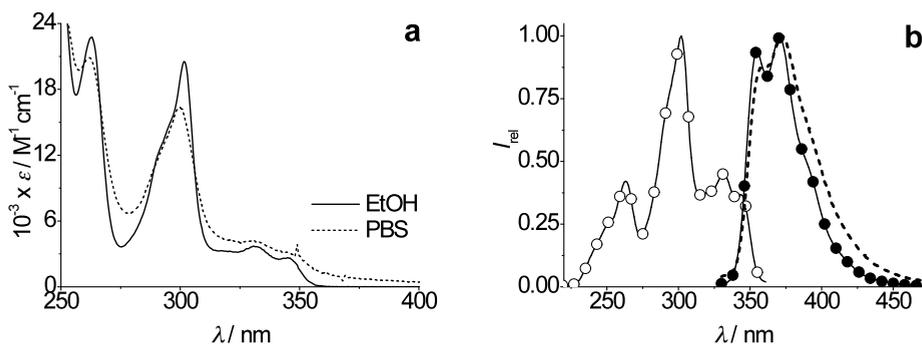


Figura 4.18: a) Espectro de absorción de 3α-Cpf-ChA en diferentes disolventes. b) Espectros normalizados de 3α-Cpf-ChA: excitación en EtOH (○); emisión en EtOH (●); emisión en PBS (- - -), $\lambda_{exc}=300$ nm.

Aminoftalimida-Ácido Cólico

Se estudiaron las propiedades fotofísicas de 3α-aFt-ChA en EtOH y PBS. El espectro de UV-Vis muestra la banda de absorción con el máximo a 390 y 385 nm en EtOH y PBS, respectivamente (Figura 4.19a). En la emisión, el entorno más hidrofílico tiene un efecto en el máximo de emisión más drástico que en la absorción, produciendo un desplazamiento de 478 nm en EtOH a 501 nm en PBS (Figura 4.19b). Sorprendentemente, el rendimiento cuántico de fluorescencia no se vio afectado tan significativamente como en los casos anteriores: los valores obtenidos fueron de 0.51 en EtOH y 0.28 en PBS. La energía de singlete varió sólo ligeramente, de 66 kcal mol⁻¹ en EtOH disminuyó a 64 kcal mol⁻¹ en PBS.

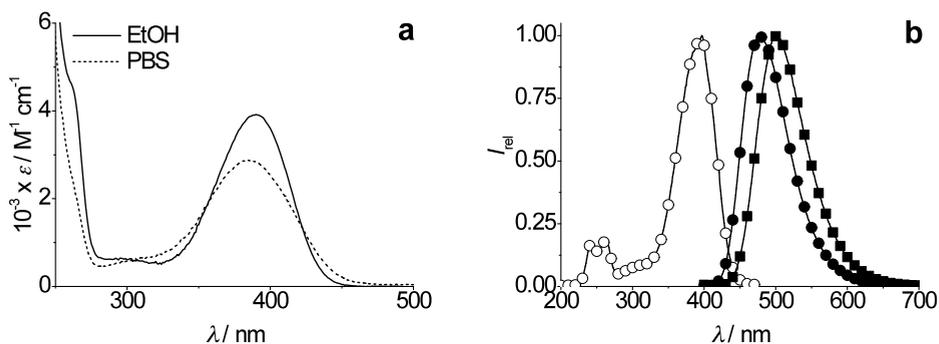


Figura 4.19: a) Espectro de absorción de 3α-aFt-ChA en diferentes disolventes. b) Espectros normalizados de 3α-aFt-ChA: excitación en EtOH (○); emisión en EtOH (●); emisión en PBS (■), $\lambda_{exc}=390$ nm.

Bimano-Ácido Cólico

Las propiedades fotofísicas de 3 α -Bm-ChA en EtOH, fueron muy similares a las del 3 α -aFt-ChA, con un máximo de absorción a 378 nm y un máximo de emisión a 445 nm (Figura 4.20).

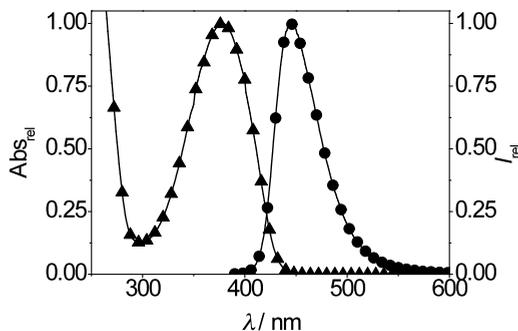


Figura 4.20: Espectros normalizados de 3 α -Bm-ChA en EtOH: absorción (▲); emisión (●), $\lambda_{\text{exc}}=380$ nm.

4.3. Conclusiones

El estudio fotofísico de los derivados fotoactivos de ácidos biliares sintetizados se llevó a cabo principalmente en etanol y tampón fosfato-salino.

Las propiedades fotofísicas de los derivados de la aminofluoresceína dependían fuertemente del pH. Se observó absorción en la zona visible y fluorescencia verde, con un rendimiento cuántico muy alto. Estos compuestos se mostraron eficientes como sondas de CO₂ en EtOH, ya que la presencia de este gas desplazó el equilibrio de protonación formando la especie no fluorescente del fluoróforo. Por otra parte, se observó la formación del estado excitado triplete con un máximo a 540 nm.

Los derivados de nitrobenzofurazano absorbieron en la zona visible y exhibieron fluorescencia verde, con un rendimiento cuántico elevado. Estas características se veían influenciadas por la naturaleza del disolvente, ya que en disolventes más hidrofílicos se observó un desplazamiento de los máximos de absorción y emisión hacía el rojo y una disminución tanto del rendimiento cuántico como del tiempo de vida de singlete. Por primera vez, ha sido observado y

caracterizado su estado excitado triplete con máximo a 390 nm, confirmado por experimentos de transferencia de energía al β -caroteno.

A continuación, los derivados de dansilo mostraron absorción en la zona UV y emisión de fluorescencia verde presentando un desplazamiento de Stokes muy alto. Su emisión se vio influenciada por la hidrofobicidad de disolvente y dicho efecto se manifestó en un desplazamiento hacia el rojo, con disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia y del tiempo de vida en un disolvente más hidrofílico. La presencia de oxígeno causó una disminución de la emisión y un acortamiento del tiempo de vida con constantes de desactivación del orden del límite de difusión (ca. $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). El mismo efecto causó la presencia de CCl_4 , un buen electrón aceptor, que favoreció la formación del catión radical de dansilo a partir del singlete. Éste se detectó en el espectro de absorción transitoria mediante FDL y presentó un máximo a 400 nm.

Por lo último, otros derivados fotoactivos de ácido cólico se estudiaron con menos detalle. Se establecieron las propiedades fotofísicas más relevantes como los máximos de absorción y emisión y las energías de singlete.

Capítulo 5

Interacciones de los Derivados Fotoactivos de los Ácidos Biliares con Proteínas

5.1. Introducción

Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos que desempeñan un papel fundamental en los seres vivos. Según su forma pueden ser fibrosas, globulares o mixtas. Las primeras (queratina, colágeno y fibrina) se presentan como cadenas polipeptídicas largas y una estructura secundaria atípica, son insolubles en agua y en disoluciones acuosas. Las proteínas globulares (enzimas, anticuerpos, algunas hormonas y proteínas de transporte) se caracterizan por doblar sus cadenas en una forma esférica apretada o compacta, dejando grupos hidrófobos hacia dentro de la proteína y grupos hidrófilos hacia fuera, lo que hace que sean solubles en agua. Por último, las proteínas mixtas poseen una parte fibrilar y otra parte globular.

Estos biopolímeros son muy versátiles y realizan numerosas funciones diferentes, entre las cuales se destacan, por ejemplo, estructural (colágeno, queratina), reguladora (insulina, hormona del crecimiento), transportadora (hemoglobina), defensiva (anticuerpos), enzimática (sacarasa, pepsina), o contráctil (actina, miosina).

Las proteínas transportadoras son aquéllas que median en los movimientos de casi todos los solutos que interaccionan en el centro activo de dichas proteínas a través de la membrana o el plasma. Un ejemplo de proteínas transportadoras plasmáticas son las albúminas.

Albumina Sérica Humana

La albúmina sérica humana (HSA) se sintetiza en el hígado y es la proteína más abundante del plasma.^[116] Normalmente constituye alrededor del 60% del total de proteína del plasma humano y su concentración varía de 35 a 50 g l⁻¹. La HSA pertenece a las proteínas transportadoras y actúa como vehículo y distribuidor de diversos agentes, tanto endógenos (ácidos grasos, hormonas, enzimas, ácidos biliares) como exógenos (fármacos).^[117] La albúmina también ayuda a mantener la presión osmótica y el pH en la sangre. La interacción de albúmina con sustratos resulta en un incremento de su solubilidad en el plasma, así como en una disminución de la toxicidad o protección frente a oxidación de sus ligandos. La unión puede también presentar un impacto significativo en farmacocinética; es decir, contribuye a prolongar la vida media de los agentes

terapéuticos, aunque una unión demasiado fuerte impide la liberación del fármaco al tejido. Ocasionalmente la albúmina presenta actividad enzimática cuando interacciona con moléculas pequeñas. Se conoce su actividad enolasa y tioesterasa; sin embargo, desde un punto de vista clínico-farmacéutico, la más importante es su actividad esterasa.^[118-119]

En cuanto a la estructura de HSA, tiene un peso molecular de 66.5 kDa y consta de 585 aminoácidos, entre los cuales se forman un total de 17 puentes de disulfuro; posee tan sólo un triptófano (Trp-214).^[120] Así, la cadena polipeptídica se dobla formando hélices que se agrupan en tres dominios homólogos (I, II y III), en los cuales puede interaccionar con sustratos de distinta naturaleza; cada dominio además está dividido en dos subdominios, A y B. La estructura de HSA se muestra en la Figura 5.1.



Figura 5.1: Estructura de HSA.

Las albúminas son proteínas flexibles que pueden adaptar su estructura para interaccionar con una gran variedad de sustratos en sus dominios de unión. Estas interacciones pueden provocar cambios en la albúmina dando lugar a una estructura más estable e incluso aumentar así su afinidad a otros sustratos.^[121] En el caso concreto de HSA, estos sitios de unión específicos fueron asignados y descritos por Sudlow.^[122] El sitio 1 (o sitio de unión de warfarina)^[123] localizado en el subdominio IIA,^[121] parece ser el sitio típico de unión para ácidos dicarboxílicos y/o moléculas heterocíclicas voluminosas, con una carga negativa localizada en el medio de la molécula, o ésteres de los ácidos arilpropiónicos. Las interacciones que predominan en este sitio son de tipo hidrofóbico.^[124] Algunas evidencias ponen de manifiesto que el sitio 1 es flexible y de gran tamaño. El sitio 2 (conocido como sitio de unión de benzodiazepinas) está ubicado en el subdominio IIIA, y los

sustratos de unión selectivos son, por ejemplo, diazepam e ibuprofeno,^[121,125] aunque también ácidos carboxílicos aromáticos con una carga negativa opuesta a la parte hidrofóbica de la molécula. El sitio 2 es más pequeño y menos flexible que el sitio 1 y las interacciones que predominan en éste son más bien puentes de hidrógeno y electrostáticas.^[126]

5.2. Interacciones de los Ácidos Biliares con Albúmina Sérica Humana

Tal como se había descrito en la introducción, los ácidos biliares son transportados desde el intestino de vuelta hasta el hígado por albúmina, como parte del ciclo de la circulación enterohepática. En el plasma, HSA es la proteína de unión preferente de los ácidos biliares (88%), mientras que el resto está unido a lipoproteínas, sobre todo de alta densidad.^[36,127-128] La afinidad a HSA es más alta para ácidos biliares hidrofóbicos, por lo que la conjugación con glicina o taurina causa una ligera disminución en la afinidad. Las constantes de asociación K_B varían entre $10^3 - 10^5 \text{ M}^{-1}$.^[129]

Hasta ahora, se han realizado varios experimentos para identificar el sitio de unión en HSA para los BAs usando diversas técnicas y métodos. Aun así, los resultados son contradictorios en muchos casos y el sitio de unión no se ha establecido definitivamente. Por ejemplo, en experimentos por cromatografía de gel o diálisis de equilibrio se concluyó que el sitio de unión coincidía con el de oleato, warfarina o dansilsarcosina (sitio 1);^[130-132] por otra parte, experimentos de calorimetría demostraron que los BAs se unen al sitio 2.^[133]

El empleo de los derivados fluorescentes de ácidos biliares sintetizados aparece como una nueva aproximación para estudiar las interacciones con HSA. Desde el punto de vista experimental, el fácil manejo o la necesidad de pequeñas concentraciones de sustratos son algunas de las ventajas que presentan.

A continuación se describen los resultados obtenidos con derivados de la familia de NBD y Dns.

5.2.1. Derivados de Nitrobenzofurazano

En la Figura 5.2 se muestran las estructuras de los derivados de NBD utilizados en los experimentos con HSA. El compuesto modelo NBD-CH fue clave para confirmar que el factor determinante para la unión no era el fluoróforo, ya que los derivados estudiados no son ácidos biliares naturales y el fluoróforo podría alterar las propiedades del ácido biliar.

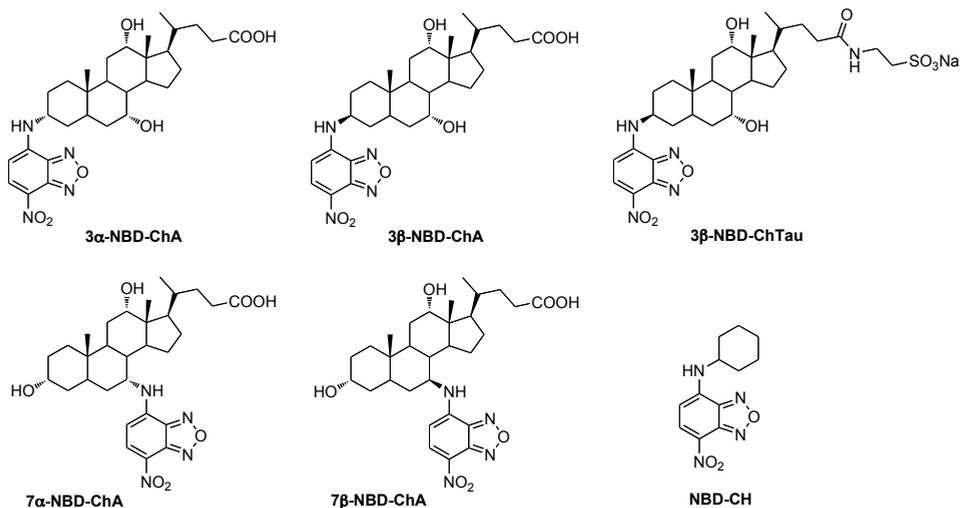


Figura 5.2: Familia de los derivados de NBD.

Tal como se había determinado en el Capítulo 4, los derivados de NBD en PBS mostraron un espectro de absorción con un máximo a *ca.* 490 nm y los espectros de fluorescencia presentaron un máximo en el rango 540 - 555 nm. En EtOH, la absorción y la emisión fueron desplazadas hacia el azul (efecto hipsocrómico) respecto al medio acuoso y el rendimiento cuántico de fluorescencia fue significativamente más alto ($\phi_F \sim 0.4$), como se puede comprobar en las Tablas 4.1 y 4.2 (apartado 4.2.2, p. 38, 40).

A continuación, se estudiaron las propiedades fotofísicas de los derivados en presencia de HSA en PBS. Así, se determinaron los espectros de absorción y emisión de los derivados de NBD con diferentes concentraciones de HSA (hasta 20 eq). El espectro de absorción sufrió un desplazamiento hipsocrómico (Tabla 5.1) con una disminución de la absorción (Figura 5.3). Los cambios en la absorción podrían deberse a la formación de un complejo entre el derivado de NBD y HSA,

por lo que se representaron los cambios en la absorbancia relativa *versus* la concentración de HSA (Figura 5.4).

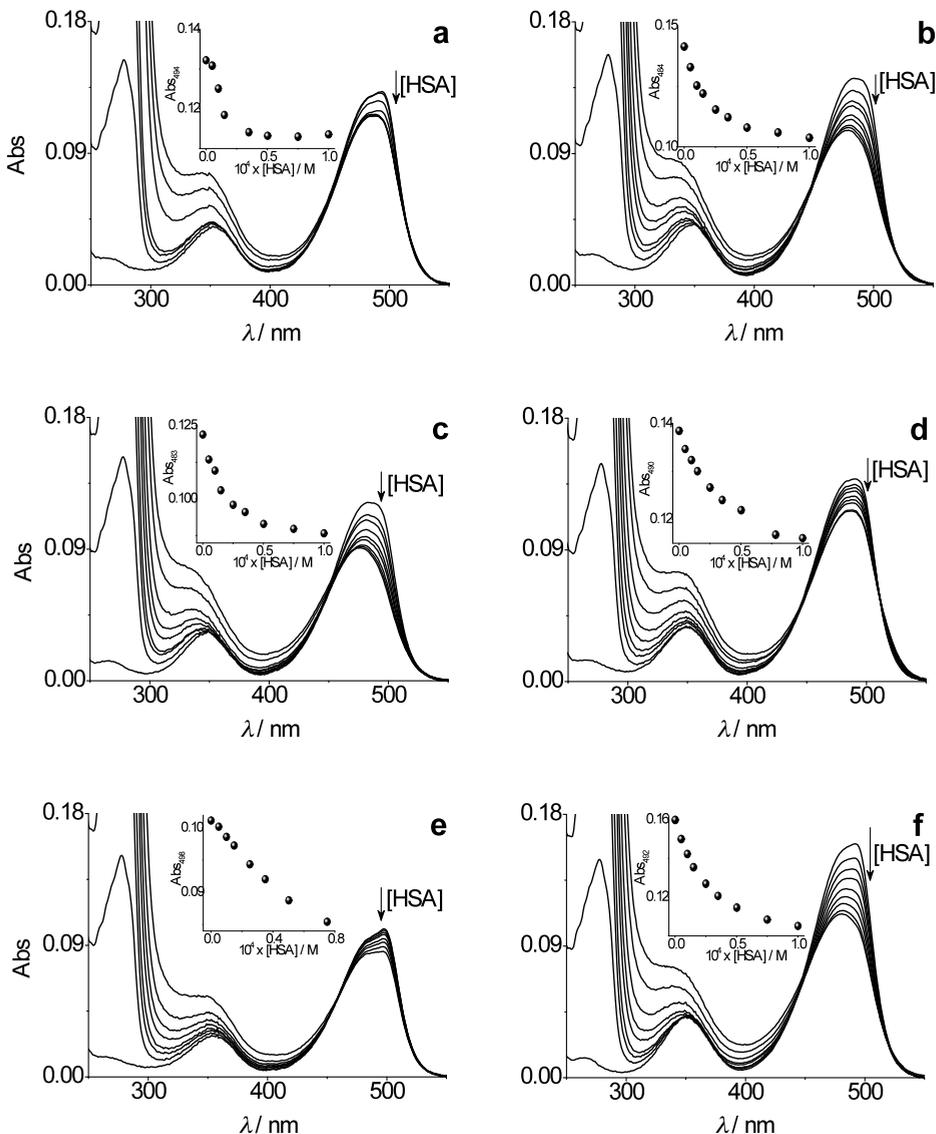
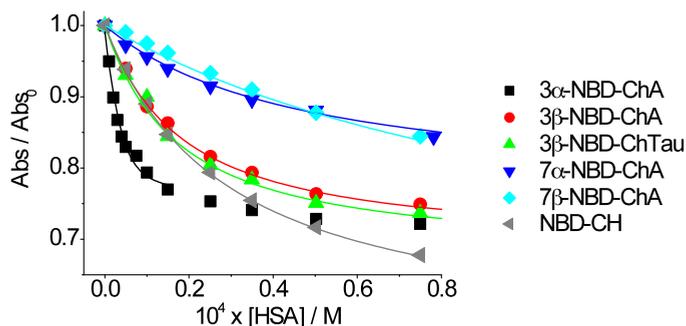


Figura 5.3: Espectros UV-Vis de a) 3α -NBD-ChA; b) 3β -NBD-ChA; c) 3β -NBD-ChTau; d) 7α -NBD-ChA; e) 7β -NBD-ChA; f) NBD-CH en PBS ($5\ \mu\text{M}$) en presencia de concentraciones crecientes de HSA (0-100 μM); Insert: Cambios en la absorbancia a λ_{max} *versus* concentración de HSA.


 Figura 5.4: Cambios en la absorbancia relativa de los derivados de NBD *versus* concentración de HSA.

Los espectros de fluorescencia (λ_{exc} en el correspondiente punto isoabsorptivo, ca. 450 nm) de los derivados de NBD en presencia de HSA mostraron un desplazamiento hipsocrómico (ca. 5 - 25 nm) con un aumento de la intensidad de emisión respecto al PBS (Tabla 5.1 y Figura 5.5). Simultáneamente con el aumento de fluorescencia se observó un incremento en los tiempos de vida de los NBDs en presencia de HSA, en concreto de ca. 1 ns (en PBS) hasta ca. 5 ns (con 20 eq de HSA).

Tabla 5.1: Propiedades fotofísicas de los derivados de NBD en PBS en ausencia y en presencia de HSA (20 eq).

	$\lambda_{abs} / \text{nm}$		λ_{em} / nm		ϕ_F	
	PBS	con HSA	PBS	con HSA	PBS	con HSA
3 α -NBD-ChA	494	488	555	541	0.036	0.08
3 β -NBD-ChA	484	479	545	521	0.043	0.16
3 β -NBD-ChTau	483	476	545	519	0.042	0.22
7 α -NBD-ChA	490	487	539	536	0.039	0.07
7 β -NBD-ChA	498	496	547	542	0.042	0.05
NBD-CH	492	481	549	524	0.041	0.10

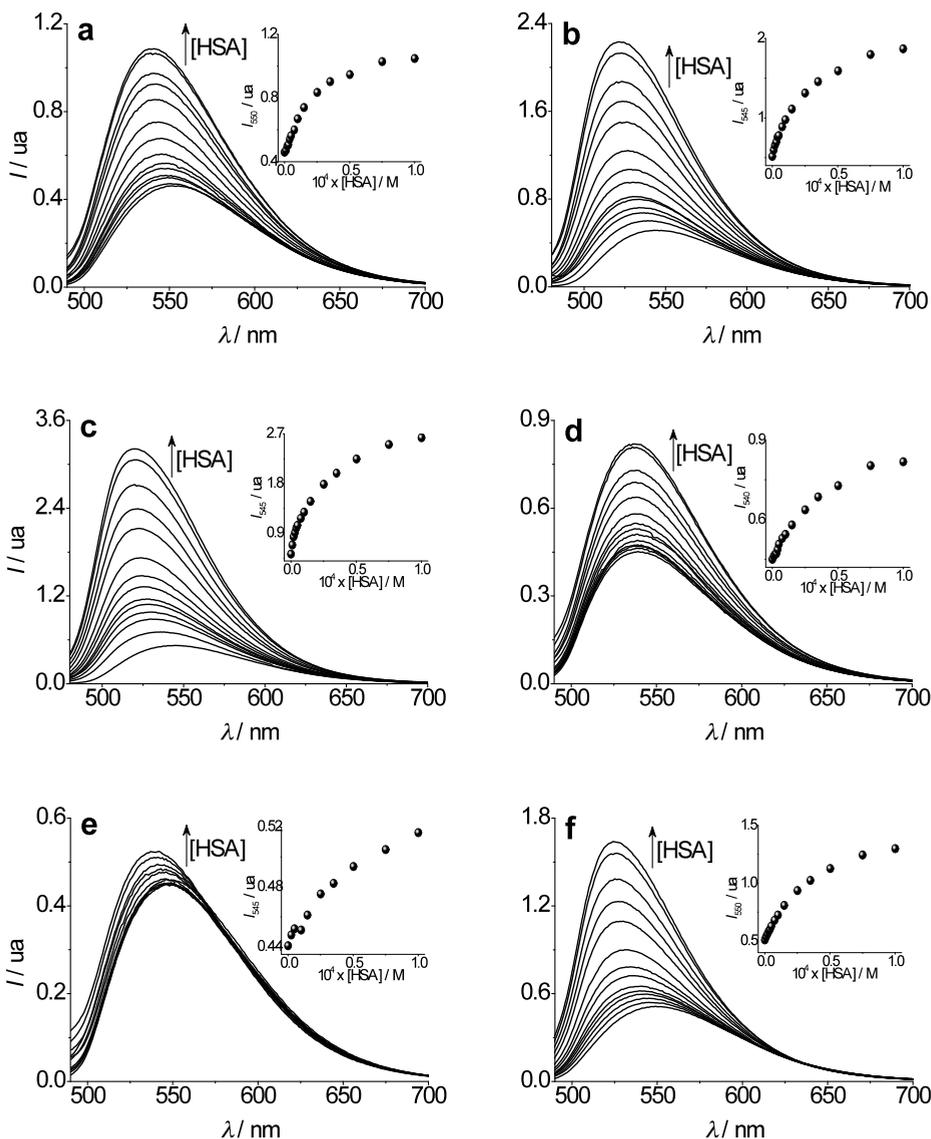


Figura 5.5: Espectros de emisión de a) 3 α -NBD-ChA; b) 3 β -NBD-ChA; c) 3 β -NBD-ChTau; d) 7 α -NBD-ChA; e) 7 β -NBD-ChA; f) NBD-CH en PBS (5 μ M) en presencia de concentraciones crecientes de HSA (0-100 μ M), λ_{exc} en el punto isoabsorptivo; Insert: Cambios en la intensidad a λ fija (I_0) versus concentración de HSA.

Como en el caso de la absorción, se representaron los cambios de emisión relativa (a la λ correspondiente al máximo en ausencia de HSA) versus la concentración de HSA (Figura 5.6a). De los datos experimentales (Figura 5.6a y Tabla 5.1) es evidente que los derivados con el fluoróforo en la posición C-3 presentaron mayor incremento de rendimiento cuántico de fluorescencia (hasta 5 veces en el caso de

3β -NBD-ChTau), mientras que este efecto en el caso de los derivados de NBD en C-7 fue mucho menos acusado. El compuesto modelo NBD-CH dio resultados parecidos a los derivados C-3 de NBD. Este aumento era debido no sólo al efecto hidrofóbico de los sitios de unión de HSA sino también a la restricción de los grados de libertad, ya que el fluoróforo NBD es muy sensible a la naturaleza del entorno.^[134] El hecho de que se observaran diferencias tan significativas en el aumento relativo de intensidades de fluorescencia entre los derivados, podría deberse a una suma de dos factores. Por un lado, la hidrofobicidad del microentorno de la cavidad de HSA afectaba la fluorescencia del NBD y, por otro, las interacciones específicas de la proteína con el fluoróforo unido en diferentes posiciones del esqueleto de ácido cólico con una estereoquímica definida. Para comprobar esta hipótesis del aumento de hidrofobicidad se realizaron los espectros de emisión en disolución $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ utilizando diferentes proporciones de ambos (Figura 5.6b). Se observó que el aumento de hidrofobicidad se reflejaba en un aumento de fluorescencia pero similar para todos los derivados. Las interacciones específicas son, por tanto, responsables de las diferencias observadas entre unos derivados y otros en presencia de HSA. Estas interacciones involucran tanto el confinamiento de espacio proporcionado por el sitio de unión de HSA como las desactivaciones selectivas del estado excitado del NBD por aminoácidos situados en su proximidad (de hecho se observó transferencia electrónica de NBD a Trp en disolución de CH_3CN con una constante de velocidad $5.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

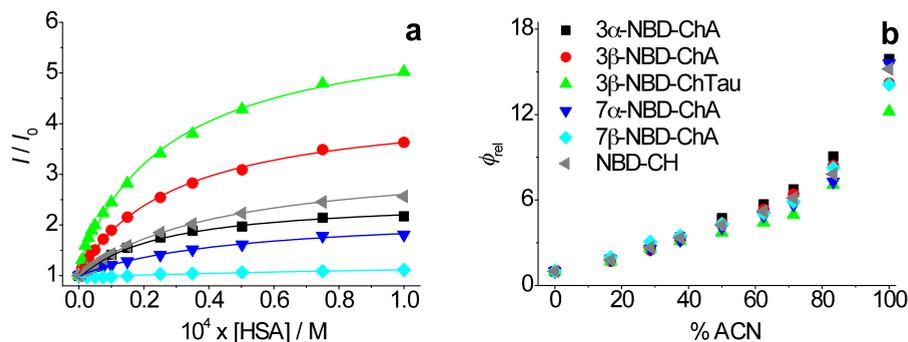


Figura 5.6: a) Cambios en la intensidad relativa de fluorescencia (I/I_0) de los derivados de NBD *versus* concentración de HSA. b) Cambios en el área relativa (ϕ_{rel}) de los derivados de NBD en H_2O con concentraciones crecientes de CH_3CN .

Con objeto de caracterizar los complejos, observados entre los derivados de ácido cólico y la HSA, se estudió en primer lugar la estequiometría de los mismos. Así, se representaron los cambios relativos en la absorción o emisión *versus* la fracción molar de HSA, manteniendo la concentración total (NBD + HSA) constante. Las representaciones de Job^[135] indicaron la formación de un complejo 1:1 para todos los derivados de ácido cólico (Figura 5.7a para un ejemplo), incluyendo el compuesto modelo (Figura 5.7b).

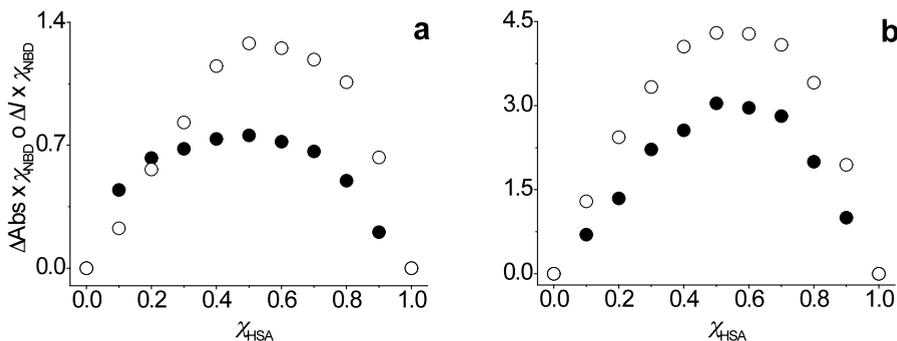
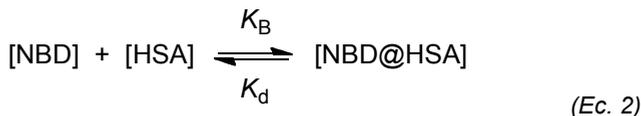


Figura 5.7: Representación de Job de absorción (●) o emisión (○) para: a) 3α-NBD-ChA; b) NBD-CH, concentración total de (NBD + HSA) 5 μM.

Una vez determinada la estequiometría se abordó el cálculo de la constante de asociación. Cuando un ligando derivado de NBD se une reversiblemente a HSA formando un complejo 1:1 (NBD@HSA), el equilibrio se puede representar como:



Este equilibrio está determinado por la constante de equilibrio o también constante de asociación o unión K_B , que es la inversa de la constante de disociación K_d :

$$K_d = \frac{1}{K_B} = \frac{[\text{NBD}][\text{HSA}]}{[\text{NBD@HSA}]}
 \tag{Ec. 3}$$

Los cambios de una señal observada S (respuesta en absorción o fluorescencia) del complejo resultante se pueden representar como:^[136]

$$S = a [\text{NBD}] + b [\text{NBD@HSA}] \quad (\text{Ec. 4})$$

donde S es un valor experimental y a y b son constantes de proporcionalidad. La concentración del complejo se puede representar en función de $[\text{NBD}]$, $[\text{HSA}]$ y K_d . Sustituyendo en la Ec. 4 y representando la variación relativa, se obtiene la siguiente ecuación:

$$S_{\text{rel}} = \frac{a[\text{NBD}]}{S_0} + \frac{b-a}{2S_0} \left([\text{NBD}] + [\text{HSA}] + K_d - \sqrt{([\text{NBD}] + [\text{HSA}] + K_d)^2 - 4[\text{NBD}][\text{HSA}]} \right) \quad (\text{Ec. 5})$$

donde S_{rel} es la absorbancia o intensidad de fluorescencia relativa. Para obtener los valores de K_d , y por tanto de K_B , los experimentos se realizan manteniendo una de las concentraciones constantes. Así, usando la Ec. 5 para los datos experimentales obtenidos (Figura 5.4 o Figura 5.6a), manteniendo la $[\text{NBD}]$ constante, se obtuvieron los valores de K_B (Tabla 5.2). Los resultados obtenidos a partir de los datos de absorción y emisión fueron del mismo orden de magnitud e indicaron que los derivados de NBD se unen eficientemente a la HSA.

Tabla 5.2: Constantes de asociación calculadas para los complejos NBD@HSA.

	$10^{-4} \times K_B / \text{M}^{-1}$ (UV-Vis)	$10^{-4} \times K_B / \text{M}^{-1}$ (fluorescencia)
3 α -NBD-ChA	(8.45 \pm 1.60)	(3.55 \pm 0.16)
3 β -NBD-ChA	(4.56 \pm 0.61)	(3.65 \pm 0.12)
3 β -NBD-ChTau	(4.32 \pm 0.55)	(4.98 \pm 0.11)
7 α -NBD-ChA	(1.81 \pm 0.45)	(2.10 \pm 0.16)
7 β -NBD-ChA	(1.20 \pm 0.18)	(0.51 \pm 0.20)
NBD-CH	(2.23 \pm 0.23)	(2.47 \pm 0.09)

A continuación se decidió explorar la posibilidad de transferencia de energía entre el triptófano de HSA y los derivados de NBD. Tal como se había mencionado en la introducción de este capítulo, la HSA posee tan sólo un triptófano (Trp), ubicado en el sitio 1, y la emisión de HSA puede ser sensible a la

presencia de un aceptor de energía.^[137] En este contexto, se estudió la fluorescencia de HSA (que corresponde a la emisión de Trp con un máximo a 338 nm, λ_{exc} 290 nm) tras adición de cantidades crecientes de los derivados de NBD. Como se puede ver en la Figura 5.8a, la emisión de Trp se desactivaba eficientemente en presencia de NBD y a la vez aparecía una nueva banda, propia de la emisión de NBD ($\lambda \sim 520$ nm). Esta observación, para todos los derivados de NBD, fue atribuida a una transferencia de energía singlete - singlete de Trp a NBD. Aplicando la ecuación de Stern-Volmer (Ec. 1, p. 43), tomando para Trp $\tau_0 = 6.38$ ns,^[137] se obtuvieron las correspondientes constantes de velocidad de desactivación que fueron de $k_q > 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 5.8b para dos ejemplos), mucho mayor que la constante de difusión en biopolímeros,^[138] indicando así el carácter estático de esta desactivación.

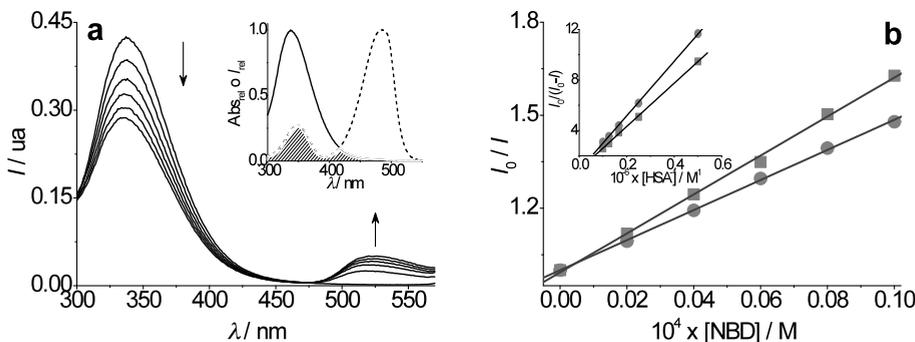


Figura 5.8: Espectro de emisión de HSA (10 μM) en PBS tras adición de 3β-NBD-ChTau (0-10 μM) en PBS, λ_{exc} =290 nm; Insert: Solapamiento de la emisión de HSA (—) y la absorción de 3β-NBD-ChTau (- - -), normalizadas. b) Representación de Stern-Volmer para 3β-NBD-ChA (■) y 3β-NBD-ChTau (●); Insert: Representación de Stern-Volmer modificada para los mismos derivados.

En este caso, los datos se analizaron también con una ecuación de Stern-Volmer modificada:^[139]

$$\frac{I_0}{\Delta I} = \frac{I_0}{I_0 - I} = \frac{1}{f_a K_B} \frac{1}{[\text{NBD}]} + \frac{1}{f_a} \quad (\text{Ec. 6})$$

donde f_a es la fracción de las partes emisivas accesibles y K_B la constante de asociación efectiva para el fluoróforo. De las correspondientes pendientes de estas representaciones (Insert de Figura 5.8b para los mismos ejemplos) se determinaron las K_B obteniéndose 5.18×10^4 y $3.90 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para 3β-NBD-ChA y

3β-NBD-ChTau, respectivamente, de acuerdo con los valores previamente obtenidos de los datos de absorción UV-Vis y emisión de fluorescencia (Tabla 5.2, p. 60).

Según la teoría de Förster,^[140] una molécula dadora, excitada a una longitud de onda determinada, puede transferir la energía no radiativamente por interacciones dipolo - dipolo a un aceptor que se halla a una “distancia de Förster” (2 - 8 nm) de él. La transferencia de energía por un camino no radiativo se denomina FRET (“Fluorescence Resonance Energy Transfer”) cuando ambos, el dador y el aceptor son fluorescentes. La eficiencia (E) depende: i) de la distancia entre el dador y el aceptor que tiene que estar dentro de la distancia de Förster (r), ii) del solapamiento (J) que tiene que ser apreciable entre la emisión del dador y la absorción del aceptor y iii) de la propia orientación del dipolo de transición del dador y del aceptor. La eficiencia de FRET (E), que depende tanto de la inversa de la distancia (r) elevada a la sexta potencia como de la distancia crítica (R_0) a la cual se transfiere el 50% de la energía en condiciones de proporción dador:aceptor 1:1 se puede representar como:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{I}{I_0} \quad (\text{Ec. 7})$$

donde I_0 e I son las intensidades de fluorescencia del dador en ausencia y en presencia del aceptor (proporción 1:1), respectivamente. Además, R_0 se puede calcular como:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} \kappa^2 n^{-4} \phi_D J \quad (\text{Ec. 8})$$

donde κ^2 es el factor de orientación espacial, n es el índice de refracción del medio y ϕ_D es el rendimiento cuántico de fluorescencia del dador. J es la integral de solapamiento del espectro de emisión del dador y el espectro de absorción del aceptor (Insert de la Figura 5.8a), que se puede calcular como:

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \quad (\text{Ec. 9})$$

Para calcular la distancia entre Trp y el NBD de los derivados se utilizaron los siguientes parámetros: se tomó un valor de $\kappa^2 = 0.67$ ^[141] para una distribución isotrópica de la orientación del dador y el aceptor, $n = 1.333$ para PBS 0.01M (pH 7.4), y $\phi_D = 0.14$ para Trp en medio acuoso.^[142] Con estos parámetros, los valores que se obtuvieron para R_0 fueron de 23 - 25 Å, y las distancias estimadas r entre el triptófano y el fluoróforo NBD fueron de 27 - 30 Å. Estos resultados explican la desactivación observada; sin embargo, son compatibles con la posibilidad de que los derivados de NBD se encuentren dentro de la albúmina tanto en el sitio 1 como en el sitio 2.

A continuación, después de confirmar la formación de los complejos NBD@HSA de estequiometría 1:1 y determinar las correspondientes K_B , se realizaron experimentos adicionales para determinar el sitio de unión de estos compuestos en la HSA. Para ello, se utilizaron sustratos específicos, en concreto warfarina e ibuprofeno como sondas específicas de los sitios 1 y 2, respectivamente. Sus constantes de unión a HSA son $(2.5 - 3.6) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para warfarina y $(2.6 - 6.7) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para ibuprofeno.^[136] Así pues, se registraron los espectros de fluorescencia de los derivados de NBD en PBS en presencia de dos equivalentes de HSA tras adiciones de concentraciones crecientes de cada una de las sondas. En el caso de los derivados de ácido cólico, la adición de warfarina causó una disminución de la intensidad (se comprobó que no se trataba de desactivación por transferencia de energía con un blanco) que se atribuyó a su desplazamiento fuera del sitio 1 de HSA, mientras que la adición de ibuprofeno no causó ningún cambio en la fluorescencia (Figura 5.9a). El efecto contrario se observó en el caso del compuesto modelo NBD-CH que se desplazaba con ibuprofeno mientras que la warfarina no tuvo ningún efecto competitivo (Figura 5.9b).

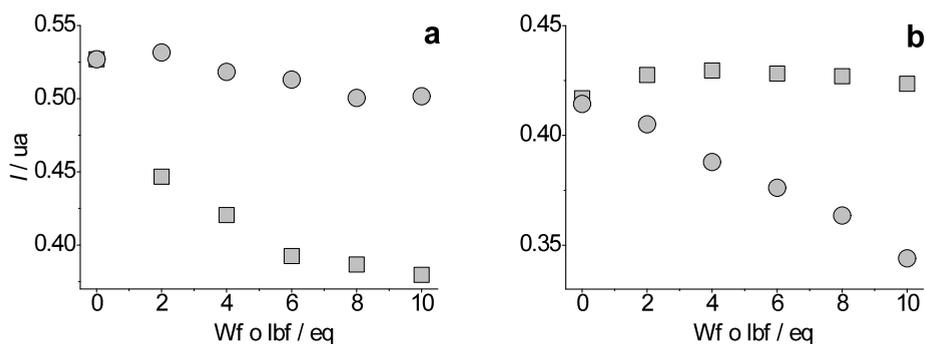


Figura 5.9: Cambios en la intensidad de fluorescencia de: a) 3β-NBD-ChA (5 μM) y HSA (10 μM); b) NBD-CH (5 μM) y HSA (10 μM) tras adiciones de warfarina (■) o ibuprofeno (●) 0-50 μM; $\lambda_{exc}=445$ nm.

Una comprobación adicional de la asignación del sitio de unión 1 para los derivados de ácido cólico se realizó con un experimento competitivo de formación del complejo NBD@HSA en presencia de warfarina. Tal como se puede ver en la Figura 5.10 para 3β-NBD-ChTau, la formación de dicho complejo se vio disminuida en presencia de warfarina.

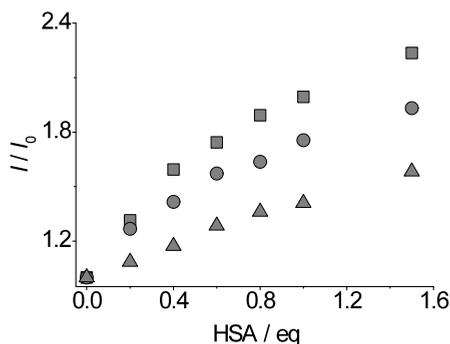
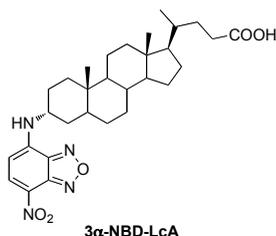
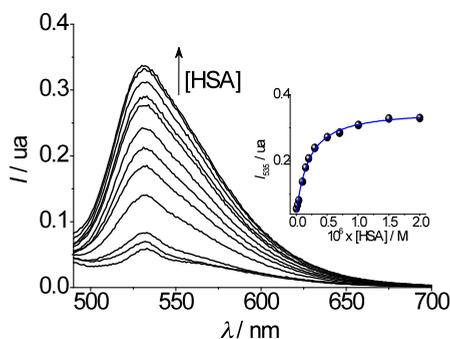


Figura 5.10: Curvas de valoración de 3β-NBD-ChTau (5 μM) en ausencia (■) y en presencia de warfarina (5 μM ●, 25 μM ▲) tras adiciones de HSA (0-7.5 μM), $\lambda_{exc}=445$ nm.

A continuación, se intentaron realizar mismos experimentos con el derivado fluorescente de ácido litocólico, 3α-NBD-LcA (Figura 5.11), ya que está descrito que el natural se une a HSA en el sitio 2.^[143-144] Sus propiedades fotofísicas determinadas en etanol en el apartado 4.2.2. fueron muy similares a las de los demás derivados de la familia de NBD. Sin embargo, resultó ser prácticamente insoluble en medio acuoso.


 Figura 5.11: Estructura de 3 α -NBD-LcA.

Para los estudios con HSA se tuvo que recurrir a unas concentraciones extremadamente bajas (100 nM) a las cuales no se pudieron realizar los experimentos de UV-Vis en presencia de HSA. A pesar de ello, en fluorescencia, un método muy sensible, se observó un aumento de la intensidad por adición de cantidades crecientes de HSA, tal como en los casos anteriores (Figura 5.12).


 Figura 5.12: Espectro de emisión de 3 α -NBD-LcA (0.1 μ M) en PBS tras adición de HSA (0-2 μ M), λ_{exc} =450 nm; Insert: curva de valoración a λ =535 nm con el correspondiente ajuste.

Así, representando la intensidad *versus* concentración de HSA, se obtuvo la curva de valoración (Insert de la Figura 5.12) para determinar la constante de asociación. No obstante, aplicando la Ec. 5 (p. 60) para un complejo 1:1 no fue posible ajustar los valores obtenidos, lo que sugirió la existencia de dos constantes de asociación. Con un programa de ajustes para complejos supramoleculares, cedido por el Prof. Antoni Costa (UIB), los datos experimentales se ajustaron a dos K_B : $4.17 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ y $8.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, lo que indicó que tiene afinidad por ambos sitios de unión. No se pudo determinar el sitio de preferencia, ya que la constante de mayor afinidad supera las de las sondas específicas, warfarina e ibuprofeno, por lo que los experimentos de desplazamiento no dieron una respuesta concluyente.

5.2.2. Derivados de Dansilo

Una vez demostrado que los derivados fluorescentes de ácido cólico se complejan con la albúmina y que es posible, en base a medidas tanto de absorción como de emisión, determinar la estequiometría de los complejos, las constantes de asociación y el sitio de unión, se planteó la posibilidad de utilizar otro fluoróforo como el dansilo y estudiar si éste permitiría estudiar otras características del transporte de los ácidos biliares por HSA. Por ejemplo, es conocido que el fluoróforo dansilo por sí mismo no tiene un sitio preferente de unión a la HSA, así la dansilamida y la dansilsarcosina tienen afinidad por el sitio 1 y el 2, respectivamente.^[136] Se eligió el ácido cólico como ácido biliar modelo y se utilizaron los derivados que contenían el dansilo en la posición 3 α , 3 β , 7 α y 7 β , sintetizados previamente, que se pueden ver en la Figura 5.13.

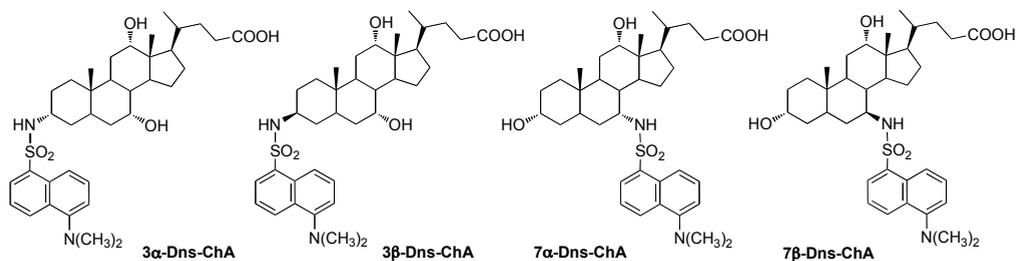


Figura 5.13: Familia de los derivados de Dns.

Las propiedades fotofísicas de estos derivados, determinadas en PBS se describieron en el Capítulo 4. A modo de resumen, el espectro de absorción en PBS mostró las bandas principales en la zona UV A, con el máximo a 330 nm. Los derivados mostraron fluorescencia verde con el máximo centrado a 550 y 540 nm para los derivados C-3 y C-7, respectivamente (Tabla 4.3, p. 43).

Una vez establecidas sus propiedades de absorción y emisión en disolución, se estudió el estado fundamental de los derivados en presencia de HSA. Desafortunadamente, la albúmina presenta una absorción residual en la misma zona que el fluoróforo Dns (ca. 330 nm) y el solapamiento resultante impidió observar los cambios relevantes atribuidos a la formación de un complejo en el espectro UV-Vis, que se producían conforme se añadían concentraciones crecientes de HSA, y no observándose un punto isoabsorptivo. Para evitar este problema se hicieron experimentos blanco UV-Vis con concentraciones idénticas de HSA en PBS y se restaron a continuación ambos espectros. El resultado, tal

como se puede apreciar en la Figura 5.14, desveló claramente un punto isoabsorptivo a 340 nm. Los cambios observados después de la resta indican de nuevo la formación de un complejo entre los Dns-ChA y HSA en estado fundamental.

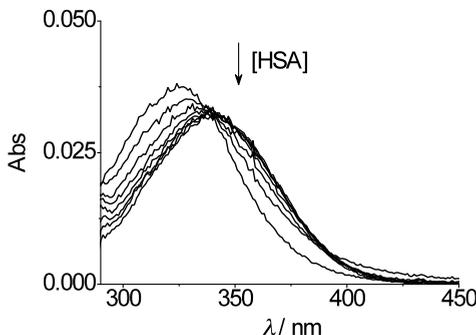


Figura 5.14: Zona ampliada del espectro de absorción de 3 α -Dns-ChA en PBS (10 μ M) en presencia de concentraciones crecientes de HSA (0-50 μ M) al que se ha restado la absorción correspondiente de HSA en PBS a las mismas concentraciones.

Así, se pudieron realizar a continuación los experimentos de fluorescencia de los Dns-ChA. En presencia de HSA, los espectros de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 340$ nm, punto isoabsorptivo) de los derivados de Dns no sólo mostraron un desplazamiento hipsocrómico (ca. 50 nm) sino también un claro aumento de intensidad, ca. 10 veces para los derivados C-3 y ca. 3 veces para los C-7 (Figura 5.15). Representando las áreas relativas *versus* concentraciones de HSA se obtuvieron las correspondientes curvas de valoración que permitirían determinar las constantes de asociación (Figura 5.16). Para el cálculo de estas últimas se aplicó la ecuación utilizada para los derivados de NBD (Ec. 5, p. 60) asumiendo una estequiometría 1:1 para los complejos formados. En el caso de los derivados C-3 fue imposible obtener buenos ajustes mientras que en el caso de los derivados C-7 se obtuvieron unas constantes de asociación del orden de 10^4 M⁻¹ (Tabla 5.3). En cuanto a los derivados C-3, de nuevo se recurrió a un ajuste 1:2, obteniéndose así buenos resultados con dos constantes de asociación (Tabla 5.3).

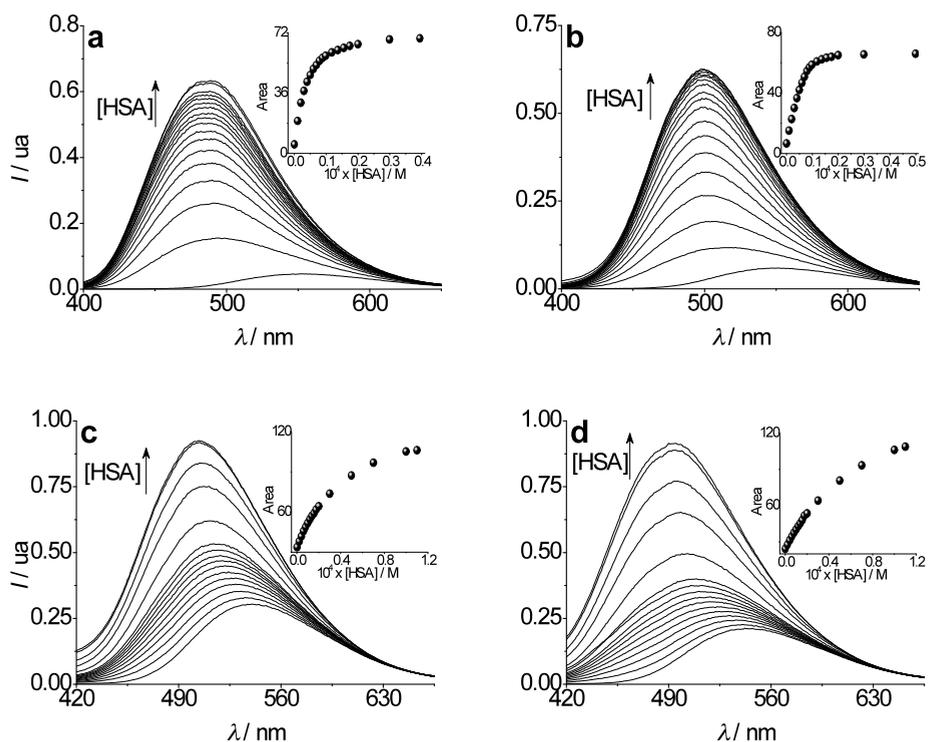


Figura 5.15: Espectros de emisión de a) 3α -Dns-ChA; b) 3β -Dns-ChA; c) 7α -Dns-ChA; d) 7β -Dns-ChA en PBS ($10\ \mu\text{M}$) en presencia de concentraciones crecientes de HSA (0 - $50\ \mu\text{M}$ para los C-3, 0 - $110\ \mu\text{M}$ para los derivados C-7), $\lambda_{\text{exc}}=340\ \text{nm}$; Insert: curvas de valoración correspondientes.

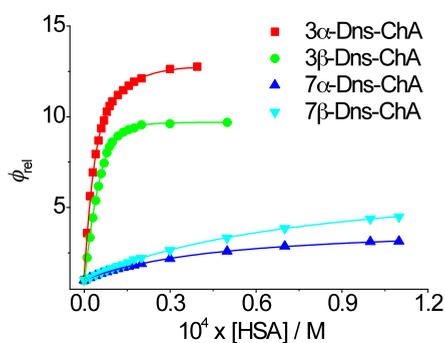
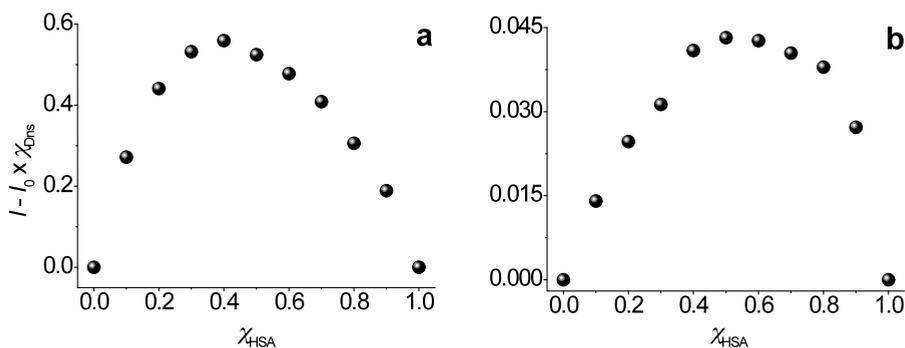


Figura 5.16: Curvas de valoración relativas de los cuatro derivados con los correspondientes ajustes.

Tabla 5.3: Constantes de asociación calculadas para los complejos Dns-ChA@HSA.

	K_{B1} / M^{-1}	K_{B2} / M^{-1}
3 α -Dns-ChA	$(7.24 \pm 0.22) \times 10^5$	$(7.59 \pm 0.23) \times 10^4$
3 β -Dns-ChA	$(4.17 \pm 0.13) \times 10^5$	$(0.91 \pm 0.03) \times 10^4$
7 α -Dns-ChA	$(2.50 \pm 0.06) \times 10^4$	-
7 β -Dns-ChA	$(1.43 \pm 0.04) \times 10^4$	-

Para confirmar el distinto comportamiento observado entre ambos regioisómeros, se realizaron experimentos de Job para confirmar la estequiometría correcta de los complejos. A partir de los resultados obtenidos para los derivados C-3 se puede deducir una estequiometría 1:2 (Figura 5.17a); mientras que los resultados obtenidos para los derivados C-7 confirmaron el resultado obtenido a partir del ajuste de K_B , es decir, una estequiometría 1:1 (Figura 5.17b). No obstante, cabe destacar que si se comparan las dos constantes, tanto para el 3 α - como para 3 β -Dns-ChA, en condiciones de no saturación el sitio con mayor afinidad estaría ocupado por el ligando en un 80 - 90%, por lo tanto se puede hablar de un sitio mayoritario.


 Figura 5.17: Representación de Job de fluorescencia para: a) 3 α -Dns-ChA y b) 7 α -Dns-ChA, concentración total de (Dns + HSA) 5 μ M.

A diferencia de los derivados de NBD, los derivados de Dns en PBS presentan tiempos de vida de singlete más largos (ca. 5 ns). Este hecho podría resultar útil para analizar el comportamiento de los derivados en presencia de albúmina, siempre y cuando el compuesto presente otro tiempo de vida dentro de la proteína. Experimentos similares basados en análisis de los tiempos de vida de triplete se han realizado en el grupo de investigación.^[145-146] Como se puede apreciar en la Figura 5.18, el singlete del derivado de Dns en presencia de HSA

mostró un tiempo de vida mucho mayor que en PBS. Así pues, la desactivación tipo monoexponencial en ausencia de HSA pasó a ser multiexponencial en presencia de HSA. Los tiempos en ausencia y en presencia de HSA se resumen en la Tabla 5.5.

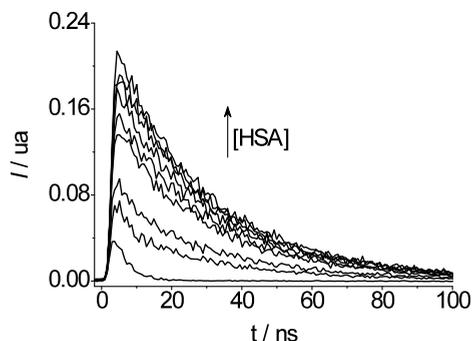


Figura 5.18: Cinéticas de desactivación del singlete de 3β-Dns-ChA (10 μM) en PBS tras adiciones de HSA (0-50 μM), $\lambda_{exc}=358$ nm.

Tabla 5.5: Tiempos de vida de singlete de los derivados de Dns en ausencia y en presencia de HSA.

	τ_S / ns	
	libre	unido a HSA
3α-Dns-ChA	3.6	24.6
3β-Dns-ChA	4.2	25.5
7α-Dns-ChA	7.9	21.1
7β-Dns-ChA	4.8	25.7

El aumento apreciable en los tiempos de vida de singlete de los Dns-ChA dentro de la proteína se debe a varios factores, entre los que se incluyen importantes restricciones en los grados de libertad, así como protección del estado excitado singlete frente a otros desactivadores, sobre todo el oxígeno (apartado 4.2.3., p. 43). Con objeto de calcular la ocupación y la distribución en HSA se aplicó el análisis de regresión de las curvas de desactivación multiexponencial. Desafortunadamente, en el caso de los derivados C-3, a pesar de existir afinidad a ambos sitios de unión, no se observó diferencia en los tiempos de vida de singlete en los sitios 1 y 2. Por lo tanto, en todos los casos se obtuvieron ajustes de las curvas de desactivación siguiendo una ley de segundo orden:

$$\Delta I = \Delta I_0 + A_L e^{(-t/\tau_L)} + A_U e^{(-t/\tau_U)} \quad (Ec. 10)$$

donde los subíndices “L” y “U” se refieren al derivado libre en disolución y unido a la HSA, respectivamente. Usando los factores preexponenciales (A) se pudo calcular la proporción de los Dns-ChA unidos a HSA según la fórmula:

$$\%_U = \frac{\frac{A_U}{\phi_{rel}}}{A_L + \frac{A_U}{\phi_{rel}}} \times 100 \quad (Ec. 11)$$

donde ϕ_{rel} es el rendimiento cuántico relativo de fluorescencia de los derivados de Dns dentro de la albúmina. Los porcentajes de unión para los cuatro derivados están representados comparativamente en la Figura 5.20 y se corresponden razonablemente con los resultados obtenidos a partir de la fluorescencia en estado estacionario.

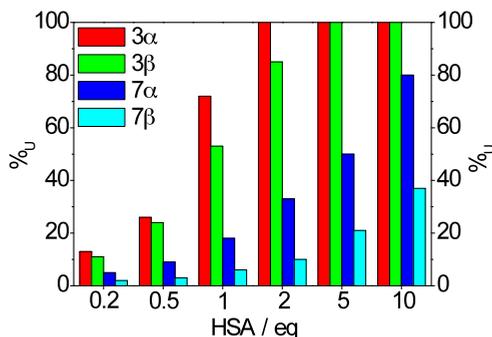


Figura 5.19: Porcentaje de unión de los Dns-ChA en PBS (10 μM) en presencia de diferentes concentraciones de HSA (0-100 μM).

Dado que el fluoróforo dansilo presenta la banda principal de absorción donde exhibe fluorescencia el triptófano (Figura 5.20a), se esperaría, tal como en el caso de los NBD, observar una transferencia de energía singlete - singlete entre Trp y Dns. Así, de la misma manera que para la familia de NBDs, se hicieron experimentos de FRET para estimar las distancias entre el fluoróforo y el Trp. En presencia de concentraciones crecientes de los derivados Dns-ChA la emisión de

Trp a 338 nm disminuía (Figura 5.20b) a la vez que aparecía una nueva banda correspondiente a la emisión de Dns. Utilizando la ecuación de Stern-Volmer (Ec. 1, p. 43) se obtuvieron los valores de las constantes de desactivación siendo del orden de 10^{12} - 10^{13} $M^{-1} s^{-1}$, superando la constante de difusión y apuntando a un carácter estático de dicha desactivación. La representación de Stern-Volmer modificada (Ec. 6, p. 61), se aplicó solamente para los derivados C-7, ya que ésta tiene en cuenta una sola constante de asociación. Se obtuvieron unos valores que estaban en acuerdo con las constantes calculadas a partir de los datos de fluorescencia, siendo $3.23 \times 10^4 M^{-1}$ y $1.77 \times 10^4 M^{-1}$ para el 7α -y 7β -Dns-ChA, respectivamente. A continuación, partiendo de los resultados obtenidos con los derivados de NBD y asumiendo un proceso de transferencia de energía por un mecanismo de Förster, se calcularon las distancias entre el dador y el aceptor (Ec. 7 - Ec. 9, p. 62). Para los derivados C-3, la distancia calculada entre el Trp y el Dns fue de ca. 21 Å, y para los C-7 de ca. 25 Å. De nuevo, esta información no era contundente para la asignación del sitio de unión.

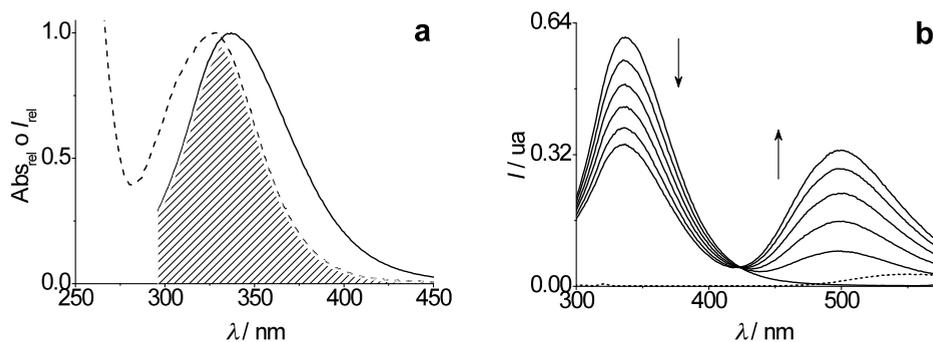


Figura 5.20: a) Solapamiento de la emisión de HSA (—), $\lambda_{exc}=290$ nm y de la absorción de 3β -Dns-ChA (- -) en PBS, normalizadas. b) Espectro de emisión de HSA (20 μ M) en PBS, tras adición de 3β -Dns-ChA (0-20 μ M), la línea de puntos corresponde al blanco: 3β -Dns-ChA (20 μ M) en PBS, $\lambda_{exc}=290$ nm.

Con objeto de determinar inequívocamente el sitio de unión mayoritario de todos los derivados, se llevaron a cabo experimentos de desplazamiento con warfarina e ibuprofeno, sondas específicas de los sitios 1 y 2, respectivamente. Los derivados de C-3 presentaron un comportamiento claramente distinto a los NBD-ChAs. Tal como se observa en la Figura 5.21a, el desplazamiento de 3α -Dns-ChA por ibuprofeno confirmó la ocupación preferente del sitio 2 de HSA por este compuesto; la misma tendencia se observó en el caso de 3β -Dns-ChA. Por otro lado, los derivados C-7 se comportaron como los NBD, ya que se observó

desplazamiento con warfarina (ver 7β -DnsChA en la Figura 5.21b), por lo que el sitio de unión resultó ser el sitio 1.

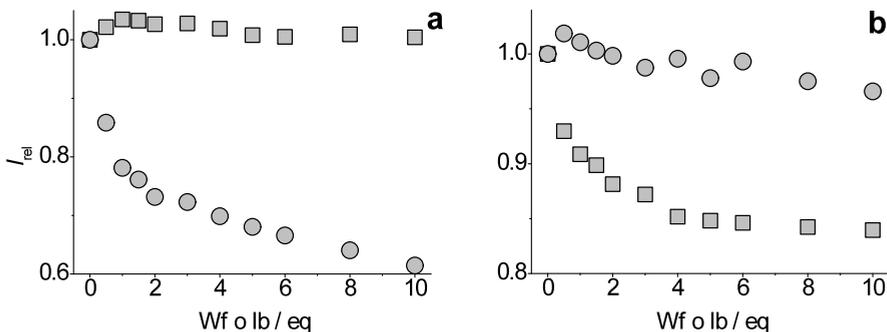


Figura 5.21: Cambios en la intensidad de fluorescencia relativa de a) 3α -Dns-ChA (10 μ M); b) 7β -Dns-ChA (10 μ M) en presencia de HSA (10 μ M) tras adiciones de warfarina (\blacksquare) 0-100 μ M, λ_{exc} =360 nm o ibuprofeno (\bullet) 0-100 μ M, λ_{exc} =340 nm.

Dado que los derivados de C-7 se comportaron de manera idéntica a los de NBD y no aportaron ninguna información adicional en cuanto al estudio de la interacción de los ácidos biliares con albúmina, se decidió explotar los derivados de C-3. En concreto, se decidió experimentar su desplazamiento por los ácidos biliares naturales, ácido cólico (ChA) y litocólico (LcA), con el propósito de averiguar si estos derivados serían útiles como sondas fluorescentes y podrían imitar en su comportamiento a los naturales. Por otra parte, la asignación inequívoca del sitio de unión para los ácidos biliares naturales aportaría un avance, ya que hasta ahora este problema no ha sido completamente resuelto.^[130-133,143-144] Primero se escogió el 3α -Dns-ChA como sonda fluorescente del sitio 2 y los resultados de los experimentos de desplazamiento con los ácidos biliares naturales se pueden ver en la Figura 5.22a. Así, el ácido cólico (ChA) no desplazó a 3α -Dns-ChA, lo que podría deberse bien a que se coloca en el otro sitio de unión o a que tiene una constante de afinidad menor. Sin embargo, el ácido litocólico (LcA), consiguió desplazar el derivado 3α -Dns-ChA fuera de HSA. El isómero 3β -Dns-ChA, en las mismas condiciones, demostró incluso mayor desplazamiento por LcA (Figura 5.22b).

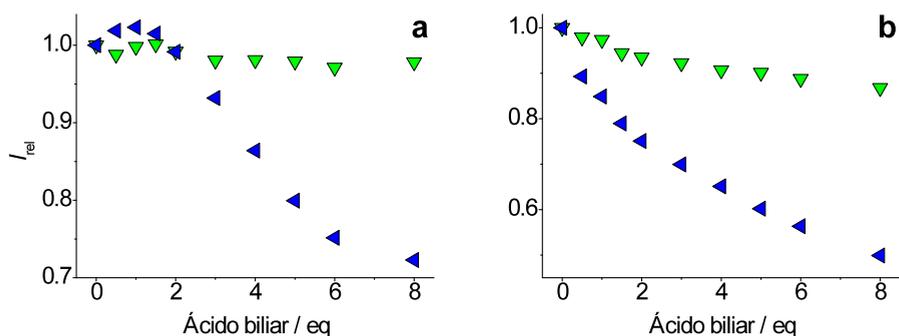


Figura 5.22: Cambios en la intensidad de fluorescencia relativa de a) 3α -Dns-ChA (10 μ M); b) 3β -Dns-ChA (10 μ M) en presencia de HSA (10 μ M) tras adiciones de ácido cólico (∇) o ácido litocólico (\blacktriangleleft) (0-80 μ M), λ_{exc} =340 nm.

5.3. Conclusiones

Se han utilizado por primera vez derivados fluorescentes del ácido cólico para estudiar y racionalizar las interacciones entre ácidos biliares y albúmina sérica humana.

En la familia de NBD, representada por cinco derivados y un compuesto modelo con el mismo fluoróforo, pero sustituyendo la estructura de esteroide por un ciclohexilo, se observaron cambios significativos en la absorción y en la emisión en presencia de HSA. Ello permitió utilizar la representación de Job para comprobar que los complejos tienen estequiometría 1:1. A partir de los datos de variación de absorbancia o intensidad de fluorescencia con HSA se calcularon las constantes de asociación para la formación de los complejos NBD-ChA@HSA, que son del orden de 10^4 M^{-1} . Gracias a la transferencia de energía observada entre el único triptófano presente en HSA y el fluoróforo NBD, asumiendo un mecanismo de Förster, se pudieron estimar las distancias entre ambos, que fueron de 27 - 30 Å, compatibles con los dos sitios de unión. Por ello se hizo necesario realizar experimentos de desplazamiento, utilizando warfarina e ibuprofeno como sondas específicas para los sitios de unión 1 y 2 de HSA, respectivamente. En base al desplazamiento observado por warfarina se asignó el sitio 1 de unión para los análogos de ácido cólico. El compuesto modelo fue desplazado por ibuprofeno, por lo que se asignó al sitio de unión 2, lo que indica que el fluoróforo presente en

la estructura de ácido cólico no resulta determinante en el sitio de unión y el reconocimiento por HSA. Finalmente, el derivado fluorescente de ácido litocólico mostró afinidad por ambos sitios de unión, con constantes de asociación calculadas del orden de 10^6 M^{-1} , dos órdenes de magnitud mayores que para los NBD-cólicos. Esta observación confirmó la tendencia de que cada hidroxilo presente en la molécula de ácido biliar disminuye la constante de unión en un orden de magnitud.

La interacción de HSA con los derivados de la familia de dansilo, representada por cuatro estereoisómeros, se llevó a cabo por fluorescencia tanto en estado estacionario como en tiempo resuelto. Se observaron aumentos significativos en la emisión y tiempos de vida en presencia de HSA. A partir de los datos de variación de intensidad de fluorescencia con HSA se calcularon las constantes de asociación para la formación de los complejos Dns-ChA@HSA. Se observó una regiodiferenciación, ya que los derivados C-3 presentaban dos constantes de afinidad del orden de *ca.* 10^5 y 10^4 M^{-1} , mientras que los derivados C-7 una sola constante, del orden de 10^4 M^{-1} . Las medidas de tiempo de vida de fluorescencia en presencia de HSA permitieron calcular el porcentaje de unión, usando los valores preexponenciales de los ajustes; sin embargo, no se pudo distinguir entre los sitios 1 y 2 en el caso de los derivados C-3. Gracias a la transferencia de energía observada entre el único triptófano presente en HSA y el fluoróforo Dns por un mecanismo de Förster, se pudieron estimar las distancias entre ambos, que fueron de 21 Å y 25 Å para los regioisómeros C-3 y C-7, respectivamente. Experimentos adicionales de desplazamiento, utilizando warfarina e ibuprofeno como sondas específicas para los sitios de unión 1 y 2 de HSA, respectivamente, manifestaron ocupación mayoritaria del sitio 2 por los derivados C-3, mientras que los derivados C-7 se comportaron como los derivados de NBD, es decir mostraron afinidad al sitio 1. Finalmente, utilizando los compuestos C-3 como sondas fluorescentes del sitio 2, en experimentos de desplazamiento por dos ácidos biliares naturales, el ácido cólico y el ácido litocólico, se desveló una clara diferencia entre ambos. Su desplazamiento del HSA por el ácido litocólico confirmó la afinidad de éste por el sitio 2. Así, un simple cambio de la posición de la unión covalente del dansilo al ácido cólico permitió una aproximación a los ácidos biliares naturales, comportándose los derivados C-3

como análogos del ácido litocólico y los C-7 como análogos del ácido cólico natural.

De esta forma se han preparado derivados fluorescentes del ácido cólico utilizando los fluoróforos nitrobenzofurazano y dansilo. A partir de los resultados de desplazamiento por sondas específicas y los ácidos biliares naturales se puede concluir que los NBD-ChA y los C-7 Dns-ChA resultan análogos fluorescentes apropiados para estudiar el comportamiento de ácido cólico mientras que los C-3 Dns-ChA se pueden utilizar como análogos fluorescentes de ácido litocólico.

Capítulo 6

Medidas de Transporte en Modelos Celulares

6.1. Introducción

La complejidad morfológica del hígado, la complejidad biológica del transporte transcelular, así como el conjunto de la circulación enterohepática de los ácidos biliares son objeto de investigación durante las últimas décadas.^[65-66] Recientemente, diferentes proteínas transportadoras de ácidos biliares han sido aisladas, expresadas y/o clonadas para proporcionar información molecular sobre las características generales del transporte.^[38,40] Se puede encontrar una gran cantidad de modelos celulares *ex vivo* o *in vitro* para explorar las funciones y regulación de transportadores hepáticos, incluyendo hígado perfundido,^[147] trozos de hígado,^[148] cultivos primarios de hepatocitos (bien como monocapa convencional o bien como cultivos de “sandwich”),^[149] o suspensiones primarias de hepatocitos.^[150] La identificación de los transportadores involucrados en cada proceso particular requiere un modelo celular que mantenga la expresión fisiológica de la mayoría, si no de todos los transportadores.

La metodología más común para realizar dichos estudios se basa en un marcaje de los ácidos biliares, bien isotópicamente^[134,151-152] o bien mediante preparación de derivados fluorescentes.^[79,84,153]

Los ácidos biliares fluorescentes presentan una gran ventaja desde el punto de vista de la sensibilidad; sin embargo, en el sistema biológico es necesario que se mantenga realmente una analogía funcional con los ácidos biliares naturales, en el sentido de su solubilidad, transporte, metabolismo, toxicidad, etc.

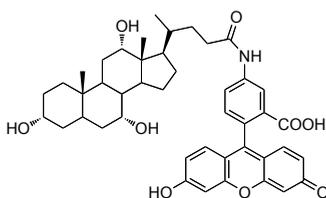
Aparte de la microscopía de fluorescencia, otra técnica basada en medidas de fluorescencia es la citometría de flujo, que presenta diferentes ventajas y utilidades, como por ejemplo el menor tiempo en obtener resultados, la posibilidad de medir diversos parámetros en decenas de millares de células individuales en pocos segundos o un menor costo. Su aplicación utilizando los derivados fluorescentes sintetizados que se describe a continuación se llevó a cabo en colaboración con el Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fé de Valencia, bajo la dirección del Prof. J. V. Castell y con el Centro de Investigación Príncipe Felipe, bajo la dirección del Dr. J.-E. O'Connor.

6.2. Aplicación de Citometría de Flujo con los Derivados Sintetizados

La citometría de flujo es una técnica cuantitativa basada en medidas de propiedades de absorción y dispersión de luz por la célula o partícula subcelular, así como en la fluorescencia emitida por fluoróforos unidos a componentes celulares de interés, inducida por una iluminación apropiada. Permite examinar propiedades funcionales de células (o partículas) individuales, del tamaño de 0.5 a 40 μm , en tiempo real conforme se les hace pasar a través de un haz de luz. Para su análisis por citometría de flujo, las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido.^[154] Ensayos cinéticos por citometría de flujo más específicos han sido utilizados por ejemplo para monitorizar el transporte a través de la membrana celular,^[155] o metabolismo oxidativo en los hepatocitos.^[156]

Los derivados fluorescentes del ácido cólico sintetizados fueron utilizados en citometría de flujo con hepatocitos, con objeto de estudiar la captación específica por las células y por extensión, para detectar y cuantificar los efectos inhibidores del transporte de fármacos colestásicos.

6.2.1. Derivado de Aminofluoresceína



CamF

Con objeto de evaluar si CamF es apropiado para estudios adicionales de transporte por citometría de flujo, se estudió la dinámica de transporte de CamF a través de la membrana plasmática. En primer lugar, se realizaron experimentos de cinética de captación de CamF por hepatocitos (de ratones). Tal como se puede ver en la Figura 6.1, el experimento con yoduro de propidio (ver Parte Experimental) permitió identificar células muertas (región R3) que presentaban fluorescencia naranja muy intensa y células vivas (región R1) con fluorescencia naranja débil (autofluorescencia). De este modo se pudo seguir la captación por células vivas y muertas por separado en una representación cinética de intensidad de fluorescencia verde *versus* tiempo (Figura 6.2).

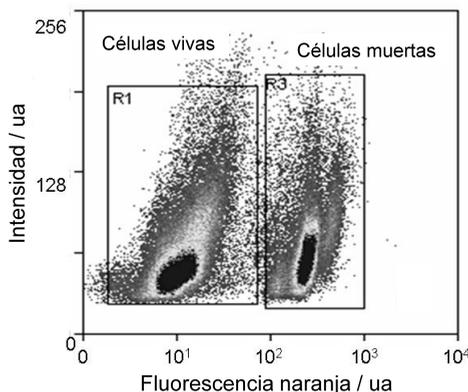


Figura 6.1: Determinación de células vivas y muertas.

Los resultados muestran (Figura 6.2) que los hepatocitos vivos acumulan lenta pero constantemente el CamF a lo largo de minutos mientras que las células muertas captan el CamF inmediatamente, en un rápido equilibrio con el compuesto fluorescente del medio.

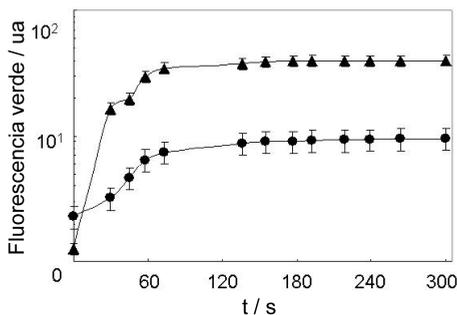


Figura 6.2: Captación cinética de CamF por hepatocitos vivos (●) y muertos (▲).

En una segunda serie de ensayos se estudió la dependencia del transporte a través de la membrana plasmática a distintas concentraciones de CamF. Suspensiones de células conteniendo cantidades de CamF sometidos a los mismos experimentos cinéticos mostraron que la captación resultaba claramente dependiente de la concentración extracelular de CamF (Figura 6.3a). Como un ensayo en blanco, se realizaron medidas de fluorescencia de CamF en disolución etanólica sin células, en placa de 96-pozos, en las mismas condiciones ópticas experimentales del citómetro de flujo. Éste resultó de acuerdo con el comportamiento de CamF con células (Figura 6.3b).

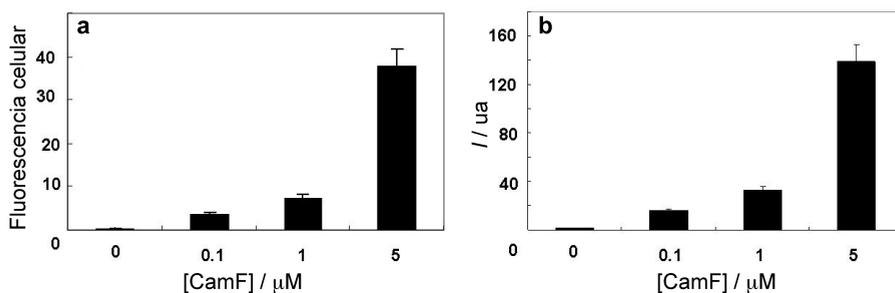
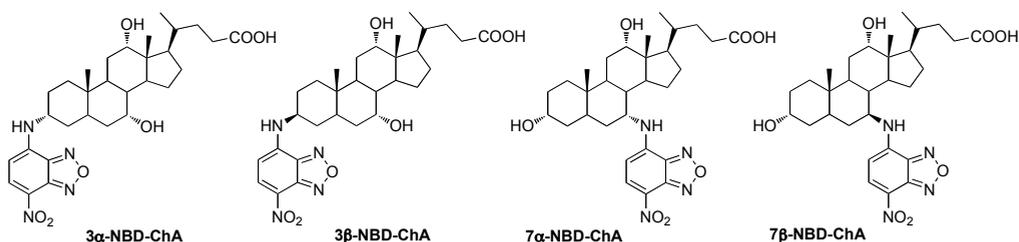


Figura 6.3: a) Determinación de la dependencia de la fluorescencia intracelular (hepatocitos vivos) *versus* concentración de CamF. b) Dependencia de la intensidad de fluorescencia en disolución en función de la concentración de CamF.

6.2.2. Derivados de Nitrobenzofurazano



Estos derivados fueron también utilizados en citometría de flujo con hepatocitos, tal como se ha discutido en el caso de CamF. Inicialmente, para realizar experimentos de captación específica, se identificaron las células vivas para los análisis y se excluyeron las muertas (Figura 6.4a). De esta manera se siguió el crecimiento de fluorescencia verde de las células vivas, correspondiente a la emisión de los derivados NBD, *versus* tiempo (Figura 6.4b).

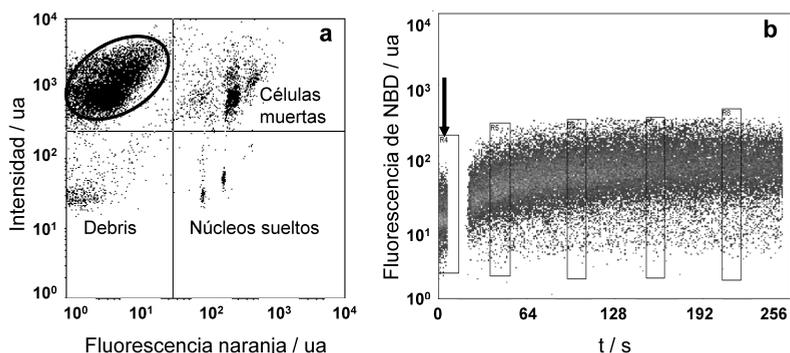


Figura 6.4: a) Selección de células vivas (círculo marcado). b) Cinética de captación de 3α-NBD-ChA por los hepatocitos.

Posteriormente, se estudió la dependencia de la captación de 3α -NBD-ChA por los inhibidores, que está mediada por NTCP y OATP, tal como se describió en la introducción. Para ello, se utilizó la troglitazona, un fármaco utilizado para diabetes bien conocido por sus efectos colestásicos *in vivo*, que inhibe el NTCP y OATP, lo que fue también demostrado por ensayos *in vitro* con células en suspensión o en cultivo “sandwich”.^[70-71] Así pues, tal como se muestra en la Figura 6.5, tras preincubación del medio celular con troglitazona (a diferentes concentraciones), se observó inhibición de la captación de 3α -NBD-ChA.

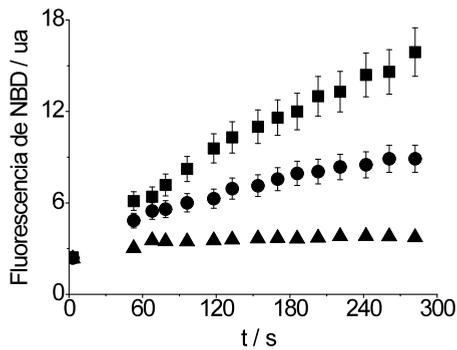


Figura 6.5: Efecto de la concentración de troglitazona (0 μ M ■, 1 μ M ●, 10 μ M ▲) en la captación de 3α -NBD-ChA por los hepatocitos.

Se realizaron experimentos similares con el resto de los derivados fluorescentes de ácido cólico, registrando la captación de NBD-ChA en presencia y ausencia de troglitazona a lo largo del tiempo. Como se puede ver en la Figura 6.6, los hepatocitos tratados con troglitazona no exhibieron una captación significativa de los NBD-ChA mientras que las células no tratadas acumularon el ácido biliar constantemente hasta llegar a una meseta a los ca. 20 min tras su adición a la suspensión celular. Además, entre todos los derivados se observaron diferencias cuantitativas en la tendencia general de captación, similar a la observada en la unión a la albúmina (Figura 5.6a, p. 58).

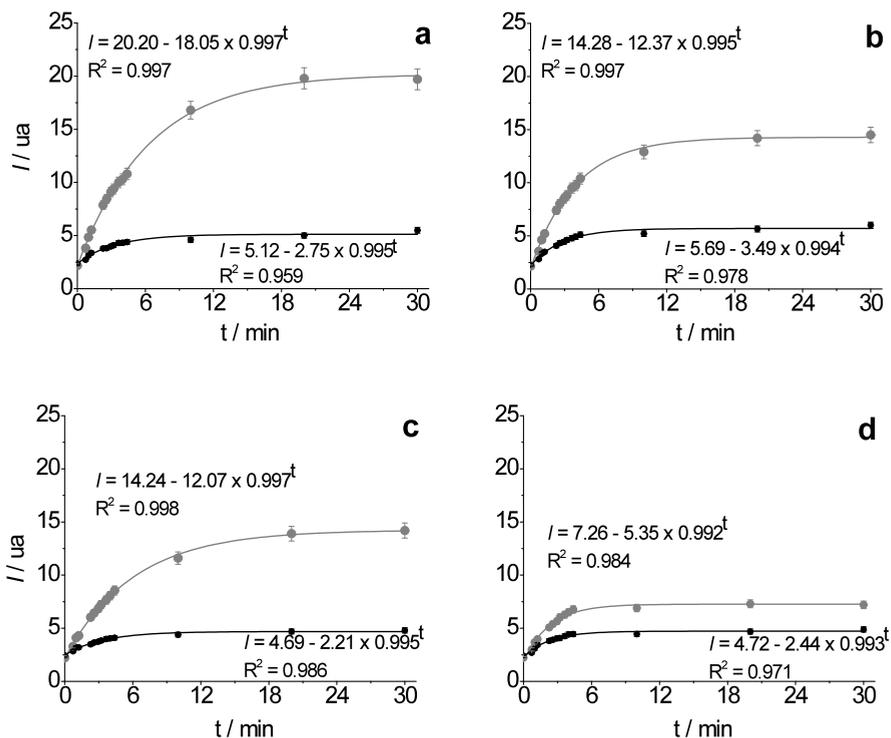


Figura 6.6: Cinéticas comparativas de la captación de a) 3 α -NBD-ChA; b) 3 β -NBD-ChA; c) 7 α -NBD-ChA; d) 7 β -NBD-ChA por los hepatocitos en ausencia (●) y en presencia de troglitazona (◐).

La variación cinética del incremento de fluorescencia (I) en función del tiempo se puede representar como:

$$I = a - b \times c^t$$

donde a presenta el máximo de fluorescencia alcanzada y $(a - b)$ es la autofluorescencia basal celular antes de la adición de los derivados de NBD. De este modo, la velocidad de captación de los NBD-ChA en unidades arbitrarias por segundo se calculó como la primera derivada en el punto en que se alcanzaba el 50% de la fluorescencia máxima. Según este criterio, la velocidad de la captación de los dos derivados C-3 fue muy similar (ca. 0.03), mientras que los dos derivados C-7 presentaron un valor levemente más bajo (ca. 0.02). La autofluorescencia basal fue siempre muy parecida. Así, tanto la velocidad de la captación inicial como el nivel de la fluorescencia intracelular alcanzada permitieron clasificar la eficiencia de cada derivado, siendo el orden: 3 α - > 3 β - \approx

7α - > 7β -NBD-ChA. La velocidad de la captación en presencia de troglitazona disminuyó significativamente en todos los casos (0.005 - 0.010).

Los resultados obtenidos en la velocidad de captación de los derivados de NBD y el efecto inhibitor de la troglitazona hicieron pensar que estos derivados pudiesen ser utilizados para detectar y cuantificar efectos tóxicos relacionados con la captación por suspensiones de hepatocitos. La combinación de la sonda fluorescente (NBD-ChA) y las medidas de citometría de flujo serían una herramienta potente para una evaluación *in vitro* de la captación de ácidos biliares. No obstante, estas medidas cinéticas presentan el inconveniente de requerir mucho tiempo cuando debe ser evaluada una gran cantidad de compuestos, aparte de un gran rango de concentraciones. Sin embargo, a la vista de la cinética de captación de estos derivados que se estabiliza una vez alcanzada la meseta, se decidió realizar sólo medidas de tipo "single end-point", de forma que se podría alcanzar un alto rendimiento. Con este fin, se analizaron los efectos de algunos fármacos, conocidos por sus efectos colestásicos, mediante la fluorescencia intracelular de 3α -NBD-ChA a los 15 min de su adición a la suspensión celular. Para esta serie de experimentos, se eligieron dos compuestos fuertemente colestásicos, clorpromazina y ciclosporina A,^[21,72,76] y un fármaco levemente colestásico, valproato sódico,^[157] que se estudiaron en un intervalo de concentraciones sub-citotóxicas. Además, se comparó con citrato sódico como control negativo. Como se puede ver en la Figura 6.7, estos compuestos mostraron inhibición a la captación de ácido biliar por los hepatocitos de acuerdo con su potencial colestásico relativo; el citrato sódico no tuvo ningún efecto significativo sobre la acumulación de 3α -NBD-ChA. Como control adicional, se trabajó en ausencia de células y se estudió una posible desactivación de la fluorescencia de NBD por estos compuestos a través de otros mecanismos. Sin embargo, no se observó ninguna disminución de la fluorescencia en disolución por lo que se confirmó que los ensayos con células realmente mostraban una inhibición de su captación celular.

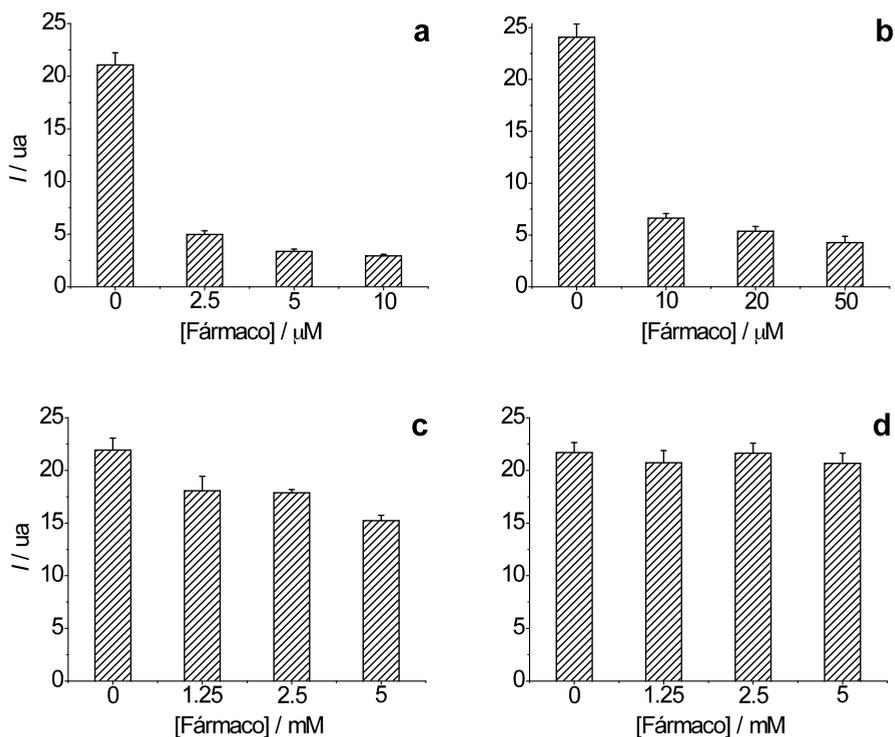
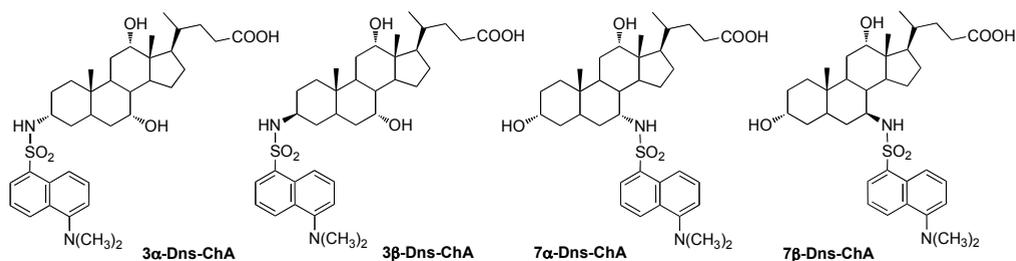


Figura 6.7: Medidas de fluorescencia intracelular de 3α-NBD-ChA (100 nM) en presencia de tres inhibidores de transportadores biliares: a) clorpromazina; b) ciclosporina A; c) valproato sódico; y un control negativo: d) citrato sódico, realizadas a los 15 min tras su adición a la suspensión celular.

6.2.3. Derivados de Dansilo



A diferencia de CamF y los NBD-ChA, estos derivados en citometría de flujo con hepatocitos presentaron absorción en la región UV, por lo que se utilizaron otras condiciones experimentales (λ_{exc} , ver parte experimental).

Inicialmente, para realizar experimentos de captación específica, utilizando el 3α-Dns-ChA, se identificaron células vivas para los análisis y se excluyeron las

muertas (Figura 6.8a). De esta manera se siguió el crecimiento de fluorescencia verde, correspondiente a la emisión del derivado Dns *versus* tiempo (Figura 6.8b). De la misma manera que con los derivados NBD-ChA, la captación específica por los hepatocitos se manifestó también con los derivados de Dns, y la acumulación intracelular al cabo de 30 min tras su adición a la suspensión celular muestra una gran diferencia respecto a las células no incubadas (Figura 6.8c).

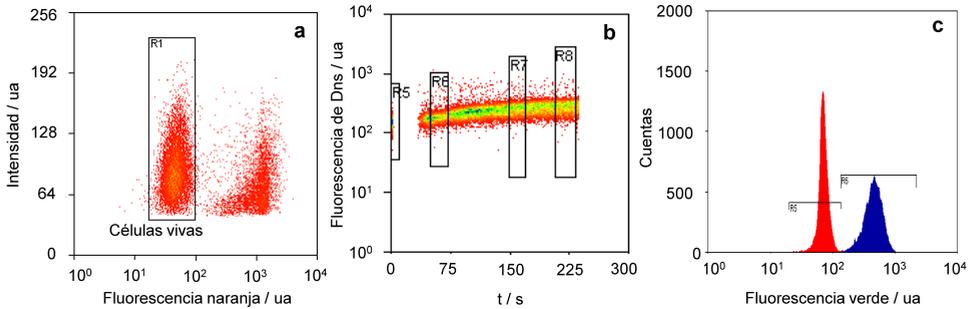


Figura 6.8: a) Determinación de células vivas. b) Cinética de captación de 3α -Dns-ChA. c) Medida “end-point” de la acumulación de 3α -Dns-ChA, autofluorescencia total de células (rojo) y fluorescencia verde de 3α -Dns-ChA de las células incubadas (azul).

A continuación, se realizaron experimentos con los cuatro derivados de Dns para comparar la eficiencia de su captación por hepatocitos y también ver la dependencia de la concentración presente en el medio celular. En medidas de “single end-point”, representando la relación fluorescencia acumulada de Dns/autofluorescencia, a los 30 min de su adición a diferentes concentraciones, se observó una acumulación intracelular dependiente de la concentración, apreciándose además diferencias significativas entre los derivados (Figura 6.9), siendo el más eficiente el 3α -Dns-ChA.

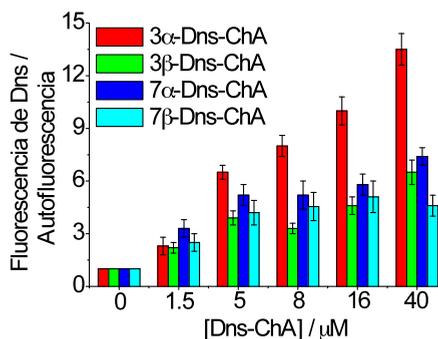


Figura 6.9: Comparación citométrica de la captación de los derivados de Dns por los hepatocitos a diferentes concentraciones de Dns-ChA, medida a los 30 min tras la incubación.

Finalmente, una vez comprobada la captación específica por los hepatocitos, se experimentó el efecto de troglitazona, tal como en el caso de NBD-ChA. De nuevo, se observó la fuerte inhibición de la captación de todos Dns-ChA (Figura 6.10).

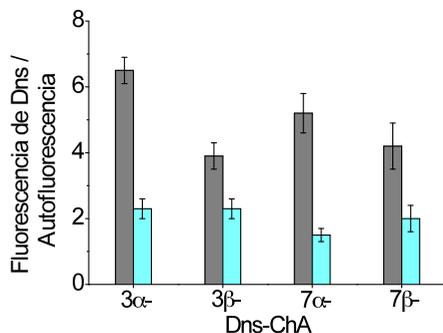


Figura 6.10: Captación intracelular de los derivados Dns-ChA (5 μ M) en ausencia (■) y presencia (■) de troglitazona (50 μ M) medida a los 30 min tras la incubación.

6.3. Conclusiones

Se ha estudiado la captación de varios derivados fluorescentes de ácido cólico por hepatocitos en suspensión por medio de citometría de flujo, una técnica cuantitativa basada en fluorescencia, que permite examinar propiedades celulares en tiempo real. En primer lugar, se demostró que CamF es captado específicamente por los hepatocitos vivos lentamente en función de la concentración. Se observó una captación inespecífica más rápida también por células muertas, lo que no sería conveniente en otros análisis. Estos experimentos permitieron poner a punto esta técnica y optimizar las condiciones experimentales para otros estudios más detallados.

A continuación, se estudiaron las cinéticas de captación de los derivados de nitrobenzofurazano, que demostraron ser captados específicamente por los hepatocitos vivos con una eficiencia distinta entre los cuatro derivados, siendo el más eficiente 3 α -NBD-ChA. Se detectó y cuantificó el incremento de fluorescencia correspondiente a NBD dentro de las células vivas. Esta técnica se aplicó a diferentes fármacos colestásicos, con objeto de detectar y cuantificar los efectos de la inhibición por fármacos. Se observó una inhibición en la captación de 3 α -

NBD-ChA por troglitazona, clorpromazina, ciclosporina A y valproato sódico, de acuerdo con su potencial colestásico *in vivo*.

Finalmente, se utilizaron los derivados de dansilo para ensayos de citometría de flujo. A diferencia de los NBD-ChA (absorción en Vis), se utilizó la longitud de onda de excitación en la zona UV. Los cuatro derivados se acumularon de forma específica y dependiente de la concentración en las suspensiones de hepatocitos. El derivado 3 α -Dns-ChA mostró ser de nuevo el más eficiente en la captación, tal como en el caso de NBD. De momento la troglitazona produjo un efecto fuertemente inhibitorio.

Todos los derivados demostraron gran utilidad, al menos en un primer análisis de los efectos colestásicos, aunque hay que tener en cuenta que los mecanismos de la colestasis son muy complejos y no se limitan solamente a la inhibición de la captación, sino que involucran impedimento de varios transportadores.

Desde el punto de vista experimental, los derivados de NBD se manifestaron más potentes como herramienta analítica; no obstante, una combinación adecuada de los derivados de NBD y Dns, cada uno absorbiendo en una zona de longitud de onda diferente, podría ser muy útil en estudios simultáneos de múltiples transportadores o interacciones con modelos celulares *in vitro*.

Capítulo 7

Parte Experimental

7.1. Instrumentación

Caracterización

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C fueron realizados en un instrumento Bruker (Rheinstetten, Germany) de 300 MHz. Los valores de las constantes de acoplamiento (J) se indican en Hz. Se utilizaron CDCl_3 , CD_3OD y $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ como disolventes y la señal correspondiente al disolvente deuterado en cada caso se tomó como referencia: CDCl_3 ($\delta = 7.26$ para ^1H RMN, $\delta = 77.2$ para ^{13}C RMN), CD_3OD ($\delta = 3.31$ para ^1H RMN, $\delta = 49.0$ para ^{13}C RMN) y $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ($\delta = 2.05$ para ^1H RMN, $\delta = 29.8$ para ^{13}C RMN). La masa exacta de alta resolución (EMAR) está incluida para algunos de los compuestos finales nuevos y se obtuvo por la técnica de impacto electrónico en modo positivo con un instrumento VG Autospec.

Medidas Fotofísicas

Los espectros de absorción ultravioleta-visible se registraron en un espectrofotómetro Cary 300 UV-Vis (UV0811M209, Varian). Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se obtuvieron con un instrumento Photon Technology Internacional (PTI) modelo LPS-220B equipado con lámpara de Xenón de 75 W. Las medidas de fluorescencia en tiempo resuelto se realizaron en un espectrómetro PTI modelo TM-2/2003 equipado con lámpara H_2/N_2 (50/50, duración del pulso de 1.8 ns) y un detector estroboscópico. Para los experimentos de fotólisis de destello láser (FDL) se utilizaron dos equipos diferentes: un láser pulsado de Nd-YAG (Spectron SL4004G-10) con duración de pulso de 10 ns y energía 10-15 mJ/pulso para la excitación a 355 nm o un láser de excímero de XeCl (LEXTRA50 Lambda Physik LaserTechnik) con duración ca. 17 ns y energía 40 mJ/pulso para la excitación a 308 nm. Se empleó una lámpara de Xenón Oriel Lo255 (Stratford, CT) como fuente de luz para análisis de especies transitorias. El sistema de FDL consiste en un láser pulsado, lámpara de Xe, un monocromador Oriel 77200, un sistema fotomultiplicador Oriel (PMT) formado por un tubo lateral 77348 PMT, una carcasa 70680 PMT, una fuente de potencia 70705 PMT y un osciloscopio Tektronik TDS-640A. La señal se transfirió a un ordenador personal para tratar los datos con el programa Onda.

Citometría de Flujo

En los casos de CamF y NBD-ChA, las medidas de cinética y de “single end-point” se realizaron en un citómetro de flujo Cytomics FC500 MCL (Beckman-Coulter, Brea, CA) equipado con un láser argón-ion, con refrigeración de aire, emitiendo a 488 nm. La emisión de fluorescencia de cada célula se registró a 525 nm (fluorescencia verde) y 625 nm (fluorescencia naranja de yoduro de propidio). Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó CXP-software (Beckman-Coulter, Brea, CA) conectado con el citómetro de flujo.

En el caso de los Dns-ChA, las medidas citométricas se realizaron en MoFlo Cell Sorter (Beckman-Coulter, Brea, CA) equipado con láser argón-ion, con refrigeración de agua, emitiendo a 350 nm (láser UV para excitación de Dns-ChAs) y a 488 nm (láser azul para excitación de yoduro de propidio); la energía de láser se mantuvo a 50 mW. La emisión de fluorescencia se registró a 530 nm (fluorescencia verde de Dns) y 625 nm (fluorescencia naranja de yoduro de propidio). El resto del procedimiento fue idéntico al caso anterior. Los datos se analizaron en Summit V4.0 software (Beckman-Coulter, Brea, CA) conectado con el citómetro.

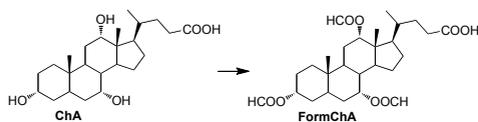
7.2. Materiales y Métodos

Síntesis

Todos los reactivos empleados en la síntesis han sido adquiridos en Sigma Chemical Co. (Madrid, Spain) y se utilizaron tal como fueron recibidos. Los disolventes (anhídros incluidos) se adquirieron en Aldrich o Scharlau y se utilizaron tal como fueron recibidos. La gel de sílice Silica gel 60 (35-70 μm) (SiO_2) y LiChroprep[®] RP-18 (40-63 μm) (RP18) utilizadas como fase estacionaria en la cromatografía de columna fue suministrada por Merck. Los disolventes utilizados como eluyentes para estas cromatografías procedían de Scharlau. Las placas TLC fueron reveladas (cuando era necesario) con una disolución de ácido fosfomolibdico en EtOH (7%) y calentando.

Síntesis de ácido 2-(3-oxo-6-hidroxi-3*H*-xanten-9-il)-5-(3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-amido)benzoico (CamF)

Ácido 3 α ,7 α ,12 α -trisformiloxi-5 β -colan-24-oico (FormChA)^[158]

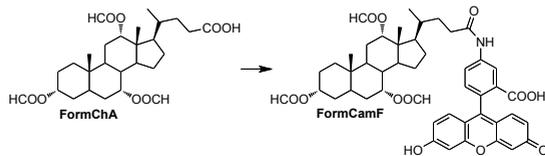


A una disolución de ácido cólico (1.00 g, 2.45 mmol) en 4 ml de ácido fórmico (88%) se le añadieron gota a gota 0.5 ml

de ácido perclórico. La mezcla resultante se calentó a 50°C durante 2 horas, y transcurrido este tiempo se adicionaron lentamente 3.2 ml de anhídrido acético durante 10 minutos a 60°C para destruir el exceso de ácido fórmico. La mezcla se dejó enfriar, se vertió sobre agua fría (40 ml) y el producto precipitado se recogió por filtración en forma de sólido blanco, se lavó y se secó. Tras la recrystalización de H₂O-EtOH se obtuvo **FormChA** como un producto cristalino de color blanco (87%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.76 (s, 3H, 18-CH₃), 0.85 (d, J = 6.6, 3H, 21-CH₃), 0.94 (s, 3H, 19-CH₃), 4.71 (m, 1H, 3 β -H), 5.07 (s ancho, 1H, 7 β -H), 5.27 (s ancho, 1H, 12 β -H), 8.02 (s, 1H, 3 α -OOCH), 8.10 (s, 1H, 7 α -OOCH), 8.16 (s, 1H, 12 α -OOCH); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.1 (CH₃), 17.4 (CH₃), 22.3 (CH₃), 22.7 (CH₂), 25.5 (CH₂), 26.6 (CH₂), 27.1 (CH₂), 28.5 (CH), 30.4 (CH₂), 30.9 (CH₂), 31.3 (CH₂), 34.3 (C), 34.4 (CH₂), 34.5 (CH₂), 34.7 (CH), 37.7 (CH), 40.8 (CH), 43.0 (CH), 45.0 (C), 47.2 (CH), 70.7 (CH), 73.8 (CH), 75.3 (CH), 160.6 (HCOO-), 160.65 (HCOO-), 160.7 (HCOO-), 179.6 (COOH).

Ácido 2-(3-oxo-6-hidroxi-3*H*-xanten-9-il)-5-(3 α ,7 α ,12 α -trisformiloxi-5 β -colan-24-amido)benzoico (FormCamF)

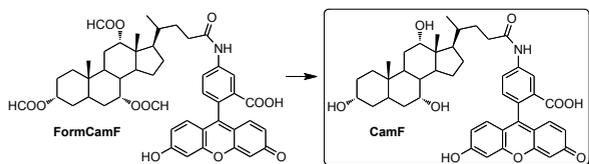


A una disolución de **FormChA** (0.25 g, 0.5 mmol) en 20 ml de benceno anhidro, bajo N₂, se le añadieron lentamente 86 μ l (1

mmol) de cloruro de oxalilo. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas, tras las cuales se evaporó el disolvente. El producto crudo (en forma de aceite) se redisolvió en 7 ml de acetona anhidra y se enfrió a 0°C. A continuación, se le añadió lentamente una disolución de aminofluoresceína (90 mg, 0.25 mmol) en 7 ml de acetona anhidra. La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo se

evaporó el disolvente y el producto crudo **FormCamF** se utilizó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

Ácido 2-(3-oxo-6-hidroxi-3*H*-xanten-9-il)-5-(3 α ,7 α ,12 α -trihidroxi-5 β -colan-24-amido)benzoico (**CamF**)^[79]

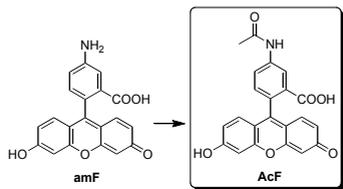


El crudo **FormCamF** se disolvió en KOH-MeOH (1 M, 10 ml) y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente.

La disolución resultante, de color rojizo, se vertió sobre 40 ml de HCl 1M y el precipitado obtenido se recogió por filtración. Tras purificación por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:MeOH, 4:1) se obtuvieron 105 mg del producto final, **CamF**, como un sólido naranja (rendimiento global de las dos etapas: 56%).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.74 (s, 3H, 18-CH₃), 0.92 (s, 3H, 19-CH₃), 1.10 (d, J = 6.0, 3H, 21-CH₃), 3.38 (m, 1H, 3 β -H), 3.80 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.98 (s ancho, 1H, 12 β -H), 6.52 - 6.67 (m, 6H, 6 \times CH(Ar)), 7.14 (d, J = 8.2, 1H, 3-CH(Ar)), 7.85 (d, J = 8.2, 1H, 4-CH(Ar)), 8.32 (s, 1H, 6-CH(Ar)); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 13.1 (CH₃), 17.9 (CH₃), 23.2 (CH₃), 24.3 (CH₂), 28.0 (CH), 28.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 31.0 (CH₂), 33.1 (CH₂), 35.0 (CH₂), 36.0 (CH₂), 36.6 (CH₂), 37.0 (CH), 40.5 (CH₂), 41.1 (CH), 43.1 (CH), 43.3 (CH), 47.6 (CH), 69.1 (7-CH), 72.9 (3-CH), 74.1 (12-CH), 103.6 (CH), 111.7 (C), 113.8 (CH), 116.2 (CH), 125.9 (CH), 128.0 (CH), 130.3 (CH), 142.0 (C), 154.3 (C), 171.4 (CONH), 175.7 (COOH).

Síntesis de ácido 5-acetamido-2-(3-oxo-6-hidroxi-3*H*-xanten-9-il)benzoico (AcF**)^[159]**



Una disolución de aminofluoresceína (50 mg, 0.14 mmol) en ácido acético (0.3 ml) se trató con anhídrido acético (15 μ l, 0.15 mmol) y se calentó a reflujo durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó y el crudo se purificó por

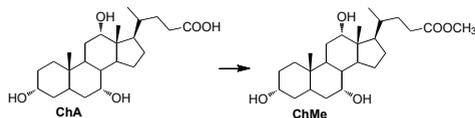
cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:MeOH, 9:1) para proporcionar el producto **AcF** (46 mg, 82%) como un sólido naranja (punto de fusión 240°C con descomposición (lit. 237-240°C)^[159]).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 2.19 (s, 3H, CH₃CO), 6.52 - 6.67 (m, 6H, 6 \times CH(Ar)), 7.14 (d, J = 8.3, 1H, 3-CH(Ar)), 7.83 (d, J = 8.3, 1H, 4-CH(Ar)), 8.30 (s,

^1H , 6- $\text{CH}(\text{Ar})$); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 24.2 (CH_3), 103.5 (CH), 111.6 (C), 113.7 (CH), 116.1 (CH), 125.8 (CH), 128.0 (CH), 130.2 (CH), 141.9 (C), 154.2 (C), 171.3 (CONH), 172.0 (COOH).

Síntesis de 3 α -amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (3 α -NH $_2$ -ChMe)

3 α ,7 α ,12 α -Trihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (ChMe)^[81]

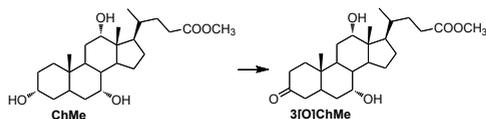


A una disolución de ácido cólico (2 g, 4.9 mmol) en MeOH (10 ml) que contenía 0.3 ml de HCl concentrado se le añadió

dimetoxipropanona (5 ml). La mezcla se agitó durante la noche y a continuación se evaporó el disolvente. El crudo sólido se redisolvió en AcOEt, lavó con NaHCO_3 saturado y salmuera, se secó con MgSO_4 y se concentró para dar el producto **ChMe** como un sólido blanco cristalino (1.95 g, 94%) que fue utilizado en la siguiente etapa sin purificación adicional.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 0.64 (s, 3H, 18- CH_3), 0.85 (s, 3H, 19- CH_3), 0.95 (d, $J = 5.7$, 3H, 21- CH_3), 3.29 (s ancho, 3H, 3 \times OH), 3.39 (m, 1 H, 3 β -H), 3.63 (s, 3H, CH_3O), 3.80 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.92 (s ancho, 1H, 12 β -H); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 12.6 (CH_3), 17.4 (CH_3), 22.6 (CH_3), 23.4 (CH_2), 26.4 (CH), 27.7 (CH_2), 28.3 (CH_2), 30.5 (CH_2), 31.1 (CH_2), 31.2 (CH_2), 34.8 (CH_2), 34.9 (CH), 35.4 (CH), 39.5 (CH_2), 39.6 (CH), 41.6 (CH), 41.7 (CH), 46.5 (CH), 47.1 (C), 51.6 (CH_3O), 68.5 (7-CH), 72.0 (3-CH), 73.2 (12-CH), 175.0 (COO).

3-Oxo-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (3[O]ChMe)^[81]



A una disolución de **ChMe** (0.97 g, 2.3 mmol) en tolueno anhidro (30 ml), se le añadió $\text{Ag}_2\text{CO}_3@$ Celite^{®*} (2.38 g, 3.45

mmol) y la reacción se calentó a reflujo en un equipo Dean-Stark bajo atmósfera de N_2 durante 7 horas. A continuación, se filtró, lavó con tolueno caliente y concentró. Tras cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt:*n*-hexano, 5:1), se obtuvo **3[O]ChMe** (0.81 g, 84%) como un sólido blanco.

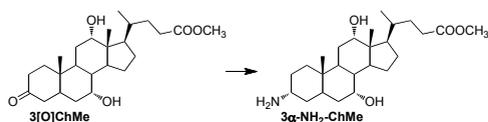
^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 0.72 (s, 3H, 18- CH_3), 0.98 (s ancho, 6H, 19- CH_3 + 21- CH_3), 3.40 (dd, $J = 15.0, 13.5$, 1H, 4- H_{ax}), 3.66 (s, 3H, CH_3O), 3.92 (s ancho, 1H, 7 β -H), 4.02 (s ancho, 1H, 12 β -H); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 12.7 (CH_3), 17.5 (CH_3), 21.9 (CH_3), 23.3 (CH_2), 27.4 (CH), 27.6 (CH_2), 28.8 (CH_2),

31.0 (CH₂), 31.2 (CH₂), 34.0 (CH₂), 35.0 (C), 35.3 (CH), 36.8 (CH₂), 37.0 (CH₂), 39.7 (CH), 42.0 (CH), 43.2 (CH), 45.7 (CH₂), 46.8 (C), 47.5 (CH), 51.7 (CH₃O), 68.5 (7-CH), 73.0 (12-CH), 174.8 (COO), 213.2 (C=O).

*Carbonato de plata sobre Celite® (Ag₂CO₃@Celite®)

A una disolución de AgNO₃ (1.5 g, 8.75 mmol) en 10 ml de H₂O que contenía 1.25 g de Celite® se le añadió lentamente y con agitación una disolución de Na₂CO₃ (1.25 g, 11.75 mmol) en 15 ml de H₂O. El precipitado resultante de color verde se filtró, lavó con agua y secó. Se obtuvo Ag₂CO₃ soportado sobre Celite® como un sólido gris verdoso (2.38 g, 93%) con una concentración teórica de 1.72 mmol de reactivo/g de sólido.

3 α -Amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (3 α -NH₂-ChMe)^[160]



Una mezcla de 3[O]ChMe (0.81 g, 1.92 mmol), acetato amónico (1.48 g, 19.2 mmol) y NaBH₃CN (0.12 g, 1.92 mmol)

en MeOH anhidro (40 ml) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂ durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se acidificó cuidadosamente con HCl concentrado hasta pH 3 y se evaporó el disolvente. El sólido resultante se lavó con Et₂O, redisolvió en 1-BuOH (25 ml), se filtró, lavó con salmuera y concentró. Tras purificación por recristalización de MeOH-CH₂Cl₂, se obtuvo 3 α -NH₂-ChMe·HCl como un sólido blanco (0.49 g, 60%).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.72 (s, 3H, 18-CH₃), 0.97 (s, 3H, 19-CH₃), 1.01 (d, *J* = 6.3, 3H, 21-CH₃), 2.93 (m, 1H, 3 β -H), 3.65 (s, 3H, CH₃O), 3.81 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.99 (s ancho, 1H, 12 β -H); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 13.0 (CH₃), 17.6 (CH₃), 23.0 (CH₃), 24.1 (CH₂), 26.7 (CH₂), 28.0 (CH), 28.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 31.9 (CH₂), 32.2 (CH₂), 35.4 (CH₂), 35.6 (CH₂), 35.8 (C), 36.0 (CH₂), 36.8 (CH), 41.0 (CH), 43.0 (CH), 43.1 (CH), 47.5 (C), 48.0 (CH), 52.0 (CH₃O), 52.7 (3-CH), 68.6 (7-CH), 73.7 (12-CH), 176.5 (COO).

Síntesis de 3 β -amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (3 β -NH₂-ChMe)

3 α -Metilsulfoniloxi-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (3 α -Ms-ChMe)^[161]

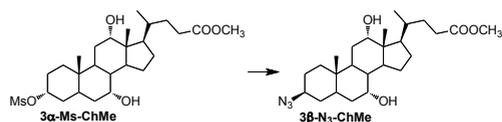


A una disolución de ChMe (0.5 g, 1.2 mmol) en piridina anhidra (5 ml) a 0°C se le añadió gota a gota cloruro de

mesilo (0.19 ml, 2.4 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de N_2 , durante 7 horas. Transcurrido ese tiempo se vertió sobre 100 ml de HCl (6 M) saturado con NaCl y se extrajo tres veces con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó con HCl 1M y salmuera, se secó sobre $MgSO_4$ y se concentró. El crudo **3 α -Ms-ChMe** se purificó por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt:*n*-hexano, 1:1), tras la cual se obtuvo como un sólido blanco (0.55 g, 92%).

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 0.68 (s, 3H, 18- CH_3), 0.90 (s, 3H, 19- CH_3), 0.97 (d, $J = 6.3$, 3H, 21- CH_3), 2.98 (s, 3H, CH_3SO_2), 3.66 (s, 3H, CH_3O), 3.86 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.98 (s ancho, 1H, 12 β -H), 4.50 (m, 1 H, 3 β -H); ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 12.7 (CH_3), 17.5 (CH_3), 22.5 (CH_3), 23.3 (CH_2), 26.7 (CH), 27.6 (CH_2), 28.0 (CH_2), 28.4 (CH_2), 31.0 (CH_2), 31.2 (CH_2), 34.3 (CH_2), 34.6 (C), 34.9 (CH_2), 35.3 (CH), 36.2 (CH_2), 39.0 (CH_3S), 39.6 (CH), 41.6 (CH), 42.0 (CH), 46.7 (C), 47.3 (CH), 51.7 (CH_3O), 68.2 (7-CH), 72.9 (12-CH), 82.9 (3-CH), 174.9 (COO).

3 β -Azido-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (**3 β -N $_3$ -ChMe**)^[161]

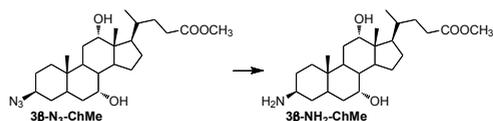


Una disolución de **3 α -Ms-ChMe** (0.55 g, 1.1 mmol) y NaN_3 (0.13 g, 1.98 mmol) en DMF anhidra (15 ml) se

calentó a 100°C durante 5 horas, en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo el disolvente se evaporó, el crudo se redisolvió en CH_2Cl_2 , lavó con salmuera, secó sobre $MgSO_4$ y concentró. Tras purificación por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt:*n*-hexano, 1:1), el producto **3 β -N $_3$ -ChMe** se obtuvo como un sólido blanco (0.29 g, 59%).

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 0.69 (s, 3H, 18- CH_3), 0.93 (s, 3H, 19- CH_3), 0.97 (d, $J = 6.0$, 3H, 21- CH_3), 3.66 (s, 3H, CH_3O), 3.86 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.90 (s ancho, 1 H, 3 α -H), 3.98 (s ancho, 1H, 12 β -H); ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 12.7 (CH_3), 17.5 (CH_3), 23.1 (CH_3), 23.3 (CH_2), 24.7 (CH_2), 26.4 (CH), 27.6 (CH_2), 28.7 (CH_2), 30.6 (CH_2), 31.0 (CH_2), 31.2 (CH_2), 33.2 (CH_2), 34.2 (CH_2), 35.2 (C), 35.3 (CH), 36.9 (CH), 39.6 (CH), 42.2 (CH), 46.7 (C), 47.4 (CH), 51.7 (CH_3O), 58.8 (3-CH), 68.5 (7-CH), 73.1 (12-CH), 174.8 (COO).

3 β -Amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (**3 β -NH $_2$ -ChMe**)^[162]



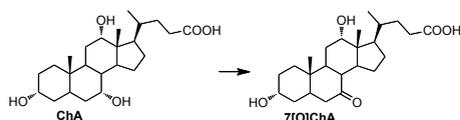
0.29 g (0.65 mmol) de **3 β -N $_3$ -ChMe** se disolvieron en una mezcla de

AcOEt:MeOH (1:2, 9 ml). Sobre ésta se adicionó formiato amónico (0.41 g, 6.5 mmol) y Pd-C 10% (0.14 g, 20% mol) y la reacción se calentó a reflujo durante 6 horas. La mezcla se filtró, lavó con una disolución de Et₃N al 10% en MeOH y concentró. El crudo se redisolvió en CH₂Cl₂, lavó con salmuera y concentró. La amina se redisolvió en MeOH con un 5% de HCl concentrado para obtener el hidrocloreuro y se dejó agitar durante una hora. El disolvente se evaporó, lavó con Et₂O y se secó. Después de la recristalización de CH₂Cl₂-MeOH, el producto **3β-NH₂-ChMe-HCl** se obtuvo como un sólido blanco (0.17 g, 63%).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.72 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (s ancho, 6H, 19-CH₃ + 21-CH₃), 3.50 (br s, 1H, 3α-H), 3.65 (s, 3H, CH₃O), 3.81 (s ancho, 1H, 7β-H), 3.97 (s ancho, 1H, 12β-H); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 13.0 (CH₃), 17.6 (CH₃), 23.0 (CH₃), 24.1 (CH₂), 24.2 (CH₂), 27.5 (CH), 28.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 30.5 (CH₂), 31.9 (CH₂), 32.2 (CH₂), 32.8 (CH₂), 34.9 (CH₂), 36.3 (C), 36.8 (CH), 37.3 (CH), 40.9 (CH), 43.0 (CH), 47.6 (C), 48.0 (CH), 49.4 (3-CH), 52.0 (CH₃O), 68.7 (7-CH), 73.8 (12-CH), 176.5 (COO).

Síntesis de 7α-amino-3α,12α-dihidroxi-5β-colan-24-oato de metilo (7α-NH₂-ChMe)

Ácido 7-oxo-3α,12α-dihidroxi-5β-colan-24-oico (7[O]ChA)^[82]



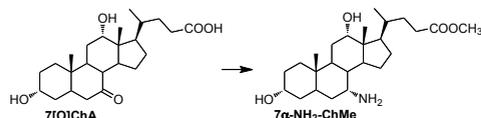
A una disolución caliente (70°C) de ácido cólico (1 g, 2.45 mmol) en NaHCO₃ acuoso (3%, 40 ml), se añadió N-bromosuccinimida (1 g, 6.12 mmol) en pequeñas porciones durante una hora. La

mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente, en ausencia de luz y, a continuación, se calentó a 80°C durante 2 horas. Después de enfriar, la mezcla se acidificó con HCl 6 M (40 ml) y el precipitado formado se filtró y lavó con agua. El crudo se redisolvió en AcOEt, lavó con salmuera, y secó sobre MgSO₄. Tras purificación por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:MeOH, 20:1) se obtuvo **7[O]ChA** (0.58 g, 58%) como un sólido blanco.

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.72 (s, 3H, 18-CH₃), 1.02 (d, *J* = 6.3, 3H, 21-CH₃), 1.22 (s, 3H, 19-CH₃), 2.56 (dd, *J* = 12.0, 11.4, 1H, 8-CH), 2.98 (dd, *J* = 12.3, 6.0, 1H, 6-CH), 3.52 (m, 1H, 3β-H), 3.99 (s ancho, 1H, 12β-H); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 13.2 (CH₃), 17.7 (CH₃), 23.3 (CH₃), 25.4 (CH₂), 28.7 (CH₂), 30.5 (CH₂), 30.6 (CH₂), 32.0 (CH₂), 32.3 (CH₂), 35.2 (CH₂), 35.9 (C), 36.6 (CH), 37.5

(CH), 38.3 (CH₂), 41.9 (CH), 46.3 (CH₂), 47.3 (CH), 47.5 (CH), 47.6 (C), 50.8 (CH), 71.6 (3-CH), 72.9 (12-CH), 178.2 (COOH), 214.8 (C=O).

7 α -Amino-3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (7 α -NH₂-ChMe)

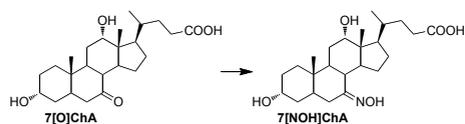


Una mezcla de **7[O]ChA** (0.58 g, 1.4 mmol), NaBH₃CN (0.09 g, 1.4 mmol) y acetato amónico (1 g, 14 mmol) se disolvió en MeOH anhidro (40 ml) y se agitó a temperatura ambiente, bajo atmósfera de N₂, durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se acidificó cuidadosamente con HCl concentrado hasta pH 3 y se evaporó el disolvente. El sólido se lavó con Et₂O, redisolvió en 1-BuOH, lavó con agua y concentró. El crudo se agitó en MeOH:HCl (10:0.3 ml) durante toda la noche para completar la esterificación (el grupo carboxilo se esterificó parcialmente durante la aminación reductiva). Tras purificación por cromatografía de columna (SiO₂, CH₂Cl₂:MeOH:NH₃, 90:10:1), el producto se convirtió en hidrocloreto por agitación en MeOH conteniendo un 5% de HCl, se concentró, lavó con Et₂O y secó. El compuesto **7 α -NH₂-ChMe-HCl** se obtuvo como un sólido blanco (0.25 g, 42%).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.74 (s, 3H, 18-CH₃), 0.98 (s, 3H, 19-CH₃), 1.01 (d, J = 6.3, 3H, 21-CH₃), 3.44 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.50 (m, 1 H, 3 β -H), 3.65 (s, 3H, CH₃O), 4.04 (s ancho, 1H, 12 β -H); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 12.7 (CH₃), 17.6 (CH₃), 22.6 (CH₃), 23.9 (CH₂), 27.7 (CH), 28.5 (CH₂), 29.0 (CH₂), 31.0 (CH₂), 31.8 (CH₂), 32.0 (CH₂), 32.1 (CH₂), 35.8 (C), 36.1 (CH₂), 36.6 (CH), 37.9 (CH), 39.6 (CH₂), 41.8 (CH), 42.3 (CH), 47.8 (C), 47.9 (CH), 51.2 (7-CH), 52.0 (CH₃O), 72.1 (3-CH), 73.0 (12-CH), 176.4 (COO); EMAR: encontrado m/z : 421.3193 (calculado para C₂₅H₄₃NO₄: 421.3192).

Síntesis de 7 β -amino-3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (7 β -NH₂-ChMe)

Ácido 7-hidroxiimino-3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (7[NOH]ChA)^[83]

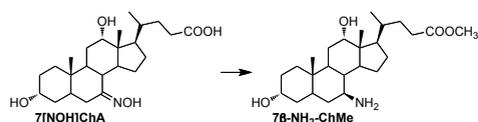


A una disolución de **7[O]ChA** (0.7 g, 1.72 mmol) en MeOH (10 ml), se le adicionó una disolución de hidroxilamina-hidrocloreto (0.21 g, 3.1 mmol) y acetato sódico (0.42 g, 5.16 mmol) en H₂O (1 ml) y se calentó a reflujo durante 4 horas. A continuación, la mezcla caliente se filtró, se redujo a la mitad de volumen y se vertió sobre salmuera acidificada (pH 2, 70

ml). El precipitado resultante se filtró, redisolvió en AcOEt, lavó con salmuera y concentró. Tras purificación por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt:MeOH, 20:1) se obtuvo el **7[NOH]ChA** (0.49 g, 68%) como un sólido blanco.

^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 0.73 (s, 3H, 18- CH_3), 1.02 (d, $J = 6.3$, 3H, 21- CH_3), 1.08 (s, 3H, 19- CH_3), 3.07 (dd, $J = 12.9, 1.8$, 1H, 6- CH), 3.52 (m, 1H, 3 β - H), 3.99 (s ancho, 1H, 12 β - H); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 13.3 (CH_3), 17.7 (CH_3), 23.5 (CH_3), 26.0 (CH_2), 28.3 (CH_2), 28.6 (CH_2), 30.0 (CH_2), 30.7 (CH_2), 32.0 (CH_2), 32.3 (CH_2), 35.6 (C), 36.1 (CH), 36.6 (CH), 37.6 (CH_2), 37.8 (CH), 42.4 (CH), 43.5 (CH), 46.0 (CH_2), 47.4 (CH), 47.6 (C), 71.8 (3- CH), 73.3 (12- CH), 160.5 (C=NOH), 178.3 (COOH).

7 β -Amino-3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (7 β - NH_2 -ChMe)^[163]



A una disolución de **7[NOH]ChA** (0.49 g, 1.2 mmol) en 1-BuOH (25 ml) a reflujo se le adicionó Na (0.48 g, 21.6 mmol) en

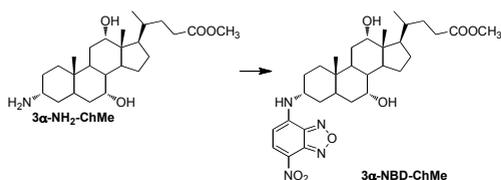
pequeñas porciones durante 1 hora. La mezcla se mantuvo a reflujo otras 3 horas y, a continuación, se vertió sobre agua fría (25 ml). Después de acidificar con HCl (1M) hasta pH 2, la fase orgánica se separó y concentró. El crudo se calentó en una disolución de NaOH/MeOH al 10% durante 1 hora para saponificar el éster butílico parcialmente formado. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó, la mezcla se redisolvió en MeOH y filtró. Para obtener el éster metílico el filtrado se acidificó con HCl y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Purificación por cromatografía de columna (SiO_2 , CH_2Cl_2 :MeOH: NH_3 , 90:10:1) condujo a 0.25 g (49%) de un sólido cristalino blanco como una mezcla de isómeros **7 α - NH_2 -ChMe**:**7 β - NH_2 -ChMe** (30:70) que fue utilizada en el siguiente paso como tal.

^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 0.74 (m, 3H, 18- CH_3 (7 α - NH_2 -ChMe) + 18- CH_3 (7 β - NH_2 -ChMe)), 0.94 (s, 3H, 19- CH_3), 1.02 (d, $J = 6.3$, 3H, 21- CH_3), 2.82 (m, 0.7H, 7 α - H), 2.97 (s ancho, 0.3H, 7 β - H), 3.40 (m, 0.3H, 3 β - H (7 α - NH_2 -ChMe)), 3.51 (m, 0.7H, 3 β - H (7 β - NH_2 -ChMe)), 3.65 (s, 3H, CH_3O), 3.94 (s ancho, 1H, 12 β - H); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 13.0 (CH_3 (7 α - NH_2 -ChMe)), 13.3 (CH_3 (7 β - NH_2 -ChMe)), 17.6 (CH_3), 23.1 (CH_3 (7 α - NH_2 -ChMe)), 23.7 (CH_3 (7 β - NH_2 -ChMe)), 24.4 (CH_2), 27.4(CH(7 α - NH_2 -ChMe)), 27.5 (CH(7 β - NH_2 -ChMe)), 28.6 (CH_2 (7 α - NH_2 -ChMe)), 29.0 (CH_2 (7 β - NH_2 -ChMe)), 29.4 (CH_2 (7 α - NH_2 -ChMe)), 30.3 (CH_2 (7 β - NH_2 -ChMe)), 30.9 (CH_2 (7 β - NH_2 -ChMe)), 31.2 (CH_2 (7 α - NH_2 -ChMe)), 31.8 (CH_2), 32.2

(CH₂(7 α -NH₂-ChMe)), 33.5 (CH₂(7 β -NH₂-ChMe)), 34.8 (CH₂(7 β -NH₂-ChMe)), 34.9 (CH₂(7 α -NH₂-ChMe)), 36.0 (C), 36.3 (CH₂(7 β -NH₂-ChMe)), 36.4 (CH₂(7 α -NH₂-ChMe)), 36.5 (CH(7 β -NH₂-ChMe)), 36.7 (CH(7 α -NH₂-ChMe)), 37.4 (CH₂(7 β -NH₂-ChMe)), 37.9 (CH(7 β -NH₂-ChMe)), 40.2 (CH(7 α -NH₂-ChMe)), 41.0 (CH₂(7 α -NH₂-ChMe)), 43.1 (CH(7 α -NH₂-ChMe)), 43.2 (CH(7 α -NH₂-ChMe)), 43.6 (CH(7 β -NH₂-ChMe)), 45.0 (CH(7 β -NH₂-ChMe)), 46.5 (CH(7 β -NH₂-ChMe)), 47.6 (CH(7 α -NH₂-ChMe)), 48.0 (C), 48.9 (7-CH(7 β -NH₂-ChMe)), 49.5 (7-CH(7 α -NH₂-ChMe)), 51.4 (CH₃O(7 α -NH₂-ChMe)), 52.0 (CH₃O(7 β -NH₂-ChMe)), 72.2 (3-CH(7 β -NH₂-ChMe)), 72.6 (3-CH(7 α -NH₂-ChMe)), 73.2 (12-CH(7 β -NH₂-ChMe)), 73.8 (12-CH(7 α -NH₂-ChMe)), 176.5 (COO).

Síntesis de ácido 3 α -(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (3 α -NBD-ChA)

3 α -(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (3 α -NBD-ChMe)^[160]



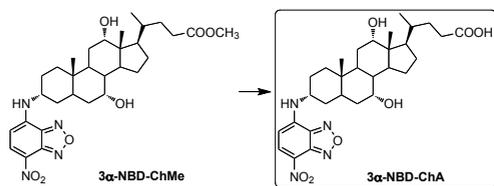
300 mg (0.65 mmol) de **3 α -NH₂-ChMe·HCl** se disolvieron en MeOH anhidro (10 ml), se le añadieron 0.27 ml de Et₃N (1.96 mmol) y la mezcla se

agitó a 0°C durante 10 min. A continuación, se añadió gota a gota una disolución de NBD-Cl (170 mg, 0.85 mmol) en 1,4-dioxano anhidro (5 ml). La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente en ausencia de luz. El disolvente se evaporó y el sólido crudo se purificó por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano, 2:1). El producto deseado se obtuvo como un sólido anaranjado-ámbar (203 mg, 53%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.72 (s, 3H, 18-CH₃), 0.98 (s ancho, 6H, 19-CH₃ + 21-CH₃), 3.54 (m, 1H, 3 β -H), 3.67 (s, 3H, CH₃O), 3.90 (s ancho, 1H, 7 β -H), 4.03 (s ancho, 1H, 12 β -H), 6.14 (d, J = 8.7, 1H, 6-CH(Ar)), 6.36 (s ancho, 1H, NH), 8.46 (d, J = 8.7, 1H, 5-CH(Ar)); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.7 (CH₃), 17.5 (CH₃), 22.8 (CH₃), 23.3 (CH₂), 27.0 (CH), 27.1 (CH₂), 27.6 (CH₂), 28.4 (CH₂), 31.0 (CH₂), 31.2 (CH₂), 34.3 (CH₂), 35.0 (C), 35.2 (CH), 35.6 (CH₂), 35.9 (CH₂), 39.7 (CH), 42.0 (CH), 42.1 (CH), 46.7 (C), 47.5 (CH), 51.7 (CH₃O), 54.4 (3-CH),

68.4 (7-CH), 73.0 (12-CH), 104.0 (CH), 123.4 (C), 136.8 (CH), 143.3 (C), 144.1 (C), 144.5 (C), 174.8 (COO).

Ácido 3 α -(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (3 α -NBD-ChA)^[83]



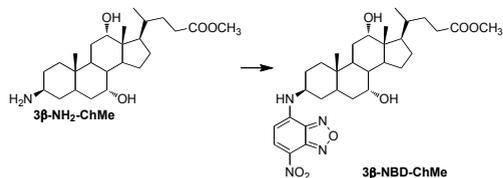
203 mg (0.35 mmol) de **3 α -NBD-ChMe** se disolvieron en 5 ml de MeOH y sobre esta disolución se adicionaron 3.5 ml de KOH en MeOH (1M). La

mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente y, a continuación, se evaporó el disolvente. El crudo se redisolvió en H₂O se acidificó con HCl 1M, se extrajo con AcOEt y se concentró. El crudo se purificó por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano:AcOH, 70:30:1 y, a continuación, RP18, MeOH:AcOEt:H₂O:AcOH, 80:10:10:1). El producto **3 α -NBD-ChA** se obtuvo como un sólido naranja-rojizo (186 mg, 94%).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.72 (s, 3H, 18-CH₃), 0.99 (s, 3H, 19-CH₃), 1.02 (d, J = 6.3, 3H, 21-CH₃), 3.61 (m, 1 H, 3 β -H), 3.81 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.98 (s ancho, 1H, 12 β -H), 6.33 (d, J = 9.3, 1H, 6-CH(Ar)), 8.45 (d, J = 9.0, 1H, 5-CH(Ar)); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 13.0 (CH₃), 17.6 (CH₃), 23.2 (CH₃), 24.2 (CH₂), 28.0 (CH), 28.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 32.0 (CH₂), 32.3 (CH₂), 35.7 (CH₂), 36.0 (C), 36.7 (CH₂), 36.8 (CH), 41.0 (CH), 43.0 (CH), 43.4 (CH), 47.5 (C), 48.0 (CH), 55.8 (3-CH), 68.8 (7-CH), 73.9 (12-CH), 99.8 (CH), 122.3 (C), 138.6 (CH), 145.5 (C), 145.7 (C), 145.8 (C), 178.2 (COOH); EMAR: obtenido m/z : 570.3046 (calculado para C₃₀H₄₂N₄O₇: 570.3055).

Síntesis de ácido 3 β -(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (3 β -NBD-ChA)

3 β -(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (3 β -NBD-ChMe)



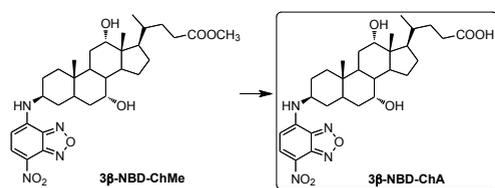
El compuesto **3 β -NBD-ChMe** se preparó a partir de **3 β -NH₂-ChMe** siguiendo el mismo procedimiento descrito para 3 α -NBD-ChMe. Así,

partiendo de **3 β -NH₂-ChMe·HCl** (0.15 g, 0.33 mmol), y tras purificación por

cromatografía de columna (SiO_2 , $\text{AcOEt}:n\text{-hexano}$, 2:1) se obtuvo el producto **3 β -NBD-ChMe** (0.15 g, 80%) como un sólido anaranjado-ámbar.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 0.72 (s, 3H, 18- CH_3), 0.99 (s ancho, 6H, 19- CH_3 + 21- CH_3), 3.67 (s, 3H, CH_3O), 3.91 (s ancho, 1H, 7 β -H), 4.03 (s ancho, 2H, 3 α -H + 12 β -H), 6.16 (d, $J = 8.7$, 1H, 6- $\text{CH}(\text{Ar})$), 6.39 (d, $J = 7.2$, 1H, NH), 8.48 (d, $J = 8.7$, 1H, 5- $\text{CH}(\text{Ar})$); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 12.7 (CH_3), 17.5 (CH_3), 23.2 (CH_3), 23.3 (CH_2), 24.0 (CH_2), 26.4 (CH), 27.6 (CH_2), 28.7 (CH_2), 31.0 (CH_2), 31.1 (CH_2), 31.2 (CH_2), 32.6 (CH_2), 34.0 (CH_2), 35.2 (CH), 35.3 (C), 37.4 (CH), 39.7 (CH), 42.1 (CH), 46.8 (C), 47.5 (CH), 49.8 (3-CH), 51.7 (CH_3O), 68.4 (7-CH), 73.0 (12-CH), 99.1 (CH), 123.8 (C), 136.8 (CH), 143.1 (C), 144.1 (C), 144.6 (C), 174.8 (COO).

Ácido 3 β -(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico
(**3 β -NBD-ChA**)^[83]

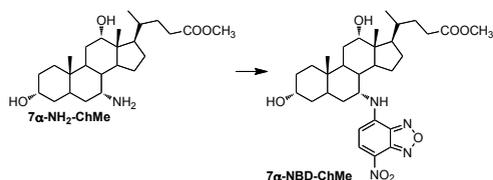


El compuesto **3 β -NBD-ChA** se preparó utilizando el procedimiento descrito para 3 α -NBD-ChA. Así a partir de **3 β -NBD-ChMe** (0.15 g), tras purificación por cromatografía de columna (SiO_2 , $\text{AcOEt}:n\text{-hexano}:\text{AcOH}$, 70:30:1 y, a continuación, RP18, $\text{MeOH}:\text{AcOEt}:\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}$, 80:10:10:1) se obtuvo el producto **3 β -NBD-ChA** como un sólido naranja (0.13 g, 90%).

^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 0.73 (s, 3H, 18- CH_3), 1.02 (s ancho, 6H, 19- CH_3 + 21- CH_3), 3.83 (s ancho, 1H, 7 β -H), 4.00 (s ancho, 1H, 12 β -H), 4.15 (s ancho, 1H, 3 α -H), 6.39 (d, $J = 9.0$, 1H, 6- $\text{CH}(\text{Ar})$), 8.51 (d, $J = 9.0$, 1H, 5- $\text{CH}(\text{Ar})$); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 13.0 (CH_3), 17.7 (CH_3), 23.4 (CH_3), 24.2 (CH_2), 27.7 (CH), 28.7 (CH_2), 29.8 (CH_2), 32.2 (CH_2), 33.0 (CH_2), 33.7 (CH_2), 35.4 (CH_2), 36.3 (C), 37.0 (CH), 38.4 (CH), 41.0 (CH), 43.0 (CH), 47.6 (CH), 48.3 (3-CH), 69.0 (7-CH), 74.0 (12-CH), 99.7 (CH), 122.0 (C), 138.2 (CH), 146.7 (C), 147.3 (C), 180.2 (COOH); EMAR: obtenido m/z : 570.3057 (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_7$: 570.3055).

Síntesis de ácido 7 α -(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (7 α -NBD-ChA)

7 α -(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (7 α -NBD-ChMe)

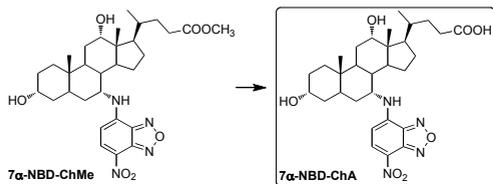


El compuesto **7 α -NBD-ChMe** se preparó a partir de **7 α -NH₂-ChMe** siguiendo el procedimiento descrito para 3 α -NBD-ChMe. Así, partiendo de

7 α -NH₂-ChMe·HCl (84 mg, 0.18 mmol), y tras purificación por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano, 3:1) se obtuvo el producto **7 α -NBD-ChMe** (35 mg, 33%) como un sólido anaranjado-ámbar.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.73 (s, 3H, 18-CH₃), 0.91 (d, *J* = 6.3, 3H, 21-CH₃), 1.02 (s, 3H, 19-CH₃), 3.58 (s + m, 4H, CH₃O + 3 β -H), 3.89 (s ancho, 1H, 7 β -H), 4.07 (s ancho, 1H, 12 β -H), 6.11 (d, *J* = 8.1, 1H, 6-CH(Ar)), 6.45 (s ancho, 1H, NH), 8.47 (d, *J* = 8.1, 1H, 5-CH(Ar)).

Ácido 7 α -(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (7 α -NBD-ChA)^[83]



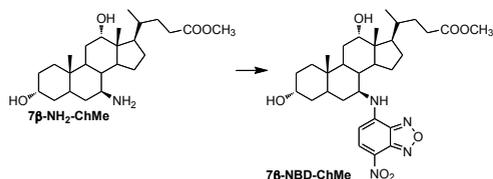
El compuesto **7 α -NBD-ChA** se preparó a partir de **7 α -NBD-ChMe** siguiendo el procedimiento descrito para 3 α -NBD-ChA. Así, partiendo de

7 α -NBD-ChMe (35 mg), tras purificación por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano:AcOH, 80:20:1 y, a continuación, RP18, MeOH:AcOEt:H₂O:AcOH, 80:10:10:1), se obtuvo el producto **7 α -NBD-ChA** (27 mg, 83%) como un sólido naranja-rojizo.

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.76 (s, 3H, 18-CH₃), 1.02 (s ancho, 6H, 19-CH₃ + 21-CH₃), 3.39 (m, 1H, 3 β -H), 3.99 (s ancho, 1H, 7 β -H), 4.05 (s ancho, 1H, 12 β -H), 6.36 (d, *J* = 8.7, 1H, 6-CH(Ar)), 8.55 (d, *J* = 9.0, 1H, 5-CH(Ar)); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 12.7 (CH₃), 17.7 (CH₃), 22.8 (CH₃), 24.1 (CH₂), 28.3 (CH₂), 29.5 (CH₂), 30.8 (CH₂), 31.0 (CH₂), 32.1 (CH₂), 32.3 (CH₂), 36.2 (CH₂), 36.7 (CH), 38.3 (CH), 40.0 (CH₂), 42.8 (CH), 43.3 (CH), 47.8 (CH), 52.6 (7-CH), 72.3 (3-CH), 73.9 (12-CH), 100.0 (CH), 123.4 (C), 138.6 (CH), 145.3 (C), 146.2 (C), 178.5 (COOH); EMAR: obtenido *m/z*: 570.3064 (calculado para C₃₀H₄₂N₄O₇: 570.3055).

Síntesis de ácido 7β-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-3α,12α-dihidroxi-5β-colan-24-oico (7β-NBD-ChA)

7β-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-3α,12α-dihidroxi-5β-colan-24-oato de metilo (7β-NBD-ChMe)

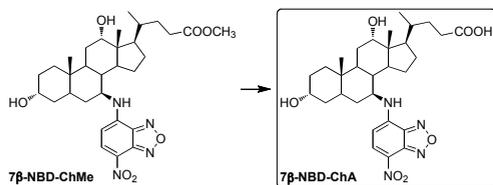


El compuesto **7β-NBD-ChMe** se preparó a partir de una mezcla **7α-NH₂-ChMe:7β-NH₂-ChMe** siguiendo el mismo procedimiento descrito para 3α-

NBD-ChMe, excepto que en vez de emplear Et₃N como base se utilizó NaHCO₃. Así, partiendo de 0.24 g (0.57 mmol) de la mezcla, y tras purificación por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano, 3:1) se obtuvo el producto **7β-NBD-ChMe** (56 mg, 17%) como un sólido anaranjado-ámbar.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.73 (s, 3H, 18-CH₃), 0.96 (d, *J* = 6.3, 3H, 21-CH₃), 1.00 (s, 3H, 19-CH₃), 3.63 (s, 3H, CH₃O), 3.70 (m, 2H, 3β-H + 7α-H), 4.02 (s ancho, 1H, 12β-H), 6.12 (d, *J* = 8.7, 1H, 6-CH(Ar)), 6.17 (d, *J* = 8.7, 1H NH), 8.48 (d, *J* = 8.7, 1H, 5-CH(Ar)).

Ácido 7β-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-3α,12α-dihidroxi-5β-colan-24-oico (7β-NBD-ChA)^[83]



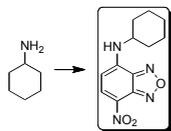
Se preparó utilizando el mismo procedimiento descrito para 3α-NBD-ChA. Así, a partir de **7β-NBD-ChMe** (56 mg), tras purificación por

cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano:AcOH, 80:20:1 y, a continuación, RP18, MeOH:AcOEt:H₂O:AcOH, 80:10:10:1), se obtuvo el producto **7β-NBD-ChA** como un sólido naranja-rojizo (49 mg, 90%).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.79 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (d, *J* = 6.3, 3H, 21-CH₃), 1.04 (s, 3H, 19-CH₃), 3.57 (m, 1H, 3β-H), 3.83 (m, 1H, 7α-H), 3.98 (s ancho, 1H, 12β-H), 6.30 (d, *J* = 9.0, 1H, 6-CH(Ar)), 8.54 (d, *J* = 9.0, 1H, 5-CH(Ar)); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 13.3 (CH₃), 17.6 (CH₃), 23.6 (CH₃), 26.7 (CH₂), 28.9 (CH₂), 30.3 (CH₂), 30.9 (CH₂), 32.1 (CH₂), 32.3 (CH₂), 34.1 (CH), 34.5 (CH₂), 34.8 (C), 36.1 (CH₂), 36.6 (CH), 37.3 (CH₂), 41.5 (CH), 43.4 (CH), 46.8 (CH), 48.8 (CH), 55.1 (7-CH), 72.1 (3-CH), 73.1 (12-CH), 98.7 (CH), 122.2 (C), 139.0 (CH),

145.6 (C), 146.1 (C), 178.3 (COOH); EMAR: obtenido m/z : 570.3062 (calculado para $C_{30}H_{42}N_4O_7$: 570.3055).

Síntesis de *N*-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)-ciclohexilamina (NBD-CH)

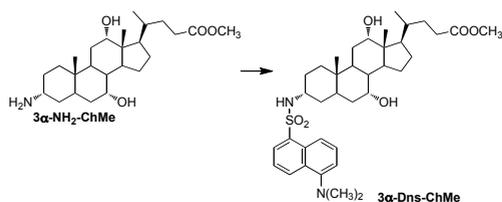


A una disolución de ciclohexilamina (0.1 ml, 0.87 mmol) y $NaHCO_3$ (0.44 g, 5.33 mmol) en 1,4-dioxano anhidro (2.5 ml), se le añadió, gota a gota, una disolución de NBD-Cl (0.2 g, 1.04 mmol) en 1,4-dioxano anhidro (2.5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche; transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó y el crudo se purificó por cromatografía de columna (SiO_2 , $CH_2Cl_2:n$ -hexano, 2:1), obteniéndose el compuesto **NBD-CH** como un sólido naranja (0.17 g, 75%).

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 1.25 - 1.51 (m, 5H, cHe), 1.74 (m, 1H, cHe), 1.87 (m, 2H, cHe), 2.17 (m, 2H, cHe), 3.66 (m, 1H, CH-NH), 6.14 (s ancho, 1H, NH), 6.19 (d, $J = 8.7$, 1H, 6-CH(Ar)), 8.49 (d, $J = 8.7$, 1H, 5-CH(Ar)); ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 24.7 (CH_2), 25.2 (CH_2), 32.4 (CH_2), 53.0 (CH), 98.8 (CH), 123.7 (C), 136.7 (CH), 143.0 (C), 144.1 (C), 144.5 (C); EMAR: obtenido m/z : 262.1073 (calculado para $C_{12}H_{12}N_4O_3$: 262.1066).

Síntesis de ácido 3α -(5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonil)amino- $7\alpha,12\alpha$ -dihidroxi- 5β -colan-24-oico (3α -Dns-ChA)

3α -(5-Dimetilaminonaftalen-1-sulfonil)amino- $7\alpha,12\alpha$ -dihidroxi- 5β -colan-24-oato de metilo (3α -Dns-ChMe)^[160]

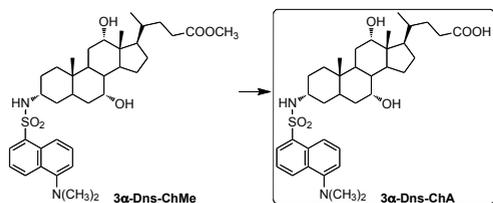


A una disolución de **3α -NH₂-ChMe·HCl** (0.1 g, 0.25 mmol) en DMF anhidra (2.5 ml), se le añadió Et_3N (0.1 ml, 0.75 mmol) y la mezcla se enfrió a 0°C. A continuación, se le adicionó

gota a gota, bajo atmósfera de N_2 , una disolución de Dns-Cl (95 mg, 0.35 mmol) en CH_3CN anhidro (1 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó y el crudo se redisolvió en $AcOEt$, lavó con HCl 1M y salmuera, secó sobre $MgSO_4$ y se concentró. El crudo se purificó por cromatografía de columna (SiO_2 , $AcOEt:n$ -hexano, 1:1) para obtener el **3α -Dns-ChMe** como un sólido verdoso (80 mg, 49%).

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 0.62 (s, 3H, 18- CH_3), 0.79 (s, 3H, 19- CH_3), 0.94 (d, $J = 5.7$, 3H, 21- CH_3), 2.87 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{N}$), 2.96 (m, 1 H, 3 β -H), 3.65 (s, 3H, CH_3O), 3.77 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.91 (s ancho, 1H, 12 β -H), 5.26 (d, $J = 7.8$, 1H, NH), 7.15 (d, $J = 7.2$, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 7.50 (m, 2H, 2 $\times\text{CH}(\text{Ar})$), 8.26 (m, 2H, 2 $\times\text{CH}(\text{Ar})$), 8.51 (d, $J = 8.4$, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 12.6 (CH_3), 17.4 (CH_3), 22.6 (CH_3), 23.2 (CH_2), 26.7 (CH), 27.6 (CH_2), 28.3 (CH_2), 28.9 (CH_2), 31.0 (CH_2), 31.2 (CH_2), 34.6 (CH_2), 35.3 (CH), 35.9 (CH_2), 37.7 (CH_2), 39.5 (CH), 42.0 (CH), 42.1 (CH), 45.6 (CH_3N), 46.5 (C), 47.2 (CH), 51.7 (CH_3O), 54.4 (3-CH), 68.3 (7-CH), 73.0 (12-CH), 115.3 (CH), 119.5 (CH), 123.3 (CH), 128.2 (CH), 129.2 (CH), 129.8 (C), 129.9 (C), 130.1 (CH), 136.3 (C), 151.7 (C), 174.9 (COO); EMAR: obtenido m/z : 654.3710 (calculado para $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$: 654.3703).

Ácido 3 α -(5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonil)amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (3 α -Dns-ChA)



Sobre una disolución de **3 α -Dns-ChMe** (80 mg, 0.12 mmol) en 2 ml de MeOH, se adicionó una disolución de KOH en MeOH (1M, 1.2 ml). La mezcla se agitó durante la noche a

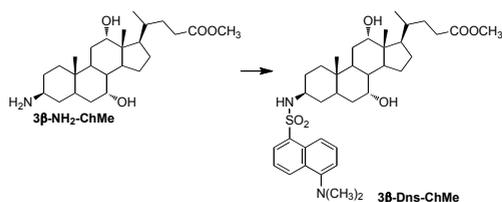
temperatura ambiente y a continuación se evaporó el disolvente. El crudo se redisolvió en H_2O , se acidificó con HCl 1M y extrajo con AcOEt. La fase orgánica se concentró y el producto crudo se purificó por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt:n-hexano:AcOH 70:30:1 y, a continuación, RP18, MeOH:AcOEt: H_2O :AcOH, 80:10:10:1). El producto **3 α -Dns-ChA** se obtuvo como un sólido verdoso (68 mg, 89%).

^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 0.65 (s, 3H, 18- CH_3), 0.81 (s, 3H, 19- CH_3), 0.98 (d, $J = 6.0$, 3H, 21- CH_3), 2.87 (s, 7H, $(\text{CH}_3)_2\text{N} + 3\beta$ -H), 3.71 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.89 (s ancho, 1H, 12 β -H), 7.25 (d, $J = 7.5$, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 7.55 (m, 2H, 2 $\times\text{CH}(\text{Ar})$), 8.20 (d, $J = 7.2$, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 8.34 (d, $J = 8.7$, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 8.53 (d, $J = 8.4$, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 12.9 (CH_3), 17.6 (CH_3), 23.1 (CH_3), 24.1 (CH_2), 27.8 (CH), 28.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.6 (CH_2), 32.1 (CH_2), 32.3 (CH_2), 35.6 (CH_2), 36.8 (CH), 37.1 (CH_2), 38.7 (CH_2), 40.9 (CH), 43.0 (CH), 43.9 (CH), 45.8 (CH_3N), 47.4 (CH), 48.0 (C), 55.5 (3-CH), 68.8 (7-CH), 73.8 (12-CH), 116.3 (CH), 120.9 (CH), 124.2 (CH), 128.8 (CH), 129.8 (CH), 130.9 (CH), 131.0

(C), 131.2 (C), 138.3 (C), 153.1 (C), 178.3 (COOH); EMAR: obtenido m/z : 640.3538 (calculado para $C_{36}H_{52}N_2O_6S$: 640.3546).

Síntesis de ácido 3β -(5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonil)amino- $7\alpha,12\alpha$ -dihidroxi- 5β -colan-24-oico (3β -Dns-ChA)

3β -(5-Dimetilaminonaftalen-1-sulfonil)amino- $7\alpha,12\alpha$ -dihidroxi- 5β -colan-24-oato de metilo (3β -Dns-ChMe)

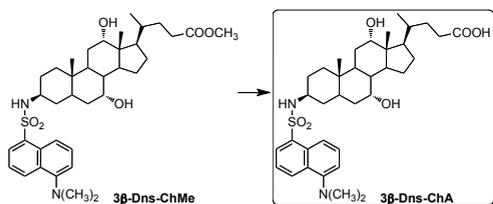


El compuesto **3β -Dns-ChMe** se preparó empleando el protocolo descrito para 3α -Dns-ChMe. Así, a partir del **3β -NH₂-ChMe-HCl** (0.1 g, 0.24 mmol), tras purificación por

cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt:*n*-hexano, 1:1) se obtuvo el **3β -Dns-ChMe** (85 mg, 55%) como un sólido verdoso.

1H RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 0.60 (s, 3H, 18- CH_3), 0.76 (s, 3H, 19- CH_3), 0.90 (d, $J = 6.3$, 3H, 21- CH_3), 2.87 (s, 6H, $(CH_3)_2N$), 3.41 (s ancho, 1H, 3 α -H), 3.63 (s, 3H, CH_3O), 3.69 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.87 (s ancho, 1H, 12 β -H), 5.02 (d, $J = 6.3$, 1H, NH), 7.15 (d, $J = 7.5$, 1H, $CH(Ar)$), 7.50 (m, 2H, 2 \times $CH(Ar)$), 8.23 (d, $J = 7.2$, 1H, $CH(Ar)$), 8.28 (d, $J = 8.4$, 1H, $CH(Ar)$), 8.50 (d, $J = 8.4$, 1H, $CH(Ar)$); ^{13}C RMN (75 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 12.6 (CH_3), 17.4 (CH_3), 23.0 (CH_3), 23.2 (CH_2), 25.7 (CH_2), 26.1 (CH), 27.5 (CH_2), 28.5 (CH_2), 30.3 (CH_2), 30.9 (CH_2), 31.2 (CH_2), 34.0 (CH_2), 34.2 (CH_2), 35.0 (C), 35.2 (CH), 36.7 (CH), 39.5 (CH), 41.9 (CH), 45.6 (CH_3N), 46.5 (C), 47.3 (CH), 50.1 (3-CH), 51.6 (CH_3O), 68.3 (7-CH), 72.9 (12-CH), 115.1 (CH), 118.7 (CH), 123.3 (CH), 128.4 (CH), 129.7 (CH), 129.8 (CH), 129.9 (C), 130.4 (CH), 135.5 (C), 152.1 (C), 174.8 (COO); EMAR: obtenido m/z : 654.3701 (calculado para $C_{37}H_{54}N_2O_6S$: 654.3703).

Ácido 3β -(5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonil)amino- $7\alpha,12\alpha$ -dihidroxi- 5β -colan-24-oico (3β -Dns-ChA)



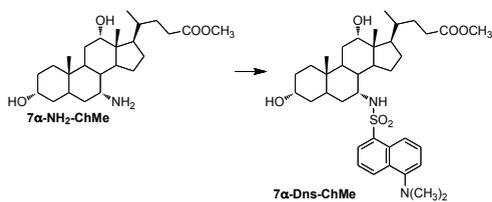
El compuesto **3β -Dns-ChA** se preparó empleando el procedimiento descrito para la síntesis de 3α -Dns-ChA. Así, a partir de **3β -Dns-ChMe** (85 mg), tras purificación por cromatografía de

columna (SiO₂, AcOEt:n-hexano:AcOH 70:30:1 y, a continuación, RP18, MeOH:AcOEt:H₂O:AcOH, 80:10:10:1) se obtuvo el **3β-Dns-ChA** (60 mg, 83%) como un sólido verdoso.

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.65 (s, 3H, 18-CH₃), 0.76 (s, 3H, 19-CH₃), 0.97 (d, *J* = 6.3, 3H, 21-CH₃), 2.88 (s, 6H, (CH₃)₂N), 3.39 (s ancho, 1H, 3α-H), 3.63 (s ancho, 1H, 7β-H), 3.87 (s ancho, 1H, 12β-H), 7.26 (d, *J* = 7.2, 1H, CH(Ar)), 7.57 (m, 2H, 2×CH(Ar)), 8.20 (dd, *J* = 7.2, 1.2, 1H, CH(Ar)), 8.41 (d, *J* = 8.7, 1H, CH(Ar)), 8.54 (d, *J* = 8.4, 1H, CH(Ar)); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 12.9 (CH₃), 17.6 (CH₃), 23.2 (CH₃), 24.1 (CH₂), 26.5 (CH₂), 27.3 (CH), 28.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 31.2 (CH₂), 32.1 (CH₂), 32.3 (CH₂), 34.9 (CH₂), 35.2 (CH₂), 36.0 (C), 36.8 (CH), 37.7 (CH), 40.8 (CH), 42.9 (CH), 45.8 (CH₃N), 47.5 (C), 48.0 (CH), 51.4 (3-CH), 68.9 (7-CH), 73.9 (12-CH), 116.3 (CH), 120.7 (CH), 124.3 (CH), 128.9 (CH), 130.2 (CH), 131.0 (C), 131.1 (C), 137.9 (C), 153.2 (C), 178.3 (COOH); EMAR: obtenido *m/z*: 640.3552 (calculado para C₃₆H₅₂N₂O₆S: 640.3546).

Síntesis de ácido 7α-(5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonyl)amino-3α,12α-dihidroxi-5β-colan-24-oico (7α-Dns-ChA)

7α-(5-Dimetilaminonaftalen-1-sulfonyl)amino-3α,12α-dihidroxi-5β-colan-24-oato de metilo (7α-Dns-ChMe)



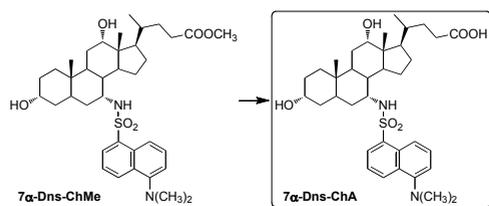
El compuesto **7α-Dns-ChMe** fue preparado siguiendo el protocolo descrito para 3α-Dns-ChMe. Así, a partir del **7α-NH₂-ChMe·HCl** (42 mg, 0.09 mmol), tras purificación por

cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:n-hexano, 2:1) se obtuvo **7α-Dns-ChMe** (46 mg, 70%) como un sólido verdoso.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.45 (s, 3H, 18-CH₃), 0.82 (s, 3H, 19-CH₃), 0.85 (d, *J* = 5.1, 3H, 21-CH₃), 2.86 (s, 6H, (CH₃)₂N), 3.26 (s ancho, 1H, 7β-H), 3.42 (m, 1H, 3β-H), 3.67 (s, 3H, CH₃O), 3.87 (s ancho, 1H, 12β-H), 6.25 (d, *J* = 6.6, 1H, NH), 7.18 (d, *J* = 7.5, 1H, CH(Ar)), 7.50 (t, 1H, CH(Ar)), 7.63 (t, 1H, CH(Ar)), 8.28 (d, *J* = 7.2, 1H, CH(Ar)), 8.51 (d, *J* = 8.4, 2H, 2×CH(Ar)); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.8 (CH₃), 17.6 (CH₃), 23.1 (CH₃), 26.8 (CH₂), 28.0 (CH₂), 28.9 (CH₂), 30.3 (CH₂), 31.0 (CH₂), 31.2 (CH₂), 33.2 (CH), 33.4 (C), 34.9 (CH₂), 35.0

(CH), 35.4 (CH₂), 36.3 (CH₂), 41.8 (CH), 42.6 (CH), 45.5 (CH₃N), 45.9 (CH), 46.6 (CH), 48.0 (C), 51.7 (CH₃O), 54.3 (7-CH), 71.3 (3-CH), 72.2 (12-CH), 115.2 (CH), 118.8 (CH), 123.6 (CH), 128.4 (CH), 129.1 (CH), 129.7 (C), 129.9 (C), 130.3 (CH), 137.3 (C), 152.1 (C), 174.8 (COO); EMAR: obtenido *m/z*: 654.3682 (calculado para C₃₇H₅₄N₂O₆S: 654.3703).

Ácido 7 α -(5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonil)amino-3 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (7 α -Dns-ChA)



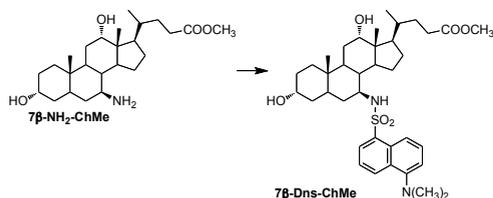
El compuesto **7 α -Dns-ChA** fue preparado siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de 3 α -Dns-ChA. Así a partir de **7 α -Dns-ChMe** (46 mg), tras purificación por cromatografía

de columna (SiO₂, AcOEt:n-hexano:AcOH 75:25:1 y, a continuación, RP18, MeOH:AcOEt:H₂O:AcOH, 80:10:10:1) se obtuvo **7 α -Dns-ChA** (40 mg, 90%) como un sólido verdoso.

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.43 (s, 3H, 18-CH₃), 0.87 (s, 3H, 19-CH₃), 0.90 (d, *J* = 5.7, 3H, 21-CH₃), 2.88 (s, 6H, (CH₃)₂N), 3.02 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.42 (m, 1H, 3 β -H), 3.86 (s ancho, 1H, 12 β -H), 7.31 (d, *J* = 7.5, 1H, CH(Ar)), 7.54 (t, 1H, CH(Ar)), 7.62 (t, 1H, CH(Ar)), 8.19 (d, *J* = 7.2, 1H, CH(Ar)), 8.55 (d, *J* = 8.4, 1H, CH(Ar)), 8.60 (d, *J* = 8.7, 1H, CH(Ar)); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 12.7 (CH₃), 17.7 (CH₃), 22.9 (CH₃), 23.5 (CH₂), 27.6 (CH₂), 27.9 (CH), 29.2 (CH₂), 31.0 (CH₂), 31.1 (CH₂), 32.1 (CH₂), 34.6 (CH₂), 35.9 (CH), 36.0 (C), 36.4 (CH₂), 39.1 (CH), 40.2 (CH₂), 41.8 (CH), 43.2 (CH), 45.9 (CH₃N), 46.9 (CH), 47.0 (C), 52.8 (7-CH), 72.8 (3-CH), 73.5 (12-CH), 116.6 (CH), 121.6 (CH), 124.1 (CH), 128.9 (CH), 130.5 (CH), 131.0 (CH), 131.3 (C), 131.4 (C), 137.4 (C), 153.3 (C), 178.2 (COOH); EMAR: obtenido *m/z*: 640.3539 (calculado para C₃₆H₅₂N₂O₆S: 640.3546).

Síntesis de ácido 7β-(5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonyl)amino-3α,12α-dihidroxi-5β-colan-24-oico (7β-Dns-ChA)

7β-(5-Dimetilaminonaftalen-1-sulfonyl)amino-3α,12α-dihidroxi-5β-colan-24-oato de metilo (7β-Dns-ChMe)

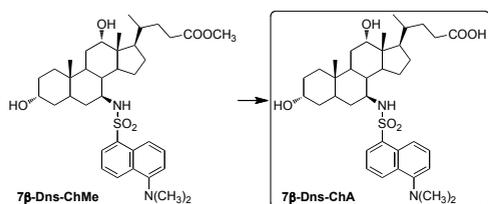


El compuesto **7β-Dns-ChMe** fue preparado a partir de la mezcla **7α-NH₂-ChMe:7β-NH₂-ChMe** siguiendo el protocolo descrito para 3α-Dns-ChMe. Así, a partir de 150 mg de la mezcla, y

tras purificación por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano, 2:1) se obtuvo **7β-Dns-ChMe** (91 mg, 41%) como un sólido verdoso.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.66 (s, 3H, 18-CH₃), 0.73 (s, 3H, 19-CH₃), 0.96 (d, *J* = 6.0, 3H, 21-CH₃), 2.89 (s, 6H, (CH₃)₂N), 3.36 (m, 2H, 3β-H + 7α-H), 3.67 (s, 3H, CH₃O), 3.94 (s ancho, 1H, 12β-H), 4.22 (d, *J* = 9.3, 1H, NH), 7.17 (d, *J* = 7.5, 1H, CH(Ar)), 7.54 (m, 2H, 2×CH(Ar)), 8.24 (d, *J* = 7.5, 2H, 2×CH(Ar)), 8.51 (d, *J* = 8.4, 1H, CH(Ar)); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.4 (CH₃), 17.3 (CH₃), 22.3 (CH₂), 22.4 (CH₃), 26.6 (CH₂), 27.0 (CH), 27.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 30.1 (CH₂), 30.7 (CH₂), 32.2 (CH₂), 34.6 (C), 34.8 (CH), 35.2 (CH₂), 37.9 (CH), 39.3 (CH₂), 41.0 (CH), 41.3 (CH), 45.4 (CH₃N), 46.2 (C), 46.5 (CH), 51.4 (7-CH), 51.5 (CH₃O), 71.7 (3-CH), 72.6 (12-CH), 115.0 (CH), 119.6 (CH), 123.3 (CH), 128.1 (CH), 129.4 (CH), 129.8 (C), 130.0 (C), 130.1 (CH), 136.1 (C), 152.0 (C), 174.7 (COO); EMAR: obtenido *m/z*: 654.3739 (calculado para C₃₇H₅₄N₂O₆S: 654.3703).

Ácido 7β-(5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonyl)amino-3α,12α-dihidroxi-5β-colan-24-oico (7β-Dns-ChA)



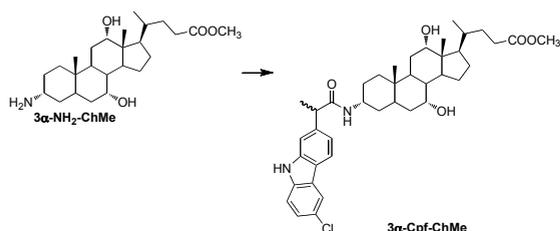
El compuesto **7β-Dns-ChA** fue preparado siguiendo el procedimiento descrito para la síntesis de 3α-Dns-ChA. Así, a partir de **7β-Dns-ChMe** (91 mg), tras purificación por cromatografía

de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano:AcOH 75:25:1 y, a continuación, RP18, MeOH:AcOEt:H₂O:AcOH, 80:10:10:1) se obtuvo **7β-Dns-ChA** (80 mg, 85%) como un sólido verdoso.

^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 0.43 (s, 3H, 18- CH_3), 0.87 (s, 3H, 19- CH_3), 0.90 (d, $J = 5.7$, 3H, 21- CH_3), 2.88 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{N}$), 3.02 (s ancho, 1H, 7 α -H), 3.42 (m, 1H, 3 β -H), 3.86 (s ancho, 1H, 12 β -H), 7.31 (d, $J = 7.5$, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 7.54 (t, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 7.62 (t, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 8.19 (d, $J = 7.2$, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 8.55 (d, $J = 8.4$, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 8.60 (d, $J = 8.7$, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 13.4 (CH_3), 17.7 (CH_3), 23.5 (CH_3), 27.6 (CH_2), 29.1 (CH_2), 30.2 (CH_2), 30.8 (CH_2), 32.4 (CH_2), 32.5 (CH_2), 34.3 (CH), 34.6 (C), 36.0 (CH_2), 36.6 (CH), 37.2 (CH_2), 43.0 (CH), 43.3 (CH), 45.8 (CH_3N), 46.7 (CH), 48.0 (CH), 55.1 (7-CH), 72.0 (3-CH), 73.2 (12-CH), 116.3 (CH), 120.9 (CH), 124.4 (CH), 129.0 (CH), 129.7 (CH), 130.8 (CH), 131.1 (C), 131.2 (C), 139.6 (C), 153.1 (C), 178.7 (COOH); EMAR: obtenido m/z : 640.3549 (calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$: 640.3546).

Síntesis de ácido 3 α -[2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (3 α -Cpf-ChA)

3 α -[2-(6-Cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de metilo (3 α -Cpf-ChMe)



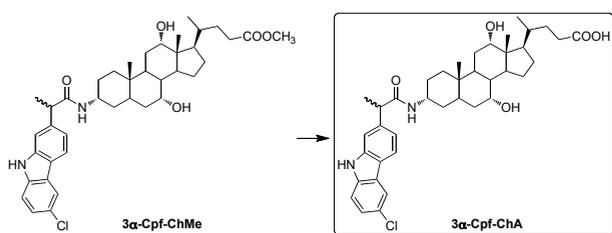
Carprofeno (0.12 g, 0.43 mmol), EDC (76 μl , 0.43 mmol) y 4-PPY (10 mg, cat.) se disolvieron en CH_2Cl_2 anhidro, bajo atmósfera de N_2 , y la mezcla se enfrió a

0°C. Sobre ésta, se añadió lentamente una disolución de 3 α - NH_2 -ChMe-HCl (0.18 g, 0.39 mmol) y diisopropiletilamina (68 μl , 0.39 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro. La mezcla se agitó durante la noche, en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo, se filtró, lavó con HCl 1M, NaHCO_3 saturado y salmuera, se secó sobre MgSO_4 y concentró. Purificación del crudo por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt:*n*-hexano, 3:1) proporcionó el producto 3 α -Cpf-ChMe (60 mg, 23%) como un sólido blanco.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): algunas señales desdobladas (diasterémeros) δ (ppm) 0.69 (s, 3H, 18- CH_3), 0.77 (s ancho, 3H, 19- CH_3), 0.91 (d, $J = 6.0$, 3H, 21- CH_3), 1.52 (d, $J = 7.2$, 3H, $\text{CH}_3\text{C}^*\text{H}$), 3.55 (m, 2H, 3 β -H + C^*H), 3.65 (s, 3H, CH_3O), 3.74 + 3.79 (2xs ancho, 1H, 7 β -H), 3.87 (s ancho, 1H, 12 β -H), 5.30 + 5.44 (2xd, $J = 8.1$, 1H, NH), 7.07 (d, $J = 8.1$, 1H, $\text{CH}(\text{Ar})$), 7.33 (m, 3H, 3 $\times\text{CH}(\text{Ar})$), 7.87 (dd, $J =$

8.1, 5.1, 1H, CH(Ar)), 7.93 (s, 1H, CH(Ar)), 9.08 + 9.16 (2xs ancho, 1H, NH(Ar)); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 12.5 (CH_3), 17.5 (CH_3), 19.2 (CH_3), 22.6 (CH), 23.2 (CH_2), 26.7 (CH), 27.6 (CH_2), 27.9 (CH_2), 28.3 (CH_2), 31.0 (CH_2), 31.2 (CH_2), 34.4 (CH_2), 34.6 (C), 35.3 (CH_3), 35.6 (CH_2), 36.3 (CH_2), 39.5 (CH), 41.8 (CH), 42.1 (CH), 46.5 (C), 47.4 (CH), 47.6 (CH), 49.9 (3-CH), 51.7 (CH_3O), 68.4 (7-CH), 73.1 (12-CH), 109.7 (CH), 112.0 (CH), 119.5 (CH), 120.0 (CH), 120.7 (CH), 121.6 (C), 124.2 (C), 124.7 (C), 125.8 (CH), 138.5 (C), 140.2 (C), 140.9 (C), 174.0 (CONH), 174.9 (COO).

Ácido 3 α -[2-(6-cloro-9H-carbazol-2-il)propanoil]amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (3 α -Cpf-ChA)



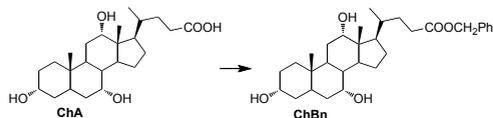
20 mg (0.03 mmol) de **3 α -Cpf-ChMe** se disolvieron en 1 ml de MeOH y sobre esta disolución se adicionaron 0.3 ml de KOH en MeOH (1M). La mezcla se calentó a

reflujo durante 1 hora, y a continuación, se evaporó el disolvente. El crudo se redisolvió en H_2O se acidificó con HCl 1M, se extrajo con AcOEt y se concentró. El crudo se purificó por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt:c-hexano:AcOH, 80:20:1). El producto **3 α -Cpf-ChA** se obtuvo como un sólido blanco (12 mg, 67%).

^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 0.68 (s, 3H, 18- CH_3), 0.90 (s, 3H, 19- CH_3), 0.99 (d, $J = 5.7$, 3H, 21- CH_3), 1.51 (d, $J = 7.2$, 3H, $\text{CH}_3\text{C}^*\text{H}$), 3.49 (m, 1H, 3 β -H), 3.74 (m, 2H, 7 β -H + C^*H), 3.91 + 3.94 (2xs ancho, 1H, 12 β -H), 7.14 - 7.55 (m, 4.5H, 4.5 \times CH(Ar)), 7.73 (m, 0.5H, 0.5 \times CH(Ar)), 7.93 - 7.99 (m, 2H, CH(Ar) + NH(Ar)); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 12.9 (CH_3), 17.6 (CH_3), 19.2 (CH_3), 23.2 (CH), 24.2 (CH_2), 27.9 (CH), 28.3 (CH_2), 28.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 32.1 (CH_2), 32.4 (CH_2), 35.7 (CH_2), 35.9 (CH_3), 36.8 (CH), 37.1 (CH_2), 37.3 (CH_2), 40.9 (CH), 43.0 (CH), 43.6 (CH), 47.5 (C), 48.0 (CH), 51.2 (3-CH), 69.0 (7-CH), 73.9 (12-CH), 110.6 (CH), 112.8 (CH), 120.0 (CH), 120.5 (CH), 121.2 (CH), 122.3 (C), 125.1 (C), 125.4 (C), 126.2 (CH), 140.1 (C), 141.8 (C), 142.4 (C), 176.3 (CONH), 178.3 (COOH).

Síntesis de ácido 3 α -(4-amino-1,3-dioxoisindol-2-il)-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (3 α -aFt-ChA)

3 α ,7 α ,12 α -Trihidroxi-5 β -colan-24-oato de bencilo (ChBn)^[164]

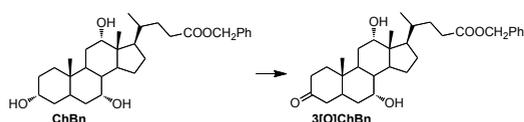


A una disolución de ácido cólico (0.5 g, 1.2 mmol) en DMF anhidra (5 ml) a 0°C, se le añadió DBU (0.2 ml, 1.35 mmol) y al cabo de 10 min bromuro de bencilo (0.16 ml, 1.35 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido este tiempo el disolvente se evaporó y el crudo se redisolvió en AcOEt, lavó con NaHCO₃ saturado, HCl 1M, salmuera, secó sobre MgSO₄ y concentró. Después de purificación por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano, 9:1) se obtuvo el producto **ChBn** como un sólido blanco (0.6 g, 98%).

1H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.65 (s, 3H, 18-CH₃), 0.88 (s, 3H, 19-CH₃), 0.96 (d, $J = 5.7$, 3H, 21-CH₃), 3.45 (m, 1 H, 3 β -H), 3.84 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.96 (s ancho, 1H, 12 β -H), 5.11 (d, $J = 2.7$, 2H, CH₂Ph), 7.35 (m, 5H, 5 \times H(Ph)); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.7 (CH₃), 17.5 (CH₃), 22.7 (CH₃), 23.3 (CH₂), 26.7 (CH), 27.6 (CH₂), 28.5 (CH₂), 30.6 (CH₂), 31.0 (CH₂), 31.4 (CH₂), 34.7 (CH₂), 34.8 (C), 35.3 (CH), 35.4 (CH₂), 39.7 (CH₂), 39.8 (CH), 41.6 (CH), 42.0 (CH), 46.6 (C), 47.3 (CH), 66.3 (CH₂Ph), 68.6 (7-CH), 72.1 (3-CH), 73.1 (12-CH), 128.3 (CH), 128.4 (CH), 128.7 (CH), 136.3 (C), 174.2 (COO).

1H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.65 (s, 3H, 18-CH₃), 0.88 (s, 3H, 19-CH₃), 0.96 (d, $J = 5.7$, 3H, 21-CH₃), 3.45 (m, 1 H, 3 β -H), 3.84 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.96 (s ancho, 1H, 12 β -H), 5.11 (d, $J = 2.7$, 2H, CH₂Ph), 7.35 (m, 5H, 5 \times H(Ph)); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.7 (CH₃), 17.5 (CH₃), 22.7 (CH₃), 23.3 (CH₂), 26.7 (CH), 27.6 (CH₂), 28.5 (CH₂), 30.6 (CH₂), 31.0 (CH₂), 31.4 (CH₂), 34.7 (CH₂), 34.8 (C), 35.3 (CH), 35.4 (CH₂), 39.7 (CH₂), 39.8 (CH), 41.6 (CH), 42.0 (CH), 46.6 (C), 47.3 (CH), 66.3 (CH₂Ph), 68.6 (7-CH), 72.1 (3-CH), 73.1 (12-CH), 128.3 (CH), 128.4 (CH), 128.7 (CH), 136.3 (C), 174.2 (COO).

3-Oxo-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de bencilo (3[O]ChBn)



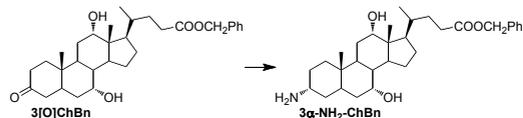
A una disolución de **ChBn** (0.6 g, 1.2 mmol) en tolueno anhidro (20 ml), se le añadió Ag₂CO₃@Celite[®] (1 g, 1.45 mmol). La reacción se calentó a reflujo en un equipo Dean-Stark, bajo atmosfera de N₂, durante 20 horas. A continuación, se filtró, lavó con tolueno caliente y concentró. Tras purificación por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano, 9:1) se obtuvo **3[O]ChBn** (0.51 g, 87%) como un sólido blanco.

1H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.71 (s, 3H, 18-CH₃), 0.98 (s ancho, 6H, 19-CH₃ + 21-CH₃), 3.41 (dd, $J = 15.3, 13.5$, 1H, 4-*H*_{ax}), 3.92 (s ancho, 1H, 7 β -H), 4.02 (s ancho, 1H, 12 β -H), 5.11 (d, $J = 1.8$, 2H, CH₂Ph), 7.35 (m, 5H, 5 \times H(Ph)); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.7 (CH₃), 17.5 (CH₃), 21.9 (CH₃), 23.3 (CH₂), 27.4 (CH), 27.5 (CH₂), 28.8 (CH₂), 31.0 (CH₂), 31.4 (CH₂), 33.9 (CH₂), 35.0 (C), 35.2 (CH), 36.8 (CH₂), 36.9 (CH₂), 39.7 (CH), 42.0 (CH), 43.2 (CH), 45.2 (CH₂),

1H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.71 (s, 3H, 18-CH₃), 0.98 (s ancho, 6H, 19-CH₃ + 21-CH₃), 3.41 (dd, $J = 15.3, 13.5$, 1H, 4-*H*_{ax}), 3.92 (s ancho, 1H, 7 β -H), 4.02 (s ancho, 1H, 12 β -H), 5.11 (d, $J = 1.8$, 2H, CH₂Ph), 7.35 (m, 5H, 5 \times H(Ph)); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.7 (CH₃), 17.5 (CH₃), 21.9 (CH₃), 23.3 (CH₂), 27.4 (CH), 27.5 (CH₂), 28.8 (CH₂), 31.0 (CH₂), 31.4 (CH₂), 33.9 (CH₂), 35.0 (C), 35.2 (CH), 36.8 (CH₂), 36.9 (CH₂), 39.7 (CH), 42.0 (CH), 43.2 (CH), 45.2 (CH₂),

46.8 (C), 47.5 (CH), 66.3 (CH₂Ph), 68.4 (7-CH), 72.9 (12-CH), 128.3 (CH), 128.4 (CH), 128.7 (CH), 136.2 (C), 174.1 (COO), 213.2 (C=O).

3 α -Amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de bencilo (3 α -NH₂-ChBn)

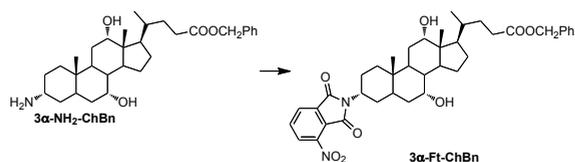


Una mezcla de **3[O]ChBn** (0.35 mg, 0.7 mmol), acetato amónico (0.27 g, 3.5 mmol) y NaBH₃CN (44 mg, 0.7

mmol) en MeOH anhidro (10 ml) se agitó a temperatura ambiente, bajo N₂, durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se acidificó cuidadosamente con HCl concentrado hasta pH 3 y el disolvente se evaporó. El sólido resultante se lavó con Et₂O, redisolvió en 1-BuOH, se filtró, lavó con salmuera y concentró. Tras purificación por recristalización de MeOH-CH₂Cl₂, se obtuvo el compuesto **3 α -NH₂-ChBn·HCl**, conteniendo 10% de β -epímero como un sólido blanco (0.3 g, 80%).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.68 (s, 3H, 18-CH₃), 0.96 (s, 3H, 19-CH₃), 1.00 (d, J = 5.7, 3H, 21-CH₃), 2.93 (m, 0.9H, 3 β -H), 3.50 (s ancho, 0.1H, 3 α -H), 3.81 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.97 (s ancho, 1H, 12 β -H), 5.11 (d, J = 2.7, 2H, CH₂Ph), 7.35 (m, 5H, 5 \times H(Ph)); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 13.0 (CH₃), 17.5 (CH₃), 23.0 (CH₃), 24.1 (CH₂), 26.7 (CH₂), 28.0 (CH), 28.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 32.2 (CH₂), 32.3 (CH₂), 35.4 (CH₂), 35.6 (CH₂), 35.7 (CH₂), 36.0 (C), 36.7 (CH), 41.0 (CH), 43.0 (CH), 43.1 (CH), 47.5 (C), 48.0 (CH), 52.6 (3-CH), 67.1 (CH₂Ph), 68.6 (7-CH), 73.7 (12-CH), 129.2 (CH), 129.3 (CH), 129.5 (CH), 137.7 (C), 175.7 (COO).

3 α -(4-Nitro-1,3-dioxoisindol-2-il)-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oato de bencilo (3 α -Ft-ChBn)



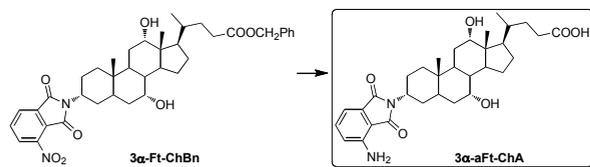
A una disolución de **3 α -NH₂-ChBn·HCl** (100 mg, 0.19 mmol) en tolueno anhidro (6 ml), se le añadió Et₃N (40 μ l, 0.28 mmol).

La mezcla se calentó a reflujo en un equipo Dean-Stark, bajo atmosfera de N₂, durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente y el crudo se redisolvió en AcOEt, lavó con HCl 1M y salmuera, se secó sobre MgSO₄ y concentró. Purificación por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano, 1:1) proporcionó el producto **3 α -Ft-ChBn** como un sólido blanco roto (70 mg, 63%).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.68 (s, 3H, 18-CH₃), 0.96 (s, 3H, 19-CH₃), 0.99 (d, J = 5.7, 3H, 21-CH₃), 3.85 (s ancho, 1H, 7 β -H), 4.05 (m, 2H, 3 β -H + 12 β -

H), 5.11 (d, $J = 2.4$, 2H, CH_2Ph), 7.35 (m, 5H, $5 \times H(\text{Ph})$), 7.85 (dd, $J = 8.1$, 7.5, 1H, $\text{CH}(\text{Ft})$), 8.02 (m, 2H, $2 \times \text{CH}(\text{Ft})$).

Ácido 3α -(4-amino-1,3-dioxoisindol-2-il)- $7\alpha,12\alpha$ -dihidroxi- 5β -colan-24-oico (3α -aFt-ChA)



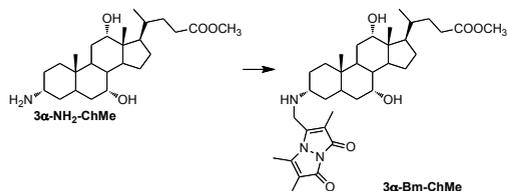
A una disolución de **3α -Ft-ChBn** (40 mg, 0.06 mmol) en AcOEt (5 ml), se le adicionó formiato amónico (38 mg, 0.6

mmol) y Pd-C 10% (14 mg, 20% mol) y la mezcla se calentó a reflujo durante toda la noche. A continuación se filtró, lavó con MeOH y concentró. El crudo se purificó por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt:MeOH, 25:1 y, a continuación RP18, MeOH:AcOEt:H₂O:AcOH, 80:10:10:1) obteniéndose el producto deseado **3α -aFt-ChA** como un sólido amarillo (20 mg, 60%).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.74 (s, 3H, 18- CH_3), 0.99 (s, 3H, 19- CH_3), 1.04 (d, $J = 6.3$, 3H, 21- CH_3), 3.82 (s ancho, 1H, 7 β - H), 3.91 (m, 1H, 3 β - H), 3.97 (br s, 1H, 12 β - H), 6.95 (m, 2H, $2 \times \text{CH}(\text{Ft})$), 7.39 (dd, $J = 8.4$, 7.2, 1H, $\text{CH}(\text{Ft})$); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 13.0 (CH_3), 17.6 (CH_3), 23.3 (CH_3), 24.2 (CH_2), 25.8 (CH_2), 28.0 (CH), 28.7 (CH_2), 29.7 (CH_2), 32.2 (CH_2), 32.4 (CH_2), 34.9 (CH_2), 35.7 (CH_2), 36.1 (C), 36.8 (CH), 38.0 (CH_2), 41.2 (CH), 43.0 (CH), 44.6 (CH), 47.6 (C), 48.1 (CH), 53.0 (3-CH), 68.2 (7-CH), 74.1 (12-CH), 112.1 (CH), 122.3 (CH), 133.9 (C), 136.0 (CH), 147.9 (C), 170.4 (C=O), 171.4 (C=O), 178.5 (COOH).

Síntesis de ácido 3α -[(2,5,6-trimetil-1,7-dioxo-1*H*,7*H*-pirazolo[1,2-*a*]pirazol-3-il)metil]amino- $7\alpha,12\alpha$ -dihidroxi- 5β -colan-24-oico (3α -Bm-ChA)

3α -[(2,5,6-Trimetil-1,7-dioxo-1*H*,7*H*-pirazolo[1,2-*a*]pirazol-3-il)metil]amino- $7\alpha,12\alpha$ -dihidroxi- 5β -colan-24-oato de metilo (3α -Bm-ChMe)



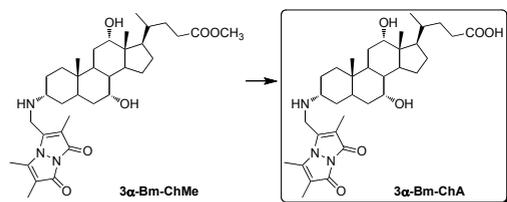
A una disolución de **3α -NH₂-ChMe-HCl** (25 mg, 55 μmol) y Et₃N (22 μl , 0.16 mmol) en DMF anhidra (1 ml) a 0°C, se le añadió lentamente una disolución de bromobimano (21

mg, 78 μmol) en DMF anhidra (1 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó y el crudo se

purificó por cromatografía de columna (SiO_2 , $\text{AcOEt}:\text{MeOH}$, 19:1) proporcionando el producto **3 α -Bm-ChMe** (16 mg, 48%) como un sólido amarillo.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 0.69 (s, 3H, 18- CH_3), 0.91 (s, 3H, 19- CH_3), 0.97 (d, $J = 6.0$, 3H, 21- CH_3), 1.81 (s, 3H, CH_3), 1.85 (s, 3H, CH_3), 2.44 (s, 3H, CH_3), 3.66 (s, 3H, CH_3O), 3.75 (s ancho, 2H, CH_2NH), 3.85 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.98 (s ancho, 1H, 12 β -H); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.0 (CH_3), 7.1 (CH_3), 11.6 (CH_3), 12.7 (CH_3), 17.5 (CH_3), 23.0 (CH_3), 23.3 (CH_2), 27.0 (CH), 27.5 (CH_2), 28.4 (CH_2), 28.5 (CH_2), 31.0 (CH_2), 31.1 (CH_2), 34.7 (CH_2), 35.2 (CH), 35.3 (C), 36.0 (CH_2), 37.5 (CH_2), 39.7 (CH), 40.5 (CH_2N), 42.1 (CH), 42.2 (CH), 46.7 (C), 47.4 (CH), 51.7 (CH_3O), 58.3 (3-CH), 68.4 (7-CH), 73.0 (12-CH), 111.9 (CH), 113.6 (CH), 147.1 (C-N), 147.6 (C-N), 160.8 (C=O), 161.1 (C=O), 174.8 (COO).

Ácido 3 α -[(2,5,6-trimetil-1,7-dioxo-1*H*,7*H*-pirazolo[1,2-*a*]pirazol-3-il)metil]amino-7 α ,12 α -dihidroxi-5 β -colan-24-oico (3 α -Bm-ChA)

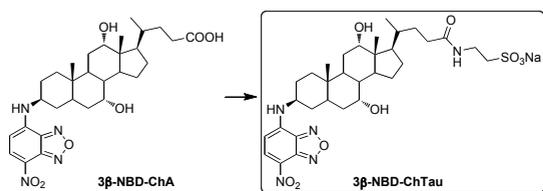


A una disolución de **3 α -Bm-ChMe** (15 mg, 25 μmol) en $\text{DMSO}:\text{tampón fosfato-citrato pH 5}$ (19 ml, 20:80 v/v) se le añadió esterasa porcina PLE (7.6 mg, 0.4 mg/ml) y la mezcla se

agitó suavemente a 40°C durante 7 horas. Transcurrido este tiempo, el pH se ajustó a 2 con HCl 1M y se lavó con CH_2Cl_2 . La fase acuosa conteniendo el producto se evaporó y el crudo se purificó por cromatografía de columna (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, 9:1), obteniéndose el producto **3 α -Bm-ChA** como un sólido amarillo (6 mg, 46%).

^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 0.63 (s, 3H, 18- CH_3), 0.84 (s, 3H, 19- CH_3), 0.91 (d, $J = 6.3$, 3H, 21- CH_3), 1.70 (s, 3H, CH_3), 1.77 (s, 3H, CH_3), 2.42 (s, 3H, CH_3), 3.71 (s ancho, 1H, 7 β -H), 3.85 (s, 2H, CH_2NH), 3.89 (s ancho, 1H, 12 β -H); ^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 6.9 (CH_3), 7.2 (CH_3), 11.8 (CH_3), 13.4 (CH_3), 18.1 (CH_3), 23.7 (CH_3), 24.2 (CH_2), 28.4 (CH), 28.6 (CH_2), 29.2 (CH_2), 30.1 (CH_2), 30.5 (CH_2), 31.1 (CH), 31.2 (CH), 33.6 (CH_2), 36.2 (CH_2), 37.2 (C), 37.4 (CH), 38.1 (CH_2), 41.1 (CH_2N), 41.4 (CH), 43.4 (CH), 48.5 (CH), 60.5 (3-CH), 69.4 (7-CH), 74.4 (12-CH), 112.9 (CH), 115.6 (CH), 150.2 (C-N), 151.2 (C-N), 163.6 (C=O), 163.6 (C=O), 178.3 (COOH).

Síntesis de 2-[3β-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-7α,12α-dihidroxi-5β-colan-24-amido]etanosulfonato de sodio (3β-NBD-ChTau)^[83]



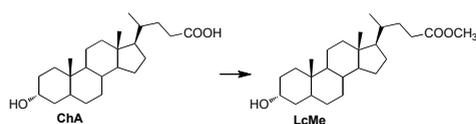
A una disolución de **3β-NBD-ChA** (60 mg, 0.11 mmol) y EEDQ (36 mg, 0.15 mmol) en DMF se le añadió taurina (15 mg, 0.12 mmol) y Et₃N (20 μl, 0.14 mmol). La

mezcla se calentó a 90°C durante 2 horas (hasta total disolución de la taurina), se enfrió a temperatura ambiente manteniendo la agitación y se vertió lentamente sobre 10 ml de Et₂O frío (0°C). Se mantuvo a 5°C durante la noche tras la cual el producto formado tenía apariencia de resina. La fase líquida se separó y la resina se lavó con Et₂O (hasta que las aguas fueron claras). Se redisolvió en CH₂Cl₂ (5 ml), filtró y el filtrado se vertió lentamente sobre Et₂O (15 ml) a 0°C, manteniendo la agitación para conseguir su precipitación. Se mantuvo a 0°C durante una hora más y se filtró. El sólido se redisolvió rápidamente (higroscópico) en NaOH-MeOH (0.05 M, 5 ml) con objeto de transformar la sal de trietilamonio en la sal sódica y a continuación se diluyó con Et₂O (10 ml). Así se mantuvo de nuevo a 5°C durante varias horas y el sólido formado se filtró, lavó con Et₂O y secó. El producto **3β-NBD-ChTau** se obtuvo como un sólido rojizo (50 mg, 68%).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.73 (s, 3H, 18-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 1.04 (d, *J* = 6.3, 3H, 21-CH₃), 2.96 (t, *J* = 6.9, 2H, CH₂NH), 3.59 (t, *J* = 6.9, 2H, CH₂SO₃), 3.82 (s ancho, 1H, 7β-H), 3.98 (s ancho, 1H, 12β-H), 4.07 (m, 1H, 3α-H), 6.33 (d, *J* = 9.9, 1H, 6-CH(Ar)), 8.17 (s ancho, 1H, 5-CH(Ar)); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 13.0 (CH₃), 17.7 (CH₃), 23.4 (CH₃), 24.3 (CH₂), 28.0 (CH), 28.7 (CH₂), 29.8 (CH₂), 33.2 (CH₂), 34.3 (CH₂), 36.3 (C), 36.6 (CH₂NH), 37.0 (CH), 38.4 (CH), 41.0 (CH), 43.0 (CH), 47.6 (C), 48.0 (CH), 48.7 (3-CH), 51.5 (CH₂SO₃), 69.2 (7-CH), 74.1 (12-CH), 176.6 (CONH).

Síntesis de ácido 3α-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-5β-colan-24-oico (3α-NBD-LcA)

3α-Hidroxi-5β-colan-24-oato de metilo (LcMe)^[165]

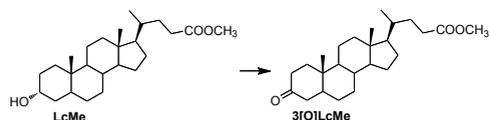


A una disolución de ácido litocólico (2 g, 5.3 mmol) en MeOH (10 ml),

conteniendo 0.3 ml de HCl concentrado se le añadió dimetoxipropanona (5 ml). La mezcla se agitó durante la noche y, transcurrido este tiempo, se evaporó el disolvente. El sólido crudo se redisolvió en AcOEt, lavó con NaHCO₃ saturado y salmuera, se secó con MgSO₄ y se concentró para dar el producto **LcMe** como un sólido cristalino blanco (2 g, 99%) que fue usado en el siguiente paso sin purificación adicional.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.64 (s, 3H, 18-CH₃), 0.90 (s ancho, 6H, 19-CH₃ + 21-CH₃), 3.69 (m, 1H, 3β-H), 3.66 (s, 3H, CH₃O); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.2 (CH₃), 18.4 (CH₃), 21.0 (CH₂), 23.5 (CH₃), 24.4 (CH₂), 26.6 (CH₂), 27.3 (CH₂), 28.3 (CH₂), 30.7 (CH₂), 31.1 (CH₂), 31.2 (CH₂), 34.7 (C), 35.4 (CH₂), 35.5 (CH), 36.0 (CH), 36.3 (CH₂), 40.3 (CH₂), 40.6 (CH), 42.2 (CH), 42.9 (C), 51.6 (CH₃O), 56.1 (CH), 56.6 (CH), 72.0 (3-CH), 174.9 (COO).

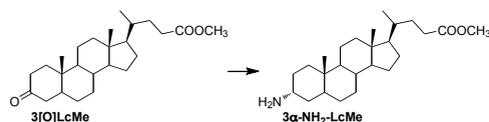
3-Oxo-5β-colan-24-oato de metilo (3[O]LcMe)^[166]



A una disolución de **LcMe** (2 g, 5.3 mmol) en tolueno anhidro (50 ml), se le añadió Ag₂CO₃@Celite® (3.6 g, 5.8 mmol) y la reacción se calentó a reflujo en un equipo Dean-Stark, bajo atmósfera de N₂, durante 9 horas. A continuación, la mezcla se filtró, se lavó con tolueno caliente y se concentró. Tras purificación por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano, 1:2), se obtuvo **3[O]LcMe** (1.7 g, 83%) como un sólido blanco.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.68 (s, 3H, 18-CH₃), 0.92 (d, *J* = 6.3, 3H, 21-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 2.69 (dd, *J* = 14.7, 13.8, 1H, 4-H_{ax}), 3.66 (s, 3H, CH₃O); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.2 (CH₃), 18.4 (CH₃), 21.3 (CH₂), 22.8 (CH₃), 24.3 (CH₂), 25.9 (CH₂), 26.8 (CH₂), 28.3 (CH₂), 31.1 (CH₂), 31.2 (CH₂), 35.0 (C), 35.5 (CH), 35.7 (CH), 37.2 (CH₂), 37.4 (CH₂), 40.2 (CH₂), 40.9 (CH), 42.5 (CH₂), 42.9 (C), 44.5 (CH), 51.6 (CH₃O), 56.1 (CH), 56.6 (CH), 174.9 (COO), 213.5 (C=O).

3α-Amino-5β-colan-24-oato de metilo (3α-NH₂-LcMe)^[167]

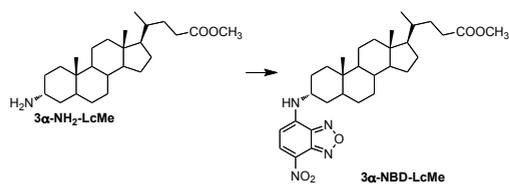


Una mezcla de **3[O]LcMe** (0.5 g, 1.29 mmol), acetato amónico (0.5 g, 6.45 mmol) y NaBH₃CN (80 mg, 1.29 mmol) en MeOH anhidro (25 ml) se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se acidificó cuidadosamente con HCl concentrado hasta pH 3 y se evaporó el disolvente. El sólido se lavó con Et₂O,

redisolvió en 1-BuOH (25 ml), filtró, lavó con salmuera y concentró. Tras la purificación por recristalización de MeOH-CH₂Cl₂, se obtuvo el compuesto **3 α -NH₂-LcMe-HCl** como un sólido blanco, conteniendo una parte de β -epímero (10%) que no se consiguió separar en esta etapa (0.26 g, 47%).

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 0.70 (s, 3H, 18-CH₃), 0.94 (d, *J* = 6.6, 3H, 21-CH₃), 1.00 (s, 3H, 19-CH₃), 3.12 (m, 0.9H, 3 β -H), 3.58 (s ancho, 0.1H, 3 α -H), 3.65 (s, 3H, CH₃O); ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ (ppm) 12.4 (CH₃), 18.7 (CH₃), 21.9 (CH₂), 23.7 (CH₃), 25.2 (CH₂), 26.6 (CH₂), 27.5 (CH₂), 27.9 (CH₂), 29.2 (CH₂), 31.9 (CH₂), 32.2 (CH₂), 32.3 (CH₂), 35.6 (C), 36.0 (CH₂), 36.7 (CH), 37.1 (CH), 41.5 (CH₂), 41.8 (CH), 43.2 (CH), 43.9 (C), 52.0 (CH₃O), 52.3 (3-CH), 57.5 (CH), 57.9 (CH), 176.4 (COO).

3 α -(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-5 β -colan-24-oato de metilo (3 α -NBD-LcMe)

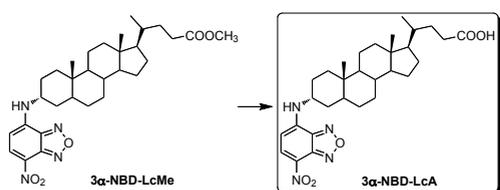


El compuesto **3 α -NBD-LcMe** se preparó siguiendo el procedimiento descrito para 3 α -NBD-ChMe. Así, se partió de **3 α -NH₂-LcMe-HCl** (82 mg,

0.19 mmol), y tras purificación por cromatografía de columna (SiO₂, AcOEt:*n*-hexano, 1:3), se obtuvo el producto **3 α -NBD-LcMe** (65 mg, 62%) como un sólido anaranjado-ámbar.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.66 (s, 3H, 18-CH₃), 0.91 (d, *J* = 6.3, 3H, 21-CH₃), 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), 3.66 (s + m, 4H, CH₃O + 3 β -H), 6.18 (s ancho + d, *J* = 8.7, 2H, 6-CH(Ar) + NH), 8.48 (d, *J* = 8.7, 1H, 5-CH(Ar)); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.2 (CH₃), 18.4 (CH₃), 21.0 (CH₂), 23.7 (CH₃), 24.3 (CH₂), 26.5 (CH₂), 27.1 (CH₂), 27.4 (CH₂), 28.3 (CH₂), 31.1 (CH₂), 31.2 (CH₂), 33.2 (CH₂), 35.0 (C), 35.5 (CH), 35.8 (CH₂), 36.0 (CH), 40.2 (CH₂), 40.8 (CH), 42.6 (CH), 42.9 (CH), 51.7 (CH₃O), 54.3 (3-CH), 56.1 (CH), 56.6 (CH), 98.7 (CH), 123.7 (C), 136.7 (CH), 143.1 (C), 144.1 (C), 144.5 (C), 174.9 (COO).

Ácido 3 α -(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il)amino-5 β -colan-24-oico (3 α -NBD-LcA)



El compuesto **3 α -NBD-LcA** se preparó empleando el procedimiento descrito para 3 α -NBD-ChA. Así, a partir de **3 α -NBD-LcMe** (65 mg), tras

purificación por cromatografía de columna (SiO_2 , AcOEt:n-hexano:AcOH 50:50:1 y, a continuación, RP18, MeOH:AcOEt:H₂O:AcOH, 80:10:10:1) se obtuvo el producto **3 α -NBD-LcA** como un sólido naranja-rojizo (48 mg, 70%).

¹H RMN (300 MHz, (CD₃)₂CO): δ (ppm) 0.71 (s, 3H, 18-CH₃), 0.95 (d, $J = 6.3$, 3H, 21-CH₃), 1.03 (s, 3H, 19-CH₃), 6.54 (d, $J = 8.7$, 1H, 6-CH(Ar)), 8.07 (s ancho, 1H, NH), 8.50 (d, $J = 9.0$, 1H, 5-CH(Ar)).

Medidas Fotofísicas

Todos los disolventes utilizados para las medidas fotofísicas fueron de grado espectrofotométrico o HPLC y fueron suministrados por Aldrich o Scharlau; el agua utilizada fue Millipore. El tampón McIlvaine fue preparado a partir de una disolución 0.1M de ácido cítrico y una disolución 0.2M de Na₂HPO₄, en distintas proporciones según el pH deseado. El tampón fosfato-salino PBS 0.01M pH 7.4 se adquirió en forma de pastillas en Sigma-Aldrich y se disolvió en agua Millipore siguiendo las indicaciones. Todas las medidas fueron realizadas en cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Las disoluciones madre de los derivados de amF fueron preparadas en EtOH (5 mM), los derivados de NBD y el resto de los derivados se prepararon en DMSO (5 mM y 10 mM, respectivamente).

Los rendimientos cuánticos se determinaron utilizando los siguientes patrones: Fluoresceína/ 0.01M KOH en MeOH ($\phi = 1$)^[98] para los derivados de amF y NBD y Cumarina30/ CH₃CN/ aire ($\phi = 0.67$)^[168] para los derivados de Dns y aFt aplicando la siguiente ecuación:^[169]

$$\phi_i = \phi_s \frac{n_i^2}{n_s^2} \frac{\text{Área}_i}{\text{Área}_s} \frac{1 - 10^{-\text{Abs}_s}}{1 - 10^{-\text{Abs}_i}}$$

donde n representa índice de refracción de los correspondientes disolventes, área representa las integrales de los correspondientes espectros de emisión, Abs representa la absorbancia a la λ_{exc} , y los subíndices “i” y “s” se refieren a la muestra de interés y al patrón, respectivamente.

La energía de singlete se calculó con la siguiente ecuación:

$$E_s = N_A \frac{hc}{\lambda_{\text{cr}}} \quad [\text{J mol}^{-1}]$$

donde λ_{cr} es la longitud de onda del cruce de los espectros normalizados de emisión y excitación representada en metros.

Estudios con Albúmina

HSA (esencialmente libre de ácidos grasos 99%), (S)-ibuprofeno y warfarina (98%) se adquirieron en Sigma Aldrich y se utilizaron tal como se recibieron.

La longitud de onda de excitación en los experimentos de valoración con HSA fue ca. 450 nm (punto isoabsorptivo) y 340 nm, para los NBDs y Dns, respectivamente. Para los experimentos FRET se excitó a 290 nm.

La concentración de los derivados de NBD y Dns en PBS para experimentos de UV-Vis y fluorescencia fue 5 μM y 10 μM , respectivamente (obtenidos a partir de una disolución madre en DMSO 5 mM o 10 mM, respectivamente). Estas disoluciones fueron valoradas con una disolución de HSA en PBS 0.5 mM en ambos casos, conteniendo 5 μM o 10 μM de derivado fluorescente de NBD o Dns, respectivamente. Para experimentos de desplazamiento, una disolución de derivado de NBD 5 μM con HSA 10 μM o un derivado de Dns 10 μM con HSA 10 μM fueron valoradas con una disolución de ibuprofeno o warfarina en DMSO (13 mM para los derivados de NBD y 51 mM para los derivados de Dns). Para los experimentos de FRET, la concentración de HSA fue 10 μM y 20 μM (para NBD y Dns respectivamente), y los derivados fueron añadidos de sus correspondientes disoluciones madre hasta una proporción equimolar.

Citometría de Flujo

Los hepatocitos se obtuvieron a partir de 200-300 g Sprague Dawley ratones machos por perfusión del hígado con colagenasa.^[170] La viabilidad celular de la suspensión, asignada por test de exclusión con azul tripán, fue de más del 85%.

Las suspensiones de hepatocitos recién aislados se diluyeron a una densidad de 10^5 células viables/ml en medio Ham's F-12/Lebovitz L-15 (1:1), complementado con suero bovino 2%, insulina 10 nM y albúmina sérica bovina 0.2%, así se mantuvo a 37°C en atmósfera humidificada con CO₂ 5% hasta los

análisis. Los experimentos de citometría de flujo se realizaron siempre en las 2 h siguientes a su aislamiento.

Para los análisis de citometría de flujo, los derivados fluorescentes se disolvieron en EtOH (1 mg/ml). En los experimentos cinéticos de captación de los derivados, las suspensiones de hepatocitos (10^5 células viables/ml) se dispersaron en un tubo estándar de polipropileno y se incubaron con yoduro de propidio (5 μ g/ml) durante 10 min a 37°C en una atmósfera humificada con CO₂ 5%, para identificar y excluir células muertas.^[154] Se ajustaron los parámetros de detector para visualizar las células vivas como luz (Forward scatter) más intensa y la vez fluorescencia naranja de menos intensidad (correspondiente a autofluorescencia). Las células muertas y las que estaban muriéndose aparecieron como fluorescencia intensa de propidio, mientras que núcleos sueltos excluidos por células necróticas aparecieron como casos pequeñitos pero fluorescentes. A continuación, cada tubo fue cargado al citómetro de flujo y la adquisición comenzó durante unos 10 s, para detectar la autofluorescencia verde de células en el tiempo inicial. Después, la adquisición de datos se paró y se adicionó rápidamente un volumen apropiado de la disolución madre de los derivados de ácido cólico hasta alcanzar una concentración final de 100 nM. En este momento, la adquisición continuó hasta 300 s. El transporte dentro de las células fue detectado y cuantificado registrando el incremento de fluorescencia verde en células a lo largo de tiempo. Los valores matemáticos se obtuvieron a partir de los datos crudos de la región analítica rectangular visualizada, por medio de un ordenador conectado al citómetro, a lo largo del eje x.

Para medidas de “single end-point” de fluorescencia celular se analizó cada muestra de suspensión celular (como anteriormente) con la concentración correspondiente de derivado fluorescente en el citómetro de flujo a 10, 20, 30 y 60 min después de la adición del compuesto. Los datos de fluorescencia se adquirieron de 10.000 células vivas.

Para verificar la especificidad, los efectos colestásicos y como medida de control, la suspensión de hepatocitos se trató con troglitazona (10 μ M concentración final a partir de disolución una madre en DMSO 1 mg/ml), clorpromazina, ciclosporina A, valproato sódico o citrato sódico y se incubó durante 15 min a 37°C. A continuación, la cinética de captación para los derivados de NBD o Dns se determinó tal como en los casos anteriores.

Capítulo 8

Referencias Bibliográficas

- [1] Jenkins, G.; Hardie, L. J. *Bile Acids Toxicology and Bioactivity*. Royal Society of Chemistry: Cambridge. 2008.
- [2] Hofmann, A. F. *News Physiol. Sci.* **1999**, *14*, 24.
- [3] Eggertsen, G.; Olin, M.; Andersson, U.; Ishida, H.; Kubota, S.; Hellman, U.; Okuda, K. I.; Bjorkhem, I. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 32269.
- [4] Cali, J. J.; Russell, D. W. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7774.
- [5] Kullak-Ublick, G. A.; Paumgartner, G.; Berr, F. *Hepatology* **1995**, *21*, 41.
- [6] Solaas, K.; Ulvestad, A.; Soreide, O.; Kase, B. F. *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 1154.
- [7] Nair, P. P.; Kritchevski, D. *The Bile Acid's Chemistry, Physiology and Metabolism*, Vol. 1. Plenum Press: NY. 1971.
- [8] Mazer, N. A.; Carey, M. C.; Kwasnick, R. F.; Benedek, G. B. *Biochemistry* **1979**, *18*, 3064.
- [9] Danielsson, H.; Sjövall, J. *Sterols and Bile Acids*. Elsevier. 1985.
- [10] Esposito, G.; Giglio, E.; Pavel, N. V.; Zanobi, A. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 356.
- [11] Carey, M. C.; Small, D. M. *Am. J. Med.* **1970**, *49*, 590.
- [12] Esumi, K.; Ueno, M. *Structure-Performance Relationships in Surfactants*. Marcel and Dekker: New York. 1997.
- [13] Wiedmann, T. S.; Kamel, L. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1743.
- [14] Schölmerich, J.; Becher, M. S.; Schmidt, K.; Schubert, R.; Kremer, B.; Feldhaus, S.; Gerok, W. *Hepatology* **1984**, *4*, 661.
- [15] Quist, R. G.; Ton-Nu, H. T.; Lillienau, J.; Hofmann, A. F.; Barrett, K. E. *Gastroenterology* **1991**, *101*, 446.
- [16] Roberts, L. R.; Kurosawa, H.; Bronk, S. F.; Fesmier, P. J.; Agellon, L. B.; Leung, W. Y.; Mao, F.; Gores, G. J. *Gastroenterology* **1997**, *113*, 1714.
- [17] Rodrigues, C. M.; Fan, G.; Ma, X.; Kren, B. T.; Steer, C. J. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 2790.
- [18] Arias, I. M.; Boyer, J. L.; Fausto, N.; Jakoby, W. B.; Schachter, D. A.; Shafritz, D. A. *The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press: New York. 1994.
- [19] Schultz, S. G. *Handbook of Physiology*. Md: American Physiological Society: Bethesda. 1989.

- [20] Kast, C.; Stieger, B.; Winterhalter, K. H.; Meier, P. J. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 5179.
- [21] Stieger, B.; Fattinger, K.; Madon, J.; Kullak-Ublick, G. A.; Meier, P. J. *Gastroenterology* **2000**, *118*, 422.
- [22] Gerloff, T.; Stieger, B.; Hagenbuch, B.; Madon, J.; Landmann, L.; Roth, J.; Hofmann, A. F.; Meier, P. J. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 10046.
- [23] Verdake, H. J.; Vonk, J. R.; Kuipers, F. *Hepatology* **1995**, *21*, 1174.
- [24] Paulusma, C. C.; Bosma, P. J.; Zaman, G. J.; Bakker, C. T.; Otter, M.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; Borst, P.; Elferink, R. P. *Science* **1996**, *271*, 1126.
- [25] Buchler, M.; Konig, J.; Brom, M.; Kartenbeck, J.; Spring, H.; Horie, T.; Keppler, D. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15091.
- [26] Ito, K.; Suzuki, H.; Hirohashi, T.; Kume, K.; Shimizu, T.; Sugiyama, Y. *Am. J. Physiol.* **1997**, *272*, G16.
- [27] Nathanson, M. H.; Boyer, J. L. *Hepatology* **1991**, *14*, 551.
- [28] Coleman, R.; Iqbal, S.; Godfrey, P. P.; Billington, D. *Biochem. J.* **1979**, *178*, 201.
- [29] Wirtz, K. W. *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 73.
- [30] Hirohashi, T.; Suzuki, H.; Ito, K.; Ogawa, K.; Kume, K.; Shimizu, T.; Sugiyama, Y. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *53*, 1068.
- [31] de Vree, J. M.; Jacquemin, E.; Sturm, E.; Cresteil, D.; Bosma, P. J.; Aten, J.; Deleuze, J. F.; Desrochers, M.; Burdelski, M.; Bernard, O.; Elferink, R. P.; Hadchouel, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 282.
- [32] Kramer, W.; Girbig, F.; Glombik, H.; Corsiero, D.; Stengelin, S.; Weyland, C. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36020.
- [33] Craddock, A. L.; Love, M. W.; Daniel, R. W.; Kirby, L. C.; Walters, H. C.; Wong, M. H.; Dawson, P. A. *Am. J. Physiol.* **1998**, *274*, G157.
- [34] Gong, Y. Z.; Everett, E. T.; Schwartz, D. A.; Norris, J. S.; Wilson, F. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 4741.
- [35] Toke, O.; Monsey, J. D.; De Koster, G. T.; Tochtrop, G. P.; Tang, C.; Cistola, D. P. *Biochemistry* **2006**, *45*, 727.
- [36] Kramer, W.; Buscher, H. P. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *102*, 1.
- [37] Horie, T.; Mizuma, T.; Kasai, S.; Awazu, S. *Am. J. Physiol.* **1988**, *254*, G465.

- [38] Jacquemin, E.; Hagenbuch, B.; Stieger, B.; Wolkoff, A. W.; Meier, P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 133.
- [39] Kouzuki, H.; Suzuki, H.; Stieger, B.; Meier, P. J.; Sugiyama, Y. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 505.
- [40] Hagenbuch, B.; Meier, P. J. *J. Clin. Invest.* **1994**, *93*, 1326.
- [41] Meier, P. J. *Am. J. Physiol.* **1995**, *269*, G801.
- [42] Reichen, J.; Paumgartner, G. *Am. J. Physiol.* **1976**, *231*, G734.
- [43] Schwarz, L. R.; Burr, R.; Schwenk, M.; Pfaff, E.; Greim, H. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *55*, 617.
- [44] Soroka, C. J.; Lee, J. M.; Azzaroli, F.; Boyer, J. L. *Hepatology* **2001**, *33*, 783.
- [45] Zeng, H.; Liu, G.; Rea, P. A.; Kruh, G. D. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4779.
- [46] Suchy, F. J.; Balistreri, W. F.; Hung, J.; Miller, P.; Garfield, S. A. *Am. J. Physiol.* **1983**, *245*, G681.
- [47] Simion, F. A.; Fleischer, B.; Fleischer, S. *Biochemistry* **1984**, *23*, 6459.
- [48] Takikawa, H.; Sugiyama, Y.; Hanano, M.; Kurita, M.; Yoshida, H.; Sugimoto, T. *J. Clin. Invest.* **1987**, *80*, 861.
- [49] Takikawa, H.; Stolz, A.; Kaplowitz, N. *J. Clin. Invest.* **1987**, *80*, 852.
- [50] Feldman, M.; Scharschmidt, B. F.; Sleisenger, M. H. *Gastrointestinal Disease*. Pa: WB Saunders Co: Philadelphia. 1997.
- [51] Wagner, M.; Zollner, G.; Trauner, M. *J. Hepatol.* **2009**, *51*, 565.
- [52] Geier, A.; Wagner, M.; Dietrich, C. G.; Trauner, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 283.
- [53] Kullak-Ublick, G. A.; Stieger, B.; Meier, P. J. *Gastroenterology* **2004**, *126*, 322.
- [54] Trauner, M.; Meier, P. J.; Boyer, J. L. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 1217.
- [55] Zollner, G.; Fickert, P.; Fuchsbichler, A.; Silbert, D.; Wagner, M.; Arbeiter, S.; Gonzalez, F. J.; Marschall, H.-U.; Zatloukal, K.; Denk, H.; Trauner, M. *J. Hepatol.* **2003**, *39*, 480.
- [56] Zollner, G.; Fickert, P.; Silbert, D.; Fuchsbichler, A.; Marschall, H.-U.; Zatloukal, K.; Denk, H.; Trauner, M. *J. Hepatol.* **2003**, *38*, 717.
- [57] Beuers, U. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **2006**, *3*, 318.
- [58] Paumgartner, G.; Pusl, T. *Clin. Liver Dis.* **2008**, *12*, 53.
- [59] Erlinger, S. *J. Hepatol.* **1997**, *26*, 1.

- [60] Fattinger, K.; Funk, C.; Pantze, M.; Weber, C.; Reichen, J.; Stieger, B.; Meier, P. J. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2001**, *69*, 223.
- [61] Funk, C.; Ponelle, C.; Scheuermann, G.; Pantze, M. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 627.
- [62] Bode, K. A.; Donner, M. G.; Leier, I.; Keppler, D. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 151.
- [63] Smith, A. J.; van Helvoort, A.; van Meer, G.; Szabo, K.; Welker, E.; Szakacs, G.; Varadi, A.; Sarkadi, B.; Borst, P. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23530.
- [64] Marschall, H.-U.; Wagner, M.; Zollner, G.; Trauner, M. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 895.
- [65] Hofmann, A. F. *Arch. Intern. Med.* **1999**, *159*, 2647.
- [66] Hofmann, A. F.; Hagey, L. R. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2461.
- [67] El-Seaidy, A. Z.; Mills, C. O.; Elias, E.; Crawford, J. M. *Am. J. Physiol.* **1997**, *272*, G298.
- [68] Kramer, W.; Wess, G.; Baringhaus, K.-H.; Boeger, G., Enhnen, A.; Falk, E.; Friedrich, M. in *Bile acids in gastroenterology: basic and clinical advances*. Kluwer Academic Publishers: London. 1995.
- [69] Benedetti, A.; Di Sario, A.; Marucci, L.; Svegliati Baroni, G.; Schteingart, C. D.; Ton Nu, H. T.; Hofmann, A. F. *Am. J. Physiol.* **1997**, *272*, G1416.
- [70] Marion, T. L.; Leslie, E. M.; Brouwer, K. L. R. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 911.
- [71] Kemp, D. C.; Zamek-Gliszczynski, M. J.; Brouwer, K. L. R. *Toxicol. Sci.* **2005**, *83*, 207.
- [72] Mita, S.; Suzuki, H.; Akita, H.; Hayashi, H.; Onuki, R.; Hofmann, A. F.; Sugiyama, Y. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 1575.
- [73] Kostrubsky, V. E.; Strom, S. C.; Hanson, J.; Urda, E.; Rose, K.; Burliegh, J.; Zocharski, P.; Cai, H.; Sinclair, J. F.; Sahi, J. *Toxicol. Sci.* **2003**, *76*, 220.
- [74] Lengyel, G.; Veres, Z.; Tugyi, R.; Vereczkey, L.; Molnár, T.; Glavinas, H.; Krajcsi, P.; Jemnitz, K. *Hepatol. Res.* **2008**, *38*, 300.
- [75] Noe, J.; Kullak-Ublick, G. A.; Jochum, W.; Stieger, B.; Kerb, R.; Haberl, M.; Müllhaupt, B.; Meier, P. J.; Pauli-Magnus, C. *J. Hepatol.* **2005**, *43*, 536.
- [76] Horikawa, M.; Kato, Y.; Tyson, C. A.; Sugiyama, Y. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2003**, *18*, 16.

- [77] McRae, M. P.; Lowe, C. M.; Tian, X.; Bourdet, D. L.; Ho, R. H.; Leake, B. F.; Kim, R. B.; Brouwer, K. L. R.; Kashuba, A. D. M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *318*, 1068.
- [78] Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. *Curr. Sci.* **2004**, *87*, 1666.
- [79] Holzinger, F.; Schteingart, C. D.; Ton Nu, H. T.; Eming, S. A.; Monte, M. J.; Hagey, L. R.; Hofmann, A. F. *Hepatology* **1997**, *26*, 1263.
- [80] Holzinger, F.; Schteingart, C. D.; Ton Nu, H. T.; Cerre, C.; Steinbach, J. H.; Yeh, H.-Z.; Hofmann, A. F. *Hepatology* **1998**, *28*, 510.
- [81] Tserng, K.-Y. *J. Lipid Res.* **1978**, *19*, 501.
- [82] Batta, A. K.; Aggarwal, S. K.; Salen, G.; Shefer, S. *J. Lipid Res.* **1991**, *32*, 977.
- [83] Schneider, S.; Schramm, U.; Schreyer, A.; Buscher, H. P.; Gerok, W.; Kurz, G. *J. Lipid Res.* **1991**, *32*, 1755.
- [84] Maglova, L. M.; Jackson, A. M.; Meng, X.-J.; Carruth, M. W.; Schteingart, C. D.; Ton Nu, H. T.; Hofmann, A. F.; Weinman, S. A. *Hepatology* **1995**, *22*, 637.
- [85] Bosca, F.; Encinas, S.; Heelis, P. F.; Miranda, M. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 820.
- [86] Bosca, F.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 637.
- [87] Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A. *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 2277.
- [88] Kosower, N. S.; Kosower, E. M.; Newton, G. L.; Ranney, H. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, *76*, 3382.
- [89] Danielsohn, P.; Nolte, A. *Histochemistry* **1987**, *86*, 281.
- [90] Baba, A.; Yoshioka, T. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3303.
- [91] Tserng, K.-Y.; Hachey, D. L.; Klein, P. D. *J. Lipid Res.* **1977**, *18*, 404.
- [92] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer. 2006.
- [93] Jablonski, A. *Z. Phys.* **1935**, *94*, 38.
- [94] Abdel-Halim, F. M.; Issa, R. M.; El-Ezaby, M. S.; Hasanein, A. A. *Z. Phys. Chemie* **1970**, *73*, 59.
- [95] Sjoeback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. *Spectrochim. Acta A* **1995**, *51*, L7.
- [96] Martin, M. M.; Lindqvist, L. *J. Lumin.* **1975**, *10*, 381.
- [97] Fleming, G. R.; Knight, A. W. E.; Morris, J. M.; Morrison, R. J. S.; Robinson, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4306.

- [98] Magde, D.; Wong, R.; Seybold, P. G. *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 327.
- [99] Alvarez-Pez, J. M.; Ballesteros, L.; Talavera, E.; Yguerabide, J. J. *Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 6320.
- [100] Choi, M. F.; Hawkins, P. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3897.
- [101] Choi, M. F.; Hawkins, P. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1995**, *91*, 881.
- [102] Munkholm, C.; Parkinson, D.-R.; Walt, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2608.
- [103] Förster, T. *Z. Electrochem.* **1950**, *54*, 531.
- [104] Laws, W. R.; Brand, L. *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 795.
- [105] Leonhardt, H.; Gordon, L.; Livingstone, R. *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 245.
- [106] Lee, Y. J.; Notides, A. C.; Tsay, Y.-G.; Kende, A. S. *Biochemistry* **1977**, *16*, 2896.
- [107] Chattopadhyay, A. *Chem. Phys. Lipids* **1990**, *53*, 1.
- [108] Uchiyama, S.; Takechira, K.; Kohtani, S.; Imai, K.; Nakagaki, R.; Tobita, S.; Santa, T. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1067.
- [109] Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Hanbook of Photochemistry*. Marcel Dekker, Inc.: New York. 1993.
- [110] Georganakis, M.; Rosenkranz, H. J.; Schmid, H. *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 819.
- [111] Yavari, I.; Esfandiari, S.; Mostashari, A.; Hunter, P. W. W. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 2880.
- [112] Zanetta, J. P.; Vincendon, G.; Mandel, P.; Gombos, G. *J. Chromatogr.* **1970**, *51*, 441.
- [113] Bosca, F.; Canudas, N.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *71*, 173.
- [114] Naitoh, T.; Yamaoka, T. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **1992**, 663.
- [115] Guy, J.; Caron, K.; Dufresne, S.; Michnick, S. W.; Skene, W. G.; Keillor, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11969.
- [116] Peters, T. *All about Albumin: biochemistry, genetics, and medical application*. Academic Press. 1996.
- [117] Dockal, M.; Carter, D. C.; Rüker, F. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 29303.

- [118] Dubois-Presle, N.; Lapicque, F.; Maurice, M. H.; Fournel-Gigleux, S.; Magdalou, J.; Abiteboul, M.; Siest, G.; Netter, P. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *47*, 647.
- [119] Rainsford, K. D.; Ford, N. L. V.; Brooks, P. M.; Watson, H. M. *Eur. J. Clin. Invest.* **1980**, *10*, 413.
- [120] He, K. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, *358*, 29.
- [121] Kragh-Hansen, U.; Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 695.
- [122] Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11*, 824.
- [123] Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Otagiri, M.; Curry, S. *J. Mol. Biol.* **2005**, *353*, 38.
- [124] Rahman, M. H.; Yamasaki, K.; Shin, Y.-H.; Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **1993**, *16*, 1169.
- [125] Mandula, H.; Parepally, J. M. R.; Feng, R.; Smith, Q. R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *317*, 667.
- [126] Lapicque, F.; Muller, N.; Payan, E.; Dubois-Presle, N. *Clin. Pharmacokinet.* **1993**, *25*, 115.
- [127] Rudman, D.; Kendall, F. E. *J. Clin. Invest.* **1957**, *36*, 538.
- [128] Ceryak, S.; Bouscarel, B.; Fromm, H. *J. Lipid Res.* **1993**, *34*, 1661.
- [129] Roda, A.; Cappelleri, G.; Aldini, R.; Roda, E.; Barbara, L. *J. Lipid Res.* **1982**, *23*, 490.
- [130] Beckett, G. J.; Armstrong, P.; Percy-Robb, I. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *664*, 602.
- [131] Bowmer, C. J.; Donoghue, P. G.; Leong, C. F.; Yates, M. S. *J. Pharm. Pharmacol.* **1985**, *37*, 812.
- [132] Takikawa, H.; Sugiyama, Y.; Hanano, M.; Kurita, M.; Yoshida, H.; Sugimoto, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *926*, 145.
- [133] Farruggia, B.; Garcia, F.; Pico, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1252*, 59.
- [134] Schramm, U.; Dietrich, A.; Schneider, S.; Buscher, H. P.; Gerok, W.; Kurz, G. *J. Lipid Res.* **1991**, *32*, 1769.
- [135] Huang, C. Y. *Meth. Enzymol.* **1982**, *87*, 509.
- [136] Epps, D. E.; Raub, T. J.; Kezdy, F. J. *Anal. Biochem.* **1995**, *227*, 342.
- [137] Sytnik, A.; Litvinyuk, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 12959.
- [138] Ware, W. R. *J. Phys. Chem.* **1962**, *66*, 455.

- [139] Lehrer, S. S. *Biochemistry* **1971**, *10*, 3254.
- [140] Förster, T. *Modern Quantum Chemistry*, Vol. 3. Academic Press: New York. 1996.
- [141] Förster, T. *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, *27*, 7.
- [142] Eaton, D. F. *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 1107.
- [143] Bertucci, C. *Chirality* **2001**, *13*, 372.
- [144] Takikawa, H.; Sekiya, Y.; Yamanaka, M.; Sugiyama, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1244*, 277.
- [145] Jimenez, M. C.; Miranda, M. A.; Vaya, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10134.
- [146] Lhiaubet-Vallet, V.; Sarabia, Z.; Bosca, F.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9538.
- [147] Ruiz, M. L.; Villanueva, S. S.; Luquita, M. G.; Vore, M.; Mottino, A. D.; Catania, V. A. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 1030.
- [148] Elferink, R. P.; Olinga, P.; Draaisma, A. L.; Merema, M. T.; Faber, K. N.; Sloof, J. H.; Meijer, D. K. F.; Groothuis, G. M. M. *Am. J. Physiol.* **2004**, *287*, G1008.
- [149] Liu, X.; LeCluyse, E. L.; Brouwer, K. R.; Gan, L. S.; Lemasters, J. J.; Stieger, B.; Meier, P. J.; Brouwer, K. L. R. *Am. J. Physiol.* **1999**, *277*, G12.
- [150] Bow, D. A. J.; Perry, J. L.; Miller, D. S.; Pritchard, J. B.; Brouwer, K. L. R. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 198.
- [151] Kramer, W.; Stengelin, S.; Baringhaus, K.-H.; Enhnen, A.; Heuer, H.; Becker, W.; Corsiero, D.; Girbig, F.; Noll, R.; Weyland, C. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 1604.
- [152] Kramer, W.; Sauber, K.; Baringhaus, K.-H.; Kurz, M.; Stengelin, S.; Lange, G.; Corsiero, D.; Girbig, F.; König, W.; Weyland, C. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7291.
- [153] Schramm, U.; Fricker, G.; Buscher, H. P.; Gerok, W.; Kurz, G. *J. Lipid Res.* **1993**, *34*, 741.
- [154] Herrera, G.; Diaz, L.; Martinez-Romero, A.; Gomes, A.; Villamon, E.; Callaghan, R. C.; O'Connor, J. E. *Toxicol. in Vitro* **2007**, *21*, 176.
- [155] Garcia-Escarp, M.; Martinez-Munoz, V.; Sales-Pardo, I.; Barquinero, J.; Domingo, J. C.; Marin, P.; Petriz, J. *Cytometry* **2004**, *62A*, 129.

- [156] Juan, G.; Gil-Benso, R.; O'Connor, J.-E.; Callaghan, R. C. *Hepatology* **1996**, *24*, 385.
- [157] Kim, R. B.; Leake, B. F.; Cvetkovic, M.; Roden, M.; Nadeau, J.; Walubo, A.; Wilkinson, G. R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *291*, 1204.
- [158] Tserng, K.-Y.; Klein, P. D. *Steroids* **1977**, *29*, 635.
- [159] Ogamo, A.; Matsuzaki, K.; Uchiyama, H.; Nagasawa, K. *Carbohydr. Res.* **1982**, *105*, 69.
- [160] Zhao, Y.; Zhong, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17894.
- [161] Pore, V. S.; Aher, N. G.; Kumarb, M.; Shukla, P. K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11178.
- [162] Denike, J. K.; Moskova, M.; Zhu, X. X. *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *77*, 261.
- [163] Enhnen, A.; Glombik, H.; Muellner, S. *E.P. Application* **1993**, EP 548793.
- [164] MacLachlan, A. *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 1598.
- [165] Fieser, L. F.; Rajagopalan, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 5530.
- [166] Fieser, L. F.; Rajagopalan, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *53*, 1700.
- [167] Albert, D.; Fiegel, M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 565.
- [168] Jones II, G.; Jackson, W. R.; Choi, C. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 294.
- [169] Valeur, B. *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*. Wiley-VCH: Weinheim. 2002.
- [170] Gomez-Lechon, M. J.; Jover, R.; Donato, T.; Ponsoda, X.; Rodriguez, C.; Stenzel, K. G.; Klocke, R.; Paul, D.; Guillen, I.; Bort, R.; Castell, J. V. *J. Cell. Physiol.* **1998**, *177*, 553.

Conclusiones Generales

Conclusiones

De la presente tesis doctoral, que versa sobre síntesis de derivados fotoactivos de ácidos biliares para aplicaciones biológicas, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los derivados 3 α , 3 β , 7 α y 7 β -amino del ácido cólico se obtienen de forma regio y estereoselectiva a partir del ácido cólico. La conjugación de estos intermedios con distintos fluoróforos: nitrobenzofurazano, dansilo, carprofeno, anhídrido ftálico y bimano da lugar a los correspondientes derivados fluorescentes.
- Las propiedades del estado excitado singlete de los derivados sintetizados depende fuertemente de las características del medio.
- La fluorescencia del derivado de aminofluoresceína disminuye drásticamente en presencia de CO₂.
- El máximo de emisión de los derivados de nitrobenzofurazano y dansilo experimenta un desplazamiento batocrómico, junto con una disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia y del tiempo de vida de singlete, a medida que aumenta la hidrofilia del disolvente.
- El tiempo de vida y el rendimiento cuántico de fluorescencia de los derivados de dansilo disminuyen en presencia de O₂.
- El espectro de fotólisis de destello láser de los derivados de nitrobenzofurazano muestra una banda con un máximo a 390 nm atribuido al triplete y confirmado por transferencia de energía al β -caroteno.
- El espectro de fotólisis de destello láser de los derivados de dansilo muestra una banda con un máximo a 400 nm, correspondiente a un catión radical y proveniente de la desactivación del singlete, cuya formación se favorece en presencia de electrón aceptores como el CCl₄.

- La interacción entre los derivados de cólico-nitrobenzofurazano y albúmina sérica humana da lugar a la formación de los correspondientes complejos, con estequiometría 1:1. Las constantes de asociación determinadas en base a medidas tanto de absorción como de emisión, son del orden de 10^4 M^{-1} . Mediante experimentos de desplazamiento se confirma que estos compuestos ocupan el sitio 1 de HSA. El fluoróforo no es determinante del sitio de unión, ya que el compuesto modelo muestra afinidad por el sitio 2. Por todo ello son buenos análogos fluorescentes del ácido cólico natural.
- Los C-7 derivados cólico-dansilo se comportan de la misma manera que los compuestos de nitrobenzofurazano. En cambio, los C-3 derivados de dansilo muestran afinidad por ambos sitios, pero mayoritariamente por el sitio 2. Por ello resultan una buena aproximación de otro ácido biliar natural, el ácido litocólico, como se demuestra por experimentos de desplazamiento.
- Mediante la técnica de citometría de flujo se demuestra que los derivados de nitrobenzofurazano y dansilo son captados específicamente por hepatocitos en suspensión, siendo más eficientes los 3α -derivados en ambos casos. La inhibición de la captación de 3α -NBD-ChA por troglitazona, clorpromazina, ciclosporina A y valproato sódico guarda una relación directa con el potencial colestásico *in vivo* de estos fármacos.

Conclusions

From this doctoral thesis, which deals with the synthesis of photoactive bile acid derivatives for biological applications, the following conclusions can be drawn:

- 3α , 3β , 7α and 7β -aminocholic acid derivatives are regio and stereoselectively obtained, starting from cholic acid. Conjugation of these intermediates with different fluorophores, namely nitrobenzofurazan, dansyl, carprofen, phthalic anhydride and bimane, gives the corresponding fluorescent derivatives.
- Singlet excited state properties of the synthesized derivatives are strongly dependent on the characteristics of the media.
- Fluorescence of the aminofluorescein derivatives decreases dramatically in the presence of CO_2 .
- Emission maxima of the nitrobenzofurazan and dansyl derivatives experiment a bathochromic shift, as well as a decrease of the fluorescence quantum yields and fluorescence lifetimes, with increasing solvent hydrophilicity.
- Fluorescence lifetime and quantum yield of the dansyl derivatives decrease in the presence of O_2 .
- Laser flash photolysis spectra of the nitrobenzofurazan derivatives show transient absorption maxima at 390 nm, attributed to the triplet excited state and confirmed by energy transfer to β -carotene.
- Laser flash photolysis spectra of the dansyl derivatives show bands with maxima at 400 nm, corresponding to the radical cation, arising from the singlet excited state, whose formation is favored in the presence of an electron acceptor as CCl_4 .
- The interaction between cholic-nitrobenzofurazan derivatives and human serum albumin leads to formation of the corresponding complexes with 1:1 stoichiometry. The binding constants determined by means of the absorption or fluorescence measurements are in the order of 10^4 M^{-1} . Displacement experiments confirm site 1

occupancy within HSA. The fluorophore is not determinant of the binding site, since a simple model compound shows affinity to HSA at site 2. Hence these compounds are convenient analogs of natural cholic acid.

- The C-7 cholic-dansyl derivatives show a similar behavior as the nitrobenzofurazan family. However, the C-3 dansyl regioisomers show affinity to both binding sites, but mainly to site 2. For this reason, they are appropriate analogs of other natural bile acid, lithocholic acid, as demonstrated by displacement experiments.

- By means of the flow cytometry technique, specific uptake of the nitrobenzofurazan and dansyl derivatives by suspended hepatocytes has been demonstrated, the 3α -derivatives being the most efficient, in both cases. Inhibition of the 3α -NBD-ChA uptake of by troglitazone, chlorpromazine, cyclosporine A and sodium valproate is in good agreement with the *in vivo* cholestatic potential of these drugs.

Resúmenes

Resumen

Los ácidos biliares son esteroides biosintetizados en el hígado que actúan como tensoactivos, formando micelas mixtas con colesterol y otros lípidos para facilitar su digestión. Con este fin, los ácidos biliares viajan hasta el intestino, donde se separan de los lípidos ingeridos y vuelven al hígado para ser reutilizados en un movimiento conocido como circulación enterohepática. El ácido biliar más abundante es el ácido cólico, seguido por desoxicólico y quenodesoxicólico. Se encuentran mayoritariamente conjugados con glicina o taurina y así incrementan su solubilidad en agua a pH fisiológico. La circulación enterohepática es un proceso muy complejo en el que no todas las etapas están perfectamente entendidas. Además pueden suceder alteraciones y como consecuencia, problemas de toxicidad, ya que los ácidos biliares en concentraciones muy altas son citotóxicos. Una de estas alteraciones es la colestasis, que comprende todas las situaciones en las cuales existe una alteración en el flujo normal de la bilis desde el polo canalicular del hepatocito hasta el duodeno. La colestasis puede estar inducida por fármacos, lo que usualmente implica su retirada del mercado.

En la presente tesis doctoral se planteó preparar derivados fotoactivos de ácidos biliares para estudiar varios aspectos relacionados con la circulación enterohepática, en concreto para estudiar las interacciones con albúmina sérica humana, el transportador mayoritario de los ácidos biliares en la última etapa de la circulación enterohepática; y por otra parte estudiar el comportamiento de los ácidos biliares con modelos celulares para detectar efectos colestásicos de fármacos.

En primer lugar se optimizaron las rutas sintéticas que permitieron obtener regio- y estereoselectivamente amino derivados de ácido cólico en las posiciones 3α , 3β , 7α o 7β . Estos intermedios resultaron muy versátiles, ya que pudieron ser conjugados con fluoróforos como nitrobenzofurazano, dansilo, carprofeno, aminoftalimida y bimano. Se utilizó también la aminofluoresceína, que se unió por el grupo carboxílico del ácido cólico. Además, se prepararon dos compuestos modelo más sencillos con los fluoróforos aminofluoresceína y nitrobenzofurazano. Por último, también se prepararon dos derivados fluorescentes de otros ácidos biliares, el taurocolato y el ácido litocólico, con el fluoróforo nitrobenzofurazano.

A continuación, se estudiaron sus propiedades fotofísicas. Así, los derivados de aminofluoresceína mostraron una gran dependencia del pH. Se observó absorción en la zona visible y fluorescencia verde, con un rendimiento cuántico muy alto. Se mostraron eficientes como sondas de CO_2 y se observó la formación del estado excitado triplete con un máximo a 540 nm. Los derivados de nitrobenzofurazano absorbieron en la zona visible y exhibieron fluorescencia verde, con un rendimiento cuántico elevado. Estas características se vieron influenciadas por la naturaleza del medio, ya que en disolventes más hidrofílicos se observó un desplazamiento de los máximos de absorción y emisión hacia el rojo y una disminución tanto del rendimiento cuántico como del tiempo de vida de singlete. Por primera vez, ha sido observado y caracterizado su estado excitado triplete con un máximo a 390 nm, confirmado por experimentos de transferencia de energía al β -caroteno. Los derivados de dansilo mostraron absorción en la zona UV y fluorescencia verde. Su emisión fue influenciada por la hidrofobicidad de disolvente, efecto que se manifestó en un desplazamiento hacia el rojo con disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia y del tiempo de vida en disolventes más hidrofílicos. La presencia de oxígeno causó una disminución de la emisión y acortamiento del tiempo de vida, un proceso controlado por difusión. El espectro de absorción transitoria mediante fotólisis de destello láser mostró una banda con un máximo a 400 nm, que se asignó a un catión radical de dansilo en base a que no se desactivaba por oxígeno y a que su formación se favorecía en presencia de un buen electrón aceptor, el CCl_4 . Mediante medidas de fluorescencia en presencia de CCl_4 se confirmó que el catión radical se formaba a partir del singlete. Por último, el estudio del resto de los derivados fotoactivos de ácido cólico se limitó a sus propiedades fotofísicas del estado singlete más importantes.

Las interacciones de los derivados de nitrobenzofurazano con albúmina sérica humana, estudiadas por absorción y fluorescencia, demostraron que se formaban complejos de estequiometría 1:1. Los cambios en absorción y emisión debidos a la presencia de HSA permitieron calcular las constantes de asociación para los complejos formados (del orden de 10^4 M^{-1}). Por otra parte, gracias a la transferencia de energía observada entre el triptófano de HSA y el nitrobenzofurazano de los derivados se pudieron calcular las distancias entre ambos en los complejos (27 - 30 Å). Finalmente, mediante experimentos de

desplazamiento con sondas específicas, se comprobó que el sitio de unión para estos derivados era el sitio 1. Experimentos adicionales con un compuesto modelo conteniendo el fluoróforo permitieron concluir que la preferencia de los derivados de ácidos biliares por el sitio 1 era debida al esqueleto de esteroide. La emisión y tiempos de vida de fluorescencia de los derivados de dansilo aumentaba en presencia de HSA, lo que permitió de nuevo calcular las constantes de asociación y distribución en la HSA para los complejos formados Dns-ChA@HSA, donde los derivados C-3 presentaban dos constantes de afinidad del orden de ca. 10^5 y 10^4 M^{-1} , mientras que los derivados C-7 una sola constante del orden de 10^4 M^{-1} . Gracias a la transferencia de energía observada entre el triptófano de HSA y el fluoróforo Dns, asumiendo un mecanismo de Förster, se pudieron estimar las distancias entre ambos, que fueron 21 - 25 Å. Experimentos adicionales de desplazamiento, utilizando sondas específicas manifestaron ocupación mayoritaria del sitio 2 por los derivados C-3, mientras que los derivados C-7 se comportaron como los derivados de nitrobenzofurazano, es decir mostraron afinidad al sitio 1. Finalmente, en experimentos de desplazamiento por dos ácidos biliares naturales, se confirmó la afinidad del ácido litocólico por el sitio 2. A partir de estos resultados se puede concluir que los derivados C-3 son análogos fluorescentes del ácido litocólico y los C-7 análogos del ácido cólico natural.

Se estudió la captación de algunos derivados fluorescentes de ácido cólico por suspensiones de hepatocitos, utilizando la técnica de citometría de flujo. Primero, se demostró que CamF fue captado específicamente por los hepatocitos vivos más lentamente que por las células muertas y que esta captación dependía de la concentración. Estos experimentos permitieron poner a punto la técnica y optimizar las condiciones experimentales para otros estudios más detallados. A continuación se estudiaron las cinéticas de transporte de los derivados de nitrobenzofurazano que mostraron ser captados específicamente por los hepatocitos vivos, siendo 3α -NBD-ChA el derivado más eficiente. Se detectó y cuantificó el incremento de fluorescencia correspondiente al fluoróforo dentro de las células vivas; esta técnica se pudo extender a la detección y cuantificación de los efectos de inhibición por fármacos colestásicos. Se observó una inhibición en la captación de 3α -NBD-ChA por troglitazona, clorpromazina, ciclosporina A y valproato sódico, en buena correlación con su potencial colestásico *in vivo*. Finalmente, los derivados de dansilo en ensayos citométricos se comportaron de

manera análoga, siendo 3α -Dns-ChA el derivado el más eficiente en la captación por los hepatocitos; de nuevo se observó el efecto inhibidor de troglitazona para los cuatro derivados.

Resum

Els àcids biliars són esteroides biosintetitzats en el fetge que actuen com a tensioactius, formant micel·les mixtes amb colesterol i altres lípids per tal de facilitar la seva digestió. Amb aquesta finalitat, els àcids biliars viatgen fins a l'intestí, i allà se separen dels lípids ingerits i tornen al fetge per tal de ser reutilitzats en un moviment conegut com a circulació enterohepàtica. L'àcid biliar més abundant és l'àcid còlic, seguit del desoxicòlic i el quenodesoxicòlic. Tots aquests es troben majoritàriament conjugats amb glicina o taurina i d'aquesta manera incrementen la seva solubilitat en aigua a pH fisiològic. La circulació enterohepàtica és un procés molt complex en el qual no totes les etapes són perfectament enteses. A més, poden tenir lloc alteracions i, com a conseqüència d'aquestes, problemes de toxicitat, ja que els àcids biliars són citotòxics a concentracions molt altes. Una de les alteracions més rellevants és la colèstasi, que comprén totes les situacions en les quals existeix una alteració del flux normal de la bilis des del pol canalicular de l'hepatocit fins al duodè. La colèstasi pot estar induïda per fàrmacs, i això usualment implica la retirada del mercat d'aquests.

En la present tesi doctoral es planteja, d'una banda, preparar derivats fotactius d'àcids biliars per tal d'estudiar diversos aspectes relacionats amb la circulació enterohepàtica, concretament les interaccions amb albúmina sèrica humana, que és el transportador majoritari dels àcids biliars en l'última etapa de la circulació enterohepàtica; i, d'una altra, estudiar el comportament d'aquests amb models cel·lulars i així detectar efectes colestàsics de fàrmacs.

Per fer això, en primer lloc s'optimitzaren les rutes sintètiques que permeteren obtindre regioselectivament i estereoselectivament aminoderivats d'àcid còlic en les posicions 3α , 3β , 7α i 7β . Aquests intermedis resultaren ser molt versàtils, ja que pogueren ser conjugats amb fluoròfors com nitrobenzofurazà, dansil, carprofè, aminoftalimida i bimà. S'utilitzà també l'aminofluoresceïna, la qual s'uní pel grup carboxílic de l'àcid còlic. A més, es prepararen dos compostos model més senzills amb els fluoròfors aminofluoresceïna i nitrobenzofurà. Per últim, també es prepararen dos derivats fluorescents d'altres àcids biliars: el taurocolat i l'àcid litocòlic amb el fluoròfor nitrobenzofurà.

A continuació s'estudiaren les propietats fotofísiques d'aquests compostos. Així, els derivats d'aminofluoresceïna mostraren una gran dependència del pH. S'observà que presentaven absorció en la zona visible i fluorescència verda, amb

un rendiment quàntic molt alt. Es mostraren eficients com a sondes de CO₂ en EtOH. A més, s'observà la formació de l'estat excitat triplet amb un màxim a 540 nm. Els derivats de nitrobenzofurazà absorbiren en la zona del visible i exhibiren fluorescència verda, amb un rendiment quàntic elevat. Aquestes característiques es veieren influenciades per la naturalesa del medi, ja que en dissolvents més hidrofílics s'observà un desplaçament dels màxims d'absorció i emissió cap al roig i una disminució tant del rendiment quàntic com del temps de vida del singlet. Per primera vegada, ha estat observat i caracteritzat l'estat excitat triplet d'aquests compostos amb un màxim a 390 nm, confirmat per experiments de transferència d'energia al b-carotè. Els derivats de dansil mostraren absorció en la zona ultraviolada i fluorescència verda. La seva emissió fou influenciada per la hidrofobicitat del dissolvent, efecte que es manifestà en un desplaçament cap al roig i amb una disminució del rendiment quàntic de fluorescència i del temps de vida en dissolvents més hidrofílics. La presència d'oxigen causà una disminució de l'emissió i un acurtament del temps de vida, un procés controlat per difusió. L'espectre d'absorció transitòria obtingut mitjançant fotòlisi de flaix làser mostrà una banda amb un màxim a 400 nm, que s'assignà a un catió radical del dansil ja que no es desactivava per oxigen i que la seva formació s'afavoria en presència d'un bon acceptor d'electrons, el CCl₄. Mitjançant mesures de fluorescència en presència de CCl₄, es confirmà que el catió radical es formava a partir del singlet. Per últim, pel que fa a la resta dels derivats fotoactius d'àcid còlic, només s'estudiaren les propietats fotofísiques més importants del seu estat singlet.

Les interaccions dels derivats de nitrobenzofurazà amb albúmina sèrica humana estudiades per absorció i fluorescència, demostraren que es formaven complexos d'estequiometria 1:1. Els canvis en l'absorció i l'emissió deguts a la presència de l'HSA permeteren calcular les constants d'associació per als complexos formats (que eren de l'ordre de 10⁴ M⁻¹). D'altra banda, gràcies a la transferència d'energia observada entre el triptòfan de l'HSA i el nitrobenzofurazà dels derivats, es pogueren calcular les distàncies entre ambdós en els complexos (27 - 30 Å). Finalment, mitjançant experiments de desplaçament amb sondes específiques, es comprovà que el lloc d'unió per a aquests derivats era el lloc 1. Experiments addicionals amb un compost model contenint el fluoròfor, permeteren concloure que la preferència dels derivats d'àcids biliars pel lloc 1 era deguda a l'esquelet esteroide. L'emissió i temps de vida de fluorescència dels derivats de

dansil augmentava en presència d'HSA, el que va permetre de nou calcular les constants d'associació i distribució en l'HSA per als complexos formats Dns-ChA@HSA, on els derivats C-3 presentaven dos constants d'afinitat de l'ordre de ca. 10^5 i 10^4 M⁻¹, mentre que els derivats C-7 presentaven una sola constant de l'ordre de 10^4 M⁻¹. Gràcies a la transferència d'energia observada entre el triptòfan de l'HSA i el fluoròfor Dns, assumint un mecanisme de Förster, s'estimaren les distàncies entre ambdós que foren 21 - 25 Å. Experiments addicionals de desplaçament utilitzant sondes específiques, manifestaren una ocupació majoritària del lloc 2 pels derivats C-3, mentre que els derivats C-7 es comportaren com els derivats de nitrobenzofurazà, es a dir, mostraren afinitat pel lloc 1. Finalment, en experiments de desplaçaments per dos àcids biliars naturals, es confirmà l'afinitat de l'àcid litocòlic pel lloc 2. A partir d'estos resultats es pot concloure que els derivats C-3 son anàlegs fluorescents de l'àcid litocòlic i els C-7 anàlegs de l'àcid còlic natural.

S'estudià també la captació d'alguns derivats fluorescents d'àcid còlic per suspensions d'hepatocits, utilitzant la tècnica de citometria de flux. Primer es demostrà que CamF fou captat específicament pels hepatocits vius més lentament que per les cèl·lules mortes i que aquesta captació depenia de la concentració. Aquests experiments permeteren posar a punt la tècnica i optimitzar les condicions experimentals per a altres estudis més detallats. A continuació s'estudiaren les cinètiques de transport dels derivats de nitrobenzofurazà, que mostraren ser captats específicament pels hepatocits vius. El derivat 3 α -NBD-ChA resultà ser el més eficient. Es detectà i quantificà l'increment de fluorescència corresponent al fluoròfor dins de les cèl·lules vives; aquesta tècnica es pogué estendre a la detecció i quantificació dels efectes d'inhibició per fàrmacs colestàsics. S'observà una inhibició en la captació de 3 α -NBD-ChA per troglitazona, clorpromazina, ciclosporina A i valproat sòdic en bona correlació amb el seu potencial colestàsic *in vivo*. Finalment, els derivats de dansil aplicats per a assajos citomètrics es comportaren de manera anàloga. El derivat el 3 α -Dns-ChA resultà ser més eficient en la captació pels hepatocits. S'observà de nou l'efecte inhibidor de troglitazona per als quatre derivats.

Summary

Bile acids are steroidal tensoactives biosynthesized in the liver, which form mixed micelles with cholesterol and other lipids to enable their digestion. Bile acids travel to the intestine, where they separate from the ingested lipids and return to the liver to be reused, in a movement known as enterohepatic circulation. The most abundant bile acid is cholic acid, followed by deoxycholic and chenodeoxycholic acids. They are mostly found conjugated with glycine or taurine, to increase their solubility in water at physiological pH. The enterohepatic circulation is a very complex process in which not all the steps are completely understood; moreover, its alterations may lead to toxicity problems, since bile acids are cytotoxic at high concentrations. One of the most relevant types of hepatotoxicity is cholestasis, which refers to any alteration of the normal bile flow from canaliculus to the duodenum. Cholestasis may be induced by drugs; this is an undesired side effect that may result in drug withdrawal from the market.

The goal of the present doctoral thesis was the synthesis of photoactive bile acid derivatives that could help to investigate key aspects of enterohepatic circulation, specifically the interactions with human serum albumin, the major bile acid carrier in the last step of the cycle. On the other hand, such photoactive derivatives could be used to study the behavior of bile acids in cellular models, to detect potential drug cholestatic effects.

In a first stage, optimization of the synthetic sequences provided 3α , 3β , 7α or 7β -amino derivatives of cholic acid, with remarkable regio- and stereoselectivity. These versatile intermediates were conjugated with different fluorophores, such as nitrobenzofurazane, dansyl, carprofen, aminophthalimide and bimeane. Aminofluorescein was also covalently linked to the bile acid skeleton through the carboxylic group. Furthermore, two simple model cyclohexane-derived compounds bearing aminofluorescein or nitrobenzofurazane were synthesized for comparison. Finally, two fluorescent nitrobenzofurazan derivatives of taurocholate and lithocholic acid, were also prepared.

Next, the photophysical properties of the synthetic compounds were examined. Thus, aminofluorescein derivatives showed strong pH dependence; they exhibited absorption in the visible region as well as green fluorescence, with high quantum yield. Moreover, they behaved as probes to detect CO_2 and formation of the triplet excited state with a maximum at 540 nm was observed. The

nitrobenzofurazan derivatives also displayed absorption in the visible region and exhibited green fluorescence with high quantum yield. These characteristics were affected by the nature of the medium, as indicated by the redshift observed for the absorption and emission maxima in more hydrophilic solvents, together with the decrease in fluorescence quantum yields and lifetimes. For the first time, the triplet excited state with maximum at ca. 390 nm has been detected. The assignment of this transient was confirmed by means of energy transfer experiments, using β -carotene as acceptor. The dansyl derivatives showed UV light absorption and green fluorescence. Their emission was also affected by solvent hydrophobicity, with similar results as above. The presence of oxygen caused a decrease in the fluorescence intensity and lifetime, with diffusion-controlled quenching rate constants. The transient absorption spectra obtained by means of laser flash photolysis showed a band with maximum at 400 nm, which was assigned to dansyl radical cation, since it remained unchanged in the presence of oxygen and was enhanced in the presence of CCl_4 , a good electron acceptor. Fluorescence measurements in the presence of CCl_4 are consistent with formation of the radical cation from the singlet excited state. Finally, only the most important photophysical properties of singlet excited state were established for the rest of the fluorescent bile acid derivatives synthesized.

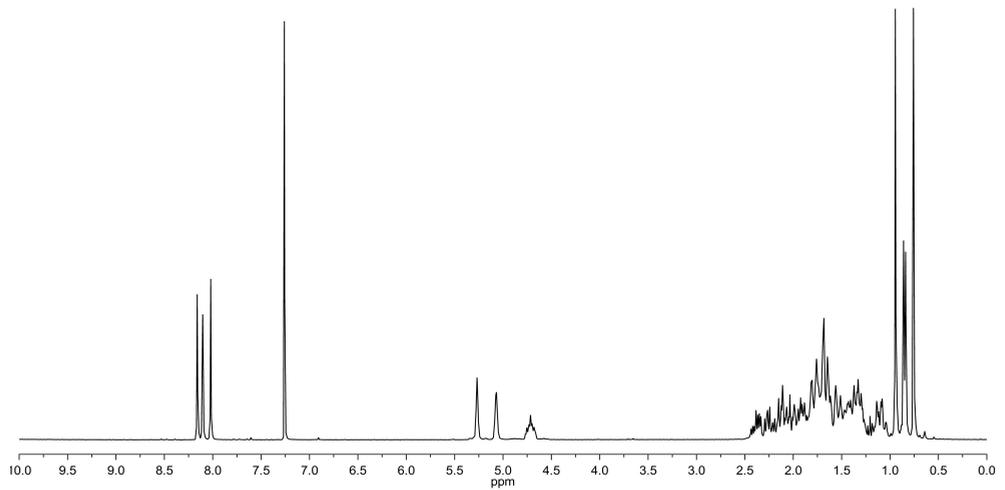
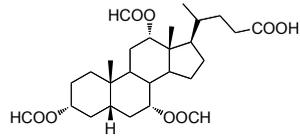
Interactions of the nitrobenzofurazan derivatives with human serum albumin were investigated by means of absorbance and fluorescence measurements; they demonstrated formation of 1:1 complexes. Absorption and emission changes associated with the presence of HSA were used to determine the binding constants for complex formation (in the order of 10^4 M^{-1}). On the other hand, the observed energy transfer from tryptophan (in HSA) to the nitrobenzofurazan fluorophore led to an estimation of 27 - 30 Å for the donor-acceptor distance in the complexes. Finally, site assignment was unambiguously achieved by displacement experiments, using selective binding probes. It was confirmed that these derivatives bind to HSA at site 1. Additional experiments with the model compound lacking the steroidal skeleton, which was found to bind at site 2 of HSA, concluded that selective binding of the bile acid derivatives to site 1 of HSA is the result of specific recognition of the steroidal skeleton. The emission and fluorescence lifetime of the dansyl family increase in the presence of HSA, that allowed again to calculate the binding constants and distribution within HSA for the

corresponding complexes Dns-ChA@HSA. For the C-3 derivatives two binding constants in the order *ca.* 10^5 y 10^4 M⁻¹ were calculated, while for the C-7 derivatives only one in the order *ca.* 10^4 M⁻¹. The observed energy transfer from HSA tryptophan to dansyl fluorophore by a Förster mechanism allowed to estimate the distance, 21 - 25 Å. The C-3 derivatives show major affinity to site 2 while the C-7 derivatives behave as the NBD derivatives, binding to the site 1. Finally, displacement experiments with natural bile acids confirmed analogy of the C-3 derivatives to lithocholic acid while the C-7 derivatives behaved as analogues of cholic acid.

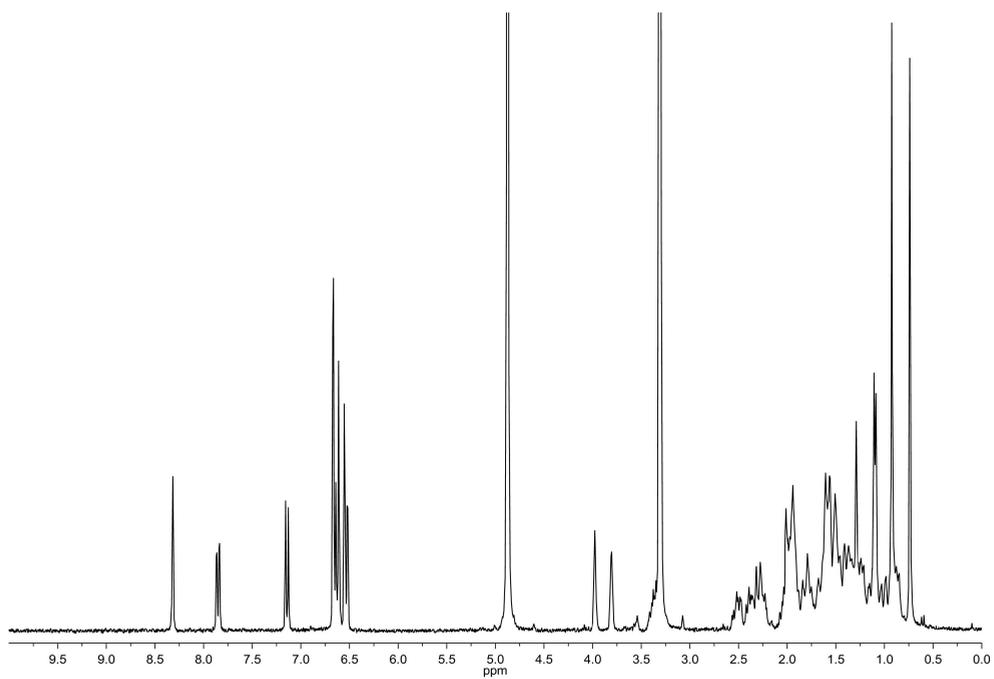
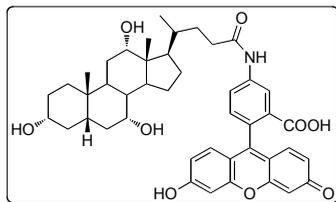
The uptake of several fluorescent cholic acid derivatives by suspended hepatocytes was examined using flow cytometry technique. Thus, specific uptake of cholylamidofluorescein by living hepatocytes was observed; it was discriminated from the faster nonspecific uptake by dead cells and was found to be concentration dependent. These preliminary experiments were used to adjust the technique and to optimize experimental conditions for further investigations. Next, studies on the transport kinetics of the nitrobenzofurazan derivatives showed specific uptake by living hepatocytes, with the 3 α -derivative being the most efficient. The enhanced fluorescence corresponding to the fluorophore within living cells was monitored and quantified, in order to develop a methodology capable of detecting uptake inhibition by cholestatic drugs. The results obtained with the 3 α -NBD-ChA in the presence of troglitazone, chlorpromazine, cyclosporine A and sodium valproate were in good agreement with the *in vivo* cholestatic effects. Finally, the dansyl derivatives showed a similar behavior in flow cytometric experiments, with the 3 α -derivative being more efficiently uptaken by the hepatocytes. Again, the inhibitory effect of troglitazone was observed in the case of the four dansyl derivatives.

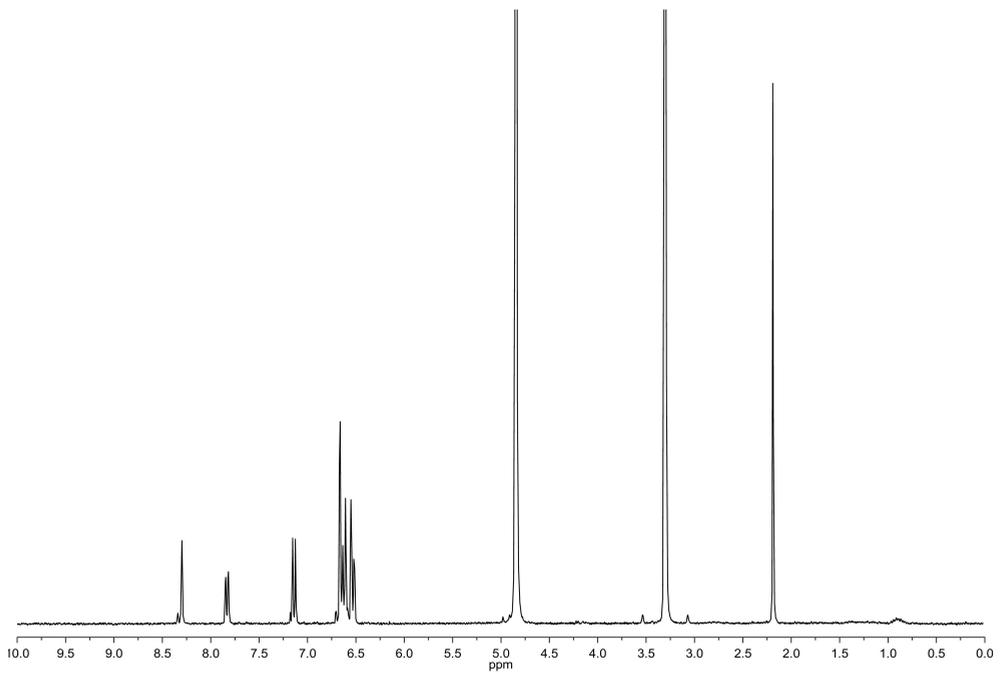
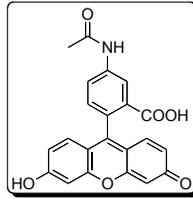
Anexo I

Espectros de ^1H RMN

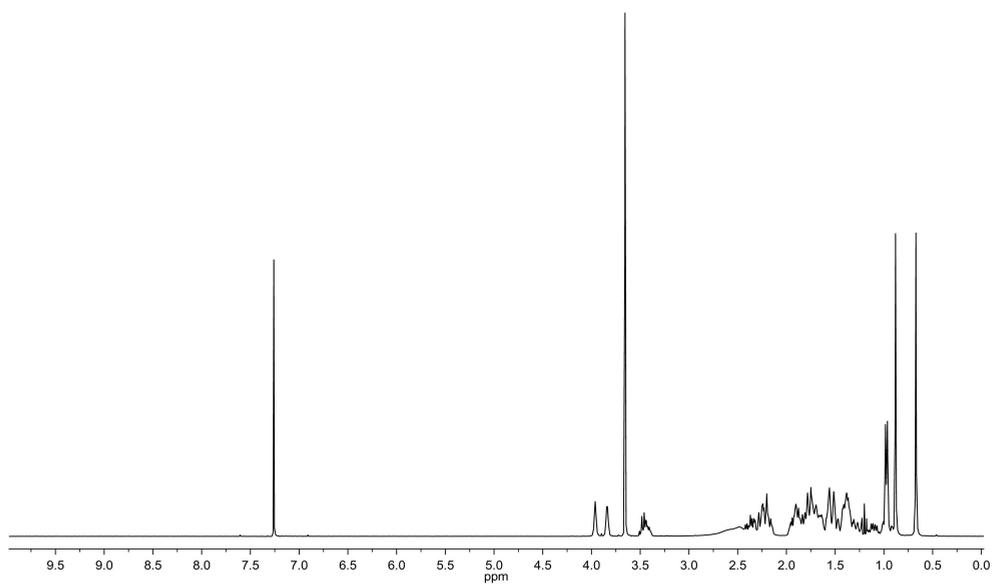
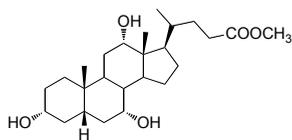
^1H RMN de **FormChA**

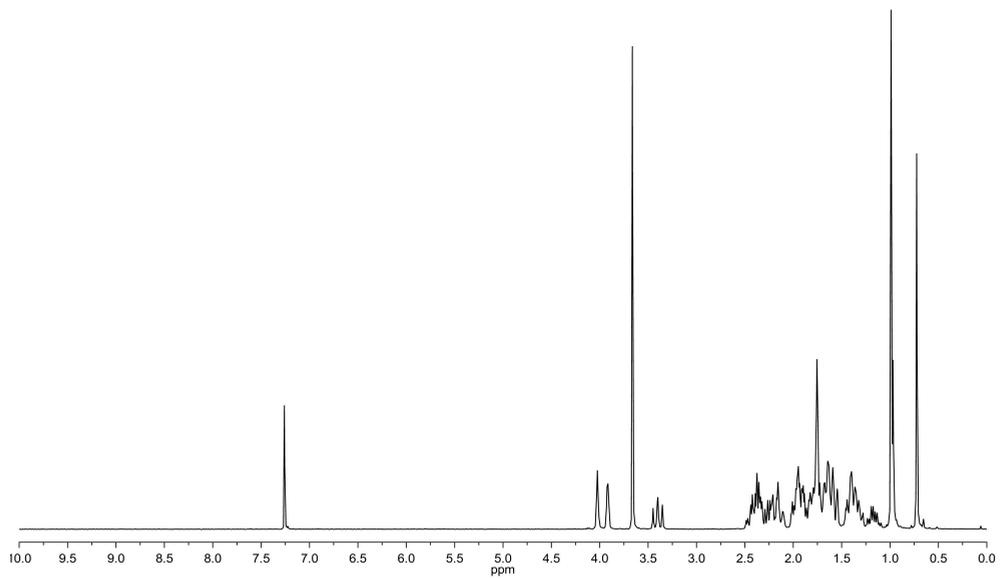
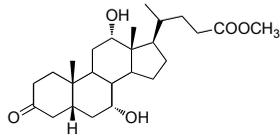
^1H RMN de CamF



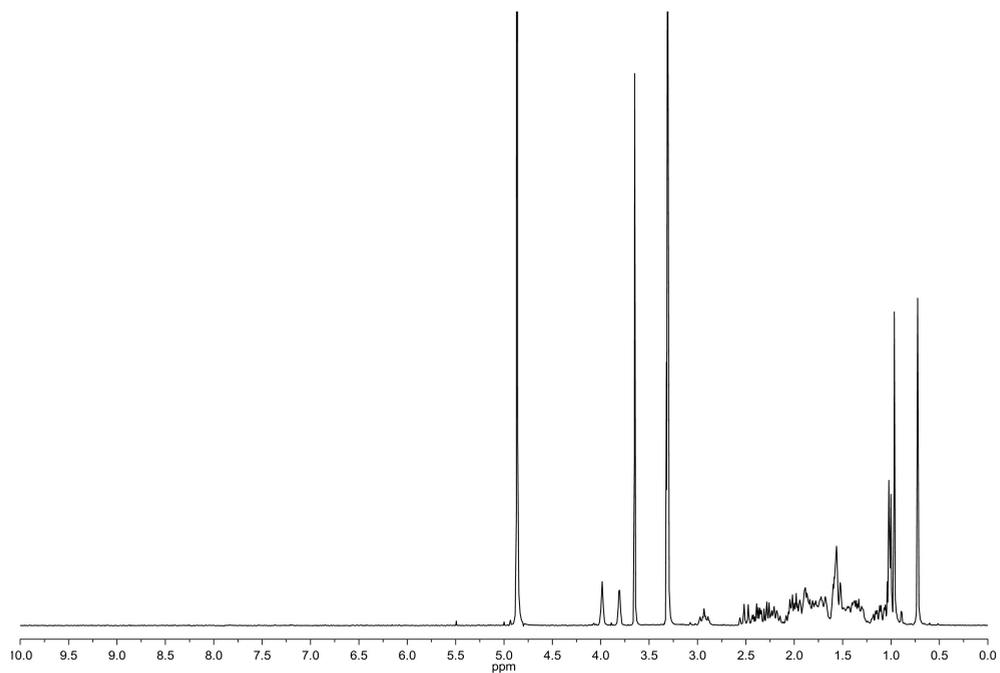
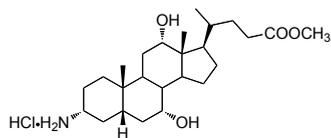
^1H RMN de AcF

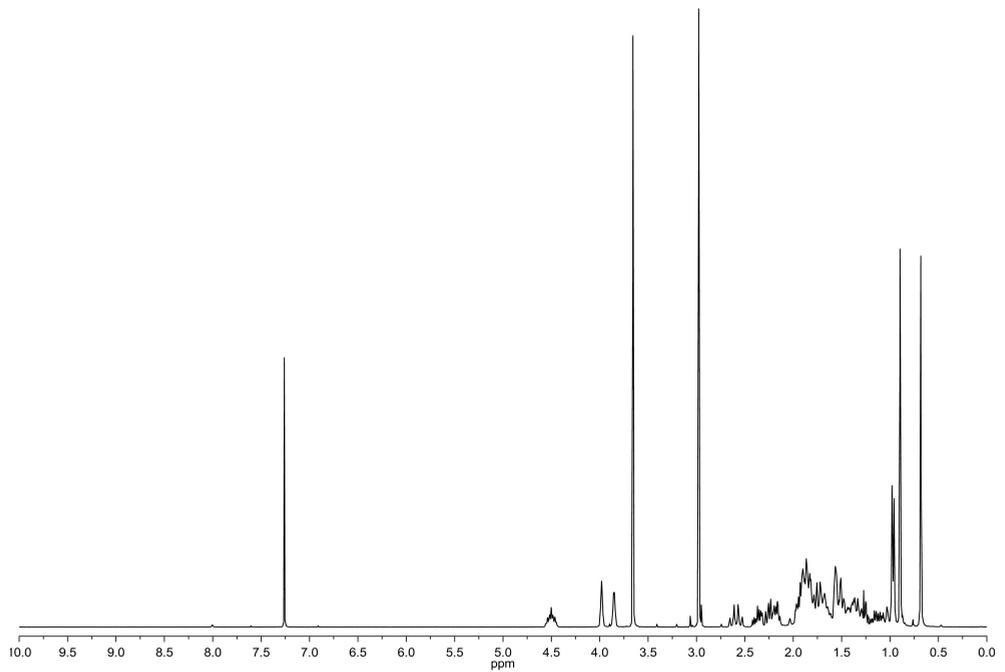
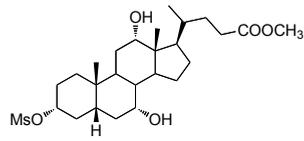
^1H RMN de ChMe



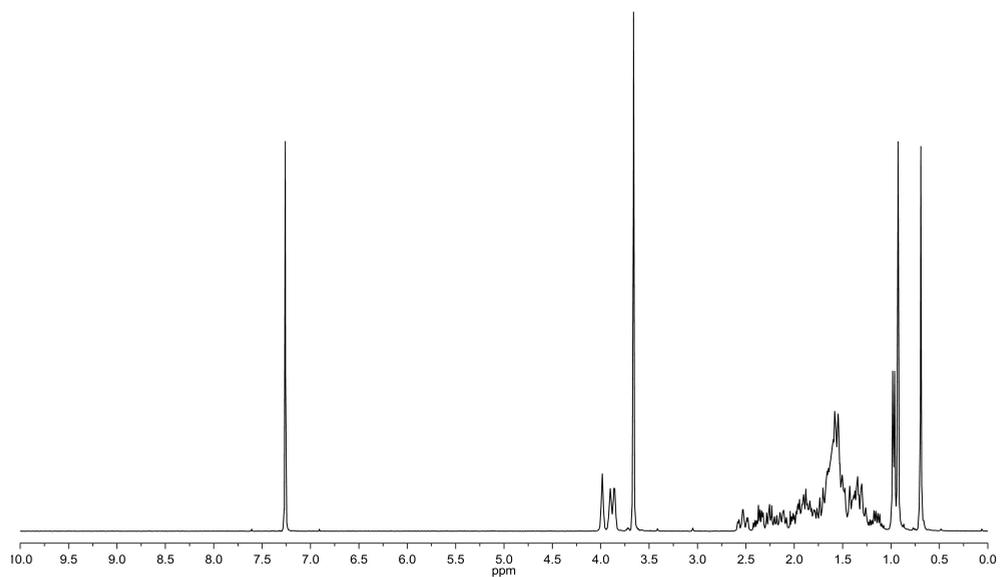
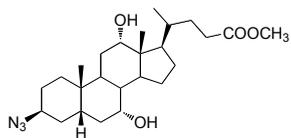
^1H RMN de 3[O]ChMe

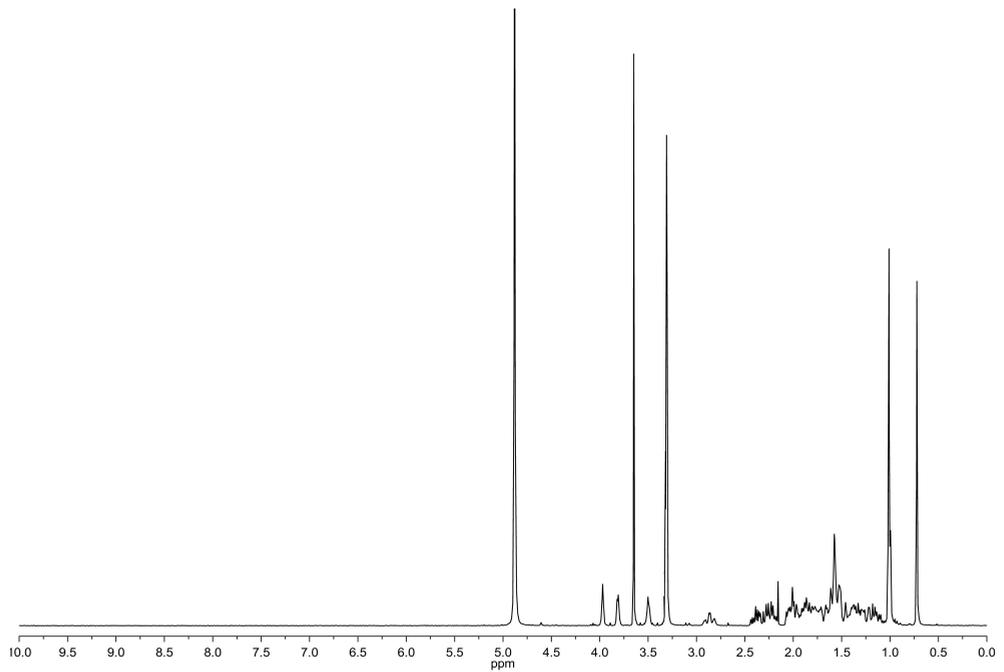
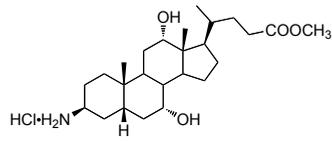
^1H RMN de $3\alpha\text{-NH}_2\text{-ChMe}\cdot\text{HCl}$



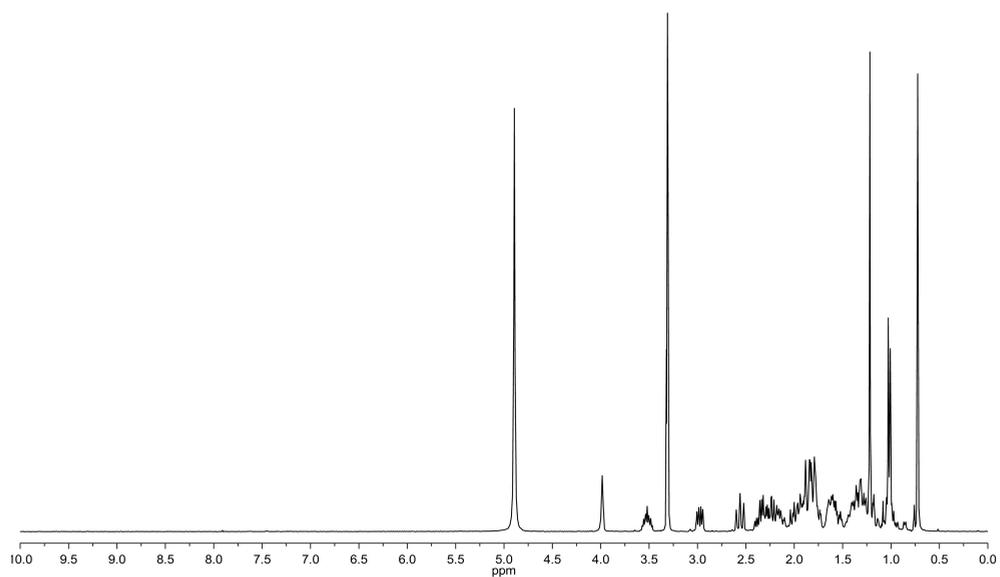
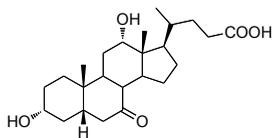
^1H RMN de **3 α -Ms-ChMe**

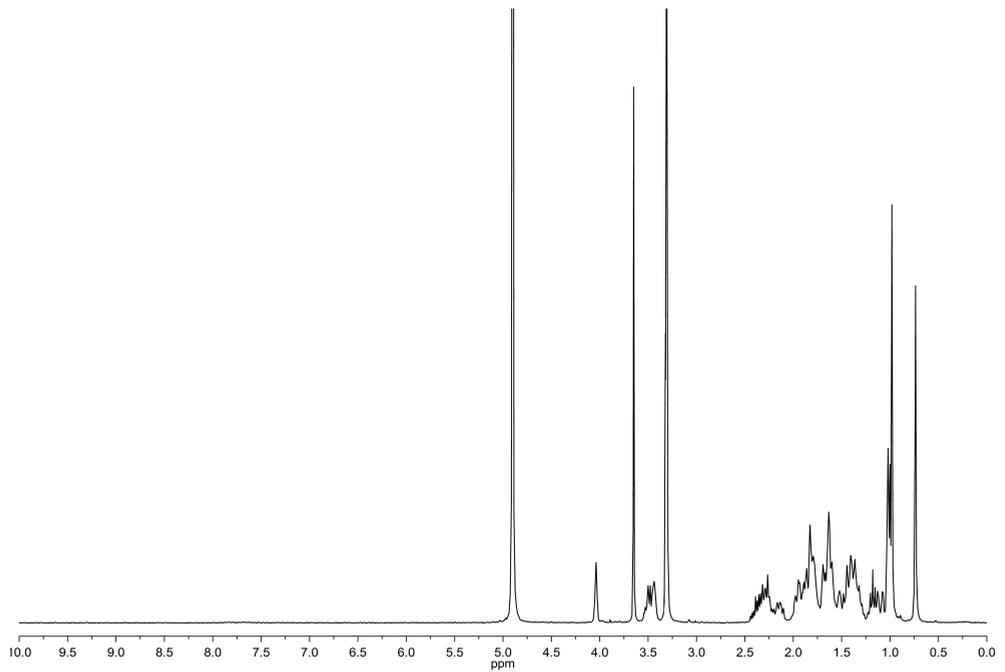
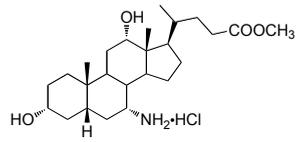
^1H RMN de $3\beta\text{-N}_3\text{-ChMe}$



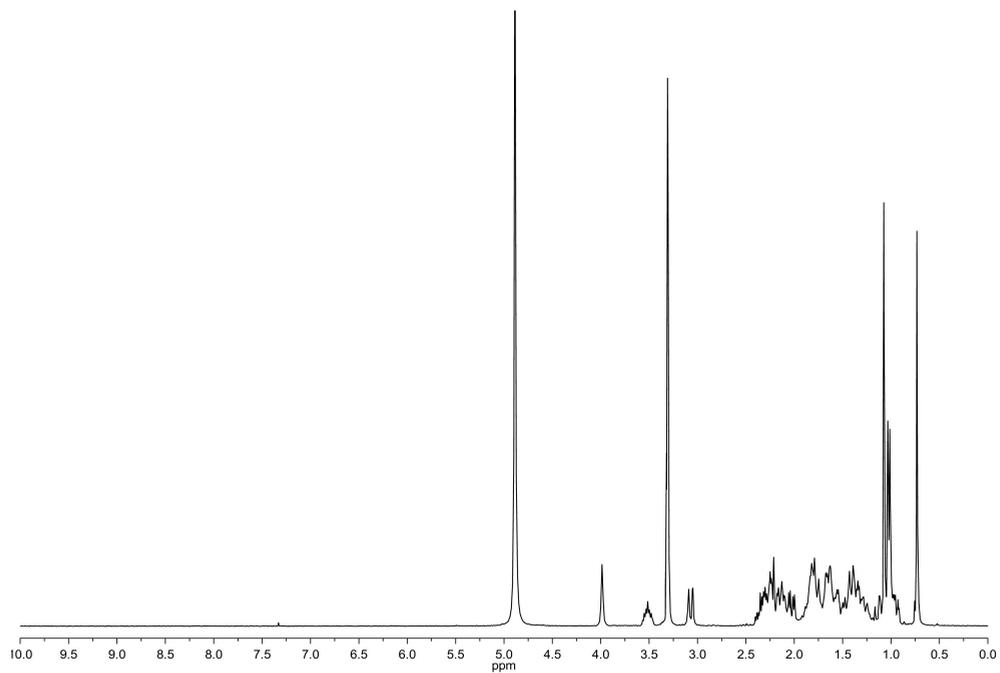
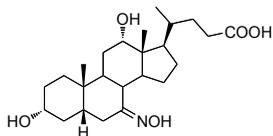
^1H RMN de $3\beta\text{-NH}_2\text{-ChMe}\cdot\text{HCl}$ 

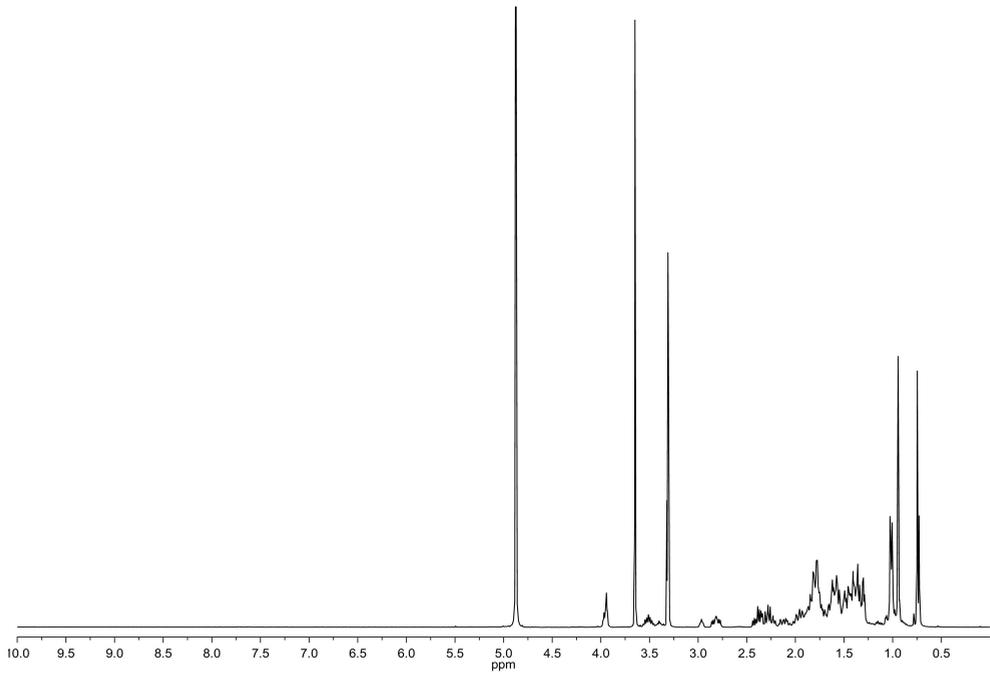
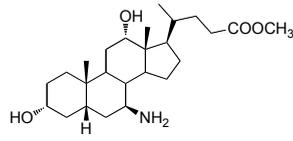
^1H RMN de 7[O]ChA



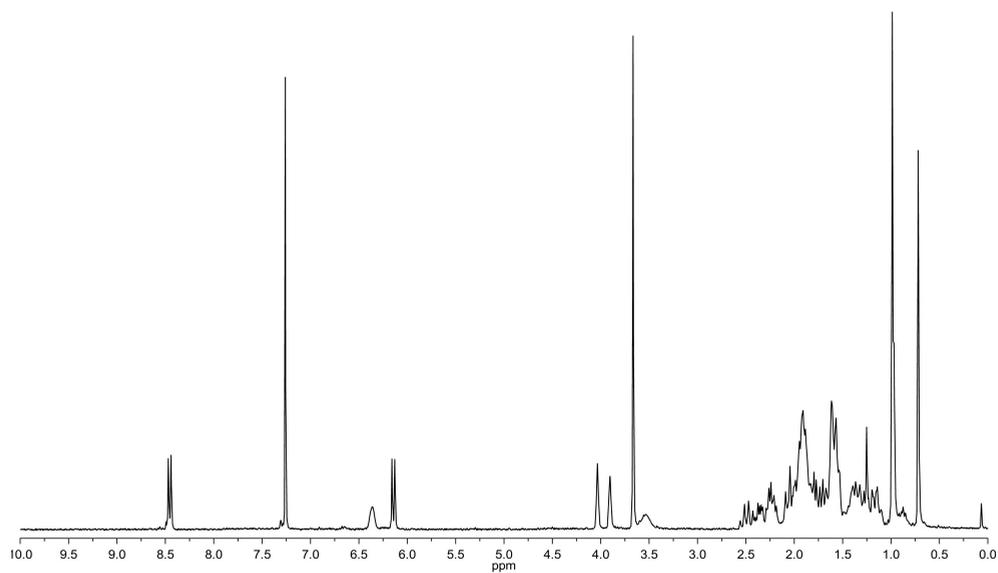
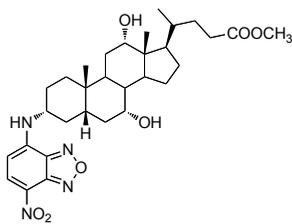
^1H RMN de $7\alpha\text{-NH}_2\text{-ChMe}\cdot\text{HCl}$ 

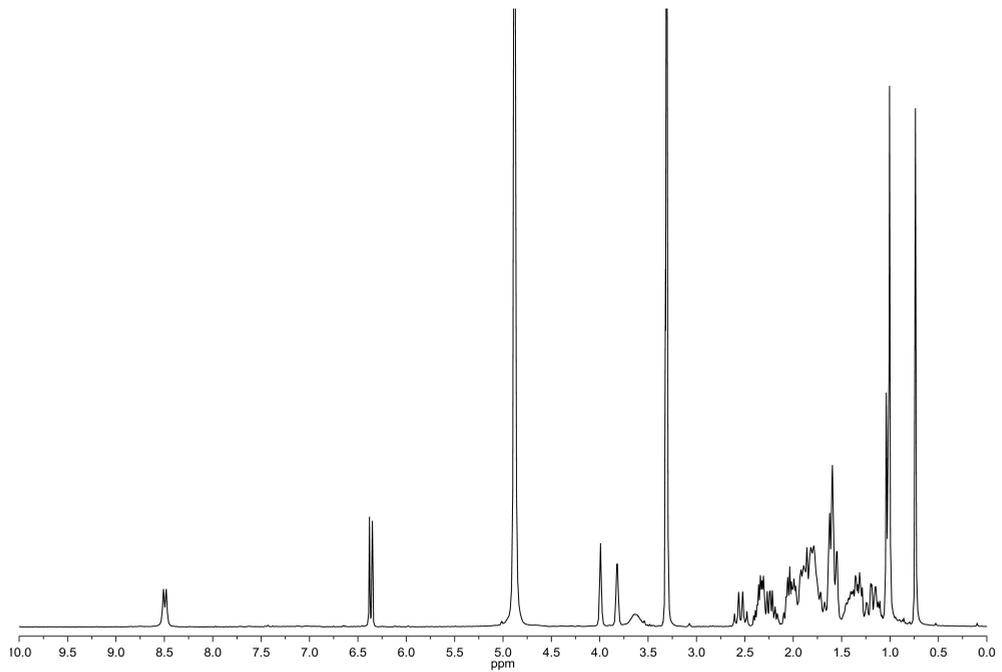
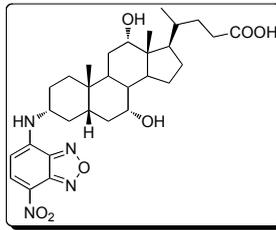
^1H RMN de 7[NOH]ChA



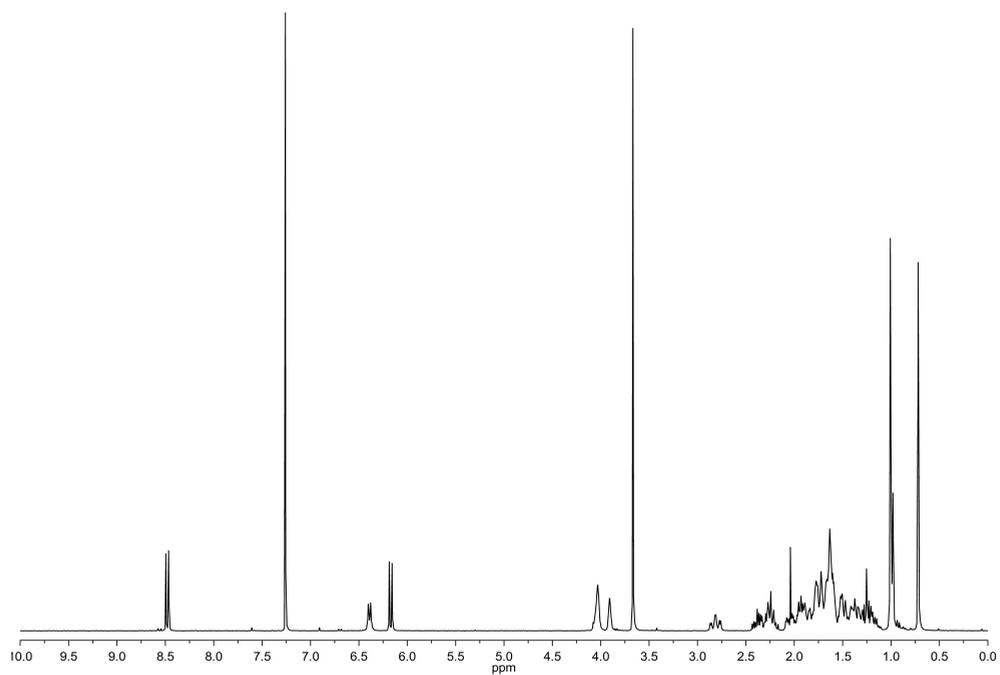
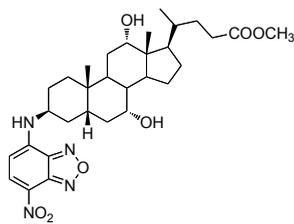
^1H RMN de $7\beta\text{-NH}_2\text{-ChMe}$ (+ $7\alpha\text{-NH}_2\text{-ChMe}$)

^1H RMN de **3 α -NBD-ChMe**

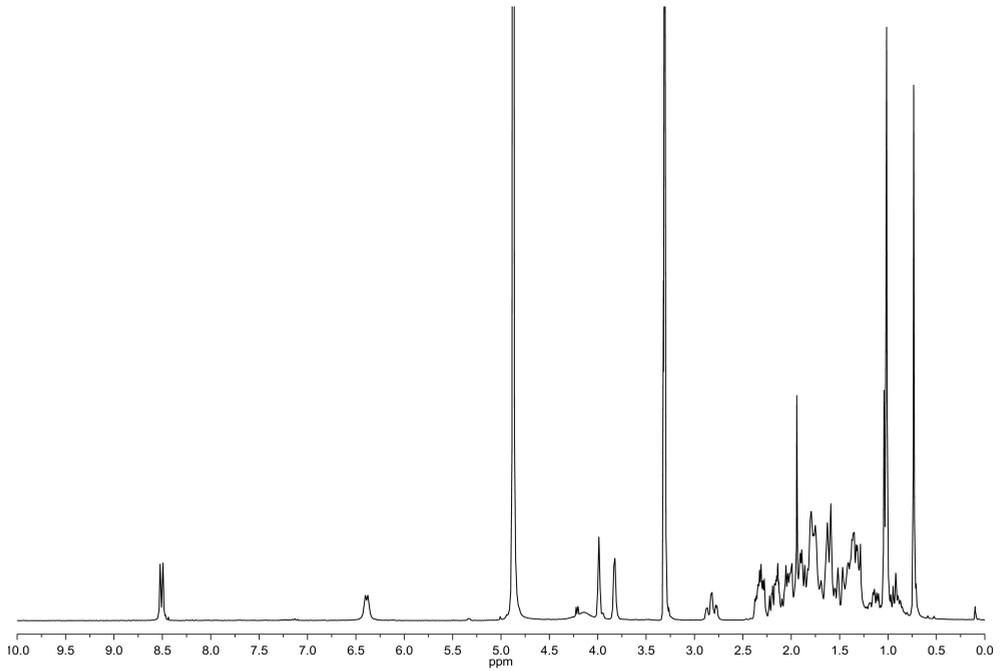
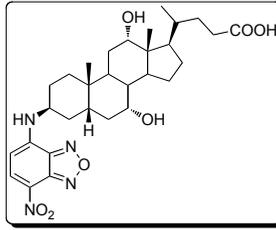


^1H RMN de $3\alpha\text{-NBD-ChA}$ 

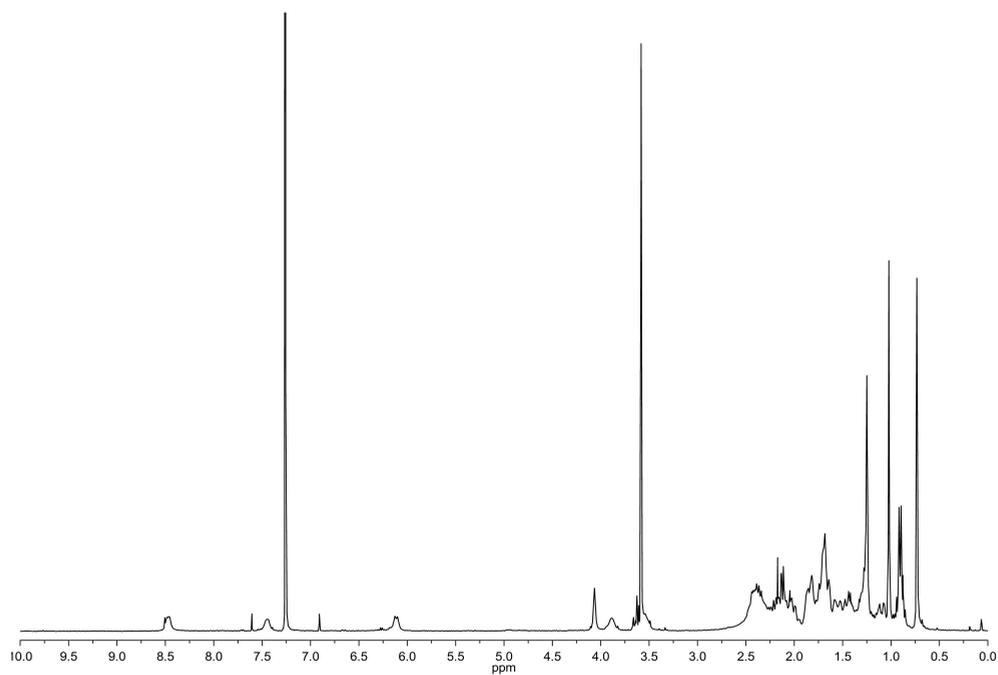
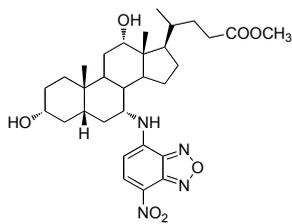
^1H RMN de $3\beta\text{-NBD-ChMe}$

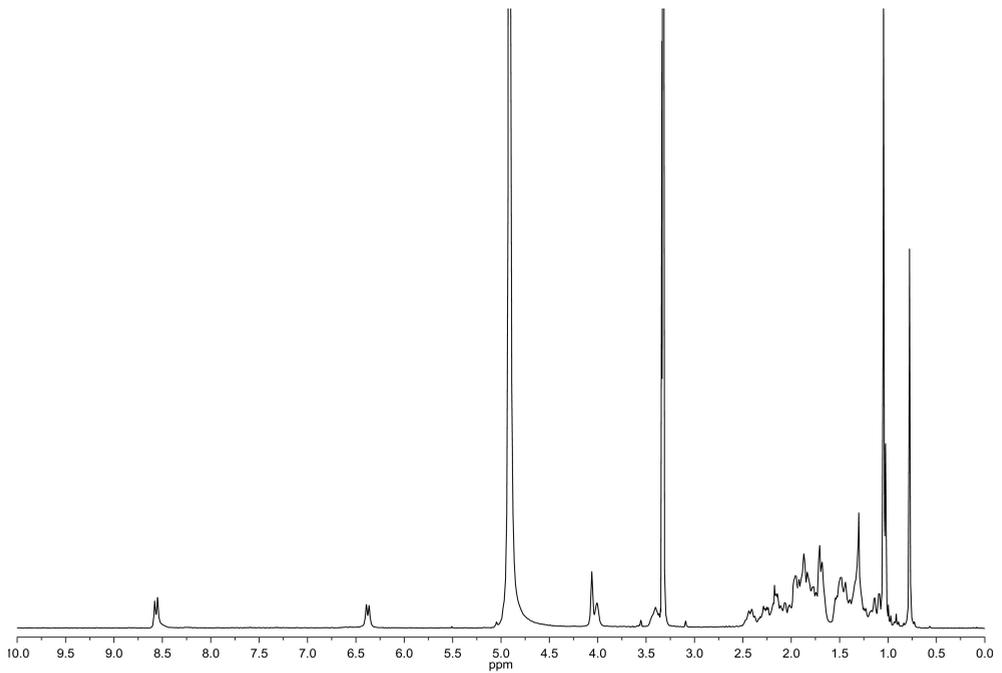
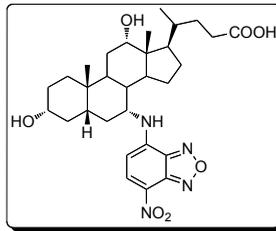


^1H RMN de $3\beta\text{-NBD-ChA}$

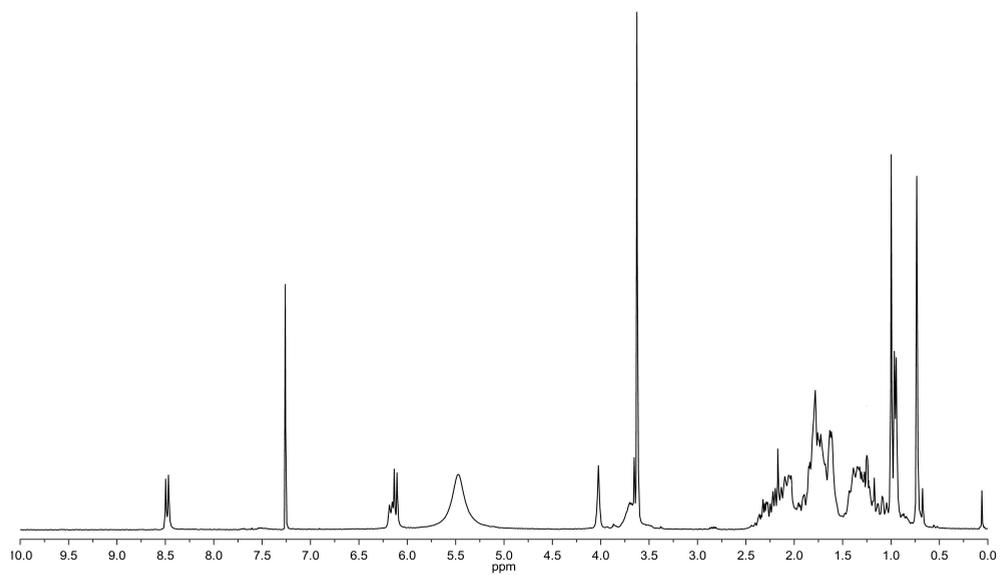
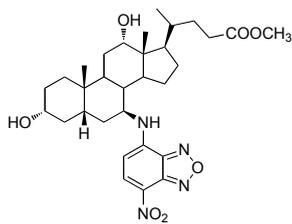


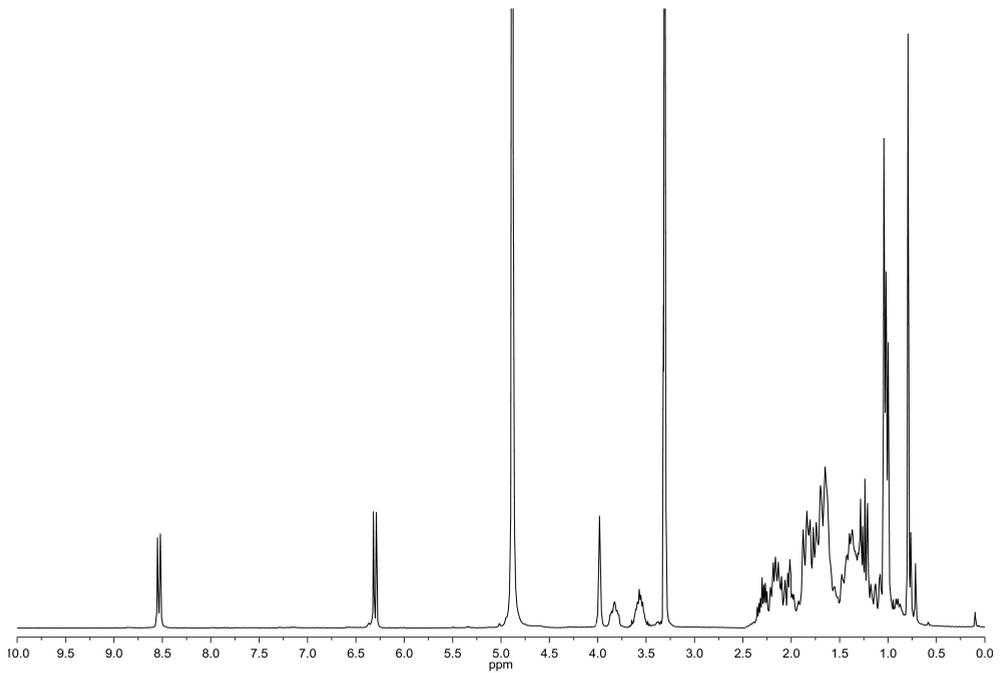
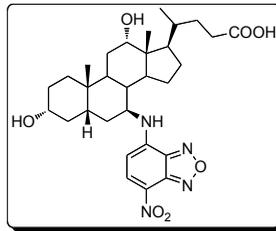
^1H RMN de 7α -NBD-ChMe



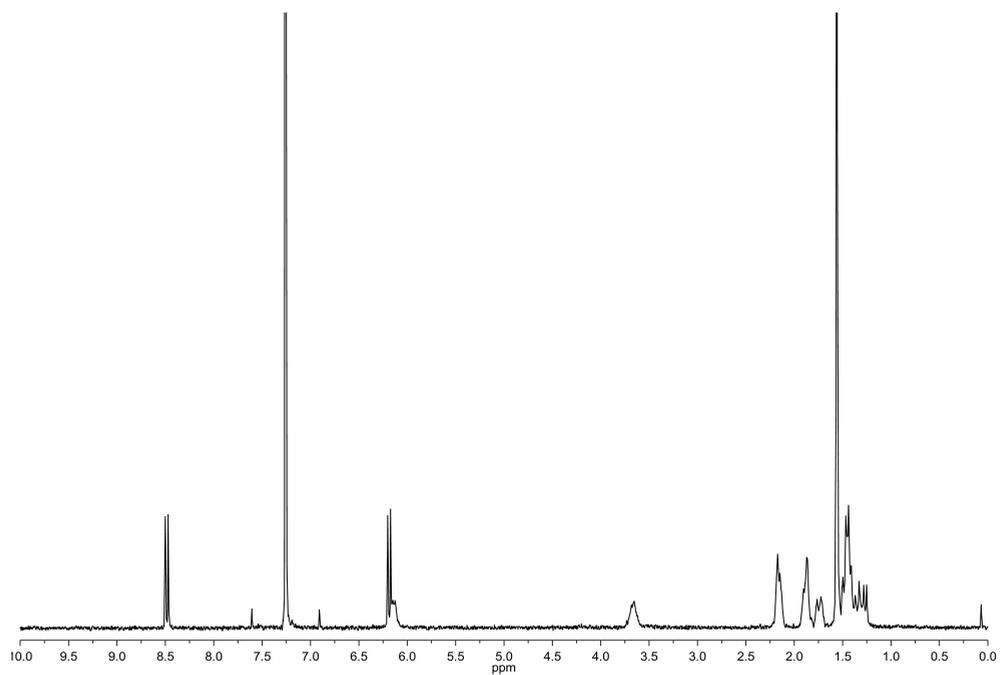
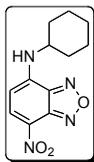
^1H RMN de $7\alpha\text{-NBD-ChA}$ 

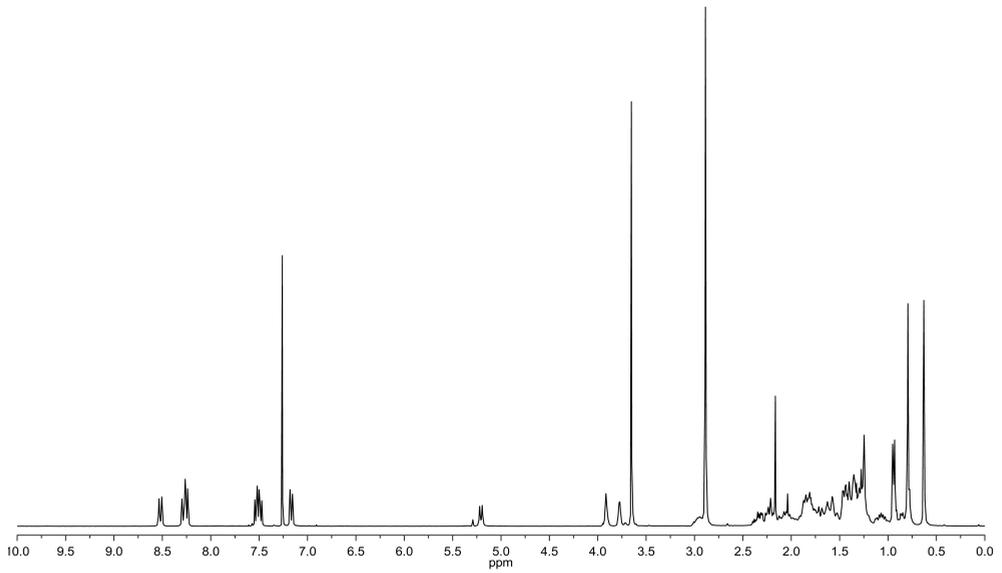
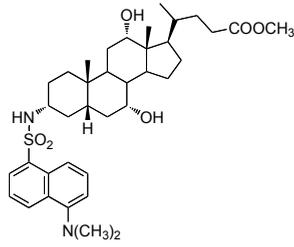
^1H RMN de 7 β -NBD-ChMe



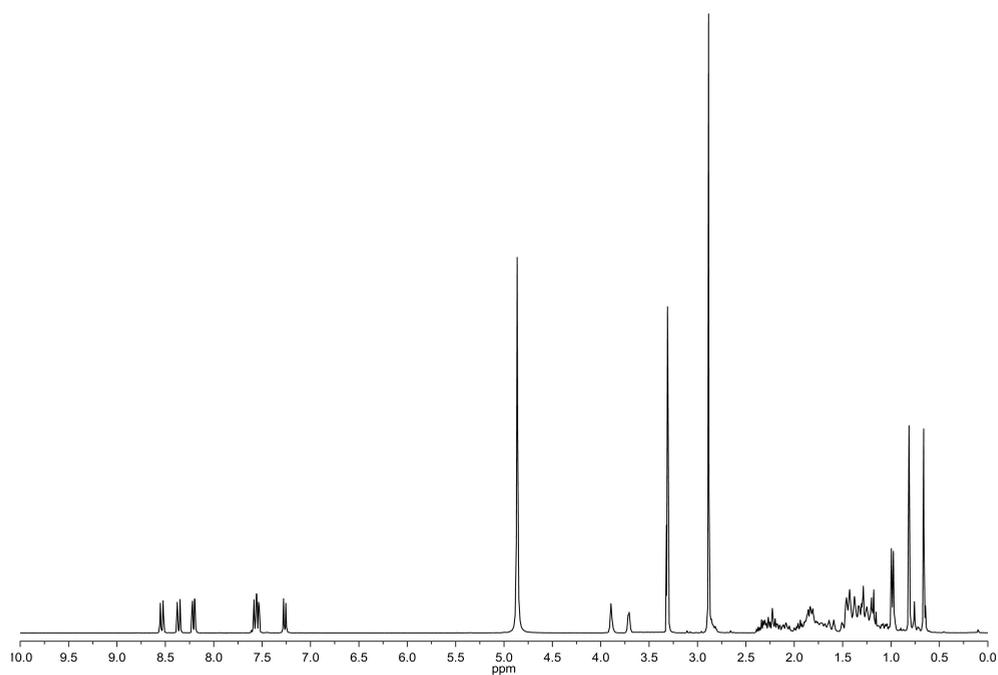
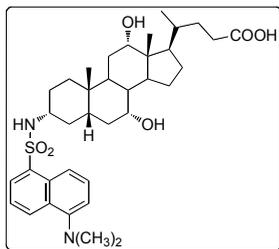
^1H RMN de 7 β -NBD-ChA

^1H RMN de **NBD-CH**

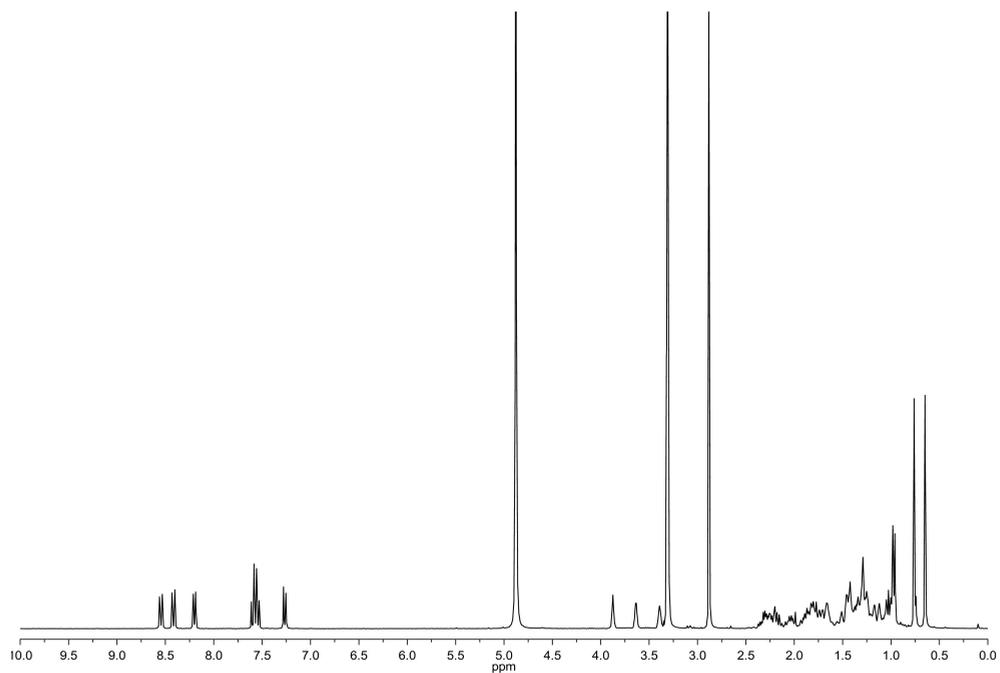
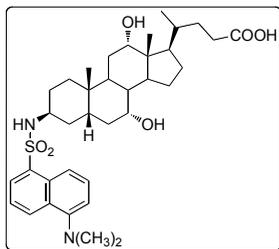


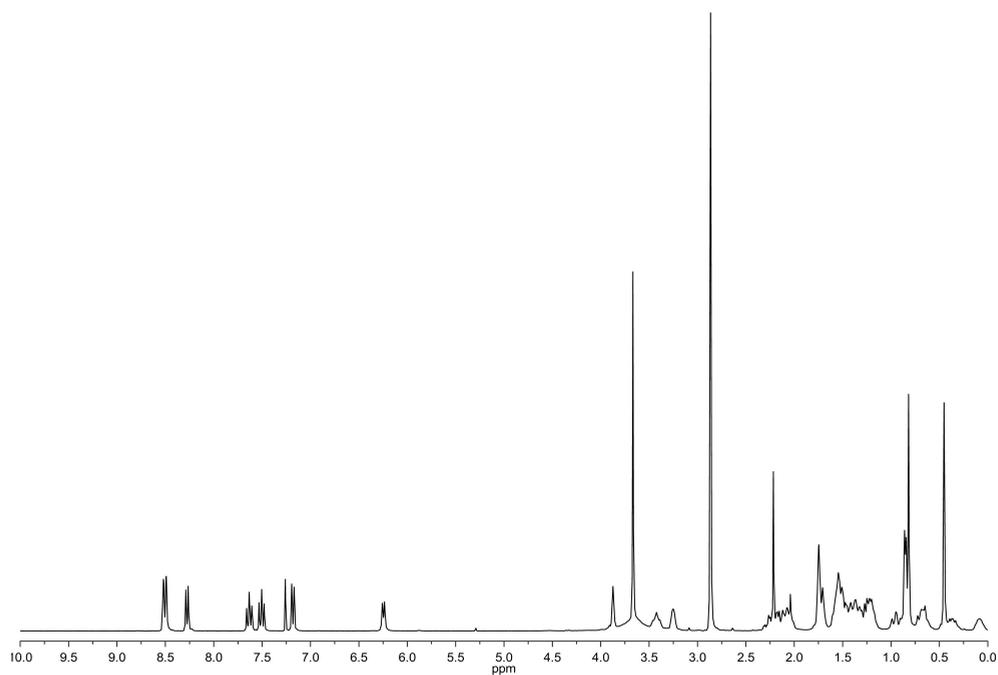
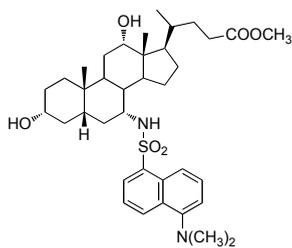
^1H RMN de 3α -Dns-ChMe

^1H RMN de 3α -Dns-ChA

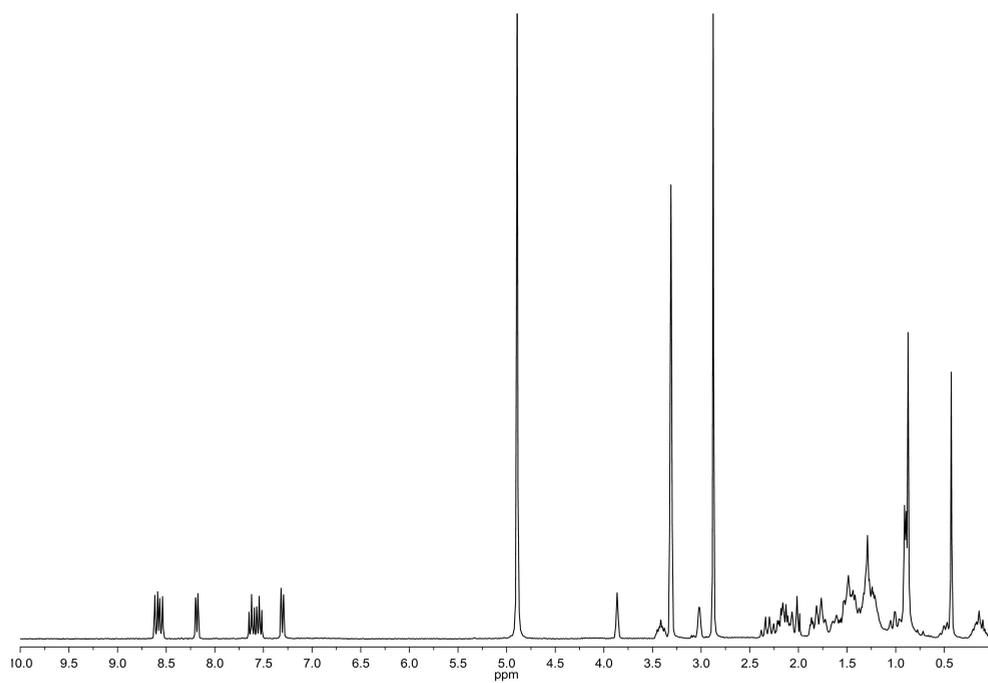
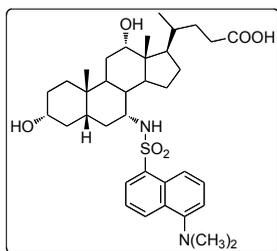


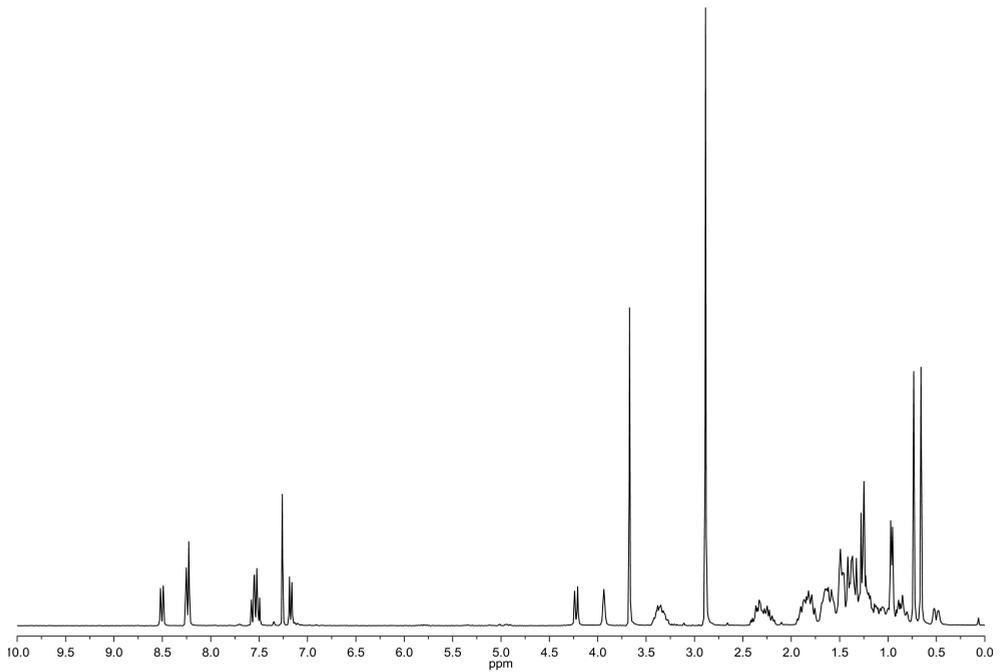
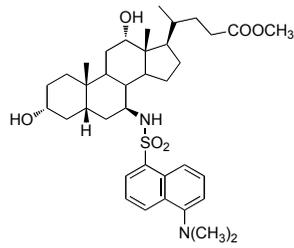
^1H RMN de 3β -Dns-ChA



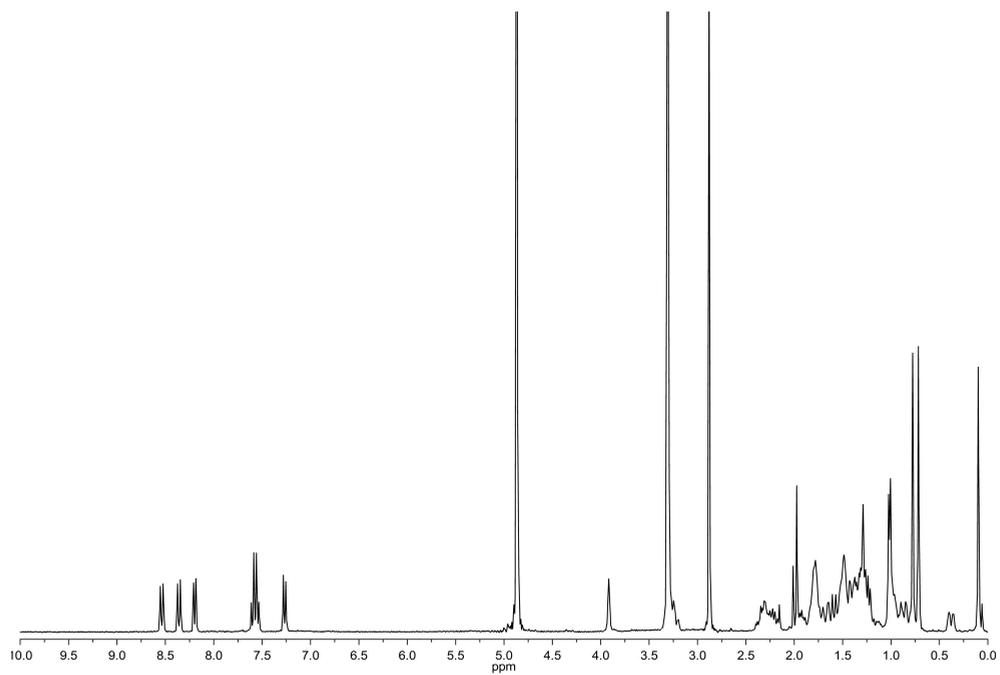
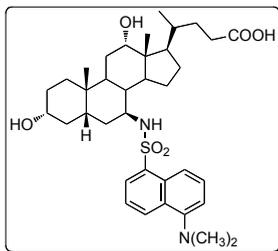
^1H RMN de 7 α -Dns-ChMe

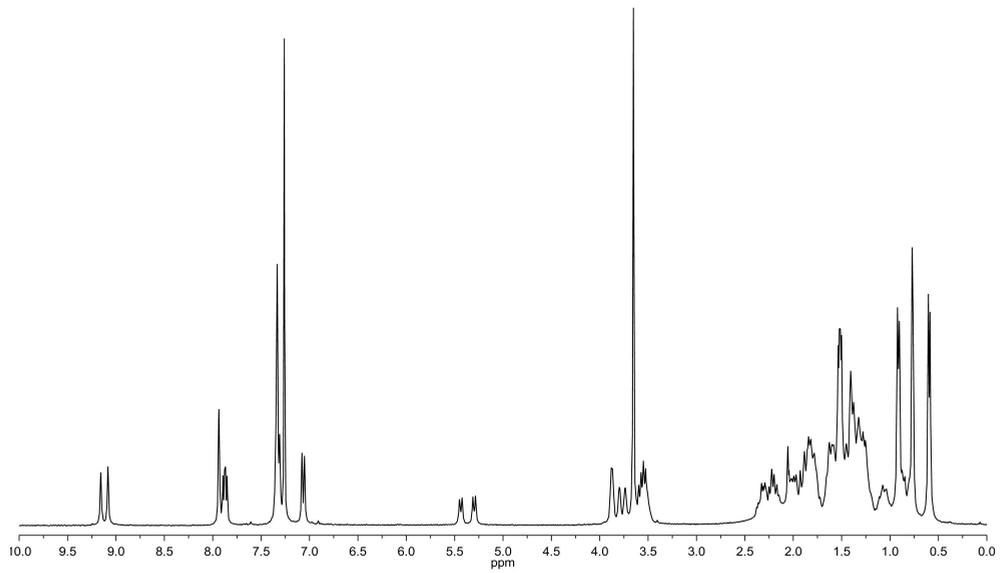
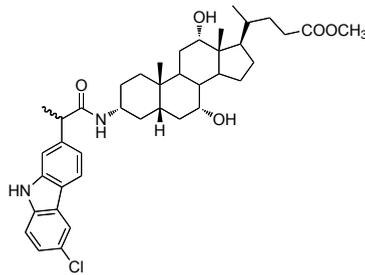
^1H RMN de 7α -Dns-ChA



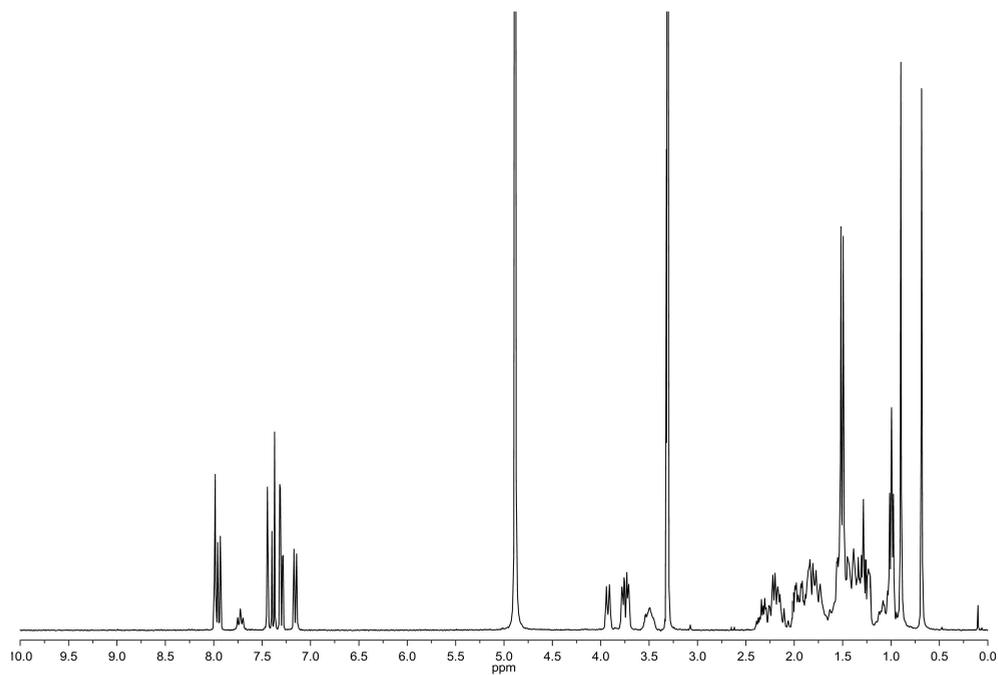
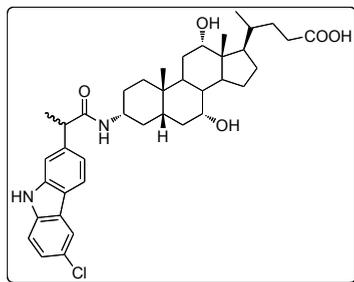
^1H RMN de 7 β -Dns-ChMe

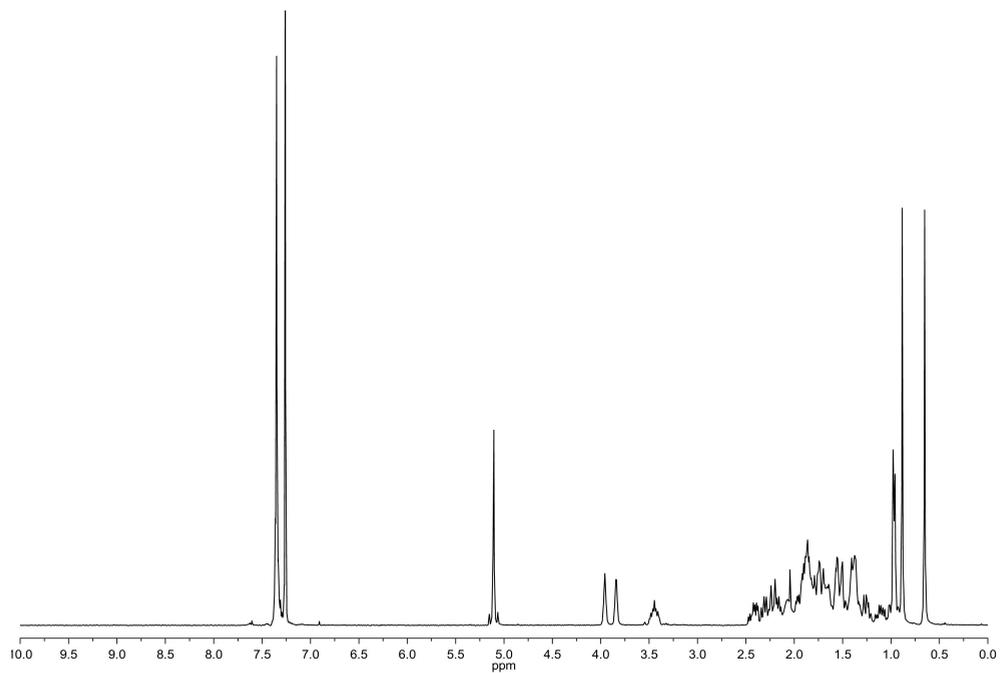
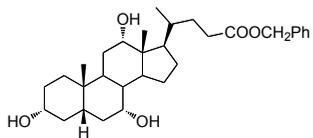
^1H RMN de 7β -Dns-ChA



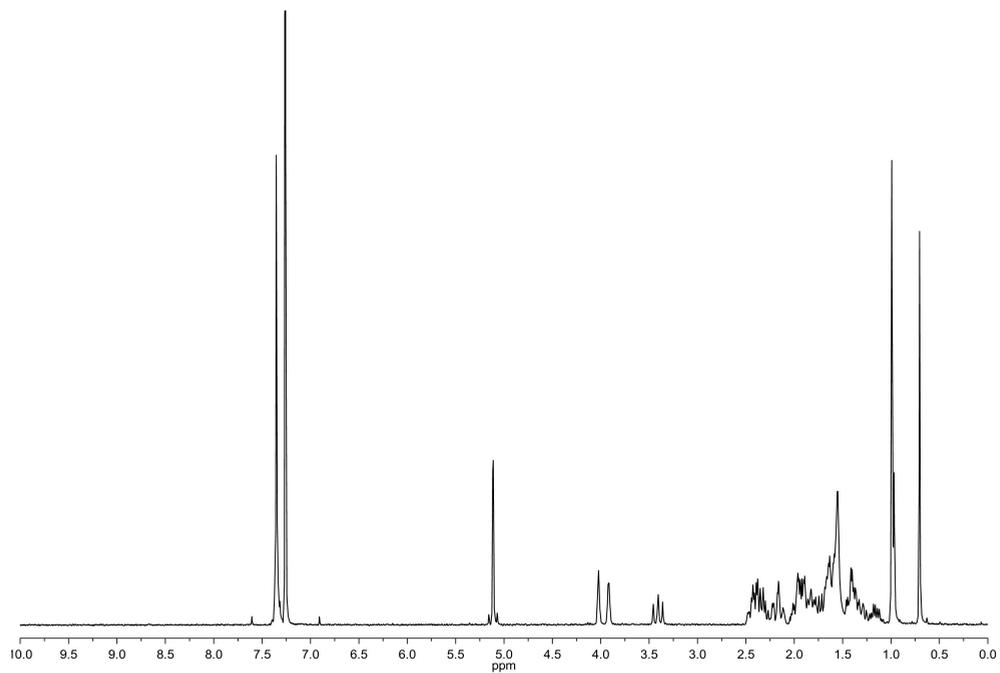
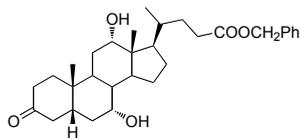
^1H RMN de 3α -(S)-Cpf-ChMe + 3α -(R)-Cpf-ChMe

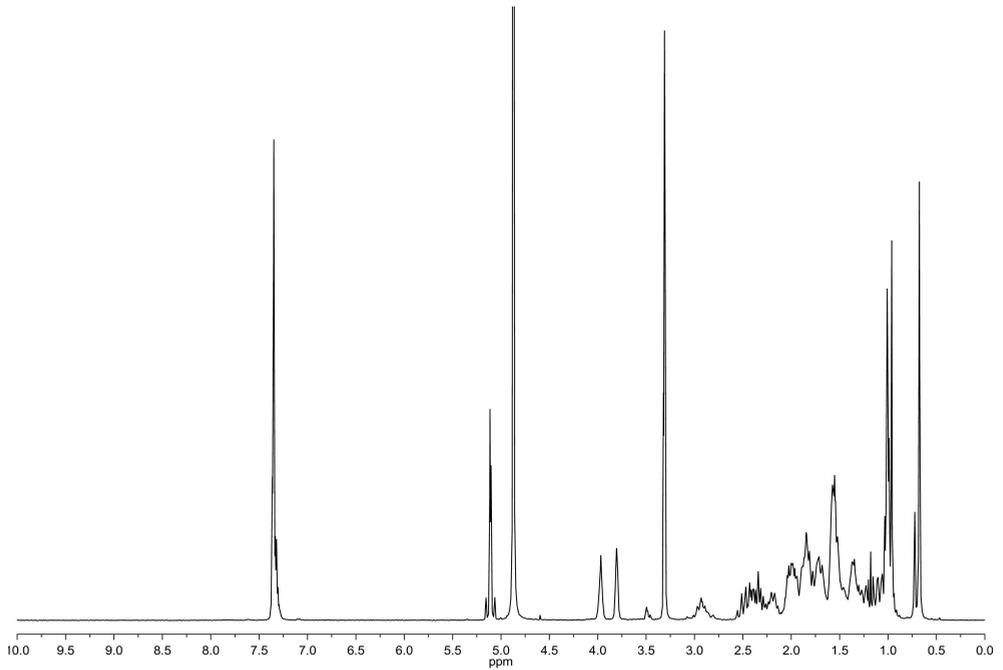
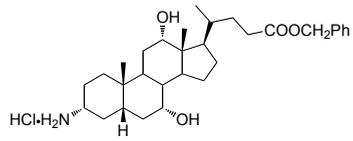
^1H RMN de 3α -(S)-Cpf-ChA + 3α -(R)-Cpf-ChA



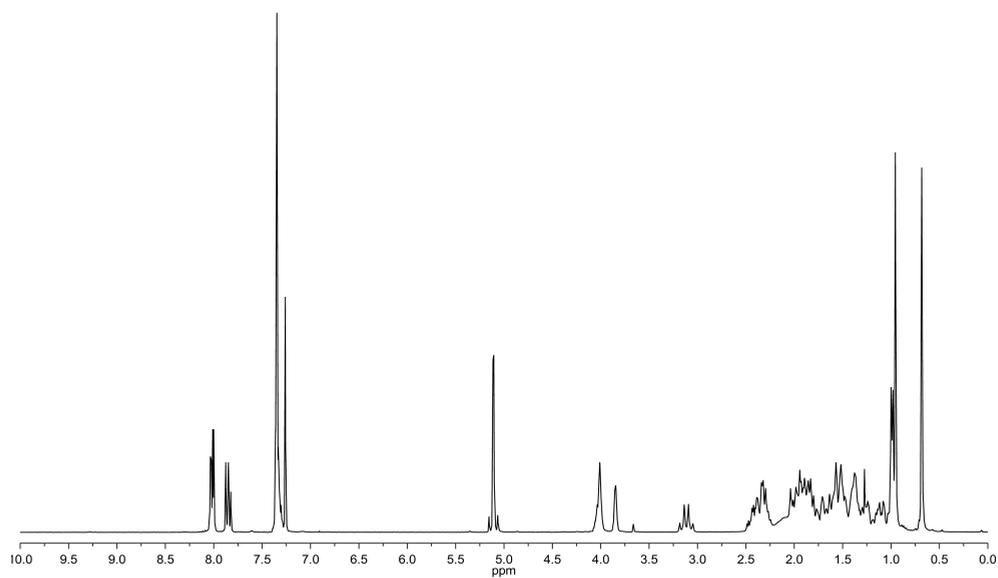
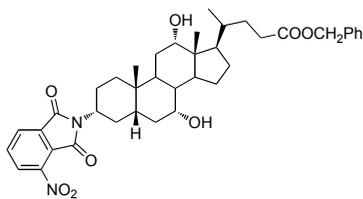
^1H RMN de ChBn

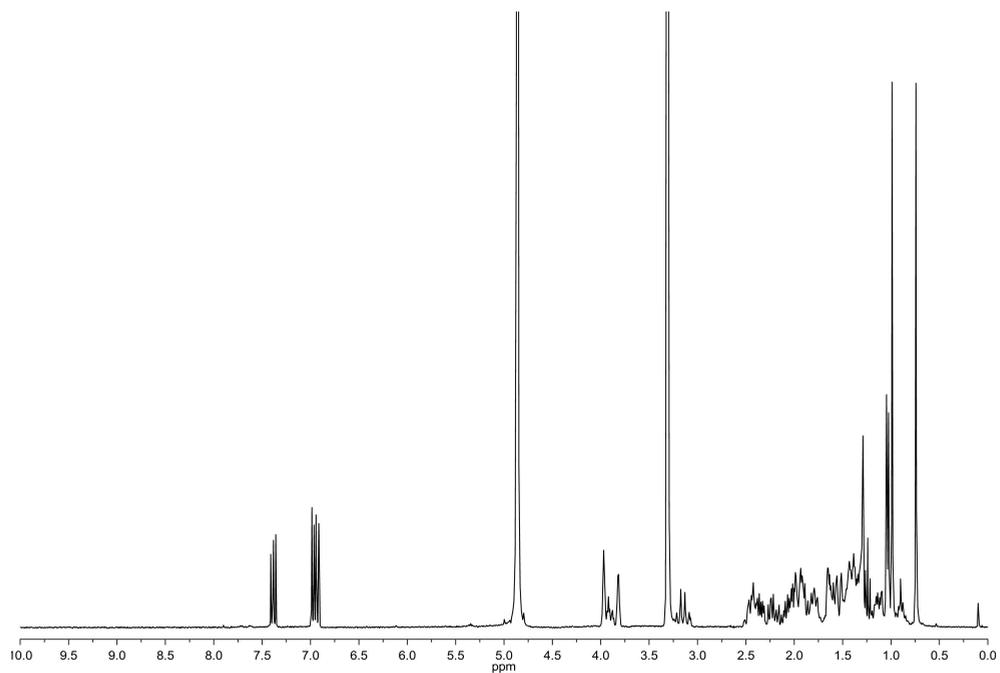
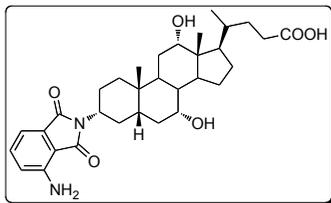
^1H RMN de 3[O]ChBn



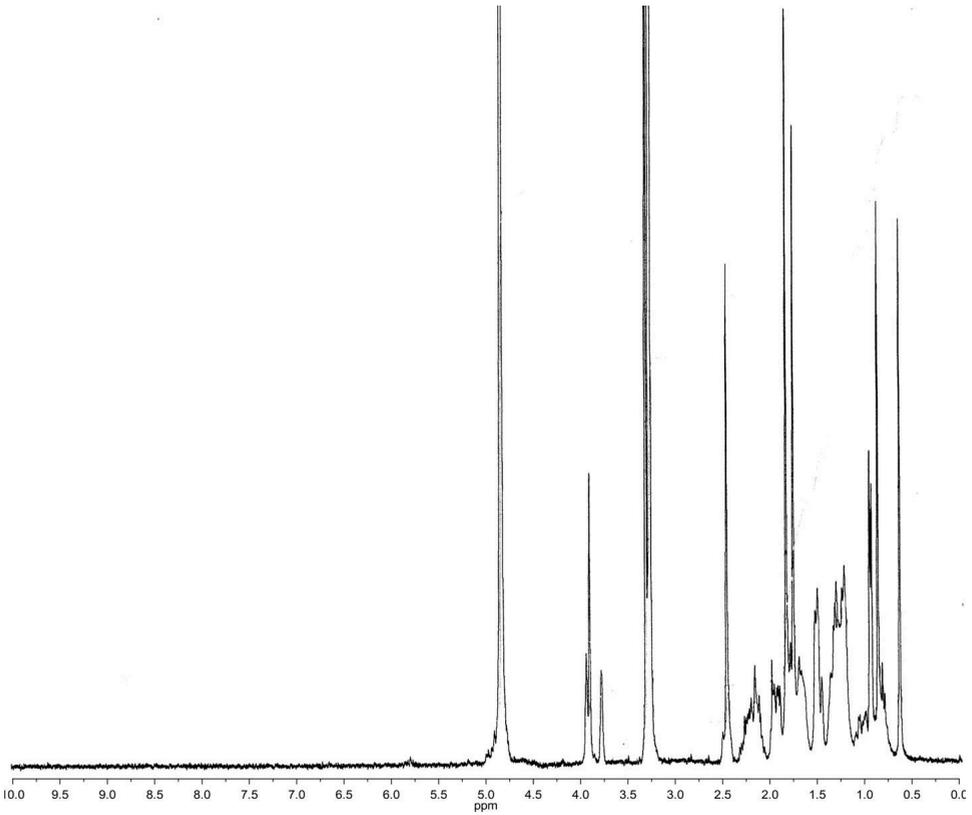
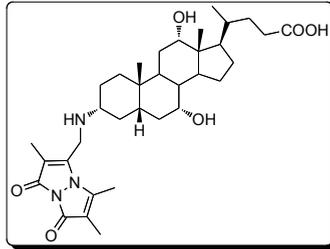
^1H RMN de $3\alpha\text{-NH}_2\text{-ChBn}\cdot\text{HCl}$ (+ $3\beta\text{-NH}_2\text{-ChBn}\cdot\text{HCl}$)

^1H RMN de $3\alpha\text{-Ft-ChBn}$

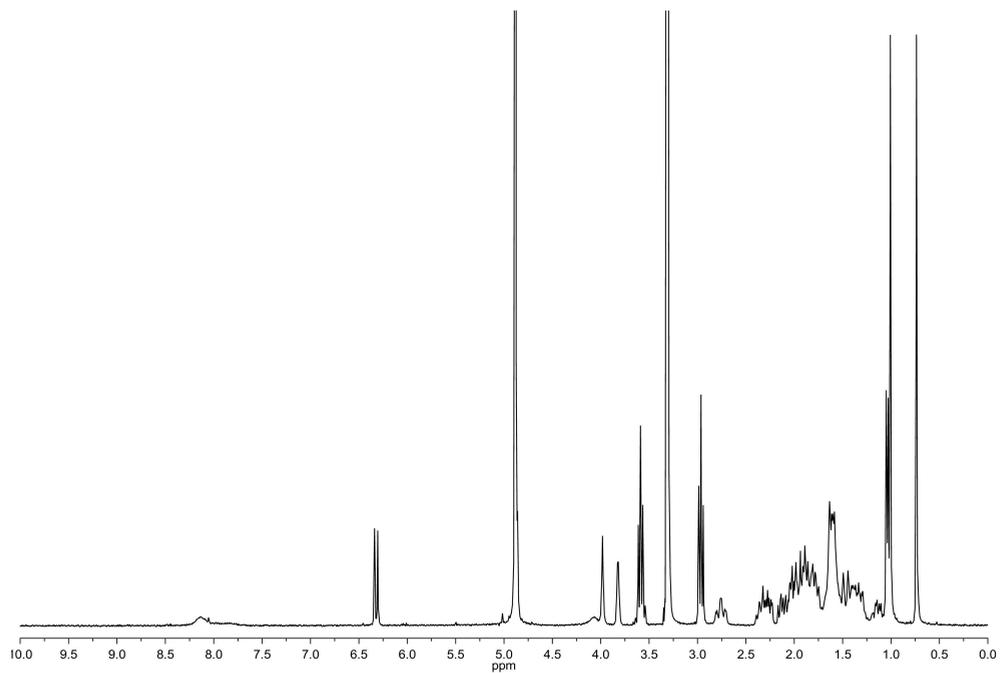
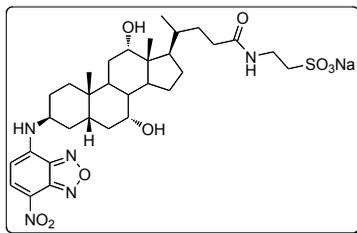


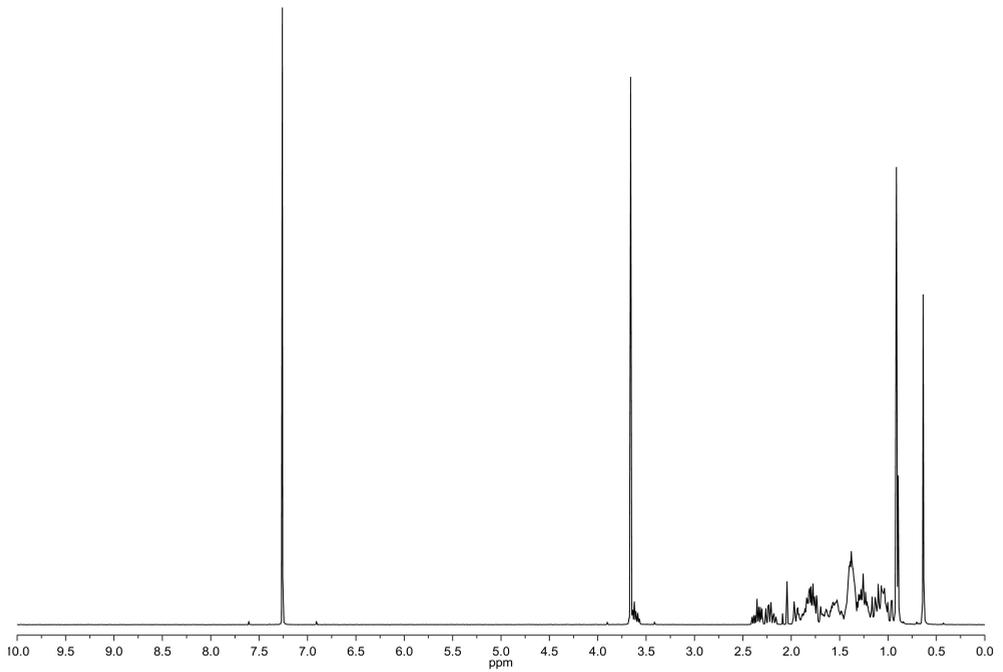
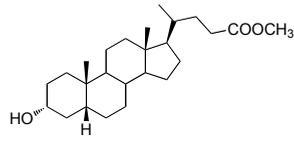
^1H RMN de $3\alpha\text{-aFt-ChA}$ 

^1H RMN de $3\alpha\text{-Bm-ChA}$

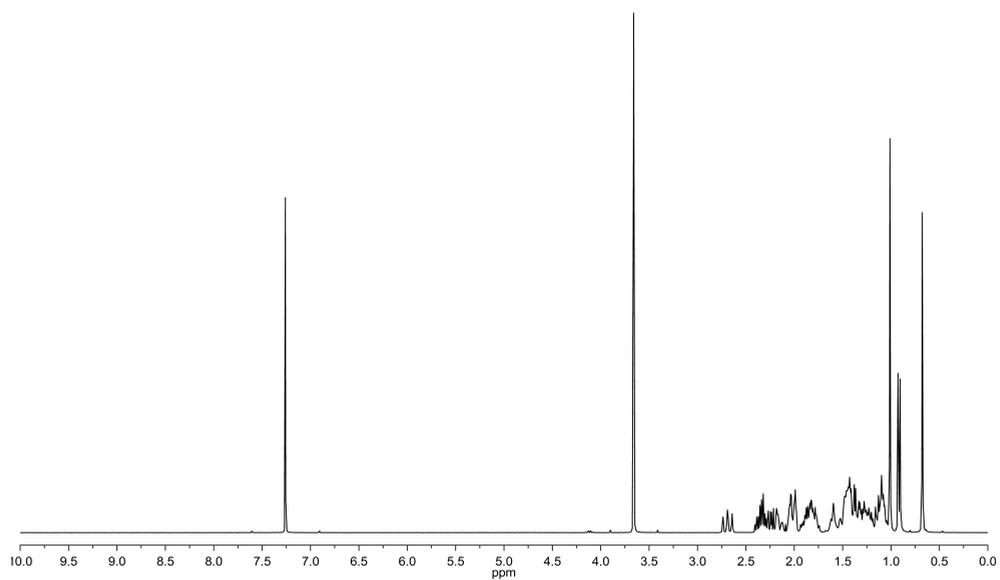
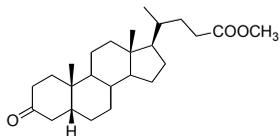


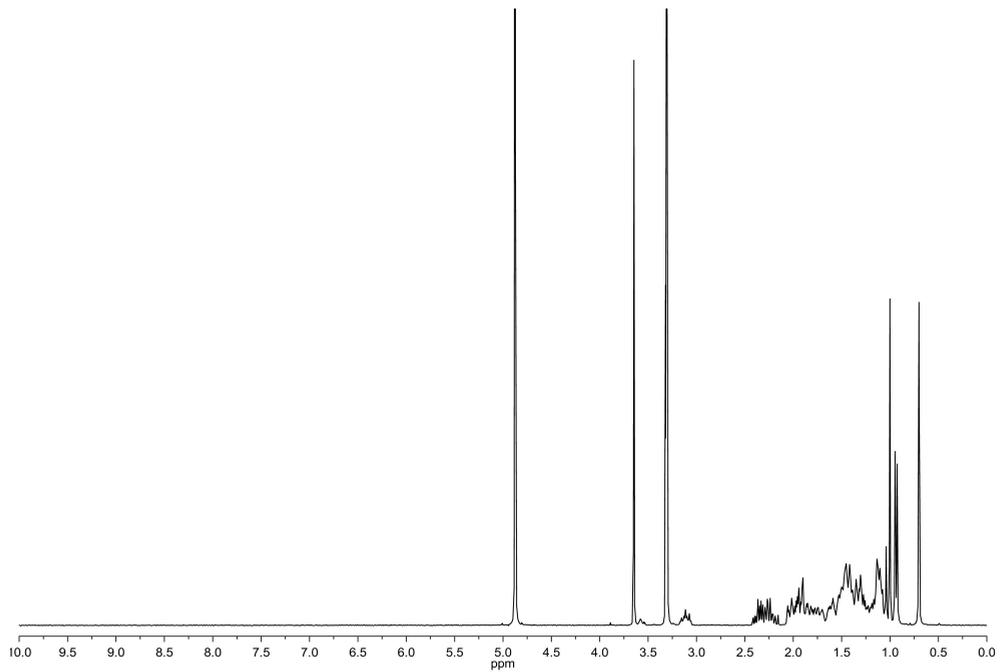
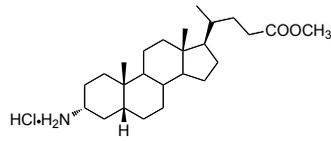
^1H RMN de 3β -NBD-ChTau



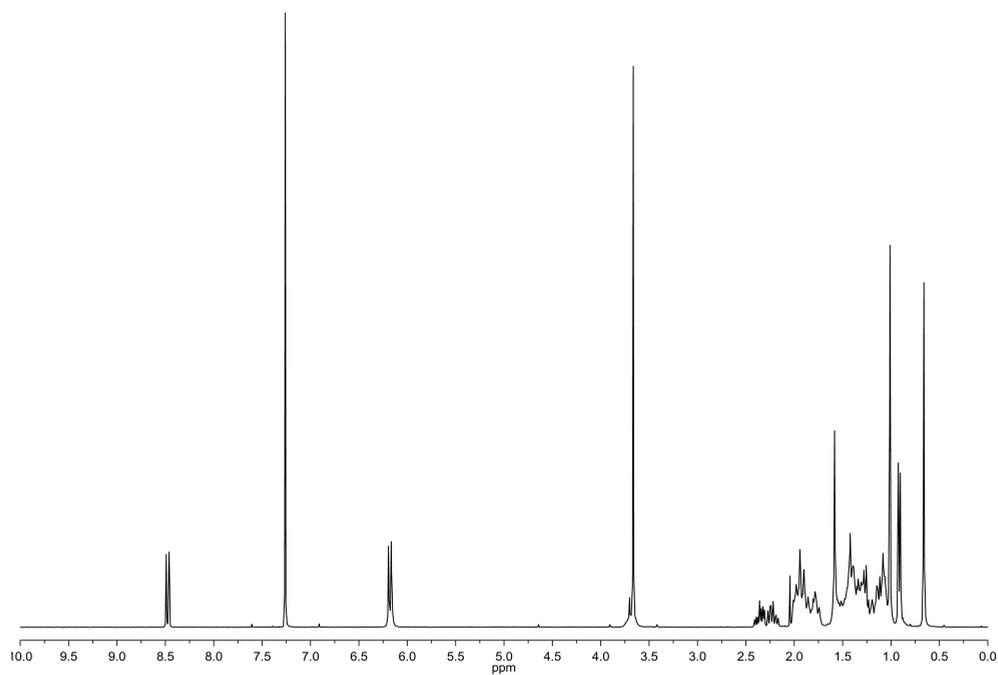
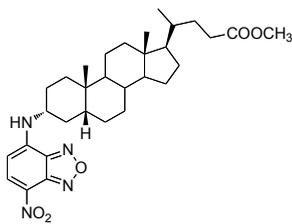
^1H RMN de LcMe

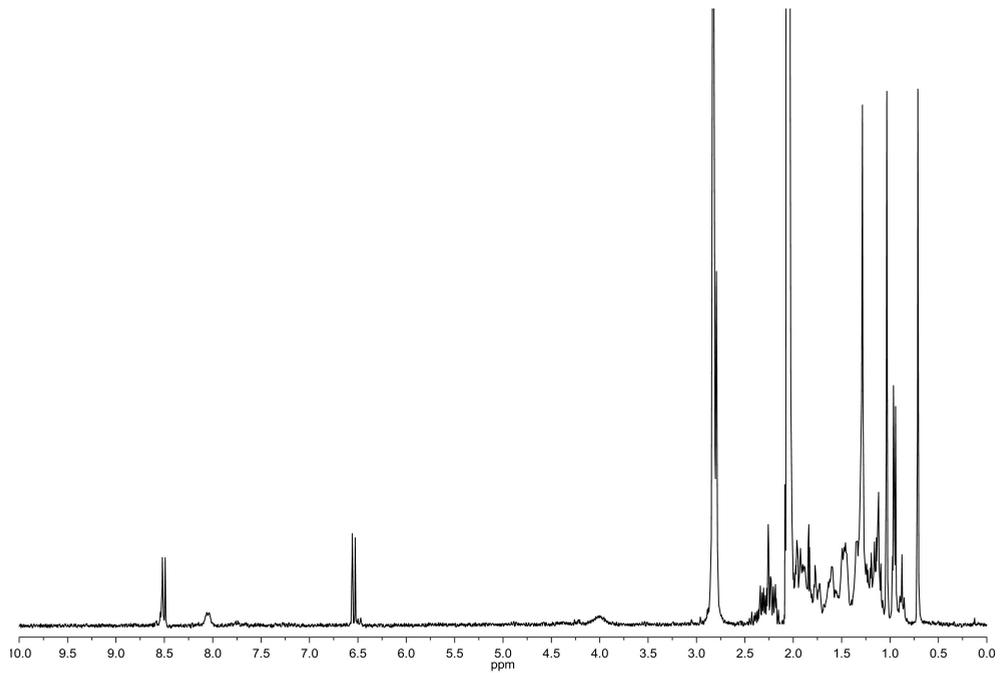
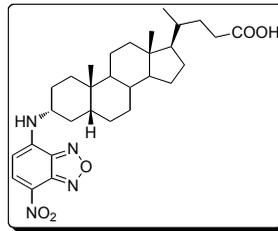
^1H RMN de 3[O]LcMe



^1H RMN de $3\alpha\text{-NH}_2\text{-LcMe}\cdot\text{HCl}$ (+ $3\beta\text{-NH}_2\text{-LcMe}\cdot\text{HCl}$)

^1H RMN de **3 α -NBD-LcMe**



^1H RMN de $3\alpha\text{-NBD-LcA}$ 

Anexo II

Publicaciones Derivadas de la Presente Tesis Doctoral

J. Rohacova, M. L. Marin, A. Martinez-Romero, J.-E. O'Connor, M. J. Gomez-Lechon, M. T. Donato, J. V. Castell, M. A. Miranda. "Photophysical Characterization and Flow Cytometry Applications of Cholyamidofluorescein, a Fluorescent Bile Acid Scaffold". *Photochemical & Photobiological Sciences*, **2008**, 7, 860-866.

J. Rohacova, M. L. Marin, A. Martinez-Romero, L. Diaz, J.-E. O'Connor, M. J. Gomez-Lechon, M. T. Donato, J. V. Castell, M. A. Miranda. "Fluorescent Benzofurazan-Cholic Acid Conjugates for in vitro Assessment of Bile Acid Uptake and Its Modulation by Drugs". *ChemMedChem*, **2009**, 4, 466-472.

J. Rohacova, M. L. Marin, A. Martinez-Romero, J.-E. O'Connor, M. J. Gomez-Lechon, M. T. Donato, J. V. Castell, M. A. Miranda. "Synthesis of New, UV-Photoactive Dansyl Derivatives for Flow Cytometric Studies on Bile Acid Uptake". *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2009**, 7, 4973-4980.

J. Rohacova, M. L. Marin, M. A. Miranda. "Complexes between Fluorescent Cholic Acid Derivatives and Human Serum Albumin. A Photophysical Approach To Investigate the Binding Behavior". *The Journal of Physical Chemistry B*, **2010**, 114, 4710-4716.

