



ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

Gonzalo
Lasanta Díaz

Tese de doutoramento

DESARROLLO DE ANÁLOGOS
DEL ÁCIDO LITOCÓLICO
MODIFICADOS EN LA
CADENA LATERAL Y ANILLO A
COMO LIGANDOS ACTIVOS
DEL RECEPTOR DE LA
VITAMINA D

Santiago de Compostela, 2023

TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO LITOCÓLICO MODIFICADOS EN LA CADENA LATERAL Y ANILLO A COMO LIGANDOS ACTIVOS DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D

Autor

Gonzalo Lasanta Díaz

Directores: D. Antonio Mouriño Mosquera y D. Miguel Ángel Maestro Saavedra

Tutor: D. Manuel María Paz Castañal

A mis Padres

A mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

A *D. Antonio Mouriño Mosquera*, por la oportunidad recibida desde mi comienzo hasta mi estancia final en el laboratorio de investigación Ignacio Ribas.

A *D. Miguel Ángel Maestro Saavedra*, por todos tus consejos y enseñanzas durante estos años.

Gracias por vuestra amistad, por los buenos momentos y experiencias académicas vividas, especialmente durante el período de síntesis del análogo *ZK168281*.

A *Manuel Paz*, gracias por tutorizar esta tesis doctoral y por el buen trato recibido.

A *Carlos Gregorio y Iago*, por la ayuda y el buen trato recibido.

A los compañeros conocidos durante mi estancia en este laboratorio, en especial, a *Tamara*. Gracias por los buenos momentos y por el material de laboratorio prestado.

A mi colega de laboratorio, el Dr. *Stefan Peters*, por la ayuda prestada en estudios de docking durante su estancia en el laboratorio Ignacio Ribas de la Facultad de Química.

A la profesora *Carmen M. González*, por la colaboración prestada en las etapas tempranas de síntesis de este trabajo.

Al profesor *Antonio Sousa*, por la ayuda recibida en difracción de Rayos-X.

A *Paula y Mencha*, por su ayuda en la manipulación de los equipos de RMN de la Facultad de Química.

A la gente que he podido conocer en Santiago de Compostela.

A todos mis colegas del Norte.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

Arg (R)	Arginina
Asp (D)	Aspártico
1,25D₃	1 α ,25-dihidroxitamina D ₃
d	Doblete
d,s	Doblete-singlete
dd	Doblete de dobletes
ddd	Doblete de dobletes de dobletes
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESI	Ionización por electrospray
Gln (G)	Glicina
His (H)	Histidina
HRMS	Espectroscopía de masas de alta resolución
IC₅₀	Concentración inhibitoria media
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
LCA	Ácido litocólico
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
m	Multiplete
pf	Punto de fusión
Phe (F)	Fenilalanina
q	Cuartete
rf	Factor de retención
s	Singlete
Ser (S)	Serina
t	Triplete
tr	Tiempo de retención
Tyr (Y)	Tirosina
VDR	Receptor de la vitamina D

Índice

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	P. 17
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	P. 29
3. PARTE 1. DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS DERIVADOS DEL ÁCIDO LITOCÓLICO DIHIDROXILADOS EN LA CADENA LATERAL	
3.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	P. 35
3.2 DISCUSIÓN	P. 41
4. RESULTADOS PARTE 2. DISEÑO Y SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO LITOCÓLICO MODIFICADOS EN EL ANILLO A Y EN LA CADENA LATERAL CICLOHEXÁNICA DIHIDROXILADA	
4.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	P. 59
4.2 DISCUSIÓN	P. 60
5. RESULTADO EXPERIMENTAL	
5.1 CONTENIDO EXPERIMENTAL PARTE 1	P. 67
5.2 CONTENIDO EXPERIMENTAL PARTE 2	P. 83
5.3 CONCLUSIONES	P. 85
ANEXO I. ESPECTROS DE RMN	P. 89
ANEXO II. DIFRACCIÓN DE RAYOS-X	P. 122
ANEXO III. PUBLICACIÓN Y PERMISOS	P. 128
ANEXO I. ÍNDICE DE ESTRUCTURAS	P. 132
ANEXO V. BIBLIOGRAFÍA	P. 136
ANEXO VI. RESUMEN	P. 144

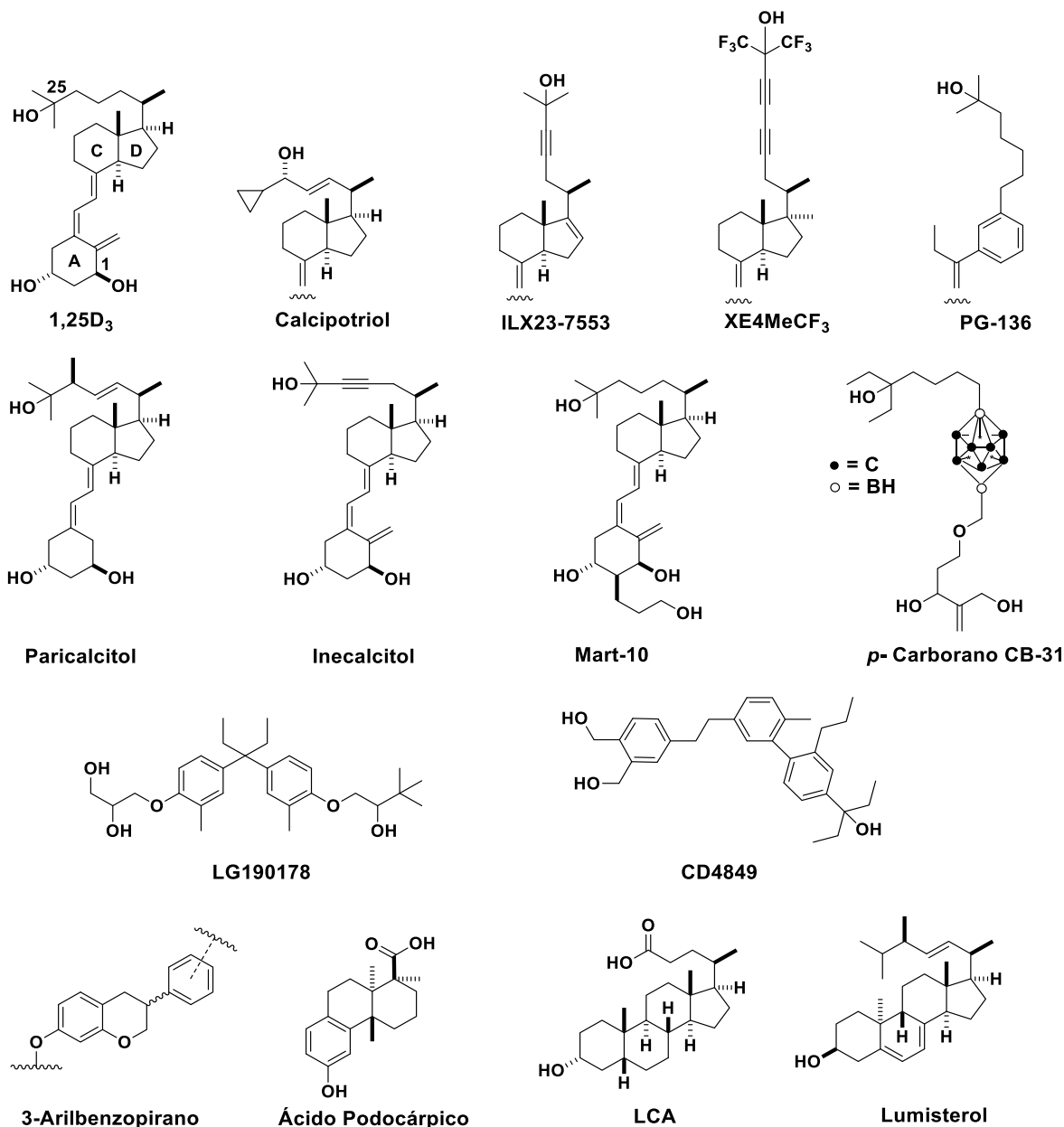
1. Introducción

1. EL RECEPTOR DE LA VITAMINA D (VDR)

El receptor de vitamina D (VDR) es un factor de transcripción que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares y ejerce sus funciones biológicas a través de su ligando natural $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 [calcitriol, $1,25(OH)_2D_3$, $1,25D_3$, **Figura 1**], que actúa como las hormonas esteroideas clásicas y es la forma activa de la vitamina D_3 .^[1,2] El VDR forma un heterodímero con el receptor del ácido retinoico X (RXR). Tras la unión del ligando, el VDR sufre un cambio conformacional permitiendo que el heterodímero RXR-VDR se una a secuencias específicas del DNA, conocidas como elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE), para interactuar con varias proteínas coactivadoras que promueven la transcripción de genes diana.^[3] Como resultado, se producen las proteínas responsables de múltiples funciones biológicas, que incluyen la regulación de la mineralización ósea calcio-fósforo, crecimiento celular, diferenciación/proliferación celular, apoptosis y respuestas inmunes.^[4-5] El hecho de que el VDR se haya encontrado en más de 30 tejidos diana y tumores de células ha sugerido que podría mediar en una gama aún más amplia de funciones biológicas, incluido la prevención del cáncer.^[6,7] Las acciones biológicas mediadas por el VDR le han señalado como un posible objetivo terapéutico para la terapia de trastornos hiperproliferativos.^[4,5] Desafortunadamente, el uso clínico de la hormona nativa $1,25D_3$ en el tratamiento del cáncer ha sido limitada por la inducción paralela de niveles elevados de calcio (hipercalcemia).^[4] Se ha desarrollado un elevado número de ligandos VDR secosteroidales no calcémicos altamente activos^[8,9] y algunos de ellos encuentran aplicaciones clínicas,^[9] pero con un éxito limitado en el tratamiento del cáncer debido a que las dosis farmacológicas requeridas inducen hipercalcemia. La mayoría de estos ligandos, son análogos secosteroidales de vitamina D_3 estructuralmente modificados en la cadena lateral y anillos (A, C y D).^[8,9] Algunos ejemplos de esta clase de compuestos incluyen calcipotriol (MC903),^[12] el ILX23-7553,^[13] el XE4MeCF₃,^[14] el PG-136,^[15] el Paricalcitol (Zemplar®),^[16] el Inecalcitol (TX522)^[17] y el Mart-10.^[18] Otro grupo de los agonistas del VDR con posibles aplicaciones terapéuticas incluyen compuestos no esteroideos fácilmente asequibles por síntesis y que imitan la potencia biológica de la hormona $1,25D_3$ sin causar acción calcémica.^[9-11,19-20] Ligandos seleccionados de este grupo de ligandos VDR incluyen el LG190178,^[21] el CD4849,^[22] y el *p*-carborano CB-31^[23] (**Figura 1**).

Además, los hidroxiderivados de la vitamina D₃ no calcémicos han demostrado que actúan como agonistas de VDR.^[24] Otros ligandos que se unen a VDR incluyen 3-Arribenzopiranos,^[25] el 1 α ,25(OH)₂-lumisterol,^[26] derivados del ácido podocárpico,^[27] y compuestos de ácidos biliares naturales como el ácido litocólico (LCA).

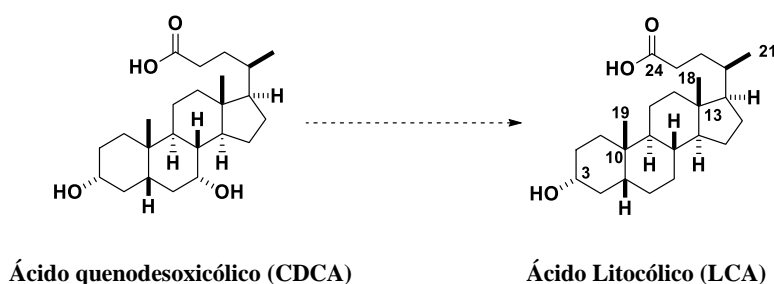
Figura 1. Estructura de la hormona natural 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (1,25D₃), análogos de (1,25D₃) no calcémicos seleccionados y mímicos no esteroideos.



2. ÁCIDO LITOCÓLICO (LCA) Y DERIVADOS

El ácido litocólico (LCA), es un ácido biliar formado a partir del ácido quenodesoxicólico (CDCA) (ácido biliar primario), como producto del catabolismo del colesterol, el cual permite su excreción.^[28] El LCA se produce en la flora intestinal y ha sido asociado a varias enfermedades hepáticas e intestinales. La síntesis del LCA se atribuye principalmente a bacterias productoras de 7 α -deshidroxilasa como *Clostridium* y *Eubacterium*^[29] (**Figura 2**).

Figura 2. Deshidroxilación del ácido quenodesoxicólico durante el catabolismo del colesterol.



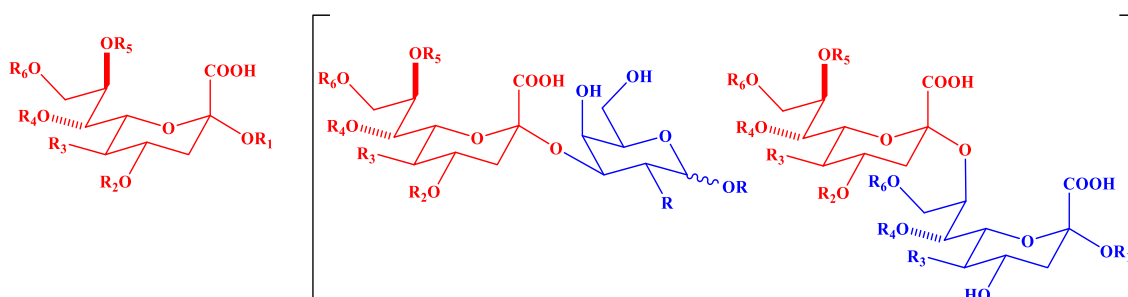
El LCA ha sido relacionado con la regulación de la expresión de proteínas involucradas en la absorción intestinal y con el metabolismo de la glucosa participando en el metabolismo de lípidos y homeostasis energética. Previamente ha sido considerado como tóxico, sin embargo, estudios recientes revelan que el LCA y sus derivados sintéticos pueden presentar efectos antitumorales en ciertas condiciones,^[30-34] cuyas propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas deben ser tomadas en consideración en el desarrollo de fármacos tanto en enfermedades intestinales, hepáticas y tratamientos contra el cáncer.^[33]

El ácido litocólico (LCA) lleva a cabo funciones de la vitamina D₃, como la elevación de los niveles de calcio y la movilización de calcio en los huesos.^[35] El LCA ha sido identificado como ligando endógeno secundario del VDR, pero su actividad como ligando es muy débil y su papel fisiológico completo es todavía desconocido. También, se han publicado las propiedades anticáncer del LCA en varios modelos de células cancerosas y la capacidad de controlar la inmunidad adaptativa.^[36] Los derivados sintéticos del LCA se consideran como inhibidores de sialiltransferasas^[37] y se han ensayado contra la metástasis en cáncer.^[38] De forma genérica, se ha publicado su actividad antibacteriana^[39] y antitumoral en cánceres de mama y colon.^[40]

2.1 DERIVADOS DEL ÁCIDO LITOCÓLICO COMO INHIBIDORES DE SIALILTRANSFERASAS EN EL TRATAMIENTO DE METÁSTASIS DE CÁNCER

Los ácidos siálicos,^[41] que existen como azúcares terminales de glicoconjugados, juegan un papel importante en diversos procesos biológicos y patológicos tales como la adhesión celular, la defensa inmunitaria y la metástasis de células tumorales e inflamación de tejidos. Las sialiltransferasas (ST), catalizan la transferencia de residuos de ácido siálico a cadenas de oligosacáridos no reductores dentro de proteínas y lípidos (**Figura 3**).

Figura 3. Estructura de los ácidos siálicos (rojo) y ejemplos de siálicos/*linkers* naturales (azul).



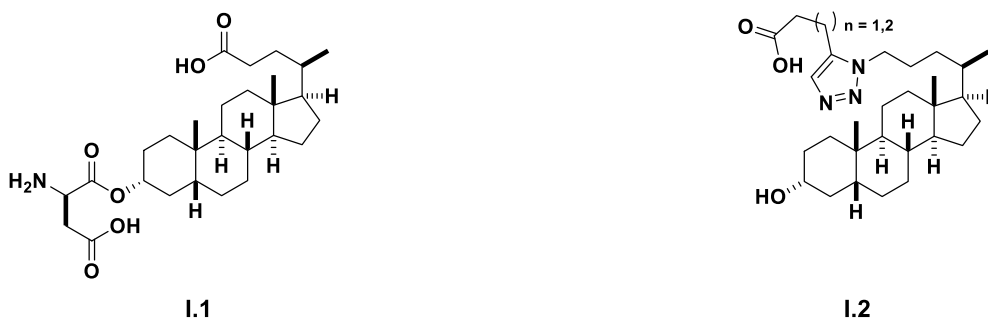
$R_1 = (-OH)$; $R_2 = (-H / -Ac)$; $R_3 = (-NHAc)$; $R_{4-5-6} = (-H / -Ac)$; $R = \text{unión a otro linker natural}$.

Las sialiltransferasas se consideran posibles dianas farmacológicas para el tratamiento del cáncer por lo que presentan interés medicinal. Los inhibidores de sialiltransferasas han sido clasificados en varios grupos: 1) análogos del ácido siálico,^[42,43] 2) análogos de ácido siálico-CMP,^[44-47] 3) análogos de la citidina,^[48-54] 4) derivados de oligosacáridos,^[55-58] 5) análogos aromáticos,^[59,60] 6) flavonoides y derivados,^[61,62] 7) ácido litocólico y análogos.^[63-67] En relación con los análogos del ácido litocólico, se viene observando un interés creciente por su modo de acción a nivel fisiológico y molecular y por las relaciones estructura-actividad. Por ejemplo, se ha observado que modificaciones en la cadena lateral inducen actividades más elevadas frente a sialiltransferasas. Todavía se desconoce si el esqueleto esteroide (anillos A, B, C y D),^[65] influye en actividad biológica frente a las sialiltransferasas. Li y col.^[68] desarrollaron varios análogos potentes frente a sialiltransferasas.

Algunos análogos poseen modificaciones en la cadena lateral del esteroide con estructura de aminoácido (**I.1**) y estructura de un ácido-triazol (**I.2**) (**Figura 4**).

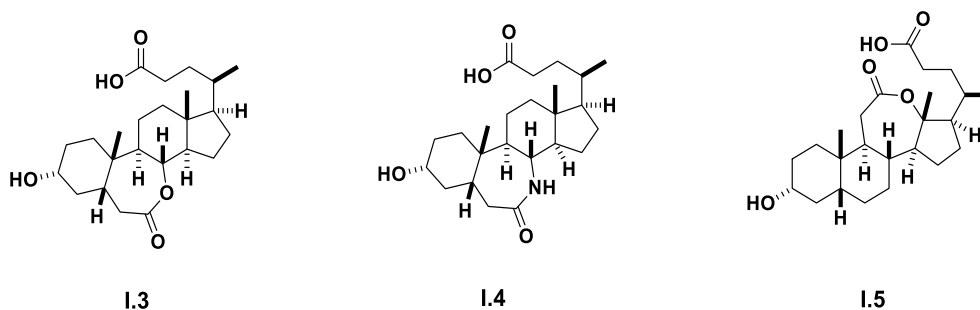
La presencia de grupos funcionales, tales como lactona (-COO-), lactama (-NH-CO) e hidroxilo, en los anillos B/C del esteroide mejoran la actividad antitumoral.^[65,68-69]

Figura 4. Inhibidores de la actividad de 2,3-ST. (**I.1** = aminoácido en C-3, **I.2** = triazol en C-24).



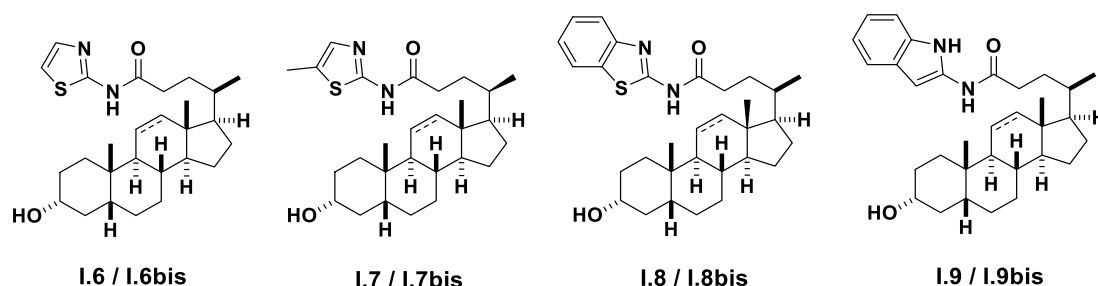
Los análogos mencionados han demostrado ser activos frente a las sialiltransferasas (ST): 2,6-ST y 2,3-ST y los compuestos **I.3**, **I.4** y **I.5** llegan a ser efectivos en el tratamiento de metástasis de cáncer (**Figura 5**).

Figura 5. Análogos modificados en el anillo B/C que son potentes inhibidores de sialiltransferasas.



2.2 DERIVADOS DEL ÁCIDO LITOCÓLICO CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN CÁNCER DE MAMA

El ácido litocólico (LCA) es un metabolito que provoca estrés oxidativo celular, ralentizando la proliferación de células de cáncer de mama. Qiu y col.^[40, 70-72] llevaron a cabo la síntesis de derivados de ácido litocólico para estudiar su actividad frente al crecimiento de células tumorales. Los compuestos sintetizados y evaluados presentan un grupo amida secundaria unida a un heterociclo como tiazol, metiltiazol, benzotiazol o fenilindol. Los compuestos sintetizados que presentan una insaturación (**I.6**, **I.7**, **I.8** y **I.9**) en el anillo C del esteroide (C-11, C-12), aumentan la actividad antitumoral en comparación con los compuestos saturados (**I.6bis**, **I.7bis**, **I.8bis** y **I.9bis**) (**Figura 6**).

Figura 6. Derivados funcionalizados del LCA activos frente a cáncer de mama.

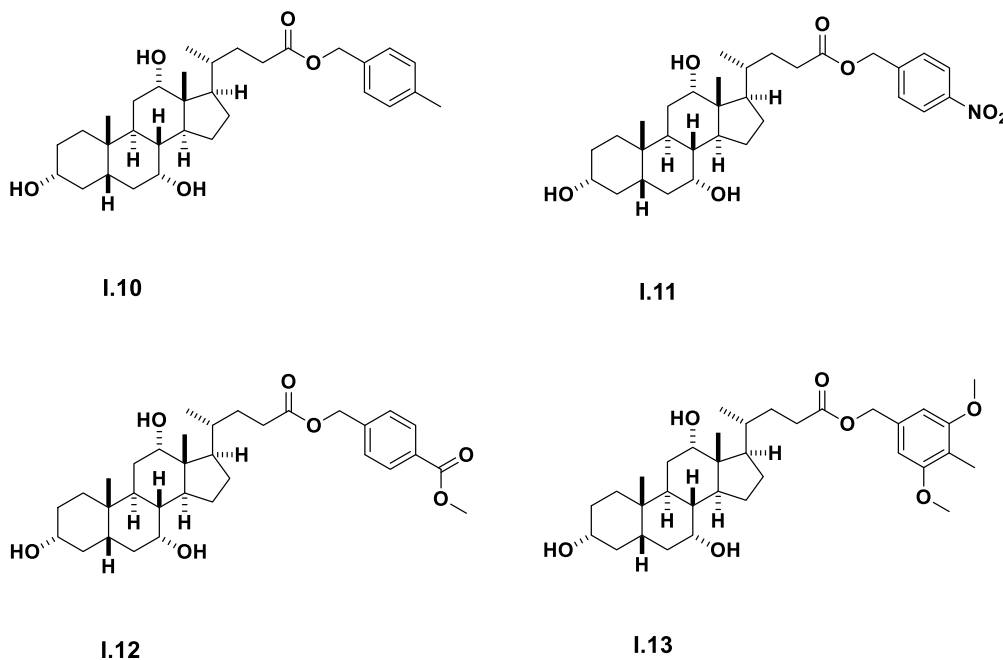
2.3 DERIVADOS DEL LCA CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN CÁNCER DE COLON

Los ácidos biliares (BA), que contienen grupos hidroxilo y carboxilo hidrófilos y núcleos esteroídicos hidrofóbicos, pueden promover la absorción de grasa y otras sustancias en el intestino.

Debido a que hay muchos receptores de ácidos biliares en la membrana celular de los tejidos del colon, estos análogos pueden mejorar la administración específica y el transporte de medicamentos. Además, los ácidos biliares poseen cierta actividad anticancerígena e inflamatoria.^[73,74] Zhao y col.^[75] diseñaron, sintetizaron y evaluaron una serie de derivados de ácidos contra el cáncer de colon que incluyen el ácido cólico (CA), el ácido quenodesoxicólico (CDCA), el ácido ursodesoxicólico (UDCA) y el ácido litocólico (LCA).

En los estudios *in vitro*, todos los compuestos mostraron una inhibición de la proliferación celular y, en particular, mostraron una inhibición superior en las células de cáncer de colon frente a otras líneas celulares. Los compuestos **I.10**, **I.11**, **I.12** y **I.13** mostraron mayor actividad antitumoral (**Figura 7**). Estos compuestos presentaron, además, actividad antiinflamatoria intermedia y la posibilidad de disminuir la expresión del TNF- α (factor de necrosis tumoral inductor de cáncer).

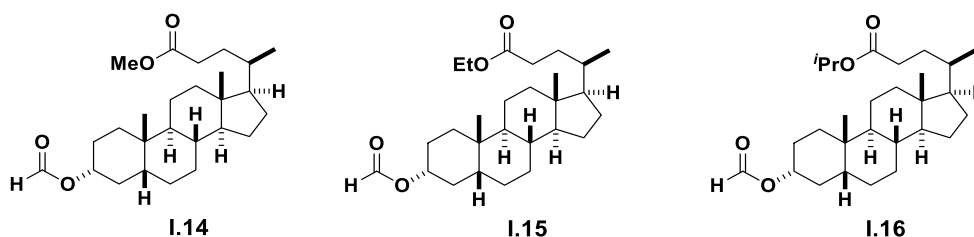
Figura 7. Derivados del LCA más potentes en la inhibición de células malignas en cáncer de colon.



2.4 DERIVADOS DE ÁCIDO LITOCÓLICO CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

El ácido litocólico (LCA) y sus derivados semisintéticos pueden interactuar dentro de la capa lipídica en membranas celulares pudiendo afectar a la cadena respiratoria y a la producción de energía de bacterias,^[76] por lo que pueden hacer a la célula más permeable frente a antibióticos.^[76] La resistencia de las bacterias puede superarse a través de este tipo de derivados, que pueden llevar a cabo una acción lipofílica sobre la célula, afectando a la membrana de la bacteria, para favorecer la rotura celular con posterior necrosis.^[77-81] Coutinho y col.^[39] prepararon y evaluaron sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa*, varios derivados del LCA modificados en las posiciones C-3 y/o C-24. Los derivados más potentes fueron **I.14**, **I.15** y **I.16** (**Figura 8**). No existen trabajos previos sobre el diseño de análogos del LCA como agonistas de actividad antibiótica. Los resultados que presentan dichos compuestos pueden potenciar el efecto de antibióticos conocidos como amicacina, gentamicina y neomicina. El diseño y síntesis de nuevos derivados es un reto de interés farmacéutico debido a la reciente elevada resistencia a los antibióticos.

Figura 8. Derivados de ácido litocólico con potente actividad antibacteriana.



2.5 LCA-VDR: ESTRUCTURA CRISTALINA DEL COMPLEJO ZVDR-LCA

En el año 2002 se identificó al VDR como un receptor del LCA. Rochel y col.^[82-83] descubrieron que el receptor α VDR (pez cebra) es capaz de alojar dos moléculas de LCA, una en el bolsillo interior clásico y otra en la superficie (**Figura 9**).

Figura 9. A) Estructura cristalina modo del complejo α VDR-LCA en el bolsillo de unión-ligando (LBP) (Código PDB: 3W5P). B) Estructura del LCA e interacciones en el complejo α VDR-LCA (Código PDB: 4Q0A). C) Interacciones en el sitio de unión de la segunda molécula de LCA.

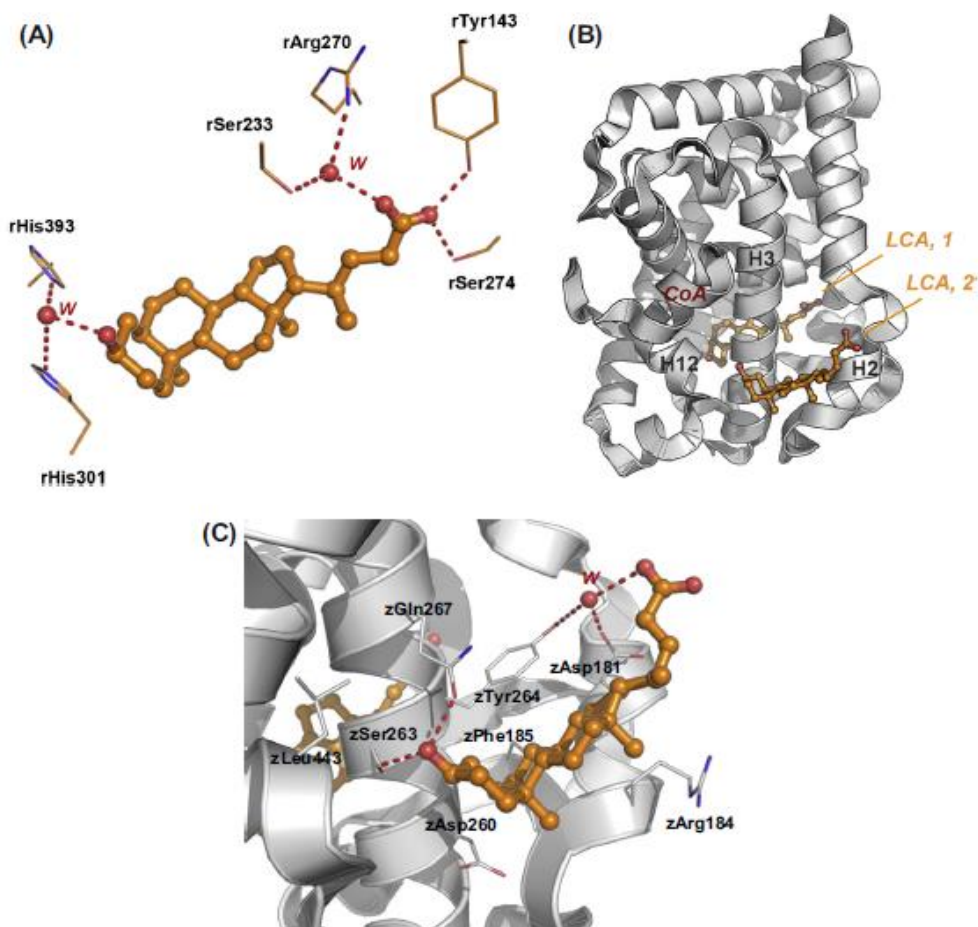


Figura 9: Estructura cristalina del complejo LCA-zVDR(LBD). Una segunda molécula LCA fue observada en la superficie del VDR y es estabilizada mediante interacciones no polares con zAsp181, zArg184, zPhe185 (H-2), zAsp260, zSer263, zTyr264, zGln267 (H-3), y zLeu443 (H-12). El grupo hidroxilo del anillo A, forma dos enlaces de hidrógeno con zSer263 (H-3) y zGln267 (H-3). La cadena lateral se coloca de una forma más cercana y el grupo carboxilo interactúa a través de una molécula de agua con zAsp181 (H-2) y zLys268 (H-3). [(H-2, 3 y 12), hélices dos, tres y doce].

2.6 DERIVADOS DE ÁCIDO LITOCÓLICO COMO POTENTES AGONISTAS DEL VDR

Se han desarrollado muy pocos análogos del LCA como ligandos del VDR, a pesar de su mayor accesibilidad química y estabilidad en comparación con la hormona natural 1,25D₃ más flexible (**Figura 10**). Entre ellos, el 3-acetato (**I.17**)^[84,85] y 3-mesilato (**I.18**)^[86] son más activos que el ácido litocólico (**LCA**) en células HL-60 (ensayos de diferenciación celular), pero sus actividades son bajas en comparación con la 1,25D₃.

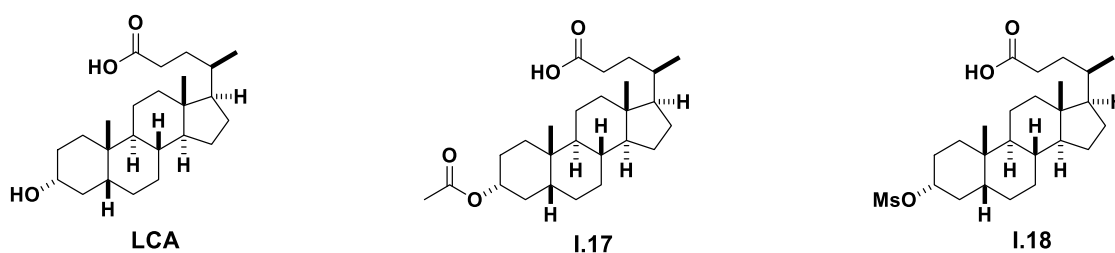


Figura 10. Ácido litocólico (**LCA**), 3-acetato (**I.17**) y 3-mesilato (**I.18**).

A partir del LCA se intercambió el C-3-OH por el grupo 2-hidroxi-2-metil-1-propilo.^[87]

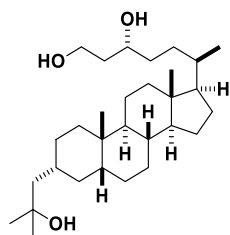
El compuesto obtenido **I.23** resultó ser 10.000 veces más potente que el LCA y tres veces más potente que la 1,25D₃ en células HL-60. El compuesto **I.24** no es tan activo como

2. Objetivos y plan de trabajo

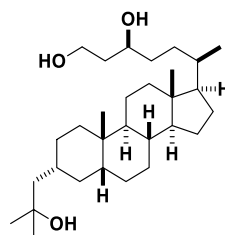
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

• OBJETIVO 1

Síntesis de los nuevos análogos **CAR-R** y **CAR-S** como derivados hidroxilados en la cadena lateral del ácido litocólico para estudiar sus actividades agonistas del receptor de la vitamina D (VDR).



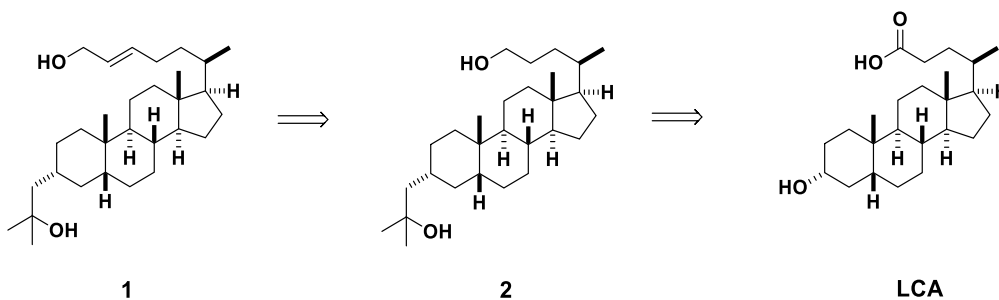
CAR-R



CAR-S

• OBJETIVO 2

Síntesis de los dioles **1** y **2**, a partir del ácido litocólico, como precursores de los derivados hidroxilados **CAR-R** y **CAR-S**.



OBJETIVO 3

(ver página 58)

OBJETIVO 4

(ver página 58)

3. Parte 1

**DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS
DERIVADOS DEL ÁCIDO LITOCÓLICO DIHIDROXILADOS EN
LA CADENA LATERAL**

Parte de estos resultados han sido publicados en la revista Bioorganic Chemistry.

REFERENCIA: Bioorganic Chemistry
Volume 115, October 2021, 105202

PUBLICACIÓN:

Design, synthesis and evaluation of side-chain hydroxylated derivatives of lithocholic acid as potent agonists of the vitamin D receptor (VDR)

Carmen M. González ^{a,1}, Sunil Gaikwad ^{a,2}, Gonzalo Lasanta ^a, Julian Loureiro ^{a,3},
Niclas Nilsson ^b, Carole Peluso-Iltis ^{c,d,e,f}, Natacha Rochel ^{c,d,e,f,*}, Antonio Mouriño ^{a,*}

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105202>

FILIACIÓN:

Carmen M. González ^{a,1}, Sunil Gaikwad ^{a,2}, Gonzalo Lasanta ^a, Julian Loureiro ^{a,3},
Niclas Nilsson ^b, Carole Peluso-Iltis ^{c,d,e,f}, Natacha Rochel ^{c,d,e,f,*}, Antonio Mouriño ^{a,*}

a Departamento de Química Orgánica, Laboratorio de Investigación Ignacio Ribas, Universidad de Santiago de Compostela, Avda. das Ciencias s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

b LEO Pharma, Open Innovation, Industriparken 55, 2750 Ballerup, Denmark.

c Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire (IGBMC), 67400 Illkirch, France.

d Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale (INSERM), U1258, 67400 Illkirch, France.

e Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), UMR7104, 67400 Illkirch, France.

f Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France.

ISSN: 0045-2068.

3.1 Antecedentes y justificación

3.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

En base a estudios de docking, el Dr. Sunil Gaikwad comenzó la síntesis de los análogos del LCA (**I.19**, **I.20**, **I.21**, **I.22**, **I.23** e **I.24**) en estos laboratorios (**Figura 12**), que posteriormente se patentaron y publicaron.^[87] El reciente trabajo del grupo de investigación de H. Kagechika^[88], sobre derivados de ácido litocólico modificados en el anillo A como agonistas del VDR (**I.23** y **I.24**), nos llevó a publicar nuestros resultados en el diseño, síntesis y caracterización de análogos modificados en el anillo A del esteroide.

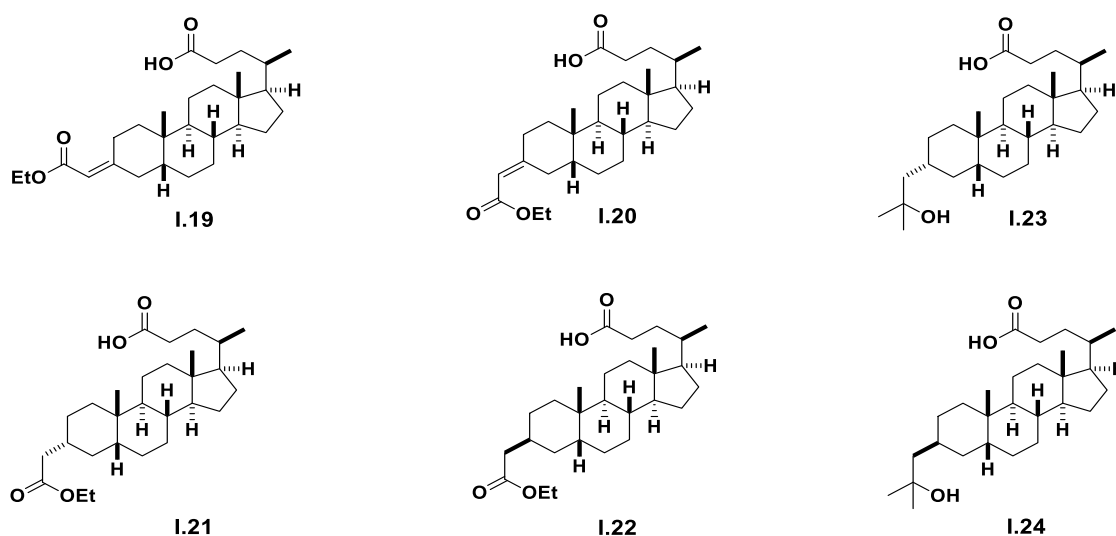
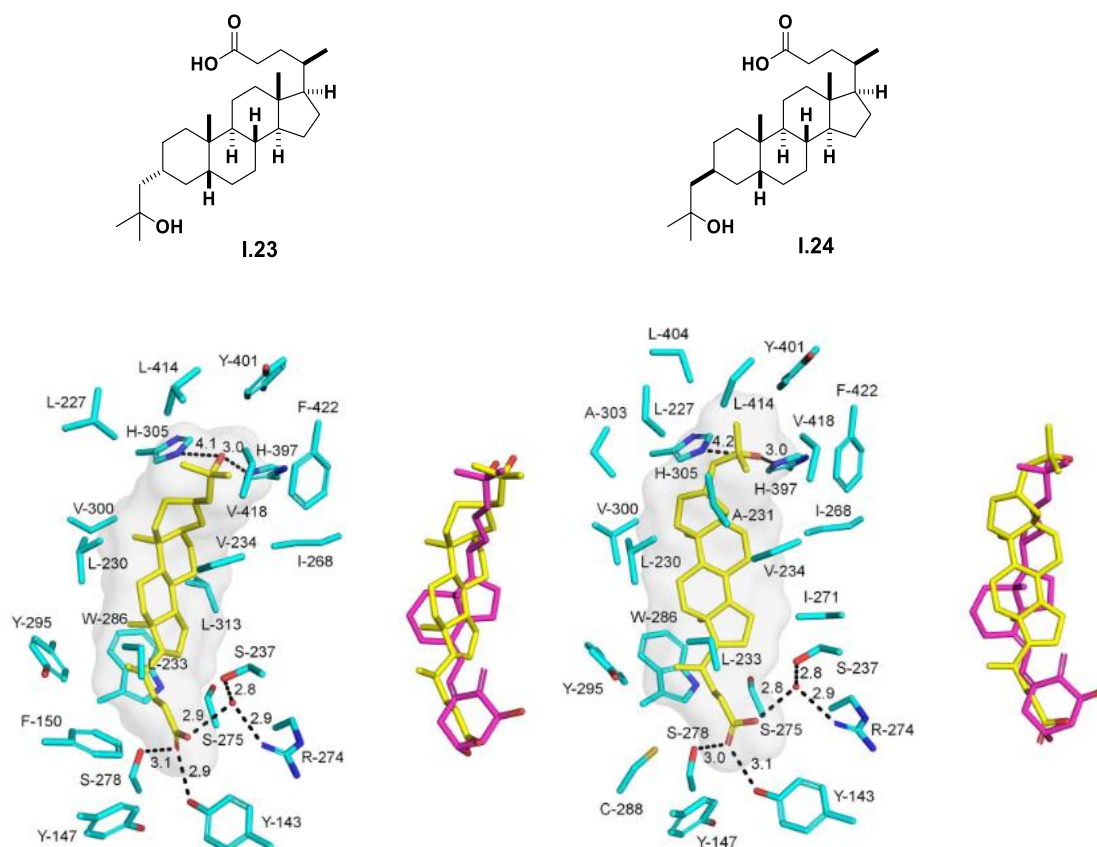


Figura 12. Derivados del ácido litocólico como potentes agonistas del VDR.

En comparación con la hormona natural 1,25D₃, el compuesto **I.23** se enlaza al *h*VDR (receptor humano) 15 veces peor, pero induce la diferenciación celular en células HL-60 de forma similar, aunque sin causar efectos calcémicos. Los demás análogos resultaron menos activos que **I.23**. Muestras de **I.23** y de su epímero menos activo **I.24**, se enviaron a los laboratorios de la Dr. Natacha Rochel (IGBMC, Illkirch-Francia), dónde se obtuvieron cristales de los correspondientes complejos ligando α VDR(LBD), los cuales, se sometieron al análisis estructural en el sincrotrón de Grenoble. Las estructuras cristalinas muestran que los grupos carboxílicos imitan las interacciones de los grupos hidroxilo del anillo A de la hormona natural 1,25D₃ con los residuos de aminoácidos Ser-265, Arg-302, Tyr-175 y Ser-306. Las estructuras cristalinas están de acuerdo con las estructuras obtenidas por docking y se representan en la **Figura 14**. El grupo carboxilo hace las funciones del anillo A de la hormona 1,25D₃, mientras que el hidroxilo terciario imita al hidroxilo de la cadena lateral de la hormona.

Figura 14: Estructuras ligando α VDR(LBD). Ligando más potente **I.23** y epímero **I.24**. (Residuos de aminoácidos: A = alanina, F = fenilalanina, H = histidina, I = isoleucina, L= leucina, R = arginina, S = serina, V = valina, W = triptófano, Y = tirosina).



Estudios de docking posteriores sobre ligandos del LCA con cadenas laterales dihidroxiladas en lugar de cadenas carboxílicas nos llevaron a los análogos **CAR-R** y **CAR-S** (**Figura 15**), que mejoran sustancialmente la afinidad de los análogos anteriores por el h VDR(LBD).^[89]

3.1.1 DISEÑO DE CAR-R Y CAR-S

En la **Figura 16** se muestran detalles de las estructuras de docking obtenidas para **CAR-R** y **CAR-S** utilizando el dominio de enlace (LBD) del receptor α VDR. Los nuevos análogos se enlazan bien al receptor (>90%) en comparación con la 1,25D₃ (100%) y mejor que el LCA (85%), adoptando orientaciones similar a la del LCA, pero invertidas en comparación con la 1,25D₃. Las cadenas laterales ocupan la región correspondiente al anillo A de 1,25D₃. El hidroxilo primario en C26 de la cadena lateral de **CAR-R** se une directamente vía enlace de hidrogeno al residuo Arg-302 y a través de una molécula de agua al residuo de Ser-265. El hidroxilo secundario en C24 se une

eficientemente a la Ser-306 y de forma débil a la Tyr-175. El hidroxilo terciario se une eficientemente a la His-333 y débilmente a la His-423. Las interacciones de **CAR-S** con el receptor son similares a las de su C-24-epímero, **CAR-R**.

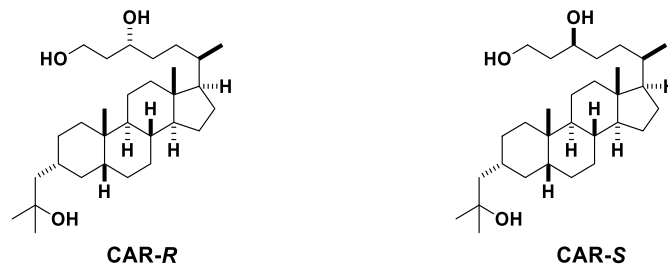


Figura 15. Derivados dihidroxilados en cadena lateral como agonistas del VDR.

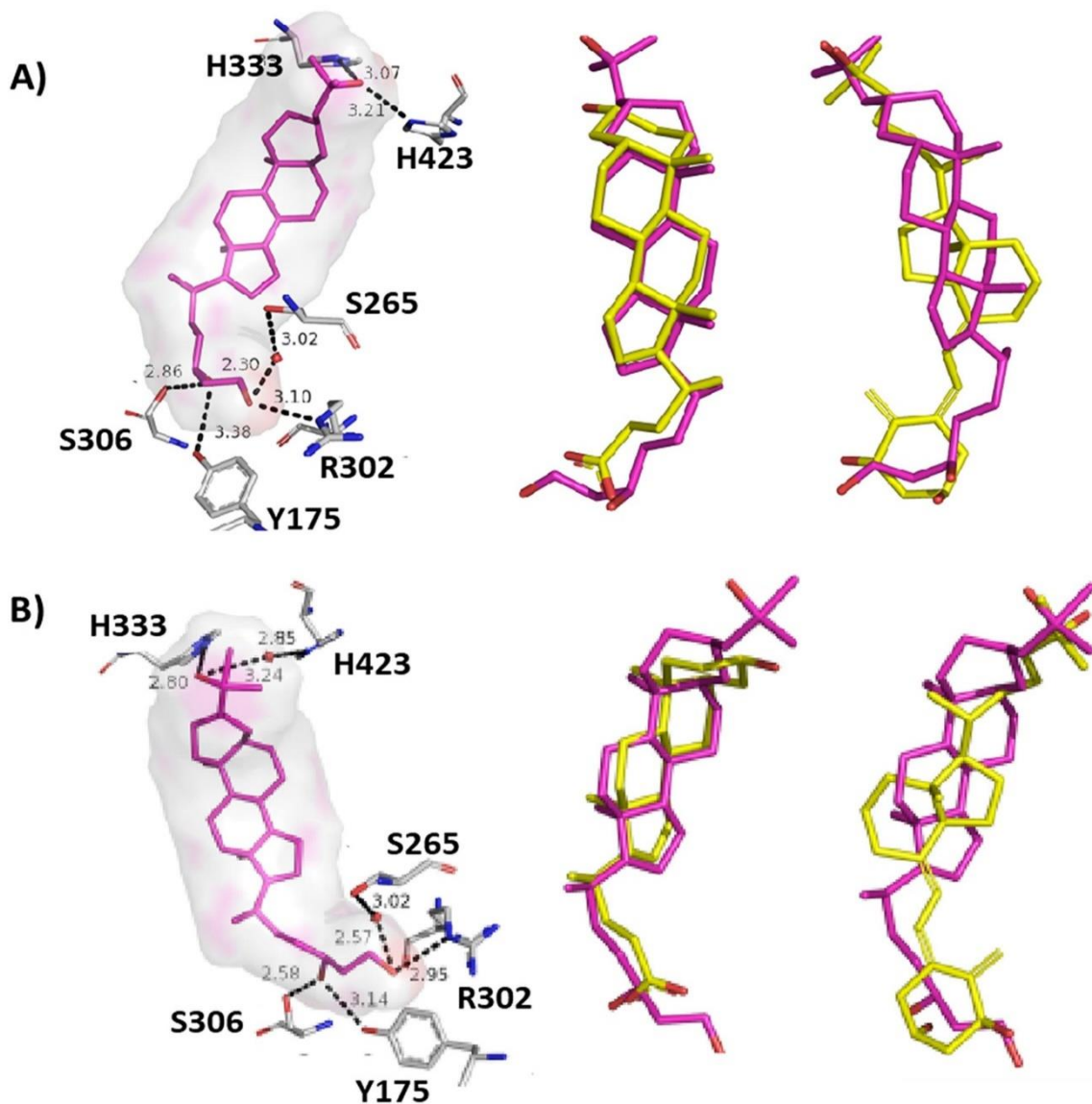


Figura 16: (A) Izquierda: posición del ligando **CAR-R** en el α VDR(LBD). Interacciones de las cadenas laterales hidroxiladas con el receptor. Derecha: superposición de **CAR-R**

(en rosa) con LCA (amarillo) y con 1,25D₃ (amarillo), respectivamente. (B) Izquierda: interacciones de las cadenas laterales hidroxiladas de **CAR-S** con el α VDR(LBD). Derecha: superposición de **CAR-S** con LCA y 1,25D₃, respectivamente.

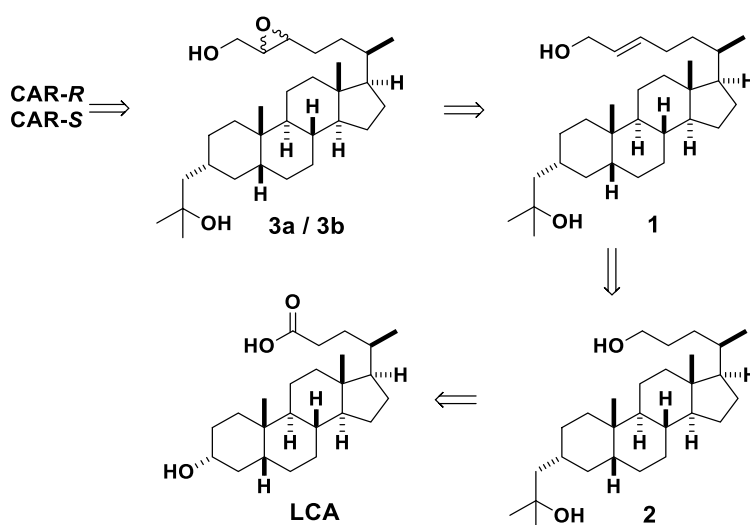
Después de publicar nuestros análogos **CAR-R** y **CAR-S**,^[89] Kagechika y col.^[90] patentaron los mismos compuestos como derivados del LCA como potentes agonistas del receptor de la vitamina D (VDR).

3.2 Discusión

3.2.1 RETROSÍNTESIS DE CAR-R Y CAR-S

Siguiendo la estrategia sintética desarrollada^[87] en estos laboratorios para la síntesis de derivados del LCA, se planteó la síntesis de los análogos **CAR-R** y **CAR-S**^[89] (**Esquema 1**).

La síntesis de los análogos diseñados empieza con la preparación del diol **2** a partir de LCA, destacando como pasos claves posteriores, la síntesis del alcohol alílico **1**, intermedio hacia las epoxidaciones asimétricas correspondientes para la obtención de sendos epóxidos **3a/3b** como precursores de **CAR-R** y **CAR-S**.



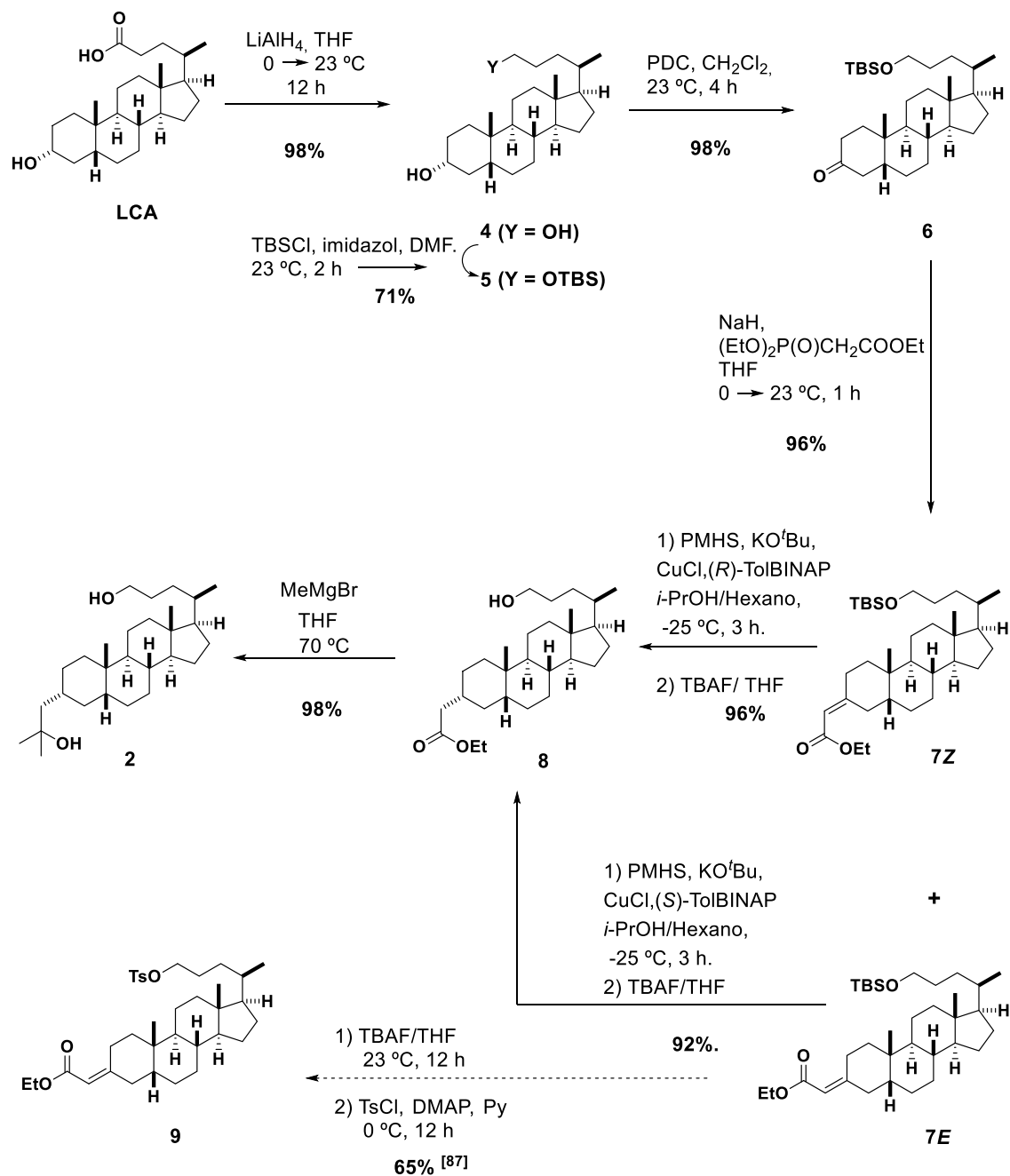
Esquema 1. Análisis retrosintético de los nuevos análogos dihidroxilados en cadena lateral como análogos superagonistas del VDR: **CAR-R** y **CAR-S**.

3.2.2. TRABAJO REALIZADO

3.2.2.1 SÍNTESIS DEL DIOL (2)

La síntesis del alcohol **2** a partir del LCA se ilustra en el **Esquema 2**. La reducción del LCA con hidruro de litio y aluminio en tetrahidrofurano proporcionó el diol **4** (98%), que se protegió de forma selectiva con cloruro de *tert*-butildimetilsililo e imidazol en dimetilformamida para dar al éter silícico **5** (71%). La oxidación de **5** con dicromato de piridinio (PDC) en diclorometano condujo a la cetona **6** (98%), cuya reacción de olefinación de Horner-Wadsworth-Emmons con el iluro $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}(\text{Na})\text{COOEt}$ en tetrahidrofurano permitió obtener, después de separación por HPLC los ésteres **7Z** (41%) y el **7E** (46%). La estructura del compuesto mayoritario se elucidó por rayos-X del correspondiente tosilato **9**^[87].

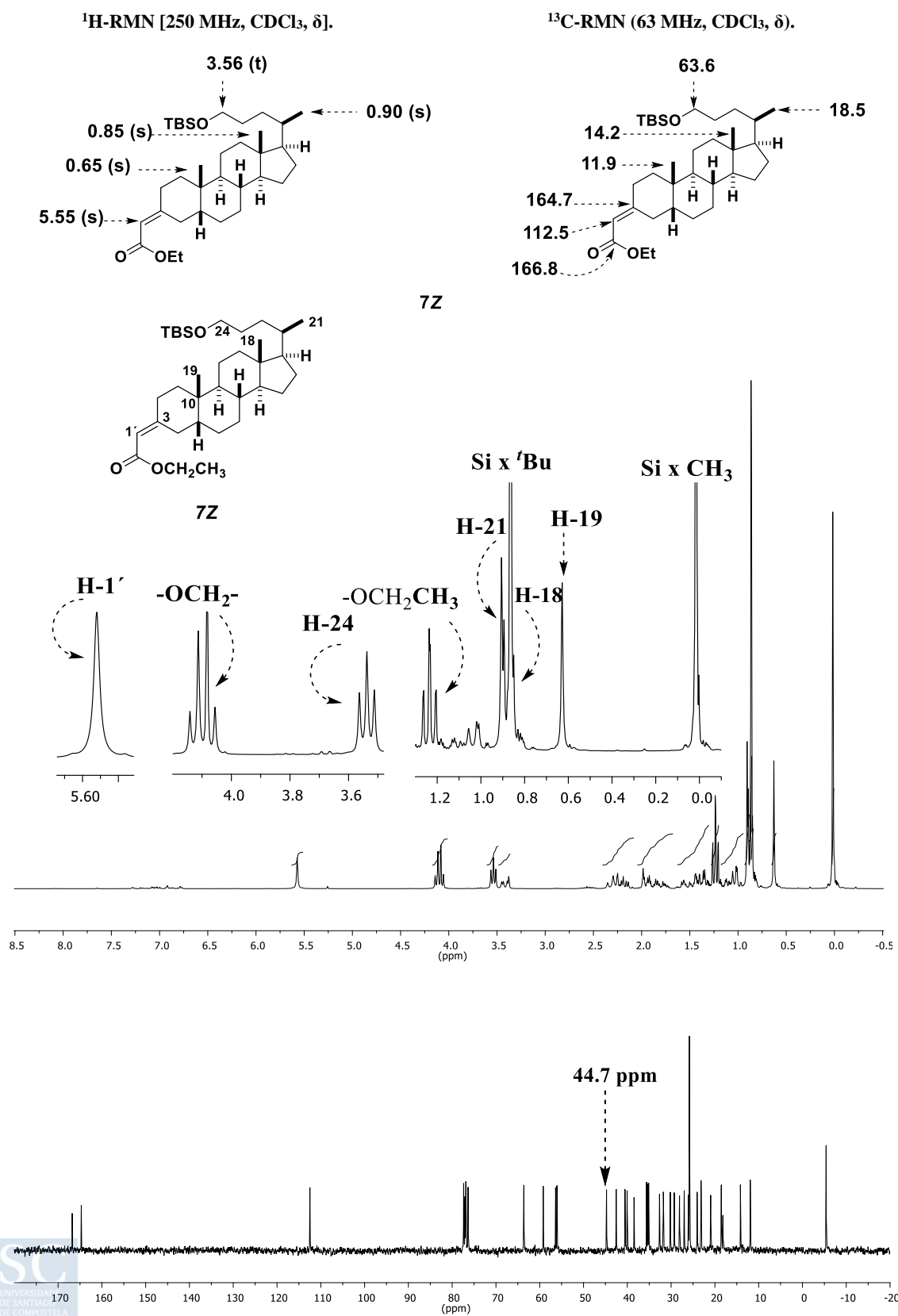
El éster **7E** (δ 45.5 ppm) puede distinguirse de su isómero **7Z** (δ 44.7 ppm) mediante ^{13}C -RMN. (Figuras 17 y 18).



Esquema 2: Síntesis del diol **2** desde ácido litocólico (LCA).

A continuación, se muestran las señales principales de RMN de los ésteres sintetizados **7Z/7E** y sus espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. (Figura 17).

Figura 17. Espectros de ^1H -RMN (250 MHz, CDCl_3) y de ^{13}C -RMN (CDCl_3 , 63 MHz) del compuesto **7Z**.



A continuación, se muestran las principales señales características de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN de los compuestos **2** y **8** junto con el espectro de ^1H -RMN (250 MHz, CDCl_3) del compuesto **2** (Figura 19).

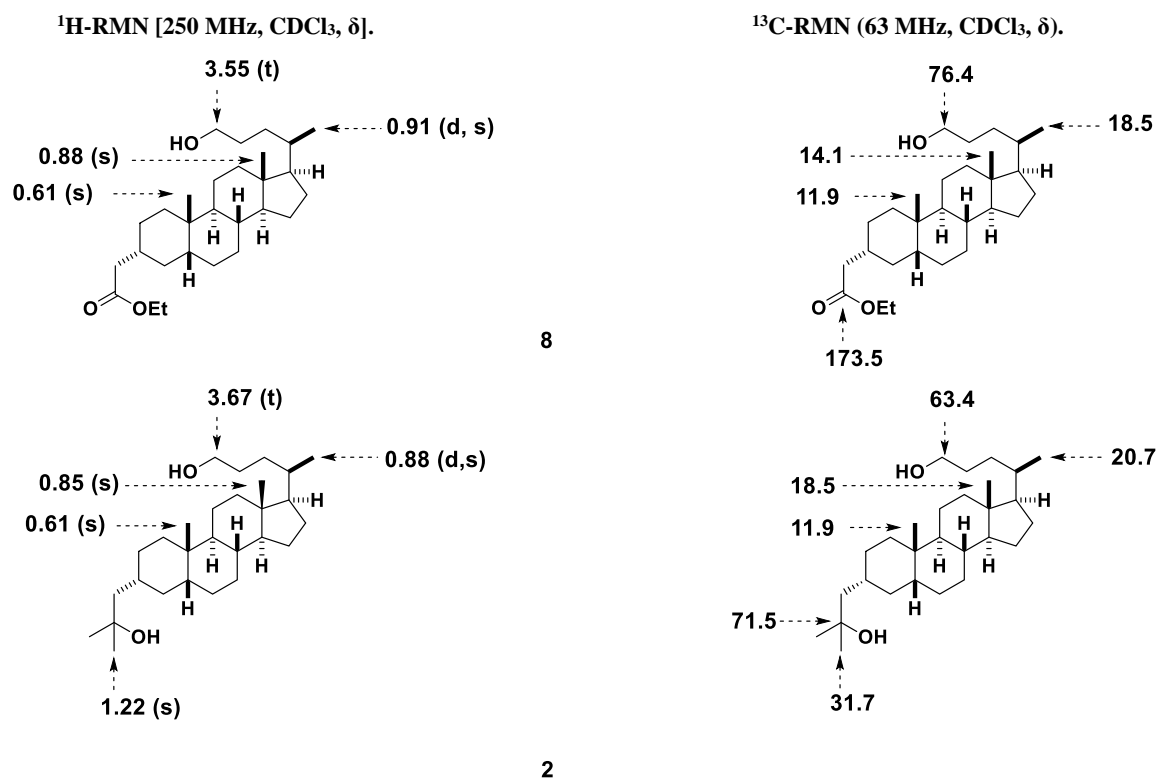
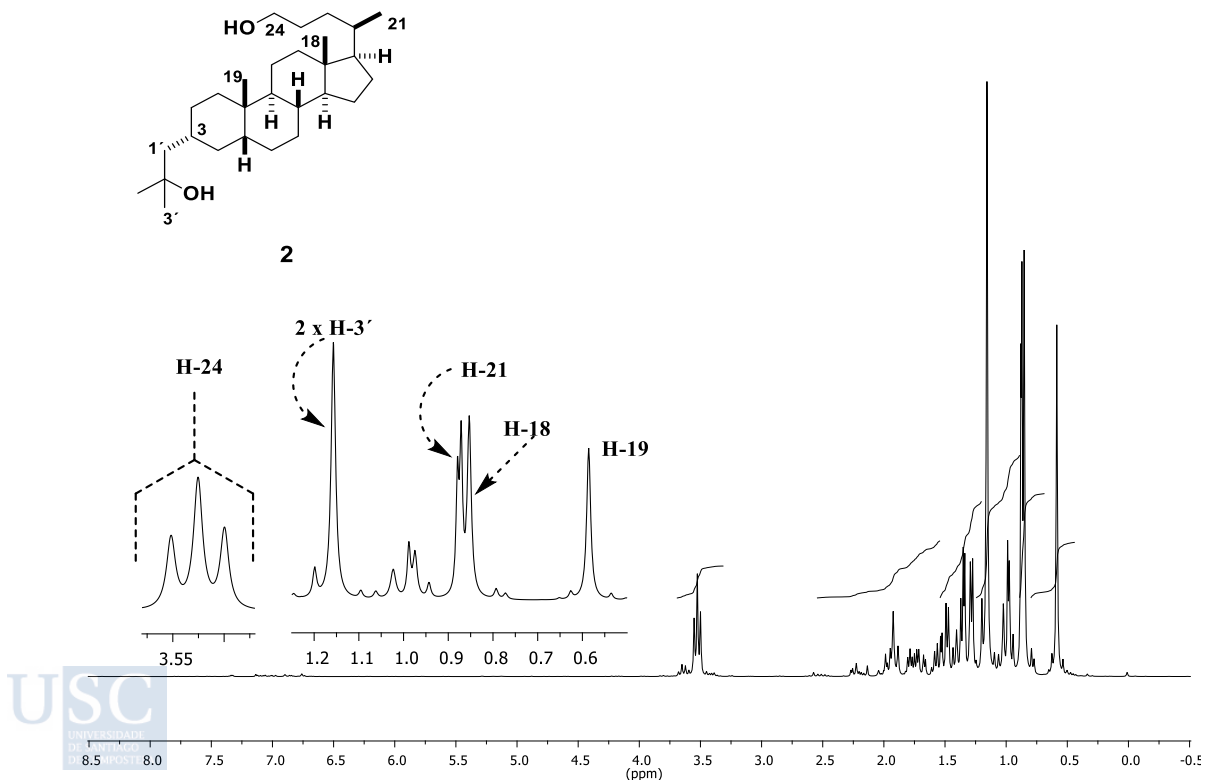
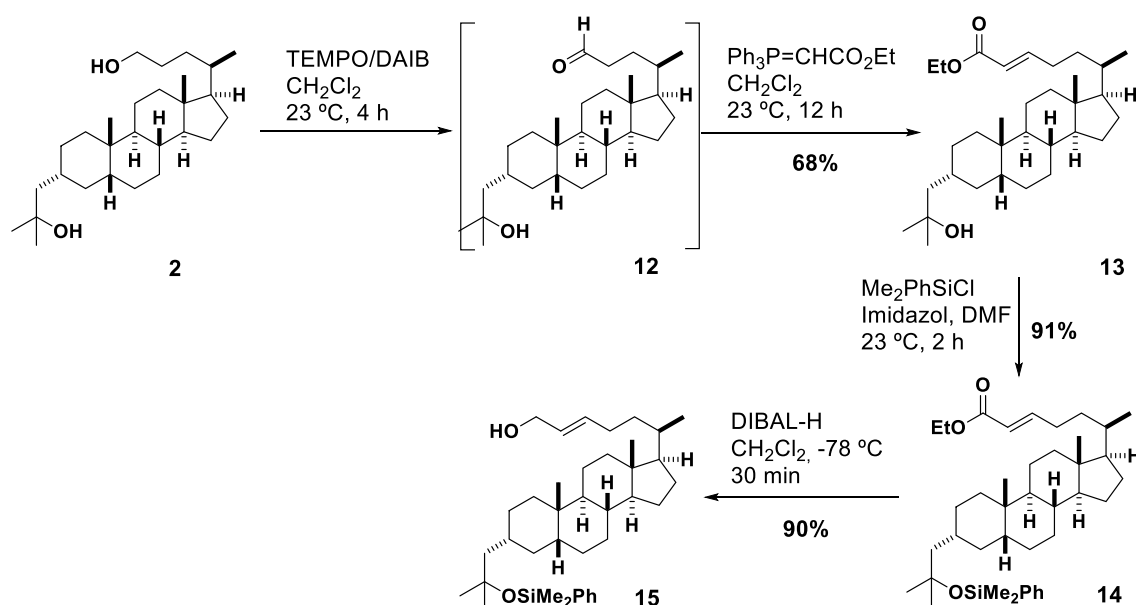


Figura 19. Espectro de ^1H -RMN (250 MHz, CDCl_3) del compuesto **2**.



3.2.2.2 SÍNTESIS DEL ALCOHOL ALÍLICO (15)

La oxidación del diol **2** con TEMPO [((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxidanilo)] catalítico en presencia de diacetoxibenceno (DAIB) como cooxidante en diclorometano proporcionó el aldehído **12**, el cual se hizo reaccionar *in situ* con el iluro $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2\text{Et}$, para dar el éster α,β -insaturado **13** (68%, dos pasos). Con objeto de facilitar las purificaciones posteriores por HPLC mediante la obtención de compuestos detectables al UV, se procedió a la protección del hidroxilo terciario de **13** con cloruro de dimetilfenilsililo en presencia de imidazol en dimetilformamida para dar el compuesto **14** (91%), el cual se redujo con hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H) en diclorometano para dar el alcohol alílico **15** (90%) (Esquema 5).



Esquema 5. Síntesis del alcohol alílico **15** a partir del diol **2**.

En las siguientes figuras se muestran las principales señales de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN del compuesto **15** (Figuras 20 y 21).

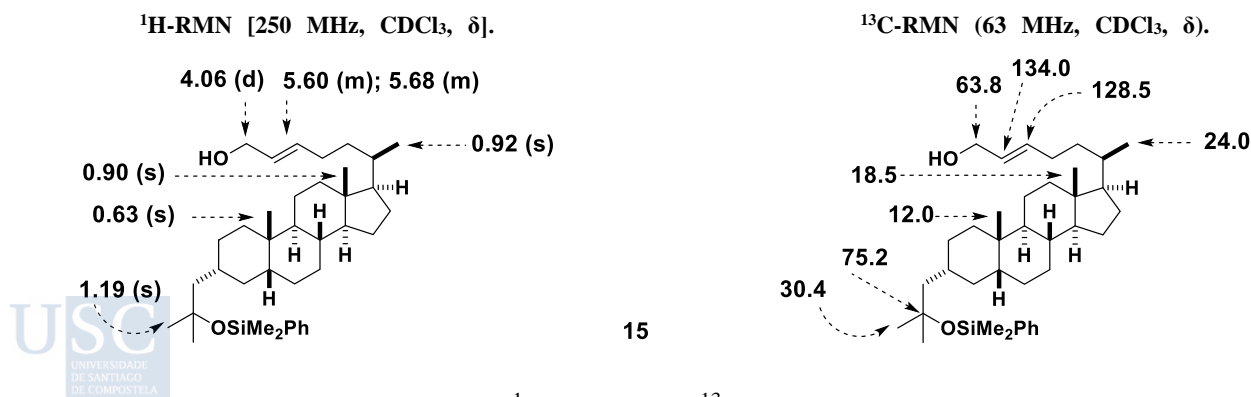
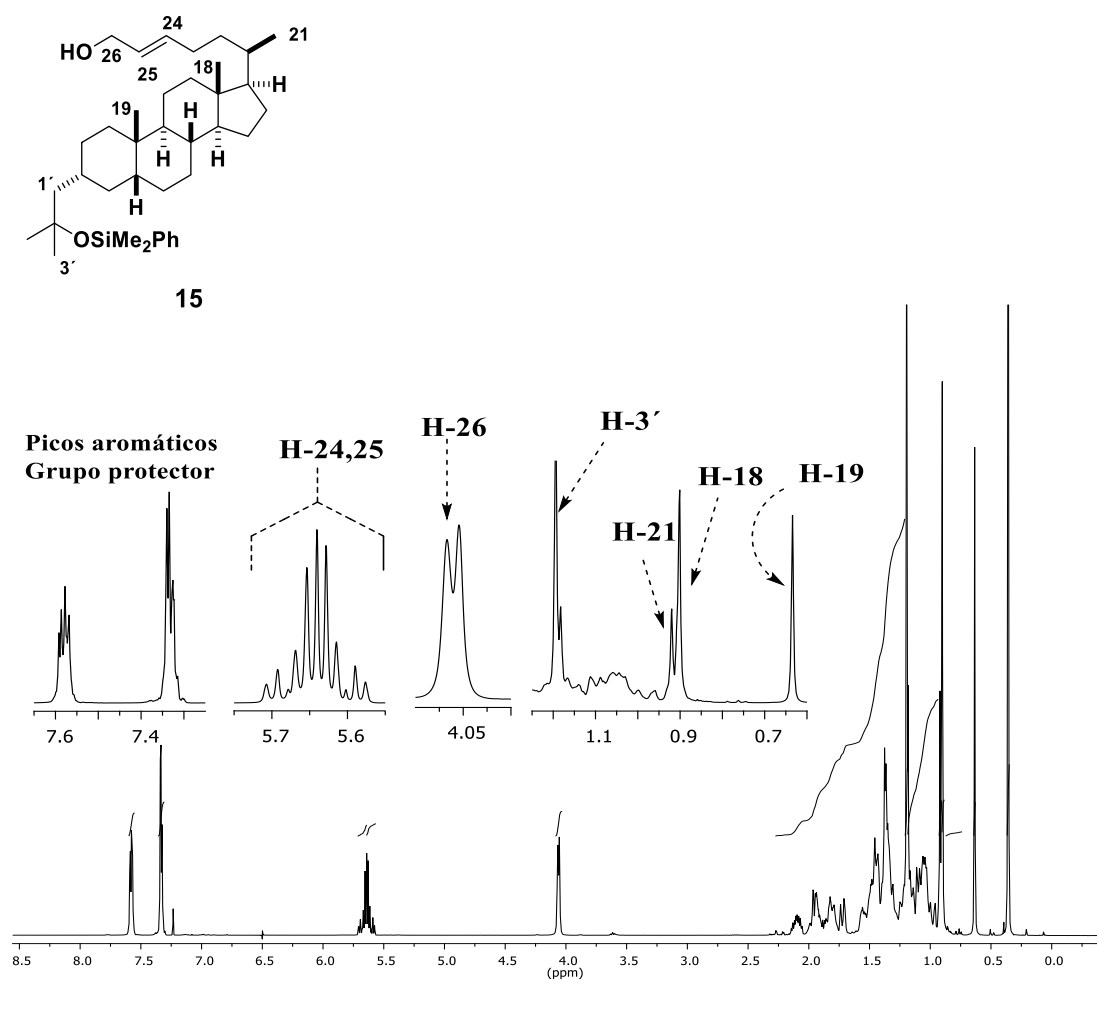


Figura 20. Principales señales de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN del alcohol alílico **15**.

Figura 21. Espectro de ^1H -RMN (250 MHz, CDCl_3) de **15**.

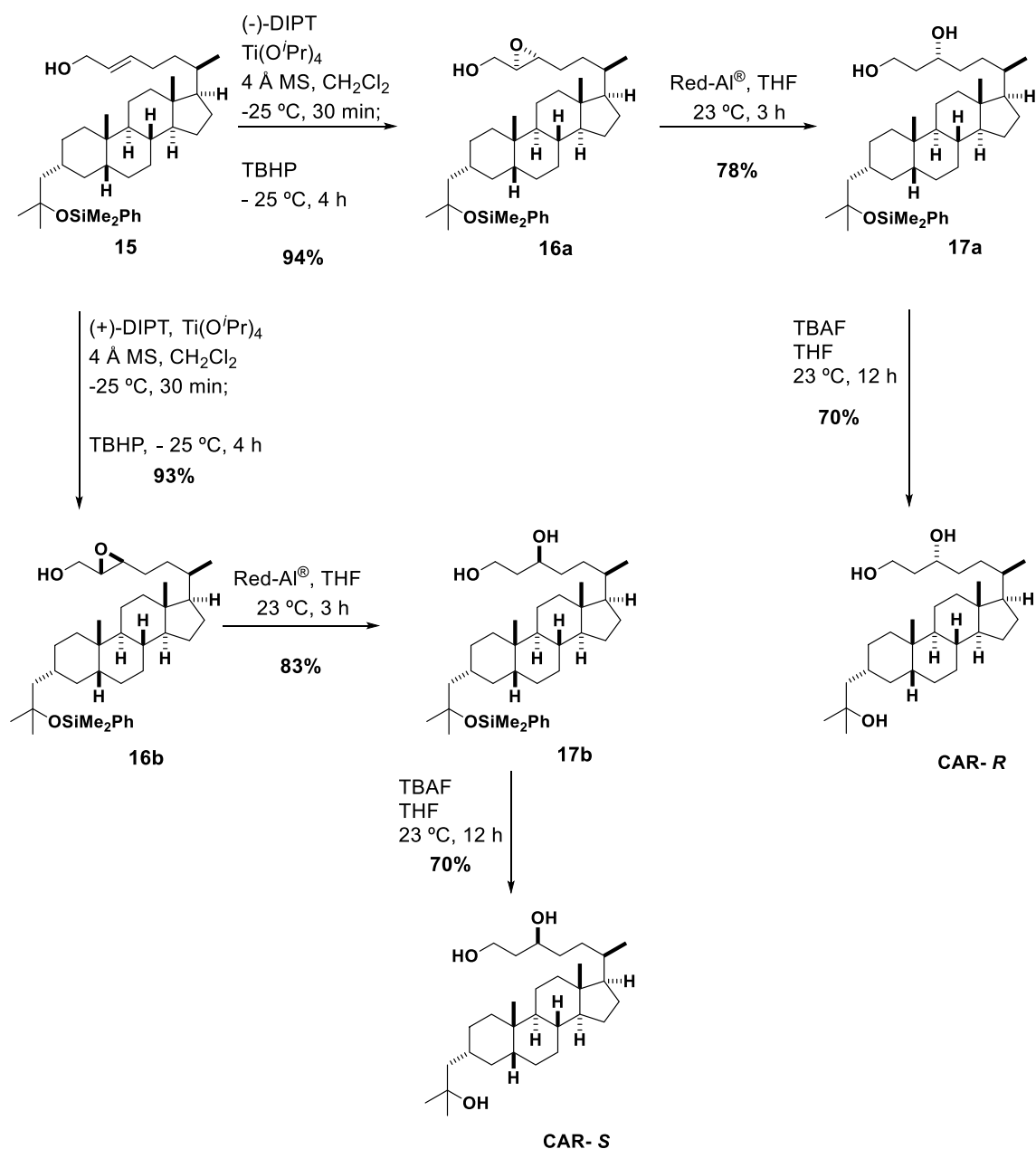


3.2.2.3 SÍNTESIS DE CAR-R Y CAR-S

La síntesis de los análogos hidroxilados **CAR-R** y **CAR-S** se muestra en el **Esquema 6**. La epoxidación asimétrica de Sharpless^[94] del alcohol alílico **15** empleando hidroperóxido de *tert*-butilo (TBHP) en presencia de isopropóxido de titanio (IV) $[\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4]$ y (-)-DIPT [(2*S*,3*S*)-D(-)-tartrato de isopropilo] en diclorometano, condujo al epoxi-alcohol **16a** en un 94% de rendimiento.

El tratamiento de **15** con (+)-DIPT, generó el epoxi-alcohol **16b** (93%). Ambos epóxidos se purificaron por HPLC. Las aperturas de ambos epóxidos asistidas por el hidroxilo de la cadena lateral con Redal[®] (hidruro de bis-metoxietoxi-aluminio y sodio) en tetrahidrofurano condujo a los dioles **17a** (78%) y **17b** (83%).

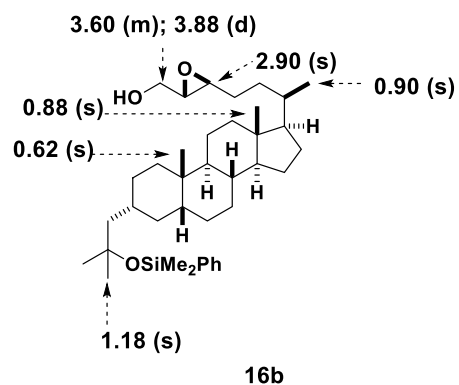
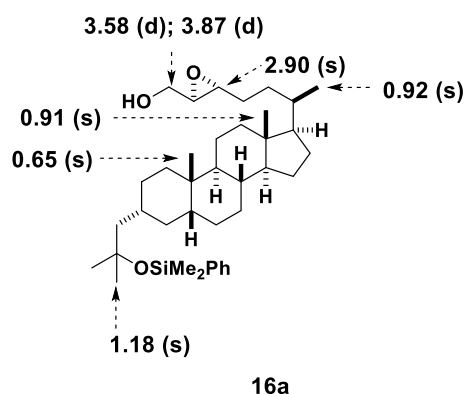
La posterior desprotección de los compuestos **17a** y **17b**, cuya desprotección con fluoruro de tetrabutilamonio en tetrahidrofurano proporcionó los análogos deseados **CAR-R** (70%) y **CAR-S** (70%).^[89] Los cristales de **CAR-R** y **CAR-S**, crecidos en EtOAc, se sometieron a difracción de rayos-X (**Figura 23**).



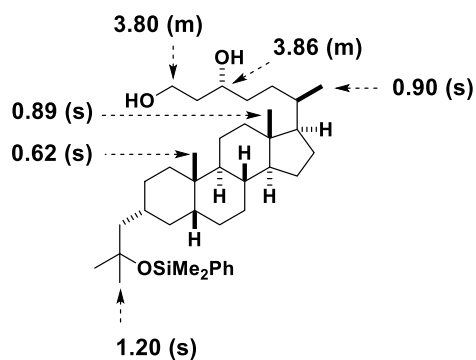
Esquema 6. Síntesis de **CAR-R** y **CAR-S** a partir del alcohol alílico **12**.

A continuación, se muestran las principales señales de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN de los epóxidos **16a/16b** y los dioles **17a/17b** (**Figura 22**).

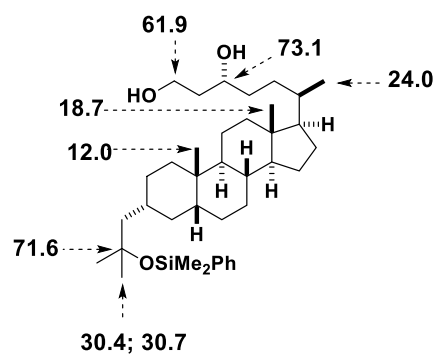
$^1\text{H-RMN}$ [250 MHz, CDCl_3 , δ].



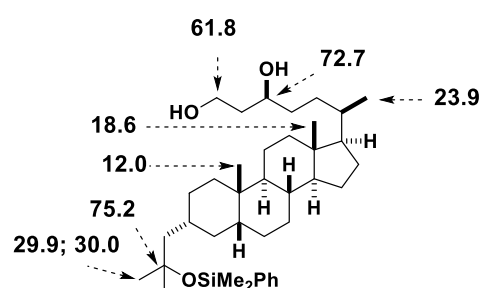
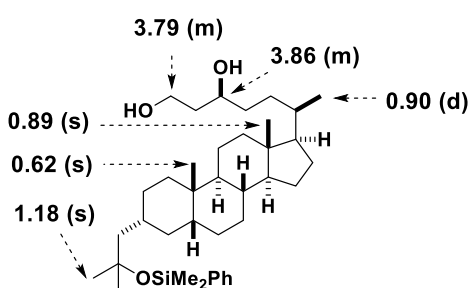
$^1\text{H-RMN}$ [250 MHz, CDCl_3 , δ].



$^{13}\text{C-RMN}$ (63 MHz, CDCl_3 , δ).



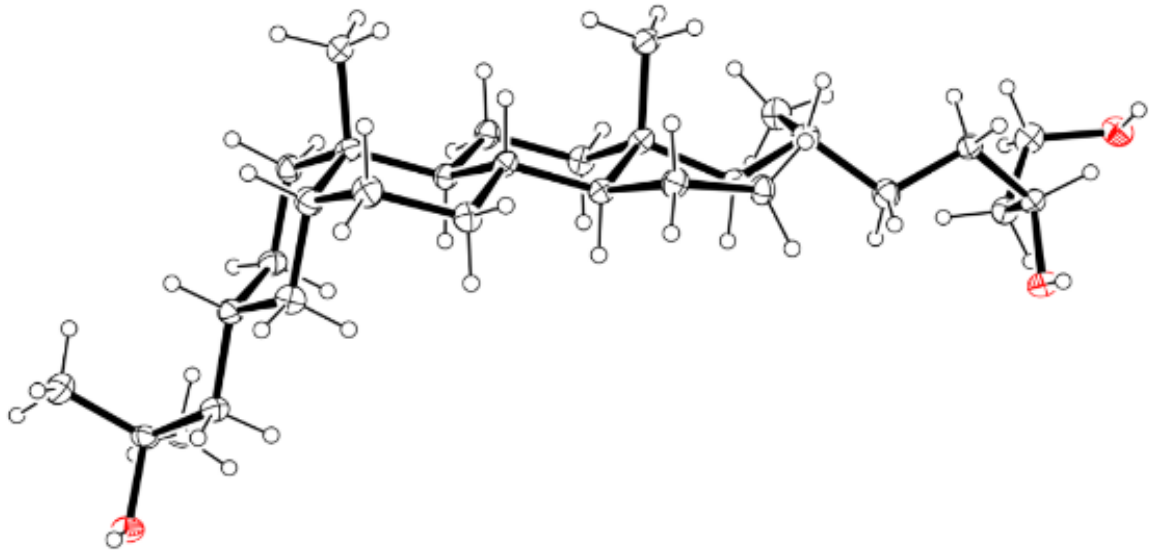
17a



17b

Figura 22. Principales señales de $^1\text{H-RMN}$ y de $^{13}\text{C-RMN}$ de los compuestos **16a/16b** y **17a/17b**.

CAR-R



CAR-S

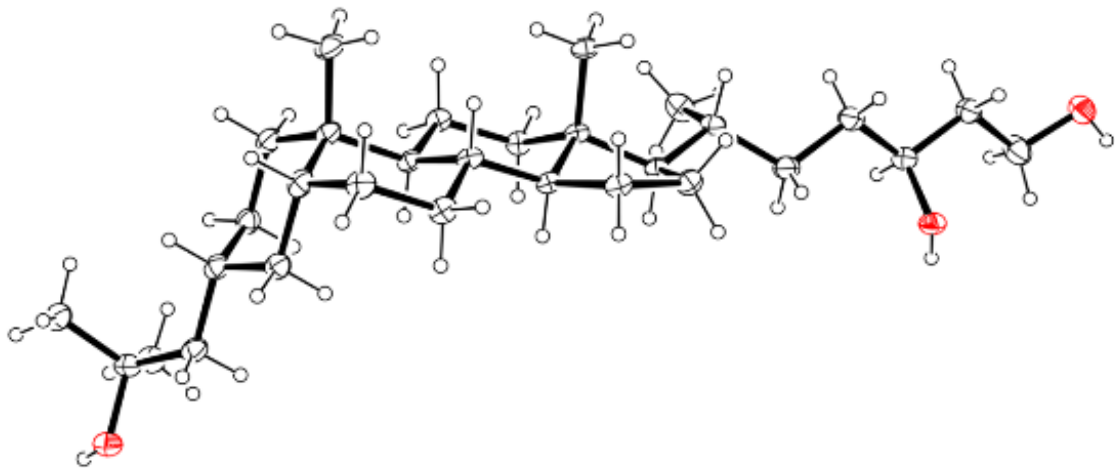


Figura 23. Estructuras cristalinas de **CAR-R** y **CAR-S** obtenidas por difracción de rayos-X de monocristal.

A continuación, se muestran las señales principales de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN de los compuestos finales **CAR-R** y **CAR-S** (Figuras 24 y 25).

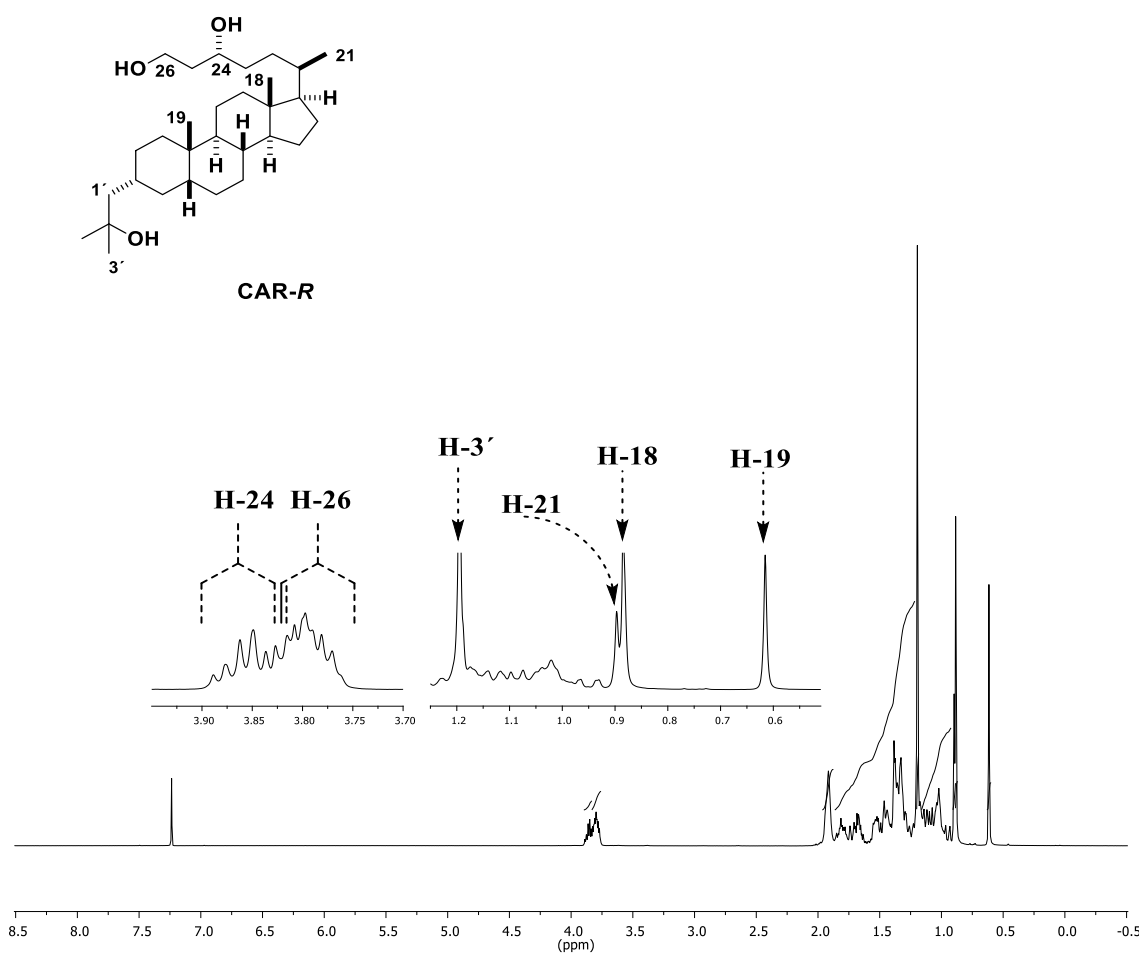
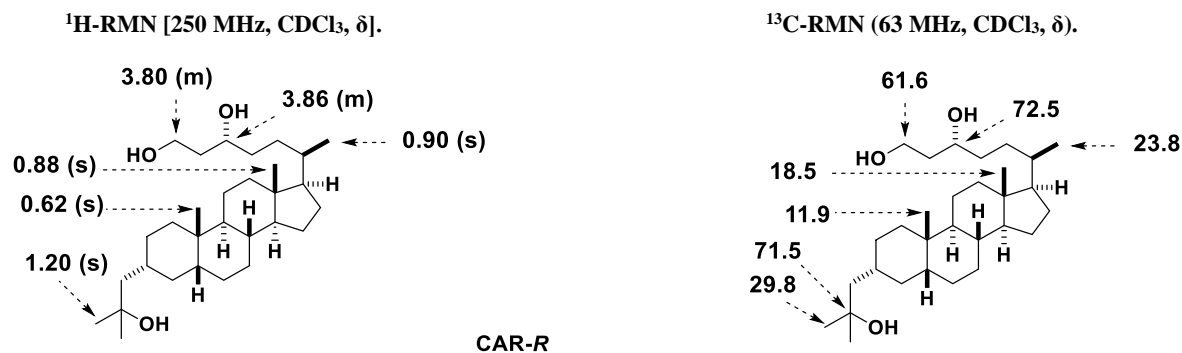


Figura 24. Espectro de ^1H -RMN (250 MHz, CDCl_3) de **CAR-R**.

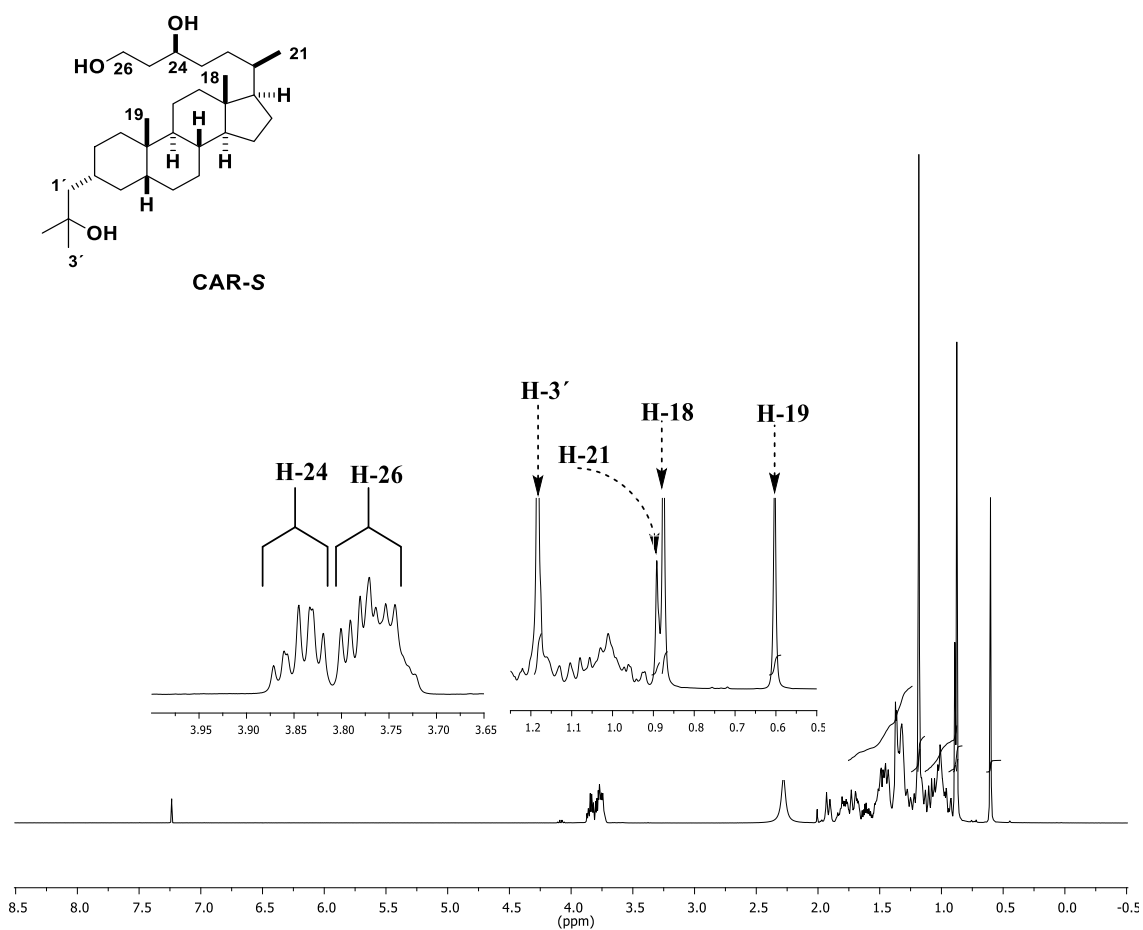
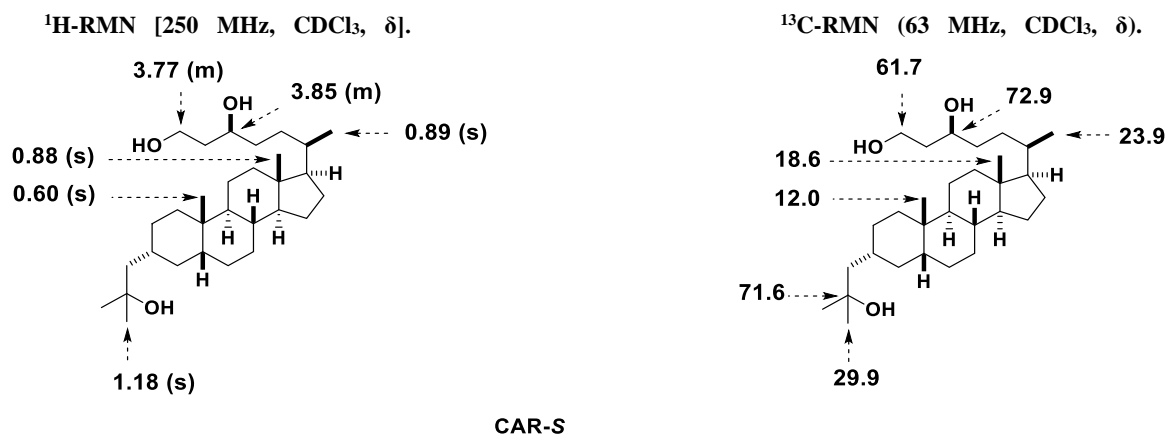


Figura 25. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) de **CAR-S**.

3.2.2.4 EVALUACIÓN BIOLÓGICA CAR-R Y CAR-S

Los dos análogos **CAR-R** y **CAR-S** mostraron un efecto de inhibición relevante en la inflamación de los queratinocitos primarios humanos. El análogo **CAR-R** mostró el mayor efecto de inhibición. Como se indica en la tabla, el análogo **CAR-R** exhibió la potencia más alta en la reducción de (CCl₂) de queratinocitos primarios humanos con un IC₅₀ de 0.15 nM y una inhibición total de los niveles de (CCl₂) inducidos. El análogo **CAR-S**, también presentó una alta potencia en la reducción de (CCl₂) aunque ligeramente menor que **CAR-R** (IC₅₀ = 0.26 nM). Este resultado indica una gran diferencia de actividad entre ambos diastereoisómeros.

Ambos derivados presentan una viabilidad celular equitativa y el análogo **CAR-R** presenta un valor superior de efecto máximo de viabilidad celular.

- (CCl₂) = proteína quimioatrayente de monocitos-1; derivado de quimiocina que participa en regeneración de tejidos)].
- Concentración para la inhibición al 50% (IC₅₀) (nM)
- [Efecto máximo = máxima inhibición de CCl₂ o viabilidad celular].

Compuesto	IC ₅₀ CCl ₂ (nM)	IC ₅₀ Viabilidad	Efecto máximo de viabilidad (%)
CAR-R	0.15	1080	33
CAR-S	0.26	1080	18

Tabla 1. Ensayos biológicos de los análogos **CAR-R** y **CAR-S**.

Los resultados biológicos que presentan estos análogos dihidroxilados,^[89] nos llevó a diseñar por docking molecular, agonistas más potentes del ácido litocólico y a plantear estrategias de síntesis de los mismos (**Resultados Parte II**).

4. Parte 2

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DEL ÁCIDO
LITOCÓLICO MODIFICADOS EN EL ANILLO A Y EN LA
CADENA LATERAL CICLOHEXÁNICA DIHIDROXILADA**

ALCANCE DE CONFIDENCIALIDAD

Se ha llevado a cabo un estudio hacia la obtención de cadenas laterales ciclohexánicas dihidroxiladas de análogos modificados en el anillo A del ácido litocólico como potentes candidatos agonistas del receptor de la vitamina D.

Esta tesis doctoral brinda este resultado hacia la posterior síntesis de los análogos diseñados por docking con objeto de evaluación biológica, publicación y patente de resultados.

4.1 Antecedentes y justificación

(Ver página 58)

4.2 *Discusión*

(Ver página 58)

5.Resultado experimental

PROCEDIMIENTOS GENERALES.

Las reacciones con compuestos o mezclas sensibles al oxígeno o a la humedad se llevaron a cabo bajo atmósfera de argón desoxigenado y seco. Los matraces utilizados para las reacciones se secaron en una estufa a 150 °C, al menos durante 12 h. o se flamearon o calentaron con un decapador y enfriaron bajo corriente de argón. Los disolventes utilizados se purificaron según las indicaciones de H. C. Brown^[109] y se destilaron bajo atmósfera de argón, utilizando un agente desecante adecuado. Las disoluciones comerciales de ⁿBuLi (disolución en hexanos, Aldrich) ^tBuLi (disolución en pentano, Aldrich), se valoraron con *N*-bencilbenzamida (Aldrich) y/o ácido difenilacético (Fluka) antes de su uso.^[110] Et₂O y THF se destilaron de Na-benzofenona, benceno de Na, tolueno de Na; piridina, Et₃N y hexanos de CaH₂; CH₂Cl₂ de P₂O₅, MeOH de Mg/I₂; la DMF de calidad síntesis se secó sobre tamices moleculares de 4 Å. Hexano (HPLC) e ⁱPrOH (HPLC) se utilizaron directamente. El dicromato de piridinio (PDC) se preparó según las indicaciones de E. J. Corey.^[111] Para las reacciones a baja temperatura se utilizaron baños de hielo seco en acetona o metanol, enfriados con una sonda de refrigeración Inmersión Cooler EK-90 de Thermo Fisher Scientific, provista de un controlador de temperatura. Para las reacciones a alta temperatura se utilizaron baños de silicona provistos de termómetro de contacto en el baño. Las temperaturas indicadas se refieren a la temperatura del baño externo. Las jeringas utilizadas fueron de plástico (Discardit) y de vidrio (Hamilton), con agujas con acoplamiento Luer. La adición de disoluciones o disolventes se realizó vía jeringa o cánula. Se utilizó agitación magnética. Las fases orgánicas procedentes de la elaboración de las diversas reacciones se secaron con Na₂SO₄ anhidro. La concentración de disolventes a presión reducida se realizó en un rotavapor Büchi modelo R-114. El progreso de las reacciones se siguió mediante cromatografía en capa fina. Se utilizaron placas de aluminio con una capa de gel de sílice GF-254 Merck. Después de observar la fluorescencia a la luz ultravioleta de 254 nm, las placas se revelaron tratándolas con distintas disoluciones reveladoras: (a) disolución de *p*-anisaldehído en etanol y (b) disolución de molibdato cérico amónico en etanol y posterior calentamiento con un decapador. Para la cromatografía rápida en columna se utilizaron las condiciones de W. C. Still.^[112] Se utilizó gel de sílice (230-400 mesh, Merck). Los disolventes a granel comerciales hexanos, EtOAc y CH₂Cl₂ utilizados para la cromatografía rápida y extracciones se destilaron antes de su uso. Et₂O y TBME para las extracciones se utilizaron sin destilar. Las separaciones por HPLC se realizaron en un

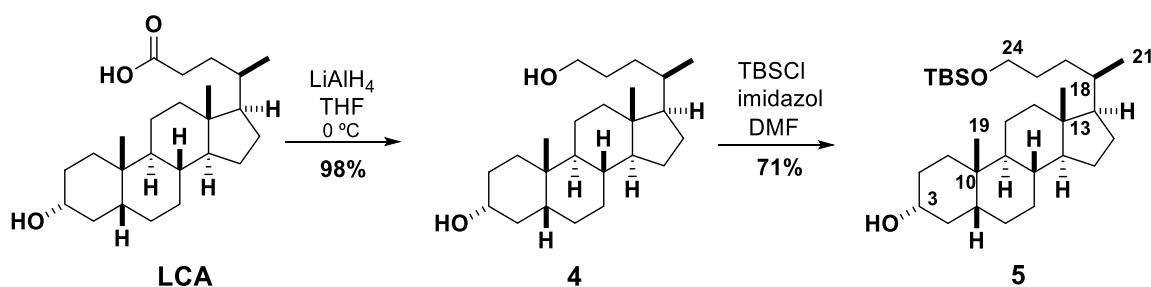
equipo SHIMADZU modelo LC-8A equipado con un detector de UV THERMO SP modelo Spectra 100 utilizando una columna Phenomenex-LUNA 5 μ micro Sílica (2), 10 x 250 mm, fase normal y otra columna, Phenomenex Luna 5 μ C18 (2) 250 x 10.00 mm 5 μ micro, fase reversa. Los disolventes utilizados en HPLC: EtOAc, *i*PrOH y CH₃CN de calidad síntesis y los hexanos-comerciales se destilaron. Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Varian Inova-400 (9.39 T, 400 MHz para ¹H RMN) y Bruker DPX-250 (5.87 T, 250 MHz para ¹H RMN y 63 MHz para ¹³C RMN) pertenecientes al servicio de RMN de la Universidad de Santiago de Compostela. Los espectros se realizaron utilizando CDCl₃ como disolvente. Los desplazamientos químicos se expresan en unidades δ (ppm) en la escala del TMS ($\delta = 0.0$ ppm) y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz. Se utilizó como referencia interna la señal residual del disolvente; CDCl₃: 7.26 ppm (¹H RMN) y 77.0 ppm (¹³C RMN, triplete). Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas de sector magnético Thermo MAT95XP (EI+) y en un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite (ESI) de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña. Los espectros IR se registraron en un espectrofotómetro de infrarrojo, BRUKER VECTOR 22 de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña. Los compuestos se nombraron y numeraron siguiendo la nomenclatura y numeración esteroideal. A continuación, se recogen las referencias, el número CAS y la casa comercial correspondiente para cada uno de los reactivos utilizados en este trabajo.

REACTIVOS.

- Ac₂O, Acros, CAS: 108-24-7.
 AIBN, Aldrich, CAS: 78-67-1.
 Bu₃SnH, Acros, CAS: 688-73-3.
 BH₃·SMe₂, Aldrich, CAS: 13292-87-0.
 Benceno, Honeywell, CAS: 71-43-2.
 Bromuro de metiltrifenilfosfonio, Aldrich, CAS: 1779-49-3.
 CatBH, Aldrich, CAS: 274-07-7.
 Ciclohexeno, Aldrich, CAS:110-83-8.
 Cu(OAc)₂, Fluka, CAS: 142-71-2.
 CuCl, Fluka, CAS: 7758-89-6.
 CuI, Aldrich, CAS: 792063
 CDCl₃, Aldrich, CAS: 151823.
 CH₂Cl₂, Honeywell, CAS: 75-09-2.
 CHCl₃, Honeywell, CAS: 67-66-3.
 Dess-Martin Peryodinano, Aldrich, CAS: 274623.
 DAIB, Aldrich, CAS: 3240-34-4
 DIBAL-H, hexanos, Aldrich, CAS: 190306.
 (+)-DIPT, Aldrich, CAS: 2217-15-4.
 (-)-DIPT, Aldrich, CAS: 62961-64-2.
 DMAP, Aldrich, CAS: 1122-58-3.
 DMF, Aldrich, CAS: 68-12-2.
 DMSO, Aldrich, CAS: 472301.
 Et₂O, Honeywell, CAS: 60-29-7.
 Et₃N, Aldrich, CAS: 471283.
 EtOH, Honeywell, CAS: 64-17-5.
 Fosfonoacetato de trietilo, Aldrich, CAS: 867-13-0
 Grubb's second generation catalyst, Aldrich, CAS: 246047-72-3.
 Hoveyda-Grubb's second generation catalyst, Aldrich, CAS: 301224-40-8.
 Hexano (Aldrich, HPLC), CAS: 110-54-3.
 H₂SO₄, 98%, Quimipur, CAS:7664-93-9.
 HF, 48-51%, Acros, CAS: 7664-39-3.
 HCOOH, Fluka, CAS: 64-18-6.
 Imidazol, Fluka, CAS: 288-32-4.
 Isopropanol (Fisher, HPLC), CAS: 67-63-0.
 I₂, Aldrich, CAS: 7553-56-2.
 KCN, Aldrich, CAS: 151-50-8.
 K₂CO₃, Quimipur, CAS: 584-08-7.
 KO^tBu, THF, Acros, CAS: 865-47-4.
 LiAlH₄, Aldrich, CAS: 16853-85-3.
 MeCN, Panreac, CAS: 75-05-8.
 MeMgBr, Éter dietílico, Acros, CAS:75-16-1.
 Me₂PhSiCl, Aldrich, CAS: 768-33-2.
 MeOH, Honeywell, CAS: 67-56-1.
 Na, Prolabo, CAS: 7440-23-5.
 NaOAc·3H₂O, Aldrich, CAS: 6131-90-4.
 Na₂S₂O₃, Acros, CAS: 7772-98-7.
 Na₂SO₄, Quimipur, CAS: 7757-82-6.
 NaBH₄, Fluka, CAS: 213462.
 NaH, Acros, CAS:7646-69-7.
 NaHCO₃, Quimipur, CAS: 144-55-8.
 NaOH, Sharlan, CAS: 1310-73-2.
ⁿBuLi, hexanos, Acros, CAS: 230707.
 NH₄Cl, Quimipur, CAS: 12125-02-9.
 PMHS, Aldrich, CAS: 63148-57-2.
 Pb(OAc)₄, Acros, CAS: 546-67-8.
 Pd/C, 10 %, Aldrich. CAS: 205699.
 Pd₂(dba)₃, Aldrich, CAS: 51364-51-3.
 Pd(OAc)₂, Aldrich, CAS: 3375-31-3.
 Pd(PPh₃)₄, Aldrich, CAS: 14221-01-3.
 PPh₃, Aldrich, CAS: 603-35-0.
 P₂O₅, Panreac, CAS: 1314-56-3.
 PCy₃, Aldrich, CAS: 2622-14-2.
 PhMe, Aldrich, CAS: 108-88-3.
 (R)-TolBINAP, ABCR, CAS: 99646-28-3.
 Red-Al[®], Aldrich, CAS: 22722-98-1.
 (S)-TolBINAP, ABCR, CAS: 100165-88-6.
 SO₂Cl₂, Aldrich, CAS: 7791-25-5.
 Silica Gel 60, Merck, CAS:112926-00-8.
 TBAF, THF, Aldrich, CAS: 216143.
 TBHP, decano, Aldrich, CAS: 75-91-2.
 TBSCl, ABCR, CAS: 18162-48-6.
 1,1'-TCDI, Aldrich, CAS: 6160-65-2.
 Ti(OⁱPr)₄, Aldrich, CAS: 546-68-9.
^tBuLi, pentano, Acros, CAS: 594-19-4, 109-66-0.
 TsNHNH₂, Aldrich, CAS: 1576-35-8.
 TBSOTf, Aldrich, CAS: 69739-34-

5.1 Contenido experimental. Parte 1

(3 α ,5 β)-24-[(*tert*-butildimetilsilil)-oxi]-colan-3-ol (**5**)



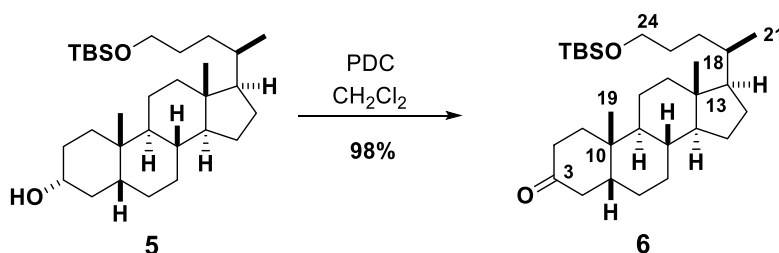
LiAlH₄ (3.62 g, 94.55 mmol, 5 equiv) se añadió en porciones sobre una disolución enfriada a 0 °C de **LCA** (7.17 g, 19.04 mmol, 1 equiv) en THF (150 mL). Después de 15 minutos, la mezcla de reacción se retiró del baño y se agitó durante 12 h. Sobre la mezcla enfriada a 0 °C se añadió lentamente HCl (10%, 50 mL). La mezcla se agitó durante 30 minutos. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 50 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. Al residuo se diluyó con una mezcla de EtOAc/hexanos (1:1, 40 mL). La suspensión resultante se calentó a 50 °C hasta disolución transparente. La mezcla se dejó venir a 23 °C y luego se enfrió a 0 °C, observándose la formación de un sólido blanco, que se filtró y secó a vacío. El sólido blanco se repurificó por recristalización de MeOH/CH₂Cl₂ para dar **4**^[91] [6.80 g, 98%, cristales, pf. 172-173 °C, *R_f* = 0.10 (20% EtOAc/hexanos)]. Una mezcla de **4** (6.80 g, 18.75 mmol, 1 equiv), imidazol (1.28 g, 18.75 mmol, 1 equiv), y DMF (150 mL) se agitó a 40 °C durante 30 minutos y luego se dejó alcanzar 23 °C. Una disolución de TBSCl (2.81 g, 18.75 mmol, 1 equiv) en CH₂Cl₂ (20 mL) se añadió vía jeringa automática (flujo = 5 mL/h, 2 h). El CH₂Cl₂ se evaporó a vacío y se añadió una disolución acuosa saturada de NaCl (300 mL). La mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 100 mL). La fase orgánica se lavó con H₂O (50 ml). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró a vacío. El residuo se redisolvió en la mínima cantidad de EtOAc caliente y se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, 5 × 15 cm, 20% EtOAc/hexanos) para dar **5**^[87] [6.35 g, 71%, sólido blanco, pf. 160.0-160.5 °C, *R_f* = 0.5 (20% EtOAc/hexanos)].

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 3.70–3.50 (m, 3H, H-3, H-24), 0.90 (d, s, 9H, Si x ^tBu), 0.86 (s, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-18), 0.59 (s, 3H, H-19), 0.04 (s, 6H, Si x CH₃).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 71.7 (CH, C-3), 63.7 (CH₂, C-24), 56.4 (CH), 56.0 (CH), 42.5 (C, C-13), 41.9 (CH), 40.3 (CH), 40.0 (CH₂), 36.3 (CH₂), 35.7 (CH), 35.4 (CH), 35.2 (CH₂), 34.4 (C, C-10), 31.1 (CH₂), 30.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 28.1 (CH₂), 27.1 (CH₂), 26.3

(CH₂), 25.8 (CH₃, Si x ^tBu), 24.1 (CH₂), 23.2 (CH₃, C-19), 20.7 (CH₂), 18.8 (C, Si), 18.5 (CH₃, C-18), 11.9 (CH₃, C-19), -5.4 (CH₃, Si x CH₃).

(5 β ,24)-24-[(*tert*-butildimetilsilil)-oxi]-colan-3-ona (6)

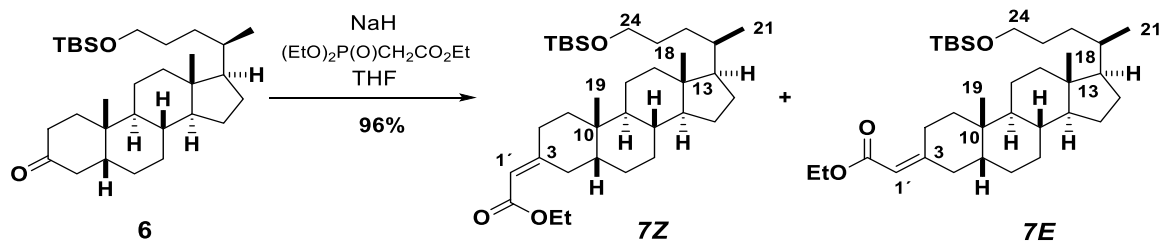


PDC (2.60 g, 6.93 mmol, 3 equiv) se añadió a una disolución de **5** (1.10 g, 2.31 mmol, 1 equiv) en CH₂Cl₂ (45 mL). La suspensión se agitó protegida de la luz durante 24 h. La mezcla se diluyó con TBME (50 mL) y se filtró sobre celita. El residuo sólido se lavó copiosamente con TBME. El filtrado se concentró a vacío y el residuo sólido se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, ϕ 2.5 \times 5 cm, 2% EtOAc/hexanos) para dar **6**^[87] [1.02 g, 2.14 mmol, 98%, sólido blanco, pf. 69–69.5 °C, *R_f* = 0.75 (20% EtOAc/hexanos)].

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 3.50 (t, *J* = 6 Hz, 2H, H-24), 1.0 (s, 3H, H-21), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.85 (d, s, 9 H, Si x ^tBu), 0.65 (s, 3H, H-19), 0.02 (s, 6H, Si x CH₃).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 213.4 (C, CO), 63.7 (CH₂, C-24), 56.4 (CH), 56.1 (CH), 44.2 (CH), 42.6 (C, C-13), 42.3 (CH₂), 40.6 (CH), 39.9 (CH₂), 37.1 (CH₂), 36.9 (CH₂), 35.4 (CH), 34.8 (C, C-10), 31.8 (CH₂), 29.3 (CH₂), 28.1 (CH₂), 26.5 (CH₂), 25.8 (CH₃, Si x ^tBu), 25.7 (CH₂), 24.1 (CH₂), 22.6 (CH₃, C-21), 21.1 (CH₂), 18.6 (C, Si-C), 18.5 (CH₃, H-18), 11.9 (CH₃, H-19), -5.4 (Si x CH₃).

(3Z,5β)-3-(2-Etoxi-2-oxoetiliden)-colan-24-ol *terc*-butildimetilsilil Éter (7Z) y *terc*-butildimetilsilil éter (7E)



Trietilfosfonoacetato (6.91 g, 30.83 mmol, 6.14 mL, 2.4 equiv) se añadió lentamente sobre una suspensión enfriada a 0 °C de NaH [0.74 g, (1.24 g, 60% w/w), lavado en hexanos, 30.83 mmol, 2.4 equiv] en THF (20 mL). La mezcla se agitó durante 1 h fuera del baño refrigerante. Una disolución de **6** (6.13 g, 12.92 mmol, 1 equiv.) in THF (10 mL) se añadió vía cánula y la mezcla se agitó durante 2 h. La reacción se detuvo tras la adición de unas gotas de H₂O y posteriormente se añadió H₂O (20 mL). La mezcla se concentró a medio volumen. Se añadió TBME (100 mL) y H₂O (100 mL) y la fase acuosa se extrajo con TBME (2 x 25 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, ϕ 4 × 7 cm, 2% EtOAc/hexanos) para dar una mezcla de ésteres **7Z/7E** ^[87] [6.8 g, 96%, aceite incoloro, R_f = 0.72 (15% EtOAc/hexanos)]. Una fracción de la mezcla (1.43 g) se disolvió en 0.2% EtOAc/hexanos (11 mL) y se cromatografió mediante HPLC/UV (Phenomenex Luna, sílica, 5 μ , 250 x 21 mm, 0.2% EtOAc/hexanos, flujo: 13 mL/min, inyección = 0.25 ml) para dar **5Z** [0.55 g, 41%, t_r = 38 min.] y **5E** [0.65 g, 46%, t_r = 43 min.].

(3Z,5β)-3-(2-Etoxi-2-oxoetiliden)-colan-24-ol *terc*-Butildimetilsilil Éter (7Z)

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 5.55 (s, 1H, H-1'), 4.10 (q, J = 7.1 Hz, 2H, -OCH₂-), 3.56 (t, J = 6.4 Hz, 2H, H-24), 1.2 (m, 3H, -OCH₂-CH₃), 0.90 (d, s, 3H, H-21), 0.85 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 9H, Si x ^tBu), 0.65 (s, 3H, H-19), 0.00 (s, 6H, Si x CH₃).

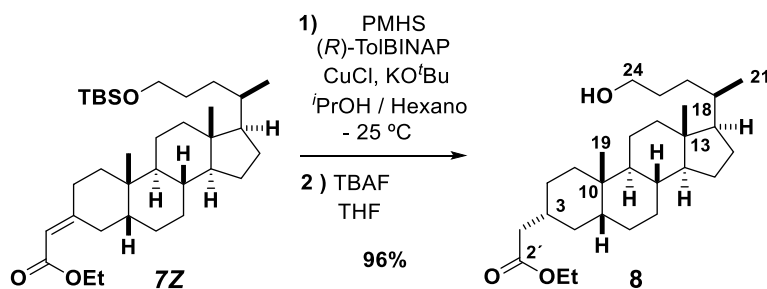
¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 166.8 (C, CO), 164.7 (C, C-3), 112.5 (CH, C-1'), 63.6 (CH₂, C-24), 59.2 (CH₂, -OCH₂-), 56.4 (CH), 56.0 (CH), 44.7 (CH), 42.5 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.0 (CH₂), 38.4 (CH₂), 35.6 (CH), 35.4 (CH), 32.6 (CH₂), 31.7 (CH₂), 30.1 (CH₂), 29.6 (C, C-10), 29.2 (CH₂), 28.0 (CH₂), 27.0 (CH₂), 26.0 (CH₂), 25.8 (CH₃, Si x ^tBu), 24.0 (CH₂), 23.2 (CH₃, -OCH₂-CH₃), 20.9 (CH₂), 18.5 (CH₃, C-21), 18.2 (C, Si-C), 14.2 (CH₃, H-18), 11.9 (CH₃, H-19), - 5.4 (Si x CH₃).

(3E,5β)-3-(2-Etoxi-2-oxoetiliden)-colan-24-ol *terc*-butildimetilsilil Éter (7E)

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 5.56 (s, 1H, H-1'), 4.10 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, -OCH₂-), 3.57 (m, 2H, H-24), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, -OCH₂-CH₃), 0.91 (s, 3H, H-21), 0.85 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 9H, Si x ^tBu) 0.63 (s, 3H, H-19), 0.02 (s, 6 H, Si x CH₃).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 166.6 (C, CO), 164.6 (C, C-3), 112.4 (CH, C-1'), 63.6 (CH₂, C-24), 59.3 (CH₂), 56.4 (CH), 56.1 (CH), 45.5 (CH), 42.5 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.0 (CH₂), 38.1 (CH₂), 37.9 (CH₂), 35.6 (CH), 35.4 (CH), 35.1 (C, C-10), 31.8 (CH₂), 29.3 (CH₂), 28.1 (CH₂), 26.9 (CH₂), 26.1 (CH₂), 25.8 (CH₃, Si x ^tBu), 24.6 (CH₂), 24.1 (CH₂), 23.0 (CH₃, -OCH₂-CH₃), 20.9 (CH₂), 18.5 (CH₃, C-21), 18.2 (C, Si-C), 14.2 (CH₃, H-18), 11.9 (CH₃, H-19), -5.4 (CH₃, Si x CH₃).

(3α,5β)-3-(2-oxoetil-2-etoxi)-24-norcolan-24-ol (8) Método A



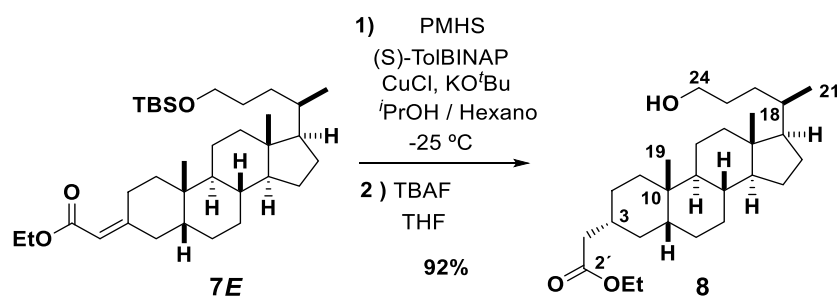
PMHS (0.337 g, 0.334 mL, 5.5786 mmol, 16 equiv) y KO^tBu (1M en THF, 0.270 mL, 0.2690 mmol, 0.75 equiv), se añadieron sucesivamente sobre una suspensión de CuCl (0.024 mg, 0.2441 mmol, 0,70 equiv) y (*R*)-TolBINAP (0,028 g, 0.042 mmol, 0.12 equiv) en hexano (8 mL). La suspensión se sometió a la acción de los ultrasonidos durante 15 minutos, (pasó de un color amarillo a marrón oscuro) y se enfrió a -25 °C. Una disolución de **7Z** (0.190g, 0.3486 mmol, 1 equiv) en hexano (4 mL) e *i*PrOH (0.11 mL, 1.3946 mmol, 4 equiv) se añadió vía cánula sobre la suspensión enfriada y el contenido se agitó a -25 °C durante 3 h. La reacción se detuvo mediante adición de una disolución saturada de NH₄Cl (10 mL) y la mezcla se concentró a medio volumen. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 10 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, φ 2 x 8 cm, 2% EtOAc/hexanos) y se concentró a vacío. El aceite obtenido se redisolvió en THF (10 mL), se añadió TBAF (1M en THF, 4 mL) y la mezcla se agitó durante 12 h. La mezcla se concentró a medio volumen y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 10 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró a vacío. El residuo se purificó por

cromatografía rápida en columna (SiO₂, φ 2 x 8 cm, 14% EtOAc/hexanos) para dar **8**^[87] [0.145 g, 96%, *R_f* = 0.25, (20% EtOAc/hexanos), semisólido blanco].

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 4.1 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, -OCH₂-), 3.55 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-24), 1.2 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, -OCH₂-CH₃), 0.91 (s, d, 3H, H-21), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.61 (s, 3H, H-19).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 173.5 (C, CO), 76.4 (CH₂, H-24), 60.0 (CH₂, -OCH₂-), 56.4 (CH), 56.0 (CH), 43.0 (C, C-13), 42.5 (CH), 42.1 (CH₂), 40.35 (CH), 40.0 (CH₂), 36.8 (CH₂), 35.7 (CH), 35.6 (CH), 35.43 (CH), 34.7 (C, C-10), 33.4 (CH₂), 31.7 (CH₂), 29.2 (CH₂), 28.15 (CH₂), 27.4 (CH₂), 27.1 (CH₂), 26.3 (CH₂), 24.05 (CH₂), 23.7 (CH₃, -OCH₂-CH₃), 20.6 (CH₂), 18.5 (CH₃, H-21), 14.1 (CH₃, H-18), 11.9 (CH₃, H-19).

(3α,5β)-3-(2-Oxoetil-2-etoxi)-24-norcolan-24-ol (**8**) Método B



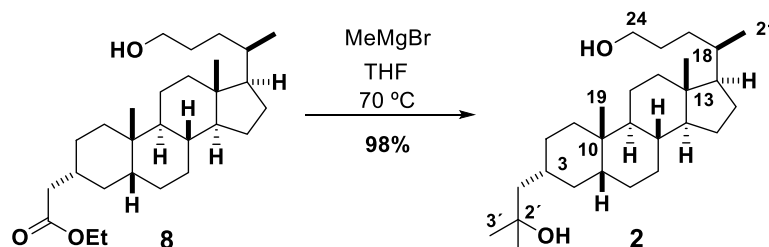
PMHS (0.337 g, 0.334 mL, 5.5786 mmol, 16 equiv) y KO^tBu (1M en THF, 0.270 mL, 0.2690 mmol, 0.75 equiv), se añadieron sucesivamente sobre una suspensión de CuCl (0.024 mg, 0.2441 mmol, 0.70 equiv) y (S)-TolBINAP (0,028 g, 0.042 mmol, 0.12 equiv) en hexano (8 mL). La suspensión se sometió a la acción de los ultrasonidos durante 15 minutos, (cambió de color amarillo a marrón oscuro) y se enfrió a -25 °C. Una disolución de **5E** (0.190g, 0.3486 mmol, 1 equiv) en hexano (4 mL) e *i*PrOH (0.11 mL, 1.3946 mmol, 4 equiv) se añadió vía cánula sobre la suspensión enfriada y el contenido se agitó a -25 °C durante 3 h. La reacción se detuvo tras la adición de una disolución saturada de NH₄Cl (10 mL) y la mezcla se concentró a medio volumen. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 10 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, φ 2 x 8 cm, 2% EtOAc/hexanos) y se concentró a vacío. El aceite obtenido se redisolvió en THF (10 mL), se añadió TBAF (1M en THF, 4 mL) y la mezcla se agitó durante 12 h. La mezcla se concentró a medio volumen y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 10 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en

columna (SiO₂, φ 2 x 8 cm, 14% EtOAc/hexanos) para dar **8**^[87] [0.138 g, 92%, *R_f* = 0.25, (20% EtOAc/hexanos), semisólido blanco].

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 4.1 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, -OCH₂-), 3.55 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-24), 1.2 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, -OCH₂-CH₃), 0.91 (s, d, 3H, H-21), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.61 (s, 3H, H-19).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 173.5 (C, CO), 76.4 (CH₂, H-24), 60.0 (CH₂, -OCH₂-), 56.4 (CH), 56.0 (CH), 43.0 (C, C-13), 42.5 (CH), 42.1 (CH₂), 40.35 (CH), 40.0 (CH₂), 36.8 (CH₂), 35.7 (CH), 35.6 (CH), 35.43 (CH), 34.7 (C, C-10), 33.4 (CH₂), 31.7 (CH₂), 29.2 (CH₂), 28.15 (CH₂), 27.4 (CH₂), 27.1 (CH₂), 26.3 (CH₂), 24.05 (CH₂), 23.7 (CH₃, -OCH₂-CH₃), 20.6 (CH₂), 18.5 (CH₃, H-21), 14.1 (CH₃, H-18), 11.9 (CH₃, H-19).

(3α,5β)-3-(2-Hidroxi-2-metilprop-1-il)-24-norcolan-24-ol (2)



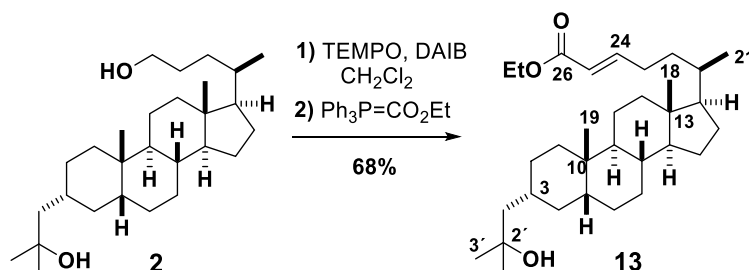
MeMgBr (1.5 M en Et₂O, 1.2 mL, 1.806 mmol, 6 equiv) se añadió sobre una disolución enfriada de **8** (0.14 g, 0.301 mmol, 1 equiv) en THF (5 mL) a 0 °C. La disolución se sacó del baño refrigerante, se dejó alcanzar 23 °C y se calentó a reflujo durante 1 h. Tras alcanzar 23 °C, la disolución se enfrió a 0 °C y se goteó lentamente una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (10 mL). La mezcla se concentró a medio volumen y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (3 x 8 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, φ 2 x 5, 50% EtOAc/hexanos) para dar **2**^[87] [0.13 g, 98%, *R_f* = 0.20, 30% EtOAc/hexanos, sólido blanco, pf. 152.0 °C].

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 3.67 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-24), 1.22 (s, 6H, H-3'), 0.88 (s, 3H, H-21), 0.85 (s, 3H, H-18), 0.61 (s, 3H, H-19).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 71.5 (C, C-2'), 63.4 (CH₂, C-24), 56.4 (CH), 56.0 (CH), 51.1 (CH₂), 43.5 (CH), 42.5 (C, C-13), 40.4 (CH), 40.1 (CH₂), 37.3 (CH₂), 35.8 (CH), 35.7 (CH), 35.4 (C, C-10), 34.9 (CH₂), 34.6 (CH₂), 31.7 (CH₃, C-3'), 29.9 (CH₂), 29.7

(CH), 29.2 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.3 (CH₂), 26.4 (CH₂), 24.1 (CH₂), 23.9 (CH₂), 20.7 (CH₃, C-21), 18.5(CH₃, C-18), 11.9 (CH₃, C-19).

Éster etílico del Ácido-(3 α ,5 β ,24E)-3-(2-hidroxi-2-metilprop-1-il)-27-nor-colest-24-en-26-oico (13)



Una mezcla de diol **2** [0.58 g, 1.385 mmol, Pf. 152 °C (EtOAc)], TEMPO (0.067 g, 0.432 mmol, 0.3 equiv), DAIB (0.5 g, 1.518 mmol, 1.1 equiv) en CH₂Cl₂ (25 mL) se agitó durante 4 h protegida de la luz. A la disolución resultante se añadió Ph₃P=CHCO₂Et (cristalizado de CH₂Cl₂, 0.579 g, 1.660 mmol, 1.2 equiv). La mezcla se agitó durante 12 h y la reacción se detuvo tras adición de una disolución acuosa saturada de Na₂S₂O₃ (50 mL). La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 20 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró a vacío. El residuo se filtró sobre sílica en columna rápida (SiO₂, ϕ 2 x 5 cm, 5% EtOAc/hexanos) y se purificó mediante HPLC (Phenomenex luna, sílica, 5 μ , 250 x 10 mm; 5% ⁱPrOH/hexanos) para dar **13**^[89] [0.456 g, 68%, *R_f* = 0.7 (30% EtOAc/hexanos), semisólido cristalino, $[\alpha]_D^{25} = +22.54$ (c = 3.14, CHCl₃).

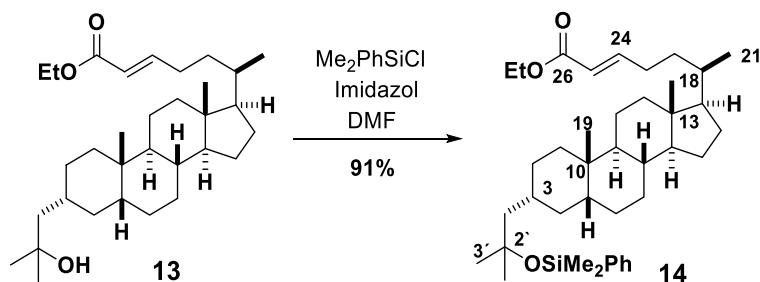
HRMS (ESI⁺): Calculado para C₃₂H₅₄O₃Na: 509.3958, encontrado 509.3960.

IR (cm⁻¹): 3435, 2924, 2860, 1722, 1650.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 6.90 (m, 1H, H-24), 5.74 (d, *J* = 15 Hz, 1H, H-26), 4.12 (q, *J* = 7 Hz, 2H, -OCH₂-), 1.22 (t, *J* = 7 Hz, 3H, -O-CH₂-CH₃), 1.16 (s, 6H, H-3'), 0.88 (s, 3H, H-21), 0.85 (s, 3H, H-18), 0.58 (s, 3H, H-19).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 166.6 (C, CO), 149.8 (CH, C-24), 120.7 (CH, C-25), 71.3 (C, C-2'), 59.9 (CH₂, -O-CH₂-), 56.4 (CH), 55.9 (CH), 51.1 (CH₂), 43.4 (CH), 42.5 (C, C-13), 40.3 (CH), 40.0 (CH₂), 37.3 (CH₂), 35.8 (CH₂), 35.6 (CH), 35.3 (CH), 34.8 (CH), 34.5 (C, C-10), 34.1 (CH₂), 29.9 (CH₃, C-3'), 29.8 (CH₃, C-3'), 29.6 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.1 (CH₂), 27.2 (CH₂), 26.3 (CH₂), 24.0 (CH₂), 23.8 (CH₃, -O-CH₂-CH₃), 20.6 (CH₂) 18.2 (CH₃, C-21), 14.1 (CH₃, C-18), 11.9 (CH₃, C-19).

Éster etílico del ácido (3 α ,5 β ,24E)-3-[2-(dimetilfenilsilil)oxi-2-metilprop-1-il]-27-nor-colest-24-en-26-oico (14)



Una mezcla de **13** (1.588 g, 3.262 mmol, 1 equiv), Me_2PhSiCl (0.668 g, 3.915 mmol, 1.017 equiv), imidazol (0.266 g, 3.915 mmol, 1.2 equiv), in DMF (25 mL) se agitó durante 2 h. Se añadió H_2O (100 mL) y se extrajo con Et_2O (2×100 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO_2 , ϕ 3 x 10, 0.5% EtOAc /hexanos) para dar **14** ^[89] [1.80 g, 91%, $R_f = 0.8$ (20% EtOAc /hexanos), semisólido blanco, $[\alpha]_D^{25} = +28.54$ ($c = 3.14$, CHCl_3)].

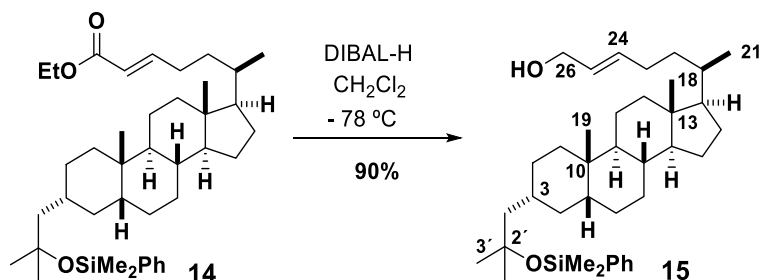
HRMS (ESI⁺): Calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{O}_3\text{NSiNa}$: 643.3994, encontrado 643.4094.

IR (cm^{-1}): 3489, 2925, 2861, 1721, 1653, 1447.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 7.57 (m, 2H, H-Ar), 7.32 (m, 3H, H-Ar), 6.95 (m, 1H, H-24), 5.79 (d, $J = 15$ Hz, 1H, H-25), 4.16 (q, $J = 7$ Hz, 2H, - OCH_2 -), 1.26 (t, $J = 7$ Hz, 3H, - $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.20 (s, 6H, H-3'), 0.92 (s, 3H, H-21), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.62 (s, 3H, H-19), 0.35 (s, 6H, Si x - CH_3).

¹³C-RMN (CDCl_3 , 63 MHz) δ 166.6 (C, CO), 149.8 (CH, C-24), 140.5 (C, Si-Ar), 133.2 (CH, C-Ar), 128.8 (CH, C-Ar), 127.4 (CH, C-Ar), 120.8 (CH, C-25), 75.0 (C, C-2'), 59.9 (CH_2 , - O-CH_2 -), 56.5 (CH), 56.0 (CH), 52.1 (CH_2), 43.6 (CH), 42.6 (C, C-13), 40.4 (CH), 40.2 (CH_2), 37.5 (CH_2), 35.8 (CH_2), 35.7 (CH), 35.4 (CH), 34.9 (CH), 34.6 (C, C-10), 34.2 (CH_2), 30.6 (CH_3 , C-3'), 30.3 (CH_3 , C-3'), 29.8 (CH_2), 28.8 (CH_2), 28.2 (CH_2), 27.4 (CH_2), 26.4 (CH_2), 24.1 (CH_2), 23.9 (CH_3 , - $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 20.7 (CH_2), 18.3 (CH_3 , H-21), 14.1 (CH_3 , H-18), 11.9 (CH_3 , H-19), 1.4 (CH_3 , Si x CH_3).

(3 α ,5 β ,24E)-3-[2-(Dimetilfenilsilil)oxi-2-metilprop-1-il]-27- nor-colest-24-en-26-ol (15)



DIBAL-H (1M en hexanos, 3.84 mmol, 3.8 mL, 2.5 equiv) se añadió vía cánula a una solución enfriada a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ de **14** (0.96 g, 1.537 mmol, 1 equiv) en CH_2Cl_2 (40 mL). La mezcla se agitó durante 30 minutos. Se añadió hielo picado y H_2O (1 mL), se agitó durante 12 h y se añadió sobre CH_2Cl_2 (50 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2×50 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO_2 , $\phi 2 \times 8$ cm, 10% EtOAc/hexanos) para dar **15**^[89] [0.80 g, 90%, $R_f = 0.5$ (20% EtOAc/hexanos), sólido amarillo, pf. $125.0\text{ }^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} = +25.48$ ($c = 0.79$, CHCl_3)].

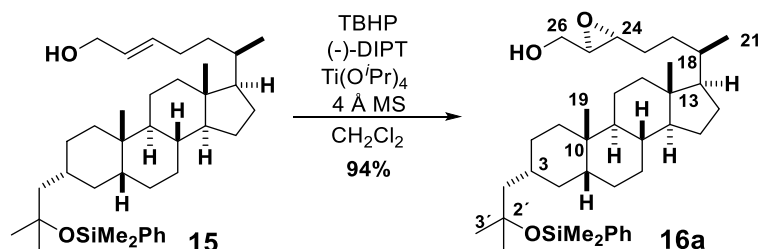
HRMS (ESI+): Calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{62}\text{O}_2\text{NaSi}$: 601.4405, encontrado 601.4411.

IR (cm^{-1}): 3320, 2926, 2862, 1189.

$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 7.58 (m, 2H, H-Ar), 7.33 (m, 3H, H-Ar), 5.68-5.60 (m, 2H, H-24, H-25), 4.06 (d, $J = 5$ Hz, 2H, H-26), 1.19 (s, 6H, H-3'), 0.92 (s, 3H, H-21), 0.90 (s, 3H, H-18), 0.63 (s, 3H, H-19), 0.36 (s, 6H, Si x CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 63 MHz) δ 140.6 (C, Si-Ar), 134.0 (CH, C-25), 133.3 (CH, C-Ar), 128.9 (CH, C-Ar), 128.5 (CH, C-24), 127.5 (CH, C-Ar), 75.2 (C, C-2'), 63.8 (CH_2 , C-26), 56.6 (CH), 56.2 (CH), 52.2 (CH_2), 43.7 (CH), 42.7 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.2 (CH_2), 37.6 (CH_2), 36.0 (CH_2), 35.9 (CH), 35.5 (CH), 35.4 (CH_2), 35.1 (CH), 34.7 (C, C-10), 30.7 (CH_3 , C-3'), 30.4 (CH_3 , C-3'), 29.9 (CH_2), 28.9 (CH_2), 28.3 (CH_2), 27.5 (CH_2), 26.5 (CH_2), 24.2 (CH_2), 24.0 (CH_3 , C-21), 20.8 (CH_2), 18.5 (CH_3 , C-18), 12.1 (CH_3 , C-19), 1.5 (CH_3 , Si x CH_3).

(3 α ,5 β ,24*R*,25*S*)-3-[2-(Dimetilfenilsilil)oxi-2-metilprop-1-il]-27-nor-24,25-epoxi-colestan-26-ol (16a)



Una disolución de **12** (0.32 g, 0.553 mmol, 1equiv) en CH₂Cl₂ (8 mL) se añadió sobre una suspensión de tamiz molecular 4 Å en CH₂Cl₂, enfriada a -25 °C. (-)-Diisopropil tartrato [(-)-DIPT, 0.16 g, 0.139 mL, 0.664 mmol, 1.2 equiv) y Ti(O^{*i*}Pr)₄ (0.16 g, 0.160 mL, 0.553 mmol, 1 equiv), fueron añadidos sucesivamente vía cánula. Tras una agitación vigorosa durante 30 minutos, (TBHP, 0.154 mL, 0.77, 1.4 equiv) fue añadido lentamente vía jeringa. La mezcla se agitó durante 4 h a -25 °C. El contenido se purificó directamente por cromatografía rápida en columna (SiO₂, ϕ 2 × 5 cm, 5% EtOAc/hexanos) y se repurificó mediante HPLC [Phenomenex luna, sílica, 5 μ , 250 × 10 mm, λ = 254 nm, (20% EtOAc/hexanos)] para dar **16a**^[89] [0.31g, 94%, *R*_f = 0.5 (30% EtOAc/hexanos), aceite incoloro, $[\alpha]_D^{25} = +34.0$ (c = 0.47, CHCl₃)].

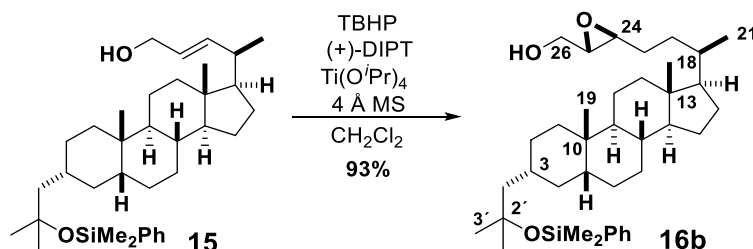
HRMS (ESI+): Calculado para C₃₈H₆₂O₃NaSi): 617.4359, encontrado 617.4360.

IR (cm⁻¹): 2924, 2859, 1729, 1038.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (m, 2H, H-Ar), 7.33 (m, 3H, H-Ar), 3.87 (d, *J* = 12 Hz, 1H)-3.58 (d, *J* = 12 Hz, 1H) (H-26), 2.90 (s, 2H, H-24, H-25), 1.18 (s, 6H, H-3'), 0.92 (s, 3H, H-21), 0.91 (s, 3H, H-18), 0.65 (s, 3H, H-19), 0.34 (s, 6H, Si x -CH₃).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 140.6 (C, Si-Ar), 133.3 (CH, C-Ar), 128.9 (CH, C-Ar), 127.5 (CH, C-Ar), 75.1 (C, C-2'), 61.8 (CH₂, C-26), 58.5 (CH), 56.5 (CH), 56.1 (CH), 52.2 (CH₂), 43.7 (CH), 42.7 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.3 (CH₂), 37.6 (CH₂), 36.0 (CH₂), 35.9 (CH), 35.5 (CH), 35.1 (CH), 34.7 (C, C-10), 32.1 (CH₂), 30.8 (CH₃, C-3'), 30.4 (CH₃, C-3'), 29.9 (CH₂), 28.3 (CH₂), 27.6 (CH₂), 26.6 (CH₂), 24.3 (CH₂), 24.0 (CH₃, C-21), 20.9 (CH₂), 18.6 (CH₃, C-18), 12.1 (CH₃, C-19), 1.5 (CH₃, Si x -CH₃).

(3 α ,5 β ,24S,25R)-3-[2-(Dimetilfenilsilil)oxi-2-metilprop-1-il]-27-nor-24,25-epoxi-colestan-26-ol (**16b**)



Una disolución de **15** (0.32 g, 0.553 mmol, 1equiv) en CH₂Cl₂ (8 mL) se añadió sobre una suspensión de tamiz molecular 4 Å en CH₂Cl₂, enfriada a -25 °C. (+)-Diisopropil tartrato [(+)-DIPT, 0.16 g, 0.139 mL, 0.664 mmol, 1.2 equiv) y Ti(O^{*i*}Pr)₄ (0.157 g, 0.160 mL, 0.553 mmol, 1 equiv), fueron añadidos sucesivamente vía cánula. Tras una agitación vigorosa durante 30 minutos, (TBHP, 0.154 mL, 0.77, 1.4 equiv) fue añadido lentamente vía jeringa. La mezcla se agitó durante 4 h a -25 °C. El contenido se purificó directamente por cromatografía rápida en columna (SiO₂, ϕ 2 × 5 cm, 5% EtOAc/hexanos) y se repurificó mediante HPLC [Phenomenex luna, sílica, 5 μ , 250 × 10 mm, λ = 254 nm, (20 % EtOAc/hexanos)] para dar **16b**^[89] [0.28 g, 93%, *R*_f = 0.5 (30% EtOAc/hexanos), aceite incoloro, $[\alpha]_D^{25} = +31.5$ (c = 3.58, CHCl₃)].

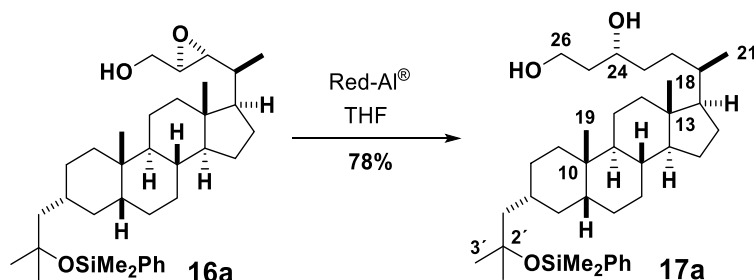
IR (cm⁻¹): 2924, 2859, 1729, 1038.

HRMS (ESI+): Calculado para C₃₈H₆₂O₃NaSi: 617.4359, encontrado 617.4360.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 7.56 (m, 2H, H-Ar), 7.32 (m, 3H, H-Ar), 3.88 (d, *J* = 13 Hz, 1H)-3.60 (m, 1H) (H-26), 2.90 (s, 2H, H-24, H-25), 1.18 (s, 6H, H-3'), 0.90 (s, 3H, H-21), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.62 (s, 3H, H-19), 0.34 (s, 6H, Si x CH₃).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 140.6 (C, C-Ar), 133.3 (CH, C-Ar), 128.9 (CH, C-Ar), 127.5 (CH, C-Ar), 75.2 (C, C-2'), 61.7 (CH₂, C-26), 58.5 (CH), 56.5 (CH), 56.2 (CH), 56.1 (CH), 52.2 (CH₂), 43.7 (CH), 42.7 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.2 (CH₂), 37.6 (CH₂), 35.9 (CH₂), 35.3 (CH), 35.3 (CH), 35.1 (CH), 34.7 (C, C-10), 31.7 (CH₂), 30.7 (CH₃, C-3'), 30.4 (CH₃, C-3'), 29.9 (CH₂), 28.3 (CH₂), 28.1 (CH₂), 27.5 (CH₂), 26.5 (CH₂), 24.2 (CH₂), 23.9 (CH₃, C-21), 20.8 (CH₂), 18.5 (CH₃, C-18), 12.0 (CH₃, C-19), 1.5 (CH₃ Si x CH₃).

(3 α ,5 β ,24R)-3-[2-(Dimetilfenilsilil)oxi-2-metilprop-1-il]-27-nor-colestan-24,26-diol (17a)



Una disolución de Red-Al[®] (~50 % en tolueno, 0.300 mL, 0.9 mmol, 3 equiv) se añadió lentamente a una disolución del epóxido **16a** (0.168 g, 0.282 mmol, 1 equiv) en THF (20 mL). Después del cese de burbujeo (H₂), la mezcla se agitó durante 3 h. La reacción se detuvo mediante la adición de H₂O (20 gotas). La mezcla se filtró sobre una columna corta rellena de sílica gel, el residuo sólido se lavó copiosamente con EtOAc y el filtrado se concentró a vacío. El residuo se redisolvió en CH₂Cl₂ y se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, ϕ 2 \times 6 cm, 15% EtOAc/hexanos) para dar el diol **17a**^[89] [0.13 g, 78%, *R_f* = 0.4 (50% EtOAc/hexanos), aceite incoloro, $[\alpha]_D^{25} = +21.7$ (*c* = 1.27, CHCl₃)].

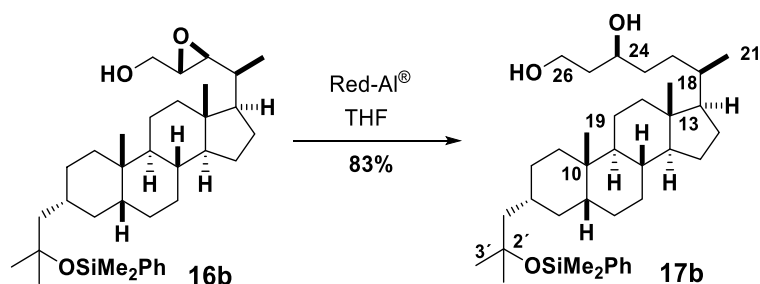
HRMS (ESI⁺): Calculado para C₃₈H₆₄O₃NaSi: 619.4519 encontrado 619.4516.

IR (cm⁻¹): 3300, 2925, 2862, 998.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 7.56 (m, 2H, H-Ar), 7.32 (m, 3H, H-Ar), 3.87 (m, 1H, H-24), 3.80 (m, 2H, H-26), 1.18 (s, 6H, H-3'), 0.90 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-21), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.62 (s, 3H, H-19), 0.34 (s, 6H, Si x -CH₃).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 140.6 (C, Si-Ar), 133.3 (CH, C-Ar), 128.9 (CH, C-Ar), 127.5 (CH, C-Ar), 75.2 (C, C-2'), 73.1 (CH, C-24), 61.9 (CH₂, C-26), 56.6 (CH), 56.0 (CH), 52.2 (CH₂), 43.7 (CH), 42.7 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.2 (CH₂), 38.1 (CH₂), 37.6 (CH₂), 35.9 (CH₂), 35.8 (CH), 35.7 (CH), 35.1 (CH), 34.7 (C, C-10), 34.3 (CH₂), 31.6 (CH₂), 30.7 (CH₃, C-3'), 30.4 (CH₃, C-3'), 29.9 (CH₂), 28.3 (CH₂), 27.5 (CH₂), 26.5 (CH₂), 24.2 (CH₂), 24.0 (CH₃, C-21), 20.8 (CH₂), 18.7 (CH₃, C-18), 12.0 (CH₃, C-19), 1.5 (CH₃, Si x CH₃).

(3 α ,5 β ,24S)-3-[2-(Dimetilfenilsilil)oxi-2-metilpropil]-27-nor-colestan-24,26-diol (17b)



Una disolución de Red-Al[®] (~50% en tolueno, 0.300 mL, 0.9 mmol, 3 equiv) se añadió lentamente a una disolución del epóxido **16b** (0.168 g, 0.282 mmol, 1 equiv) en THF (20 mL). Después del cese de burbujeo (H₂), la mezcla se agitó durante 3 h. La reacción se detuvo mediante la adición de H₂O (20 gotas). La mezcla se filtró sobre una columna corta rellena de sílica gel, el residuo sólido se lavó copiosamente con EtOAc y el filtrado se concentró a vacío. El residuo se redisolvió en CH₂Cl₂ y se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, ϕ 2 \times 6 cm, 15% EtOAc/hexanos) para dar el diol **17b** [0.141 g, 83%, *R*_f = 0.4 (50% EtOAc/hexanos), aceite incoloro, $[\alpha]_D^{25} = +22.0$ (c = 1.15, CHCl₃)].

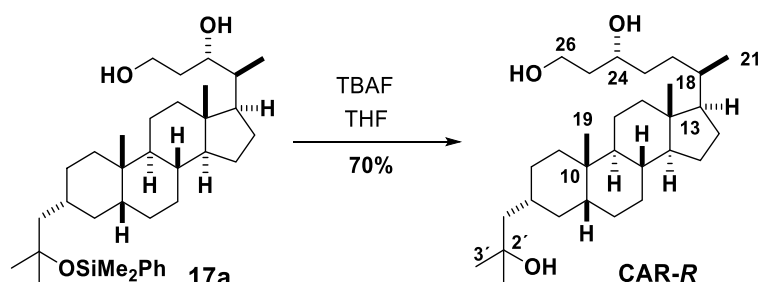
HRMS (ESI⁺): Calculado para C₃₈H₆₄O₃SiNa: 619.4519, encontrado 619.4516.

IR (cm⁻¹): 3300, 2925, 2862, 998.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (m, 2H, H-Ar), 7.34 (m, 3H, H-Ar), 3.86 (m, 1H, H-24), 3.79 (m, 2H, H-26), 1.20 (s, 6H, H-3'), 0.90 (s, 3H, H-21), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.62 (s, 3H, H-19), 0.30 (s, 6H, Si x CH₃).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 139.7 (C, Si-Ar), 132.9 (CH, C-Ar), 129.2 (CH, C-Ar), 127.6 (CH, C-Ar), 72.7 (CH, C-24), 71.6 (C, C-2'), 61.8 (CH₂, C-26), 56.5 (CH), 56.0 (CH), 51.2 (CH₂), 43.5 (CH), 42.6 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.2 (CH₂), 38.3 (CH₂), 37.4 (CH₂), 35.9 (CH₂), 35.8 (CH), 35.6 (CH), 34.9 (CH), 34.7 (C, C-10), 34.2 (CH₂), 31.5 (CH₂), 30.0 (CH₃, C-3'), 29.9 (CH₃, C-3'), 29.8 (CH₂), 28.3 (CH₂), 27.4 (CH₂), 26.4 (CH₂), 24.2 (CH₂), 23.9 (CH₃, C-21), 20.8 (CH₂), 18.6 (CH₃, C-18), 12.0 (CH₃, C-19), 0.84 (CH₃, Si x CH₃).

(3 α ,5 β ,24R)-3-(2-Metil-prop-1-il)-27-norcolestano-24,26-diol (CAR-R)



TBAF (1 M en THF, 0.386 mmol, 0.386 mL, 2 equiv) se añadió sobre una disolución de **17a** (0.115 g, 0.193 mmol, 1 equiv) en THF (10 mL). La mezcla se agitó durante 18 h y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en CHCl₃ (3 mL) y se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, ϕ 2 \times 7 cm, 50% EtOAc/hexanos) para dar el triol **CAR-R** [0.075 g, 70%, R_f = 0.5 (50% EtOAc/hexanos), sólido cristalino-cristales (EtOAc), pf. 132–133 °C, $[\alpha]_D^{25}$ = + 29.18 (c = 0.98, CHCl₃)].

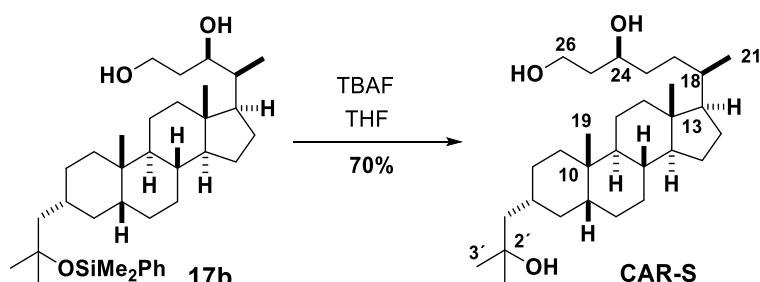
IR (cm⁻¹): 3550–3120, 2959, 2903, 2848.

Análisis elemental: calculado para C₃₀H₅₄O₃: C, 77.87%; H, 11.76%. Encontrado: C, 77.57%; H 11.97%.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 3.86 (m, 1H, H-24), 3.80 (m, 2H, H-26), 1.20 (s, 6H, H-3'), 0.90 (s, 3H, H-21), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.62 (s, 3H, H-19).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 72.5 (CH, H-24), 71.5 (C, C-2'), 61.6 (CH₂, H-26), 56.4 (CH), 56.0 (CH), 51.2 (CH₂), 43.5 (CH), 42.6 (C, C-13), 40.4 (CH), 40.1 (CH₂), 38.3 (CH₂), 37.4 (CH₂), 35.8 (CH₂), 35.7 (CH), 35.5 (CH), 34.8 (CH), 34.6 (C, C-10), 34.1 (CH₂), 31.4 (CH₂), 29.8 (CH₃, C-3'), 29.8 (CH₃, C-3'), 29.7 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.3 (CH₂), 26.4 (CH₂), 24.0 (CH₂), 23.8 (CH₃, C-21), 20.6 (CH₂), 18.5 (CH₃, C-18), 11.9 (CH₃, C-19).

(3 α ,5 β ,24S)-3-(2-Metil-prop-1-il)-27-norcoleston-24,26-diol (CAR-S)



TBAF (1M en THF, 0.386 mmol, 0.386 mL, 2 equiv) se añadió sobre una disolución de **13b** (0.115 g, 0.193 mmol) en THF (10 mL). La mezcla se agitó durante 18 h y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en CHCl₃ (3 mL) y se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, ϕ 2 \times 7 cm, 50% EtOAc/hexanos) para dar el triol **CAR-S** [0.054 g, 70 %, R_f = 0.5 (50% EtOAc/hexanos), sólido cristalino-cristales (EtOAc), pf. 133.0 °C, $[\alpha]_D^{25} = +28.95$ (c = 1.14, CHCl₃)].

IR (cm⁻¹): 3539, 3103, 2968, 2904, 2833.

Análisis elemental: calculado para C₃₀H₅₄O₃: C, 77.87%; H, 11.76%. Encontrado, C, 77.68%; H, 12.14%.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 3.85 (m, 1H, H-24), 3.77 (m, 2H, H-26), 1.18 (s, 6H, H-3'), 0.89 (s, 3H, H-21), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.60 (s, 3H, H-19).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 72.9 (CH, C-24), 71.6 (C, C-2'), 61.7 (CH₂, C-26), 56.5 (CH), 56.0 (CH), 51.2 (CH₂), 43.5 (CH), 42.6 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.2 (CH₂), 38.0 (CH₂), 37.4 (CH₂), 35.9 (CH₂), 35.8 (CH), 35.7 (CH), 34.9 (CH), 34.6 (C, C-10), 34.2 (CH₂), 31.6 (CH₂), 29.9 (CH₃, C-3'), 29.9 (CH₃, C-3'), 29.7 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.4 (CH₂), 26.4 (CH₂), 24.1 (CH₂), 23.9 (CH₃, C-21), 20.8(CH₂), 18.6 (CH₃, C-18), 12.0 (CH₃, C-19).

5.2Contenido experimental. Parte 2

(Ver página 58)

5.3 Conclusiones

5.3 CONCLUSIONES

Conclusiones Parte 1.

- Se han diseñado por docking y sintetizado los compuestos **CAR-R** y **CAR-S** que se comportan como potentes agonistas del ácido litocólico de potencial interés terapéutico para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas.^[89]
- Los análogos **CAR-R** y **CAR-S** se sintetizaron en 13 pasos a partir del ácido litocólico y rendimientos globales del 17.4% y 18.4%, respectivamente.

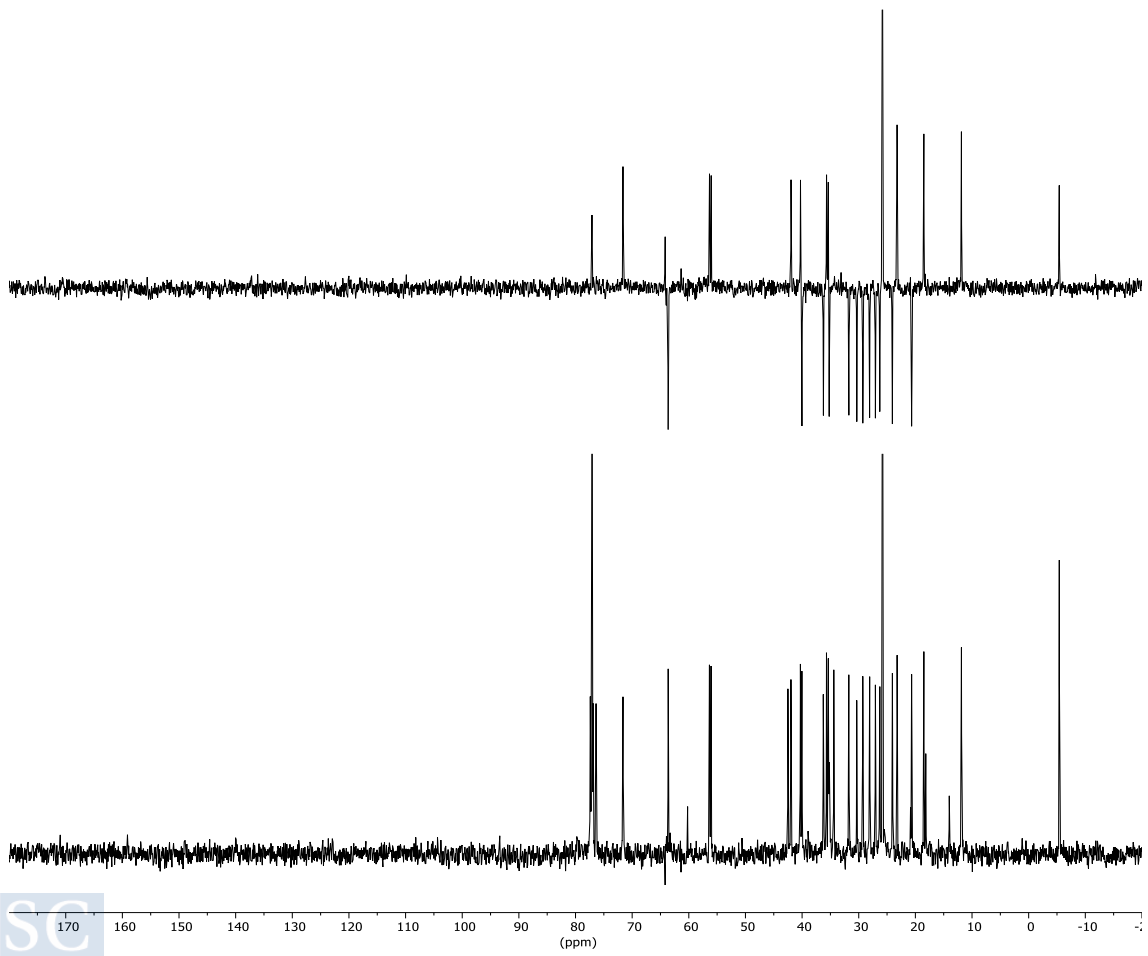
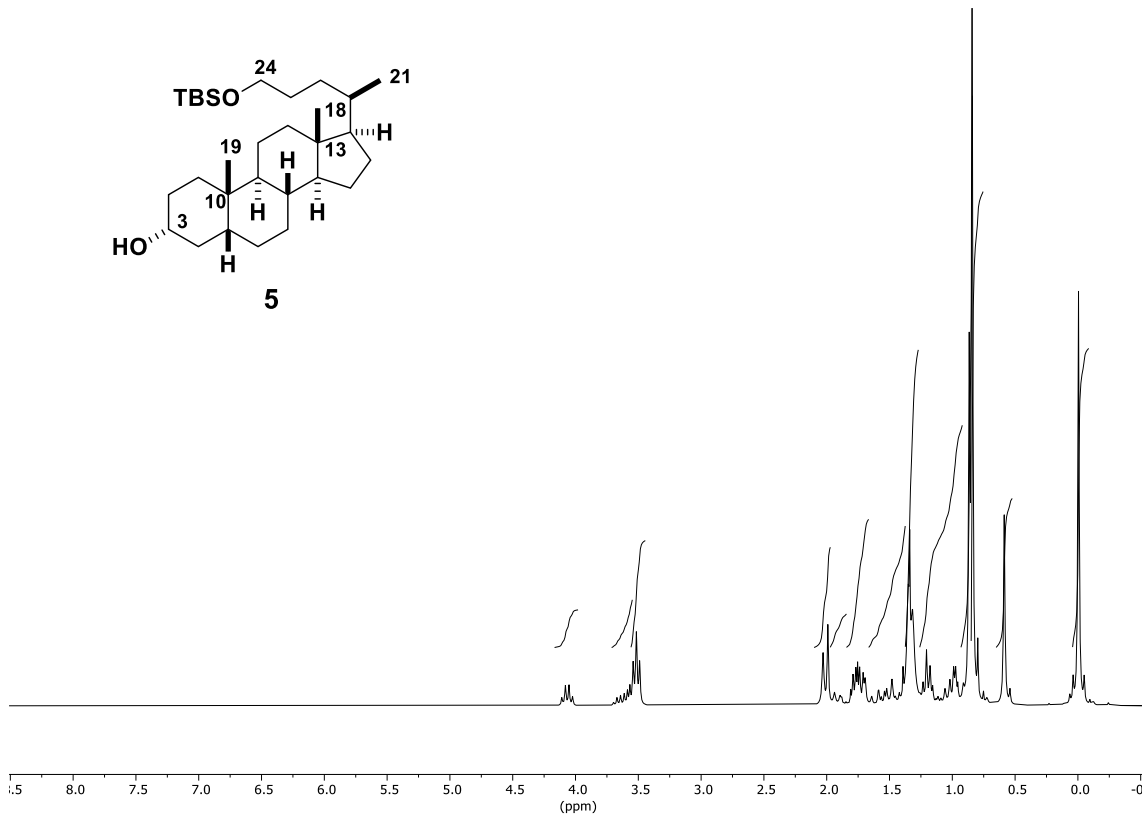
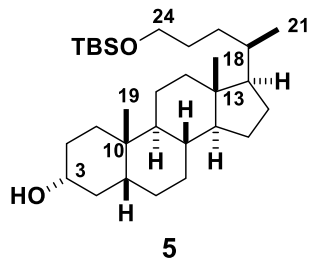
Conclusiones Parte 2.

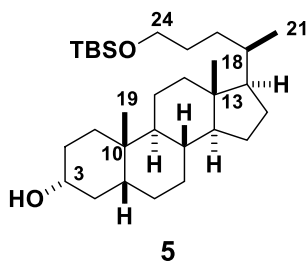
(Ver página 58).

ANEXO I

Espectros de RMN

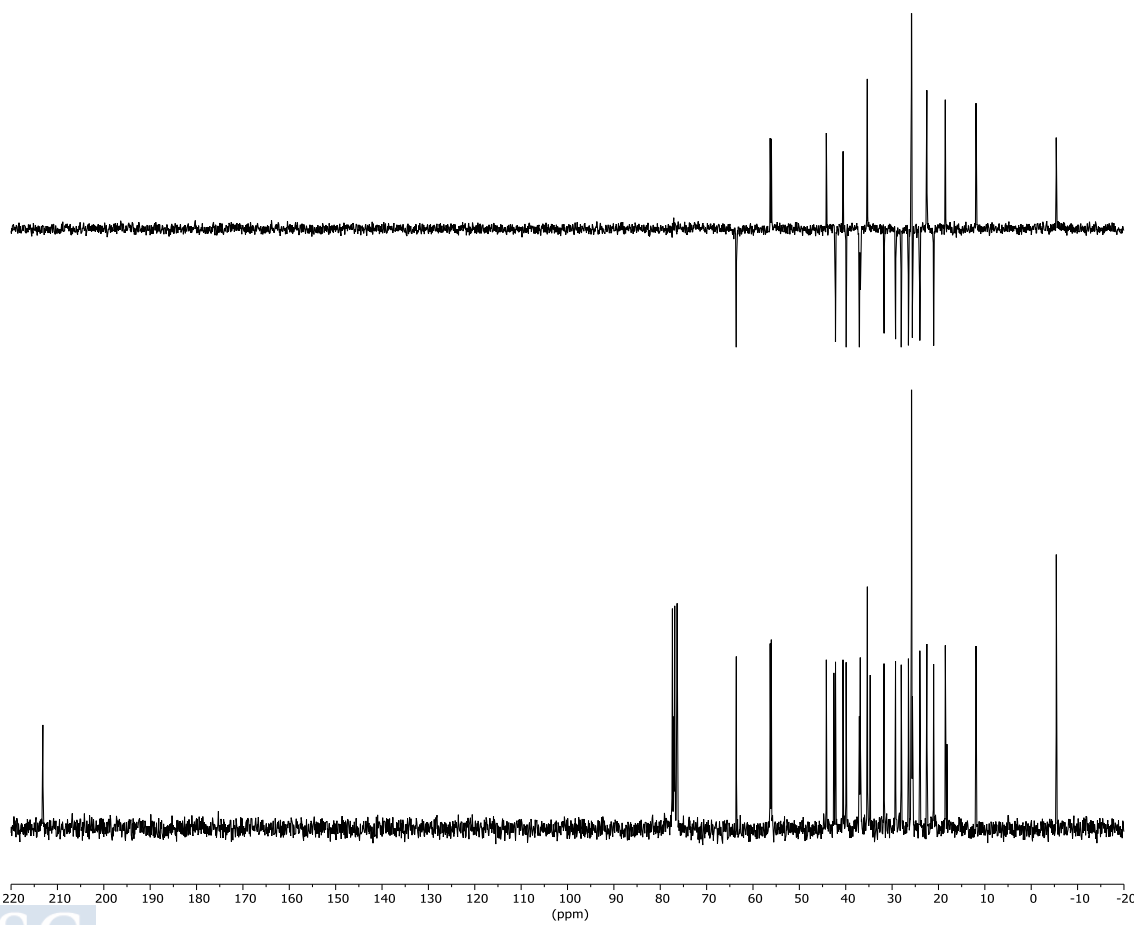
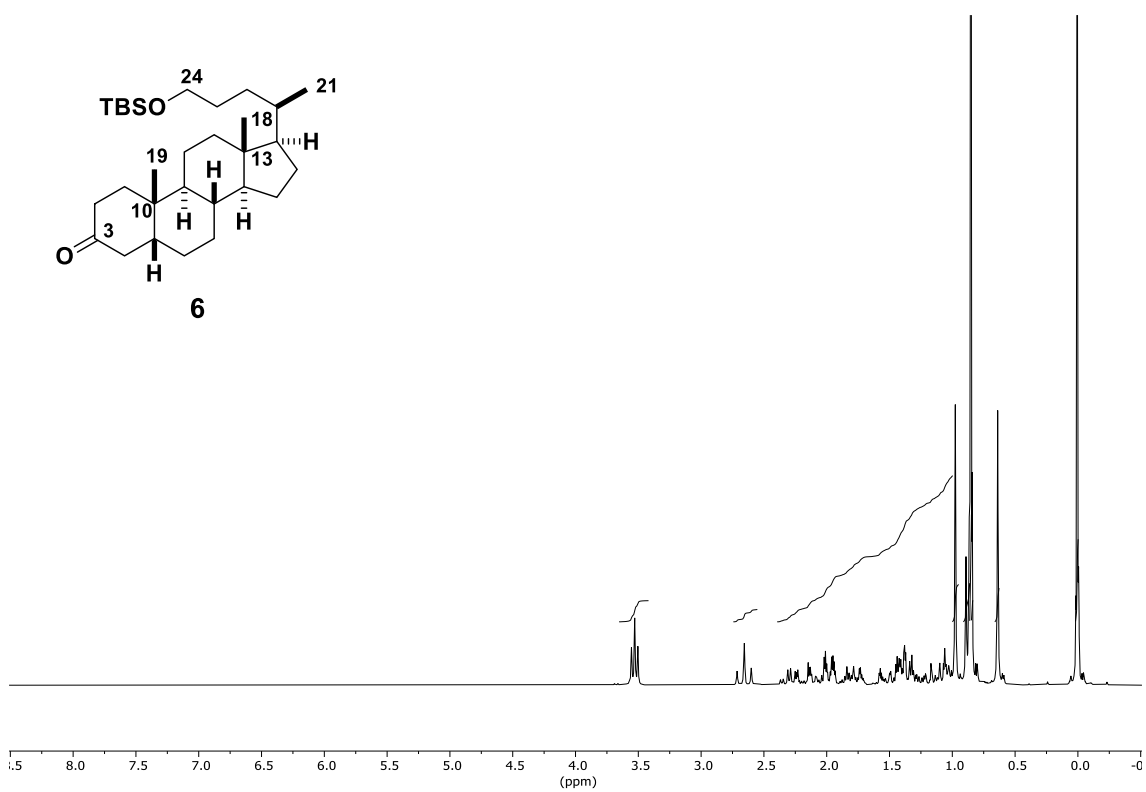
Espectros Parte 1.

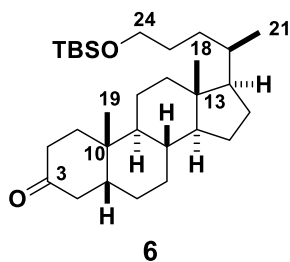




¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 3.70–3.50 (m, 3H, H-3, H-24), 0.90 (d,s, 9H, Si x ^tBu), 0.86 (s, 3H, H-21), 0.84 (s, 3H, H-18), 0.59 (s, 3H, H-19), 0.04 (s, 6H, Si x CH₃).

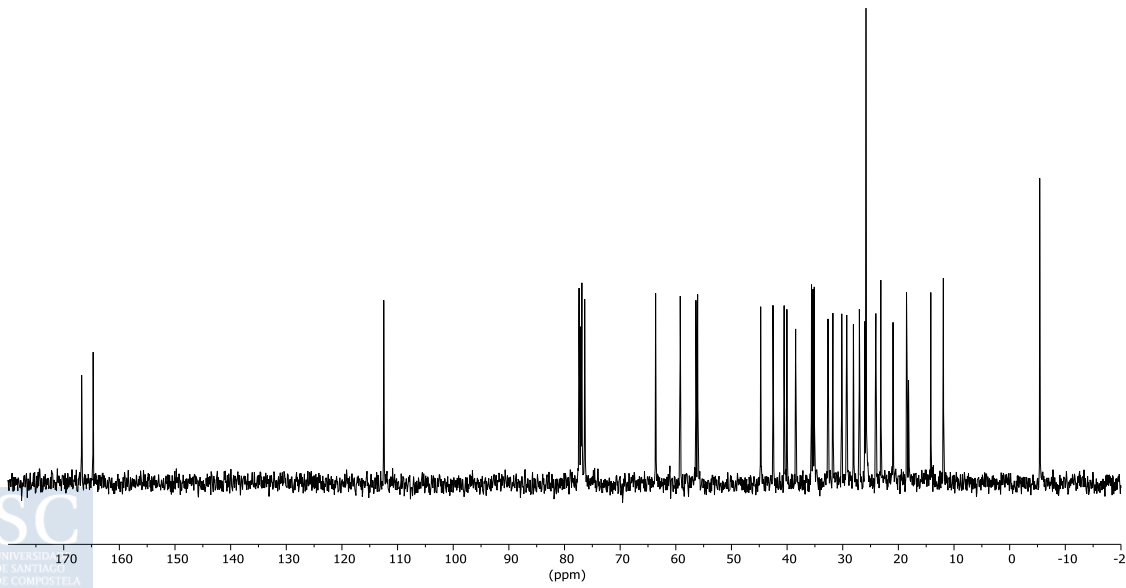
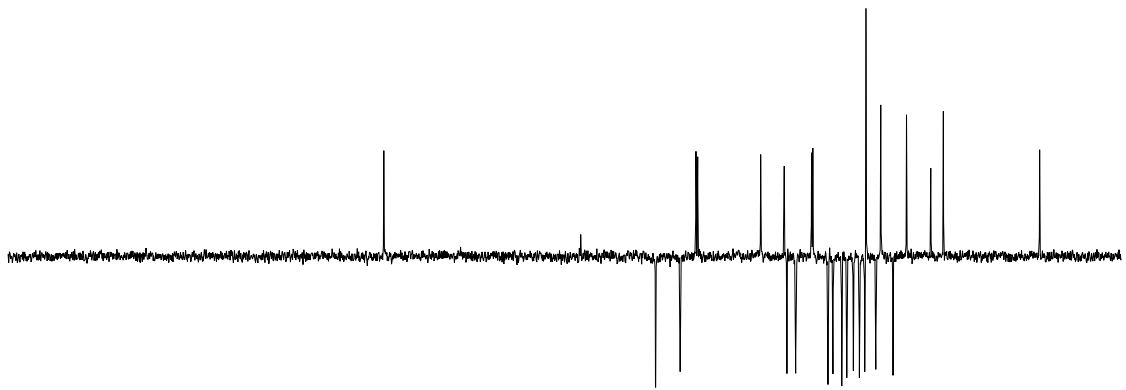
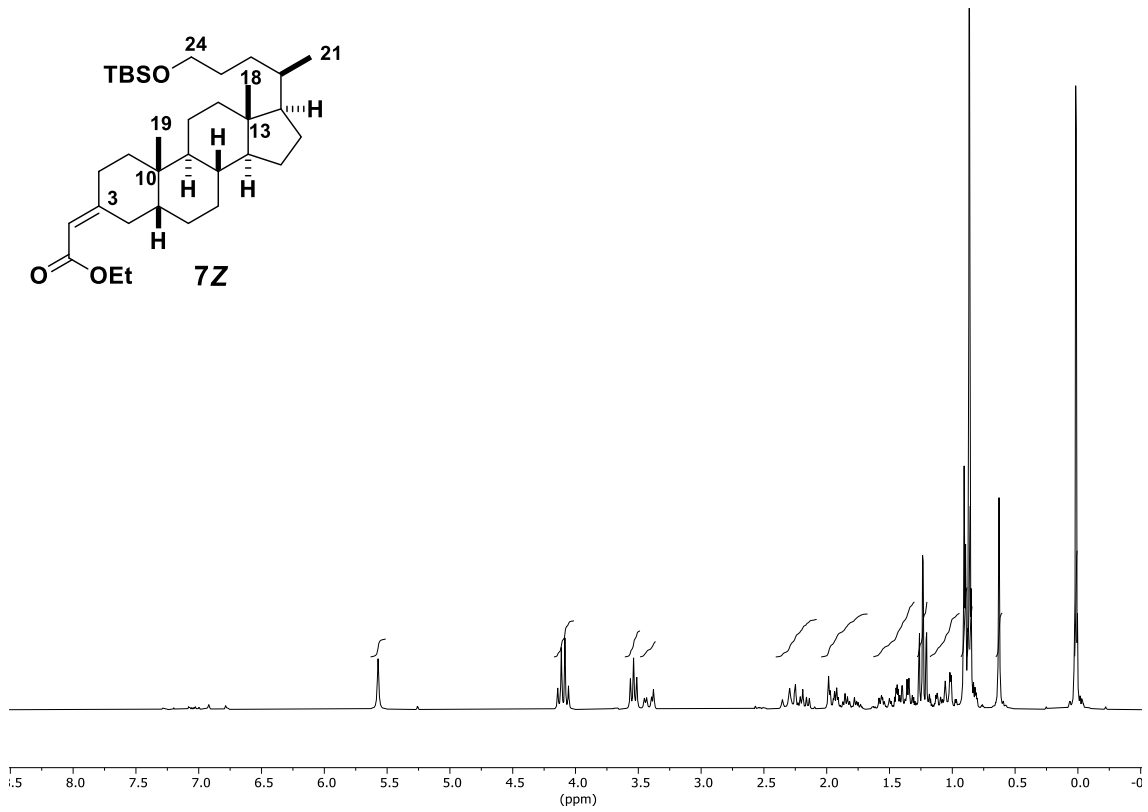
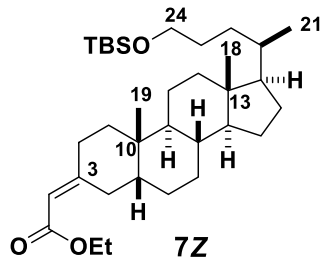
¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 71.7 (CH, C-3), 63.7 (CH₂, C-24), 56.4 (CH), 56.0 (CH), 42.5 (C, C-13), 41.9 (CH), 40.3 (CH), 40.0 (CH₂), 36.3 (CH₂), 35.7 (CH), 35.4 (CH), 35.2 (CH₂), 34.4 (C, C-10), 31.1 (CH₂), 30.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 28.1 (CH₂), 27.1 (CH₂), 26.3 (CH₂), 25.8 (CH₃, Si x ^tBu), 24.1 (CH₂), 23.2 (CH₃, C-19), 20.7 (CH₂), 18.8 (C, Si), 18.5 (CH₃, C-18), 11.9 (CH₃, C-19), -5.4 (CH₃, Si x CH₃).

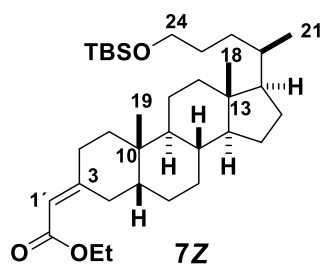




¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 3.50 (t, $J = 6$ Hz, 2H, H-24), 1.0 (s, 3H, H-21), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.85 (d, s, 9 H, Si x ^tBu), 0.65 (s, 3H, H-19), 0.02 (s, 6H, Si x CH₃).

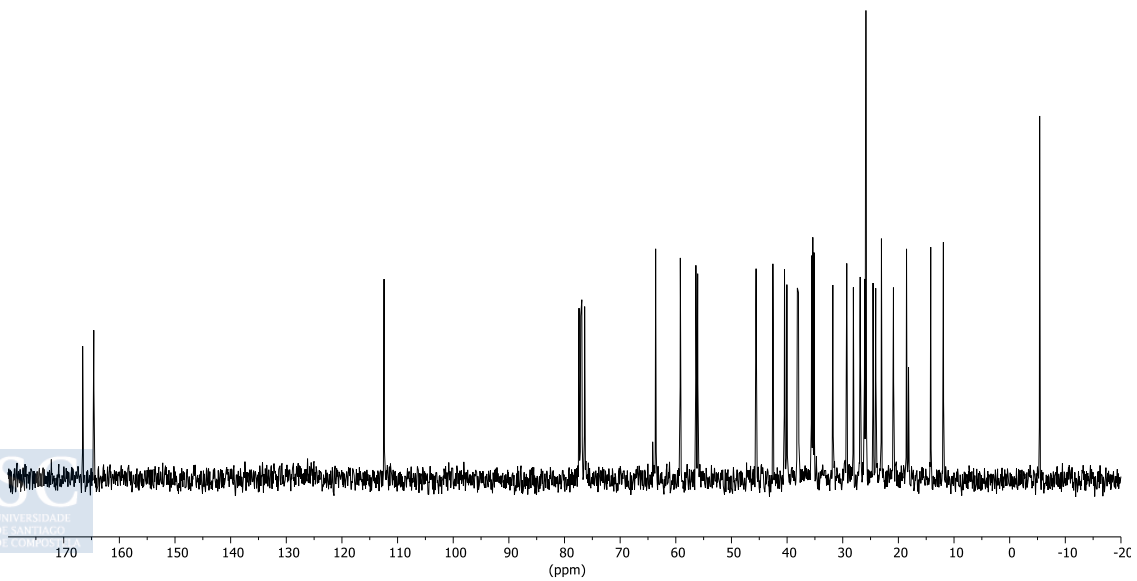
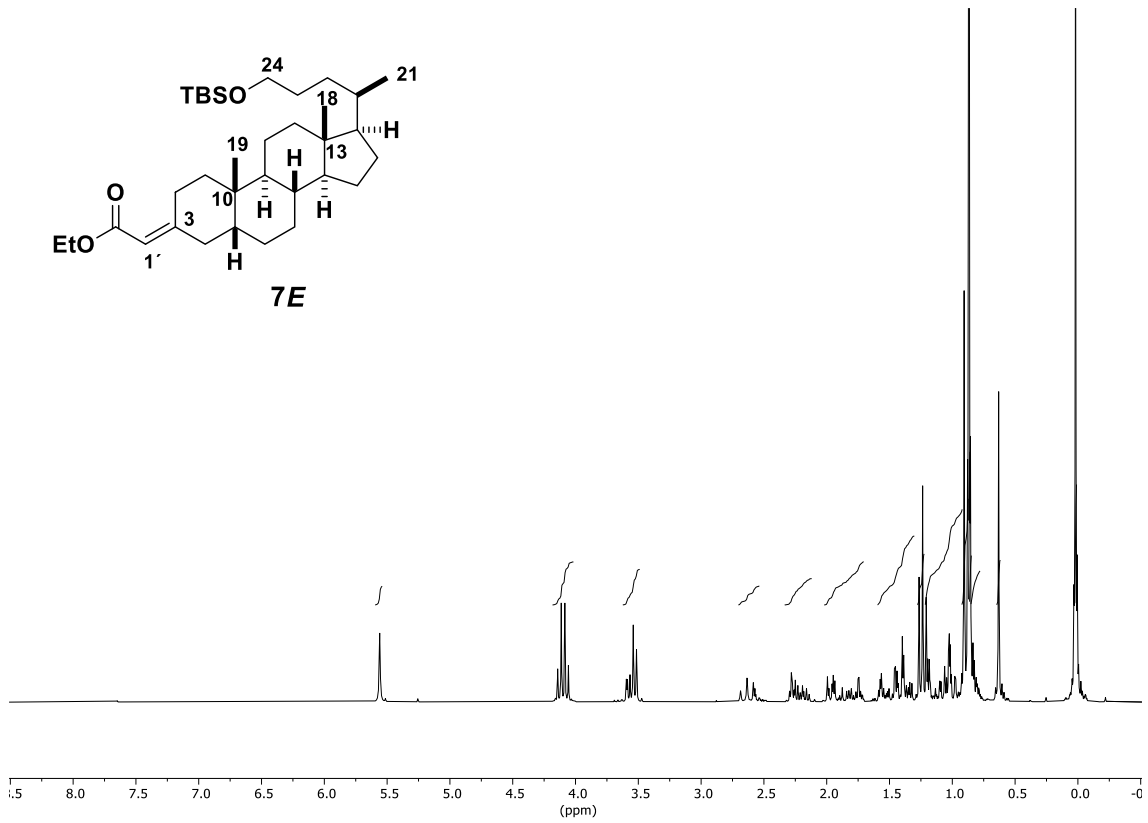
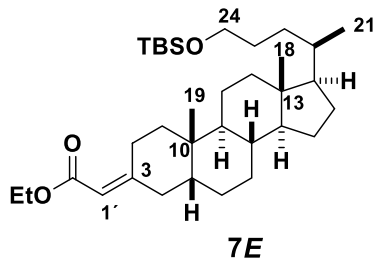
¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 213.4 (C, CO), 63.7 (CH₂, C-24), 56.4 (CH), 56.1 (CH), 44.2 (CH), 42.6 (C, C-13), 42.3 (CH₂), 40.6 (CH), 39.9 (CH₂), 37.1 (CH₂), 36.9 (CH₂), 35.4 (CH), 34.8 (C, C-10), 31.8 (CH₂), 29.3 (CH₂), 28.1 (CH₂), 26.5 (CH₂), 25.8 (CH₃, Si x ^tBu), 25.7 (CH₂), 24.1 (CH₂), 22.6 (CH₃, C-21), 21.1 (CH₂), 18.6 (C, Si-C), 18.5 (CH₃, H-18), 11.9 (CH₃, H-19), -5.4 (Si x CH₃).

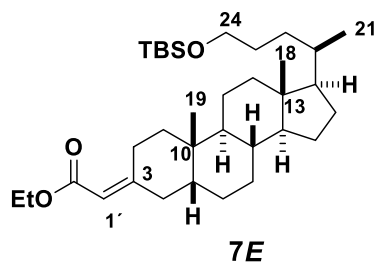




¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 5.55 (s, 1H, H-1'), 4.10 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, -OCH₂-), 3.56 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, H-24), 1.2 (m, 3H, -OCH₂-CH₃), 0.90 (d, s, 3H, H-21), 0.85 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 9H, Si x ^tBu), 0.65 (s, 3H, H-19), 0.00 (s, 6H, Si x CH₃).

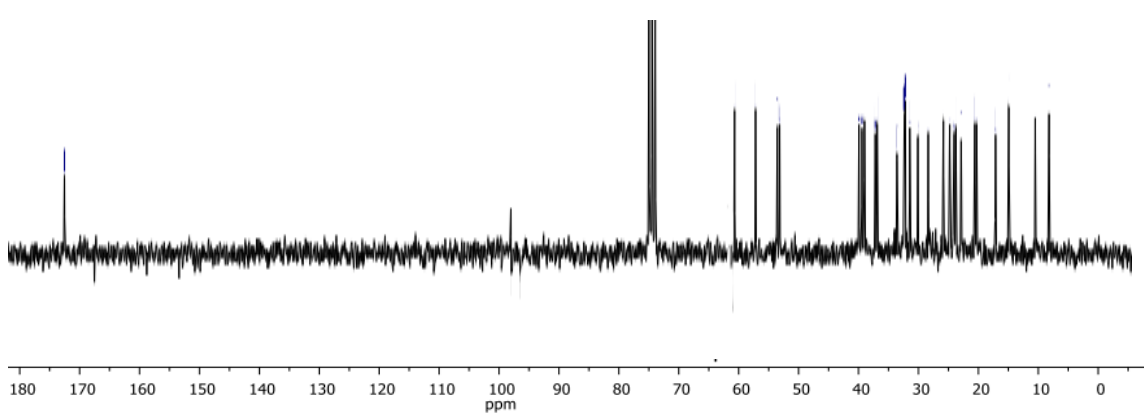
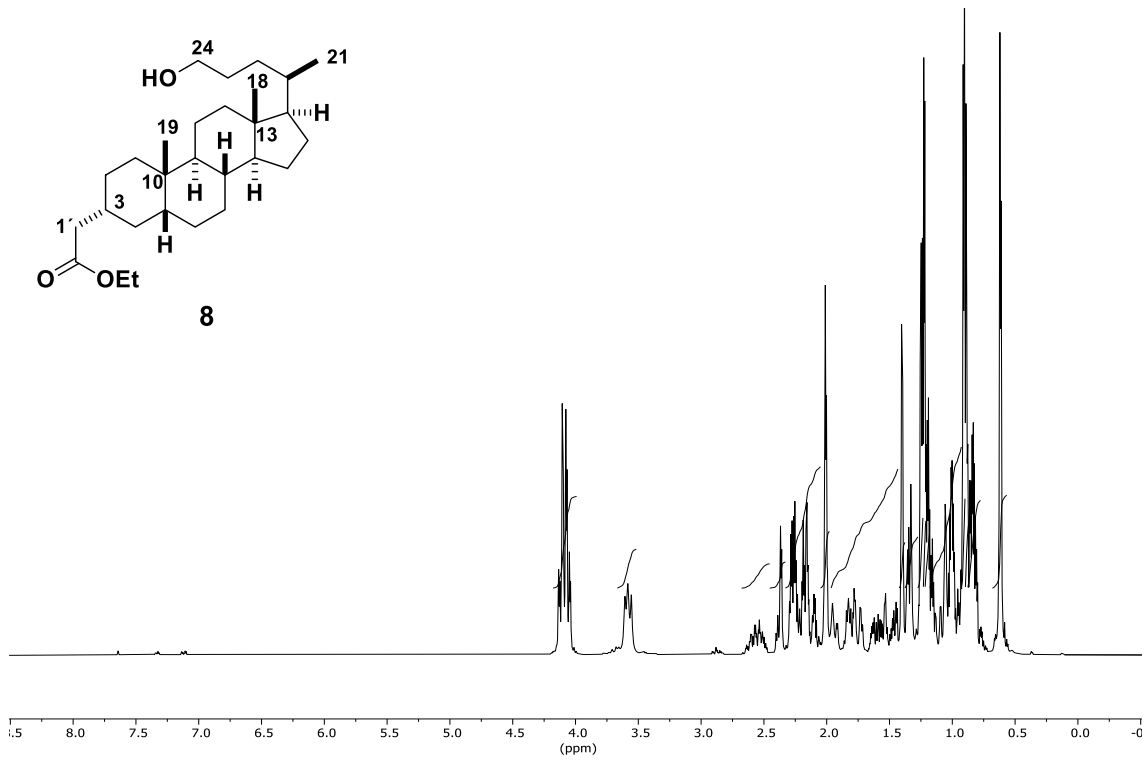
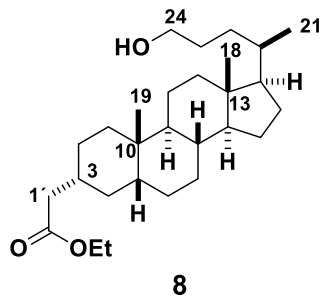
¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 166.8 (C, CO), 164.7 (C, C-3), 112.5 (CH, C-1'), 63.6 (CH₂, C-24), 59.2 (CH₂, -OCH₂-), 56.4 (CH), 56.0 (CH), 44.7 (CH), 42.5 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.0 (CH₂), 38.4 (CH₂), 35.6 (CH), 35.4 (CH), 32.6 (CH₂), 31.7 (CH₂), 30.1 (CH₂), 29.6 (C, C-10), 29.2 (CH₂), 28.0 (CH₂), 27.0 (CH₂), 26.0 (CH₂), 25.8 (CH₃, Si x ^tBu), 24.0 (CH₂), 23.2 (CH₃, -OCH₂-CH₃), 20.9 (CH₂), 18.5 (CH₃, C-21), 18.2 (C, Si-C), 14.2 (CH₃, H-18), 11.9 (CH₃, H-19), - 5.4 (Si x CH₃).

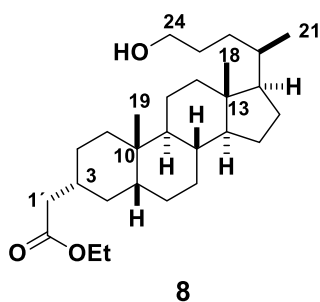




¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) 5.56 (s, 1H, H-1'), 4.10 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, -OCH₂-), 3.57 (m, 2H, H-24), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, -OCH₂-CH₃), 0.91 (s, 3H, H-21), 0.85 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 9H, Si x ^tBu) 0.63 (s, 3H, H-19), 0.02 (s, 6 H, Si x CH₃).

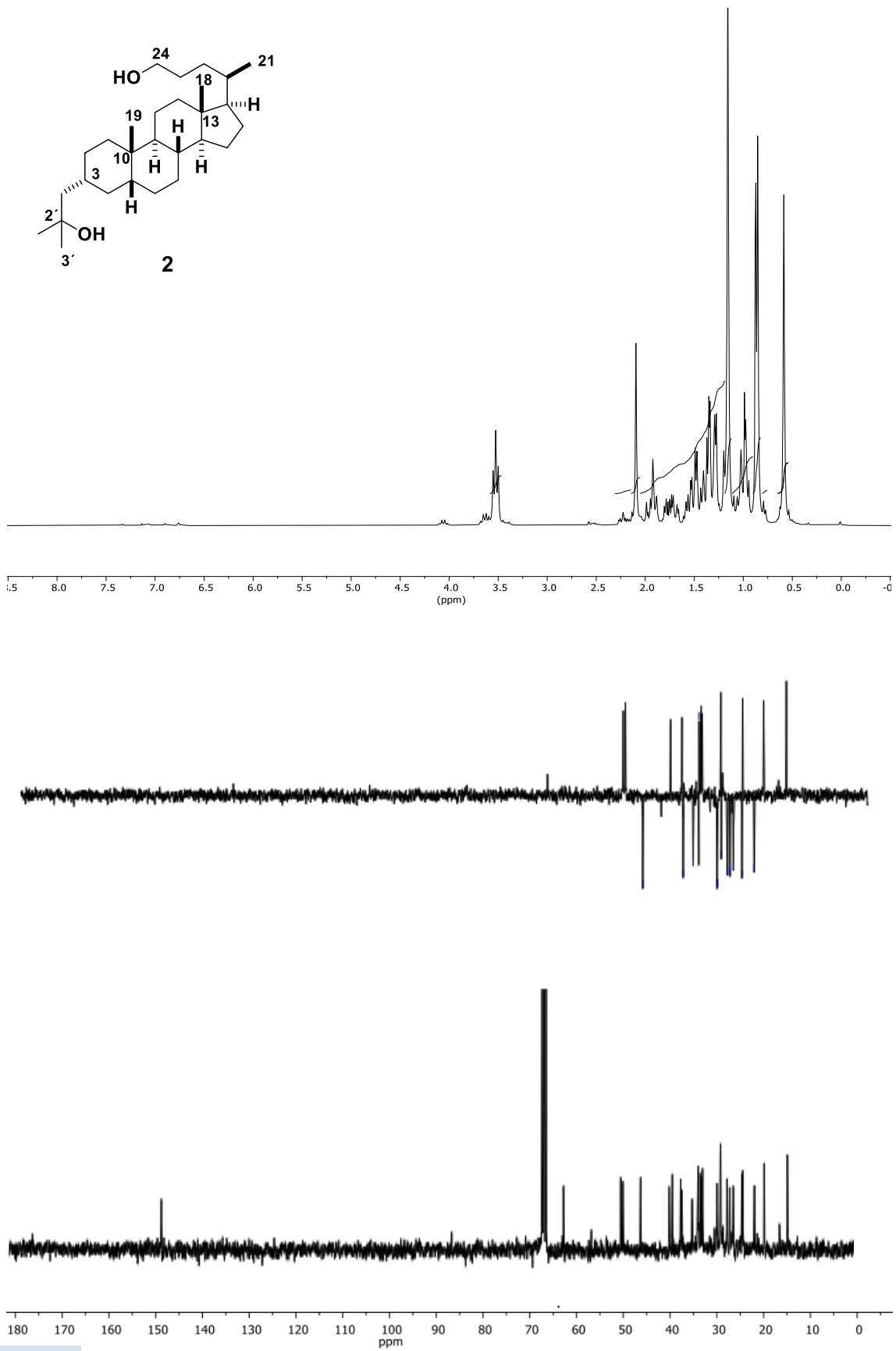
¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) 166.6 (C, CO), 164.6 (C, C-3), 112.4 (CH, C-1'), 63.6 (CH₂, C-24), 59.3 (CH₂), 56.4 (CH), 56.1 (CH), 45.5 (CH), 42.5 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.0 (CH₂), 38.1 (CH₂), 37.9 (CH₂), 35.6 (CH), 35.4 (CH), 35.1 (C, C-10), 31.8 (CH₂), 29.3 (CH₂), 28.1 (CH₂), 26.9 (CH₂), 26.1 (CH₂), 25.8 (CH₃, Si x ^tBu), 24.6 (CH₂), 24.1 (CH₂), 23.0 (CH₃, -OCH₂-CH₃), 20.9 (CH₂), 18.5 (CH₃, C-21), 18.2 (C, Si-C), 14.2 (CH₃, H-18), 11.9 (CH₃, H-19), -5.4 (CH₃, Si x CH₃).

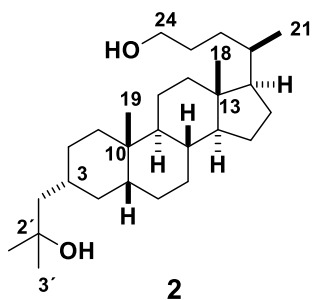




$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 4.1 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, $-\text{OCH}_2-$), 3.55 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, H-24), 1.2 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $-\text{OCH}_2-\text{CH}_3$), 0.91 (s, d, 3H, H-21), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.61 (s, 3H, H-19).

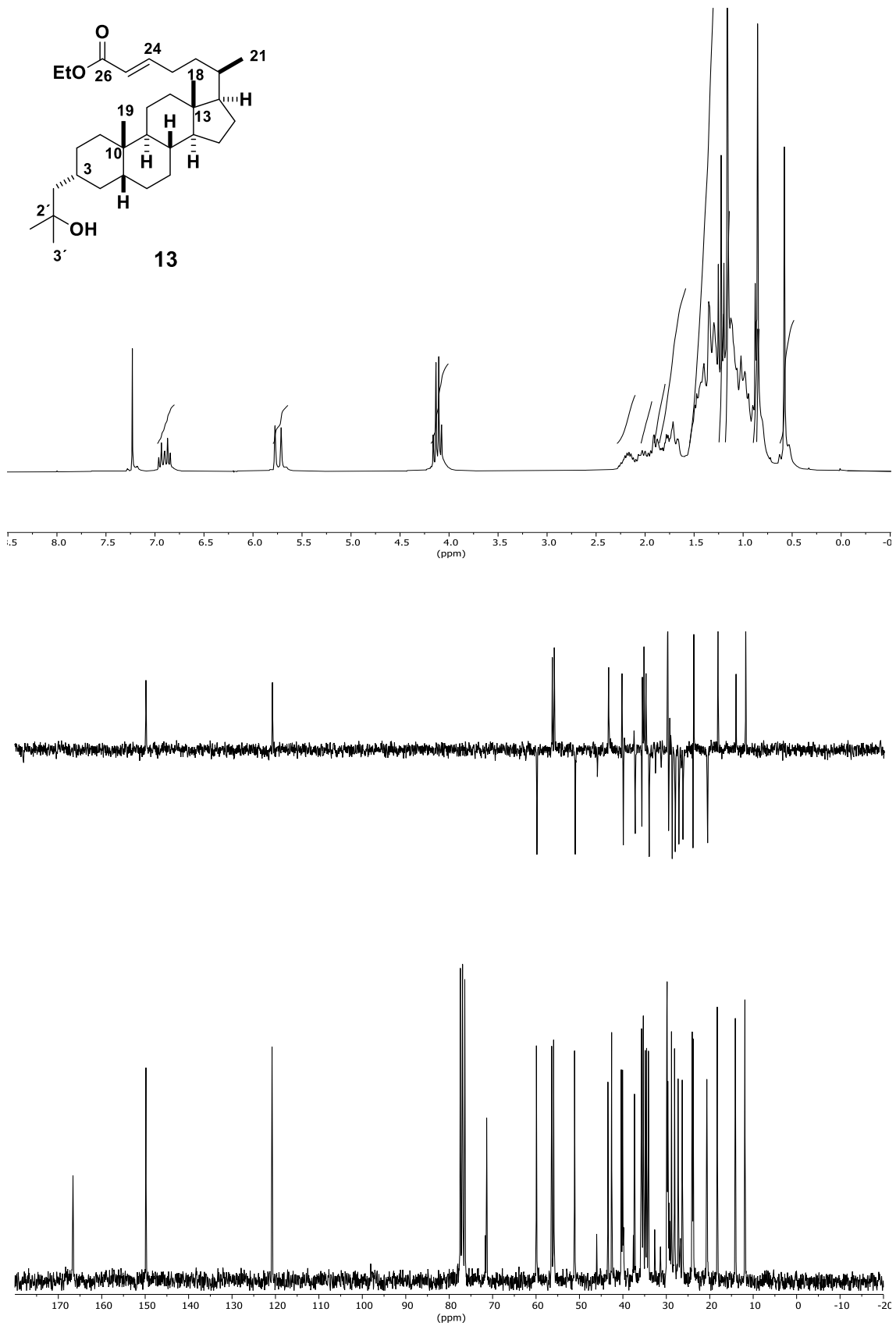
$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 63 MHz) δ 173.5 (C, CO), 76.4 (CH_2 , H-24), 60.0 (CH_2 , $-\text{OCH}_2-$), 56.4 (CH), 56.0 (CH), 43.0 (C, C-13), 42.5 (CH), 42.1 (CH_2), 40.35 (CH), 40.0 (CH_2), 36.8 (CH_2), 35.7 (CH), 35.6 (CH), 35.43 (CH), 34.7 (C, C-10), 33.4 (CH_2), 31.7 (CH_2), 29.2 (CH_2), 28.15 (CH_2), 27.4 (CH_2), 27.1 (CH_2), 26.3 (CH_2), 24.05 (CH_2), 23.7 (CH_3 , $-\text{OCH}_2-\text{CH}_3$), 20.6 (CH_2), 18.5 (CH_3 , H-21), 14.1 (CH_3 , H-18), 11.9 (CH_3 , H-19).

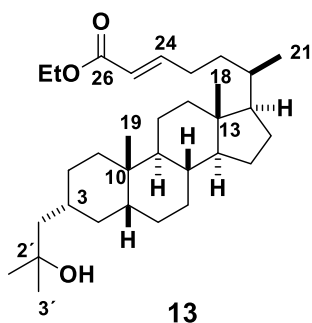




¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 3.67 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-24), 1.22 (s, 6H, H-3'), 0.88 (s, 3H, H-21), 0.85 (s, 3H, H-18), 0.61 (s, 3H, H-19).

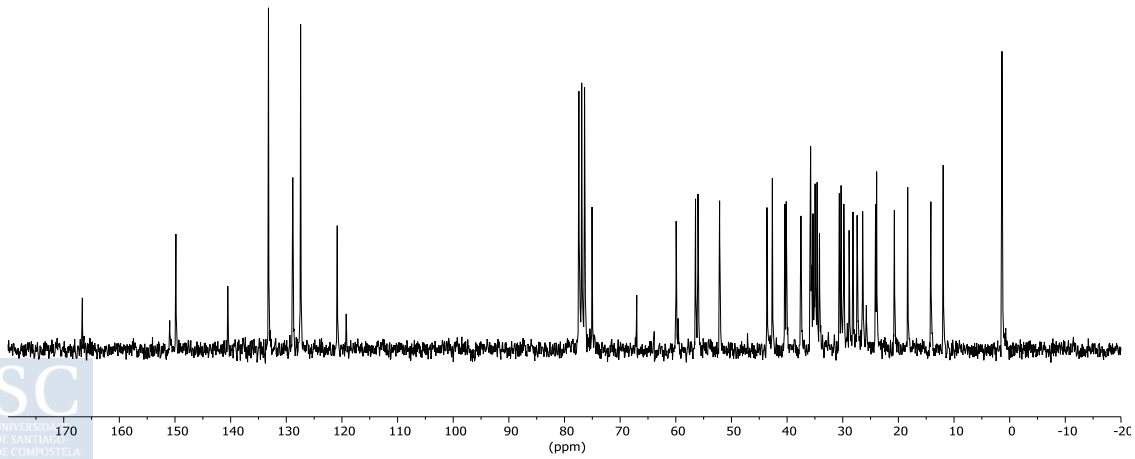
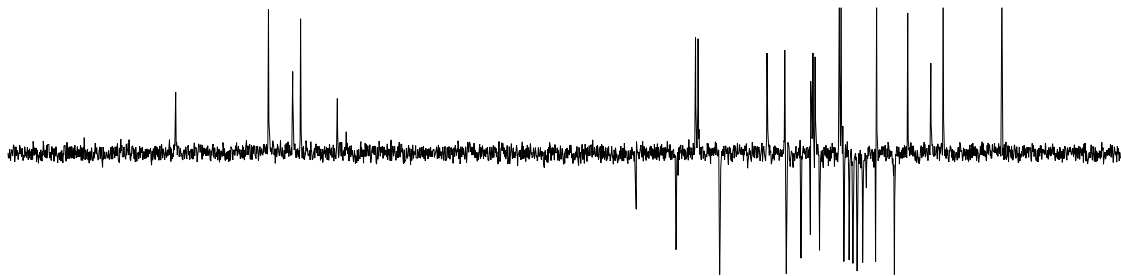
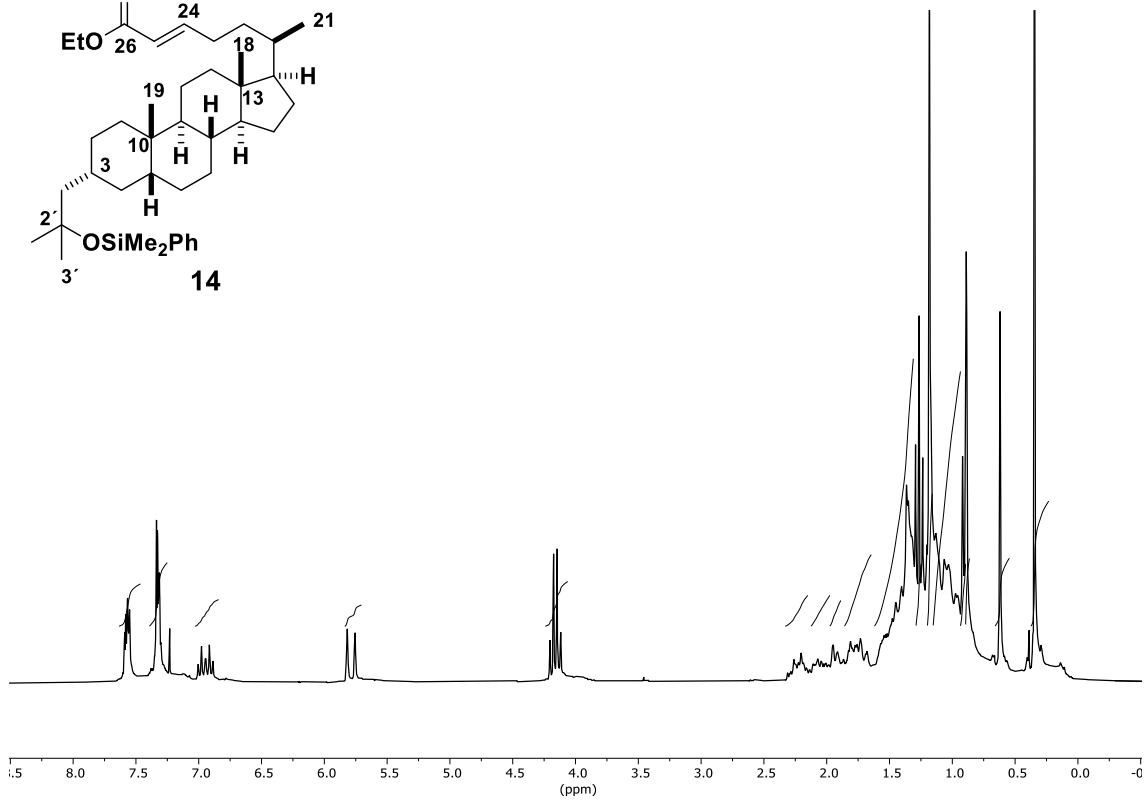
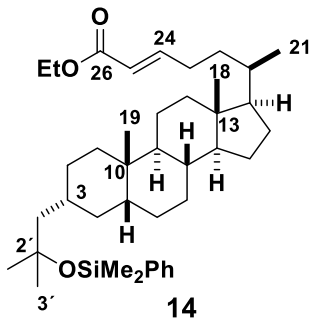
¹³C-RMN (63 MHz, CDCl₃) δ 71.5 (C, C-2'), 63.4 (CH₂, C-24), 56.4 (CH), 56.0 (CH), 51.1 (CH₂), 43.5 (CH), 42.5 (C, C-13), 40.4 (CH), 40.1 (CH₂), 37.3 (CH₂), 35.8 (CH), 35.7 (CH), 35.4 (C, C-10), 34.9 (CH₂), 34.6 (CH₂), 31.7 (CH₃, C-3'), 29.9 (CH₂), 29.7 (CH), 29.2 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.3 (CH₂), 26.4 (CH₂), 24.1 (CH₂), 23.9 (CH₂), 20.7 (CH₃, C-21), 18.5 (CH₃, C-18), 11.9 (CH₃, C-19).

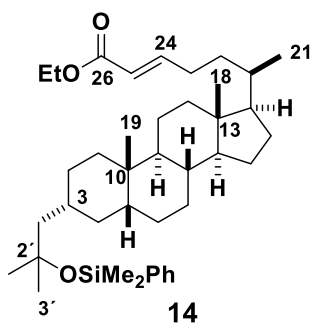




$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 6.90 (m, 1H, H-24), 5.74 (d, $J = 15 \text{ Hz}$, 1H, H-26), 4.12 (q, $J = 7 \text{ Hz}$, 2H, $-\text{OCH}_2-$), 1.22 (t, $J = 7 \text{ Hz}$, 3H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 1.16 (s, 6H, H-3'), 0.88 (s, 3H, H-21), 0.85 (s, 3H, H-18), 0.58 (s, 3H, H-19).

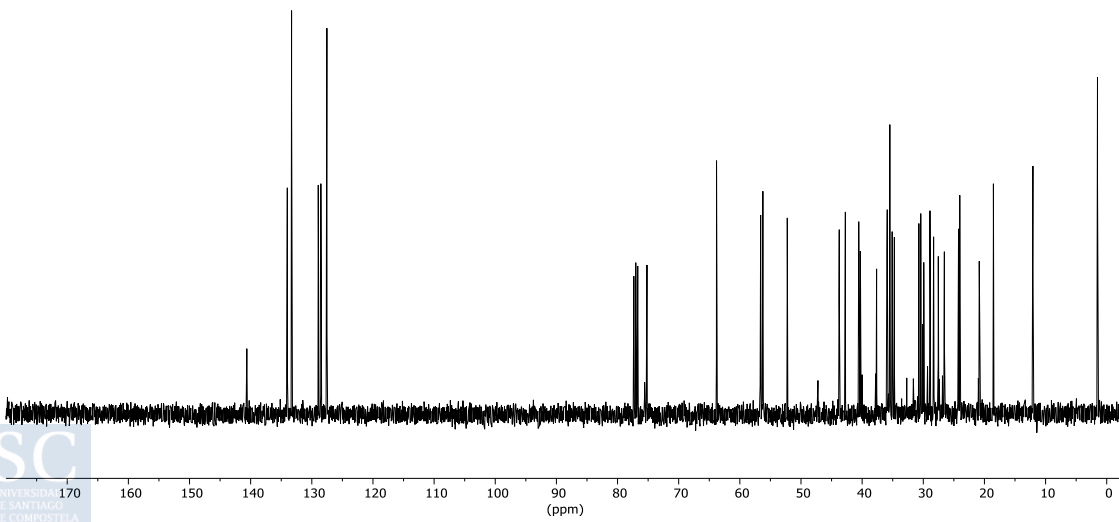
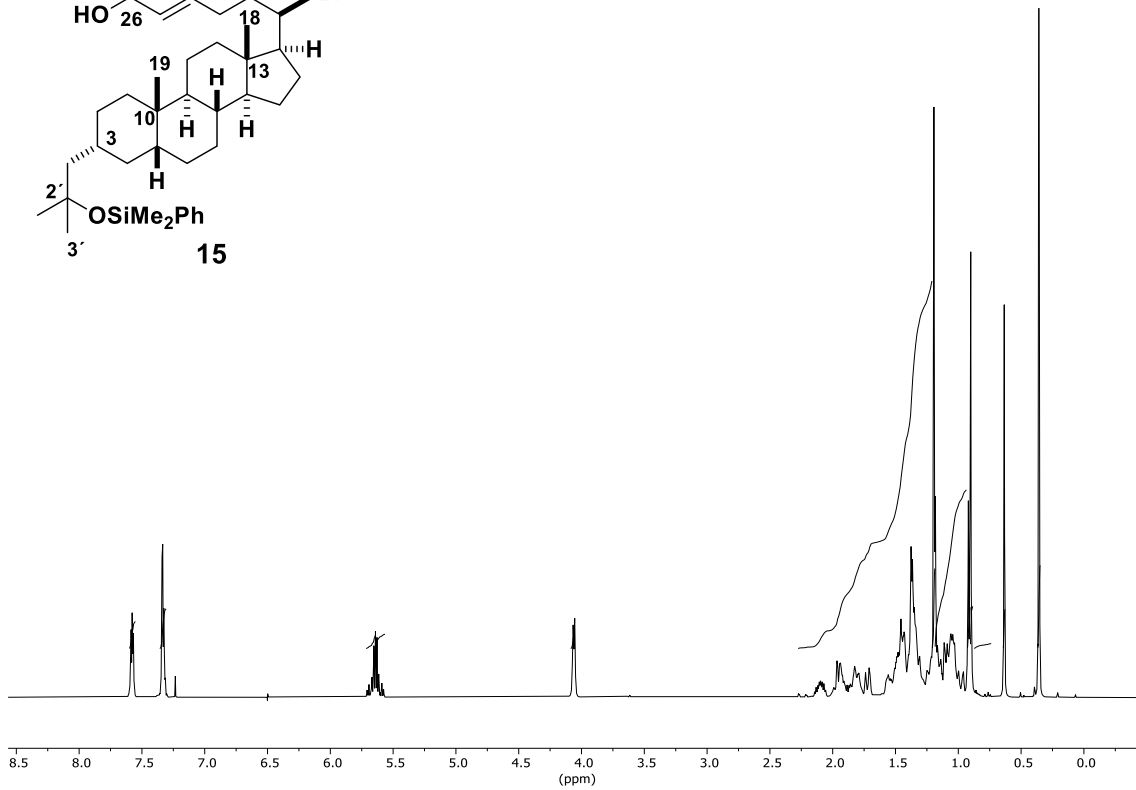
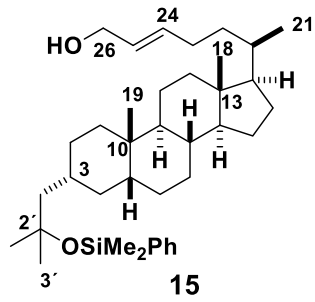
$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 63 MHz) δ 166.6 (C, CO), 149.8 (CH, C-24), 120.7 (CH, C-25), 71.3 (C, C-2'), 59.9 (CH_2 , $-\text{O-CH}_2-$), 56.4 (CH), 55.9 (CH), 51.1 (CH_2), 43.4 (CH), 42.5 (C, C-13), 40.3 (CH), 40.0 (CH_2), 37.3 (CH_2), 35.8 (CH_2), 35.6 (CH), 35.3 (CH), 34.8 (CH), 34.5 (C, C-10), 34.1 (CH_2), 29.9 (CH_3 , C-3'), 29.8 (CH_3 , C-3'), 29.6 (CH_2), 28.8 (CH_2), 28.1 (CH_2), 27.2 (CH_2), 26.3 (CH_2), 24.0 (CH_2), 23.8 (CH_3 , $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 20.6 (CH_2), 18.2 (CH_3 , C-21), 14.1 (CH_3 , C-18), 11.9 (CH_3 , C-19).

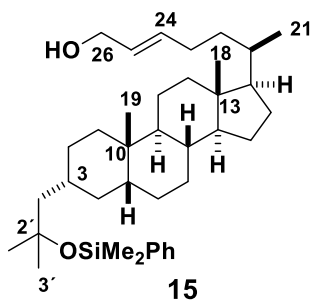




¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 7.57 (m, 2H, H-Ar), 7.32 (m, 3H, H-Ar), 6.95 (m, 1H, H-24), 5.79 (d, $J = 15$ Hz, 1H, H-25), 4.16 (q, $J = 7$ Hz, 2H, -OCH₂-), 1.26 (t, $J = 7$ Hz, 3H, -O-CH₂-CH₃), 1.20 (s, 6H, H-3'), 0.92 (s, 3H, H-21), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.62 (s, 3H, H-19), 0.35 (s, 6H, Si x -CH₃).

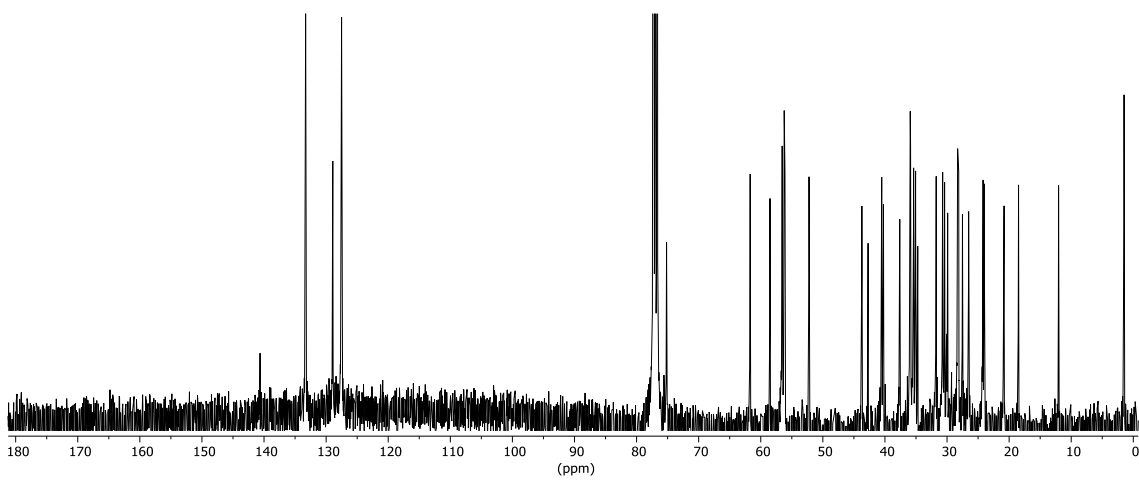
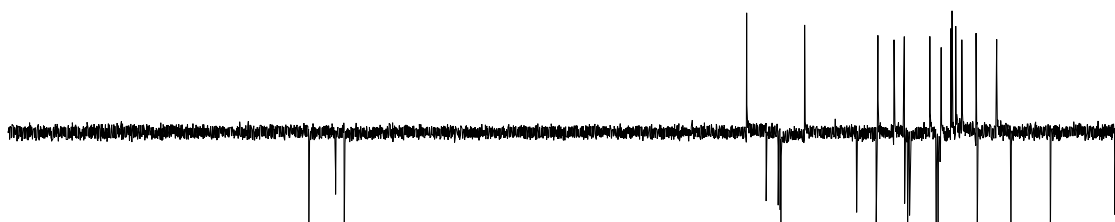
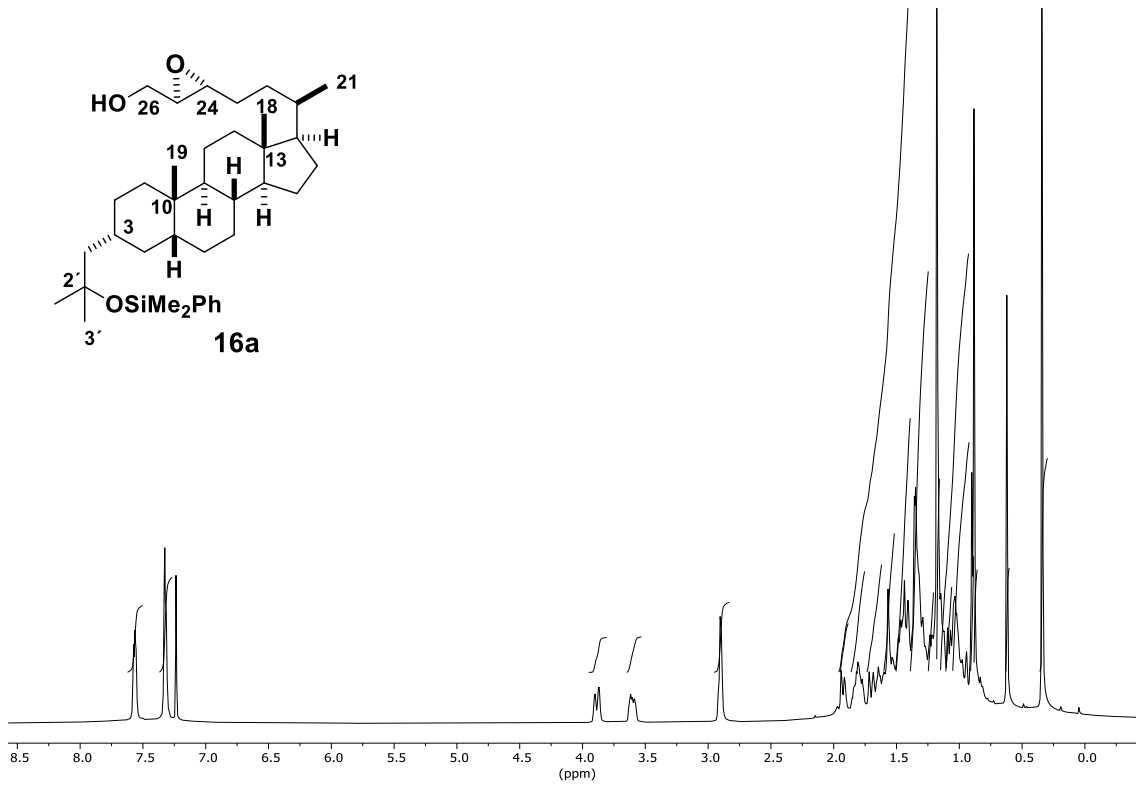
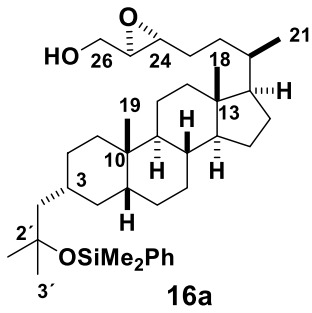
¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 166.6 (C, CO), 149.8 (CH, C-24), 140.5 (C, Si-Ar), 133.2 (CH, C-Ar), 128.8 (CH, C-Ar), 127.4 (CH, C-Ar), 120.8 (CH, C-25), 75.0 (C, C-2'), 59.9 (CH₂, -O-CH₂-), 56.5 (CH), 56.0 (CH), 52.1 (CH₂), 43.6 (CH), 42.6 (C, C-13), 40.4 (CH), 40.2 (CH₂), 37.5 (CH₂), 35.8 (CH₂), 35.7 (CH), 35.4 (CH), 34.9 (CH), 34.6 (C, C-10), 34.2 (CH₂), 30.6 (CH₃, C-3'), 30.3 (CH₃, C-3'), 29.8 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.4 (CH₂), 26.4 (CH₂), 24.1 (CH₂), 23.9 (CH₃, -O-CH₂-CH₃), 20.7 (CH₂), 18.3 (CH₃, H-21), 14.1 (CH₃, H-18), 11.9 (CH₃, H-19), 1.4 (CH₃, Si x CH₃).

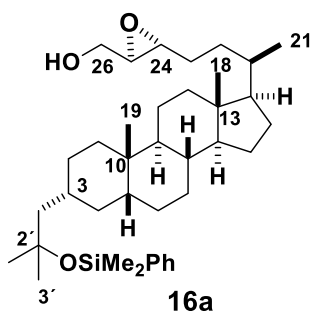




¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 7.58 (m, 2H, H-Ar), 7.33 (m, 3H, H-Ar), 5.68-5.60 (m, 2H, H-24, H-25), 4.06 (d, $J = 5$ Hz, 2H, H-26), 1.19 (s, 6H, H-3'), 0.92 (s, 3H, H-21), 0.90 (s, 3H, H-18), 0.63 (s, 3H, H-19), 0.36 (s, 6H, Si x CH₃).

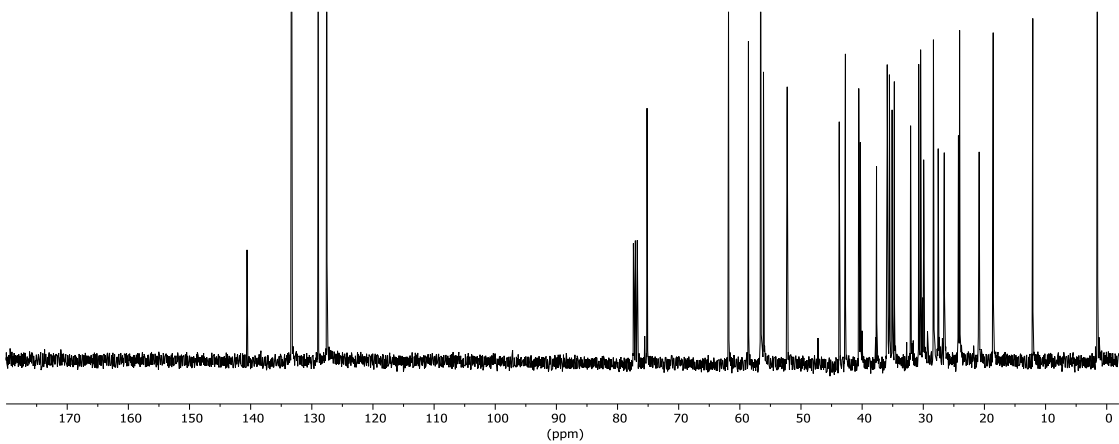
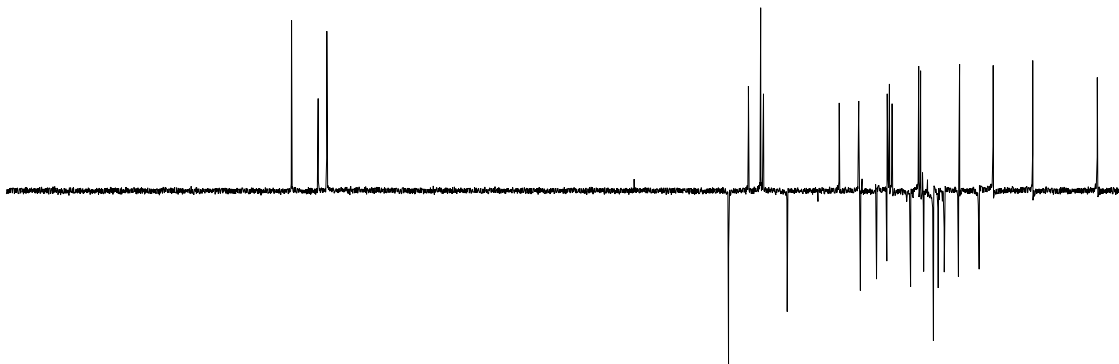
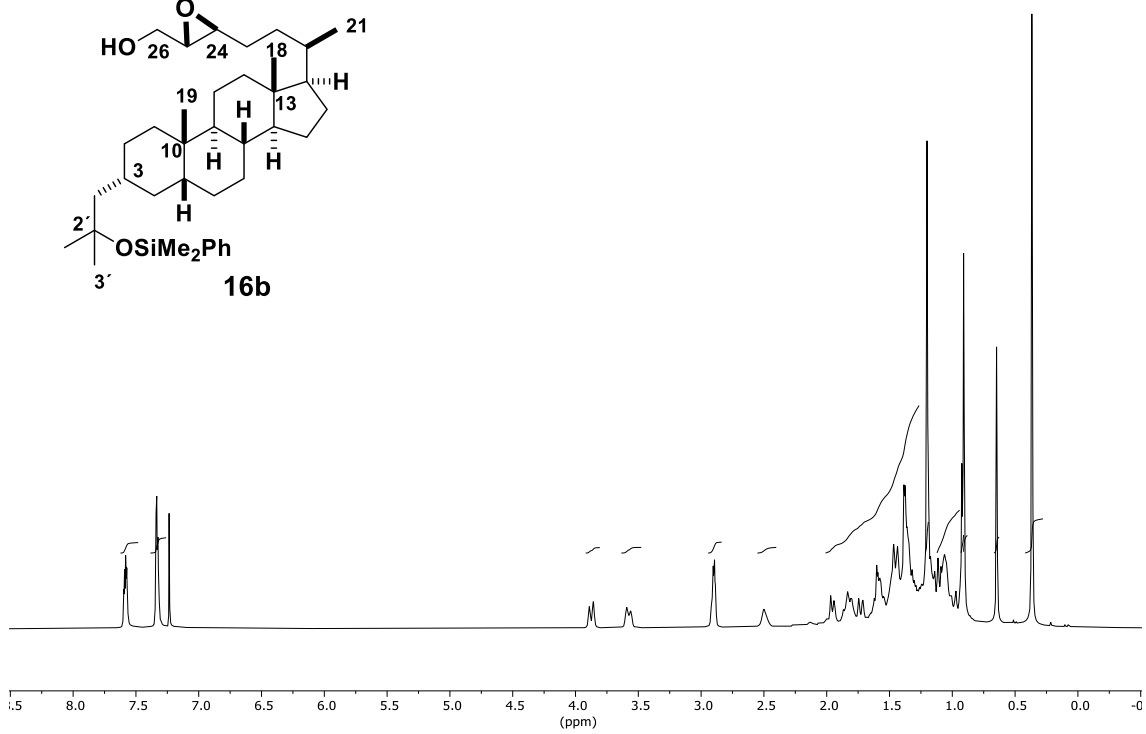
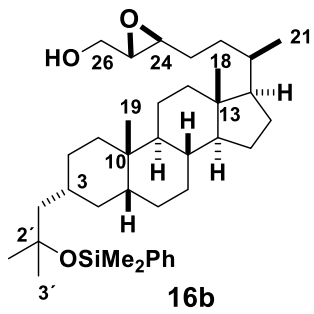
¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 140.6 (C, Si-Ar), 134.0 (CH, C-25), 133.3 (CH, C-Ar), 128.9 (CH, C-Ar), 128.5 (CH, C-24), 127.5 (CH, C-Ar), 75.2 (C, C-2'), 63.8 (CH₂, C-26), 56.6 (CH), 56.2 (CH), 52.2 (CH₂), 43.7 (CH), 42.7 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.2 (CH₂), 37.6 (CH₂), 36.0 (CH₂), 35.9 (CH), 35.5 (CH), 35.4 (CH₂), 35.1 (CH), 34.7 (C, C-10), 30.7 (CH₃, C-3'), 30.4 (CH₃, C-3'), 29.9 (CH₂), 28.9 (CH₂), 28.3 (CH₂), 27.5 (CH₂), 26.5 (CH₂), 24.2 (CH₂), 24.0 (CH₃, C-21), 20.8 (CH₂), 18.5 (CH₃, C-18), 12.1 (CH₃, C-19), 1.5 (CH₃, Si x CH₃).

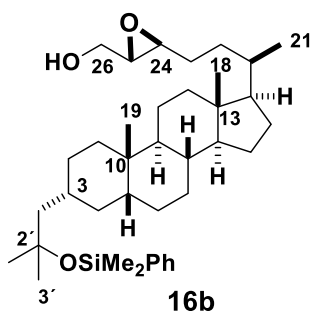




$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 7.59 (m, 2H, H-Ar), 7.33 (m, 3H, H-Ar), 3.87 (d, $J = 12$ Hz, 1H)-3.58 (d, $J = 12$ Hz, 1H) (H-26), 2.90 (s, 2H, H-24, H-25), 1.18 (s, 6H, H-3'), 0.92 (s, 3H, H-21), 0.91 (s, 3H, H-18), 0.65 (s, 3H, H-19), 0.34 (s, 6H, Si x - CH_3).

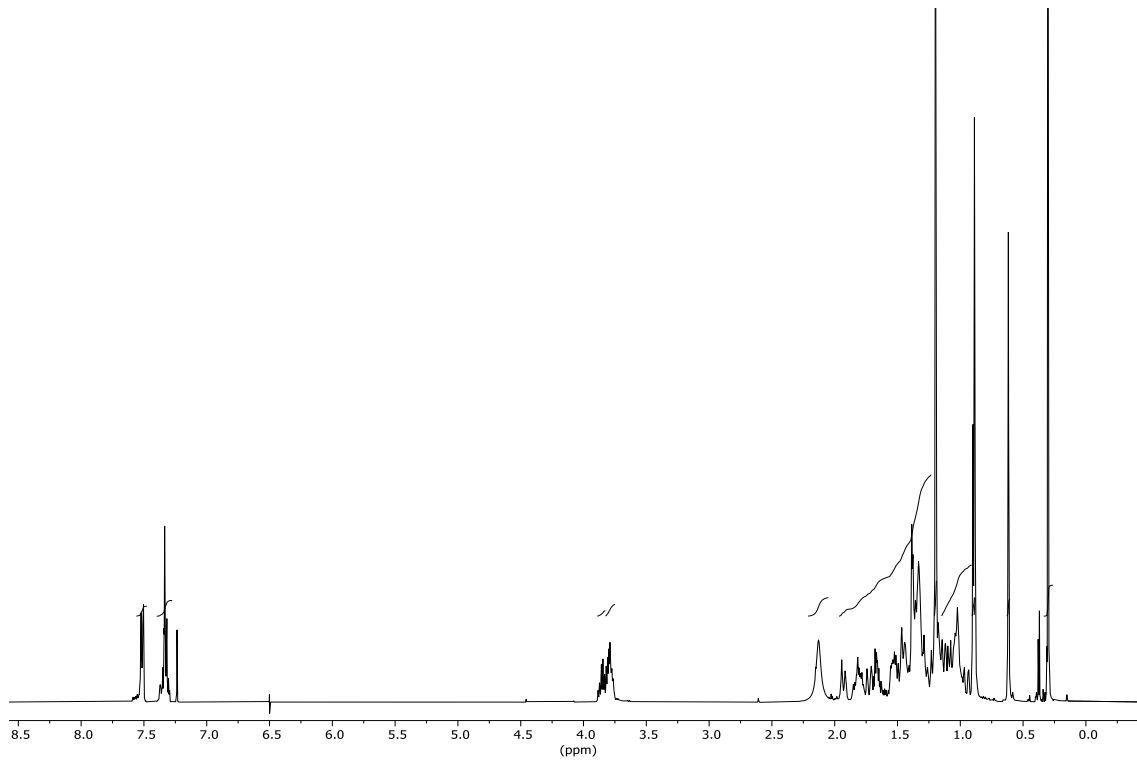
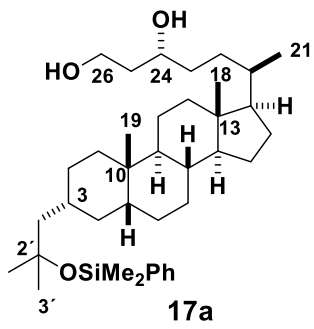
$^{13}\text{C-RMN}$ (63 MHz, CDCl_3) δ 140.6 (C, Si-Ar), 133.3 (CH, C-Ar), 128.9 (CH, C-Ar), 127.5 (CH, C-Ar), 75.1 (C, C-2'), 61.8 (CH_2 , C-26), 58.5 (CH), 56.5 (CH), 56.1 (CH), 52.2 (CH_2), 43.7 (CH), 42.7 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.3 (CH_2), 37.6 (CH_2), 36.0 (CH_2), 35.9 (CH), 35.5 (CH), 35.1 (CH), 34.7 (C, C-10), 32.1 (CH_2), 30.8 (CH_3 , C-3'), 30.4 (CH_3 , C-3'), 29.9 (CH_2), 28.3 (CH_2), 27.6 (CH_2), 26.6 (CH_2), 24.3 (CH_2), 24.0 (CH_3 , C-21), 20.9 (CH_2), 18.6 (CH_3 , C-18), 12.1 (CH_3 , C-19), 1.5 (CH_3 , Si x - CH_3).

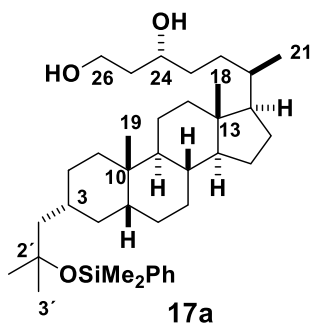




^1H -RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 7.56 (m, 2H, H-Ar), 7.32 (m, 3H, H-Ar), 3.88 (d, $J = 13$ Hz, 1H)-3.60 (m, 1H) (H-26), 2.90 (s, 2H, H-24, H-25), 1.18 (s, 6H, H-3'), 0.90 (s, 3H, H-21), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.62 (s, 3H, H-19), 0.34 (s, 6H, Si x CH_3).

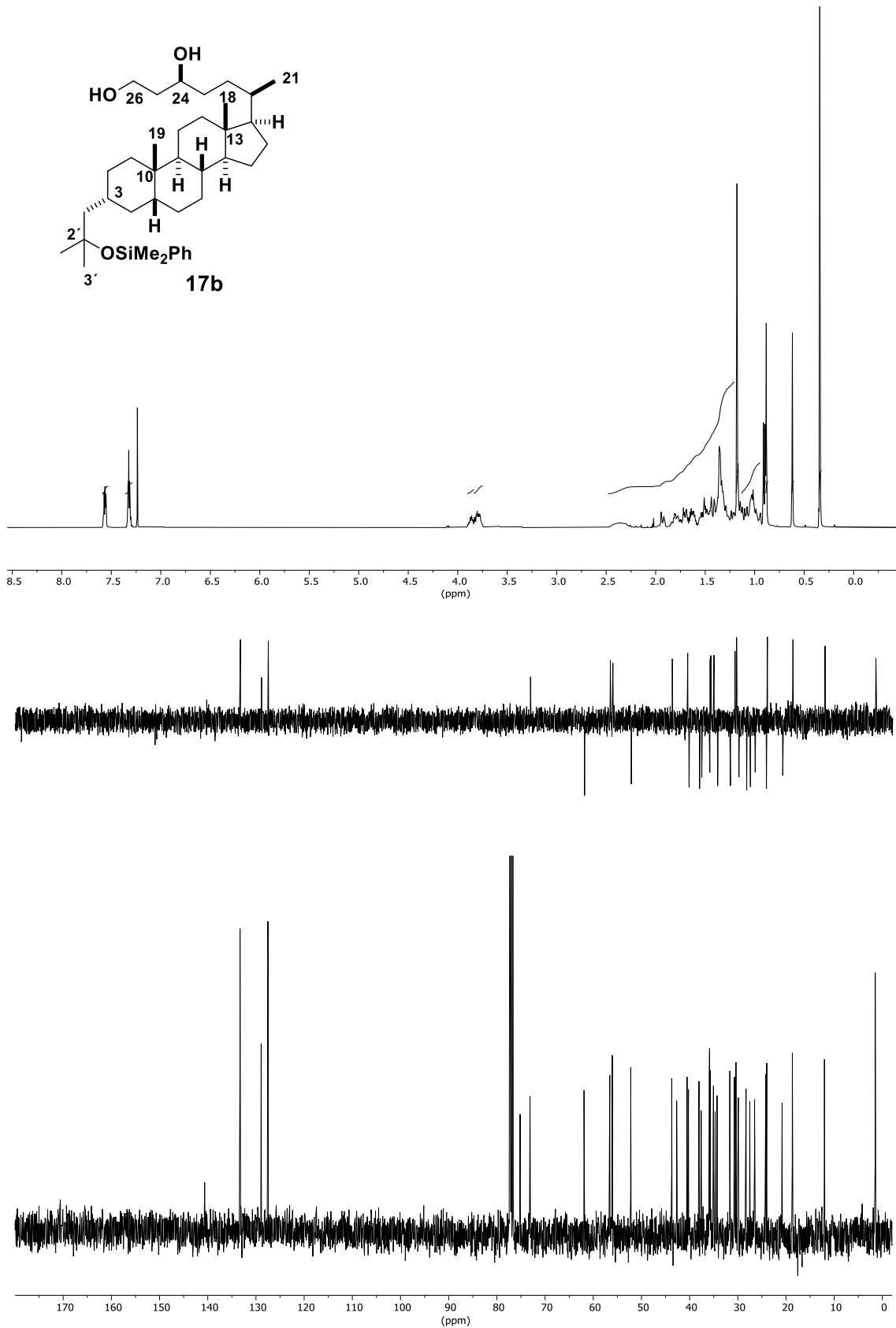
^{13}C -RMN (CDCl_3 , 63 MHz) δ 140.6 (C, C-Ar), 133.3 (CH, C-Ar), 128.9 (CH, C-Ar), 127.5 (CH, C-Ar), 75.2 (C, C-2'), 61.7 (CH_2 , C-26), 58.5 (CH), 56.5 (CH), 56.2 (CH), 56.1 (CH), 52.2 (CH_2), 43.7 (CH), 42.7 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.2 (CH_2), 37.6 (CH_2), 35.9 (CH_2), 35.3 (CH), 35.3 (CH), 35.1 (CH), 34.7 (C, C-10), 31.7 (CH_2), 30.7 (CH_3 , C-3'), 30.4 (CH_3 , C-3'), 29.9 (CH_2), 28.3 (CH_2), 28.1 (CH_2), 27.5 (CH_2), 26.5 (CH_2), 24.2 (CH_2), 23.9 (CH_3 , C-21), 20.8 (CH_2), 18.5 (CH_3 , C-18), 12.0 (CH_3 , C-19), 1.5 (CH_3 Si x CH_3).

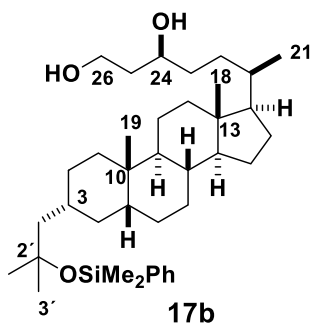




¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 7.56 (m, 2H, H-Ar), 7.32 (m, 3H, H-Ar), 3.87 (m, 1H, H-24), 3.80 (m, 2H, H-26), 1.18 (s, 6H, H-3'), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-21), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.62 (s, 3H, H-19), 0.34 (s, 6H, Si x -CH₃).

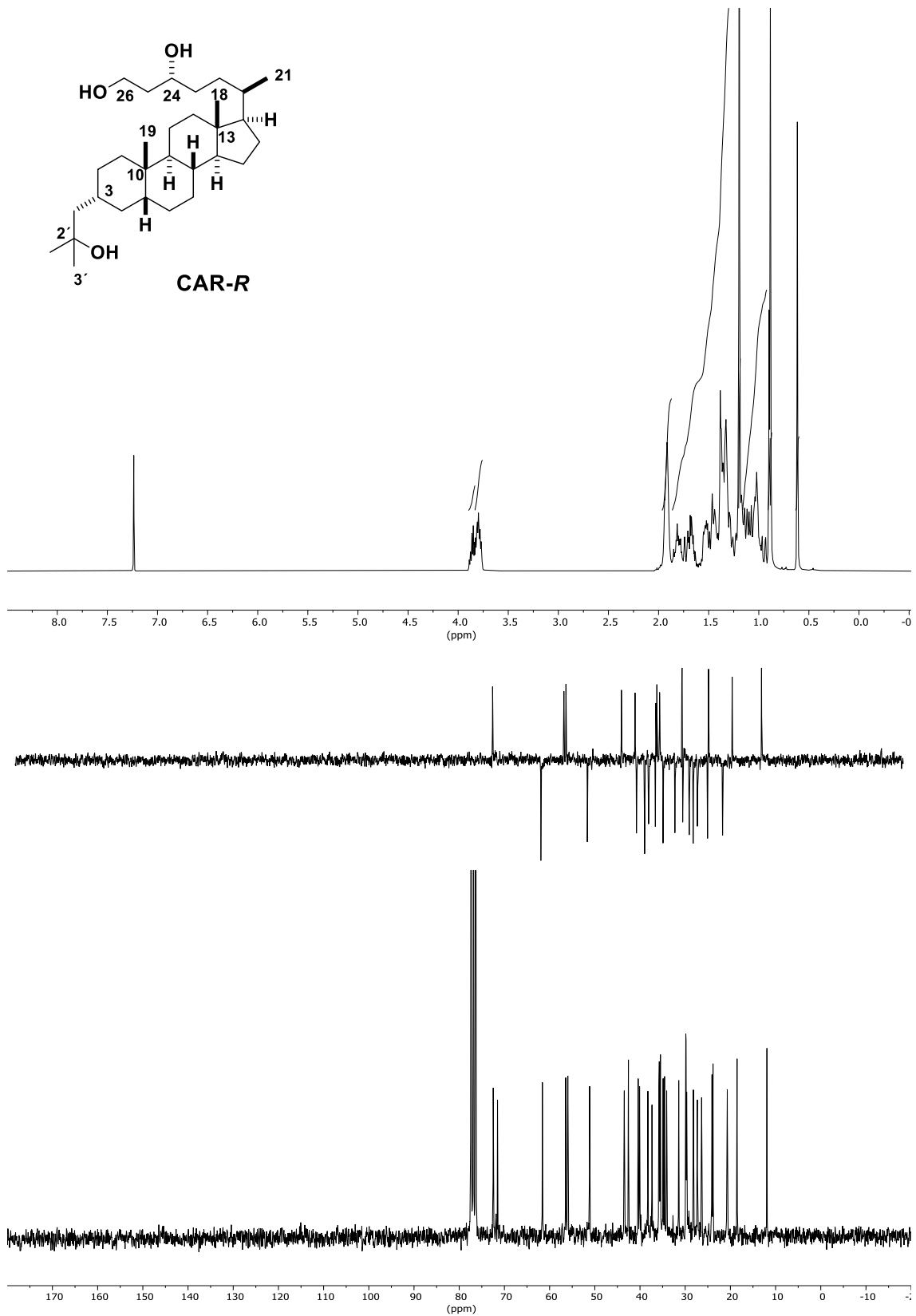
¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 140.6 (C, Si-Ar), 133.3 (CH, C-Ar), 128.9 (CH, C-Ar), 127.5 (CH, C-Ar), 75.2 (C, C-2'), 73.1 (CH, C-24), 61.9 (CH₂, C-26), 56.6 (CH), 56.0 (CH), 52.2 (CH₂), 43.7 (CH), 42.7 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.2 (CH₂), 38.1 (CH₂), 37.6 (CH₂), 35.9 (CH₂), 35.8 (CH), 35.7 (CH), 35.1 (CH), 34.7 (C, C-10), 34.3 (CH₂), 31.6 (CH₂), 30.7 (CH₃, C-3'), 30.4 (CH₃, C-3'), 29.9 (CH₂), 28.3 (CH₂), 27.5 (CH₂), 26.5 (CH₂), 24.2 (CH₂), 24.0 (CH₃, C-21), 20.8 (CH₂), 18.7 (CH₃, C-18), 12.0 (CH₃, C-19), 1.5 (CH₃, Si x -CH₃).

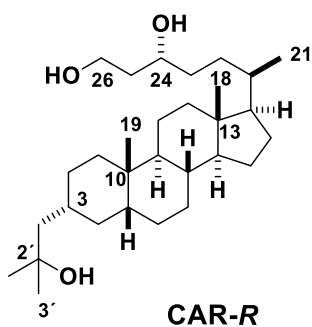




¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (m, 2H, H-Ar), 7.34 (m, 3H, H-Ar), 3.86 (m, 1H, H-24), 3.79 (m, 2H, H-26), 1.20 (s, 6H, H-3'), 0.90 (s, 3H, H-21), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.62 (s, 3H, H-19), 0.30 (s, 6H, Si x CH₃).

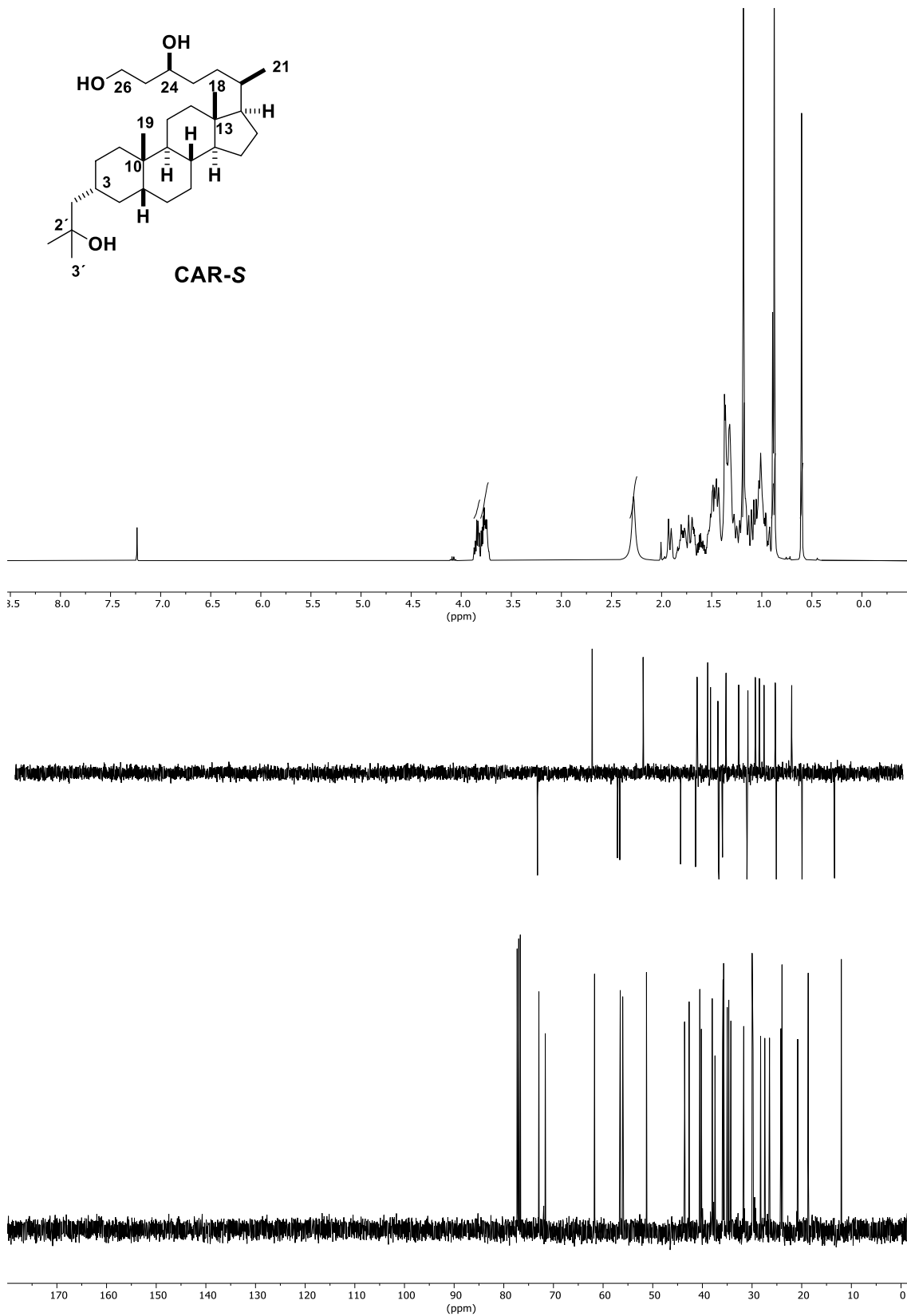
¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 139.7 (C, Si-Ar), 132.9 (CH, C-Ar), 129.2 (CH, C-Ar), 127.6 (CH, C-Ar), 72.7 (CH, C-24), 71.6 (C, C-2'), 61.8 (CH₂, C-26), 56.5 (CH), 56.0 (CH), 51.2 (CH₂), 43.5 (CH), 42.6 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.2 (CH₂), 38.3 (CH₂), 37.4 (CH₂), 35.9 (CH₂), 35.8 (CH), 35.6 (CH), 34.9 (CH), 34.7 (C, C-10), 34.2 (CH₂), 31.5 (CH₂), 30.0 (CH₃, C-3'), 29.9 (CH₃, C-3'), 29.8 (CH₂), 28.3 (CH₂), 27.4 (CH₂), 26.4 (CH₂), 24.2 (CH₂), 23.9 (CH₃, C-21), 20.8 (CH₂), 18.6 (CH₃, C-18), 12.0 (CH₃, C-19), 0.84 (CH₃, Si x CH₃).

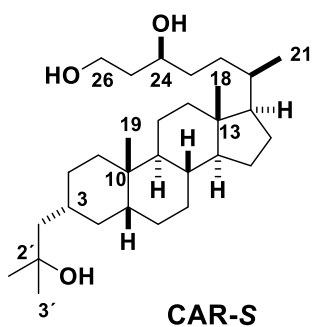




¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 3.86 (m, 1H, H-24), 3.80 (m, 2H, H-26), 1.20 (s, 6H, H-3'), 0.90 (s, 3H, H-21), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.62 (s, 3H, H-19).

¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 72.5 (CH, H-24), 71.5 (C, C-2'), 61.6 (CH₂, H-26), 56.4 (CH), 56.0 (CH), 51.2 (CH₂), 43.5 (CH), 42.6 (C, C-13), 40.4 (CH), 40.1 (CH₂), 38.3 (CH₂), 37.4 (CH₂), 35.8 (CH₂), 35.7 (CH), 35.5 (CH), 34.8 (CH), 34.6 (C, C-10), 34.1 (CH₂), 31.4 (CH₂), 29.8 (CH₃, C-3'), 29.8 (CH₃, C-3'), 29.7 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.3 (CH₂), 26.4 (CH₂), 24.0 (CH₂), 23.8 (CH₃, C-21), 20.6 (CH₂), 18.5 (CH₃, C-18), 11.9 (CH₃, C-19).





¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 3.85 (m, 1H, H-24), 3.77 (m, 2H, H-26), 1.18 (s, 6H, H-3'), 0.89 (s, 3H, H-21), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.60 (s, 3H, H-19).

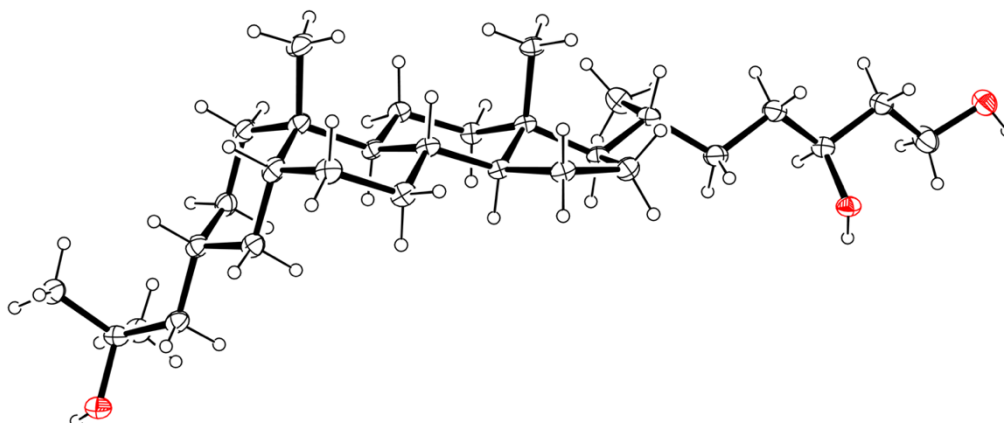
¹³C-RMN (CDCl₃, 63 MHz) δ 72.9 (CH, C-24), 71.6 (C, C-2'), 61.7 (CH₂, C-26), 56.5 (CH), 56.0 (CH), 51.2 (CH₂), 43.5 (CH), 42.6 (C, C-13), 40.5 (CH), 40.2 (CH₂), 38.0 (CH₂), 37.4 (CH₂), 35.9 (CH₂), 35.8 (CH), 35.7 (CH), 34.9 (CH), 34.6 (C, C-10), 34.2 (CH₂), 31.6 (CH₂), 29.9 (CH₃, C-3'), 29.9 (CH₃, C-3'), 29.7 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.4 (CH₂), 26.4 (CH₂), 24.1 (CH₂), 23.9 (CH₃, C-21), 20.8 (CH₂), 18.6 (CH₃, C-18), 12.0 (CH₃, C-19).

ESPECTROS PARTE 2. (VER PÁGINA 58).

ANEXO II

Difracción de Rayos-X

CAR-S

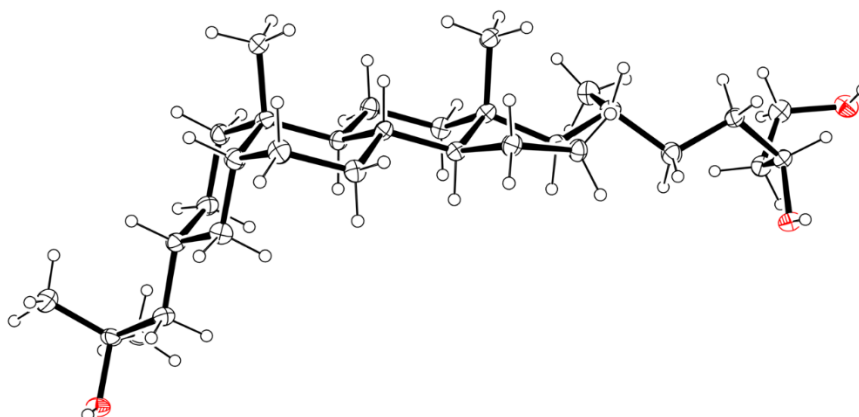


Crystal data and structure refinement for **CAR-S**.

Identification code	shelx	
Empirical formula	C ₃₀ H ₅₄ O ₃	
Formula weight	462.73	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P 21 21 21	
Unit cell dimensions	a = 6.5904(2) Å	a = 90°.
	b = 20.4754(9) Å	b = 90°.
	c = 20.7187(9) Å	g = 90°.
Volume	2795.80(19) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.099 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.521 mm ⁻¹	
F(000)	1032	
Crystal size	0.260 x 0.050 x 0.020 mm ³	
Theta range for data collection	3.034 to 77.355°.	
Index ranges	-8<=h<=8, -25<=k<=25, -26<=l<=26	
Reflections collected	66959	

Independent reflections	5944 [R(int) = 0.0786]
Completeness to theta = 67.679°	100.0 %
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.9582 and 0.8494
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	5944 / 0 / 315
Goodness-of-fit on F ²	1.063
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0431, wR2 = 0.1069
R indices (all data)	R1 = 0.0495, wR2 = 0.1106
Absolute structure parameter	0.37(11)
Extinction coefficient	n/a
Largest diff. peak and hole	0.221 and -0.168 e.Å ⁻³

CAR-R



Crystal data and structure refinement for **CAR-R**.

Identification code	shelx
Empirical formula	C30 H54 O3
Formula weight	462.73
Temperature	100(2) K
Wavelength	1.54178 Å
Crystal system	Orthorhombic

Anexo II. Rayos-X

Space group	P 21 21 21	
Unit cell dimensions	a = 6.5778(5) Å	$\alpha = 90^\circ$.
	b = 18.3581(15) Å	$\beta = 90^\circ$.
	c = 22.2904(18) Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume	2691.7(4) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.142 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.542 mm ⁻¹	
F(000)	1032	
Crystal size	0.450 x 0.020 x 0.020 mm ³	
Theta range for data collection	3.118 to 74.448°.	
Index ranges	-5<=h<=8, -22<=k<=22, -27<=l<=27	
Reflections collected	35525	
Independent reflections	5492 [R(int) = 0.1690]	
Completeness to theta = 67.679°	100.0 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.9582 and 0.8494	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	5492 / 0 / 306	
Goodness-of-fit on F ²	1.073	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0733, wR2 = 0.1505	
R indices (all data)	R1 = 0.1009, wR2 = 0.1618	
Absolute structure parameter	0.0(3)	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.204 and -0.225 e.Å ⁻³	

Data collection and refinement statistics of VDR complexes.

	zVDR LBD / CAR-R	zVDR LBD / CAR-S
PDB ID	7OXZ	7OY4
Data Collection and processing statistics		
Beamline	Proxima 2A	Proxima 2A
Wavelength (Å)	0.98	0.98
Space group	P6 ₅ 22	P6 ₅ 22
Unit cell parameters (Å, °)	a=b=66.38, c=263.19 α=β=90, γ=120	a=b=66.49, c=263.85 α=β=90, γ=120
Resolution (Å)	43.29-2.2 (2.28-2.2)	38.9-2.0 (2.07-2.0)
Total reflections	29620 (916)	41578 (1912)
Unique reflections	14810 (458)	20789 (956)
Multiplicity	2.0 (2.0)	2.0 (2.0)
I/σ(I)	21.06 (1.44)	23.07 (2.78)
Completeness	80.18 (25.24)	84.95 (40.30)
Wilson B-factor	46.54	29.11
R _{meas}	0.032 (0.61)	0.038 (0.45)
CC _{1/2}	1 (0.82)	0.999 (0.2)
Refinement		
Reflections used in refinement	14796	20784
Reflections used for R-free	1480	955
R _{work} / R _{free}	0.1967 / 0.2534	0.1955 / 0.238
R.M.S.D. Bond lengths (Å)	0.007	0.008
R.M.S.D. Bond angles (°)	0.97	0.99
Ramachandran		
Outliers (%)	0	0
Favored (%)	97.52	98.35
Mean B factor (Å ²)		
Protein	53.89	38.31
Ligand	39.29	23.54

ANEXO III.
Publicación y permisos

Bioorganic Chemistry Paper

Design, synthesis and evaluation of side-chain hydroxylated derivatives of lithocholic acid as potent agonists of the vitamin D receptor (VDR). *Bioorg. Chem.* **2021**, *115*, 105202 **IF**: 5.307 **Año de publicación**: 2021

Author rights

The below table explains the rights that authors have when they publish with Elsevier, for authors who choose to publish either open access or subscription. These apply to the corresponding author and all co-authors.

Author rights in Elsevier's proprietary journals	Published open access	Published subscription
1. Use and share their works for scholarly purposes (with full acknowledgement of the original article): 1. In their own classroom teaching. Electronic and physical distribution of copies is permitted 2. If an author is speaking at a conference, they can present the article and distribute copies to the attendees 3. Distribute the article, including by email, to their students and to research colleagues who they know for their personal use 4. Share and publicize the article via Share Links, which offers 50 days' free access for anyone, without signup or registration 5. Include in a thesis or dissertation (provided this is not published commercially)	✓	✓

PARTICIPACIÓN Y FUNCIÓN COAUTORES

Carmen M. González (carmenmariagonza@gmail.com): Codirección del trabajo

Sunil Gaikwad (sunilunipune2012@gmail.com): Docking general de análogos del ácido litocólico.

Gonzalo Lasanta (sunil.gaikwad@uniba.sk): Síntesis de los análogos del ácido litocólico funcionalizados en el anillo A y en la cadena lateral. Nuevas estrategias de síntesis de análogos del ácido litocólico con cadena lateral ciclohexánica dihidroxilada.

Julian Loureiro (julian.loureiro@rai.usc.es): Docking general

Niclas Nilsson (NNIDK@leo-pharma.com): Ensayos biológicos en la compañía farmacéutica (LEO-Dinamarca).

Carole Peluso-Iltis (caro@igbmc.fr): Cristalización y Rayos X complejo ligando-VDR

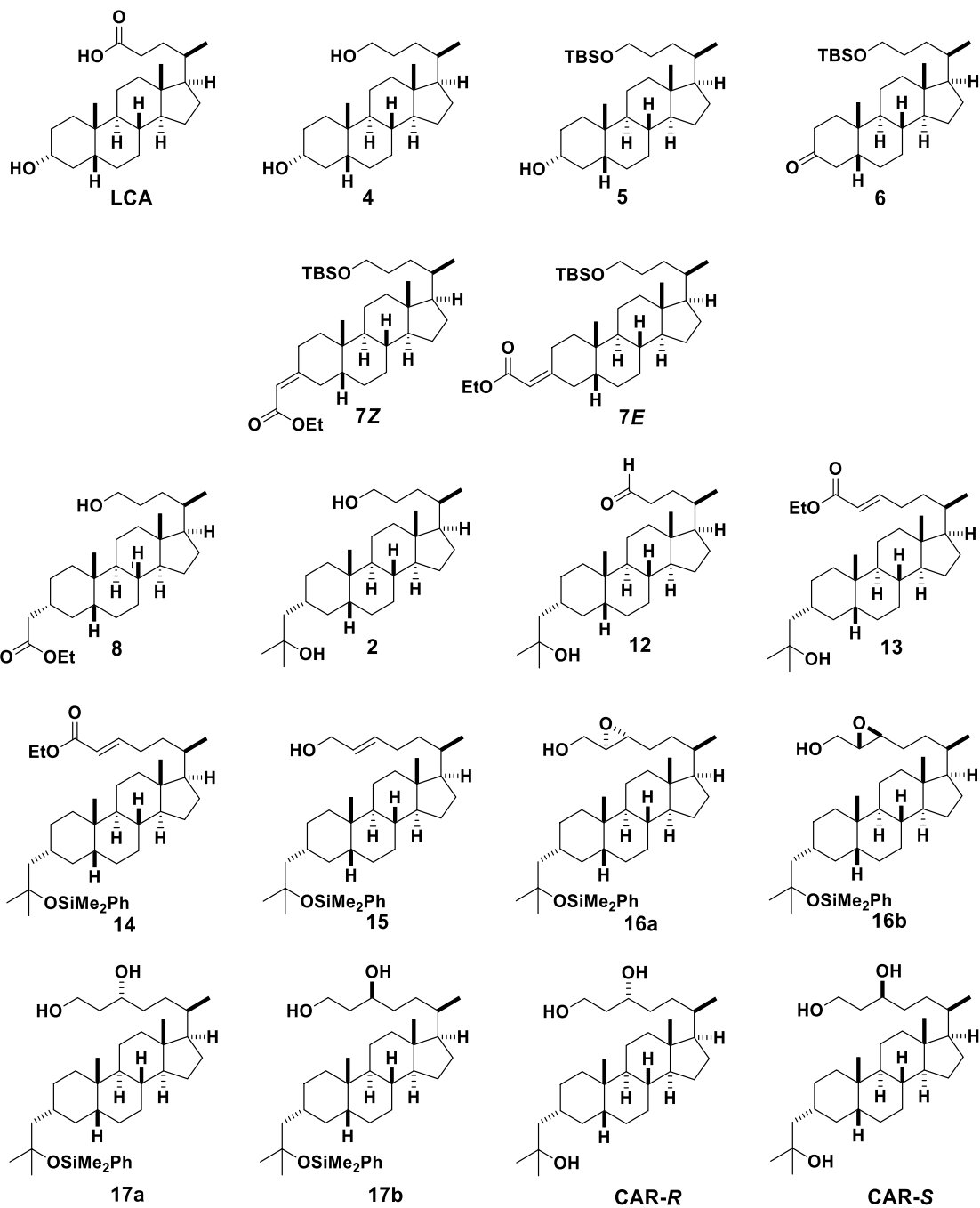
Natacha Rochel (rochel@igbmc.fr): Dirección. Cristalización y Rayos X complejo ligando-VDR

Antonio Mouriño (antonio.mourino@usc.es): Dirección del trabajo



ANEXO IV.
Índice de estructuras

RESULTADOS PARTE I



RESULTADOS PARTE II
(VER PÁGINA 58)

ANEXO V.
Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R.M. Evans. Steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. **1988**, *240*, 889–895.
- [2] G. Jones, S.A. Strugnell, H.F. DeLuca. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 1193–1231.
- [3] M.R. Haussler, G.K. Whitfield, I. Kaneko, C.A. Haussler, D. Hsieh, J.-C. Hsieh, P. W. Jurutka. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif. Tissue Int.* **2013**, *92*, 77–98.
- [4] Vitamin D (D. Feldman, J.W. Pike, J.S. Adams). Third edition. Two-Volume Set, Elsevier, *Academic Press*, New York, **2011**.
- [5] S. Li, J. De La Cruz, S. Hutchens, S. Mukhopadhyay, Z.K. Criss, R. Aita, O. Pellon- Cardenas, J. Hur, P. Soteropoulos, S. Husain, P. Dhawan, L. Verlinden, G. Carmeliet, J.C. Fleet, N.F. Shroyer, M.P. Verzi, S. Christakos. Analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ genomic action reveals calcium-regulating and calcium-independent effects in mouse intestine and human enteroids, *Mol. Cell Biol.* **2020**, *41*, e00372–e00420.
- [6] S.V. Ramagopalan, A. Heger, A.J. Berlanga, N.J. Maugeri, M.R. Lincoln, A. Burrell, L. Handunnetthi, A.E. Handel, G. Disanto, S.-M. Orton, C.T. Watson, J.M. Morahan, G. Giovannoni, C.P. Ponting, G.C. Ebers, J.C. Knight. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res.* **2010**, *20*, 1352–1360.
- [7] F. Pereira, M.J. Larriba, A. Muñoz. Vitamin D and colon cancer. *Endocrine-Related Cancer.* **2012**, *19*, R51–R71.
- [8] M.A. Maestro, F. Molnar, C. Carlberg. Vitamin D and its synthetic analogs. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 6854–6875.
- [9] J. Chen, Z. Tang, A.T. Slominski, W. Li, M.A. Zmijewski, Y. Liu, J. Chen. Vitamin D and its analogs as anticancer and anti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *207*, 112738.
- [10] A. Lori, L.A. Plum, H.F. DeLuca. Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nat. Drug Discov.* **2010**, *9*, 941–955.
- [11] C. Leysseers, L. Verlinden, M. Verstuyf. The future of vitamin D analogs. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 1–18.
- [12] M.J. Calverly. Synthesis of MC 903, a biologically active vitamin D metabolite. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4609–4619.
- [13] R.K. Jain, D.L. Trump, M.J. Egorin, M. Fernandez, C.S. Johnson, R.K. Ramanathan. A phase I study of the vitamin D₃ analogue ILX23-7553 administered orally to patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* **2011**, *29*, 1420–1425.
- [14] R. Sigüeiro, M.A. Maestro, A. Mourino. Synthesis of side-chain locked analogs of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ bearing a C₁₇ methyl group. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 2641–2644.
- [15] P. Gogoi, S. Seoane, R. Sigüeiro, T. Guiberteau, M.A. Maestro, R. Pérez-Fernández, N. Rochel, A. Mourino. Aromatic-based design of highly active and noncalcemic vitamin D receptor agonists. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 4928–4937.
- [16] A. Glebocka, G. Chiellini. A-Ring analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *523*, 48–

- [17] L. Verlinden, A. Verstuyf, M. Van Camp, S. Marcelis, K. Sabbe, X.-Y. Zhao, P. De Clercq, M. Vandewalle, R. Bouillon. Two novel 14-epi-analogues of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibit the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2673–2679.
- [18] K. Ono, A. Yoshida, N. Saito, T. Fujishima, S. Honzawa, Y. Suhara, S. Kishimoto, T. Sugiura, K.W. Aku, H.T. Takayama, A. Kittaka. Efficient synthesis of 2-modified 1 α ,25-dihydroxy-19-norvitamin D₃ with Julia olefination: high potency in induction of differentiation on HL-60 cells. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7407–7415.
- [19] S. Yamada, M. Makishima. Structure–activity relationship of nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 324–337.
- [20] A.Y. Belorusova, N. Rochel. Structural studies of vitamin D nuclear receptor ligand- binding properties. *Vitam. Horm.* **2016**, *100*, 83–116.
- [21] M.F. Boehml, P. Fitzgerald, A. Zou, M.G. Elgort, E.D. Bischoff, L. Mere, D.E. Mais, R.P. Bissonnette, R.A. Heyman, A.M. Nadzanl, M. Reichman, E.A. Allegretto. Novel nonsecosteroidal vitamin D mimics exert VDR-modulating activities with less calcium mobilization than 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 265–275.
- [22] F. Ciesielski, Y. Sato, Y. Chebaro, D. Moras, A. Dejaegere, N. Rochel. Structural basis for the accommodation of bis- and tris-aromatic derivatives in the vitamin D nuclear receptor. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8440–8449.
- [23] S. Fujii, R. Sekine, A. Kano, H. Masuno, S. Songkram, E. Kawachi, T. Hirano, A. Tanatani, H. Kagechika. Structural development of *p*-carborane-based potent non-secosteroidal vitamin D analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5891–5901.
- [24] A.T. Slominski, T.K. Kim, W. Li, A. Postlethwaite, E.W. Tieu, E.K.Y. Tang, R.C. Tuckey. Detection of novel CYP11A1-derived secosteroids in the human epidermis and serum and pig adrenal gland. *Sci. Rep.* **2016**, *5*, 14875.
- [25] M. I. Ahmad, R.R. Raghuvanshi, S. Singh, A.A. Johan, R. Prakash, K.S. Nainawat, D. Singh, S. Tripathi, A. Sharma, A. Gupta. Design and synthesis of 3-arylbenzopyran based non-steroidal vitamin-D₃ mimics as osteogenic agents. *Med. Chem. Commun.* **2016**, *7*, 2381–2394.
- [26] A.M. Vertino, C.M. Bula, J.-R. Chen, M. Almeida, L. Han, T. Bellido, S. Kousteni, A.W. Norman, S.C. Manolagas. Nongenotropic, anti-apoptotic signaling of 1 α ,25-(OH)₂-vitamin D₃ and analogs through the ligand binding domain of the vitamin D receptor in osteoblasts and osteocytes. *Chem. Biol.* **2005**, *280*, 14130–14137.
- [27] F. Chen, Q. Su, M. Torrent, N. Wei, N. Peekhaus, D. McMasters, J. Fisher, H. Glantschnig, P. Hodor, O. Flores, A. Reszka. Identification and characterization of a novel non-secosteroidal vitamin D receptor ligand. *Drug Dev. Res.* **2007**, *68*, 51–60.
- [28] D.W. Russell. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 137–174.
- [29] S. Fiorucci, M. Biagioli, A. Zampella, and E. Distrutti. Bile acids activated receptors regulate innate immunity. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1853.
- [30] J.A. Nehring, C. Zierold, H.F. DeLuca. Lithocholic acid can carry out in vivo functions of vitamin D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 10006–10009.

- [31] A.Y. Belorusova, J. Eberhardt, N. Potier, R.H. Stote, A. Dejaegere, N. Rochel. Structural insights into the molecular mechanism of vitamin D receptor activation by lithocholic acid involving a new mode of ligand recognition. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4710–4719.
- [32] A.M. Marchionatti, A. Perez, M.A. Rivoira, V.A. Rodríguez, N.G. Tolosa de Talamoni. Lithocholic acid: a new emergent protector of intestinal calcium absorption under oxidant conditions. *Biochem. Cell Biol.* **2017**, *95*, 273–279.
- [33] M. Ishizawa, D. Akagi, M. Makishima. Lithocholic acid is a vitamin D receptor ligand that acts preferentially in the ileum. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1975.
- [34] L. Zhang. The effect of lithocholic acid on the gut liver axis. *Frontiers in pharmacology*, review July **2022**, *13*, 910493.
- [35] J.A. Nehring, C. Zierold, H.F. DeLuca. Lithocholic acid can carry out in vivo function of vitamin D, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 10006-10009.
- [36] T.W.H. Pols, T. Puchner, H.I. Korkmaz, M.Vos, R. Soetas, C.J.M. de Vries. Lithocholic acid controls adaptive immune responses by inhibition of Th1 activation through the vitamin D receptor. *Plos One.* **2017**, *12*, 1-16.
- [37] L. Wang, Y. Liu, L. Wu, X.L. Sun. Sialyltransferase inhibition and recent advances. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.* **2016**, *1864*, issue 1, 143-153.
- [38] J. Fu, M. Yu, W. Xu, S. Yu. Research progress of bile acids in cancer. *Front Oncol.* **2021**, *11*, 778258.
- [39] P.G.G. Do Nascimento, T.L.G. Lemos, M.C.S. Almeida, J.M.O. De Souza, A.M.C. Bizerra, G.M.P. Santiago, J.G.M. Da Costa, H.D.M. Coutinho. Lithocholic acid and derivatives: antibacterial activity. *Steroids.* **2015**, *104*, 8-15.
- [40] X.L. He, Y. Xing, X.Z. Gu, J. X. Xiao, Y.Y. Wang, Z. Yi, W.W. Qiu. The synthesis and antitumor activity of lithocholic acid and its derivatives. *Steroids.* **2017**, *125*, 54-60.
- [41] X. Chen, A. Varki. Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS Chem.Biol.* **2010**, *5*, 163–176.
- [42] L.L. Lairson, B. Henrissat, G.J. Davies, S.G. Withers. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 521–555.
- [43] M. D. Burkart, S.P. Vincent, A. Düffels, B.W. Murray, S.V. Ley, C.H. Wong. Chemo-enzymatic synthesis of fluorinated sugar nucleotide: useful mechanistic probes for glycosyltransferases. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1937–1946.
- [44] X. Wang, L.H. Zhang, X.S. Ye. Recent development in the design of sialyltransferase inhibitors. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 32–47.
- [45] K.-H. Jung, R. Schwörer, R.R. Schmidt. Sialyltransferase inhibitors. *Trends. GlycosciGlycotechnol.* **2003**, *15*, 275–289.
- [46] I. Masayuki, W. Katsuhiko, Y. Hideya, H. Hironobu. Synthesis of bisubstrate and donor analogues of sialyltransferase and their inhibitory activities. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8817–8824.

- [47] R. Kumar, R. Nasi, M. Bhasin, N.H. Khieu, M. Hsieh, M. Gilbert, H. Jarrell, W. Zou, H.J. Jennings. Sialyltransferase inhibitors: consideration of molecular shape and charge/hydrophobic interactions. *Carbohydr. Res.* **2013**, *378*, 45–55.
- [48] S. Danielle, S. Ralf, H. Tobias, R.R. Schmidt. Asymmetric synthesis, and affinity of potent sialyltransferase inhibitors based on transition-state analogs. *Glycoconjugate J.* **2004**, *21*, 205–219.
- [49] M. Bini, R.R. Schmidt. Potential sialyltransferase inhibitors based on neuraminyl substitution by heteroaryl rings. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 558–566.
- [50] L. Lee, K.H. Chang, F. Valiyev, H.J. Liu, W.S. Li. Synthesis and biological evaluation of 5'-triazole nucleosides. *J. Chin. Chem. Soc.* **2006**, *53*, 1547–1555.
- [51] N. Satomi, K.V. Subbarao, H. Wang, X. Chen. Synthetic studies of new CMP-sialic acid analogs applying a novel buffer-mediated rearrangement. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8757–8760.
- [52] K. Angata, M. Fukuda. Carbohydrates of neural cell glycoproteins: structure, biosynthesis and function, in: M. Fukuda, U. Rutishauser, R.L. Schnaar (Eds.). *Neuroglycobiology*, Oxford University Press, Oxford **2005**, pp. 1–38.
- [53] R.A. Falconer, R.J. Errington, S.D. Shnyder, P.J. Smith, L.H. Patterson. Polysialyltransferase: a new target in metastatic cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* **2012**, *12*, 925–939.
- [54] T. Miyazaki, K. Angata, P.H. Seeberger, O. Hindsgaul, M. Fukuda. CMP substitutions preferentially inhibit polysialic acid synthesis. *Glycobiology.* **2008**, *18*, 187–194.
- [55] K.B. Wlasichuk, M. Kashem, P.V. Nikrad, P. Bird, C. Jiang, A.P. Venot. Determination of the specificities of rat liver Gal (α -4) GlcNAc α 2,6-sialyltransferase and Gal (α -3/4) GlcNAc α 2,3-sialyltransferase using synthetic modified acceptors, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 13971–13977.
- [56] F.M. Perron-Sierra, M. Burbridge, C. Pean, G.C. Tucker, P. Casara. Synthesis of a novel dioxan sialic acid analog. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4163–4166.
- [57] M.C. Galan, A.P. Venot, G.J. Boons. Glycosyltransferase activity can be modulated by small conformational changes of acceptor substrates. *Biochemistry.* **2003**, *42*, 8522–8529.
- [58] J. Xia, J. Xue, R.D. Locke, E.V. Chandrasekaran, T. Srikrishnan, K.L. Matta, Synthesis of fluorinated mucin core branched oligosaccharides with the potential of novel substrates and enzyme inhibitors for glycosyltransferases and sulfotransferases. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3696–3706.
- [59] X. Niu, X. Fan, J. Sun, P. Ting, S. Narula, D. Lundell. Inhibition of fucosyltransferase VII by gallic acid and its derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *425*, 51–57.
- [60] C.D. Rillahan, S.J. Brown, A.C. Register, H. Rosen, J.C. Paulson. High-throughput screening for inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12534–12537.
- [61] K.I.P.J. Hidari, K. Oyama, G. Ito, M. Nakayama, M. Inai, S. Goto, Y. Kanai, K. Watanabe, K. Yoshida, T. Furuta. Identification and characterization of flavonoids as sialyltransferase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *382*, 609–613.
- [62] Y. Hirooka, M. Nitta, T. Furuta, T. Kan. Efficient Synthesis of Optically Active Gallocatechin-3-gallate Derivatives via 6-endo-Cyclization. *Synlett.* **2008**, 3234–3238.

- [63] C.D. Rillahan, A. Antonopoulos, C.T. Lefort, R. Sonon, P. Azadi, K. Ley, A. Dell, S.M. Haslam, J.C. Paulson. Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 661–668.
- [64] R. Kumar, R. Nasi, M. Bhasin, N.H. Khieu, M. Hsieh, M. Gilbert, H. Jarrell, W. Zou, H.J. Jennings. Sialyltransferase inhibitors: consideration of molecular shape and charge/hydrophobic interactions, *Carbohydr. Res.* **2013**, *378*, 45–55.
- [65] K.H. Chang, L. Lee, J. Chen, W. Li. Lithocholic acid analogues, new and potent α -2,3- sialyltransferase inhibitors. *Chem. Commun.* **2006**, *6*, 629–631.
- [66] J. Chen, Y. Tang, S. Huang, H. Juan, L.Wu, Y. Sun, S. Wang, K. Wu, G. Balraj, T. Chang. A novel sialyltransferase inhibitor suppresses FAK/paxillin signaling and cancer angiogenesis and metastasis pathways. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 473–483.
- [67] C.H. Chiang, C.H. Wang, H.C. Chang, V.M. Shivaji, W.S. Li, W. Hung. A novel sialyltransferase inhibitor AL10 suppresses invasion and metastasis of lung cancer cells by inhibiting integrin-mediated signaling. *J. Cell. Physiol.* **2010**, *223*, 492–499.
- [68] S.J.L.P. Perez, C.-W. Fu, W.-S. Li. Sialyltransferase inhibitors for the treatment of cancer metastasis: current challenges and future perspectives. *Molecules.* **2021**, *26*, 5673.
- [69] H.H.M. Adbu-Allah, T.T. Chang, W.S. Li. Synthesis of B- and C-ring-modified lithocholic acid analogues as potential sialyltransferase inhibitors. *Steroids.* **2016**, *112*, 54–61.
- [70] P. Kovács, T. Csonka, T. Kovács, Z Gyula Ujlaki, A. Sipos, Z. Karányi, D. Sze, C. Heged, K. Uray, L.Jankó, M. Kiss, B. Kiss, D. Laoui, L. Virág, G. Méhes, P. Bai, E. Mikó. Lithocholic Acid, a Metabolite of the Microbiome, Increases Oxidative Stress in Breast Cancer. *Cancers.* **2019**, *11*, 1255.
- [71] M. Hu, S. Peng, Y. He, M. Qin, X. Cong, Y. Xing, M. Liu, Z. Yi. Lycorine is a novel inhibitor of the growth and metastasis of hormone-refractory prostate cancer. *Oncotarget.* **2015**, *6*, *17*, 15348–15361.
- [72] I.I. Popadyuk, A.V. Markov, O.V. Salomatina, E.B. Logashenko, A.V. Shernyukov, M.A. Zenkova, N.F. Salakhutdinov. Synthesis and biological activity of novel deoxycholic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, *15*, 5022–5034.
- [73] Q. Du, Y. Zhang, Y. Pan, T. Duan. Lithocholic acid-induced placental tumor necrosis factor- α upregulation and syncytiotrophoblast cell apoptosis in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Hepatology Research*, **2014**, *44*, 532–541.
- [74] Y. Liu, S. Zhang, W. Zhou, D. Hu, H. Xu and G. Ji. Secondary Bile Acids and Tumorigenesis in Colorectal Cancer. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 813745.
- [75] Z. Wang, X. Qiang, Y. Peng, Y. Wang, Q. Zhao, D. He. Design and synthesis of bile acid derivatives and their activity against colon cancer. *RSC Med. Chem.* **2022**, *13*, 1391-1409.
- [76] K. Nicolson, G. Evans, P.W. Otoole, Potentiation of methicillin. Activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiol. Lett.* **1999**, *179*, 233–239.
- [77] T. Köhler, J.C. Pechère, P. Plésiat. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *Cell. Assoc. Mol. Life Sci.* **1999**, *56*, 771–778.

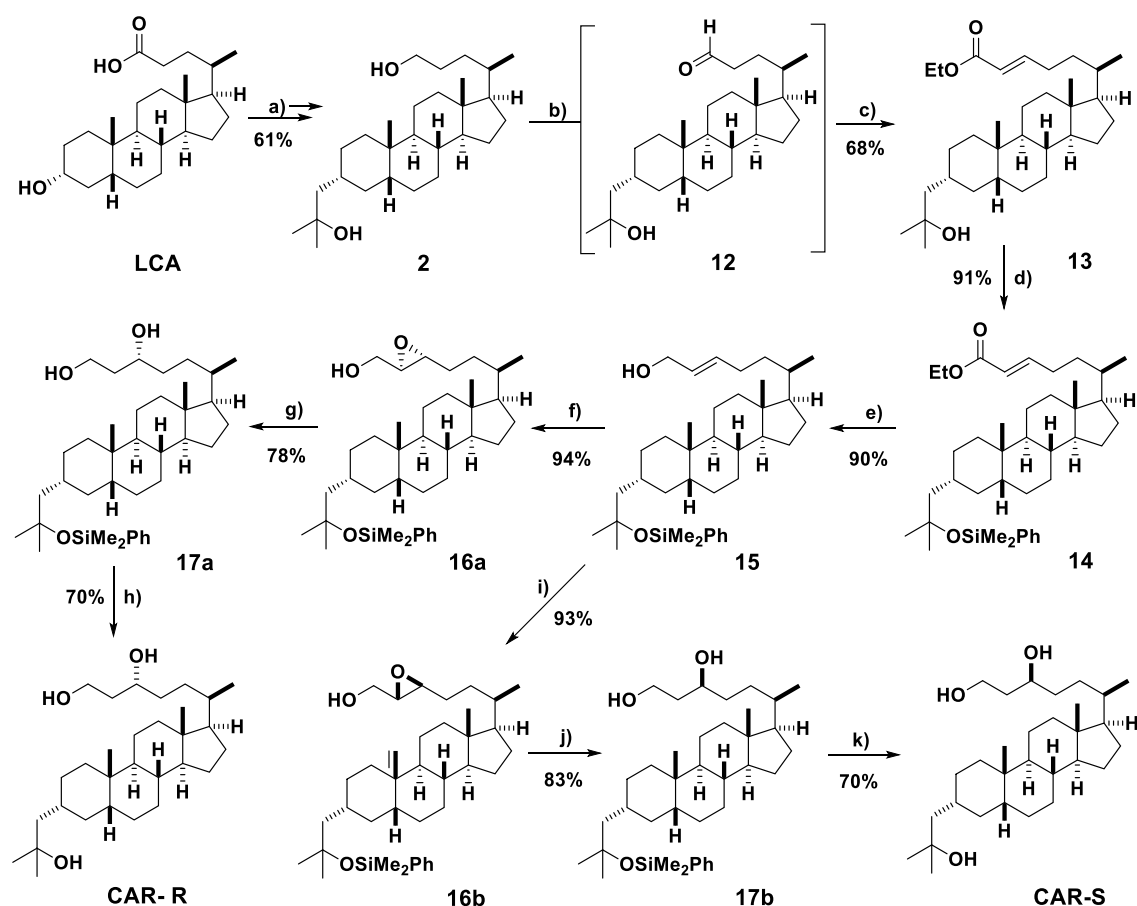
- [78] S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review, *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223–253.
- [79] A. Nostro, A.R. Blanco, M.A. Cannatelli, V. Enea, G. Flamini, I. Morelli, A.S. Roccaro, V. Alonzo. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol, *FEMS. Microbiol. Lett.* **2004**, *230*, 191–195.
- [80] J.R. Knowles, S. Roller, D.B. Murray, A.S. Naidu. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 797–803.
- [81] J.S. Armstrong. Mitochondria: a target for cancer therapy. *Brit. J. Pharmacol.* **2006**, *147*, 239–248.
- [82] A.Y. Belorusova, N. Rochel. Vitamin D (four edition), chapter 11- Structural basis for ligand activity in vitamin D receptor. **2018**, *1*, 189-209.
- [83] A.Y. Belorusova, J. Eberhardt, N. Potier, R.H. Stote, A. Dejaegere, N. Rochel Structural Insights into the Molecular Mechanism of Vitamin D Receptor Activation by Lithocholic Acid Involving a New Mode of Ligand Recognition. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4710–4719.
- [84] R. Adachi, Y. Honma, H. Masuno, K. Kawana, I. Shimomura, S. Yamada, M. Makishima. Selective Activation of Vitamin D Receptor by Lithocholic Acid Acetate, a Bile Acid Derivative. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 46–57.
- [85] M. Ishizawa, M. Matsunawa, R. Adachi, S. Uno, K. Ikeda, H. Masuno, M. Shimizu, K. Iwasaki, S. Yamada, M. Makishima. Lithocholic Acid Derivatives Act as Selective Vitamin D Receptor Modulators without Inducing Hypercalcemia. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 763–772.
- [86] H. Masuno, Y. Kazui, A. Tanatani, S. Fujii, E. Kawachi, T. Ikura, N. Ito, K. Yamamoto, H. Kagechika. Development of Novel Lithocholic Acid Derivatives as Vitamin D Receptor Agonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 3674–3681.
- [87] S. Gaikwad, C. M. González, D. Vilariño, G. Lasanta, C. Villaverde, A. Mourino, L. Verlinden, A. Verstuyf, C. Peluso-Iltis, N. Rochel, K. Berkowska, E. Marcinkowska. Lithocholic acid-based design of noncalcemic vitamin D receptor agonists. *Bioorganic Chemistry*. **2021**, *111*, 104878. [E. Marcinkowska, K. Berkowska, A. Mourino, R. Siqueiro, S. Gaikwad, Compuestos de interés farmacéutico, **ES 2-769-905 A-1**].
- [88] H. Sasaki, H. Masuno, H. Kawasaki, A. Yoshihara, N. Numoto, N. Ito-Hiroaki Ishida, K. Yamamoto, N. Hirata, Y. Kanda, E. Kawachi, H. Kagechika, A. Tanatani. Lithocholic Acid Derivatives as Potent Vitamin D Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 516–526.
- [89] C. M. González, S. Gaikwad, G. Lasanta, J. Loureiro, N. Nilsson, C. Peluso-Iltis, N. Rochel, A. Mourino. Design, synthesis and evaluation of side-chain hydroxylated derivatives of lithocholic acid as potent agonists of the vitamin D receptor (VDR) *Bioorganic Chemistry*. **2021**, *115*, 105202.
- [91] A. Valkonen, E. Sievänen, S. Ikonen, N.V. Lukashev, P.A. Donez, A.D. Averin, M. Lahtinen, E. Kolehmainen. Novel lithocholaphanes: syntheses, NMR, MS and molecular modeling studies. *J. Mol. Struct.* **2007**, *846*, 65-73.

ANEXO VI.

Resumen

RESUMEN DE LOS RESULTADOS. PARTE I

El plan sintético de los ligandos **CAR-R** y **CAR-S** se muestra a continuación. La obtención del diol **2** se llevó a cabo desde ácido litocólico **LCA**, presentando un rendimiento global del 61%^[87]. La posterior elongación de la cadena lateral del compuesto **2** hacia el alcohol alílico **15**, se llevó a cabo a través de tres pasos: oxidación, olefinación de Wittig y reducción. Los epóxidos **16a/16b**, se obtuvieron desde el alcohol **15** a través de epoxidación asimétrica de Sharpless. La protección previa del compuesto **13**, permitió determinar la pureza diastereomérica de ambos epóxidos a través de HPLC/UV.



a) Referencia **87** (61%, 6 pasos). b) TEMPO, DAIB, CH₂Cl₂, 23 °C, 4 h; c) Ph₃P=CHCO₂Et, CH₂Cl₂, 23 °C, 12 h, 68 %, (dos pasos). d) Me₂PhSiCl, imidazol, DMF, 23 °C, 2 h, 91%. e) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -78 °C, 30 min, 90%. f) 4 Å MS, CH₂Cl₂, -25 °C, (-)-DIPT, Ti(O*i*-Pr)₄, 30 min; TBHP, -25 °C, 4 h, 94%. g) Red-Al[®], THF, 23 °C, 3 h, 78%. h) TBAF, THF, 23 °C, 12 h, 70%. i) (+)-DIPT, Ti(O*i*-Pr)₄, 30 min; TBHP, -25 °C, 4 h; 93%. j) Red-Al[®], THF, 23 °C, 3 h, 83%. k) TBAF, THF, 23 °C, 12 h, 70%.

La reducción dirigida desde el hidroxilo de la cadena lateral de ambos epóxidos generó los dioles **17a** y **17b**. La posterior desprotección de los anteriores compuestos proporcionó los nuevos análogos superagonistas del receptor VDR: **CAR-R** y **CAR-S** [89]. Tras publicar los resultados biológicos que presentan estos análogos dihidroxilados, se planteó el diseño y la estrategia sintética de nuevos agonistas derivados de ácido litocólico enfocados a presentar similar o mayor porcentaje de afinidad al receptor del VDR frente a los análogos **CAR-R** y **CAR-S**.

[87] S. Gaikwad, C. M. González, D. Vilariño, G. Lasanta, C. Villaverde, A. Mourino, L. Verlinden, A. Verstuyf, C. Peluso-Iltis, N. Rochel, K. Berkowska, E. Marcinkowska. Lithocholic acid-based design of noncalcemic vitamin D receptor agonists. *Bioorganic Chemistry*, 111, **2021**, 104878.

[89] C. M. González, S. Gaikwad, G. Lasanta, J. Loureiro, N. Nilsson, C. Peluso-Iltis, N. Rochel, A. Mourino. Design, synthesis and evaluation of side-chain hydroxylated derivatives of lithocholic acid as potent agonists of the vitamin D receptor (VDR) *Bioorganic Chemistry*, 115, **2021**, 105202.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS. PARTE II

(ver página 58)



Se han diseñado por docking y sintetizado los compuestos CAR-R y CAR-S que se comportan como potentes agonistas del ácido litocólico de potencial interés terapéutico para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas. Los análogos CAR-R y CAR-S se sintetizaron en 13 pasos a partir del ácido litocólico y rendimientos globales del 17% y 18%, respectivamente.

Posteriormente, se han estudiado tres estrategias de síntesis distintas para acceder a cadenas laterales ciclohexánicas dihidroxiladas de análogos modificados en el anillo A del ácido litocólico. La ruta sintética que se basa en la transposición de diaceno conduce con éxito a las cadenas propuestas. Posteriormente, se han descrito dos rutas sintéticas del diol 31a, precursor de los análogos GLD y GLS diseñados por docking, a partir del ácido litocólico.