

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 895**

51 Int. Cl.:
C07D 307/12 (2006.01)
A61K 31/341 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06793841 .5**
- 96 Fecha de presentación: **26.09.2006**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1928851**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

54 Título: **Derivados de la vitamina D activos en los receptores nucleares de la vitamina D, preparación y usos de los mismos**

30 Prioridad:
28.09.2005 EP 05292017

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.04.2012

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR;
Université de Strasbourg;
Universidad de Santiago de Compostela y
INSERM (Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale)**

72 Inventor/es:
**MORAS, Dino;
MOURINO-MOSQUERA, Antonio;
RODRIGUES, Luis Cezar;
ROCHEL, Natacha y
WURTZ, Jean-Marie**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 378 895 T3

DESCRIPCIÓN

Derivados de la vitamina D activos en los receptores nucleares de la vitamina D, preparación y usos de los mismos.

- 5 La invención se refiere a derivados de la vitamina D y a sus usos, particularmente en la industria farmacéutica. La invención describe compuestos que tienen diferentes propiedades biológicas interesantes, incluyendo la actividad agonista del receptor nuclear de vitamina D (VDR), así como métodos terapéuticos mediante la administración de dichos compuestos, en particular para tratar el cáncer, la psoriasis, enfermedades autoinmunes, osteodistrofia y osteoporosis. Se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos y a métodos para preparar las mismas.

Antecedentes de la invención

- 10 El receptor de vitamina D (VDR) es un regulador transcripcional dependiente del ligando que pertenece a la familia del factor de transcripción del receptor nuclear (NR) (1), que controla el crecimiento y la diferenciación celular, la homeostasis, el desarrollo, y varios procesos biológicos. La unión del ligando al VDR induce un cambio conformacional en la orientación del dominio AF-2 (función de activación 2) central que permite la interacción con coactivadores que median en la interacción entre el receptor nuclear y la maquinaria de transcripción basal (2-4).

- 15 La plétora de acciones de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, el ligando natural de VDR, en diferentes procesos fisiológicos sugirió amplias aplicaciones clínicas para los ligandos del receptor nuclear de vitamina D (VDR) en los tratamientos de la inflamación (artritis reumatoide, artritis psoriásica), trastornos dermatológicos (psoriasis, fotoenvejecimiento), osteodistrofia, osteoporosis, cánceres (de mama, de próstata, de colon, leucemia), y enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple, diabetes tipo I) (5-7). Sin embargo, los efectos calcémicos inducidos por $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que causa hipercalcemia, el aumento de la resorción ósea, y la calcificación de tejidos blandos limitan el uso del ligando natural en estas aplicaciones clínicas, y esto ha llevado al desarrollo de análogos con efectos secundarios reducidos.

- 20 Se ha demostrado que algunos análogos sintéticos de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ son superagonistas. Estos análogos son al menos 10 veces más potentes que $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la transactivación y presentan una actividad antiproliferativa que es varios órdenes de magnitud más alta que la de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (8-10).

- 25 Se han descrito derivados de la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 en diferentes documentos, incluyendo el documento WO98/51678, Saito *et al.* (Tetrahedron **2004**, 60, 7951) y Carlberg *et al.* (Expert Opinion on therapeutic patents 2003, 13(6), 761).

- 30 La presente invención proporciona una nueva clase de compuestos que son análogos de $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$. En particular, la invención proporciona moduladores de VDR, por ejemplo, agonistas o antagonistas. De forma interesante, la invención proporciona también superagonistas de VDR en ensayo *in vitro*. Estos análogos son también eficaces *in vivo*. Proporciona también análogos de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que presentan un bajo efecto de hipercalcemia.

Sumario de la invención

- 35 La presente invención se refiere a nuevos análogos de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que presentan un anillo de oxolano en su cadena lateral alifática.

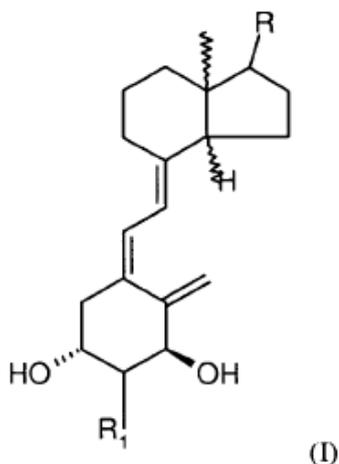
La presente invención se refiere también a un método para preparar nuevos análogos de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

- 40 La presente invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos uno de los nuevos análogos de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ según la invención en un soporte farmacéuticamente aceptable, opcionalmente asociado con otro agente activo.

La presente invención se refiere también al uso de los compuestos según la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que responden a los ligandos del receptor de Vitamina D, incluyendo en particular el cáncer, la inflamación, trastornos dermatológicos, enfermedades autoinmunes, osteodistrofia u osteoporosis.

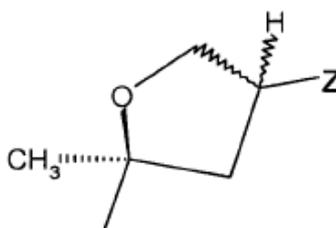
- 45 **Descripción detallada de la invención**

Un aspecto de la invención se refiere a nuevos análogos de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que presentan la siguiente fórmula (I):



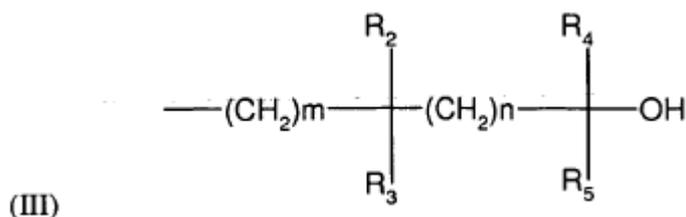
en la que R_1 representa un grupo seleccionado de un átomo de hidrógeno, un alquilo (C_1 - C_{10}) lineal o ramificado y un grupo alcoxi (C_1 - C_{10}), donde dicho grupo está opcionalmente sustituido con al menos un grupo hidroxilo;

y en la que R representa



5

donde Z representa



en la que:

10 - R_2 y R_3 , idénticos o diferentes, representan un grupo seleccionado de H, un átomo de halógeno, un grupo alquilo C_1 - C_{10} ramificado o lineal, alquenilo C_2 - C_{10} ramificado o lineal o alquinilo C_2 - C_{10} ramificado o lineal; R_4 y R_5 , idénticos o diferentes, representan un grupo seleccionado de H, un átomo de halógeno, un grupo alquilo C_1 - C_6 lineal o ramificado, alquenilo C_2 - C_{10} ramificado o lineal o alquinilo C_2 - C_{10} ramificado o lineal;

- m representa un número entero comprendido entre 0 y 5 inclusive; y

15 - n representa un número entero comprendido entre 0 y 5 inclusive,

estando dicho grupo alquenilo opcionalmente sustituido con un grupo arilo;

estando dicho grupo alquinilo opcionalmente sustituido con un grupo arilo o siendo seleccionado dicho grupo alquinilo alternativamente de los grupos 3-(benciloxi)-prop-1-inilo y *terc*-butil-prop-2-inilcarbamato;

20 y donde el término arilo incluye cualquier grupo aromático que comprende de 5 a 14 átomos de carbono, opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados de N, O, S o P (denominado, más específicamente, heteroarilo).

La invención incluye también los isómeros ópticos y geométricos de dichos compuestos, los racematos, sales, hidratos y las mezclas de los mismos.

Los compuestos de la invención tienen varios centros quirales y pueden existir por tanto en formas ópticamente activas. En esta invención se contemplan los isómeros R y S y las mezclas de los mismos, incluyendo las mezclas racémicas.

5 En un grupo sustituyente tal como un grupo alquilo pueden estar presentes átomos de carbono asimétricos adicionales. Todos estos isómeros así como sus mezclas se pretende que estén incluidos en la invención. Si se desea un estereoisómero particular, se puede preparar éste por métodos bien conocidos en la técnica utilizando reacciones estereoespecíficas con materiales de partida que contienen los centros asimétricos y están ya resueltos o, alternativamente por métodos que llevan a mezclas de los estereoisómeros y la subsiguiente resolución por métodos conocidos.

10 Los grupos alquilo pueden ser lineales o ramificados. Ejemplos de grupos alquilo que tienen de 1 a 10 átomos de carbono inclusive son metilo, etilo, propilo, isopropilo, t-butilo, n-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, 2-etilhexilo, 2-metilbutilo, 2-metilpentilo, 1-metilhexilo, 3-metilheptilo y las otras formas isoméricas de los mismos. Preferiblemente, los grupos alquilo presentan de 1 a 6 átomos de carbono.

15 Los grupos alquenoilo son funciones hidrocarbonadas lineales o ramificadas que contienen uno o más dobles enlaces, tales como por ejemplo el grupo alilo. Ellos contienen de forma ventajosa de 2 a 6 átomos de carbono y preferiblemente, 1 o 2 dobles enlaces. Los grupos alquenoilo pueden estar sustituidos con un grupo arilo tal como se ha definido anteriormente, en cuyo caso se denomina un grupo arilalquenoilo.

20 Los grupos alquinoilo son funciones hidrocarbonadas lineales o ramificadas que contienen uno o más triples enlaces, tales como por ejemplo los grupos 3-(benciloxi)prop-1-inilo, feniletinilo, prop-2-inilo y *tert*-butil-prop-2-inilcarbamato. Los grupos alquinoilo pueden estar sustituidos con un grupo arilo tal como se ha definido anteriormente, en cuyo caso se denomina un grupo arilalquinoilo.

25 Dentro del contexto de la presente solicitud, el término alcoxi indica un grupo saturado lineal o ramificado que contiene de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 6, átomos de carbono. Un grupo alcoxi es específicamente un grupo -O-alquilo, en el que el grupo alquilo es como se ha definido antes.

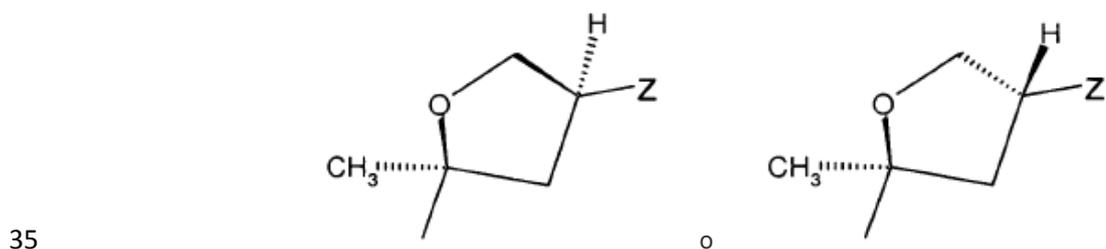
El término arilo incluye cualquier grupo aromático que comprende de 5 a 14 átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 14 átomos de carbono, opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados de N, O, S o P (denominado, más específicamente, heteroarilo). Los grupos arilo más preferidos son mono- o bi-cíclicos y comprenden de 6 a 14 átomos de carbono, tales como grupo fenilo, α -naftilo, β -naftilo, antraceno, o fluorenilo.

30 El término ariloxi indica un grupo -O-arilo, en el que el grupo arilo es como se ha definido antes.

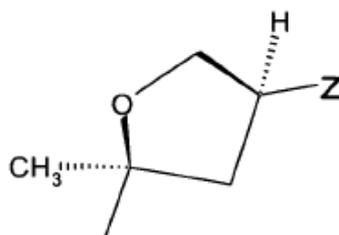
Halógeno se entiende que se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

En una realización particular, R_1 representa un grupo seleccionado de H, CH_3 , $(CH_2)_3OH$ o $O(CH_2)_3OH$ y lo más preferiblemente R_1 es H o CH_3 .

Como se representa por la fórmula (I), R puede representar



Más preferiblemente, R representa:



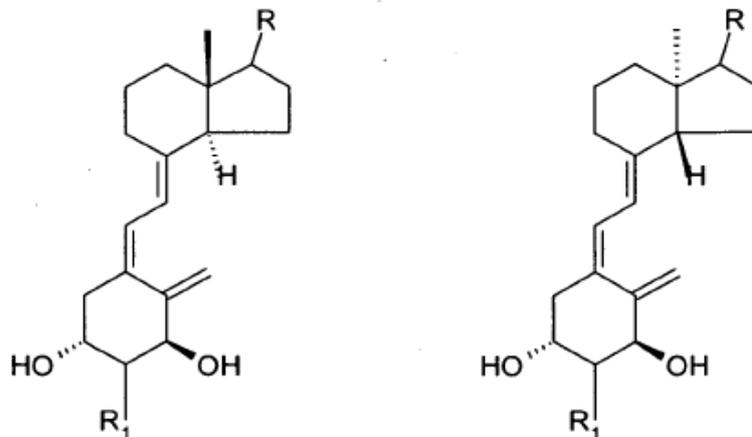
En una realización particular, m representa un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5. Más preferiblemente, m es 0 o 1.

En una realización particular, n representa un número entero 0, 1, 2, 3, 4 o 5. Más preferiblemente, n es 0.

En una realización particular, R₂ y R₃, idénticos o diferentes, representan un grupo seleccionado de H, átomo de halógeno y un alquilo C₁-C₄ ramificado o lineal. Más preferiblemente, ambos representan H o un átomo de halógeno.

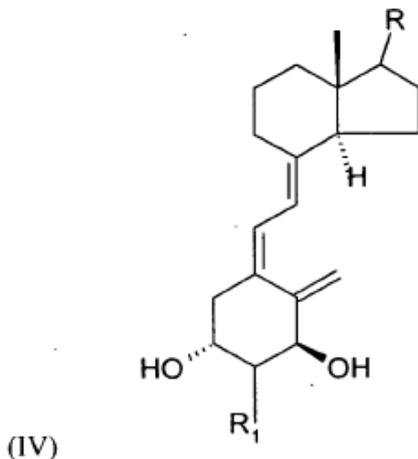
5 En una realización particular, R₄ y R₅, idénticos o diferentes, representan un grupo seleccionado de H, átomo de halógeno y un alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado. Más preferiblemente, al menos uno de R₄ y R₅ es diferente de H, en particular al menos uno es CH₃ (por ejemplo uno es H y el otro es CH₃). Más específicamente, ambos representan CH₃.

Como se representa por la fórmula (I) anterior, los compuestos de la invención pueden presentar las siguientes fórmulas:

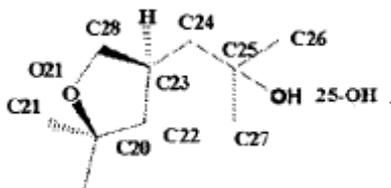


10

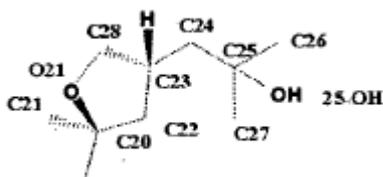
Una realización preferida de la presente invención se refiere a los compuestos que tienen la fórmula (IV):



15 En una realización muy preferida, la invención se refiere a dos análogos particulares de 1 α ,25(OH)₂D₃, denominados compuestos A y B, que presentan la fórmula (IV) como se ha descrito antes y en la que R, en la fórmula general (IV), corresponde a:



y



respectivamente.

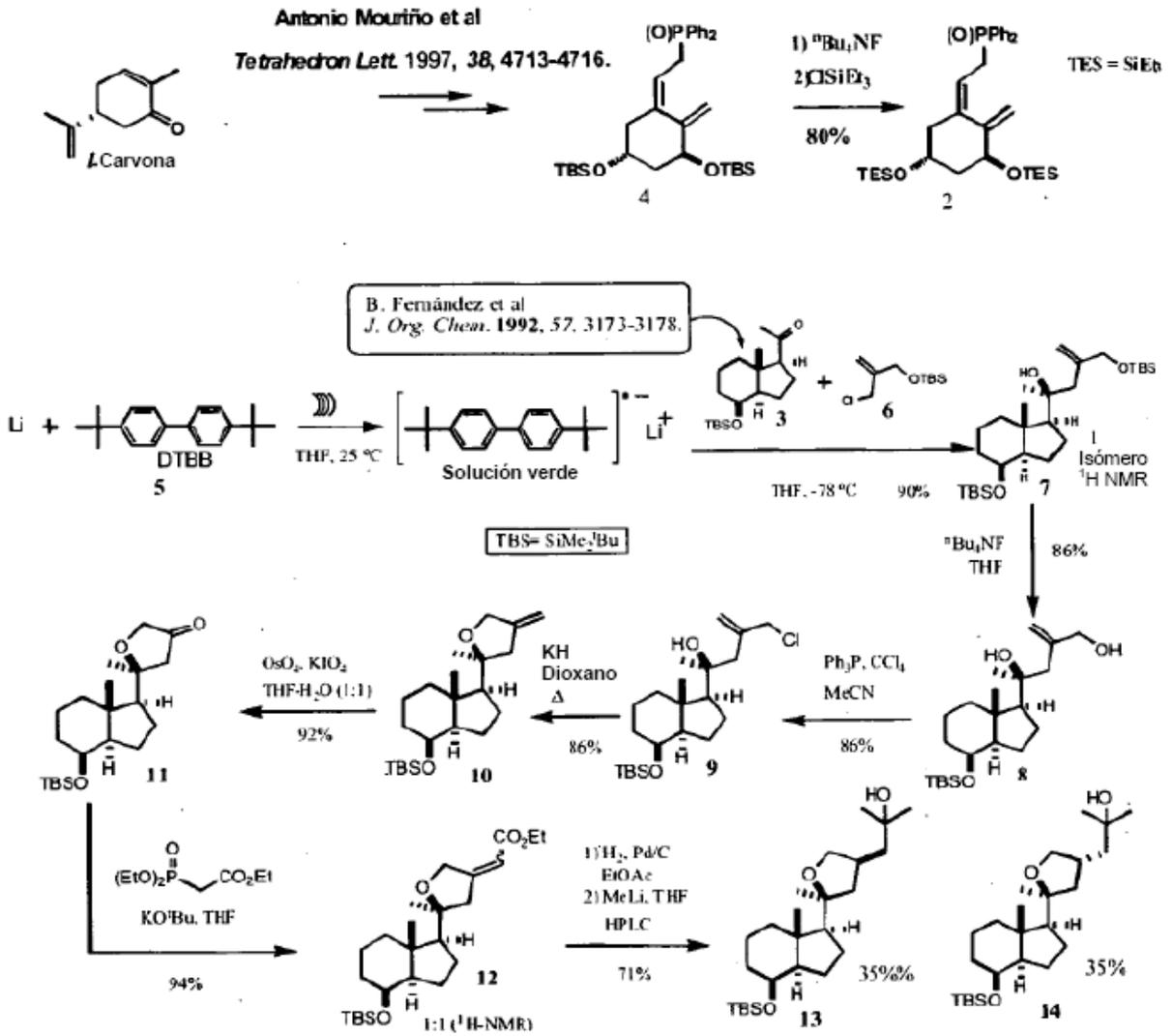
Los compuestos A y B son dos diastereoisómeros. El compuesto A presenta actividad de superagonista de VDR mientras que compuesto B se comporta como la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

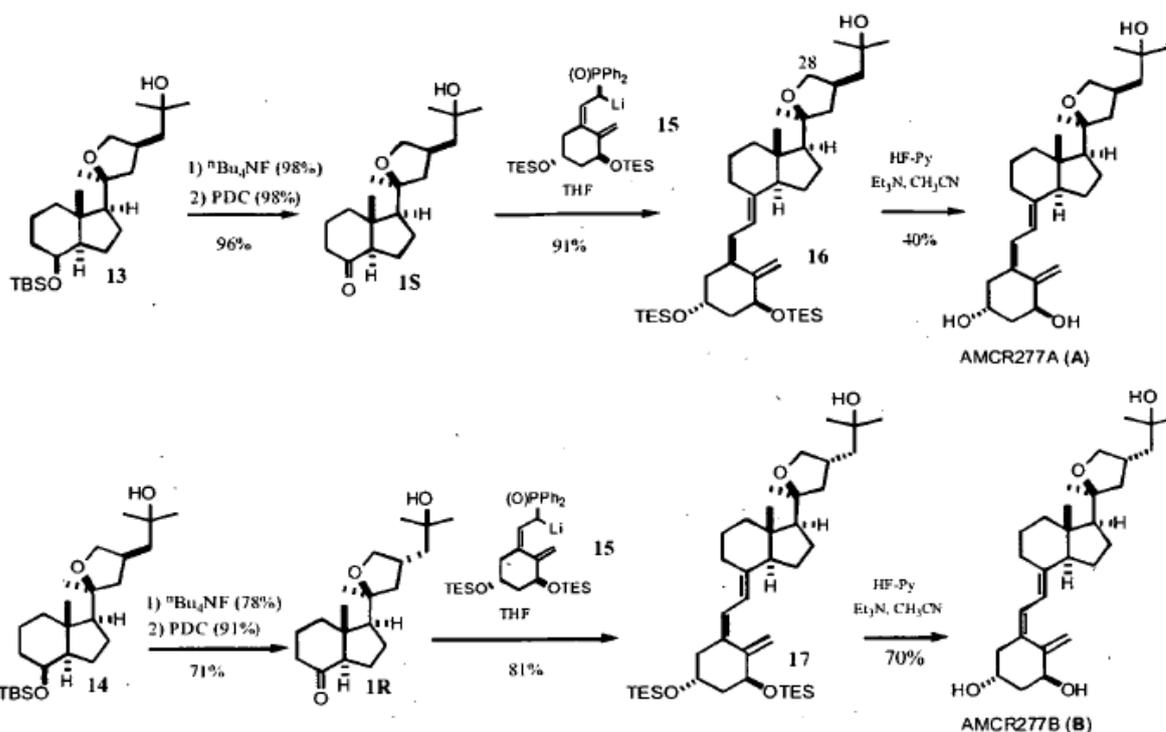
- 5 Cuando los compuestos de la fórmula (I) según la invención están en las formas de sales, ellas son preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales incluyen sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables, sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables, sales metálicas farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y de amonio alquilado. Las sales de adición de ácido incluyen sales de ácidos inorgánicos así como de ácidos orgánicos. Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen
- 10 los ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico, sulfúrico, perclórico, y similares. Los ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen los ácidos fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, y similares. Otros ejemplos de sales de adición de ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptables incluyen las sales farmacéuticamente aceptables listadas en J. Pharm. Sci. 1977, 66, 2, y en Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use editado por P. Heinrich Stahl and Camille G. Wermuth 2002. Los ejemplos de sales metálicas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, magnesio y similares. Los ejemplos de sales de amonio y de amonio alquilado incluyen sales de amonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, tetrametilamonio y similares. Los ejemplos de bases orgánicas incluyen lisina, arginina, guanidina, dietanolamincolina y similares.

- 20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar los compuestos definidos antes. Los compuestos de la invención se pueden preparar a partir de productos comercialmente disponibles, empleando una combinación de reacciones químicas conocidas por los expertos en la técnica.

En una realización particular, los compuestos A y B de la presente invención se pueden preparar poniendo en práctica la siguiente ruta de síntesis:

Síntesis del fragmento de anillo A





Siguiendo las recomendaciones contenidas en esta solicitud, un experto en la técnica sabe cómo adaptar este proceso para preparar otros compuestos según la fórmula (I).

- 5 La presente invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto como se ha definido antes en un soporte farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en asociación con otro agente activo.

Otro aspecto de la invención es usar los compuestos de la invención para tratar enfermedades que responden a los ligandos del receptor de Vitamina D.

- 10 Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de un compuesto como se ha definido antes para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de enfermedades que responden a los ligandos del receptor de Vitamina D, en particular el cáncer, trastornos dermatológicos, trastornos relacionados con la inflamación, enfermedades autoinmunes, osteodistrofia u osteoporosis.

- 15 La invención se refiere más particularmente a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de cáncer (incluyendo cáncer de mama, de próstata, de colon, o leucemia), trastornos relacionados con la inflamación (incluyendo reumatoide artritis, o artritis psoriásica), trastornos dermatológicos (incluyendo psoriasis o fotoenvejecimiento), enfermedades autoinmunes (incluyendo esclerosis múltiple o diabetes tipo I), osteodistrofia u osteoporosis, especialmente osteoporosis de bajo recambio óseo, osteoporosis inducida por esteroides, osteoporosis senil u osteoporosis postmenopáusica, osteomalacia u osteodistrofia renal.

- 20 La invención se refiere también a un método para el tratamiento de enfermedades que responden a los ligandos del receptor de Vitamina D, incluyendo en particular el cáncer (incluyendo cáncer de mama, de próstata, de colon, o leucemia), inflamación (incluyendo artritis reumatoide, o artritis psoriásica), trastornos dermatológicos (incluyendo psoriasis o fotoenvejecimiento), enfermedades autoinmunes (incluyendo esclerosis múltiple o diabetes tipo I), osteodistrofia u osteoporosis (incluyendo osteoporosis de bajo recambio óseo, osteoporosis inducida por esteroides, osteoporosis senil u osteoporosis postmenopáusica, osteomalacia u osteodistrofia renal), que comprende administrar a un sujeto, en particular un ser humano, que necesite dicho tratamiento, una dosis eficaz de un compuesto representado por la fórmula (I) o de una composición farmacéutica según la invención.

- 25 El tratamiento puede ser tópico, transdérmico, oral, rectal, sublingual, intranasal o parenteral. Los compuestos se pueden administrar por inyección o por perfusión intravenosa o soluciones estériles adecuadas, o en la forma de dosis líquidas o sólidas a través del canal alimentario, o en la forma de cremas, pomadas, parches, o vehículos similares adecuados para aplicaciones transdérmicas. Los compuestos pueden estar presentes en una composición en una cantidad de aproximadamente 0,01 $\mu\text{g/g}$ a aproximadamente 500 $\mu\text{g/g}$ de la composición, y se pueden administrar en dosis de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/día}$ a aproximadamente 50 $\mu\text{g/día}$ y más específicamente de aproximadamente 0,5 $\mu\text{g/día}$ a aproximadamente 2 $\mu\text{g/día}$.

Los compuestos se pueden formular como soluciones en disolventes farmacéuticamente compatibles o como emulsiones, suspensiones o dispersiones en disolventes o vehículo farmacéuticos adecuados, o como píldoras, comprimidos o cápsulas que contienen vehículos sólidos de un modo conocido en la técnica. Para uso tópico, los compuestos se formulan preferiblemente como cremas o pomadas o en una forma farmacéutica similar adecuada para uso tópico. La administración tópica incluye preparaciones líquidas o semi-líquidas tales como linimentos, lociones, aplicadores, emulsiones aceite en agua o agua en aceite tales como cremas, pomadas o pastas; o soluciones o suspensiones tales como gotas; o como pulverizaciones. Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden estar en la forma de unidades discretas como cápsulas, sobres, comprimidos o comprimidos para chupar, conteniendo cada una, una cantidad predeterminada del ingrediente activo; en la forma de polvo o gránulos; en la forma de una solución o una suspensión en un líquido acuoso o líquido no acuoso; o en la forma de una emulsión aceite en agua o una emulsión agua en aceite. Las formulaciones para administración rectal pueden estar en la forma de un supositorio que contiene el ingrediente activo y un vehículo tal como manteca de cacao, o en la forma de un enema. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral de forma conveniente comprenden una preparación estéril oleosa o acuosa del ingrediente activo que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor.

Cada una de dichas formulaciones puede contener también otros agentes auxiliares farmacéuticamente compatibles y no tóxicos, tales como, por ejemplo sustancias estabilizantes, antioxidantes, aglutinantes, colorantes, emulsionantes o aromatizantes. Las formulaciones de la presente invención comprenden un ingrediente activo en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de las formulaciones y no ser perjudicial para el receptor del mismo.

Los compuestos se aplican de forma ventajosa mediante inyección o perfusión intravenosa de soluciones estériles adecuadas o como dosis oral por el tracto digestivo o tópicamente en la forma de cremas, pomadas, lociones o emplastos transdérmicos adecuados.

Por "cantidad eficaz" se quiere decir aquella la cantidad del agente farmacéutico correspondiente a la fórmula (I) que previene, remueve o reduce los efectos perjudiciales de una enfermedad en los mamíferos, incluyendo los seres humanos. Se entiende que la dosis administrada puede ser adaptada por los expertos en la técnica según el paciente, la patología, el modo de administración, etc.

Siempre que dentro de esta memoria descriptiva completa se mencione "tratamiento de una afección o trastorno" o similares con referencia a un compuesto de la fórmula (I), significa:

- a) un método para tratar una afección o trastorno, comprendiendo dicho método administrar un compuesto de la invención a un sujeto que necesite tal tratamiento;
- b) el uso de un compuesto de la invención para el tratamiento de una afección o de un trastorno;
- c) el uso de un compuesto de la invención para la fabricación de una preparación farmacéutica para el tratamiento de una afección o de un trastorno; y/o
- d) una preparación farmacéutica que comprende una dosis de un compuesto de la invención que es apropiada para el tratamiento de una afección o de un trastorno.

Dentro del contexto de la invención, el término tratamiento indica tratamiento curativo, sintomático, y preventivo. Los compuestos de la invención se pueden usar en los seres humanos con enfermedad declarada, incluyendo en las etapas iniciales y tardías del progreso de la enfermedad. Los compuestos de la invención no curarán necesariamente al paciente que tiene la enfermedad pero retrasarán o harán más lento el progreso o evitarán el progreso posterior de la enfermedad, mejorando con ello la condición de los pacientes. Los compuestos de la invención se pueden administrar también a los que no tienen las enfermedades y entonces aquellos que normalmente desarrollarían la enfermedad o están en riesgo elevado de enfermedad, no desarrollarán la enfermedad. El tratamiento incluye también retrasar el desarrollo de la enfermedad en un individuo que a la larga desarrollará la enfermedad o estaría en riesgo de enfermedad debido a la edad, historia familiar, anormalidades genéticas o cromosómicas, y/o debido a la presencia de uno o más marcadores biológicos de la enfermedad, tales como una conocida mutación genética en tejidos o fluidos. Retrasando el comienzo de la enfermedad, los compuestos de la invención han evitado que el individuo adquiera la enfermedad durante el periodo en que el individuo habría adquirido normalmente la enfermedad o han reducido la velocidad de desarrollo de la enfermedad o alguno de sus efectos por la administración de compuestos de la invención hasta el tiempo en que el individuo finalmente adquiere la enfermedad. El tratamiento incluye también la administración de los compuestos de la invención a aquellos individuos que se cree que están predispuestos a la enfermedad. En el tratamiento de las enfermedades anteriores, los compuestos de la invención se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Tales compuestos, composiciones que comprenden los mismos, o tratamiento se pueden poner en práctica solos o en combinación con otros ingredientes activos, composiciones o tratamientos. Los compuestos se pueden administrar adecuadamente solos, o junto con dosis graduales de otro ingrediente activo, tal como un compuesto de vitamina D, por ejemplo 1 α -hidroxivitamina D2 o D3, o 1 α ,25-dihidroxivitamina D3, en situaciones en que se

encuentra que son ventajosos diferentes grados de movilización de los minerales óseos y de estimulación del transporte del calcio. Además, puede corresponder al tratamiento de trastornos crónicos o agudos.

Otros aspectos y ventajas de esta invención serán descritos en los siguientes ejemplos, que se deben considerar como ilustrativos y no limitantes del alcance de esta solicitud.

5 Leyendas de las figuras

Figura 1: Estructuras químicas del ligando conocido $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y nuevos ligandos (compuestos A y B)

Figura 2: Activación transcripcional de VDR por $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, compuesto A y compuesto B. Se transfectaron de forma transitoria células 293 EBNA con un plásmido indicador UAS-TATA-luciferasa y un plásmido de expresión de DBD GAL4-LBD VDR y se trataron seguidamente con $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, compuesto A (A), y compuesto B (B) a 10^{-10} y 10^{-9} M. La actividad de luciferasa para cada muestra se normalizó con la actividad de la β -galactosidasa. Los datos se muestran como multiplicación de la inducción de la actividad de luciferasa inducida por el agonista dividida por la actividad de luciferasa del vehículo.

Figura 3: Efectos de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y nuevos ligandos (compuestos A y B) sobre los niveles de calcio en suero. (Figura 3.1) Se administró a los ratones el vehículo (aceite de sésamo), o 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, o 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de compuesto A o 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de compuesto B durante 7 días. (Figura 3.2) Se administró a los ratones el vehículo (Veh), o $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (D3), o compuesto A durante 4 días. Se presentan los datos como la media \pm SEM. Las diferencias significativas están marcadas como * $p < 0,05$, *** $p < 0,01$.

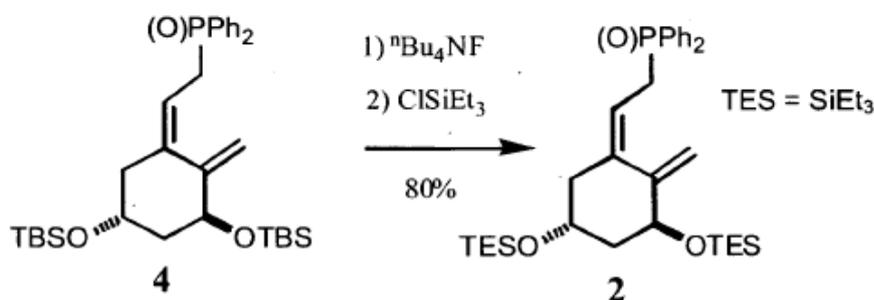
EJEMPLOS

I. Síntesis de los compuestos A y B

20 Todas las reacciones que incluyen compuestos sensibles al oxígeno o a la humedad se llevaron a cabo en una atmósfera de Ar seco. Las temperaturas de reacción se refieren a las temperaturas del baño externo. Todos los disolventes se destilaron bajo Ar inmediatamente antes de su uso. El tetrahidrofurano (THF) se destiló sobre Na/benzofenona; el diclorometano (CH_2Cl_2) se destiló sobre P_2O_5 ; el acetonitrilo (CH_3CN), $i\text{-Pr}_2\text{NH}$, Et_3N y $i\text{-Pr}_2\text{NET}$ se destilaron sobre CaH_2 . Los reactivos líquidos o las soluciones de reactivos se añadieron con jeringa o con cánula.

25 Los extractos orgánicos se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron utilizando un evaporador rotatorio a una presión de aspiración (20-30 mm de Hg). Se hizo el seguimiento de las reacciones por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando placas de gel de sílice Merck 60 (0,2 mm de espesor) con soporte de aluminio; los cromatogramas se visualizaron en primer lugar con luz ultravioleta (254 nm) y después por inmersión en una solución de ácido fosfomolibdico en EtOH (5 %), seguido por calentamiento. La cromatografía en columna rápida se llevó a cabo con gel de sílice Merck 60 (230-400 mallas). Todos los espectros NMR se midieron con soluciones en CDCl_3 a menos que se indique otra cosa. Los desplazamientos químicos se presentan en la escala δ (ppm) con relación al tetrametilsilano ($\delta = 0,0$ ppm) utilizando la señal de disolvente residual a $\delta = 7,26$ ppm (^1H) o $\delta = 77$ ppm (^{13}C) como estándar interno; las constantes de acoplamiento se presentan en Hz. Se utilizó la técnica Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) para asignar los tipos de carbono.

35 [(2Z)-2-[(3S,5R)-5-Bis[triethylsilyl]-2-metilenciclohexiliden]-etil]difenilfosfina (Óxido) (2)



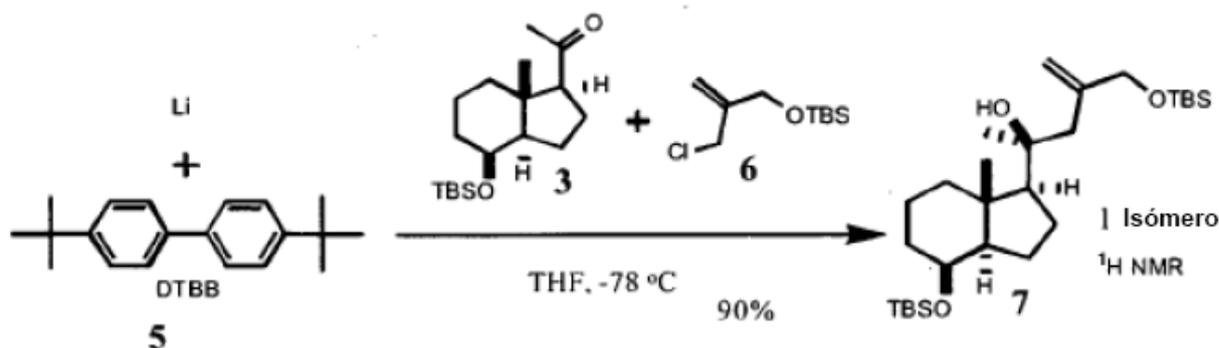
Una solución del compuesto 4 (2,23 g, 3,82 mmol) en THF seco (20 mL) se trató con $^t\text{Bu}_4\text{NF}$ (3,2 g, 10 mmol). Después de concentración se extrajo el residuo con CH_2Cl_2 (3 \times 20 mL). La fase orgánica se secó, se filtró y se concentró a vacío. Se disolvió el residuo en piridina seca (10 mL) y se trató con ClSiEt_3 (1,5 g, 9,9 mmol) y DMAP (4-dimetilaminopiridina, 20 mg). Después de 15 min, se sofocó la reacción por la adición de una solución saturada de NaHCO_3 (20 mL). Se extrajo la mezcla con CH_2Cl_2 (2 \times 30 mL). La fase orgánica se secó, se filtró y se concentró a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO_2 , 3 \times 10 cm, EtOAc al 15 % -hexanos) para dar el compuesto 2 (1,78 g, 80 %, aceite incoloro).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 7,59~7,68 [m, 4H, (O)PPh₂], 7,26~7,43 [m, 6H, (O)PPh₂], 5,10~5,25 (m, 2H), 4,81 (s, 1H), 4,30 (m, 0,73H), 4,03~4,08 (m, 0,83H), 3,35~3,48 (m, 1H), 3,02~3,15 (m, 1H), 2,36 (d, $J=11,8\text{Hz}$, 1H), 1,97~2,10 (m, 2,42H), 1,67~1,75 (m, 1,2H), 1,19~1,21 (m, 1,86H).

5 $^{13}\text{C-NMR}$ (62,89 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 4,60 (CH_2), 4,64 (CH_2), 6,72 (CH_3), 6,75 (CH_3), 30,88 (CH_2), 32,00 (CH_2), 44,89 (CH_2), 45,46 (CH_2), 67,06 (CH), 70,38 (CH), 110,35 (CH_2), 115,12 (CH), 115,24 (CH), 128,28 (CH), 128,46 (CH), 130,85 (CH), 130,95 (CH), 130,99 (CH), 131,09 (CH), 131,57 (CH), 131,92 (C), 133,48 (C), 140,75 (C), 140,95 (C), 147,61 (C).

MS [m/z , (%): 582,31 (100), 583,31 (45,8), 584,31 (10,6), 584,32 (7,1), 585,31 (2,9), 585,32 (1,7)

10 **(S)-4-(*tert*-butildimetilsililoxi)-2-((3S,3aS,7S,7aR)-octahidro-7-(*tert*-butildimetilsililoxi)-3a-metil-1H-inden-3-il)pent-4-en-2-ol (7)**



TBS significa "*tert*-butildimetilsililo".

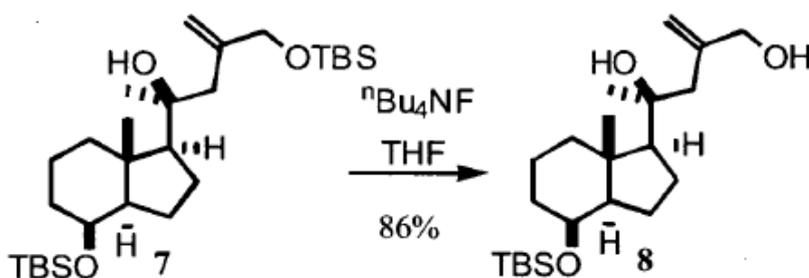
15 Se cortó litio (330 mg, 47,55 mmol) en pequeñas porciones y se añadió a una solución de 4,4'-di-*tert*-butil-bifenilo (DTBB, 1,3 g, 4,88 mmol) en tetrahidrofurano seco (THF, 40 mL) bajo argón. Después de sonicación durante 40 min se observó un color verde. Se enfrió la mezcla a $-78\text{ }^\circ\text{C}$. Se añadió lentamente una solución del compuesto **3** (B. Fernández, J. A. Martínez-Pérez, J. R. Granja, L. Castedo, y A. Mouriño *J. Org. Chem.* 1992, 57, 3173-3178) (0,7 mg, 2,25 mmol) y del compuesto **6** (M. Sworin and K.-C. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 1815) (2,9 g, 11,36 mmol) en THF seco (15 mL). El color verde cambia a color rojo. Se sofocó la reacción por la adición de metanol (1 mL). Se añadieron sucesivamente Et_2O (30 mL) y H_2O (30 mL). La fase orgánica se extrajo con Et_2O (2 \times 30 mL).
20 Las fases orgánicas reunidas se secaron (Na_2SO_4), se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO_2 , 2,5 \times 11 cm, Hexanos) para dar el compuesto **7** (1,3 g, 95 %, aceite incoloro).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 0,00 (s, 6H, TBS), 0,08 (s, 6H, TBS), 0,88 (s, 9H, TBS), 0,92 (s, 9H, TBS), 1,11 (s, 3H), 1,23 (s, 3H), 4,04 (m, 1H, HC-OTBS), 4,14 (s, 2H, $\text{H}_2\text{C-OTBS}$), 4,86 (s, 1H, $\text{CH}_2=$), 5,16 (s, 1H, $\text{CH}_2=$).

25 $^{13}\text{C-NMR}$ (62,89 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): $-5,35$ (CH_3), $-4,83$ (CH_3), 15,42 (CH_3), 17,62 (CH_2), 17,99 (C), 18,34 (C), 21,84 (CH_2), 22,82 (CH_2), 25,78 (CH_3), 25,91 (CH_3), 26,06 (CH_3), 34,34 (CH_2), 41,21 (CH_2), 43,02 (C), 47,04 (CH_2), 53,08 (CH), 60,55 (CH), 67,37 (CH_2), 69,49 (CH), 74,26 (C), 114,33 (CH_2), 145,22 (C)

MS [m/z , (%): 496,38 (100,0), 497,38 (41,2), 498,38 (8,5), 498,37 (6,7), 499,38 (2,9)

(S)-4-((3S,3aS,7S,7aR)-octahidro-7-(*tert*-butildimetilsililoxi)-3a-metil-1H-inden-3-il)-2-metilenpentano-1,4-diol (8)



30 Una solución del compuesto **7** (1,3 g, 2,6 mmol) en THF seco (6 mL) se trató con $^n\text{Bu}_4\text{NF}$ (1,6 g, 5 mmol). Después de 1 h, se añadió una solución saturada de NaHCO_3 (30 mL). Se extrajo la mezcla con EtOAc (3 \times 30 mL). La fase orgánica se secó, se filtró y se concentró a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO_2 , 3 \times 10 cm, Et_2O al 25 %-hexanos) para dar el compuesto **8** (0,86 g, 86 %, sólido blanco, punto de fusión: $95\text{ }^\circ\text{C}$). Análisis elemental: C = 68,12 %, H = 11,18 %
35

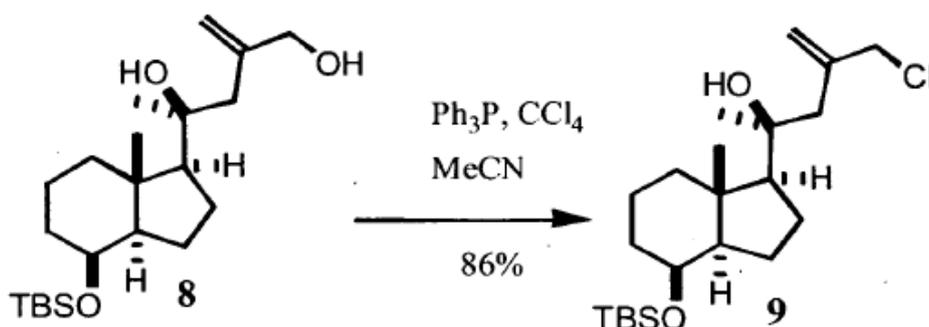
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 0,00 (ds, 6H, $\text{CH}_3\text{Si} \times 2$), 0,88 (s, 9H, $^t\text{BuSi}$), 1,13 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Cy}$), 1,27 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C-OH}$), 4,00-4,08 (m, 3H, CH_2OH , CH-OTBS), 4,83 (s, 1H, C=H_2), 4,10 (s, 1H, C=H_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62,89 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -5,22 (CH_3), -4,86 (CH_3), 15,50 (CH_3), 17,51 (CH_2), 17,94 (C), 21,68 (CH_2), 22,71 (CH_2), 25,74 (CH_3), 25,74 (CH_3), 34,18 (CH_2), 41,08 (CH_2), 43,04 (C), 47,04 (CH_2), 52,91 (CH), 60,58 (CH), 67,12 (CH_2), 69,35 (CH), 75,26 (C), 116,18 (CH_2), 145,43 (C)

MS [m/z , (%): 496,38 (100,0), 497,38 (41,2), 498,38 (8,5), 498,37 (6,7), 499,38 (2,9)

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_3\text{Si}$: C, 69,05; H, 11,06; O, 12,54; Si, 7,34. Encontrado: C, 68,13; H, 11,18

(S)-4-(clorometil)-2-((3S,3aS,7S,7aR)-octahidro-7-(terc-butildimetilsililoxi)-3a-metil-1H-inden-3-il)pent-4-en-2-ol (9)

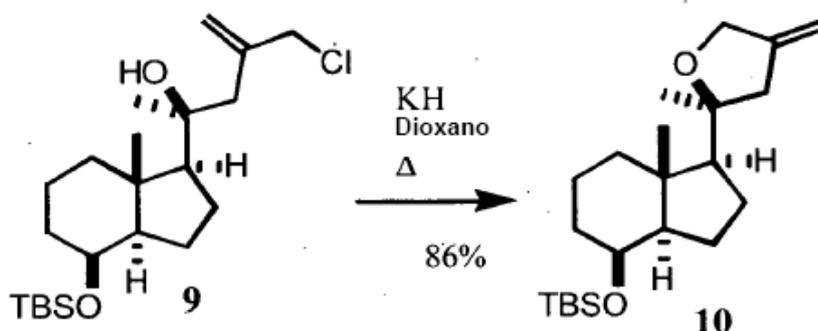


Una mezcla del compuesto **8** (82 mg, 0,2 mmol), Ph_3P (85 mg, 3,32 mmol), CCl_4 (54 mg, 0,35 mmol, secado con CaCl_2), y CH_3CN (2 mL, secado con CaH_2); se agitó durante 30 min bajo argón. Se sometió la mezcla a cromatografía rápida (SiO_2 , $2,5 \times 5$ cm, EtOAc al 5 %-hexanos) para dar el compuesto **9** (70 mg, 77 %). Este compuesto inestable se usó inmediatamente en la siguiente etapa.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 0,00 (ds, 6H, $\text{CH}_3\text{Si} \times 2$), 0,88 (s, 9H, $^t\text{BuSi}$), 1,12 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Cy}$), 1,25 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C-OH}$), 4,00-4,02 (m, 1H, CH-OTBS), 4,10 (d, $J=11,6$ Hz, 1H $\text{CH}_2\text{-Cl}$), 4,29 (d, $J=11,6$ Hz, 1H $\text{CH}_2\text{-Cl}$), 5,0 (s, 1H, C=H_2), 5,3 (s, 1H, C=H_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62,89 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -5,18 (CH_3), -4,80 (CH_3), 15,56 (CH_3), 17,56 (CH_2), 17,99 (C), 21,78 (CH_2), 22,76 (CH_2), 25,78 (CH_3), 25,78 (CH_3), 34,22 (CH_2), 41,10 (CH_2), 43,05 (C), 45,61 (CH_2), 49,67 (CH_2), 52,97 (CH), 60,28 (CH), 69,37 (CH), 75,39 (C), 118,57 (CH_2), 142,58 (C)

(S)-tetrahidro-2-((3S,3aS,7S,7aR)-octahidro-7-(terc-butildimetilsililoxi)-3a-metil-11H-inden-3-il)-2-metil-4-metilenfurano (10)



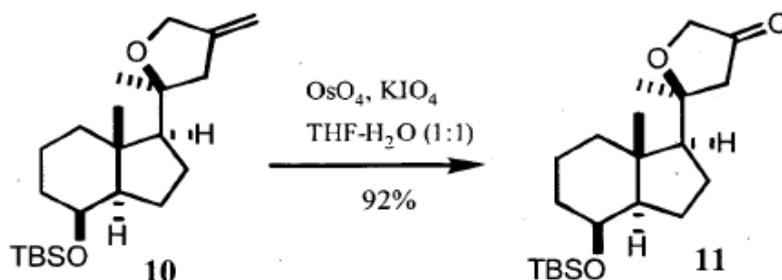
Una solución del compuesto **9** (0,5 g, 1,32 mmol) en dioxano seco (5 mL), se trató con KH (0,3 g, 7,5 mmol). Se calentó la mezcla a reflujo. Después de 30 min, se sofocó la reacción por la adición de metanol (1 mL) y H_2O (10 mL). Se extrajo la mezcla con Et_2O (3×15 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO_2 , $2,5 \times 7$ cm, hexanos) para dar el compuesto **10** (0,4 g, 86 %, aceite incoloro). $^1\text{H-NMR}$ --- $^{13}\text{C-NMR}$. HRMS (FAB)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 0,00 (ds, 6H, $\text{CH}_3\text{Si} \times 2$), 0,87 (s, 9H, $^t\text{BuSi}$), 1,10 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Cy}$), 1,21 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C-O}$), 2,38 (d, 1H, $J=13,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C=}$), 2,11 (d, 1H, $J=13,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C=}$), 4,34 (m, 2H= $\text{C-CH}_2\text{-O}$), 4,01 (m, 1H, CH-OTBS), 4,92 (s, 1H, C=H_2), 5,14 (s, 1H, C=H_2)

¹³C-NMR (62,89 MHz, CDCl₃, δ, ppm): -5,21 (CH₃), -4,85 (CH₃), 15,63 (CH₃), 17,57 (CH₂), 17,97 (C), 22,26 (CH₂), 22,90 (CH₂), 24,70 (CH₃), 25,77 (CH₃), 34,38 (CH₂), 40,89 (CH₂), 42,77 (C), 44,42 (CH₂), 52,92 (CH), 59,21 (CH), 69,38 (CH), 69,84 (CH₂), 85,58 (C), 103,99 (CH₂), 148,77 (C)

5 MS [m/z, (%): 105,06 (44,23), 107,07 (50,80), 109,09 (23,70), 115,09 (29,42), 119,08 (36,92), 121,10 (36,07), 131,08 (24,96), 133,10 (55,50), 135,12 (67,29), 159,13 (31,40), 161,14 (67,45), 171,13 (92,61), 201,17 (25,35), 213,17 (58,40), 231,18 (43,82), 363,27 (100,00), 364,28 (31,41), 379,27 (34,03),

(S)-dihidro-5-((3S,3aS,7S,7aR)-octahidro-7-(*tert*-butildimetilsililoxi)-3a-metil-1H-inden-3-il)-5-metilfuran-3(2H)-ona (11)



10 Se trató el alqueno **10** (140 mg, 0,38 mmol), en THF/H₂O (40 mL, 1:1) con peryodato de sodio (415 mg, 1,8 mmol) y una solución de tetróxido de osmio en H₂O (0,2 mL, 4) y se dejó durante la noche a temperatura ambiente. Se trató la mezcla de reacción con una solución saturada de NaCl (40 mL). Se extrajo la mezcla con Et₂O (3 × 50 mL). Las fases orgánicas se secaron, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO₂, 2,5 × 8 cm, EtOAc al 5 %-hexanos) para dar el compuesto **11** (130 mg, 91 %, sólido blanco, punto de fusión: 52 °C).

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 0,00 (s, 6H, CH₃Si × 2), 0,87 (s, 9H, ^tBuSi), 1,07 (s, 3H, CH₃-CO), 1,34 (s, 3H, CH₃-Cy), 2,15 (d, J=17,9 Hz, 1H, CH₃-CO), 2,59 (d, J=17,9 Hz, 1H, CH₃-CO), 3,99 (d, J=17,5 Hz, 1H, O-CH₂-CO), 4,00 (m, 1H, HC-OTBS), 4,09 (d, J=17,5, 1H, O-CH₂-CO).

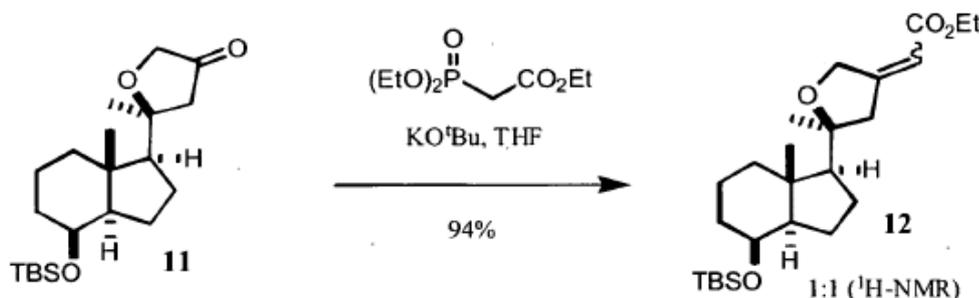
20 ¹³C-NMR (62,89 MHz, CDCl₃, δ, ppm): -5,19 (CH₃), -4,83 (CH₃), 15,87 (CH₃), 17,49 (CH₂), 17,98 (C), 22,32 (CH₂), 22,77 (CH₂), 25,21 (CH₃), 25,77 (CH₃), 34,25 (CH₂), 40,85 (CH₂), 42,89 (C), 48,64 (CH₂), 52,87 (CH), 59,15 (CH), 69,22 (CH), 69,92 (CH₂), 84,80 (C), 216,53 (C).

MS [m/z, (%): 133,1 (49,50), 135,1 (63,31), 136,0 (46,33), 137,0 (39,60), 154,1 (20,35), 161,1 (100), 171,1 (73,46), 176,1 (21,68), 199,1 (25,37), 221,1 (22,8), 225,2 (18,55), 233,1 (28,22), 235,2 (16,04), 265,2 (12,96), 291,2 (19,14), 307,1 (6,55), 309,2 (11,30), 363,2 (29,53), 365,2 (67,50), 366,24 (24,74), 367,2 (32,01), 462,2 (28,50).

25 **acetato de (Z)-etil 2-((S)-dihidro-5-((3S,3aS,7S,7aR)-octahidro-7-(*tert*-butildimetilsililoxi)-3a-metil-1H-inden-3-il)-5-metilfuran-3(2H)-ilideno) (12Z)**

y

acetato de (E)-etil 2-((S)-dihidro-5-((3S,3aS,7S,7aR)-octahidro-7-(*tert*-butildimetilsililoxi)-3a-metil-1H-inden-3-il)-5-metilfuran-3(2H)-ilideno) (12E)



30 Se añadió fosfonoacetato de trietilo seco (2,04 mL, 10,2 mmol) gota a gota a una solución en agitación de *tert*-butóxido de potasio (1,4 g, 10,2 mmol) en THF seco (10 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h. Se enfrió la mezcla a -8 °C y se añadió entonces una solución del compuesto **11** (0,6 g, 1,57 mmol) en THF seco (5 mL). Después de 1 h a -8 °C, se añadieron una solución saturada de cloruro de amonio (10 mL) y H₂O (25 mL).

35 Se extrajo la mezcla con Et₂O (4 × 50 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron, se filtraron y se concentraron a

vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO₂, 2,5 × 9 cm, Et₂O al 5 %-hexanos) para dar el compuesto **12** (680 mg, 94 %, sólido blanco, punto de fusión: 101 °C).

Compuestos con menor polaridad:

5 ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ, ppm): -0,03 (s, 3H, CH₃Si), -0,02 (s, 3H, CH₃Si), 0,86 (s, 9H, ^tBuSi), 1,03 (s, 3H, CH₃-Cy), 1,19 (s, 3H, CH₂-CO), 1,26 (t, J=7,1 Hz, 3H, CH₃-CH₂-OCO), 3,99 (m, 1H, HC-OTBS), 4,14 (q, J=7,1 Hz, 2H, CH₃-CH₂-OCO), 5,73 (m, 1H, H-C=CO₂Et).

¹³C-NMR (62,89 MHz, CDCl₃, δ, ppm): -5,22 (CH₃), -4,86 (CH₃), 14,27 (CH₃), 15,59 (CH₃), 17,52 (CH₂), 17,95 (C), 22,19 (CH₂), 22,86 (CH₂), 24,84 (CH₃), 25,75 (CH₃), 34,31 (CH₂), 40,83 (CH₂), 42,79 (C), 43,84 (CH₂), 52,86 (CH), 58,95 (CH₂), 59,79 (CH), 69,31 (CH), 70,68 (CH₂), 86,69 (C), 110,21 (CH), 163,23 (C), 166,42 (C).

10 Compuestos con mayor polaridad:

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ, ppm): -0,02 (s, 3H, CH₃Si), -0,01 (s, 3H, CH₃Si), 0,86 (s, 9H, ^tBuSi), 1,04 (s, 3H, CH₃-Cy), 1,18 (s, 3H, CH₃-CO), 1,26 (t, J=7,1 Hz, 3H, CH₃-CH₂-OCO), 2,35 (d, J=16,8 Hz, 1H, CH₂C=), 2,77 (d, J=16,8 Hz, 1H, CH₂C=), 3,99 (m, 1H, HC-OTBS), 4,13 (q, J=7,1 Hz, 2H, CH₃-CH₂-OCO), 5,77 (s, 1H, H-C=CO₂Et).

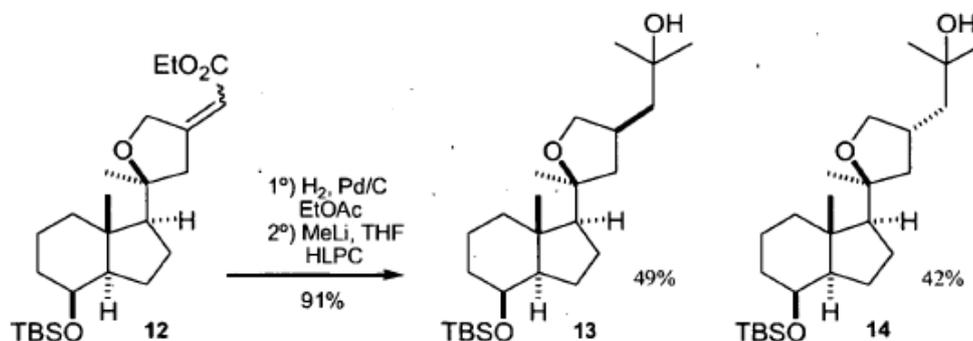
15 ¹³C-NMR (62,89 MHz, CDCl₃, δ, ppm): -5,21 (CH₃), -4,85 (CH₃), 14,28 (CH₃), 15,69 (CH₃), 17,52 (CH₂), 17,96 (C), 22,24 (CH₂), 22,83 (CH₂), 24,02 (CH₃), 25,76 (CH₃), 34,30 (CH₂), 40,82 (CH₂), 42,76 (C), 45,72 (CH₂), 52,88 (CH), 58,63 (CH), 59,92 (CH₂), 69,28 (CH), 69,95 (CH₂), 84,25 (C), 111,26 (CH), 164,08 (C), 166,08 (C).

Análisis elemental. Calculado para C₂₅H₄₄O₄Si: C, 68,76; H, 10,16; O, 14,65; Si, 6,43, Encontrado: C, 68,71; H, 10,43

MS [m/z, (%): 136,04 (28,37) 137,05 (25,77), 141,06 (21,07), 154,06 (26,06), 169,09 (100,00), 305,20 (23,33), 435,28 (29,90), 436,29 (19,78), 437,30 (33,42), 532,27 (16,89).

20 **1-((3S,5S)-tetrahidro-5-((3S,3aS,7S,7aR)-octahidro-7-(*terc*-butildimetilsililoxi)-3a-metil-1H-inden-3-il)-5-metilfuran-3-il)-2-metilpropan-2-ol (13)**

1-((3R,5S)-tetrahidro-5-((3S,3aS,7S,7aR)-octahidro-7-(*terc*-butildimetilsililoxi)-3a-metil-1H-inden-3-il)-5-metilfuran-3-il)-2-metilpropan-2-ol (14)



25 Una suspensión del compuesto **12** (680 mg, 1,56 mmol) y Pd/C al 5 % (15 mg, 0,15 mmol) en EtOAc (20 mL), se agitó en atmósfera de H₂ (1 atm) durante 12 h. Se filtró la mezcla y se concentró a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO₂, 2,5 × 6,5 cm, hexanos) para dar el compuesto **12a** (660 mg, 96 %, aceite incoloro).

30 Se añadió una solución de MeLi en THF (10 mL, 10 mmol, 1 M) a una solución del compuesto **12a** (660 mg, 1,5 mmol) en THF seco (5 mL). Se agitó la mezcla durante 30 min y después se templó a 0 °C a lo largo de 1 h. Se añadieron lentamente MeOH (0,5 mL) y NH₄Cl saturado (4 mL). Se extrajo la capa acuosa con éter (4 × 30 mL), y las capas orgánicas reunidas se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo por HPLC (columna Phenomenex 250 × 10 mm, 5 Φ-hexano-Et₂O) para dar el compuesto **13** (330 mg, 49 % en 2 etapas) y el compuesto **14** (280 mg, 42 % en 2 etapas)

MS [m/z, (%): 424,34 (100,0), 425,34 (32,8), 426,34 (5,6), 426,33 (3,3), 427,34 (1,3)

35 Compuestos con menor polaridad:

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ, ppm): -0,04 (s, 3H, CH₃Si), -0,03 (s, 3H, CH₃Si), 0,85 (s, 9H, ^tBuSi), 1,00 (s, 3H, CH₃-Cy), 1,18 (s, 6H, 2 × CH₃-C-OH), 1,23 (s, 3H, CH₃-CO), 3,34 (t, J=9 Hz, 1H, OCH₂Cy), 3,97 (m, 1H, HCOTBS), 4,04 (t, 1H, J=7 Hz, OCH₂Cy)

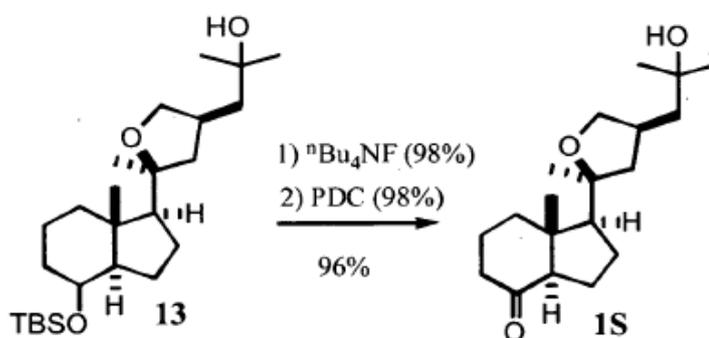
^{13}C -NMR (62,89 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -5,19 (CH_3), -4,83 (CH_3), 15,04 (CH_3), 17,57 (CH_2), 17,98 (C), 22,25 (CH_2), 22,77 (CH_2), 25,78 (CH_3), 27,53 (CH_3), 29,68 (CH_3), 30,10 (CH_3), 34,40 (CH_2), 35,77 (CH), 40,96 (CH_2), 42,81 (C), 47,14 [$2 \times (\text{CH}_2)$], 52,96 (CH), 60,12 (CH), 69,40 (CH), 70,93 (C), 73,17 (CH_2), 84,99 (C).

Compuestos con mayor polaridad:

5 ^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -0,02 (s, 3H, CH_3Si), -0,01 (s, 3H, CH_3Si), 0,87 (s, 9H, $^t\text{BuSi}$), 1,03 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Cy}$), 1,21 (s, 9H, $2 \times \text{CH}_3\text{-C-OH}$, $\text{CH}_3\text{-C-O-CH}_2$), 3,33 (dd, $J=8,5, 9,7$, OCH_2Cy), 3,98 (m, 1H, HCOTBS), 4,09 (t, 1H, $J=7,8$ Hz, OCH_2Cy)

10 ^{13}C -NMR (62,89 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): -5,19 (CH_3), -4,83 (CH_3), 15,53 (CH_3), 17,57 (CH_2), 17,98 (C), 22,21 (CH_2), 22,73 (CH_2), 25,78 (CH_3), 27,14 (CH_3), 29,81 (CH_3), 30,01 (CH_3), 34,13 (CH), 34,38 (CH_2), 40,93 (CH_2), 42,69 (C), 46,08 (CH_2), 46,40 (CH_2), 52,96 (CH), 60,08 (CH), 69,38 (CH), 70,94 (C), 74,88 (CH_2), 85,19 (C).

(1S,3aR,7aR)-octahidro-1-((2S,4S)-tetrahidro-4-(2-hidroxi-2-metilpropil)-2-metilfuran-2-il)-7a-metilinden-4-ona (1S)



15 **(1S,3aR,4S,7aS)-octahidro-1-((2S,4S)-tetrahidro-4-(2-hidroxi-2-metilpropil)-2-metilfuran-2-il)-7a-metil-1H-inden-4-ol (13a)**

Una solución del compuesto **13** (330 mg, 0,78 mmol) en THF seco (4 mL) se trató con $^n\text{Bu}_4\text{NF}$ (1,02 g, 3,25 mmol). Se calentó la mezcla a reflujo durante 90 h. Se añadieron H_2O (20 mL) y EtOAc (20 mL). Se extrajo la capa acuosa con EtOAc (4×20 mL) y las capas orgánicas reunidas se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO_2 , $2 \times 5,5$ cm, EtOAc al 30 %-hexanos) para dar el compuesto **13a** (224 mg, 93 %, sólido blanco, punto de fusión: 98°C).

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_3$: C, 73,50; H, 11,04; O, 15,46. Encontrado C, 73,29, H, 11,35

(1S,3aR,7aR)-octahidro-1-((2S,4S)-tetrahidro-4-(2-hidroxi-2-metilpropil)-2-metilfuran-2-il)-7a-metilinden-4-ona (1S)

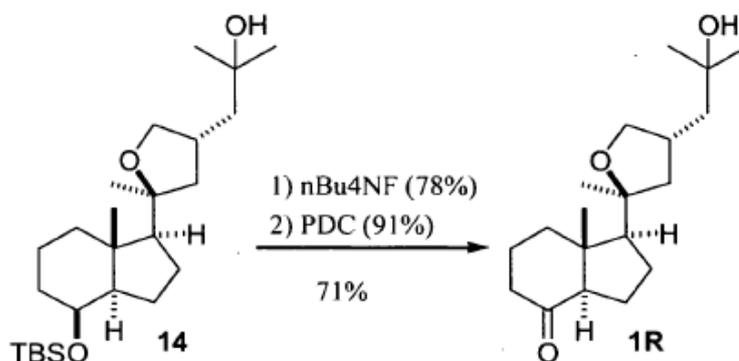
25 Una solución del compuesto **13a** (123 mg, 0,4 mmol) en CH_2Cl_2 seco (10 mL), se trató con PDC (dicromato de piridinio, 0,6 g, 1,6 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 h. Se filtró la mezcla y se concentró a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO_2 , $3 \times 5,5$ cm, EtOAc al 20 %-hexanos) para dar el compuesto **1S** (120 mg, 98 %, sólido blanco, punto de fusión: 87°C). Análisis elemental C = 73,80 %, H = 10,51 %.

30 ^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 0,65 (s, 3H, CH_3Cy), 1,13 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3\text{-COH}$), 1,20 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C-OCH}_2$), 3,29 (t, 1H, $J=9,2$ Hz CH_2OCy), 4,00 (t, 1H, $J=7,8$ Hz, OCH_2Cy)

^{13}C -NMR (62,89 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 13,42 (CH_3), 18,63 (CH_2), 22,41 (CH_2), 23,76 (CH_2), 27,81 (CH_3), 29,47 (CH_3), 29,99 (CH_3), 35,68 (CH), 38,93 (CH_2), 40,67 (CH_2), 46,59 (CH_2), 46,76 (CH_2), 49,90 (C), 59,68 (CH), 61,80 (CH), 70,45 (C), 73,08 (CH_2), 83,99 (C), 212,01 (C).

Análisis elemental. Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_3$: C, 73,98; H, 10,46; O 15,56. Encontrado C, 73,80, H, 10,51

35 **(1S,3aR,7aR)-octahidro-1-((2S,4R)-tetrahidro-4-(2-hidroxi-2-metilpropil)-2-metilfuran-2-il)-7a-metilinden-4-ona (1R)**



(1S,3aR,4S,7aS)-octahidro-1-((2S,4R)-tetrahidro-4-(2-hidroxi-2-metilpropil)-2-metilfuran-2-il)-7a-metil-1H-inden-4-ol 14a

- 5 Una solución del compuesto **14** (280 mg, 0,78 mmol) en THF seco (4 mL), se trató con ⁿBu₄NF (1,05 g, 3,3 mmol). Se calentó la mezcla a reflujo. Después de 115 h se añadieron H₂O (20 mL) y EtOAc (20 mL). Se extrajo la capa acuosa con EtOAc (4 × 20 mL) y las capas orgánicas reunidas se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO₂, 2 × 5,5 cm, EtOAc al 30 %-hexanos) para dar el correspondiente diol **14a** (180 mg, 88 %, sólido blanco, punto de fusión: 67 °C).

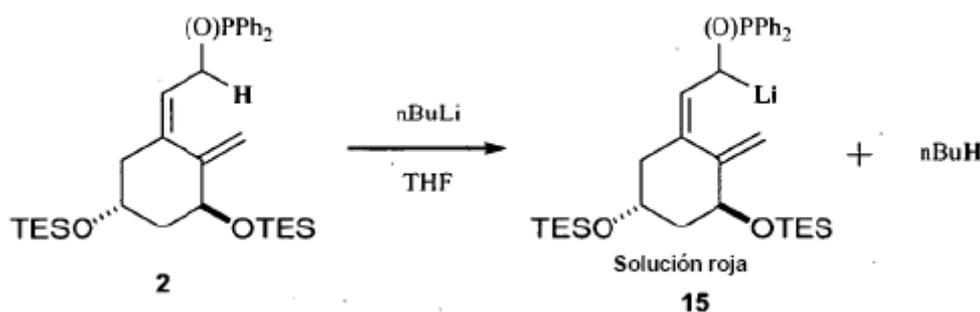
(1S,3aR,7aR)-octahidro-1-((2S,4R)-tetrahidro-4-(2-hidroxi-2-metilpropil)-2-metilfuran-2-il)-7a-metilinden-4-ona (1R)

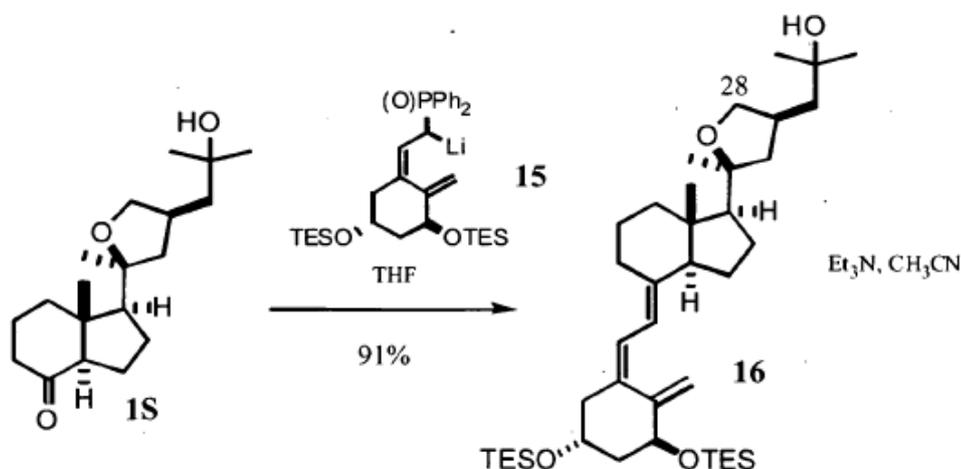
- 10 Una solución del compuesto **14a** (100 mg, 0,32 mmol) en CH₂Cl₂ seco (10 mL) se trató con PDC (dicromato de piridinio, 0,5 g, 1,3 mmol). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 h, se filtró la mezcla y se concentró a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO₂, 3 × 5,5 cm, EtOAc al 20 %-hexanos) para dar el compuesto **1R** (90 mg, 91 %, sólido blanco, punto de fusión: 82 °C).

- 15 ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 0,73 (s, 3H, CH₃Cy), 1,20 (s, 6H, 2 × CH₃-COH), 1,22 (s, 3H, CH₃-C-OCH₂), 3,32 (dd, 1H, J=8,5 Hz, J=9,9 Hz, CH₂OCy), 4,09 (t, 1H, J=7,9 Hz, OCH₂Cy)

¹³C-NMR (62,89 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 14,12 (CH₃), 18,74 (CH₂), 22,52 (CH₂), 23,88 (CH₂), 27,58 (CH₃), 29,77 (CH₃), 30,04 (CH₃), 34,08 (CH), 39,07 (CH₂), 40,81 (CH₂), 45,73 (CH₂), 46,24 (CH₂), 49,89 (C) 59,64 (CH), 62,00 (CH), 70,72 (C), 75,06 (CH₂), 84,34 (C), 212,03 (C).

- 20 **1-((3R,5S)-tetrahidro-5-((3S,3aS,7E,7aS)-octahidro-7-((Z)-2-((3S,5R)-3,5-Bis(trietilsililoxi)-2-metilenciclohexiliden)etiliden)-3a-metil-1H-inden-3-il)-5-metilfuran-3-il)-2-metilpropan-2-ol (16)**



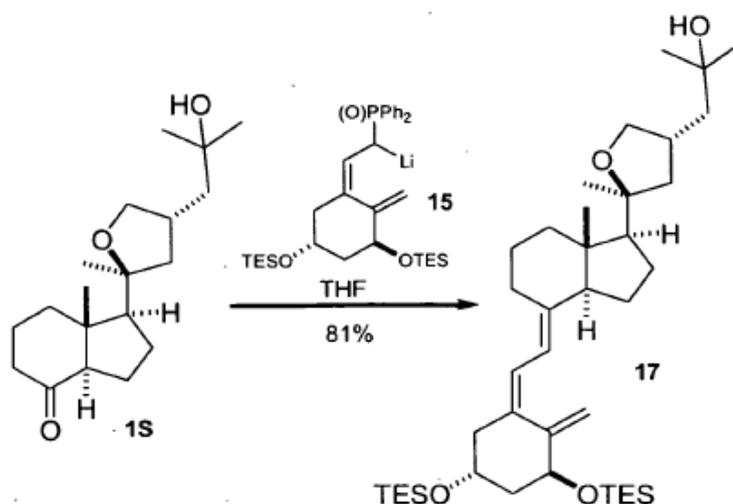


Se añadió una solución de *n*-BuLi en hexano (0,74 mL, 1,68 mmol, 2,25 M) a una solución de óxido de fosfina **2** (1,045 g, 1,8 mmol, 4,6 equivalentes) en THF seco a -78°C . La solución de color rojo oscuro se agitó durante 1 h. Se añadió gota a gota una solución de la cetona **1S** (120 mg, 0,39 mmol, 1 equivalente) en THF seco. Se agitó la mezcla de reacción en la oscuridad durante 5 h a -78°C y a -55°C durante 1 h. Se sofocó la reacción por la adición de H_2O (8 mL) y EtOAc (15 mL). Por concentración de la mezcla se obtuvo un residuo que se disolvió en Et_2O (100 mL). Las capas reunidas se lavaron con NaHCO_3 saturado (3 \times 25 mL), NaCl saturado (50 mL) y H_2O (50 mL), se secaron, se filtraron, y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO_2 , 3 \times 15 cm, Et_2O al 40 %-hexanos) para dar el análogo protegido **16** [150 mg, 91 %, ($R_f=0,7$, EtOAc al 50 %-hexanos), aceite incoloro].

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 0,5-0,6 (m, 15H, 6 \times $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{Si}$, $\text{CH}_3\text{-Cy}$), 0,92 (t, 18H, $J=7,9$ Hz, 6 \times $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-Si}$), 1,22 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C-OCH}_2$), 1,17 (s, 6H, CH_3COH), 1,23 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_2$), 3,34 (t, 1H, $J=9,1$ Hz, CH_2OCy), 4,03 (t, 1H, $J=7,7$ Hz, OCH_2Cy), 4,16 (m, 1H, H-C-OH), 4,36 (t, 1H, $J=4,9$ Hz, H-COH de C_1), 4,8 (d, 1H, $J=2$ Hz, $\text{H}_2\text{C=}$), 5,19 (d, 1H, $J=2$ Hz, H-C=), 6,00 (d, 1H, $J=11,2$ Hz), 6,20 (d, 1H, $J=11,2$ Hz, H-C=).

$^{13}\text{C-NMR}$ (62,89 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 4,76 (CH_2), 4,79 (CH_2), 6,80 (CH_3), 6,85 (CH_3), 13,00 (CH_3), 21,73 (CH_2), 22,64 (CH_2), 23,30 (CH_2), 27,56 (CH_3), 28,78 (CH_2), 29,64 (CH_3), 30,08 (CH_3), 35,85 (CH), 40,76 (CH_2), 44,96 (CH_2), 45,92 (CH_2), 46,96 (CH_2), 47,05 (CH_2), 47,05 (C), 56,47 (CH), 59,92 (CH), 67,15 (CH), 70,83 (C), 71,35 (CH), 73,12 (CH_2), 84,87 (C), 111,08 (CH_2), 118,16 (CH), 123,07 (CH), 135,04 (C), 140,61 (C), 148,30 (C).

1-((3S,5S)-tetrahidro-5-((3S,3aS,7E,7aS)-octahidro-7-((Z)-2-((3S,5R)-3,5-Bis(trietilsililoxi)-2-metilenciclohexiliden)etiliden)-3a-metil-1H-inden-3-il)-5-metilfuran-3-il)-2-metilpropan-2-ol (17)



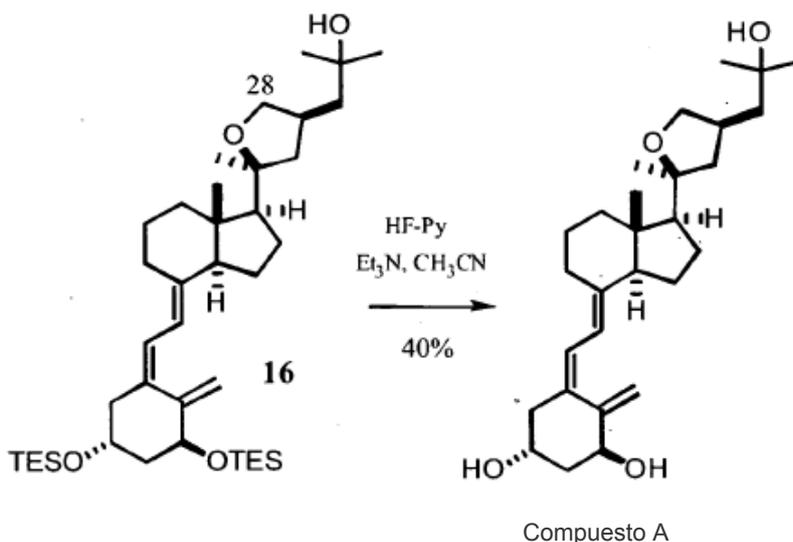
Se añadió una solución de *n*-BuLi en hexano (0,55 mL, 1,23 mmol, 2,25 M) a una solución de óxido de fosfina **15** (785 mg, 1,3 mmol, 4,6 equivalentes) en THF seco a -78°C . La solución de color rojo oscuro se agitó durante 1 h. Se añadió gota a gota una solución de la cetona **1R** (88 mg, 0,28 mmol, 1 equivalente) en THF seco. Se agitó la mezcla de reacción en la oscuridad durante 5 h a -78°C y a -55°C durante 1 h. Se sofocó la reacción por la adición de H_2O (8 mL) y EtOAc (15 mL). Por concentración de la mezcla se obtuvo un residuo que se disolvió en Et_2O (100 mL).

mL). Las capas reunidas se lavaron con NaHCO₃ saturado (3 × 25 mL), NaCl saturado (50 mL) y H₂O (50 mL), se secaron, se filtraron, y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO₂, 3 × 15 cm, Et₂O al 40 %-hexanos) para dar el análogo protegido **17** [120 mg, 81 %, (R_f = 0,7, EtOAc al 50 %/hexanos), aceite incoloro) y se recuperó el compuesto **1R** (20 mg).

5 ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 0,59 (q, J=7,8 Hz, 6H, CH₃-CH₂Si), 0,60 (q, J=7,5 Hz, 6H, CH₃-CH₂Si) 0,66 (s, 3H, CH₃-Cy), 0,94 (t, 18H, J=7,8 Hz, CH₃CH₂-Si), 1,21 (s, 6H, 2 × CH₃-COH), 1,22 (s, 3H, CH₃-CO-CH₂), 3,34 (t, J=8,9 Hz, 1H, CH₂OCy), 4,10 (t, J=7,8 Hz, 1H, CH₂OCy), 4,18 (m, 1H, HC³), 4,39 (t, 1H, J=4,9 Hz, HC¹), 4,88 (s, 1H, =CH₂), 5,21 (s, 1H, =CH₂), 6,03 (d, 1H, J=1,1 Hz, -HC=CH-), 6,23 (d, 1H, J=1,1 Hz, -HC=CH-).

10 ¹³C-NMR (62,89 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 4,76 (CH₂), 4,79 (CH₂), 6,79 (CH₃), 6,84 (CH₃), 13,51 (CH₃), 21,75 (CH₂), 22,67 (CH₂), 23,32 (CH₂), 27,15 (CH₃), 28,76 (CH₂), 29,74 (CH₃), 30,02 (CH₃), 34,20 (CH), 40,75 (CH₂), 44,96 (CH₂), 45,81 (CH₂), 45,90 (CH₂), 46,02 (CH₂), 46,39 (C), 56,48 (CH), 59,86 (CH), 67,14 (CH), 70,79 (C), 71,37 (CH), 74,89 (CH₂), 85,06 (C), 111,10 (CH₂), 118,20 (CH), 123,07 (CH), 135,05 (C), 140,62 (C), 148,29 (C).

(1R,3S,5Z)-5-((E)-2-((1S,3aS,7aS)-hexahidro-1-((2S,4S)-tetrahidro-4-(2-hidroxi-2-metilpropil)-2-metilfuran-2-il)-7a-metil-1H-inden-4(7aH)-iliden)etiliden)-4-metilenciclohexano-1,3-diol (A)

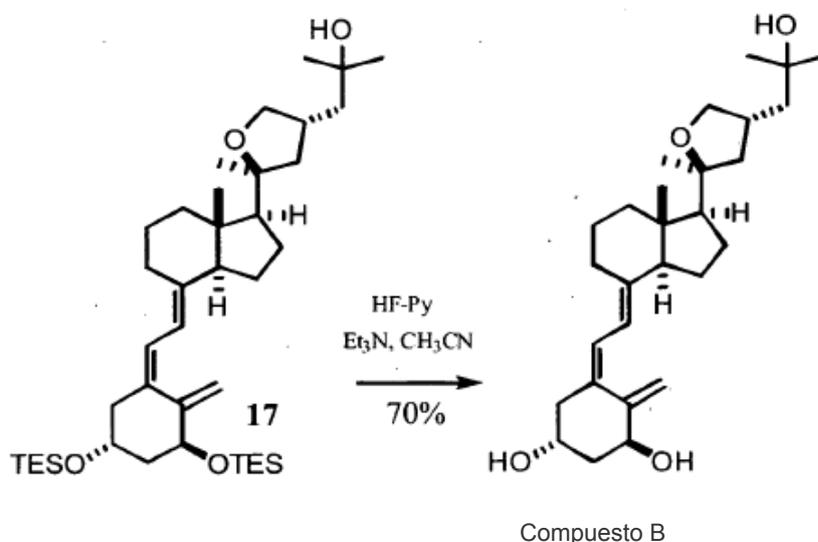


Se añadió HF-Py (0,4 mL) a una solución del compuesto **16** (134 mg, 0,2 mmol) en CH₃CN (2,5 mL) y Et₃N (1,5 mL). Después de 10 min, se sofocó la reacción por la adición de NaHCO₃ saturado (5 mL). Se extrajo la mezcla con Et₂O (2 × 20 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaCl saturado (25 mL) y H₂O (25 mL), se secaron, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO₂, 1,5 × 9,5 cm, EtOAc al 50 %-hexanos) para dar el compuesto **A** (80 mg, 88 %, sólido blanco, punto de fusión: 128 °C).

20 ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 0,62 (s, 3H, Cy-CH₃), 1,18 (s, 6H, 2 × CH₃-C-OH), 1,23 (s, 3H, CH₃-C-O-CH₂-), 3,34 (t, 1H, J=9,1 Hz, C-O-CH₂), 4,03 (t, 1H, J=7,7 Hz, C-O-CH₂), 4,17 (m, 1H, HC-OH), 4,37 (m, 1H, HC-OH), 4,95 (s, 1H, H₂C=C), 5,29 (s, 1H, H₂C=C), 5,98 (d, 1H, J=11,1, =CH-HC=), 6,32 (d, 1H, J=11,1, =CH-HC=).

25 ¹³C-NMR (62,89 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 13,12 (CH₃), 21,91 (CH₂), 22,62 (CH₂), 23,36 (CH₂), 27,58 (CH₃), 28,94 (CH₂), 29,63 (CH₃), 30,09 (CH₃), 35,82 (CH), 40,62 (CH₂), 42,76 (CH₂), 45,02 (CH₂), 46,05 (C), 46,82 (CH₂), 47,06 (CH₂), 56,44 (CH), 59,86 (CH), 66,68 (CH), 70,40 (C), 70,90 (CH), 73,08 (CH₂), 84,93 (C), 111,54 (CH₂), 117,38 (CH), 124,65 (CH), 133,24 (C), 142,49 (C), 147,66 (C).

30 **(1R,3S,5Z)-5-((E)-2-((1S,3aS,7aS)-hexahidro-1-((2S,4R)-tetrahidro-4-(2-hidroxi-2-metilpropil)-2-metilfuran-2-il)-7a-metil-1H-inden-4(7aH)-iliden)etiliden)-4-metilenciclohexano-1,3-diol (B)**



Se añadió HF-Py (0,4 mL) a una solución del compuesto **17** (117 mg, 0,17 mmol) en CH₃CN (2,5 mL) y Et₃N (1,5 mL). Después de 10 min, se sofocó la reacción por la adición de NaHCO₃ saturado (5 mL). Se extrajo la mezcla con Et₂O (2 × 20 mL). Las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaCl saturado (25 mL) y H₂O (25 mL), se secaron, se filtraron y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo por cromatografía rápida (SiO₂, 1,5 × 11 cm, EtOAc al 50 %-hexanos) para dar el compuesto **B** (60 mg, 85 %, sólido blanco, punto de fusión: 96 °C). ¹H-NMR---¹³C-NMR. HRMS (FAB)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 0,67 (s, 3H, CH₃), 1,22 (s, 9H, 2 × CH₃-C-OH, CH₃-C-O-CH₂-), 3,34 (dd, 1H, J=8,5, 9,7 Hz, C-O-CH₂), 4,11 (t, 1H, J=7,9 Hz, C-O-CH₂), 4,22 (m, 1H, HC-OH), 4,44 (m, 1H, HC-OH), 4,99 (s, 1H, H₂C=C), 5,32 (s, 1H, H₂C=C), 6,01 (d, 1H, J=11,3, =CH-HC=), 6,36 (d, 1H, J=11,3, =CH-HC=).

¹³C-NMR (62,89 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 13,64 (CH₃), 21,97 (CH₂), 22,64 (CH₂), 23,41 (CH₂), 27,26 (CH₃), 28,96 (CH₂), 29,78 (CH₃), 30,08 (CH₃), 34,22 (CH), 40,64 (CH₂), 42,79 (CH₂), 45,11 (CH₂), 46,00 (CH₂), 46,36 (CH₂), 46,36 (C), 56,50 (CH), 59,84 (CH), 66,80 (CH), 70,58 (C), 70,93 (CH), 74,97 (CH₂), 85,10 (C), 111,62 (CH₂), 117,38 (CH), 124,82 (CH), 133,08 (C), 142,72 (C), 147,65 (C).

II. Ensayos *in vitro*

Materiales y métodos

Purificación y cristalización

Se obtuvieron cristales del dominio de unión a ligando (LBD) de hVDR en complejo con los compuestos A y B utilizando el mutante que carece de 50 residuos en el bucle que conecta la hélice H1 y H3, usado para resolver la estructura del LBD de VDR unido a 1α,25(OH)₂D₃ y varios ligandos sintéticos (**10-12**). Este mutante tiene las mismas propiedades biológicas (unión, transactivación en varias líneas celulares, heterodimerización) que el LBD de VDR de tipo natural (**11**). La purificación y cristalización de los complejos de LBD de VDR humano con los nuevos ligandos se llevaron a cabo utilizando el procedimiento descrito (**11**). El LBD del VDR humano (residuos 118-427 Δ165-215) se clonó en el vector de expresión pET28b para obtener una proteína de fusión marcada con hexahistidina en N-terminal y se sobreprodujo en *E. Coli* BL21 (DE3). Se cultivaron las células en medio LB y posteriormente se indujeron durante 6 h a 20 °C con tior-β-D-galactósido de isopropilo 1 mM. La purificación de la proteína incluyó una etapa de cromatografía metálica de afinidad sobre una resina quelante de cobalto. Después de la separación de la marca por digestión con trombina, se purificó adicionalmente la proteína por filtración en gel. El tampón de proteína final fue Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, y ditiotreitolo 5 mM. Se concentró la proteína a 10 mg/mL y se incubó en presencia de un exceso de 5 veces de los ligandos. Se evaluó la pureza y homogeneidad de la proteína por SDS-PAGE y Native-PAGE. Se obtuvieron cristales de los complejos a 4 °C por difusión de vapor en gotas pendientes. Se utilizaron cristales de complejo LBD de VDR-1α,25(OH)₂ D₃ para micro-siembra; las semillas de diluciones seriadas se introdujeron en las gotas recientemente formadas. Las soluciones de reserva contenían Mes-KOH 100 mM y sulfato de amonio 1,4 M a pH 6,0.

Recogida de datos de rayos X y determinación de la estructura

Los cristales fueron crioprotectados con una solución que contenía la solución de reserva más glicerol al 30 % y PEG400 al 5 %, montada en bucles de fibra y se enfrió rápidamente en etano líquido a la temperatura del N₂ líquido. La recogida de datos de un único cristal congelado se llevó a cabo a 100K en la línea de luz BM30 del ESRF (Grenoble, France). Los cristales eran isomorfos y pertenecían al grupo espacial ortorrómbico P2₁2₁2₁ con los

parámetros celulares unitarios que se especifican en la Tabla 1. Los datos fueron integrados y ordenados utilizando el programa HKL2000 (13).

Tabla 1. Recogida de datos y estadística de refinamiento.

Ligando	Compuesto A	Compuesto B
Longitud de onda	0,9794 Å	0,9796 Å
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de celdillas		
A	45,01 Å	45,06 Å
B	51,37 Å	51,46 Å
C	132,24 Å	132,13 Å
Intervalo de resolución (última concha)	20-2,0 Å (2,07-2,0)	20-1,8 Å (1,86-1,8)
Reflexiones únicas	21276	28589
Complejidad (última concha)	99,7 % (97,8 %)	99,5 % (97,3 %)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	30,2 (5,7)	26,7 (4,2)
^a R-merge (última concha)	0,062 (0,232)	0,061 (0,294)
^b R _{crist}	18,6 %	19,2 %
^c R _{libre}	21,7 %	20,6 %
Rmsd de las longitudes de enlace	0,005 Å	0,005 Å
Rmsd de los ángulos de enlace	1,05°	1,09°
Átomos de proteína que no son hidrógeno	2019	2019
Átomos de ligando que no son hidrógeno	32	32
Moléculas de disolvente	159	193
Factor B medio para los átomos no hidrógeno		
Proteína	23,2 Å ²	18,3 Å ²
Ligando	14,3 Å ²	14,1 Å ²
Disolvente	32,5 Å ²	28,1 Å ²

^aR-merge: $\sum |I_h - \langle I_h \rangle| / \sum I_h$.

^bR_{crist}: $\sum |F_o - F_c| / \sum F_o$, donde F_o y F_c son las amplitudes del factor de estructura observadas y calculadas, respectivamente.

^cEl valor R_{libre} se calculó a partir del 5 % de todos los datos que no se utilizaron en el refinamiento.

Rmsd: desviación cuadrática media de la geometría ideal

5 Las estructuras cristalinas de los complejos LBD de VDR con el compuesto A y con el compuesto B se resolvieron por reemplazamiento molecular utilizando la estructura conocida de LBD de VDR humano-1 α ,25(OH)₂D₃ como modelo de partida y refinado a resolución 2,0 y 1,8 Å, respectivamente. Se utilizaron los mapas omit del modelo atómico refinado de LBD de VDR para ajustar los ligandos a su densidad electrónica. Se utilizaron el escalado anisotrópico y una corrección del disolvente a granel, y un refinamiento restringido del factor B atómico isotrópico. Los factores de la temperatura media para los ligandos (14,3 Å² y 14,1 Å² para los compuestos A y B, respectivamente) fueron más bajos que los de la proteínas (23,2 Å² y 18,3 Å² para el compuesto A y el compuesto B, respectivamente).

15 Se llevaron a cabo ciclos alternados de refinamiento probablemente máximo y de ajuste del modelo para generar los modelos finales de los complejos. Todos los datos se incluyeron en el refinamiento (sin límites δ). Todos los modelos refinados presentaron una quiralidad inequívoca para los ligandos y ningún resultado fuera de la representación de Ramachandran según PROCHECK. Los modelos finales de complejos VDR-A y VDR-B contienen 255 residuos, con ninguna densidad electrónica clara para los dos primeros residuos de N-terminal y los cuatro últimos residuos de C-terminal, y pobre densidad electrónica para los residuos 375-377 en el bucle que conecta H9-H10. Los datos cristalográficos se resumen en la Tabla 1. Se utilizaron los programas MOLREP (14), CNS-SOLVE (15), y O (16) para el reemplazamiento molecular, el refinamiento estructural, y la construcción del modelo. Para la comparación de la estructura, se superpusieron las trazas C α de los modelos utilizando los comandos *lsq* de O y los parámetros por defecto. Las figuras se generaron con Pymol (17).

Ensayo de transfección y transactivación

25 El LBD de VDR humano se subclonó en el plásmido derivado pG4M como una proteína de fusión Gal. Se realizaron experimentos de transfección transitoria para el análisis de la activación de VDR en placas de 48 pocillos, utilizando una técnica estándar de coprecipitación con fosfato de calcio como está descrita (11). Se sembraron células 293 EBNA (6,0 \times 10⁴ células por pocillo) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C en medio Dulbecco (DMEM + 1 g/L de glucosa), que contiene 10 % de FCS, gentamicina y 1 mg/ml G418 (geneticina). Se transfectaron transitoriamente células 293 EBNA con 12,5 ng de plásmido Gal-4-LBD VDR, 10 ng de plásmido indicador UAS-TATA-luciferasa, y 37,5 ng de control interno PCH110 recombinante que expresa el plásmido β -galactósido. Una vez que se incubaron las células durante 8 horas a 37 °C, se reemplazó el medio y se añadieron los compuestos en diluciones seriadas optimizadas. Después de 20 horas a 37 °C, se lavaron las células con PBS y se recogieron en tampón de lisis Passiv (Promega). Se analizaron los lisados de las células en cuanto a la actividad de luciferasa y β -galactosidasa.

La actividad de luciferasa para cada muestra se normalizó a la actividad de β -galactosidasa. Se trataron las células con $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, compuesto A, y compuesto B. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Resultados y discusión

Nuevos análogos de cadena lateral

- 5 En las estructuras cristalinas de VDR complejo con varios ligandos (**10-12**), el ligando está fuertemente unido al receptor alrededor de los anillos A-, Seco B-, C- y D-. En contraste, la cadena lateral alifática está menos constreñida, permitiendo de este modo conformaciones alternativas de la cadena lateral para la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

- 10 Dos epímeros, compuesto A y compuesto B, con estereoquímica opuesta en el C23 de un resto oxolano, se sintetizaron como se ha descrito antes (Figura 1). Los experimentos preliminares de acoplamiento demostraron que el compuesto A y $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ podrían adoptar una conformación similar, y que átomos adicionales O21 y C28 realizan nuevos contactos de Van der Waals con el bolsillo de unión a ligandos (LBP). Por otro lado, el compuesto B adopta una conformación diferente y podría inducir un cambio de la estructura de la proteína. Los datos experimentales fueron necesarios para resolver ambos puntos.

- 15 Los ensayos de su actividad biológica pusieron de relieve las diferencias esperadas. Los resultados de transactivación en los experimentos de transfección celular se muestran en la Figura 2.

A una concentración 10^{-10} M, el compuesto A indujo las actividades transcripcionales del VDR humano 12 veces más eficientemente que la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Por otro lado, la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y el compuesto B indujeron las actividades transcripcionales del VDR humano con eficiencia similar.

Interacciones ligando-proteína

- 20 Los dos complejos adoptan la conformación canónica de todas las estructuras previamente descritas de VDR unido a ligandos agonistas. Las variaciones corresponden solamente a algunas cadenas laterales localizadas en la superficie de la proteína. Cuando se compara con el complejo VDR- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, los modelos atómicos muestran una r.m.s.d. sobre átomos de C α de 0,23 Å y 0,24 Å para los complejos VDR-A y VDR-B respectivamente.

- 25 Los compuestos A y B adoptan una conformación alargada, observada también en el complejo VDR- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Para los tres complejos, la distancia entre 1-OH y 25-OH varía de 12,8 Å a 13,1 Å. Las interacciones entre la proteína y los anillos A-, Seco B-, C-, y D- son idénticas. Los grupos hidroxilo forman los mismos enlaces hidrógeno, 1-OH con Ser-237 y Arg-274, 3-OH con Tyr-143 y Ser-278, y el 25-OH con His-305 y His-397.

- 30 En la estructura cristalina, la cadena lateral del compuesto A adopta una conformación similar a la de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y por tanto forma todos los contactos observados previamente que contribuyen a contactos más fuertes ligando-proteína. Una nueva característica cuando se compara con $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ es el contacto adicional de van der Waals de O21 con Val-300, que está también presente pero es más débil en el complejo VDR-B. El estereoisómero B adopta una conformación diferente de la cadena lateral debida a la configuración inversa en C23. C23 y C24 están 0,6 Å y 1,2 Å alejados de su posición en el complejo del compuesto A lo que afecta a los respectivos contactos. En consecuencia, las posiciones de C25, C26, C27 y 25-OH son también diferentes y la interacción directa del compuesto B con la hélice-12 de activación es entonces más débil (C27-Val-418 de 4,6 Å).

Relación estructura-actividad

- 40 Las dos estructuras cristalinas proporcionan una explicación sobre la potencia de transactivación más alta de un diastereoisómero (compuesto A). En el caso del compuesto A, el anillo de oxolano estabiliza una conformación que imita la forma unida del ligando natural. Él adopta la conformación de semi bote energéticamente favorable que permite que la cadena lateral se fije sin tensión adicional como se muestra en el ángulo de enlace observado de C23-C24-C25 (118°), similar al de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (121°). Se proporciona también estabilidad adicional por el contacto adicional de van der Waals de O21 con Val-300.

- 45 Como para el compuesto B, los contactos adicionales de van der Waals con el LBP se compensan por la conformación planar energéticamente desfavorable de anillo de oxolano (los ángulos de torsión de O21-C20-C22-C23 y C20-C22-C23-C28 son -9° y -3°, respectivamente), enlace C23-C24-C25 más amplio (124°), y la interacción más débil de C27 con Val-418.

- 50 El nuevo anillo cumple dos funciones: (i) una fracción más grande del LBP es ocupada por el ligando dando lugar de este modo a contactos adicionales estabilizantes, y (ii) la forma activa del ligando unido es favorecida por el arrugamiento del anillo. Esta última característica es equivalente a un factor de discriminación que restringe el conjunto de la conformación del ligando a un número más pequeño de muestras que hacen el proceso de unión más eficiente (**6**). La estabilización de una conformación de unión energéticamente favorable es equivalente a la selección de un ajustador óptimo dentro de un conjunto y tiene claras ventajas entrópicas para un proceso de fijación inducido (**18**). Esto debería afectar a la especificidad del ligando así como a la cinética de unión.

El presente análisis sugiere una posibilidad de una mejora adicional de la potencia y de la especificidad del ligando. Un modo fácil de aumentar la estabilidad del complejo es llenar más del bolsillo de unión al ligando y aumentar con ello el número de contactos entre la proteína y el ligando. Una metilación en la posición C2, por ejemplo, cumpliría los requerimientos ya que la estructura cristalina de VDR en complejo con $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ muestra una cavidad vacía en este lugar. De hecho se ha sintetizado un grupo metilo en C2 α del compuesto y presenta una afinidad de unión más alta (19). La metilación en la posición C2 α de los compuestos A y B debe aumentar el carácter superagonista de los ligandos.

III. Experimentos *in vivo*

Se obtuvieron ratones machos C57BL/6J, de 6-7 semanas de edad, de Charles River Laboratories France (l'Arbresle, France). Se mantuvieron todos los ratones en unas instalaciones de temperatura controlada (23 °C) con un ciclo de 12 h de luz/oscuridad y se les dio libre acceso a los alimentos y al agua. Se alimentaron los ratones con la dieta EQ12310 de UAR (Villemoison sur Orge, France), que contenía 16,8 % de proteínas, 73,5 % de carbohidratos y 4,8 % de grasa. Los diferentes agonistas de VDR se disolvieron en aceite de sésamo y se administraron por sonda oral a las dosis indicadas. Se dejaron los ratones en ayunas 4 h antes de recoger la sangre para subsiguientes medidas de calcio, que se realizaron como está descrito (1).

En un experimento inicial 12 ratones machos C57BL/6J recibieron por sonda durante 7 días 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de compuesto A, o 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de compuesto B. A esta dosis todos los compuestos indujeron un aumento de los niveles de calcio en suero que fue más pronunciado para $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y el compuesto A (Figura 3.1). Después se llevó a cabo una respuesta detallada a la dosis (0,2, 0,5, 1, y 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) tanto con $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, como con el compuesto A (Figura 3.,2). En este estudio los compuestos se administraron por sonda durante 4 días consecutivos. De forma interesante y consistente con los estudios de transfección, el compuesto A tuvo un efecto más débil sobre los niveles de calcio en suero, que solamente fue significativo a la dosis de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, que el de la $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, que ya producía hipercalcemia a la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Estos nuevos compuestos son agonistas de VDR prometedores con actividades calcémicas *in vivo* significativamente más bajas.

Referencias

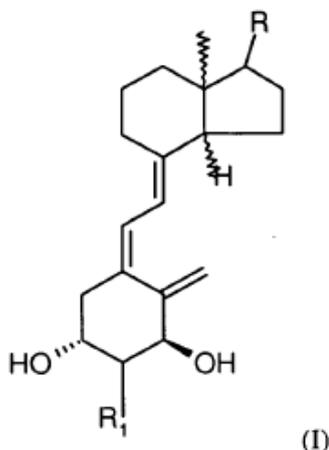
- 1) Laudet, V., & Gronemeyer H. (2002) *The Nuclear Receptor Facts Book*, Academic Press, London.
- 2) Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2000) *Genes Dev.* 14, 121-141.
- 3) Greschik, H., & Moras, D. (2003) *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 1573-1599.
- 4) Smith, C. L., & O'Malley, B. W. (2004) *Endocr. Rev.* 25, 45-71.
- 5) Bouillon, R., Verstuyf, A., Verlinden, L., Eelen, G., & Mathieu, C. (2003) *Recent Results Cancer Res.* 164, 353-356.
- 6) Norman, A. W., Mizwicki, M. T., & Norman, D. P. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 27-41.
- 7) DeLuca HF (2004) *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1689S-1696S.
- 8) Peleg, S., S Sastry, M., Collins, E. D., Bishop, J. E. & Norman, A. W. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 10551-10558.
- 9) Yamamoto, H., Shevde, N. K., Warriar, A., Plum, L. A., DeLuca, H. F., & Pike, J. W. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 31756-31765.
- 10) Eelen, G., Verlinden, L., Rochel, N., Claessens, F., De Clercq, P., Vandewalle, M., Tocchini-Valentini, G., Moras, D., Bouillon, R., & Verstuyf, A. (2005) *Mol. Pharmacol.* 67, 1566-1573.
- 11) Rochel, N., Wurtz, J. M., Mitschler, A., Klaholz, B., & Moras, D. (2000) *Mol Cell* 5, 173-179.
- 12) Tocchini-Valentini, G., Rochel, N., Wurtz, J. M., Mitschler, A., & Moras, D. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5491-5496.
- 13) Otwinowski Z., & Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.* 276, 307-326.
- 14) Vagin, A., & Teplyakov, A. (1997) *J. Appl. Crystallogr.* 30, 1022-1025.
- 15) Brunger, A. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., et al. (1998) *Acta Crystallogr. D.* 54, 905-921.
- 16) Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard. (1991) *Acta Crystallogr. A* 47, 110-119.
- 17) DeLano, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System* (2002) DeLano Scientific, San Carlos, Calif., USA.

18) Billas, I. M., Twema, T., Garnier, J. M., Mitschler, A., Rochel, N., & Moras, D. (2003). *Nature* 426, 91-96.

19) Konno, K, Fujishima T, Maki S, Liu Z, Miura D, Chokki M, Ishizuka S, Yamaguchi K, Kan Y, Kurihara M, Miyata N, Smith C, DeLuca HF, & Takayama H. (2000). *J. Med. Chem.* 43, 4247-4265.

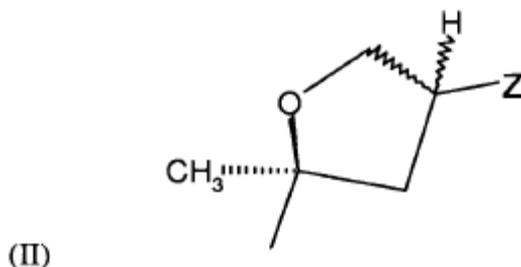
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que presenta la siguiente fórmula (I):

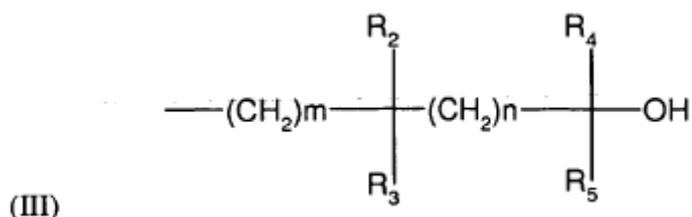


5 en la que R1 representa un grupo seleccionado de un átomo de hidrógeno, un alquilo (C₁-C₁₀) lineal o ramificado y un alcoxi (C₁-C₁₀), donde dicho grupo está opcionalmente sustituido con al menos un grupo hidroxilo;

y en la que R representa



donde Z representa



10 en la que:

- R₂ y R₃, idénticos o diferentes, representan un grupo seleccionado de H, un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₁₀ ramificado o lineal, alqueno C₂-C₁₀ ramificado o lineal o alquino C₂-C₁₀ ramificado o lineal;
- R₄ y R₅, idénticos o diferentes, representan un grupo seleccionado de H, un átomo de halógeno, un grupo alquilo C₁-C₆ lineal o ramificado, alqueno C₂-C₁₀ ramificado o lineal o alquino C₂-C₁₀ ramificado o lineal;

15 - m representa un número entero comprendido entre 0 y 5 inclusive; y

- n representa un número entero comprendido entre 0 y 5 inclusive,

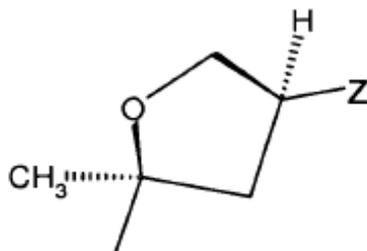
estando dicho grupo alqueno opcionalmente sustituido con un grupo arilo;

estando dicho grupo alquino opcionalmente sustituido con un grupo arilo o siendo seleccionado dicho grupo alquino alternativamente de los grupos 3-(benciloxi)-prop-1-ino y *terc*-butil-prop-2-inoilcarbamato;

y donde el término arilo incluye cualquier grupo aromático que comprende de 5 a 14 átomos de carbono, opcionalmente interrumpidos por uno o varios heteroátomos seleccionados de N, O, S o P (denominado, más específicamente, heteroarilo).

5 2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que R₁ representa un grupo seleccionado de H, CH₃, (CH₂)₃OH o O(CH₂)₃OH.

3. Un compuesto según las reivindicaciones 1 o 2, en el R representa:



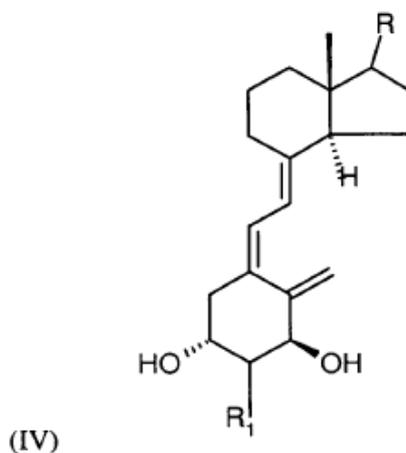
4. Un compuesto según una de las reivindicaciones 1-3, en el que m es 0 o 1.

5. Un compuesto según una de las reivindicaciones 1-4, en el que n es 0.

10 6. Un compuesto según una de las reivindicaciones 1-5, en el que R₂ y R₃, idénticos o diferentes, representan un grupo seleccionado de H, átomo de halógeno y un alquilo C₁-C₄ ramificado o lineal.

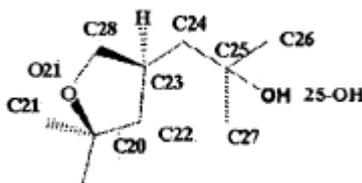
7. Un compuesto según una de las reivindicaciones 1-6, en el que R₄ y R₅, idénticos o diferentes, representan un grupo seleccionado de H, un átomo de halógeno y un alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado.

15 8. Un compuesto según una de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho compuesto es el estereoisómero específico según la siguiente fórmula (IV):

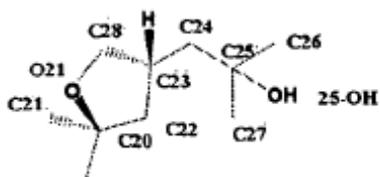


en la que R₁ y R son como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

9. Un compuesto según la reivindicación 8, en el que R representa



20 10. Un compuesto según la reivindicación 8, en el que R representa



11. Un compuesto según las reivindicaciones 9 o 10, en el que R₁ representa un átomo de hidrógeno.
12. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un soporte farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en asociación con otro agente activo.
- 5 13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 12, para uso en el tratamiento de cáncer, trastornos dermatológicos, trastornos relacionados con la inflamación, enfermedades autoinmunes, osteodistrofia u osteoporosis.
- 10 14. Una composición farmacéutica según la reivindicación 12, para uso en el tratamiento de cáncer de mama, de próstata, de colon, leucemia, artritis reumatoide, artritis psoriásica, psoriasis, fotoenvejecimiento, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, osteoporosis de bajo recambio óseo, osteoporosis inducida por esteroides, osteoporosis senil, osteoporosis postmenopáusica, osteomalacia u osteodistrofia renal.

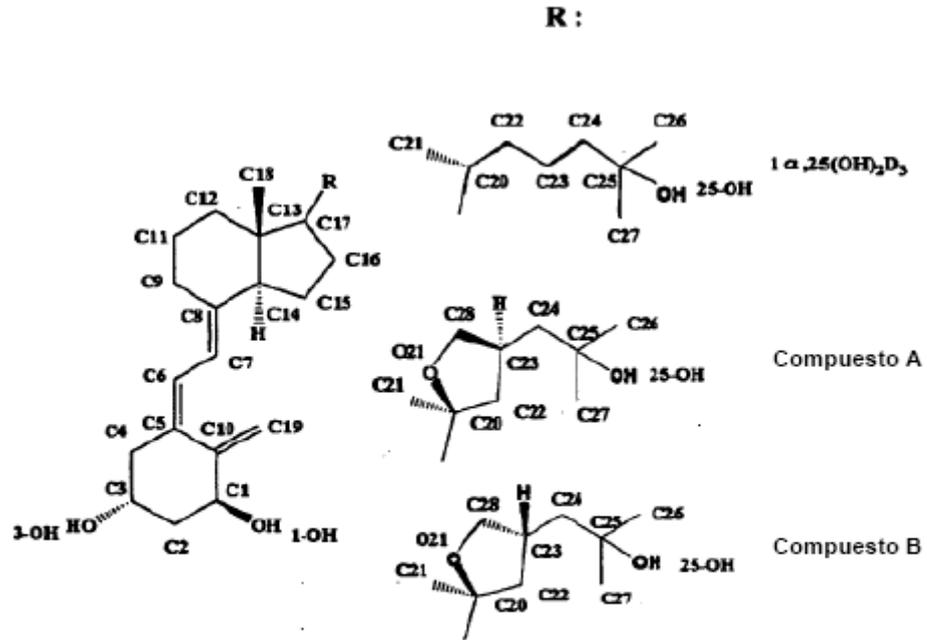


FIGURA 1

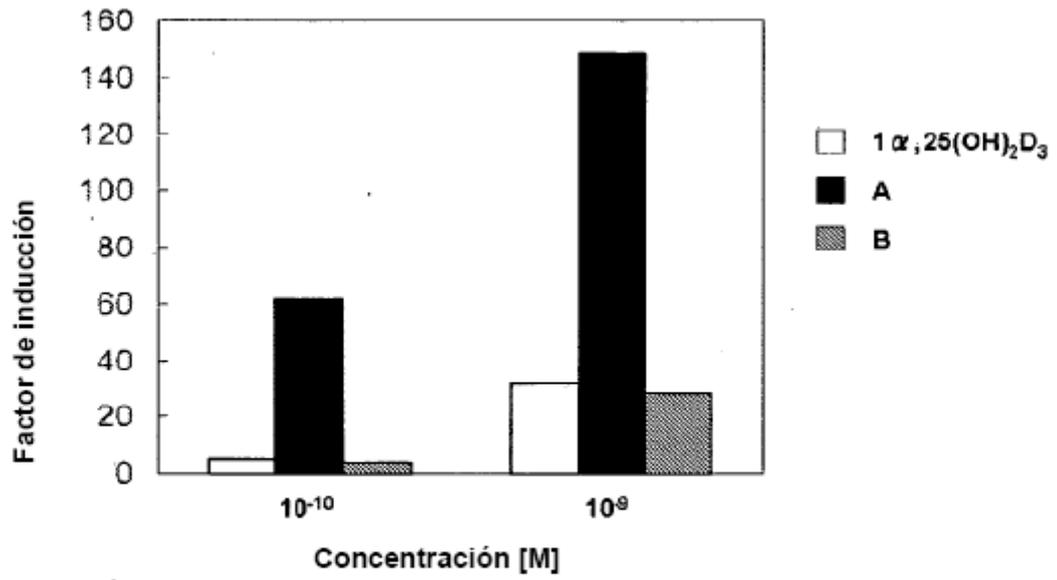


FIGURA 2

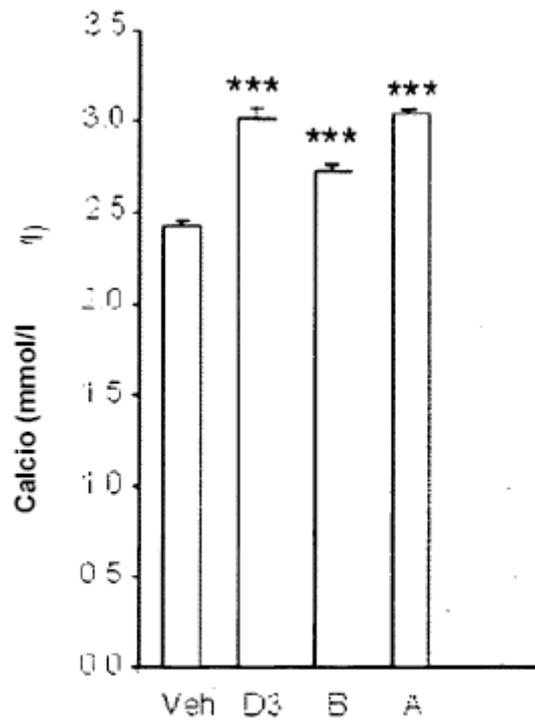


Fig. 3.1

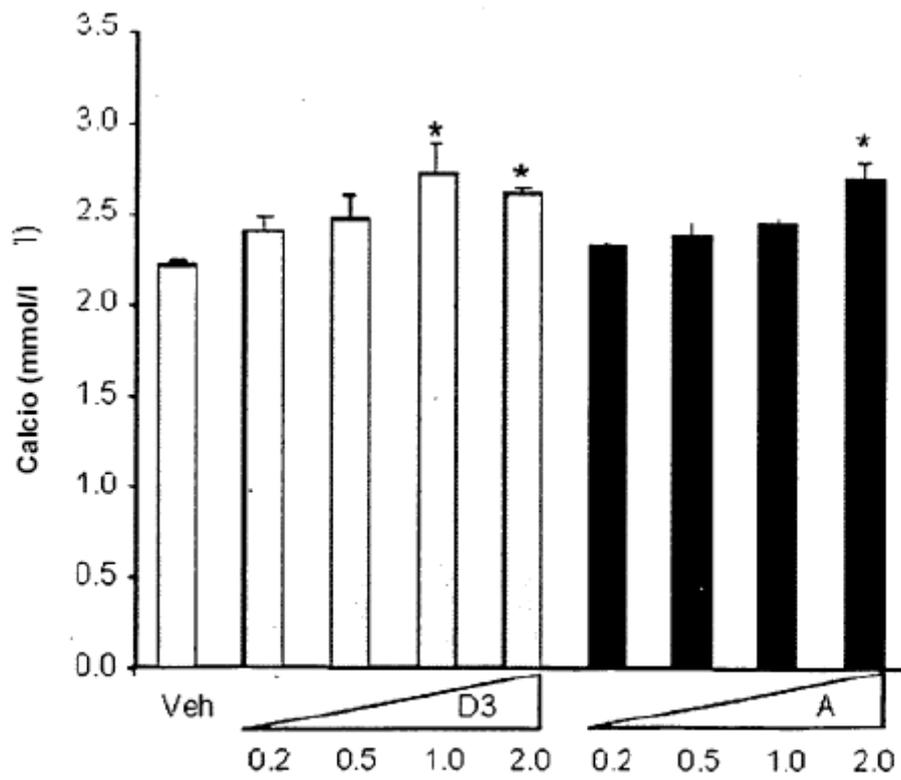


Fig. 3.2

FIGURA 3