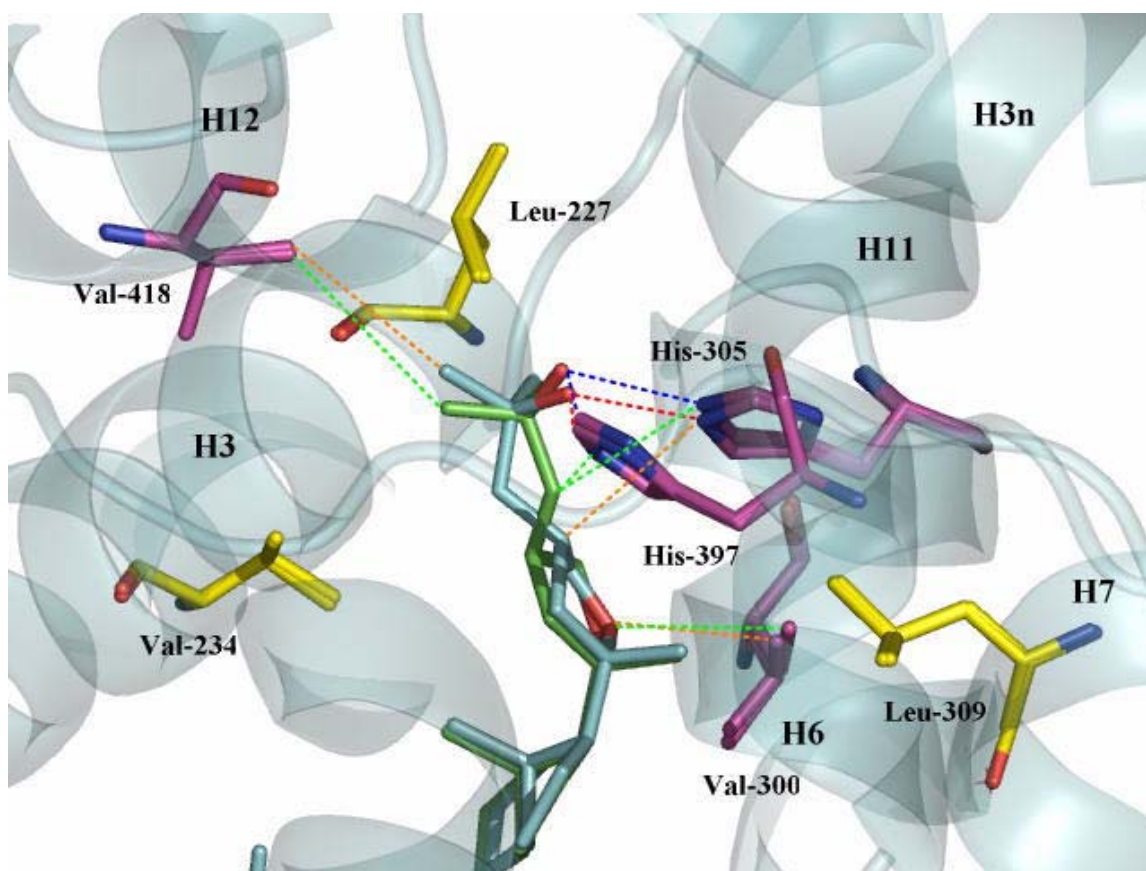


**DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE UN NUEVO  
LIGANDO SUPERAGONISTA (AMCR277A) DEL RECEPTOR  
NUCLEAR DE LA VITAMINA D**



**LUIS CEZAR RODRIGUES**  
Santiago de Compostela, Septiembre 2007



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

FACULTADE DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

Y UNIDAD ASOCIADA AL CSIC

**DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE UN NUEVO  
LIGANDO SUPERAGONISTA (AMCR277A) DEL RECEPTOR  
NUCLEAR DE LA VITAMINA D**

Memoria que presenta Luis Cezar Rodrigues  
Para optar al grado de Doctor por la  
Universidade de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, Septiembre de 2007.



**D. Antonio Mouriño Mosquera**, Catedrático de Química Orgánica de la Universidade de Santiago de Compostela y **D. Daniel Nicoletti**, Doctor en Química Orgánica.

**Certifican:**

Que el trabajo titulado “Diseño, síntesis y actividad biológica de un nuevo ligando superagonista (AMCR277A) del receptor nuclear de la vitamina D”, fue realizado por D. Luis Cezar Rodrigues bajo su dirección en el Departamento de Química Orgánica y Unidade Asociada al C.S.I.C. de la Universidade de Santiago de Compostela.

Santiago de Compostela, septiembre de 2007.

Fdo.: Antonio Mouriño Mosquera

Fdo.: Daniel Nicoletti



**DISEÑO, SÍNTESIS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE UN NUEVO  
LIGANDO SUPERAGONISTA (AMCR277A) DEL RECEPTOR  
NUCLEAR DE LA VITAMINA D**

Memoria que presenta  
Luis Cezar Rodrigues  
para optar al grado de Doctor por la  
Universidade de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, Septiembre de 2007.

Fdo.: Luis Cezar Rodrigues

Fdo.: Carlos Saa Rodriguez  
Director del Departamento de Química Orgánica



## AGRADECIMENTOS

A D. Antonio Mouriño Mosquera y D. Daniel Nicoletti, por sus enseñanzas durante la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio,

Muy especialmente a Carlos Gregorio, Avión, Checho, Edelmiro, Mercedes, Ramon, Ricardo Riveiros, Rita, Mary, Rumbo, Silvina, Xenxo, Miguel Maestro, cuyas enseñanzas, afecto y buen humor fueron imprescindibles para la realización de este trabajo.

- A la Universidade de Santiago de Compostela por la beca concedida.
- Al Ministerio de Educación y Ciencia (Proyecto SAF 2004-01885)
- A la Xunta de Galicia (Grupos de Referencia Competitiva, GRC 65/2006)
- A la Xunta de Galicia (Proyecto PGIDITO5PX1C20903P)
- CESGA por la utilización de los superordenadores.
- A Dino Moras y Natacha Rochel por la realización de los ensayos biológicos y estructurales.
- A Fredy Sussman por las enseñanzas sobre *docking*.
- A Miguel Maestro por las estructuras de rayos X



*Aos meus pais*



**ÍNDICE**

ABREVIATURAS

<b>Resumen</b> .....	1
1. Síntesis de los análogos AMCR277A y AMCR277B.....	2
2. Estudios Cristalográficos. ....	8
3. Ensayos biológicos.....	10
4. Mejora de la síntesis de AMCR277A. ....	10
<b>Introducción</b> .....	15
1. Introducción .....	17
2. Estructura de la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D <sub>3</sub> (Calcitriol).....	19
3. Nomenclatura de la vitamina D .....	21
4. Biogénesis de la vitamina D .....	22
5. Fuentes y necesidades diarias recomendadas de vitamina D <sub>3</sub> .....	24
6. Metabolismo de la hormona calcitriol .....	25
6.1. Anabolismo del calcitriol .....	27
6.2. Catabolismo del calcitriol .....	27
7. Transporte de la vitamina D <sub>3</sub> y sus metabolitos .....	28
8. Usos clínicos y bioactividad del calcitriol y análogos .....	30
8.1. Funciones clásicas.....	31
8.1.1. Homeostasis del calcio .....	31
8.1.2. Raquitismo y Osteomalacia .....	33
8.2. Funciones no clásicas .....	33
8.2.1. Animals VDR <i>knockout</i> (VDR-KO) .....	34
8.2.2. Cáncer.....	34
8.2.2.1. Cáncer de próstata.....	34
8.2.2.2. Cáncer de mama.....	36
8.2.2.3. Cáncer de colon .....	37
8.2.2.4. Leucemia .....	38
8.2.2.5. Otras enfermedades hiperproliferativas .....	39
8.2.4. Psoriasis .....	40
8.2.5. Osteoporosis.....	42
8.2.6. Hiperparatiroidismo secundario .....	43
9. Mecanismos de acción del calcitriol.....	44

9.1. Mecanismo genómico .....	44
9.1.1. El receptor nuclear de la vitamina D (VDR).....	45
9.1.1.1. El dominio A/B.....	46
9.1.1.2. El dominio C o dominio de unión al DNA (DBD).....	47
9.1.1.3. El dominio D o bisagra.....	49
9.1.1.4. El dominio E/F o dominio de unión al ligando (LBD) .	49
9.1.2. El receptor de Moras .....	51
9.1.3. La unión del calcitriol al VDR.....	52
9.1.4. Formación del heterodímero VDR-RXR y unión al VDRE ...	53
9.1.5. Activación de la expresión génica. ....	54
9.1.6. Regulación de la respuesta génica.....	57
9.2. Mecanismo no-genómico .....	58
9.2.1. VDR de membrana.....	58
9.2.2. Especificidad conformacional y dominio de unión alternativo	59
9.3. Genómico y no genómico <i>cross-talk</i> .....	63
10. Análogos del calcitriol y sus aplicaciones clínicas .....	65
10.1. Derivados 16-en-22-oxa-calcitriol.....	65
10.2. Derivados 24-sulfona y 24-sulfoxina .....	66
10.3. Derivados con cadenas laterales truncadas .....	67
10.4. Derivados con cadena lateral semi-rígida.....	68
10.5. Derivados 21-nor-22-oxa.....	68
10.6. Derivados modificados en el biciclo CD.....	69
10.7. Derivados modificados en el anillo A.....	70
10.8. Derivados del ácido litocólico.....	71
10.9. Miméticos y derivados no esteroideos .....	72
10.10. Derivados no esteroideos con modificaciones en el sistema CD	73
10.11. Análogos Gemini.....	74
10.12. Otros análogos.....	75
11. Resumen de los métodos de síntesis para la obtención de análogos de la vitamina D. ....	76
11.1. Ruta de Wittig-Horner. ....	76
11.2. Ruta de Wittig-Horner alternativa.....	77
11.3. Ruta a través de la forma 5,6- <i>trans</i> . ....	78
11.4. Estrategia Vinilalénica. ....	78
11.5. Ruta dienínica. ....	79
10.6. Ruta acoplamiento-ciclación catalizado por Pd(0).....	79

11.7. Ciclación – Acoplamiento a partir de enoltriflatos .....	80
<b>Objetivos</b> .....	81
1. Objetivos .....	83
2. Justificación .....	84
<b>Antecedentes</b> .....	85
1. Aspecto biológico .....	87
1.1. Agonistas, superagonistas y antagonistas del calcitriol. ....	87
1.2. Superagonistas conocidos del calcitriol. ....	90
1.3. Los superagonistas KH1060 y MC1288. ....	91
<b>Resultados y discusión</b> .....	95
1. Modelado molecular .....	97
2. Cálculos de <i>docking</i> .....	97
3. Síntesis de los análogos .....	102
3.1. Análisis Retrosintético. ....	102
3.2. Síntesis del oxido de fosfina. ....	103
3.3. Síntesis de la cetona de partida <b>7</b> .....	103
3.4. Síntesis de las cetonas cíclicas <b>4</b> y <b>6</b> .....	104
3.4.1. Acoplamiento con magnesianos.....	105
3.4.2. Acoplamiento con organolíticos .....	107
3.4.3. Preparación de los haloalcoholes protegidos alternativos ...	110
3.4.4. Adición de alilitios a la cetona <b>7</b> .....	113
3.4.5. Formación del ciclo tetrahydrofuránico vía química de paladio- $\pi$ -alilo.....	115
3.4.6. Formación del ciclo tetrahydrofuránico vía síntesis de Williamson. ....	117
3.5. Construcción de la cadena lateral. ....	119
3.5.1. Cadena lateral vía metátesis .....	120
3.5.2. Introducción de la cadena lateral vía química de boranos ..	121
3.5.3. Introducción de la cadena lateral vía química de fosfonatos	122
3.6. Preparación de los alcoholes terciarios <b>34a</b> y <b>34b</b> .....	123
3.7. Preparación de las cetonas <b>4</b> y <b>5</b> .....	124
3.8. Síntesis de los análogos AMCR277A y AMCR277B.....	125
4. Estudios cristalográficos .....	126
4.1. Cristalización y estructura de los complejos ligando-VDR .....	126
4.2. Análisis de los resultados.....	126
5. Ensayos biológicos .....	128

5.1. Inducción de la transcripción .....	129
5.2. Diferenciación celular e inhibición de la proliferación celular en células HL60. ....	129
5.3. Efecto hipocalcémico en ratones.....	131
5.4. Afinidad por el VDR. ....	132
6. Mejora de la síntesis de AMCR277A .....	133
6.1. Retrosíntesis alternativa del superagonista AMCR277A .....	133
6.2. Síntesis estereoselectiva de los ésteres $\alpha,\beta$ -insaturados <b>27a</b> y <b>27b</b> .....	134
6.2.1. Preparación del reactivo de Fuji y reacción de Wadsworth-Horner-Emmons con la cetona <b>6</b> . ....	136
6.3. Hidrogenación de los ésteres $\alpha,\beta$ -insaturados.....	142
6.4. Reducción catalítica enantioselectiva de sistemas conjugados. ..	143
6.5. Acoplamiento.....	146
6.5.1. Intentos de haloolefinación de cetonas .....	146
6.5.2. Intentos de formación de alquencilboranos .....	148
6.5.3. Preparación eficiente del bromuro alquencilico <b>46a</b> .....	150
<b>Trabajo Experimental</b> .....	153
Materiales y métodos generales .....	155
Preparación de <b>14e</b> .....	157
Preparación de <b>16d</b> .....	158
Preparación de <b>16g</b> .....	159
Preparación de <b>17a</b> .....	160
Preparación de <b>17e</b> .....	161
Preparación de <b>18a</b> .....	162
Preparación de <b>18e</b> .....	162
Preparación de <b>20e</b> .....	163
Preparación de <b>20a</b> .....	165
Preparación de <b>21</b> .....	166
Preparación de <b>26a</b> .....	167
Preparación de <b>10d</b> .....	168
Preparación de <b>6</b> .....	169
Preparación de <b>40c</b> .....	170
Preparación de <b>44R</b> y <b>44S</b> .....	171
Preparación de (S)-Fuji ( <b>45S</b> ) .....	172
Preparación de <b>27a</b> y <b>27b</b> .....	173

## Índice

---

Preparación de <b>33a</b> y <b>34a</b> .....	176
Preparación de <b>33b</b> y <b>34b</b> y <b>33c</b> .....	178
Preparación de <b>35a</b> .....	181
Preparación de <b>35b</b> .....	182
Preparación de <b>4</b> .....	183
Preparación de <b>5</b> .....	184
Preparación de <b>5a</b> .....	185
Preparación de <b>5b</b> .....	186
Preparación de <b>1e</b> .....	187
Preparación de <b>1f</b> .....	188
Preparación de <b>1a</b> .....	179
Preparación de <b>1b</b> .....	190
Preparación de <b>38</b> .....	191
<b>Apéndices</b> .....	193
<b>IR</b> .....	195
<b>RMN</b> .....	207
<b>Datos Cristalográficos</b> .....	259
<b>Bibliografía</b> .....	265
<b>Índice de Estructuras</b> .....	279



**ABREVIATURAS**

$1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$	$1\alpha,25$ -dihidroxitamina $\text{D}_3$ o calcitriol
AF-2	Función de activación dependiente del ligando
Camp	Adenosín monofosfato cíclico
Arg	Arginina
BAIB	Bis-acetoxi-yodo-benceno
$n\text{BuLi}$	$n$ Butillitio
Bz	Benzoilo
BzCl	Cloruro de Benzoilo
CYP	Enzimas citocrómicas monooxigenasas
d	Doblete
DAIB	3-exo-Dimetilaminoisoborneol
DBD	Dominio de unión al DNA
DBP	Proteína transportadora de la vitamina D
DBU	1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-eno
dd	doble doblete
DIBAL-H	Hidruro de diisobutilaluminio
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMP	2,5-Dimetilpirazol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico

## Abreviaturas

---

DRIP	Proteína de interacción con el VDR
e.e.	Exceso enantiomérico
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
EMBR	Espectrometría de masas de baja resolución
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
h	Horas
Hex.	Hexanos
<sup>n</sup> HexLi	<sup>n</sup> Hexillitio
HMPA	Hexametilfosforamida
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IL-2	Interleuquina-2
Im	Imidazol
IQ	Ionización química
IR	Espectro infrarrojo
LBD	Dominio de unión al ligando
LDA	Diisopropilamiduro de litio
m	Multiplete
MCPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
min	Minutos
MOM	Metoximetilo
Ms	Metanosulfonilo

*Abreviaturas*

---

NCS	<i>N</i> -clorosuccinimida
OCT	Oxacalcitriol
PDC	Dicromato de piridinio
PG	Grupo protector
p.f.	Punto de fusión
PhH	Benceno
PKC	Proteína quinasa
PTH	Hormona paratiroidea
Py	Piridina
RAR	Receptor del ácido retinoico
R <sub>f</sub>	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón
RNA	Ácido ribonucleico
RXR	Receptor del ácido 9- <i>cis</i> -retinoico
s	Singlete
SEM	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SiMe <sub>3</sub>
Ser	Serina
SMRT	Receptor de la hormona paratiroidea
SRC	Cofactor del receptor esteroideal (Steroid receptor cofactor)
t	Triplete

## Abreviaturas

---

t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBDPS	<i>tert</i> -butildifenilsililo
TBSCl	Cloruro de <i>tert</i> -butildimetilsililo
TBS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
TEMPO	Óxido de 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinilo (radical libre)
T <sub>f</sub>	Trifluorometanosulfonilo
THF	Tetrahidrofurano
TIPS	Triisopropilsililo
TIPSCl	Cloruro de triisopropilsililo
TMS	Trimetilsilo
Tol	Tolueno
Trp	Triptófano
TsCl	Cloruro de tosilo
Tyr	Tirosina
UV	Luz ultravioleta
Val	Valina
VDR	Receptor nuclear de la vitamina D
VDRE	Elementos de respuesta de la vitamina D

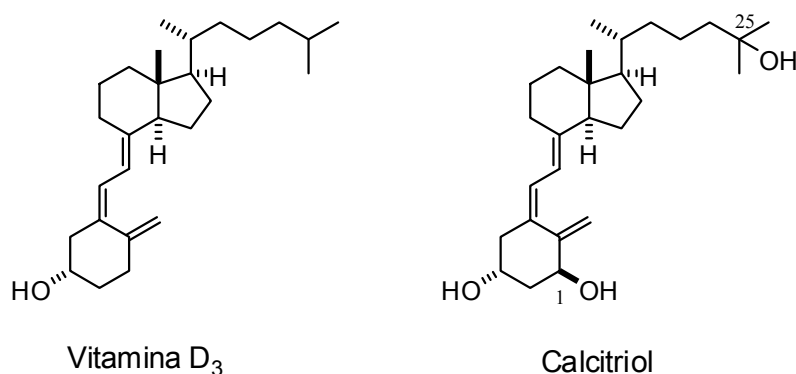
# **RESUMEN**



**RESUMEN**

La vitamina D<sub>3</sub> es esencial para el metabolismo mineral de los vertebrados terrestres. Esta vitamina puede obtenerse a partir de algunos alimentos o por fotosíntesis en la piel. El organismo es capaz de transformar la vitamina D<sub>3</sub> en el metabolito 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitammina D<sub>3</sub> (calcitriol) que posee un mecanismo de acción similar al de otras hormonas esteroides clásicas (Figura I).

Figura I. Estructuras de la vitamina D<sub>3</sub> y del calcitriol.



La profusión de acciones del calcitriol en varios procesos fisiológicos sugiere amplias aplicaciones clínicas para sus análogos sintéticos que se enlacen al receptor nuclear de la vitamina D (VDR).

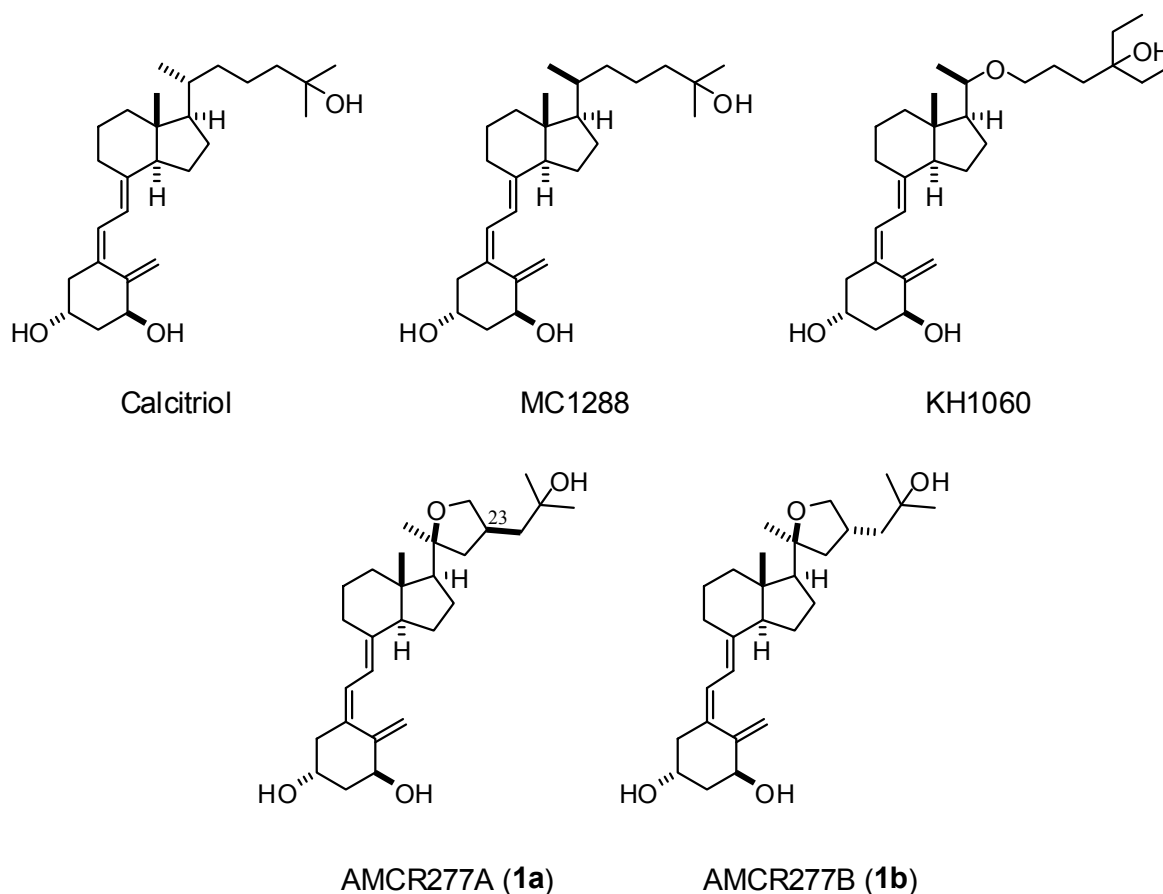
El VDR es un factor de transcripción nuclear que, una vez activado por el calcitriol, heterodimeriza con el receptor retinoide (RXR) para unirse al DNA en zonas específicas de la región promotora de genes diana llamados elementos de respuesta a la vitamina D (VDRE) regulando la expresión de importantes proteínas.

Moras y col., en una de las contribuciones más importantes en el campo de la vitamina D, fueron capaces de cristalizar el complejo formado por un fragmento activo del dominio de enlace del receptor de la vitamina D<sub>3</sub> y el calcitriol (Moras 1,25-VDR). Asimismo, fueron capaces de cristalizar complejos formados por el receptor de Moras y dos superagonistas (KH1060 y MC1288). Tomando como base la superposición de las estructuras cristalinas de los complejos anteriores

fue posible diseñar un nuevo superagonista que incorpora en su cadena lateral una unidad tetrahidrofuránica.

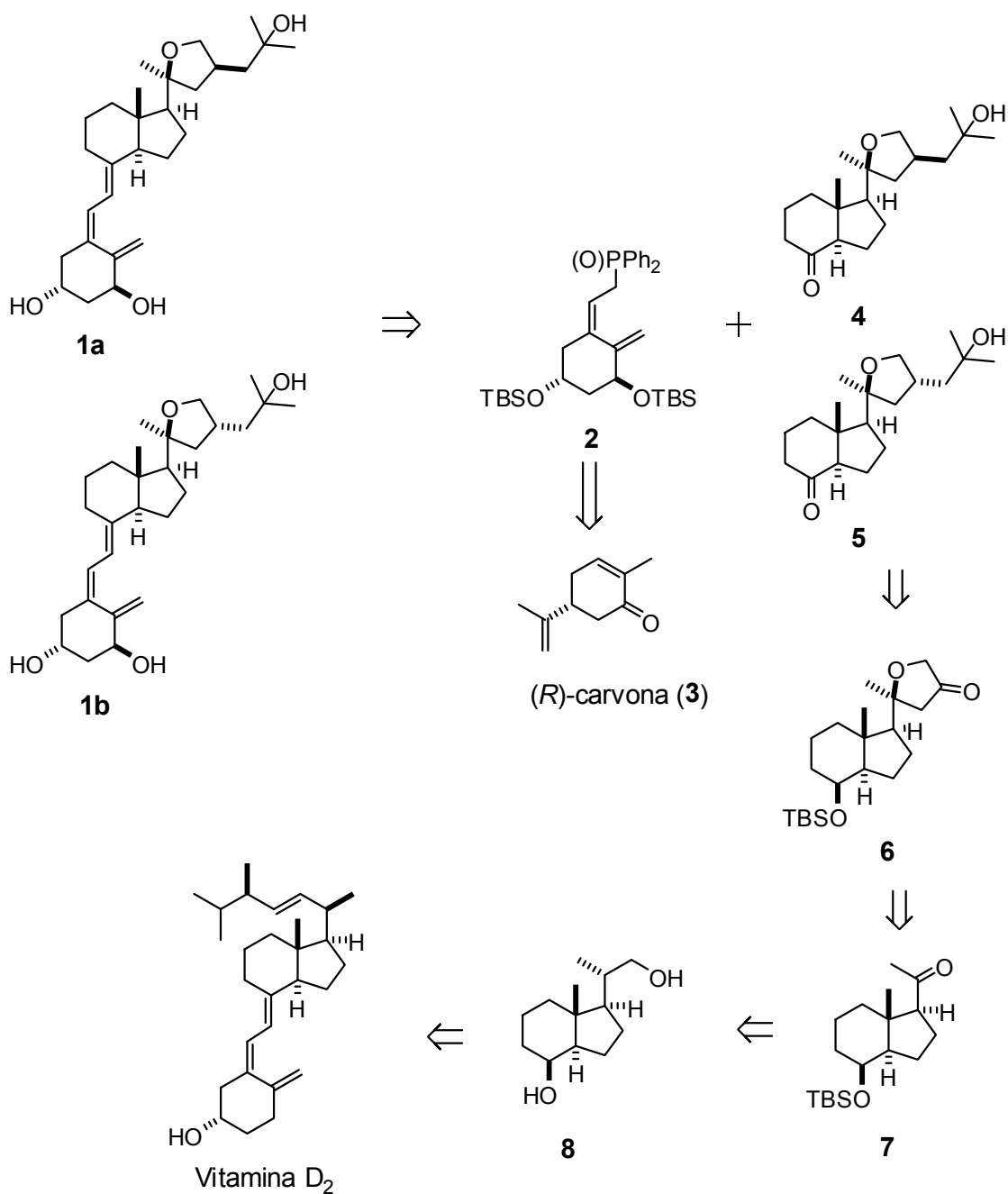
Las estructuras propuestas para los posibles superagonistas son AMCR277A (**1a**) y su epímero en C<sub>23</sub> AMCR277B (**1b**). Según cálculos de *docking* utilizando la estructura del complejo de Moras (1,25-VDR), el compuesto **1a** debería ser más activo que **1b**. (Figura II).

Figura II. Estructuras del calcitriol, KH1060, MC1288 y los análogos sintéticos AMCR277A y AMCR277B.



### 1. Síntesis de los análogos AMCR277A y AMCR277B.

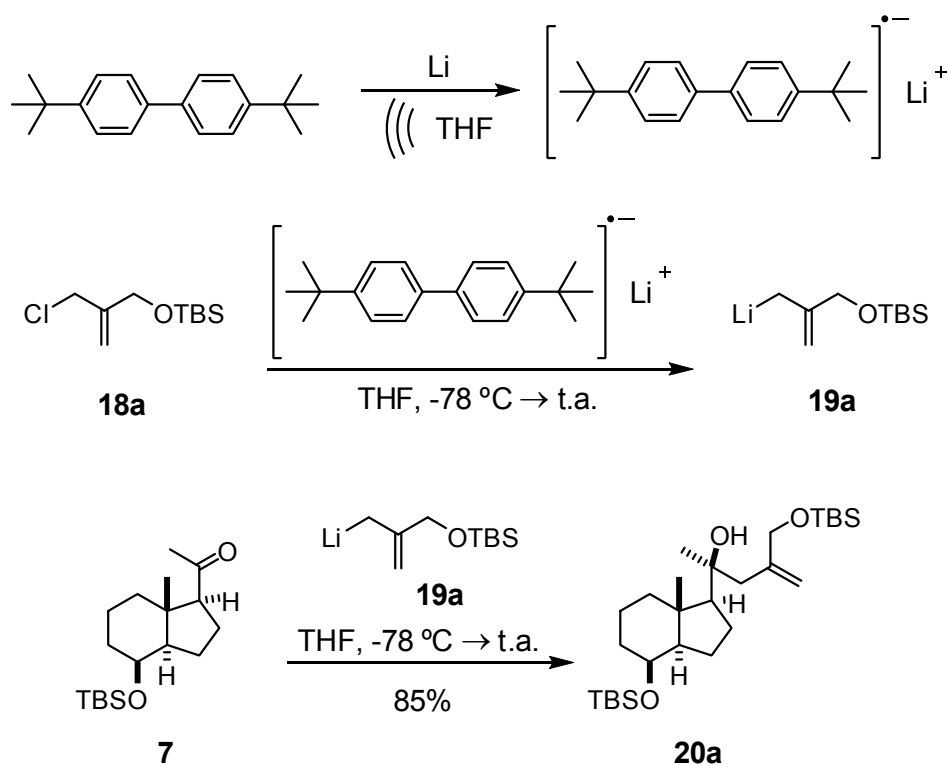
A continuación se procedió a su preparación de acuerdo al plan de síntesis que se expone en el esquema I

Esquema I: Retrosíntesis de los análogos **1a** y **1b**.

La cetona de partida **7** se preparó a partir del diol de Inhoffen **8** siguiendo un protocolo sintético optimizado en nuestro grupo de investigación.

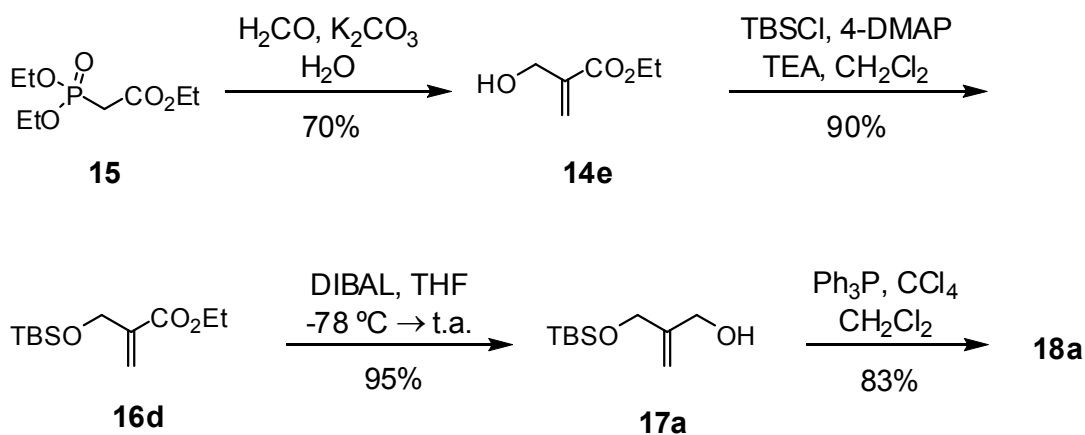
La cetona **7** se trató con el organometálico de litio **19a** para formar el alcohol terciario **20a** (Esquema II).

Esquema II. Preparación del organometálico de litio y reacción con la cetona **7**.



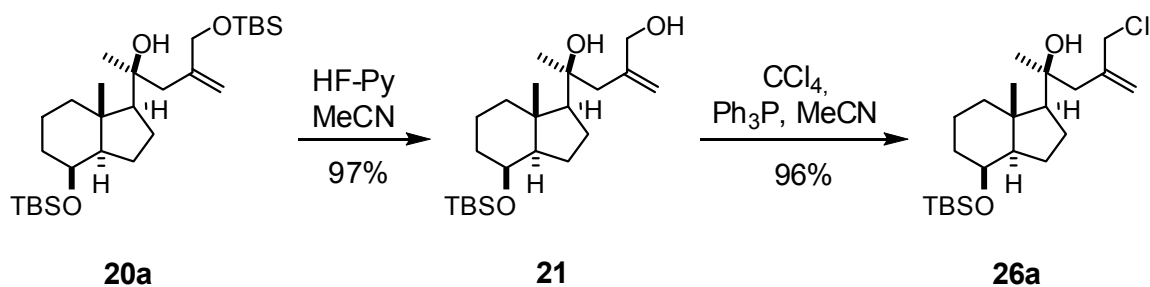
Para la síntesis del cloruro vinílico **18a** se partió del fosfonato comercial **15** que al ser tratado con formaldehído y carbonato de potasio en medio acuoso produjo **14e**. La protección y reducción condujo al alcohol vinílico **17a**, que se transformó en el cloruro **18a** (Esquema III).

Esquema III. Preparación del cloruro vinílico **18a**.



La desprotección de **20a** y posterior halogenación selectiva del hidroxilo primario resultante por el método de Collington y Meyers condujo al cloruro vinílico **26a** (Esquema IV).

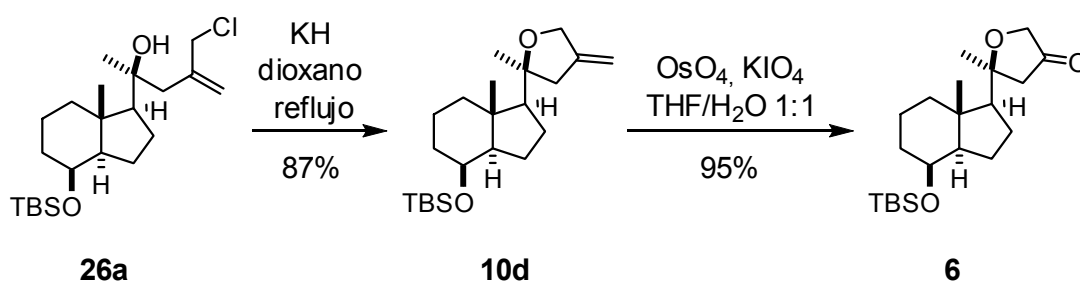
Esquema IV. Preparación del cloruro alílico **26a**.



La formación del ciclo tetrahidrofuránico se llevó a cabo vía reacción de Williamson intramolecular, utilizando el aloxido del alcohol **21**.

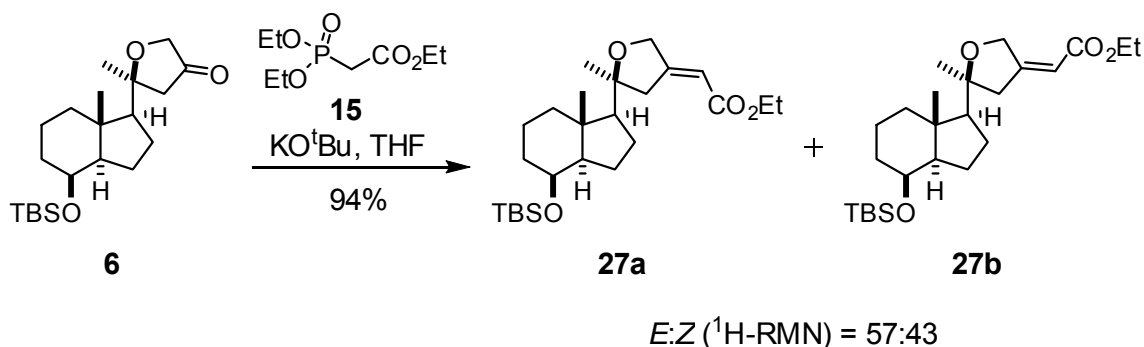
El posterior tratamiento de la olefina **10d** con tetróxido de osmio y peryodato de potasio condujo a la cetona deseada **6** (Esquema V).

Esquema V. Obtención de la cetona **6**.



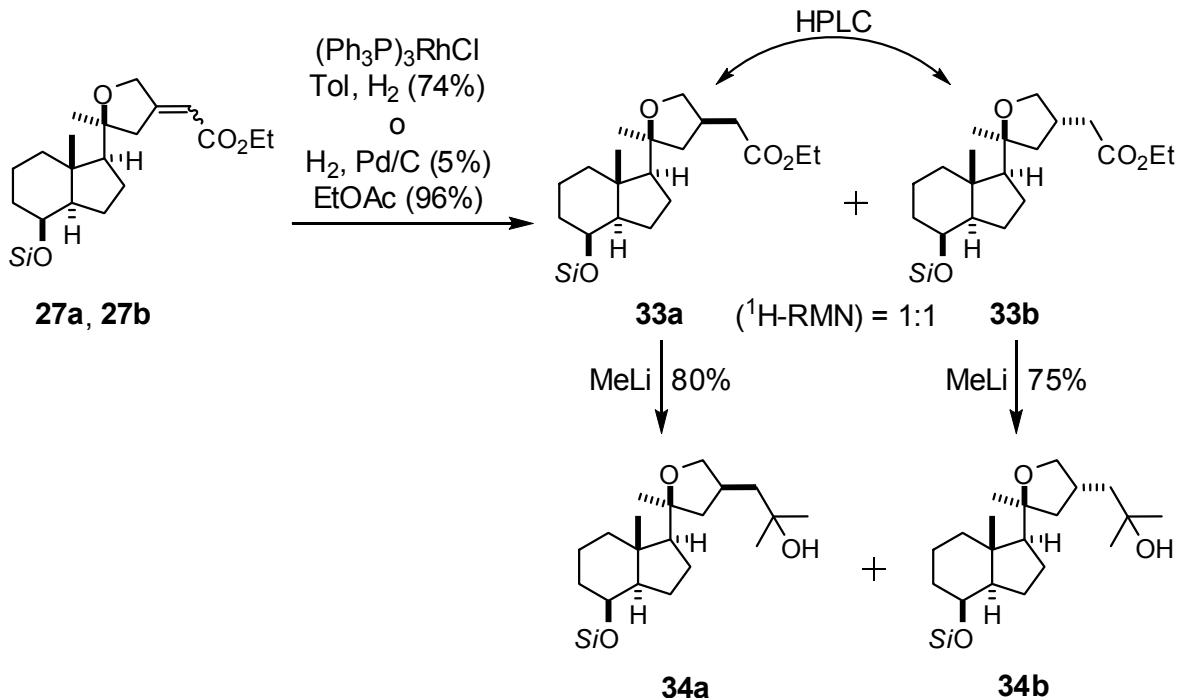
La reacción de Wadsworth-Horner-Emmons de la cetona **6** con el anión del fosfonato comercial **15** condujo a una mezcla aproximadamente equimolecular de los ésteres **27a** y **27b** (Esquema VI).

Esquema VI: Preparación de los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados **27a** y **27b**.



La hidrogenación de la mezcla de ésteres **27a** y **27b** en presencia de cantidades catalíticas de Pd sobre carbón o el catalizador de Willianson, condujo a una mezcla (1:1) de los ésteres **33a** y **33b** que pudieron separarse por HPLC. Ambos ésteres se metilaron con MeLi obteniéndose los correspondientes alcoholes terciarios **34a** y **34b** en buen rendimiento (Esquema VII).

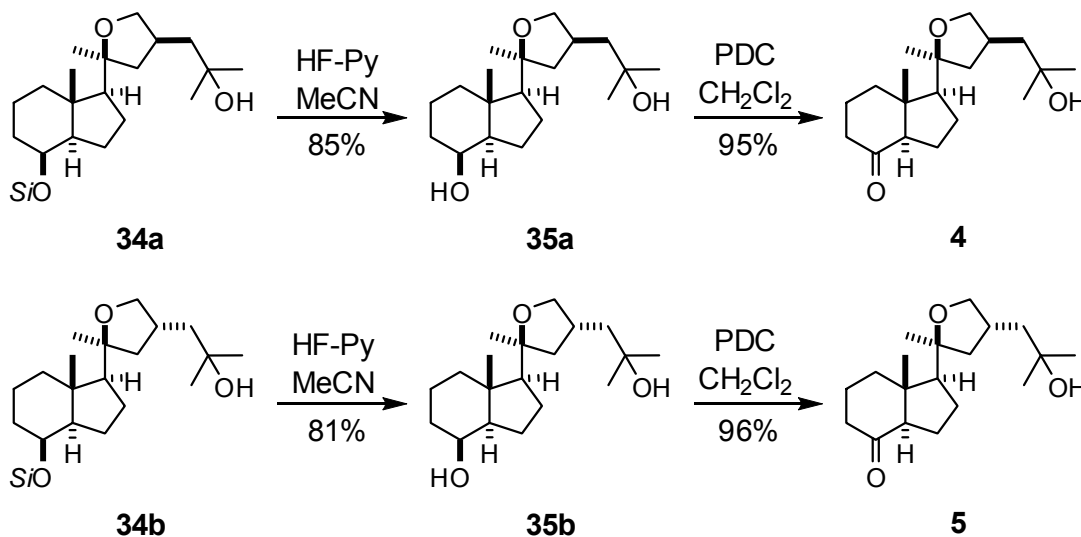
Esquema VII: Preparación de los alcoholes terciarios **34a** y **34b**.



Los alcoholes terciarios **34a** y **34b** se desililaron con fluoruro de piridinio en acetonitrilo para dar los correspondientes dioles **35a** y **35b** en buenos

rendimientos. Los dioles se oxidaron a las respectivas cetonas **4** y **5** utilizando dicromato de piridinio en diclorometano (Esquema VIII).

Esquema VIII: Preparación de las cetonas **4** y **5**.

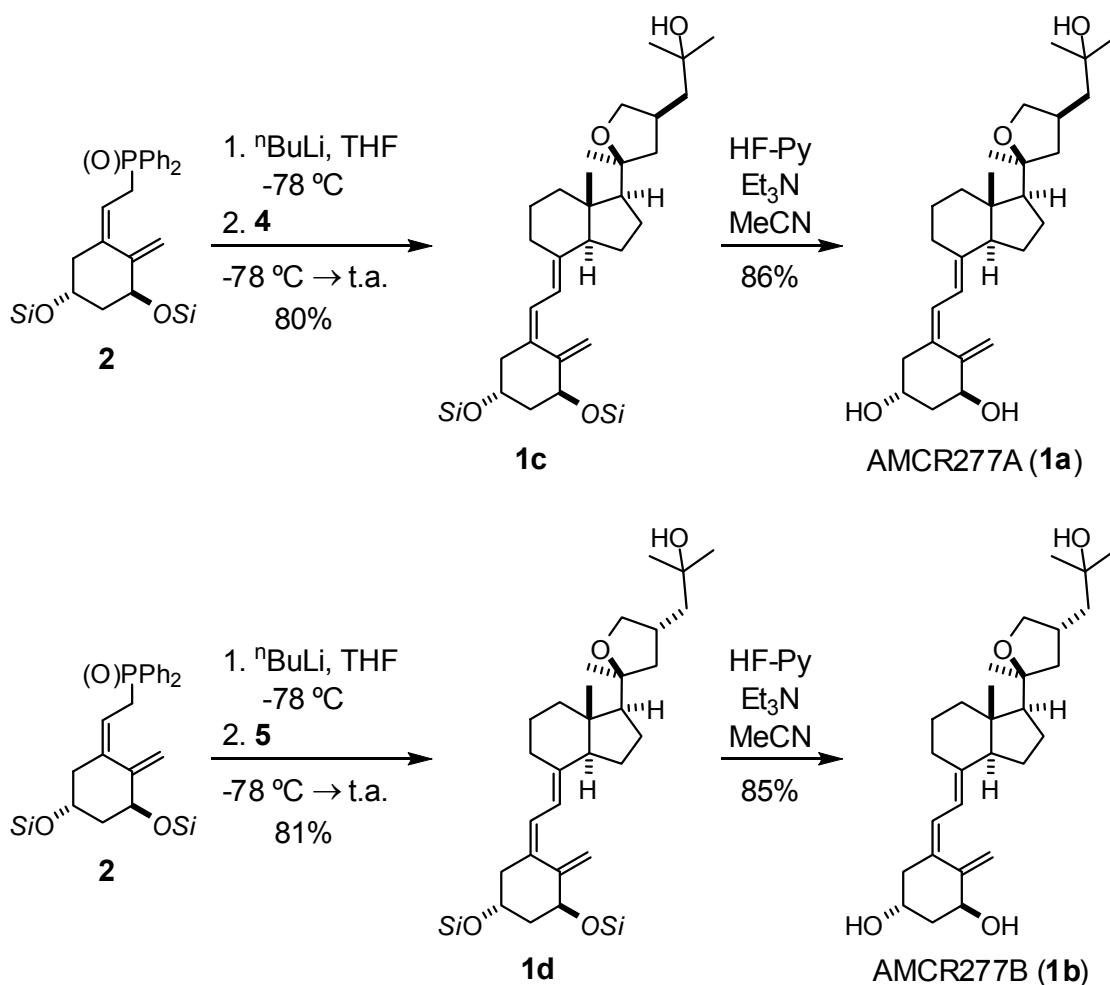


La estereoquímica de los alcoholes se comprobó por difracción de rayos X. Los primeros intentos de cristalización con el hidroxilo protegido en C8 no condujeron a cristales suficientemente perfectos para el experimento de difracción y se descartaron. Fue posible, sin embargo, obtener la difracción de rayos X de los correspondientes dioles desililados cristalizados en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

La estructural obtenida por difracción de rayos X concuerda con los experimentos de NOE.

De acuerdo con el plan de síntesis establecido, las cetonas **4** y **5** se trataron con el anion del óxido de fosfina **2** para dar los correspondientes análogos protegidos **1c** y **1d**. Los análogos sililados **1c** y **1d** se desprotegieron con fluoruro de piridinio para dar los análogos deseados AMCR277A (**1a**) y AMCR277B (**1b**) (Esquema IX).

Esquema IX: Síntesis de los análogos AMCR277A y AMCR277B.



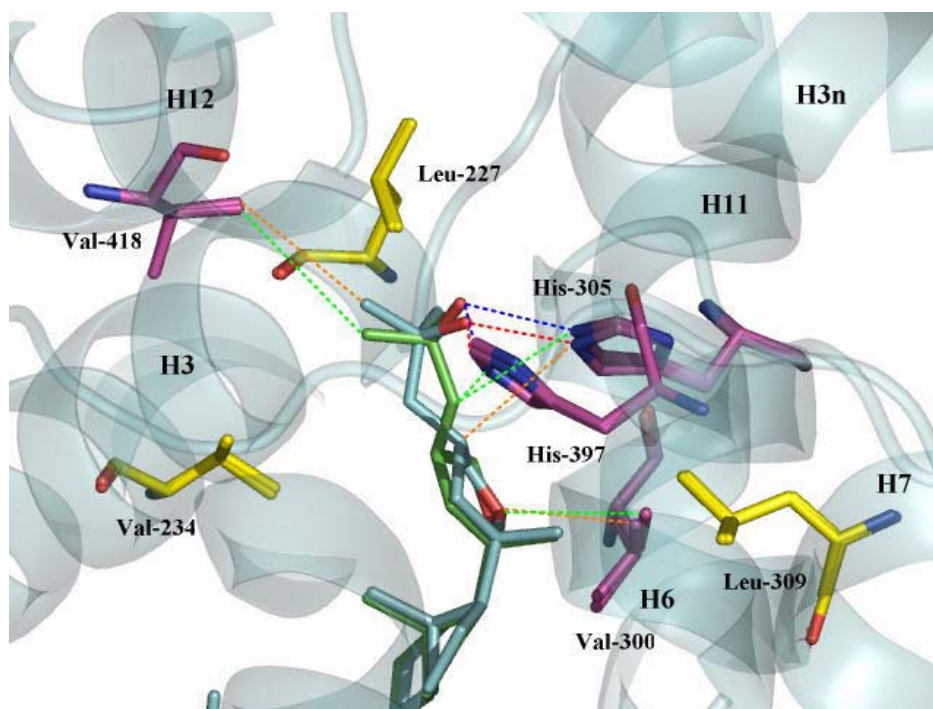
## 2. Estudios Cristalográficos.

Los análogos sintetizados AMCR277A y AMCR277B se enviaron a los laboratorios del Prof. Moras (IG-BMC-Ilkirch) donde se trataron con el receptor mutado de Moras (Moras-VDR) para inducir la cristalización de los respectivos complejos ligando-VDR por el método de la gota invertida.

Los cristales seleccionados correspondientes a cada complejo ligando-VDR se enviaron a Grenoble con el fin de obtener los datos de difracción cristalográfica que permitieron deducir las estructuras cristalinas de los complejos.

A continuación se muestra la superposición de las estructuras cristalográficas de los complejos AMCR277A-(Moras-VDR) y AMCR277B-(Moras-VDR) (Figura I).

Figura III. Estructuras cristalográficas de los complejos AMCR277A-(Moras-VDR) y AMCR277B-(Moras-VDR).



Las interacciones ligando-VDR más importantes son: (1) Enlace de hidrógeno entre el 25-OH y las histidinas His-305 y His-397. (2) Enlace de hidrógeno entre el 1 $\alpha$ -OH y la serina Ser-237 y la arginina Arg-274. (3) Enlaces de hidrógeno entre el 3-OH y la Tyr-143 y la Ser 278. (4) Interacciones de van der Waals entre las cadenas laterales y las histidinas His-305, His397 y la valina Val-300. (5) Interacciones de van der Waals entre los metilos C26 y C27 con la Val-418.

La interacción de van der Waals entre el oxígeno tetrahidrofuránico y la Val-300 es más fuerte en el caso del isómero AMCR277A. Esta interacción no existe en el caso de la hormona natural. Un aspecto importante es la distancia más corta que existe entre el metilo C27 de AMCR277A y la valina Val-418 cuando se compara con la distancia entre la Val418 y el metilo C27 del otro isómero. Se puede decir que el isómero AMCR277A activa más la hélice 12 para la transactivación a través del residuo de Val418 que el otro isómero.

### **3. Ensayos biológicos.**

#### 3.1. Capacidad de inducir la transcripción genética.

AMCR277A induce la transactivación 10 veces mejor que la hormona calcitriol a una concentración de 0.1 nM, comportándose así como un superagonista. Su epímero AMCR277B se comporta como la hormona calcitriol.

#### 3.2. Capacidad de estimular la diferenciación e inhibir la proliferación en células HL60.

La incubación de células con AMCR277A causó la inhibición de la mitosis 10 veces mejor que el calcitriol o el epímero AMCR277B. A una concentración de 1 nM el AMCR277A inhibió 45% de la proliferación celular, mientras que a esta concentración ningún efecto fue observado con AMCR277B o con el calcitriol.

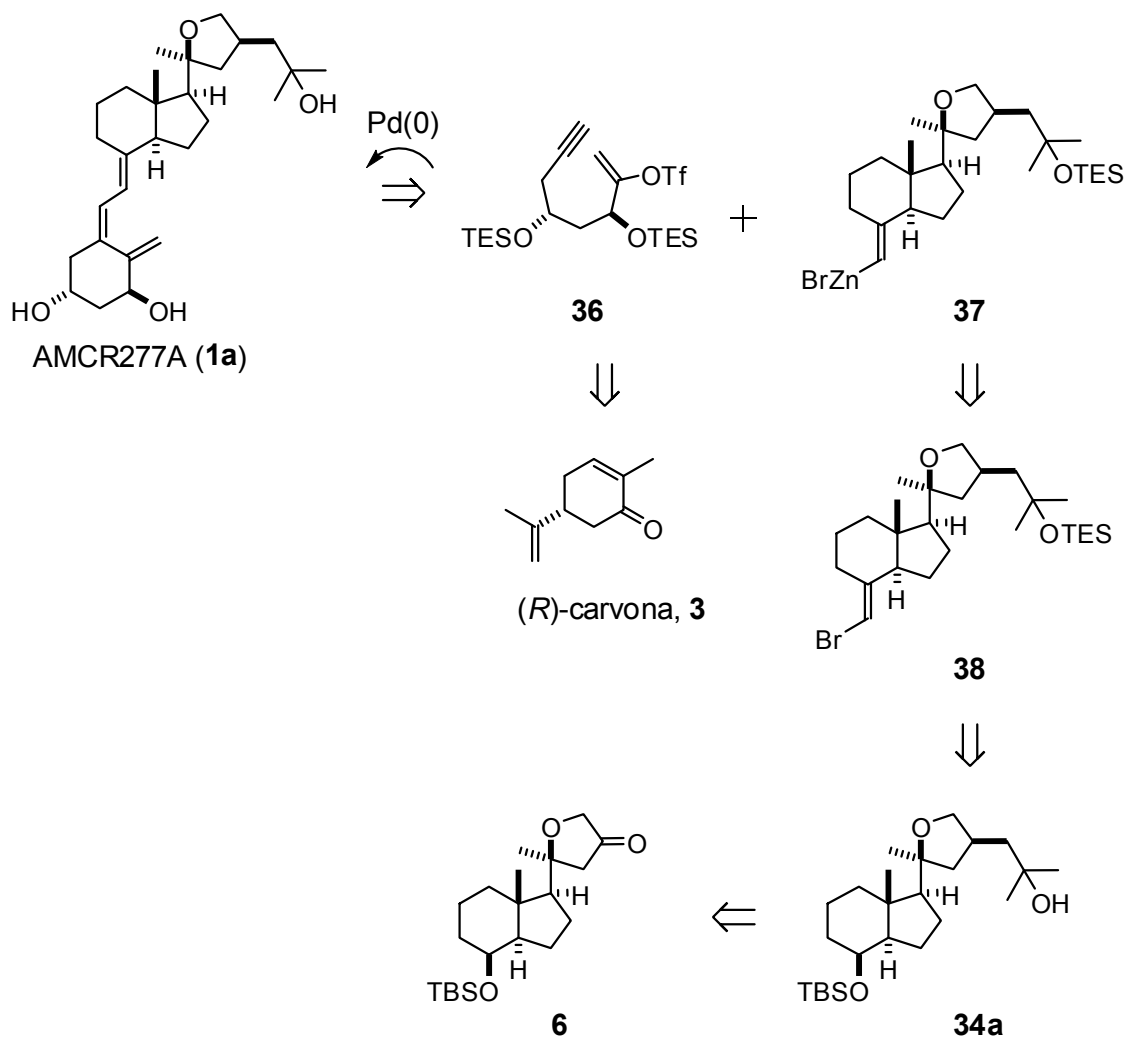
#### 3.3. Efectos calcémicos.

Dosis de 1-2 µg/Kg de calcitriol causan hipercalcemia en ratones. En contraste, la dosis de 1 µg/Kg de AMCR277A no presenta un aumento significativo de los niveles de calcio en suero.

### **4. Mejora de la síntesis de AMCR277A.**

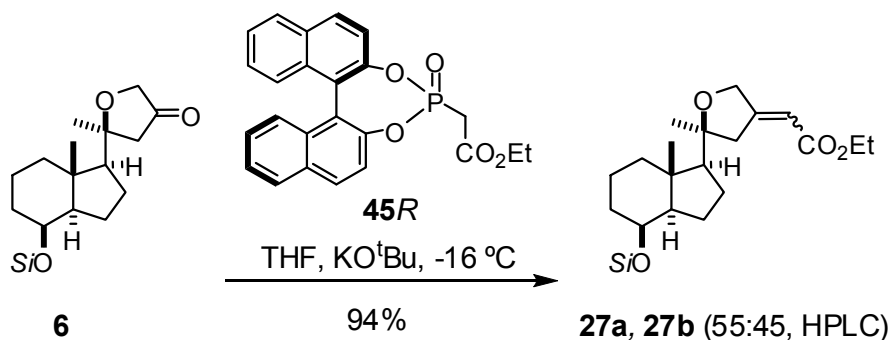
Dados los prometedores resultados biológicos que presenta el superagonista AMCR277A, se consideró de interés mejorar su síntesis. Para ello se realizó un nuevo planteamiento sintético que se basa en un proceso catalizado por Pd(0) (ciclación de enol triflato seguido de acoplamiento del intermedio de paladio resultante con organometálicos alquénlicos de zinc) para la construcción del sistema triénico (Esquema X).

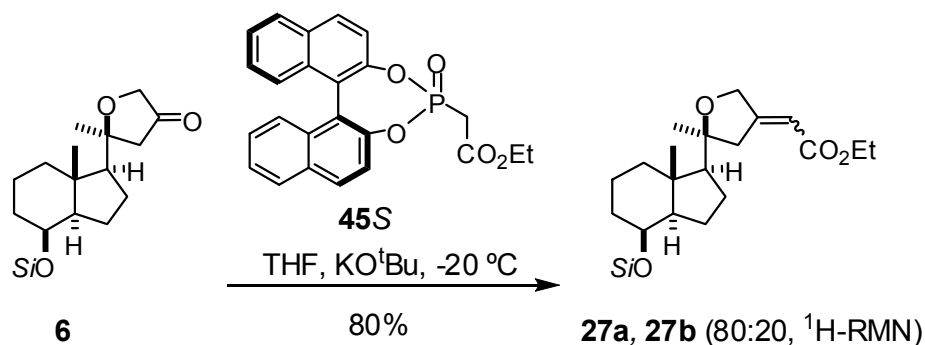
Esquema X. Nuevo planteamiento retrosintético del superagonista AMCR277A.



Intentos para mejorar la estereoselectividad en la formación de los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados **27a** y **27b** vía reacción de Wadsworth-Horner-Emmons usando los reactivos quirales de Fuji dieron pobres resultados (Esquema XI).

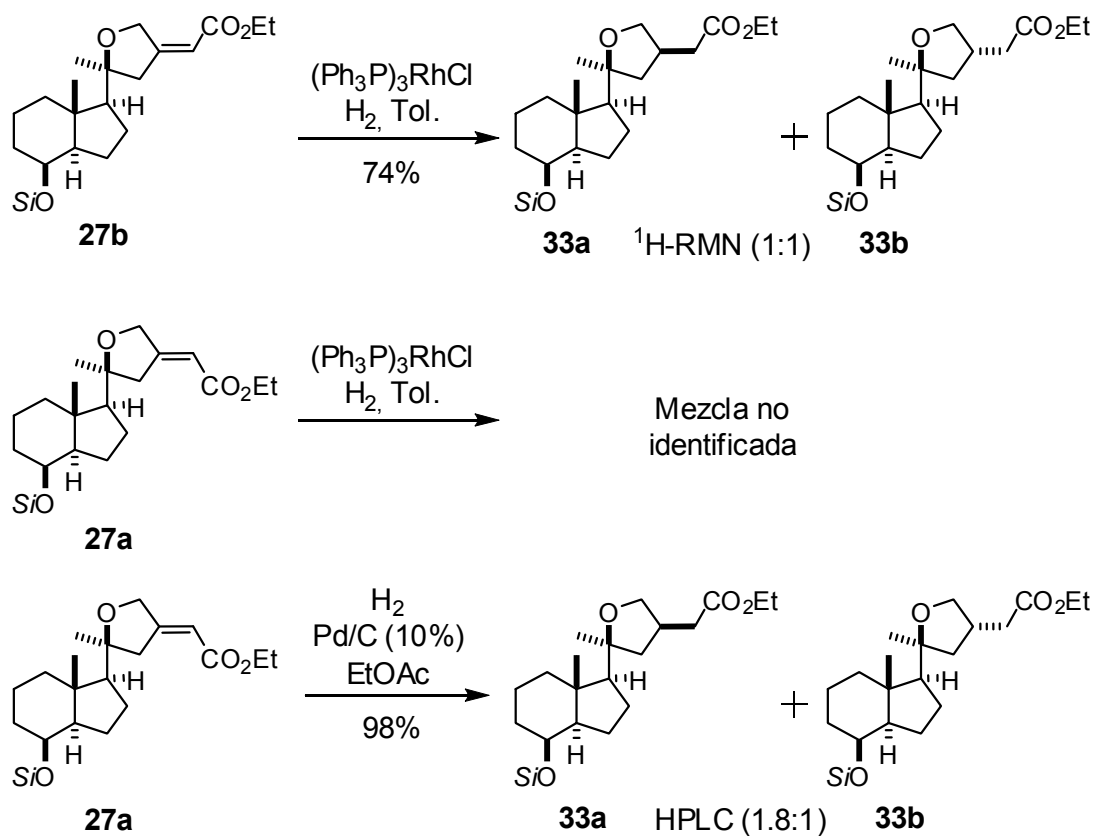
Esquema XI: Reacciones de Wadsworth-Horner-Emmons con los reactivos de Fuji enantioméricamente enriquecidos.





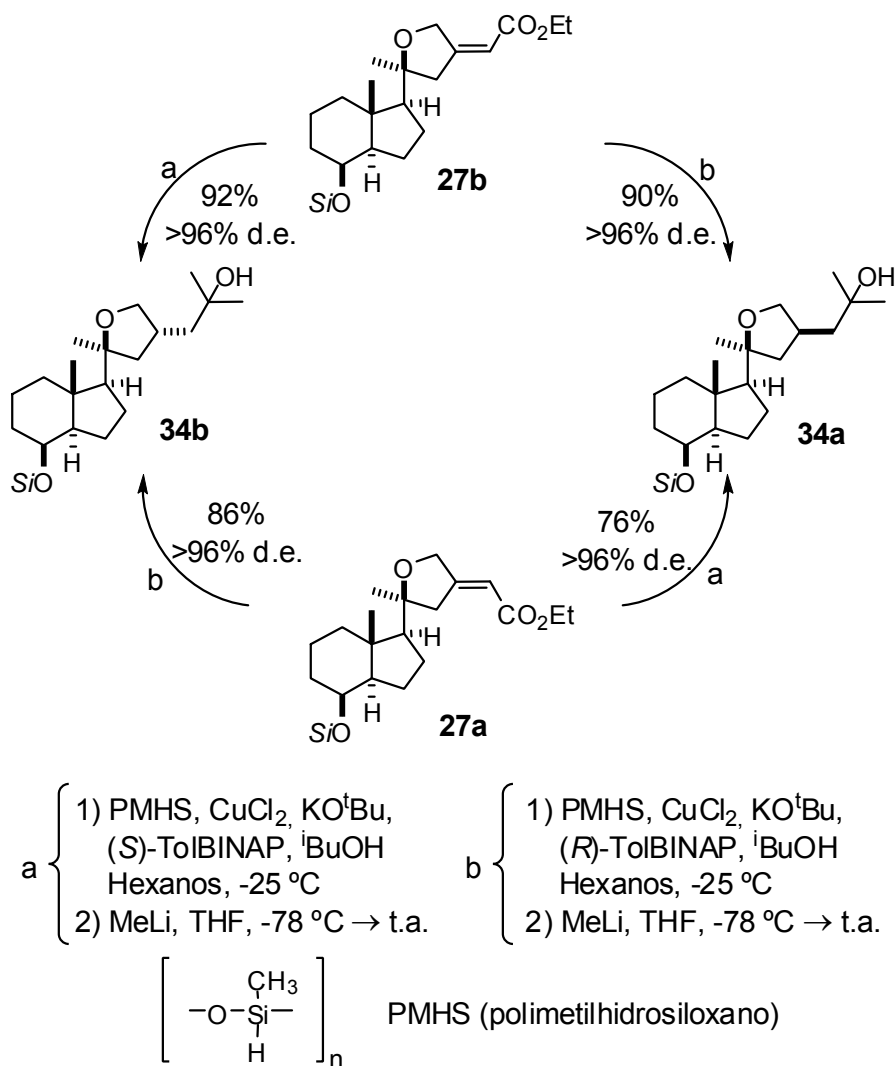
La hidrogenación de los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados **27a** y **27b** tampoco ofreció un grado de estereoselectividad apreciable (Esquema XII).

Esquema XII: *Hidrogenación de los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados.*

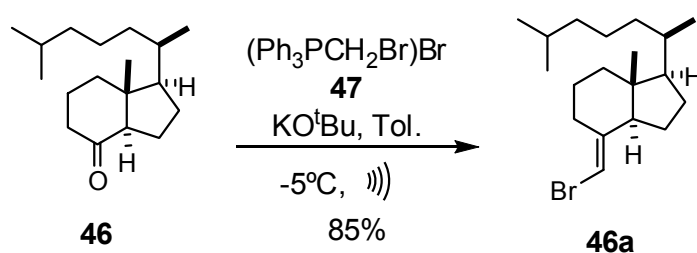


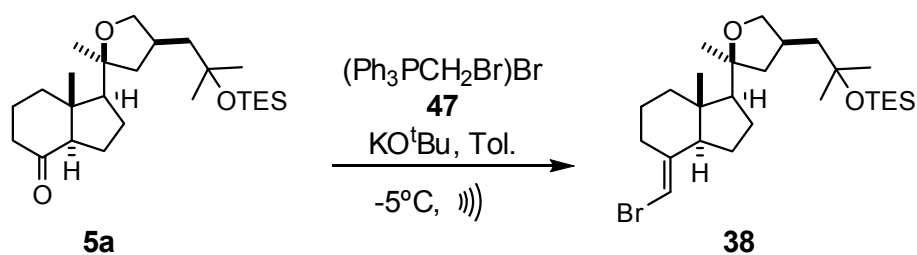
Esto nos llevó a estudiar la hidrogenación catalítica asimétrica (Esquema XIII). En este caso se pudo obtener el alcohol deseado **34a** de forma satisfactoria.

Esquema XIII: Hidrogenación asimétrica y metilación de los ésteres resultantes.



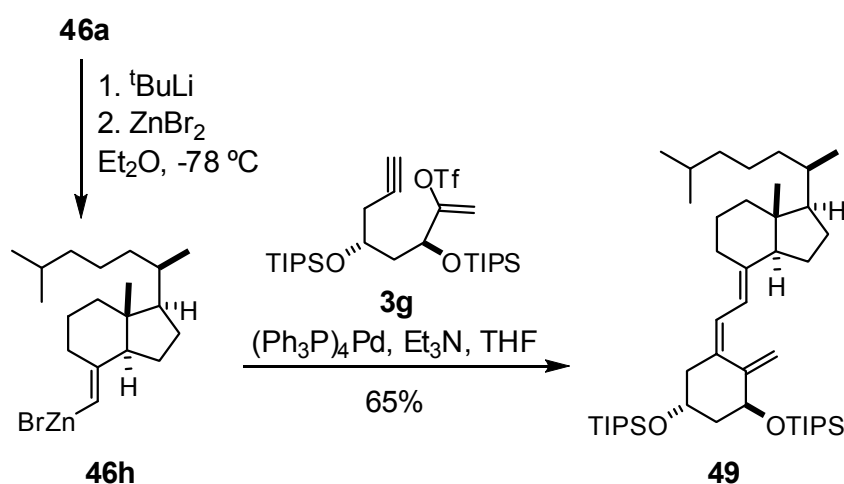
Para preparar el bromuro vinílico **38** de forma eficiente a partir de la cetona **5a**, se decidió estudiar el proceso partiendo de la cetona más sencilla **46** para obtener el bromuro **46a** (Esquema XIV).

Esquema XIV: Preparación del bromuro vinílico **38** a partir de la cetona **5a**.



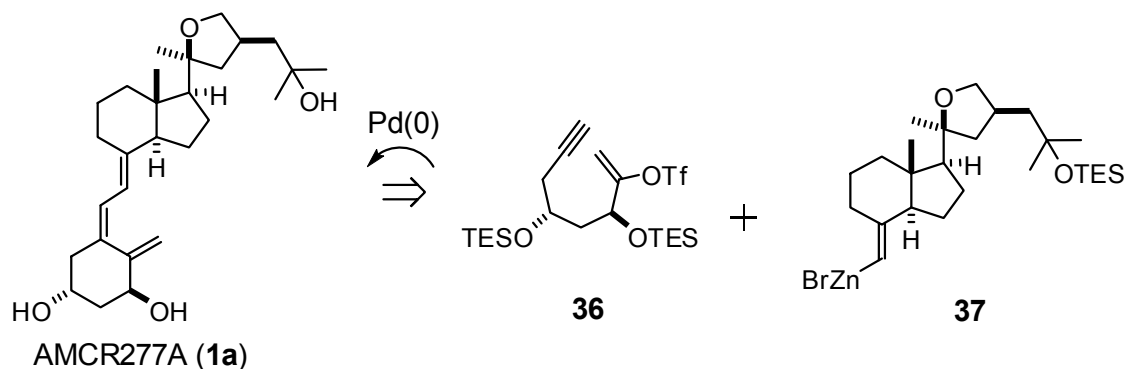
Se encontró que la reacción de **46** con el iluro generado por tratamiento de la sal  $(\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{Br})\text{Br}$  (previamente lavada con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) con  $\text{KO}^t\text{Bu}$  en tolueno, en presencia de ultrasonidos, condujo al bromuro **46a** en buenos rendimientos (Esquema XIV). El plan de síntesis propuesto (Esquema X) se ensayó con éxito en sistemas modelo (Esquema XV).

Esquema XV: Acoplamiento entre el organometálico de zinc **46h** y el enoltriflato **3g**.



El acoplamiento entre **3g** y **37** (Esquema XVI) será objeto de futuros trabajos en este laboratorio.

Esquema XVI: Acoplamiento entre el organometálico de zinc **37** y el enoltriflato **36**.



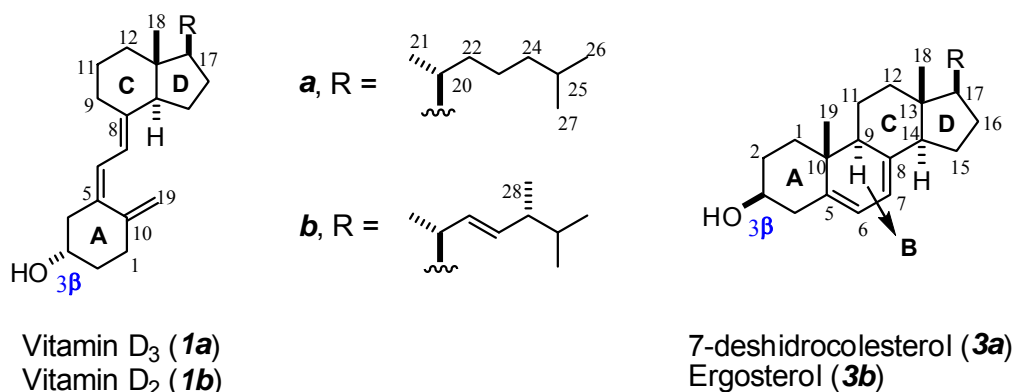
# **INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

En 1919 Sir Edgard Mellanby llevó a cabo un experimento con el que relacionó por primera vez el raquitismo, un desorden esquelético caracterizado por la desmineralización ósea, con un factor nutricional. Mellanby consideró que dicho factor era la vitamina A.<sup>1</sup> Sin embargo, McCollum a principios de 1920 descubrió en el aceite del hígado de bacalao que el factor responsable de curar el raquitismo se debía a otro factor distinto al que denominó vitamina D.<sup>2</sup> El premio Nobel, Adolf Windaus (Universidad de Göttingen, Alemania) unos años más tarde describía las estructuras químicas de la vitamina D (**1a** y **1b**, Figura 1).<sup>3</sup> La vitamina D<sub>2</sub> (**1b**) se obtuvo al irradiar con luz ultravioleta ( $\lambda=290-315$  nm) el esteroide ergosterol **3b**, y la vitamina D<sub>3</sub> (**1a**) por irradiación ultravioleta del 7-deshidrocolesterol **3a**.<sup>4</sup>

**Figura 1:** Estructuras de las vitaminas D<sub>3</sub> y D<sub>2</sub> y sus respectivos precursores esteroidales, el 7-deshidrocolesterol y el ergosterol.

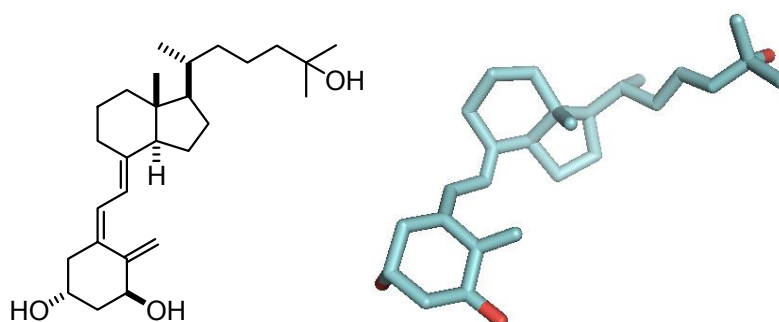


La vitamina D<sub>3</sub> puede transformarse en su forma biológicamente activa, la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> [1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, calcitriol, **2**, Figura 2) en dos pasos de hidroxilación secuenciales. La vitamina D<sub>3</sub> y sus metabolitos circulan por la sangre unidos a la proteína transportadora (DBP, Vitamin D Binding Protein). El calcitriol, descubierto en 1968 y posteriormente sintetizado para uso comercial, presenta una actividad biológica cinco veces más potente y de acción más rápida

- (1) Mellanby E. "An experimental investigación on richets." *Lancet I*, **1919**, *1*, 407.
- (2) McCollum EV, Simmonds N, Becker IE, Shipley PG. *J. Biol. Chem.* **1922**, *53*, 293.
- (3) Windaus A, Linsert O. *Ann. Chem.* **1928**, *465*, 148.
- (4) (a) Brockmann H. *Hoppe Seylers Zeit. Phisiol. Chem.* **1936**, *241*, 104-115. (b) Bouillon R, DeGroot LJ, Jameson JL (Eds.), *Endocrinology*, Elsevier Saunders, Philadelphia, **2005**, pp. 1435-1463.

que sus precursores, por lo que se le considera la forma activa de la vitamina D<sub>3</sub> y se clasifica como una hormona esteroidea.<sup>5</sup>

**Figura 2:** Estructura del calcitriol y su conformación activa en el VDR de Moras.<sup>6</sup>



Calcitriol (2)

El calcitriol controla el metabolismo del calcio y fósforo así como sus niveles en la sangre contribuyendo a la formación y mantenimiento de la integridad ósea. Este conjunto de actividades se conocen como acciones clásicas de la vitamina D. El descubrimiento de que la hormona calcitriol ejerce un importante papel en la proliferación y diferenciación celular estimuló el interés por investigar su posible utilización terapéutica en el tratamiento del cáncer, rechazo en transplantes, enfermedades del sistema inmunológico, psoriasis, hiperparatiroidismo, etc. Desafortunadamente, las altas dosis necesarias para producir la acción terapéutica, conllevan efectos calcémicos colaterales, como por ejemplo la reabsorción ósea exagerada, que genera niveles elevados de calcio en la sangre (hipercalcemia) y orina (hipercalcúria), provocando la deposición de calcio en los tejidos blandos (calcificación tisular). Actualmente, en vista de las prometedoras acciones terapéuticas de la hormona en una gran variedad de enfermedades, se buscan análogos sintéticos de la vitamina D con efectos biológicos selectivos y de baja actividad calcémica. Para el desarrollo de análogos del calcitriol de potencial interés terapéutico fue importante la cristalización y elucidación estructural de un complejo activo formado por un receptor mutado de la vitamina D<sub>3</sub> y la hormona calcitriol. Los datos cristalográficos de este complejo obtenidos por el

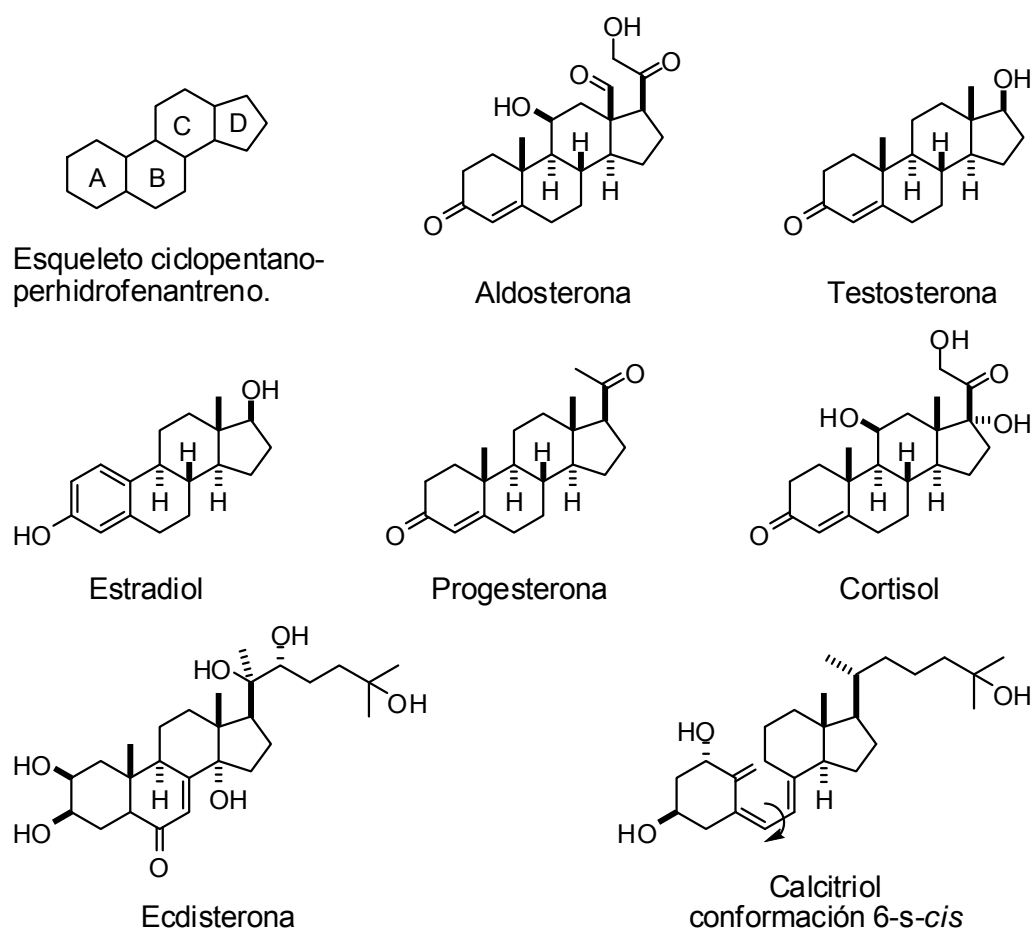
- (5) (a) Haussler MR, Myrtle JF, Norman AW. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 4055. (b) Lawson D, Fraser DR, Kodicek E. *Nature* **1971**, *230*, 228. (c) Holick MF, Schoes HK, DeLuca HF. *Biochemistry* **1971**, *10*, 2799.
- (6) Tocchini-Valentini G, Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Moras D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5491-5496.

grupo del profesor Moras,<sup>7</sup> constituyen la base del diseño racional actual de nuevos análogos con actividad superior al calcitriol. Posteriormente se elucidó la estructura del complejo formado por la proteína transportadora y el metabolito 25-OH-D<sub>3</sub>.

## 2. ESTRUCTURA DE LA 1 $\alpha$ ,25-DIHIODROXIVITAMINA D<sub>3</sub> (CALCITRIOL).

La hormona calcitriol incluye un anillo A, un seco anillo B, un biciclo CD, y una cadena lateral flexible. Teniendo en cuenta la estructura, el modo de acción, y su activación, la hormona calcitriol pertenece a la misma familia que las hormonas esteroides clásicas tales como la aldosterona, testosterona, estradiol, progesterona, cortisol y ecdisterona (Figura 3).<sup>8</sup>

**Figura 3:** Estructura del calcitriol y otras hormonas esteroides.



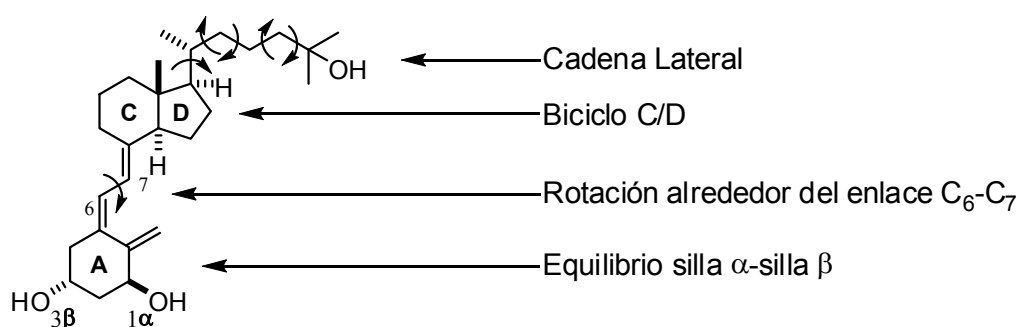
(7) Rochel N, Moras D. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, 6, 1229-1241.

(8) Norman AW, Litwark GL. *Hormones*. Academic Press, New York **1979**.

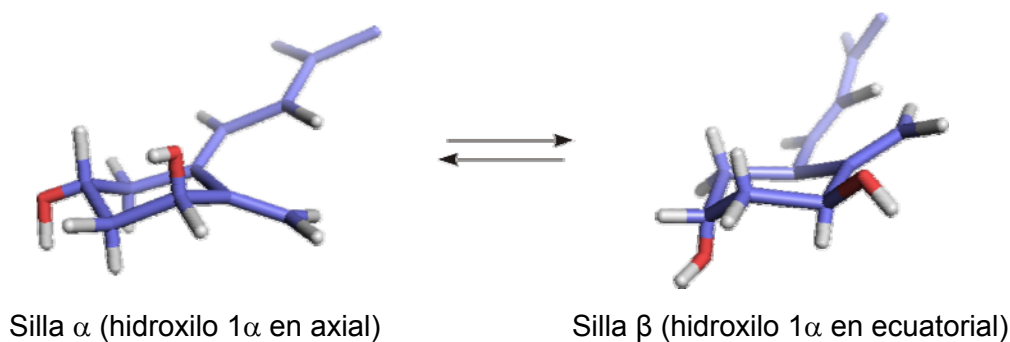
Este tipo de compuestos se caracterizan por un núcleo estructural básico de cuatro anillos fusionados conocidos como sistema ciclopentanoperhidrofenantreno.

Una de las características de la vitamina D<sub>3</sub> y sus metabolitos, entre los que se incluye el calcitriol, es su flexibilidad conformacional comparada con la rigidez de otras hormonas esteroidales (Figura 4 y 5).<sup>9</sup>

**Figura 4:** Flexibilidad conformacional de la hormona 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> y sus metabolitos.



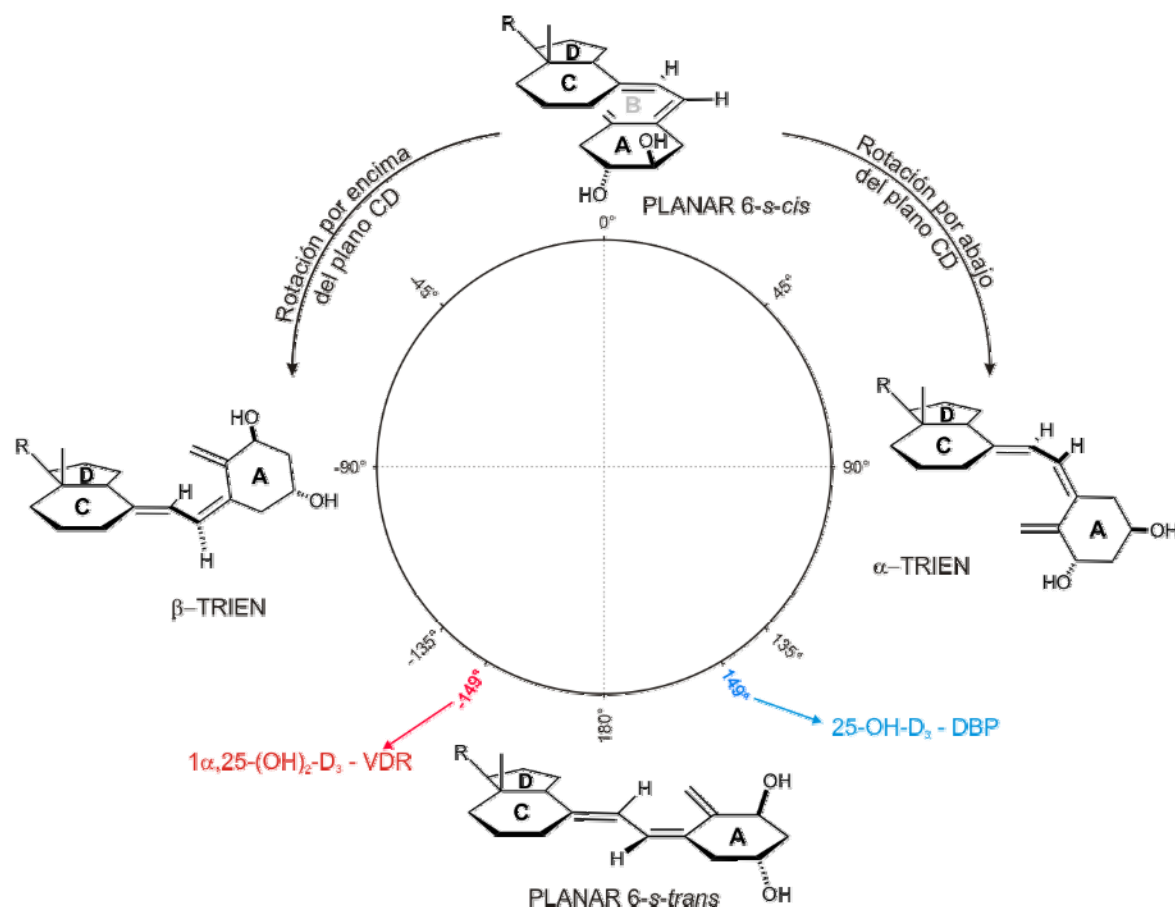
**Figura 5:** Conformación  $\alpha$  y  $\beta$  del anillo A.



En la Figura 6 se representan las diversas conformaciones posibles relativas al giro libre entre C6 y C7. Al analizar la conformación que adopta el calcitriol en el dominio de enlace al VDR y en la DBP, se observa una diferencia conformacional significativa, lo que ilustra la necesaria flexibilidad de estos compuestos para el desempeño de sus actividades.

(9) Mizwicki MT, Bula CM, Bishop JE, Norman AW. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, 97, 69-82

**Figura 6:** Rotación de 360° alrededor del enlace C6-C7, mostrando los ángulos que presenta en el dominio de unión al VDR y DBP.



### 3. NOMENCLATURA DE LA VITAMINA D.

Se denomina vitamina a aquella sustancia que se necesita en pequeñas cantidades y que el organismo no es capaz de sintetizar. Sin embargo, el cuerpo humano mismo es capaz de producir grandes cantidades de vitamina D<sub>3</sub> por fotosíntesis en la piel. Por lo tanto, la vitamina D<sub>3</sub> puede considerarse históricamente mal clasificada, porque es un precursor hormonal más bien que una vitamina. Cuando el organismo no es capaz de sintetizarla debido, sobre todo, a una exposición solar deficiente o a disfunciones génicas en su biogénesis, es necesario adquirirla por la dieta o por vía parietal, adquiriendo así matiz de vitamina.

Las vitaminas D se consideran, a efectos de nomenclatura, como seco-esteroides ya que su esqueleto proviene de la ruptura del enlace C9-C10 correspondiente al anillo B del esteroide precursor. Así, el 7-deshidrocolesterol (**3a**, Figura 1) y el

ergosterol (**3b**) son los precursores de la vitamina D<sub>3</sub> (**1a**) y de la vitamina D<sub>2</sub> (**1b**), respectivamente.

Los esteroides son compuestos naturales que se caracterizan por poseer un sistema de 4 anillos fusionados (A, B, C y D) que conforman una estructura rígida (Figura 3). Los sustituyentes que se dirigen hacia la cara inferior de la molécula se denominan  $\alpha$  y los que se dirigen hacia la cara superior se denominan  $\beta$ .<sup>10</sup> La numeración y denominaciones estereoquímicas utilizadas para los esteroides se mantienen en las vitaminas D y en sus metabolitos, conservándose así en los anillos A, C y D las denominaciones  $\alpha$  y  $\beta$  esteroidales (Figura 1). Según recomienda la IUPAC,<sup>11</sup> a lo largo de este trabajo se adoptará el nombre de calcitriol para la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, [1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, estructura **2**, Figura 2]

#### 4. BIOGÉNESIS DE LA VITAMINA D<sub>3</sub>.

La biosíntesis de la vitamina D<sub>3</sub> comienza con la transformación del colesterol en 7-deshidrocolesterol, o pro-vitamina D<sub>3</sub>, por acción de la luz solar (Figura 7).<sup>12</sup> Este sufre una ruptura fotoquímica del anillo B produciendo la previtamina D<sub>3</sub>, la cual posee dos conformeros estables *s-cis*, *s-cis* y *s-cis*, *s-trans*.

El conformero *cis*, *trans* es el termodinámicamente más estable, sin embargo el conformero *cis*, *cis* es el único capaz de convertirse en la vitamina D<sub>3</sub> mediante un desplazamiento sigmatrópico antarafacial [1,7] de hidrógeno.

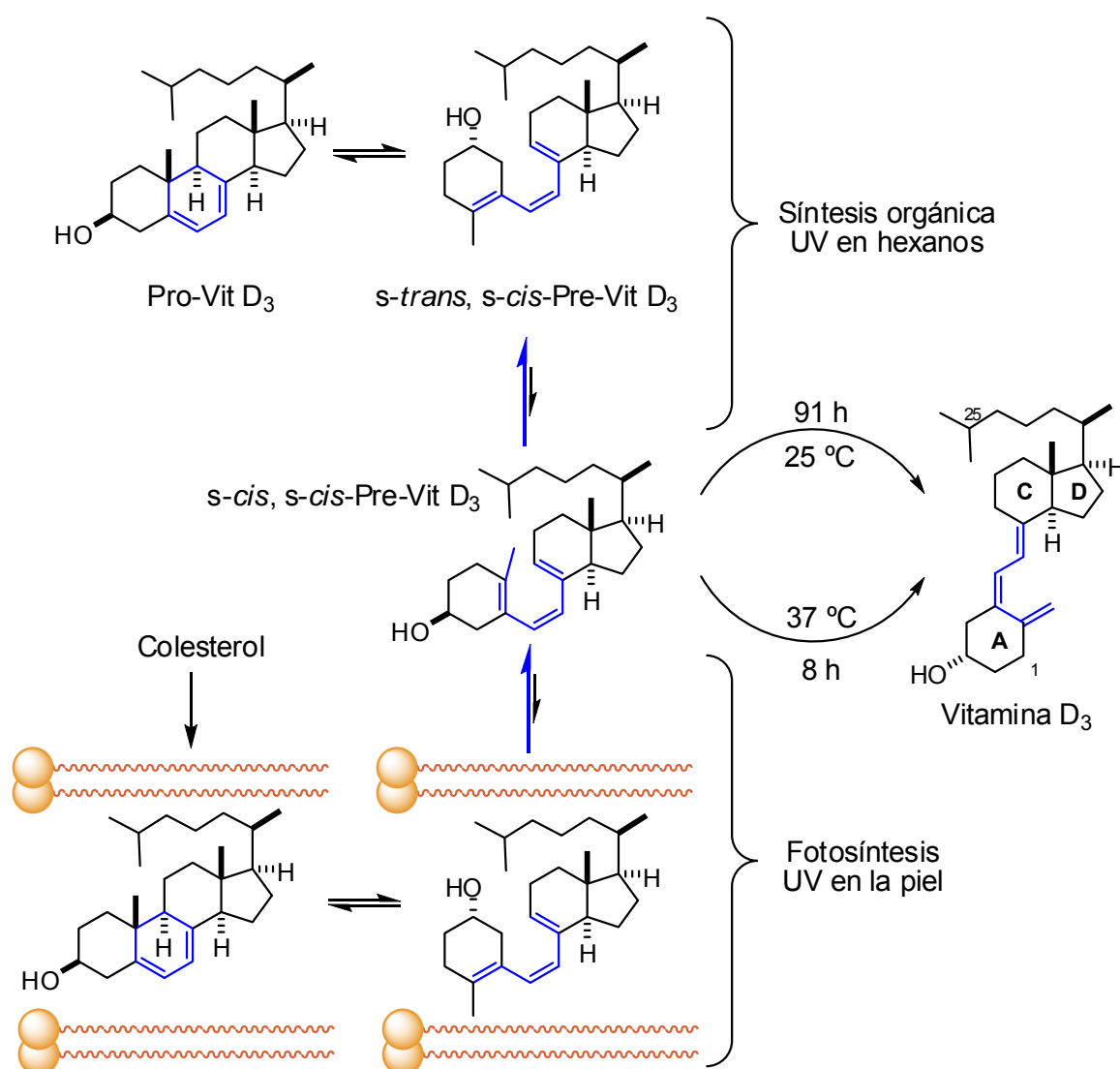
---

(10) Eliel EI, Manoharan M. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1959.

(11) (a) *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 1511-1516. (b) *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 2nd edition, Portland Press, **1992**, pages 242-246. (c) *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *218*, 342-346. (d) *Endokrinol. Inform.* **1982**, *2*, 53-62. (e) *Eur. J. Biochem.* **1982**, *124*, 223-227. (f) *Mol. Cell. Biochem.* **1982**, *49*, 177-181

(12) Holick MF. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, 619-630.

**Figura 7:** Comparación entre la fotólisis del 7-deshidrocolesterol en la piel y en hexanos. El equilibrio está desplazado hacia la forma *s-cis, s-cis*, *s-cis* en el sistema biológico.



El conformero *s-cis, s-cis* de la previtamina está estabilizado en la bicapa fosfolipídica tanto por interacciones hidrófilas entre el hidroxilo del C3 y la cabeza polar de los lípidos, como por la interacción de tipo Van der Waals entre el anillo esteroidal y la cadena alifática de los lípidos.<sup>13</sup> Estas interacciones desfavorecen la conversión del conformero *s-cis, s-cis* en el *s-trans, s-cis*, facilitando la isomerización hacia la vitamina D<sub>3</sub>. Por motivos estéricos la vitamina D<sub>3</sub>, una vez formada, atraviesa la membrana al espacio extracelular.

(13) Holick MF, Tian XQ, Allen M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92, 3124-3126.

## 5. FUENTES Y NECESIDADES DIARIAS RECOMENDADAS DE VITAMINA D<sub>3</sub>.

Además de la producción endógena por fotosíntesis en la piel, la vitamina D se puede obtener a partir de la dieta. Apenas unos pocos alimentos como aceites de pescado, champiñones y la yema de huevo contienen cantidades significativas de vitaminas D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>. A partir de 1930 y promovido por Estados Unidos,<sup>14</sup> muchos alimentos se enriquecen con vitamina D<sub>3</sub>, por eso hoy en día las cantidades mínimas recomendadas son fáciles de obtener en la dieta.<sup>15</sup>

En la Tabla 1 se ilustran las cantidades diarias de vitamina D<sub>3</sub> recomendadas (RDA-Recommended Daily Allowance).<sup>16</sup> El RDA de 400 UI estaba basado en la vitamina D<sub>3</sub> contenida en una cucharilla de aceite de hígado de bacalao. Sin embargo, un estudio reciente demuestra que estos valores de RDA son demasiado bajos para mantener un óptimo nivel de vitamina D<sub>3</sub>.<sup>17</sup>

**Tabla 1:** Cantidades diarias de vitamina D<sub>3</sub> recomendadas.

Edad	Hombre	Mujer
19-50	5 µg o 200 UI	5 µg o 200 UI
51-69	10 µg o 400 UI	10 µg o 400 UI
70-	15 µg o 600 UI	15 µg o 600 UI

\*1 µg vitamina D<sub>3</sub>=40 Unidades internacionales (UI)

En el 5° Simposio Internacional sobre Aspectos Alimenticios de Osteoporosis de Mayo de 2003, se reunieron seis expertos que establecieron unos niveles mínimos para el calcitriol en suero. Recientemente publicaron estas conclusiones<sup>18</sup> y establecieron que el nivel mínimo en el suero de la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (25-OH-D<sub>3</sub>) para una óptima prevención de fractura debe estar entre 50 y 80 nMol/L. El umbral de consenso para la absorción de calcio y supresión de la hormona paratiroidea (PTH, Paratyroid Hormone) fue de 75 nMol/L. Por lo tanto, el hombre o mujer de media edad necesitan 800-1.000

(14) Holick MF. *J. Cell. Biochem.* **2003**, 88, 296-307.

(15) Andersen R, Brot C, Ovensen L. Towards A strategy for optimal vitamin D fortification (OPTIFORD). *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* **2001**, 11, 74-77.

(16) National Academy of Sciences, *Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes: for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride.* Washington, DC: National Academic Press. **1997**, 38-144.

(17) Schneider DL, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* **2006**, 13, 483-490.

(18) Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF. *Osteopor. Int.* **2005**, 16, 713-715.

UI/día de la vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) para mantener en el suero un nivel más alto que 75 nMol/L de 25-OH-D<sub>3</sub>, que es la concentración en el suero requerida para la supresión del PTH. La vitamina D<sub>3</sub> aumenta la concentración en el suero de 25-OH-D<sub>3</sub> más eficazmente que la vitamina D<sub>2</sub> de origen vegetal (ergocalciferol).<sup>19</sup>

Como la vitamina D<sub>3</sub> es liposoluble, algunos investigadores están preocupados con la recomendación de una cantidad excesiva de vitamina D<sub>3</sub>. Hay pocos datos sobre su toxicidad. La hipercalcemia no se desarrolla, por lo general, hasta niveles de 25-OH-D<sub>3</sub> en el suero superiores a 500 nMol/L y es más común por encima de 750 nMol/L.<sup>20</sup> Dosis únicas de 600.000 UI de vitamina D<sub>3</sub> han sido administradas sin producir hipercalcemia.<sup>21</sup> Según la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, no existe riesgo para la salud asociado al uso regular de un suplemento de vitamina D<sub>3</sub> de 2.000 UI diarias.<sup>22</sup>

## **6. METABOLISMO DE LA HORMONA CALCITRIOL.**

La vitamina D<sub>3</sub> es una pro-hormona y no se le conoce ninguna función biológica en el organismo, excepto la de servir como precursor biosintético de otros metabolitos, principalmente su forma activa, el calcitriol, que se obtiene por hidroxilaciones sucesivas de la vitamina D<sub>3</sub> en las posiciones 1 $\alpha$  y 25.

La hormona calcitriol, como ya se ha mencionado, es el metabolito activo de la vitamina D<sub>3</sub> responsable de todos los efectos biológicos conocidos. Su estructura constituye la base del diseño de nuevos análogos de interés terapéutico. La comprensión de su metabolismo es fundamental en las aplicaciones clínicas y el estudio de su mecanismo de acción proporciona la base para el conocimiento de la relación estructura-actividad.

Las principales rutas metabólicas para la producción y desactivación de la hormona se exponen en el Figura 8. Hasta la fecha se han aislado y caracterizado unos 37 metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub>. La vitamina D<sub>3</sub> no

---

(19) Trang HM, Cole DE, Rubin LA. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 854-858.

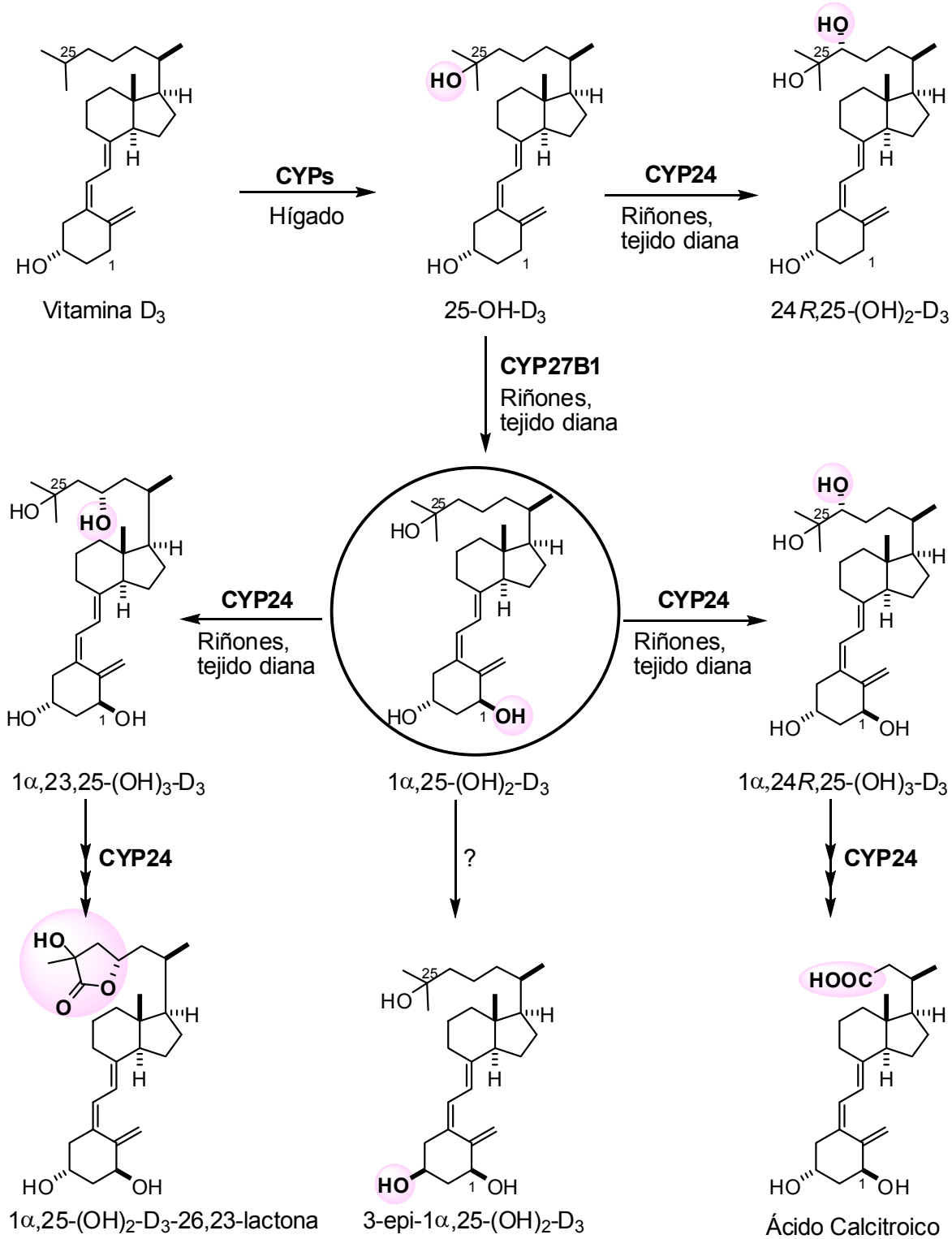
(20) Vieth R. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *69*, 842-856.

(21) Vieth R, Chan PC, MacFarlane GD. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 288-294.

(22) Heaney RP, Davies KM, Chen TC. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 204-210.

permanece largos períodos de tiempo en el torrente sanguíneo ya que se acumula en el tejido adiposo o en el hígado para su posterior metabolización.

**Figura 8:** Metabolismo de la hormona calcitriol.



### 6.1 Anabolismo del calcitriol.

La biosíntesis del calcitriol a partir de la vitamina D<sub>3</sub> se realiza en dos pasos. Una primera hidroxilación en la posición C25 en el hígado, y una segunda hidroxilación en la posición C1 $\alpha$  en los riñones.<sup>23</sup>

### 6.2 Catabolismo del calcitriol.

El conocimiento de los mecanismos degradativos del calcitriol es de gran importancia a la hora de diseñar análogos más potentes y de acción prolongada. La conversión del calcitriol a metabolitos menos activos o completamente inactivos es mediada por caminos enzimáticos diferentes, principalmente por hidroxilaciones adicionales. El calcitriol induce directamente la expresión de la más importante enzima involucrada en su inactivación, la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina-D<sub>3</sub>-24-hidroxilasa (CYP24), un miembro de las oxidasas P450. Esta enzima hidroxila la posición C24 tanto del calcitriol como de su precursor 25-OH-D<sub>3</sub> para dar la 1 $\alpha$ ,24R,25-(OH)<sub>3</sub>-D<sub>3</sub> y 24R,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, respectivamente. Mientras este último presenta cierta bioactividad, el primero inicia el camino que finalmente conduce al inactivo e hidrosoluble catabolito final, el ácido calcitroico,<sup>24</sup> que es eliminado por la orina. Esto demuestra el papel tanto biosintético como degradativo de la enzima CYP24 que se encuentra ubicada en todos los tejidos diana para el calcitriol.<sup>25</sup> El hecho de que el calcitriol estimula la síntesis de la CYP24 constituye un mecanismo de autocontrol por *feedback* negativo de los niveles de calcitriol *in situ*.

Como consecuencia del importante papel desempeñado por el calcitriol en los procesos de proliferación y diferenciación celular, el gen para el CYP24 ha sido implicado en la génesis de algunos tipos de cáncer. Un bajo control de la expresión de este gen posee efectos carcinogénicos. De hecho, muchos tipos de cáncer, como colon, mama y una larga lista de líneas de células cancerosas, presentan un alto nivel de expresión de la CYP24, lo que demuestra que la

---

(23) (a) Tucker G, Gagnon RE, Haussler MR. *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *155*, 47-57. (b) Prosser DE, Jones G. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 664.

(24) (a) Makin G, Lohnes D, Byford V, Ray R, Jones G. *Biochem. J.* **1989**, *262*, 173. (b) Reddy GS, Tsemg KY. *Biochemistry* **1989**, *28*, 1763.

(25) Henry HL. *Steroids* **2001**, *66*, 391-398.

actividad catabólica de esta enzima limita la actividad antiproliferativa y pro-diferenciadora que presenta la hormona y sus análogos.<sup>26</sup>

Las hidroxilaciones en C23 y C26, también mediadas por CYP24, conducen al metabolito final, la calcitriollactona.<sup>27</sup> Este metabolito puede inhibir, vía interacción con el VDR, ciertas funciones de la hormona natural. Por lo tanto algunos antagonistas sintéticos son análogos de este metabolito natural.<sup>28</sup>

El calcitriol, asimismo, puede transformarse en 3-*epi*-calcitriol, un metabolito con acción biológica significativa y que parece ser más resistente al catabolismo que el calcitriol.<sup>29</sup> Las conclusiones recientes indican que la enzima (o enzimas) que producen la epimerización en C3 probablemente tiene una posición microsomal y podría diferir de las enzimas del citocromo P450 y otras epimerasas esteroidales.<sup>30</sup>

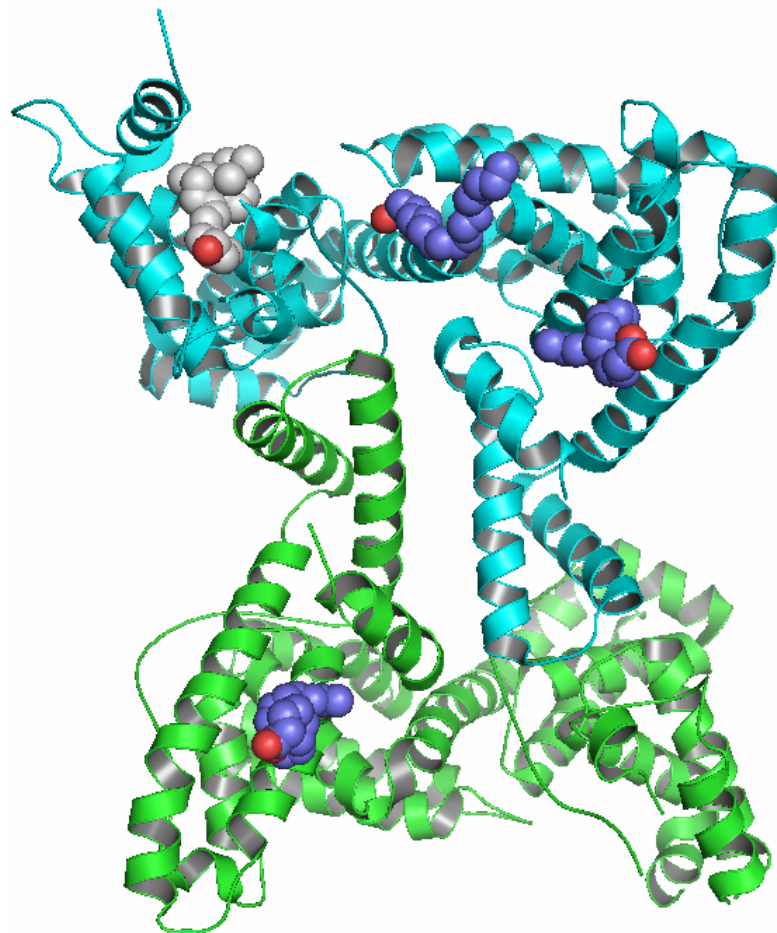
## 7. TRANSPORTE DE LA VITAMINA D<sub>3</sub> Y SUS METABOLITOS.

Como el metabolismo de la vitamina D<sub>3</sub> se produce en varias etapas y en diferentes órganos del cuerpo y como sus metabolitos son altamente lipofílicos y poco afines al medio semi-acuoso del plasma, hace falta una proteína que los transporte por el torrente sanguíneo. Tanto la vitamina D<sub>3</sub> como sus metabolitos hidroxilados 25-OH-D<sub>3</sub>, 24,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> y el calcitriol se enlazan a proteínas transportadoras. Dentro de éstas se encuentran la albúmina y otras lipoproteínas de las que la más importante es la proteína transportadora DBP ya que el 85% de estos metabolitos circulan por la sangre unidos a esta proteína.

- 
- (26) Schuster I, Egger H, Bikel H, Herzig G, Reddy GS, Stuetz A, Stuetz P, Vorisek G. *Steroids* **2001**, 66(3-5), 409-422.
- (27) Ishizuka S, Norman AW. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 7165.
- (28) (a) Ishizuka S, Miura D, Ozono K, Saito M, Eguchi H, Chokki M, Norman AW. *Steroids* **2001**, 66, 227-237. (b) Ishizuka S, Miura D, Ozono K, Saito M, Eguchi H, Chokki M, Norman AW. *Endocrinology* **2001**, 142, 59-67. (c) Miura D, Manabe K, Ozono K, Saito M, Gao G, Norman AW, Ishizuka S. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 16392-9
- (29) Brown AI, Ritter C, Slatopolsky R, Muralidharan KR, Okamura WH, Reddy GS, *J. Cell Biochem.* **1999**, 73, 106
- (30) Kamao M, Hatakeyama S, Sakaki T, Sawada N, Inouye K, Kubodera N, Reddy GS, Okano T. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, 436, 196.

A principios de esta década se ha publicado la estructura cristalina de la DBP unida a la 25-OH-D<sub>3</sub> y a una serie de análogos.<sup>31</sup> La DBP cristaliza como un dímero donde el primer fragmento (DBP-A, en verde en la Figura 9) se une a una molécula de ácido oleico (azul oscuro) y el segundo fragmento (DBP-B, en azul) se une a la 25-OH-D<sub>3</sub> (ceniza) y a dos moléculas de ácido oleico.

**Figura 9:** Estructura cristalina del dímero de la proteína transportadora DBP con el calcitriol en gris y las moléculas de ácido oleico en azul.



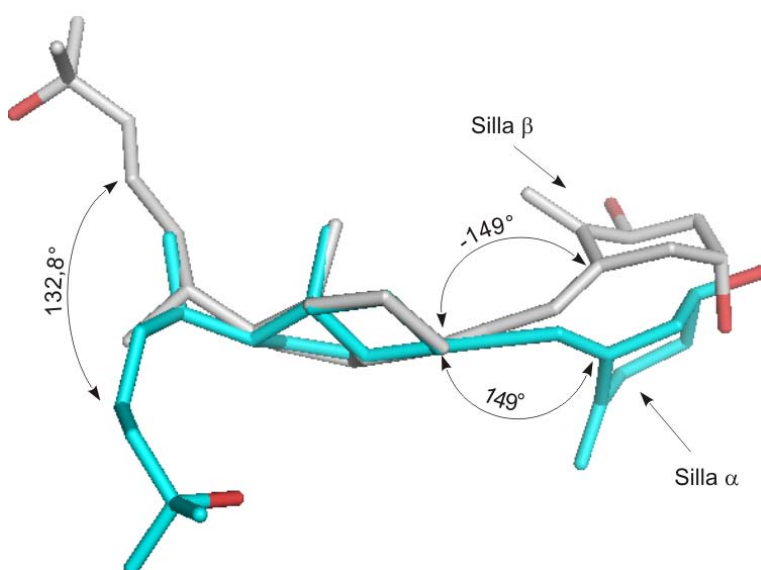
Esta estructura muestra que la región de unión de la 25-OH-D<sub>3</sub> es una hendidura en la superficie de la proteína y está parcialmente en contacto con el exterior. Esta forma de enlace es compatible con la función de transporte que desempeña la proteína, puesto que la 25-OH-D<sub>3</sub> tiene facilitada su entrada y salida.

(31) Verboven C, Rabijns A, De Maeyer M, Van Baelen H, Bouillon R, De Ranter C. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 131-136.

La estructura que adopta la 25-OH-D<sub>3</sub> unido a la DBP es muy diferente de la que tiene la hormona unida al receptor nuclear de la vitamina D<sub>3</sub> (VDR). En la Figura 10 se pueden observar las diferencias más significativas entre las conformaciones que adopta el calcitriol en el receptor mutado de Moras, de color gris, y la conformación del 25-OH-D<sub>3</sub> en el DBP, de color azul.

Además de transportar y almacenar los metabolitos de la vitamina D<sub>3</sub>, la DBP afecta a su farmacocinética, pues los protege de la degradación metabólica.<sup>32</sup> Este efecto debe tenerse en cuenta en el diseño de análogos del calcitriol pues la actividad biológica va a depender de la concentración libre (no asociada a la DBP) y no de la concentración total del análogo. El complejo formado por la DBP y la 25-OH-D<sub>3</sub> se reabsorbe en el tubo proximal renal y es llevado a las células encargadas de la 1 $\alpha$ -hidroxilación.

**Figura 10:** Comparación entre las estructuras cristalinas del calcitriol unido al VDR (gris) y la 25-OH-D<sub>3</sub> unida a la DBP (azul).



## 8. USOS CLÍNICOS Y BIOACTIVIDAD DEL CALCITRIOL Y ANÁLOGOS.

Las funciones clásicas de la hormona tienen lugar en el intestino, riñones y glándula paratiroidea y están relacionadas con su papel fundamental en la homeostasis del calcio y del fósforo, promoviendo la absorción del calcio y

(32) (a) White P, Cooke N. *Trends Endocrinol. Metab.* **2000**, *16*, 320-327. (b) Safadi FF. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 239-251.

facilitando la mineralización de los huesos.<sup>33</sup> Además de estas actividades, el calcitriol también posee otras funciones en las que están implicados otros órganos y sistemas no clásicos, como demuestra el hecho de que el receptor de la vitamina D (VDR) se encuentra en células de diferentes tejidos tales como la piel, el esqueleto, el tracto digestivo, el corazón, los pulmones, el sistema inmunológico, el colon, etc.<sup>34</sup>

### 8.1. Funciones clásicas.

Como veremos más adelante, para realizar sus funciones, la hormona se vale de mecanismos genómicos y no genómicos. En el mecanismo genómico, la hormona activa la transcripción de los genes que codifican las proteínas responsables de la absorción de calcio intestinal y de la movilización del calcio óseo. La hormona facilita la absorción, a través del intestino, de los iones calcio y fosfato procedentes de la dieta y también promueve la reabsorción de calcio a través de los túbulos renales y la absorción rápida de calcio a través del intestino, proceso conocido como transcaltaquia que es demasiado rápido para poder ser explicado por un mecanismo genómico.

#### 8.1.1. Homeostasis del calcio.

El calcio es el catión más abundante del organismo e imprescindible para la construcción del esqueleto, la transmisión neuronal, la contracción muscular, la regulación enzimática, la estabilización de membranas, la coagulación sanguínea, el desarrollo embrionario y la adhesión celular. Todo esto hace que la homeostasis del calcio sea uno de los procesos más regulados y controlados del organismo. La concentración de calcio iónico se mantiene constante en 0,10 mg por mL de plasma sanguíneo. El nivel del calcio se controla mediante una serie de hormonas, entre las cuales el calcitriol tiene un papel fundamental. En la Figura 11 se muestra de forma resumida la homeostasis del calcio y las funciones biológicas del calcitriol.

- 
- (33) (a) Spiess YH, Price PA, Deftos JL, Manolagas SC. *Endocrinology* **1986**, *16*, 1340-1346. (b) Norman AW. *Vitamin D, the Calcium Homeostatic Steroid Hormone*, **1979**, Academic Press: New York. (c) Chen TC, Castillo L, Korycka-Dahl M, DeLuca HF. *J. Nutr.* **1974**, *104*, 1056-1060.
- (34) (a) Holick MF, Editor. *Vitamin D: Physiology, Molecular Biology and Clinical Applications* **1999**, Humana press, Totowa NJ, USA. (b), Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 1193-1231. (c) DeLuca HF, Zeierld C. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 54-75. (d) Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. *Endocr. Rev.* **1995**, *16*, 200-257.



---

esqueleto paralizando la reabsorción ósea y promoviendo la deposición de calcio en los huesos.

### **8.1.2. Raquitismo y Osteomalacia.**

La mayor parte de los casos de osteomalacia y raquitismo se deben a una deficiencia de vitamina D. Los “raquitismos dependientes de la vitamina D (RVDDs)” se deben a alteraciones en el metabolismo de la vitamina D o sus receptores. El raquitismo dependiente de la vitamina D tipo I (RVDD-I) se produce a causa de una mutación en el gen que codifica la 1- $\alpha$ -hidroxilasa renal. Se transmite como herencia autosómica recesiva y suele manifestarse en los dos primeros años de vida y se corrige con la administración de dosis fisiológicas de calcitriol. El raquitismo dependiente de la vitamina D tipo II (RVDD-II), es una alteración genética del receptor de la vitamina D también denominado raquitismo hereditario resistente al calcitriol que es transmitido de forma autosómica recesiva.

### **8.2. Funciones no clásicas.**

La expresión de VDR en una amplia variedad de líneas celulares, tanto maduras como indiferenciadas, juntamente con la participación del VDR en procesos de diferenciación celular, inhibición de la proliferación celular, inmunomodulación en macrófagos y en linfocitos activados T y B, artritis reumatoide (RA), sinoviocitos, sarcoma de Kaposi (KS), células de cáncer de mama, próstata y colon, han apuntado pruebas crecientes del efecto terapéutico de sus ligandos en varias enfermedades humanas, así como en varios modelos animales de enfermedades no tradicionalmente relacionadas con sus funciones clásicas. Estos estudios han conducido al desarrollo de análogos del calcitriol para el tratamiento de la psoriasis,<sup>35</sup> hiperparatiroidismo secundario<sup>36</sup> y la osteoporosis.<sup>37</sup> Además, los análogos del calcitriol han mostrado alguna eficacia en procesos clínicos del cáncer de próstata, mielodisplasia (un estado precanceroso) y artritis psoriásica, entre otros. La misma eficacia se ha mostrado en la prevención y el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes en varios animales modelo.

---

(35) Fogh K, Kragballe K. *Curr. Pharm. Des.* **2000**, *6*, 961–972.

(36) Slatopolsky E, Brown AJ. *Blood Purif.* **2002**, *20*, 109–112.

### **8.2.1. Animales VDR *knockout* (VDR-KO).**

Los estudios en ratones genéticamente modificados, en que se suprime la expresión para el gen del VDR (VDR *knockout* o VDR-KO) y mutaciones naturales en el VDR humano han proporcionado especulaciones considerables sobre las funciones fisiológicas del calcitriol.

Los animales modelos permitieron entender mejor los detalles moleculares de la acción del calcitriol en el transporte de fosfato, calcio, y además, revelaron un amplio espectro de actividades más allá de los efectos calcémicos del calcitriol. Éstos efectos llamados “no clásicos” fueron predichos anteriormente cuando se descubrieron las acciones *in vitro* del calcitriol en la proliferación y diferenciación celular en varios sistemas fisiológicos. Más exactamente, el calcitriol ejerce importantes efectos en el crecimiento del pelo (resultando en total alopecia en ratones VDR-KO), células de la piel, en la mayor parte de tipos celulares del sistema inmunológico,<sup>38</sup> en la bilis, en el sistema cardiovascular, y en la maduración y fisiología de las células musculares.<sup>39</sup>

### **8.2.2. CÁNCER.**

En vista de los importantes efectos del calcitriol en la proliferación y diferenciación celular y los sugestivos datos epidemiológicos que apuntan a una relación inversa entre la exposición a la luz UV o deficiencia en vitamina D y cáncer, se exponen de forma resumida los datos sobre los efectos del calcitriol y sus análogos en el cáncer.<sup>40</sup>

#### **8.2.2.1. Cáncer de próstata.**

El cáncer de próstata es el segundo tipo de cáncer más frecuente en el hombre después del cáncer de piel. También es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos.<sup>41</sup> El descubrimiento de que el VDR es expresado en la próstata normal y cancerosa, hiperplasia benigna de la próstata (BPH) y líneas

---

(37) Richey F, Ethgen O, Bruyere O, Reginster JY. *Osteoporos Int.* **2004**, *15*, 301–310.

(38) Mathieu C, Adorini L. *Trends Mol. Med.* **2002**, *8* (4), 174–179.

(39) Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. *Endocr. Rev.* **2005**, *26* (5), 662–687.

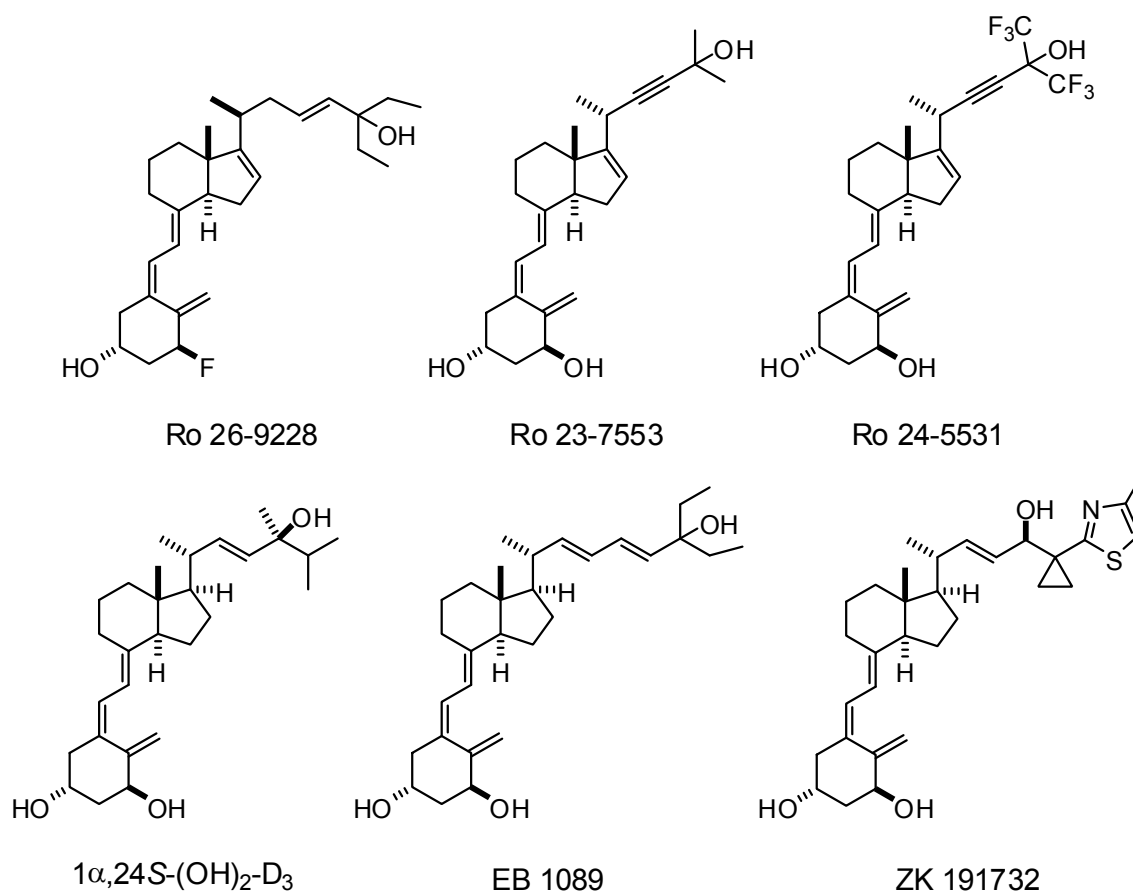
(40) Roger B, Guy E, Lieve V, Chantal M, Geert C, Annemieke V. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *102*, 203–211.

celulares de cáncer de próstata llevó al reconocimiento de que BPH y el cáncer de próstata podrían ser dianas potenciales para análogos del calcitriol.<sup>42</sup> Los estudios epidemiológicos indican una relación inversa entre tasas de mortalidad debidos a cáncer de próstata y la exposición a la luz UV necesaria para la síntesis de vitamina D en la piel.<sup>43</sup> De hecho, uno de los principales factores de riesgo para desarrollar cáncer de próstata es el bajo nivel sérico de 25-OH-D<sub>3</sub>.<sup>44</sup>

Varios estudios *in vitro* han demostrado que el calcitriol y sus análogos sintéticos inhiben la proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata,<sup>45</sup> BPH y células epiteliales inmaduras de próstata normal.<sup>46</sup> Los análogos de calcitriol también inhiben el crecimiento celular en tumores y metástasis *in vivo*.<sup>47</sup> El calcitriol presenta una variedad de acciones celulares en cáncer de próstata, que incluyen la detención del crecimiento en la etapa G0/G1 del ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación celular tumoral y la interacción con andrógenos.

El cetoconazol, un inhibidor del citocromo P450 hidroxilasa, también aumenta el efecto inhibitor del calcitriol y su análogo sintético EB1089 (Figura 12) en el crecimiento de células de cáncer de próstata humano.<sup>48</sup> Por lo tanto, el uso de inhibidores de la 24-hidroxilasa puede realzar la actividad inhibitor del calcitriol y sus análogos sintéticos en cáncer de próstata. El calcitriol ha demostrado inhibir la proliferación celular en cáncer de próstata tanto dependiente como independiente de andrógeno.

- 
- (41) Hellerstedt BA, Pienta KJ. *CA Cancer J. Clin.* **2002**, *52*, 154–179.
- (42) (a) Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. *Endocrinology* **1993**, *132*, 1952–1960. (b) Feldman D, Skowronski RJ, Peehl DM. *Diet and cancer*. New York: Plenum Press. **1995**, 53–63. (c) Kivineva M, Blauer M, Syvala H, Tammela T, Tuohimaa P. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *66*, 121–127.
- (43) Schwartz GG, Hulka BS. *Anticancer Res.* **1990**, *10*, 1307–1311.
- (44) Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P. *Cancer Causes & Control.* **2000**, *11*, 847–852.
- (45) Yang ES, Maiorino CA, Roos BA, Knight SR, Burnstein KL. *Mol. Cell Endocrinol.* **2002**, *186*, 69–79.
- (46) (a) Peehl DM, Skowronski RJ, Leung GK, Wong ST, Stamey TA, Feldman D. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 805–810. (b) Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D. *J. Cell Biochem.* **2003**, *88*, 363–371.
- (47) (a) Polek TC, Murthy S, Blutt SE, Boehm MF, Zou A, Weigel NL, Allegretto EA. *Prostate.* **2001**, *49*, 224–233. (b) Vegesna V, O’Kelly J, Said J, Uskokovic M, Binderup L, Koeffler HP. *Anticancer Res.* **2003**, *23*, 283–289.
- (48) Peehl DM, Seto E, Hsu JY, Feldman D. *J. Urol.* **2002**, *168*, 1583–1588.

**Figura 12:** Algunos análogos utilizados en el tratamiento del cáncer.

Algunos análogos sintéticos de la vitamina D<sub>3</sub>, con bajos efectos calcémicos como por ejemplo el Ro-26-9228 (Figura 12), inhiben, dependiendo de la dosis, el cáncer de próstata inducido por andrógenos, tanto en ratas intactas como ovariectomizadas. El efecto de los análogos es comparable al de los antiandrógenos y del finasteride.<sup>49</sup> Por lo tanto, los análogos del calcitriol tienen potencial de primera línea como nueva terapia para el tratamiento del cáncer de próstata.

### 8.2.2.2. Cáncer de mama.

El cáncer de mama afecta cada año a aproximadamente 200.000 mujeres en los Estados Unidos, de las cuales mueren cerca de 40.000.<sup>50</sup> Los estudios

(49) Crescioli C, Ferruzzi P, Caporali A, Mancina R, Comerci A, Muratori M, Scaltriti M, Vannelli GB, Smiroldo S, Mariani R, Villari D, Bettuzzi S, Serio M, Adorini L, Maggi M. *Endocrinology* **2003**, *144*, 3046–3057.

(50) Polar MK, Gennings C, Park M, Gupta MS, Gewirtz DA. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**, *51*, 415–421.

epidemiológicos han mostrado una relación inversa entre exposición a la luz solar y la mortalidad por cáncer de mama.<sup>51</sup>

También se observa en los casos de cáncer de mama que la región cromosómica 20q13.2, responsable de la expresión de la 24-hidroxilasa esta amplificada. Como esta hidroxilasa está implicada en la degradación del calcitriol, su aumento puede conducir a una disminución de los niveles de calcitriol en el suero, proporcionando así, un micro ambiente que conduce al crecimiento celular en ausencia del control antiproliferativo mediado por el calcitriol.<sup>52</sup> Además, se ha encontrado un nivel más reducido de calcitriol en el suero de pacientes con metástasis ósea de cáncer de mama avanzado que en pacientes en etapa temprana.<sup>53</sup>

El VDR se expresa en la mayoría de las líneas celulares de cáncer de mama, en tumores cancerígenos inducidos en mama de rata, en tejidos de mama normal, así como en tumores de cáncer de mama primario. Además, se han encontrado niveles elevados de RXR y VDR en tejidos de mama cancerosa en comparación con los de mama normal.<sup>54</sup>

El calcitriol y sus análogos sintéticos se han clasificado como inhibidores de la proliferación celular en cáncer de mama *in vitro* y en la progresión tumoral *in vivo*.<sup>55</sup>

### 8.2.2.3. Cáncer de colon.

El cáncer de colon, uno de los tumores más frecuentes en países occidentales, es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos. Estudios epidemiológicos han sugerido la participación de la vitamina D en la patogénesis de tumores colorectales. Se ha observado una asociación inversa entre el calcio,

- 
- (51) Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Young JF. *Prev. Med.* **1990**, *19*, 614–622. (b) John EM, Schwartz GG, Dreon DM, Koo J. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1999**, *8*, 399–406.
- (52) Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, Pinkel D. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 144–146.
- (53) Mawer EB, Walls J, Howell A, Davies M, Ratcliffe WA, Bundred NJ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 118–122.
- (54) (a) Bortman P, Folgueira MAAK, Katayama MLH, Snitcovsky IML, Brentani MM. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2002**, *35*, 1–9 201. (b) Friedrich M, Axt-Fliedner R, Villena-Heinsen C, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J. *Histochem. J.* **2002**, *34*, 35–40.
- (55) (a) Pinette KV, Yee YK, Amegadzie BY, Nagpal S. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 193–204.

vitamina D, consumo de leche, exposición de luz solar, los niveles séricos del 25-OH-D<sub>3</sub> y la mortalidad de cáncer de colon.<sup>56</sup> En tumores de colon se encontraron niveles de VDR más altos que en sus homólogos normales.<sup>57</sup> Las células de colon también poseen la capacidad de sintetizar calcitriol a partir de su precursor 25-OH-D<sub>3</sub> por acción de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa. Todas las observaciones indican que el calcitriol es potencialmente un agente terapéutico muy importante para la prevención y el tratamiento de cáncer colorectal.

El calcitriol y sus análogos sintéticos inhiben la proliferación celular en cánceres de colon afectando múltiples caminos implicados en el bloqueo del ciclo celular en G1, apoptosis y diferenciación celular.<sup>58</sup> El calcitriol induce la diferenciación celular en tumor de colon y también potencia la diferenciación celular en cáncer de colon HT-29 inducido por butirato y tributirina.<sup>59</sup> Usando el antagonista ZK191732 (Figura 12) se descubrió que la diferenciación celular en células Caco-2, con cáncer inducido por el butirato, es mediada por el VDR.

#### 8.2.2.4. Leucemia.

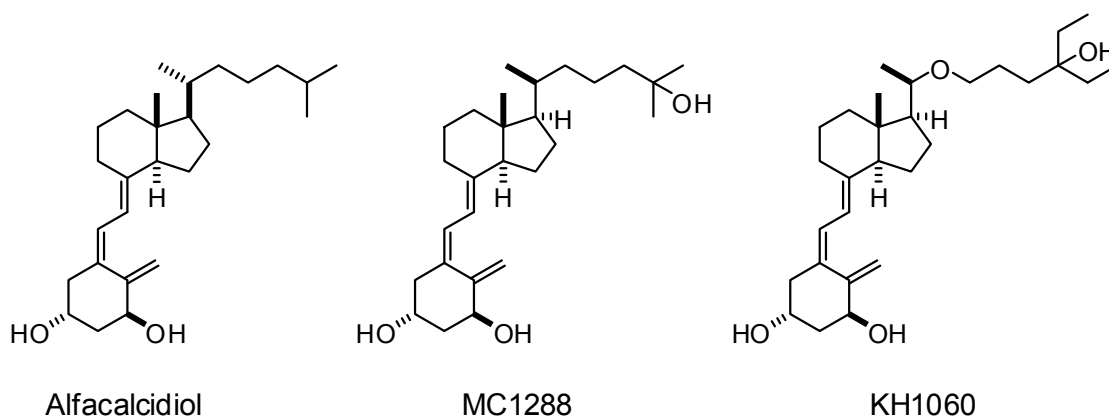
La proliferación incontrolada de células hematopoyéticas incapaces de seguir su diferenciación a células maduras causa la leucemia. El bloqueo de la maduración es también característico del síndrome mielodisplásica (MDS), un grupo clónico de células de origen hematopoyética con desórdenes en la diferenciación. Por lo tanto, los agentes que inducen la diferenciación en los precursores hematopoyéticos se consideran de potencial interés para el tratamiento de leucemias y MDS. El calcitriol también prolonga la supervivencia de ratones inoculados con células de leucemia.<sup>60</sup>

Algunos ligandos del VDR también presentan efectos cooperativos con compuestos retinoides, vitamina K<sub>2</sub> y agentes quimioterapéuticos en la

- 
- (56) (a) Vandewalle B, Adenis A, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. *Cancer Lett.* **1994**, *86*, 67–73. (b) Kallay E, Pietschmann P, Toyokuni S, Bajna E, Hahn P, Mazzucco K, Bieglmayer C, Kato S, Cross HS. *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 1429–1435.
- (57) Vandewalle B, Adenis A, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. *Cancer Lett.* **1994**, *86*, 67–73.
- (58) (a) Evans SRT, Soldatenkov V, Shechpotin EB, Bogrash E, Shechpotin IB. *Int. J. Oncol.* **1999**, *14*, 979–985. (b) Palmer HG, Gonzalez-Sancho J, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herreros AG, Lafarga M, Muñoz A. *J. Cell. Biol.* **2001**, *154*, 369–387.
- (59) Gaschott T, Steinhilber D, Milovic V, Stein J. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 1839–1843.
- (60) (a) Honma Z, Nandan D, Sly L, Knutson KL, Herrera-Velitz P, Reiner NE. *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 1583–1594. (b) Niitsu N, Umeda M, Honma Y. *Leuk. Res.* **2000**, *24*, 1–9.

diferenciación celular de leucemia mieloide.<sup>61</sup> La respuesta hematológica más intensa y duradera ha sido observada en pacientes MDS tratados con calcitriol y alfalcaldiol (Figura 13).<sup>62</sup>

**Figura 13:** Alfalcaldiol, MC1288 y KH1060



#### 8.2.2.5. Otras enfermedades hiperproliferativas.

La presencia de VDR en queratinocitos y la capacidad del calcitriol para inducir su diferenciación e inhibir su proliferación, indican su potencial utilidad en el tratamiento de carcinoma de célula *Squamous* (SCC) de cabeza, cuello y trato aerodigestivo. El calcitriol inhibe el crecimiento de células SCC *in vitro* e *in vivo*.<sup>63</sup>

Sarcoma de Kaposi (KS) y tejido tumoral de linfoma muestran sobreexpresión de VDR y de su mRNA y su proliferación es inhibida por el calcitriol *in vitro* e *in vivo*.<sup>64</sup>

- (61) (a) James SY, Williams MA, Newland AC, Colston KW. *Gen. Pharmacol.* **1999**, *32*, 143–154. (b) Kanatani Y, Makishima M, Ishikawa I, Ogasawara Y, Kawahara N, Motoyoshi K, Nagata N, Honma Y. *Exp. Hematol.* **1998**, *26*, 198–206. (c) Funato K, Miyazawa K, Yaguchi M, Gotoh A, Ohyashiki K. *Leukemia.* **2002**, *16*, 1519–1527.
- (62) (a) Motomura S, Kanamori H, Maruta A, Kodama F, Ohkubo T. *Am. J. Hematol.* **1991**, *38*, 67–68. (b) Mellibovsky L, Diez A, Perez-Vila E, Serrano S, Nacher M, Aubia J, Supervia A, Recker RR. *Br. J. Hematol.* **1998**, *100*, 516–520. (c) Santini V, Ferrini PR. *Br. J. Hematol.* **1998**, *102*, 1124–1138.
- (63) (a) Hershberger PA, Yu W-D, Modzelewski RA, Rueger RM, Johnson CS, Trump DL. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1043–1051. (b) Enepekides DJ, Black MJ, White JH. *J. Otolaryngol.* **1999**, *28*, 83–89. (c) Lin R, Nagai Y, Sladek R, Bastien Y, Ho J, Petrecca K, Sotiropoulou G, Diamandis EP, Hudson TJ, White JH. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 1243–1256.
- (64) (a) Jenner RG, Maillard K, Cattini N, Weiss RA, Boshoff C, Wooster R, Kellam P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**, *100*, 10399–10404. (b) Masood R, Nagpal S, Zheng T, Cai J, Tulpule A, Smith DL, Gill PS. *Blood* **2000**, *96*, 3188–3194.

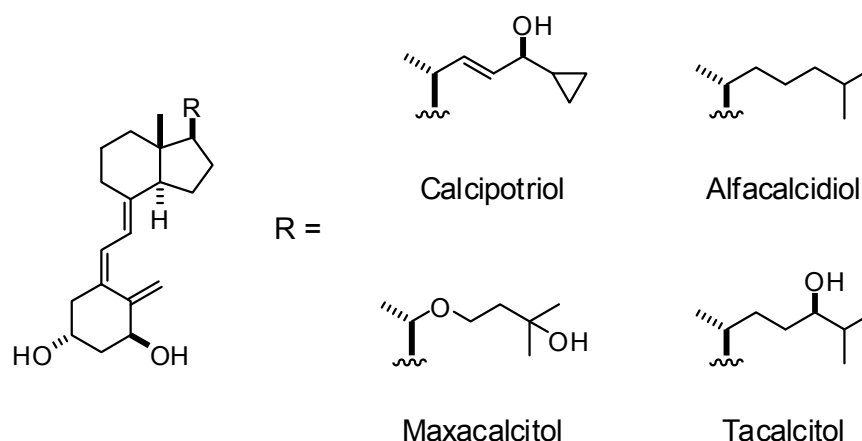
El calcitriol ejerce potentes efectos inmunomodulador en muchos tipos de células inmunes, incluyendo células inmaduras y adaptadas.<sup>65</sup> Se han observado distintos efectos del calcitriol en varios modelos de enfermedad autoinmunes como por ejemplo: lupus eritematoso sistémico (SLE),<sup>66</sup> diabetes,<sup>67</sup> artritis,<sup>68</sup> encefalomielitis alérgica experimental (EAE)<sup>69</sup> y enfermedad inflamatoria del intestino (IBD).<sup>70</sup>

Entre los análogos empleados en el tratamiento de desordenes inmunes se encuentra los ya citados MC1288 y KH1060 (Figura 13).

#### 8.2.4. Psoriasis.

La psoriasis, que es un desorden inflamatorio recurrente de la piel, afecta aproximadamente al 2% de la población. Además, el 5-10% de los pacientes desarrollan la artritis psoriática, con inflamación y de las articulaciones de las manos y los pies. La psoriasis se caracteriza por la hiperproliferación y diferenciación anormal de queratinocitos. Las observaciones de que los queratinocitos y las células T expresan VDR y que el calcitriol es un potente estimulador de la diferenciación de queratinocitos han sugerido el uso clínico de análogos de calcitriol para el tratamiento de la psoriasis (Figura 14).<sup>71</sup>

- 
- (65) (a) DeLuca HF, Cantorna MT. *FASEB J.* **2001**, *15*, 2579–2585. (b) Mathieu C, Adorini L. *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, 174–179. (c) Adorini L. *Int. Immunopharmacol.* **2002**, *2*, 1017–1028.
- (66) (a) Koizumi T, Nakao Y, Matsui T, Nakagawa T, Matsuda AS, Komoriya K. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1985**, *77*, 396–404. (b) Mathieu C, Casteels K, Waer M, Laureys J, Valckx D, Bouillon R. *Transplant Proc.* **1998**, *30*, 541.
- (67) (a) Gysemans C, Van Etten E, Overbergh L, Verstuyf A, Waer M, Bouillon R, Mathieu C. *Clin. Exp. Immunol.* **2002**, *128*, 213. (b) Overbergh L, Decallonne B, Waer M, Rutgeerts O, Valckx D, Casteels KM, Laureys J, Bouillon R, Mathieu C. *Diabetes* **2000**, *49*, 1301–1307. (c) Mauricio D, Mandrup-Poulsen T, Nerup J. *Diabetes Metab. Rev.* **1996**, *12*, 57–68. (d) Mathieu C, Waer M, Casteels K, Laureys J, Bouillon R. *Endocrinology* **1995**, *136*, 866–872. (e) Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. *Diabetes* **2002**, *51*, 1367–1374.
- (68) (a) Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 68–72. (b) Larsson P, Mattsson L, Klareskog L, Johnsson C. *Clin. Exp. Immunol.* **1998**, *114*, 277–283. (c) Tsuji M, Fujii K, Nakano T, Nishii Y. *FEBS Lett.* **1994**, *337*, 248–250.
- (69) (a) Garcion E, Sindji L, Nataf S, Brachet P, Darcy F, Montero-Menei CN. *Acta Neuropathol.* **2003**, *105*, 438–448. (b) Meehan TF, DeLuca HF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 5557–5560. (c) Nashold FE, Hoag KA, Goverman J, Hayes CE. *J. Neuroimmunol.* **2001**, *119*, 16–29. (d) Nashold FE, Miller DJ, Hayes CE. *J. Neuroimmunol.* **2000**, *103*, 171–179. (e) Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, DeLuca HF. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 5314–5319. (f) Hayes CE, Cantorna MT, DeLuca HF. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1997**, *216*, 21–27.
- (70) Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2648–2652.
- (71) (a) Provedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. *Science* **1983**, *221*, 1181–1183. (b) Feldman D, Chen T, Hirst M, Colston K, Karasek M, Cone C. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1980**, *51*, 1463–1465.

**Figura 14:** Análogos utilizados en el tratamiento de la psoriasis.

Las primeras pruebas clínicas que apoyan el uso de análogos de la vitamina D<sub>3</sub> fueron obtenidas fortuitamente cuando un paciente tratado oralmente de osteoporosis con 1 $\alpha$ -OH-D<sub>3</sub> (alfacalcidol, Alfarol, Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.; Leo Pharmaceutical Products and Teijin Ltd.) mostró una remisión notable en las lesiones psoriáticas.<sup>72</sup> Posteriormente, se obtuvieron resultados clínicos prometedores usando alfacalcidol oral, calcitriol oral y tópico y 1 $\alpha$ ,24R-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> tópico (tacalcitol, TV-02, Bonalfa, Teijin Ltd.). En estos procesos clínicos aproximadamente el 70-80% de los pacientes mostraron una marcada mejoría observándose la restauración completa de las lesiones en 20-25% de pacientes.<sup>73</sup> Actualmente se usa el calcitriol en varios países para el tratamiento de la psoriasis.<sup>74</sup>

El calcipotriol (MC903, Daivonex, Leo Pharmaceutical Products) bloquea la hiperproliferación e induce la diferenciación de queratinócitos y, además, ayuda a remitir el proceso inflamatorio con efecto hipercalcémico reducido. El maxacalcitol es otro análogo utilizado en Japón para el tratamiento de la psoriasis (OCT, Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.) que presenta una eficacia aproximadamente diez veces mayor que el calcipotriol o el tacalcitol en la supresión de la proliferación de queratinócitos *in vitro* (Figura 14).

(72) Morimoto S, Kumahara Y. *Med. J. Osaka Univ.* **1985**, *35*, 51–54.

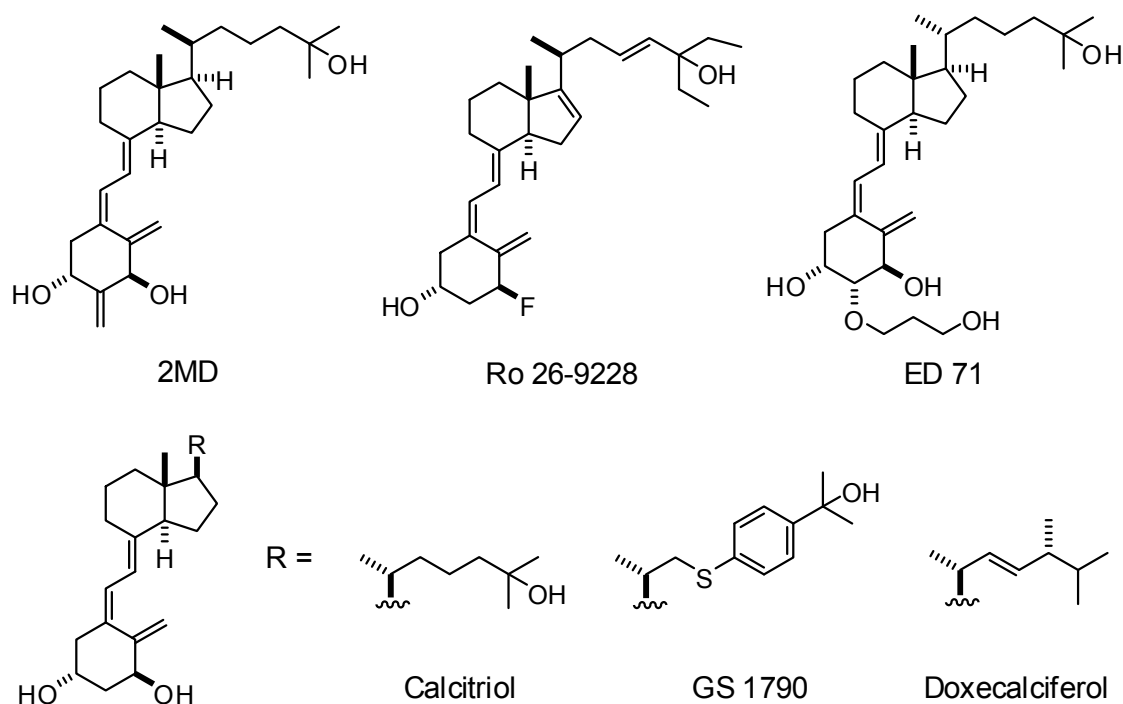
(73) Nagpal S, Lu J, Boehm MF. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1661–1679.

(74) (a) Langner A, Stapor W, Ambroziak M. *Br. J. Dermatol.* **2001**, *144*, 11–16. (b) Barker JN, Berth-Jones J, Groves R, Omerod AD, Rizova E, Griffiths CE. *J. Dermatolog. Treat.* **2003**, *14*, 14–21.

### 8.2.5. Osteoporosis.

La osteoporosis es una enfermedad metabólica común caracterizada por la reducción de la masa ósea y el deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, aumentando la fragilidad ósea y el riesgo de desarrollar fracturas. Varias condiciones pueden conducir a la osteoporosis, como la deficiencia de estrógeno y andrógeno, el exceso de glucocorticoides, la inmovilidad, el hipertiroidismo, el hiperparatiroidismo y la navegación espacial. El hueso es uno de los principales órganos diana de la vitamina D y sus análogos regulan tanto la formación como la reabsorción ósea. A causa de estas acciones el calcitriol y el alfacalcidiol (Figura 14) han sido usados para el tratamiento de osteoporosis y osteomalacia y muchos ligandos del VDR (ED-71, Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.; Ro-26-9228, Hoffmann-La Roche;  $1\alpha$ -OH-D<sub>2</sub> o doxecalCIFerol, Bone Care Internacional; 2MD y GS 1790) están en desarrollo preclínico/clínico (Figura 15).

**Figura 15:** Análogos utilizados en el tratamiento de la osteoporosis.



El mecanismo por el cual el calcitriol actúa en el anabolismo óseo no está de todo claro. El calcitriol es clásicamente considerado como un estimulador de la reabsorción ósea.<sup>75</sup> Sin embargo, *in vivo* los análogos disminuyen la reabsorción y estimula la formación ósea en animales ovariectomizados y mujeres

---

osteoporóticas. Por lo tanto, el calcitriol puede presentar actividad de reabsorción en estado normal y actividades de formación y anti reabsorción ósea en estado de osteoporosis. Una paradoja similar también se observa en la piel donde los ligandos del VDR inhiben la proliferación de queratinocitos, pero inducen la proliferación epidérmica.<sup>76</sup> Por lo tanto, parece que la acción diferencial del calcitriol en estado normal y enfermo es parte de la farmacología de la vitamina D<sub>3</sub>.

### **8.2.6. Hiperparatiroidismo secundario.**

El hiperparatiroidismo secundario es una de las principales complicaciones asociadas con la enfermedad renal crónica y se caracteriza por el continuo aumento en la síntesis y secreción de la hormona paratiroidea (PTH). La pérdida progresiva en la funcionalidad de los riñones conduce a retención de fosfato y la decadencia en la síntesis renal de calcitriol. Esto aumenta la tendencia a la hipocalcemia e hiperfosfatemia que también estimula la síntesis y secreción de la PTH ya que el calcitriol es un importante inhibidor de su síntesis. Como un exceso de PTH tiene efectos adversos en varios órganos como hueso, corazón, pulmón y aorta, se hace importante su regularización en el control de la enfermedad renal crónica.

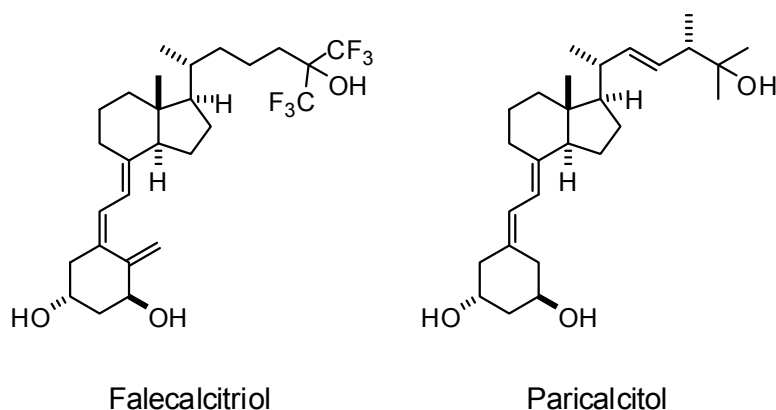
El calcitriol juega un papel importante en la regulación de la síntesis y secreción de PTH, porque actúa en su expresión génica, en la proliferación de células paratiroidales y en la regulación del equilibrio de fosfato y calcio. Basado en estos hechos, la vitamina D<sub>3</sub> es útil en el tratamiento de hiperparatiroidismo secundario. Actualmente, el maxacalcitol (Figura 14), calcitriol, doxercalciferol (Bone Care Internacional, Figura 15), paricalcitol (Abbott), y falecalcitriol (Sumitomo, Taisho; Figura 16), se utilizan en la práctica clínica.

---

(75) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. *Endocr. Rev.* **1999**, *20*, 345–357.

(76) Lutzow-Holm C, De Angelis P, Clausen OP. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **1996**, *1*, 54–59.

**Figura 16:** Análogos utilizados en el tratamiento de hiperparatiroidismo secundario.



La vitamina D<sub>3</sub> inhibe el deterioro de la función renal en modelos animales enfermos del riñón.<sup>77</sup> Pacientes de hemodiálisis crónicos que reciben vitamina D<sub>3</sub> presentan mayor supervivencia.<sup>78</sup>

## 9. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL CALCITRIOL.

Desde el descubrimiento en 1969 del receptor de la vitamina D<sub>3</sub> (VDR) se han llevado a cabo intensas investigaciones en el sistema endocrino de la vitamina D<sub>3</sub>. Ahora se sabe que el VDR se encuentra en más de 30 tejidos y órganos. A mediados de los años ochenta se descubrieron las respuestas rápidas (RR) mediadas por la vitamina D<sub>3</sub>. Éstas eran respuestas excesivamente rápidas (minutos a una hora) para ser explicadas como simples consecuencia de la regulación nuclear del VDR en la transcripción génica lo que sugiere un mecanismo alternativo no genómico de actuación.

### 9.1. Mecanismo genómico.

El calcitriol es un seco esteroide cuyo mecanismo genómico de acción es similar al de las hormonas esteroidales clásicas,<sup>79</sup> y es mediado por la unión específica

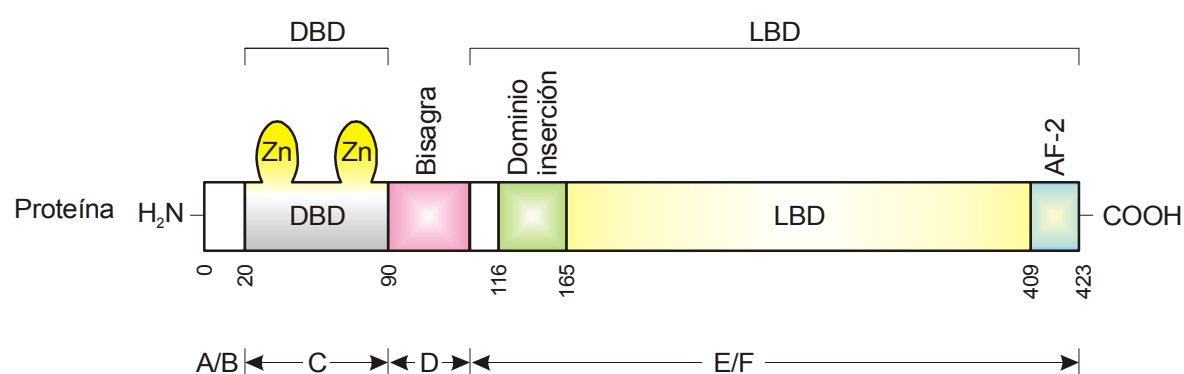
- (77) (a) Hirata M, Makibayashi K, Katsumata K, Kusano K, Watanabe T, Fukushima N. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2002**, 17(12), 2132-2137. (b) Makibayashi K, Tatematsu M, Hirata M, Fukushima N, Kusano K, Ohashi S, Abe H, Kuze K, Fukatsu A, Kita T, Doi T. *Am. J. Pathol.* **2001**, 158(5), 1733-1741.
- (78) Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, Lazarus JM, Hernan MA, Camargo CA, Thadhani R. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, 16(4), 1115-1125.
- (79) Mangedorf DJ, Thummel C, Besto M, Herrfich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. *Cell.* **1995**, 83, 835.

del calcitriol con el VDR, que heterodimeriza con el receptor del ácido retinoico X (RXR). Después de la interacción con el elemento de respuesta de la vitamina D<sub>3</sub> (VDRE) en el promotor del gen diana, tiene lugar la transcripción por interacción del VDR con coactivadores y demás componentes de la maquinaria transcripcional. La identificación de los pasos implicados en este proceso ha sido el foco principal de la investigación reciente en este campo. Sin embargo, el significado funcional de las proteínas dianas, así como de las proteínas implicadas en el transporte y el metabolismo de la vitamina D<sub>3</sub> es también de primordial importancia.

### 9.1.1. El receptor nuclear de la vitamina D (VDR).

El VDR está presente en concentraciones relativamente bajas en los tejidos y células diana debido a que es un potente regulador de los procesos de transcripción celular. El rango de abundancia oscila entre las 500 y 2500 copias por célula dependiendo del tipo o línea celular examinada.<sup>80</sup> A excepción del peso molecular, ninguna otra evidencia sugiere que las propiedades bioquímicas del VDR difieran de forma significativa entre los distintos tipos celulares o entre especies. El VDR contiene varios dominios funcionalmente distintos que se describen en la Figura 17.

**Figura 17:** Estructura y organización del receptor de la vitamina D (VDR).

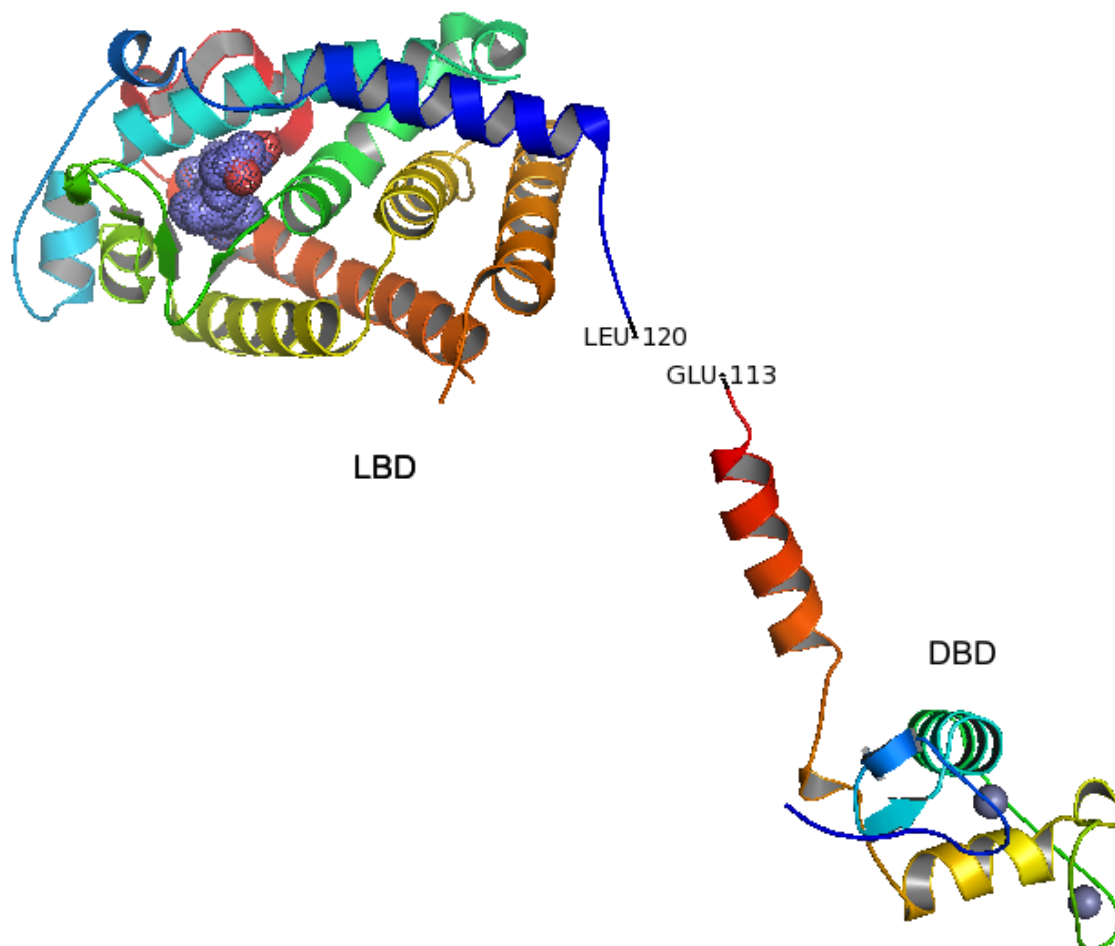


En la Figura 18 se muestran las estructuras de rayos X del LBD de Moras, fragmento que incluyen los residuos desde 118 a 425 y del cual fue extirpado el

(80) (a) Pike JW, Haussler MR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1979**, 76, 5488. (b) Haussler MR, Pike JW, Chandler JS, Manolagas SC, Deftos LJ. *Ann. NY Acad. Sci.* **1981**, 372, 502.

segmento 165-215 para facilitar su cristalización. El DBD de Gewirth incluye el fragmento con los residuos 16 a 125 (en azul se aprecia el calcitriol).<sup>81</sup>

**Figura 18:** Estructuras cristalinas del LBD y DBD del receptor de la vitamina D (VDR). Las esferas representan átomos de Zn.



#### 9.1.1.1. El dominio A/B.

Está localizado en la porción N-terminal de la proteína. La corta región A/B del VDR humano carece de función de activación característica en la transactivación habitual.

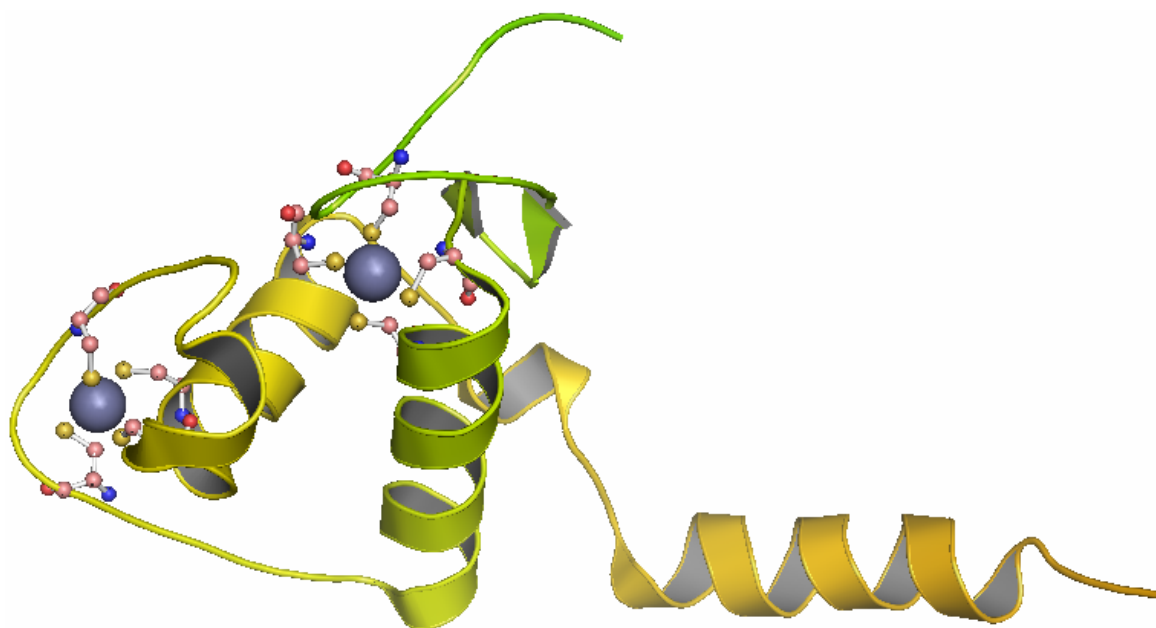
Sin embargo, las variaciones en la longitud del dominio A/B parecen afectar a la actividad transcripcional del VDR.<sup>82</sup> Este segmento no está presente en las estructuras cristalográficas de la figura 8.

(81) Shaffer PL, Gewirth DT. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, 89-90, 215-219.

### 9.1.1.2. El dominio C o dominio de unión al DNA (DBD).

Se puede decir que el DBD<sup>83</sup> es la característica principal de la familia de receptores nucleares. Contiene dos módulos en dedo de zinc que están localizados en una secuencia central de 66 aminoácidos y en ellos se observa un alto grado de conservación de los residuos de aminoácidos.<sup>84</sup> Estos dedos de zinc intervienen en la unión del VDR a regiones específicas del DNA, llamadas VDREs, que están localizadas en la porción promotora de los genes diana. En estos dedos cada catión de zinc se encuentra tetrahédricamente coordinado a través de cuatro residuos invariables de cisteína que mantienen la estructura estabilizada (Figura 19).

**Figura 19:** Estructuras cristalinas del DBD. Las esferas representan átomos de Zn. Los átomos de azufre de las cisteínas están en amarillo.



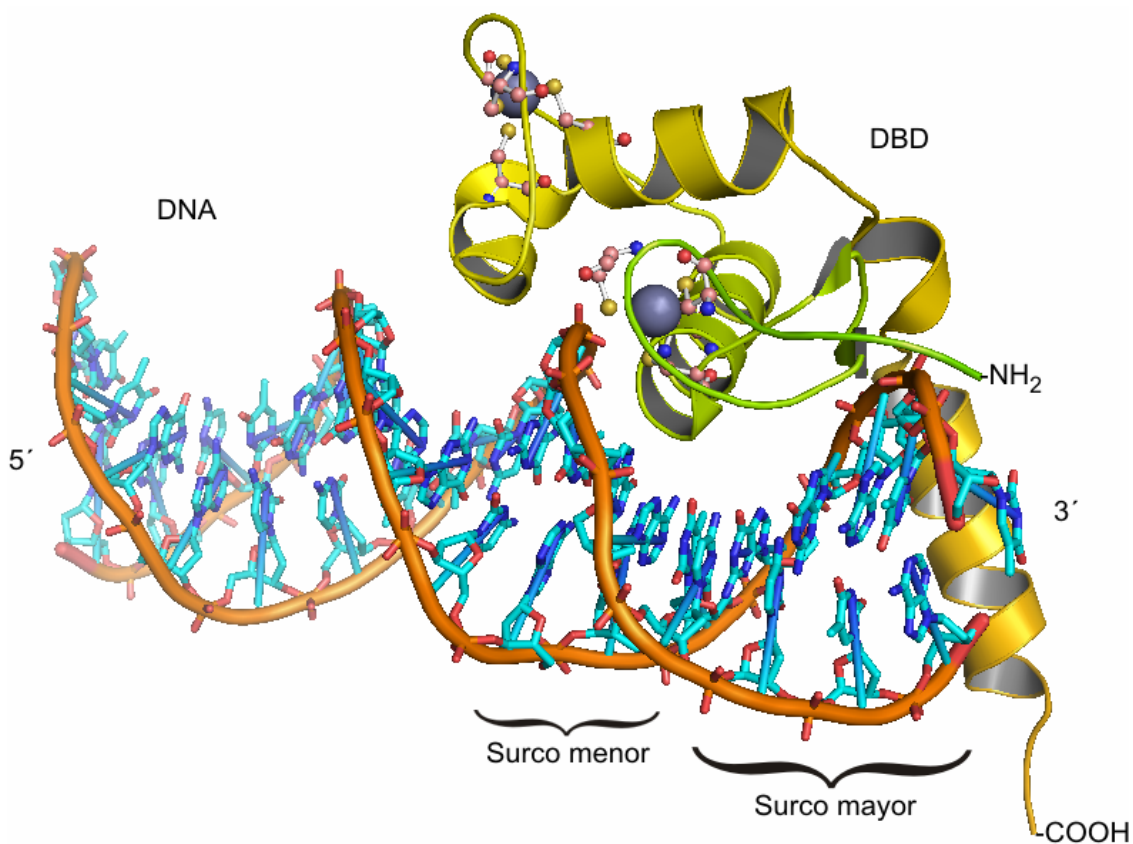
Esta coordinación con los iones de zinc es de suma importancia para mantener al VDR funcionalmente activo. A pesar de que estos dos módulos de zinc parecen estar muy relacionados en su estructura, no son topológicamente equivalentes ya

- 
- (82) (a) Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, Tavakkoli P, Galligan MA, Dang HT, Haussler CA, Haussler MR. *Mol. Endocrinol.* **2000**, *14*, 401. (b) Sunn KL, Cock TA, Crofts LA, Eisman JA, Gardiner EM. *Mol. Endocrinol.* **2001**, *15*, 1599.
- (83) McDonnell DP, Scout RA, Kerner RA, O'Malley BW, Pike JW. *Mol. Endocr.* **1989**, *3*, 635.
- (84) Khorasanizadeh S, Rastinejad F. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 384.

que los residuos que coordinan los átomos de zinc en cada módulo presentan un entorno distinto.<sup>85</sup>

Las estructuras tridimensionales del dominio de unión al DNA de varios receptores nucleares han sido determinadas por técnicas de NMR y cristalografía de rayos X.<sup>86</sup> Se sabe que los dos dedos de zinc presentes en el DBD tienen en común el plegamiento en forma de hélice  $\alpha$  que aparece en la región carboxi-terminal de cada uno, aunque su función en la unión al DNA es diferente.

**Figura 20:** El DBD unido al DNA.

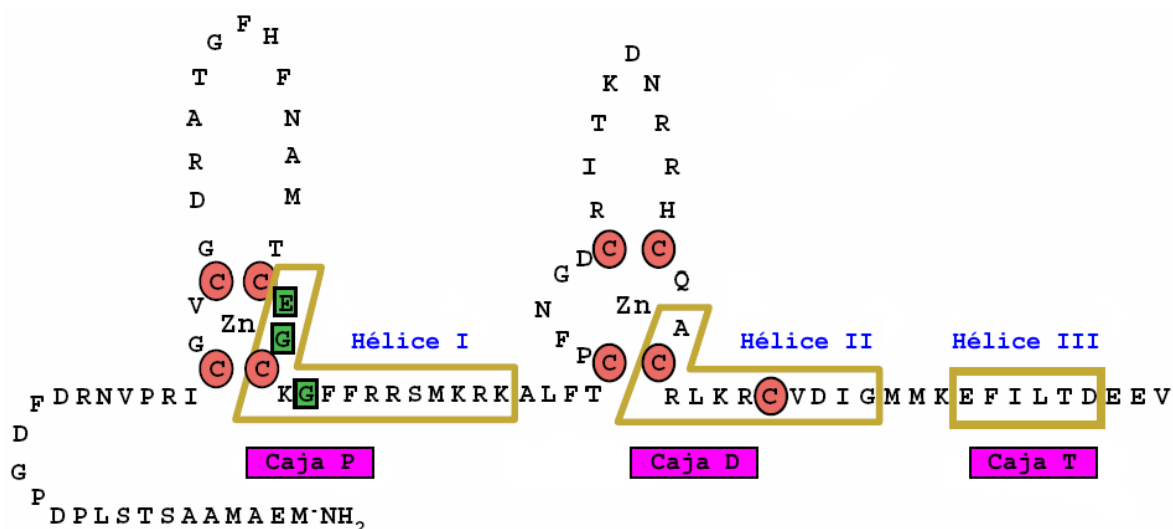


El dedo de zinc más próximo al extremo amino-terminal se une al surco mayor del DNA e interacciona directamente con las bases del elemento de respuesta específico del mismo (Figura 20 y Figura 21).

(85) Berg JM. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 99.

(86) Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Singler PB. *Nature* **1995**, 375, 203.

**Figura 21:** El dominio de unión al DNA del VDR, los residuos de cisteína que se coordinan con el Zn están en rojo.



Entre los dos dedos de zinc se encuentra la secuencia de aminoácidos que mantiene el VDR en el núcleo e interacciona con el DNA.

#### 9.1.1.3. El dominio D o bisagra.

Se piensa que ésta región confiere flexibilidad entre el dominio de unión al DNA (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD) del receptor (véase arriba).<sup>87</sup>

#### 9.1.1.4. El dominio E/F o dominio de unión al ligando (LBD).

El LBD está localizado en la porción carboxiterminal y tiene tres funciones principales: unión al ligando, dimerización y reclutamiento de reguladores de transcripción. Está formado por aproximadamente 300 aminoácidos.<sup>88</sup> El calcitriol se acopla a él con alta afinidad ( $K_d=1-2 \times 10^{-10}$  M). El anillo A del calcitriol adopta una conformación en silla  $\beta$ .<sup>89</sup>

El análisis de mutaciones en los aminoácidos que forman el LBD ha demostrado la importancia de algunos para la unión al calcitriol. Los residuos de Ser237 y Arg274 interactúan vía enlace de hidrógeno con 1 $\alpha$ -OH del calcitriol. Las Histidinas 305 y 397 interactúan también vía enlace de hidrógeno con el 25-OH.

(87) Shaffer PL, McDonnell DP, Gewirth DT. *Biochemistry* **2005**, *44*, 2678.

(88) Allegretto RA, Pike JW, Haussler MR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *147*, 479.

El 3-OH interacciona, asimismo, con los residuos de Ser278 y Tyr143.<sup>90</sup> Junto al LBD, el VDR puede reclutar su socio preferido para la heterodimerización, el receptor del ácido 9-*cis*-retinoico (RXR), otro miembro de la superfamilia de receptores nucleares.<sup>91</sup> Dos regiones en el LBD son importantes para que ocurra esta dimerización (los aminoácidos 239-269 y 317-401), así como regiones específicas en el DBD ya mencionadas.<sup>92</sup> El heterodímero VDR-RXR se une a una secuencia específica del DNA que está en la región promotora de genes diana (VDRE).

El LBD es un dominio multifuncional que ejerce un control absoluto en la unión al DNA, así como en las propiedades transcripcionales del VDR. El interruptor que transforma este factor de transcripción latente en un regulador genómico activo es la hormona calcitriol. De hecho, se cree que la unión de la hormona induce importantes cambios conformacionales en el dominio de unión al ligando del VDR. Se desconoce si estos cambios conformacionales provocados por la unión al ligando afectan únicamente al LBD o, por el contrario, afectan también a otras partes del VDR. Además, es posible que otras proteínas afecten, negativa o positivamente, la actividad del receptor.

Una función adicional inherente a la región E/F del VDR es la función de activación AF-2 (Activation Function 2), análoga a la existente en otros receptores de la misma familia y que sufre un cambio estructural tras la unión del ligando.<sup>93</sup> Ésta función se encuentra en el tercer y más pequeño subdominio carboxiterminal de los receptores y más concretamente entre los residuos 416-423 del VDR.<sup>94</sup>

---

(89) Mizwicki MT, Norman AW. *J. Bone Miner. Res.* **2003**, *18*, 795.

(90) Choi M, Yamamoto K, Masuno H, Nakashima K, Taga T, Yamada S. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1721.

(91) (a) Sone T, Ozono K, Pike IW. *Mol. Endocrinol.* **1991**, *5*, 1578. (b) Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DI, Evans RM. *Nature* **1992**, *355*, 446. (c) Carlberg C, Bendik I, Wyss A, Meier R, Sturzenbecker LJ, Grippo IF, Hunziker W. *Nature* **1993**, *361*, 657.

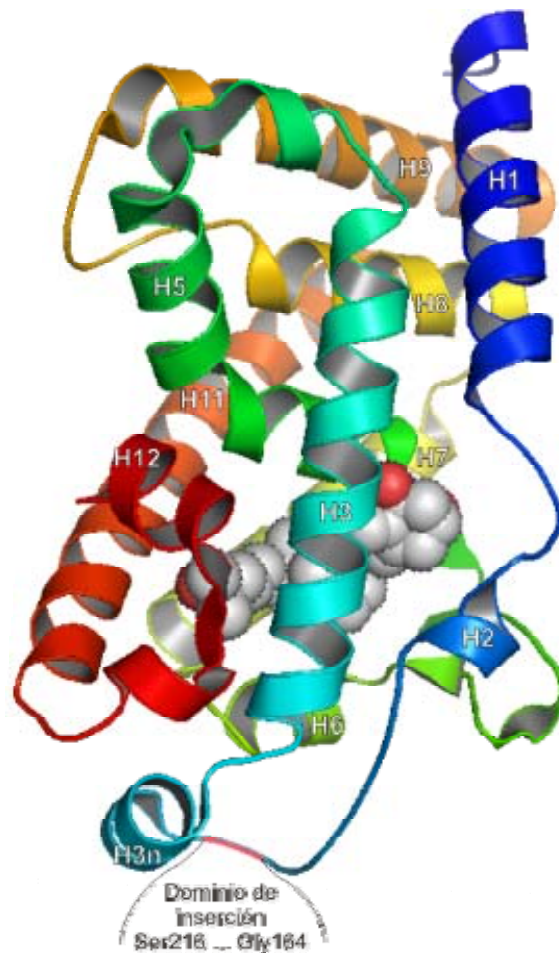
(92) (a) Jin CH, Kerner SA, Hong MH, Pike JW. *Mol. Endocrinol.* **1996**, *10*, 945. (b) Freedman LP. *Endocr. Rev.* **1992**, *13*, 129.

(93) Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG. *EMBO J.* **1992**, *11*, 1025.

### 9.1.2. El receptor de Moras.

Para poder cristalizar el receptor VDR, Moras necesitó eliminar el dominio de inserción flexible mediante ingeniería genética. Se eliminaron los residuos 165-215 del VDR natural y se dejaron 30 residuos para conectar las hélices H1 y H3. La localización del dominio de inserción está lejos de los aminoácidos que forman parte del centro activo del receptor y de los que interactúan con los coactivadores y correpresores transcripcionales<sup>95</sup> y por lo tanto no influye sobre estas funciones (Figura 22).<sup>96</sup>

**Figura 22:** Estructura cristalina del LBD del VDR unido al calcitriol. El dominio de inserción está en rojo.



- 
- (94) Whitfield GK, Hsieh JC, Nakajima S, Mac Donald PN, Thompson PD, Jurutkz PW, Haussler CA, Haussler MR. *Mol. Endocr.* **1995**, *9*, 1166.
- (95) Rochel N, Tocchini-Valentini G, Egea PF, Juntunen K, Garnier JM, Vihko P, Moras D. *Eur. J. Bioch.* **2001**, *268*, 971-979.
- (96) Miyamoto T, Kakizawa T, Ichikawa K, Nishio S, Takeda T, Suzuki S, Kaneko A, Kumagai M, Mori J, Yamashita K, Sakuma T, Hashizume K. *Mol. Cell. Endocrinology* **2001**, *181*, 229-238.

La hélice H12, cuya posición es crítica para el enlace a los coactivadores transcripcionales y la transactivación, está en la posición agonista y establece dos interacciones directas de tipo Van der Waals (Val-418 y Phe-422) con el metilo 27 del ligando. La posición de la hélice H12 está estabilizada por interacciones polares de tipo enlace de hidrógeno. Algunos de los residuos que estabilizan la posición de la hélice H12 interactúan directamente con el ligando calcitriol (Val-234, Ile-268, His-397 y Tyr-401).

El receptor mutado posee unas constantes de disociación muy similares a las del receptor natural y conserva las mismas propiedades de transcripción. Tanto es así, que el LBD mutado es plenamente funcional tanto por la afinidad por los ligandos como por la capacidad de formar dímeros con el RXR y de unirse al DNA y activar la transcripción genética.

El cristal de Moras constituye un modelo preciso de la estructura tridimensional del LBD del VDR. Cálculos de docking<sup>90</sup> en el sitio activo del LBD están permitiendo, por primera vez, el diseño racional de nuevos análogos de la vitamina D.<sup>98</sup>

### **9.1.3. La unión del calcitriol al VDR.**

Después de cruzar la membrana celular, el calcitriol es reconocido por su receptor nuclear, al cual se une con alta afinidad. El VDR es un factor de transcripción que encontrarse en el citoplasma, asociado a membrana plasmática, o en el núcleo celular. Sin embargo, se llama receptor nuclear porque sus funciones biológicas clásicas son ejercidas por su interacción con el DNA y otros factores de transcripción en el núcleo celular. Así, el calcitriol se une al VDR en la membrana para la respuesta rápida y a un VDR nuclear o citoplasmático que rápidamente se desplaza al núcleo para la respuesta genómica.<sup>99</sup> Una vez activado por el ligando los receptores nucleares inician una cascada de procesos intracelulares que causan la transcripción o represión de genes diana específicos.

---

(90) Choi M, Yamamoto K, Masuno H, Nakashima K, Taga T, Yamada S. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1721-1730.

(98) (a) Suhara Y, Nihei KI, Kurihara M, Kittaka A, Yamaguchi K, Fujishima T, Konno K, Miyata N, Takayama H. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8760-8771. (b) Fujishima T, Konno K, Nakagawa K, Tanaka M, Okano T, Kurihara M, Miyata N, Takayama H. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1011-1024. (c) Masuno H, Yamamoto K, Xinxiang W, Mihwa C, Hiroshi O, Toshimasa S, Yamada S. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1825-1834.

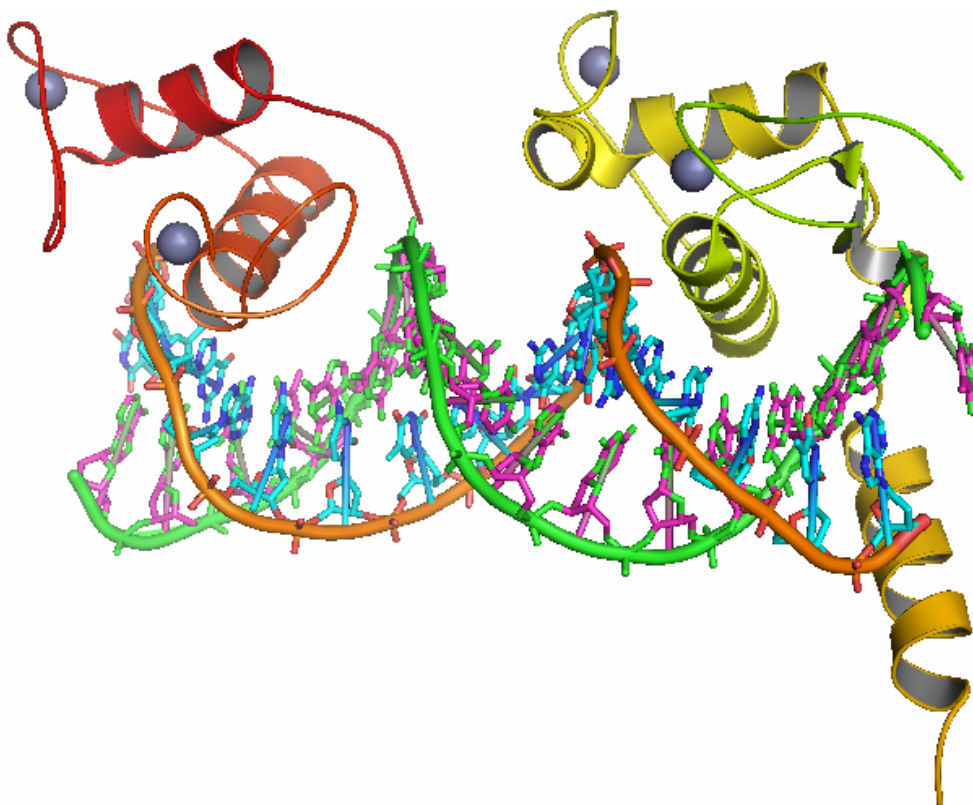
En este sentido los receptores nucleares son mediadores claves del sistema endocrino para la regulación de la síntesis de proteínas.

#### 9.1.4. Formación del heterodímero VDR-RXR y unión al VDRE.

El VDR a través de su DBD se puede unir a una secuencia específica de seis nucleótidos en el surco principal del DNA. A fin de establecer contactos eficaces con el DNA, el VDR tiene que formar un complejo dimérico con el receptor nuclear con el ácido 9-*cis*-retinoico (RXR).

El elemento más simple de respuesta para la vitamina D (VDRE) contiene obligatoriamente dos hexanucleótidos. Un VDRE simple es un dihexámero DR3 en que el VDR y RXR forman un heterodímero orientado sentido cabeza-cola, en el que éste último ocupa la orientación 5' del DNA (Figura 23).<sup>100</sup>

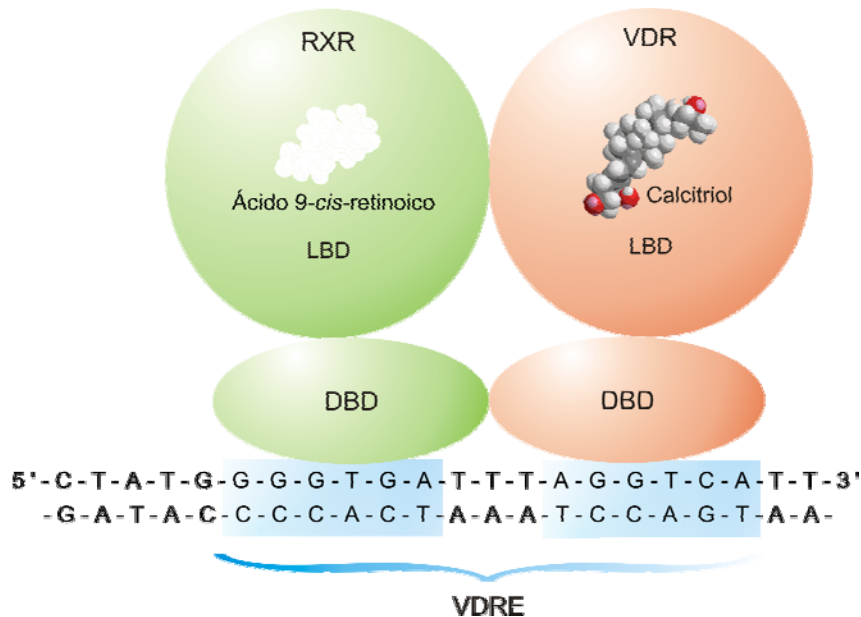
**Figura 23:** Estructura cristalina del heterodímero formado por el DBD del VDR (amarillo) y RXR (rojo) unido al elemento de respuesta de la vitamina D (DNA) en un arreglo DR3.



(99) Kawata M. *Arch. Histol. Cytol.* **2001**, 64, 353-368.

En los VDREs de tipo DR3 y DR4, los DBD tanto del VDR como del RXR se colocan al mismo lado del DNA. Por lo tanto, el área de contactos del heterodímero ocurre entre sus respectivos LBDs y DBDs (Figura 24).<sup>86</sup>

**Figura 24:** Esquema del heterodímero formado por el dímero RXR-VDR complejoado a su elemento de respuesta (VDRE) en un ajuste DR3.



Además del complejo heterodimérico VDR-RXR, el VDR homodimérico también se puede unir a VDREs y promover la transactivación.<sup>102</sup> Aunque el período de vida media de especies homodímeras asociadas a un VDRE es bastante más corto (30 s) que el heterodímero VDR-RXR (5 minutos),<sup>103</sup> el homodímero se estabiliza por interacciones con coactivadores de la familia SRC/p160.<sup>104</sup>

### 9.1.5. Activación de la expresión génica.<sup>105</sup>

El complejo VDR-RXR activado por el calcitriol se une al VDRE del gen diana y recluta varios coactivadores de transcripción (CoA) que están implicados principalmente en el reclutamiento de la RNA polimerasa II (RNA Pol II) y otros

(100) Van der Bemd GJ, Jhamai M, Staal A, Van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Pols HA, Van Leeuwen JP. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 14539-14546.

(86) Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Singler PB. *Nature* **1995**, 375, 203-211.

(102) Lemon B, Freedman LP. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, 16, 1006-1016.

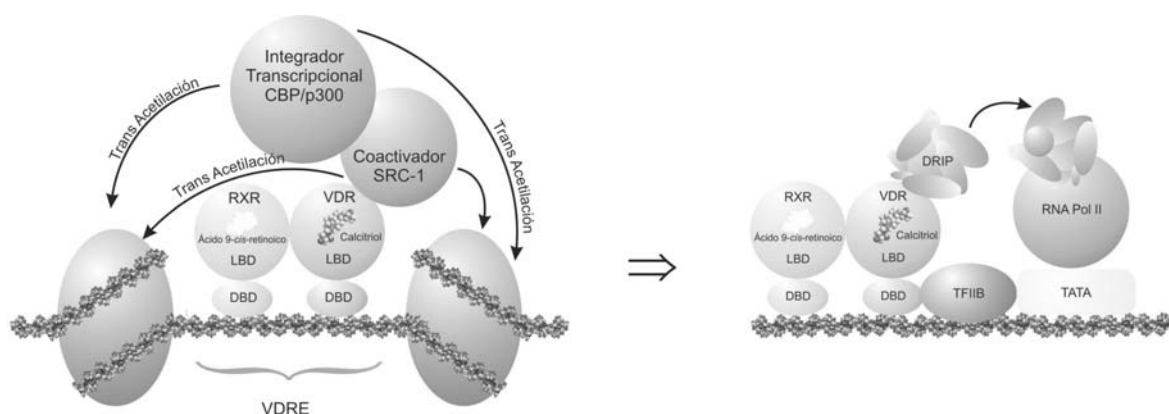
(103) Jurutka WP, MacDonald PN, Nakajima S, Hsieh J-C, Thompton PD, Whitfield GK, Galligan MA, Haussler CA, Haussler MR. *J. Cell. Biochem.* **2002**, 85, 435-457.

(104) Takeshita A, Ozawa Y, Chin WW. *Endocrinology* **2000**, 141, 1281-1284.

(105) Rachez C, Freedman LP. *Gene* **2000**, 246, 9-21.

componentes de la maquinaria de transcripción. Entre estos factores se encuentra el factor de transcripción IIB (TFIIB).<sup>106</sup> El factor TATA se une a secuencias específicas (TATA) del DNA y se encuentra en todos los genes que codifica la polimerasa II, que es la polimerasa más abundante en células eucariotas (Figura 25).

**Figura 25:** Acción de los coactivadores CBP/p300 y SRC-1 y reclutamiento del complejo RNA Polimerasa.



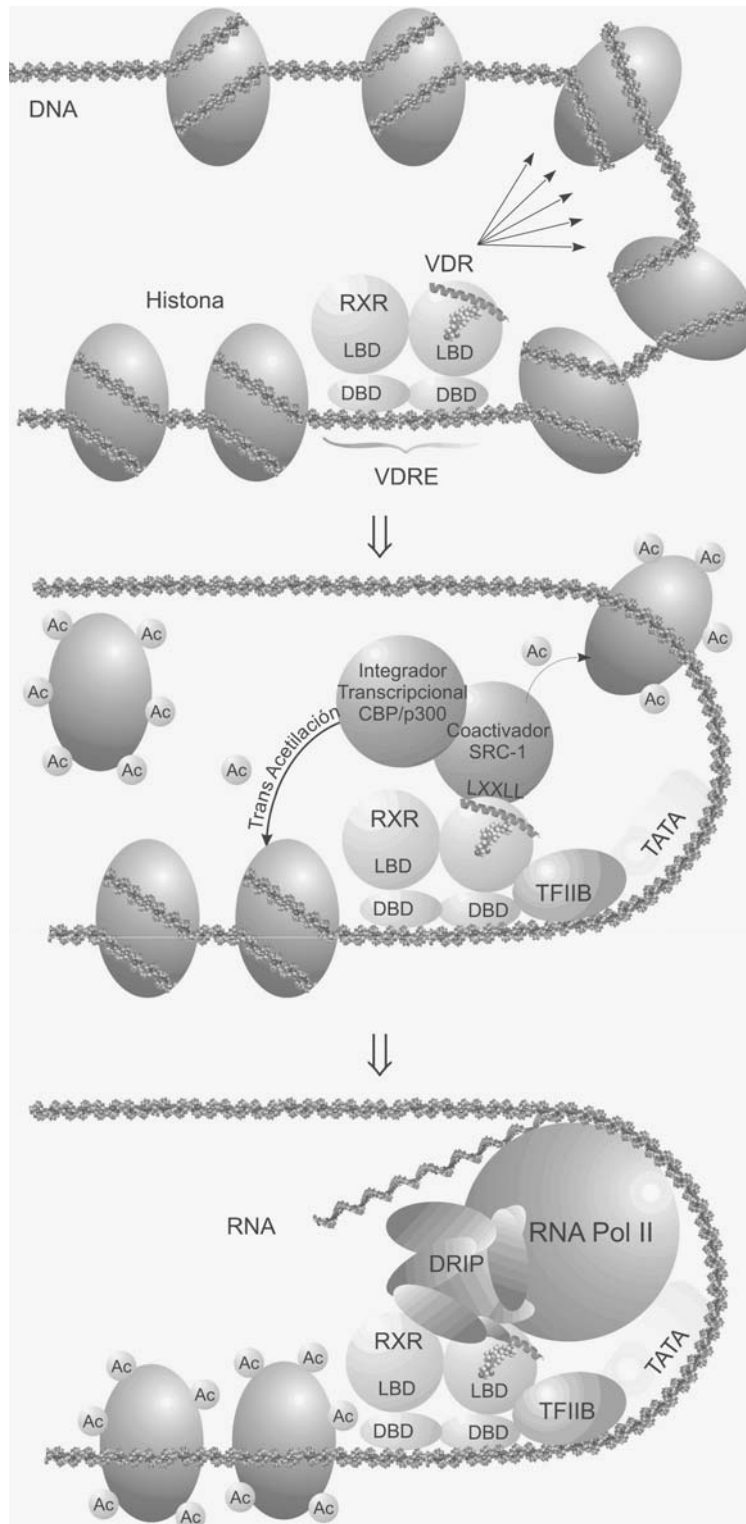
El paso previo a la transcripción génica es la apertura de la superestructura de la cromatina, esto hace al DNA accesible a la maquinaria transcriptional. Varios CoAs reclutados por el complejo de RXR-VDR activado por el ligando muestran una actividad acetil transferasa de histona (HAT). La acetilación de histonas desestabiliza sus interacciones con el DNA e induce la apertura de la cromatina. Por lo tanto, la actividad HAT de algunos coactivadores libera el DNA de los efectos represivos de la cromatina en la expresión génica. Un grupo importante de coactivadores con actividad HAT es la familia de coactivadores del receptor de esteroides SRC/p160. Cuando el calcitriol se une al LBD este sufre cambios conformacionales que permite la unión del coactivador al VDR.<sup>107</sup>

Los coactivadores de la familia SRC/p160 forman complejos con otra familia de activadores con actividad HAT, llamado coactivador de unión a proteína CBP/p300. El papel primario de las proteínas SRC/p160 es el reclutamiento de CBP/p300, que es la principal promotora de la actividad HAT (Figura 25).

- (106) (a) Blanco JCC, Wang IM, Tsai SY, Tsia MJ, O'Malley BW, Jurutka PW, Haussler MR, Ozato K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 1535-1539. (b) MacDonald PN, Sherman DR, Dowd DR, Jefcoat JR, Delisle RK. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 4748-4752.
- (107) Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. *Nature* **1998**, 395, 828-832.

El papel principal del complejo DRIP es construir un puente entre el complejo VDR-RXR-VDRE y la maquinaria transcriptional básica, acercando la RNA polimerasa II a las proximidades del gen que será transcrito (Figura 26).

**Figura 26:** Modo de acción secuencial de la activación de los coactivadores de la remodelación de la cromatina y del complejo DRIP.

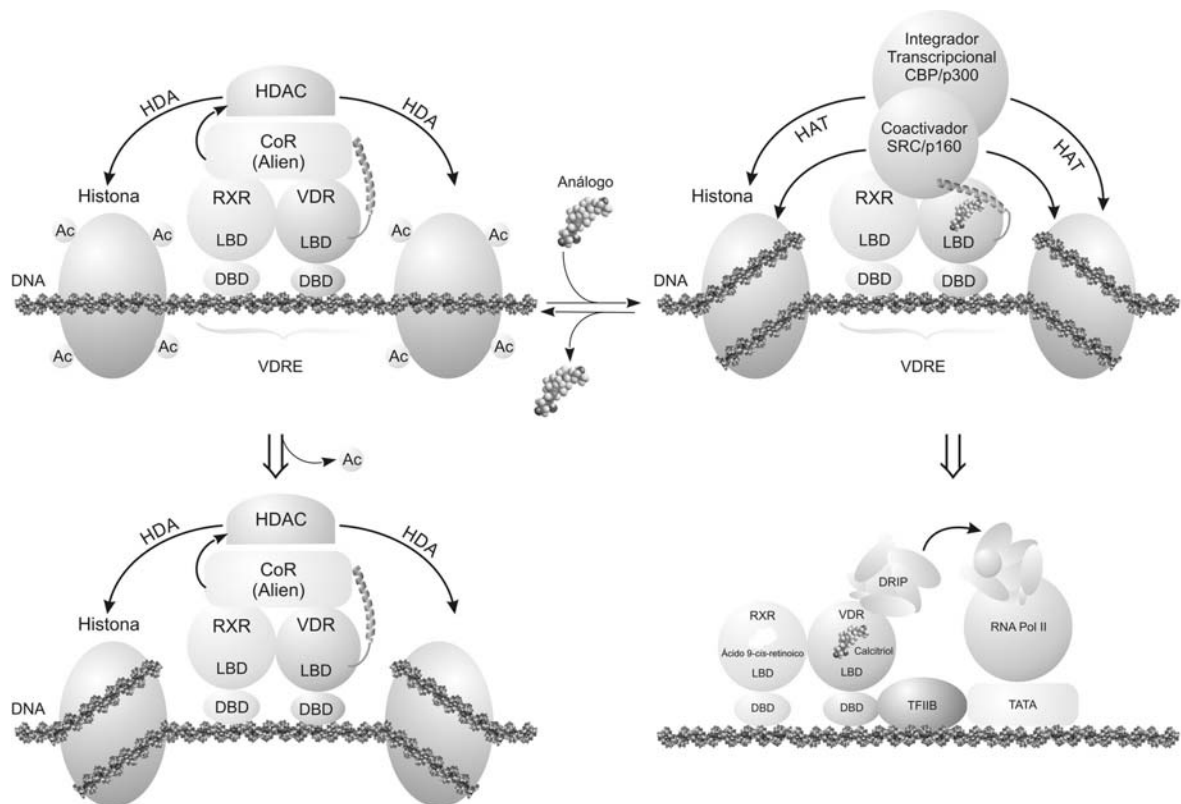


El VDR activado por el ligando inicia el reclutamiento de coactivadores remodeladores de la cromatina SRC/p160 y CBP/p300 para el complejo VDR-RXR-VDRE. La disolución de SRC/p160 y CBP/p300 viene acompañada por la unión del complejo DRIP al VDR y el reclutamiento de la RNA pol II. Además de esto, la unión del heterodímero VDR-RXR al VDRE promueve un doblamiento en la estructura del DNA acentuado por el factor TATA, lo que favorece la unión de otros componentes del complejo de transcripción

### 9.1.6. Regulación de la respuesta génica.

La activación y represión de genes son procesos complejos en los que están implicados un número siempre creciente de proteínas. Carlberg sugirió que el heterodímero VDR-RXR no activado por el ligando cuando se une al DNA tiene la capacidad de reclutar el co-represor (CoR) *Alien* (Figura 27).<sup>108</sup>

**Figura 27:** Reclutamiento de CoR con actividad HDA intermediada por VDR no activado y reclutamiento de CoA con actividad HAT intermediada por VDR activado por un agonista.



(108) Polly P, Herdick M, Moehren U, Baniahmad A, Heinzl T, Carlberg C. *FASEB J.* 2000, 14, 1455-1463.

Este co-represor se une al receptor del complejo de desacetilación de histonas (HDAC).<sup>109</sup> La desacetilación de histonas conduce a la estabilización de la cromatina y por consiguiente, a la represión génica. El cambio estructural dentro del VDR-LBD inducido por la unión al calcitriol o un análogo agonista causa la sustitución de un CoR por un CoA de la familia p160/SRC, un hecho que conduce a la eventual activación de la transcripción génica.

## 9.2. Mecanismo no-genómico.

Las hormonas esteroidales son capaces de servir de mensajeros químicos en un amplio número de células y tejidos diana, transmitiendo señales que causan efectos tanto genómicos como de respuestas rápidas (RR). El tiempo requerido para la RR depende del sistema en estudio y puede variar de segundos a 10 o 60 minutos. Las respuestas genómicas generalmente necesitan varias horas o días y pueden bloquearse por inhibidores de la transcripción y trasducción.

El calcitriol, se conoce como estimulador de una amplia serie de RR. Algunos ejemplos incluyen la absorción intestinal rápida de  $\text{Ca}^{2+}$  (transcaltaquia), secreción de insulina por células pancreáticas, apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  en osteoblastos y la migración rápida de células endoteliales. Algunos efectos no genómicos pueden influir en las acciones genómicas de la hormona,<sup>110</sup> sin embargo, no influyen de forma importante en la inhibición de la proliferación celular.<sup>111</sup>

### 9.2.1 VDR de membrana.

Aunque las respuestas genómicas de las hormonas esteroidales son mediadas por la formación de un complejo entre el ligando y su correspondiente receptor nuclear,<sup>112</sup> pruebas recientes indican que todas las hormonas esteroidales pueden actuar por un mecanismo de RR mediado por una variedad de tipos de receptores localizados cerca o en íntima asociación con la membrana plasmática

---

(109) (a) Chen JD, Evans RM. *Nature* **1995**, 377, 454-457. (b) Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss J, Kurokawa R, Ryan A, Kameyi Y, Soderstrom M, Glass KC, et al. *Nature* **1995**, 377, 397-404.

(110) (a) Baran DT. *J. Cell. Biochem.* **1994**, 56, 303-306. (b) Baran DT, Sorensen AM, Shalhoub V, Owen T, Stein G, Lian J. *J. Cell. Biochem.* **1992**, 50, 124-129.

(111) (a) Hedlund TE, Moffatt KA, Miller GJ. *Endocrinology* **1996**, 137, 1554-1561 (b) Khoury R, Ridall AL, Norman AW, Farach-Carson MC. *Endocrinology* **1994**, 135, 2446-2453.

(112) Norman AW, Mizwicki MT, Norman DPG. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 27-41.

o con su componente caveolar.<sup>113</sup> Los caveolos son deformaciones de la membrana en forma de invaginaciones de la matriz extracelular, ricos en esfingolípidos y colesterol, comúnmente encontrados en bolsas de lípidos.<sup>114</sup>

Debido a que la conformación del calcitriol que actúa en las respuestas genómicas es distinta a la conformación que adopta en las RR,<sup>115</sup> surgió la pregunta de si existiría un segundo receptor, aparte del VDR nuclear. Por ejemplo, un receptor VDR de membrana (VDRm) que respondiera a la presencia del calcitriol para generar la RR. Actualmente se postula que el VDR nuclear clásico posee en algunas células también presencia caveolar en la membrana citoplasmática. Pruebas recientes demuestran que el mismo VDR nuclear, media también en la RR. El calcitriol es suficientemente flexible como para adoptar diferentes conformaciones selectivas para ambas respuestas genómicas y rápidas.<sup>116</sup> Más recientemente tanto Norman<sup>117</sup> como Lieberherr y Garabedian<sup>118</sup> han concluido por separado que los efectos del calcitriol en la respuesta rápida (RR) requieren VDR funcional.

En el mecanismo de RR, el calcitriol se une al VDR con una constante de disociación  $K_d=0.7$  nM y preferentemente en una conformación 6-s-*cis*. Los análogos bloqueados en la conformación 6-s-*trans* muestran bajos niveles de actividad de RR frente a análogos con conformación libre o bloqueado en 6-s-*cis* que presentan mejor actividad genómica.<sup>119</sup>

### 9.2.2 Especificidad conformacional y dominio de unión alternativo.

La forma 6-s-*trans* del calcitriol es necesaria para la respuesta genómica, mientras se requiere la forma 6-s-*cis* para la RR. Se plantea el enigma de cómo un único receptor con un LBD puede unir ligandos de formas completamente

---

(113) Norman AW. In: Feldman D, Pike JW, Glorieux FH, eds. *Vitamin D*. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press **2005**, 381–407.

(114) Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 431–467.

(115) Norman AW, Okamura WH, Hammond MW, Bishop JE, Dormanen MC, Bouillon R, Van Baelen H, Ridall AL, Daane E, Khoury R, Farach-Carson MC. *Mol. Endocrinol.* **1997**, *11*, 1518–1531.

(116) Norman AW. *Endocrinology* **2006**, *147*(12), 5542–5548.

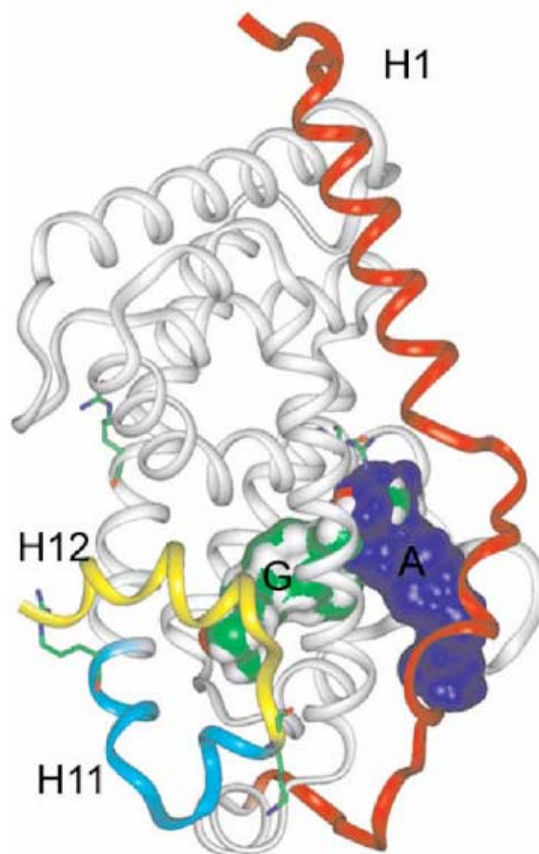
(117) Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW. *Mol. Endocrinol.* **2004**, *18*, 2660–2671.

(118) Nguyen TM, Lieberherr M, Fritsch J, Guillozo H, Alvarez ML, Fitouri Z, Jehan F, Garabedian M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 7591–7597.

diferentes y generar dos resultados biológicos completamente distintos, aunque la estructura de rayo X del VDR reveló sólo un LBD al cual esta unido la forma 6-*s-trans*.

Una posible solución para este problema fue obtenida por modelado molecular del VDR.<sup>120</sup> Usando las coordenadas atómicas de las estructuras de rayo X del VDR y modelado computacional fue posible identificar la presencia de un supuesto LBD alternativo en el VDR que podría acomodar, las hormonas naturales apropiadas o análogos que se conocen como agonistas exclusivos para la RR.

**Figura 28:** Modelos moleculares del dominio genómico **G** (verde-blanco) y del dominio no genómico **A** (azul) del VDR. Hélice 12 en amarillo, hélice 1 en rojo y hélice 11 en azul.



- (119) (a) Zhou LX, Nemere I, Norman AW. *J. Bone Miner. Res.* **1992**, *7*, 457. (b) Norman AW, Okamura WH, Hammond MW, Bishop JE, Dormanen MC, Bouillon R, Van Baelen H, Ridal AL, Daane E, Khoury R, Farah-Carson MC. *Mol. Endocr.* **1997**, *11*, 1518.
- (120) Mizwicki MT, Keidel D, Bula CM, Bishop JE, Zanello LP, Wurtz JM, Moras D, Norman AW. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12876–12881.

En la Figura 28, **G** ilustra el dominio clásico de unión al ligando (verde-blanco) y la propuesta de un dominio alternativo **A** (azul). Cada dominio de unión está previsto para tener puertas separadas. La entrada al dominio genómico (G) depende de que la hélice 12 esté en una configuración abierta, de modo que la hormona o ligando pueda entrar en el dominio del LBD y tener acceso integral a los residuos con quienes establecen enlaces de hidrógeno, ocupando así totalmente el dominio genómico. Después, la hélice 12 se mueve para cerrar de nuevo la puerta.

El descubrimiento sorprendente es que el dominio alternativo y el genómico están parcialmente superpuestos. Cada uno de estos dominios comparte puentes de hidrógeno con los mismos residuos que estabilizan el anillo A. Sin embargo, las interacciones restantes con el anillo CD y la cadena lateral del ligando en los dominios genómico y alternativo son completamente distintas.

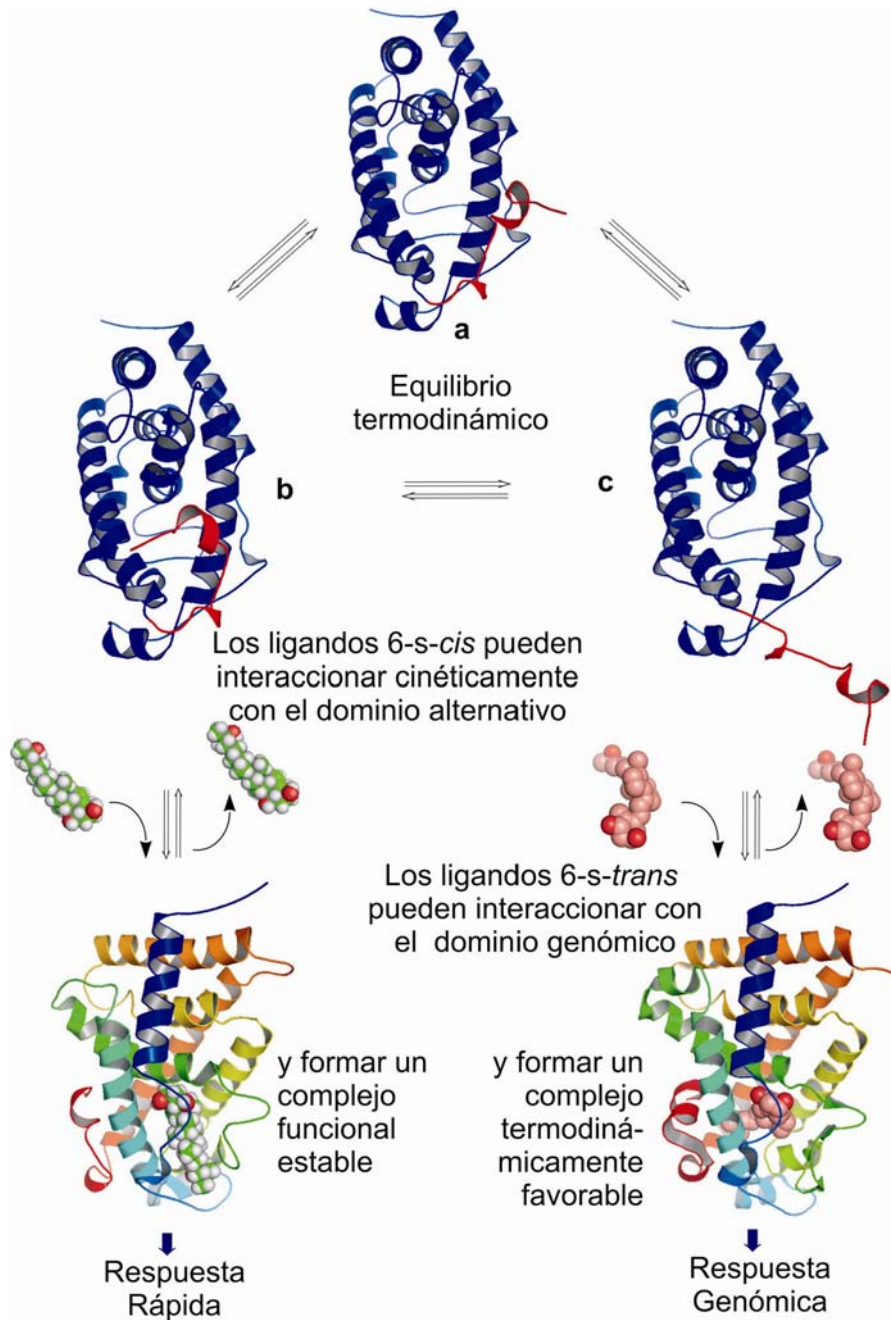
Aunque el Kd de unión al dominio genómico sea experimentalmente conocido para el calcitriol tritiado, siendo de aproximadamente 1.4 nM,<sup>117</sup> es posible que el dominio alternativo pueda tener un Kd diferente. En general, la dosis eficaz requerida por el calcitriol para iniciar la RR ha sido encontrada entre 1 y 10 nM.

La Figura 29 muestra de manera esquemática un conjunto de conformeros del VDR que describen como el receptor esteroideal clásico podría acomodar diferentes conformaciones del ligando para iniciar la respuesta rápida o genómica. El conjunto de modelos propone que haya una población de tres especies de receptor desactivados diferentes (**a**, **b**, **c**) que se diferencian por tener la hélice 12 en posiciones diferentes (hélice 12, coloreado en rojo) y que están en rápido equilibrio uno con el otro. Cada especie conformacional del receptor puede interactuar preferentemente con una forma específica del ligando.

---

(117) Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW. *Mol Endocrinol.* **2004**, *18*, 2660–2671.

**Figura 29:** Descripción de cómo el VDR clásico podría acomodar diferentes ligandos/confórmers causando el inicio de las respuestas rápidas o genómicas.<sup>122</sup>



En este ejemplo, la ocupación rápida del dominio alternativo por un ligando podría desencadenar el inicio de la RR, mientras que la ocupación del dominio clásico por el ligando conduciría a la activación de la respuesta genómica. El dominio alternativo es accesible en los tres conformeros en equilibrio (**a**, **b** y **c**).

(122) Este esquema fue construido por Mathew T. Mizwicki del grupo de Anthony Norman del Departamento de Ciencias Bioquímicas y Biomédicas de la Universidad de California.

---

La ocupación del dominio alternativo está favorecida para ligandos naturales dado el fácil acceso a las débiles interacciones de Van der Waals comparado con las fuertes y menos accesibles interacciones del dominio genómico.

El confórmero **c** es el único capaz de aceptar los ligandos que se unen al dominio clásico y conducen a respuesta genómica porque en los confórmeros **a** y **b**, la hélice 12 bloquea el acceso del ligando al imprescindible residuo de arginina localizado en la hélice 5 instalada en la intimidad del dominio clásico de unión al ligando. Una consecuencia interesante del concepto de equilibrio de receptores puede ser el cambio de preferencia resultante de la asociación del receptor nuclear con caveolos de membrana celular que puede favorecer la unión al dominio alternativo.

La ocupación del dominio genómico está favorecida por la estabilidad termodinámica obtenida de interacciones hidrofóbicas del entorno externo al LBD del VDR. Es posible que los análogos sintéticos, sobre todo aquellos relacionados con la hormona natural, puedan tener una ocupación diferencial fraccionada de los dos dominios, afectando así la eficacia celular de los caminos señalados mediados por uno u otro dominio.

La posibilidad de que esto ocurra puede explicar, al menos en parte, las interesantes y selectivas acciones biológicas de varios nuevos análogos y metabolitos. El descubrimiento de ligandos con propiedades únicas puede desencadenar oportunidades terapéuticas muy amplias.

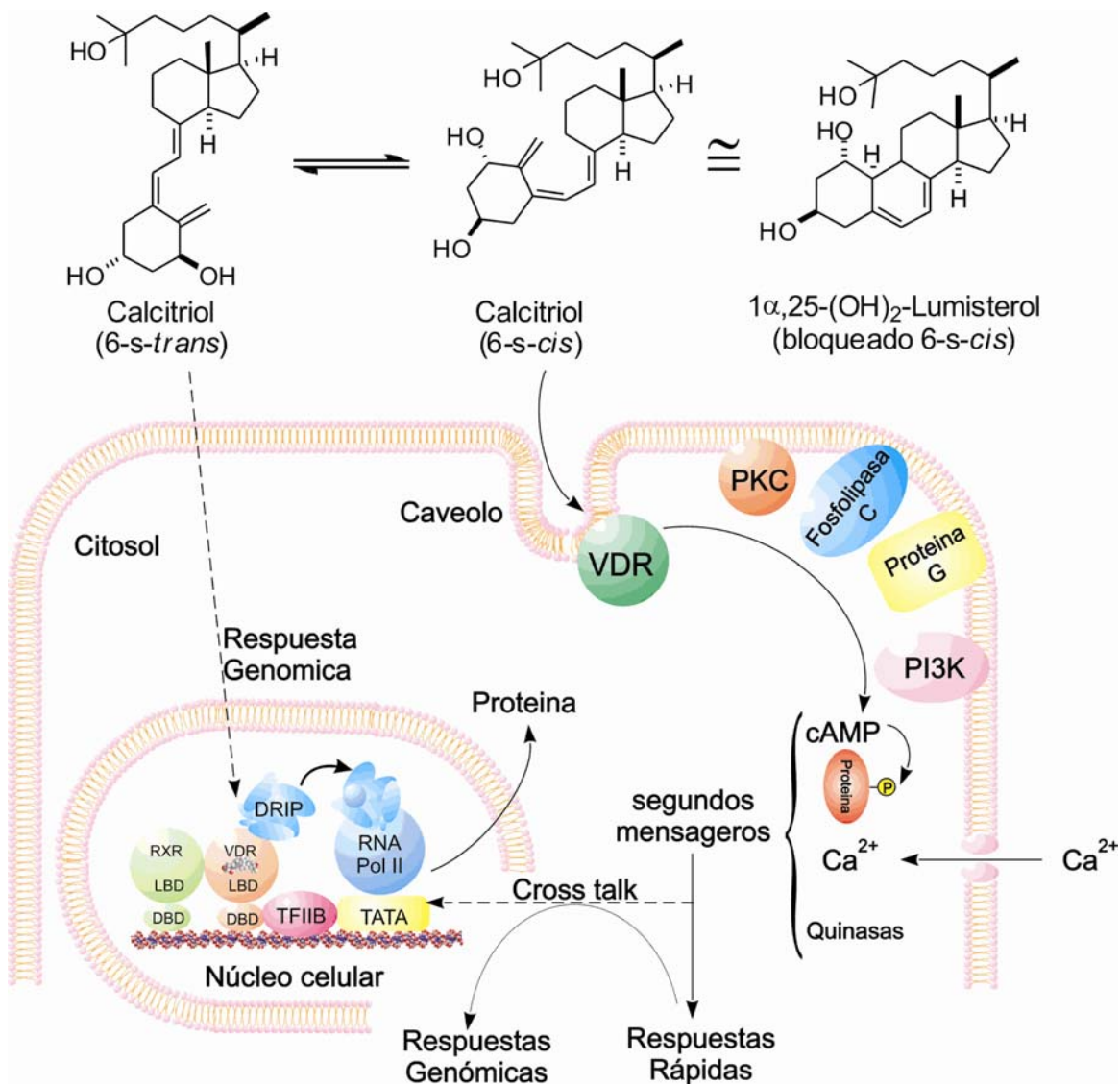
### **9.3 Genómico y no genómico *cross-talk*.**

Algunos estudios sugieren que la actividad del VDR está regulada por una serie de quinazas. La fosforilación del VDR por la quinasa A y C disminuiría las acciones genómicas del calcitriol ya que éstas enzimas se activan rápidamente por el calcitriol en las células diana. Sin embargo, la fosforilación por la caseína quinasa aumentaría la actividad del VDR, lo que demuestra una compleja e interconectada red de señales en ambos caminos.

La Figura 30 describe como el calcitriol, estructuralmente flexible, se puede relacionar con el VDR localizado en el núcleo para generar respuestas genómicas

o en caveolos de la membrana plasmática para generar RR. La unión del calcitriol al VDR asociado a caveolos de membrana puede causar la activación de uno o varios sistemas de segundo mensajero, proteína quinasa C, proteína G unida al receptor, quinasa 3-fosfatidilinositol (PI3K), incluso fosfolipasa C (PKC), que inicia una fosforilación de proteínas en cascada por lo que se forma un proceso de señalización y amplificación química. Hay varios resultados posibles incluso la apertura de canales de calcio, canales de cloruro o generación de segundos mensajeros, algunos de estos segundos mensajeros, en particular RAF/MAPK, pueden engranar el *cross-talk* para modular la expresión génica nuclear.

**Figura 30:** Mecanismo de acción no-genómico y su influencia en el modo de acción genómico (*cross-talk*).



Se han obtenido evidencias biológico-moleculares de al menos cinco sistemas diferentes de RR que pueden cambiar la expresión génica en el núcleo (*cross-talk*). Los análogos bloqueados en la conformación 6-s-*cis* (como el lumisterol, Figura 30) han demostrado modular las respuestas genómicas en intervalos de tiempo relativamente tempranos (2–4 h). Indudablemente, está claro que la ya conocida orientación genómica del VDR tiene nuevas asignaciones en el reino de las RR mediados por el calcitriol.

## 10. ANÁLOGOS DEL CALCITRIOL Y SUS APLICACIONES CLÍNICAS.<sup>123</sup>

La elucidación de la estructura cristalina del VDR humano, así como de la proteína transportadora DBP, hizo disponible el conocimiento de las interacciones clave entre varios derivados del calcitriol y el VDR. Así, los químicos sintéticos ahora tienen la oportunidad de diseñar y sintetizar nuevos análogos con alta afinidad por el VDR. Se desconoce, sin embargo, como disminuir los efectos calcémicos de análogos del calcitriol. La investigación actual se centra en el diseño racional de nuevos análogos del calcitriol con débiles efectos calcémicos y amplios efectos terapéuticos. A continuación se resumen los derivados de la vitamina D de potencial terapéutico.

### 10.1. Derivados 16-en-22-oxa-calcitriol.

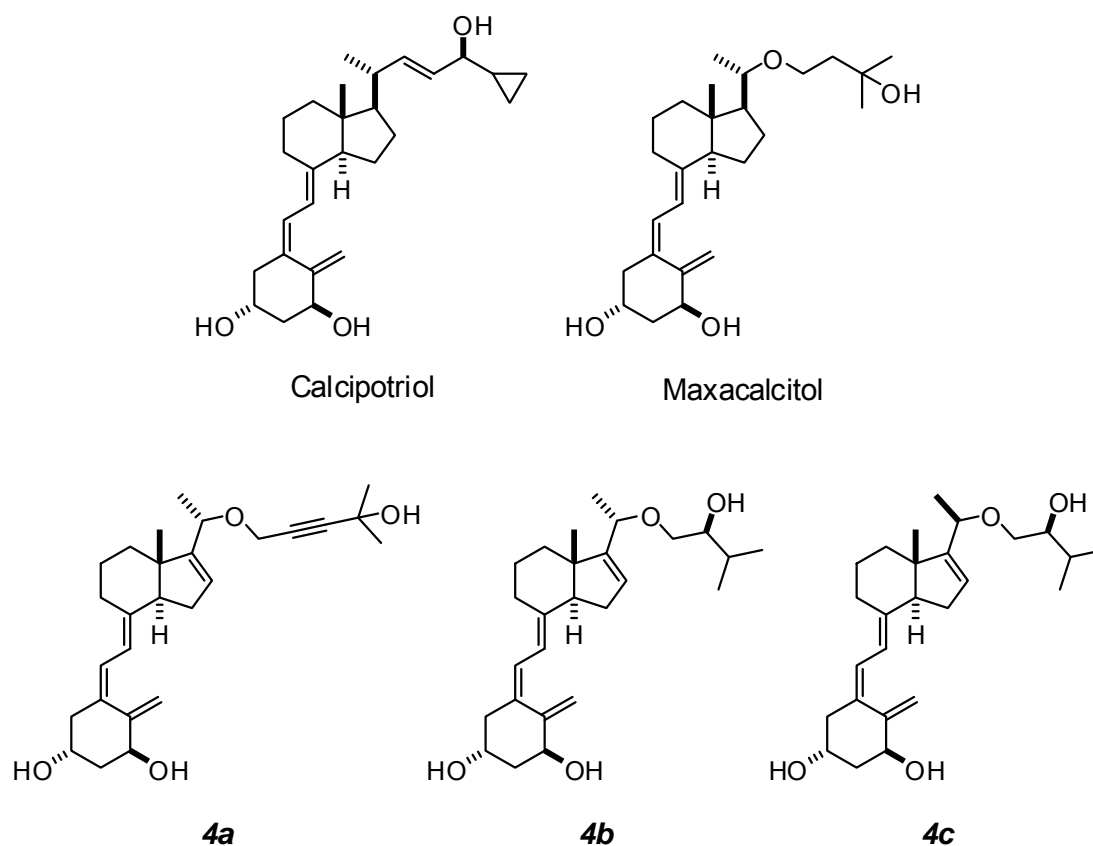
El maxacalcitol y el calcipotriol (Figura 31) son agentes antipsoriáticos percutáneos con débiles efectos calcémicos atribuibles a diferencias en los perfiles farmacocinéticos.<sup>124</sup> Los análogos **4a** y **4c** poseen labilidad metabólica superior al maxacalcitol.<sup>125</sup> Los compuestos **4a**, **4b** y **4c** presentan actividades antiproliferativas en queratinocitos superiores o comparables al maxacalcitol. Debido a su mayor labilidad metabólica se observó que, después de la administración percutánea de estos compuestos, la elevación en la concentración de calcio sérico era mucho menor que la observada después de la administración de maxacalcitol.

---

(123) Tadakatsu T, Kazumi M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1303-1316.

(124) Masuda S, Byford V, Kremer R, Makin HLJ, Kubodera N, Nishii Y, Okazaki A, Okano T, Kobayashi T, Jones G. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8700-8708.

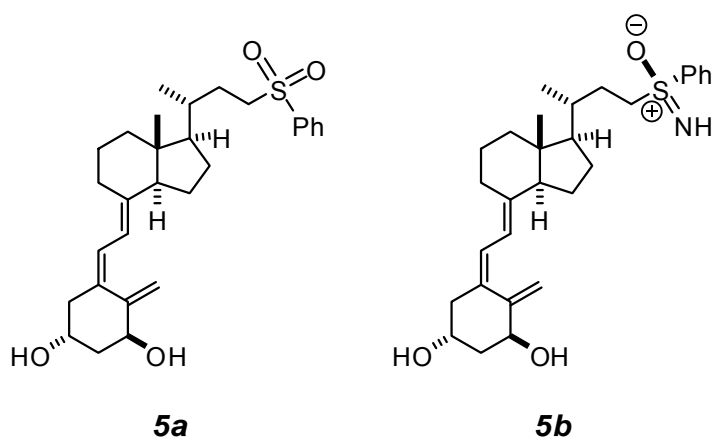
(125) Shimizu K, Kawase A, Haneishi T, Kato Y, Kobayashi T, Sekiguchi N, Yamamoto T, Ishigai M, Tokuda K, Matsushita T, Shimaoka S, Morikawa K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**

**Figura 31:** Análogos 16-en-22-oxa-calcitriol.

## 10.2. Derivados 24-sulfona y 24-sulfoxina.

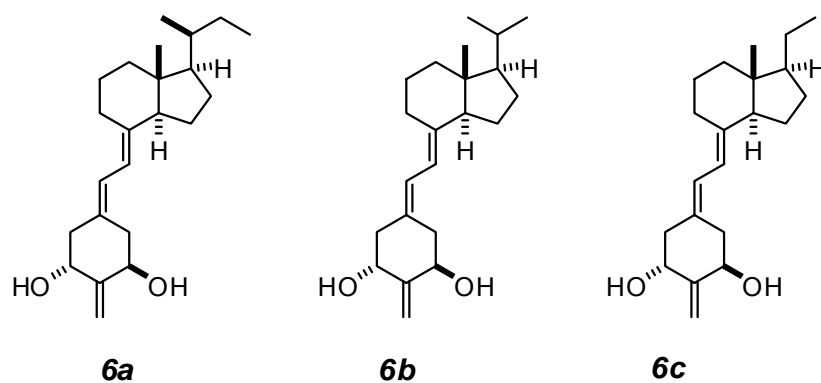
Si fuera posible inhibir o retardar la hidroxilación en la posición C24 del calcitriol su vida biológica sería más prolongado, dándole así una acción terapéutica más eficaz. Se confirmó que la sulfona **5a** y la sulfoxina **5b** (Figura 32) ejercían un efecto inhibitor sobre la CYP24 hidroxilasa humana.<sup>126</sup> Los compuestos **5a** y **5b** son inhibidores selectivos de la CYP24 hidroxilasa humana en concentraciones de 28 nM y 7.4 nM, respectivamente, pero ejercen efectos inhibitorios poco significativos para CYP27A y CYP27B, que son enzimas importantes en el camino biosintético del calcitriol. Para evaluar los efectos calcémicos *in vivo*, estos derivados se administraron oralmente en altas dosis durante una semana en ratones. Los resultados mostraron que ninguno de estos compuestos causa el aumento significativo de calcio sérico.

(126) (a) Posner GH, Crawford KR, Yang HW, Kahraman M, Jeon HB, Li H, Lee JK, Suh BC, Hatcher MA, Labonte T, Usera A, Dolan PM, Kensler TW, Peleg S, Jones G, Zhang A, Korczak B, Saha U, Chuang SS. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, 89-90, 5-12. (b) Kahraman M, Sinishtaj S, Dolan PM, Kensler TW, Peleg S, Saha U, Chuang SS, Bernstein G, Korczak B, Posner GH. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 6854-6863.

**Figura 32:** Análogos 24-sulfona y 24-sulfoxina.

### 10.3. Derivados con cadenas laterales truncadas.

Al analizar la afinidad por el VDR de los análogos **6a**, **6b** y **6c** (Figura 33) se observaron unos valores ligeramente inferiores al calcitriol, a pesar de la ausencia de cadena lateral.<sup>127</sup> Además, estos compuestos mostraron capacidad de inducir la diferenciación celular en células cancerosas HL-60 y la actividad transcripcional. Esto indica que la cadena lateral y el grupo hidroxilo en la posición C25 no son esenciales para la acción genómica.

**Figura 33:** Análogos 2-metilénicos con cadena lateral corta.

Los compuestos **6a** y **6b** no aumentaron la concentración de calcio sérico considerablemente hasta dosis de 70 mg/kilogramo/día.

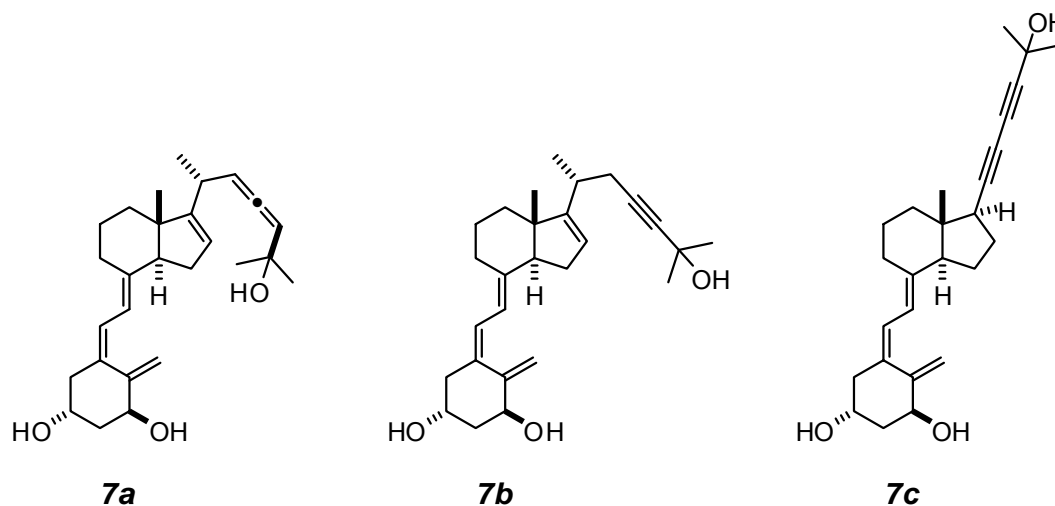
(127) Plum LA, Prahl JM, Ma X, Sicinski RR, Gowlugari S, Clagett-Dame M, DeLuca HF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6900-6904.

#### 10.4. Derivados con cadena lateral semirrígida.

Posiciones alternativas del grupo hidroxilo 25-OH en la cadena lateral podrían mejorar potencialmente la afinidad al VDR.

El compuesto **7a** (Figura 34), con un fragmento alénico en la cadena lateral<sup>128</sup> tiene 1,5 veces mayor afinidad por el VDR y 10 veces mayor actividad transcripcional que el calcitriol. Del mismo modo, el compuesto **7c**, que carece del grupo metilo en la posición C21, mostró mayor actividad transcripcional que el calcitriol.<sup>129</sup>

**Figura 34:** Análogos con cadena lateral semirrígida.



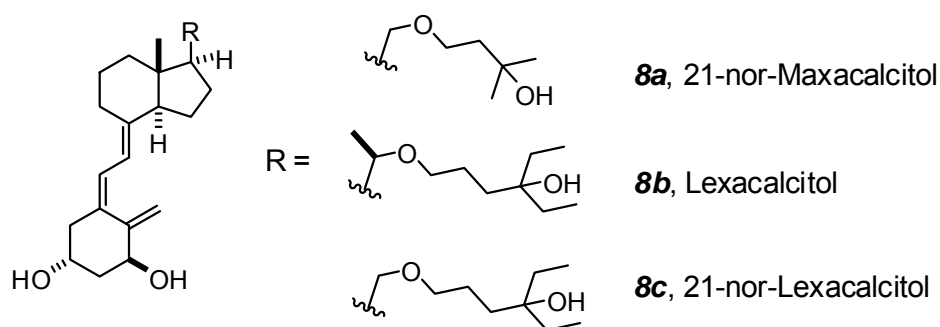
#### 10.5. Derivados 21-nor-22-oxa

Los compuestos **8a** y **8c** (Figura 35), derivados 21-nor-metílicos del maxacalcidol y lexacalcitol mostraron actividades comparables al calcitriol para algunas funciones.<sup>130</sup> El compuesto **8c** mostró mayor actividad en la inducción de la diferenciación celular (HL-60), indicando que las modificaciones en la cadena lateral pueden mejorar la actividad de diferenciación celular.

(128) Collins ED, Bishop JE, Bula CM, Acevedo A, Okamura WH, Norman AW. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *94*, 279-288.

(129) Perez-Garcia X, Rumbo A, Larriba MJ, Ordoñez P, Muñoz A, Mouriño A. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4033-4036.

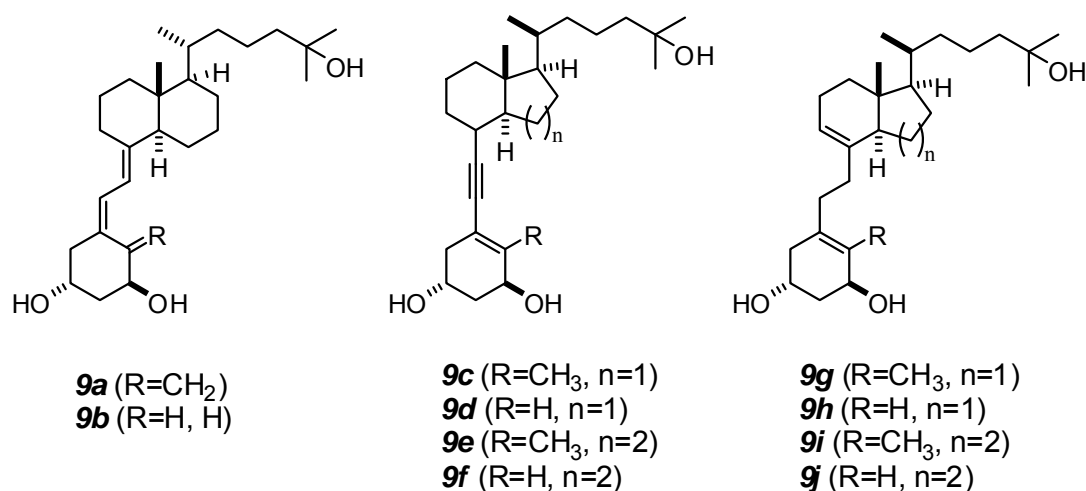
(130) Shimizu H, Shimizu K, Uchiyama Y, Sugita A, Mikami T, Yamauchi T, Kato M, Morikawa K. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7837-7841.

**Figura 35:** Análogos 21-nor-22-oxa.

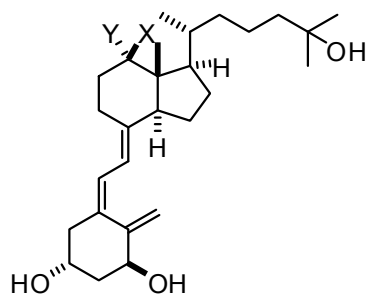
Por otra parte, el lexacalcitol no indujo aumento significativo del nivel de calcio en dosis de hasta (30 mg/Kg). Este resultado sugiere que el grupo metilo 21 desempeña un papel importante en la expresión del efecto calcémico.

### 10.6. Derivados modificados en el biclico CD.

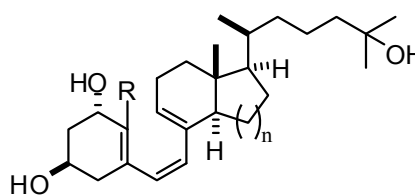
Se han sintetizado varios análogos modificados en el sistema CD.<sup>131</sup> Los análogos *trans*-decalínicos **9a** y **9b** mostraron una actividad 10 veces mayor en la inducción de la diferenciación celular (HL-60) y en la actividad antiproliferativa (MCF-7) que los compuestos parentales (Figura 36).

**Figura 36:** Análogos con modificaciones en el biciclo CD.

(131) Pinette Karen V, Yee Ying K, Amegadzie BY, Nagpal S. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, 3, 193-204.



**9k** (X=H, Y=OH)  
**9l** (X=Y=CH<sub>2</sub>)  
**9m** (X=CH<sub>3</sub>, Y=H)



**9n** (R=CH<sub>3</sub>, n=1)  
**9o** (R=H, n=1)  
**9p** (R=CH<sub>3</sub>, n=2)  
**9q** (R=H, n=2)

La actividad antiproliferativa y diferenciadora se examinó también para los análogos **9e**, **9f**, **9i**, **9j**, **9p** y **9q** que son más potentes que los compuestos con un anillo CD natural (**9p**, **9d**, **9g**, **9h**, **9n** y **9o**). Todos estos compuestos modificados mostraron actividades comparables o mayores que el calcitriol.<sup>132</sup>

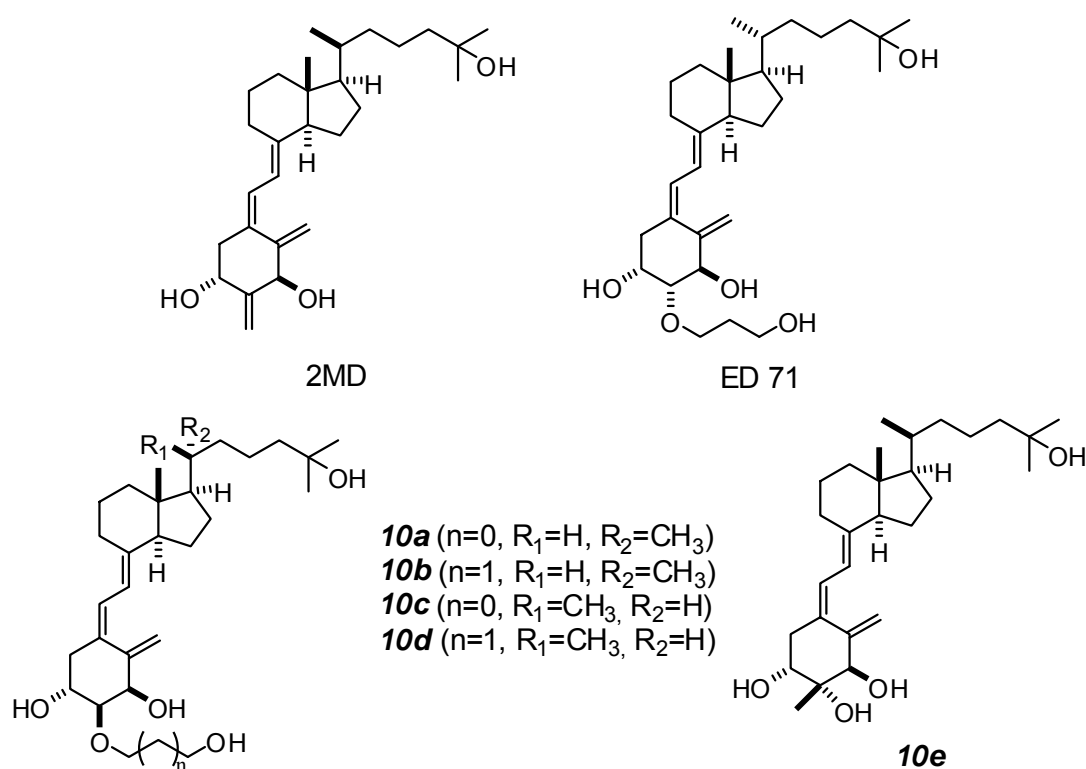
También se han sintetizado análogos sustituidos el C12.<sup>133</sup> La introducción de un grupo hidroxilo (**9k**) o grupo metileno (**9l**) disminuye la afinidad por el VDR, pero **9m**, con un grupo metilo en la posición 12 $\beta$ , se enlaza 4.4 veces mejor que el calcitriol.

### 10.7. Derivados modificados en el anillo A.

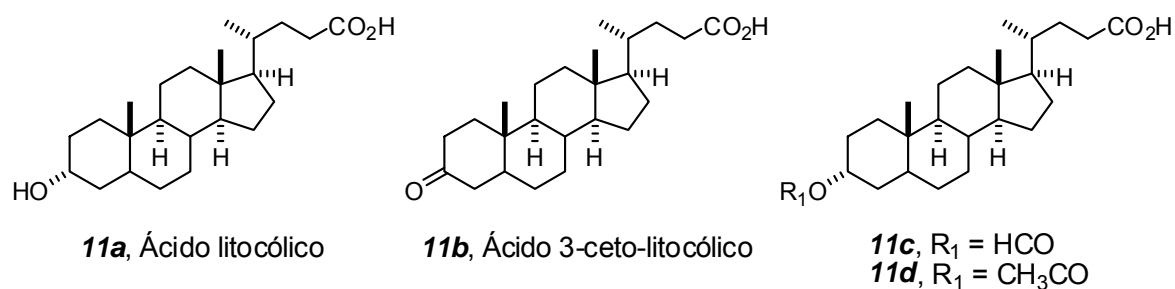
Los compuestos ED71 y 2MD (Figura 37) se desarrollaron para el tratamiento clínico de la osteoporosis. El primero posee una afinidad al VDR más débil que el calcitriol, pero cambios estructurales en la cadena lateral unida a la posición C2 pueden aumentar la afinidad por el VDR.<sup>134</sup>

De estos derivados, aquellos con cadena lateral natural (**10a** y **10b**) inducen la diferenciación de células HL-60 peor que los derivados 20-epi (**10c**, **10d**). El análogo **10e** y presenta 32 veces mayor actividad transcriptional que el calcitriol (Figura 37).

- (132) (a) Verlinden L, Verstuyf A, Verboven C, Eelen G, De Ranter C, Gao LJ, Chen YJ, Murad I, Choi M, Yamamoto K, Yamada S, Van Haver D, Vandewalle M, De Clercq PJ, Bouillon R. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 35476-35482. (b) Chen YJ, Gao LJ, Murad I, Verstuyf A, Verlinden L, Verboven C, Bouillon R, Viterbo D, Milanesio M, Van Haver D, Vandewalle M, De Clercq PJ. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 257-267.
- (133) Gonzalez-Avion XC, Mourino A. *Org. Lett.* **2003**, 5, 2291-2293.
- (134) Saito N, Suhara Y, Kurihara M, Fujishima T, Honzawa S, Takayanagi H, Kozono T, Matsumoto M, Ohmori M, Miyata N, Takayama H, Kittaka A. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7463-7471.

**Figura 37:** Análogos con modificaciones en el anillo A.**10.8. Derivados del ácido litocólico.**

Se descubrió que el ácido litocólico (**11a**, LCA) y su derivado 3-ceto-litocólico (**11b**) (Figura 38) se unían al VDR.<sup>135</sup> Algunos análogos del LCA también mostraron capacidad de activación del VDR.<sup>136</sup> Compuestos formilados o acetilados en la posición 3 del LCA (**11c**, **11d**) mostraron mayor afinidad por el VDR que el LCA, sobre todo el derivado acetilado **11d**.

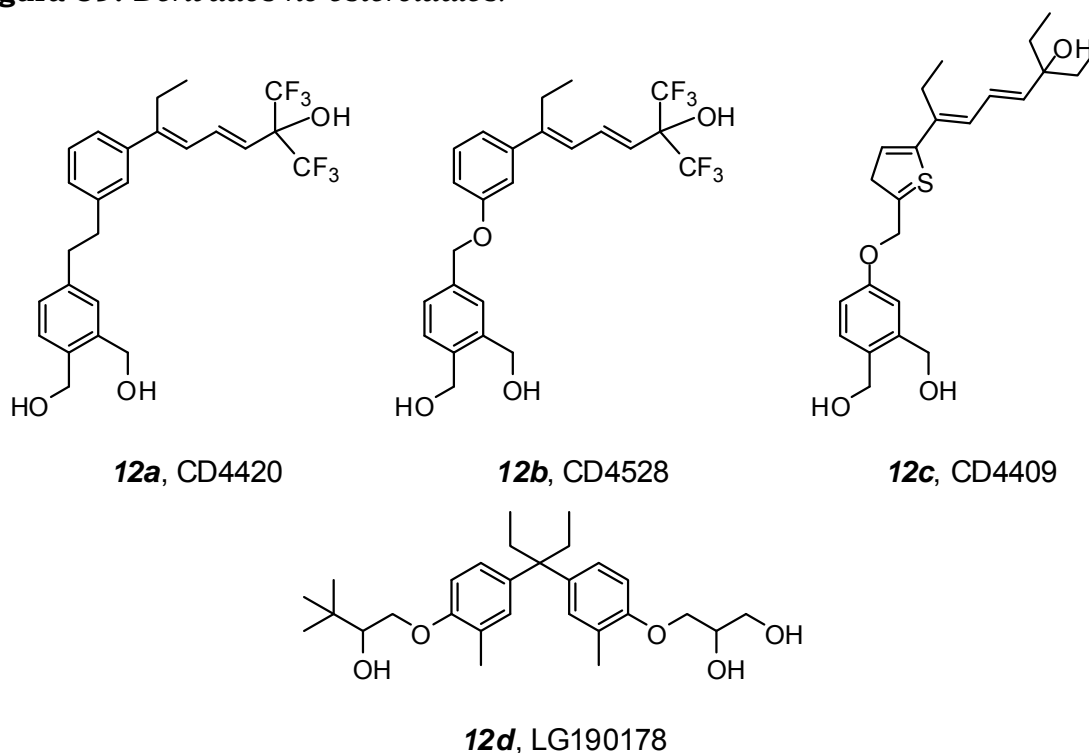
**Figura 38:** Derivados del ácido litocólico.

(135) Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, Haussler MR, Mangelsdorf DJ. *Science* **2002**, 296, 1313-1316.

### 10.9. Miméticos y derivados no esteroideos.

Ligandos no esteroideos son reconocidos por algunos miembros de la superfamilia de receptores nucleares, como el receptor de andrógenos y el receptor de estrógenos.<sup>137</sup> Para el VDR se han publicado derivados difenilmetano como el LG190178 (Figura 39),<sup>138</sup> que presentan varias actividades similares al calcitriol, como por ejemplo la afinidad por el VDR, actividad transcriptional, actividad antiproliferativa e inducción de la diferenciación celular.<sup>139</sup> Recientemente se describieron ligandos no esteroideos que poseen otras unidades aromáticas (**12a-12c**).<sup>140</sup> Estos compuestos inducen la formación del heterodímero y la interacción del VDR con coactivadores. De forma interesante, estos compuestos no inducen la actividad calcémica.

**Figura 39:** Derivados no esteroideos.

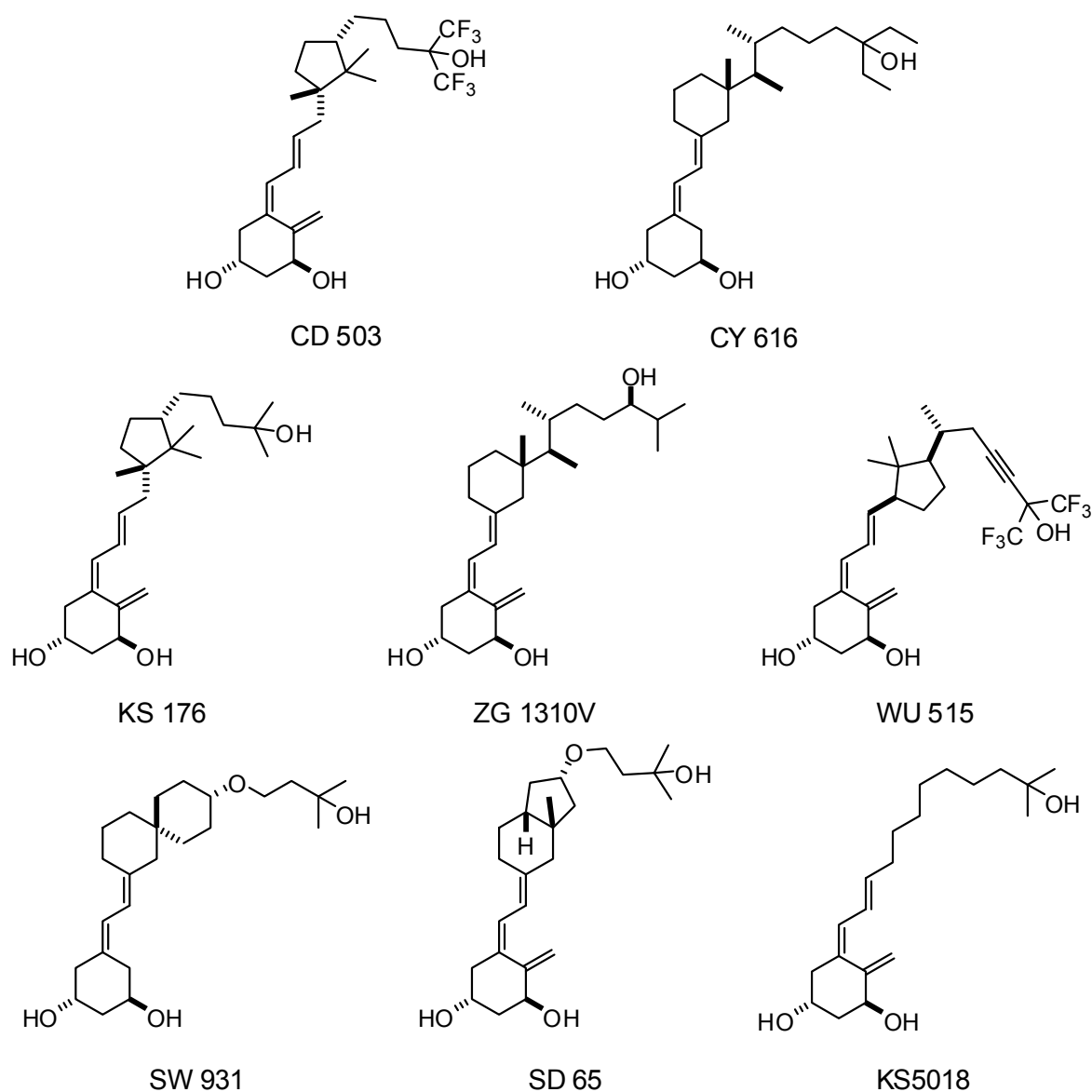


- (136) Adachi R, Honma Y, Masuno H, Kawana K, Shimomura I, Yamada S, Makishima M. *J. Lipid. Res.* **2005**, *46*, 46-57.
- (137) (a) Sun J, Meyers MJ, Fink BE, Rajendran R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. *Endocrinology* **1999**, *140*, 800-804. (b) Yin D, He Y, Perera MA, Hong SS, Marhefka C, Stourman N, Kirkovsky L, Miller DD, Dalton JT. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 211-223. (c) Einstein M. et. al. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *92*, 345-356
- (138) (a) Boehm MF, Fitzgerald P, Zou A, Elgort MG, Bischoff ED, Mere L, Mais DE, Bissonnette RP, Heyman RA, Nadzan AM, Reichman M, Allegretto EA. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 265-275. (b) Swann SL, Bergh J, Farach-Carson MC, Ocasio CA, Koh JT. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13795-13805.
- (139) Polek TC, Murthy S, Blutt SE, Boehm MF, Zou A, Weigel NL, Allegretto EA. *Prostate* **2001**, *49*, 224-233.

### 10.10. Derivados no esteroidales con modificaciones en el bicyclo CD.

Para estudiar la importancia del sistema central rígido formado por los anillos CD, se sintetizaron nuevos análogos en los que este sistema fue drásticamente modificado con la consecuente pérdida de la estructura esteroidea (Figura 40).

**Figura 40:** Derivados no esteroidales con modificaciones en el sistema CD.



El análogo K5018 no se enlaza al VDR y no estimula ninguna acción biológica. El análogo KS176 retuvo aproximadamente el 10% de la unión al VDR y mostró acción antiproliferativa, aunque mucho menos pronunciada que la del calcitriol pero con insignificante acción calcémica.

El análogo CD503 presentó acción antiproliferativa 8.5 veces mejor que el calcitriol pero con reducidas acciones calcémicas.<sup>141</sup> En general, la reintroducción de cualquiera anillo C de seis miembros o anillo D de cinco miembros produce análogos no esteroideos con una potencia antiproliferativa mayor que el calcitriol.

El análogo ZG 1310V posee una acción antiproliferativa 30 a 60 veces mayor que el calcitriol, mientras que la acción calcémica es 3 veces más baja. El análogo CY616 presenta una acción antiproliferativa/calcémica 1.275 veces mejor que el calcitriol.<sup>142</sup>

### 10.11. Análogos Gemini.

Gemini es el nombre de una clase de análogos con una doble cadena lateral en el C20. Estos análogos fueron diseñados para aumentar la actividad transcripcional.

La razón fundamental detrás de este diseño proviene tanto de la mayor actividad de los 20-epi derivados como del descubrimiento de que el calcitriol ocupa aproximadamente la mitad del espacio disponible dentro del *bolsillo* de unión al VDR. La cadena lateral original seguiría entonces el mismo camino que la cadena lateral del calcitriol, mientras que la segunda cadena lateral estaría en los espacios ocupados por el análogo 20-epi, así conduciendo a una mayor actividad transcripcional.

Por ejemplo el análogo gemini **13b** es capaz de estabilizar las conformaciones funcionales del VDR y del heterodímero VDR-RXR.<sup>143</sup> O'Kelly y col. describieron una serie adicional de análogos gemini modificados, de los cuales el análogo **13c** (Figura 41) es 10 veces más potente en la inhibición del crecimiento de células

---

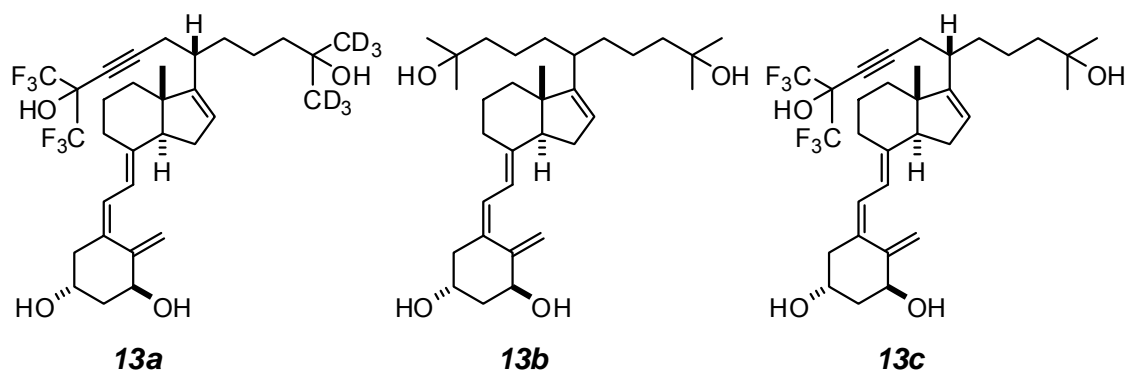
(141) Verstuyf A, Verlinden L, Van Baelen H, Sabbe K, D'Hallewyn C, De Clercq P, Vandewalle M, Bouillon R. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 549.

(142) Verstuyf A, Verlinden L, Van Etten E, Shi L, Wu Y, D'Hallewyn C, Van Haver D, Zhu GD, Chen YJ, Zhou X, Haussler MR, De Clercq P, Vandewalle M, Van Baelen H, Mathieu C, Bouillon R. *J. Bone Miner. Res.* **2000**, *15*, 237.

(143) Bury Y, Herdick M, Uskokovic MR, Carlberg C. *J. Cell Biochem.* **2001**, *81*, 179.

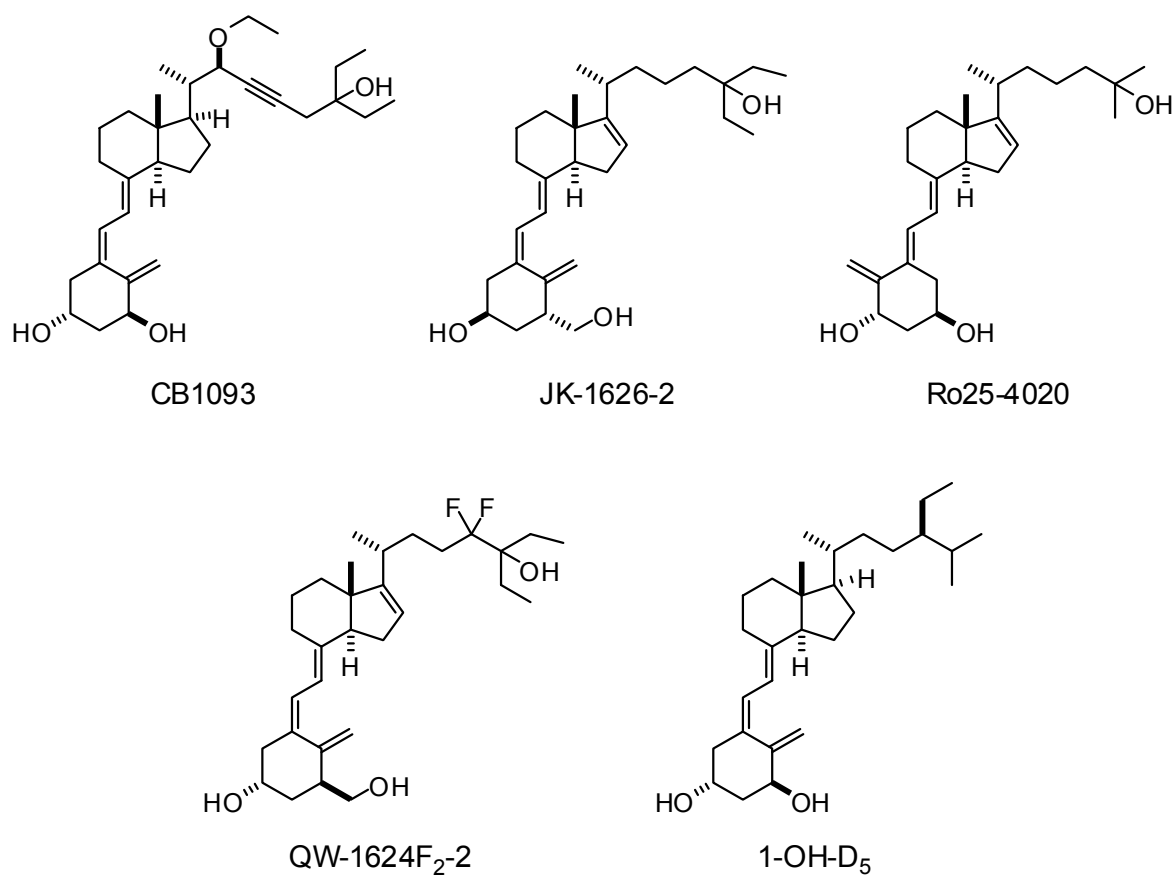
MCF-7 de cáncer de mama, células leucémicas HL-60 y células de cáncer de próstata LNCaP que el análogo gemini tradicional.<sup>144</sup>

**Figura 41:** Análogos Gemini.



### 10.12. Otros análogos.

**Figura 42:** Otros análogos.



(144) O'Kelly J, Uskokovic M, Lemp N, Vadgama J, Koeffler HP. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *100*, 107.

En la Figura 42 se muestran las estructuras de otros análogos interesantes análogos. El análogo CB1093 es 100 veces más potente en la acción antiproliferativa y 4 veces menos calcémico que el calcitriol.<sup>145</sup>

El análogo JK-1626-2 reduce la metástasis en cánceres de huesos y próstata.<sup>146</sup> El Ro25-4020 retarda la aparición y el crecimiento de tumores de origen leucémico.<sup>147</sup> El QW-1624F<sub>2</sub>2 suprime el crecimiento tumoral en neuroblastomas<sup>148</sup> y el 1-OH-D<sub>5</sub> suprime la incidencia de cáncer de mama.<sup>149</sup>

## **11. Resumen de los métodos de síntesis para la obtención de análogos de la vitamina D.**

A continuación se resumen las rutas sintéticas más usadas para la preparación de análogos de la vitamina D.

### **11.1. Ruta de Wittig-Horner.**

Esta ruta que fue desarrollada originalmente por Lythgoe y col. y más tarde mejorada por el grupo de Hoffmann la Roche. Esta estrategia es especialmente útil para construir análogos del calcitriol modificados en los anillos CD o en la cadena lateral, o para la preparación de 19-nor-análogos.<sup>150</sup> Es un método suave y altamente convergente en el que se acopla, a baja temperatura, el anión del óxido de fosfina **14** con una cetona tipo Grundmann **15** para dar, después de la desprotección, el análogo en elevado rendimiento (Esquema 1). Su inconveniente es el elevado número de pasos necesarios para obtener el óxido de fosfina.

---

(145) Binderup L, Binderup E, Godtfresden WO, Kissmeyer AM. In *Vitamin D*, 2<sup>nd</sup>. Ed. Feldman D, Pike J, Glorieux F, eds. Elsevier Academic Press **2005**, 1489.

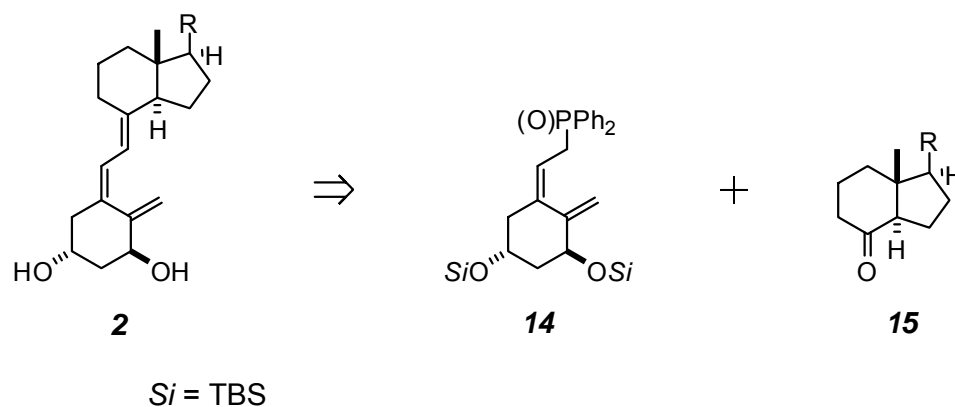
(146) Peleg S, Khan F, Navone NM, Cody DD, Johnson EM, Van Pelt CS, Posner GH. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *97*, 203.

(147) Sharabani H, Izumchenko E, Wang Q, Kreinin R, Steiner M, Barvish Z, Kafka M, Sharoni Y, Levy J, Uskokovic M, Studzinski GP, Danilenko M. *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 3012.

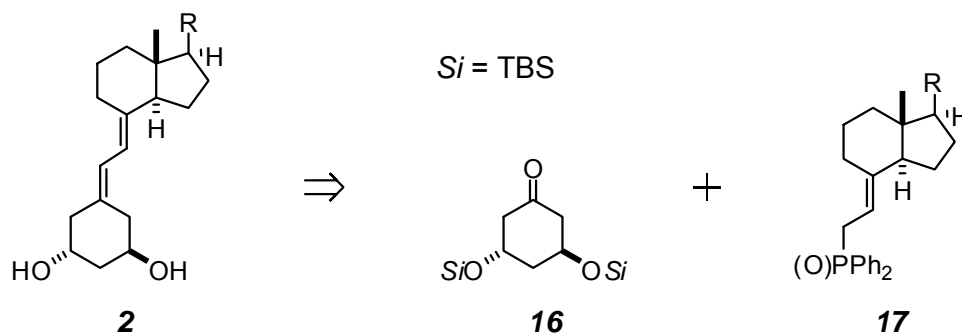
(148) Reddy CD, Patti R, Guttapalli A, Maris JM, Yanamandra N, Rachamalla A, Sutton LN, Phillips PC, Posner GH. *J. Cell Biochem.* **2006**, *97*, 198.

(149) Mehta RG, Hussain EA, Mehta RR, Das Gupta TK. *Mutat. Res.* **2003**, *523-524:253-64.*, 253.

(150) Kabat MM, Radinov R. *Curr. Opin. Drug Disc. Der.* **2001**, *4*, 808-833.

**Esquema 1:** Ruta de Wittig-Horner.**11.2. Ruta de Wittig-Horner alternativa.**

A diferencia de la ruta anterior, en este método se prepara el óxido de fosfina **17** del biciclo CD y se acopla con la cetona **16**. Esta variante de la ruta de Wittig-Horner se utiliza para preparar análogos del calcitriol modificados en el anillo A, en particular para preparar 19-nor-análogos. Este método se ha utilizado en la compañía Schering (Esquema 2).<sup>151</sup>

**Esquema 2:** Ruta de Wittig-Horner alternativa.**11.3. Ruta a través de la forma 5,6-trans.**

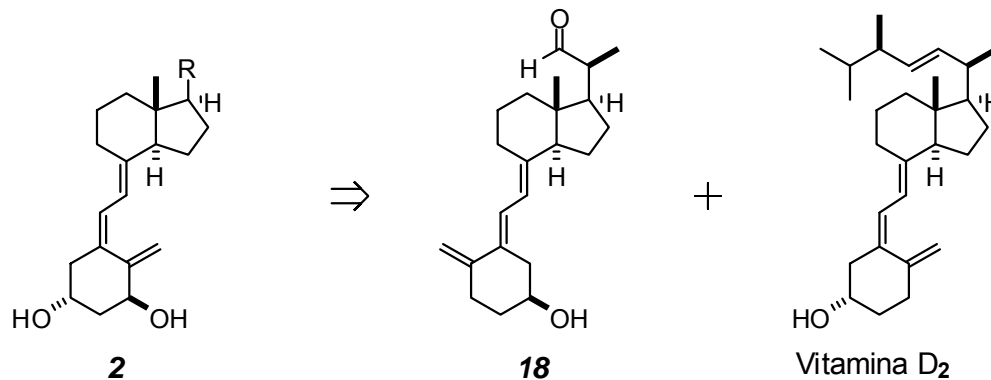
Este método se desarrolló en el grupo de Hesse<sup>152</sup> y más tarde se mejoró en los laboratorios de la compañía LEO Pharmaceutical Products. El intermedio clave de esta ruta es el 5,6-*trans*-aldehído **18** que se prepara fácilmente a partir de la

(151) SHERING AKTIENGESELLSCHAFT:WO00107405 **2000**.

(152) Andrews DR, Barton DHR, Hesse RH. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4819-4828.

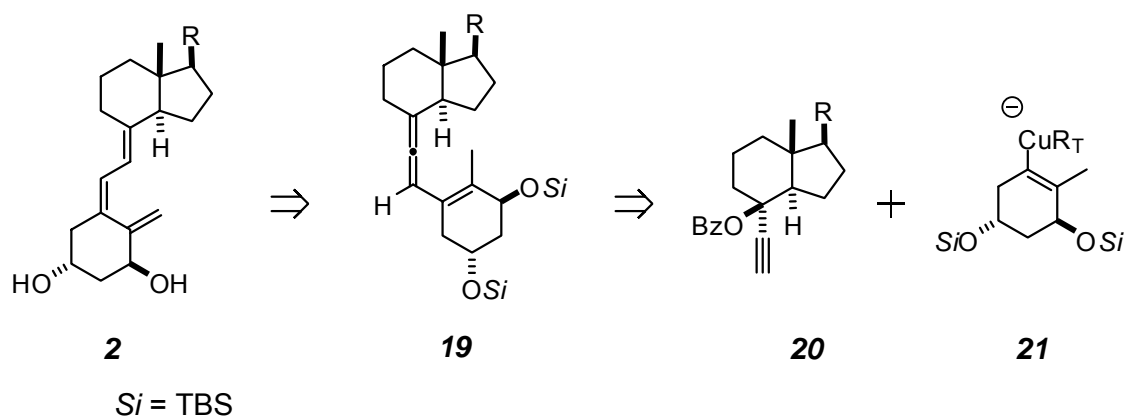
vitamina D<sub>2</sub>. Esta estrategia se utiliza actualmente en las compañías Schering y LEO Pharmaceutical Products (Esquema 3).<sup>153</sup>

**Esquema 3:** Ruta a través de la forma 5,6-trans.



#### 11.4. Estrategia Vinilalénica.

**Esquema 4:** Estrategia Vinilalénica.



Esta ruta convergente se desarrolló en el grupo de Okamura (Esquema 4).<sup>154</sup> El intermedio vinilalénico clave **19** se prepara a partir del benzoato propargílico **20** y el cuprato **21**. El vinilaleno se isomeriza térmicamente para obtener el sistema triénico de la vitamina D<sub>3</sub>. Esta ruta es de potencial interés para la preparación de análogos no accesibles por las rutas anteriores.

(153) Calverley MJ. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 43, 4609.

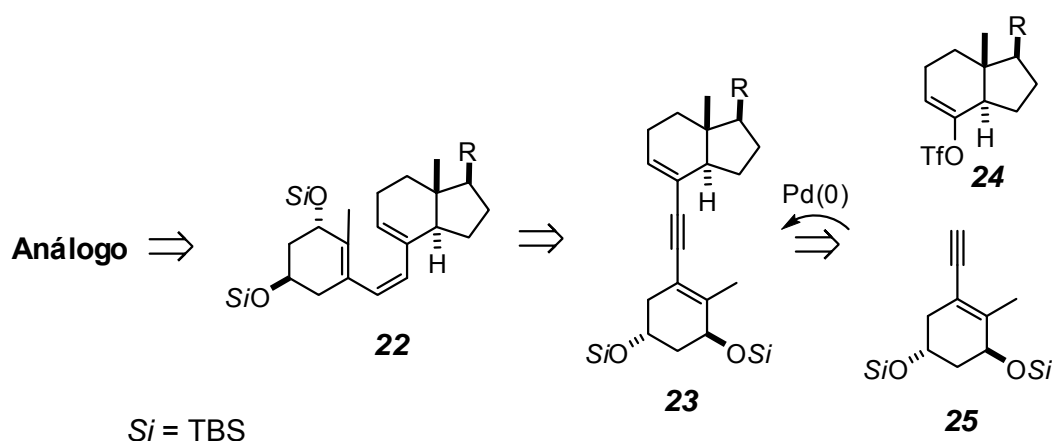
(154) Hammond ML, Mouriño A, Okamura WH. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 4907.

### 11.5 Ruta dienínica.

Este método, inicialmente desarrollado por Lythgoe, se mejoró más tarde por los grupos de Mouriño<sup>155</sup> y Okamura (Esquema 5).<sup>156</sup> El dienino **23** clave se prepara fácilmente mediante un acoplamiento catalizado por Pd(0) entre el enoltriflato cinético **24** y el enino **25**.

La hidrogenación parcial del triple enlace del dienino **23**, seguido de isomerización térmica de la correspondiente previtamina D<sub>3</sub> **22**, conduce a la formación del análogo de la vitamina D<sub>3</sub> en elevado rendimiento.

**Esquema 5:** Ruta dienínica.



### 11.6. Ruta acoplamiento-ciclación catalizada por Pd(0).

Este método fue desarrollado por Trost.<sup>157</sup> El sistema triénico de la vitamina D<sub>3</sub> se forma al calentar una mezcla del enino **26**, el bromuro vinílico **27**, trietilamina y una cantidad catalítica de Pd(0) en tolueno, seguido de desprotección (Esquema 6). Este método se ha usado para construir análogos del calcitriol modificados en el anillo A. Sin embargo, debido a la elevada temperatura que se necesita en la reacción, este método no es adecuado para preparar análogos que sean susceptibles de experimentar una isomerización térmica conducente a las correspondientes previtaminas. Este método se ha empleado en las compañías

(155) (a) Castedo L, Mascareñas JL, Mouriño A, Sarandeses LA. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1203-1206.

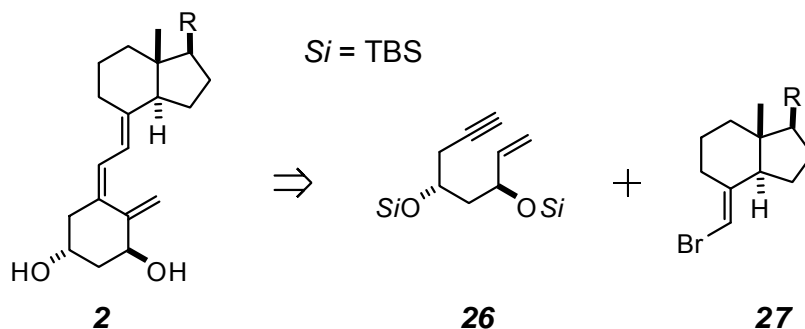
(b) Mascareñas JL, Sarandeses LA, Castedo L, Mouriño A. *Tetrahedron* **1991**, 20, 3485-3489.

(156) Okamura WH, Aurrecochea JM, Gibbs RA, Norman AW. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4072-4083.

(157) Trost BM, Dumas J, Villa M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9836-9845.

Chugai y Teijin. El método de Trost es especialmente útil para construir análogos funcionalizados en el anillo A.

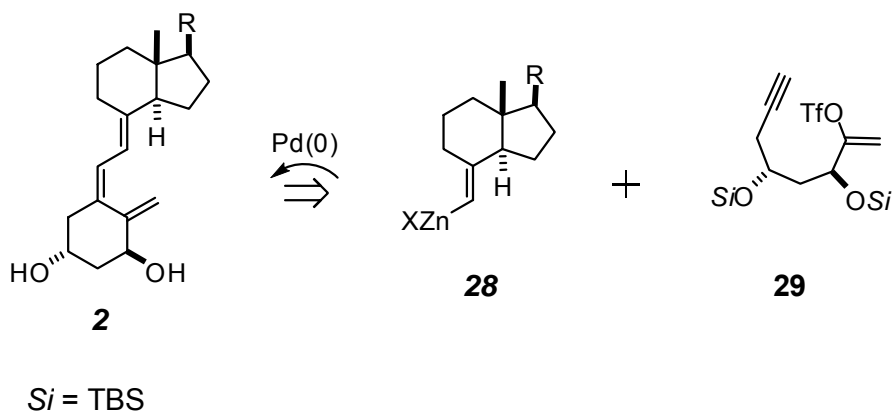
**Esquema 6:** Ruta tándem acoplamiento-ciclación catalizado por Pd(0).



### 11.7. Ciclación – Acoplamiento a partir de enoltriflatos.

Esta estrategia ha sido puesta a punto en el grupo de Mouriño.<sup>158</sup> En el esquema 7, se ilustra el proceso. La nueva estrategia posee ventajas sobre el método de Trost. Por ejemplo, no se requieren temperaturas tan altas, por lo que se puede aplicar a la síntesis de análogos de la vitamina que se isomerizan a la forma previtamínica a temperaturas superiores a la temperatura ambiente.

**Esquema 7:** Ciclación-Acoplamiento a partir de enoltriflatos.



(158) Gómez-Reino C, Vitale C, Maestro M, Mouriño A. *Org. Lett.* **2005**, 7, 5885.

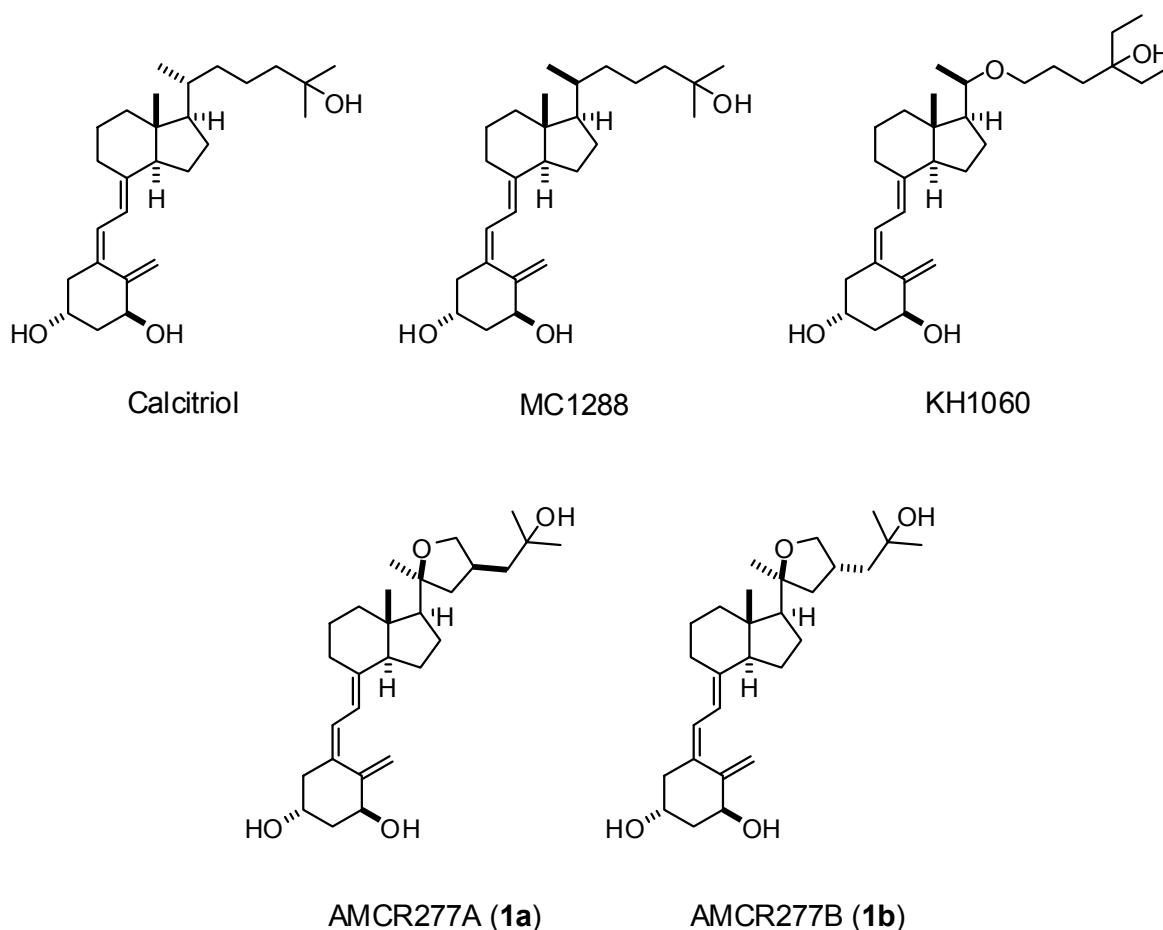
# **OBJETIVOS**



## 1. OBJETIVOS

Tomando como base la superposición de las estructuras cristalinas de los complejos formados por los dos superagonistas (MC1288 y KH1060, figura 1) y la hormona natural calcitriol, con el receptor mutado de Moras (Moras-VDR), se ha diseñado como posible nuevo superagonista el análogo AMCR277A (**1a**) que incluye en su estructura una unidad de ciclo tetrahidrofuránico en la cadena lateral.

Figura 1. El calcitriol, los superagonistas MC1288 y KH1060, y los análogos sintéticos AMCR277A y AMCR277B.



El objetivo concreto de este trabajo es

- Realización de estudios de *docking* de AMCR277A y su epímero AMCR277B.
- Síntesis de AMCR277A y AMCR277B.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los análogos de la vitamina D tienen un interés especial en la actualidad porque abren camino para la terapia del cáncer (mama, colon, próstata, leucemia), enfermedades inflamatorias (artritis reumatoide y artritis psoriática), enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple, diabetes tipo I) entre otras relevantes patologías.<sup>159</sup> El calcitriol induce la diferenciación celular, inhibe la proliferación de células malignas y reduce de forma considerable el crecimiento de tumores. Prueba de la importancia del calcitriol en los procesos cancerígenos es la existencia de concentraciones elevadas del receptor VDR en varios tumores malignos y los abundantes datos epidemiológicos que asocian una mayor incidencia de cáncer con deficiencia de vitamina D.

El diseño racional de análogos abre el camino para obtener nuevos análogos activos de potencial interés terapéutico.

---

(159) (a) Bouillon R, Verstuyf A, Verlinden L, Eelen G, & Mathieu C. *Recent Results Cancer Res.* **2003**, *164*, 353-356. (b) Norman AW, Mizwicki MT, & Norman DP. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 27-41. (c) DeLuca HF. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 1689S-1696S.

# **ANTECEDENTES**

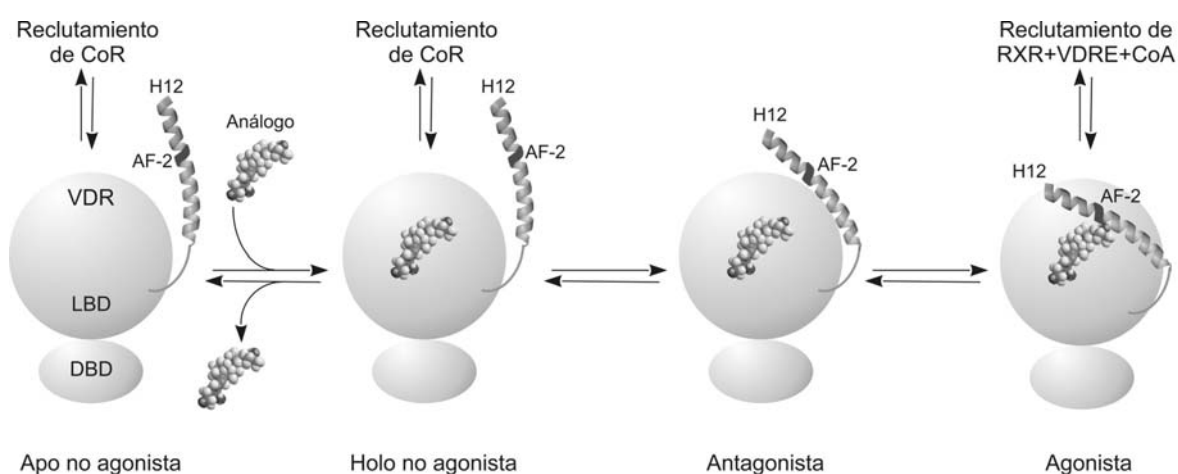


## 1. ASPECTO BIOLÓGICO.

### 1.1. Agonistas, superagonistas y antagonistas del calcitriol.

Se cree que el VDR unido al ligando puede adoptar tres conformaciones diferentes, las cuales están en equilibrio dinámico (Figura 2).

Figura 2: *Equilibrio conformacional entre el VDR activado y no activado por un análogo.*

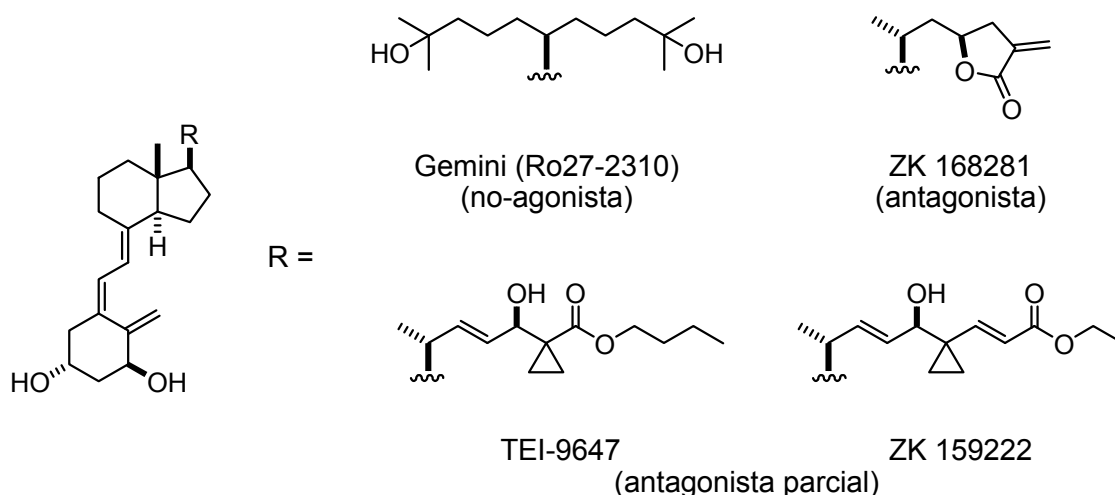


La diferencia principal entre ellos es la colocación de la función de activación AF-2 en la hélice 12. La unión al ligando debe cambiar este equilibrio para favorecer una de las posibles conformaciones. Los superagonistas del calcitriol han sido presentados como estabilizadores de la conformación agonista del VDR, que es la más resistente a la degradación proteolítica. Por lo tanto, el potencial para la transactivación de un análogo del calcitriol no depende de su constante de afinidad ( $K_a$ ) para el VDR, sino en su capacidad de estabilizar la llamada conformación agonista del VDR. La conformación agonista es responsable del reclutamiento de coactivadores (CoA) y por consiguiente, de la activación de la transcripción génica. La mayor parte de los análogos de calcitriol conocidos hasta ahora son agonistas, y algunos de éstos presentan mayor potencial para la transactivación que la hormona natural.

Los datos cristalográficos están disponibles sólo para la conformación agonista del VDR. Sin embargo, la estructura cristalina de no agonistas y las

conformaciones antagonistas son conocidas para otros receptores nucleares estrechamente relacionados. Se piensa que la conformación no agonista es la preferida en los apo-NRs y su papel biológico es de reclutamiento de co-represores (CoR) para inhibir la transcripción génica. En el caso del VDR se cree que esta conformación es estabilizada por el análogo gemini (Hoffmann-La Roche, Ro27-2310) y derivados (Figura 3). Estos compuestos que contienen dos cadenas laterales son los únicos análogos no agonistas conocidos del calcitriol hasta ahora.

Figura 3: Estructura del no agonista gemini (Hoffmann -La Roche), antagonista ZK 168281 (Schering) y antagonistas parciales: TEI-9647 (Teijin) y ZK 159222 (Schering).



Finalmente, en la conformación antagonista, la hélice 12 se coloca de tal modo que impide al VDR interactuar con coactivadores o co-represores. Hasta ahora hay dos clases de análogos del calcitriol capaces de inhibir los efectos de la hormona natural, los ésteres 25-carboxílicos de Schering (ZK159222 y ZK168281) y los análogos de  $1\alpha,25R-(OH)_2-D_3-23S,26$ -lactona, como la TEI-9647 (de Teijin). En comparación con la hormona natural, ambos tipos de compuestos tienen una cadena lateral voluminosa, que es asumida como la principal base estructural de su acción antagonista.

El potencial de un antagonista depende de su afinidad por el VDR, así como su actividad agonista residual comparada con el ligando natural. La actividad agonista residual del ZK159222 y TEI-9647 han sido determinadas, siendo

---

aproximadamente 20% de la actividad del ligando natural, mientras que ZK168281 mostró menos del 5%. Esto clasifica al ZK168281 como un antagonista verdadero, mientras que ZK159222 y TEI-9647 se describen como antagonistas parciales.

El agonismo y el antagonismo son procesos estrechamente relacionados, ya que las conformaciones agonistas y antagonistas del VDR están en equilibrio y puede modificarse por la interacción con otras moléculas además del ligando, como por ejemplo otros receptores nucleares, VDREs, CoAs y CoRs. Un ejemplo es el efecto represivo en la transcripción génica ejercida como consecuencia de la baja afinidad por un VDRE particular imperfecto que podría resultar en la estabilización de una conformación antagonista. Esto explicaría por qué algunos genes son activados y otros inhibidos por el mismo ligando del VDR.

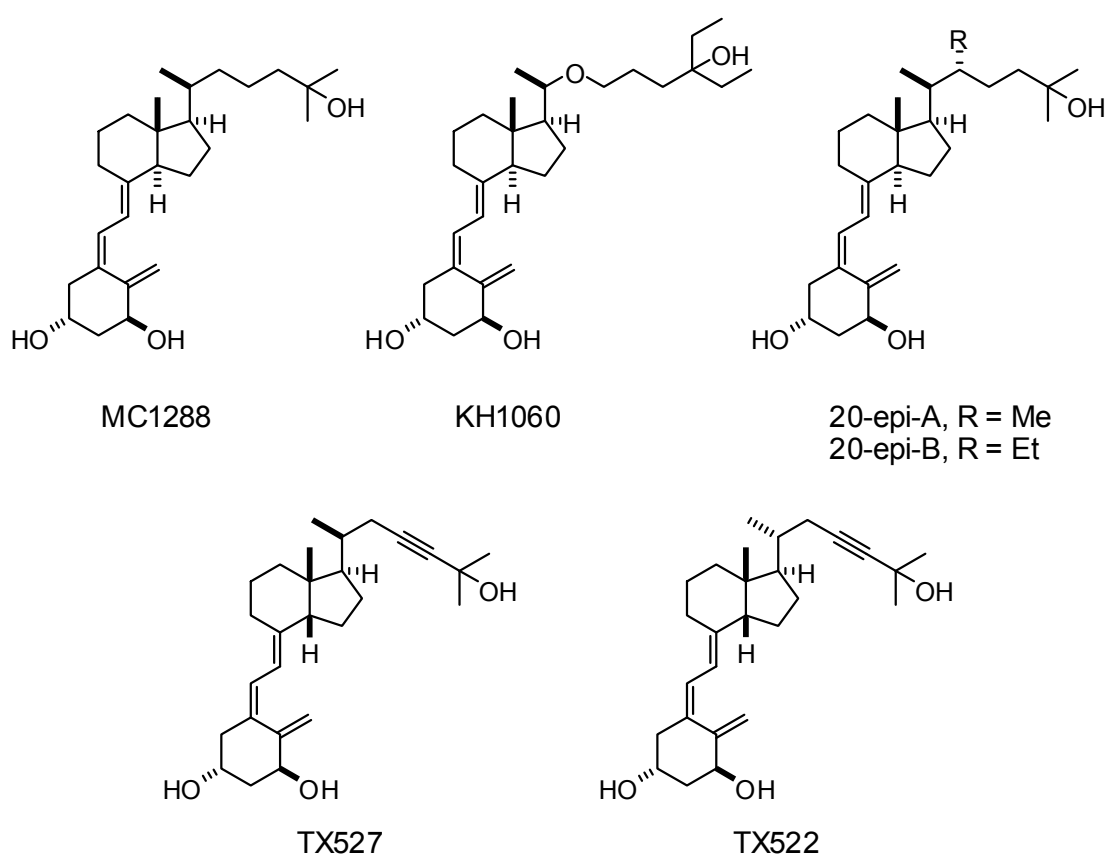
El comportamiento superagonista de algunos análogos prueba que el equilibrio agonista-antagonista del VDR puede alterarse por interacción con otros ligandos además de la hormona natural. En general, los superagonistas del calcitriol no se unen mejor al VDR o inducen mejor la formación del complejo VDR-RXR-VDRE. Su comportamiento superagonista se ha atribuido a interacciones que ocurren más allá de la formación del complejo VDR-RXR-VDRE. Es decir, la interacción del VDR con coactivadores podría cambiar el equilibrio estructural del VDR para favorecer una conformación agonista e inducir la transcripción génica (Figura 2).

Por estos motivos los términos agonista y antagonista resultan ser a veces inadecuados para describir los ligandos del receptor nuclear y algunos autores prefieren el término moduladores del receptor nuclear. Por regla general, un agonista del VDR es una molécula que al unirse a este receptor activa la transcripción génica. Un antagonista del VDR es una molécula que puede competir eficazmente con el ligando natural por el sitio de unión del receptor, pero adopta una conformación en el complejo antagonista-VDR incapaz de estimular los procesos biológicos asociados al ligando natural.

## 1.2. Superagonistas conocidos del calcitriol.

No son muchos los superagonistas conocidos del calcitriol, de hecho una búsqueda en el SciFinder con las palabras superagonistas y vitamina D presenta apenas 26 citas donde coinciden ambos términos. Entre los superagonistas más conocidos se encuentran los 20-epi-análogos KH1060 y MC1288. Recientemente se han descrito nuevos análogos del calcitriol con actividad superagonista, como los análogos 20-epi-A y 20-epi-B<sup>160</sup> o los 14-epi TX522 y TX527 (Figura 4).<sup>161</sup>

Figura 3: Superagonistas conocidos del calcitriol.



Los 14-epi-análogos TX522 y TX527 presentan propiedades antiproliferativas 10 veces mayor que la hormona natural, con efectos calcémicos marcadamente inferiores en pruebas tanto *in vitro* como *in vivo*.

(160) Yamamoto K, Inaba Y, Yoshimoto N, Choi M, Deluca HF & Yamada S. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 932-939.

(161) Eelen G, Verlinden L, Rochel N, Claessens F, De Clercq P, Vandewalle M, Tocchini-Valentini G, Moras D, Bouillon R & Verstuyf A. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1566–1573.

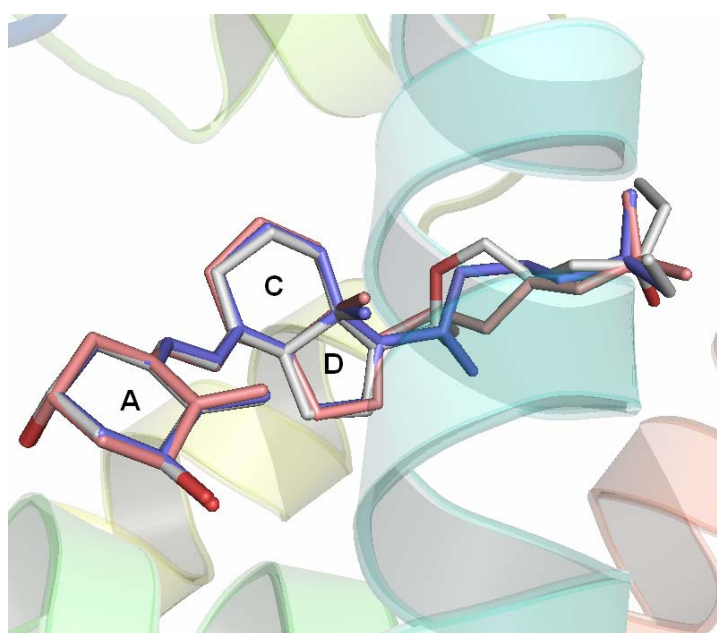
Los análogos 20-epi-A y 20-epi-B son 250 veces más potentes que la hormona natural en la inducción de la transcripción. Ambos compuestos son 120 y 28 veces más potentes que el calcitriol en la promoción de la diferenciación celular en células cancerosas HL-60.

### 1.3. Los superagonistas KH1060 y MC1288.

Los 20-epi-análogos, que poseen configuración invertida en C20, han despertado una gran atención debido a sus potentes propiedades anti-proliferativas e inductoras de la diferenciación celular con una afinidad por el receptor VDR similar al de la hormona natural.

El análogo KH1060, un miembro de la familia 20-epi, exhibe propiedades similares a la hormona natural pero a concentración no calcémica. El KH1060 y el MC1288 inducen la transcripción dependiente del VDR a concentraciones 100 veces menores que la hormona natural y presentan actividades antiproliferativas varias órdenes de magnitud más altas. No se conocen los mecanismos que expliquen las diferencias en la actividad biológica entre la hormona natural y los epi-derivados, aunque ciertamente dependen del LBD del VDR.

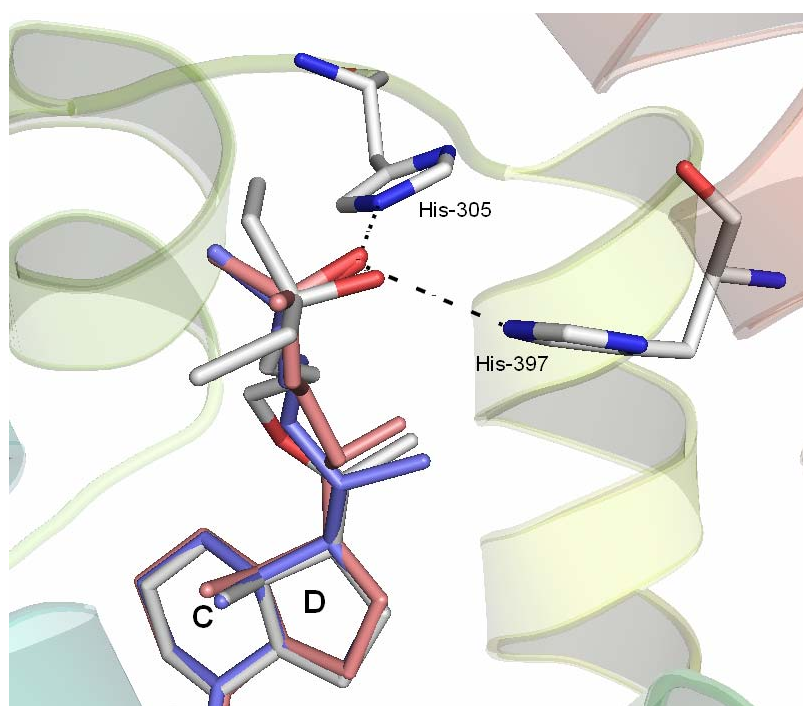
Figura 5. Superposición de las estructuras cristalinas del calcitriol (rosa), KH1060 (gris) y MC1288 (azul).



Los complejos formados por la hormona, los superagonistas KH1060 y MC1288 con el receptor VDR de Moras (Moras-VDR), muestran que la proteína adopta la misma conformación agonista, adaptándose a los ligandos en el centro activo (Figura 5).

En todos los complejos, todos los anillos (A, C y D) de los ligandos adoptan la misma conformación e interactúan de forma idéntica con la proteína. Las diferencias se encuentran únicamente en las cadenas laterales, que adaptan sus conformaciones para que el grupo C25-OH interactúe con los residuos de aminoácidos His-305 y la His-397 (Figura 6).

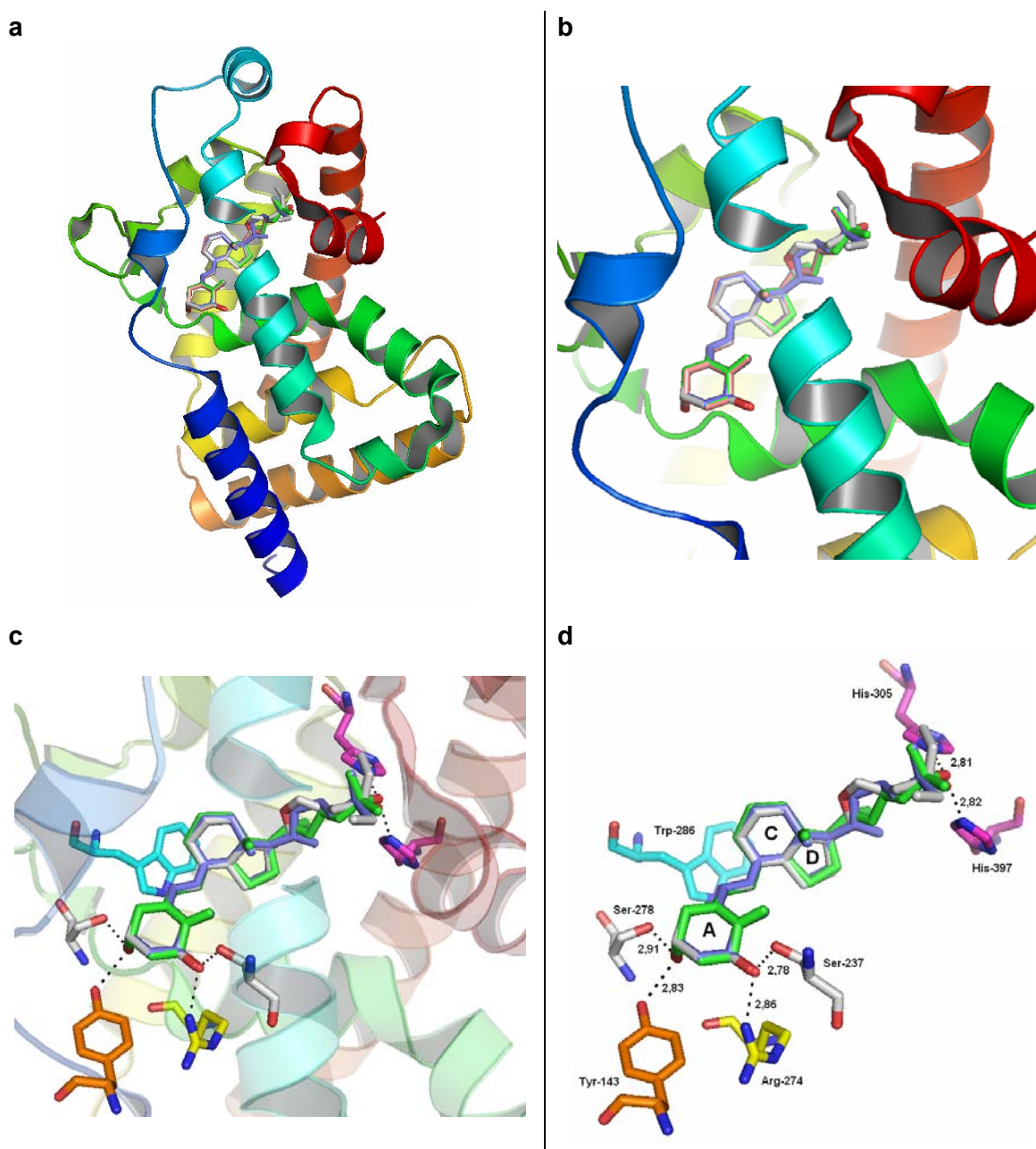
Figura 6. *Interacciones del C25-OH con las histidinas 397 y 305 del VDR mutado de Moras.*



La geometría invertida en C20 propicia que las cadenas laterales sigan diferentes senderos. El complejo MC1288-VDR presenta una conformación de más baja energía que los correspondientes complejos de KH1060 y calcitriol, que poseen conformaciones más congestionadas. El análogo KH1060 se estabiliza mediante contactos adicionales con el receptor.

Recientemente, en nuestro grupo de investigación hemos desarrollado un algoritmo computacional que permite predecir la afinidad al receptor para una amplia variedad de análogos con modificaciones en la cadena lateral. Nuestros resultados soportan la idea de que los análogos más activos son los que presentan mejor interacción con el receptor y, por lo tanto, forman complejos más estables. Tomando como base estos resultados, el efecto superagonista se ha explicado en base a una mayor estabilidad y a un mayor tiempo de vida del complejo activo, excluyendo diferentes conformaciones del LBD.

Figura 7. Diversas representaciones de los ligandos calcitriol (rosa), KH1060 (gris) y MC1288 (azul) unidos al LBD-VDR(Moras).



En la figura 7 se ilustra la superposición de las estructuras cristalinas de los 20-epi análogos y del calcitriol en el receptor VDR de Moras [VDR(Moras)]. En **(a)** VDR(Moras) + calcitriol (rosa) + KH1060 (gris) + MC1288 (azul). En **(b)** una vista ampliada del lugar de inserción de los ligandos. **(c)** Se muestran los residuos de aminoácidos más importantes en las interacciones con los ligandos y su ubicación en términos de estructura terciaria. **(d)** Ilustra una vista menos congestionada de estos residuos.

El centro activo del receptor está formado predominantemente por residuos hidrofóbicos. El C1-OH establece dos puentes de hidrógeno, uno con la Ser-237 en la hélice 3 y otra con la Arg-274 en la hélice 5. El C3-OH forma dos puentes de hidrógeno, una con la Ser-278 en la hélice 5 y otra con la Tyr-143.

El sistema triénico se ajusta a un canal hidrofóbico definido por la Ser-275 y el Trp-286 por una cara y Leu-233 por la otra. El enlace C6-C7 del calcitriol adopta una conformación *trans* desviada 30° del plano.

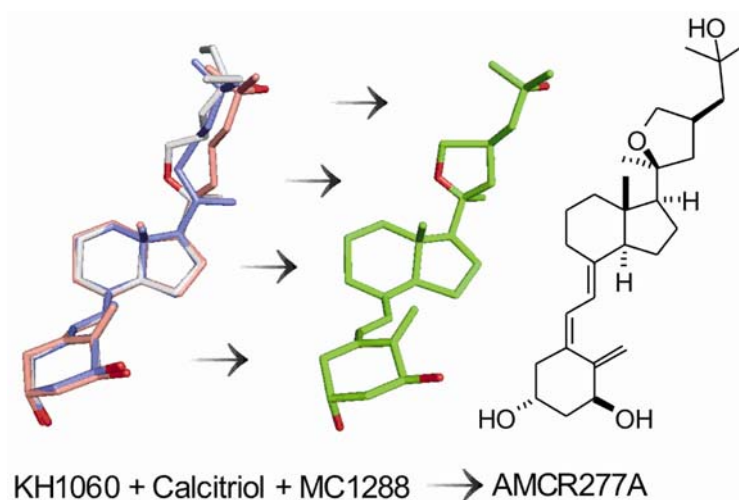
# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 1. MODELADO MOLECULAR

La figura 8 muestra los senderos que recorren las cadenas laterales del calcitriol, MC1288 y KH1060 en las estructuras cristalinas. Las cadenas laterales colapsan al alcanzar el C25. Una observación detallada de estos senderos indica que el nuevo ligando AMCR277A incluye los senderos de las cadenas laterales de MC1288 y KH1060. De esta forma, el análogo AMCR277A de estructura híbrida, debería mostrar propiedades de superagonista lo que demostraría que las conformaciones en disolución son muy similares a las observadas en estado cristalino, una conclusión importante para el diseño racional de otros análogos de interés terapéutico.

Figura 8. Superposición de las estructuras cristalinas de los superagonistas MC1288 (azul), KH1060 (gris) y calcitriol (rosa) sugiriendo la estructura virtual del análogo AMCR277A (verde).



### 1.1. Cálculos de *docking*

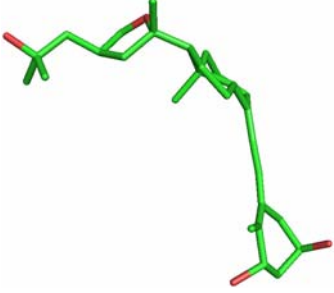
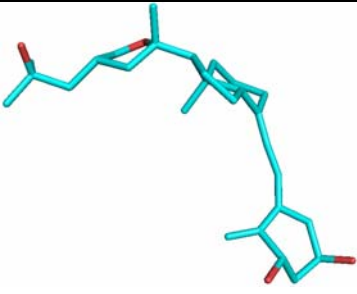
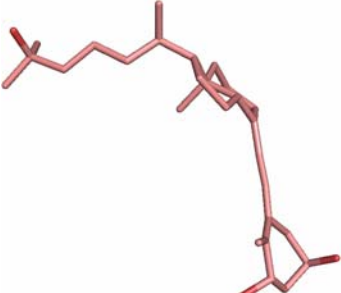
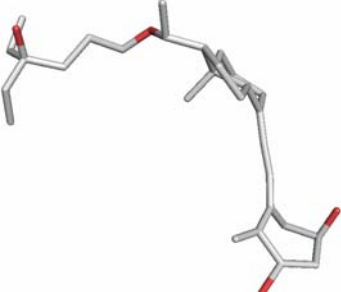
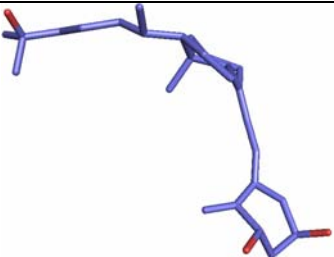
Para los cálculos de *docking* se utilizó el VDR mutado de Moras. Se reemplazó el calcitriol del centro activo del complejo cristalino de Moras (calcitriol-VDR) por los diferentes ligandos. Cada ligando se adaptó al sitio de unión en 100 conformaciones distintas generadas por dinámica molecular y búsqueda conformacional de Monte Carlo del programa Discover Studio.

A continuación se minimizaron todos los confórmeros *in situ* hasta una disposición de menor energía. La estabilidad relativa de las conformaciones minimizadas se evaluó utilizando criterios de puntuación (*scoring*): LigScore2,<sup>162</sup> PLP1,<sup>163</sup> Jain,<sup>164</sup> PMF<sup>165</sup> y Ludi Energy Estimate 3<sup>166</sup> del programa Discovery Studio. Cada uno de estos métodos de puntuación nos condujo a una tabla de valores, con la puntuación de todos los ligandos en cada una de sus 100 conformaciones. La aplicación del protocolo de *scoring* de consenso del mismo programa condujo a una tabla única con los ligandos y confórmeros clasificados en orden descendente de puntuación.

Los ligandos evaluados son los superagonistas KH1060 y MC1288, la hormona calcitriol y los análogos sintéticos AMCR277A y AMCR277B. La clasificación en orden decreciente de *scoring* de consenso sitúa al análogo AMCR277A en primero lugar, seguido del epímero AMCR277B, el calcitriol, KH1060 y MC1288. En la tabla 1 se ilustra los ligandos en las conformaciones de mejor evaluación. Todos los ligandos presentan sus respectivos hidroxilos C25 en una posición orientada en dirección a las histidinas 305 y 397.

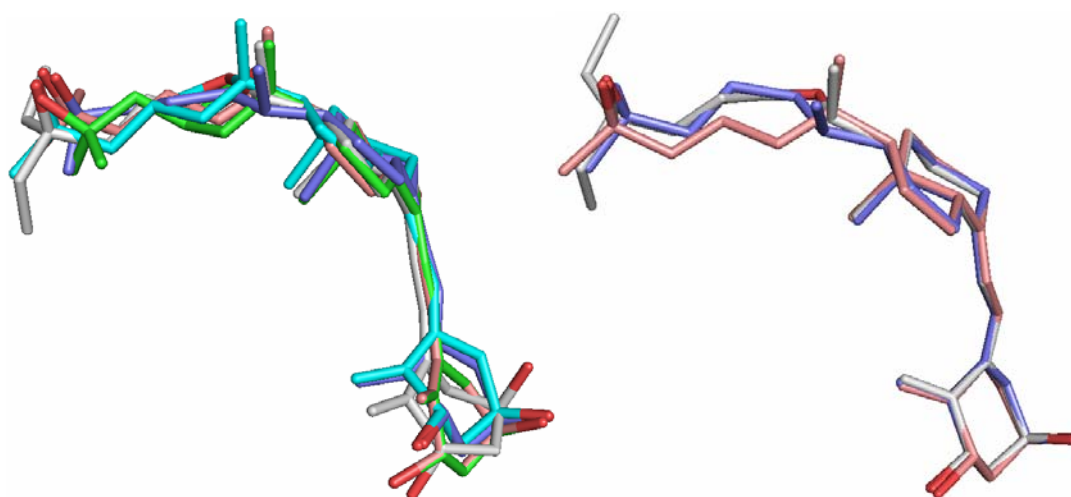
- 
- (162) Krammer A, Kirchoff PD, Jiang X, Venkatachalam CM, Waldman M. LigScore: A novel scoring function for predicting binding affinities. *J. Mol. Graph. Model.* **2005**, *23*, 395-407.
- (163) (a) Gehlhaar DK, Bouzida D, Rejto PA, Parrill L, Rami RM. Rational Drug Design: Novel Methodology and Practical Applications (ACS symposium series, 719). *Am. Chem. Soc.* Washington, DC. **1999**, 292-311. (b) Gehlhaar DK, Verkhivker GM, Rejto PA, Sherman CJ, Fogel DB, Fogel LJ, Freer ST. Molecular Recognition of the Inhibitor AG-1343 by HIV-1 Protease: Conformationally Flexible Docking by Evolutionary Programming. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 317.
- (164) Jain AN. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: A continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. *J. Comp. Aided Molec. Design* **1996**, *10*, 427-440.
- (165) Muegge I, Martin YC. A General and Fast Scoring Function for Protein-Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 791.
- (166) (a) Böhm HJ. Prediction of binding constants of protein ligands: A fast method for the prioritization of hits obtained from the de novo design or 3D database search programs. *J. Comp. Aided Molec. Design* **1998**, *12*, 309-323. (b) Böhm HJ. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J. Comp. Aided Molec. Design* **1994**, *8*, 243-256.

Tabla 1. Clasificación en orden decreciente de scoring de consenso.

Estructura	Ligando	Consenso	-PLP1	-PMF	Jain	LigScore2-Dreiding	Ludi3
	AMCR277A	6	120	241	8.2	8.6	801
	AMCR277B	6	114	240	8.8	8.5	774
	Calcitriol	5	116	229	7.4	8.8	720
	KH1060	5	114	248	7.3	8.4	729
	MC1288	5	108	227	7.3	8.3	703

Es interesante observar que de una amplia población de posibles conformeros, los que presentan mejores resultados poseen cierta similitud conformacional. La superposición de las estructuras de la tabla 1 demuestra que los hidroxilos en C25, C3 y C1 se encuentran muy próximo unos de otros. Estos resultados concuerdan con los datos cristalográficos que también presentan los ligandos en disposición similar. En la figura 9 se ilustra la superposición de los ligandos de mejor evaluación en el *docking* (izquierda) y la superposición de las estructuras cristalográficas (derecha). El calcitriol (rosa), el KH1060 (gris), el MC1288 (índigo), el AMCR277A (verde) y el AMCR277B (marino).

Figura 9. Superposición de las conformaciones de menor energía obtenidos por modelado molecular (izquierda). Superposición de las estructuras cristalográficas (derecha).

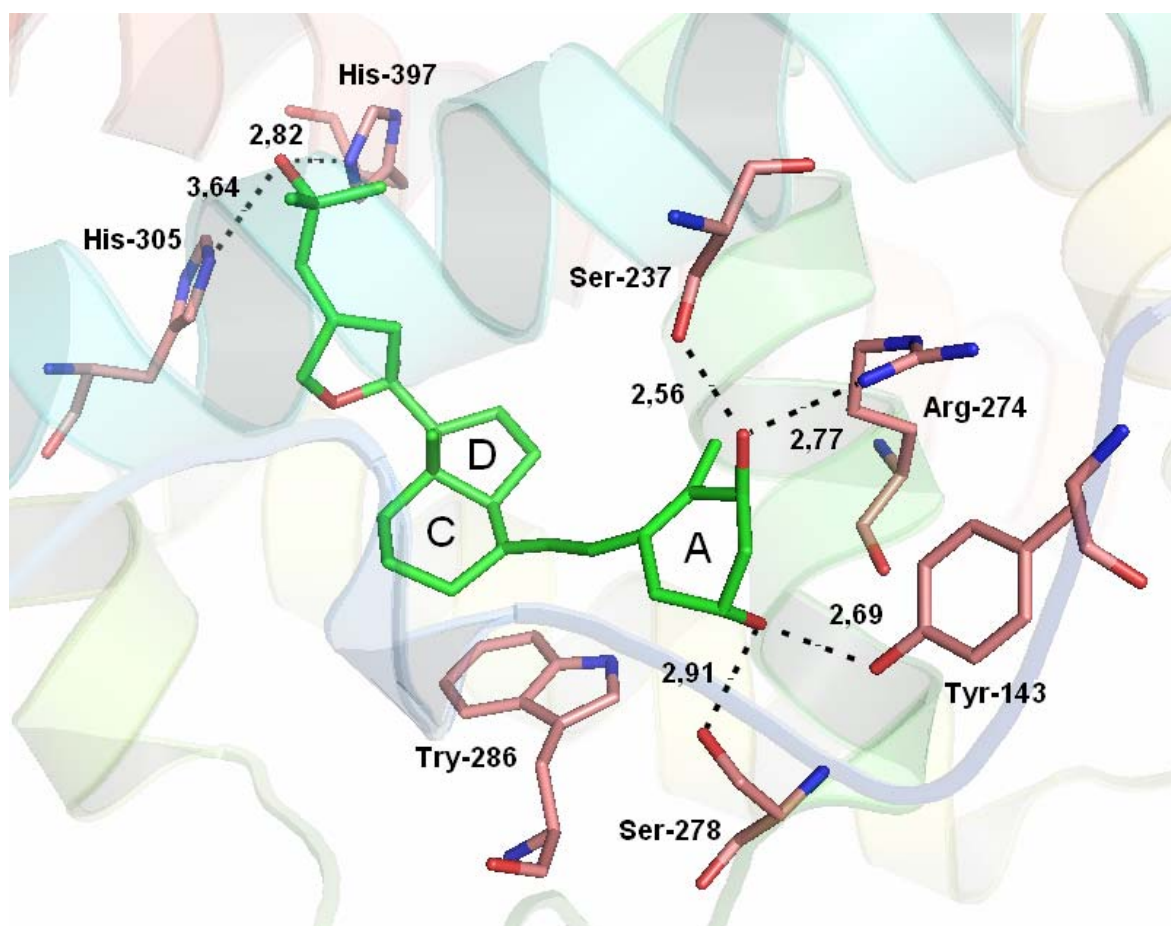


La observación de que los hidroxilos conservan respectivamente bien su posición tanto en las estructuras cristalográficas como en los cálculos de *docking* convencional constituye la base de un algoritmo para el acoplamiento de ligandos al centro activo del VDR desarrollado en nuestro grupo de investigación. En una primera etapa, se generan los conformeros mediante dinámica molecular restringida del ligando, utilizando el módulo Discover del programa de visualización y modelización InsightII. Una vez generado una población de conformeros, éstos se acoplan al dominio de enlace de la estructura cristalográfica del receptor, usando como puntos de anclaje los grupos hidroxilos o cualquier otro grupo polar que pueda formar pares iónicos o enlaces de hidrógeno con el receptor. Las conformaciones de las estructuras se optimizan *in*

*situ* a través de una minimización de la energía del complejo, usando el módulo CHARMM del programa InsightII. La afinidad relativa del ligando por el receptor se obtiene evaluando las energías de interacción con el receptor comparadas con el calcitriol.

El modelado molecular indica que el análogo AMCR277A posee una afinidad por el receptor de Moras (Moras-VDR) superior a la de la hormona natural y los dos superagonistas mostrados en la tabla 1. En la figura 10 se ilustra la disposición obtenida por *docking* del análogo AMCR277A en el sitio de unión al ligando.

Figura 10. *Docking* del análogo AMCR277A con sus interacciones más relevantes en el centro activo. Las distancias para los enlaces de hidrógeno se indican en Å.

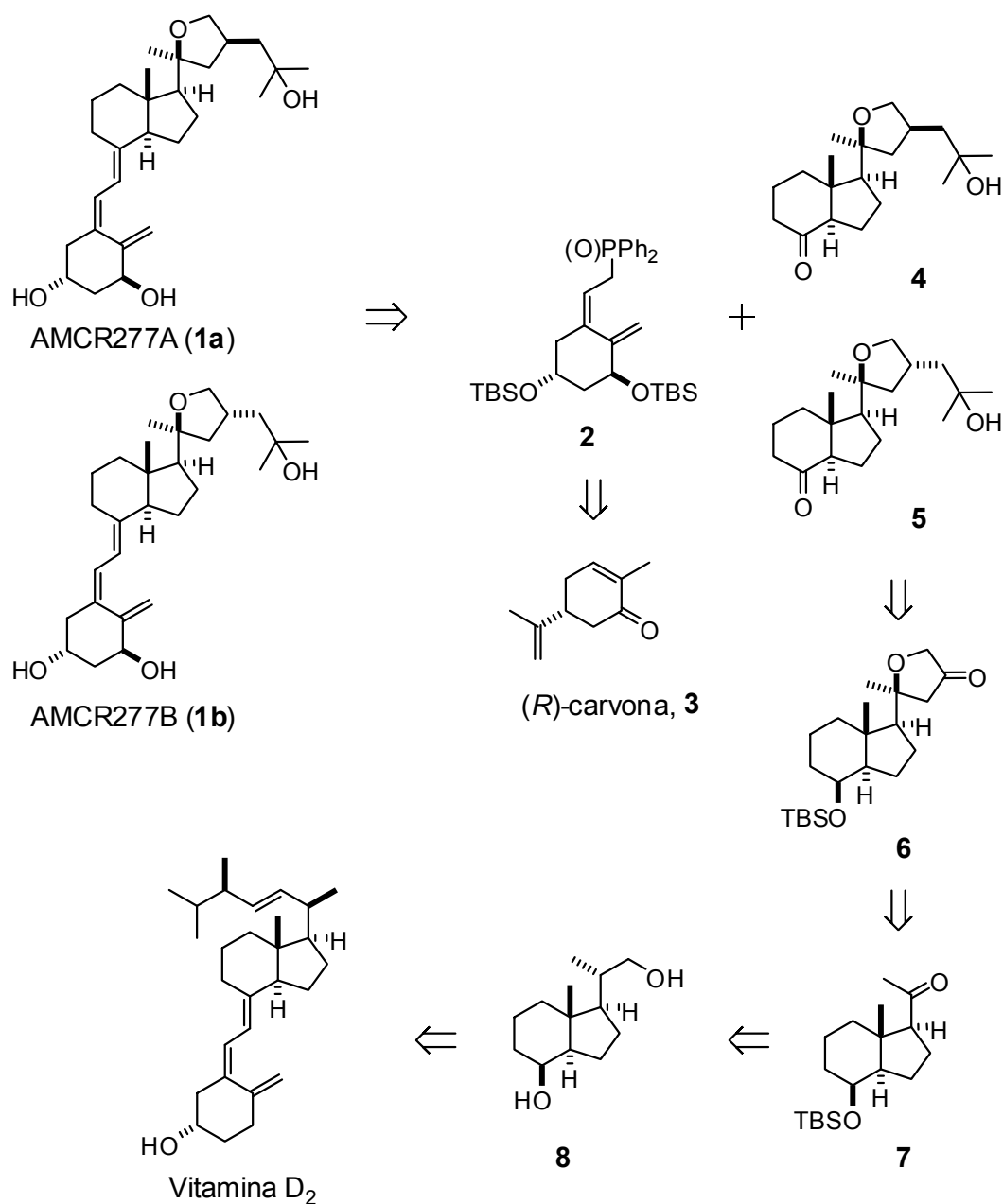


### 3. SÍNTESIS DE LOS ANÁLOGOS

#### 3.1. Análisis Retrosintético

La construcción del sistema triénico de los análogos AMCR277A y AMCR277B se basa en el acoplamiento Wittig-Horner entre las cetonas **4** y **5** que corresponden a la parte superior y el anión del óxido de fosfina **2** (Esquema 1).

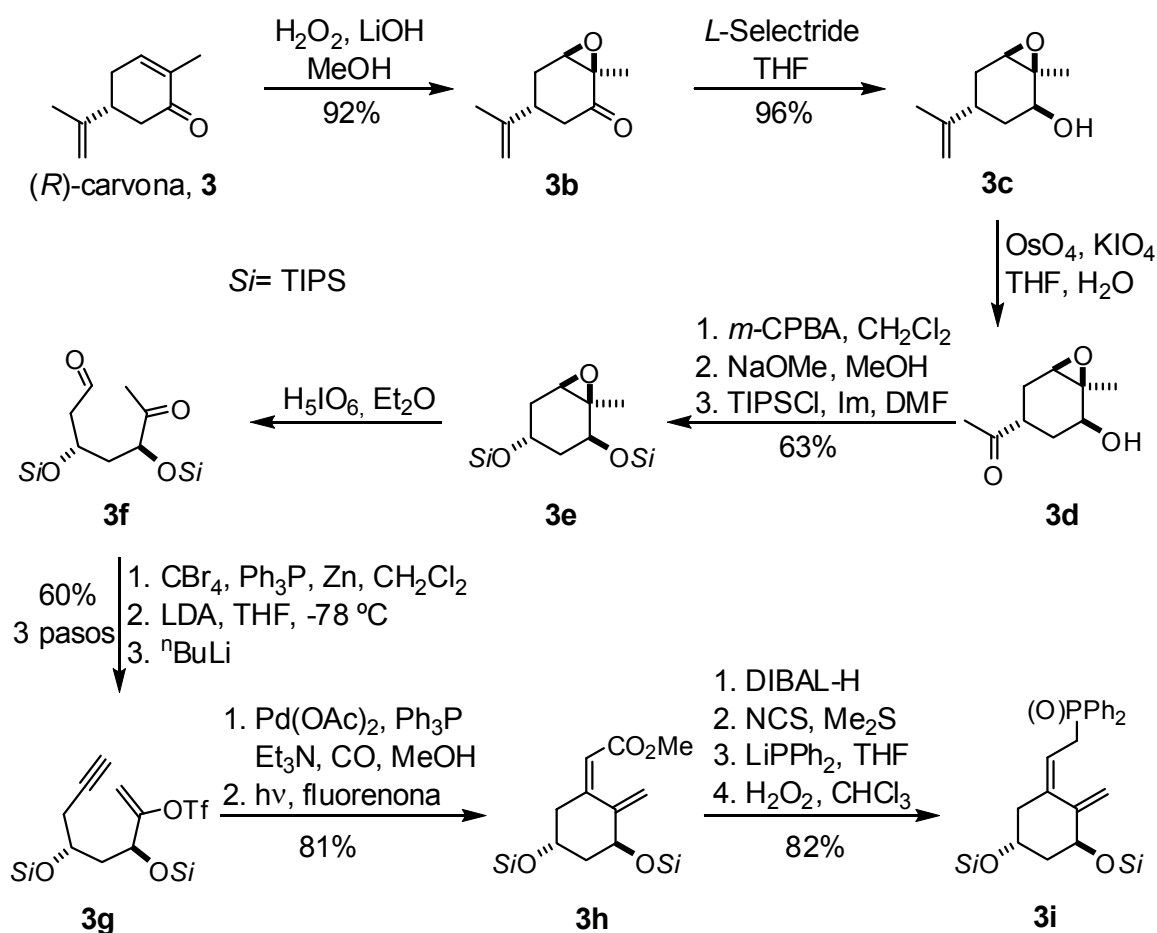
Esquema 1: Retrosíntesis de los análogos AMCR277A (**1a**) y AMCR277B (**1b**).



## 3.2. Síntesis del óxido de fosfina.

El óxido de fosfina deseado **2** se preparó por el método previamente desarrollado en este laboratorio a partir de la (*R*)-carvona (Esquema 2).<sup>167</sup>

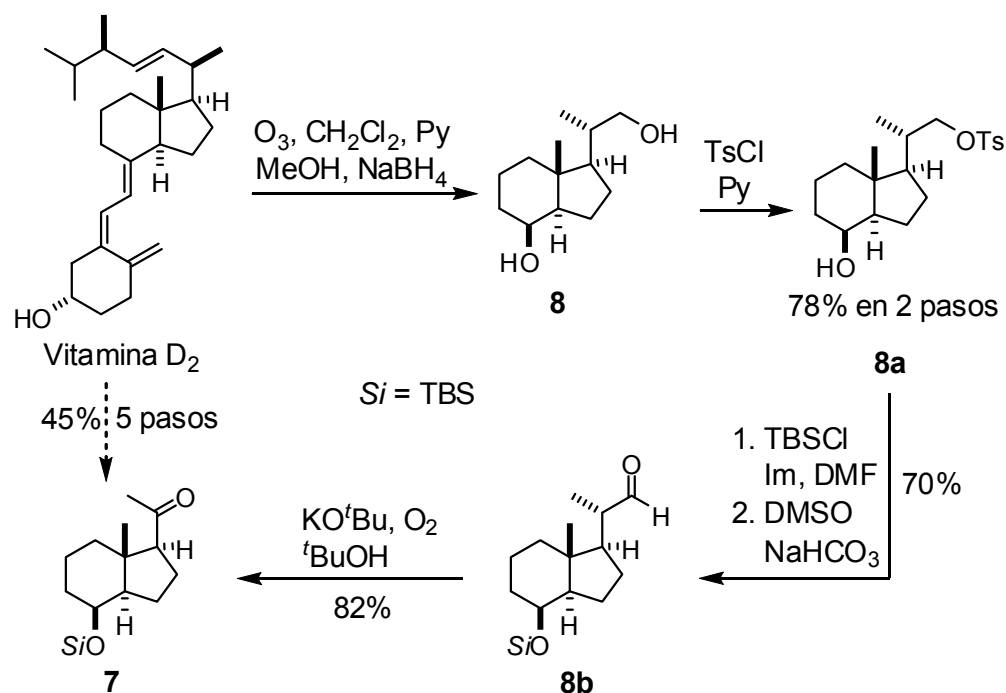
Esquema 2: Síntesis del óxido de fosfina.

3.3. Síntesis de la cetona de partida **7**.

La cetona **7** se preparó a partir del diol de Inhoffen (**8**) siguiendo un método desarrollado en este laboratorio (Esquema 3).<sup>168</sup>

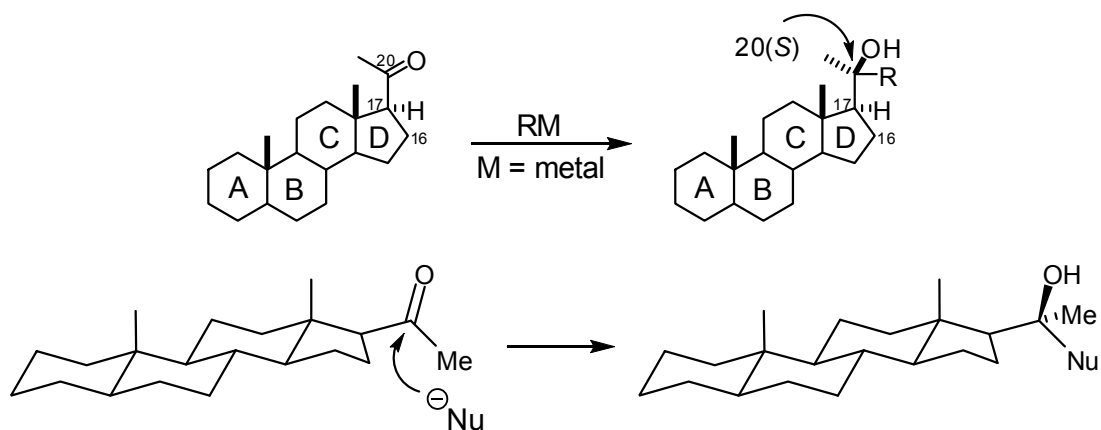
(167) Mouriño A, Torneiro M, Vitale C, Fernández S, Pérez-Sestelo J, Anne A, Gregorio C. Efficient and versatile synthesis of A-ring precursors of  $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> and analogues. Application to the synthesis of Lythgoe-Roche phosphine oxide. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4713-4716.

(168) Fernandez B, Martinez PJA, Granja JR, Castedo L, Mouriño A. Synthesis of hydrindan derivatives related to vitamin D. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3173-3178.

Esquema 3: Preparación de la cetona **7** a partir de la vitamina  $D_2$ .3.4. Síntesis de las cetonas cíclicas **4** y **6**.

En la química de esteroides es bien conocido que el ataque de magnesianos u organometálicos de litio al carbonilo C20 produce mayoritariamente el alcohol terciario de configuración (*S*) (Esquema 4).

Esquema 4: Ataque de organometálicos al carbonilo C20.

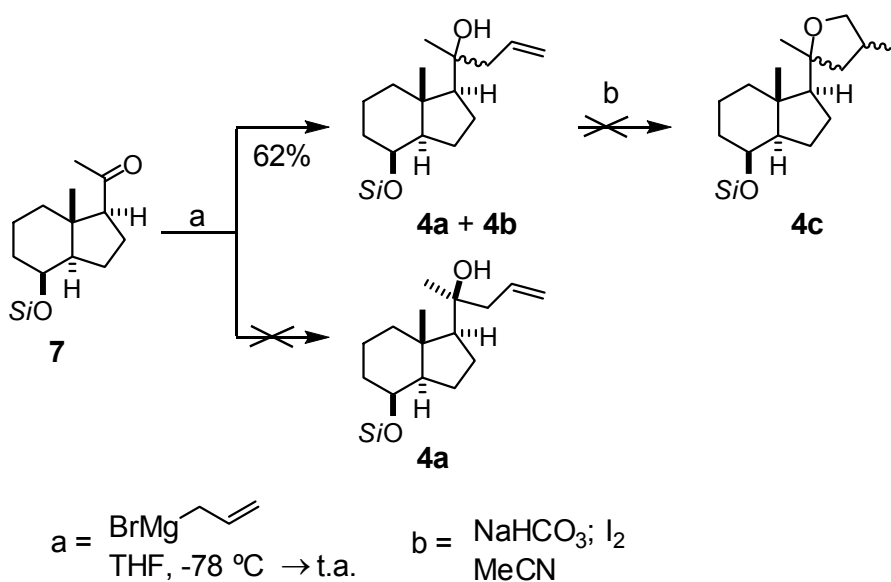


## 3.4.1. Acoplamiento con magnesianos.

Teniendo en cuenta estos resultados y considerando que nuestra cetona **7** es estructuralmente similar a los esteroides, se decidió estudiar el ataque de magnesianos sobre el carbonilo de la posición C20 de la cetona **7**.

El tratamiento de la cetona de partida **7** con el bromuro de alilmagnesio, condujo a la mezcla de alcoholes alílicos **4a** y **4b** en un 62% y en una relación de 20S:20R de (1:1,  $^1\text{H}$ -RMN) (Esquema 5). La mezcla de diastereoisómeros se utilizó en los intentos de ciclación.

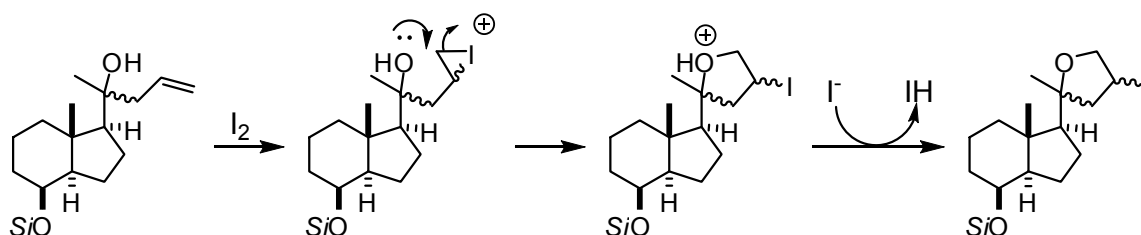
Esquema 5: Intentos de formación del ciclo tetrahidrofuránico.



La exposición de los alcoholes **4a** + **4b** a las condiciones de yodociclación de Bartlett,<sup>169</sup> en acetonitrilo anhidro no condujo a la mezcla de yoduros **4c** esperados (Esquemas 6 y 7)

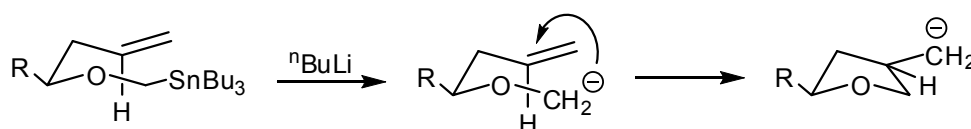
(169) Bedford SB, Bell KE, et. all. Model studies of the overall 5-endo-trig iodocyclization of homoallylic alcohols. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 15, 2143-2153.

Esquema 6: Yodociclación de Bartlett.



Estos resultados nos llevarán a la búsqueda de rutas alternativas para obtener el sistema tetrahydrofuránico. La ruta objeto del siguiente estudio se basa en la ciclación de  $\alpha$ -aniones de éteres, preparados por metalación de estannanos y que evolucionan al ciclo tetrahydrofuránico según se indica en el esquema 7.<sup>170</sup>

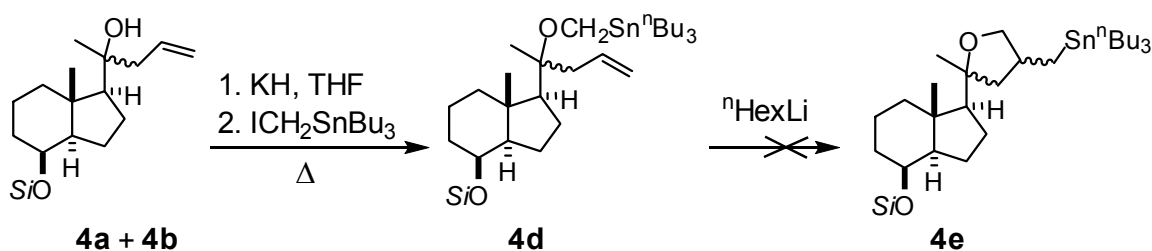
Esquema 7: Ciclacion estereoselectiva de estannanos para dar tetrahydrofuranos sustituidos.



Procedimos, por lo tanto, a la preparación del estannano deseado vía metalación de los alcoholes **4a** + **4b** con hidruro potásico en THF, seguido de reacción con el yodoestannano  $\text{ICH}_2\text{SnBu}_3$ .<sup>170</sup> En lugar de aislar los posibles estannanos **4d** se procedió a su metalación con  ${}^n\text{BuLi}$  sin que se haya observado formación alguna del producto ciclado esperado por lo que se abandonó este método (Esquema 8).

(170) (a) Still WC. Stannylation/destannylation. Preparation of  $\alpha$ -alkoxy organolithium reagents and synthesis of dendrolasin via a carbinyl carbanion equivalent. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1481-1487. (b) Still WC, Mitra A. A highly stereoselective synthesis of *Z*-trisubstituted olefins via [2,3]-sigmatropic rearrangement. Preference for a pseudoaxially substituted transition state. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1927-1928. (c) Broka CA, Lee WJ, Shen T. Anionic cyclizations of  $\alpha$ -alkoxy lithiums. New, stereoselective routes to substituted tetrahydrofurans. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1336-1338. (d) Broka CA, Shen T. Reductive lithiation mediated anionic cyclizations and [2,3]-sigmatropic rearrangements. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2981-2984. (e) Tomooka K, Komine N, and Nakai T. Cyclization of enantio-enriched  $\alpha$ -(homoallyloxy)alkyllithiums: Evidence for retention of configuration at the carbanion center. *Tetrahedron Lett.* **38**, **1997**, 8939-8942. (f) Nobuyuki K, Katsuhiko T, Takeshi N. Modified cyclization of enantio-enriched  $\alpha$ -homoallyloxy-alkyllithiums generated by Sn-Li transmetalation: effects of additives and structural requirement. *Heterocycles*, **2000**, *52*, 1071-1074.

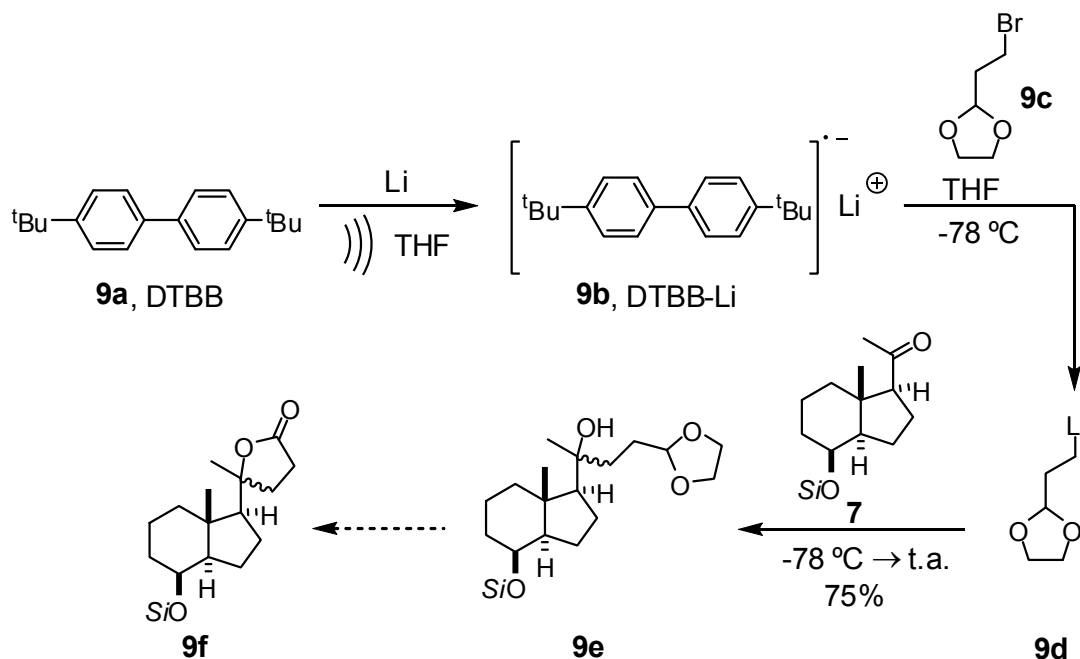
Esquema 8: Formación del tetrahidrofurano vía estannano.



## 3.4.2. Acoplamiento con organolíticos.

A continuación se examinó el comportamiento de organometálicos de litio con la cetona **7**. El organometálico de litio deseado **9d** se preparó a partir del bromuro comercial **9c** por reacción con el anión radical derivado del DTBB (di-*terc*-butil-bifenilo) **9a** (Esquema 9).

Esquema 9: Reacción de la cetona con el acetal litiado y posterior ciclación.

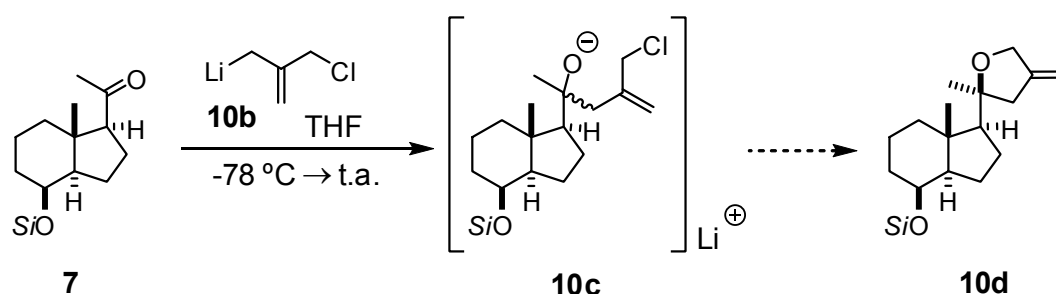


El tratamiento de la cetona **7** con el organometálico de litio en THF generó la mezcla de acetales **9e** en un 75% de rendimiento. Con el objeto de abaratar el

proceso, se sustituyó el DTBB por el naftaleno,<sup>171</sup> pero obteniéndose resultados similares.

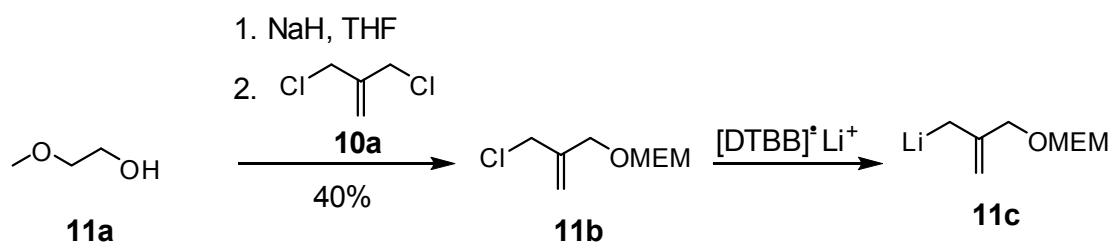
La pobre estereoselectividad obtenida (~1:1, <sup>1</sup>H-RMN) nos llevó a plantear una nueva estrategia de síntesis que comienza con la adición del organometálico de litio **10b** sobre la cetona **7**. La preparación del organolítico **10b** por el método de Yus,<sup>172</sup> seguido de reacción con la cetona **7** no condujo al ciclo esperado **10d** (Esquema 10).

Esquema 10: Reacción de la cetona con el organolítico alílico.



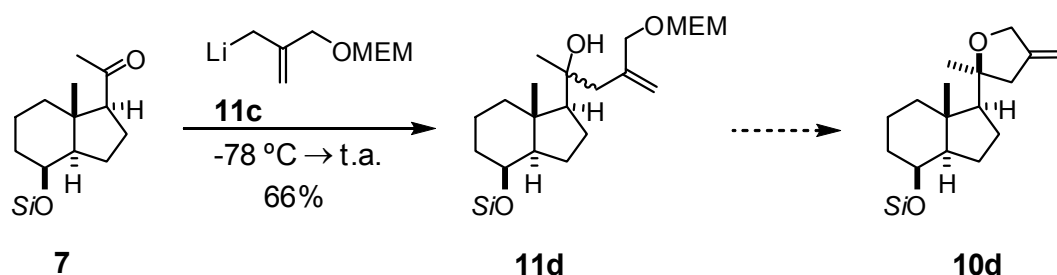
La formación de varios subproductos de reacción nos llevó a cambiar ligeramente la estrategia, sustituyendo el átomo de cloro por un hidroxilo protegido (Esquema 11).

Esquema 11: Preparación del halogenuro protegido y reacción con la cetona **7**.



(171) (a) Alonso E, Ramon DJ, Yus M. Preparation of biologically active hydroxy ketones and analogous systems through masked lithium enolates generated by a naphthalene-catalyzed lithiation. *Anal. de Quim. Int. Ed.* **1998**, *94*, 56-61. (b) Alonso F, Meléndez J, and Yus M. A new 3-methylidenepentane-1,5-dianion synthon: synthesis of perhydropyrano[2,3-b]pyrans and 1,7-dioxaspiro[4.5]decanes. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6519-6524

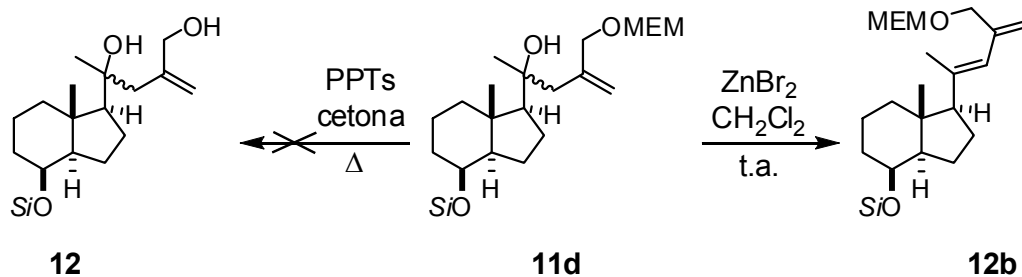
(172) Lorenzo E, Alonso F, Yus M. New Trimethylenemethane Dianion Synthons: Application to the Preparation of Substituted Perhydrofuro[2,3-b]furans. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1745-1757.



Nos decidimos por el cloruro conocido **11b**, que se preparó en un 40% de rendimiento a partir del alcohol **11a** por reacción del alcóxido correspondiente con el dicloruro **10a**. La reacción del organometálico de litio **11c**, generado a partir del cloruro **11b** siguiendo el procedimiento anterior, con la cetona **7**, condujo a la mezcla de alcoholes terciarios **11d** con pobre estereoselectividad.

A continuación, la mezcla de alcoholes protegidos **11d** se calentó a reflujo en presencia de tosilato de piridinio en acetona<sup>173</sup> con el fin de desproteger el hidroxilo. Bajo estas condiciones se desililó también el compuesto, por lo que recurrimos al uso de ZnBr<sub>2</sub>,<sup>174</sup> pero en este caso se produjo la deshidratación del hidroxilo terciario (Esquema 12).

Esquema 12: Intentos de desprotección del hidroxilo primario.

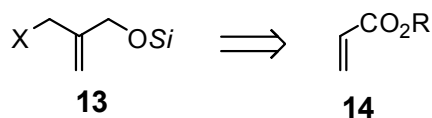


(173) (a) Mukund KG, Ravi N, Ramana CV, Sukhen K, Debendra MK. Ring-closing metathesis mediated total synthesis of microcarpalide and herbarumin III. *ARKIVOC*, **2005**, 3, 237-257. (b) Mukund KG, Nagaprasad R, Ramana CV. Total synthesis of microcarpalide. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 2873-2875.

(174) (a) Corey EJ, Gras JL, Ulrico P. A new general method for protection of the hydroxyl function. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17, 809-812. (b) Ribes C, Falomir E, Murga J. Selective cleavage of acetals with ZnBr<sub>2</sub> in dichloromethane. *Tetrahedron* **2006**, 62, 1239-1244. (c) Williams JR, Chai D, Bloxton JD, Solvibile GH. Synthesis of the aglycone of 26-O-deacetyl pavoninin-5. *Tetrahedron* **2003**, 59, 3183-3188.

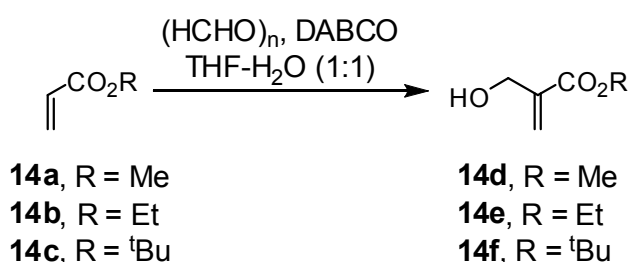
## 3.4.3. Preparación de los haloalcoholes protegidos alternativos.

En el esquema 13 se exponen los halogenuros a sintetizar vía procedimientos conocidos.<sup>175</sup>

Esquema 13: Preparación de haloalcoholes protegidos **13**.

X = Cl, Br. Si = SEM, MOM, TIPS, TBS, TBDPS. R = Et, Me, <sup>t</sup>Bu.

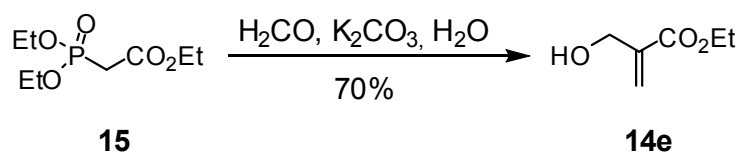
En los primeros intentos se utilizaron acrilatos como sustancias de partida (Esquema 14).<sup>176</sup>

Esquema 14: Preparación de los alcoholes alílicos **14**

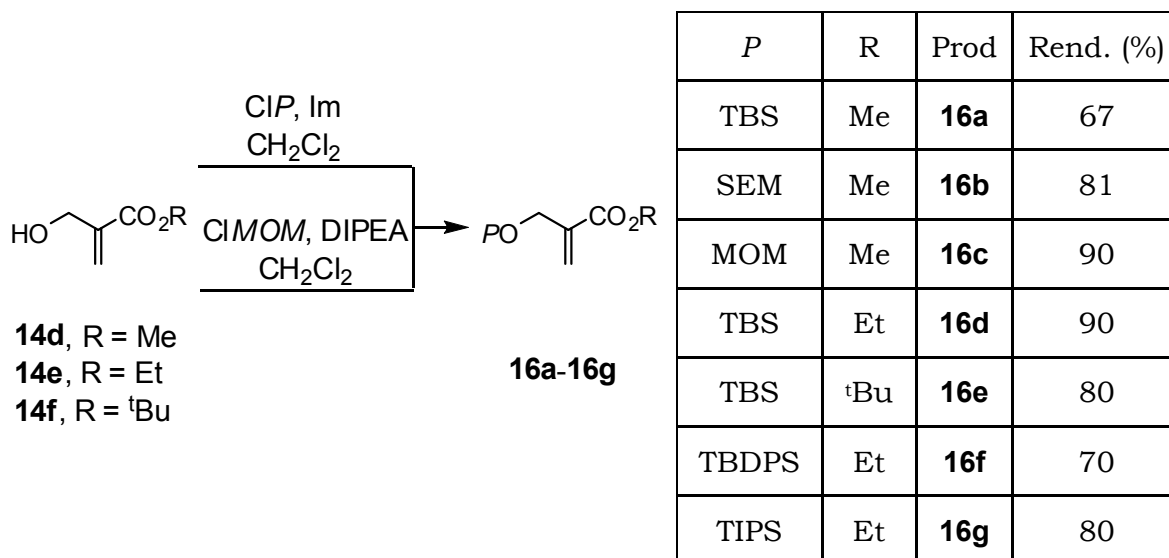
R	Prod.	Rend.(%)
Me	<b>14d</b>	20
Et	<b>14e</b>	12
<sup>t</sup> Bu	<b>14f</b>	40

Los alcoholes deseados **14d-14f** se obtuvieron a partir de los ésteres **14a-14c**. Los bajos rendimientos obtenidos, la formación de productos de polimerización, la utilización de una base cara y las dificultades de purificación encontradas, nos llevaron a examinar una ruta alternativa (Esquema 15).

- (175) (a) Turki T, Villiéras J, Amri H. An efficient synthesis of alkyl  $\alpha$ -(hydroxymethyl) acrylates induced by DABCO in an aqueous medium. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3071-3072. (b) Bruce HL, Joseph JP.  $\beta$ -(Trimethylsilyl)ethoxymethyl chloride. A new reagent for the protection of the hydroxyl group. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 3343-3346. (c) Stork G, Takahashi T. Chiral synthesis of prostaglandins (PGE1) from D-glyceraldehyde. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1275-1276. (d) Bulliard M, Heinz-Georg Z, Bernd G. Reversal of Diastereoselectivity in Reactions of Acyclic and Cyclic Radicals. *Synlett* **1991**, *1991*, 423-425.
- (176) Byun HSB, Reddy KC, Bittman R. Improved syntheses of ethyl  $\alpha$ -(bromomethyl)acrylate and 2-methylene-1,3-propanediol via ethyl  $\alpha$ -(hydroxymethyl)acrylate. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1371-1374.

Esquema 15: Preparación de los alcoholes alílicos **14**. Ruta alternativa.

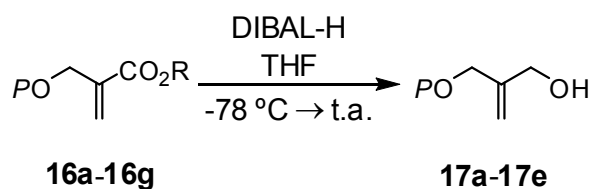
Ahora se utiliza el fosfonato comercial **15** en lugar de los acrilatos anteriores **14a-14c**. La reacción del anión resultante del tratamiento de **15** con carbonato potásico y formaldehído, condujo al alcohol deseado **14e** en un 70% de rendimiento. La reacción fue más rápida (2 h) que en el caso precedente (3 días). También se utilizaron reactivos más baratos y no se observaron subproductos de polimerización que dificultaban la purificación.<sup>177</sup> El hidroxiéster **14e** resultante se protegió con diferentes grupos protectores (Esquema 16).

Esquema 16: Protección de los alcoholes **14**.

Los ésteres se redujeron con DIBAL-H a los respectivos alcoholes en buen rendimiento (Esquema 17).

(177) Villieras J, Rambaud M. Wittig-Horner Reaction in heterogeneous media; an easy synthesis of ethyl  $\alpha$ -hydroxymethylacrylate and ethyl  $\alpha$ -halomethylacrylates using formaldehyde in water. *Synthesis* **1982**, 1982, 924-926.

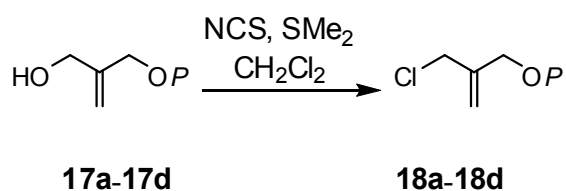
Esquema 17: Reducción con DIBAL-H.



P	R	Prod.	Rend. (%)
TBS	Me	<b>17a</b>	67
SEM	Me	<b>17b</b>	56
MOM	Me	<b>17c</b>	65
TBS	Et	<b>17a</b>	95
TBS	<sup>t</sup> Bu	<b>17a</b>	80
TBDPS	Et	<b>17d</b>	65
TIPS	Et	<b>17e</b>	78

Para transformar los alcoholes alílicos en los correspondientes cloruros se utilizó en primero lugar el método de Corey (*N*-clorosuccinimida y sulfuro de dimetilo) (Esquema 18).<sup>178</sup>

Esquema 18: Halogenación por el método de Corey-Kim.

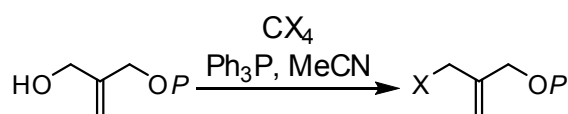


P	Prod.	Rend. (%)
TBS	<b>18a</b>	70
SEM	<b>18b</b>	70
MOM	<b>18c</b>	10
TBDPS	<b>18d</b>	40

También se ensayó el método de Meyers ( $\text{Ph}_3\text{P}$ ,  $\text{CBr}_4$ ).<sup>179</sup> En este caso se obtuvieron mejores rendimientos en halogenuros alílicos (Esquema 19).

(178) Dursina B. *et al.* Identification and Specificity Profiling of Protein Prenyltransferase Inhibitors Using New Fluorescent Phosphoisoprenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2822-2835.

Esquema 19: Método alternativo para la síntesis de los halogenuros alílicos.



**17a**, P = TBS

**17e**, P = TIPS

**17a**, P = TBS

**18a**, X = Cl

**18e**, X = Cl

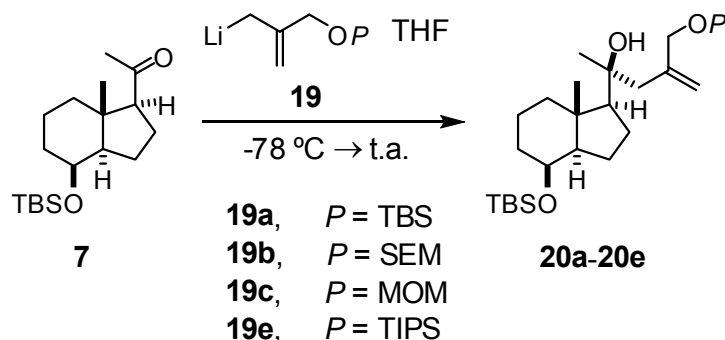
**18f**, X = Br

P	X	Prod.	Rend.(%)
TBS	Cl	<b>18a</b>	83
TIPS	Cl	<b>18e</b>	87
TBS	Br	<b>18f</b>	80

#### 3.4.4. Adición de alilitios a la cetona **7**.

Las reacciones de los correspondientes organometálicos de litio **19** con la cetona **7** bajo, las condiciones anteriormente descritas, condujeron a los alcoholes terciarios **20** (Esquema 20). Los organometálicos **19a** (P=TBS) y **19e** (P=TIPS) condujeron exclusivamente a los alcoholes terciarios **20a** y **20e**.

Esquema 20: Adición de los organometálicos de litio **19a**, **19b**, **19c** y **19e** a la cetona **7**.



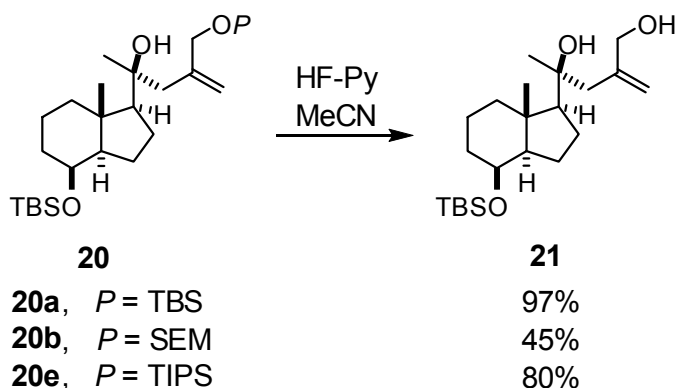
P	Prod	Rend. (%)	e.d. (%)
TBS	<b>20a</b>	85	96
SEM	<b>20b</b>	42	70
MOM	<b>20c</b>	69	60
TIPS	<b>20e</b>	80	96

A continuación se procedió a la desprotección de los alcoholes sililados **20a**, **20b** y **20e** con fluoruro de hidrógeno en piridina, aplicando procedimientos de estos laboratorios,<sup>180, 181</sup> para obtener el diol **21** (Esquema 21).

(179) (a) Meyers AI, Collington EW. Facile and specific conversion of allylic alcohols to allylic chlorides without rearrangement. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 3044-3045. (b) Snyder EI. Conversion of allylic alcohols to chlorides without rearrangement. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 1466-1466.

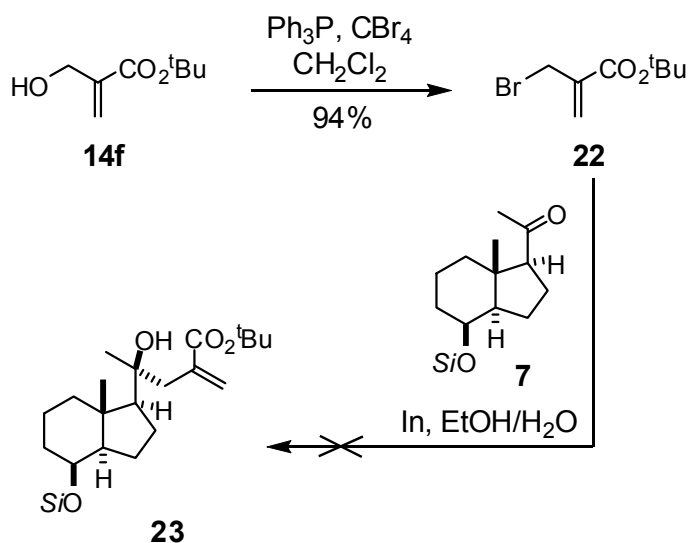
(180) Moman E, Nicoletti D, Mouriño A. Strained polycycles by H<sup>5</sup>C<sup>5x</sup> free-radical cascades. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1249-1251.

Esquema 21: Desprotección de los diversos grupos protectores con HF en piridina.



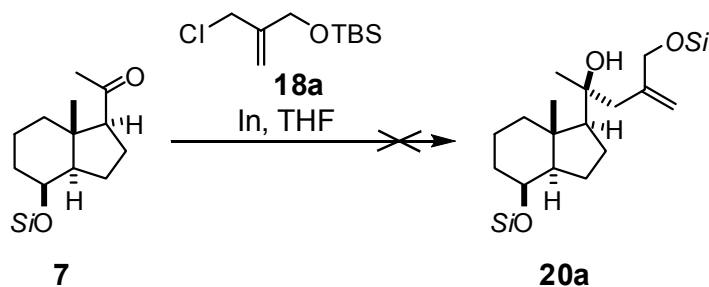
Intentos para obtener los alcoholes terciarios **20a** y **23** vía química de indio resultaron infructuosos debido, probablemente, a la baja reactividad del halogenuro (Esquema 22).<sup>182</sup>

Esquema 22: Intentos de acoplamiento vía química de indio.



(181) Nilsson K, Vallés MJ, Castedo L, Mouriño A, Halkes SJ, van de Velde JP. Synthesis and biological evaluation of 18-substituted analogs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 1855-1858.

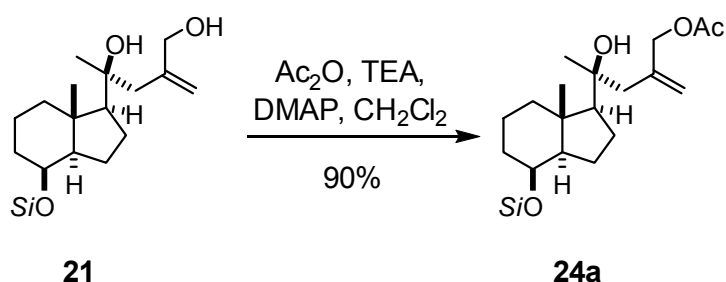
(182) (a) Araki S, Ito H, Butsugan Y. Indium in organic synthesis: indium-mediated allylation of carbonyl compounds. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 1831-1833. (b) Chan TH, Lee M-C. Indium-mediated coupling of alpha-(bromomethyl)acrylic acid with carbonyl compounds in aqueous media. concise syntheses of (+)-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid and N-acetylneuraminic acid. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 4228-4232.



#### 3.4.5. Formación del ciclo tetrahidrofuránico vía química de paladio- $\pi$ -alilo.

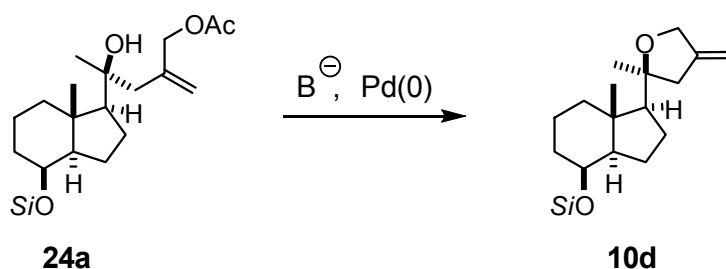
Una vez obtenido el alcohol **20a**, se procedió a la formación del ciclo tetrahidrofuránico. Como estrategia se eligió la química de Pd- $\pi$ -alilo desarrollada por Trost (Esquema 23).<sup>183</sup> Por ello se procedió, en primero lugar, a la preparación del acetato **24a**.

Esquema 23: Preparación del acetato **24a**.



Existen precedentes de preparación de anillos furanosídicos y piranosídicos vía adiciones intramoleculares de grupos hidroxilo a complejos de Pd- $\pi$ -alilo formados *in situ*, pero el proceso no es eficiente en el caso de alcoholes terciarios. Aún así intentamos mejorar esta reacción modificando las condiciones de reacción y también el grupo saliente. El tratamiento del acetato **24a** con diferentes bases en presencia de una cantidad catalítica de Pd(0) condujo, en el mejor de los casos, a un 40% de la olefina deseada **10d** (Esquema 24). El compuesto desililado condujo al mismo alcohol desprotegido en rendimiento similar (Tabla 2).

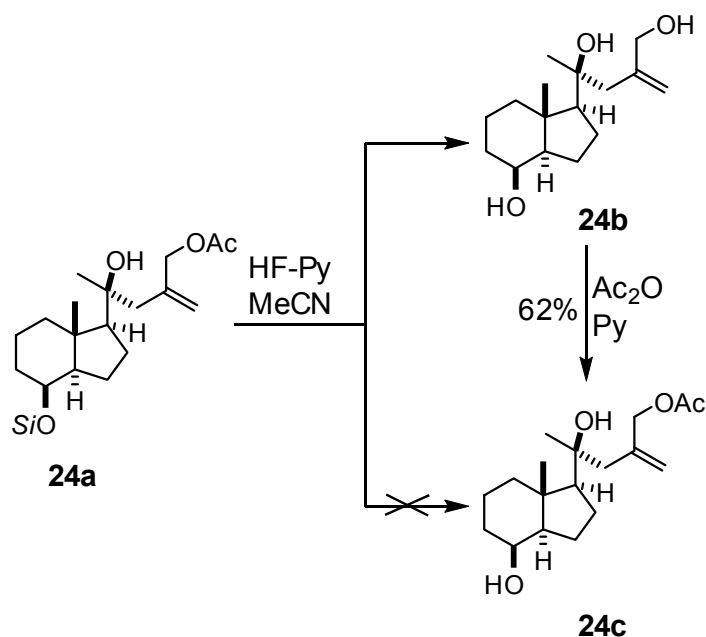
(183) (a) Trost BM, Bonk PJ. Diastereoselective [3 + 2]-type heterocyclic synthesis via [2-(acetoxymethyl)-3-allyl]tri-n-butylstannane. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1778–1781. (b) Stork G, Poirier JM. 2-Substituted tetrahydrofurans of known absolute stereochemistry by ScN' chirality transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1073-1074.

Esquema 24: *Ciclación vía paladio- $\pi$ -alilo.*Tabla 2: *Resultados de los intentos de ciclación.*

Condiciones				Rend.
Catalizador	Base	Fosfina	Disolvente	(%)
$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$	TEA	$\text{Ph}_3\text{P}$	MeCN-Reflujo	-
$\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$	TEA	-	MeCN-Reflujo	10
$\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$	TEA	$\text{P}(\text{OEt})_3$	MeCN-Reflujo	10
$\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$	DBU	$\text{Ph}_3\text{P}$	MeCN-Reflujo	-
$\text{Pd}(\text{MeCN})_2\text{Cl}_2$	DBU	$\text{Ph}_3\text{P}$	THF-Reflujo	-
$\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$	$\text{KO}^t\text{Bu}$	-	Dioxane-Reflujo	-
$\text{Pd}(\text{OAc})_2$	$^n\text{BuLi}$ , DBU	$\text{Ph}_3\text{P}$	Dioxane-Reflujo	42
$\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$	DBU	$\text{Ph}_3\text{P}$	Dioxane-Reflujo	43
$\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$	DBU	-	Dioxane-Reflujo	44
$\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$	DBU	$\text{Ph}_3\text{P}$	Dioxane-Reflujo	43 <sup>*</sup>

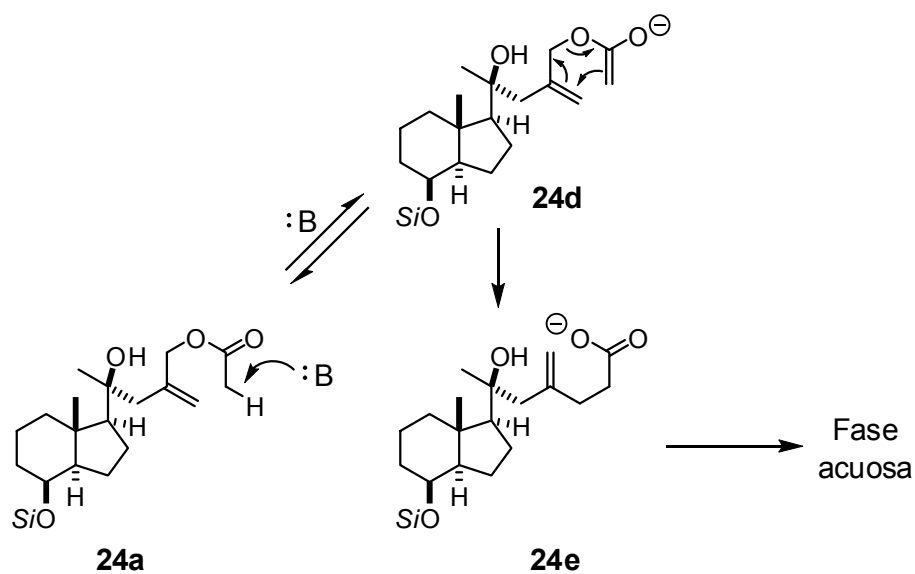
\* Con el hidroxilo secundario desprotegido.

El tratamiento de **24a** con HF-Py en acetonitrilo condujo al triol **24b** que se acetiló selectivamente al acetato deseado **24c** en moderado rendimiento (Esquema 25).

Esquema 25: Preparación del acetato alílico desprotegido **24c**.

Los rendimientos moderados en la ciclación vía Pd- $\pi$ -alilo se pueden explicar por la formación de un subproducto muy polar que racionalizamos mecanísticamente vía transposición de Claisen (Esquema 26).

Esquema 26: Transposición de Claisen



Con el objeto de evitar la transposición de Claisen, se pensó en sustituir el acetato por otros ésteres carentes de hidrógeno en  $\alpha$  (Esquema 27). También se

trató de mejorar la nucleofugacidad del grupo saliente. Sorprendentemente, en ninguno caso se obtuvo la olefina deseada. No hay explicación clara del resultado experimental.

Esquema 27: Introducción de otros grupos salientes y formación del ciclo tetrahidrofuránico.

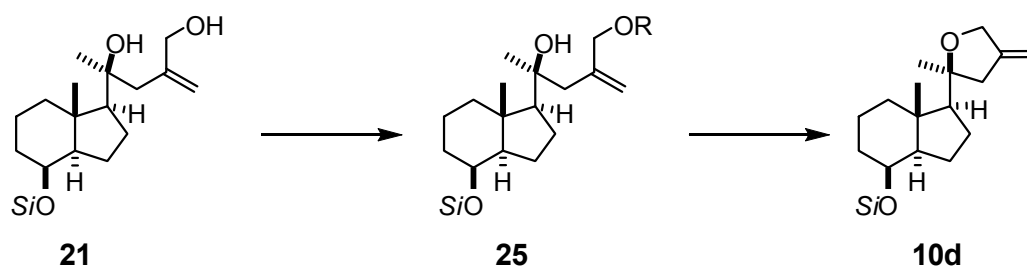
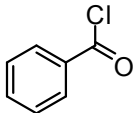
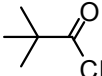
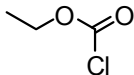
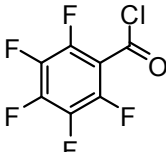


Tabla 3: Preparación y ensayo de algunos ésteres alílicos.

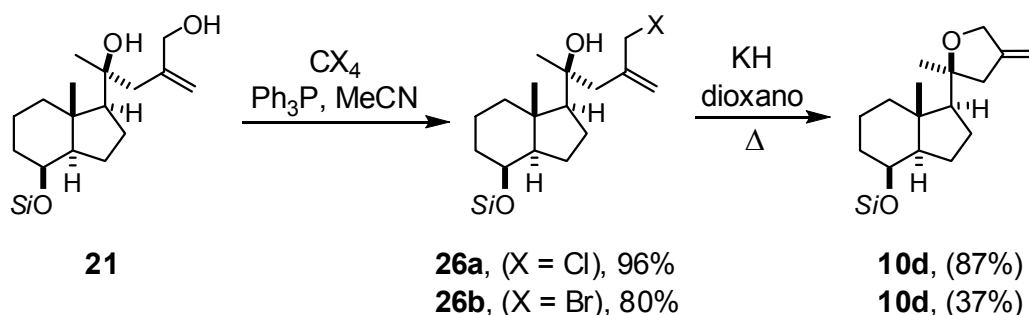
Reactivos		Rend. (%)	Prod.	Condiciones	10d (%)
	Py	95	<b>25a</b>	Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> , NaH, <sup>n</sup> Bu <sub>3</sub> Sn, dioxano, reflujo	-
	Py, 4-DMAP	98	<b>25b</b>	Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> , DBU, dioxano, reflujo	-
	Py, 4-DMAP, Et <sub>2</sub> O	92	<b>25c</b>	Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> , DBU, dioxano, reflujo	-
				Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> , DBU, (EtO) <sub>3</sub> P, dioxano, reflujo	-
	Py, 4-DMAP, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	96	<b>25d</b>	Pd(Ph <sub>3</sub> P) <sub>4</sub> , DBU, dioxano, reflujo	-

#### 3.4.6. Formación del ciclo tetrahidrofuránico vía síntesis de Williamson.

No satisfechos con el rendimiento en olefina obtenido (Tabla 2), se decidió ensayar el método tradicional de Williamson como vía alternativa. Con este fin se prepararon los halogenuros alílicos de bromo y cloro. El método de

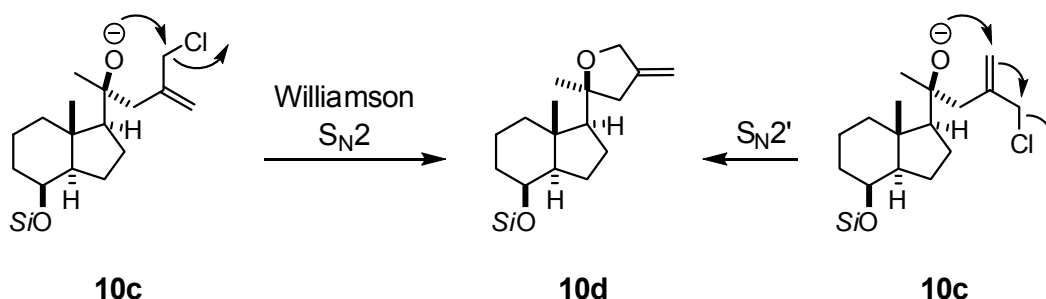
Meyers<sup>179</sup> se mostró, una vez más, superior al método de Corey<sup>178</sup> (Esquema 28).

Esquema 28: Formación del ciclo tetrahidrofuránico vía síntesis de Williamson.



La formación del alcóxido con hidruro potásico seguido de ciclación de Williamson intramolecular condujo al éter cíclico deseado en excelente rendimiento cuando se utilizó el cloruro como sustancia de partida. No se estudió el mecanismo de esta reacción (Esquema 29).

Esquema 29: Posibles mecanismos para la ciclación intramolecular.



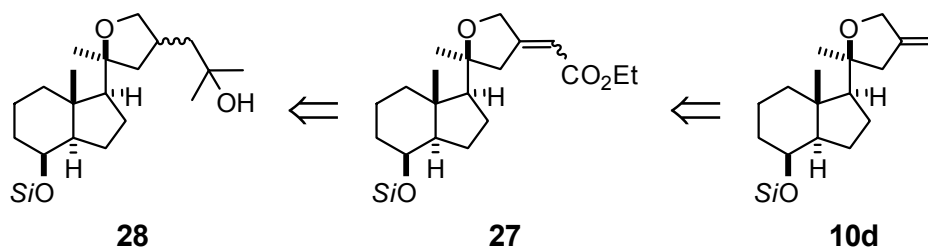
### 3.5. Construcción de la cadena lateral.

A continuación se afrontó el problema de la introducción de las cadenas laterales presentes en los compuestos clave **28** (Esquema 30).

(179) (a) Meyers AI, Collington EW. Facile and specific conversion of allylic alcohols to allylic chlorides without rearrangement. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 3044-3045. (b) Snyder EI. Conversion of allylic alcohols to chlorides without rearrangement. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 1466-1466.

(178) Dursina B. et al. Identification and Specificity Profiling of Protein Prenyltransferase Inhibitors Using New Fluorescent Phosphoisoprenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2822-2835.

Esquema 30: Construcción de la cadena lateral.



El proceso a estudiar conlleva la introducción del éster  $\alpha,\beta$ -insaturado seguido de hidrogenación del doble enlace. Para la introducción de la cadena lateral se decidió estudiar el comportamiento de la reacción de metátesis.

### 3.5.1. Cadena lateral vía metátesis.

El paso siguiente consistió en insertar la cadena lateral al anillo tetrahydrofurano (Esquema 31).

Esquema 31: Intentos de introducción de la cadena lateral hidroxilada vía metátesis.

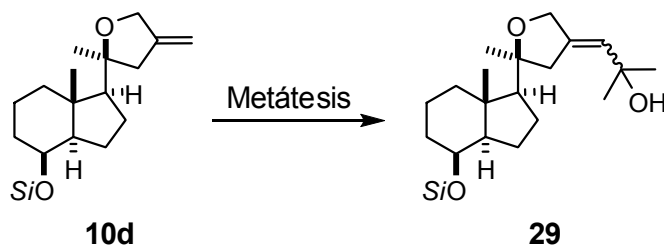
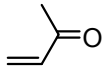
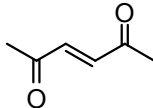


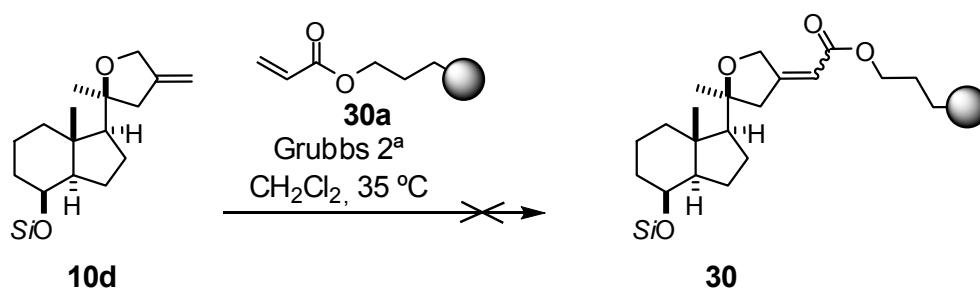
Tabla 4: Resultados de las metátesis.

Olefina	Catalizador	Condiciones	Producto
	Grubbs 1 <sup>a</sup> y 2 <sup>a</sup> Generación	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 35 °C	
	Grubbs 1 <sup>a</sup> y 2 <sup>a</sup> Generación	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 35 °C	

	Grubbs 1 <sup>a</sup> y 2 <sup>a</sup> Generación	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 35 °C	
---	--	----------------------------------	---

Los tres intentos de reacción de metátesis ensayadas bajo las condiciones indicadas en la tabla 4 condujeron a dímeros de la olefina inicial y no al producto deseado, probablemente por el impedimento estérico de la olefina disustituida de partida. Con el fin de minimizar la formación del producto olefinico dimerizado se procedió a estudiar la reacción de metátesis en fase sólida utilizando el éster  $\alpha,\beta$ -insaturado sobre un soporte sólido (NovaBiochem A26457, **30a**) y cantidades catalíticas del catalizador de Grubbs de 2<sup>a</sup> generación (Esquema 32).

Esquema 32: *Metátesis en fase sólida.*

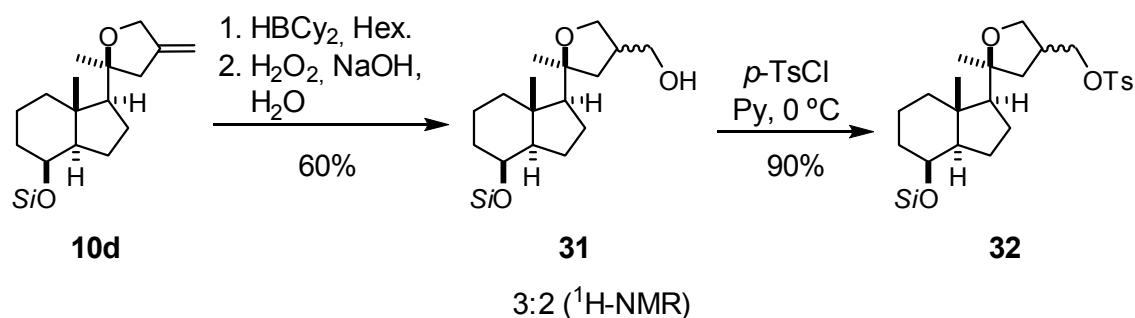


Desafortunadamente no se observó la formación del producto deseado **30**.

### 3.5.2. Introducción de la cadena lateral vía química de boranos.

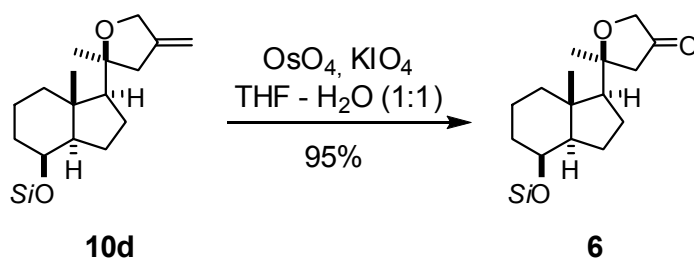
La olefina exocíclica **10d** se trató con un borano voluminoso con el objeto de aumentar la estereoselectividad en la formación de los alcoholes **31**. La utilización de biciclohexilborano, seguido de oxidación en medio alcalino, condujo a la formación de los dos alcoholes diastereoisoméricos en una relación de 3:2 (<sup>1</sup>H-NMR). La mezcla de alcoholes se transformó en los respectivos tosilatos **32** por reacción del cloruro de tosilo en piridina (90%) (Esquema 33).<sup>186</sup>

(186) H.C. Brown. *Organic Synthesis via boranes*, Wiley, New York, **1975**, p 17.

Esquema 33: *Reacción con borano.*

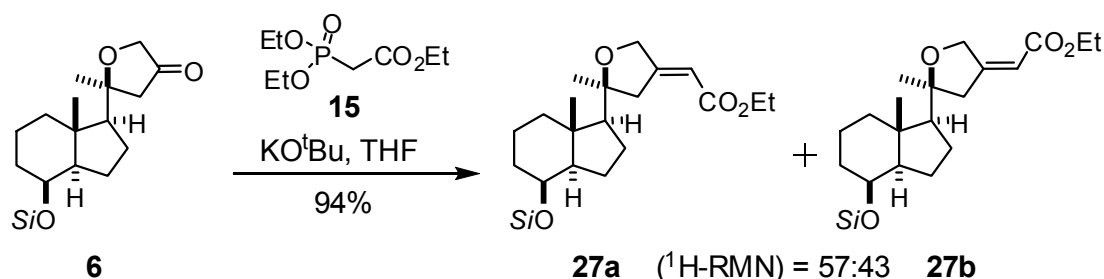
## 3.5.3. Introducción de la cadena lateral via química de fosfonatos.

La pobre estereoselectividad obtenida en la hidroborcación nos llevó a estudiar la introducción de la cadena lateral vía química de fosfonatos. El tratamiento de la olefina **10d** con tetróxido de osmio y peryodato potásico en THF-H<sub>2</sub>O (1:1) condujo a la cetona cíclica **6** en buen rendimiento (Esquema 34).<sup>187</sup>

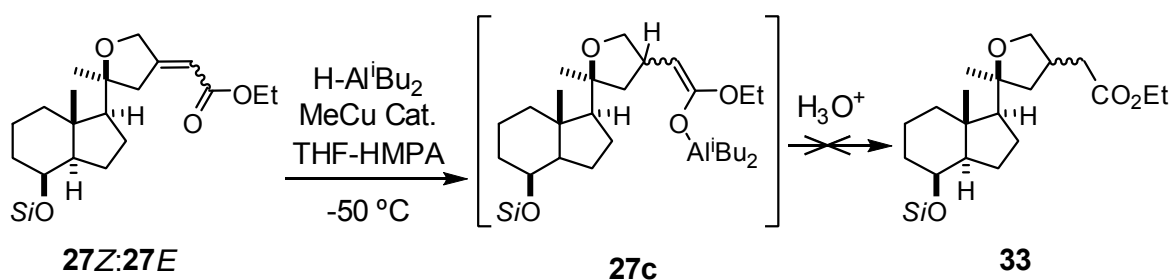
Esquema 34: *Obtención de la cetona cíclica.*

El tratamiento de la cetona **6** con el anión procedente de la metalación del fosfonato **15** con KO<sup>t</sup>Bu condujo la mezcla de los ésteres α,β-insaturados **27** en (94%, *E:Z* / 57:43) (Esquema 35).

(187) (a) Castedo L, Mascareñas JL, Mouriño A. An improved synthesis of 1α, 25-dihydroxyvitamin D A synthons. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2099-2102. (b) Snider BB, Vo NH, O'Neil SV, Foxman BM. Synthesis of (±)-Allocyathin B2 and (+)-Erinacine A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7644-7645.

Esquema 35: Formación de los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados.

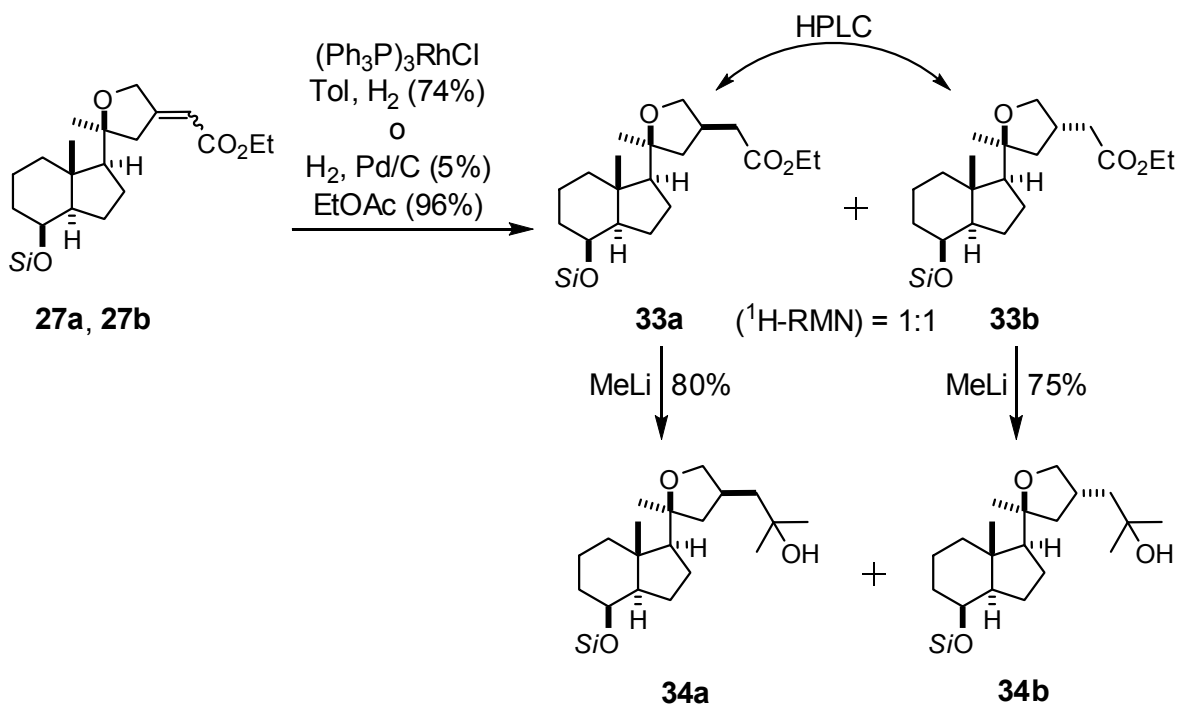
Con el objeto de mejorar la razón de diastereoisómeros decidimos probar la reducción del doble enlace vía hidruros de cobre. Sin embargo, utilizando las condiciones de Tsuda,<sup>188</sup> no fuimos capaces de obtener la mezcla de ésteres esperada debido, probablemente, a la disustitución del carbono  $\beta$  (Esquema 36).

Esquema 36: Intentos de reducción del doble enlace de **27** con "HCu".

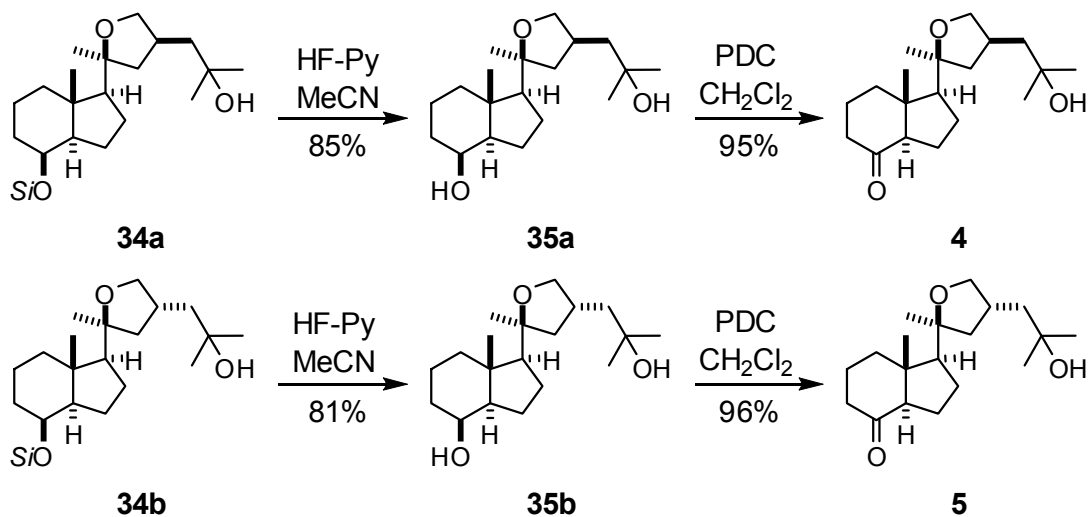
### 3.6. Preparación de los alcoholes terciarios **34a** y **34b**.

La hidrogenación de la mezcla de ésteres **27a** y **27b** en presencia de cantidades catalíticas de Pd sobre carbón o el catalizador de Willianson, condujo a una mezcla (1:1) de los ésteres **33a** y **33b** que pudieron separarse por HPLC. Ambos ésteres se metilaron con MeLi obteniéndose los correspondientes alcoholes terciarios **34a** y **34b** en buen rendimiento (Esquema 37).

(188) Tsuda T, Hayashi T, Satomi H, Kawamoto T, Saegusa T. Methylcopper(I)-catalyzed selective conjugate reduction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds by di-*iso*-butylaluminum hydride in the presence of hexamethylphosphoric triamide. *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 537-540.

Esquema 37: Preparación de los alcoholes terciarios **34a** y **34b**3.7. Preparación de las cetonas **4** y **5**.

Los alcoholes terciarios **34a** y **34b** se desililaron con fluoruro de piridinio en acetonitrilo para dar los correspondientes dioles **35a** y **35b** en buenos rendimientos. Los dioles se oxidaron a las respectivas cetonas **4** y **5** utilizando dicromato de piridinio en diclorometano (Esquema 38).

Esquema 38: Preparación de las cetonas **4** y **5**.

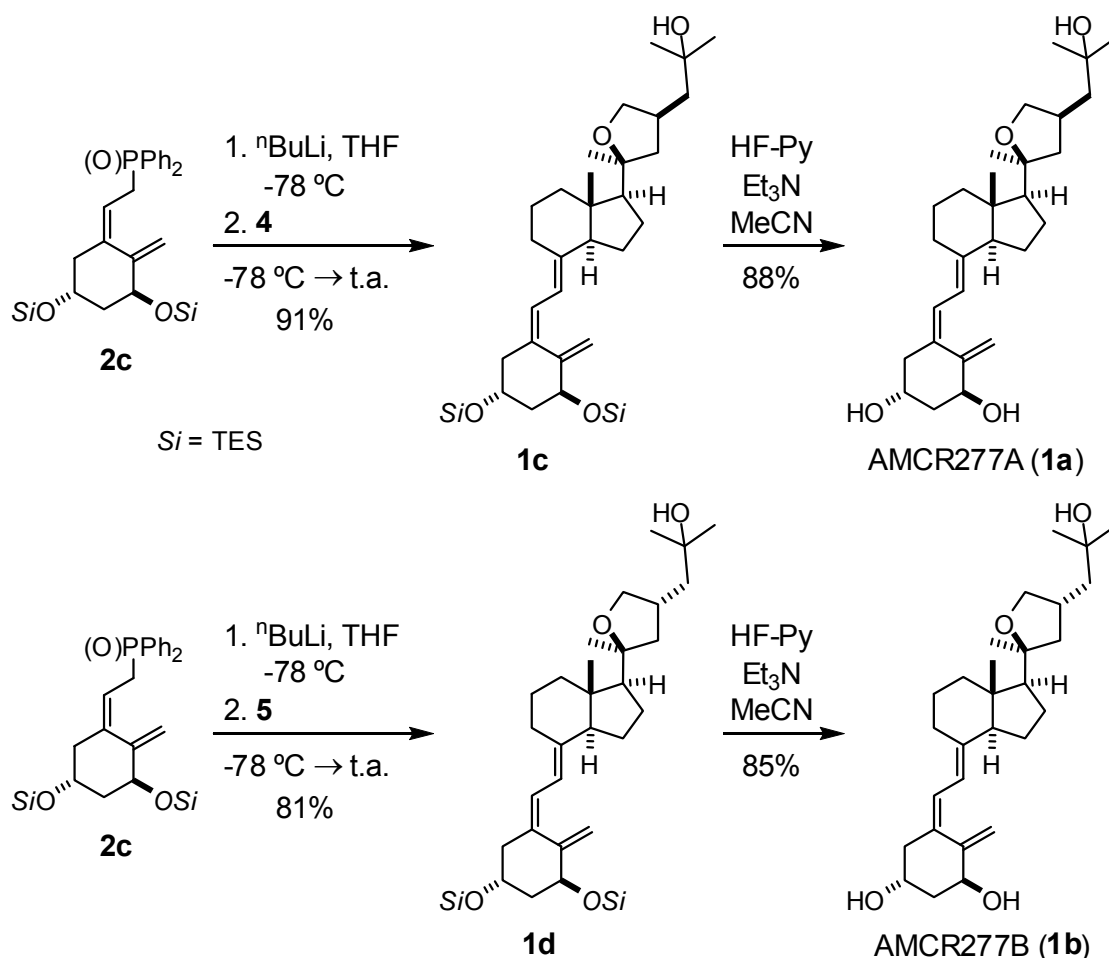
La estereoquímica de los alcoholes se comprobó por difracción de rayos X. Los primeros intentos de cristalización con el hidroxilo protegido en C8 no condujeron a cristales suficientemente perfectos para el experimento de difracción y se descartaron. Fue posible, sin embargo, obtener la difracción de rayos X de los correspondientes dioles desililados cristalizados en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

La estructural obtenida por difracción de rayos X concuerda con los experimentos de NOE.

### 3.8. Síntesis de los análogos AMCR277A y AMCR277B.

De acuerdo con el plan de síntesis establecido, las cetonas **4** y **5** se trataron con el anion del óxido de fosfina **2** para dar los correspondientes análogos protegidos **1c** y **1d**. Los análogos sililados **1c** y **1d** se desprotegeron con fluoruro de piridinio para dar los análogos deseados AMCR277A (**1a**) y AMCR277B (**1b**) (Esquema 39).

Esquema 39: Síntesis de los análogos AMCR277A y AMCR277B.



#### 4. ESTUDIOS CRISTALOGRAFICOS.

##### 4.1. Cristalización y estructura de los complejos ligando-VDR.

Los análogos sintetizados AMCR277A y AMCR277B se enviaron a los laboratorios del Prof. Moras (IG-BMC-Ilkirsch) donde se trataron con el receptor mutado de Moras (Moras-VDR) para inducir la cristalización de los respectivos complejos ligando-VDR por el método de la gota invertida.

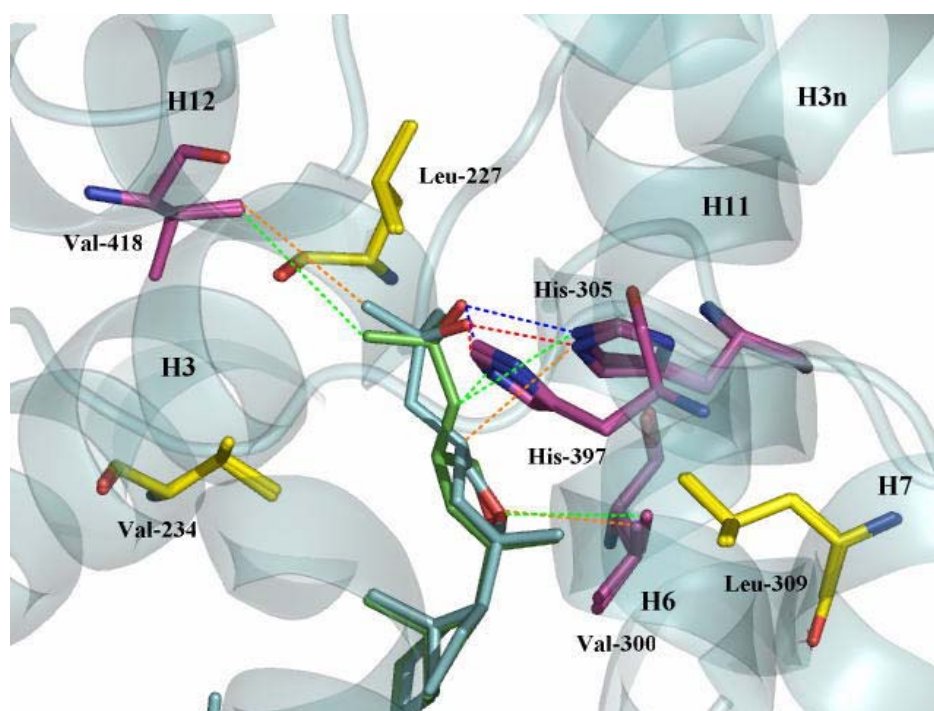
Los cristales seleccionados correspondientes a cada complejo ligando-VDR se enviaron a Grenoble con el fin de obtener los datos de difracción cristalográfica que permitieron deducir las estructuras cristalinas de los complejos.

##### 4.2. Análisis de los resultados.

La figura 3 ilustra las estructuras de los dos nuevos análogos complejados al receptor mutado de Moras. El análogo AMCR277A (ciano) y AMCR277B (verde) adoptan las conformaciones típicas de la hormona natural. Los residuos de aminoácidos que están en un radio de 4Å se señalan en amarillo. Los residuos aminoacídicos que interaccionan con los ligando se indican en color magenta. Los átomos de oxígeno se indican en rojo y los de nitrógeno en azul. Los enlaces de hidrógeno entre el receptor y el análogo AMCR277A se señalan con líneas punteadas en rojo. Los enlaces de hidrógeno entre el otro análogo AMCR277B y el receptor se señalan como líneas punteadas azules. Las interacciones de van der Waals entre AMCR277A y AMCR277B y el receptor se señalan como líneas punteadas naranja y verde, respectivamente. La estructura secundaria del VDR se muestra en color ciano. Las hélices H3n, H3, H6, H7, H11 y H12 también se señalan en la figura 3.

Las interacciones ligando-VDR más importantes son: (1) Enlace de hidrógeno entre el 25-OH y las histidinas His-305 y His-397. (2) Enlace de hidrógeno entre el 1 $\alpha$ -OH y la serina Ser-237 y la arginina Arg-274. (3) Enlaces de hidrógeno entre el 3-OH y la Tyr-143 y la Ser 278. (4) Interacciones de van der Waals entre las cadenas laterales y las histidinas His-305, His397 y la valina Val-300. (5) Interacciones de van der Waals entre los metilos C26 y C27 con la Val-418.

Figura 3. Estructuras cristalográficas de los complejos AMCR277A-(Moras-VDR) y AMCR277B-(Moras-VDR).



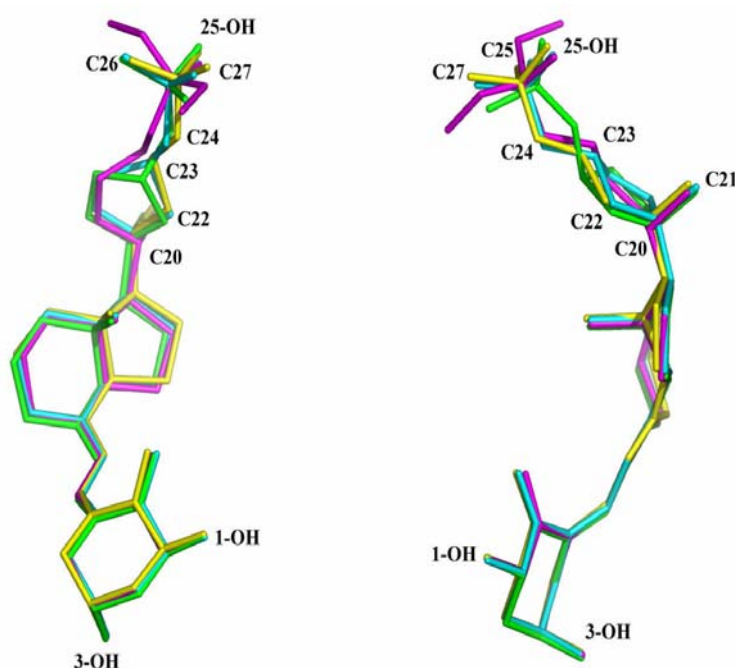
La interacción de van der Waals entre el oxígeno tetrahidrofuránico y la Val-300 es más fuerte en el caso del isómero AMCR277A. Esta interacción no existe en el caso de la hormona natural. Un aspecto importante es la distancia más corta que existe entre el metilo C27 de AMCR277A y la valina Val-418 cuando se compara con la distancia entre la Val418 y el metilo C27 del otro isómero. Se puede decir que el isómero AMCR277A activa más la hélice 12 para la transactivación a través del residuo de Val418 que el otro isómero.

Las interacciones proteína-ligando muestran que en ambos complejos la proteína adopta la misma conformación canónica observada en todas las estructuras anteriormente descritas para el VDR unido a los ligandos agonistas. Las diferencias están sólo en las cadenas laterales que están localizadas en la superficie de la proteína.

La figura 4 ilustra la superposición de las estructuras químicas de dos ligandos conocidos KH1060 (magenta) y calcitriol (amarillo) así como de los dos nuevos análogos AMCR277A (verde) y AMCR277B (ciano). Se muestran las estructuras superpuestas de los análogos como resultado de la superposición de los

complejos VDR-ligando. Vista frontal a la derecha y de perfil a la izquierda. Los átomos de oxígeno están en rojo, los átomos de la cadena lateral están numerados. El grupo hidroxilo del calcitriol está señalado. Las coordenadas atómicas utilizadas se obtuvieron del 1DB1 para el calcitriol y 1IE8 para el KH1060 que están depositadas en el banco de datos de proteínas (PDB).

Figura 4. Superposición de las conformaciones presentadas por los ligandos calcitriol (amarillo), KH1060 (magenta), AMCR277A (verde) y AMCR277B (ciano) en el LBD-VDR.



El AMCR277A y AMCR277B adoptan conformaciones alargadas, también observadas en los complejos VDR-calcitriol y VDR-KH1060. Para los cuatro complejos, las distancias entre 1-OH y 25-OH varían entre 12.8 Å a 13.1 Å. Las interacciones entre la proteína y los anillos A, Seco-B, C, y D son idénticas. Los grupos hidroxilos poseen los mismos enlaces de hidrógeno, 1-OH con Ser-237 y Arg-274, 3-OH con Tyr-143 y Ser-278, y los 25-OH con His-305 y His-397.

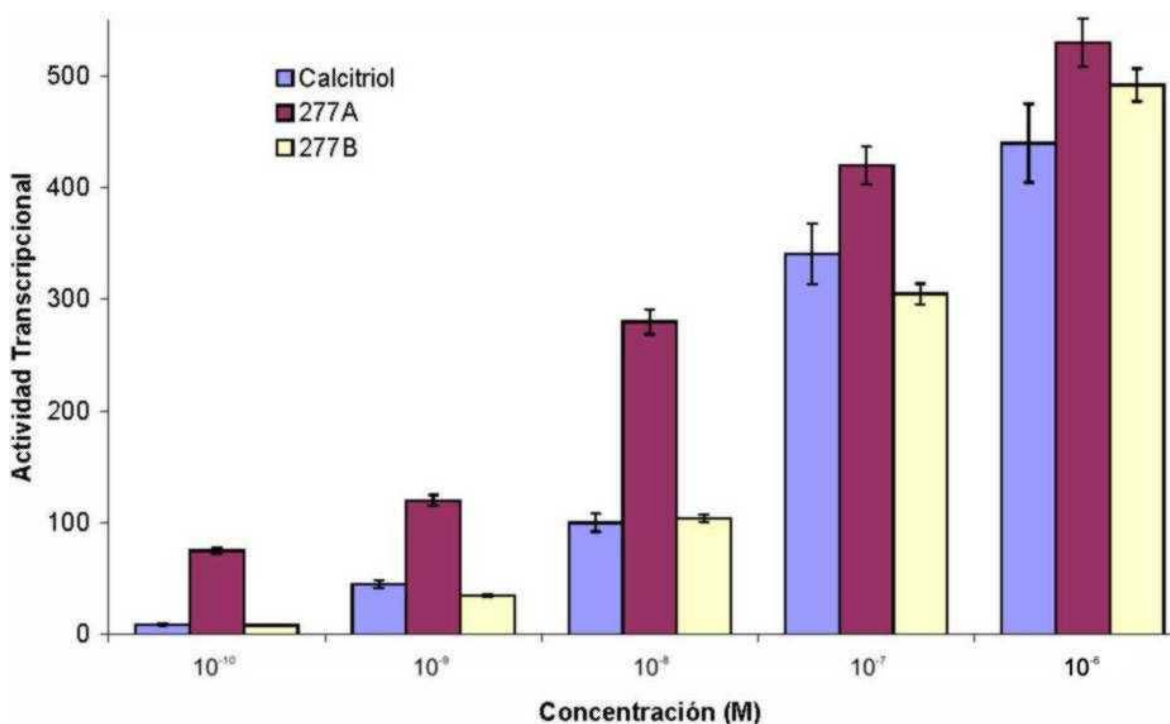
## 5. ENSAYOS BIOLÓGICOS

Los análogos se ensayaron en los laboratorios del Prof. Moras *in vitro* e *in vivo* para examinar sus actividades transcripcionales, diferenciación celular, inhibición de la proliferación celular y efectos calcémicos.

### 5.1. Inducción de la transcripción.

La actividad transcripcional de los análogos AMCR277A y AMCR277B se ensayó en células EBNA-293. De forma notable, el isómero AMCR277A induce la transcripción 12 veces mejor que la hormona natural a concentraciones de  $10^{-10}$  M. El otro isómero se comporta como la hormona natural (Figura 5).

Figura 5. Inducción de la actividad transcripcional de los análogos AMCR277A y AMCR277B.



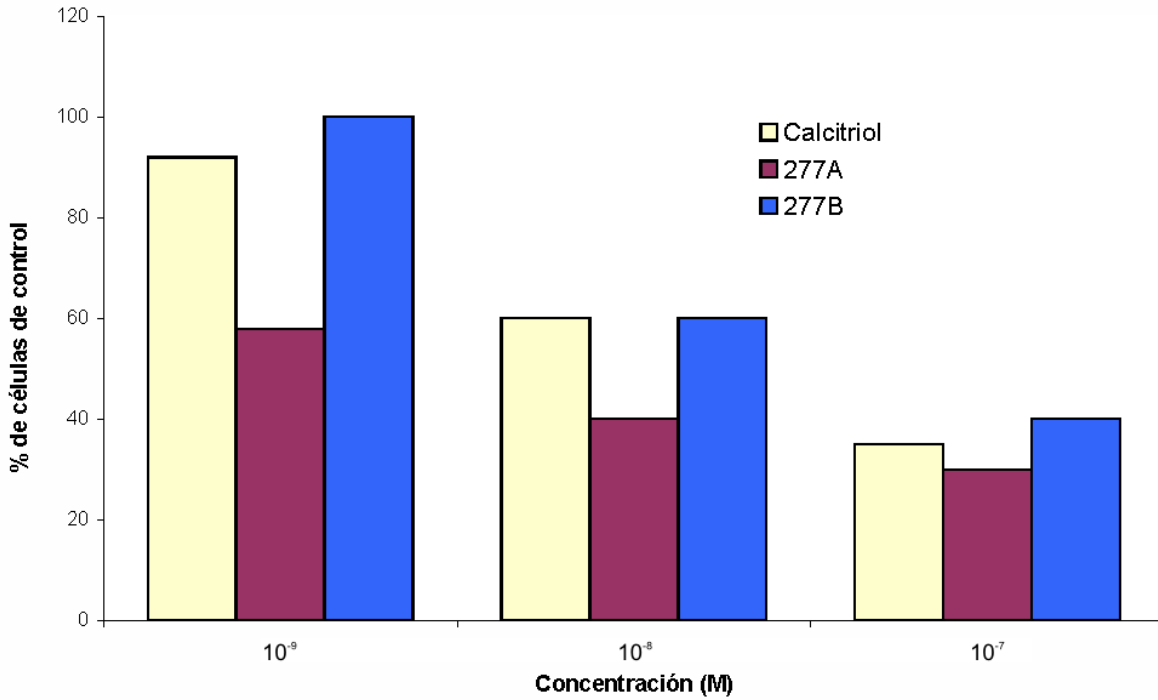
### 5.2. Diferenciación celular e inhibición de la proliferación celular en células HL60.

Puesto que AMCR277A estimula la actividad genética *in vitro*, se postuló que este efecto podría conducir a un nuevo fenotipo celular por inducción y reprogramación genética. Para probar esta hipótesis, se utilizó el clon de células humanas HL60. El calcitriol induce la inhibición de la proliferación celular y provoca su diferenciación celular en este tipo de células cancerosas.

El AMCR277B inhibe la proliferación celular de forma similar al calcitriol a diferentes dosis. El efecto causado por el AMCR277A fue 10 veces mayor

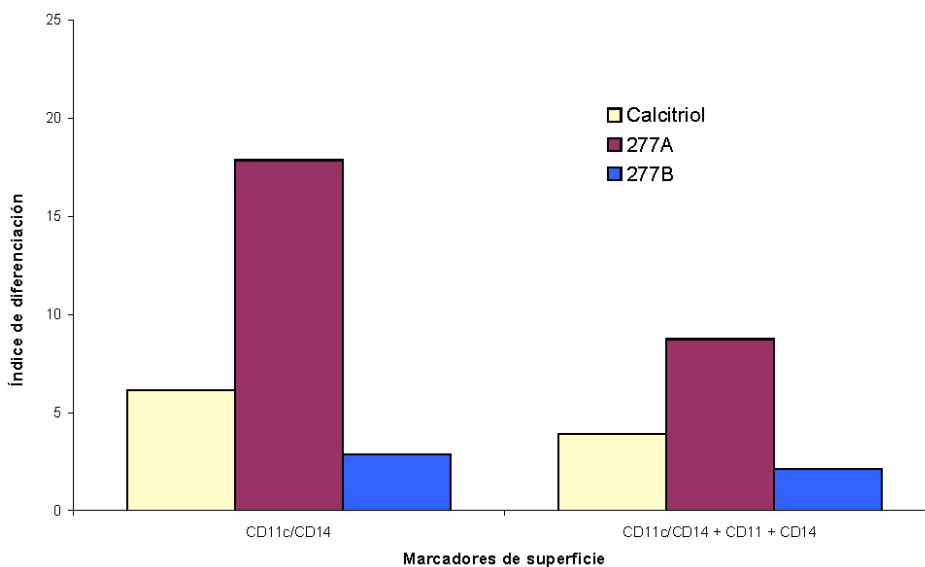
(Figura 6). Se demostró que en las células tratadas con AMCR277B se detuvo el crecimiento celular de forma comparable a como ocurre con el calcitriol en todas las dosis probadas.

Figura 6. *Inhibición de la proliferación celular.*



Del mismo modo, se encontró que AMCR277A causa la inhibición de la mitosis en las células incubadas. Sin embargo, este efecto es 10 veces superior al calcitriol o al AMCR277B.

Figura 7: *Capacidad de estimular la diferenciación celular.*



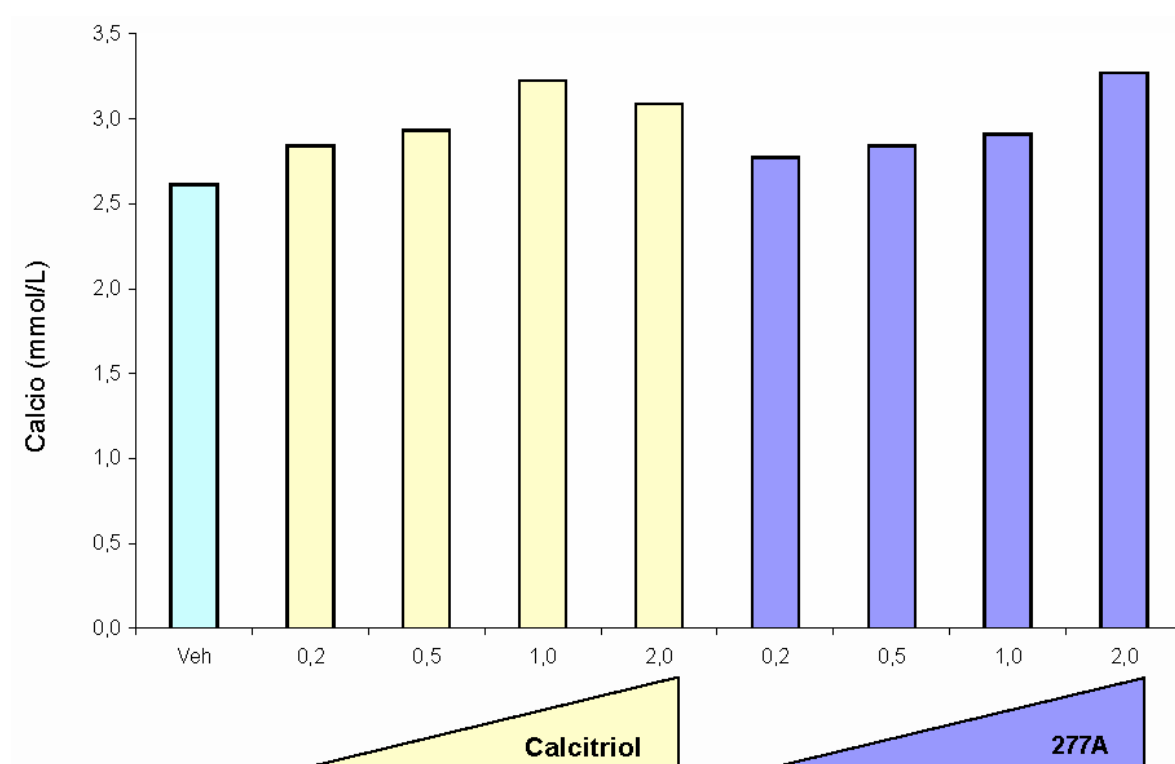
El AMCR277A mostró una mayor capacidad para inducir la producción de CD11c y CD14 cuando se compara con el calcitriol o el AMCR277B a concentraciones de 1 nM (Figura 7). AMCR277A es un fuerte inductor de la diferenciación de células HL60.

Por lo tanto concluimos que el análogo AMCR277A muestra propiedades superagonistas *in vitro* en la inhibición de la proliferación de células de HL60 y para su diferenciación en un fenotipo monocito.

### 5.3. Efecto hipocalcémico en ratones.

El AMCR277A presenta propiedades superagonistas *in vitro*. La acción calcémica inferior del AMCR277A en comparación a la del calcitriol es indicativa de su potencial interés clínico. La actividad calcémica se determinó en ratones C57BL/6J alimentados con AMCR277A o calcitriol mezclado en un excipiente.

Figura 8: Efecto calcémico en ratones.



El aumento de la calcemia es dependiente de la dosis de calcitriol (Figura 8). En los ratones control, alimentados con calcitriol, la hipercalcemia se observó a

dosis de 1 a 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En contraste, ratones alimentados con 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AMCR277A no exponen un aumento significativo del nivel de calcio en suero, que sólo fue detectado a dosis superiores. Por lo tanto, AMCR277A se comporta como un superagonista *in vivo*, regulando la movilización de calcio en la sangre.

#### 5.4. Afinidad por el VDR.

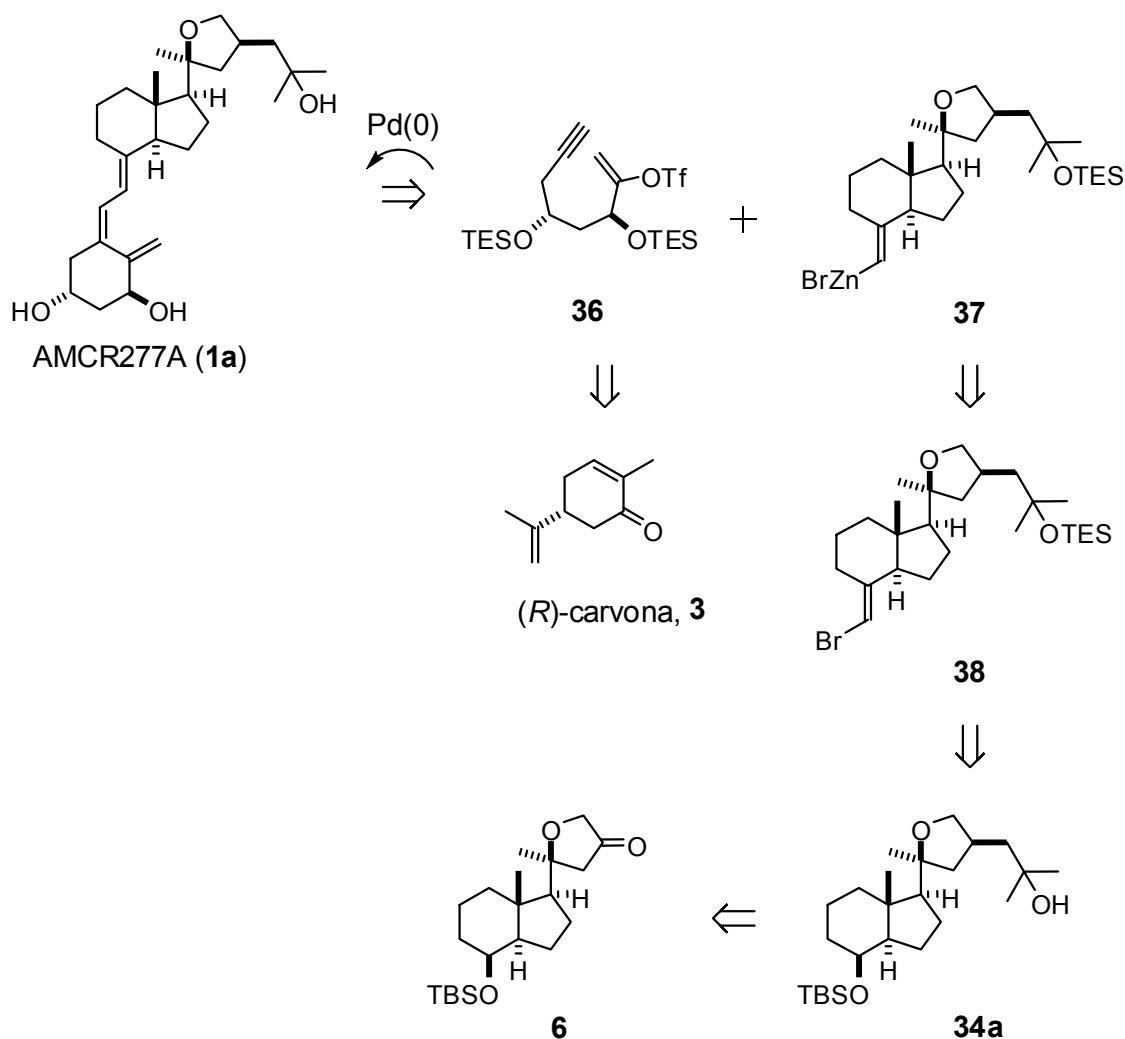
La interacción de los análogos AMCR277A y AMCR277B por el VDR-LBD se evaluó por experimentos de espectrometría de masas, utilizando el método de ionización por electrospray ESI-SRA. Esta técnica usada actualmente para estudiar la fuerza de enlace ligando-VDR permite la caracterización de interacciones no covalentes. Las modificaciones químicas del ligando, resultantes de los enlaces electrostáticos y enlaces de hidrógeno son directamente reflejados en los datos de ESI-SRA. Esto proporciona una clasificación cualitativa de los ligandos similar al obtenido por los métodos clásicos. Se determinaron los espectros de masas de (ESI) para AMCR277A, AMCR277B y el calcitriol a voltajes diferentes. El voltaje  $\text{VC}_{50}$  al cual la mitad de las especies están ligadas y la otra mitad no ligada es de 41V, 39V y 37V para AMCR277A, AMCR277B y el calcitriol respectivamente, indicando una afinidad relativa por el VDR en el orden AMCR277A > AMCR277B > calcitriol.

## 6. MEJORA DE LA SÍNTESIS DE AMCR277A.

Dados los prometedores resultados biológicos que presenta el superagonista AMCR277A, se consideró de interés mejorar su síntesis. Para ello se realizó un nuevo planteamiento sintético que se basa en un proceso catalizado por Pd(0) (ciclación de enol triflato seguido de acoplamiento del intermedio de paladio resultante con organometálicos alquénicos de zinc) para la construcción del sistema triénico (Esquema 40).<sup>158</sup>

### 6.1. Retrosíntesis alternativa del superagonista AMCR277A.

Esquema 40. Nuevo planteamiento retrosintético del superagonista AMCR277A.



(158) Gómez-Reino C, Vitale C, Maestro M, Mouriño A. Pd-Catalyzed Carbocyclization-Negishi Cross-Coupling Cascade: A Novel Approach to 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Analogues. *Org. Lett.* **2005**,*7*, 5885-5887.

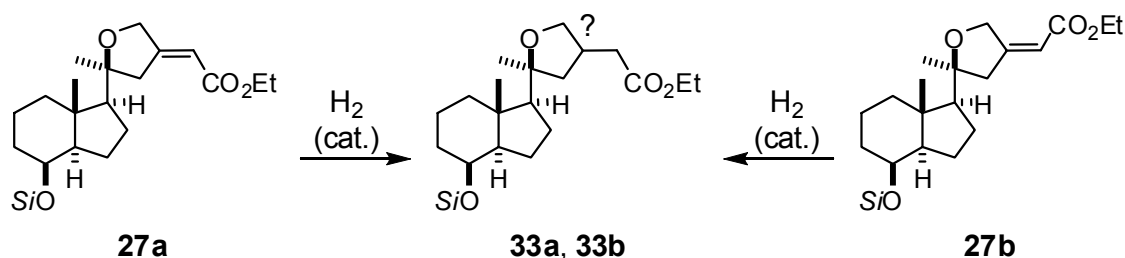
La síntesis del enoltriflato **36** ya se ha realizado con éxito en este laboratorio a partir de la (*R*)-carvona. Los aspectos a mejorar en el nuevo planteamiento incluyen: (1) la formación del bromuro alquénico **38**, ya que en sustratos similares o incluso mucho menos complejos estructuralmente, se obtienen rendimientos entorno al 50%, y (2) la síntesis estereoselectiva de **34a** a partir de la cetona **6**, que previamente conducía a una mezcla prácticamente equimolecular de los dos isómeros C23 (*R*) y C23 (*S*).

A continuación se expone el trabajo realizado para la síntesis estereoselectiva del fragmento tetrahidrofuránico **34a**.

## 6.2. Síntesis estereoselectiva de los ésteres $\alpha,\beta$ -insaturados **27a** y **27b**.

Retomamos la hidrogenación de la mezcla de ésteres y planteamos las siguientes cuestiones: ¿Cuál sería el resultado de hidrogenar separadamente los dos ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturado **27a** y **27b**? ¿Se obtendrían los ésteres reducidos **33a** y **33b** en las mismas proporciones? (Esquema 41).

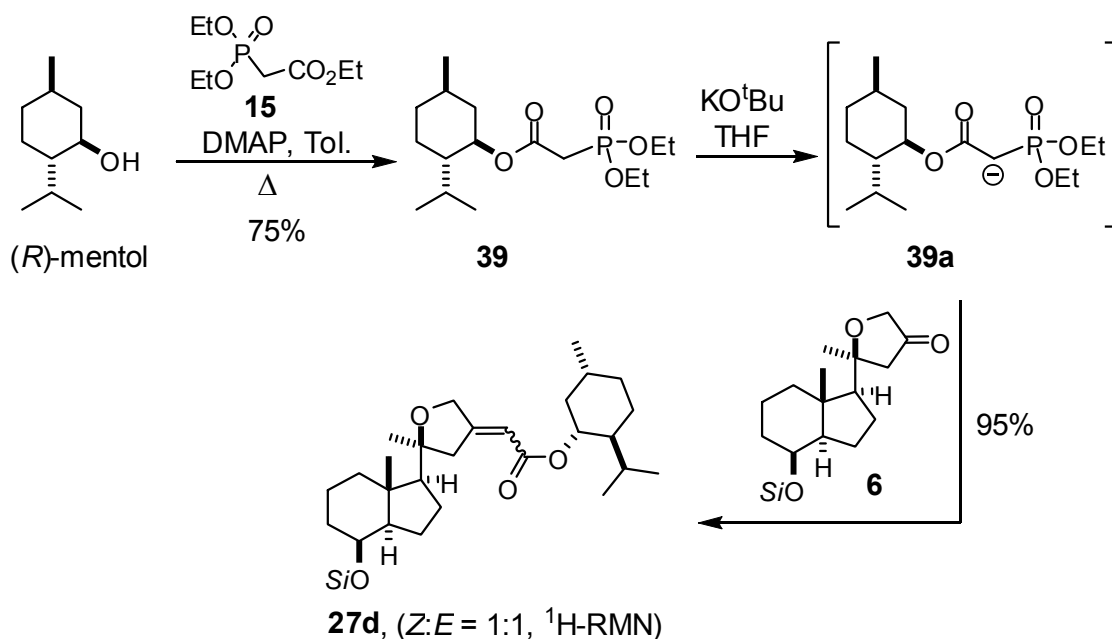
Esquema 41. *Hidrogenación de los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturado separadamente.*



Puesto que la separación de los dos ésteres **27a** y **27b** resultó posible únicamente por HPLC, se procedió a intentar mejorar la estereoselectividad de la reacción de Wadsworth-Horner-Emmons utilizando fosfonatos quirales o más voluminosos, que podrían favorecer también la separación de los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados una vez formados.

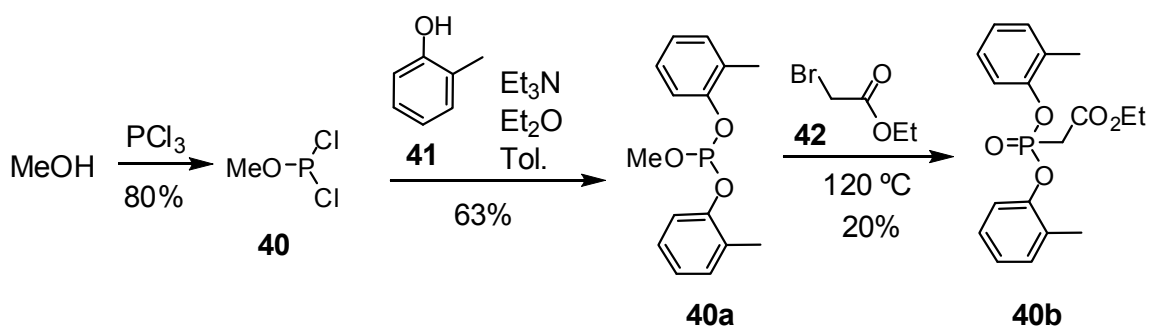
La reacción del anión **39a**<sup>190</sup> con la cetona **6** condujo a una mezcla 1:1 de los ésteres insaturados **27d** (Esquema 42).

Esquema 42: Preparación del fosfonoacetato quiral **39** y reacción de su anión con la cetona **6**.



Puesto que la introducción de quiralidad en el grupo éster del fosfonato no mejora la diastereoselectividad de la reacción, se decidió sustituir los etoxilos unidos al fósforo por otros fragmentos más voluminosos (Esquema 43).<sup>191</sup>

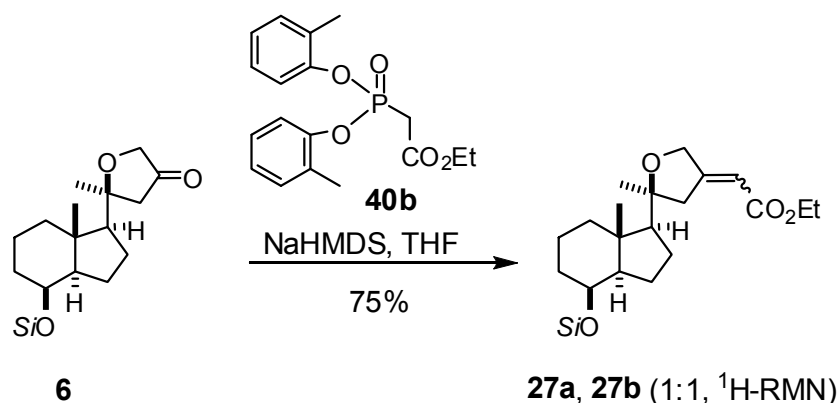
Esquema 43: Preparación del fosfonoacetato fenólico **40b**.



(190) (a) Hatakeyama S, Satoh K, Sakurai K, Takano S. Efficient ester exchange reaction of phosphonoacetates. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2713-2716. (b) Page PCB, Moore JPG, Mansfield I, McKenzie MJ, Bowler WB, Gallagher JA. Synthesis of bone-targeted oestrogenic compounds for the inhibition of bone resorption. *Tetrahedron* **2001**, 57, 1837-1847.

Desafortunadamente, el uso del fosfonato aromático **40b** no mejoró los resultados anteriores (Esquema 44).

Esquema 44: *Reacción de Wadsworth-Horner-Emmons del anión del fosfonato fenólico 40b con la cetona 6.*

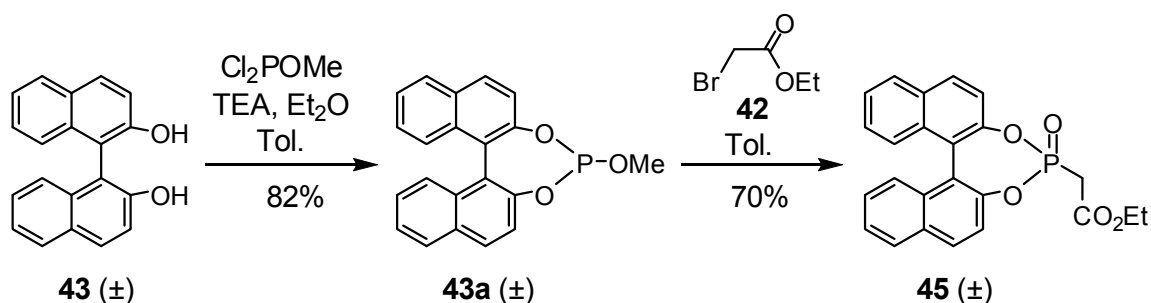


A continuación decidimos explorar el comportamiento de un fosfonato quiral más voluminoso como el reactivo de Fuji.

6.2.1. Preparación del reactivo de Fuji y reacción de Wadsworth-Horner-Emmons con la cetona **6**.

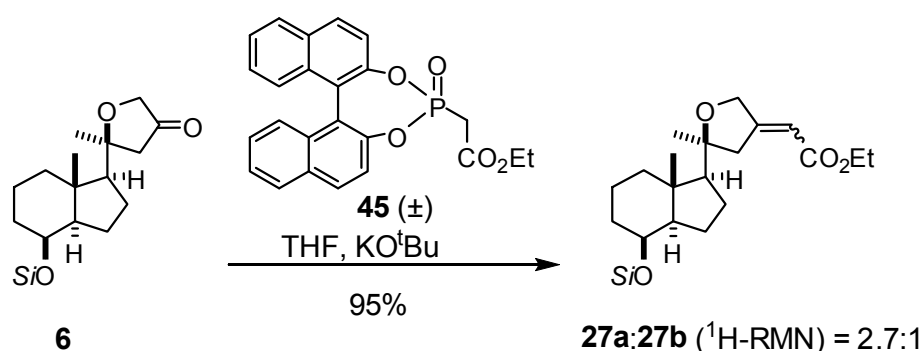
Siguiendo el procedimiento de Fuji, se transformaron los binoles **43** en los fosfitos **43a** y éstos en los fosfonatos deseados **45** (Esquema 45).

Esquema 45: *Preparación de los reactivos de Fuji (45).*



La reacción de Wadsworth-Horner-Emmons de la cetona **6** con ocho equivalentes del anión de los reactivos de Fuji (**45**) condujo a una mezcla de los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados, siendo el éster *trans* el compuesto mayoritario (Esquema 46). Este resultado nos animó a preparar el reactivo de Fuji con los binoles enantioméricamente puros.<sup>192</sup>

Esquema 46: Reacción de Wadsworth-Horner-Emmons del anión de los reactivos de Fuji (**45**) con la cetona **6**.

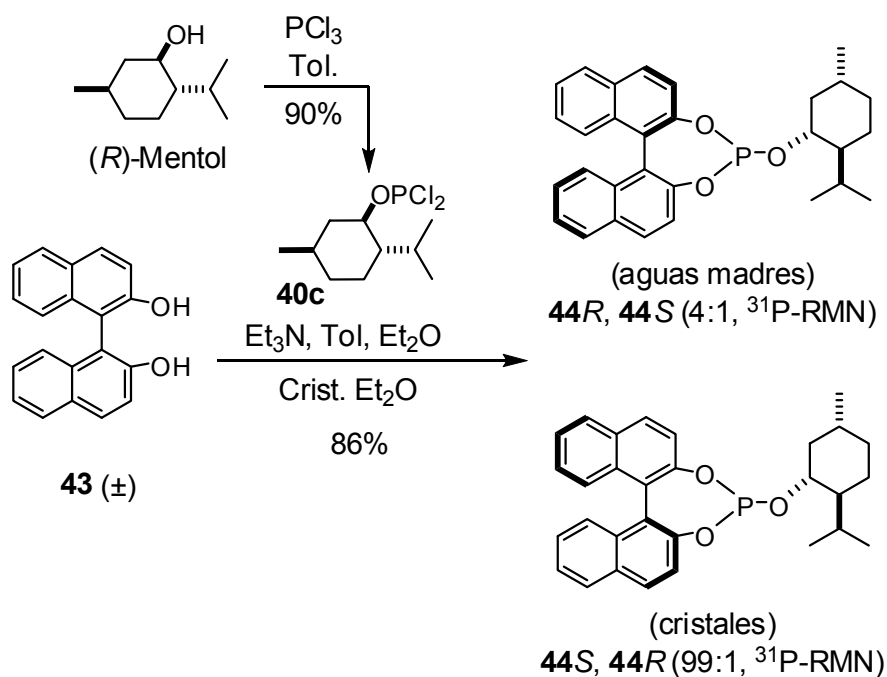


El elevado número de equivalentes del reactivo de Fuji necesarios para llevar a cabo la reacción de Wadsworth-Horner-Emmons nos llevó a reconsiderar la utilización de los binoles precursores en su forma enantioméricamente pura que son caros. Se optó por buscar un método para resolver de forma económica la mezcla de binoles precursores.

Se sabe que los éteres mentílicos de los fosfitos cíclicos del binol son separables por cristalización diferencial.<sup>193</sup> Para la preparación de los fosfitos fue necesario sintetizar el fosfodichloruro de mentol **40c** que se obtuvo por el tratamiento del mentol con tricloruro de fósforo en tolueno y posterior separación por destilación fraccionada (Esquema 47).<sup>194</sup>

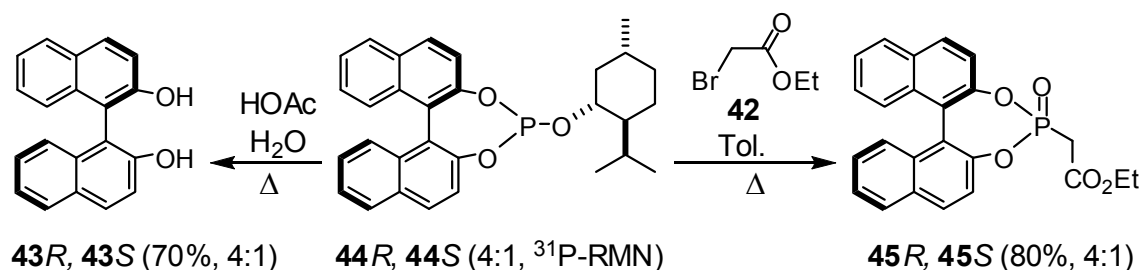
(192) Tanaka K, Ohta Y, Fuji K, Taga T. Differentiation of enantiotopic carbonyl groups by the Horner-Wadsworth-Emmons reaction. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 4071-4074.

(193) Brunel JM, Buono G. A new and efficient method for the resolution of 1,1'-binaphthalene-2,2'-diol. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7313-7314.

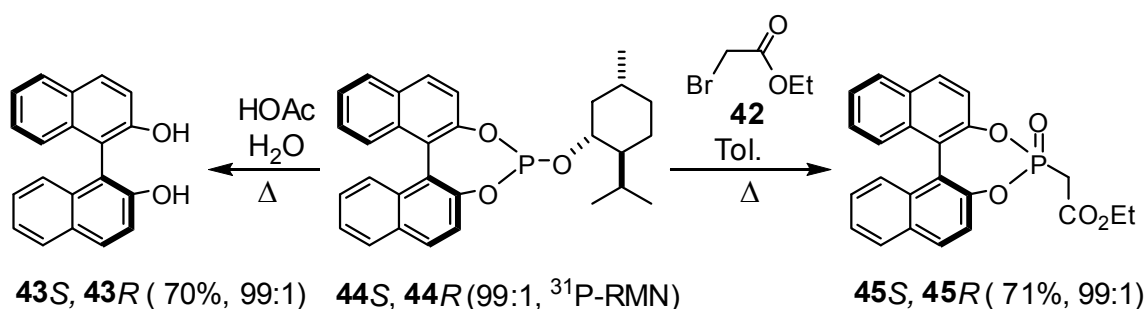
Esquema 47: Preparación y resolución de los fosfitos de binol **44**.

Los fosfitos **44R** y **44S** se pueden, ahora, transformar en los binoles enantioméricamente puros **43R** y **43S** vía métodos conocidos. Sin embargo se examinó también la posibilidad de transformar directamente los fosfitos cíclicos anteriores en los respectivos reactivos de Fuji enantioméricamente enriquecidos vía reacción de Arbuzov. En efecto, la reacción de los fosfitos **44R** y **44S** por separado con bromoacetato de etilo condujo a los reactivos de Fuji **45R** y **45S** en buen rendimiento ahorrando así varios pasos de reacción. La pureza enantiomérica de los reactivos de Fuji se dedujo del análisis de la pureza diastereoisomérica de los fosfitos de mentilo **44R** y **44S** por  $^{31}\text{P}$ -RMN (Esquema 48).

Esquema 48: Síntesis de los reactivos de Fuji enantioméricamente enriquecidos.

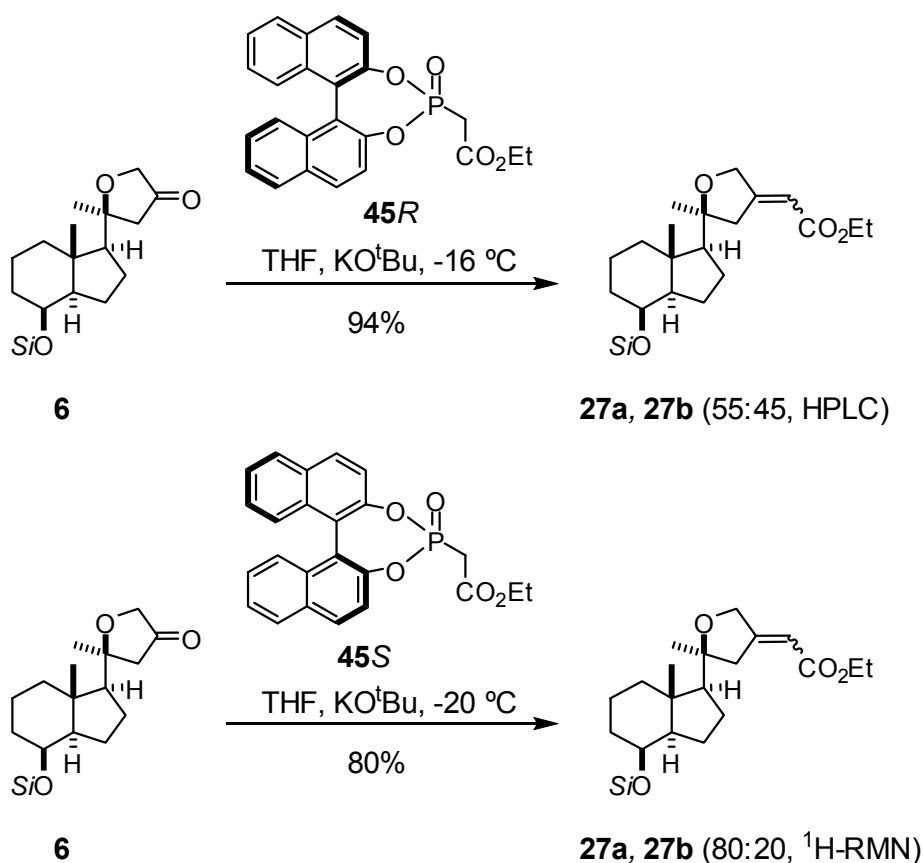


(194) Touchard FP. Phosphonate modification for a highly (*Z*)-selective synthesis of unsaturated esters by Horner-Wadsworth-Emmons olefination. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 9, 1790-1794.



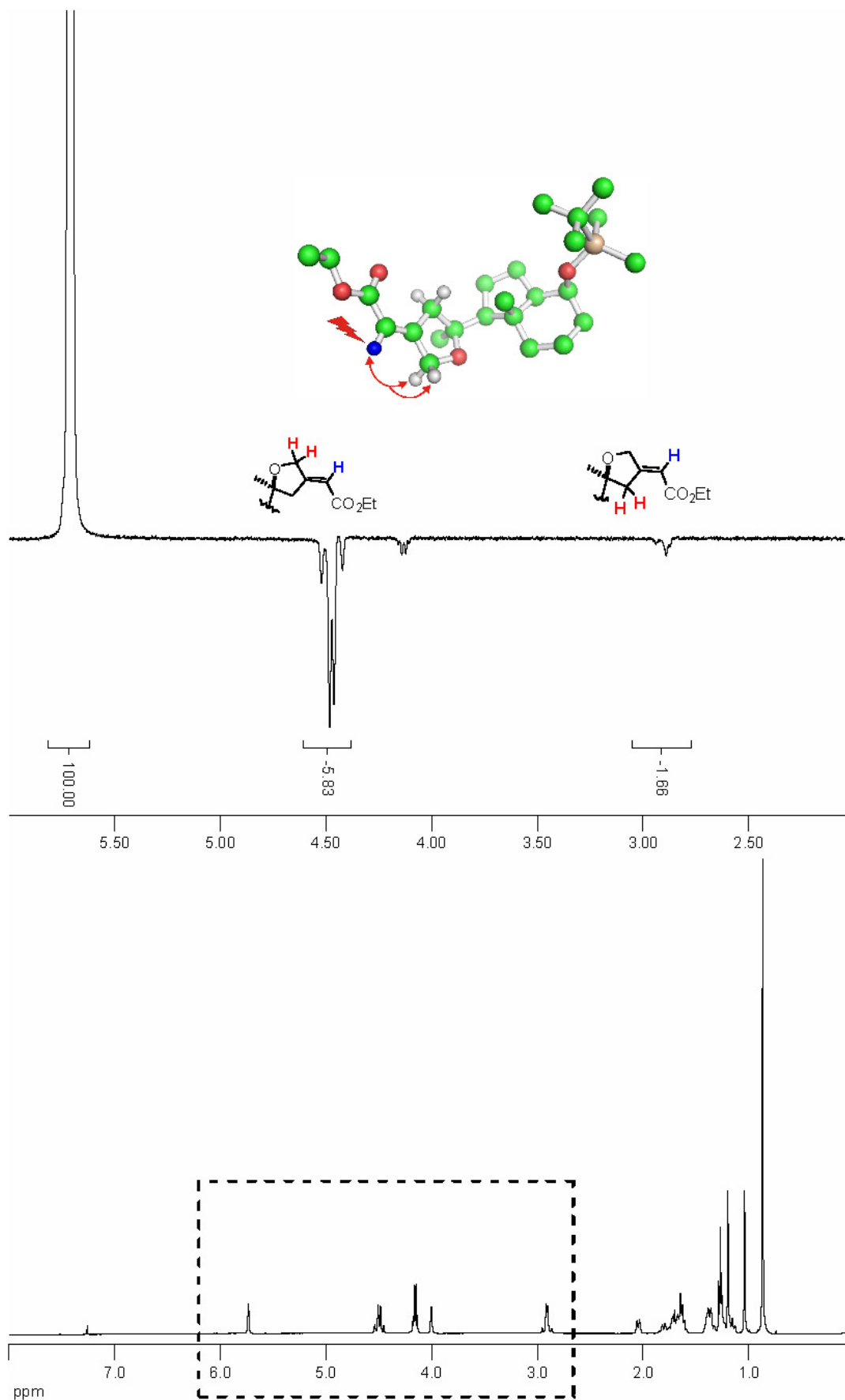
Las reacciones de la cetona **6** con los aniones de los reactivos de Fuji condujeron a los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados **27a** y **27b** en buenos rendimientos aunque el grado de estereoselectividad en ambos casos a favor del isómero *E* fue modesto. (Esquema 49).

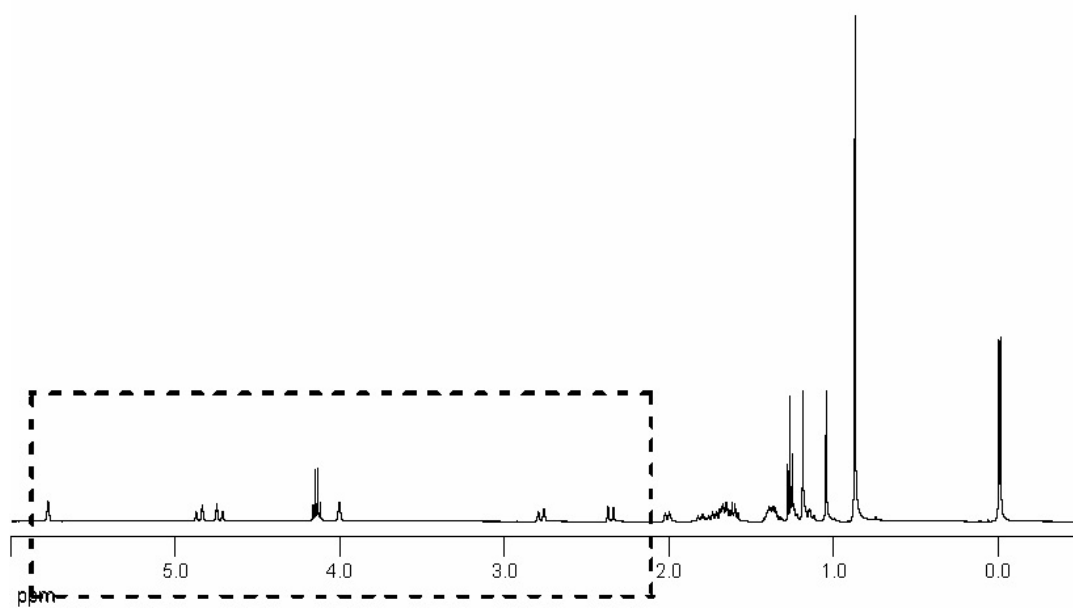
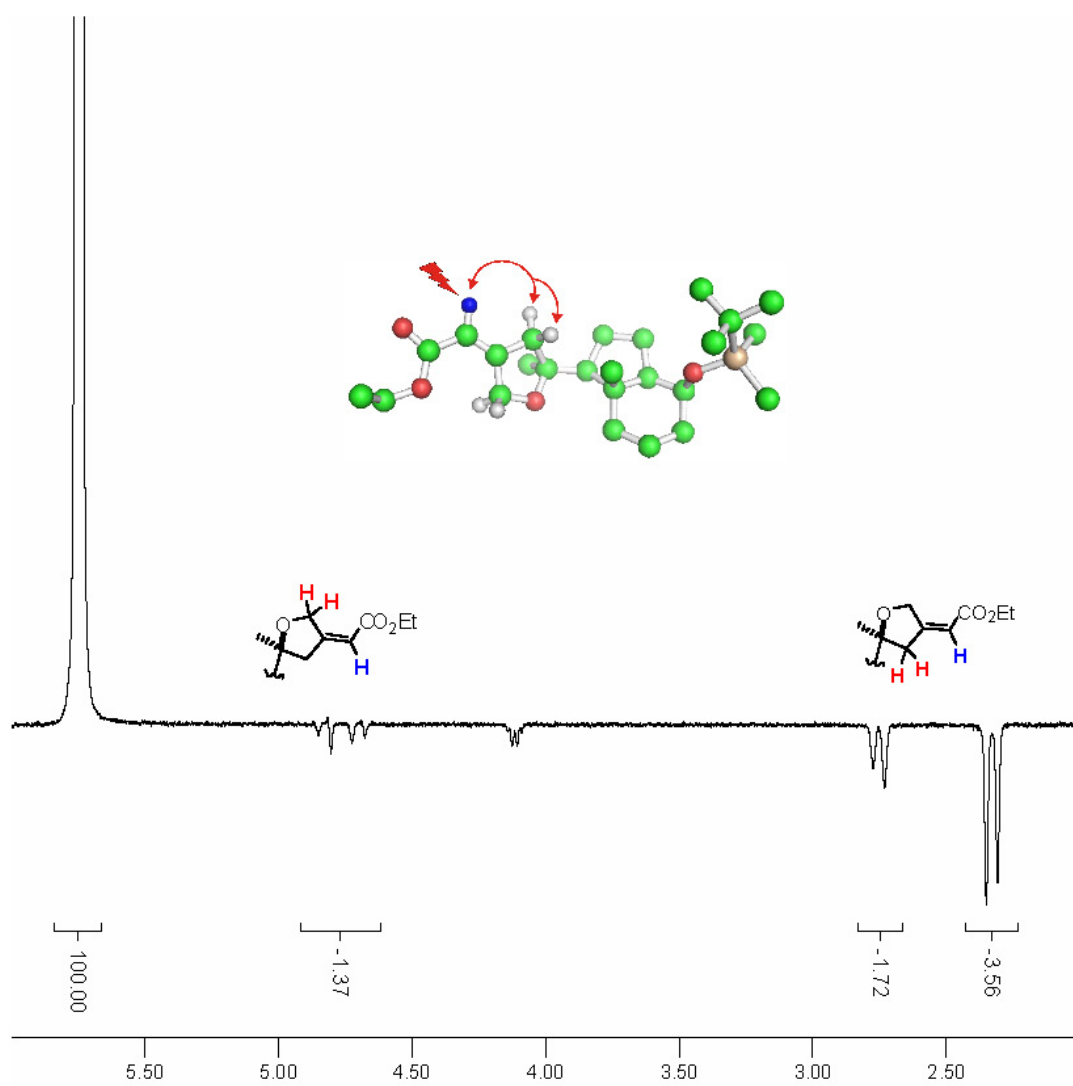
Esquema 49: Reacciones de Wadsworth-Horner-Emmons con los reactivos de Fuji enantioméricamente enriquecidos.



Los ésteres **27a** y **27b** se separaron por HPLC y se identificaron por experimentos NOE irradiando los hidrógenos unidos a carbono insaturado (Figura 9).

Figura 9: Experimentos NOE para identificar los ésteres insaturados.





El hecho de que la estereoselectividad que proporciona uno de los reactivos de Fuji no es suficientemente buena nos llevó a estudiar la hidrogenación del doble enlace de los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados **27a** y **27b**.

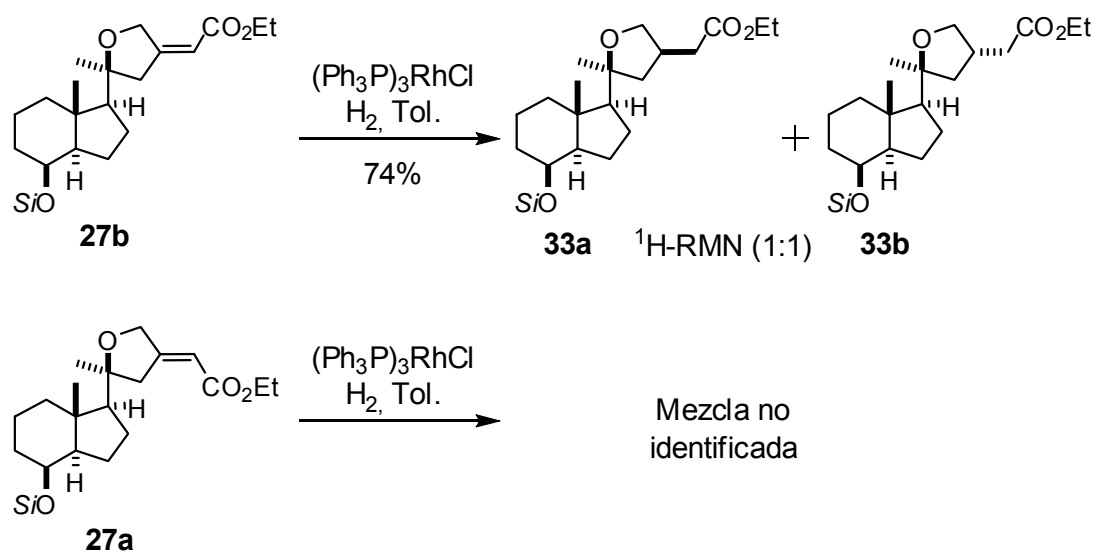
### 6.3. Hidrogenación de los ésteres $\alpha,\beta$ -insaturados.

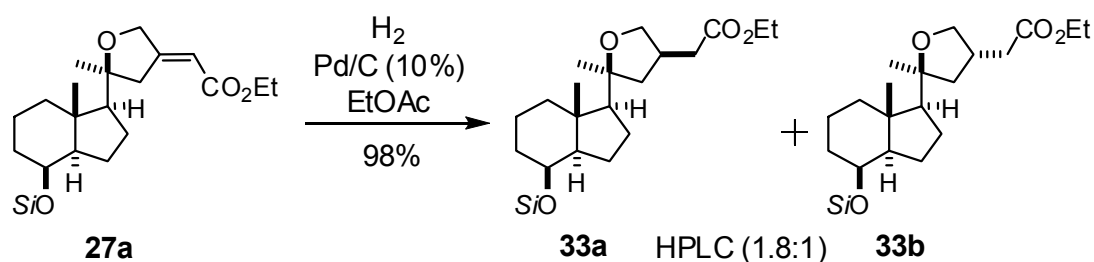
Los primeros estudios se realizaron sobre los dos ésteres una vez separados por HPLC. La hidrogenación catalítica del éster  $\alpha,\beta$ -insaturado **27b**, en presencia del catalizador de Willkinson, condujo a una mezcla equimolecular de los dos respectivos ésteres saturados **33a** y **33b** en un 74% de rendimiento. La hidrogenación del éster **27a**, bajo las mismas condiciones, condujo a una mezcla compleja de compuestos no identificada (Esquema 50).

La hidrogenación del éster **27a** en presencia de cantidades catalíticas de Pd/C (10%), proporcionó una mezcla (1.8:1,  $^1\text{H-RMN}$ ) de los ésteres saturados **33a** y **33b** en un rendimiento del 98%.

La pobre estereoselectividad observada en las hidrogenaciones nos llevó a estudiar la adición asimétrica de hidruros catalizada por metales (Esquema 51)

Esquema 50: Hidrogenación de los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados.

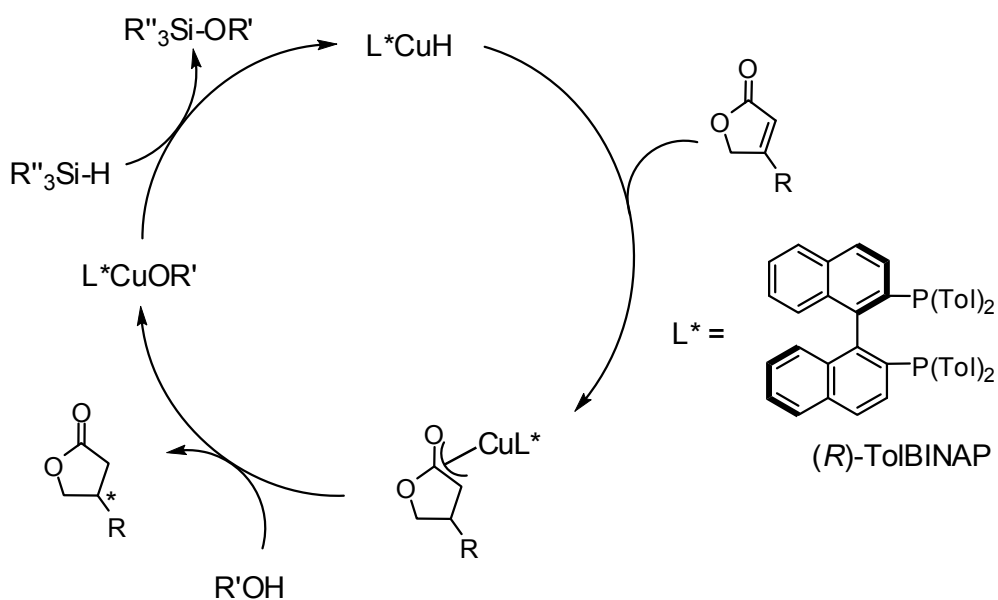




#### 6.4. Reducción catalítica enantioselectiva de sistemas conjugados.

La reducción asimétrica de los ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados utilizando la metodología de Buchwald<sup>195</sup> [un catalizador de Cu(I) complejado con tol-BINAP y PMHS (polimetilhidrosiloxano) como fuente de hidruro] proporcionó buenos resultados. La reacción se llevó a cabo en presencia de una cantidad catalítica de isobutanol. Los ésteres resultantes se metilaron con MeLi en THF, proporcionando los ésteres saturados **33a** y **33b** en buen rendimiento y elevado grado de diastereoselectividad.

Esquema 51: Mecanismo propuesto por Buchwald para la reducción catalizada por cobre.

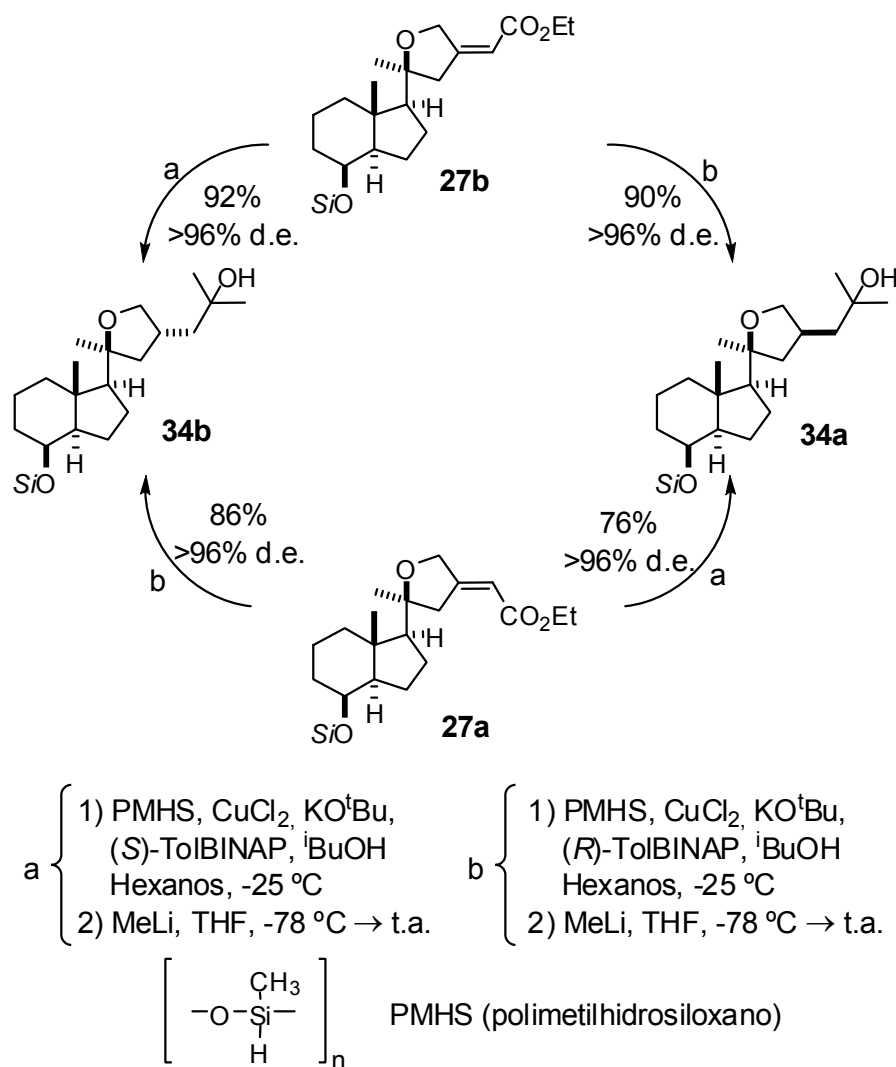


(195) Jurkauskas V, Buchwald SL. Dynamic Kinetic Resolution via Asymmetric Conjugate Reduction: Enantio- and Diastereoselective Synthesis of 2,4-Dialkyl Cyclopentanones. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2892-2893.

La adición de una cantidad catalítica de isobutanol hace que la reacción sea mucho más rápida como sugiere el mecanismo descrito por Buchwald (Esquema 51).<sup>196</sup>

El tratamiento de nuestros ésteres con el catalizador de cobre en presencia de cantidad catalíticas de isobutanol proporcionó los ésteres reducidos, que tratados con MeLi en THF condujo a los compuestos deseados en buen rendimiento y alta estereoselectividad (Esquema 52)

Esquema 52: Hidrogenación asimétrica y metilación de los ésteres resultantes.

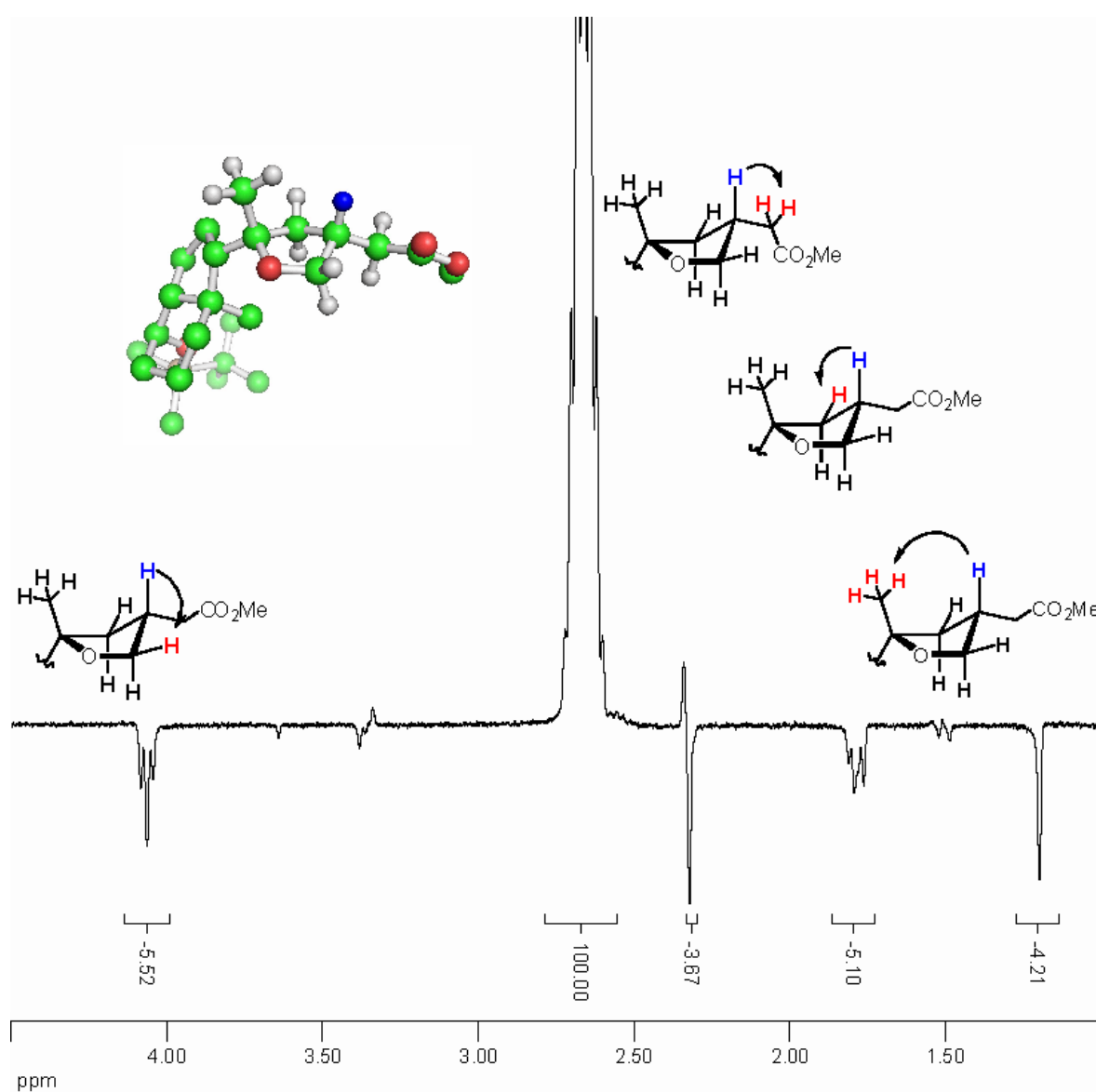


(196) (a) Hughes G, Kimura M, Buchwald SL. Catalytic Enantioselective Conjugate Reduction of Lactones and Lactams. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11253-11258. (b) Lipshutz BH, Papa P. Copper-Catalyzed Reductive Alkylations of Enones: A Novel Transmetalation Protocol. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4355-4594.

En un experimento se detuvo la reacción mediante la adición de MeOH. El contacto prolongado del MeOH con los productos de reacción causó la transesterificación parcial ( $\text{RCO}_2\text{Et} \rightarrow \text{RCO}_2\text{Me}$ ). El éster saturado resultante **33c** se utilizó para demostrar la estructura del producto de reacción **33b**.

En la figura 10, el hidrógeno  $\beta$  que se irradia esta en azul. Los hidrógenos que presentan NOE están en rojo justo sobre el pico correspondiente en el espectro. Los demás hidrógenos no se representan para facilitar la visualización.

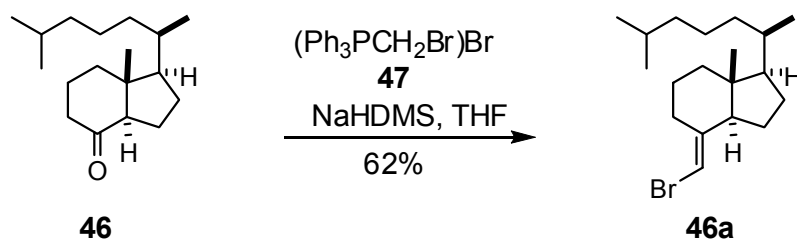
Figura 10: Experimentos con NOE para el éster metílico **33c**.



## 6.5. Acoplamiento

Trost y col.<sup>157</sup> obtuvieron el bromuro **46a** a partir de la cetona de Grudmann (**46**), en 62% de rendimiento. En nuestro laboratorio no se superaron rendimientos del 50% (Esquema 53).

Esquema 53: *Preparación del bromuro vinílico según Trost.*

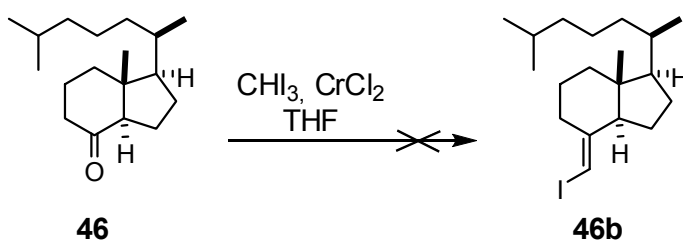


Para superar esta limitación, buscamos formas alternativas de preparar el halogenuro vinílico **46a**.

## 6.5.1. Intentos de haloolefinación de cetonas.

Inicialmente usamos el método de Takai<sup>198</sup> que emplea cromo en bajo estado de oxidación y yodoformo. La inestabilidad del yoduro vinílico **46b** puede ser la causa de que esta reacción no haya producido el éxito deseado (Esquema 54).

Esquema 54: *Intento de preparación del yoduro vinílico.*

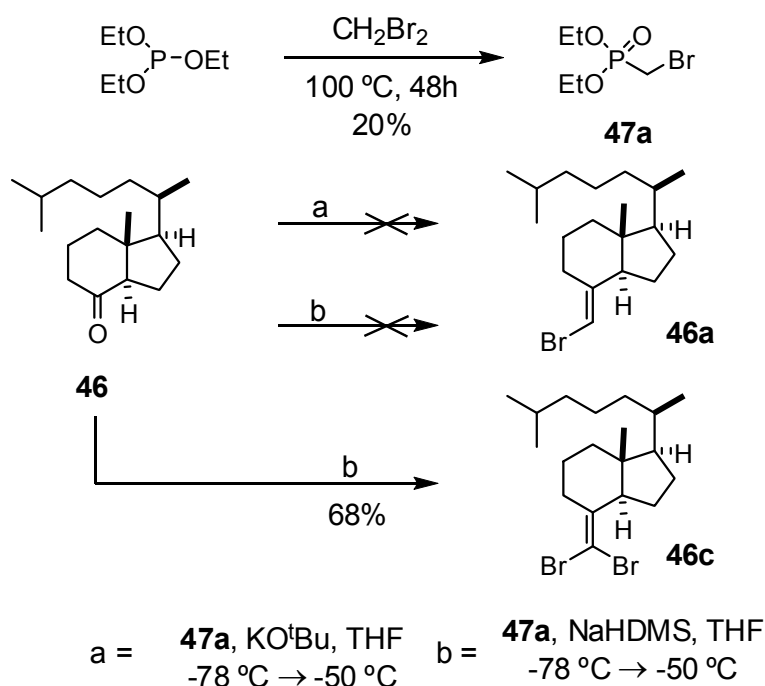


(157) Trost BM, Dumas J, Villa M. New strategies for the synthesis of vitamin D metabolites via palladium-catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9836-9845.

(198) Takai K, Nitta K, Utimoto K. Simple and selective method for aldehydes (RCHO) to (E)-haloalkenes (RCH:CHX) conversion by means of a haloform-chromous chloride system. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*; 7408-7410.

Pensamos también que el uso de un reactivo de fósforo distinto pudiera dar mejores resultados, por lo que preparamos el bromometilfosfonato **47a**.<sup>199</sup> Con este nuevo reactivo, ensayamos la reacción utilizando bases y temperaturas distintas. El tratamiento de la cetona **46** con el iluro formado por reacción de **47a** con KO<sup>t</sup>Bu en THF no condujo al producto esperado. Cuando se utilizó como base el NaHDMS en THF se obtuvo, sorprendentemente, el dibromuro **46c** en buen rendimiento (Esquema 55).

Esquema 55: *Intento de preparación del bromuro vinílico vía química de fosfonatos.*

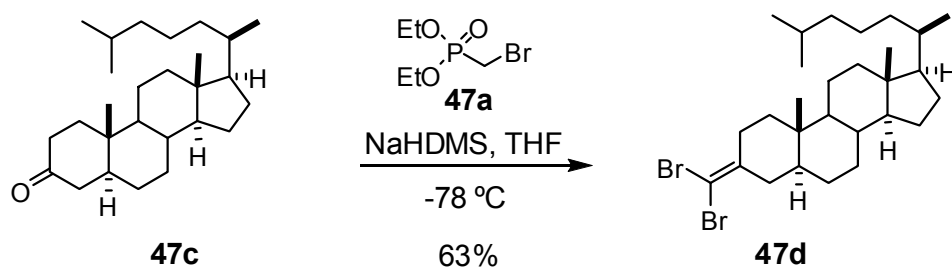


El dibromuro vinílico **46c** obtenido bajo estas condiciones, es un resultado inesperado ya que, normalmente, este tipo de compuestos se forman utilizando CBr<sub>4</sub> y Ph<sub>3</sub>P. Para examinar el alcance y la generalidad de la reacción, tratamos el esteroide **47c** con los mismos reactivos y las condiciones utilizadas para la cetona de Grudmann, obteniéndose el dibromuro esperado **47d** (Esquema 56). Posteriormente revisamos la bibliografía y constatamos que este método ya era conocido.<sup>200</sup>

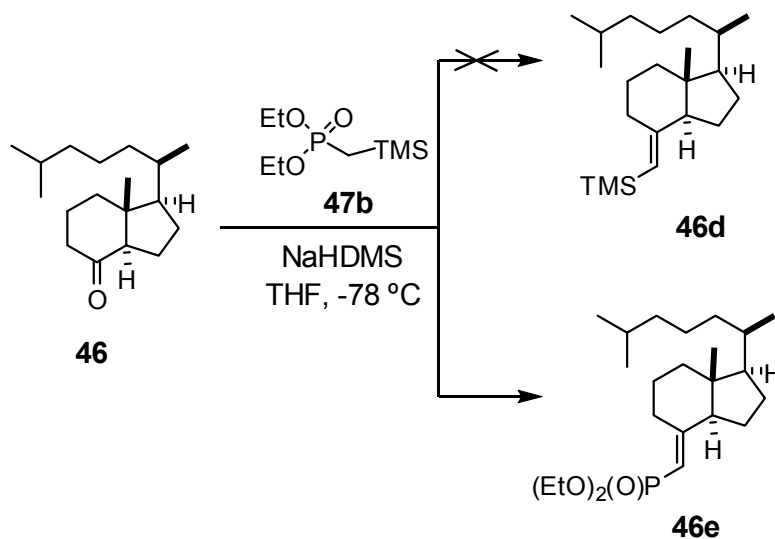
(199) Balczewski P, Mikolajczyk M. Phosphorus containing radicals. 1. Free radical reaction of  $\alpha$ -haloalkylphosphonates with alkenes and alkynes: a new approach to modified phosphonates. *Synthesis* **1995**, 4, 392-396.

(200) Savignac P, Coutrot P. Preparation of 1,1-dibromoalkenes by halogen exchange. *Synthesis* **1976**, 3, 197-199.

Esquema 56: Preparación del dibromuro vinílico de la colestanona.



En un intento por obtener el vinilsilano **46d**, fácilmente convertible en el correspondiente yoduro, tratamos la cetona de Grudmann **46**, con el iluro procedente del fosfonato **47b** de acuerdo con procedimientos conocidos.<sup>201</sup> En este caso se obtuvo el subproducto **46e** (Esquema 57).

Esquema 57: Intento de preparación del silano vinílico **46d**.

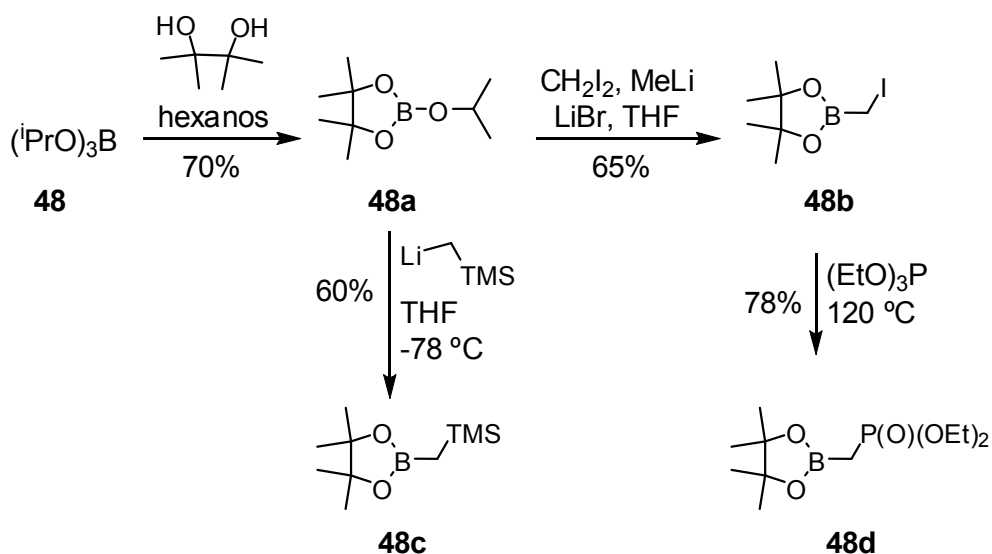
### 6.5.2. Intentos de formación de alquénilboranos.

Como alternativa al problema de la preparación del bromuro vinílico **46a**, se consideró la posibilidad de formar alquénilboranos para una ulterior utilización en acoplamientos de tipo Suzuki (Esquemas 58 y 59).<sup>202</sup>

(201) Porskamp PAT, Lammerink Ben HM, Zwanenburg B. Synthesis and Reactions of Phosphoryl-Substituted Sulfines. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 263-268.

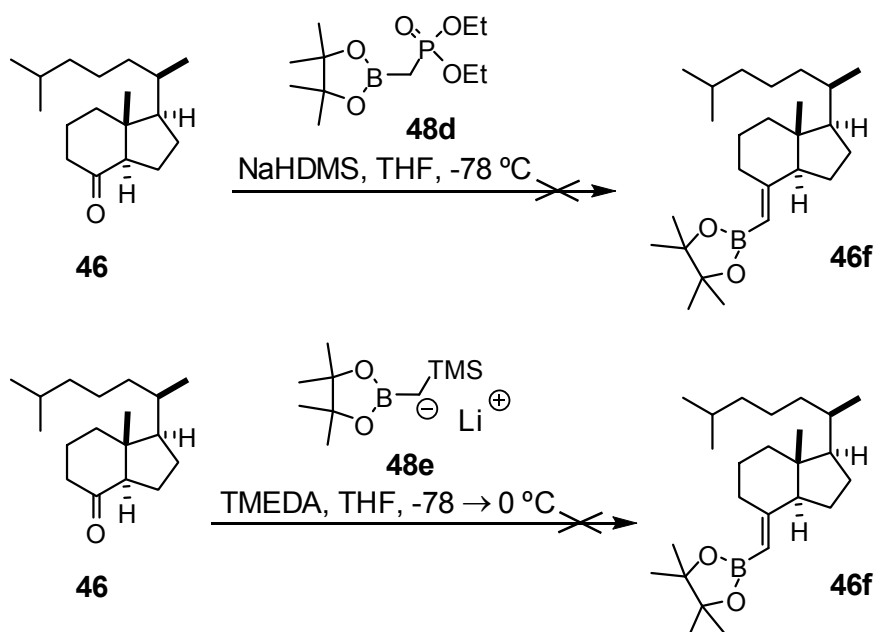
(202) (a) Andersen MW, Hildebrandt B, Köster G, Hoffmann RW. Stereoselective synthesis of alcohols, XXX: E- and Z-pentenylboronates, reagents for simple diastereoselection on addition to aldehydes. *Chem. Ber.* **1989**, *122*, 1777-1782. (b) Wallace RH, William B. The in situ generation and use of

Esquema 58: Preparación de los reactivos de boro.



Los intentos para obtener los alquenilboranos de acuerdo al esquema 59 resultaron infructuosos.<sup>203</sup>

Esquema 59: Planteamiento de síntesis de alquenilboranos.



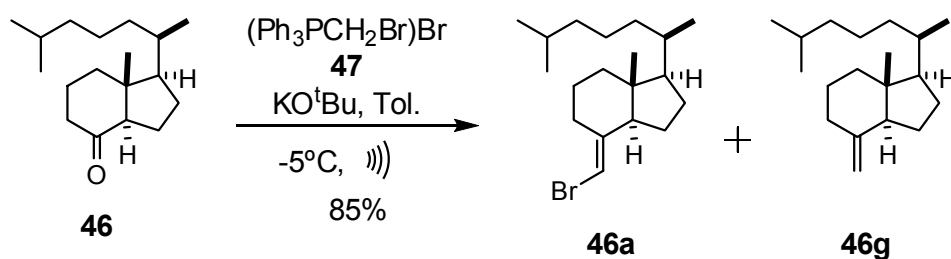
iodomethyl lithium for the one-carbon homologation of boronic esters and epoxide formation from carbonyl compounds. *Synth. Comm.* **1995**, *25*, 127-33. (c) Pergament I, Srebnik M. Arbusov reaction of 1-iodoboronates as a means of preparing C1-bridged phosphonoboronates. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3895-3898.

6.5.3. Preparación eficiente del bromuro alquenílico **46a**.

Después de todos los inconvenientes observados por lograr el objetivo de preparar eficientemente el bromuro alquenílico **46a** o un derivado alquenílico similar, decidimos centrarnos en el procedimiento clásico de Trost con el fin de mejorarlo.

Las pruebas de solubilidad indican que la sal de fósforo **47** [(Ph<sub>3</sub>PCH<sub>2</sub>Br)Br] es insoluble en la mayoría de los disolventes comunes utilizados, lo que origina heterogeneidad en el medio de reacción. Se decidió, por lo tanto, pulverizar la sal lo mejor posible vía ultrasonidos inmediatamente antes de preparar el iluro. El rendimiento de la reacción mejoró con esto cambio. La temperatura también resultó importante. Los mejores resultados se obtuvieron a -5 °C utilizando 2 h para la formación del iluro y más de 2 h a misma temperatura para la bromolefinación.

Como subproducto de la reacción de Trost se aisló la olefina **46g**, y no el bromuro alquenílico *Z* como apuntan los autores (Esquema 60).<sup>157</sup> La formación de esta olefina podría provenir del correspondiente fosforano desbromado (Ph<sub>3</sub>P=CH<sub>2</sub>) que acompaña la sal desde su preparación. Para minimizar la formación de la olefina **46g** y mejorar el rendimiento del proceso, se lavó la sal **47** con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco con el fin de eliminar posibles impurezas. Bajo estas condiciones, se obtiene de modo reproducible el bromuro **46a** con rendimiento del 85%.

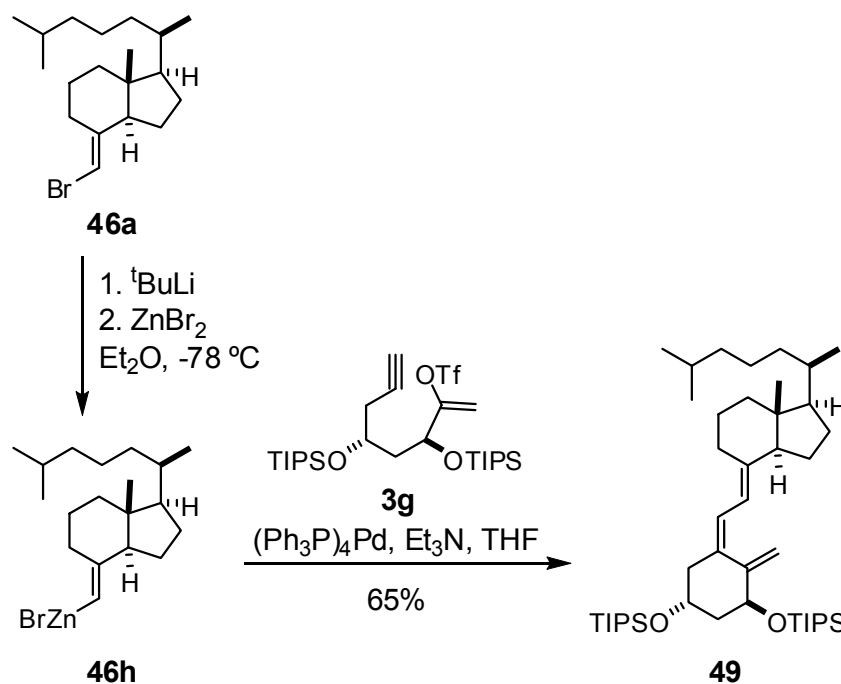
Esquema 60: Preparación del bromuro vinílico **46a**.

(203) Matteson DS, Majumdar D. alpha-Trimethylsilyl boronic esters. Pinacol lithio (trimethylsilyl) methaneboronate, homologation of boronic esters with [chloro(trimethylsilyl)methyl] lithium, and comparisons with some phosphorus and sulfur analogs. *Organometallics* **1983**, 2, 230-236.

(157) Trost BM, Dumas J, Villa M. New strategies for the synthesis of vitamin D metabolites via palladium-catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9836-9845.

Para ensayar la formación del sistema triénico vitamínico en base al plan propuesto (Esquema 40), utilizamos el bromuro **46a** que es más accesible (Esquema 61). El acoplamiento catalizado por Pd(0) entre el enol triflato **3g** y el organometálico de Zn **46h** siguiendo procedimientos de estos laboratorios,<sup>158</sup> condujo al producto deseado **49** en un rendimiento del 65% (Esquema 61).

Esquema 61: Acoplamiento entre el organometálico de zinc **46h** y el enoltriflato **3g**.



El acoplamiento entre **3g** y **37** (Esquema 40) será objeto de futuros trabajos en estos laboratorios.

(158) Gómez-Reino C, Vitale C, Maestro M, Mouriño A. Pd-Catalyzed Carbocyclization-Negishi Cross-Coupling Cascade: A Novel Approach to 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Analogues. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5885-5887.



**TRABAJO**  
**EXPERIMENTAL**



## 1. Materiales y métodos generales

Todas las reacciones que conllevan compuestos sensibles a la humedad u oxígeno se realizaron bajo una atmósfera de Ar seco. El material de vidrio y jeringas se secaron en la estufa a 100 °C durante 24 h y se purgaron bajo argon hasta alcanzar la t.a.

Todos los disolventes secos se destilaron bajo Ar inmediatamente antes de su uso. El tetrahidrofurano (THF), Et<sub>2</sub>O, tolueno, benceno y dioxano se destilaron de Na utilizando benzofenona como indicador. El diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y el tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) se destilaron de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Los compuestos nitrogenados, acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), <sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>NH, Et<sub>3</sub>N, <sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>NEt y Py se destilaron de CaH<sub>2</sub>. La dimetilformamida (DMF) se secó con moléculas sieve 4Å.

Las jeringas utilizadas fueron de plástico (Discardit) y de teflón (Hamilton), con agujas Llorach-Luer. Las adiciones de disoluciones y disolvente se llevaron a cabo vía jeringa o cánula.

Para las reacciones a baja temperatura se utilizaron baños de hielo seco con acetona, metanol o baños enfriados con una sonda de refrigeración CRYOCOOL-Inmersion Cooler, CC-8011 de NESLAB, provisto de un controlador de temperatura. Para reacciones a alta temperatura se utilizaron baños de silicona provistos de termómetro de contacto en el baño. Todas las temperaturas indicadas se refieren al baño externo.

Los extractos orgánicos se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, que se eliminó por filtración. Las disoluciones resultantes se concentraron utilizando un rotavapor a presión reducida (20-30 mmHg). Las reacciones se siguieron por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando capa de gel de sílice Merck 60 de 0.2 mm de grosor, en forma de cromatofolios de aluminio. Los cromatogramas se visualizaron, primero con la luz ultravioleta (254 nm) y luego por inmersión en una disolución disoluciones reveladoras. Estas disoluciones son: (a) una disolución de fosfomolídico (5%) en MeOH, (b) una disolución de p-anisaldehído (2.5%), HOAc (1%) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3.4%) en EtOH del 95% y (c) ninhidrina (2%) en EtOH.

Las disoluciones comerciales de  $n\text{BuLi}$ ,  $n\text{HexLi}$ ,  $\text{MeLi}$  y  $\text{MeMgBr}$  se valoraron antes de usarlas. El KH (60% en peso, Aldrich) se purificó mediante lavados con hexano seco y se almacenó en atmósfera de argón.

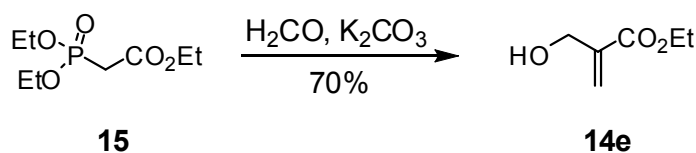
Para todas las cromatografías en columna a presión (cromatografía rápida) se utilizó gel de sílice Merck 60 (malla de 230-400 mesh), y como disolvente la mezcla indicada en cada procedimiento. Los disolventes (hexanos, EtOAc y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) proceden de DROGAS VIGO son a granel y destilados previamente a su uso.

Los espectros de RMN se registraron en espectrómetros BRUKER WM-250 (250.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 62.89 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), AMX-300 (300.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 75.47 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) y AMX-500 (500.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 125.76 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Para los espectros de RMN se empleó como disolvente  $\text{CDCl}_3$ . Los desplazamientos químicos están expresados en unidades  $\delta$  (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hz.

Los espectros de IR se realizaron en película sobre NaCl o en una pastilla de KBr, registrándose en un espectrofotómetro MIDAC PRS 124. Los espectros de masas de baja resolución se registraron en un espectrómetro Kratos MS-50, Kratos Concept 32 o en un Hewlett Packard 59970-MS, empleando impacto electrónico (75 eV), y los de alta resolución en un Kratos MS-50 o un Kratos Concept 1S.

Las separaciones por HPLC se realizaron en columna Fenomenex 00G-4274-N0 de 250x10.00 mm con relleno de sílice (2) s/n° 116830-1 de 5  $\mu$  en luna. Las mezclas fueron aplicadas disueltas en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (250  $\mu\text{L}$ ). Se utilizó una mezcla de 10%  $\text{Et}_2\text{O}$ /hexanos como eluyente a un flujo de 20 mL/min.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Büchi y no están corregidos.

**2-Hidroximetil-acrilato de etilo (14e).**

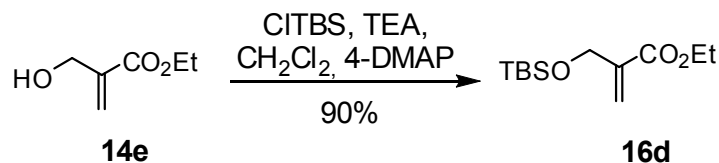
En un matraz de fondo redondo se introdujo el fosfonato **15** (6.75 g, 30.1 mmol) y una disolución acuosa de formaldehído (37%, 12 mL, 140 mmol). A la mezcla anterior en agitación magnética se adicionó, vía cánula y gota a gota, una disolución saturada de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (10 mL, 55.7 mmol) durante 30 min. La mezcla de reacción se enfrió mediante un baño de hielo para evitar que la temperatura excediese de 50 °C. Se formó una bifase que se agitó durante 1 h. A continuación se añadió una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mL) y  $\text{Et}_2\text{O}$  (50 mL). La mezcla se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x50 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por columna rápida ( $\text{SiO}_2$ , 2x5 cm, 20%  $\text{EtOAc}$ /hexanos) para dar **14e**<sup>177</sup> [2.7 g, 70%,  $R_f=0.3$  (30%  $\text{EtOAc}$ /hexanos), aceite incoloro].

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 6.17 (s, 1H,  $\underline{\text{H}}\text{C}=\text{}$ ), 5.80-5.75 (m, 1H,  $\underline{\text{H}}\text{C}=\text{}$ ), 4.24 (d,  $J=0.92$  Hz, 2H,  $\underline{\text{H}}_2\text{C-OH}$ ), 4.15 (q,  $J=7.13$  Hz, 2H,  $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_3$ ), 3.26-3.05 (m, 1H,  $-\text{O}\underline{\text{H}}$ ), 1.23 (t,  $J=7.13$  Hz, 3H,  $-\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 166.71 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 140.07 ( $\underline{\text{C}}=\text{CH}_2$ ), 125.55 ( $\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 62.26 ( $\text{O-CH}_2$ ), 61.19 ( $\text{O-CH}_2$ ), 14.47 ( $\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$ )

**MS** [ $m/z$ , (%): 54.95 (100.0), 55.95 (48.28), 56.95 (45.09), 72.95 (26.72), 82.95 (28.19), 83.95 (23.28), 84.95 (72.79), 85.95 (8.69), 101.05 (50.13), 102.05 (16.85), 113.05 (7.07), 128.95 (4.72), **130.95** (9.05).

(177) Villieras J, Rambaud M. Wittig-Horner Reaction in heterogeneous media; an easy synthesis of ethyl  $\alpha$ -hydroxymethylacrylate and ethyl  $\alpha$ -halomethylacrylates using formaldehyde in water. *Synthesis* **1982**, 1982, 924-926.

**2-[(*tert*-Butildimetilsililoxi)-metil]-acrilato de etilo (16d).**

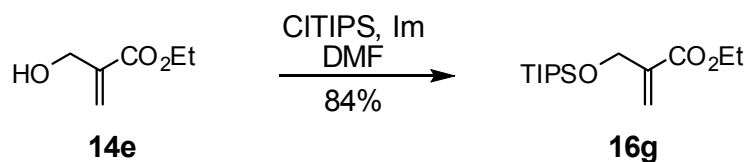
Disoluciones de CITBS (2.82 g, 18.71 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (20 mL) y el alcohol **14e** (2.05 g, 15.75 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (5 mL) se añadieron sucesivamente vía jeringa sobre una disolución previamente enfriada a 0 °C y en agitación de 4-DMAP (0.2 g, 1.64 mmol) y Et<sub>3</sub>N seca (4.4 mL, 31.62 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). Se observó la formación de un precipitado blanco. Al cabo de 1 h se retiró el baño de agua-hielo y la mezcla se dejó en agitación magnética durante 5 h. La mezcla se filtró directamente a un embudo de decantación que contenía HCl (30 mL, 10%) y hielo picado (30 mL) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL). La fase orgánica se lavó sucesivamente con disoluciones saturadas de NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) y NaCl (50 mL), secó, filtró y concentró. La cromatografía rápida (SiO<sub>2</sub>, 5x5 cm, 10% Et<sub>2</sub>O-hexanos) proporcionó **16d**<sup>207</sup> [3.5 g, 90%, R<sub>f</sub>=0.8 (20% EtOAc/hexanos), aceite incoloro].

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 6.25 (q, J=1.92 Hz, 1H, =CH), 5.89 (q, J=2.08 Hz, 1H, =CH), 4.36 (t, J=2.05 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-OTBS), 4.21 (q, J=7.13 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.30 (t, J=7.13 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.92 (s, 9H, TBS), 0.08 (s, 6H, TBS).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 165.48 (O=C), 139.73 (H<sub>2</sub>C=C), 123.12 (H<sub>2</sub>C=C), 61.27 (O-CH<sub>2</sub>), 60.13 (O-CH<sub>2</sub>), 25.55 (SiC-CH<sub>3</sub>), 18.08 (SiC-CH<sub>3</sub>), 13.97 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -5.71 (SiCH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 54.95 (6.15), 56.95 (60.91), 72.95 (19.12), 74.95 (95.11), 82.95 (10.06), 83.95 (1.36), 84.95 (6.61), 98.95 (22.60), 118.95 (1.30), 142.90 (7.16), 158.90 (100.00), 159.90 (10.02), 186.90 (78.39), 187.90 (9.41), 188.90 (5.32), 216.90 (3.36).

(207) Danishefsky SJ, Mantlo N. Total synthesis of (±)-heptelidic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8129-8133.

**2-[(Triisopropilsililoxi)-metil]- acrilato de etilo (16g).**

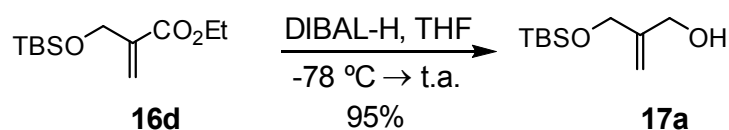
Disoluciones de CITIPS (20 g, 104 mmol) y el alcohol **14e** (7.7 g, 59 mmol) en DMF seca (5 mL) se añadieron sucesivamente vía jeringa sobre una disolución previamente enfriada a 0 °C y en agitación de Im (20.14 g, 296 mmol) en DMF seca (60 mL). Se observó la formación de una disolución amarilla. Al cabo de 1 h se retiró el baño de agua-hielo y la mezcla se dejó en agitación magnética durante 5 h. Después de enfriar a 0 °C se añadió una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (150 mL). La mezcla se filtró en placa filtrante n° 4. El residuo se lavó con hexanos (3x50 mL). El filtrado se extrajo con hexanos (3x150 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó en columna rápida (SiO<sub>2</sub>, 2x5 cm, 20% EtOAc/hexanos) para dar **16g**<sup>208</sup> [14.23 g, 84%, R<sub>f</sub>=0.8 (20% EtOAc/hexanos), aceite incoloro].

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 6.26 (q, J=2.05 Hz, 1H, HC=), 5.97 (q, J=2.16, 1H, HC=), 4.44 (t, J=2.14 Hz, 1H, SiO-CH<sub>2</sub>), 4.20 (q, J=7.13 Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.29 (t, J=7.13 Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.06 (m, 21H, TIPS).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 165.90 (O=C), 139.87 (C=CH<sub>2</sub>), 123.36 (C=CH<sub>2</sub>), 61.61 (O-CH<sub>2</sub>), 60.42 (O-CH<sub>2</sub>), 17.93 (Si-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.15 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 11.93 (Si-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 61.00 (30.25), 75.00 (42.21), 99.00 (10.21), 103.00 (30.20), 131.00 (37.98), 157.15 (18.51), 173.00 (18.50), 215.15 (43.56), 241.15 (36.77), 243.15 (100.00), 244.15 (18.98), 245.10 (5.79), **287.20** (18.10), 288.15 (3.99).

(208) Bassetti M, D'Annibale A, Fanfoni A, Minissi F. Synthesis of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated 4,5-Disubstituted  $\gamma$ -Lactones via Ring-Closing Metathesis Catalyzed by the First-Generation Grubbs' Catalyst. *Org. Lett.* **2005**, 7, 1805-1808.

**2-[(*tert*-Butildimetilsililoxi)-metil]-2-propen-1-ol (17a).**

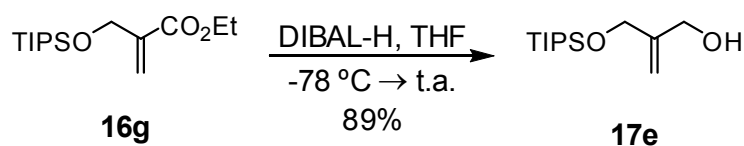
Una disolución de DIBAL-H en hexano (50 mL, 50 mmol, 1M) se añadió vía jeringa sobre una disolución en agitación y enfriada a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  de **16d** (5.72 g, 23.40 mmol) en THF seco (50 mL). Se retiró el baño y la mezcla se agitó durante 12 h. Después de enfriar a  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  se añadió lentamente una disolución KOH (120 mL, 6.5 M). Se retiró el baño y la mezcla se agitó durante 2 h y luego se transfirió a un embudo de decantación. La fase acuosa se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x200 mL). La fase orgánica combinada se lavó con HCl (37%, 70 mL) en hielo picado (~130 mL) y se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida ( $\text{SiO}_2$ , 5.5x10 cm, 20%  $\text{Et}_2\text{O}$ -hexanos) para dar **17a**<sup>209</sup> [4.57 g, 95%,  $R_f=0.5$  (20%  $\text{EtOAc}$ /hexanos), aceite incoloro].

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 5.07 (d,  $J=2.50$  Hz, 2H,  $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$ ), 4.22 (s, 2H, O- $\text{CH}_2$ ), 4.14 (s, 2H, O- $\text{CH}_2$ ), 0.89 (s, 9H, TBS), 0.07 (s, 6H, TBS).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 147.39 ( $\text{H}_2\text{C}=\underline{\text{C}}$ ), 110.94 ( $\text{H}_2\underline{\text{C}}=\text{C}$ ), 64.96 ( $\text{H}_2\text{C-O}$ ), 64.44 ( $\text{H}_2\text{C-O}$ ), 25.81 ( $\text{H}_3\text{C-TBS}$ ), 18.25 (C-TBS), -5.48 ( $\text{H}_3\text{C-Si-CH}_3$ ).

**MS** [ $m/z$ , (%): 75.00 (52.88), 77.00 (9.28), 99.00 (2.46), 105.00 (100.00), 106.00 (9.53), 117.00 (10.57), 127.10 (10.01), 131.10 (2.12), 145.00 (88.12), 146.00 (11.38), 147.15 (0.69).

(209) Sascha B, Hans-Dieter G, Stefanie D, Wibke DE. Facile synthesis of substituted 2,3,4,7-tetrahydro-1H-azepines via ring-closing metathesis. *Tetrahedron* **2006**, 62, 1777-1786.

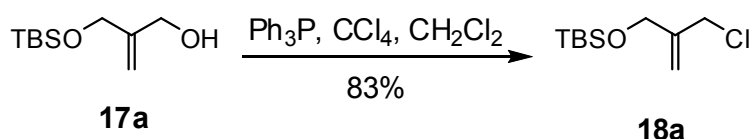
**2-[(Triisopropilsililoxi)-metil]-2-propen-1-ol (17e).**

Una disolución de DIBAL-H en hexanos (100 mL, 100 mmol, 1M) se añadió, vía jeringa, sobre una disolución en agitación de **16g** (13.2 g, 46.1 mmol) en THF seco (80 mL) a -78 °C. La mezcla se agitó sin baño durante 6 h. Después de enfriar a -15 °C, se añadió lentamente una disolución saturada de NaOH (50 mL). La mezcla se agitó sin baño durante 2 h y luego se transfirió a un embudo de decantación. La fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3x200 mL). La fase orgánica combinada se lavó con una mezcla de HCl (37%, 70 mL) y hielo picado (~130 mL) y luego se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida (SiO<sub>2</sub>, 5.5x12 cm, 20% Et<sub>2</sub>O-hexanos) para dar **17e**<sup>208</sup> [10 g, 89%, Rf=0.5 (20% EtOAc/hexanos), aceite incoloro].

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.09 (dd, J=11.35, 1.36 Hz, 2H, H<sub>2</sub>C=C), 4.32 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 4.16 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 2.35 (s, 1H, -OH), 1.07 (m, 21H, TIPS).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 147.41 (H<sub>2</sub>C=C), 110.78 (H<sub>2</sub>C=C), 65.39 (O-CH<sub>2</sub>), 64.66 (O-CH<sub>2</sub>), 17.91 (CH<sub>3</sub>, TIPS), 11.86 (Si-CH).

**MS** [m/z, (%): 60.95 (49.71), 62.95 (12.50), 69.00 (4.89), 75.00 (53.62), 77.00 (100.00), 77.95 (6.90), 103.00 (17.56), 105.00 (30.71), 115.00 (12.26), 119.00 (5.59), 131.05 (10.06), 141.00 (3.92), 145.00 (4.80), 159.05 (46.40), 160.00 (6.26), 201.15 (2.62).

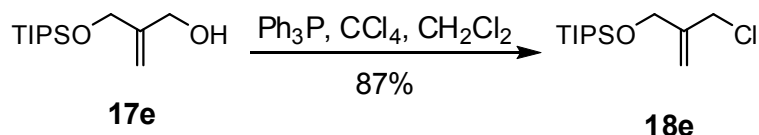
**2-Clorometil-2-propen-1-ol *terc*-butildimetilsilil éter (18a).**

MeCN (4.5 mL) y  $\text{Ph}_3\text{P}$  (7.3 g, 27.83 mmol) se añadieron sucesivamente sobre **17a** (4.5 g, 18.41 mmol). Se formó una suspensión blanca. Se añadió  $\text{CCl}_4$  seco (4.75 g, 30.88 mmol). La mezcla se agitó durante 70 min. La mezcla amarillenta se purificó por cromatografía rápida en columna ( $\text{SiO}_2$ , 3.5x18 cm, pentano) para dar **18a**<sup>210</sup> [4.02 g, 83%,  $R_f=0.8$  (2%  $\text{Et}_2\text{O}$ /hexanos), aceite incoloro].

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 5.22 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$ ), 4.24 (s, 2H, O- $\text{CH}_2$ ), 4.09 (s, 2H, O- $\text{CH}_2$ ), 0.92 (s, 9H, TBS), 0.09 (s, 6H, TBS).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 144.52 ( $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$ ), 114.33 ( $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$ ), 63.33 ( $\text{H}_2\text{C-O}$ ), 44.97 ( $\text{H}_2\text{C-Cl}$ ), 25.85 ( $\text{CH}_3$ , TBS), 18.31 (C, TBS), -5.45 ( $\text{H}_3\text{C-Si-CH}_2$ ).

**MS** [m/z, (%): 53.00 (7.31), 57.00 (23.49), 73.00 (21.48), 75.00 (14.64), 93.00 (100.00), 94.00 (8.98), 95.00 (55.27), 97.00 (9.38), 113.00 (8.35), 123.00 (94.29), 124.00 (8.48), 125.00 (35.20), 127.00 (33.44), 135.00 (5.36), 149.00 (7.80), 163.00 (74.39), 164.00 (10.07), 165.00 (28.84), 166.00 (3.76), 251.15 (3.28).

**2-Clorometil-2-propen-1-ol triisopropilsilil éter (18e).**

En un tubo de reacción se introdujo **17e** (1.025 g, 4.2 mmol). Se añadió MeCN seco (1 mL) y  $\text{Ph}_3\text{P}$  (1.67 g, 6.35 mmol). Sobre la suspensión blanca formada se añadió  $\text{CCl}_4$  seco (1.06 g, 6.89 mmol). La mezcla se agitó durante 45 min. La coloración cambió de incolora a amarillo claro y luego oscuro. El residuo

(210) Fürstner TA, Krause H. Flexible Synthesis of Metacycloprodigosin and Functional Derivatives *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8281-8286.

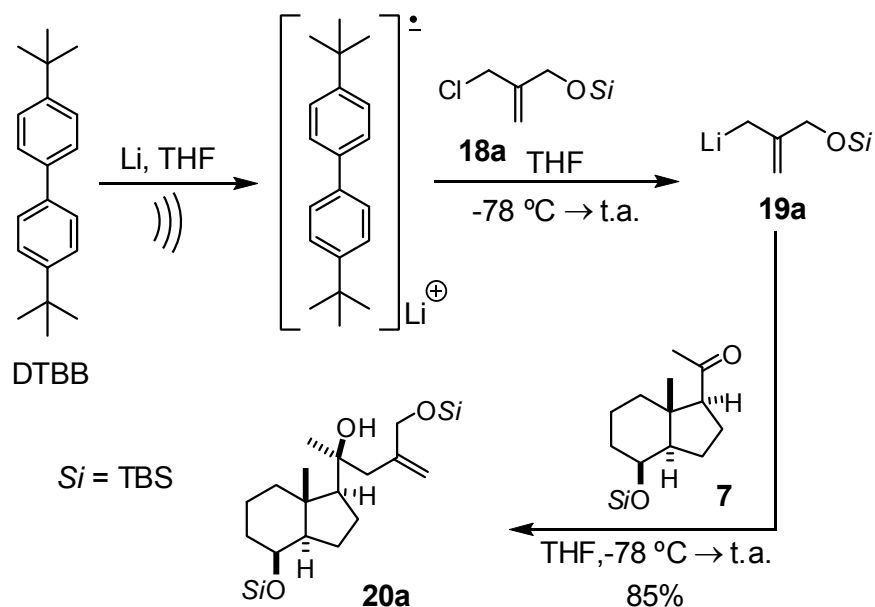
resultante se purificó directamente por cromatografía rápida ( $\text{SiO}_2$ , 3x6 cm, pentano) para dar **18e**<sup>211</sup> [0.96 g, 87%,  $R_f=0.8$  (2%  $\text{Et}_2\text{O}$ /hexanos), aceite incoloro].

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.28 (q,  $J=1.50$  Hz, 1H, HC=), 5.22 (q,  $J=1.02$  Hz, 1H, HC=), 4.33 (s, 2H,  $\text{H}_2\text{C-O}$ ), 4.11 (s, 2H,  $\text{H}_2\text{C-O}$ ), 1.08 (m, 21H, TIPS).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 144.57 ( $\text{H}_2\text{C}=\underline{\text{C}}$ ), 114.03 ( $\text{H}_2\underline{\text{C}}=\text{C}$ ), 63.58 ( $\text{H}_2\text{C-O}$ ), 45.06 ( $\text{H}_2\text{C-Cl}$ ), 17.95 ( $\text{CH}_3$ , TIPS), 11.96 ( $\text{CH}$ , TIPS)

**MS** [ $m/z$ , (%): 53.00 (24.15), 55.00 (82.65), 59.00 (35.50), 61.00 (19.26), 73.00 (27.89), 75.00 (28.06), 87.00 (34.93), 93.00 (37.38), 94.00 (15.91), 95.00 (92.76), 97.00 (38.93), 113.00 (43.08), 115.15 (63.31), 119.00 (44.27), 123.00 (38.38), 125.00 (13.60), 133.00 (43.25), 135.00 (18.81), 145.15 (31.58), 157.15 (57.84), 177.05 (100.00), 179.00 (35.89).

**(S)-4-(*terc*-Butildimetilsililoxi)-2-[(3*S*,3*aS*,7*S*,7*aR*)-octahidro-7-(*terc*-butildimetilsililoxi)-3*a*-metil-1*H*-inden-3-il]pent-4-en-2-ol (**20a**)**



En un mortero con pentano se sumergió hilo de litio (0.33 g, 47.55 mmol) que se machacó hasta obtener una cinta fina que se troceó con ayuda de unas tijeras

(211) Crimmins MT, Brown BH, Plake HR. An Intramolecular Diels-Alder Approach to the Eunicellins: Enantioselective Total Syntheses of Ophirin B and Astrogorgin. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1371-1378.

directamente sobre un tubo de reacción provisto de barra magnética y una disolución de naftaleno (0.4 g, 3.12 mmol) en THF seco (20 mL). La mezcla se sometió a la acción de ultrasonidos durante 15 min. Se retiró la disolución verde oscura resultante vía jeringa. Se añadió una nueva disolución de 4,4'-di-*tert*-butil-bifenilo (DTBB, 1.3 g, 4.88 mmol) en THF seco (40 mL). La mezcla resultante se sometió a la acción de ultrasonidos durante 40 min. El tubo de reacción se sumergió en un baño de CO<sub>2</sub>-acetona. A continuación se añadió vía cánula y lentamente (10 min) una disolución del cloruro **18a** secado con moléculas sieve 4Å (0.7 g, 2.25 mmol) y la cetona **7** (2.9 g, 11.36 mmol) en THF seco (15 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 15 min. La reacción se detuvo por adición de MeOH (1 mL). La mezcla se filtró directamente a un embudo de decantación provisto de una disolución saturada de NaCl (150 mL) y se extrajo con hexanos (3x150 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>, 2.5x11 cm, hexanos) para dar **20a** [1.16 g, 85%, R<sub>f</sub>=0.8 (5% EtOAc/hexanos), aceite incoloro].

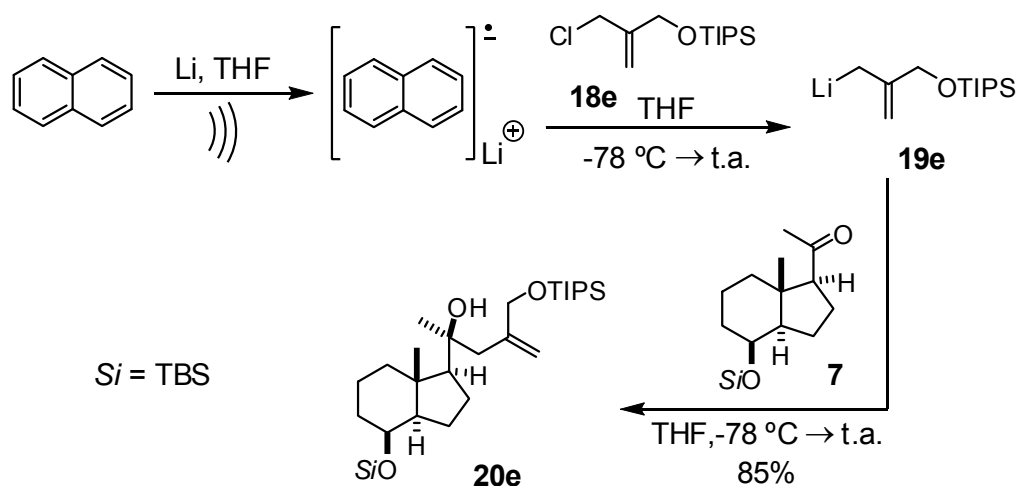
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.16 (s, 1H, =CH), 4.86 (s, 1H, =CH), 4.14 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-OTBS), 4.04 (m, 1H, HC-OTBS), 1.23 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.92 (s, 9H, TBS), 0.88 (s, 9H, TBS), 0.08 (s, 6H, TBS), 0.00 (s, 6H, TBS).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 145.22 (C), 114.33 (CH<sub>2</sub>), 74.26 (C), 69.49 (CH), 67.37 (CH<sub>2</sub>), 60.55 (CH), 53.08 (CH), 47.04 (CH<sub>2</sub>), 43.02 (C), 41.21 (CH<sub>2</sub>), 34.34 (CH<sub>2</sub>), 26.06 (CH<sub>3</sub>), 25.91 (CH<sub>3</sub>), 25.78 (CH<sub>3</sub>), 22.82 (CH<sub>2</sub>), 21.84 (CH<sub>2</sub>), 18.34 (C), 17.99 (C), 17.62 (CH<sub>2</sub>), 15.42 (CH<sub>3</sub>), -4.83 (CH<sub>3</sub>), -5.35 (CH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 75.00 (100.0), 97.00 (41.2), 15.55 (8.5), 129.05 (11.79), 179.15 (8.92), 229.15 (4.92), 311.25 (1.29).

**HRMS**: calculado para [C<sub>28</sub>H<sub>56</sub>NaO<sub>3</sub>Si<sub>2</sub>]<sup>+</sup> [(M+Na)<sup>+</sup>]: 519.3660; encontrado: 519.3660.

**(S)-2-[(1S,3aR,4S,7aS)-4-(terc-Butildimetilsililoxi)-7a-metiloctahidro-1H-inden-1-il]-4-[(trisisopropilsilil)metil]pent-4-en-2-ol (20e)**

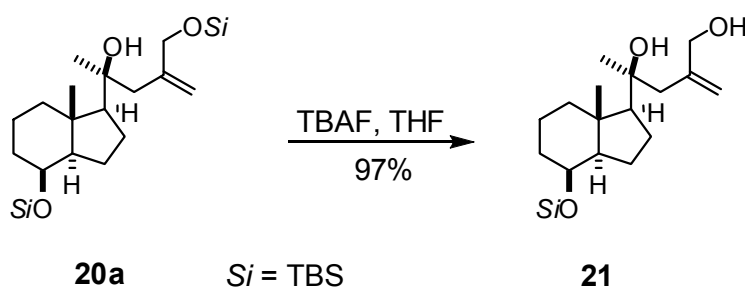


En un mortero con pentano se sumergió hilo de litio (0.29 g, 41.80 mmol) que se machacó hasta obtener una cinta fina que se troceó con unas tijeras directamente sobre un tubo de reacción provisto de barra magnética y una disolución de naftaleno (0.4 g, 3.12 mmol) en THF seco (20 mL). La mezcla se sometió a la acción de ultrasonidos durante 15 min. Se retiró la disolución verde oscura resultante vía jeringa. Se añadió una nueva disolución de naftaleno (1.032 g, 8.05 mmol) en THF seco (40 mL). La mezcla resultante se sometió a la acción de ultrasonidos durante 2 h. El tubo de reacción se sumergió en un baño de CO<sub>2</sub>-acetona. A continuación se añadió vía cánula y lentamente (10 min) una disolución del cloruro **18e** (1.5 g, 4.94 mmol) y la cetona **7** (500 mg, 1.61 mmol) en THF seco (15 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 15 min. La reacción se detuvo por adición de MeOH (1 mL). La mezcla se filtró directamente a un embudo de decantación provisto de una disolución saturada de NaCl (150 mL). La mezcla se extrajo con hexanos (3x150 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>, 5x17 cm, hexanos) para dar **20e** [725 mg, 85%, R<sub>f</sub>=0.8 (5% EtOAc/hexanos), aceite incoloro].

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.21 (s, 1H, HC=), 4.86 (s, 1H, HC=), 4.22 (q, J=13.71 Hz, 2H, TIPSO-CH<sub>2</sub>), 4.01 (m, 1H, TBSO-CH), 1.23 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>21</sub>), 1.11 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 1.07 (d, J=6.20 Hz, 21H, TIPS), 0.88 (s, 9H, TBS), 0.00 (d, J=3.29 Hz, 6H, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 145.36 (H<sub>2</sub>C=C), 113.81 (H<sub>2</sub>C=C), 74.39 (HO-C<sub>20</sub>), 69.52 (HC-OTBS), 67.40 (H<sub>2</sub>C-OTIPS), 60.52 (CH), 53.10 (CH), 46.98 (CH<sub>2</sub>), 43.02 (C), 41.22 (CH<sub>2</sub>), 34.36 (CH<sub>2</sub>), 26.10 (CH<sub>3</sub>), 25.80 (CH<sub>3</sub>), 22.84 (CH<sub>2</sub>), 21.86 (CH<sub>2</sub>), 18.01 (CH<sub>3</sub>), 17.64 (CH<sub>2</sub>), 15.44 (CH<sub>3</sub>), 15.44 (C), 11.98 (CH), -4.98 (d, J=43.62 Hz, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>)

**(S)-4-[(3S,3aS,7S,7aR)-Octahidro-7-(terc-butildimetilsililoxi)-3a-metil-1H-inden-3-il]-2-metilenepentane-1,4-diol (21)**



Fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF, 1.6 g, 5 mmol) se añadió sobre una disolución de **20a** (1.3 g, 2.6 mmol) en THF seco (6 mL). La mezcla se agitó durante 1 h. A continuación se añadió NaHCO<sub>3</sub> saturado (30 mL). El diol se extrajo con EtOAc (3x30 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>, 3x10 cm, 25% Et<sub>2</sub>O-hexanos) para dar el diol **21** [0.86 g, 97%, R<sub>f</sub>=0.6 (30% EtOAc/hexanos), sólido blanco, p.f.: 95 °C].

**Análisis Elemental** (%): Calculado para C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>Si: C (69.05), H (11.06). Encontrado: C (69.05), H (11.05).

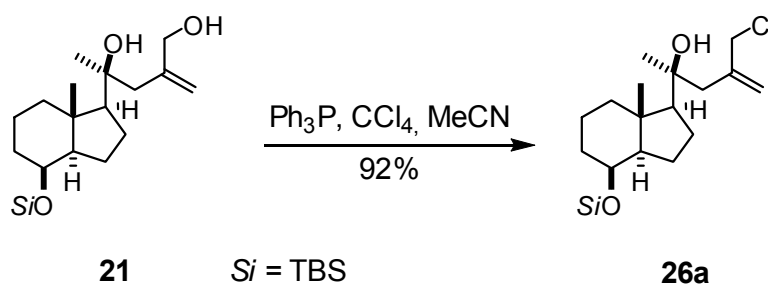
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.10 (s, 1H, =CH), 4.83 (s, 1H, =CH), 4.00-4.08 (m, 3H, CH<sub>2</sub>OH, CH-OTBS), 1.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C-OH), 1.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.88 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), 0.00 (ds, 6H, CH<sub>3</sub>Si<sub>2</sub>),

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 145.43 (C), 116.18 (CH<sub>2</sub>), 75.26 (C), 69.35 (CH), 67.12 (CH<sub>2</sub>), 60.58 (CH), 52.91 (CH), 47.04 (CH<sub>2</sub>), 43.04 (C), 41.08 (CH<sub>2</sub>), 34.18 (CH<sub>2</sub>), 25.74 (CH<sub>3</sub>), 25.74 (CH<sub>3</sub>), 22.71 (CH<sub>2</sub>), 21.68 (CH<sub>2</sub>), 17.94 (C), 17.51 (CH<sub>2</sub>), 15.50 (CH<sub>3</sub>), -4.86 (CH<sub>3</sub>), -5.22 (CH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 75.00 (100.00), 97.15 (21.87), 121.15 (13.61), 161.15 (13.81), 179.15 (10.43), 215.25 (1.02), 311.25 (1.32).

**HRMS** Calculado para  $[C_{22}H_{42}NaO_3Si_2]^+$   $[(M+Na)^+]$ : 405.2795. Encontrado: 405.2795.

**(S)-4-(Clorometil)-2-[(3S,3aS,7S,7aR)-octahidro-7-(terc-butildimetil-sililoxi)-3a-metil-1H-inden-3-il]pent-4-en-2-ol (26a).**



Una mezcla del alcohol **21** (1.9 g., 4.96 mmol),  $\text{Ph}_3\text{P}$  (2.6 g., 9.91 mmol),  $\text{CCl}_4$  (3.02 g., 19.64 mmol, seco de  $\text{CaCl}_2$ ) y  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1.9 mL) se agitó durante 30 min. La mezcla se purificó por cromatografía rápida ( $\text{SiO}_2$ , 2.5x5 cm, 5% EtOAc/hexanos) para dar el cloruro **26a** [1.83 g, 92%,  $R_f=0.6$  (10% EtOAc/hexanos), sólido blanco, p.f.: 48 °C].

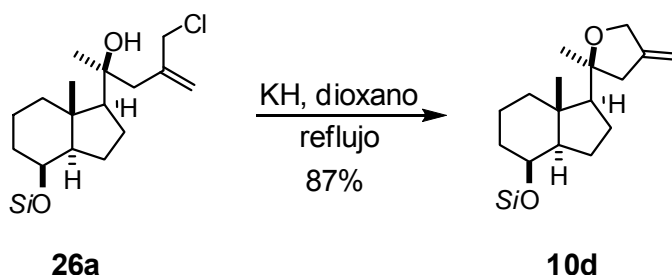
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 5.3 (s, 1H,  $\text{C}=\underline{\text{H}}_2$ ), 5.0 (s, 1H,  $\text{C}=\underline{\text{H}}_2$ ), 4.29 (d,  $J=11.6\text{Hz}$ , 1H  $\text{CH}_2\text{-Cl}$ ), 4.10 (d,  $J=11.6\text{Hz}$ , 1H  $\text{CH}_2\text{-Cl}$ ), 4.00-4.02 (m, 1H,  $\text{CH-OTBS}$ ), 1.25 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-C-OH}$ ), 1.12 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Cy}$ ), 0.88 (s, 9H,  $\text{tBuSi}$ ), 0.00 (ds, 6H,  $\text{H}_3\text{C-Si-CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 142.58 (C), 118.57 ( $\text{CH}_2$ ), 75.39 (C), 69.37 (CH), 60.28 (CH), 52.97 (CH), 49.67 ( $\text{CH}_2$ ), 45.61 ( $\text{CH}_2$ ), 43.05 (C), 41.10 ( $\text{CH}_2$ ), 34.22 ( $\text{CH}_2$ ), 25.78 ( $\text{CH}_3$ ), 25.78 ( $\text{CH}_3$ ), 22.76 ( $\text{CH}_2$ ), 21.78 ( $\text{CH}_2$ ), 17.99 (C), 17.56 ( $\text{CH}_2$ ), 15.56 ( $\text{CH}_3$ ), -4.80 ( $\text{CH}_3$ ), -5.18 ( $\text{CH}_3$ ).

**MS** [m/z, (%): 75.00 (100.00), 109.15 (23.05), 135.15 (45.23), 161.15 (39.61), 179.15 (21.65), 215.20 (4.90), 311.25 (5.11).

**HRMS:** Calculado para  $[C_{22}H_{41}ClNaO_2Si]^+$   $[(M+Na)^+]$ : 423.2457. Encontrado: 423.2457.

**(S)-Tetrahidro-2-[(3S,3aS,7S,7aR)-octahidro-7-(terc-butildimetilsililoxi)-3a-metil-1H-inden-3-il]-2-metil-4-metilenfurano (10d).**



KH (0.3 g, 7.5 mmol) se añadió sobre una disolución del cloruro **26a** (0.5 g, 1.32 mmol) en dioxano seco (5 mL). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 30 min. La reacción se detuvo por adición de metanol (1 mL) y H<sub>2</sub>O (10 mL). El producto se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3x15 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna rápida (SiO<sub>2</sub>, 2.5x7 cm, hexanos) para dar **10d** [0.4 g, 87%, R<sub>f</sub>=0.7 (10% EtOAc/hexanos), aceite incoloro].

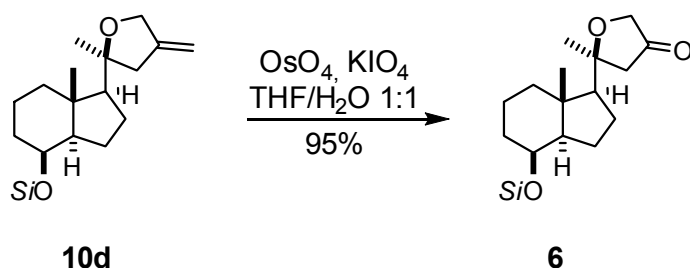
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.14 (s, 1H, =CH), 4.92 (s, 1H, =CH), 4.01 (m, 1H, CH-OTBS), 4.34 (m, 2H =C-CH<sub>2</sub>-O), 2.11 (d, 1H, J=13.5Hz, CH<sub>2</sub>-C=), 2.38 (d, 1H, J=13.5Hz, CH<sub>2</sub>-C=), 1.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C-O), 1.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.87 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), 0.00 (ds, 6H, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 148.77 (C), 103.99 (CH<sub>2</sub>), 85.58 (C), 69.38 (CH), 69.84 (CH<sub>2</sub>), 59.21 (CH), 52.92 (CH), 44.42 (CH<sub>2</sub>), 42.77 (C), 40.89 (CH<sub>2</sub>), 34.38 (CH<sub>2</sub>), 25.77 (CH<sub>3</sub>), 24.70 (CH<sub>3</sub>), 22.90 (CH<sub>2</sub>), 22.26 (CH<sub>2</sub>), 17.97 (C), 17.57 (CH<sub>2</sub>), 15.63 (CH<sub>3</sub>), -4.85 (CH<sub>3</sub>), -5.21 (CH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 75.00 (73.31), 97.15 (100.00), 121.15 (7.97), 159.15 (3.93), 215.25 (2.90), 307.25 (0.51).

**HRMS:** Calculado para [C<sub>22</sub>H<sub>39</sub>O<sub>2</sub>Si]<sup>+</sup> [(M-H)<sup>+</sup>]: 363.2714. Encontrado: 363.2714.

**(S)-Dihidro-5-[(3S,3aS,7S,7aR)-octahidro-7-(*terc*-butildimetilsililoxi)-3a-metil-1*H*-inden-3-il]-5-metilfuran-3(2*H*)-ona (6).**



NaIO<sub>4</sub> (415 mg, 1.8 mmol) y una disolución de OsO<sub>4</sub> en H<sub>2</sub>O (0.2 mL, 4%) se añadieron sucesivamente sobre una mezcla de la olefina **10d** (140 mg, 0.38 mmol) y THF/H<sub>2</sub>O (40 mL, 1:1). La mezcla de reacción se agitó toda la noche a t.a. y luego se vertió sobre NaCl saturado (40 mL). El producto se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3x50 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>, 2.5x8 cm, 5% EtOAc/hexanos) para dar la cetona **6** [130 mg, 91%, R<sub>f</sub>=0.4 (10% EtOAc/hexanos), sólido blanco, p.f.: 52 °C].

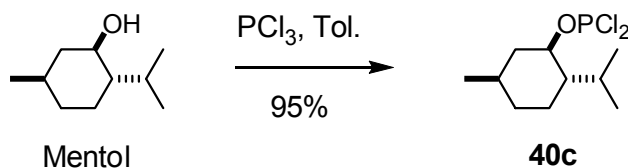
**Análisis Elemental** (%): Calculado para C<sub>21</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>Si: C (68.80), H (10.45). Encontrado: C (68.65), H (10.55).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.09 (d, J=17.5, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CO), 4.00 (m, 1H, HC-OTBS), 3.99 (d, J=17.5Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CO), 2.59 (d, J=17.9Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CO), 2.15 (d, J=17.9Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CO), 1.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 1.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 0.87 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), 0.00 (s, 6H, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>),

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 216.53 (C), 84.80 (C), 69.92 (CH<sub>2</sub>), 69.22 (CH), 59.15 (CH), 52.87 (CH), 48.64 (CH<sub>2</sub>), 42.89 (C), 40.85 (CH<sub>2</sub>), 34.25 (CH<sub>2</sub>), 25.77 (CH<sub>3</sub>), 25.21 (CH<sub>3</sub>), 22.77 (CH<sub>2</sub>), 22.32 (CH<sub>2</sub>), 17.98 (C), 17.49 (CH<sub>2</sub>), 15.87 (CH<sub>3</sub>), -4.83 (CH<sub>3</sub>), -5.19 (CH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 75.00 (98.73), 99.05 (39.43), 161.15 (100.00), 199.15 (27.62), 291.25 (3.24), 309.25 (14.82).

**HRMS**: Calculado para [C<sub>21</sub>H<sub>39</sub>O<sub>3</sub>Si]<sup>+</sup> [(M+H)<sup>+</sup>]: 367.2663. Encontrado: 367.2663.

**Dicloro [(1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexiloxi]fosfina (40c).**

Una disolución de mentol (3.03 g 19.39 mmol) en tolueno seco (80 mL) se goteó lentamente vía jeringa automática (2 h) sobre  $\text{PCl}_3$  seco (18.89 g, 137.55 mmol,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ). La disolución incolora resultante se agitó durante 1 h. La concentración a vacío utilizando un rotavapor conectado a una bomba de membrana condujo a un residuo que se disolvió en tolueno seco (100 mL). La disolución se volvió a concentrar y este proceso se repitió 3 veces. Se obtuvo **40c**<sup>212</sup> (4.75 g, 95%, aceite incoloro).

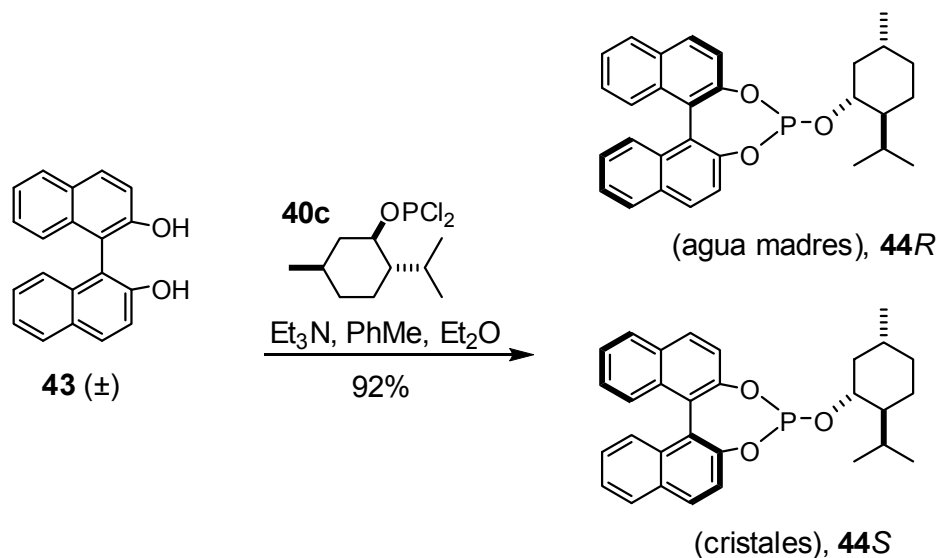
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 4.49 (dtd,  $J=15.10, 10.58, 10.56, 4.60$  Hz, 1H, HC- $\text{OPCl}_2$ ), 2.36 (m, HC-*i*Pr), 2.02 (m, 1H), 1.78-1.61 (m, 2H), 0.93 (dd,  $J=6.72, 5.43$  Hz, 6H,  $\text{H}_3\text{C-CH-CH}_3$ ), 0.80 (d,  $J=6.85$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C-CH}$ )

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 83.54 (d,  $J_{\text{C-P}}=9.86$  Hz, HC- $\text{OPCl}_2$ ), 48.61 (d,  $J_{\text{C-P}}=2.22$  Hz, HC- $\text{CHOPCl}_2$ ), 43.24 ( $\text{CH}_2$ ), 33.86 ( $\text{CH}_2$ ), 31.59 (CH), 24.99 (CH), 22.82 ( $\text{CH}_2$ ), 22.06 (CH), 21.24 ( $\text{CH}_3$ ), 16.05 ( $\text{CH}_3$ ).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 177.10 (s).

(212) Jue CX, Zheng ZH, Kang YL, Chi HY, Chu TC. An improved method for the resolution of 1,1'-binaphthalene-2,2'-diol via a phosphite using (-)-menthol as a resolving agent. *Phos. Sulf. Silic. and Rel. Elem.* **2002**, 177, 189-193.

**(11bR)-4-[(1R,2S,5R)-2-Isopropil-5-metilciclohexiloxi]dinafto(2,1-d:1',2'-f)(1,3,2)dioxafosfepina (44R) y (11bS)-4-[(1R,2S,5R)-2-Isopropil-5-metilciclohexiloxi]dinafto(2,1-d:1',2'-f)(1,3,2)dioxafosfepina (44S).**



Una disolución de **43** (5 g, 17.46 mmol) y  $\text{Et}_3\text{N}$  seca (3.72 g, 16.80 mmol) en tolueno seco (30 mL) se agitó durante 20 min. A continuación se agregó sobre la disolución marrón oscura resultante y vía jeringa automática una disolución de **40c** (4.93 g, 19.17 mmol) en  $\text{Et}_2\text{O}$  (10 mL). Se observó la formación de un precipitado blanco. Al cabo de 3 h, la mezcla se filtró a través de una placa porosa N° 4 provista de una capa de celita sobre gel de sílice. Los sólidos se lavaron con tolueno (3x50 mL) y la disolución se concentró. El residuo se disolvió en una pequeña cantidad de  $\text{Et}_2\text{O}$  (40 mL) con el fin de cristalizar. Al cabo de 12 h (5 °C) se obtuvieron los cristales de **44S**<sup>193</sup> por filtración (Rf=0.6, 10% EtOAc/hexanos). Las aguas madres contienen **44R**<sup>193</sup> [Rf=0.6 (10% EtOAc/hexanos)].

Compuesto **44S**:

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.03 (ddd, J=10.49, 8.58, 6.11 Hz, 1H, HC-OP), 2.35-2.20 (m, 1H), 0.89 (d, J=7.02 Hz, 3H, HC-CH<sub>3</sub>), 0.81 (d, J=6.99 Hz, 6H, H<sub>3</sub>C-HC-CH<sub>3</sub>).

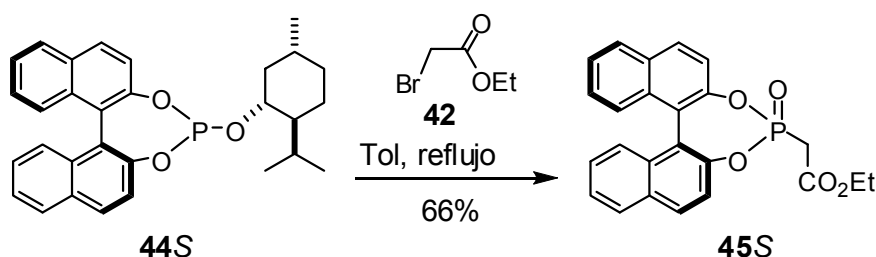
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 148.16 (C), 148.07 (C), 147.69 (C), 147.69 (C), 132.85 (C), 132.68 (C), 131.46 (C), 131.05 (C), 130.16 (CH), 129.46 (CH), 128.28 (CH),

(193) Brunel JM, Buono G. A new and efficient method for the resolution of 1,1'-binaphthalene-2,2'-diol. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7313-7314.

128.15 (CH), 127.02 (CH), 127.02 (CH), 126.11 (CH), 125.94 (CH), 124.89 (CH), 124.70 (CH), 121.95 (CH), 121.90 (CH), 48.96 (CH), 44.58 (CH<sub>2</sub>), 34.51 (CH<sub>2</sub>), 32.15 (CH), 25.83 (CH), 23.30 (CH<sub>2</sub>), 22.43 (CH), 21.51 (CH<sub>3</sub>), 16.23 (CH<sub>3</sub>).

<sup>31</sup>P-NMR (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 152.91 (**44R**), 149.51 (**44S**).

**(S)-Fuji (45S).**



En un matraz de fondo redondo provisto de refrigerante se preparó una suspensión de **44S** (6.32 g, 13.43 mmol) y **42** (18 g, 107.78 mmol) en tolueno seco (15 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 12 h. La concentración en caliente a vacío de bomba dio un residuo que se redisolvió en una cantidad mínima de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se purificó por cromatografía rápida en columna [(SiO<sub>2</sub>, 5.5x3 cm, Et<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexanos (1:1:3)] para dar **45S**<sup>214</sup> [3.12 g, 66%, R<sub>f</sub>=0.2 (50% EtOAc/hexanos), sólido blanco, p.f. 205 °C].

**Análisis Elemental** (%): Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub>P: C (68.90), H (4.58). Encontrado: C (68.75), H (4.81).

<sup>1</sup>H-NMR (250 MHz): 4.13 (q, J=7.13 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3.08 (d, J<sub>HP</sub>=20.94 Hz, 2H, P-CH<sub>2</sub>), 1.18 (t, J=7.13 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (62.89 MHz): 164.15 (O=C), 147.12 (C), 146.95 (C), 145.50 (C), 145.34 (C), 132.39 (C), 132.24 (C), 131.87 (C), 131.66 (C), 131.40 (CH), 131.34 (CH), 128.51 (CH), 128.40 (CH), 127.18 (CH), 126.93 (CH), 126.85 (CH), 126.79 (CH),

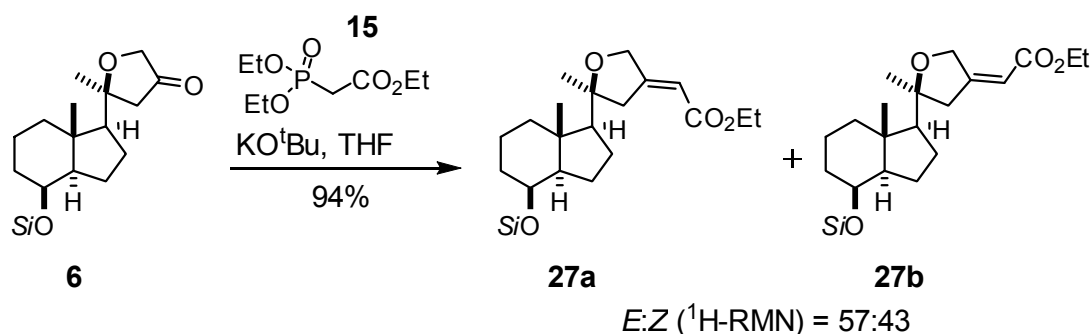
(214) (a) Touchard FP. Phosphonate modification for a highly (*Z*)-selective synthesis of unsaturated esters by Horner-Wadsworth-Emmons olefination. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 9, 1790-1794. (b) Tanaka K, Ohta Y, Fuji K, Taga T. Differentiation of enantiotopic carbonyl groups by the Horner-Wadsworth-Emmons reaction. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 4071-4074.

125.96 (CH), 125.84 (CH), 120.92 (CH), 120.09 (CH), 62.24 (O-CH<sub>2</sub>), 32.11 (d,  $J_{CP}$ =130.76 Hz, H<sub>2</sub>C-P), 13.91 (CH<sub>3</sub>).

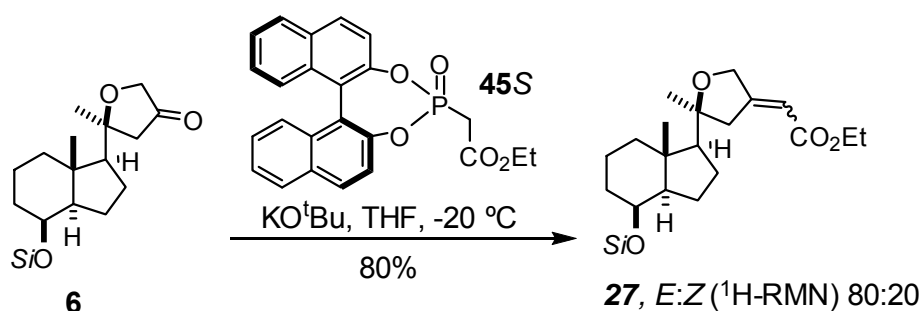
**MS** [m/z, (%): 105.00 (2.66), 226.00 (20.16), 239.00 (63.05), 240.00 (19.95), 252.00 (10.62), 255.00 (10.72), 263.00 (20.75), 264.00 (30.61), 265.00 (20.15), 266.00 (19.37), 267.00 (45.02), 268.00 (98.21), 269.00 (22.37), 279.00 (12.58), 281.00 (11.25), 313.00 (20.67), 314.00 (37.89), 373.00 (12.36), **418.00** (100.00), 419.00 (27.14)

**(E)-Etil-2-((S)-5-[(1S,3aR,4S,7aS)-4-(terc-butildimetilsililoxi)-7a-metiloctahidro-1H-inden-1-il]-5-metildihidrofuran-3(2H)-iliden) acetato (27a) y (Z)-Etil-2-((S)-5-[(1S,3aR,4S,7aS)-4-(terc-butildimetilsililoxi)-7a-metiloctahidro-1H-inden-1-il]-5-metildihidrofuran-3(2H)-iliden) acetato (27b).**

**Método A** - con el fosfonato **15**



Trietil fosfonoacetato **15** seco (2.04 mL, 10.2 mmol) se adicionó gota a gota sobre una mezcla de KO<sup>t</sup>Bu (1.4 g, 10.2 mmol) en THF seco (10 mL). La mezcla se agitó a t.a. durante 1 h y luego se enfrió a -8 °C. A continuación se añadió una disolución de **6** (0.6 g, 1.57 mmol) en THF seco (5 mL). Después de 1 h, la reacción se detuvo por adición de una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (10 mL) y H<sub>2</sub>O (25 mL). La mezcla se extrajo con Et<sub>2</sub>O (4x50 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>, 2.5x9 cm, 5% Et<sub>2</sub>O-hexanos) para dar una mezcla de **27a** y **27b** (680 mg, 94%) en una proporción 57:43 por <sup>1</sup>H-RMN. La mezcla de los dos productos se separó por HPLC **27a** [R<sub>f</sub>=0.6 (10% EtOAc/hexanos), aceite incoloro], **27b** [R<sub>f</sub>=0.6 (10% EtOAc/hexanos), sólido blanco p.f.: 101 °C].

**Método B** - con reactivo de Fuji **45S**

Una mezcla de KO<sup>t</sup>Bu (72 mg, 0.645 mmol) en THF seco (5 mL) se adicionó, vía jeringa, sobre **45S** sólido (270 mg, 0.645 mmol). La disolución amarilla resultante se agitó durante 1 h a t.a. y se enfrió mediante la sonda criogénica a -20 °C. A continuación se añadió una disolución de **6** (20 mg, 0.054 mmol) en THF seco (2 mL). Al cabo de 12 h, la mezcla se transfirió a un embudo de decantación y se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3x50 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida (SiO<sub>2</sub>, 2.5x9 cm, 5% Et<sub>2</sub>O-hexanos) para dar una mezcla de **27a** y **27b** (19 mg, 80%) en una proporción 80:20 por <sup>1</sup>H-RMN.

**27a** (compuesto menos polar, aceite incoloro):

**Análisis Elemental** (%): Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub>Si: C (68.76), H (10.16).  
Encontrado: C (68.71), H (10.43).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.77 (s, 1H, H-C=CO<sub>2</sub>Et), 4.13 (q, J=7.1Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO), 3.99 (m, 1H, HC-OTBS), 2.77 (d, J=16.8Hz, 1H, THF-O-CH<sub>2</sub>), 2.35 (d, J=16.8Hz, 1H, THF-O-CH<sub>2</sub>), 1.26 (t, J=7.1Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO), 1.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.86 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), -0.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si), -0.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 166.08 (C), 164.08 (C), 111.26 (CH), 84.25 (C), 69.95 (CH<sub>2</sub>), 69.28 (CH), 59.92 (CH<sub>2</sub>), 58.63 (CH), 52.88 (CH), 45.72 (CH<sub>2</sub>), 42.76 (C), 40.82 (CH<sub>2</sub>), 34.30 (CH<sub>2</sub>), 25.76 (CH<sub>3</sub>), 24.02 (CH<sub>3</sub>), 22.83 (CH<sub>2</sub>), 22.24 (CH<sub>2</sub>), 17.96 (C), 17.52 (CH<sub>2</sub>), 15.69 (CH<sub>3</sub>), 14.28 (CH<sub>3</sub>), -4.85 (CH<sub>3</sub>), -5.21 (CH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 75.00 (100.00) 123.00 (27.81), 169.00 (67.37), 203.00 (2.09), 213.10 (2.07), 379.20 (9.56), 380.20 (2.43).

**HRMS:** Calculado para  $[C_{25}H_{45}O_4Si]^+$  [(M+H)<sup>+</sup>]: 437.3082. Encontrado: 437.3082.

**27b** (compuesto más polar, sólido blanco, p.f.: 101 °C)

**Análisis Elemental** (%): Calculado para  $C_{25}H_{44}O_4Si$ : C (68.76), H (10.16).  
Encontrado: C (69.18), H (10.50).

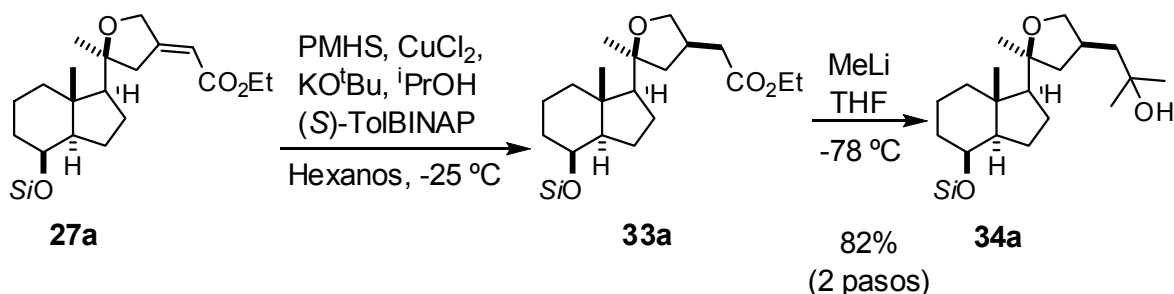
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.73 (m, 1H, H-C=CO<sub>2</sub>Et), 4.14 (q, J=7.1Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO), 3.99 (m, 1H, HC-OTBS), 1.26 (t, J=7.1Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO), 1.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.86 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), -0.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si), -0.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 166.42 (C), 163.23 (C), 110.21 (CH), 86.69 (C), 70.68 (CH<sub>2</sub>), 69.31 (CH), 59.79 (CH), 58.95 (CH<sub>2</sub>), 52.86 (CH), 43.84 (CH<sub>2</sub>), 42.79 (C), 40.83 (CH<sub>2</sub>), 34.31 (CH<sub>2</sub>), 25.75 (CH<sub>3</sub>), 24.84 (CH<sub>3</sub>), 22.86 (CH<sub>2</sub>), 22.19 (CH<sub>2</sub>), 17.95 (C), 17.52 (CH<sub>2</sub>), 15.59 (CH<sub>3</sub>), 14.27 (CH<sub>3</sub>), -4.86 (CH<sub>3</sub>), -5.22 (CH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 75.00 (12.17), 95.05 (17.71), 141.05 (8.99), 168.15 (17.11), 169.00 (100.00), 333.15 (18.68), 379.20 (20.39).

**HRMS:** Calculado para  $[C_{25}H_{44}O_4Si]^+$  [(M)<sup>+</sup>]: 436.3009. Encontrado: 436.3009.

**Etil 2-{(3*R*,5*S*)-5-[(1*S*,3*aR*,4*S*,7*aS*)-4-(*tert*-butildimetilsililoxi)-7*a*-metiloctahidro-1*H*-inden-1-il]-5-metiltetrahidrofuran-3-il} (33a) y 1-{(3*S*,5*S*)-5-[(1*S*,3*aR*,4*S*,7*aS*)-4-(*tert*-butildimetilsililoxi)-7*a*-metiloctahidro-1*H*-inden-1-il]-5-metiltetrahidrofuran-3-il}-2-metilpropan-2-ol (34a).**



### Preparación de 33a:

En un tubo de reacción seco se colocó  $\text{CuCl}_2$  (16 mg, 0.1190 mmol),  $\text{KO}^t\text{Bu}$  (46 mg, 0.4099 mmol), (S)-TolBINAP (70 mg, 0.1031 mmol) y hexanos (3 mL). Sobre la suspensión verde obtenida se añadió PMHS (1 mL, 16.57 mmol). La mezcla se sometió a la acción de los ultrasonidos durante 2 h observándose un cambio de color a rojo oscuro. Después de enfriar a  $-25\text{ }^\circ\text{C}$ , se añadió una disolución de **27a** (890 mg, 2.038 mmol) en hexanos (5 mL) e isopropanol (0.55 mL, 7.19 mmol). La reacción se detuvo al cabo de 3 h por adición de HCl (30 mL, 10%) y EtOAc (30 mL). La mezcla se extrajo con EtOAc (2x20 mL) y la fase orgánica combinada se lavó con NaCl saturado y se seco, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna ( $\text{SiO}_2$ , 3.5x10 cm, 10%  $\text{Et}_2\text{O}$ /hexanos) para dar **33a** [890 mg, 99%,  $R_f=0.4$  (15% EtOAc/hexanos), aceite incoloro] que se utilizó en el paso siguiente.

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 5.73 (m, 1H,  $\text{H-C=CO}_2\text{Et}$ ), 4.14 (q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OCO}$ ), 3.99 (m, 1H,  $\text{HC-OTBS}$ ), 1.26 (t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OCO}$ ), 1.19 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CO}$ ), 1.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Cy}$ ), 0.86 (s, 9H,  $^t\text{BuSi}$ ), -0.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ), -0.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 166.42 (C), 163.23 (C), 110.21 (CH), 86.69 (C), 70.68 ( $\text{CH}_2$ ), 69.31 (CH), 59.79 (CH), 58.95 ( $\text{CH}_2$ ), 52.86 (CH), 43.84 ( $\text{CH}_2$ ), 42.79 (C),

40.83 (CH<sub>2</sub>), 34.31 (CH<sub>2</sub>), 25.75 (CH<sub>3</sub>), 24.84 (CH<sub>3</sub>), 22.86 (CH<sub>2</sub>), 22.19 (CH<sub>2</sub>), 17.95 (C), 17.52 (CH<sub>2</sub>), 15.59 (CH<sub>3</sub>), 14.27 (CH<sub>3</sub>), -4.86 (CH<sub>3</sub>), -5.22 (CH<sub>3</sub>).

### Preparación de 34a:

Una disolución de MeLi en Et<sub>2</sub>O (8 mL, 12.8 mmol, 1.6 M) se añadió vía jeringa sobre una disolución de **33a** (890 mg, 2.03 mmol) en THF seco (10 mL). La disolución resultante se agitó durante 30 min y luego se dejó a 0 °C durante 4 h. La reacción se detuvo por adición cuidadosa de MeOH (1 mL) y una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (30 mL). La mezcla se extrajo con Et<sub>2</sub>O (4x30 mL). La fase orgánica combinada se seco, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>, 2.5x24 cm, 20% EtOAc/hexanos) para dar **34a** [707 mg, 82% en dos pasos, R<sub>f</sub>=0.2 (20% EtOAc/hexanos)].

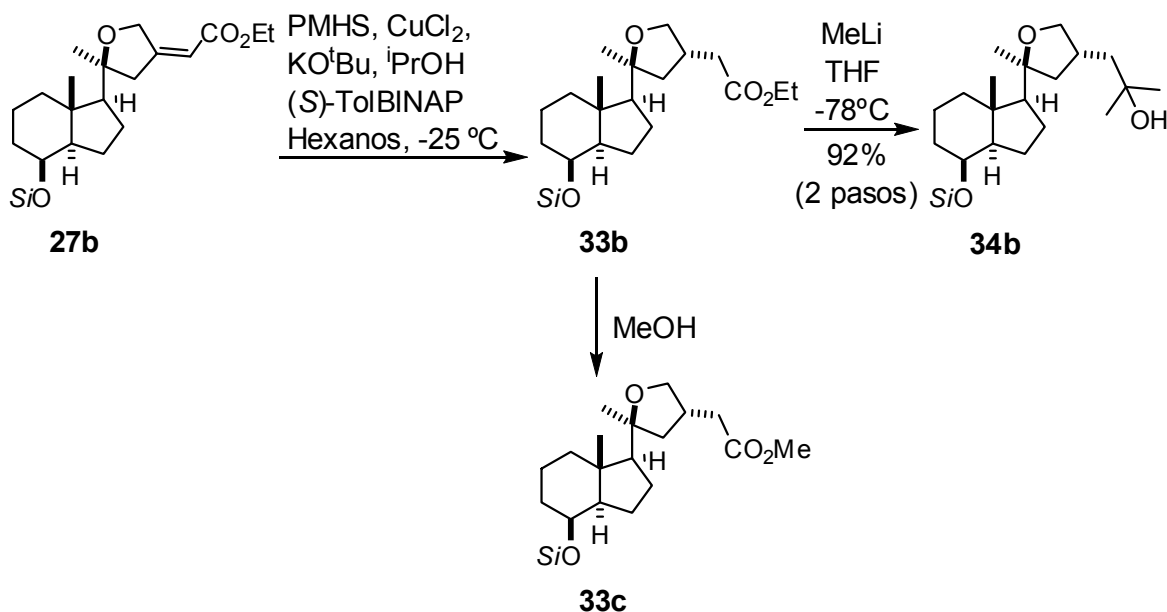
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.04 (t, 1H, J=7Hz, OCH<sub>2</sub>Cy), 3.97 (m, 1H, HCOTBS), 3.34 (t, J=9Hz, 1H, OCH<sub>2</sub>Cy), 1.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.18 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-C-OH), -0.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si), 1.00 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.85 (s, 9H, tBuSi), -0.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 84.99 (C), 73.17 (CH<sub>2</sub>), 70.93 (C), 69.40 (CH), 60.12 (CH), 52.96 (CH), 47.14 [2x(CH<sub>2</sub>)], 42.81 (C), 40.96 (CH<sub>2</sub>), 35.77 (CH), 34.40 (CH<sub>2</sub>), 30.10 (CH<sub>3</sub>), 29.68 (CH<sub>3</sub>), 27.53 (CH<sub>3</sub>), 25.78 (CH<sub>3</sub>), 22.77 (CH<sub>2</sub>), 22.25 (CH<sub>2</sub>), 17.98 (C), 17.57 (CH<sub>2</sub>), 15.04 (CH<sub>3</sub>), -4.83 (CH<sub>3</sub>), -5.19 (CH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 59.00 (100.00), 73.00 (53.15), 75.00 (86.15), 81.00 (36.06), 83.00 (35.30), 121.00 (30.26), 139.00 (45.52), 157.00 (54.74), 175.05 (2.48), 201.00 (4.84), 257.15 (2.27), 275.15 (1.33).

**HRMS**: Calculado para [C<sub>25</sub>H<sub>49</sub>O<sub>3</sub>Si]<sup>+</sup> [(M+H)<sup>+</sup>]: 425.3445. Encontrado: 425.3445.

**Etil acetato de 2-{{(3S,5S)-5-[(1S,3aR,4S,7aS)-4-(*tert*-butildimetilsililoxi)-7a-metiloctahidro-1*H*-inden-1-il]-5-metiltetrahidrofuran-3-il} (33b), 1-((3R,5S)-5-((1S,3aR,4S,7aS)-4-(*tert*-butildimetilsililoxi)-7a-metiloctahidro-1*H*-inden-1-il)-5-metiltetrahidrofurano-3-il)-2-metilpropan-2-ol (34b) y metil acetato de 2-((3S,5S)-5-[(1S,3aR,4S,7aS)-4-(*tert*-butildimetilsililoxi)-7a-metiloctahidro-1*H*-inden-1-il]-5-metiltetrahidrofuran-3-ilo) (33c).**



Preparación de **33b**:

En un tubo de reacción seco se colocó  $\text{CuCl}_2$  (19 mg, 0.1413 mmol),  $\text{KO}^t\text{Bu}$  (17.5 mg, 0.156 mmol), (S)-TolBINAP (17.4 mg, 0.0256 mmol) y hexanos (3 mL). Se formó una suspensión verde. Se añadió PMHS (0.2 mL, 3.314 mmol). La mezcla se sonicó durante 2 h mientras la coloración cambió a rojo oscuro. La mezcla se enfrió a  $-25\text{ }^\circ\text{C}$  y se añadió una disolución de **27b** (90 mg, 0.2061 mmol) en hexanos (2 mL) e isopropanol (50  $\mu\text{L}$ , 0.65 mmol). Después de 3 h, la reacción se detuvo por adición de una disolución de HCl (10 mL, 10%) y EtOAc (20 mL). La mezcla se extrajo con EtOAc (2x20 mL) y la fase orgánica combinada se lavó con NaCl saturado y se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna ( $\text{SiO}_2$ , 3x6 cm, 10%  $\text{Et}_2\text{O}$ -hexanos) para dar **33b** [90 mg, 99%,  $R_f=0.4$  (15% EtOAc/hexanos), sólido blanco p.f.:  $60\text{ }^\circ\text{C}$ ] que se utilizó en el paso siguiente.

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.08 (q, J=7.15 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.06 (t, J=8.99 Hz, 1H, THFO-CHH), 3.97 (m, 1H, TBSO-CH), 3.40 (t, J=8.99 Hz, 1H, THFO-CHH), 2.54 (m, 1H, HC-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et), 2.34 (d, J=7.34 Hz, 2H, THF-CH<sub>2</sub>), 2.20 (m, 1H), 1.25 (t, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.23 (s, H<sub>3</sub>C-THF), 1.01 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 0.85 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu-Si), -0.03 (d, 6H, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 172.45 (C=O), 85.47 (C-O), 72.03 (O-CH<sub>2</sub>), 69.40 (O-CH), 60.34 (CH<sub>2</sub>), 60.07 (CH), 52.96 (CH), 45.00 (CH<sub>2</sub>), 42.81 (C), 40.96 (CH<sub>2</sub>), 37.99 (CH<sub>2</sub>), 35.85 (CH), 34.40 (CH<sub>2</sub>), 27.53 (CH<sub>3</sub>), 25.79 (CH<sub>3</sub>), 22.76 (CH<sub>2</sub>), 22.22 (CH<sub>2</sub>), 17.99 (C), 17.58 (CH<sub>2</sub>), 15.10 (CH<sub>3</sub>), 14.21 (CH<sub>3</sub>), -5.03 (ds, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 171.25 (100.00), 172.15 (3.33), 201.30 (11.58), 381.45 (37.89), 382.55 (1.25), 423.55 (4.79).

**HRMS**: Calculado para [C<sub>25</sub>H<sub>47</sub>O<sub>4</sub>Si]<sup>+</sup> [(M+H)<sup>+</sup>]: 439.3238. Encontrado: 439.3238.

Preparación de **34b**:

MeLi en Et<sub>2</sub>O (0.5 mL, 0.8 mmol, 1.6 M) se añadió a una disolución de **33b** (97 mg) en THF seco (5 mL). La disolución resultante se agitó durante 30 min y luego a 0 °C durante 4 h. La reacción se detuvo por adición cuidadosa de MeOH (1 mL) y NH<sub>4</sub>Cl saturado (30 mL). La mezcla se extrajo con Et<sub>2</sub>O (4x30 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>, 1.5x12 cm, 10% EtOAc/hexanos) para dar **34b** [81 mg, 92% en dos pasos, R<sub>f</sub>=0.2 (20% EtOAc/hexanos), aceite incoloro].

**Análisis Elemental** (%): Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>Si: C (70.70), H (11.39). Encontrado: C (70.38), H (11.14).

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.09 (t, 1H, J=7.8Hz, OCH<sub>2</sub>Cy), 3.98 (m, 1H, HCOTBS), 3.33 (dd, J=8.5, 9.7, OCH<sub>2</sub>Cy), 1.21 (s, 9H, 2 x CH<sub>3</sub>-C-OH, CH<sub>3</sub>-C-O-CH<sub>2</sub>), 1.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.87 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), -0.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si), -0.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 85.19 (C), 74.88 (CH<sub>2</sub>), 70.94 (C), 69.38 (CH), 60.08 (CH), 52.96 (CH), 46.40 (CH<sub>2</sub>), 46.08 (CH<sub>2</sub>), 42.69 (C), 40.93 (CH<sub>2</sub>), 34.38 (CH<sub>2</sub>), 34.13 (CH), 30.01 (CH<sub>3</sub>), 29.81 (CH<sub>3</sub>), 27.14 (CH<sub>3</sub>), 25.78 (CH<sub>3</sub>), 22.73 (CH<sub>2</sub>), 22.21 (CH<sub>2</sub>), 17.98 (C), 17.57 (CH<sub>2</sub>), 15.53 (CH<sub>3</sub>), -4.83 (CH<sub>3</sub>), -5.19 (CH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 74.95 (98.31), 81.00 (57.79), 121.00 (45.86), 139.00 (63.07), 157.00 (100.00), 175.00 (5.93), 201.00 (11.02), 257.15 (3.73).

**HRMS**: Calculado para [C<sub>25</sub>H<sub>49</sub>O<sub>3</sub>Si]<sup>+</sup> [(M+H)<sup>+</sup>]: 425.3445. Encontrado: 425.3445.

Preparación de **33c**:

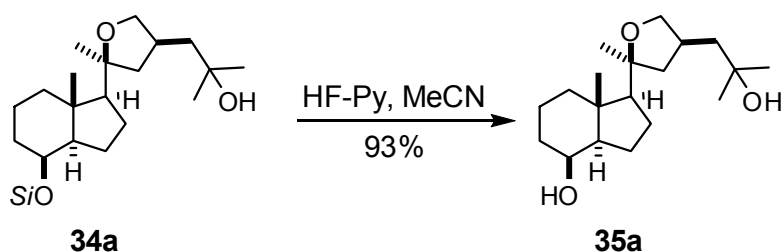
Durante la preparación de **33b**, cuando se detuvo la reacción con MeOH y se agitó durante 2 h a t.a. se formó **33c** como resultado de la transesterificación parcial de **33b**.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz): 4.09 (dt, J=8.67, 4.68 Hz, 1H, THFO-CHH), 4.00 (m, 1H, TBSO-CH), 3.66 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.38 (t, J=8.67 Hz, 1H), 2.78-2.60 (m, 1H, HC-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me), 2.35 (d, J=7.30 Hz, 2H, HC-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me), 1.80 (t, J=3.59 Hz, 1H, THF-CHH), 1.22 (s, 3H, H<sub>3</sub>C-THF), 1.04 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 0.88 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu-Si), -0.01 (d, J=3.38 Hz, 6H, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 172.97 (C=O), 85.80 (C-O), 73.12 (O-CH<sub>2</sub>), 69.40 (HC-OTBS), 59.94 (H<sub>3</sub>C-OTHF), 52.99 (CH), 51.60 (CH), 44.23 (CH<sub>2</sub>), 42.73 (C), 40.94 (CH<sub>2</sub>), 37.30 (CH<sub>2</sub>), 34.44 (CH), 34.39 (CH<sub>2</sub>), 26.54 (H<sub>3</sub>C<sub>21</sub>), 25.80 (<sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>), 22.75 (CH<sub>2</sub>), 22.20 (CH<sub>2</sub>), 18.01 (C-Si), 17.59 (CH<sub>2</sub>), 15.54 (H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), -4.99 (d, J=22.51 Hz, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>).

**NOE** (400 MHz, δ, ppm): Irradiación en 2.78-2.60 (100%), 4.09 (-5.52%), 2.35 (-3.67%), 1.80 (-5.10%), 1.22 (-4.21%).

**(1S,3aR,4S,7aS)-1-((2S,4S)-4-(2-Hidroxi-2-metilpropil)-2-metil tetrahidrofuran-2-il)-7a-metiloctahidro-1H-inden-4-ol (35a).**



Una disolución de **34a** (330 mg, 0.78 mmol) en THF seco (4 mL) se trató con  $n\text{Bu}_4\text{NF}$  (1.02 g, 3.25 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 90 h. A continuación se añadió  $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL) y EtOAc (20 mL). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (4x20 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna ( $\text{SiO}_2$ , 2x5.5 cm, 30% EtOAc/hexanos) para dar **35a** [224 mg, 93%,  $R_f=0.2$  (50% EtOAc/hexanos), sólido blanco, p.f.: 98 °C].

**Análisis Elemental** (%): Calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_3$ : C (73.50), H (11.04). Encontrado C (73.29), H (11.35).

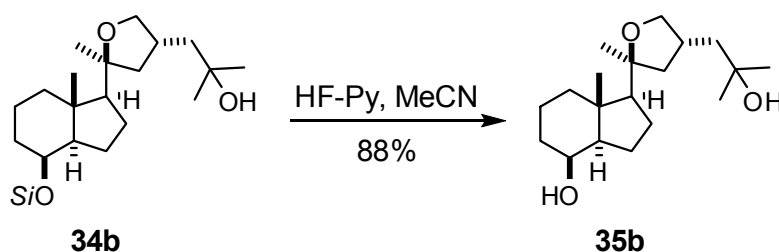
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 4.02 (t,  $J=7.48$  Hz, 1H, THF-O-CHH), 4.02 (s, 1H, TBSO-CH), 3.32 (t,  $J=9.16$  Hz, 1H, THF-O-CHH), 1.21 (s, 3H, THF- $\text{CH}_3$ ), 1.15 (s, 6H,  $\text{H}_3\text{C-COH-CH}_3$ ), 1.00 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_{18}$ )

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 84.66 (C), 73.23 ( $\text{CH}_2$ ), 70.71 (C), 69.19 (CH), 59.94 (CH), 52.42 (CH), 47.39 ( $\text{CH}_2$ ), 46.98 ( $\text{CH}_2$ ), 42.41 (C), 40.55 ( $\text{CH}_2$ ), 35.66 (CH), 33.36 ( $\text{CH}_2$ ), 29.00 (CH), 29.56 ( $\text{CH}_3$ ), 27.49 ( $\text{CH}_3$ ), 22.15 ( $\text{CH}_2$ ), 21.96 ( $\text{CH}_2$ ), 17.26 ( $\text{CH}_2$ ), 14.68 ( $\text{CH}_3$ ).

**MS** [ $m/z$ , (%): 121.20 (13.55), 139.20 (42.10), 140.20 (1.85), 158.20 (11.71), 277.30 (0.43).

**HRMS**: Calculado para  $[\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{NaO}_3]^+$  [( $M+\text{Na}$ ) $^+$ ]: 333.240. Encontrado: 333.2400.

**(1S,3aR,4S,7aS)-1-[(2S,4R)-4-(2-hidroxi-2-metilpropil)-2-metiltetrahidro furan-2-il]-7a-metiloctahidro-1H-inden-4-ol (35b).**



Una disolución de **34b** (280 mg, 0.78 mmol) en THF seco (4 mL) se trató con  $n\text{Bu}_4\text{NF}$  (1.05 g, 3.3 mmol). La mezcla se calentó a reflujo. Después de 115 h se añadió  $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL) y EtOAc (20 mL). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (4x20 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna ( $\text{SiO}_2$ , 2x5.5 cm, 30% EtOAc/hexanos) para dar el diol **35b** [180 mg, 88%,  $R_f=0.2$  (50% EtOAc/hexanos), sólido blanco, p.f.: 67 °C].

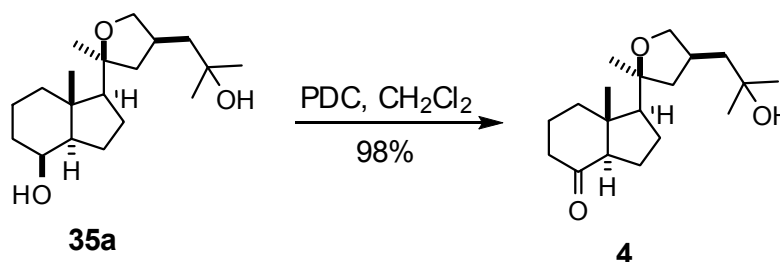
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 4.05 (t,  $J=7.48$  Hz, 1H, THF-O-CHH), 4.05 (s, 1H, TBSO-CH), 3.35 (t,  $J=8.92$  Hz, 1H, THF-O-CHH), 1.24 (s, 3H, THF- $\text{CH}_3$ ), 1.19 (s, 6H,  $\text{H}_3\text{C-COH-CH}_3$ ), 1.03 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_{18}$ )

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 84.80 (THF C-O), 74.86 (THF O- $\text{CH}_2$ ), 70.62 ( $\text{H}_3\text{C-COH-CH}_3$ ), 69.08 (HO-CH), 59.74 (CH), 52.38 (CH), 46.18 ( $\text{CH}_2$ ), 46.02 ( $\text{CH}_2$ ), 42.23 (C), 40.46 ( $\text{CH}_2$ ), 33.90 (CH), 33.27 ( $\text{CH}_2$ ), 29.87 (CH), 29.59 (CH), 27.08 (C), 22.05 ( $\text{CH}_2$ ), 21.89 ( $\text{CH}_2$ ), 17.22 ( $\text{CH}_2$ ), 15.10 ( $\text{H}_3\text{C}_{18}$ ).

**MS** [ $m/z$ , (%): 59.00 (4.16), 94.95 (0.76), 120.55 (1.39), 121.20 (18.42), 135.20 (2.14), 139.20 (44.03), 140.20 (4.26), 157.25 (100.00), 158.20 (11.27), 277.25 (7.76), 295.35 (6.68).

**HRMS**: Calculado para  $[\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{O}_3]^+$  [(M+H) $^+$ ]: 311.2581. Encontrado: 311.2581.

**(1S,3aR,7aR)-1-[(2S,4S)-4-(2-Hidroxi-2-metilpropil)-2-metiltetrahidro furano-2-il]-7a-metilhexahidro-1H-inden-4(2H)-ona (4).**



Una disolución de **35a** (123 mg, 0.4 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (10 mL), se trató con PDC (0.6 g, 1.6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 20 h. La mezcla obtenida, después de filtrar a través de una placa porosa provista de una capa de celita, se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>, 3x5.5 cm, 20% EtOAc/hexanos) para dar **4** [120 mg, 98%, R<sub>f</sub>=0.2 (30% EtOAc/hexanos), sólido blanco, p.f.: 87 °C].

**Análisis elemental** (%): Calculado para C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>: C (73.98), H (10.46). Encontrado: C (73.80), H (10.51).

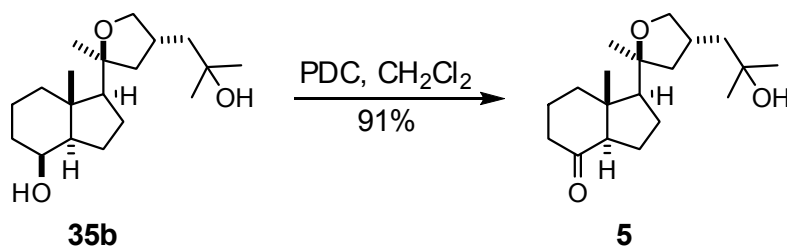
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.00 (t, 1H, J=7.8Hz, OCH<sub>2</sub>Cy), 3.29 (t, 1H, J=9.2Hz CH<sub>2</sub>OCy), 1.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-OCH<sub>2</sub>), 1.13 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-COH), 0.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Cy).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 212.01 (C), 83.99 (C), 73.08 (CH<sub>2</sub>), 70.45 (C), 61.80 (CH), 59.68 (CH), 49.90 (C), 46.76 (CH<sub>2</sub>), 46.59 (CH<sub>2</sub>), 40.67 (CH<sub>2</sub>), 38.93 (CH<sub>2</sub>), 35.68 (CH), 29.99 (CH<sub>3</sub>), 29.47 (CH<sub>3</sub>), 27.81 (CH<sub>3</sub>), 23.76 (CH<sub>2</sub>), 22.41 (CH<sub>2</sub>), 18.63 (CH<sub>2</sub>), 13.42 (CH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 59.95 (54.19), 79.00 (4.75), 81.05 (7.97), 83.00 (7.69), 95.10 (4.12), 121.20 (8.83), 139.15 (28.23), 157.15 (100.00), 158.20 (10.50), 179.10 (3.85), 195.15 (2.85), 275.25 (2.57), 293.40 (2.85).

**HRMS**: Calculado para [C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> [(M+H)<sup>+</sup>]: 309.2424. Encontrado: 309.2424.

**(1S,3aR,7aR)-1-[(2S,4R)-4-(2-Hidroxi-2-metilpropil)-2-metiltetrahidro furan-2-il]-7a-metilhexahidro-1H-inden-4(2H)-ona (5).**



Una disolución de **35b** (100 mg, 0.32 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (10 mL) se trató con PDC (0.5 g, 1.3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 20 h. La mezcla obtenida, después de filtrar en placa porosa sobre capa de celita, se concentró a vacío. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>, 3x5.5 cm, 20% EtOAc/hexanos) para dar **5** [90 mg, 91%, R<sub>f</sub>=0.2 (50% EtOAc/hexanos), sólido blanco, p.f.: 82 °C].

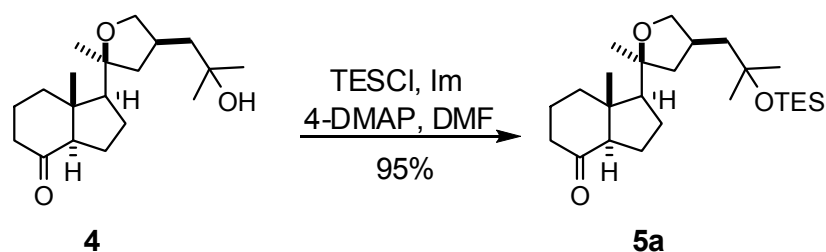
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.09 (t, 1H, J=7.9Hz, OCH<sub>2</sub>Cy), 3.32 (dd, 1H, J=8.5Hz, J=9.9Hz, CH<sub>2</sub>OCy), 1.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-OCH<sub>2</sub>), 1.20 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-COH), 0.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Cy).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 212.03 (C), 84.34 (C), 75.06 (CH<sub>2</sub>), 70.72 (C), 62.00 (CH), 59.64 (CH), 49.89 (C) 46.24 (CH<sub>2</sub>), 45.73 (CH<sub>2</sub>), 40.81 (CH<sub>2</sub>) 39.07 (CH<sub>2</sub>), 34.08 (CH), 30.04 (CH<sub>3</sub>), 29.77 (CH<sub>3</sub>), 27.58 (CH<sub>3</sub>), 23.88 (CH<sub>2</sub>), 22.52 (CH<sub>2</sub>), 18.74 (CH<sub>2</sub>), 14.12 (CH<sub>3</sub>).

**MS** [m/z, (%): 59.05 (1.72), 95.05 (0.38), 121.25 (19.58), 139.25 (49.71), 151.15 (0.41), 157.25 (100.00), 158.20 (5.27), 275.30 (3.20), 293.35 (18.05).

**HRMS:** Calculado para [C<sub>19</sub>H<sub>33</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> [(M+H)<sup>+</sup>]: 309.2424. Encontrado: 309.2424.

**(1*S*,3*aR*,7*aR*)-7*a*-Metil-1-[(2*S*,4*R*)-2-metil-4-(2-metil-2-(trietilsililoxi) propil) tetrahidrofuran-2-il] hexahidro-1*H*-inden-4(2*H*)-ona (**5a**).**



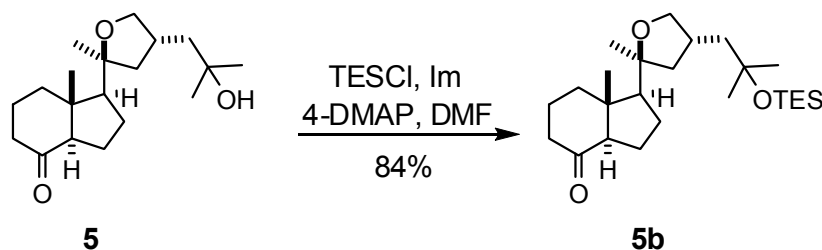
Cloruro de trietilsililo (TESCl, 542 mg, 3.6 mmol) se añadió sobre una disolución de la cetona **4** (370 mg, 1.2 mmol), 4-DMAP (85 mg, 0.7 mmol) e imidazol (234 mg, 3.4 mmol) en DMF seca (6 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 7 h. La reacción se detuvo por adición de NH<sub>4</sub>Cl saturado (10 mL). La mezcla se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3x20 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró de manera habitual y el residuo obtenido se purificó por cromatografía rápida (SiO<sub>2</sub>, 1.5x20 cm, 15% EtOAc/hexanos) para dar **5a** [480 mg, 95%, R<sub>f</sub>=0.8 (30% EtOAc/hexanos), aceite incoloro].

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.06 (t, J=7.90 Hz, 1H, THFO-CH<sub>H</sub>), 3.31 (dd, J=9.82, 8.47 Hz, 1H, THFO-CH<sub>H</sub>), 1.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-OCH<sub>2</sub>), 1.17 (d, J=1.10 Hz, 6H, H<sub>3</sub>C-COH-CH<sub>3</sub>), 0.89 (t, J=7.75 Hz, 6H, TES-CH<sub>2</sub>), 0.76 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 0.55 (q, J=7.90 Hz, 9H, TES-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 211.99 (O=C), 83.92 (C-OTES), 73.32 (O-CH<sub>2</sub>), 73.07 (C-THF), 62.01 (CH), 59.95 (CH), 50.04 (C<sub>13</sub>), 48.55 (CH<sub>2</sub>), 46.62 (CH<sub>2</sub>), 40.85 (CH<sub>2</sub>), 39.14 (CH<sub>2</sub>), 35.86 (CH), 30.63 (H<sub>3</sub>C-COTES), 29.90 (H<sub>3</sub>C-COTES), 28.02 (H<sub>3</sub>C<sub>21</sub>), 23.91 (CH<sub>2</sub>), 22.66 (CH<sub>2</sub>), 18.80 (CH<sub>2</sub>), 13.53 (H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 7.05 (TES-CH<sub>3</sub>), 6.68 (Si-CH<sub>2</sub>).

**MS** [m/z, (%): 75.05 (25.87), 83.05 (19.97), 139.20 (30.50), 161.20 (11.43), 173.20 (29.66), 271.30 (100.00), 272.30 (20.75), 273.30 (11.61), 275.25 (2.21), 335.45 (3.92), 393.45 (1.63), 407.55 (0.22).

**(1S,3aR,7aR)-7a-Metil-1-[(2S,4S)-2-metil-4-(2-metil-2-(triethylsililoxi) propil) tetrahidrofurano-2-il] hexahidro-1H-inden-4(2H)-ona (5b).**



Cloruro de trietilsililo (TESCl, 142 mg, 0.94 mmol) se añadió sobre una disolución de la cetona **5** (116 mg, 0.376 mmol), 4-DMAP (30 mg, 0.75 mmol) e imidazol (62 mg, 0.90 mmol) en DMF seca (5 mL). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 7 h. La reacción se detuvo por adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturado (10 mL). La mezcla se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x20 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró de manera habitual y el residuo obtenido se purificó por cromatografía rápida en columna ( $\text{SiO}_2$ , 1.5x20 cm, 15% EtOAc/hexanos) para dar **5b** [133 mg, 84%,  $R_f=0.8$  (30% EtOAc/hexanos), sólido blanco, p.f.: 32 °C].

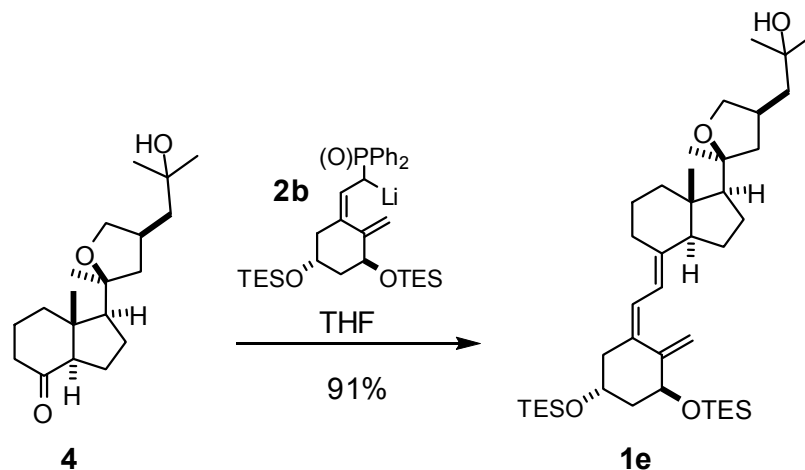
**Análisis elemental** (%): Calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{O}_3\text{Si}$ : C (71.03), H (10.97). Encontrado: C (70.70), H (11.03).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 4.07 (t,  $J=7.97$  Hz, 1H, THFO- $\text{CHH}$ ), 3.30 (dd,  $J=9.83$ , 8.54 Hz, 1H, THFO- $\text{CHH}$ ), 1.21 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-C-OCH}_2$ ), 1.18 (d,  $J=1.05$  Hz, 6H,  $\text{H}_3\text{C-COH-CH}_3$ ), 0.91 (t,  $J=7.83$  Hz, 6H, TES- $\text{CH}_2$ ), 0.74 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_{18}$ ), 0.54 (q,  $J=7.94$  Hz, 9H, TES- $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 211.83 (O=C), 83.99, (C-OTES), 75.19 ( $\text{H}_2\text{C-O}$ ), 73.02 (C-THF), 62.03 (CH), 59.77 (CH), 49.87 ( $\text{C}_{13}$ ), 47.83 ( $\text{CH}_2$ ), 45.83 ( $\text{CH}_2$ ), 40.83 ( $\text{CH}_2$ ), 39.14 ( $\text{CH}_2$ ), 34.13 (CH), 30.59 ( $\text{H}_3\text{C-COTES}$ ), 29.96 ( $\text{H}_3\text{C-COTES}$ ), 27.45 ( $\text{H}_3\text{C}_{21}$ ), 23.89 ( $\text{CH}_2$ ), 22.56 ( $\text{CH}_2$ ), 18.78 ( $\text{CH}_2$ ), 14.14 ( $\text{H}_3\text{C}_{18}$ ), 7.04 (TES- $\text{CH}_3$ ), 6.66 (Si- $\text{CH}_2$ ).

**MS** [ $m/z$ , (%): 83.10 (9.52), 139.20 (21.41), 161.20 (8.81), 173.25 (23.25), 271.30 (100.00), 272.30 (22.51), 273.30 (12.34), 275.35 (3.51), 335.40 (2.97), 393.45 (0.31), 407.50 (2.10).

**2-Metil-1-((3S,5S)-5-metil-5-((1S,3aS,7aS,E)-7a-metil-4-((Z)-2-((3S,5R)-2-metileno-3,5-bis(trietilsililoxi)cyclohexilidene)etilidene)octahidro-1H-inden-1-il)tetrahidrofuran-3-il)propan-2-ol (1e).**

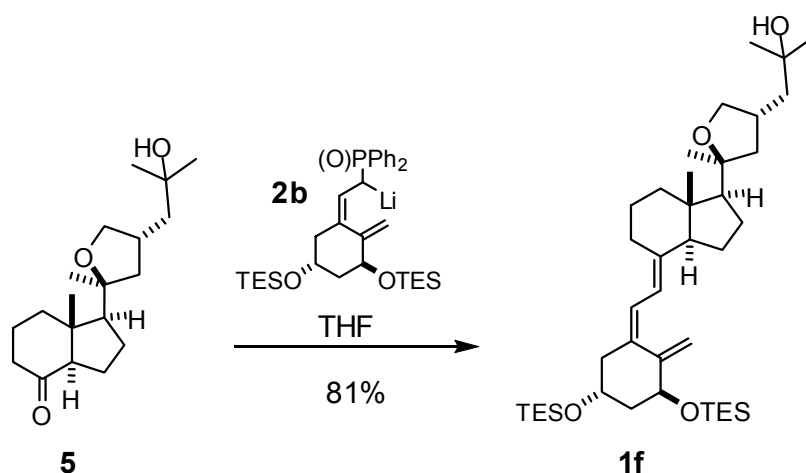


Una disolución de  $n\text{BuLi}$  en hexanos (0.74 mL, 1.68 mmol, 2.25 M) se añadió vía jeringa sobre una disolución del óxido de fosfina **2** (1.045 g, 1.8 mmol) en THF seco a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ . La disolución roja oscura se agitó durante 1 h. Una disolución de la cetona **4** (120 mg, 0.39 mmol) en THF seco se adicionó gota a gota sobre la disolución anterior. La mezcla de reacción se agitó en ausencia de luz a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 h y a  $-55\text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 h. La reacción se detuvo por adición de  $\text{H}_2\text{O}$  (8 mL) y  $\text{EtOAc}$  (15 mL). La concentración de la mezcla dio un residuo que se disolvió en  $\text{Et}_2\text{O}$  (100 mL). La fase acuosa se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x50 mL). La fase orgánica combinada se lavó con disoluciones saturadas de  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL) y  $\text{NaCl}$  (50 mL) y después con  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL). El residuo obtenido después de secar, filtrar y concentrar, se purificó por cromatografía rápida en columna ( $\text{SiO}_2$ , 3x15 cm, 40%  $\text{Et}_2\text{O}$ /hexanos) para dar el análogo protegido **1e** [150 mg, 91%,  $R_f=0.7$  (50%  $\text{EtOAc}$ /hexanos), aceite incoloro].

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 6.20 (d, 1H,  $J=11.2\text{Hz}$ ,  $\underline{\text{H}}\text{-C=}$ ), 6.00 (d, 1H,  $J=11.2\text{Hz}$ ), 5.19 (d, 1H,  $J=2\text{Hz}$ ,  $\underline{\text{H}}\text{-C=}$ ), 4.8 (d, 1H,  $J=2\text{Hz}$ ,  $\underline{\text{H}}_2\text{C=}$ ), 4.36 (t, 1H,  $J=4.9\text{Hz}$ ,  $\underline{\text{H}}\text{-COH}$  de C1), 4.16 (m, 1H,  $\underline{\text{H}}\text{C-OH}$ ), 4.03 (t, 1H,  $J=7.7\text{Hz}$ ,  $\text{OCH}_2\text{Cy}$ ), 3.34 (t, 1H,  $J=9.1\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2\text{OCy}$ ), 1.23 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_2$ ), 1.17 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{COH}$ ), 1.22 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-C-OCH}_2$ ), 0.92 (t, 18H,  $J=7.9\text{Hz}$ , 6 x  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-Si}$ ), 0.5-0.6 (m, 15H, 6 x  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{Si}$ ,  $\text{CH}_3\text{-Cy}$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 148.30 (C), 140.61 (C), 135.04 (C), 123.07 (CH), 118.16 (CH), 111.08 4.76 (CH<sub>2</sub>), 84.87 (C), (CH<sub>2</sub>), 73.12 (CH<sub>2</sub>), 71.35 (CH), 70.83 (C), 67.15 (CH), 59.92 (CH), 56.47 (CH), 47.05 (C), 47.05 (CH<sub>2</sub>), 46.96 (CH<sub>2</sub>), 45.92 (CH<sub>2</sub>), 44.96 (CH<sub>2</sub>), 40.76 (CH<sub>2</sub>), 35.85 (CH) 30.08 (CH<sub>3</sub>), 29.64 (CH<sub>3</sub>), 28.78 (CH<sub>2</sub>) 27.56 (CH<sub>3</sub>), 23.30 (CH<sub>2</sub>), 22.64 (CH<sub>2</sub>), 21.73 (CH<sub>2</sub>), 13.00 (CH<sub>3</sub>), 6.85 (CH<sub>3</sub>), 6.80 (CH<sub>3</sub>), 4.79 (CH<sub>2</sub>).

**2-Metil-1-((3R,5S)-5-metil-5-((1S,3aS,7aS,E)-7a-metil-4-((Z)-2-((3S,5R)-2-metilen-3,5-bis(trietilsililoxi)cyclohexiliden)etiliden) octahidro-1H-inden-1-il)tetrahidrofuran-3-il)propan-2-ol (1f)**

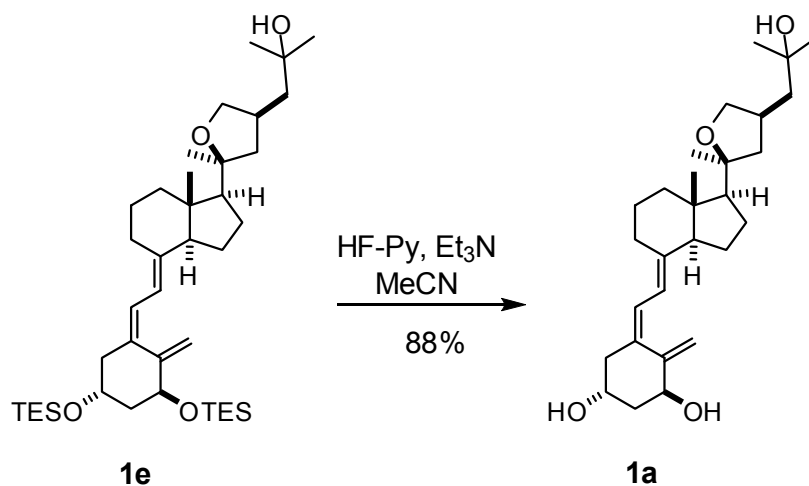


Una disolución de  $n\text{BuLi}$  en hexanos (0.55 mL, 1.23 mmol, 2.25 M) se añadió vía jeringa sobre una disolución del óxido de fosfina **2** (785 mg, 1.3 mmol) en THF seco a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ . La disolución roja oscura se agitó durante 1 h. Una disolución de la cetona **5** (88 mg, 0.28 mmol) en THF seco se adicionó gota a gota sobre la disolución anterior. La mezcla de reacción se agitó en ausencia de luz a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 h y a  $-55\text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 h. La reacción se detuvo por adición de  $\text{H}_2\text{O}$  (8 mL) y EtOAc (15 mL). La concentración de la mezcla dio un residuo que se disolvió en  $\text{Et}_2\text{O}$  (100 mL). La fase acuosa se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x50 mL). La fase orgánica combinada se lavó con disoluciones saturadas de  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL) y  $\text{NaCl}$  (50 mL) y después con  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL). El residuo obtenido después de secar, filtrar y concentrar, se purificó por cromatografía rápida en columna ( $\text{SiO}_2$ , 3x15 cm, 40%  $\text{Et}_2\text{O}$ /hexanos) para dar el análogo protegido **1f** [120 mg, 81%,  $R_f=0.7$  (50% EtOAc/hexanos), aceite incoloro].

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 6.23 (d, 1H, J=11.1Hz, -HC=CH-), 6.03 (d, 1H, J=11.1Hz, -HC=CH-), 5.21 (s, 1H, =CH<sub>2</sub>), 4.88 (s, 1H, =CH<sub>2</sub>), 4.39 (t, 1H, J=4.9Hz, HC1), 4.18 (m, 1H, HC-OH), 4.10 (t, J=7.8Hz, 1H, CH<sub>2</sub>OCy), 3.34 (t, J=8.9Hz, 1H, CH<sub>2</sub>OCy), 1.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-CH<sub>2</sub>), 1.21 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-COH), 0.94 (t, 18H, J=7.8Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-Si), 0.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.60 (q, J=7.5Hz, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>Si), 0.59 (q, J=7.8Hz, 6H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 148.29 (C), 140.62 (C), 135.05 (C), 123.07 (CH), 118.20 (CH), 111.10 (CH<sub>2</sub>), 85.06 (C), 74.89 (CH<sub>2</sub>), 71.37 (CH), 70.79 (C), 67.14 (CH), 59.86 (CH), 56.48 (CH), 46.39 (C), 46.02 (CH<sub>2</sub>), 45.90 (CH<sub>2</sub>), 45.81 (CH<sub>2</sub>), 44.96 (CH<sub>2</sub>), 40.75 (CH<sub>2</sub>), 34.20 (CH) 30.02 (CH<sub>3</sub>), 29.74 (CH<sub>3</sub>), 28.76 (CH<sub>2</sub>), 27.15 (CH<sub>3</sub>), 23.32 (CH<sub>2</sub>), 22.67 (CH<sub>2</sub>), 21.75 (CH<sub>2</sub>), 13.51 (CH<sub>3</sub>), 6.84 (CH<sub>3</sub>), 6.79 (CH<sub>3</sub>), 4.79 (CH<sub>2</sub>), 4.76 (CH<sub>2</sub>).

**(1R,3S,Z)-5-((E)-2-((1S,3aS,7aS)-1-((2S,4S)-4-(2-Hidroxi-2-metilpropil)-2-metiltetrahidrofuran-2-il)-7a-metildihidro-1H-inden-4(2H,5H,6H,7H,7aH)-iliden)etiliden)-4-metilenocyclohexan-1,3-diol (1a)**



HF-Py (0.4 mL) se adicionó a una disolución de **1e** (134 mg, 0.2 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (2.5 mL) y Et<sub>3</sub>N (1.5 mL). Después de 10 min, la reacción se detuvo por adición de una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 mL). La mezcla se extrajo con Et<sub>2</sub>O (2x20 mL). La fase orgánica combinada se lavó con NaCl saturado (25 mL) y H<sub>2</sub>O (25 mL) y luego se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>, 1.5x9.5 cm, 50% EtOAc/hexanos) para

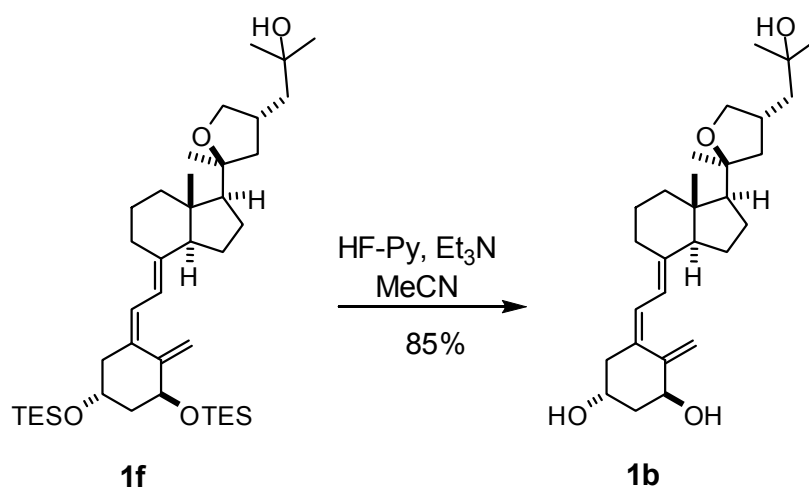
dar el análogo de la vitamina D<sub>3</sub> **1a** [80 mg, 88%, Rf=0.2 (EtOAc), sólido blanco, p.f.: 128 °C].

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 6.32 (d, 1H, J=11.1, =CH-HC=), 5.98 (d, 1H, J=11.1, =CH-HC=), 5.29 (s, 1H, H<sub>2</sub>C=C), 4.95 (s, 1H, H<sub>2</sub>C=C), 4.37 (m, 1H, HC-OH), 4.17 (m, 1H, HC-OH), 4.03 (t, 1H, J=7.7Hz, C-O-CH<sub>2</sub>), 3.34 (t, 1H, J=9.1Hz, C-O-CH<sub>2</sub>), 1.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-O-CH<sub>2</sub>-), 1.18 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-C-OH), 0.62 (s, 3H, Cy-CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 147.66 (C), 142.49 (C), 133.24 (C), 124.65 (CH), 117.38 (CH), 111.54 (CH<sub>2</sub>), 84.93 (C), 73.08 (CH<sub>2</sub>), 70.90 (CH), 70.40 (C), 66.68 (CH), 59.86 (CH), 56.44 (CH), 47.06 (CH<sub>2</sub>), 46.82 (CH<sub>2</sub>), 46.05 (C), 45.02 (CH<sub>2</sub>), 42.76 (CH<sub>2</sub>), 40.62 (CH<sub>2</sub>), 35.82 (CH) 30.09 (CH<sub>3</sub>), 29.63 (CH<sub>3</sub>), 28.94 (CH<sub>2</sub>) 27.58 (CH<sub>3</sub>), 23.36 (CH<sub>2</sub>), 22.62 (CH<sub>2</sub>), 21.91 (CH<sub>2</sub>), 13.12 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS:** Calculado para [C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup> [(M+H)<sup>+</sup>]: 445.3312. Encontrado: 445.3312.

**(1R,3S,Z)-5-((E)-2-((1S,3aS,7aS)-1-((2S,4R)-4-(2-Hidroxi-2-metilpropil)-2-metiltetrahidrofuran-2-il)-7a-metildihidro-1H-inden-4(2H,5H,6H,7H,7aH)-iliden)etiliden)-4-metilenociclohexan-1,3-diol (1b).**



HF-Py (0.4 mL) se adicionó a una disolución de **1f** (117 mg, 0.17 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (2.5 mL) y Et<sub>3</sub>N (1.5 mL). Después de 10 min, la reacción se detuvo por adición de una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 mL). La mezcla se extrajo con Et<sub>2</sub>O (2x20 mL). La fase orgánica combinada se lavó con NaCl saturado (25 mL) y

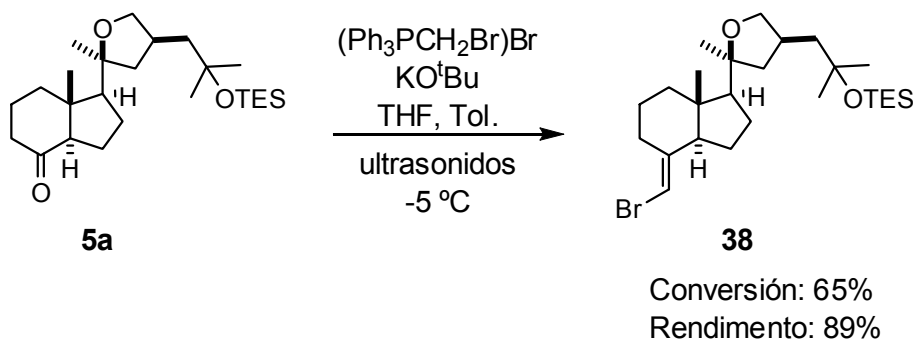
H<sub>2</sub>O (25 mL) y luego se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO<sub>2</sub>, 1.5x11 cm, 50% EtOAc/hexanos) para dar el análogo de la vitamina D<sub>3</sub> **1b** [60 mg, 85%, R<sub>f</sub>=0.2 (EtOAc), sólido blanco, p.f.: 96 °C].

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 6.36 (d, 1H, J=11.3, =CH-HC=), 6.01 (d, 1H, J=11.3, =CH-HC=), 5.32 (s, 1H, H<sub>2</sub>C=C), 4.99 (s, 1H, H<sub>2</sub>C=C), 4.44 (m, 1H, HC-OH), 4.22 (m, 1H, HC-OH), 4.11 (t, 1H, J=7.9Hz, C-O-CH<sub>2</sub>), 3.34 (dd, 1H, J=8.5, 9.7Hz, C-O-CH<sub>2</sub>), 1.22 (s, 9H, 2 x CH<sub>3</sub>-C-OH, CH<sub>3</sub>-C-O-CH<sub>2</sub>-), 0.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 147.65 (C), 142.72 (C), 133.08 (C), 124.82 (CH), 117.38 (CH), 111.62 (CH<sub>2</sub>), 85.10 (C), 74.97 (CH<sub>2</sub>), 70.93 (CH), 70.58 (C), 66.80 (CH), 59.84 (CH), 56.50 (CH), 46.36 (C), 46.36 (CH<sub>2</sub>), 46.00 (CH<sub>2</sub>), 45.11 (CH<sub>2</sub>), 42.79 (CH<sub>2</sub>), 40.64 (CH<sub>2</sub>), 34.22 (CH), 30.08 (CH<sub>3</sub>), 29.78 (CH<sub>3</sub>), 28.96 (CH<sub>2</sub>), 27.26 (CH<sub>3</sub>), 23.41 (CH<sub>2</sub>), 22.64 (CH<sub>2</sub>), 21.97 (CH<sub>2</sub>), 13.64 (CH<sub>3</sub>).

**HRMS:** Calculado para [C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup> [(M+H)<sup>+</sup>]: 445.3312. Encontrado: 445.3312.

**1-((3R,5S)-5-((1S,3aR,7aS,E)-4-(Bromometileno)-7a-metiloctahidro-1H-inden-1-il)-5-metiltetrahidrofurano-3-il)-2-metilpropan-2-iloxi}trietilsilano (**38**).**



Una suspensión de (Ph<sub>3</sub>PCH<sub>2</sub>Br)Br (1.832 g, 4.2 mmol) en tolueno (45 mL) se sometió a la acción de ultrasonidos durante 3x15 min. El tubo de reacción se pasó a un baño enfriado a -5 °C. Se añadió una disolución de KO<sup>t</sup>Bu (471 mg, 4.2 mmol) en THF (3 mL). Después de agitar la suspensión amarillo-oscuro a -5 °C durante 1 h, se añadió la cetona **5a** (115 mg, 0.272 mmol) en THF (2 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -5 °C. La reacción se detuvo por

adición de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturado (1 mL). La mezcla se filtró a través de una placa filtrante provista de doble capa de gel de silica y celita. Los sólidos se lavaron con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x20 mL). La concentración condujo a un residuo que se purificó por cromatografía rápida en columna ( $\text{SiO}_2$ , 2.5x12 cm, 5%  $\text{Et}_2\text{O}$ -hexanos) para dar **38** [60 mg, 89%, 65% conversión,  $R_f=0.5$  (10%  $\text{EtOAc}$ /hexanos), aceite incoloro] y sustancia de partida **5a** (40 mg).

**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 5.63 (s, 1H,  $\text{HC}=\text{C}$ ), 4.05 (dd,  $J=7.78$  Hz, 1H, O- $\text{CHH}$ ), 3.36 (dd,  $J=9.88$ , 8.92 Hz, 1H, O- $\text{CHH}$ ), 1.25 (s, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_{21}$ ), 1.19 (s, 6H,  $\text{H}_3\text{C-COH-CH}_3$ ), 0.93 (t,  $J=7.85$  Hz, 9H, Si- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.67 (d,  $J=3.83$  Hz, 3H,  $\text{H}_3\text{C}_{18}$ ), 0.57 (q,  $J=\text{Hz}$ , 9H, Si- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 144.90 ( $\text{C}=\text{CH}$ ), 97.53 ( $\text{C}=\text{CH}$ ), 84.32 (THF-C), 73.37 (THF- $\text{OCH}_2$ ), 73.13 (C-OTES), 59.32 (CH), 56.05 (CH), 48.67 ( $\text{CH}_2$ ), 47.06 ( $\text{CH}_2$ ), 45.69 (C), 40.08 ( $\text{CH}_2$ ), 35.90 (CH), 30.97 ( $\text{CH}_2$ ), 30.69 ( $\text{H}_3\text{C-COTES}$ ), 29.9 ( $\text{H}_3\text{C-COTES}$ ), 27.70 ( $\text{H}_3\text{C}_{21}$ ), 22.62 ( $\text{CH}_2$ ), 22.39 ( $\text{CH}_2$ ), 21.76 ( $\text{CH}_2$ ), 12.88 ( $\text{H}_3\text{C}_{18}$ ), 7.12 (Si- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 6.74 (Si- $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ).

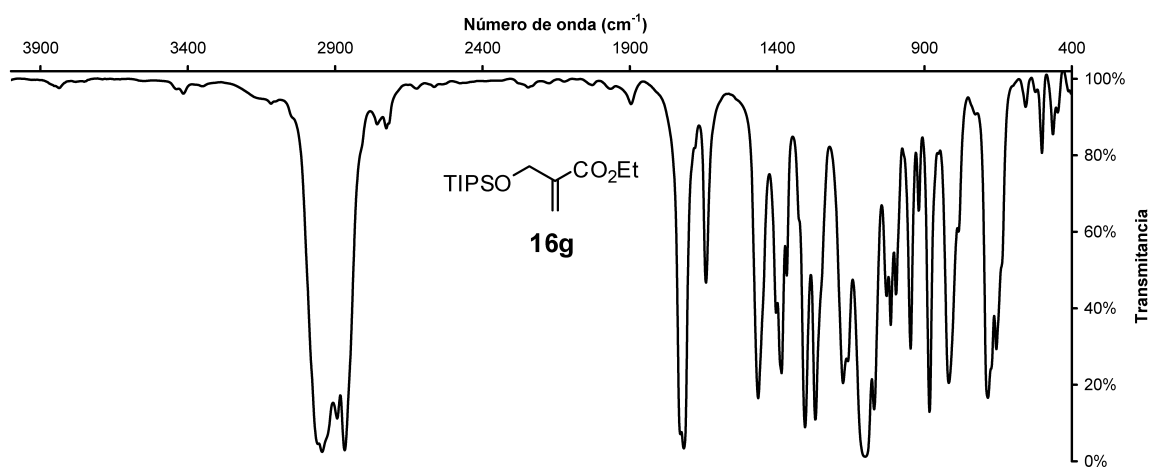
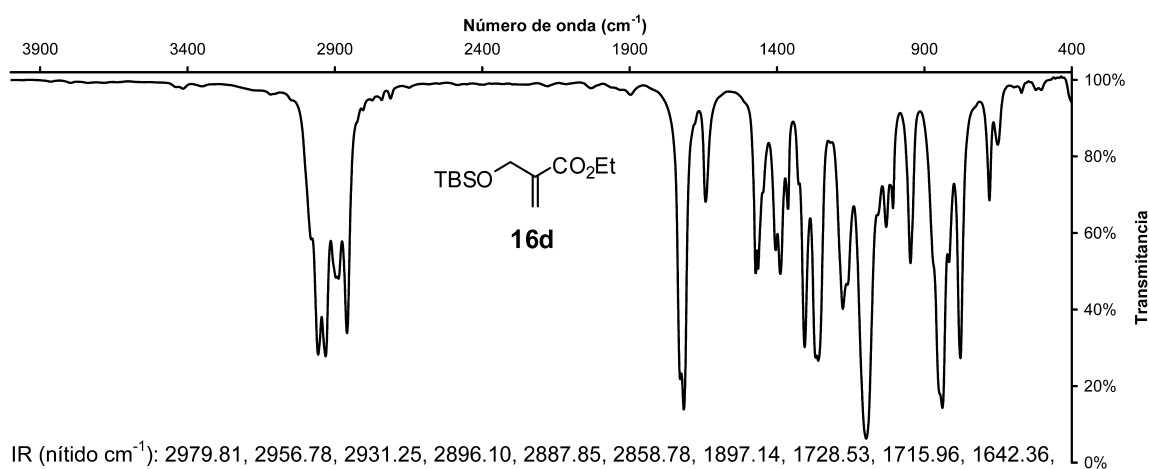
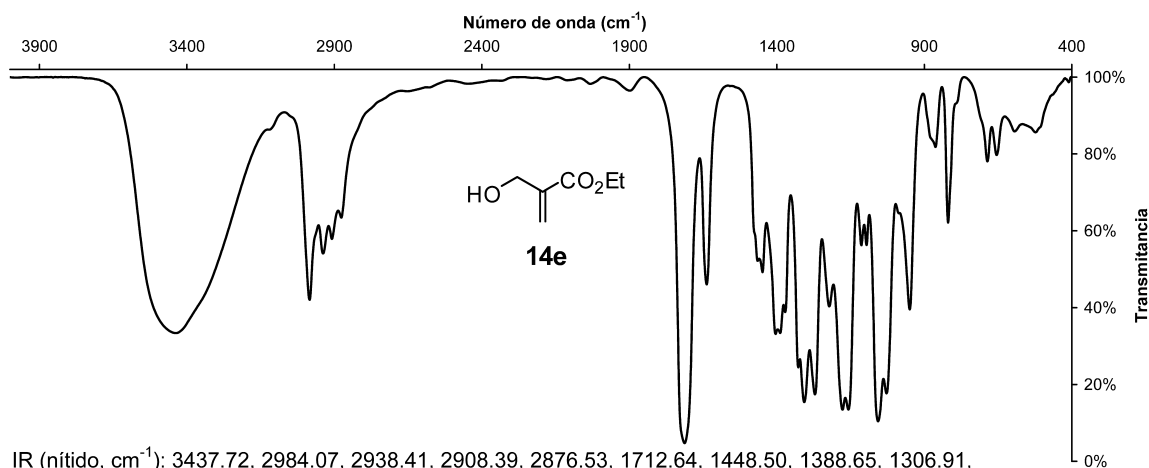
**MS** [m/z, (%): 75.00 (53.83), 83.00 (75.05), 103.00 (21.10), 121.10 (51.78), 139.15 (100.00), 161.15 (20.11), 173.15 (22.10), 213.15 (5.95), 225.00 (3.86), 227.00 (4.27), 271.20 (29.23), 272.20 (6.20).

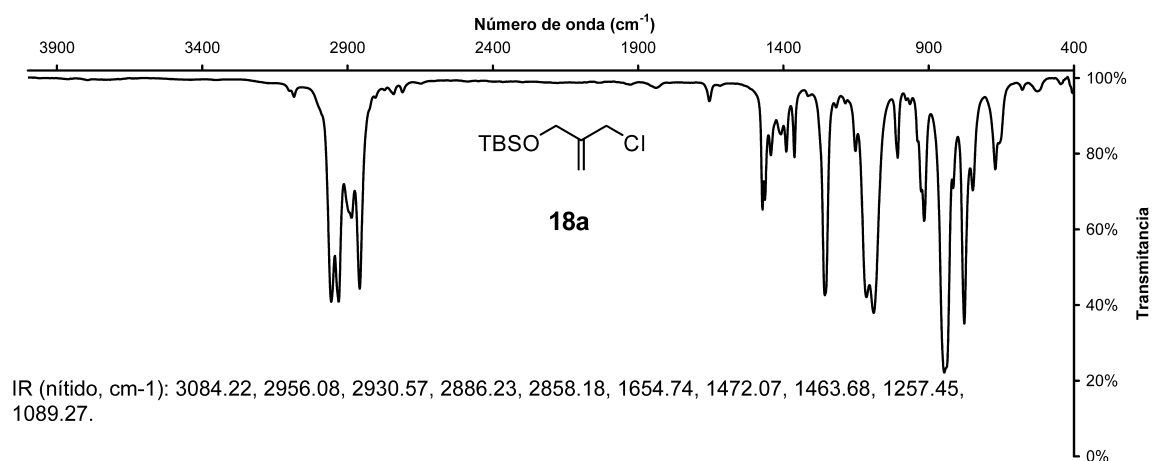
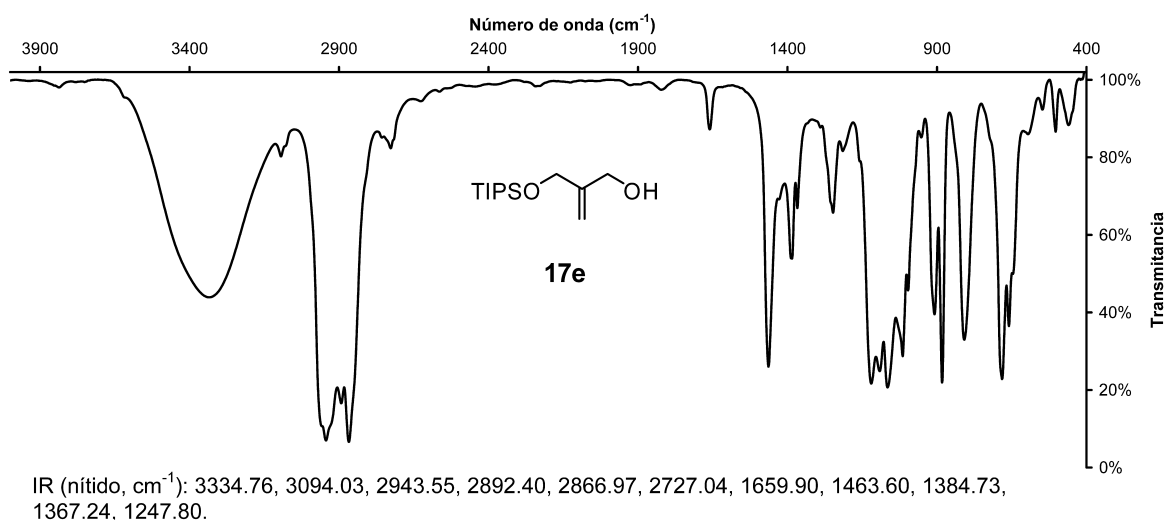
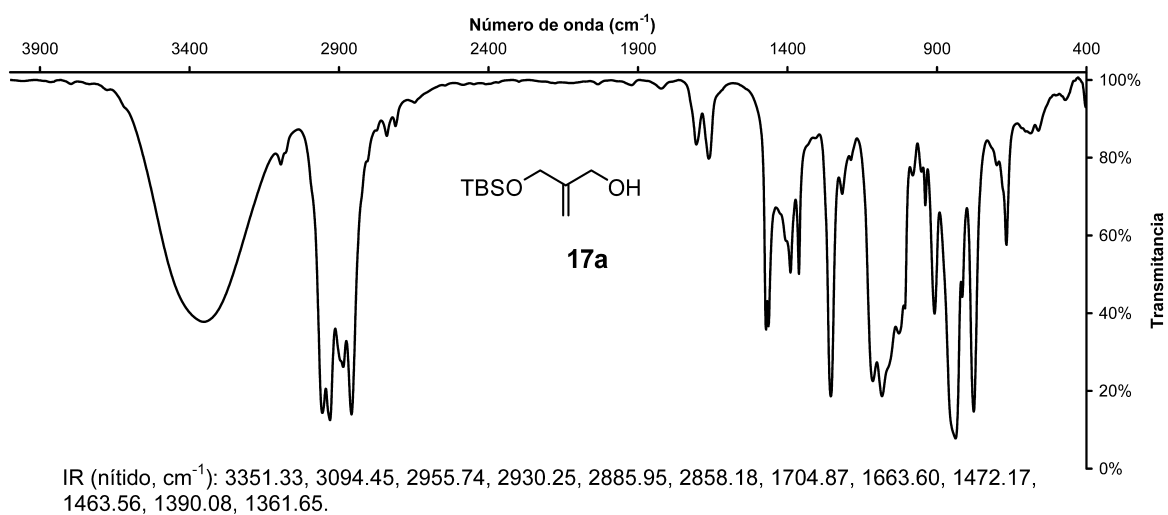
# **APÉNDICES**

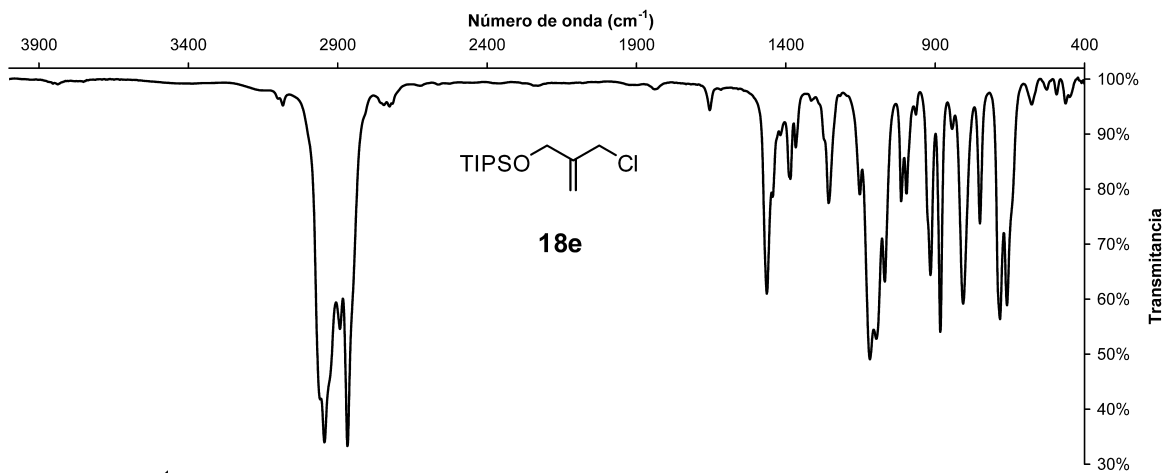


**IR**

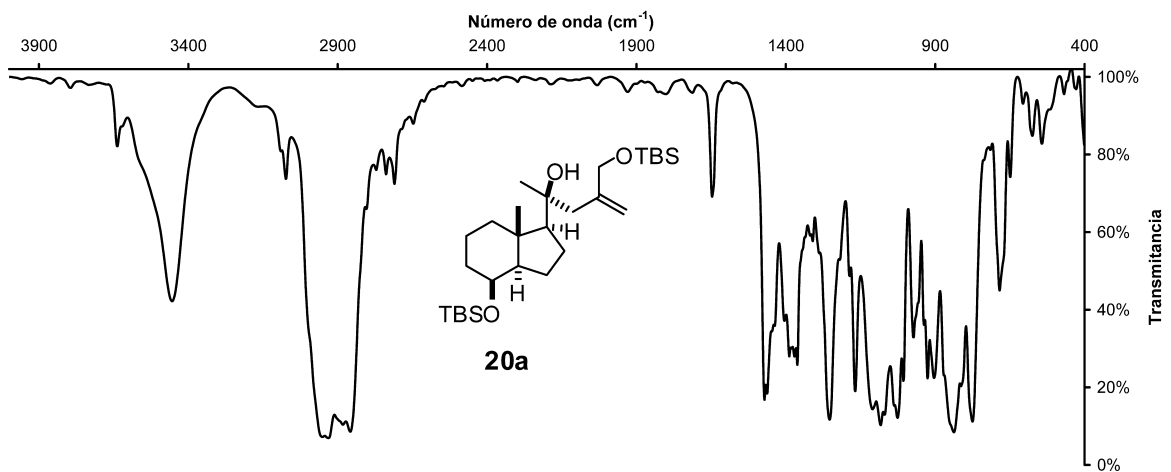




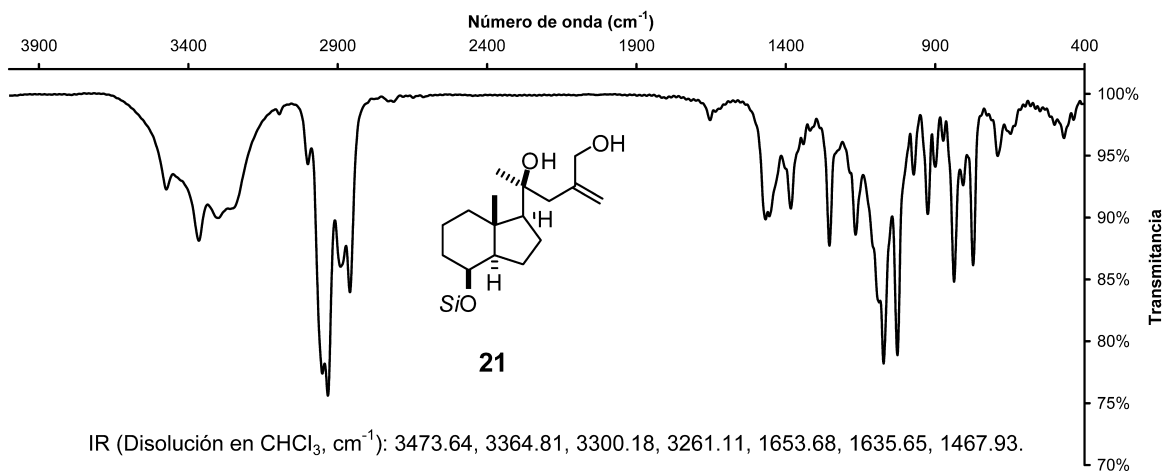




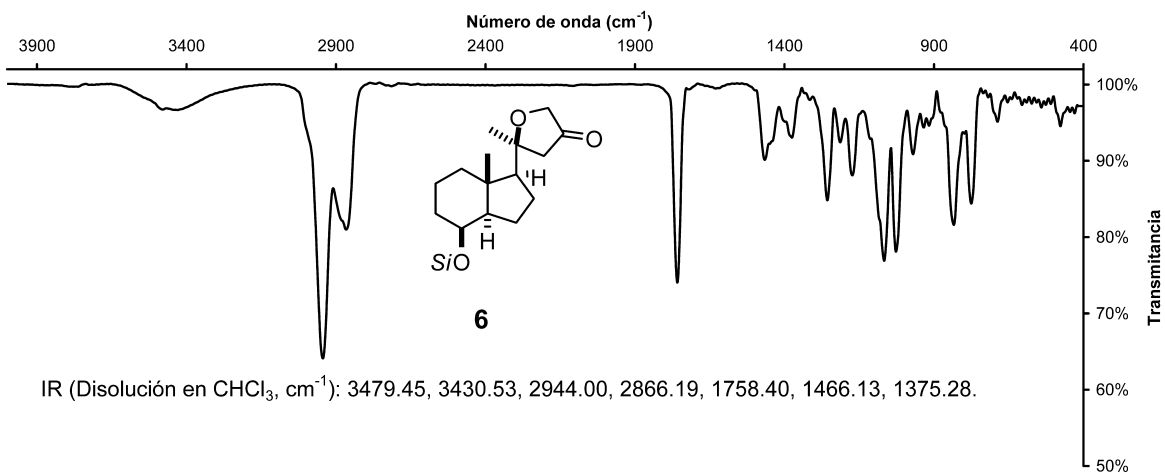
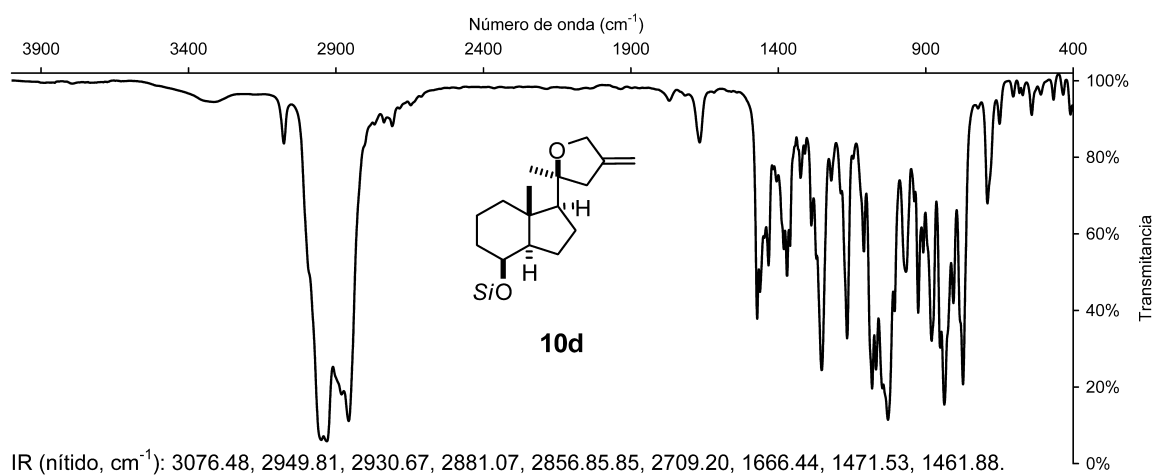
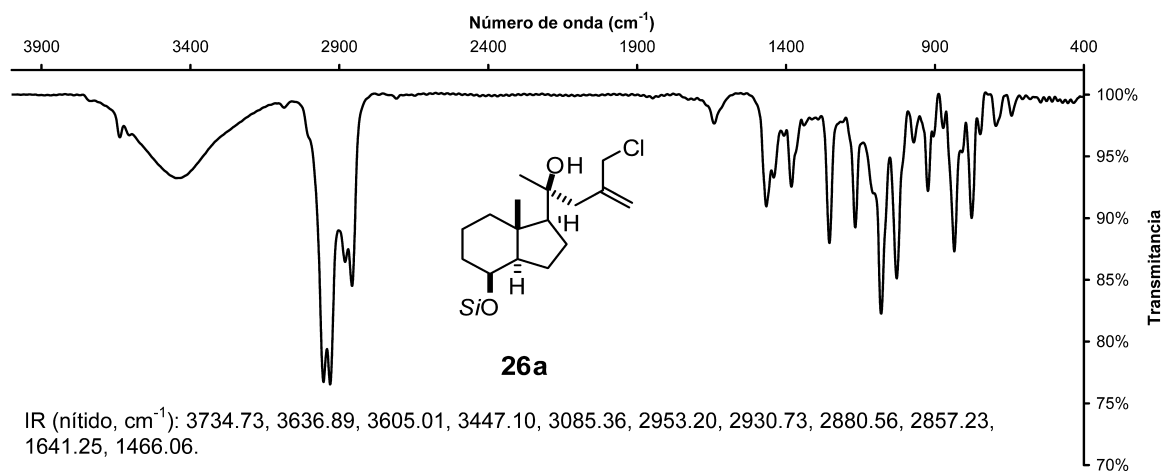
IR (nítido,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3083.65, 2958.47, 2944.29, 2892.51, 2867.11, 2745.35, 2726.80, 1654.66, 1463.56, 1256.71, 1118.55.

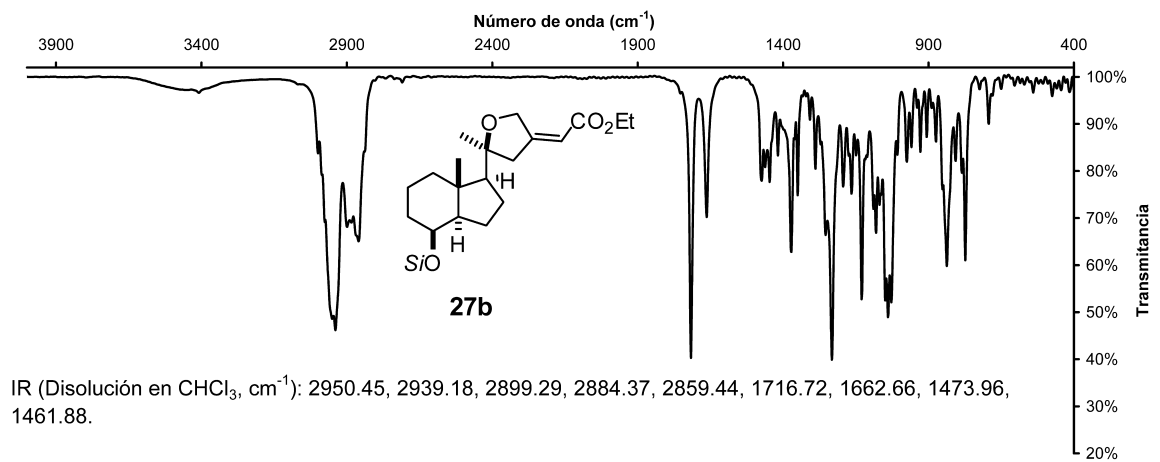
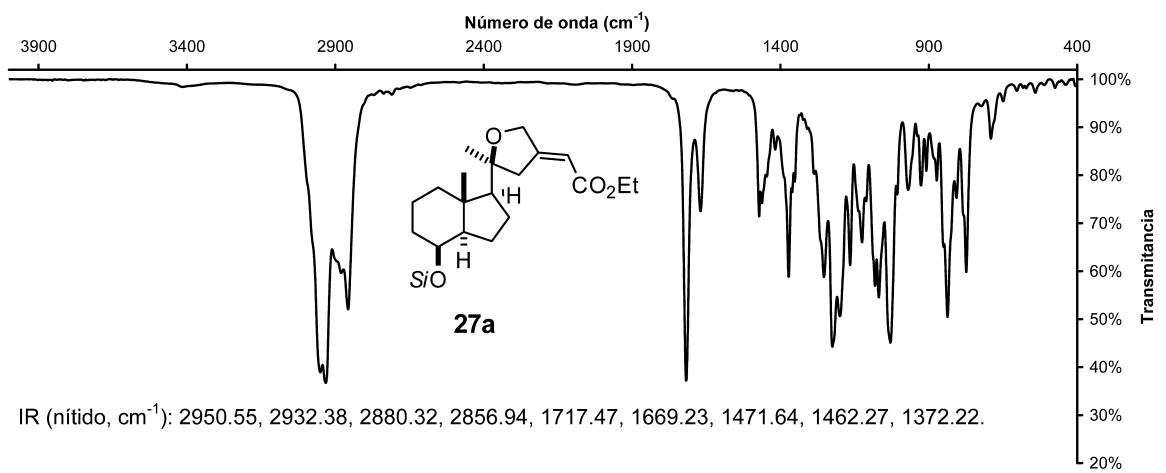
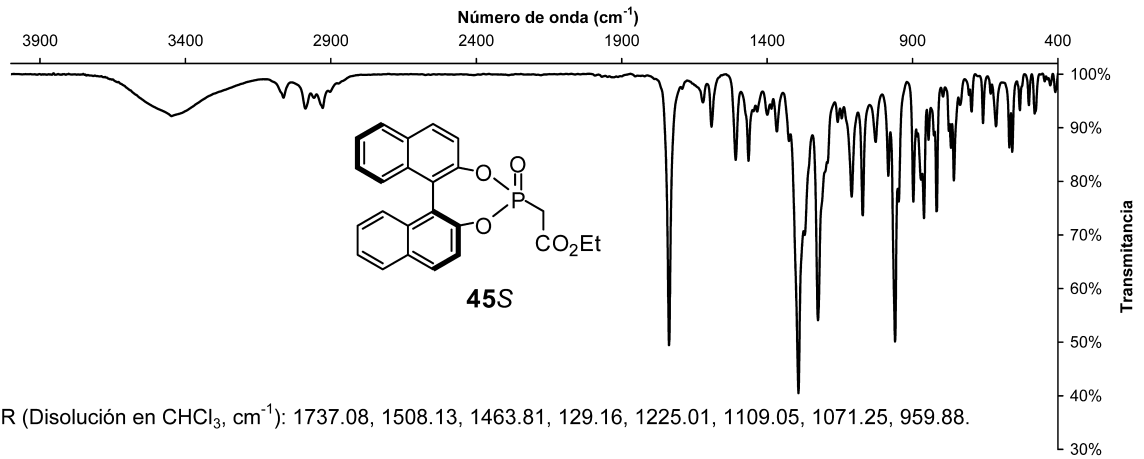


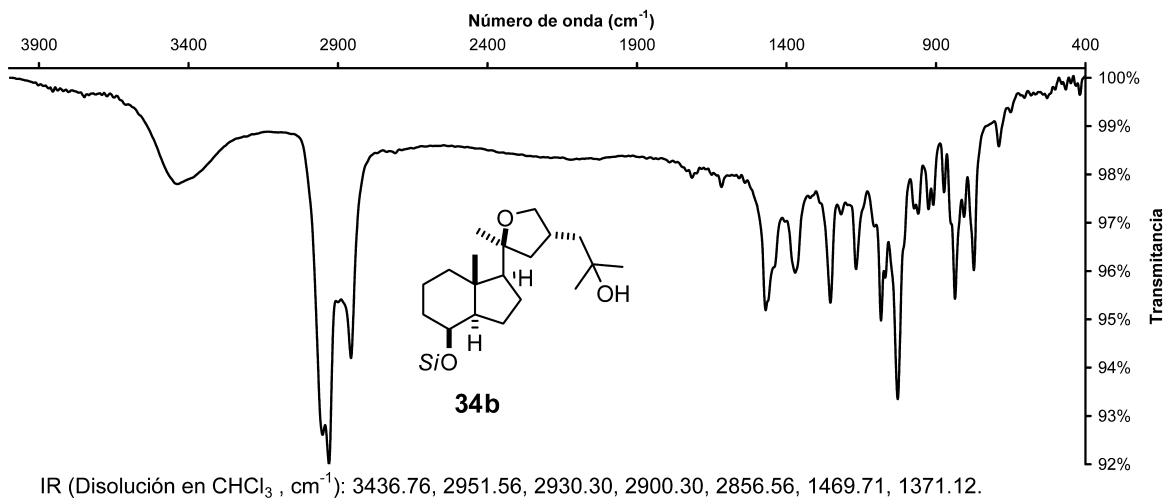
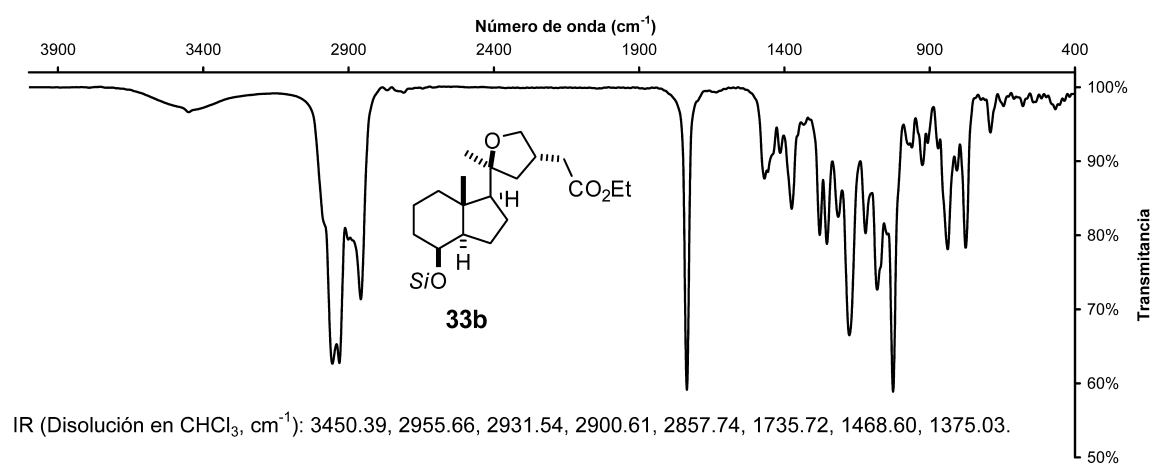
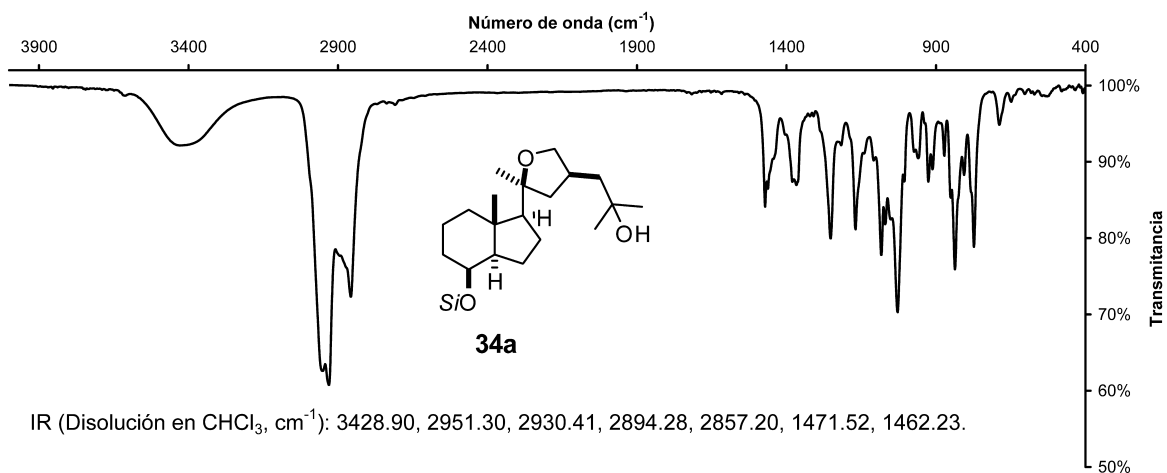
IR (nítido,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3454.43, 3073.36, 2951.02, 2930.84, 2882.80, 2857.78, 1646.76.

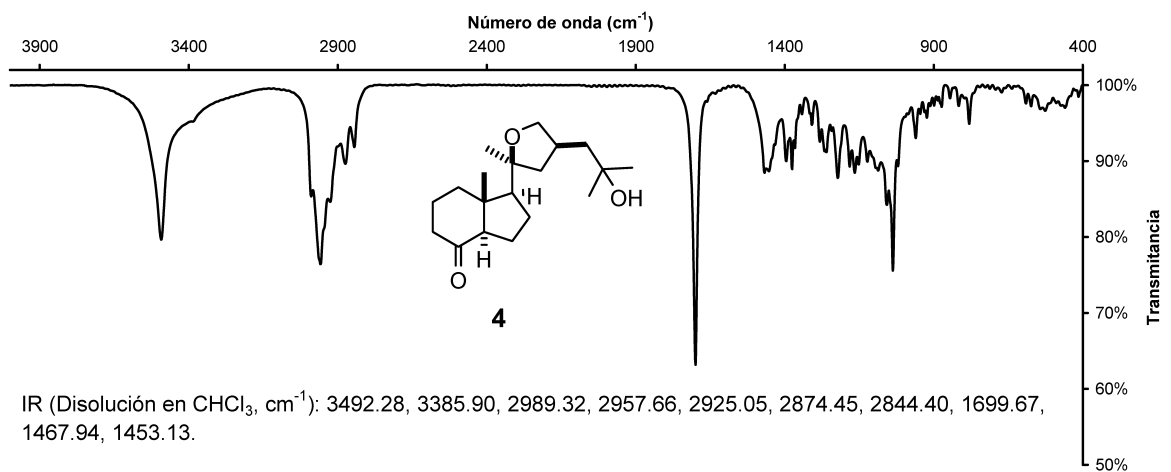
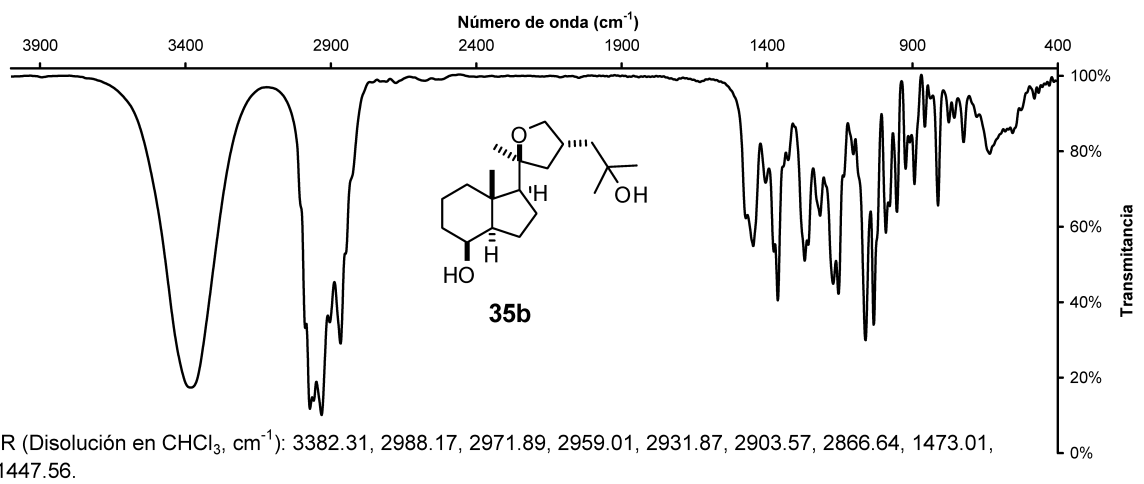
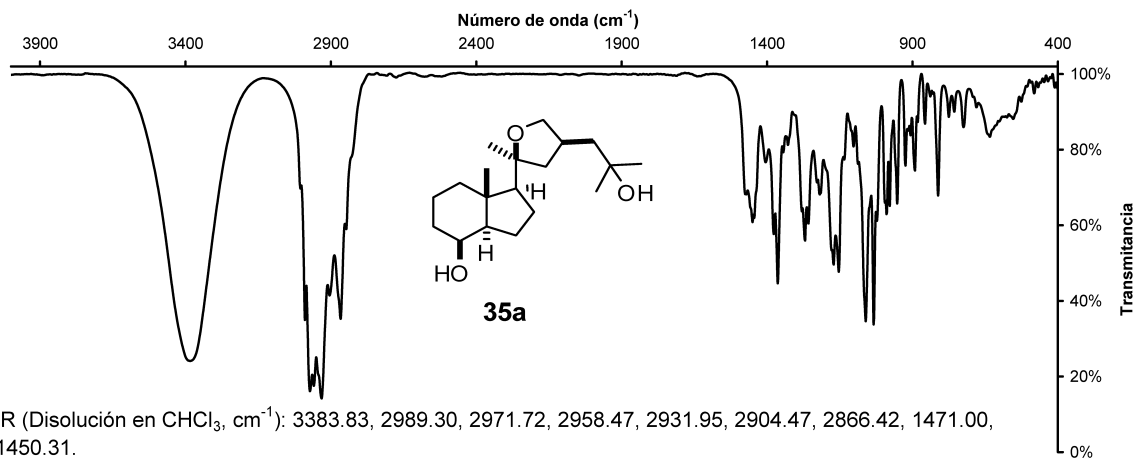


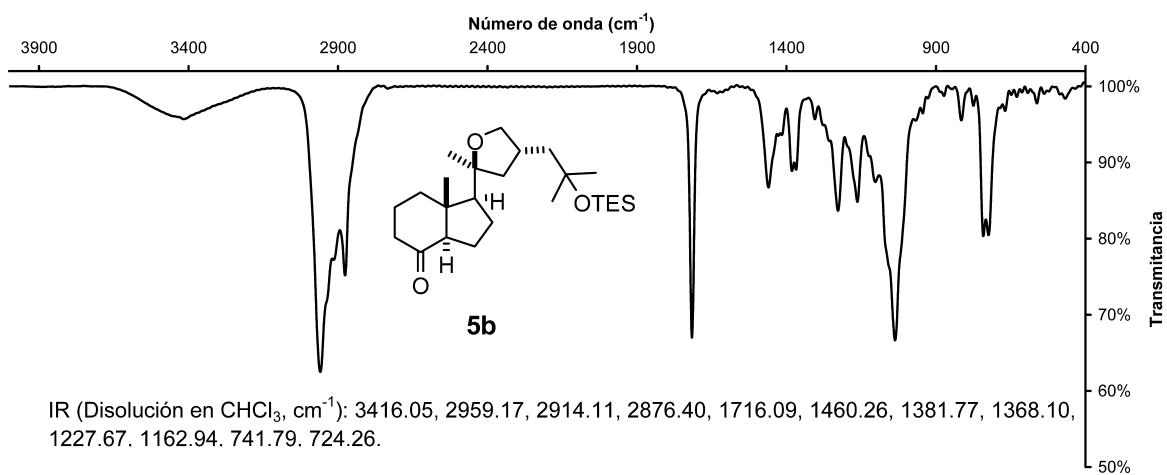
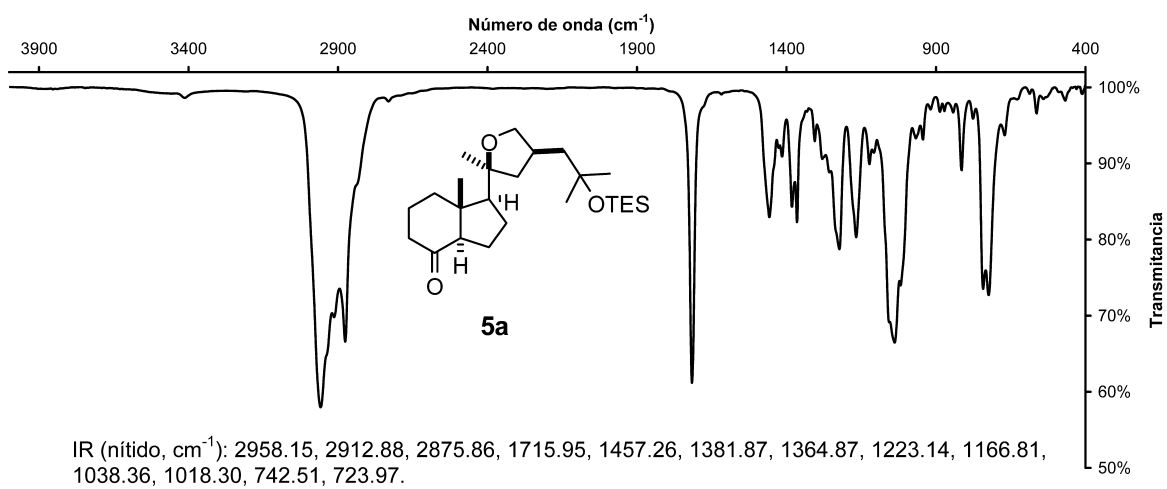
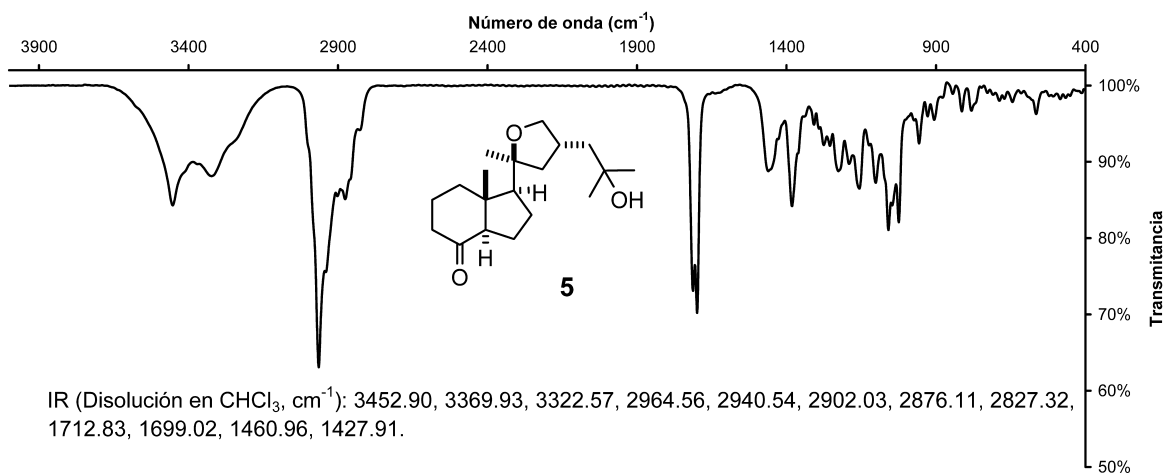
IR (Disolución en  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3473.64, 3364.81, 3300.18, 3261.11, 1653.68, 1635.65, 1467.93.

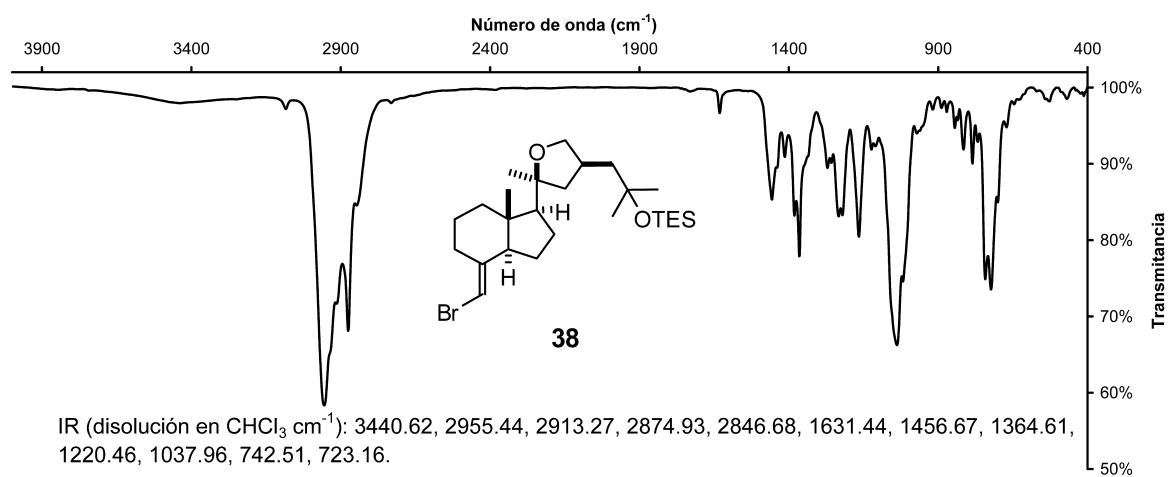








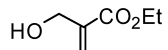




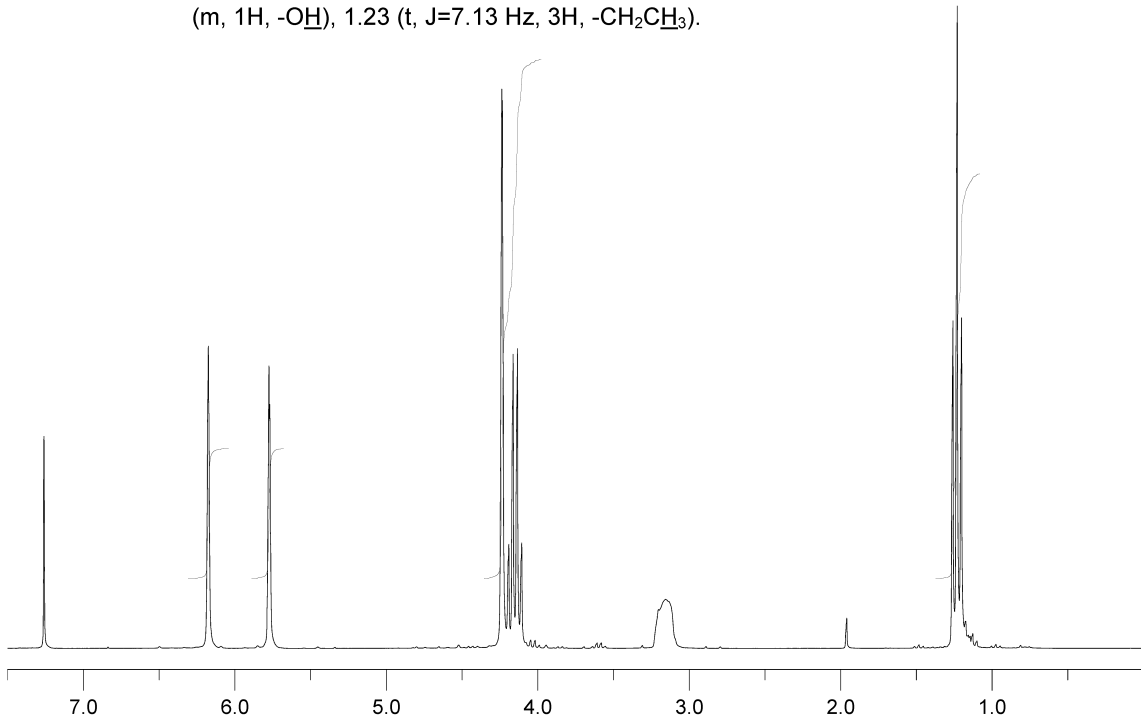


# **RMN**

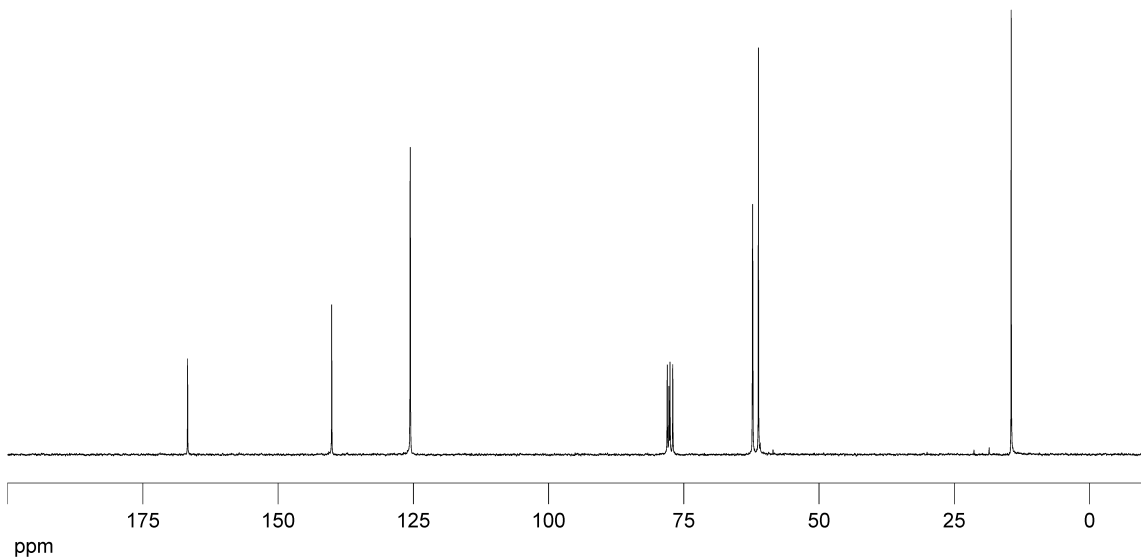


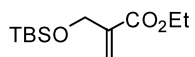
**14e**

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 6.17 (s, 1H, HC=), 5.80-5.75 (m, 1H, HC=), 4.24 (d, J=0.92 Hz, 2H, H<sub>2</sub>C-OH), 4.15 (q, J=7.13 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.26-3.05 (m, 1H, -OH), 1.23 (t, J=7.13 Hz, 3H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

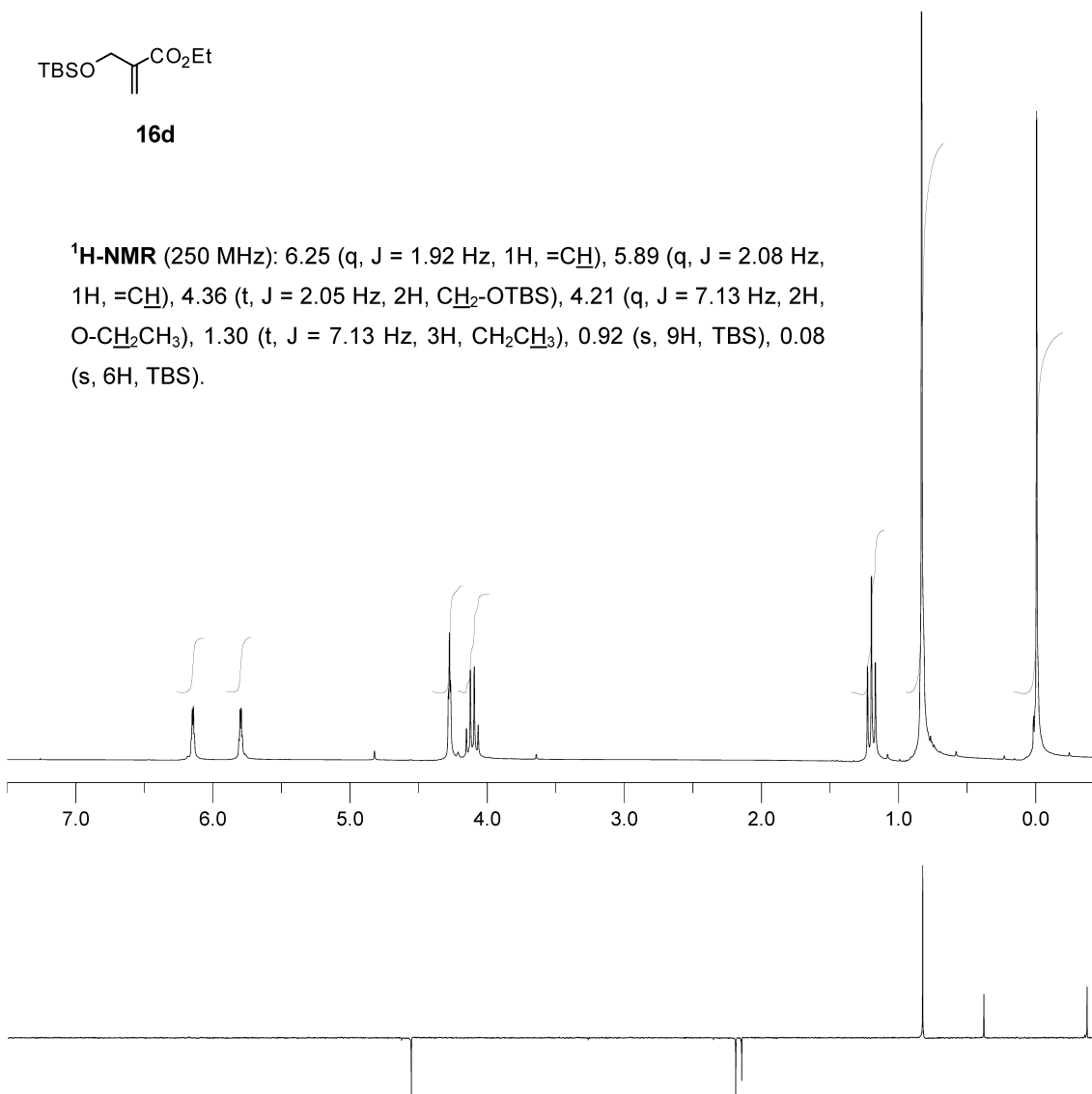


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 166.71 (C=O), 140.07 (C=CH<sub>2</sub>), 125.55 (C=CH<sub>2</sub>), 62.26 (O-CH<sub>2</sub>), 61.19 (O-CH<sub>2</sub>), 14.47 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

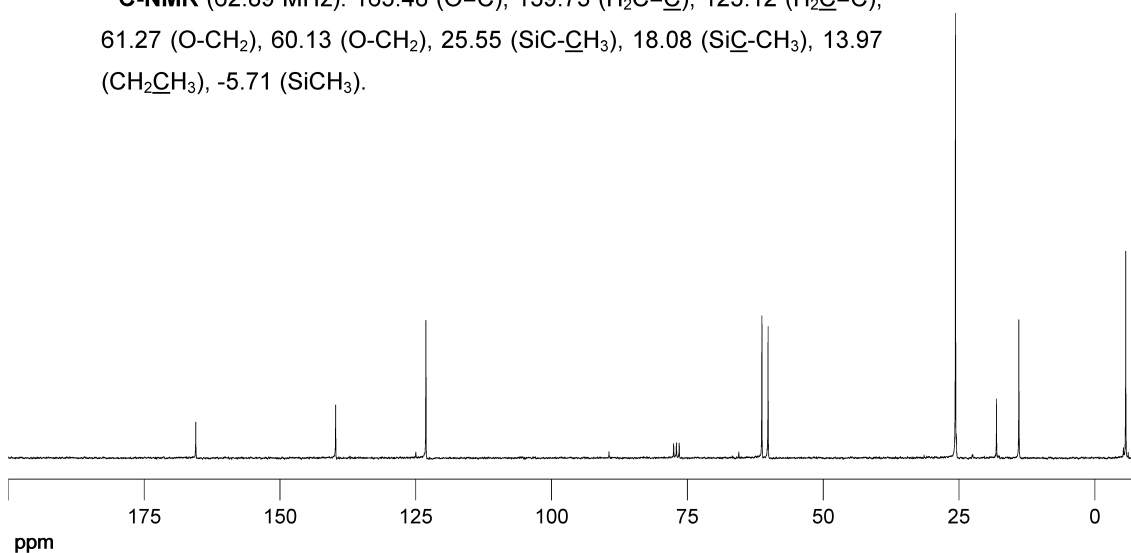


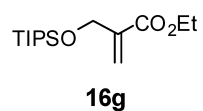
**16d**

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 6.25 (q, J = 1.92 Hz, 1H, =CH), 5.89 (q, J = 2.08 Hz, 1H, =CH), 4.36 (t, J = 2.05 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-OTBS), 4.21 (q, J = 7.13 Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.30 (t, J = 7.13 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.92 (s, 9H, TBS), 0.08 (s, 6H, TBS).

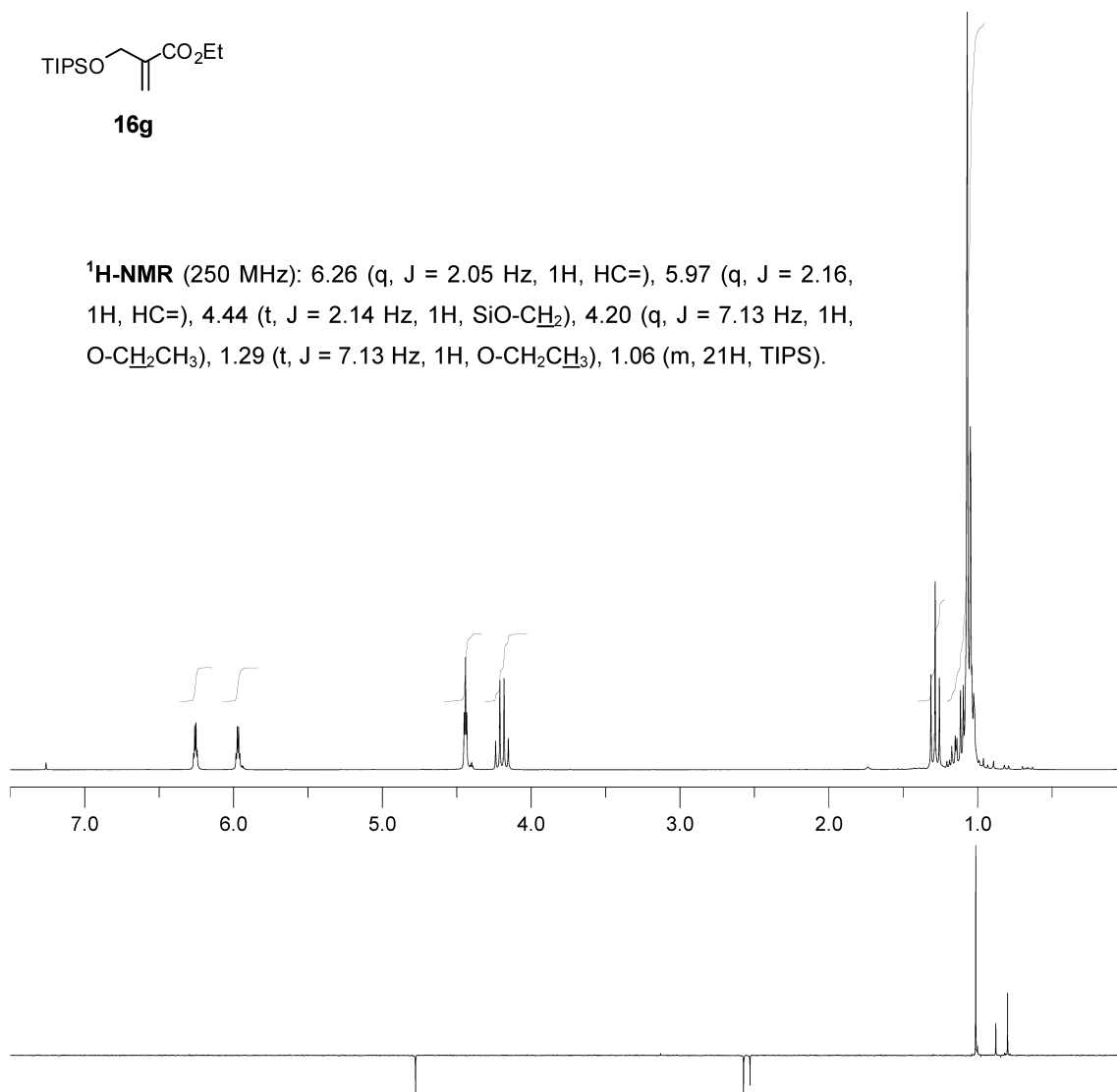


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 165.48 (O=C), 139.73 (H<sub>2</sub>C=C), 123.12 (H<sub>2</sub>C=C), 61.27 (O-CH<sub>2</sub>), 60.13 (O-CH<sub>2</sub>), 25.55 (SiC-CH<sub>3</sub>), 18.08 (SiC-CH<sub>3</sub>), 13.97 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), -5.71 (SiCH<sub>3</sub>).

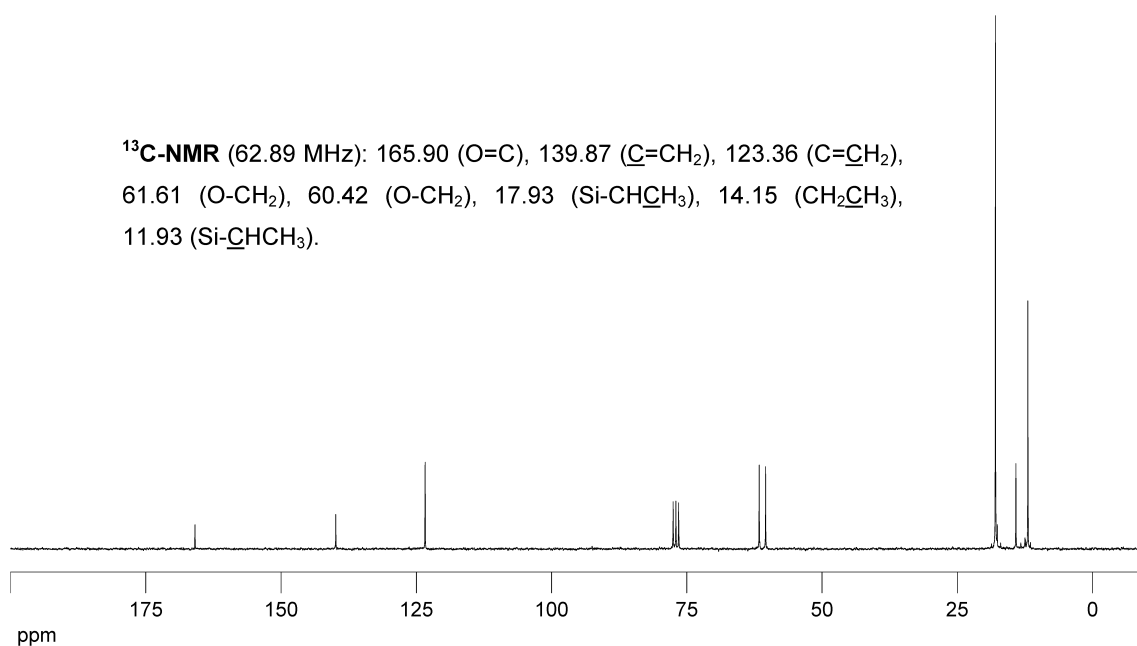


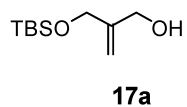


**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 6.26 (q, J = 2.05 Hz, 1H, HC=), 5.97 (q, J = 2.16, 1H, HC=), 4.44 (t, J = 2.14 Hz, 1H, SiO-CH<sub>2</sub>), 4.20 (q, J = 7.13 Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.29 (t, J = 7.13 Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.06 (m, 21H, TIPS).

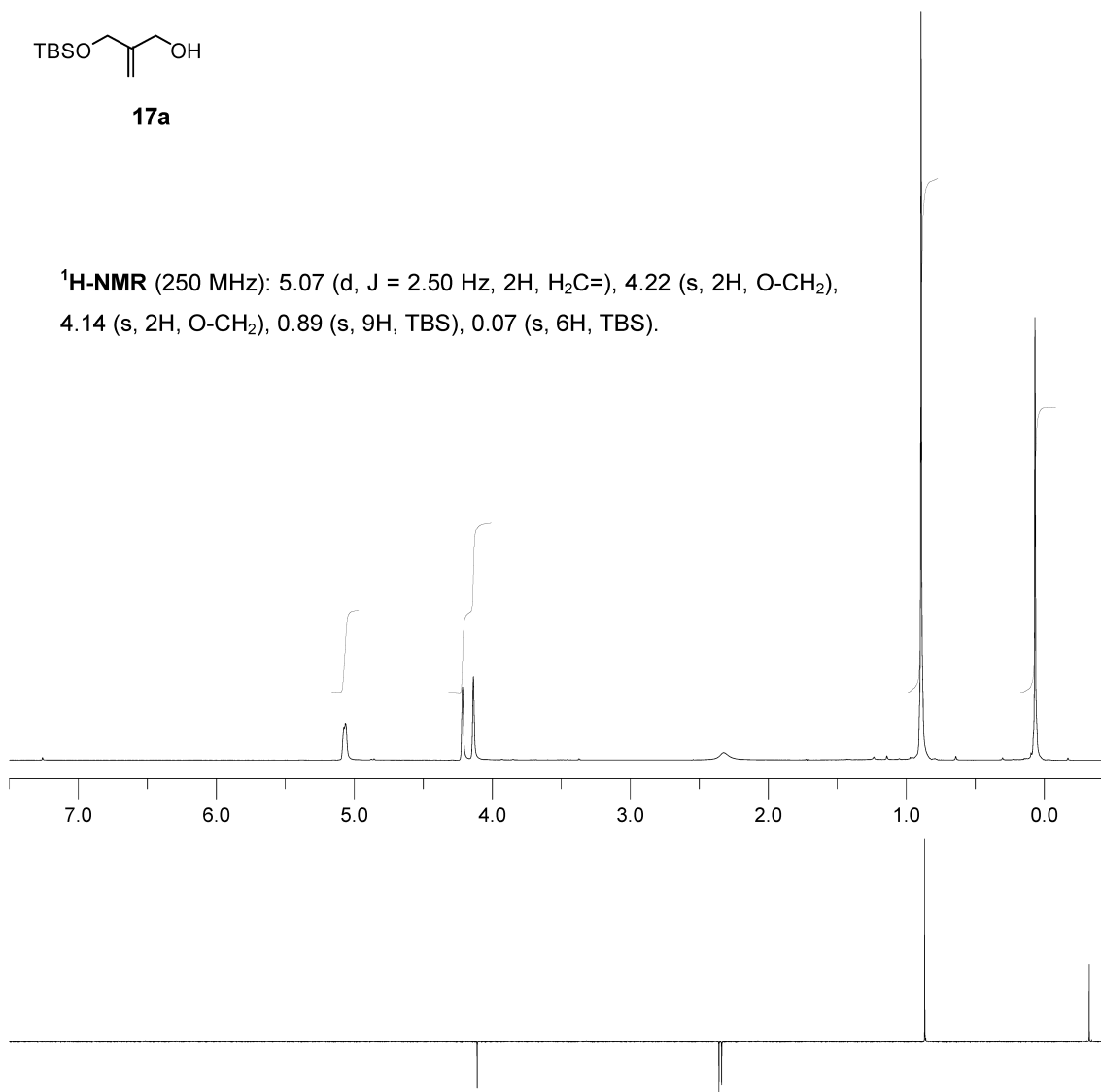


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 165.90 (O=C), 139.87 (C=CH<sub>2</sub>), 123.36 (C=CH<sub>2</sub>), 61.61 (O-CH<sub>2</sub>), 60.42 (O-CH<sub>2</sub>), 17.93 (Si-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.15 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 11.93 (Si-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

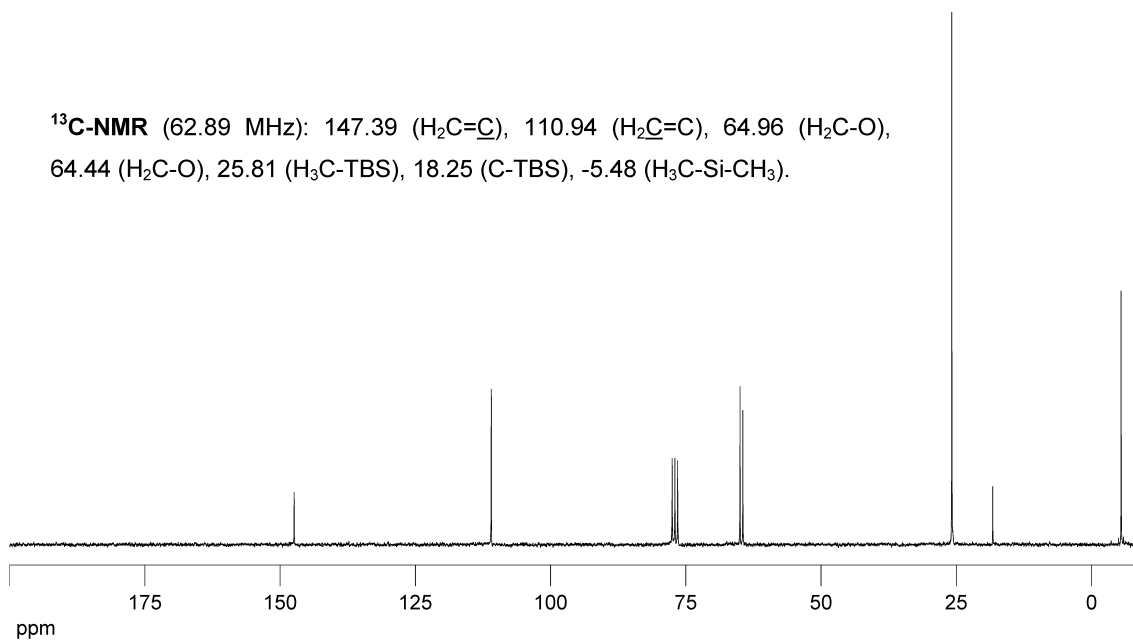


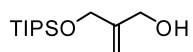


**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.07 (d, J = 2.50 Hz, 2H, H<sub>2</sub>C=), 4.22 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 4.14 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 0.89 (s, 9H, TBS), 0.07 (s, 6H, TBS).

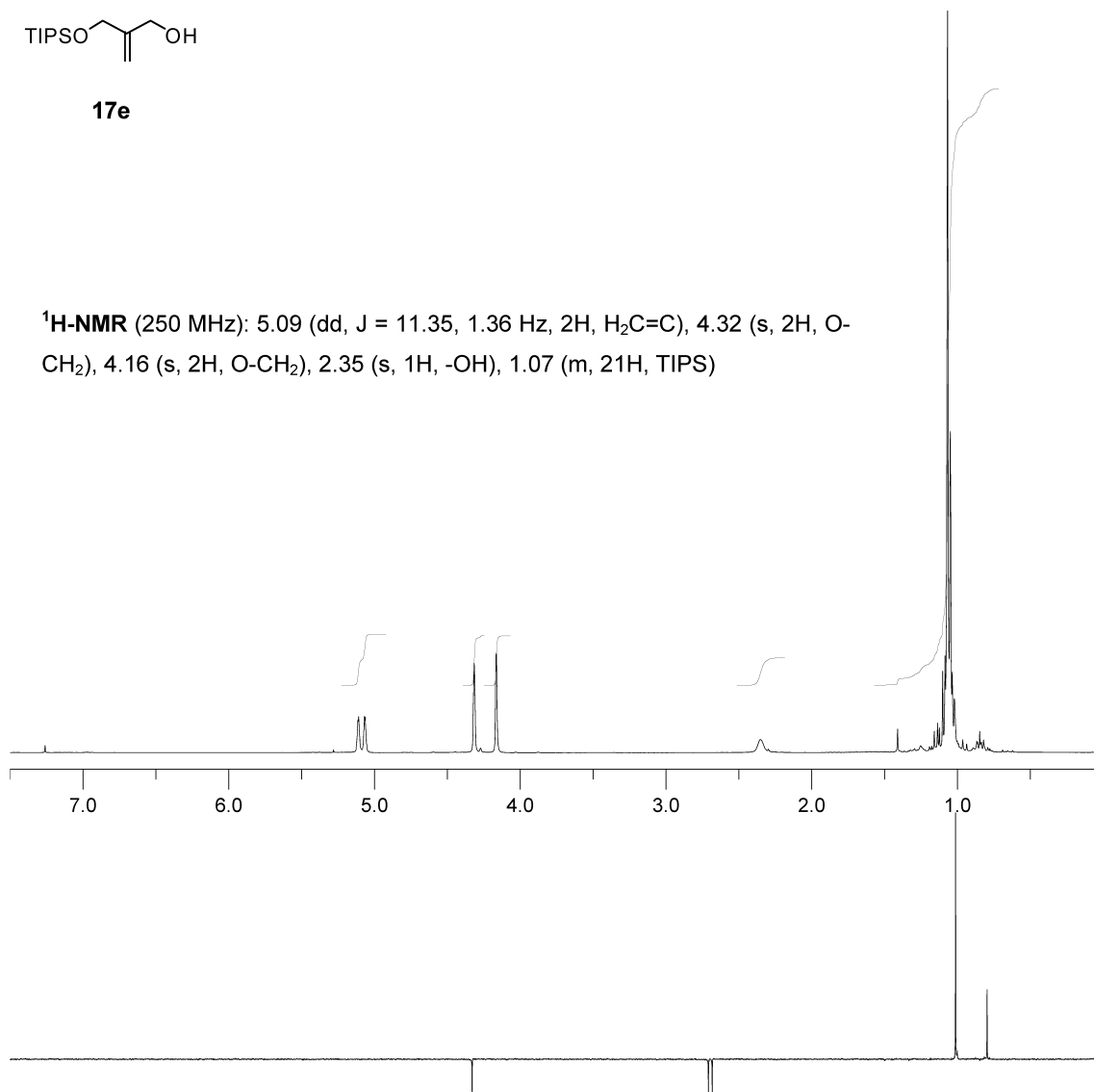


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 147.39 (H<sub>2</sub>C=C), 110.94 (H<sub>2</sub>C=C), 64.96 (H<sub>2</sub>C-O), 64.44 (H<sub>2</sub>C-O), 25.81 (H<sub>3</sub>C-TBS), 18.25 (C-TBS), -5.48 (H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>).

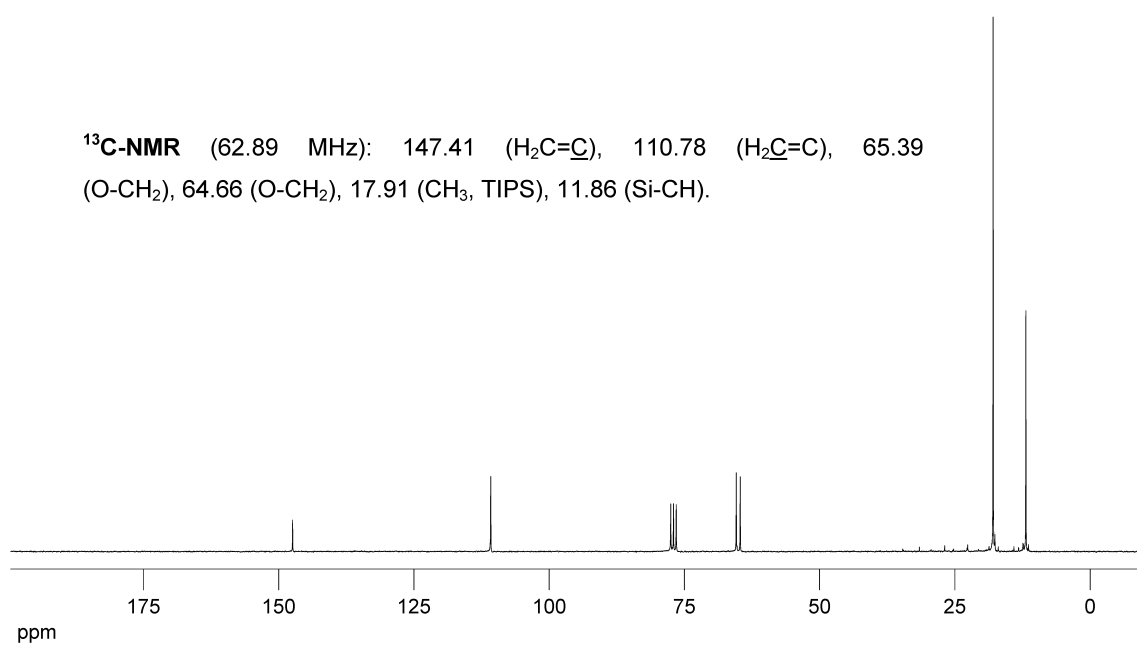


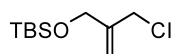
**17e**

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.09 (dd, J = 11.35, 1.36 Hz, 2H, H<sub>2</sub>C=C), 4.32 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 4.16 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 2.35 (s, 1H, -OH), 1.07 (m, 21H, TIPS)

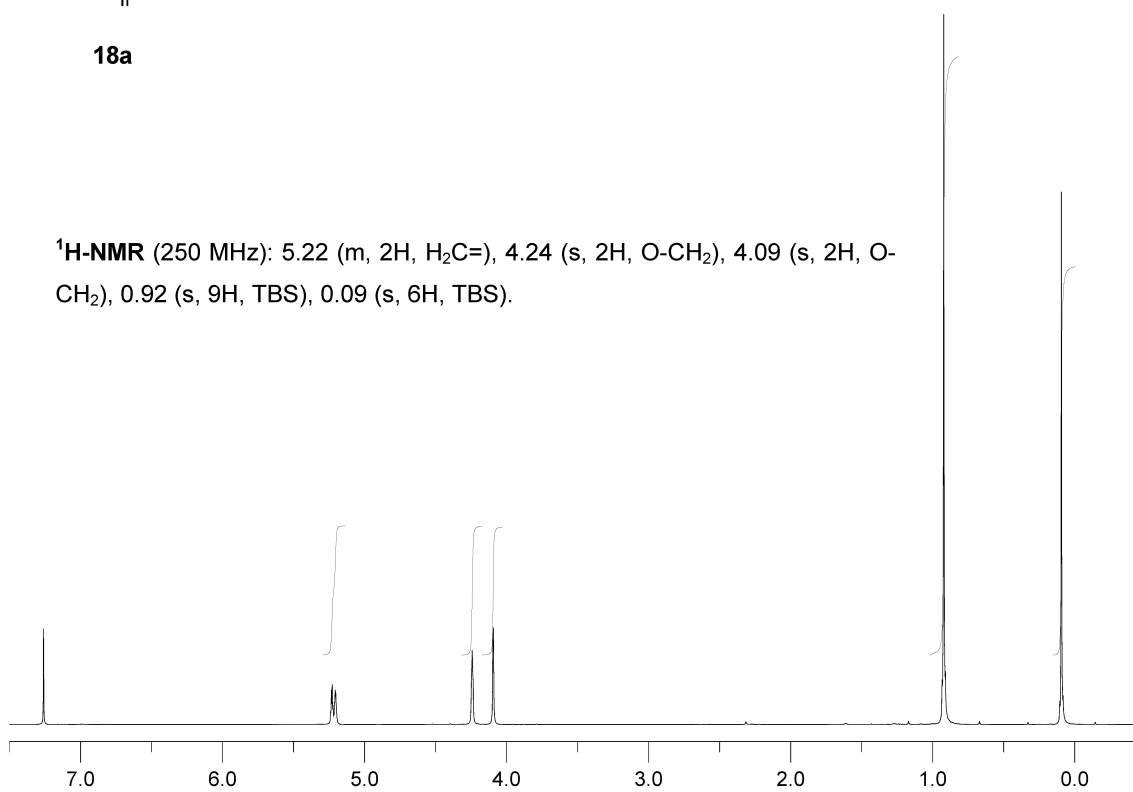


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 147.41 (H<sub>2</sub>C=C), 110.78 (H<sub>2</sub>C=C), 65.39 (O-CH<sub>2</sub>), 64.66 (O-CH<sub>2</sub>), 17.91 (CH<sub>3</sub>, TIPS), 11.86 (Si-CH).

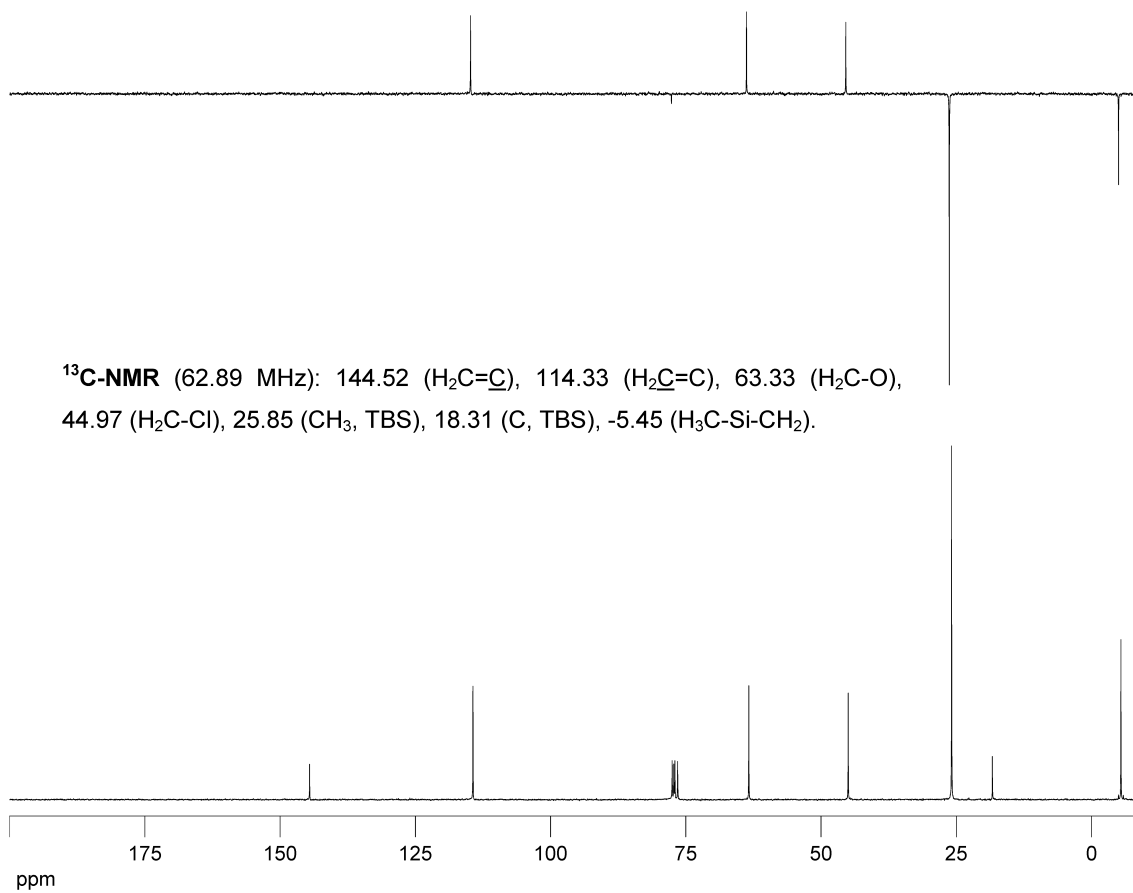


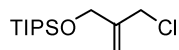
**18a**

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.22 (m, 2H, H<sub>2</sub>C=), 4.24 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 4.09 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 0.92 (s, 9H, TBS), 0.09 (s, 6H, TBS).

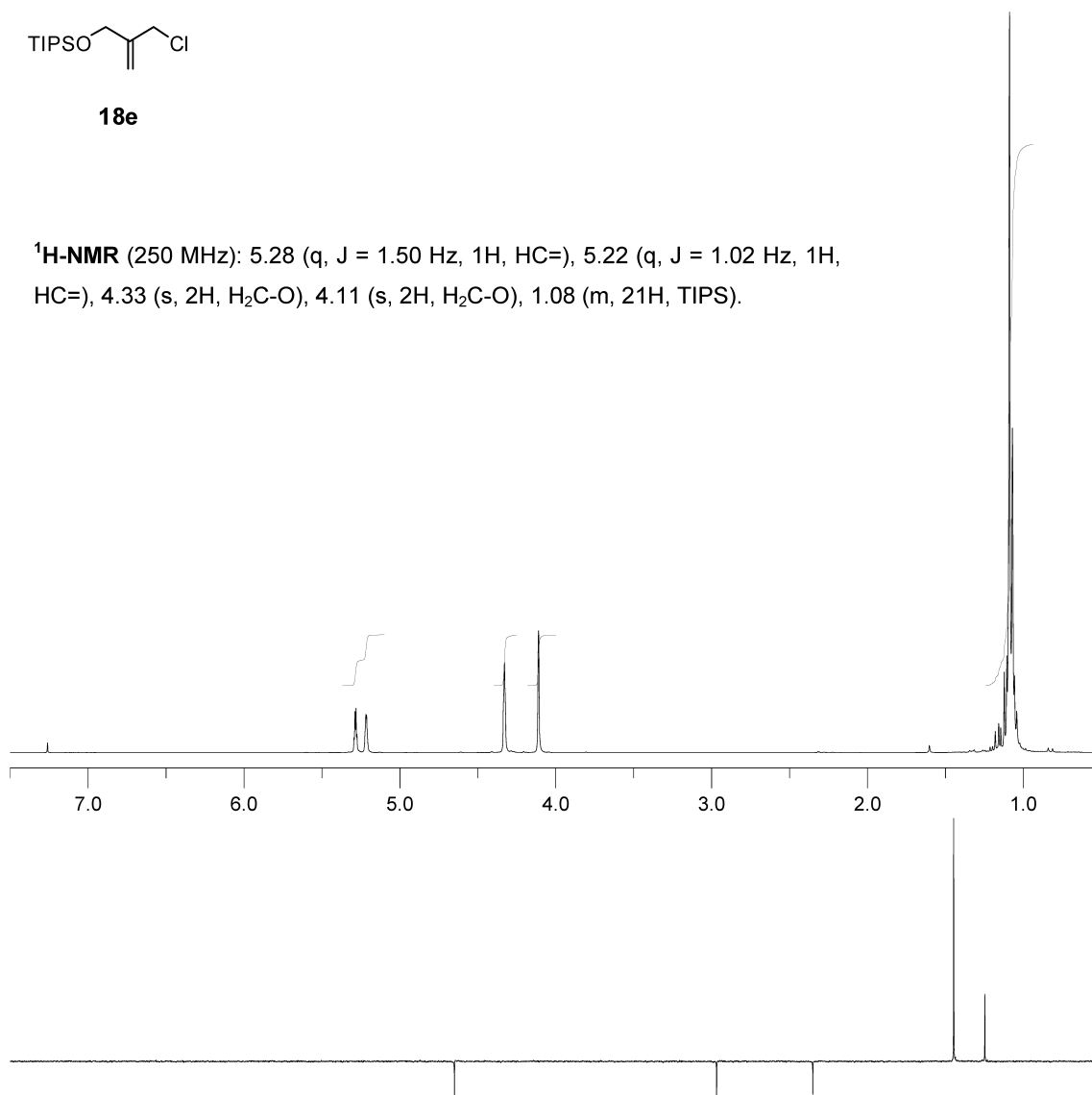


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 144.52 (H<sub>2</sub>C=C), 114.33 (H<sub>2</sub>C=C), 63.33 (H<sub>2</sub>C-O), 44.97 (H<sub>2</sub>C-Cl), 25.85 (CH<sub>3</sub>, TBS), 18.31 (C, TBS), -5.45 (H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>2</sub>).

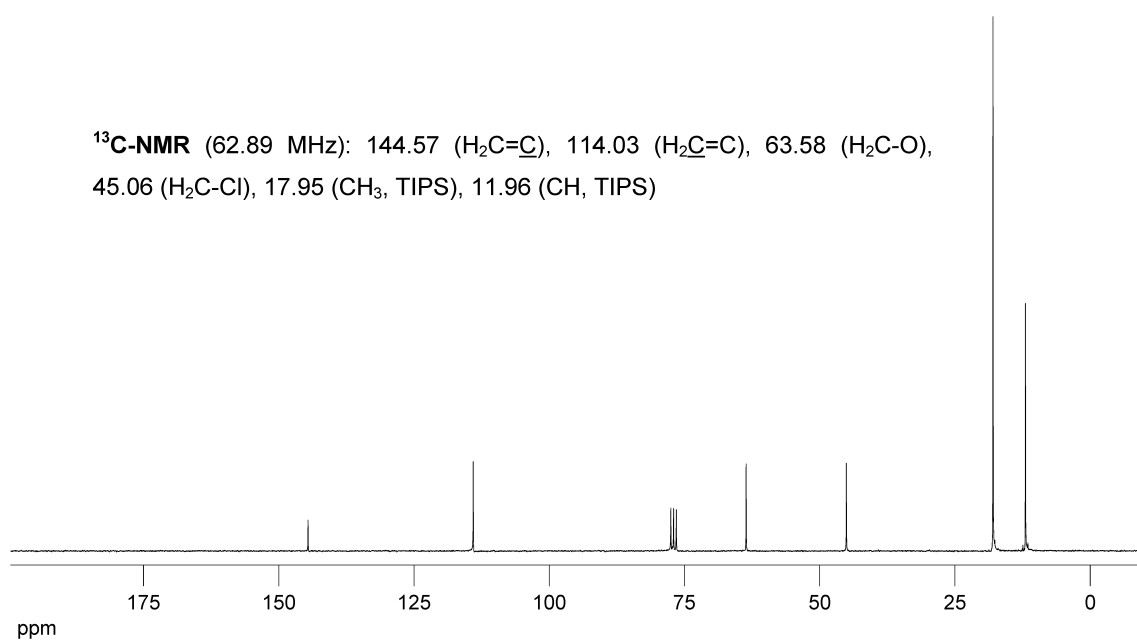


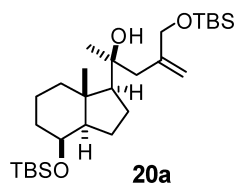
**18e**

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.28 (q, J = 1.50 Hz, 1H, HC=), 5.22 (q, J = 1.02 Hz, 1H, HC=), 4.33 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 4.11 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-O), 1.08 (m, 21H, TIPS).

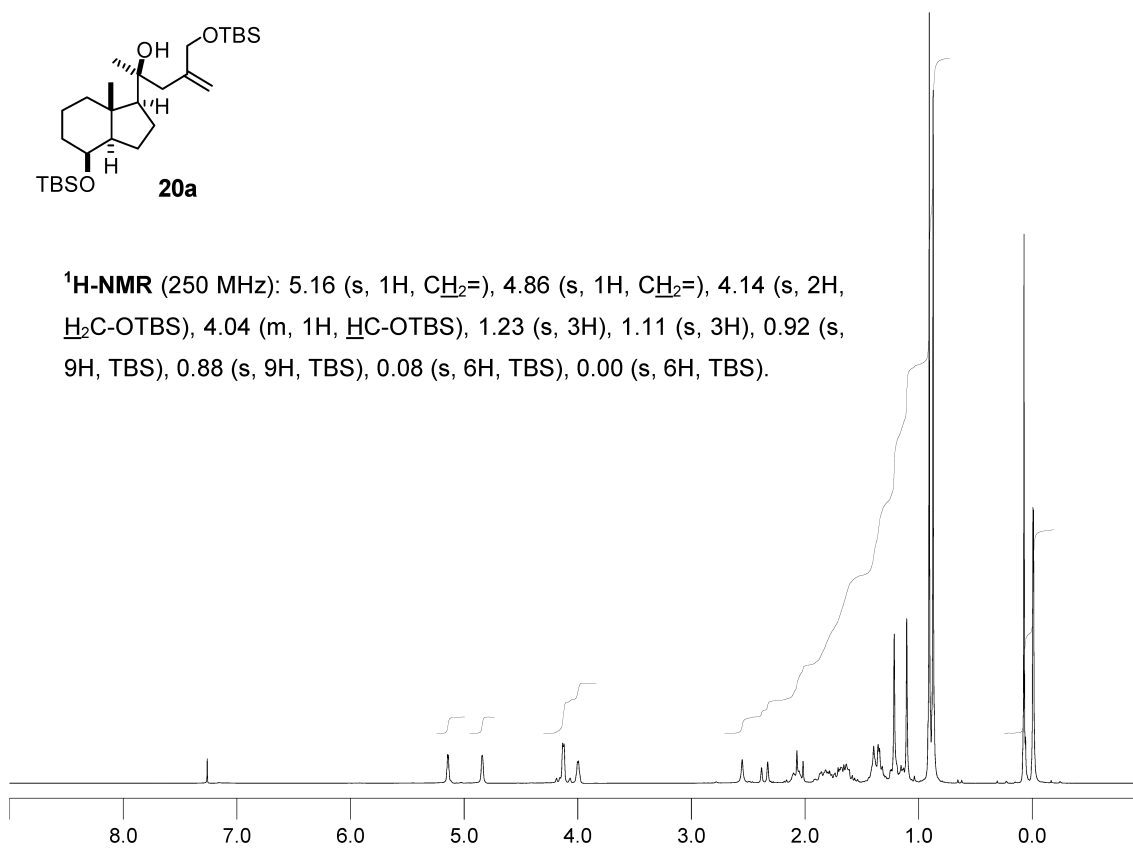


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 144.57 (H<sub>2</sub>C=C), 114.03 (H<sub>2</sub>C=C), 63.58 (H<sub>2</sub>C-O), 45.06 (H<sub>2</sub>C-Cl), 17.95 (CH<sub>3</sub>, TIPS), 11.96 (CH, TIPS)

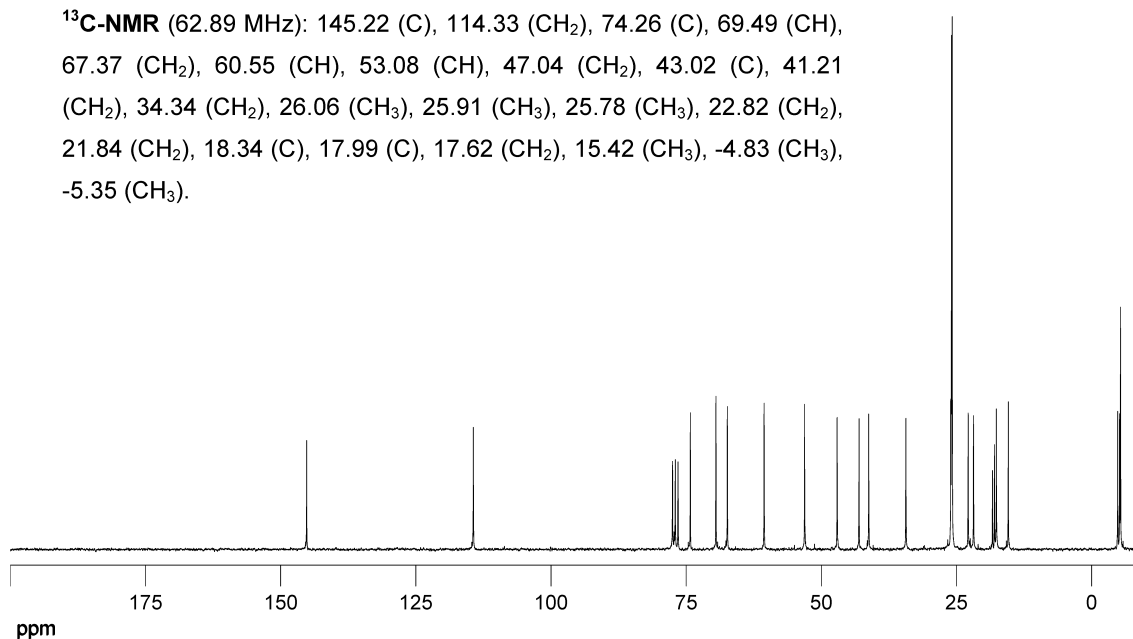


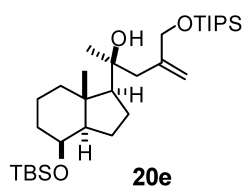


**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.16 (s, 1H, CH<sub>2</sub>=), 4.86 (s, 1H, CH<sub>2</sub>=), 4.14 (s, 2H, H<sub>2</sub>C-OTBS), 4.04 (m, 1H, HC-OTBS), 1.23 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.92 (s, 9H, TBS), 0.88 (s, 9H, TBS), 0.08 (s, 6H, TBS), 0.00 (s, 6H, TBS).

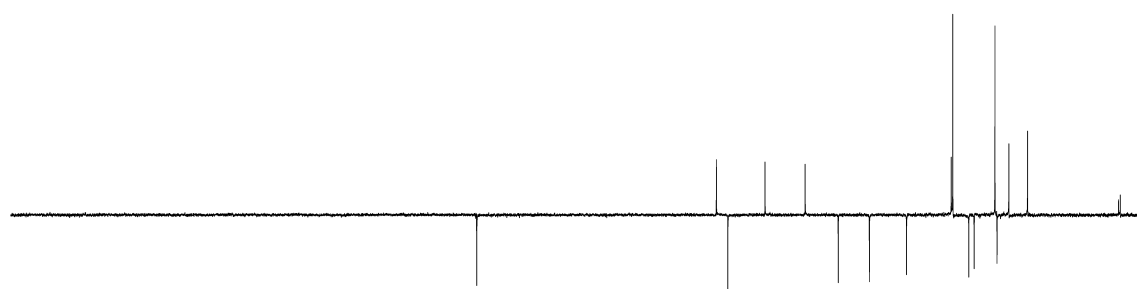
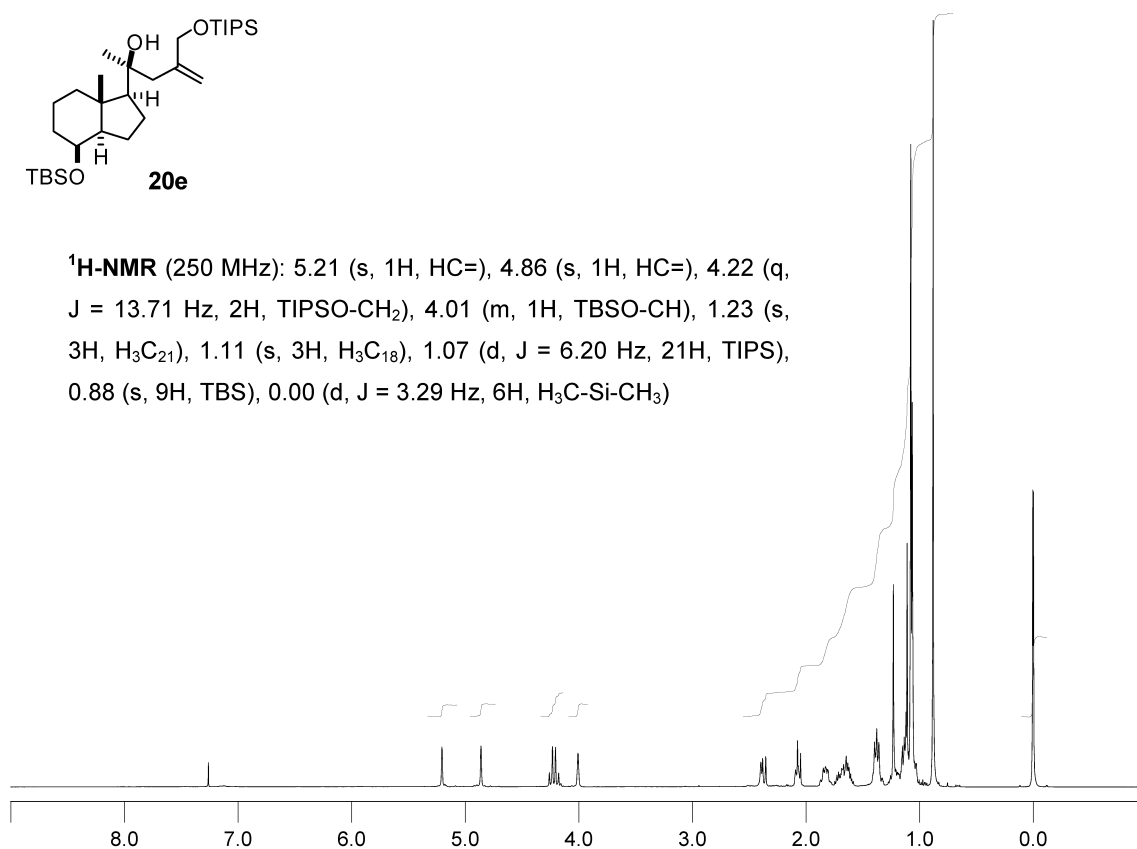


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 145.22 (C), 114.33 (CH<sub>2</sub>), 74.26 (C), 69.49 (CH), 67.37 (CH<sub>2</sub>), 60.55 (CH), 53.08 (CH), 47.04 (CH<sub>2</sub>), 43.02 (C), 41.21 (CH<sub>2</sub>), 34.34 (CH<sub>2</sub>), 26.06 (CH<sub>3</sub>), 25.91 (CH<sub>3</sub>), 25.78 (CH<sub>3</sub>), 22.82 (CH<sub>2</sub>), 21.84 (CH<sub>2</sub>), 18.34 (C), 17.99 (C), 17.62 (CH<sub>2</sub>), 15.42 (CH<sub>3</sub>), -4.83 (CH<sub>3</sub>), -5.35 (CH<sub>3</sub>).

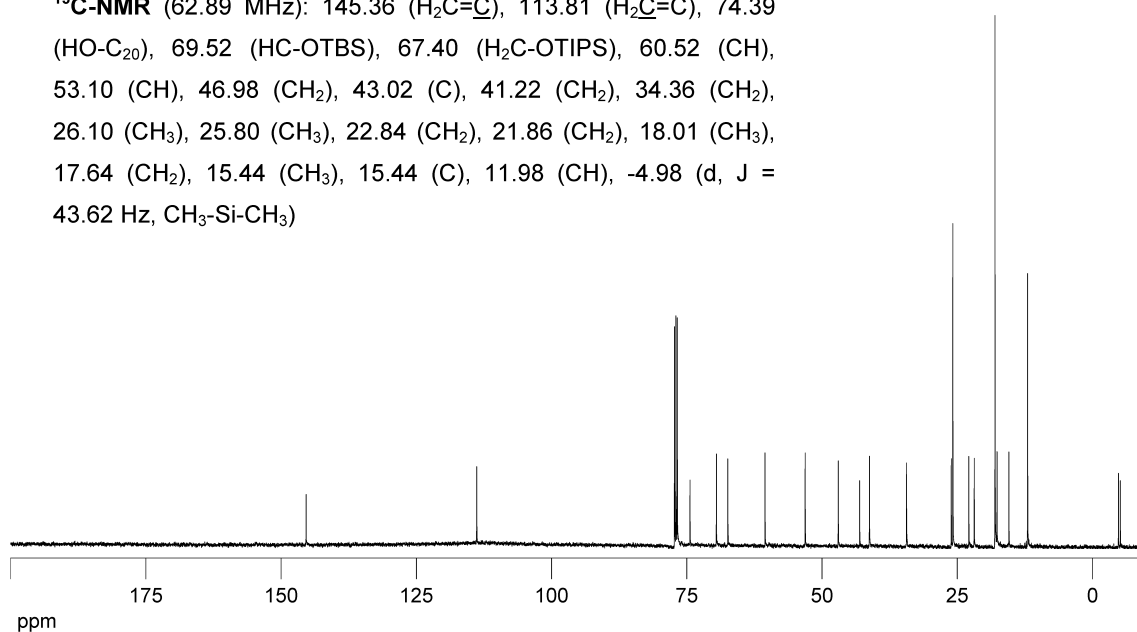


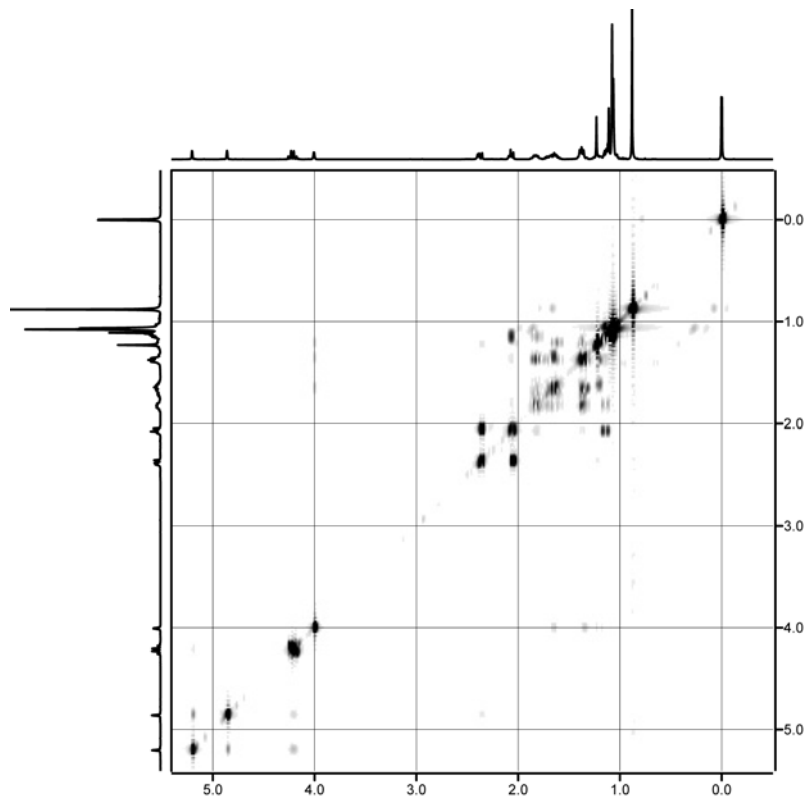
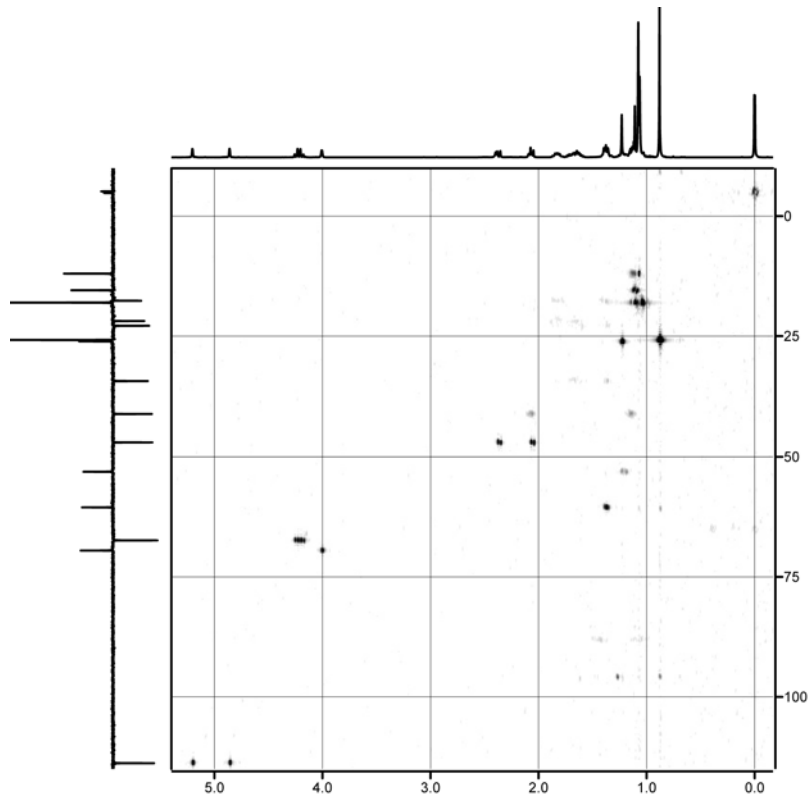


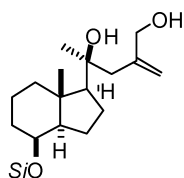
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.21 (s, 1H, HC=), 4.86 (s, 1H, HC=), 4.22 (q, J = 13.71 Hz, 2H, TIPS-CH<sub>2</sub>), 4.01 (m, 1H, TBSO-CH), 1.23 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>21</sub>), 1.11 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 1.07 (d, J = 6.20 Hz, 21H, TIPS), 0.88 (s, 9H, TBS), 0.00 (d, J = 3.29 Hz, 6H, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>)



**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 145.36 (H<sub>2</sub>C=C), 113.81 (H<sub>2</sub>C=C), 74.39 (HO-C<sub>20</sub>), 69.52 (HC-OTBS), 67.40 (H<sub>2</sub>C-OTIPS), 60.52 (CH), 53.10 (CH), 46.98 (CH<sub>2</sub>), 43.02 (C), 41.22 (CH<sub>2</sub>), 34.36 (CH<sub>2</sub>), 26.10 (CH<sub>3</sub>), 25.80 (CH<sub>3</sub>), 22.84 (CH<sub>2</sub>), 21.86 (CH<sub>2</sub>), 18.01 (CH<sub>3</sub>), 17.64 (CH<sub>2</sub>), 15.44 (CH<sub>3</sub>), 15.44 (C), 11.98 (CH), -4.98 (d, J = 43.62 Hz, CH<sub>3</sub>-Si-CH<sub>3</sub>)

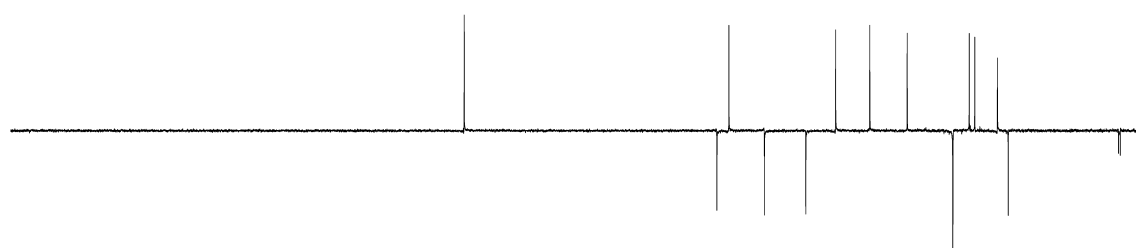
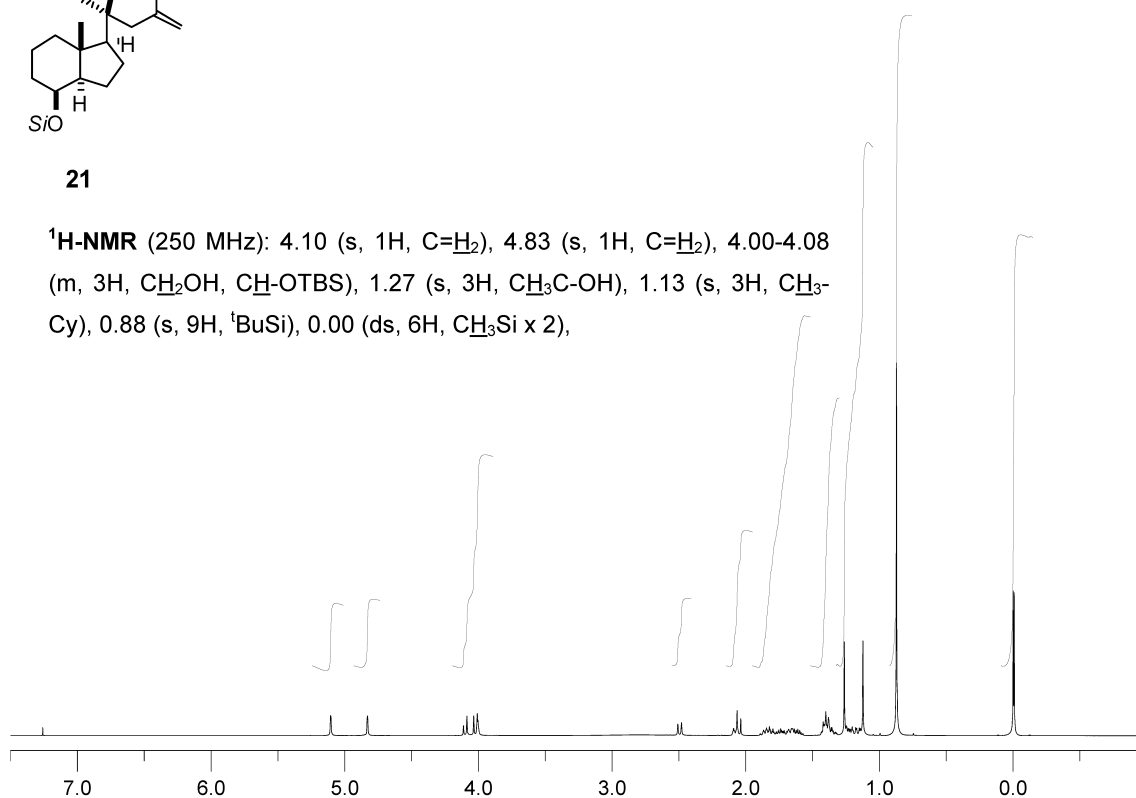


**$^1\text{H}$ -COSY****HMQC**

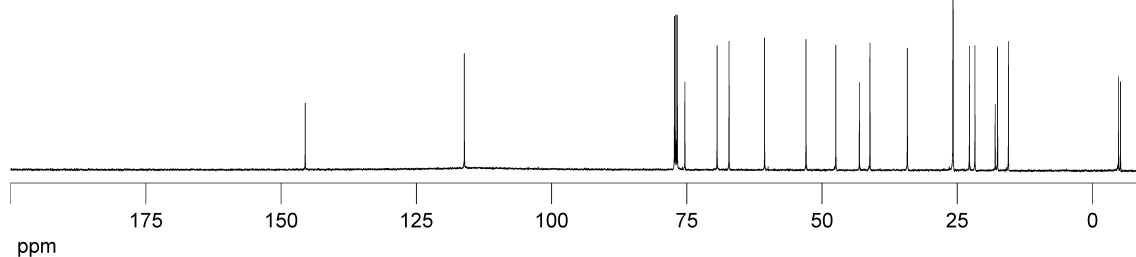


21

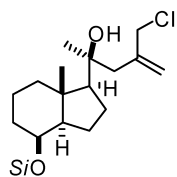
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 4.10 (s, 1H, C=H<sub>2</sub>), 4.83 (s, 1H, C=H<sub>2</sub>), 4.00-4.08 (m, 3H, CH<sub>2</sub>OH, CH-OTBS), 1.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C-OH), 1.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.88 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), 0.00 (ds, 6H, CH<sub>3</sub>Si x 2),



**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 145.43 (C), 116.18 (CH<sub>2</sub>), 75.26 (C), 69.35 (CH), 67.12 (CH<sub>2</sub>), 60.58 (CH), 52.91 (CH), 47.04 (CH<sub>2</sub>), 43.04 (C), 41.08 (CH<sub>2</sub>), 34.18 (CH<sub>2</sub>), 25.74 (CH<sub>3</sub>), 25.74 (CH<sub>3</sub>), 22.71 (CH<sub>2</sub>), 21.68 (CH<sub>2</sub>), 17.94 (C), 17.51 (CH<sub>2</sub>), 15.50 (CH<sub>3</sub>), -4.86 (CH<sub>3</sub>), -5.22 (CH<sub>3</sub>).

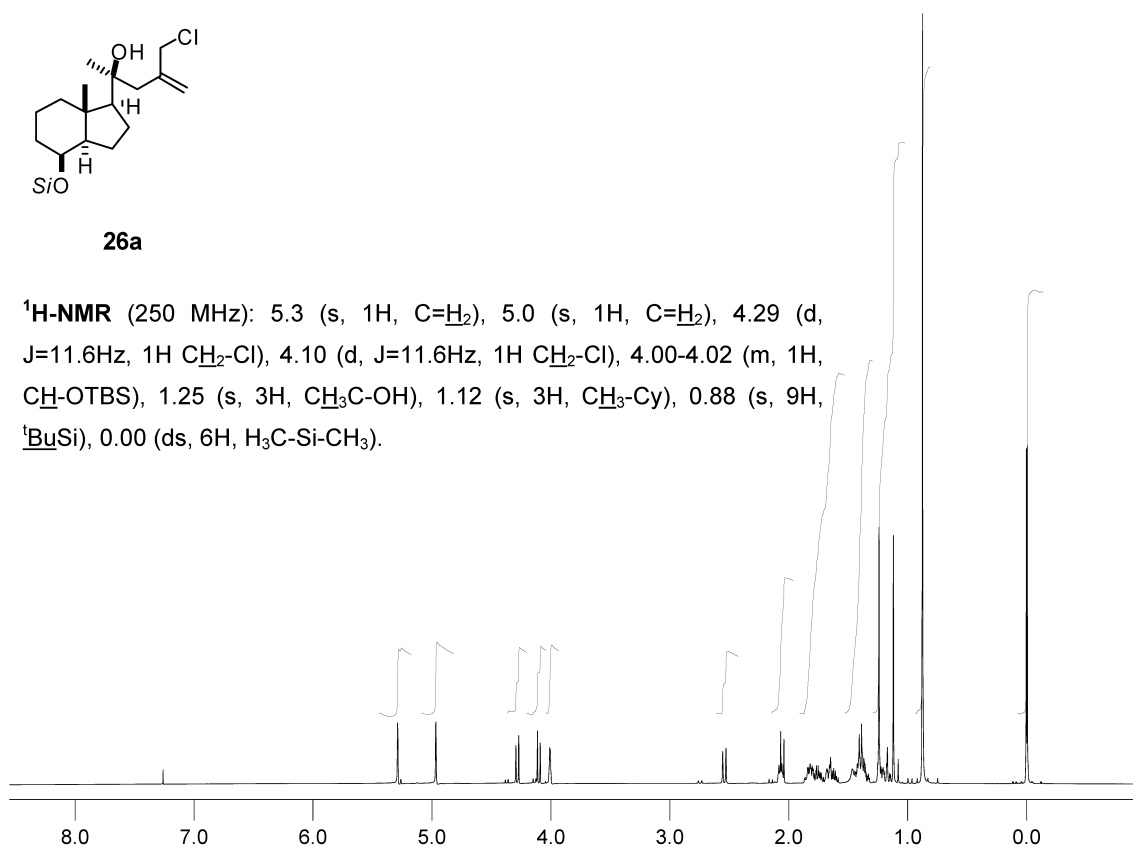




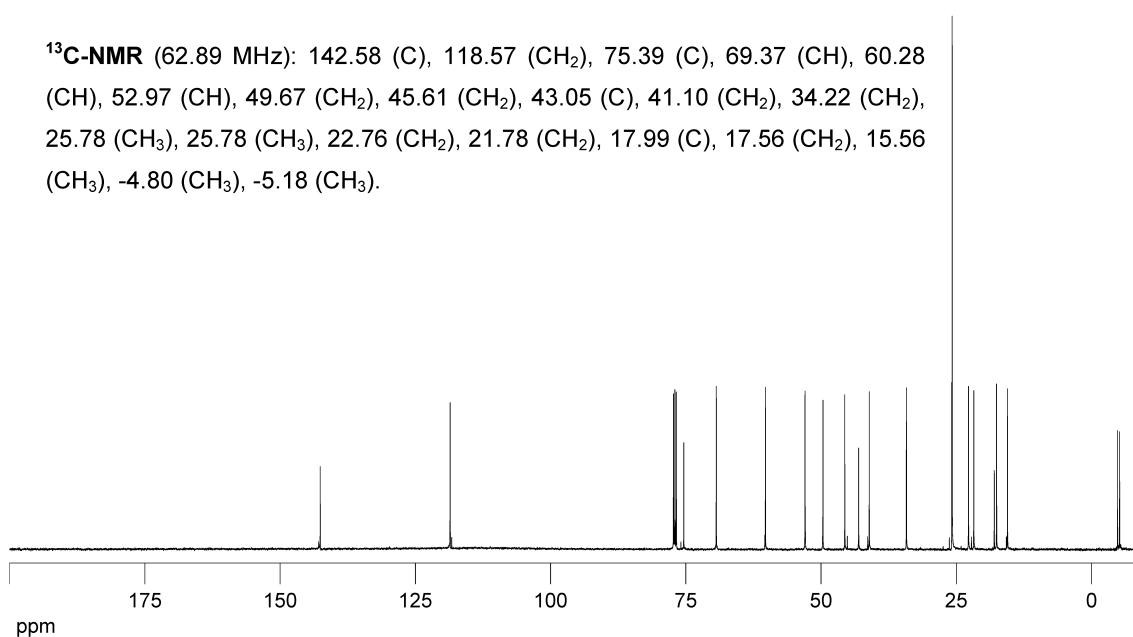


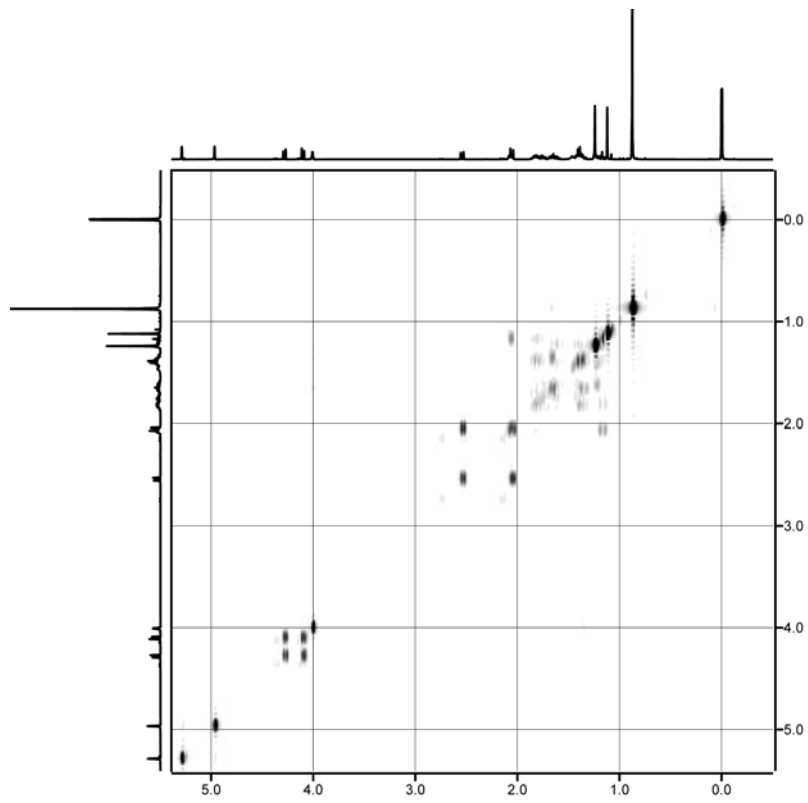
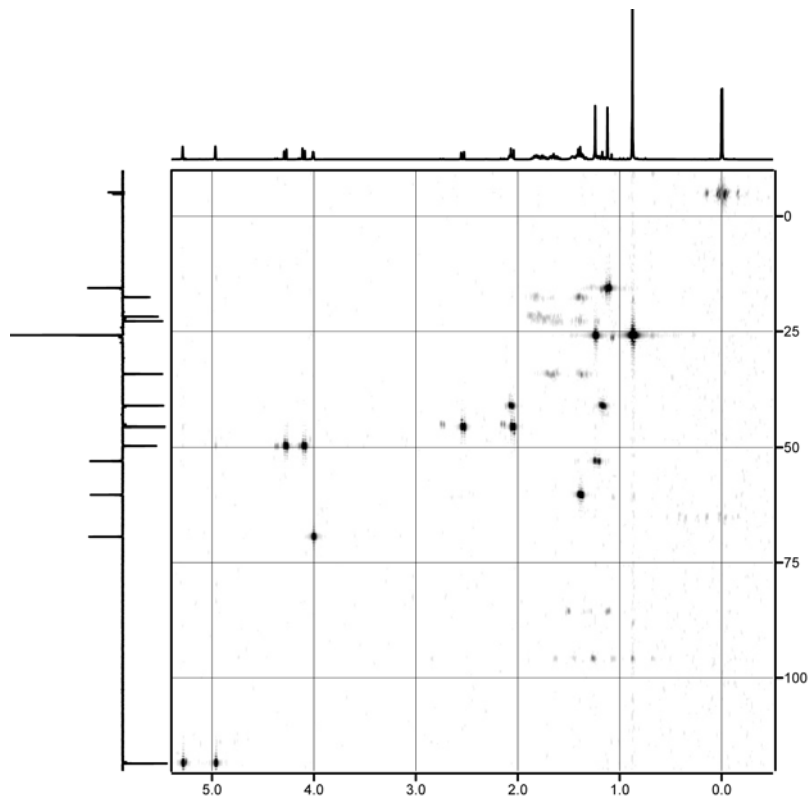
26a

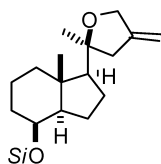
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.3 (s, 1H, C=H<sub>2</sub>), 5.0 (s, 1H, C=H<sub>2</sub>), 4.29 (d, J=11.6Hz, 1H CH<sub>2</sub>-Cl), 4.10 (d, J=11.6Hz, 1H CH<sub>2</sub>-Cl), 4.00-4.02 (m, 1H, CH-OTBS), 1.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C-OH), 1.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.88 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), 0.00 (ds, 6H, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>).



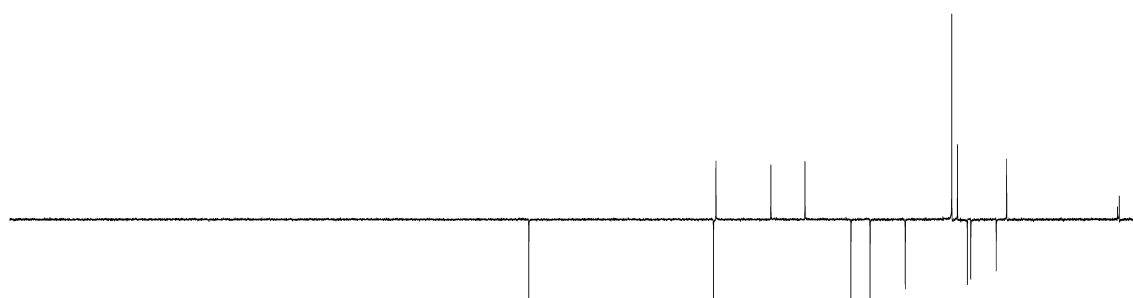
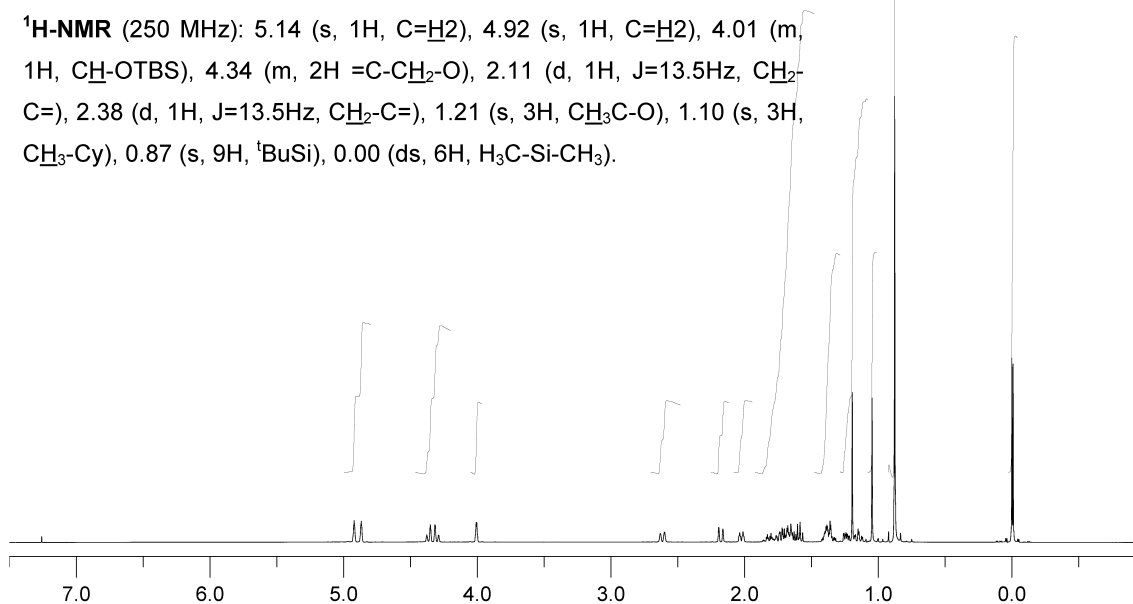
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 142.58 (C), 118.57 (CH<sub>2</sub>), 75.39 (C), 69.37 (CH), 60.28 (CH), 52.97 (CH), 49.67 (CH<sub>2</sub>), 45.61 (CH<sub>2</sub>), 43.05 (C), 41.10 (CH<sub>2</sub>), 34.22 (CH<sub>2</sub>), 25.78 (CH<sub>3</sub>), 25.78 (CH<sub>3</sub>), 22.76 (CH<sub>2</sub>), 21.78 (CH<sub>2</sub>), 17.99 (C), 17.56 (CH<sub>2</sub>), 15.56 (CH<sub>3</sub>), -4.80 (CH<sub>3</sub>), -5.18 (CH<sub>3</sub>).



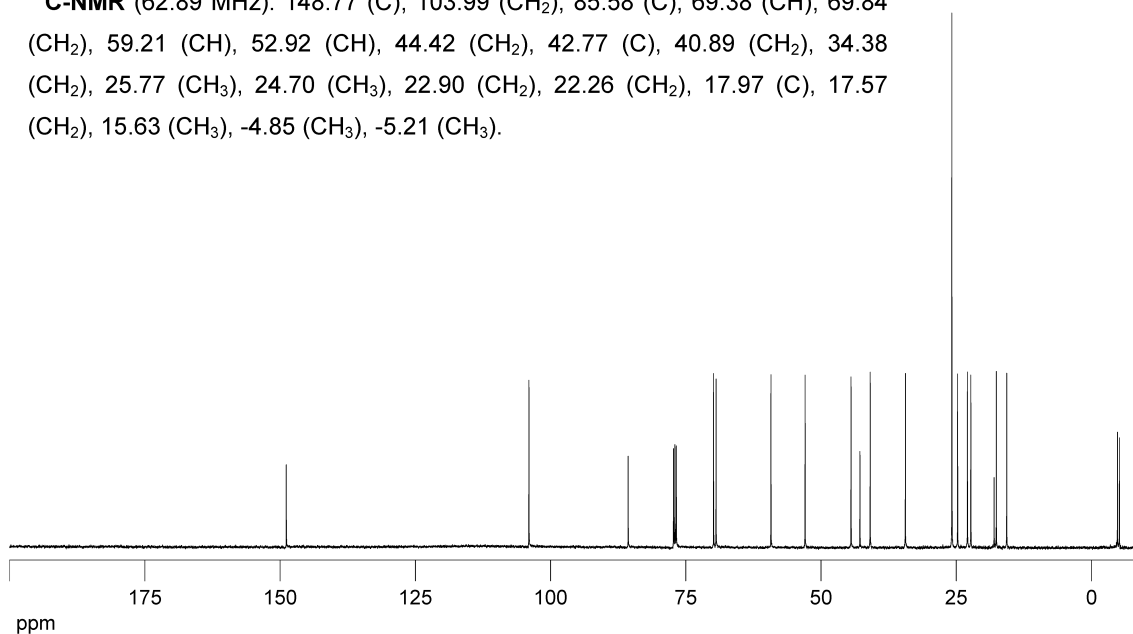
**$^1\text{H}$ -COSY****HMQC**

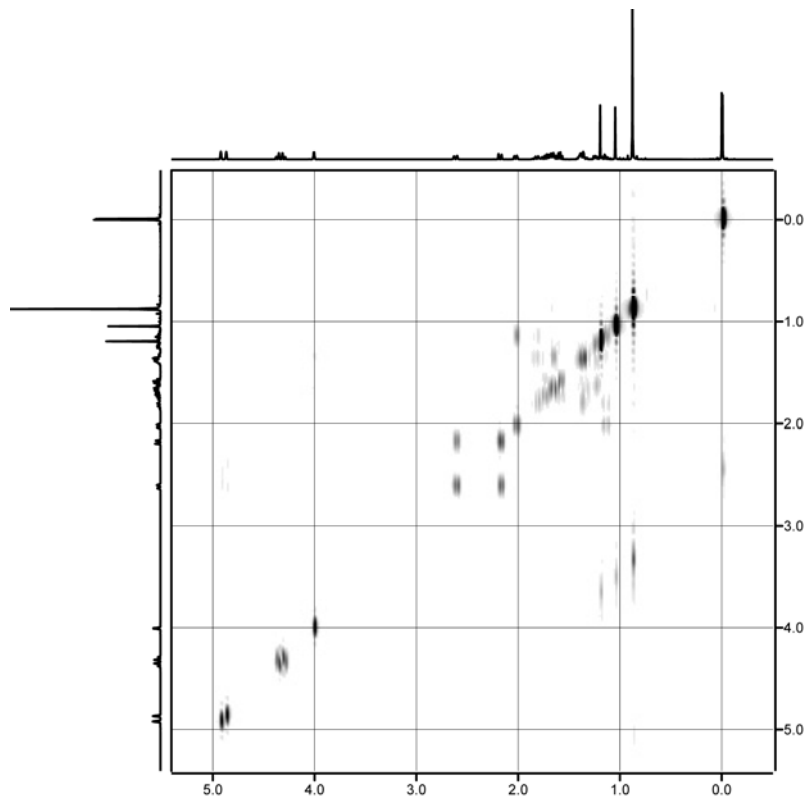
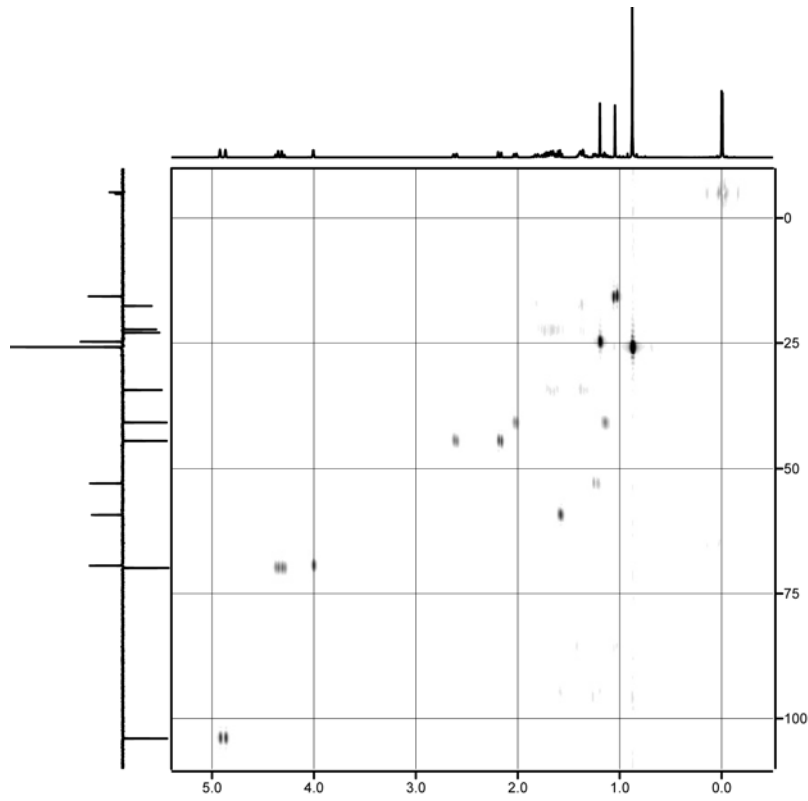
**10d**

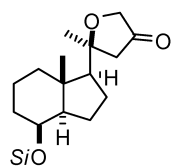
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.14 (s, 1H, C=H<sub>2</sub>), 4.92 (s, 1H, C=H<sub>2</sub>), 4.01 (m, 1H, CH-OTBS), 4.34 (m, 2H =C-CH<sub>2</sub>-O), 2.11 (d, 1H, J=13.5Hz, CH<sub>2</sub>-C=), 2.38 (d, 1H, J=13.5Hz, CH<sub>2</sub>-C=), 1.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>C-O), 1.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.87 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), 0.00 (ds, 6H, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>).



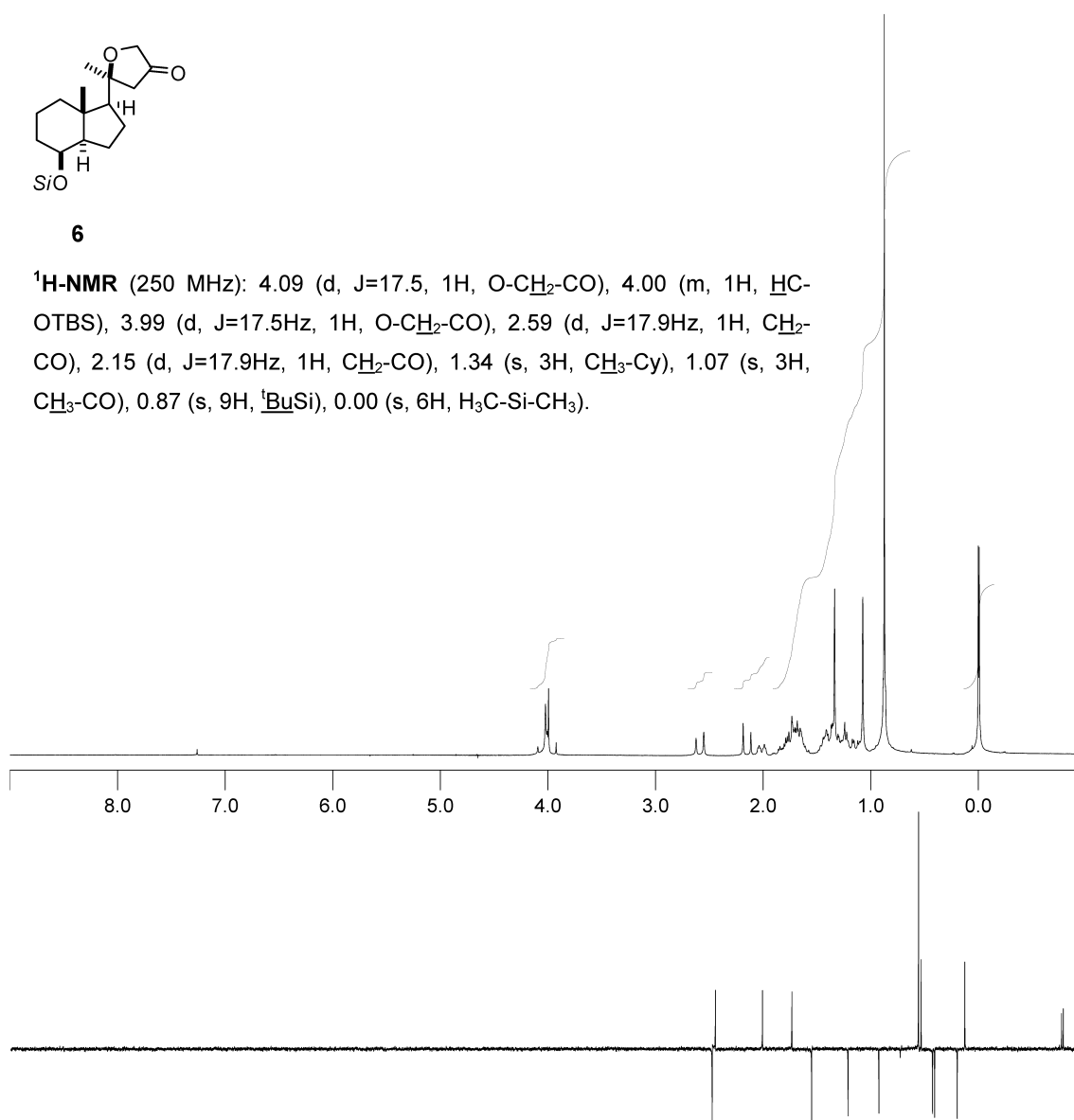
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 148.77 (C), 103.99 (CH<sub>2</sub>), 85.58 (C), 69.38 (CH), 69.84 (CH<sub>2</sub>), 59.21 (CH), 52.92 (CH), 44.42 (CH<sub>2</sub>), 42.77 (C), 40.89 (CH<sub>2</sub>), 34.38 (CH<sub>2</sub>), 25.77 (CH<sub>3</sub>), 24.70 (CH<sub>3</sub>), 22.90 (CH<sub>2</sub>), 22.26 (CH<sub>2</sub>), 17.97 (C), 17.57 (CH<sub>2</sub>), 15.63 (CH<sub>3</sub>), -4.85 (CH<sub>3</sub>), -5.21 (CH<sub>3</sub>).



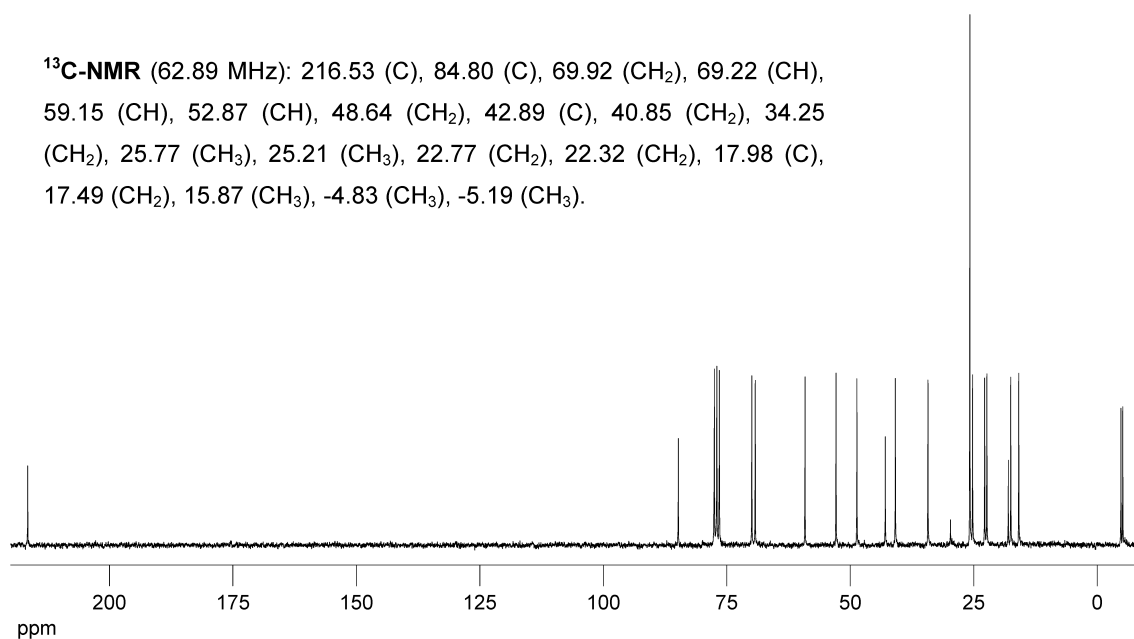
**$^1\text{H}$ -COSY****HMQC**

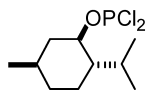
**6**

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.09 (d,  $J=17.5$ , 1H, O-CH<sub>2</sub>-CO), 4.00 (m, 1H, HC-OTBS), 3.99 (d,  $J=17.5$ Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>-CO), 2.59 (d,  $J=17.9$ Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CO), 2.15 (d,  $J=17.9$ Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CO), 1.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 1.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 0.87 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), 0.00 (s, 6H, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>).

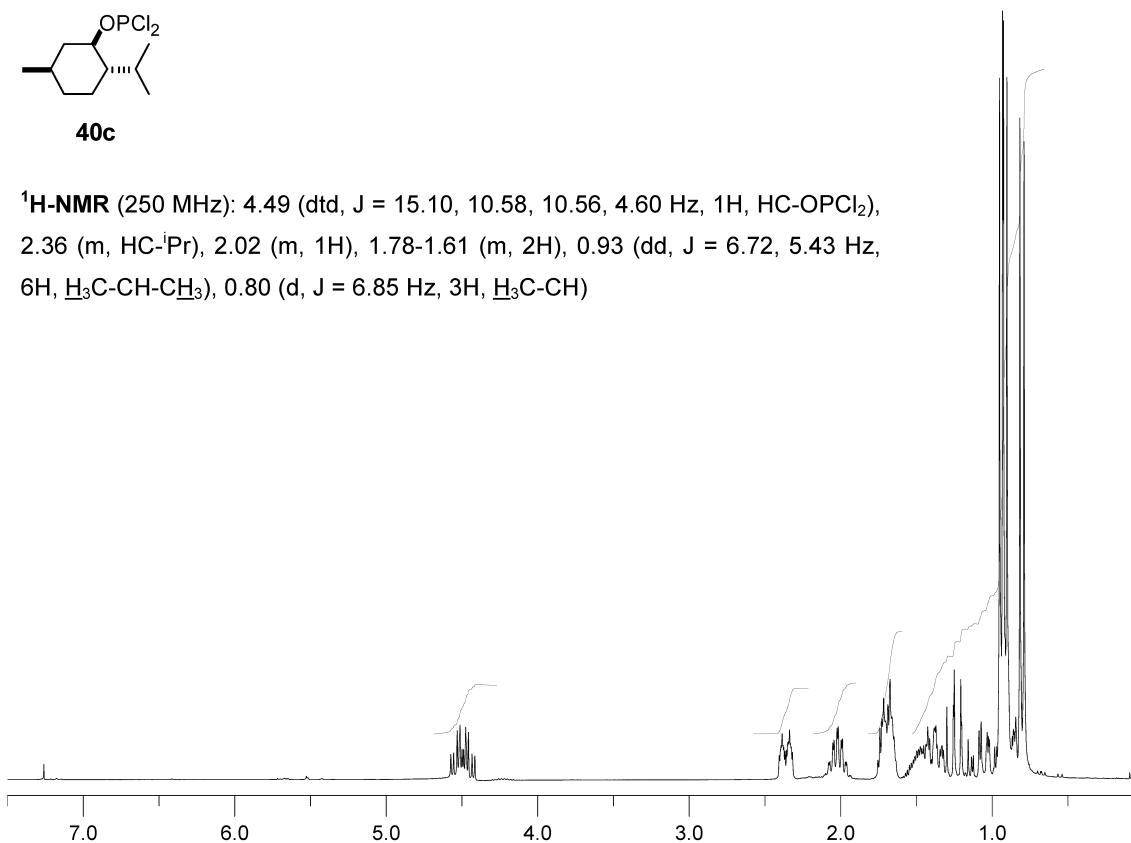


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 216.53 (C), 84.80 (C), 69.92 (CH<sub>2</sub>), 69.22 (CH), 59.15 (CH), 52.87 (CH), 48.64 (CH<sub>2</sub>), 42.89 (C), 40.85 (CH<sub>2</sub>), 34.25 (CH<sub>2</sub>), 25.77 (CH<sub>3</sub>), 25.21 (CH<sub>3</sub>), 22.77 (CH<sub>2</sub>), 22.32 (CH<sub>2</sub>), 17.98 (C), 17.49 (CH<sub>2</sub>), 15.87 (CH<sub>3</sub>), -4.83 (CH<sub>3</sub>), -5.19 (CH<sub>3</sub>).

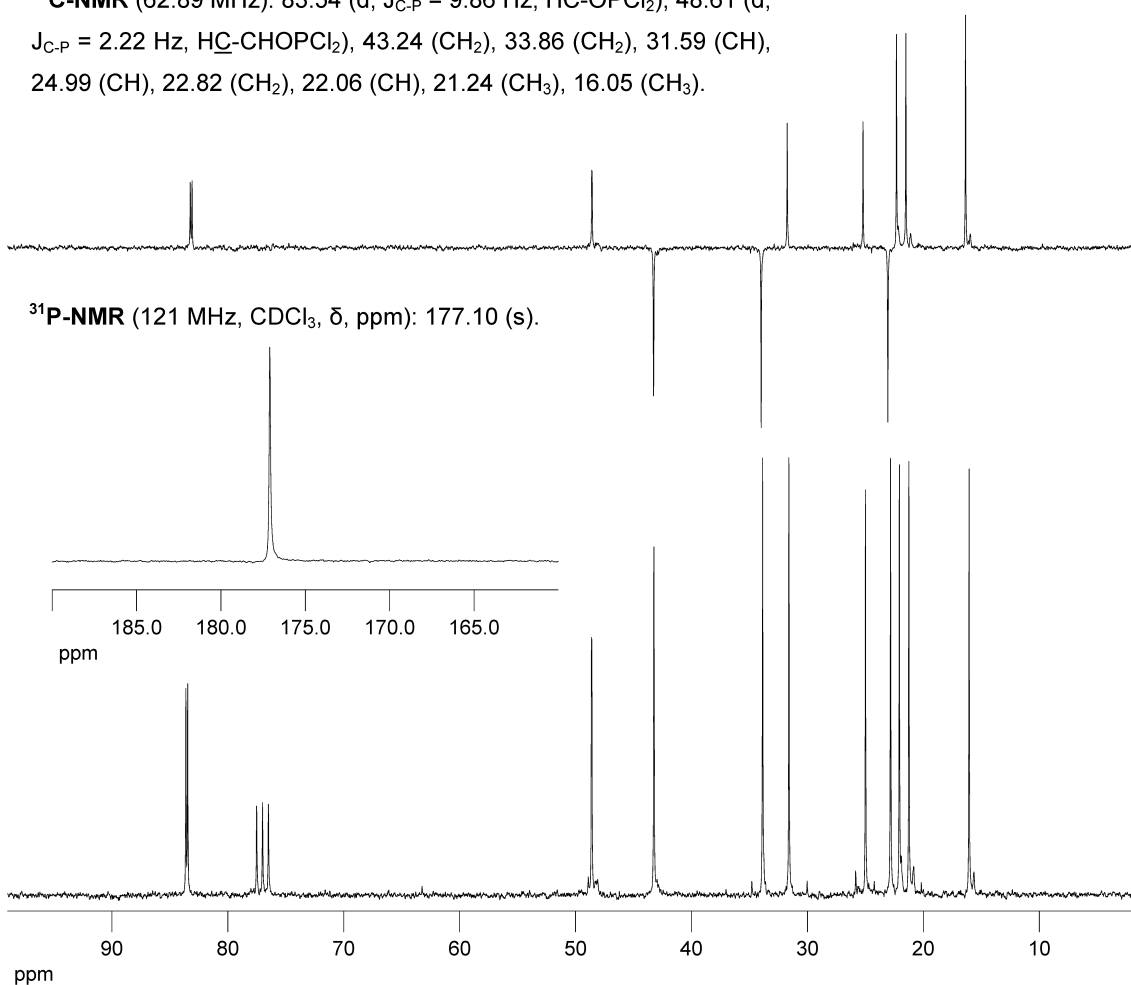


**40c**

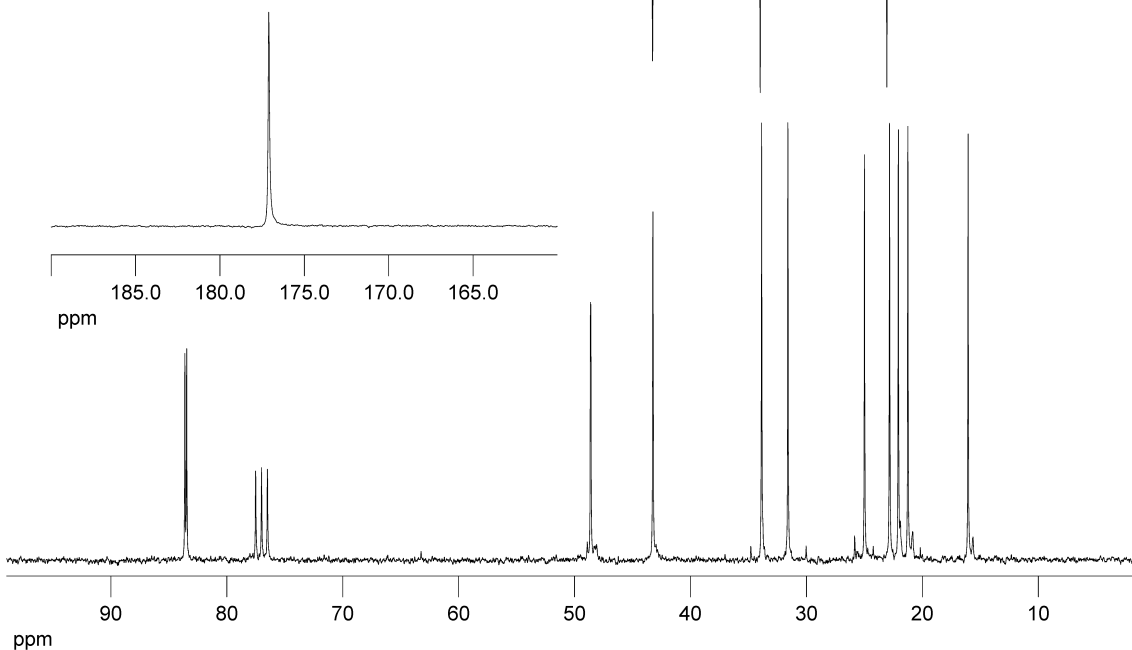
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.49 (dtd,  $J = 15.10, 10.58, 10.56, 4.60$  Hz, 1H, HC-OPCl<sub>2</sub>), 2.36 (m, HC-<sup>i</sup>Pr), 2.02 (m, 1H), 1.78-1.61 (m, 2H), 0.93 (dd,  $J = 6.72, 5.43$  Hz, 6H, H<sub>3</sub>C-CH-CH<sub>3</sub>), 0.80 (d,  $J = 6.85$  Hz, 3H, H<sub>3</sub>C-CH)

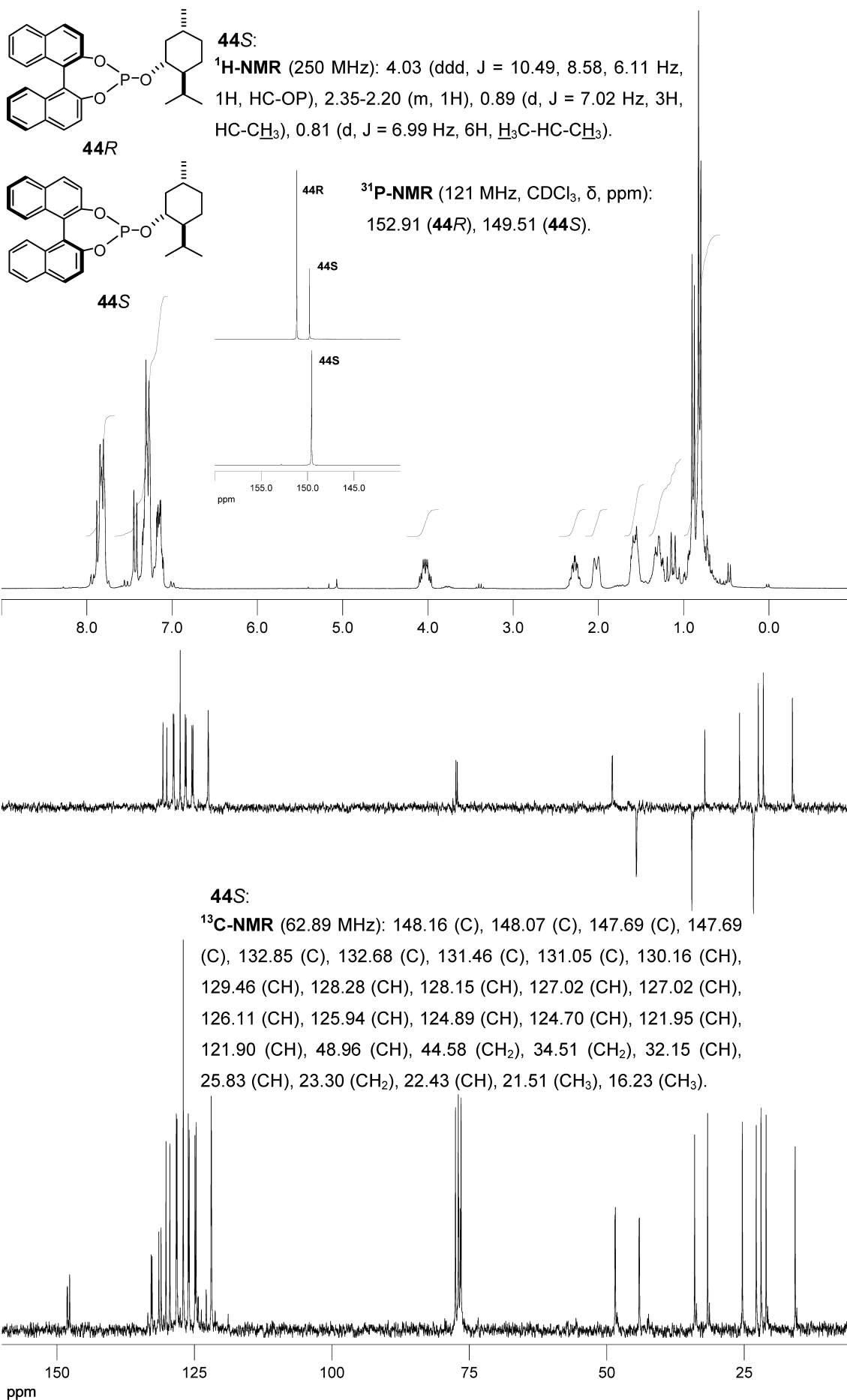


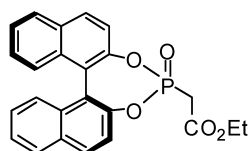
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 83.54 (d,  $J_{C-P} = 9.86$  Hz, HC-OPCl<sub>2</sub>), 48.61 (d,  $J_{C-P} = 2.22$  Hz, HC-CHOPCl<sub>2</sub>), 43.24 (CH<sub>2</sub>), 33.86 (CH<sub>2</sub>), 31.59 (CH), 24.99 (CH), 22.82 (CH<sub>2</sub>), 22.06 (CH), 21.24 (CH<sub>3</sub>), 16.05 (CH<sub>3</sub>).



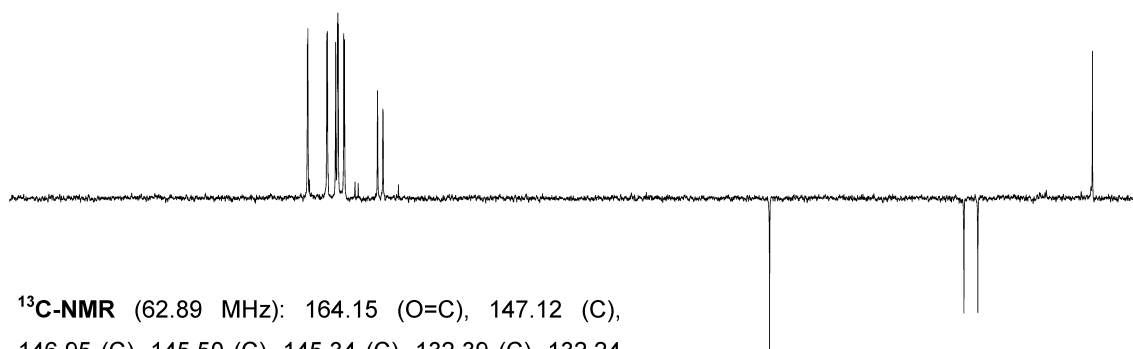
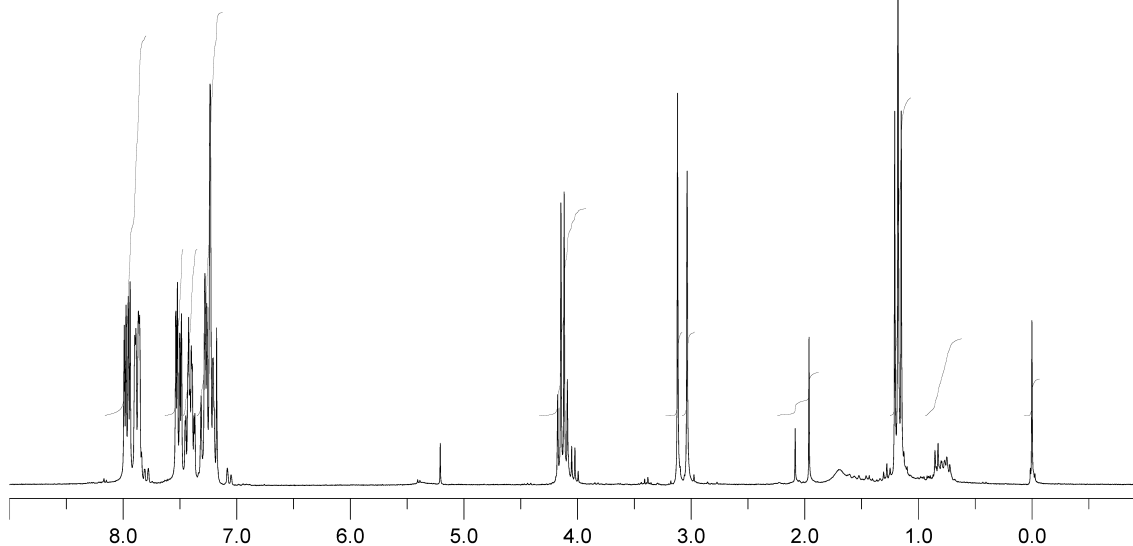
**<sup>31</sup>P-NMR** (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ , ppm): 177.10 (s).



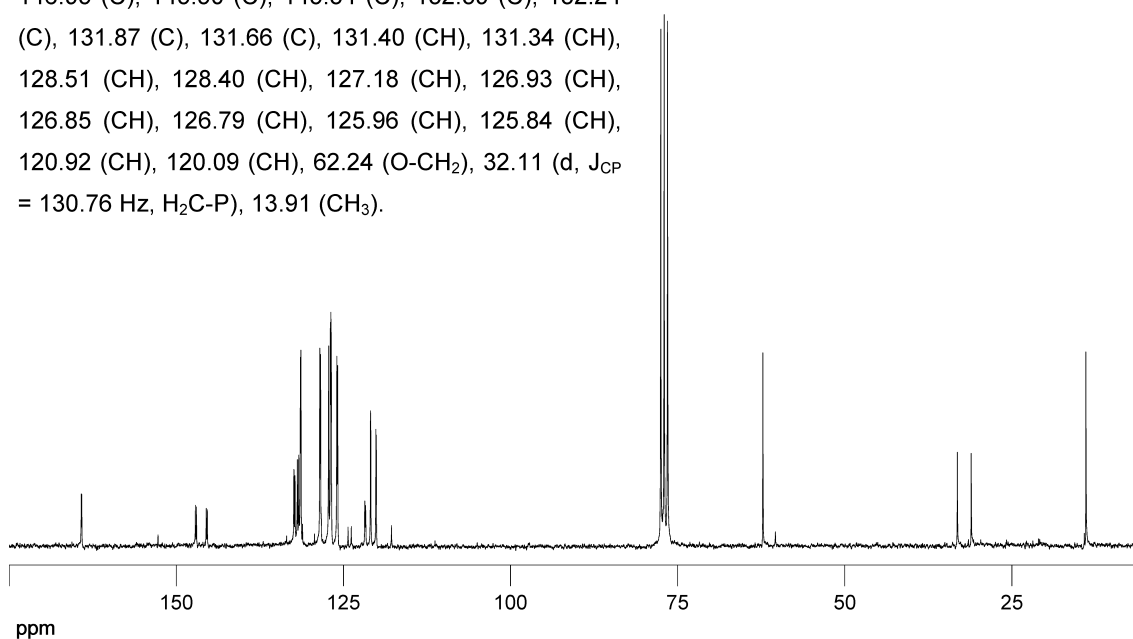


**45S**

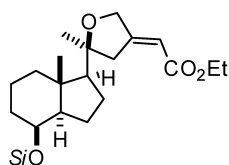
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 4.13 (q,  $J = 7.13$  Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3.08 (d,  $J_{\text{HP}} = 20.94$  Hz, 2H, P-CH<sub>2</sub>), 1.18 (t,  $J = 7.13$  Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).



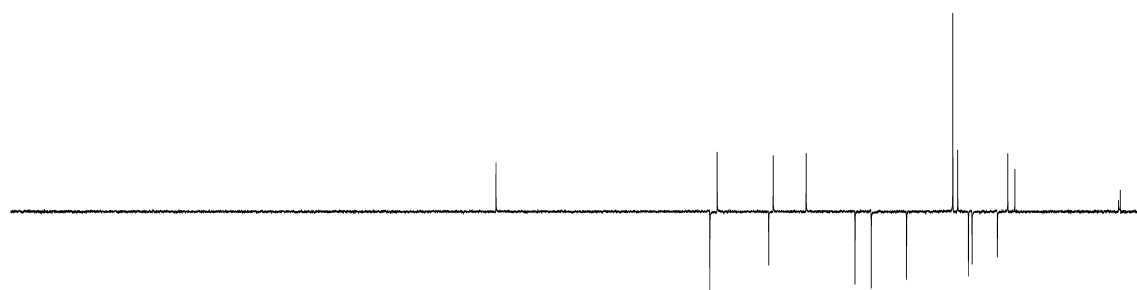
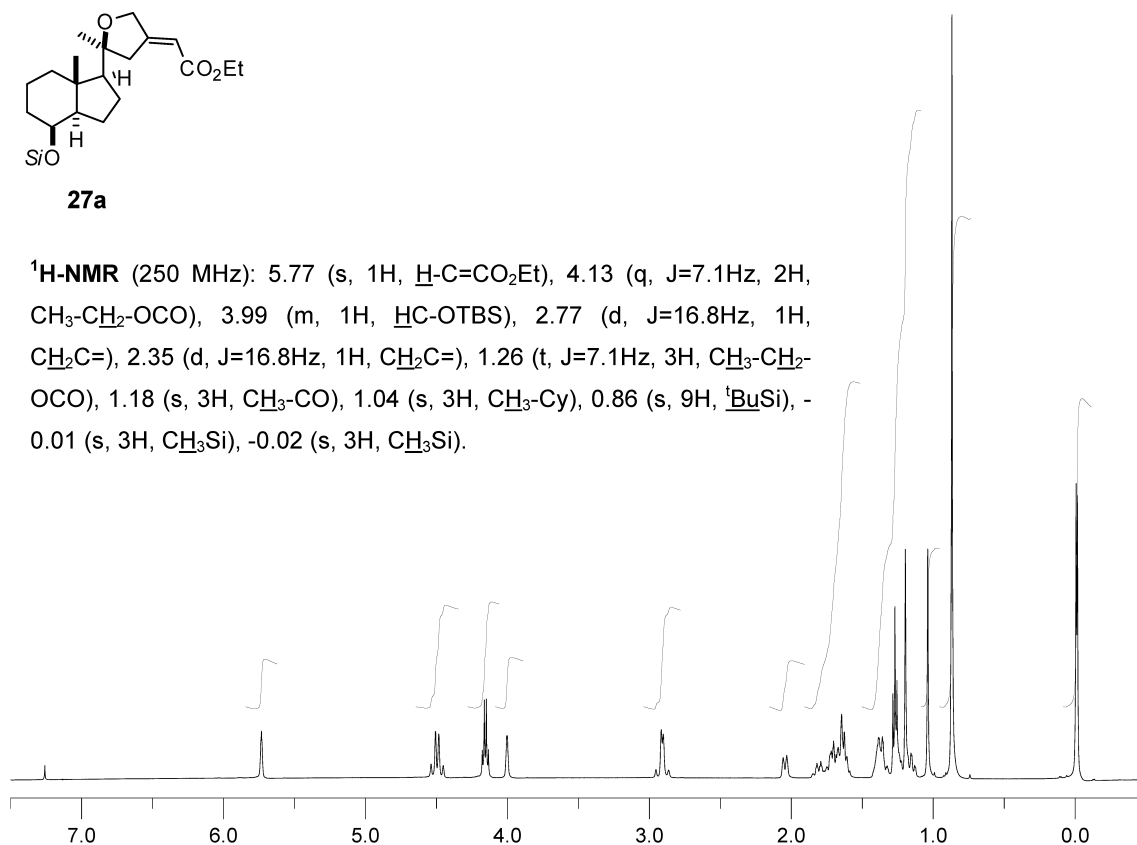
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 164.15 (O=C), 147.12 (C), 146.95 (C), 145.50 (C), 145.34 (C), 132.39 (C), 132.24 (C), 131.87 (C), 131.66 (C), 131.40 (CH), 131.34 (CH), 128.51 (CH), 128.40 (CH), 127.18 (CH), 126.93 (CH), 126.85 (CH), 126.79 (CH), 125.96 (CH), 125.84 (CH), 120.92 (CH), 120.09 (CH), 62.24 (O-CH<sub>2</sub>), 32.11 (d,  $J_{\text{CP}} = 130.76$  Hz, H<sub>2</sub>C-P), 13.91 (CH<sub>3</sub>).



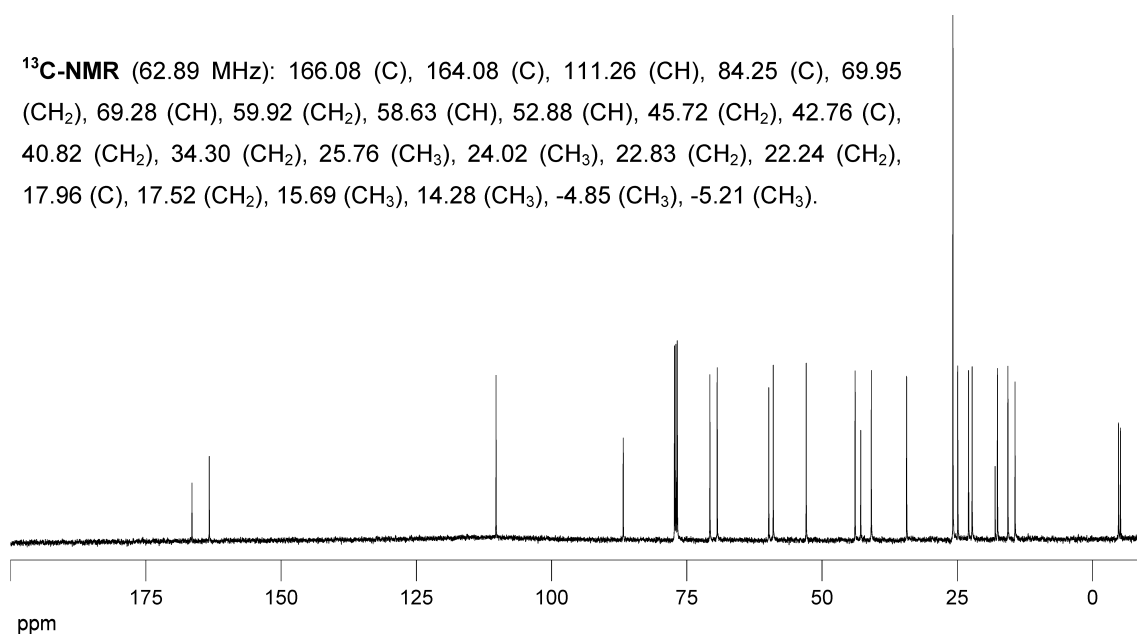
ppm

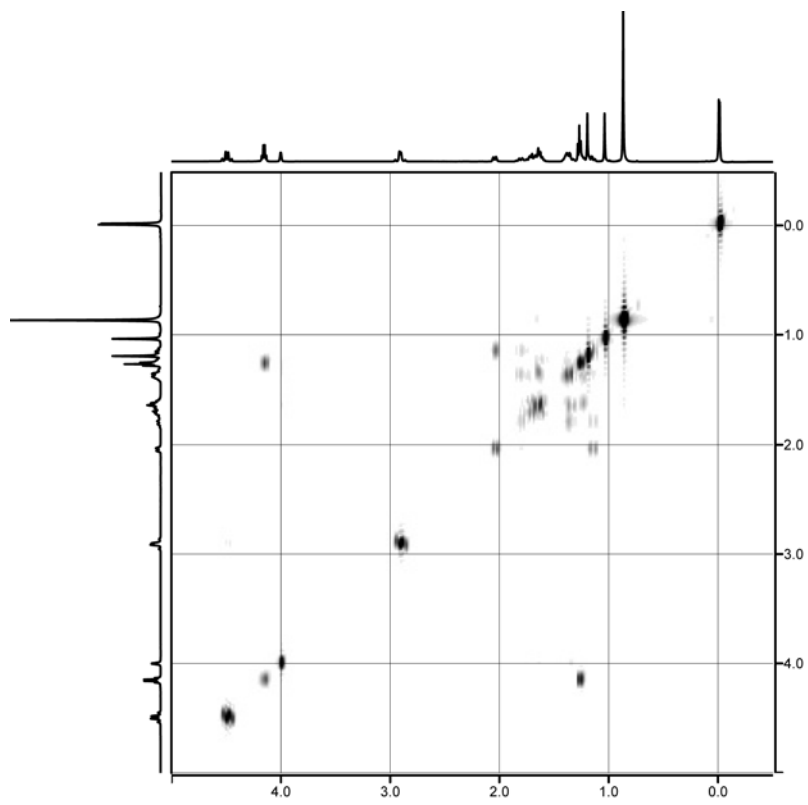
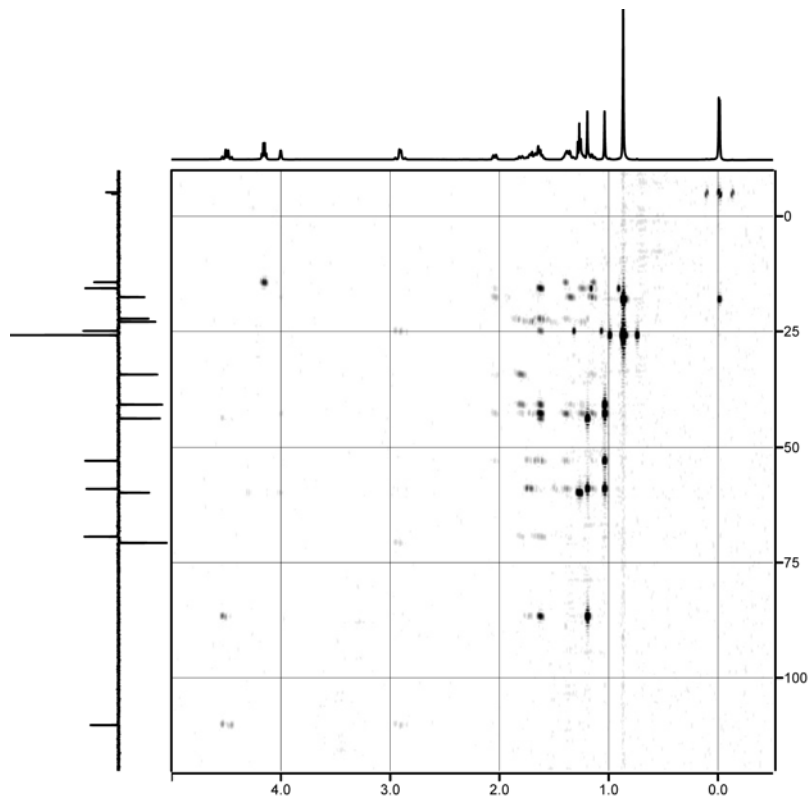
**27a**

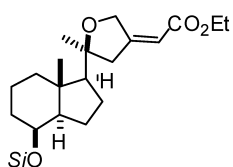
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.77 (s, 1H,  $\underline{H}$ -C=CO<sub>2</sub>Et), 4.13 (q, J=7.1Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO), 3.99 (m, 1H,  $\underline{H}$ C-OTBS), 2.77 (d, J=16.8Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C=), 2.35 (d, J=16.8Hz, 1H, CH<sub>2</sub>C=), 1.26 (t, J=7.1Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO), 1.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.86 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), -0.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si), -0.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).



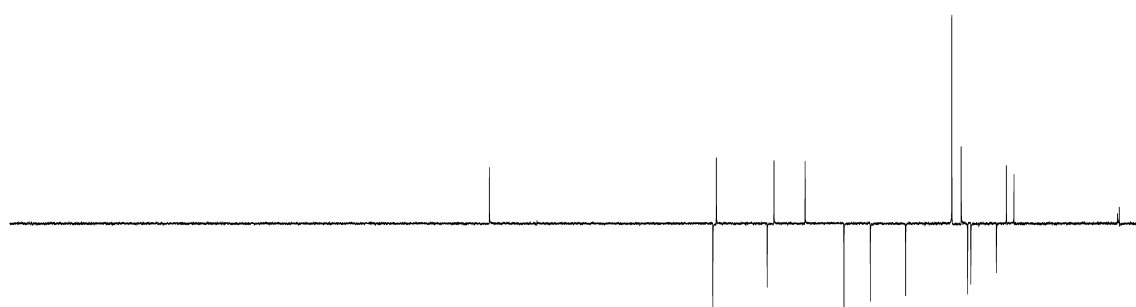
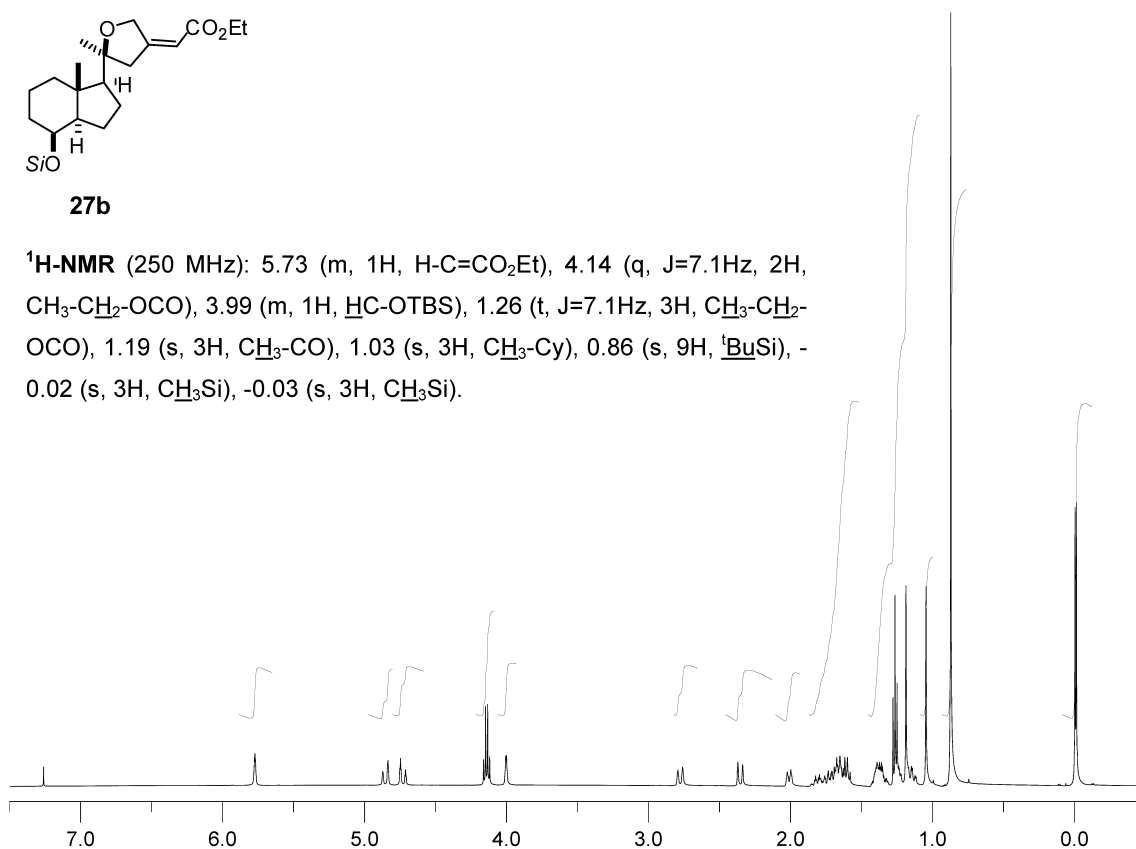
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 166.08 (C), 164.08 (C), 111.26 (CH), 84.25 (C), 69.95 (CH<sub>2</sub>), 69.28 (CH), 59.92 (CH<sub>2</sub>), 58.63 (CH), 52.88 (CH), 45.72 (CH<sub>2</sub>), 42.76 (C), 40.82 (CH<sub>2</sub>), 34.30 (CH<sub>2</sub>), 25.76 (CH<sub>3</sub>), 24.02 (CH<sub>3</sub>), 22.83 (CH<sub>2</sub>), 22.24 (CH<sub>2</sub>), 17.96 (C), 17.52 (CH<sub>2</sub>), 15.69 (CH<sub>3</sub>), 14.28 (CH<sub>3</sub>), -4.85 (CH<sub>3</sub>), -5.21 (CH<sub>3</sub>).



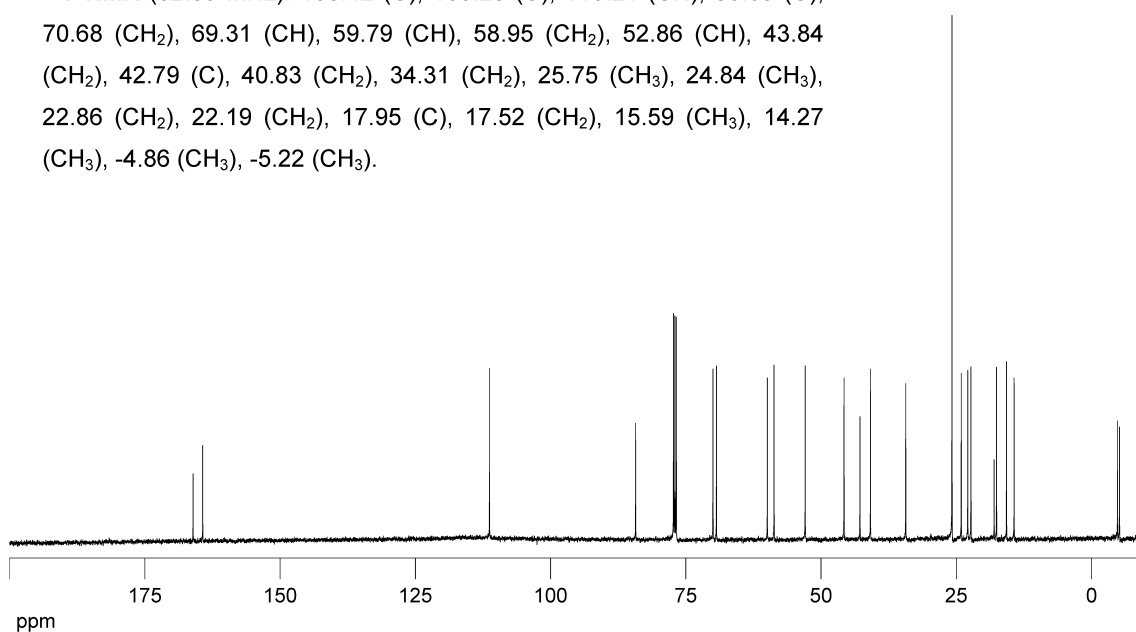
**$^1\text{H}$ -COSY****HMQC**

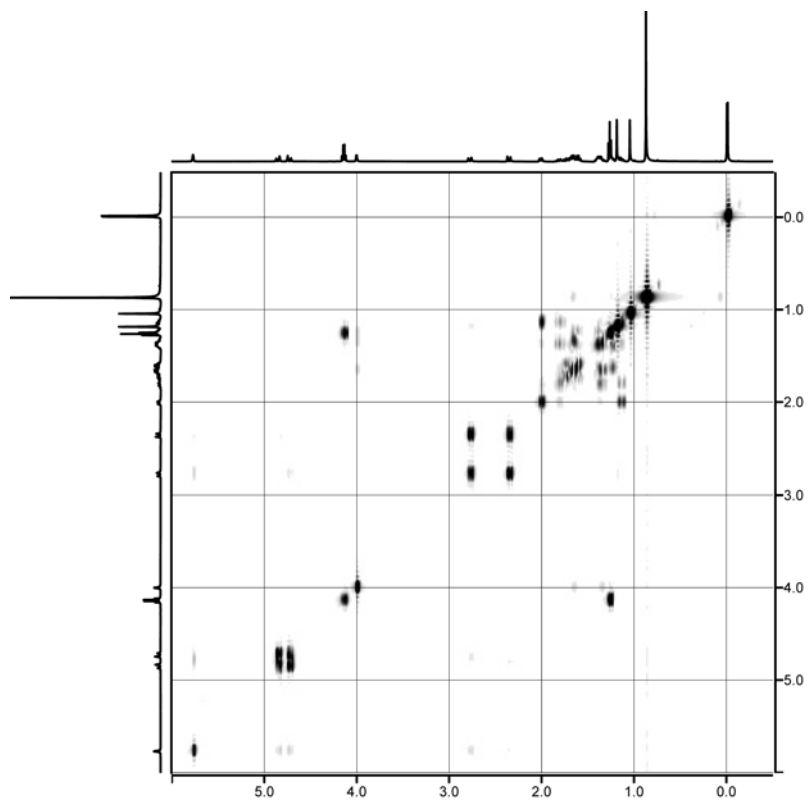
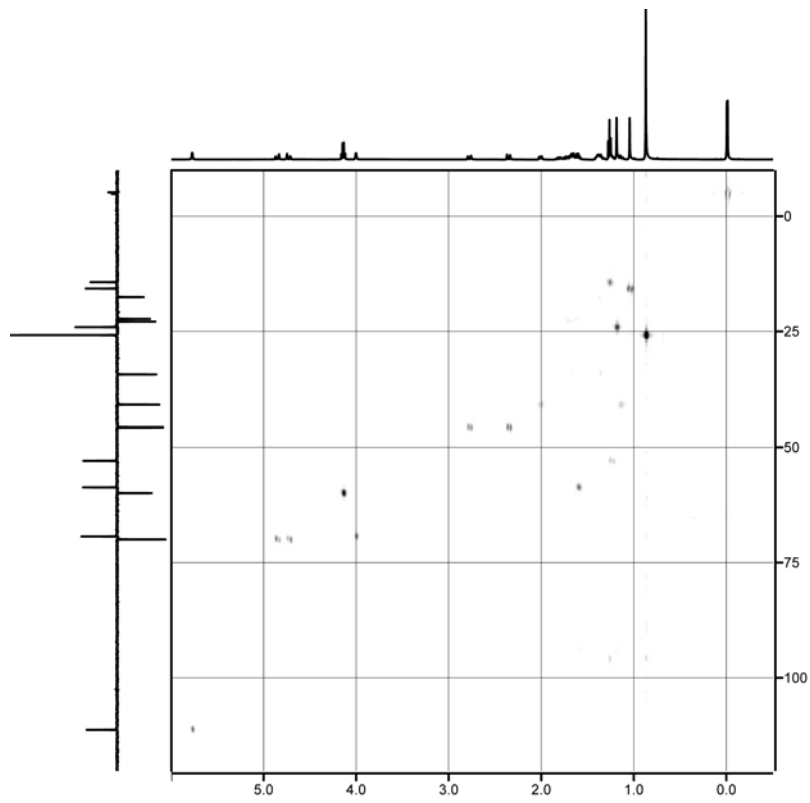
**27b**

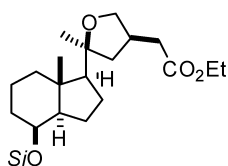
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.73 (m, 1H, H-C=CO<sub>2</sub>Et), 4.14 (q, J=7.1Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO), 3.99 (m, 1H, HC-OTBS), 1.26 (t, J=7.1Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO), 1.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.86 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), -0.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si), -0.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).



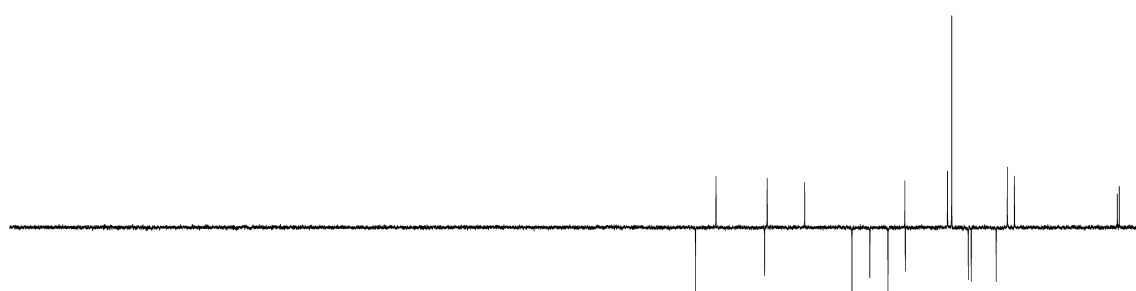
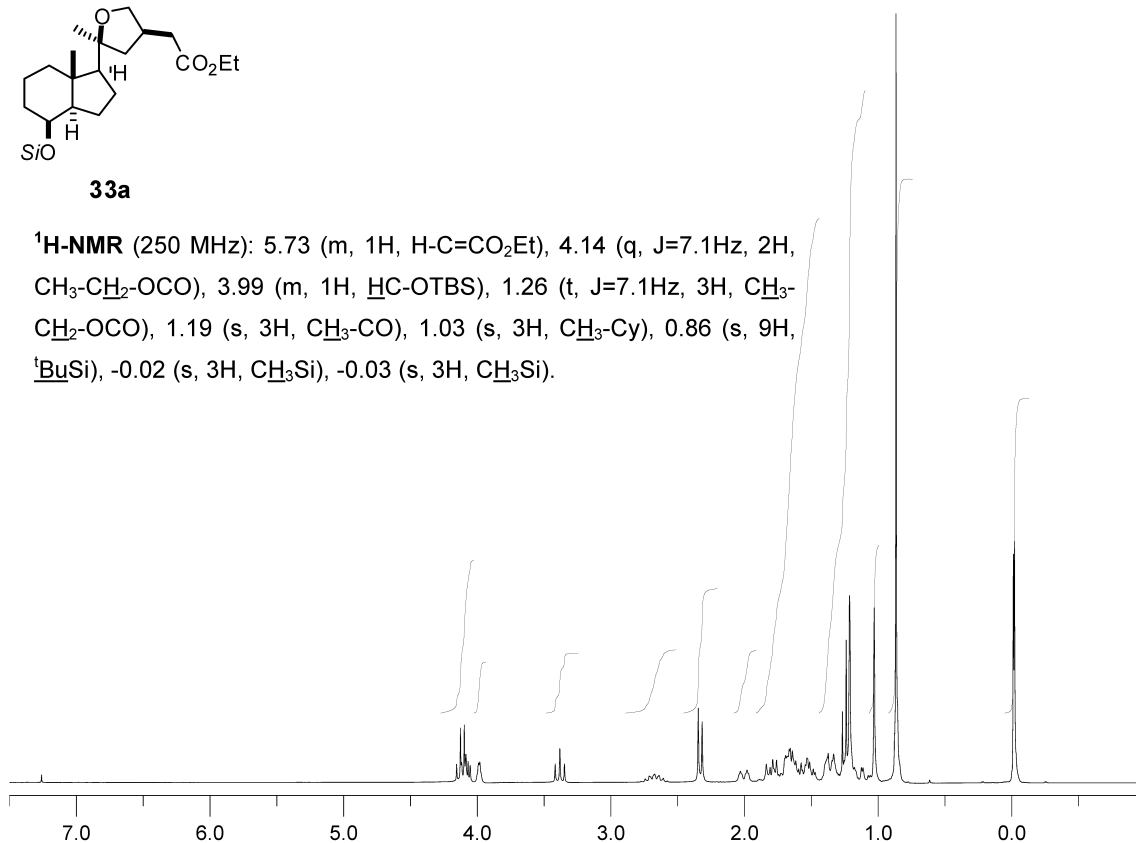
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 166.42 (C), 163.23 (C), 110.21 (CH), 86.69 (C), 70.68 (CH<sub>2</sub>), 69.31 (CH), 59.79 (CH), 58.95 (CH<sub>2</sub>), 52.86 (CH), 43.84 (CH<sub>2</sub>), 42.79 (C), 40.83 (CH<sub>2</sub>), 34.31 (CH<sub>2</sub>), 25.75 (CH<sub>3</sub>), 24.84 (CH<sub>3</sub>), 22.86 (CH<sub>2</sub>), 22.19 (CH<sub>2</sub>), 17.95 (C), 17.52 (CH<sub>2</sub>), 15.59 (CH<sub>3</sub>), 14.27 (CH<sub>3</sub>), -4.86 (CH<sub>3</sub>), -5.22 (CH<sub>3</sub>).



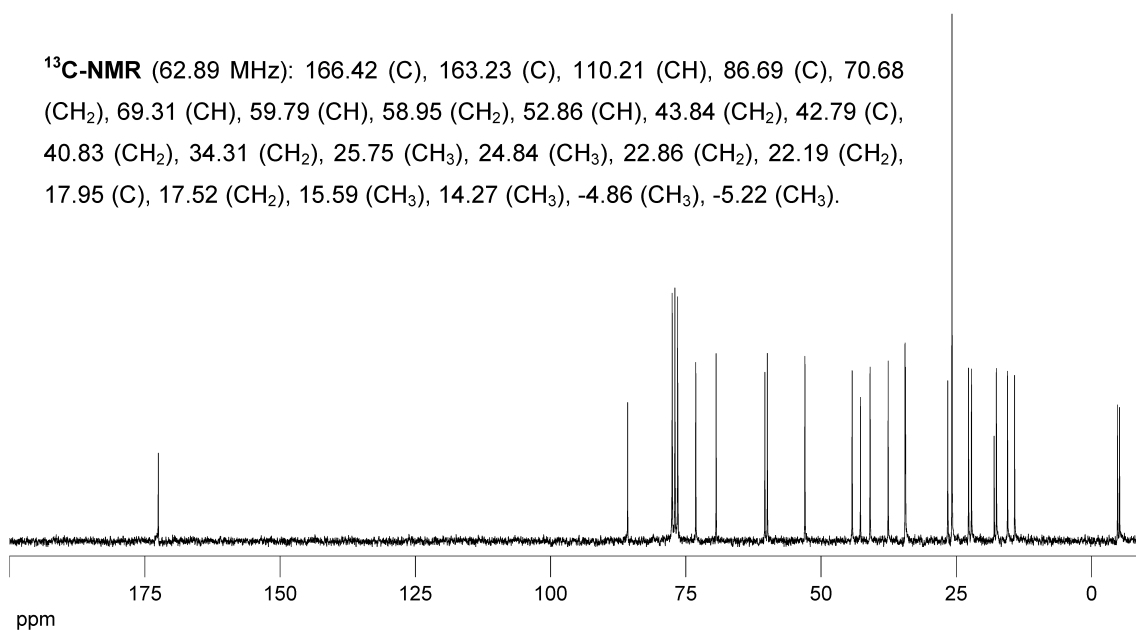
**$^1\text{H}$ -COSY****HMQC**

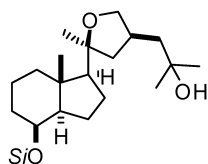
**33a**

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.73 (m, 1H, H-C=CO<sub>2</sub>Et), 4.14 (q, J=7.1Hz, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO), 3.99 (m, 1H, HC-OTBS), 1.26 (t, J=7.1Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-OCO), 1.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Cy), 0.86 (s, 9H, <sup>t</sup>BuSi), -0.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si), -0.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Si).

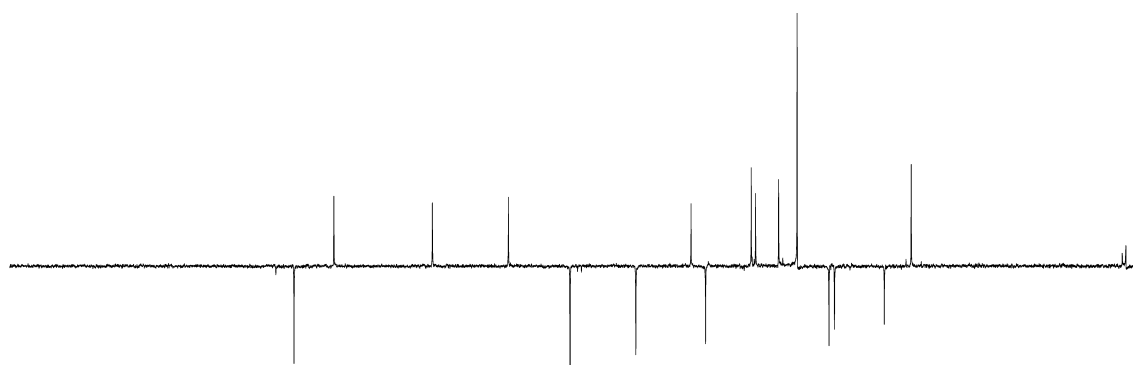
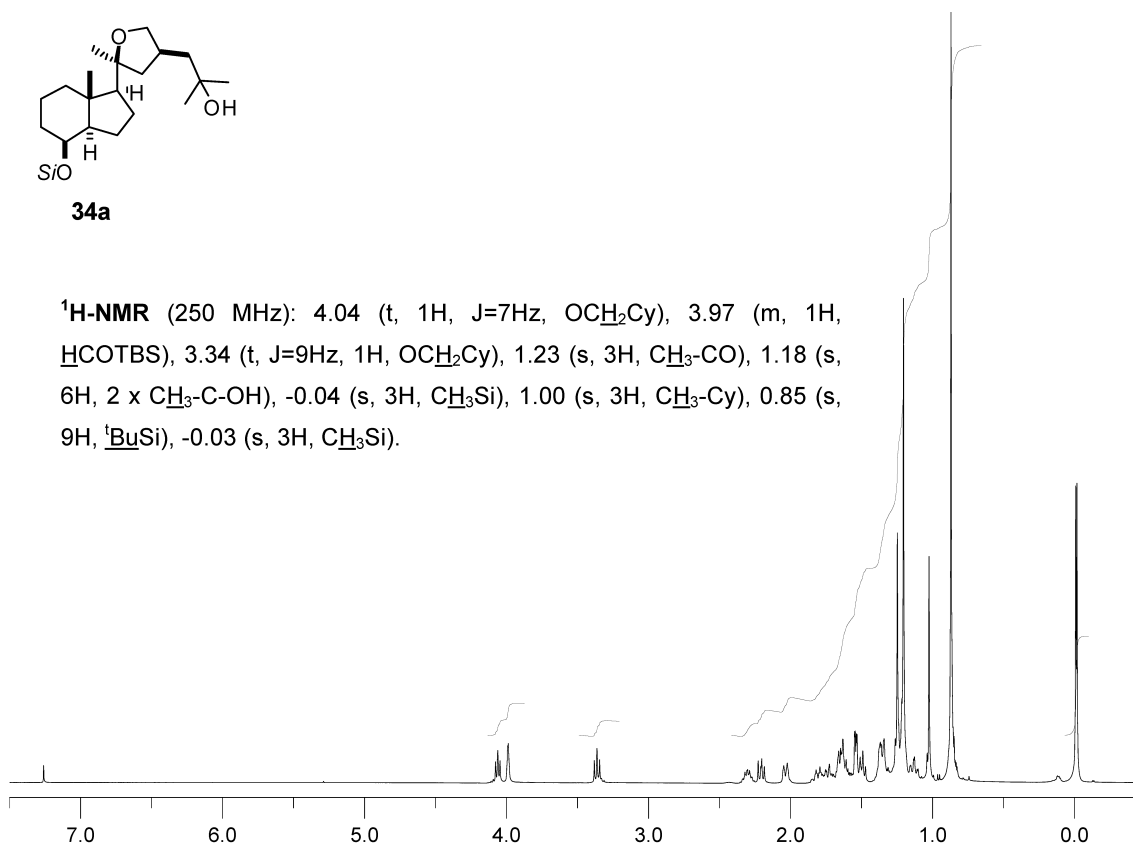


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 166.42 (C), 163.23 (C), 110.21 (CH), 86.69 (C), 70.68 (CH<sub>2</sub>), 69.31 (CH), 59.79 (CH), 58.95 (CH<sub>2</sub>), 52.86 (CH), 43.84 (CH<sub>2</sub>), 42.79 (C), 40.83 (CH<sub>2</sub>), 34.31 (CH<sub>2</sub>), 25.75 (CH<sub>3</sub>), 24.84 (CH<sub>3</sub>), 22.86 (CH<sub>2</sub>), 22.19 (CH<sub>2</sub>), 17.95 (C), 17.52 (CH<sub>2</sub>), 15.59 (CH<sub>3</sub>), 14.27 (CH<sub>3</sub>), -4.86 (CH<sub>3</sub>), -5.22 (CH<sub>3</sub>).

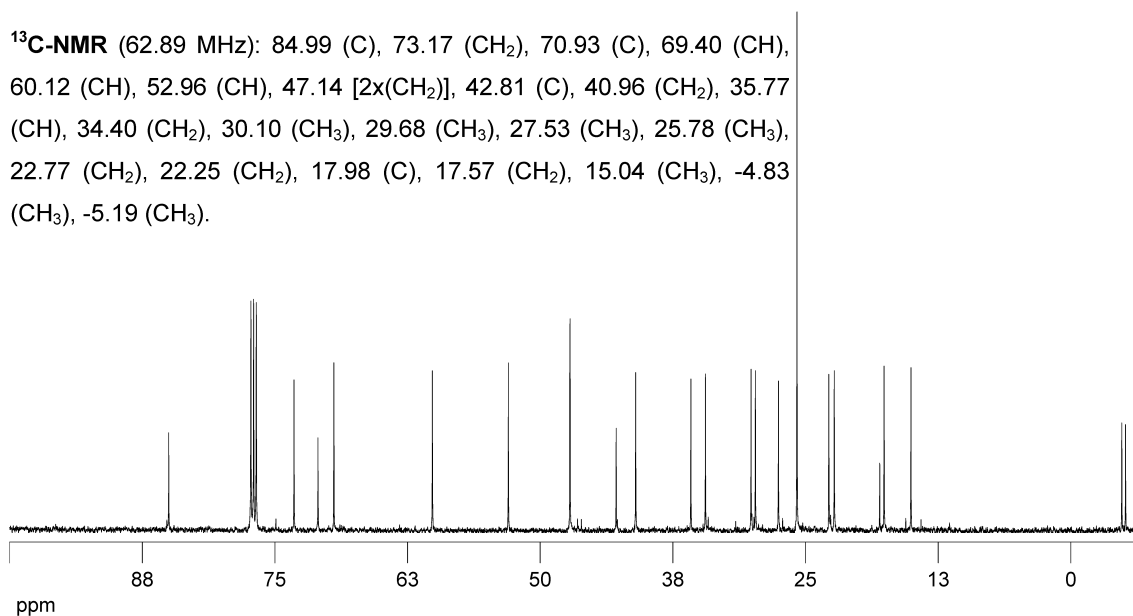


**34a**

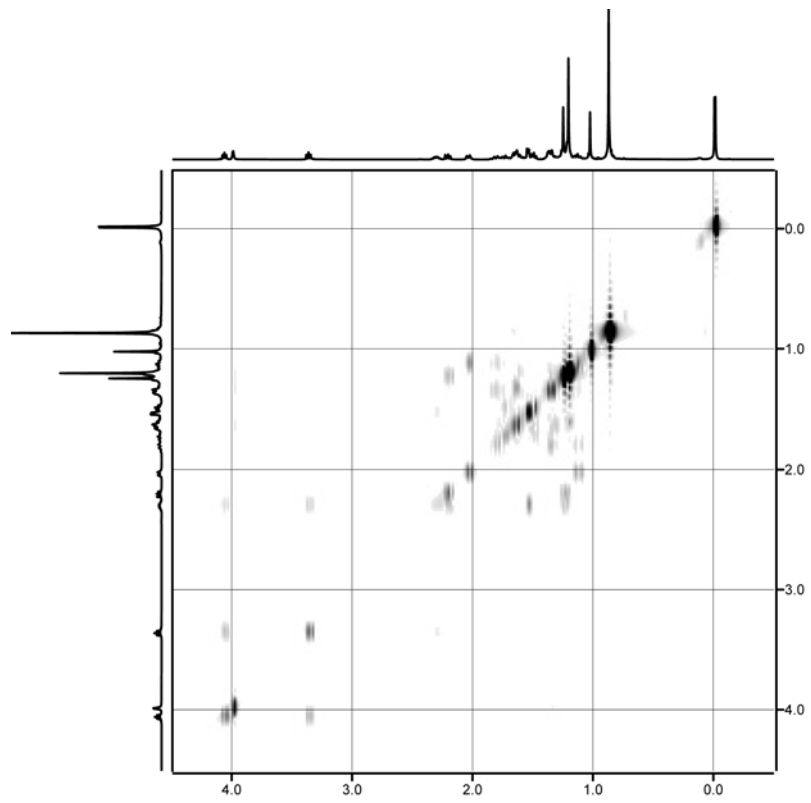
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 4.04 (t, 1H,  $J=7\text{Hz}$ ,  $\text{OCH}_2\text{Cy}$ ), 3.97 (m, 1H,  $\text{HCOTBS}$ ), 3.34 (t,  $J=9\text{Hz}$ , 1H,  $\text{OCH}_2\text{Cy}$ ), 1.23 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CO}$ ), 1.18 (s, 6H, 2 x  $\text{CH}_3\text{-C-OH}$ ), -0.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ), 1.00 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Cy}$ ), 0.85 (s, 9H,  $^t\text{BuSi}$ ), -0.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).



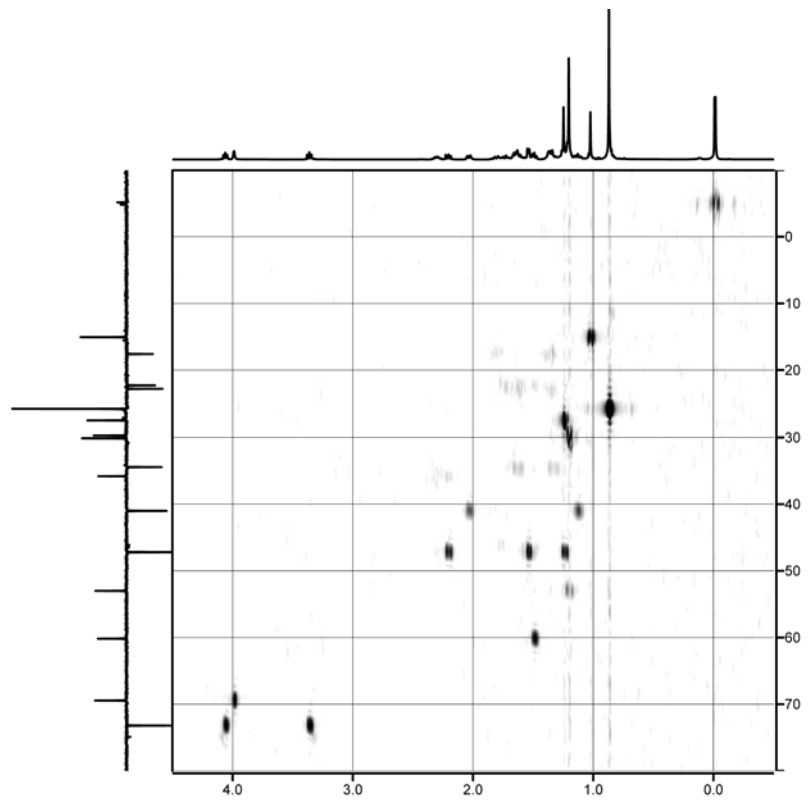
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 84.99 (C), 73.17 ( $\text{CH}_2$ ), 70.93 (C), 69.40 (CH), 60.12 (CH), 52.96 (CH), 47.14 [ $2\times(\text{CH}_2)$ ], 42.81 (C), 40.96 ( $\text{CH}_2$ ), 35.77 (CH), 34.40 ( $\text{CH}_2$ ), 30.10 ( $\text{CH}_3$ ), 29.68 ( $\text{CH}_3$ ), 27.53 ( $\text{CH}_3$ ), 25.78 ( $\text{CH}_3$ ), 22.77 ( $\text{CH}_2$ ), 22.25 ( $\text{CH}_2$ ), 17.98 (C), 17.57 ( $\text{CH}_2$ ), 15.04 ( $\text{CH}_3$ ), -4.83 ( $\text{CH}_3$ ), -5.19 ( $\text{CH}_3$ ).

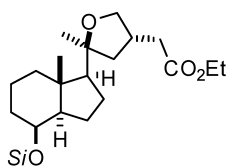


**<sup>1</sup>H-COSY**

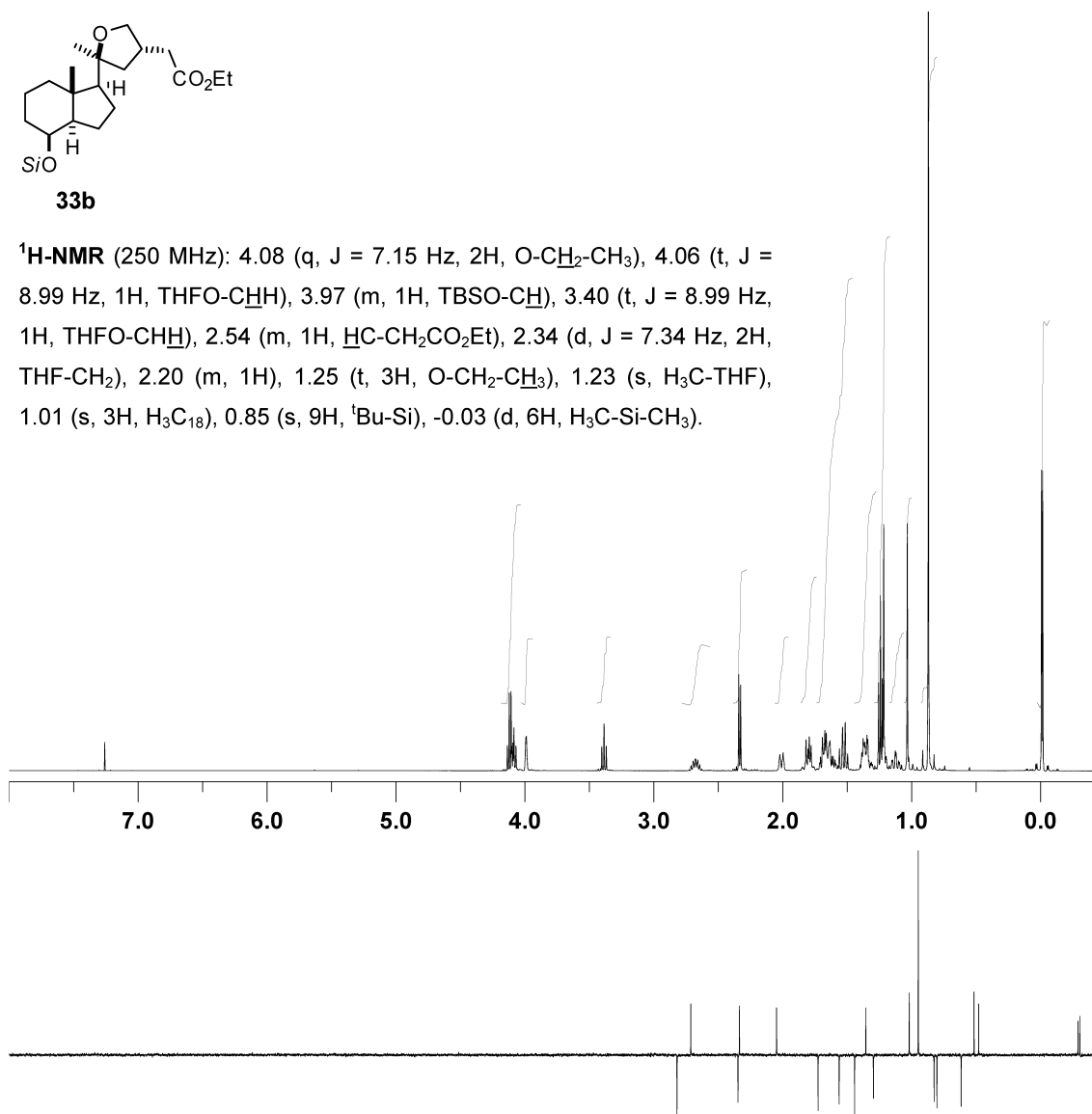


**HMQC**

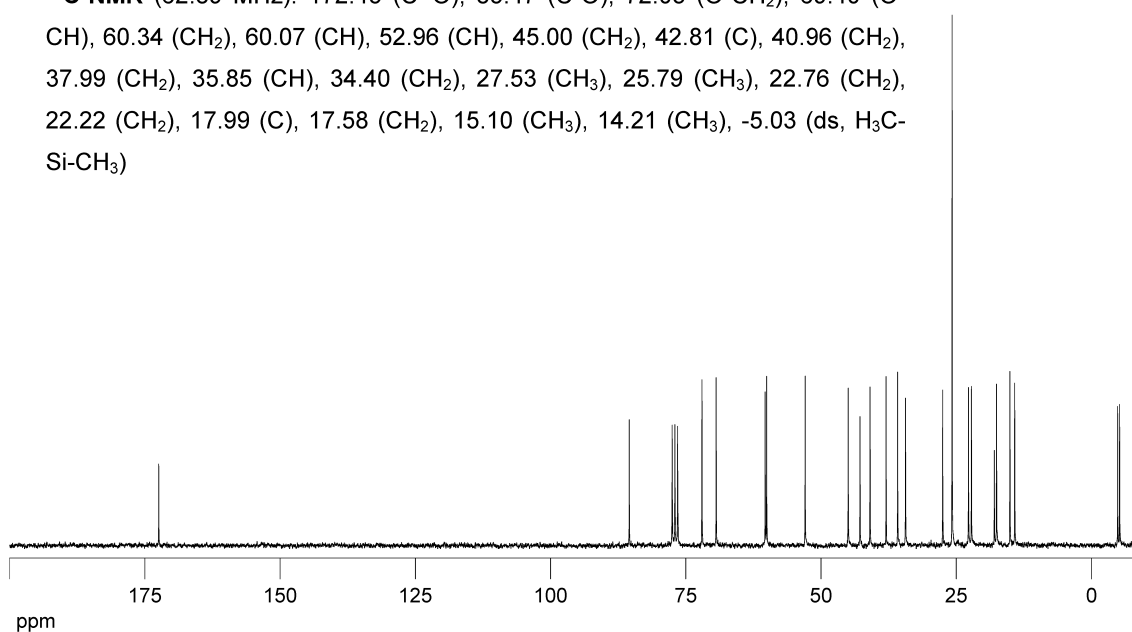


**33b**

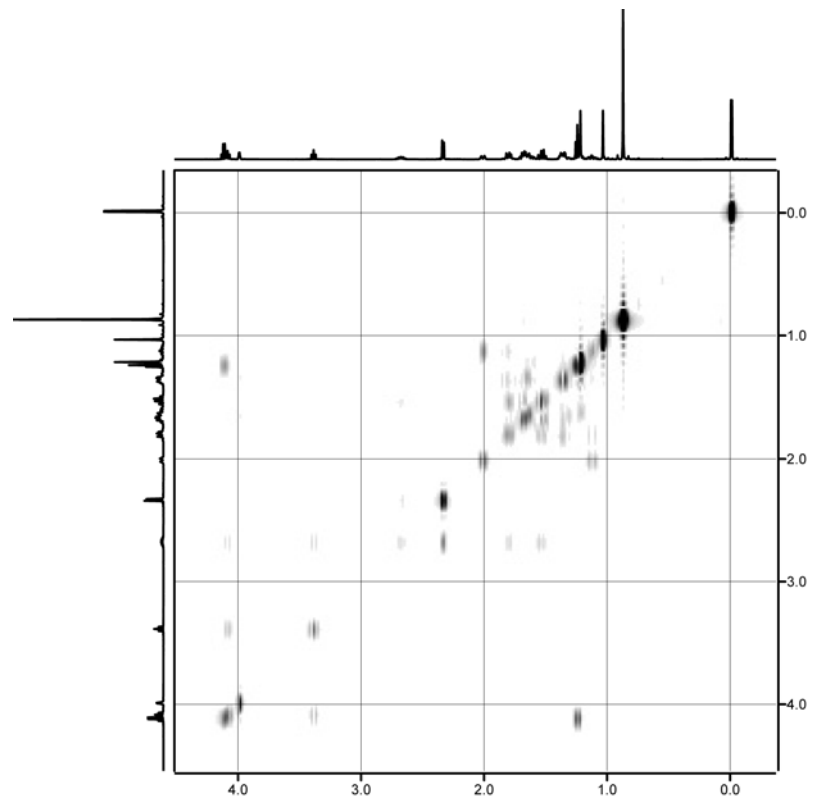
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.08 (q,  $J = 7.15$  Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4.06 (t,  $J = 8.99$  Hz, 1H, THFO-CH<sub>H</sub>), 3.97 (m, 1H, TBSO-CH), 3.40 (t,  $J = 8.99$  Hz, 1H, THFO-CH<sub>H</sub>), 2.54 (m, 1H, HC-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et), 2.34 (d,  $J = 7.34$  Hz, 2H, THF-CH<sub>2</sub>), 2.20 (m, 1H), 1.25 (t, 3H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.23 (s, H<sub>3</sub>C-THF), 1.01 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 0.85 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu-Si), -0.03 (d, 6H, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>).



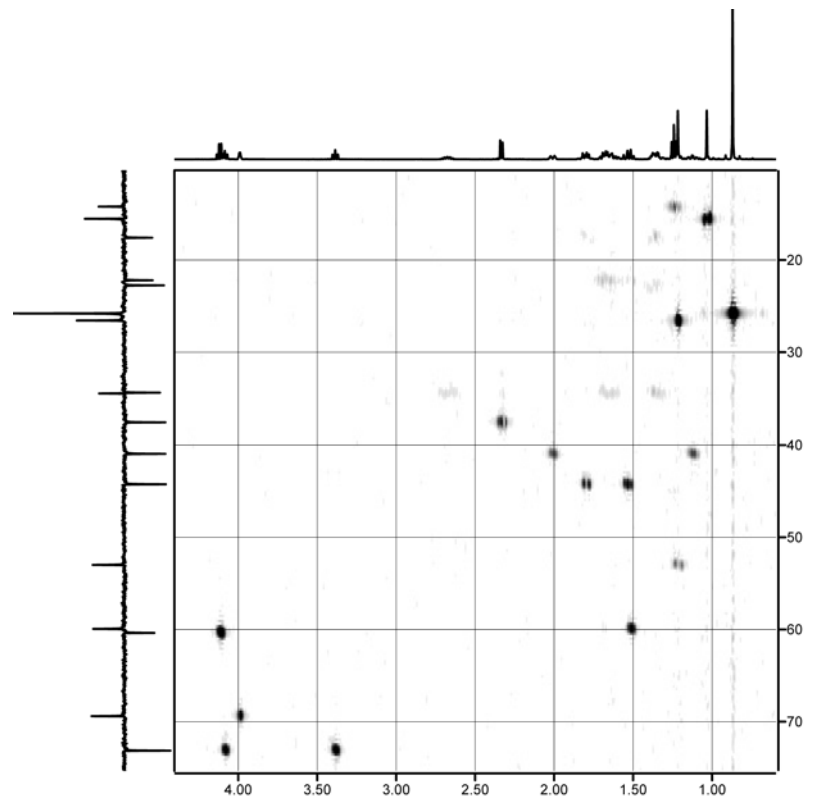
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 172.45 (C=O), 85.47 (C-O), 72.03 (O-CH<sub>2</sub>), 69.40 (O-CH), 60.34 (CH<sub>2</sub>), 60.07 (CH), 52.96 (CH), 45.00 (CH<sub>2</sub>), 42.81 (C), 40.96 (CH<sub>2</sub>), 37.99 (CH<sub>2</sub>), 35.85 (CH), 34.40 (CH<sub>2</sub>), 27.53 (CH<sub>3</sub>), 25.79 (CH<sub>3</sub>), 22.76 (CH<sub>2</sub>), 22.22 (CH<sub>2</sub>), 17.99 (C), 17.58 (CH<sub>2</sub>), 15.10 (CH<sub>3</sub>), 14.21 (CH<sub>3</sub>), -5.03 (ds, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>)

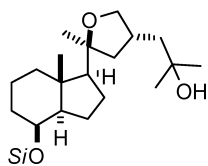


**<sup>1</sup>H-COSY**

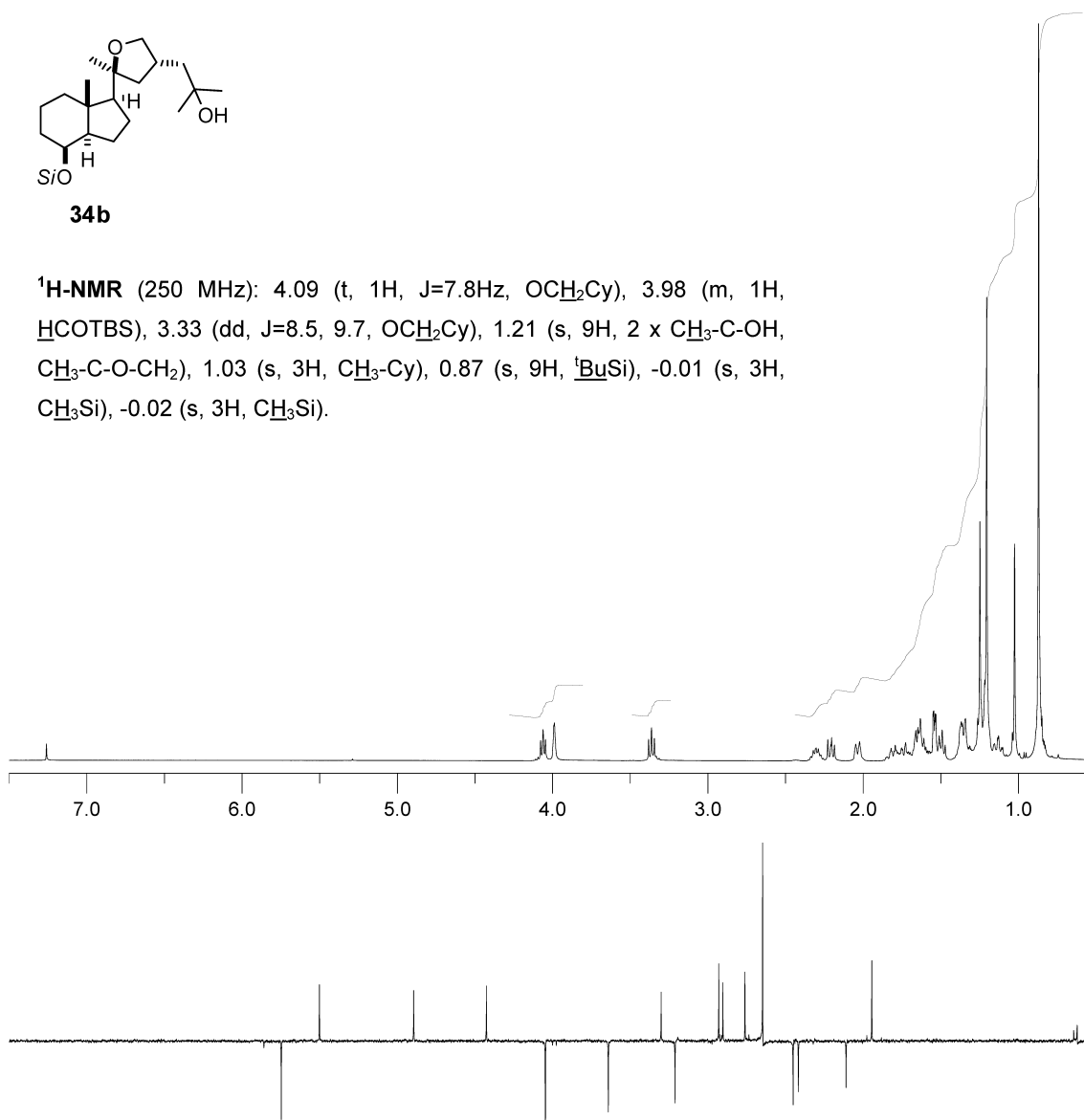


**HMQC**

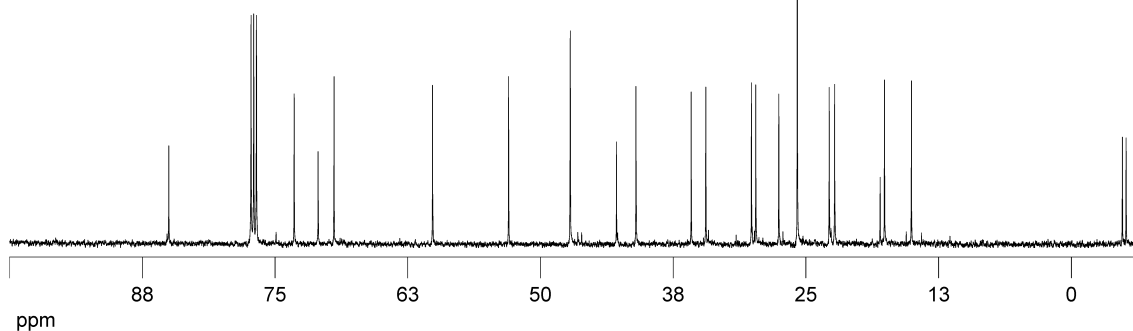


**34b**

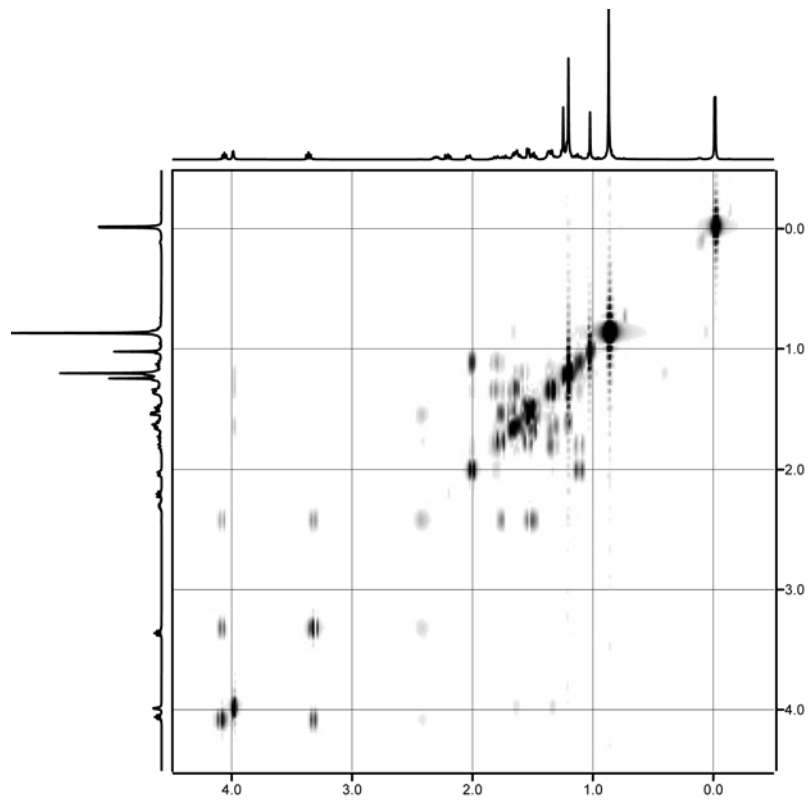
**$^1\text{H-NMR}$**  (250 MHz): 4.09 (t, 1H,  $J=7.8\text{Hz}$ ,  $\text{OCH}_2\text{Cy}$ ), 3.98 (m, 1H,  $\text{HCOTBS}$ ), 3.33 (dd,  $J=8.5, 9.7$ ,  $\text{OCH}_2\text{Cy}$ ), 1.21 (s, 9H, 2 x  $\text{CH}_3\text{-C-OH}$ ,  $\text{CH}_3\text{-C-O-CH}_2$ ), 1.03 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Cy}$ ), 0.87 (s, 9H,  $\text{t-BuSi}$ ), -0.01 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ), -0.02 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).



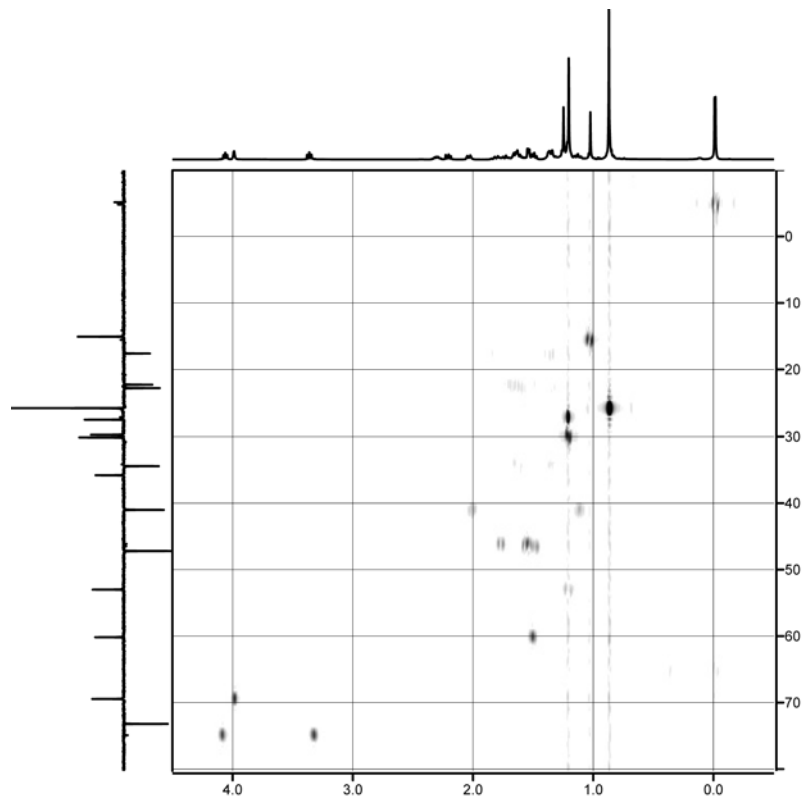
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (62.89 MHz): 85.19 (C), 74.88 ( $\text{CH}_2$ ), 70.94 (C), 69.38 (CH), 60.08 (CH), 52.96 (CH), 46.40 ( $\text{CH}_2$ ), 46.08 ( $\text{CH}_2$ ), 42.69 (C), 40.93 ( $\text{CH}_2$ ), 34.38 ( $\text{CH}_2$ ), 34.13 (CH), 30.01 ( $\text{CH}_3$ ), 29.81 ( $\text{CH}_3$ ), 27.14 ( $\text{CH}_3$ ), 25.78 ( $\text{CH}_3$ ), 22.73 ( $\text{CH}_2$ ), 22.21 ( $\text{CH}_2$ ), 17.98 (C), 17.57 ( $\text{CH}_2$ ), 15.53 ( $\text{CH}_3$ ), -4.83 ( $\text{CH}_3$ ), -5.19 ( $\text{CH}_3$ ).

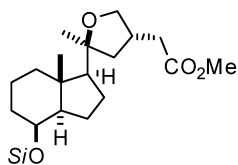


**<sup>1</sup>H-COSY**

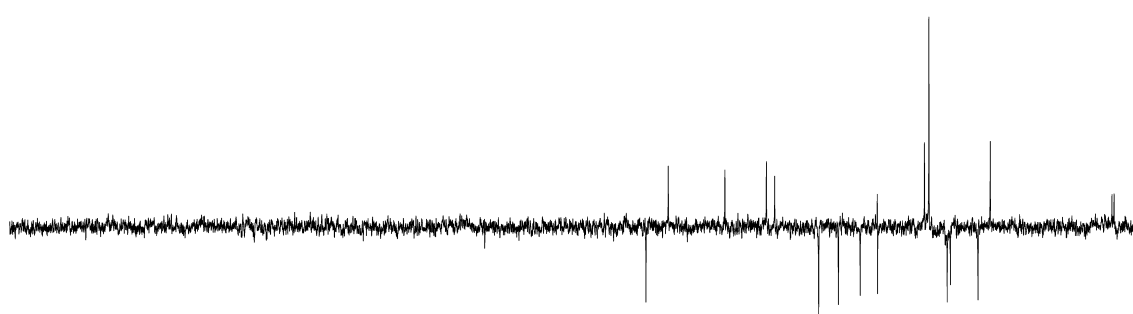
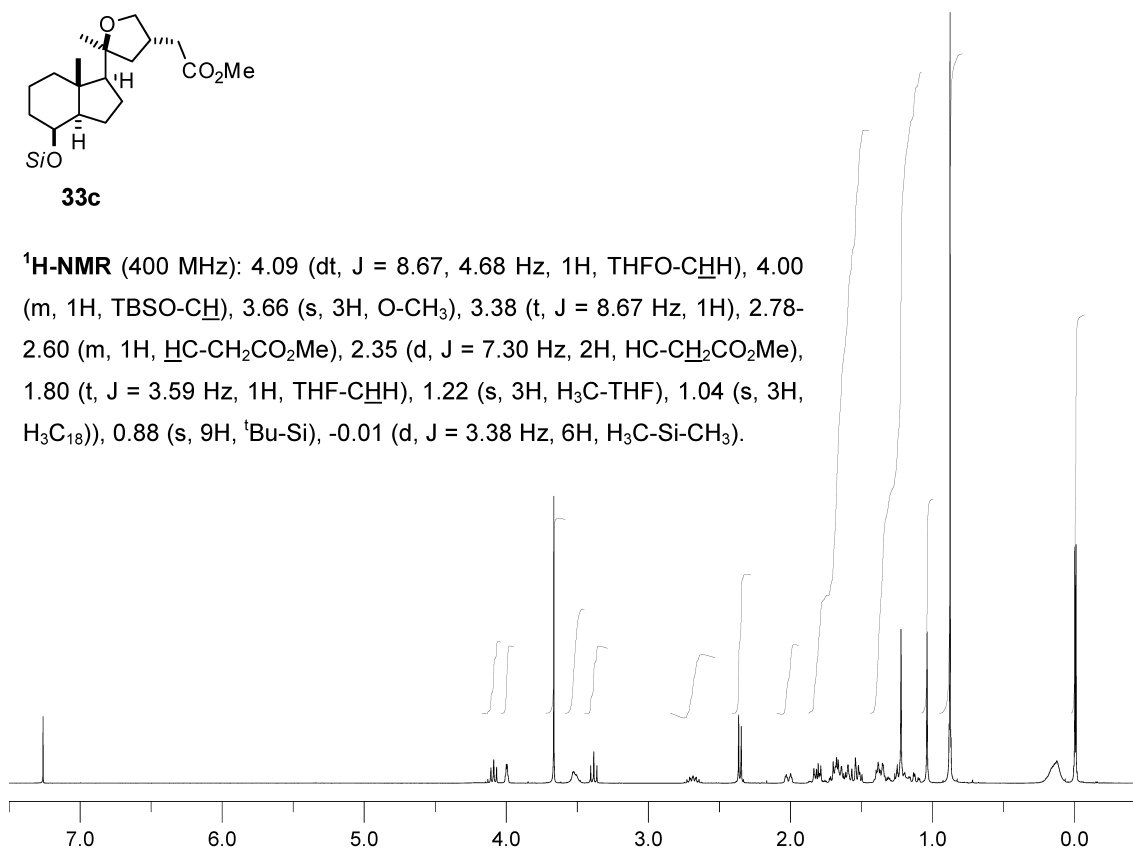


**HMQC**

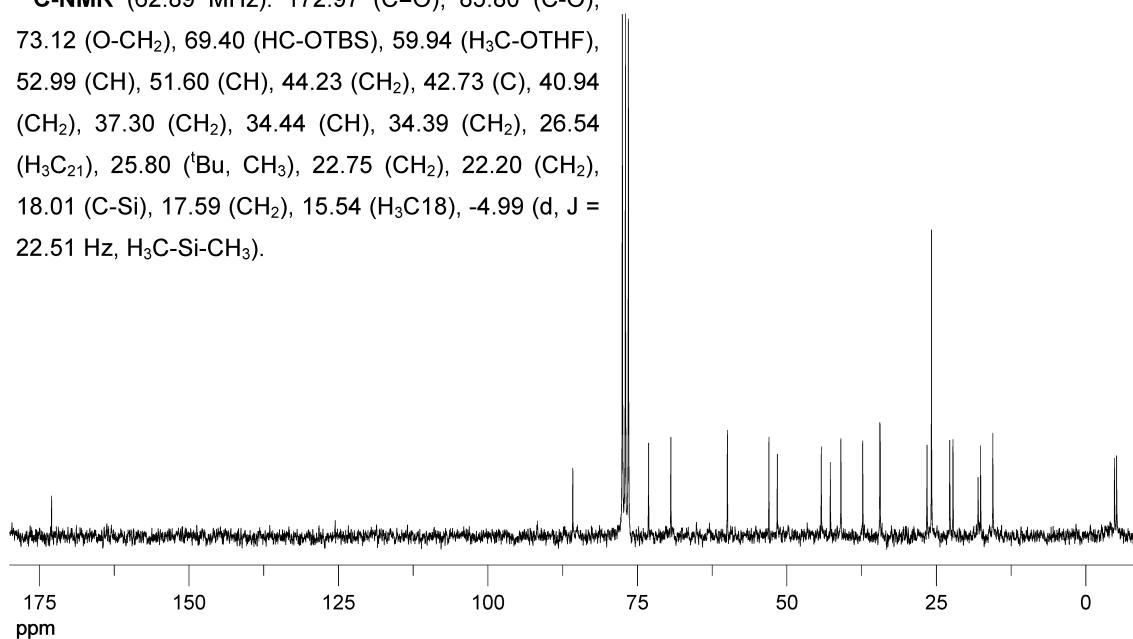


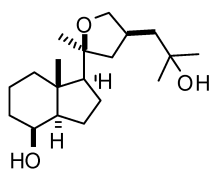
**33c**

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz): 4.09 (dt,  $J = 8.67, 4.68$  Hz, 1H, THFO-CHH), 4.00 (m, 1H, TBSO-CH), 3.66 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.38 (t,  $J = 8.67$  Hz, 1H), 2.78-2.60 (m, 1H, HC-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me), 2.35 (d,  $J = 7.30$  Hz, 2H, HC-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me), 1.80 (t,  $J = 3.59$  Hz, 1H, THF-CHH), 1.22 (s, 3H, H<sub>3</sub>C-THF), 1.04 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 0.88 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu-Si), -0.01 (d,  $J = 3.38$  Hz, 6H, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>).

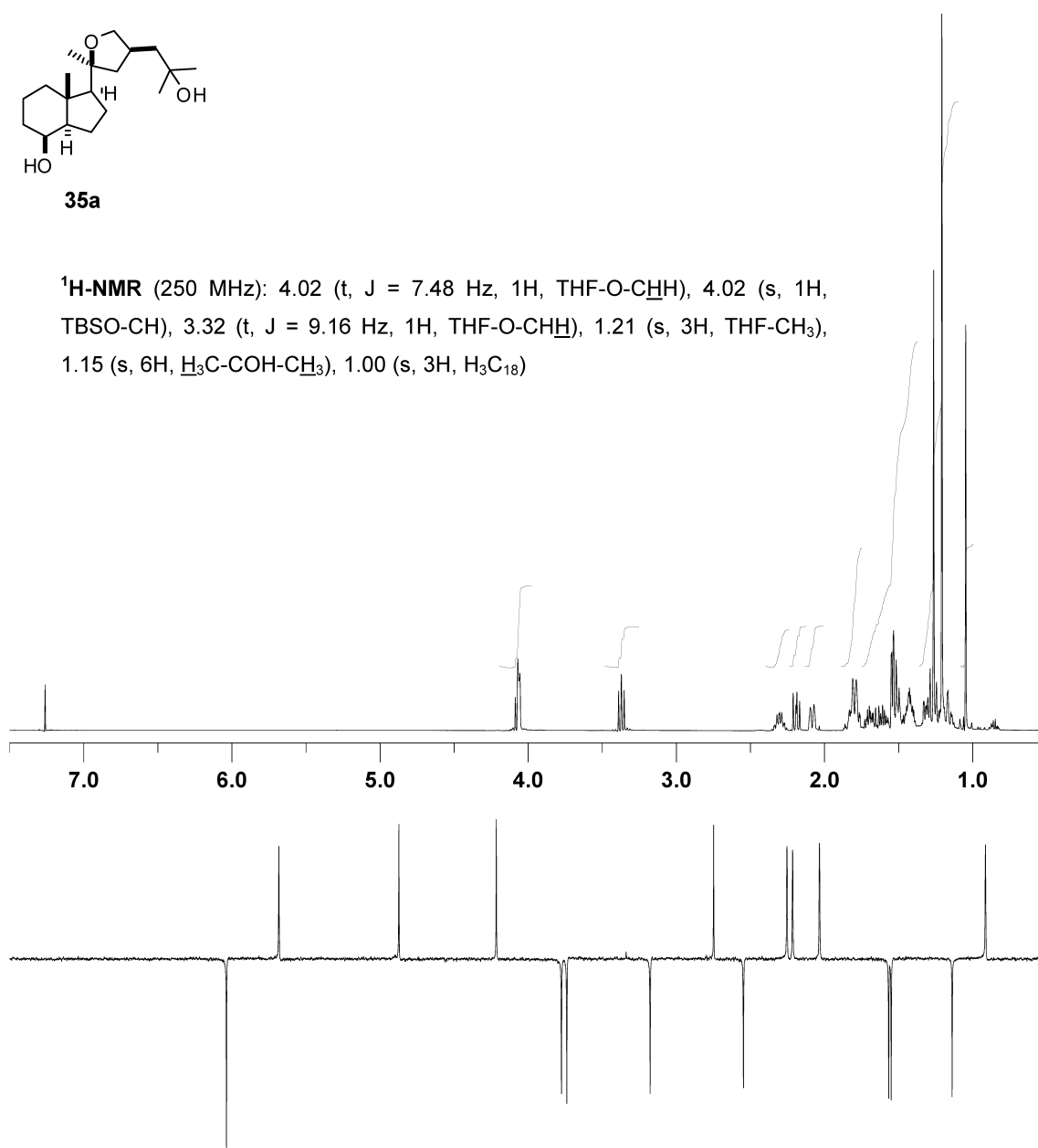


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 172.97 (C=O), 85.80 (C-O), 73.12 (O-CH<sub>2</sub>), 69.40 (HC-OTBS), 59.94 (H<sub>3</sub>C-OTHF), 52.99 (CH), 51.60 (CH), 44.23 (CH<sub>2</sub>), 42.73 (C), 40.94 (CH<sub>2</sub>), 37.30 (CH<sub>2</sub>), 34.44 (CH), 34.39 (CH<sub>2</sub>), 26.54 (H<sub>3</sub>C<sub>21</sub>), 25.80 (<sup>t</sup>Bu, CH<sub>3</sub>), 22.75 (CH<sub>2</sub>), 22.20 (CH<sub>2</sub>), 18.01 (C-Si), 17.59 (CH<sub>2</sub>), 15.54 (H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), -4.99 (d,  $J = 22.51$  Hz, H<sub>3</sub>C-Si-CH<sub>3</sub>).

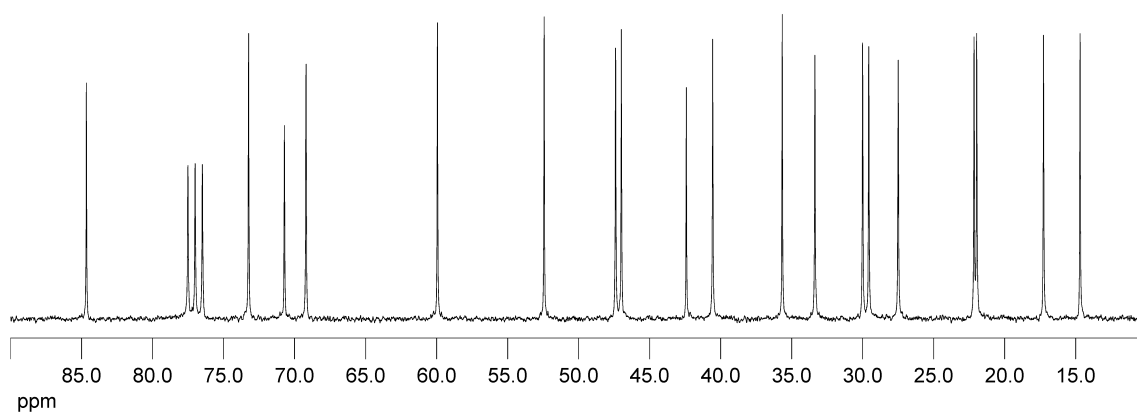


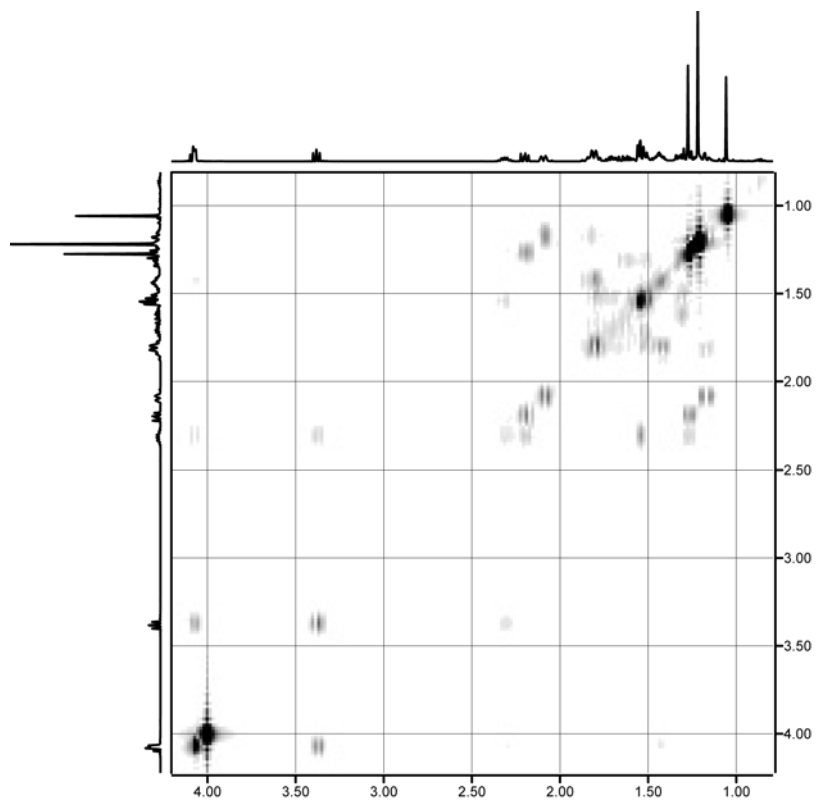
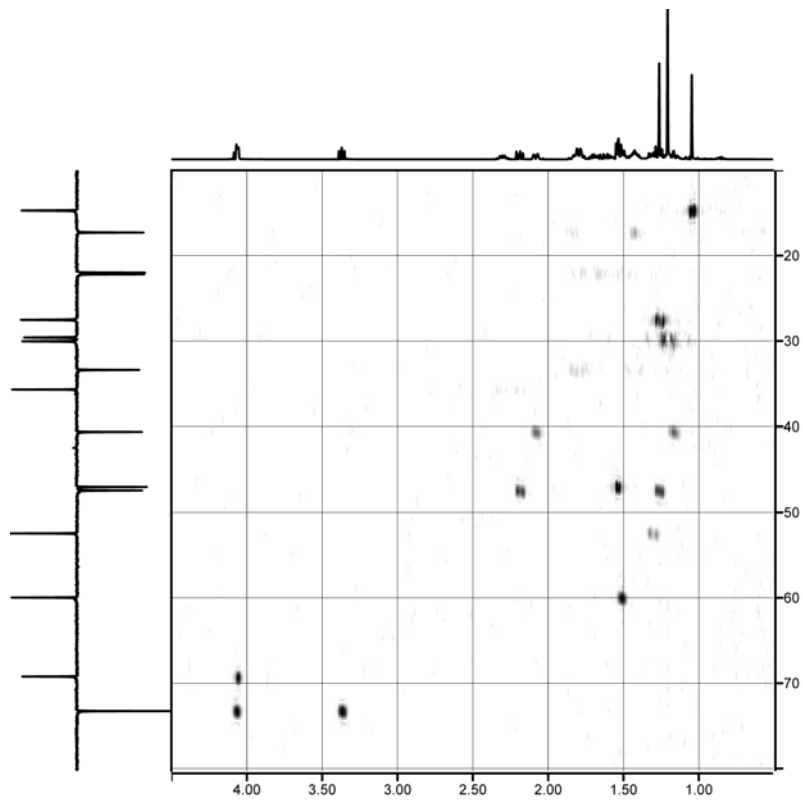
**35a**

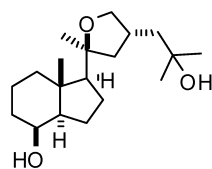
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.02 (t, J = 7.48 Hz, 1H, THF-O-CH<sub>H</sub>), 4.02 (s, 1H, TBSO-CH), 3.32 (t, J = 9.16 Hz, 1H, THF-O-CH<sub>H</sub>), 1.21 (s, 3H, THF-CH<sub>3</sub>), 1.15 (s, 6H, H<sub>3</sub>C-COH-CH<sub>3</sub>), 1.00 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>)



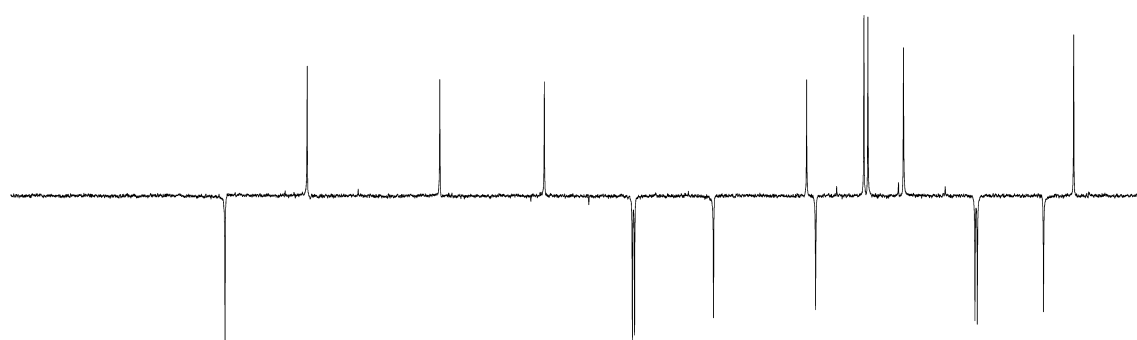
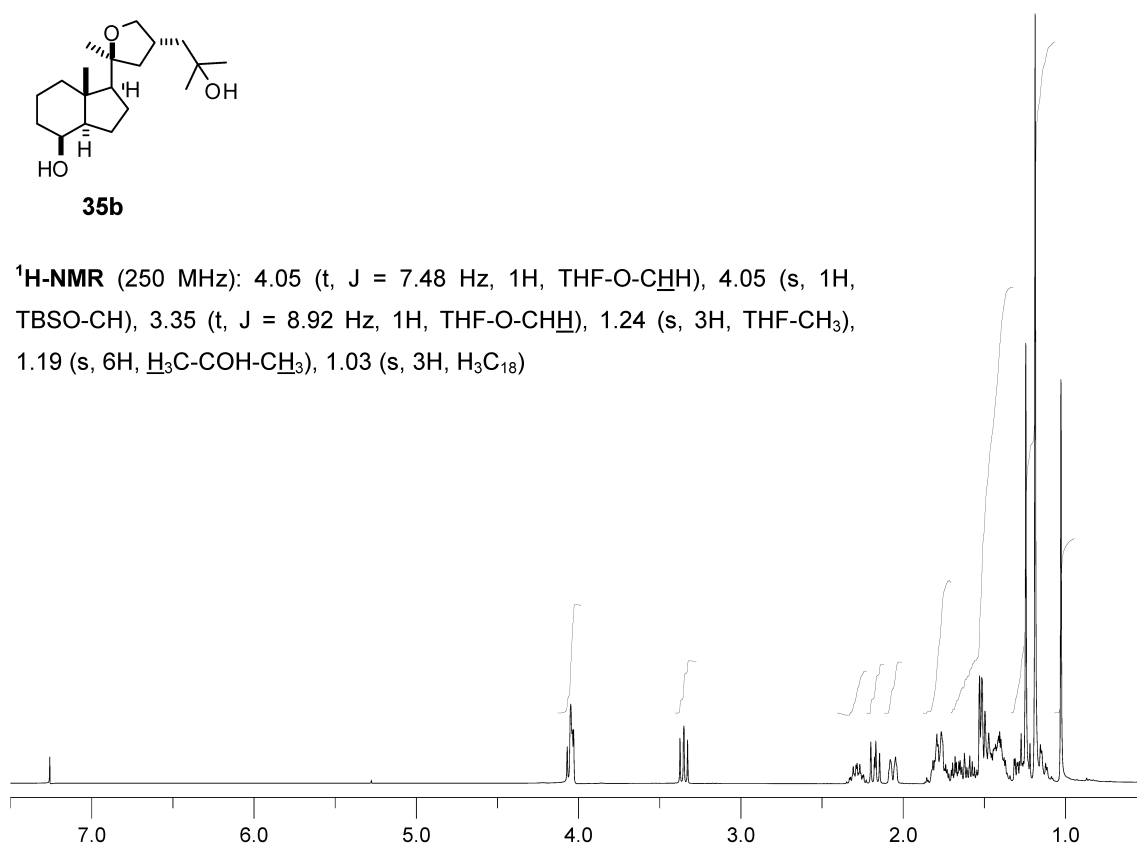
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 84.66 (C), 73.23 (CH<sub>2</sub>), 70.71 (C), 69.19 (CH), 59.94 (CH), 52.42 (CH), 47.39 (CH<sub>2</sub>), 46.98 (CH<sub>2</sub>), 42.41 (C), 40.55 (CH<sub>2</sub>), 35.66 (CH), 33.36 (CH<sub>2</sub>), 29.00 (CH), 29.56 (CH<sub>3</sub>), 27.49 (CH<sub>3</sub>), 22.15 (CH<sub>2</sub>), 21.96 (CH<sub>2</sub>), 17.26 (CH<sub>2</sub>), 14.68 (CH<sub>3</sub>).



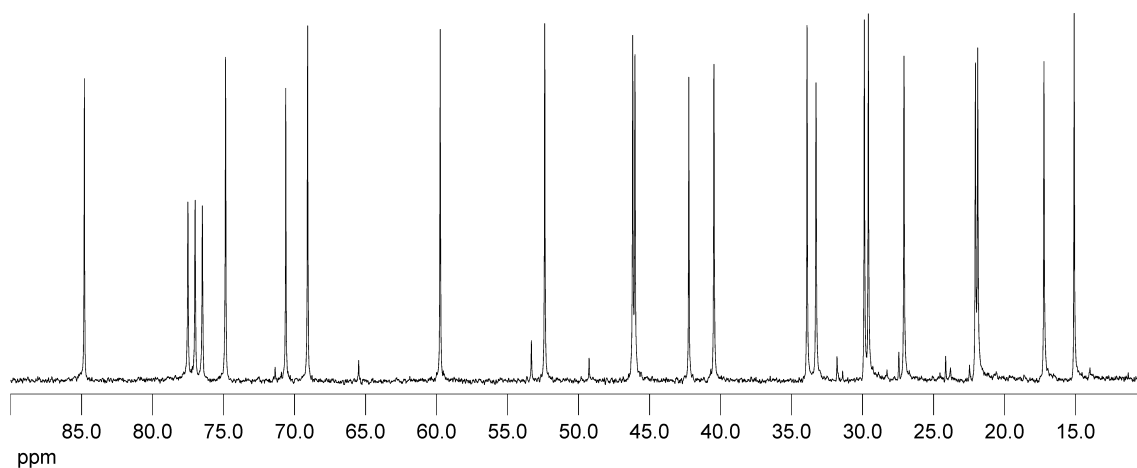
**$^1\text{H}$ -COSY****HMQC**

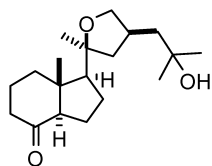
**35b**

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.05 (t, J = 7.48 Hz, 1H, THF-O-CH<sub>H</sub>), 4.05 (s, 1H, TBSO-CH), 3.35 (t, J = 8.92 Hz, 1H, THF-O-CH<sub>H</sub>), 1.24 (s, 3H, THF-CH<sub>3</sub>), 1.19 (s, 6H, H<sub>3</sub>C-COH-CH<sub>3</sub>), 1.03 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>)



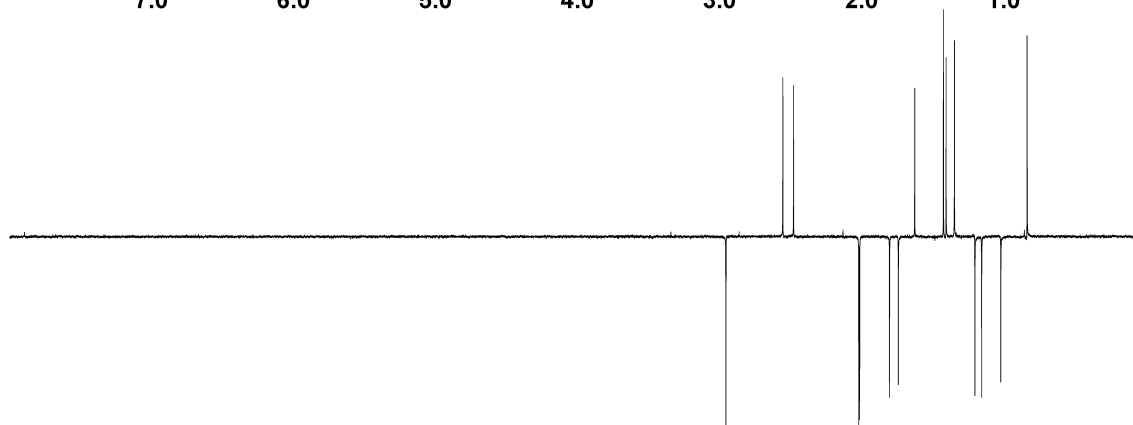
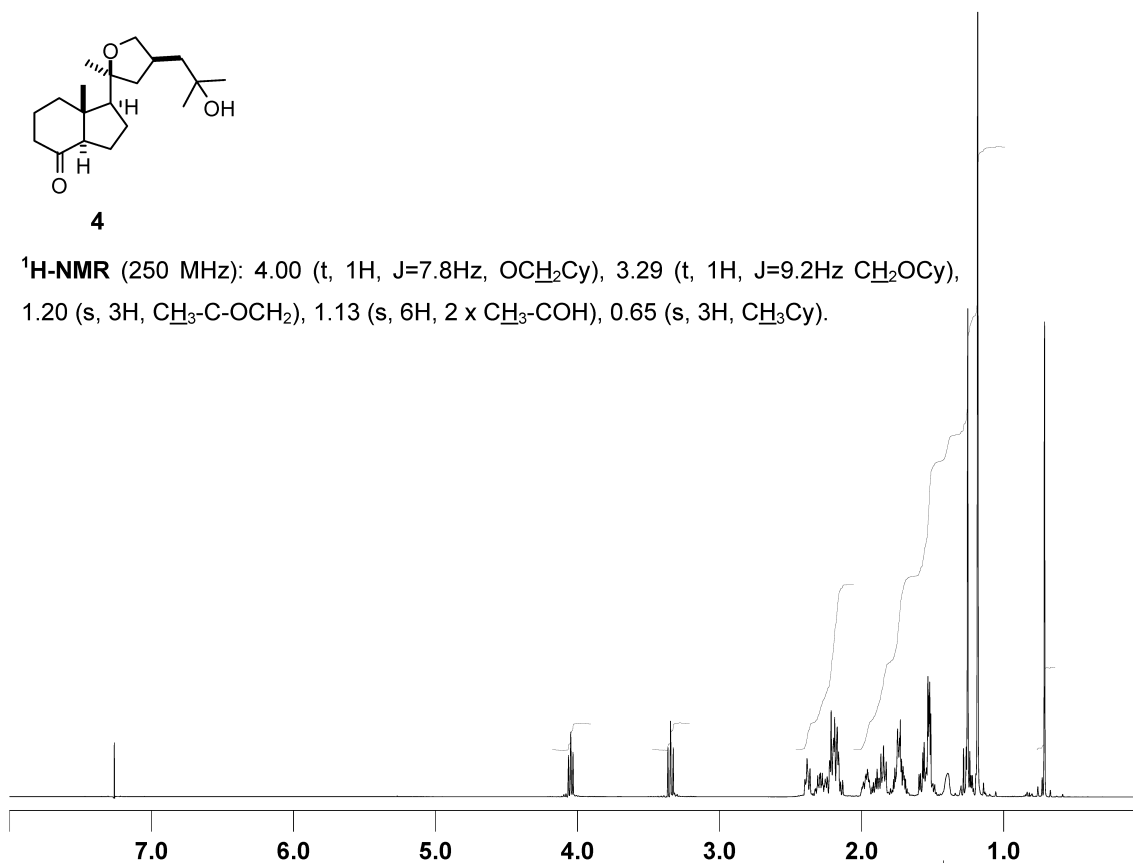
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 84.80 (THF C-O), 74.86 (THF O-CH<sub>2</sub>), 70.62 (H<sub>3</sub>C-COH-CH<sub>3</sub>), 69.08 (HO-CH), 59.74 (CH), 52.38 (CH), 46.18 (CH<sub>2</sub>), 46.02 (CH<sub>2</sub>), 42.23 (C), 40.46 (CH<sub>2</sub>), 33.90 (CH), 33.27 (CH<sub>2</sub>), 29.87 (CH), 29.59 (CH), 27.08 (C), 22.05 (CH<sub>2</sub>), 21.89 (CH<sub>2</sub>), 17.22 (CH<sub>2</sub>), 15.10 (H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>).



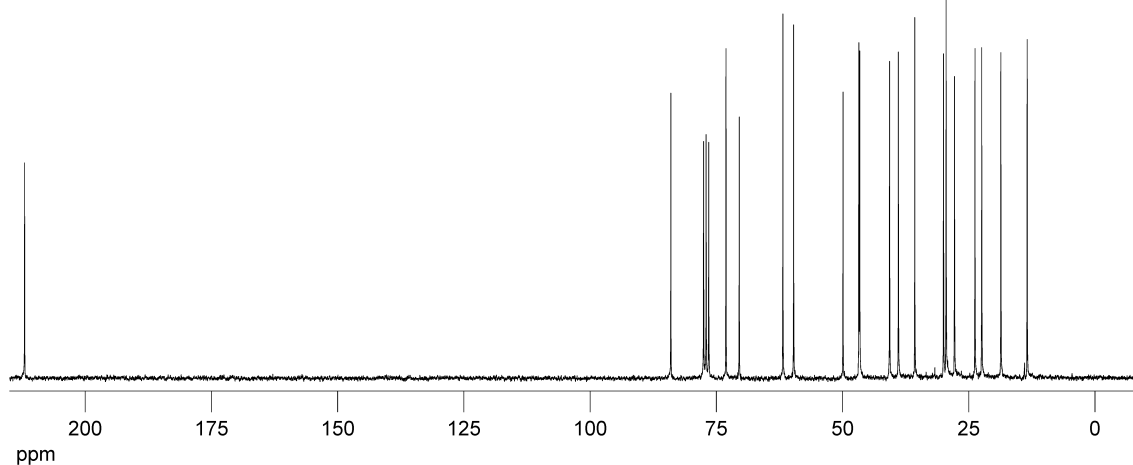


4

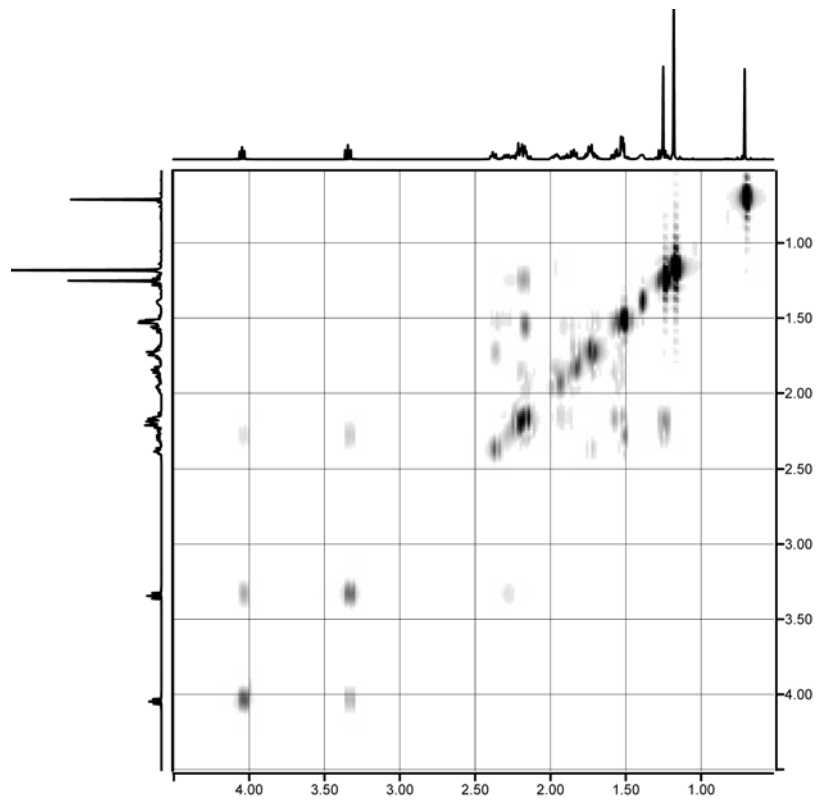
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.00 (t, 1H, J=7.8Hz, OCH<sub>2</sub>Cy), 3.29 (t, 1H, J=9.2Hz CH<sub>2</sub>OCy), 1.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-OCH<sub>2</sub>), 1.13 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-COH), 0.65 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Cy).



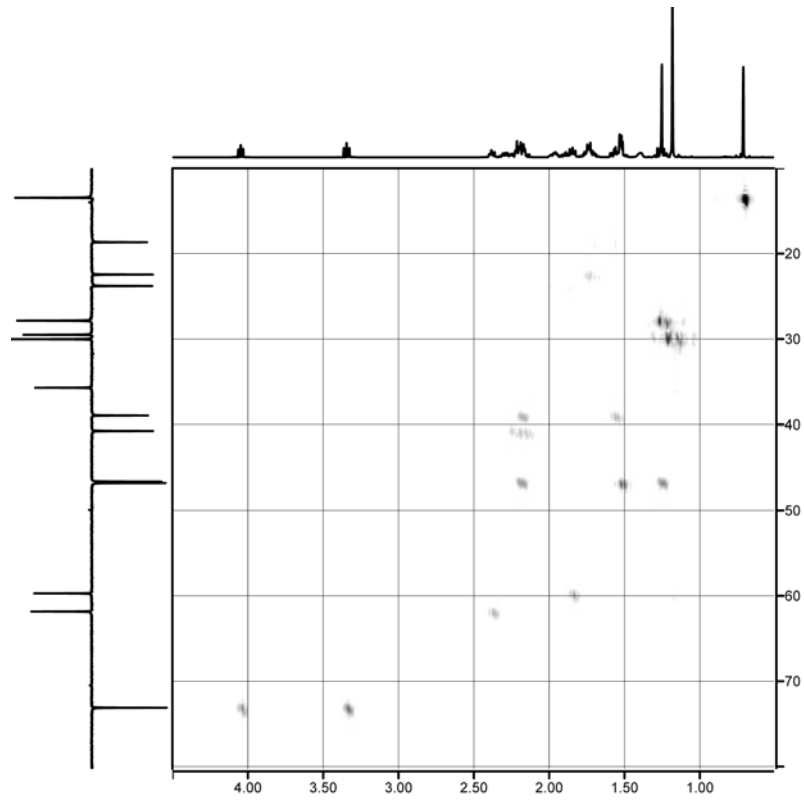
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 212.01 (C), 83.99 (C), 73.08 (CH<sub>2</sub>), 70.45 (C), 61.80 (CH), 59.68 (CH), 49.90 (C), 46.76 (CH<sub>2</sub>), 46.59 (CH<sub>2</sub>), 40.67 (CH<sub>2</sub>), 38.93 (CH<sub>2</sub>), 35.68 (CH), 29.99 (CH<sub>3</sub>), 29.47 (CH<sub>3</sub>), 27.81 (CH<sub>3</sub>), 23.76 (CH<sub>2</sub>), 22.41 (CH<sub>2</sub>), 18.63 (CH<sub>2</sub>), 13.42 (CH<sub>3</sub>).

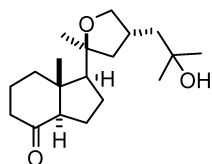


**<sup>1</sup>H-COSY**

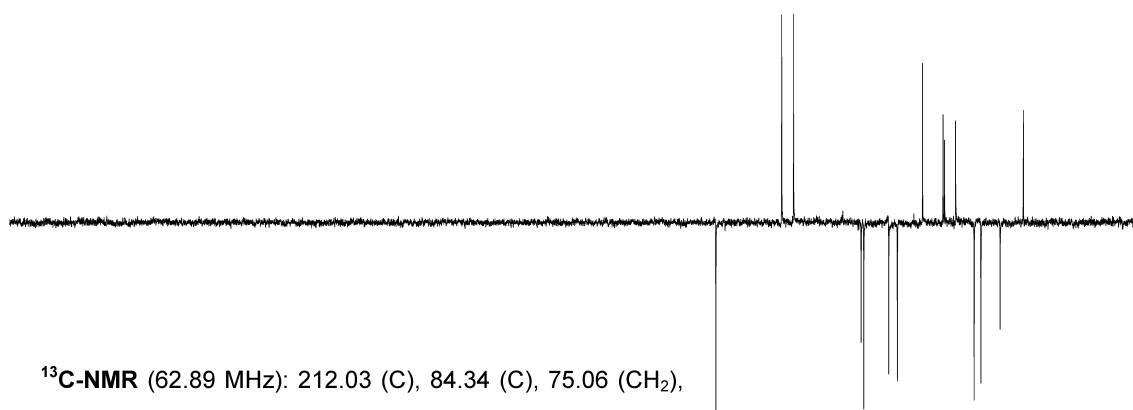
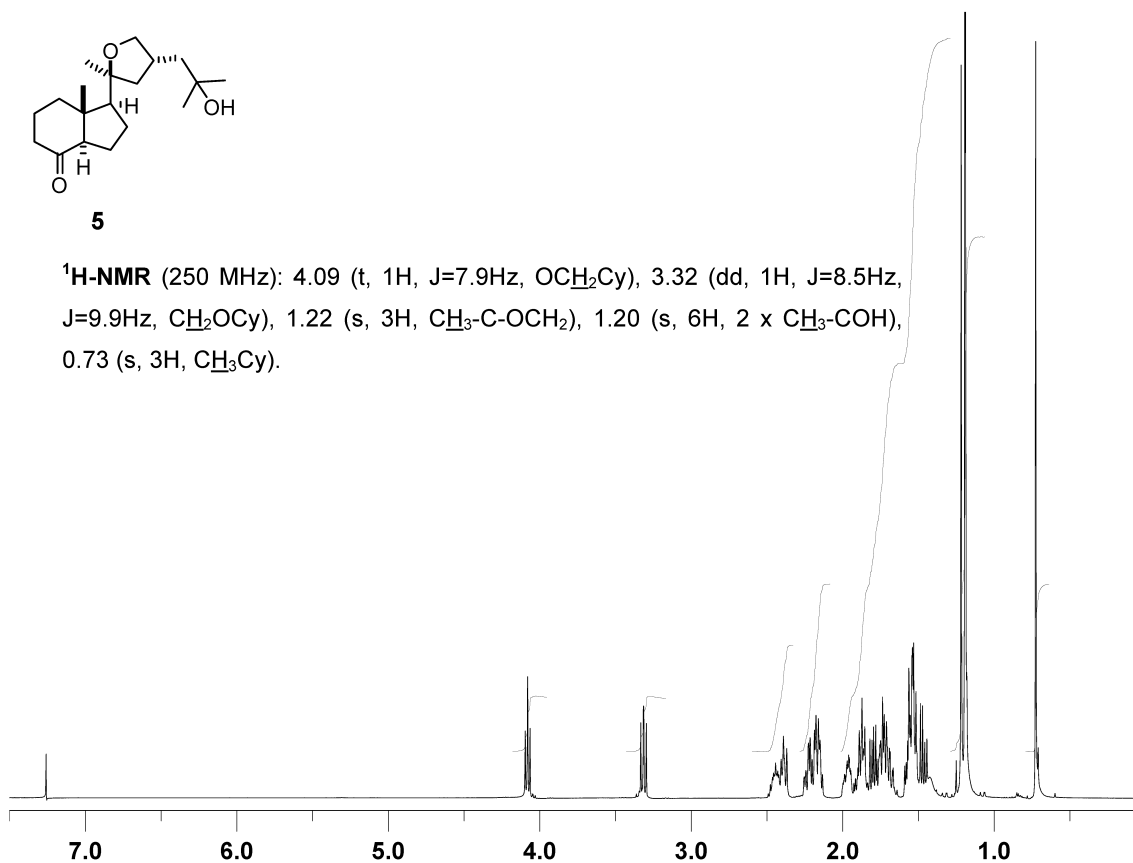


**HMQC**

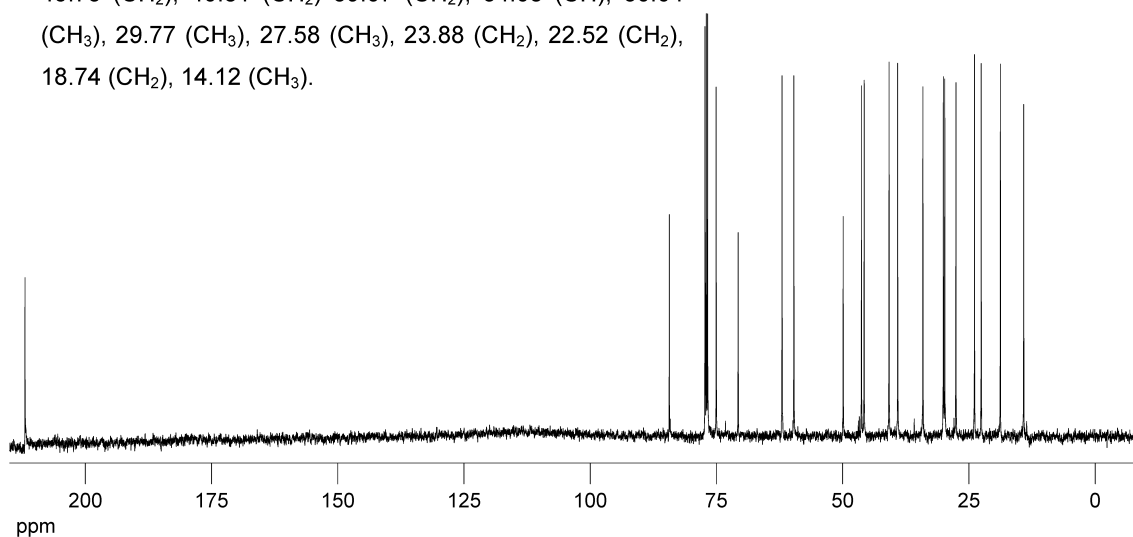


**5**

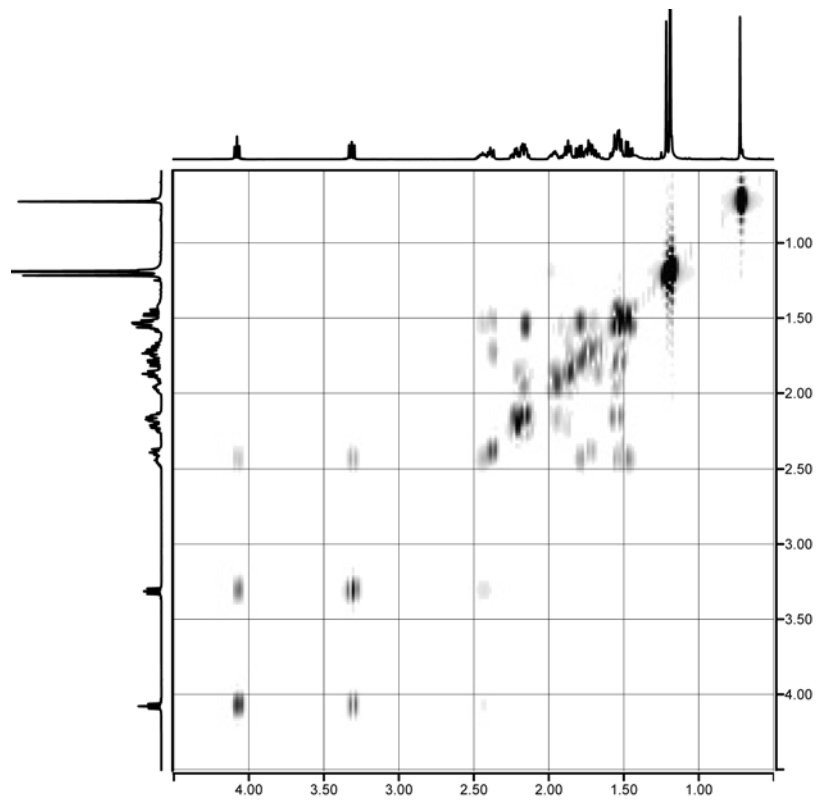
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.09 (t, 1H, J=7.9Hz, OCH<sub>2</sub>Cy), 3.32 (dd, 1H, J=8.5Hz, J=9.9Hz, CH<sub>2</sub>OCy), 1.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-OCH<sub>2</sub>), 1.20 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-COH), 0.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>Cy).



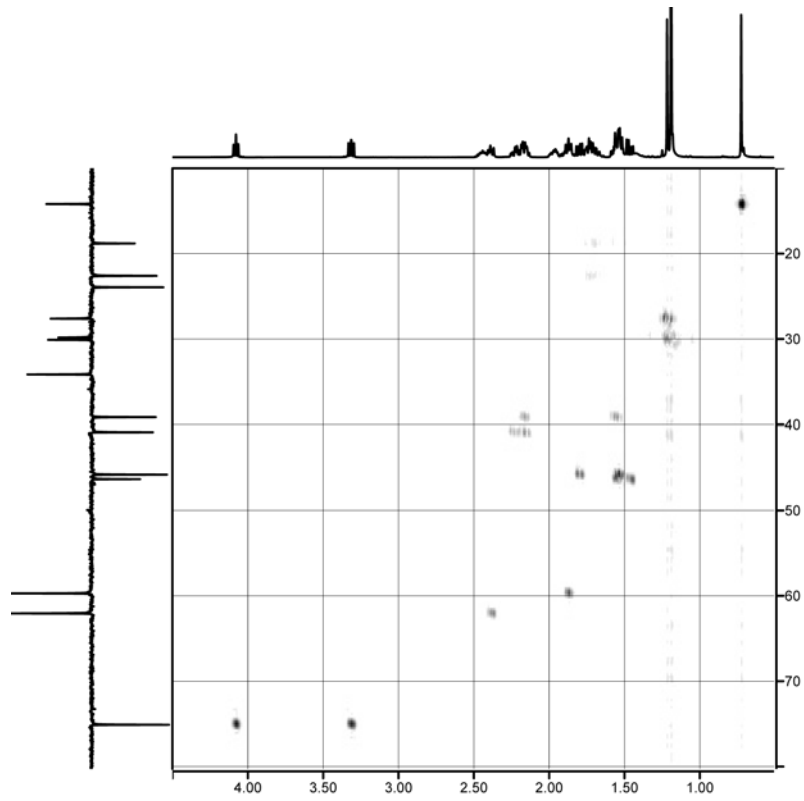
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 212.03 (C), 84.34 (C), 75.06 (CH<sub>2</sub>), 70.72 (C), 62.00 (CH), 59.64 (CH), 49.89 (C), 46.24 (CH<sub>2</sub>), 45.73 (CH<sub>2</sub>), 40.81 (CH<sub>2</sub>), 39.07 (CH<sub>2</sub>), 34.08 (CH), 30.04 (CH<sub>3</sub>), 29.77 (CH<sub>3</sub>), 27.58 (CH<sub>3</sub>), 23.88 (CH<sub>2</sub>), 22.52 (CH<sub>2</sub>), 18.74 (CH<sub>2</sub>), 14.12 (CH<sub>3</sub>).

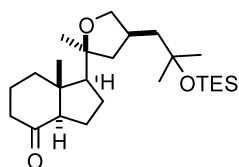


**<sup>1</sup>H-COSY**



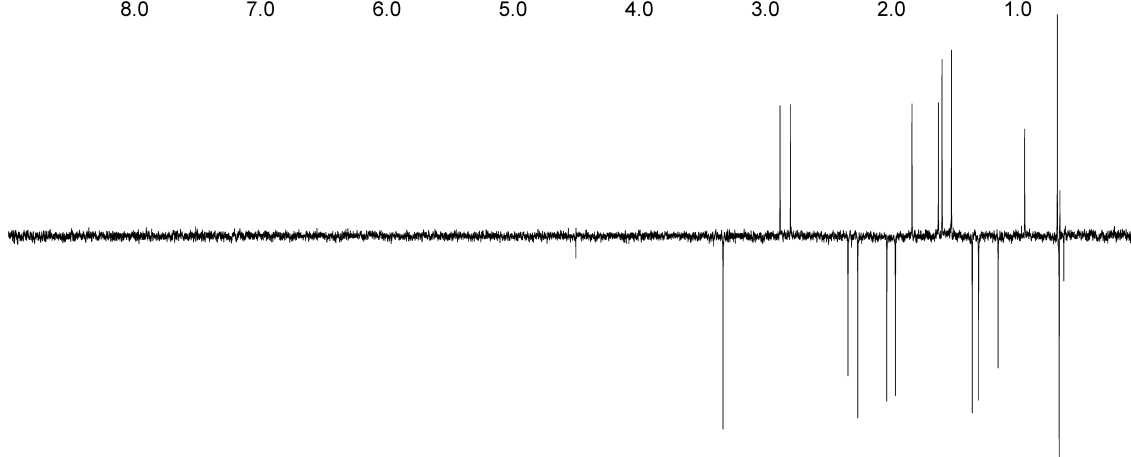
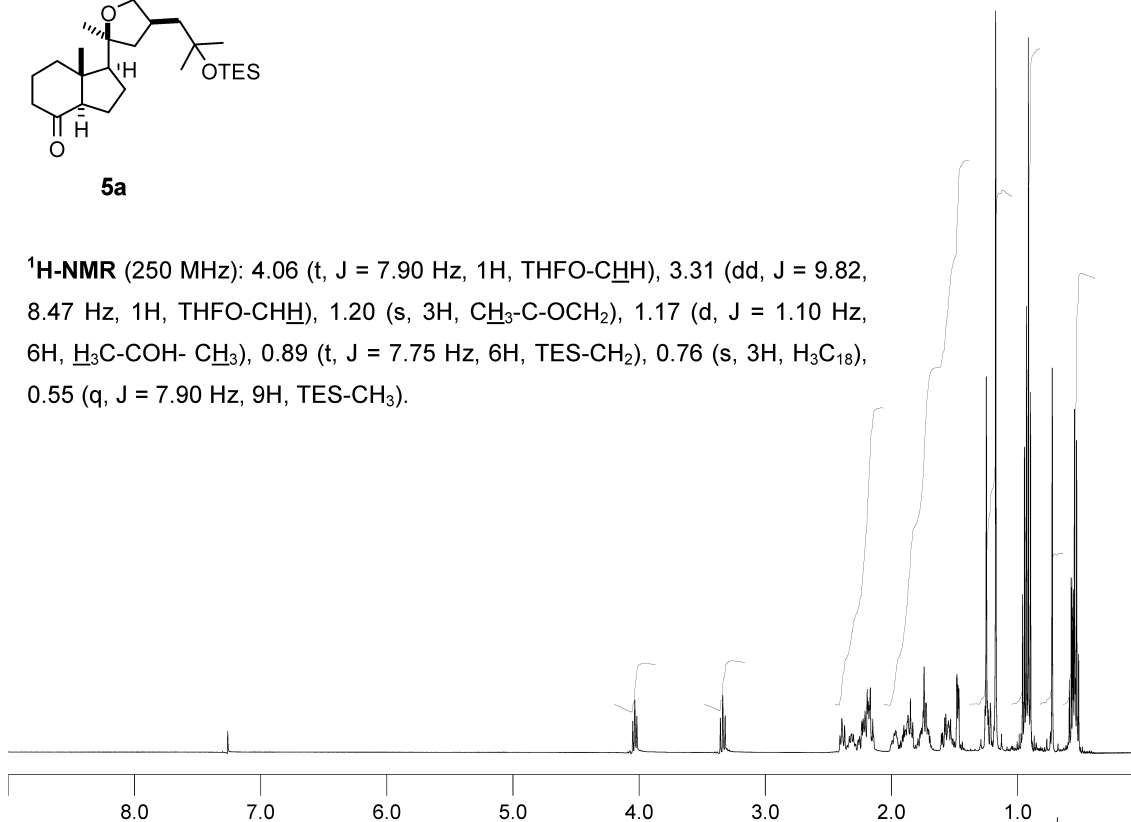
**HMQC**



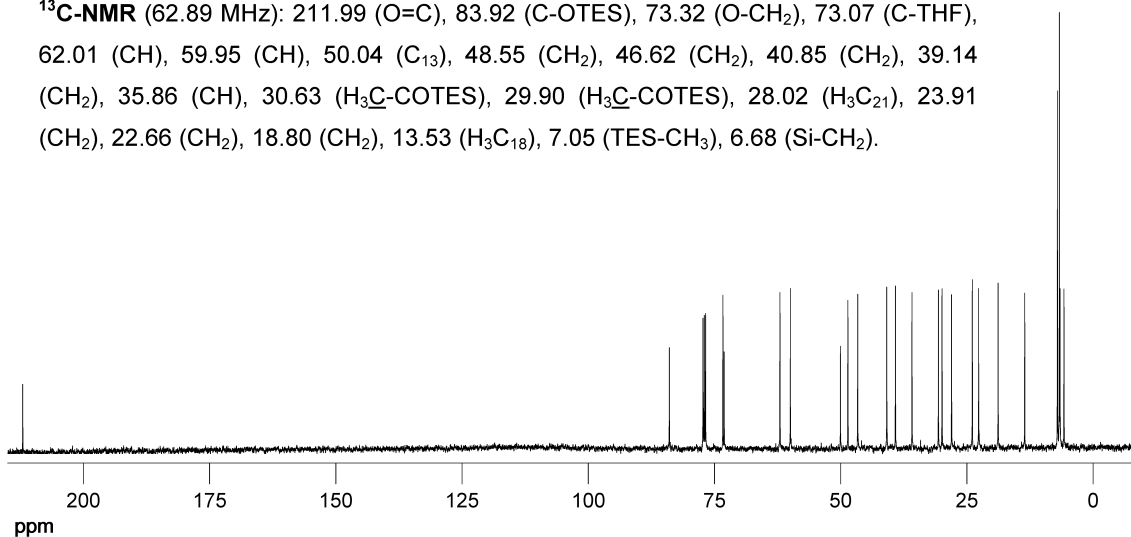


5a

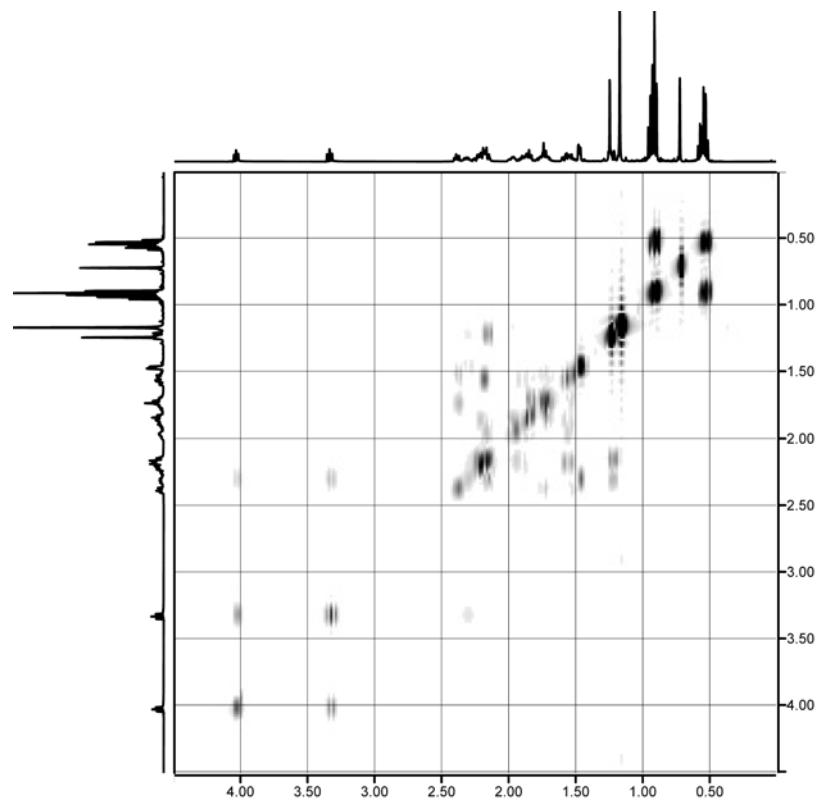
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.06 (t,  $J = 7.90$  Hz, 1H, THFO-CHH), 3.31 (dd,  $J = 9.82$ , 8.47 Hz, 1H, THFO-CHH), 1.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-OCH<sub>2</sub>), 1.17 (d,  $J = 1.10$  Hz, 6H, H<sub>3</sub>C-COH- CH<sub>3</sub>), 0.89 (t,  $J = 7.75$  Hz, 6H, TES-CH<sub>2</sub>), 0.76 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 0.55 (q,  $J = 7.90$  Hz, 9H, TES-CH<sub>3</sub>).



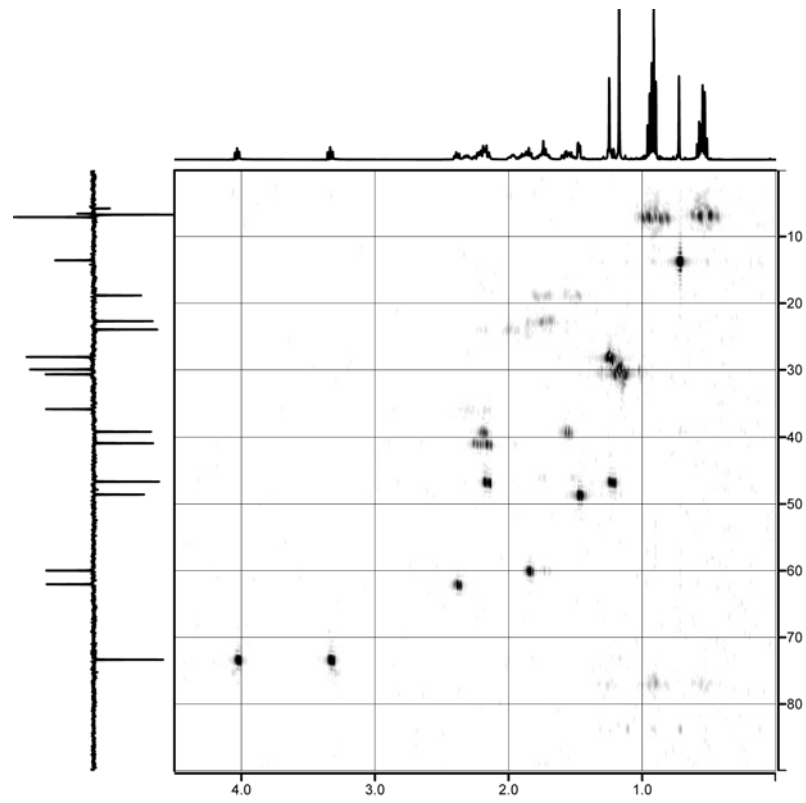
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 211.99 (O=C), 83.92 (C-OTES), 73.32 (O-CH<sub>2</sub>), 73.07 (C-THF), 62.01 (CH), 59.95 (CH), 50.04 (C<sub>13</sub>), 48.55 (CH<sub>2</sub>), 46.62 (CH<sub>2</sub>), 40.85 (CH<sub>2</sub>), 39.14 (CH<sub>2</sub>), 35.86 (CH), 30.63 (H<sub>3</sub>C-COTES), 29.90 (H<sub>3</sub>C-COTES), 28.02 (H<sub>3</sub>C<sub>21</sub>), 23.91 (CH<sub>2</sub>), 22.66 (CH<sub>2</sub>), 18.80 (CH<sub>2</sub>), 13.53 (H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 7.05 (TES-CH<sub>3</sub>), 6.68 (Si-CH<sub>2</sub>).

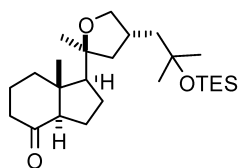


**<sup>1</sup>H-COSY**

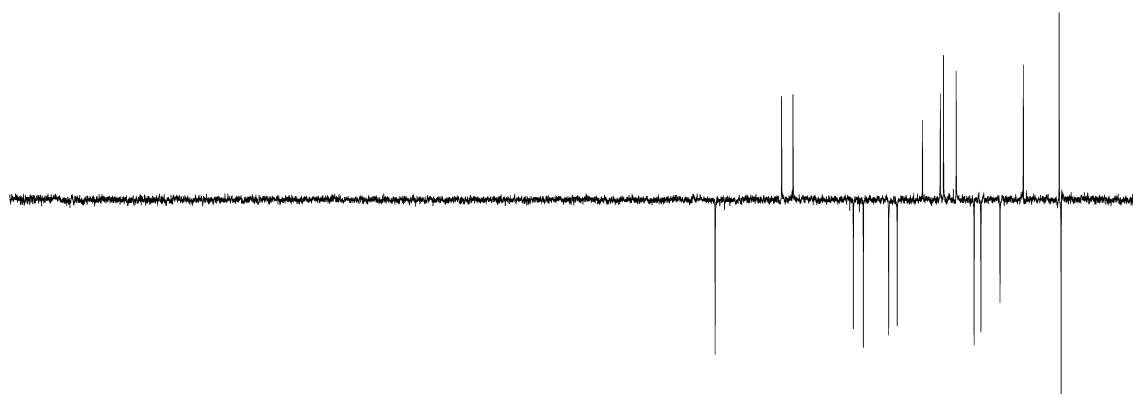
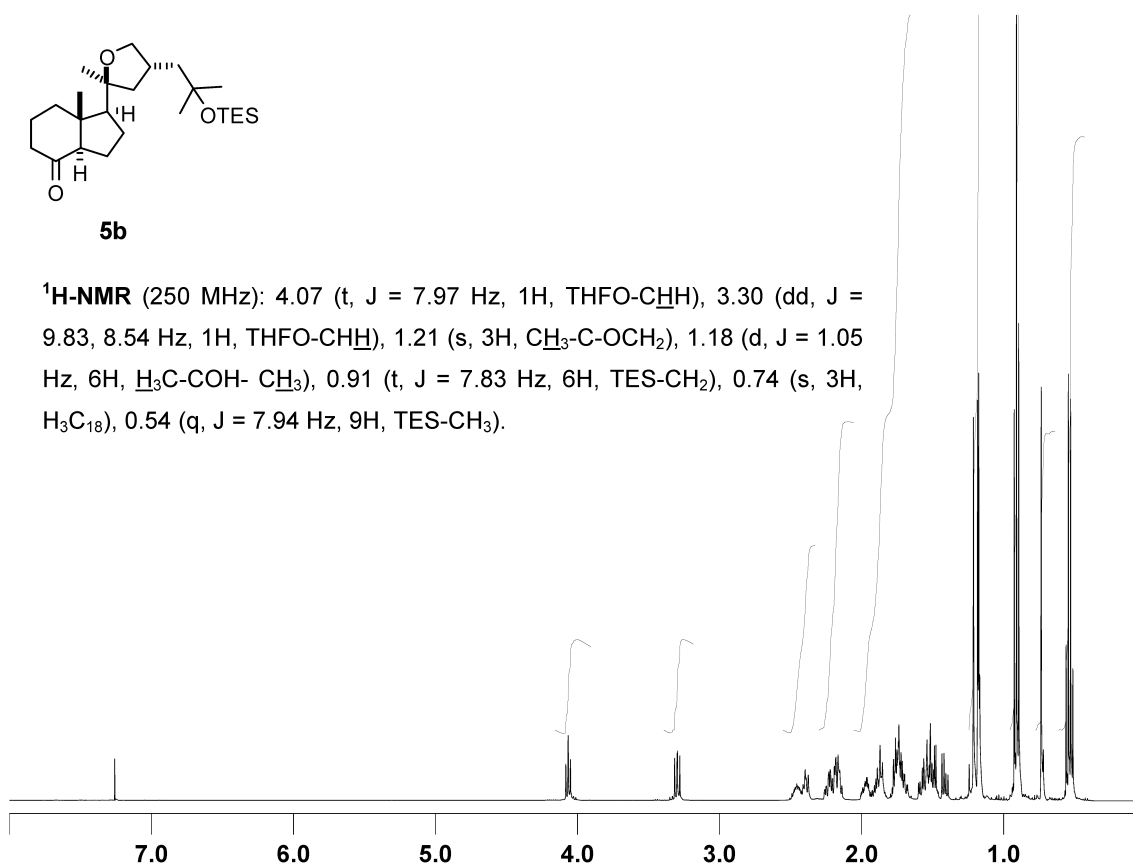


**HMQC**

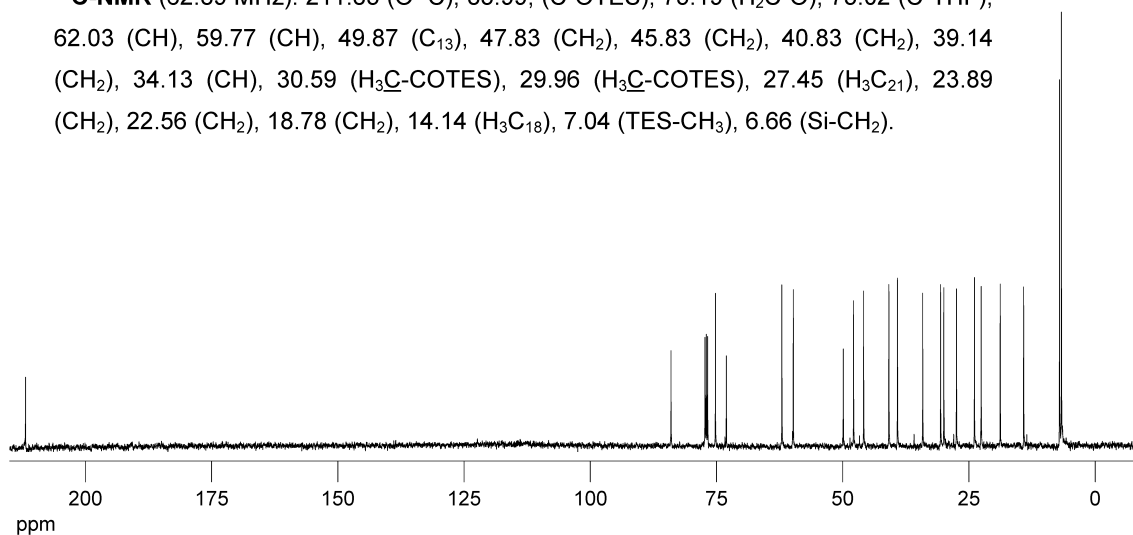


**5b**

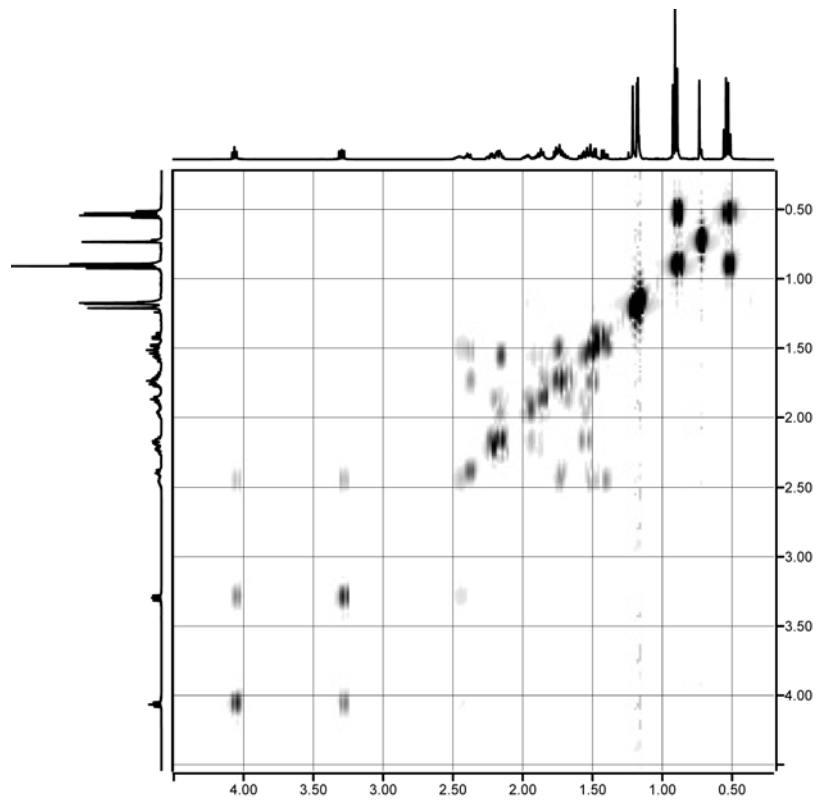
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 4.07 (t,  $J = 7.97$  Hz, 1H, THFO-CHH), 3.30 (dd,  $J = 9.83, 8.54$  Hz, 1H, THFO-CHH), 1.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-OCH<sub>2</sub>), 1.18 (d,  $J = 1.05$  Hz, 6H, H<sub>3</sub>C-COH-CH<sub>3</sub>), 0.91 (t,  $J = 7.83$  Hz, 6H, TES-CH<sub>2</sub>), 0.74 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 0.54 (q,  $J = 7.94$  Hz, 9H, TES-CH<sub>3</sub>).



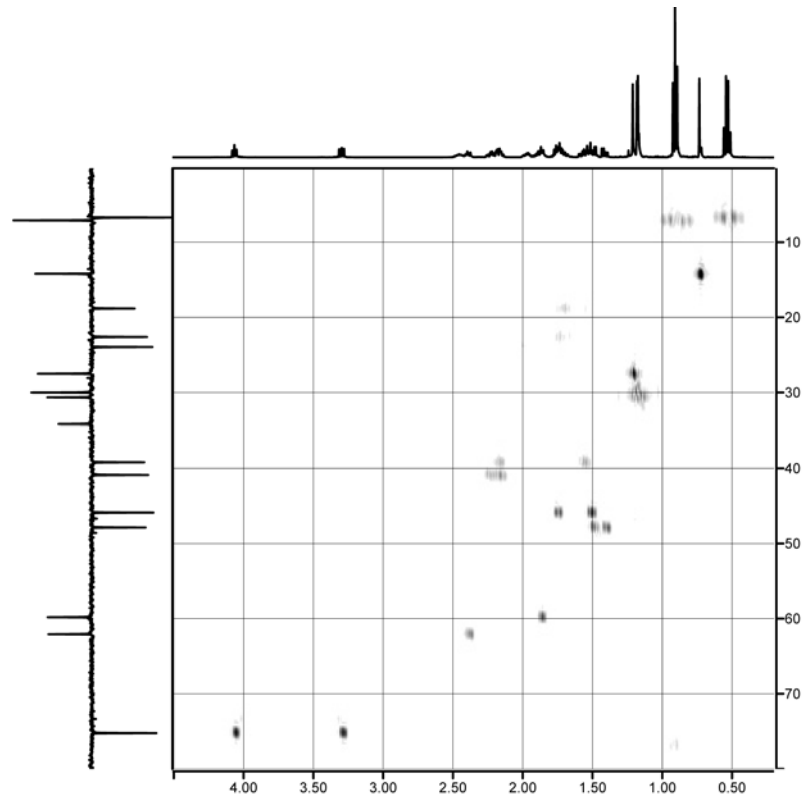
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 211.83 (O=C), 83.99 (C-OTES), 75.19 (H<sub>2</sub>C-O), 73.02 (C-THF), 62.03 (CH), 59.77 (CH), 49.87 (C<sub>13</sub>), 47.83 (CH<sub>2</sub>), 45.83 (CH<sub>2</sub>), 40.83 (CH<sub>2</sub>), 39.14 (CH<sub>2</sub>), 34.13 (CH), 30.59 (H<sub>3</sub>C-COTES), 29.96 (H<sub>3</sub>C-COTES), 27.45 (H<sub>3</sub>C<sub>21</sub>), 23.89 (CH<sub>2</sub>), 22.56 (CH<sub>2</sub>), 18.78 (CH<sub>2</sub>), 14.14 (H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 7.04 (TES-CH<sub>3</sub>), 6.66 (Si-CH<sub>2</sub>).

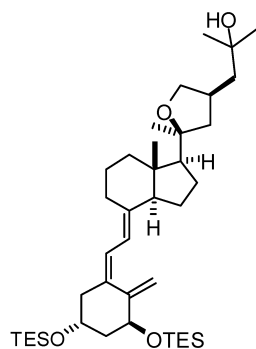


**<sup>1</sup>H-COSY**

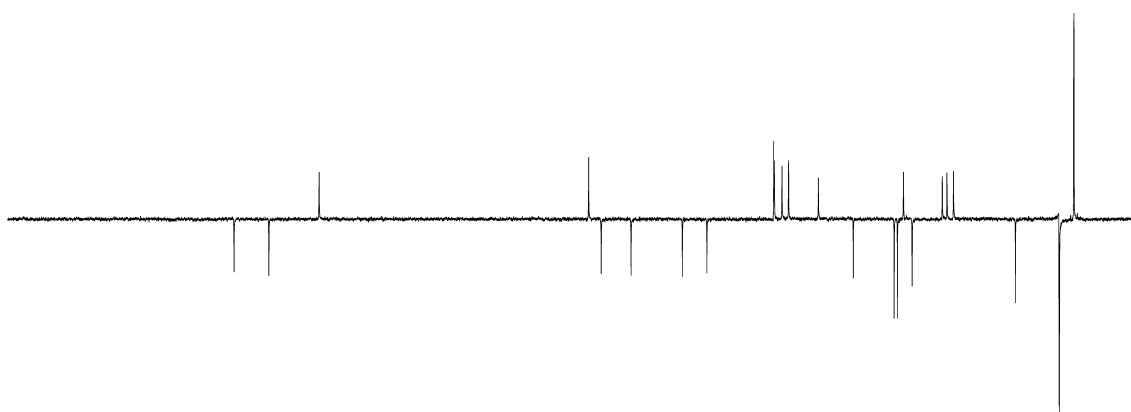
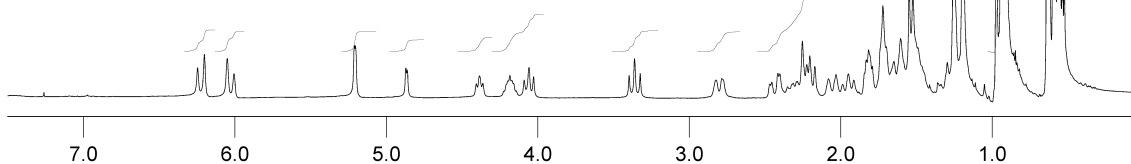


**HMQC**

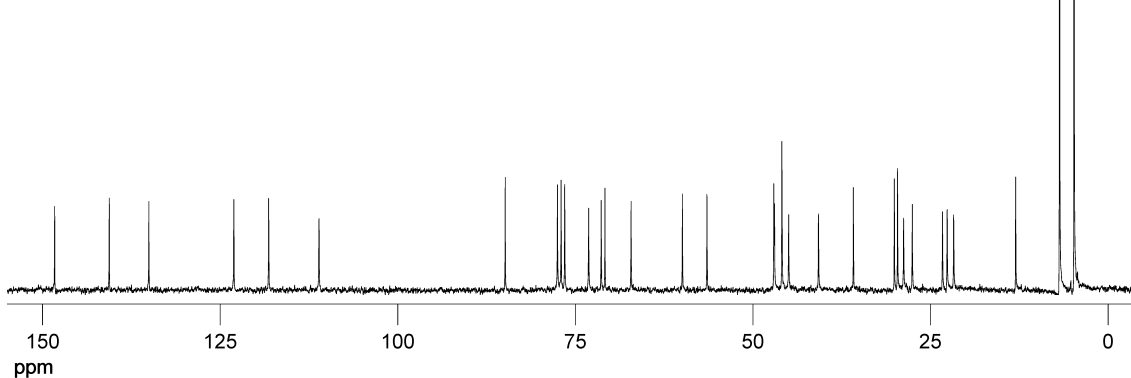


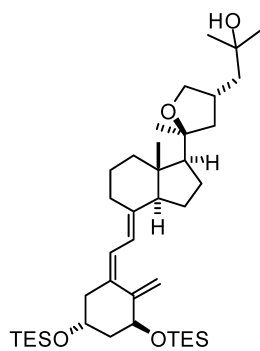
**1e**

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 6.20 (d, 1H, J=11.2Hz, H-C=), 6.00 (d, 1H, J=11.2Hz), 5.19 (d, 1H, J=2Hz, H-C=), 4.8 (d, 1H, J=2Hz, H<sub>2</sub>C=), 4.36 (t, 1H, J=4.9Hz, H-COH de C1), 4.16 (m, 1H, HC-OH), 4.03 (t, 1H, J=7.7Hz, OCH<sub>2</sub>Cy), 3.34 (t, 1H, J=9.1Hz, CH<sub>2</sub>OCy), 1.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO-CH<sub>2</sub>), 1.17 (s, 6H, CH<sub>3</sub>COH), 1.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-OCH<sub>2</sub>), 0.92 (t, 18H, J=7.9Hz, 6 x CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-Si), 0.5-0.6 (m, 15H, 6 x CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>Si, CH<sub>3</sub>-Cy).

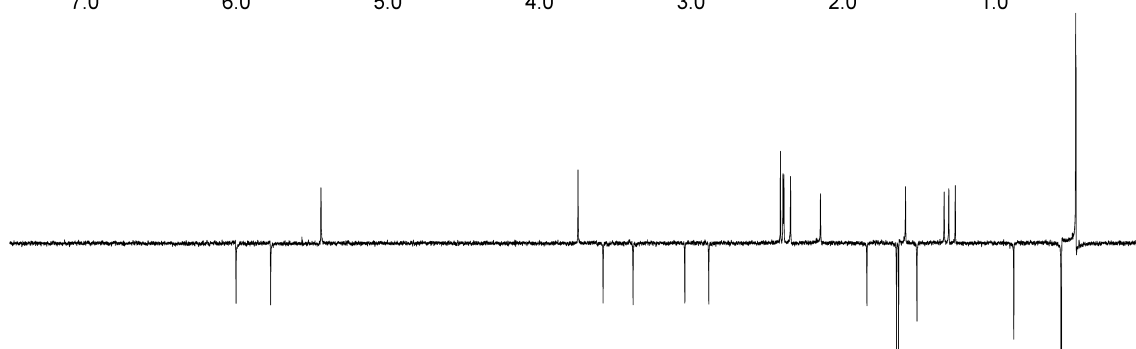
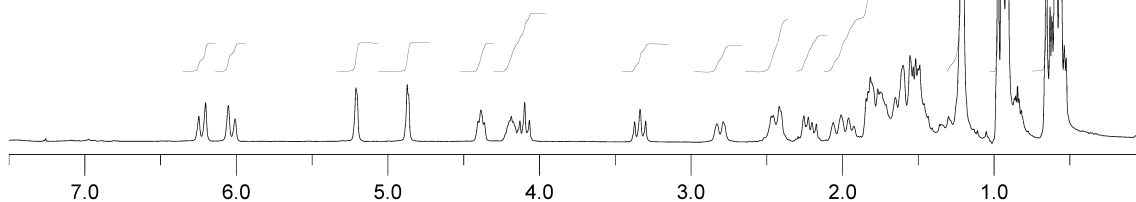


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 148.30 (C), 140.61 (C), 135.04 (C), 123.07 (CH), 118.16 (CH), 111.08 (CH<sub>2</sub>), 84.87 (C), (CH<sub>2</sub>), 73.12 (CH<sub>2</sub>), 71.35 (CH), 70.83 (C), 67.15 (CH), 59.92 (CH), 56.47 (CH), 47.05 (C), 47.05 (CH<sub>2</sub>), 46.96 (CH<sub>2</sub>), 45.92 (CH<sub>2</sub>), 44.96 (CH<sub>2</sub>), 40.76 (CH<sub>2</sub>), 35.85 (CH), 30.08 (CH<sub>3</sub>), 29.64 (CH<sub>3</sub>), 28.78 (CH<sub>2</sub>), 27.56 (CH<sub>3</sub>), 23.30 (CH<sub>2</sub>), 22.64 (CH<sub>2</sub>), 21.73 (CH<sub>2</sub>), 13.00 (CH<sub>3</sub>), 6.85 (CH<sub>3</sub>), 6.80 (CH<sub>3</sub>), 4.79 (CH<sub>2</sub>).

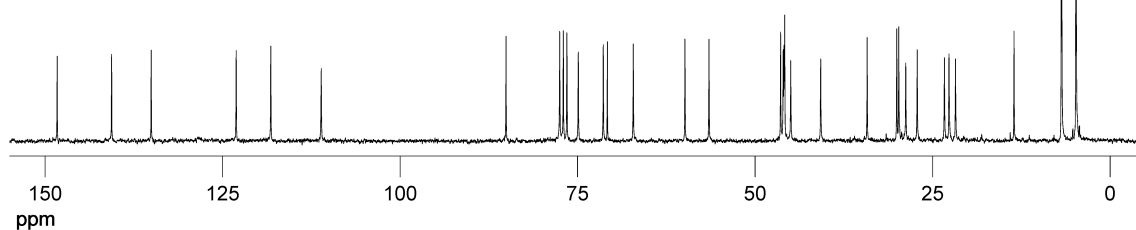


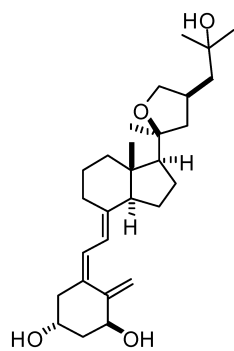
**1f**

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 6.23 (d, 1H,  $J=11.1\text{Hz}$ ,  $-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 6.03 (d, 1H,  $J=11.1\text{Hz}$ ,  $-\text{HC}=\text{CH}-$ ), 5.21 (s, 1H,  $=\text{CH}_2$ ), 4.88 (s, 1H,  $=\text{CH}_2$ ), 4.39 (t, 1H,  $J=4.9\text{Hz}$ , HC1), 4.18 (m, 1H,  $\text{HC-OH}$ ), 4.10 (t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_2\text{OCy}$ ), 3.34 (t,  $J=8.9\text{Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_2\text{OCy}$ ), 1.22 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_2$ ), 1.21 (s, 6H, 2 x  $\text{CH}_3\text{-COH}$ ), 0.94 (t, 18H,  $J=7.8\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-Si}$ ), 0.66 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Cy}$ ), 0.60 (q,  $J=7.5\text{Hz}$ , 6H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{Si}$ ), 0.59 (q,  $J=7.8\text{Hz}$ , 6H,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{Si}$ ).

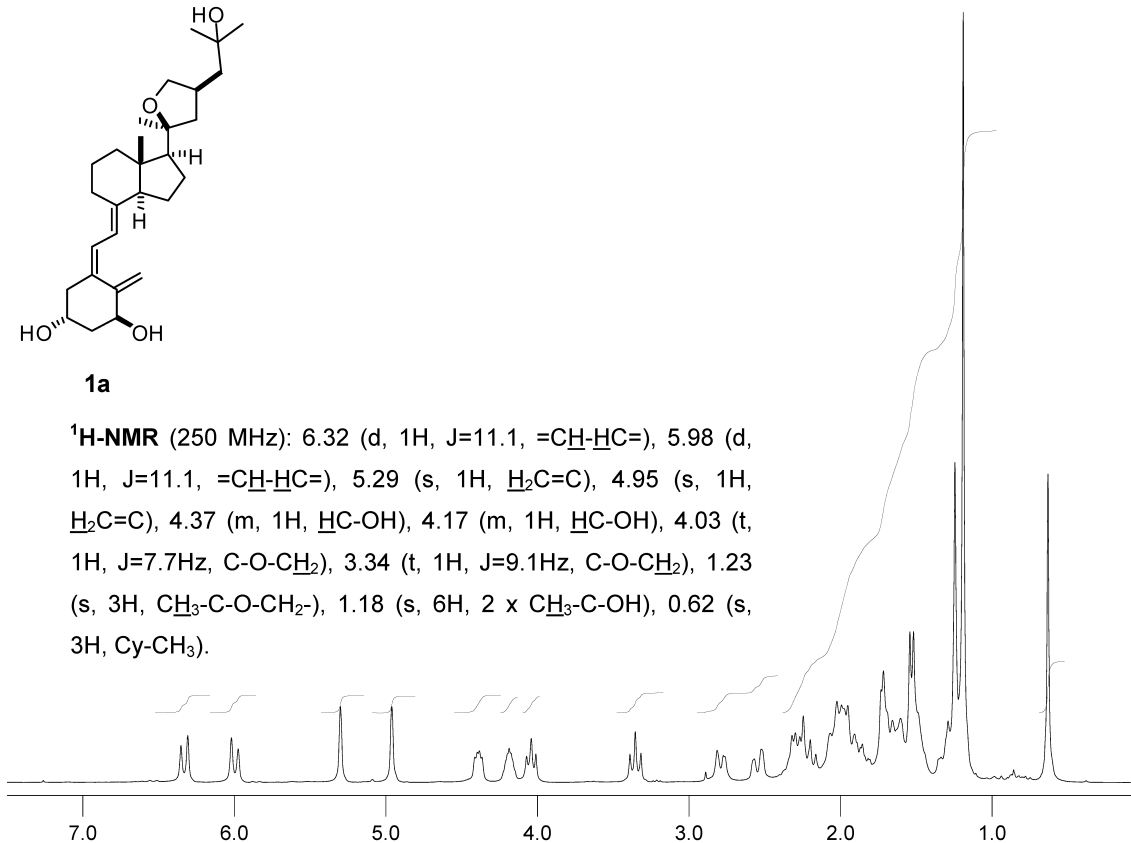


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 148.29 (C), 140.62 (C), 135.05 (C), 123.07 (CH), 118.20 (CH), 111.10 (CH<sub>2</sub>), 85.06 (C), 74.89 (CH<sub>2</sub>), 71.37 (CH), 70.79 (C), 67.14 (CH), 59.86 (CH), 56.48 (CH), 46.39 (C), 46.02 (CH<sub>2</sub>), 45.90 (CH<sub>2</sub>), 45.81 (CH<sub>2</sub>), 44.96 (CH<sub>2</sub>), 40.75 (CH<sub>2</sub>), 34.20 (CH), 30.02 (CH<sub>3</sub>), 29.74 (CH<sub>3</sub>), 28.76 (CH<sub>2</sub>), 27.15 (CH<sub>3</sub>), 23.32 (CH<sub>2</sub>), 22.67 (CH<sub>2</sub>), 21.75 (CH<sub>2</sub>), 13.51 (CH<sub>3</sub>), 6.84 (CH<sub>3</sub>), 6.79 (CH<sub>3</sub>), 4.79 (CH<sub>2</sub>), 4.76 (CH<sub>2</sub>).

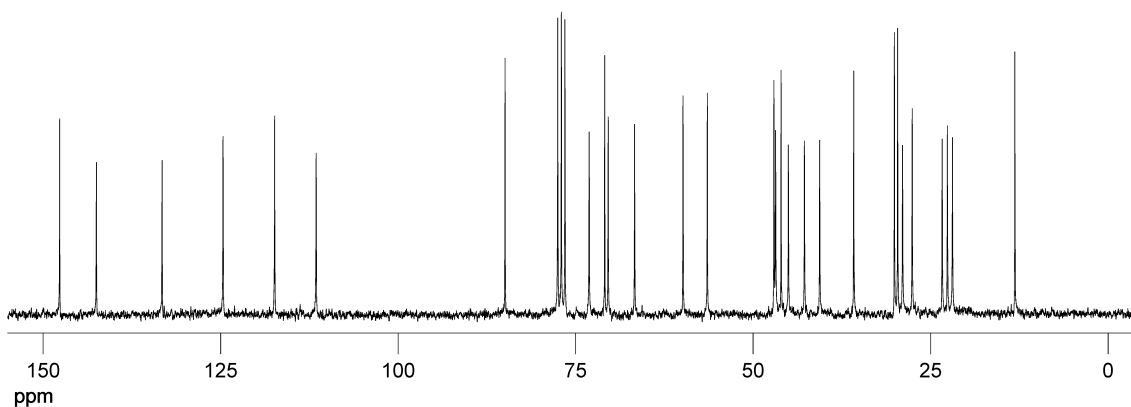


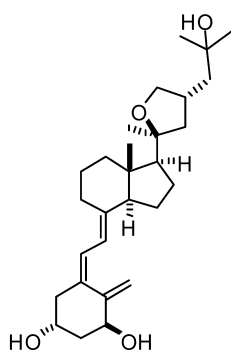
**1a**

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 6.32 (d, 1H,  $J=11.1$ , =CH-HC=), 5.98 (d, 1H,  $J=11.1$ , =CH-HC=), 5.29 (s, 1H, H<sub>2</sub>C=C), 4.95 (s, 1H, H<sub>2</sub>C=C), 4.37 (m, 1H, HC-OH), 4.17 (m, 1H, HC-OH), 4.03 (t, 1H,  $J=7.7$ Hz, C-O-CH<sub>2</sub>), 3.34 (t, 1H,  $J=9.1$ Hz, C-O-CH<sub>2</sub>), 1.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C-O-CH<sub>2</sub>-), 1.18 (s, 6H, 2 x CH<sub>3</sub>-C-OH), 0.62 (s, 3H, Cy-CH<sub>3</sub>).

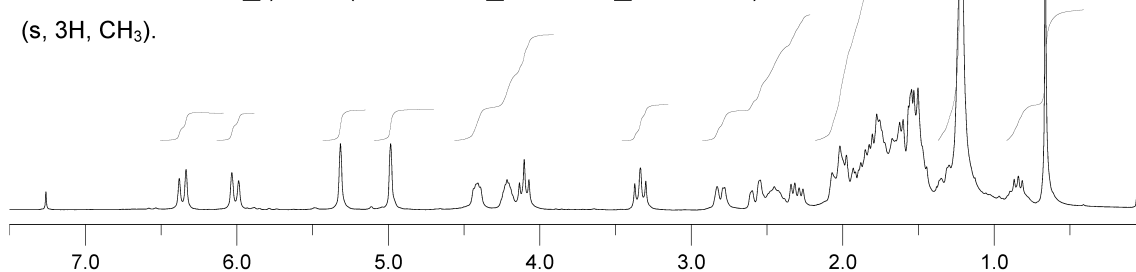


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 147.66 (C), 142.49 (C), 133.24 (C), 124.65 (CH), 117.38 (CH), 111.54 (CH<sub>2</sub>), 84.93 (C), 73.08 (CH<sub>2</sub>), 70.90 (CH), 70.40 (C), 66.68 (CH), 59.86 (CH), 56.44 (CH), 47.06 (CH<sub>2</sub>), 46.82 (CH<sub>2</sub>), 46.05 (C), 45.02 (CH<sub>2</sub>), 42.76 (CH<sub>2</sub>), 40.62 (CH<sub>2</sub>), 35.82 (CH), 30.09 (CH<sub>3</sub>), 29.63 (CH<sub>3</sub>), 28.94 (CH<sub>2</sub>), 27.58 (CH<sub>3</sub>), 23.36 (CH<sub>2</sub>), 22.62 (CH<sub>2</sub>), 21.91 (CH<sub>2</sub>), 13.12 (CH<sub>3</sub>).

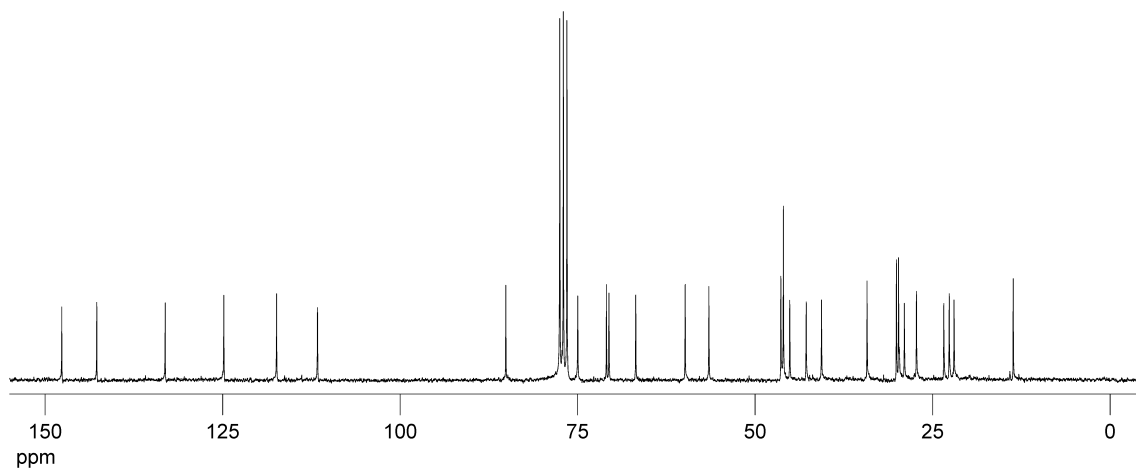


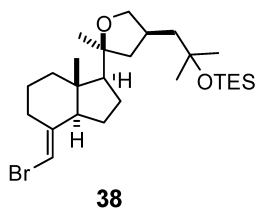
**1b**

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 6.36 (d, 1H,  $J=11.3$ , =CH-HC=), 6.01 (d, 1H,  $J=11.3$ , =CH-HC=), 5.32 (s, 1H, H<sub>2</sub>C=C), 4.99 (s, 1H, H<sub>2</sub>C=C), 4.44 (m, 1H, HC-OH), 4.22 (m, 1H, HC-OH), 4.11 (t, 1H,  $J=7.9$ Hz, C-O-CH<sub>2</sub>), 3.34 (dd, 1H,  $J=8.5, 9.7$ Hz, C-O-CH<sub>2</sub>), 1.22 (s, 9H, 2 x CH<sub>3</sub>-C-OH, CH<sub>3</sub>-C-O-CH<sub>2</sub>-), 0.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

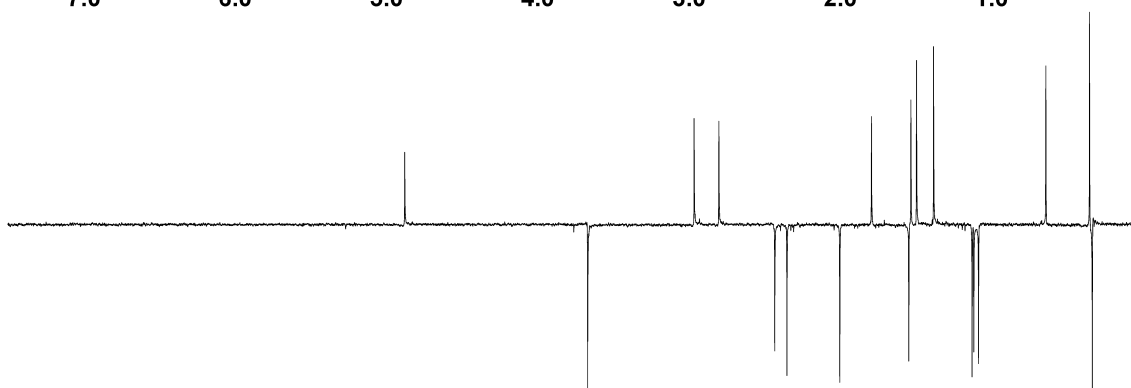
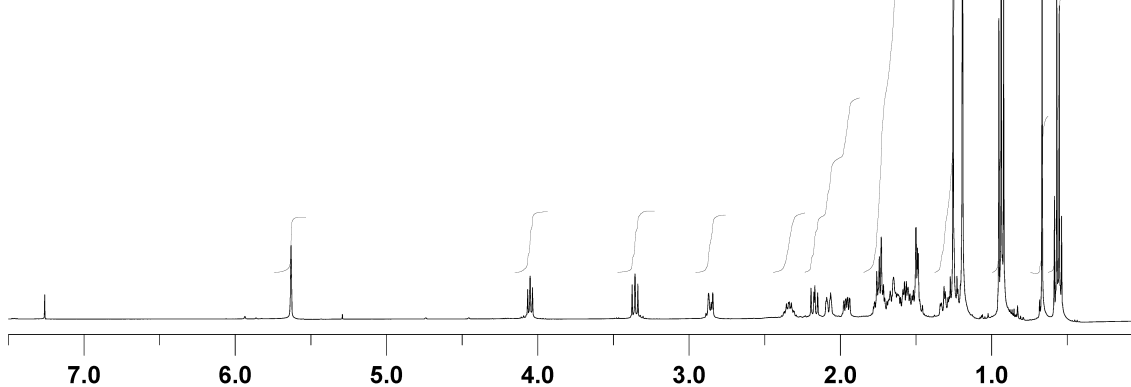


**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 147.65 (C), 142.72 (C), 133.08 (C), 124.82 (CH), 117.38 (CH), 111.62 (CH<sub>2</sub>), 85.10 (C), 74.97 (CH<sub>2</sub>), 70.93 (CH), 70.58 (C), 66.80 (CH), 59.84 (CH), 56.50 (CH), 46.36 (C), 46.36 (CH<sub>2</sub>), 46.00 (CH<sub>2</sub>), 45.11 (CH<sub>2</sub>), 42.79 (CH<sub>2</sub>), 40.64 (CH<sub>2</sub>), 34.22 (CH), 30.08 (CH<sub>3</sub>), 29.78 (CH<sub>3</sub>), 28.96 (CH<sub>2</sub>), 27.26 (CH<sub>3</sub>), 23.41 (CH<sub>2</sub>), 22.64 (CH<sub>2</sub>), 21.97 (CH<sub>2</sub>), 13.64 (CH<sub>3</sub>).

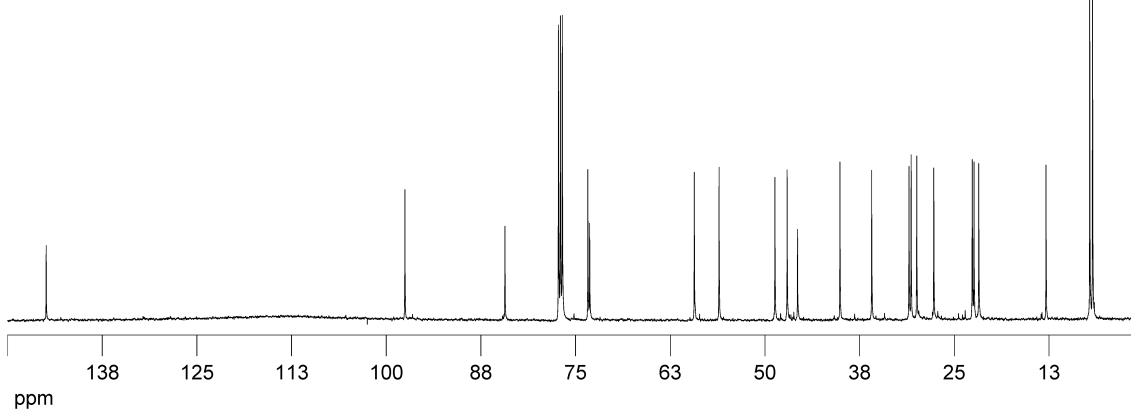




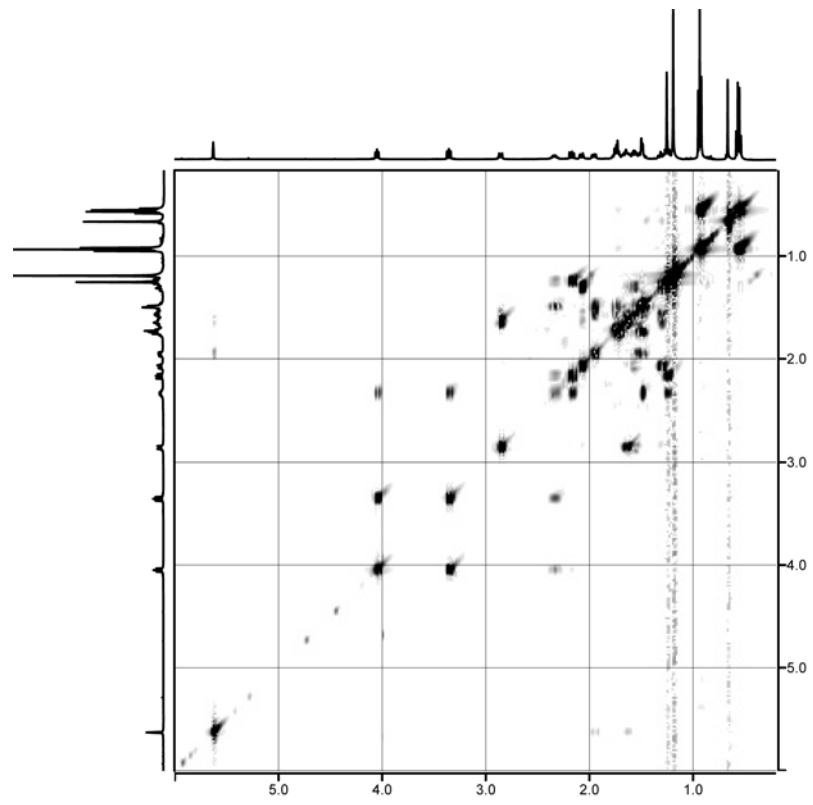
**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz): 5.63 (s, 1H, HC=C), 4.05 (dd, J = 7.78 Hz, 1H, O-CHH), 3.36 (dd, J = 9.88, 8.92 Hz, 1H, O-CHH), 1.25 (s, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>21</sub>), 1.19 (s, 6H, H<sub>3</sub>C-COH-CH<sub>3</sub>), 0.93 (t, J = 7.85 Hz, 9H, Si-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.67 (d, J = 3.83 Hz, 3H, H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 0.57 (q, J = Hz, 9H, Si-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).



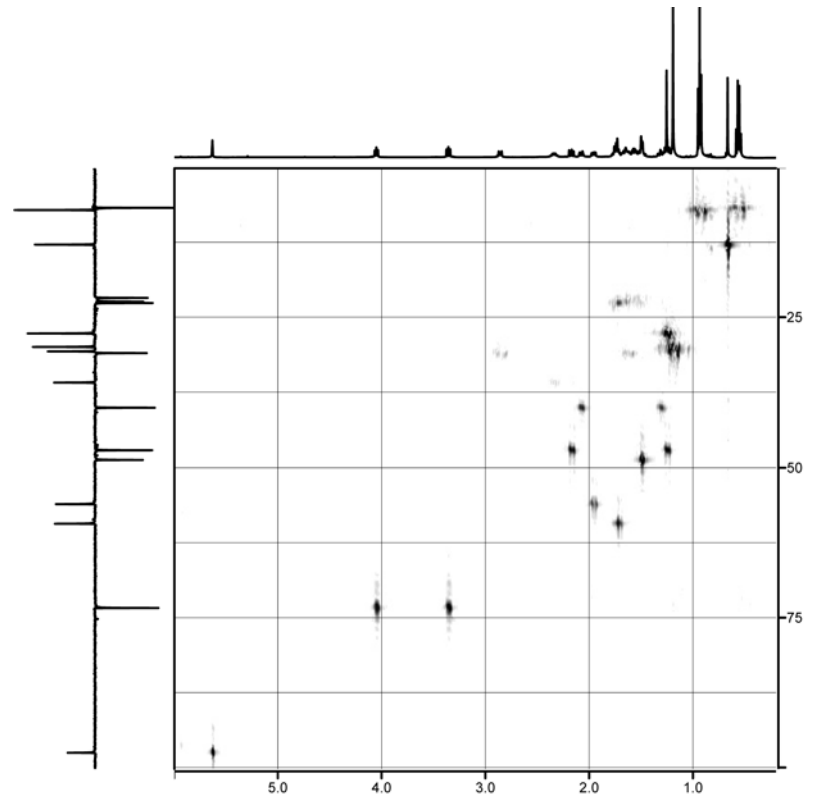
**<sup>13</sup>C-NMR** (62.89 MHz): 144.90 (C=CH), 97.53 (C=CH), 84.32 (THF-C), 73.37 (THF-OCH<sub>2</sub>), 73.13 (C-OTES), 59.32 (CH), 56.05 (CH), 48.67 (CH<sub>2</sub>), 47.06 (CH<sub>2</sub>), 45.69 (C), 40.08 (CH<sub>2</sub>), 35.90 (CH), 30.97 (CH<sub>2</sub>), 30.69 (H<sub>3</sub>C-COTES), 29.9 (H<sub>3</sub>C-COTES), 27.70 (H<sub>3</sub>C<sub>21</sub>), 22.62 (CH<sub>2</sub>), 22.39 (CH<sub>2</sub>), 21.76 (CH<sub>2</sub>), 12.88 (H<sub>3</sub>C<sub>18</sub>), 7.12 (Si-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 6.74 (Si-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).



**$^1\text{H-COSY}$**



**HMQC**



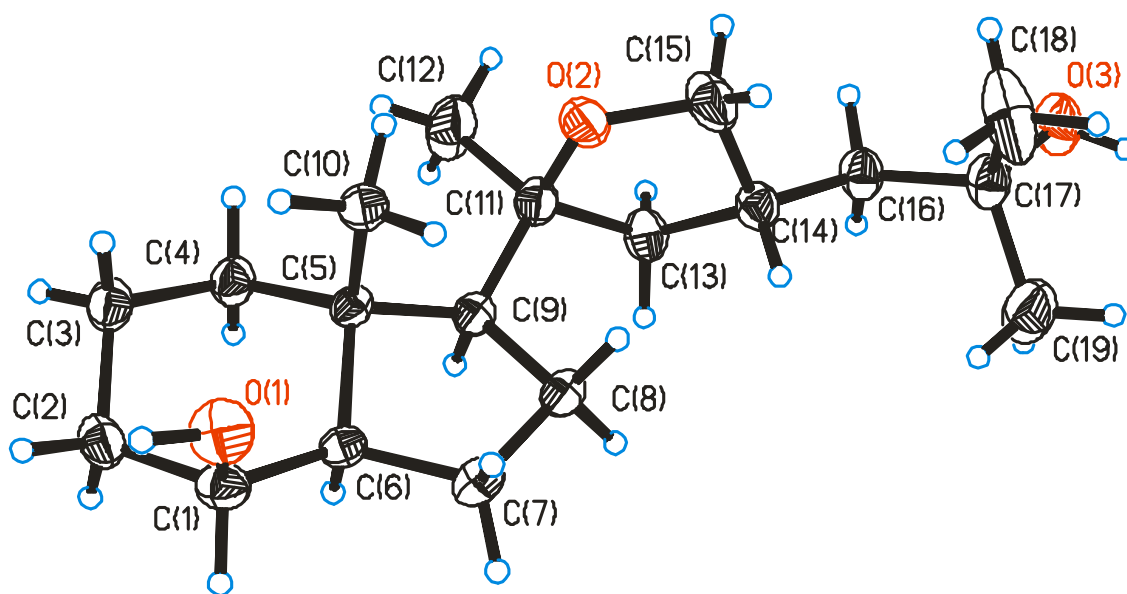


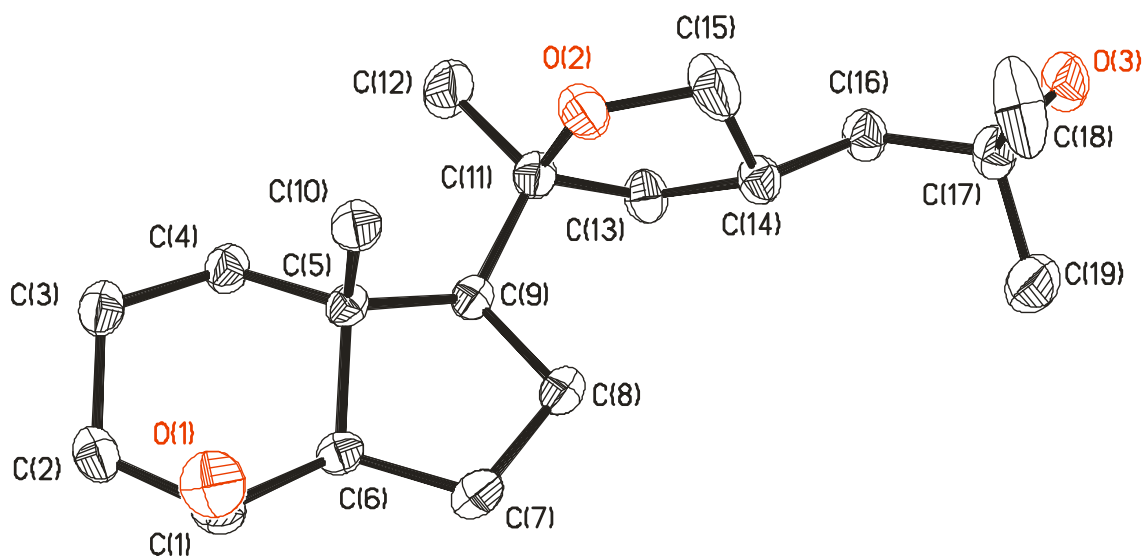
# **Datos Cristalográficos**



## Crystal data and structure refinement for AMCR277A.

Identification code	AMCR277A	
Empirical formula	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	
Formula weight	310.46	
Temperature	298(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2(1)	
Unit cell dimensions	a = 6.2599(10) Å	α = 90°.
	b = 24.558(4) Å	β = 102.801(2)°.
	c = 12.2790(19) Å	γ = 90°.
Volume	1840.7(5) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Density (calculated)	1.120 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.073 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	688	
Crystal size	0.35 x 0.25 x 0.20 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	1.66 to 26.37°.	
Index ranges	-6 ≤ h ≤ 7, -30 ≤ k ≤ 21, -15 ≤ l ≤ 13	
Reflections collected	10793	
Independent reflections	6655 [R(int) = 0.0205]	
Completeness to theta = 26.37°	99.9 %	
Absorption correction	Semi-empirical	
Max. and min. transmission	0.9855 and 0.9748	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	
Data / restraints / parameters	6655 / 1 / 397	
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.070	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0430, wR2 = 0.1098	
R indices (all data)	R1 = 0.0557, wR2 = 0.1229	
Absolute structure parameter	-0.2(10)	
Largest diff. peak and hole	0.166 and -0.238 e.Å <sup>-3</sup>	

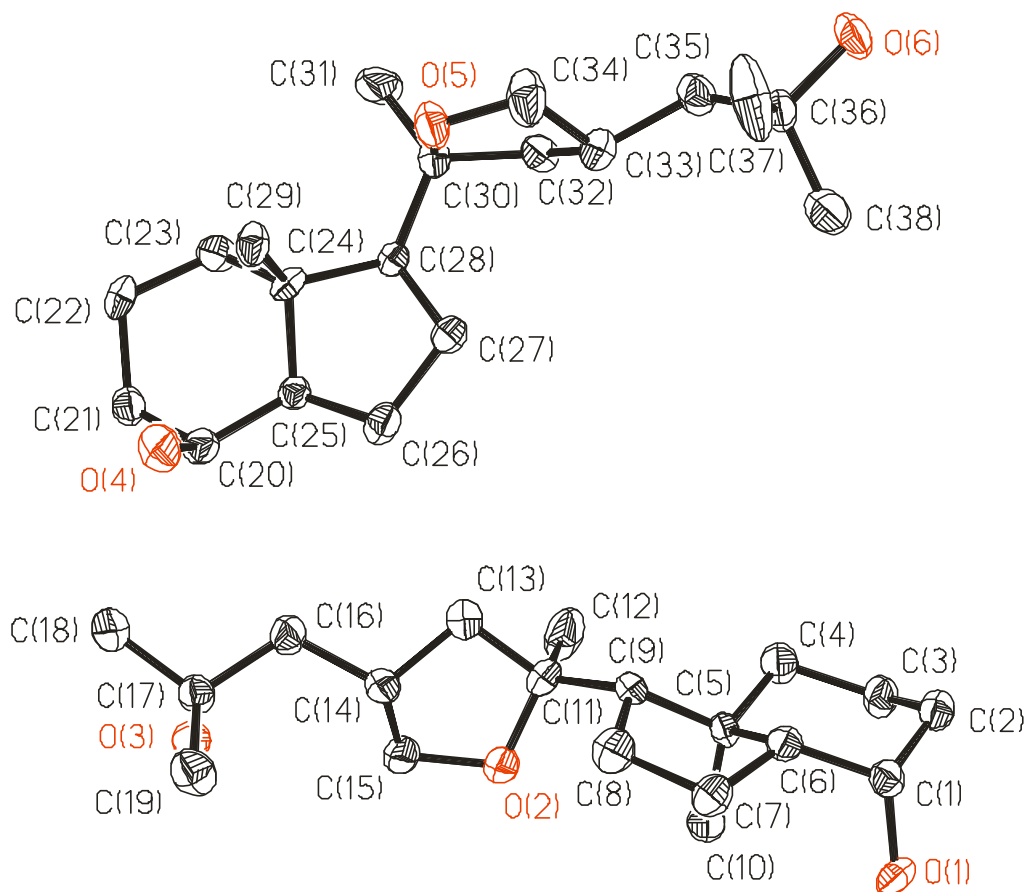




Crystal data and structure refinement for analogo AMCR277B.

Identification code	AMCR277B	
Empirical formula	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	
Formula weight	310.46	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2(1)	
Unit cell dimensions	a = 6.2603(8) Å	α = 90°.
	b = 24.535(3) Å	β = 102.734(2)°.
	c = 12.2755(16) Å	γ = 90°.
Volume	1839.1(4) Å <sup>3</sup>	
Z	4	
Density (calculated)	1.121 Mg/m <sup>3</sup>	
Absorption coefficient	0.073 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	688	
Crystal size	0.35 x 0.25 x 0.15 mm <sup>3</sup>	
Theta range for data collection	3.32 to 27.39°.	
Index ranges	-7 ≤ h ≤ 7, -30 ≤ k ≤ 16, -15 ≤ l ≤ 14	
Reflections collected	9852	
Independent reflections	5545 [R(int) = 0.0642]	
Completeness to theta = 27.39°	90.4 %	
Absorption correction	None	
Max. and min. transmission	0.9891 and 0.9748	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>	

Data / restraints / parameters	5545 / 4 / 407
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	0.974
Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	R1 = 0.0708, wR2 = 0.1898
R indices (all data)	R1 = 0.1726, wR2 = 0.2698
Absolute structure parameter	6(3)
Extinction coefficient	0.009(3)
Largest diff. peak and hole	0.221 and -0.181 e.Å <sup>-3</sup>





# **BIBLIOGRAFÍA**



- (1) Mellanby E. "An experimental investigation on rickets." *Lancet I*, **1919**, *1*, 407.
- (2) McCollum EV, Simmonds N, Becker IE, Shipley PG. *J. Biol. Chem.* **1922**, *53*, 293.
- (3) Windaus A, Linsert O. *Ann. Chem.* **1928**, *465*, 148.
- (4) (a) Brockmann H. *Hoppe Seylers Zeit. Physiol. Chem.* **1936**, *241*, 104-115. (b) Bouillon R, DeGroot LJ, Jameson JL (Eds.), *Endocrinology*, Elsevier Saunders, Philadelphia, **2005**, pp. 1435-1463.
- (5) (a) Haussler MR, Myrtle JF, Norman AW. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 4055. (b) Lawson D, Fraser DR, Kodicek E. *Nature* **1971**, *230*, 228. (c) Holick MF, Schoes HK, Peluca HF. *Biochemistry* **1971**, *10*, 2799.
- (6) Tocchini-Valentini G, Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Moras D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5491-5496.
- (7) Rochel N, Moras D. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1229-1241.
- (8) Norman AW, Litwark GL. *Hormones*. Academic Press, New York **1979**.
- (9) Mizwicki MT, Bula CM, Bishop JE, Norman AW. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *97*, 69-82
- (10) Eliel EI, Manoharan M. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1959.
- (11) (a) *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 1511-1516. (b) *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 2nd edition, Portland Press, **1992**, pages 242-246. (c) *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *218*, 342-346. (d) *Endokrinol. Inform.* **1982**, *2*, 53-62. (e) *Eur. J. Biochem.* **1982**, *124*, 223-227. (f) *Mol. Cell. Biochem.* **1982**, *49*, 177-181
- (12) Holick MF. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, 619-630.
- (13) Holick MF, Tian XQ, Allen M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 3124-3126.
- (14) Holick MF. *J. Cell. Biochem.* **2003**, *88*, 296-307.
- (15) Andersen R, Brot C, Ovansen L. Towards A strategy for optimal vitamin D fortification (OPTIFORD). *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* **2001**, *11*, 74-77.
- (16) National Academy of Sciences, *Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes: for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride*. Washington, DC: National Academic Press. **1997**, 38-144.
- (17) Schneider DL, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* **2006**, *13*, 483-490.
- (18) Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF. *Osteoporos. Int.* **2005**, *16*, 713-715.
- (19) Trang HM, Cole DE, Rubin LA. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 854-858.
- (20) Vieth R. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, *69*, 842-856.
- (21) Vieth R, Chan PC, MacFarlane GD. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 288-294.
- (22) Heaney RP, Davies KM, Chen TC. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 204-210.
- (23) (a) Tucker G, Gagnon RE, Haussler MR. *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *155*, 47-57. (b) Prosser DE, Jones G. *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 664.
- (24) (a) Makin G, Lohnes D, Byford V, Ray R, Jones G. *Biochem. J.* **1989**, *262*, 173. (b) Reddy GS, Tsemg KY. *Biochemistry* **1989**, *28*, 1763.
- (25) Henry HL. *Steroids* **2001**, *66*, 391-398.
- (26) Schuster I, Egger H, Bikel H, Herzig G, Reddy GS, Stuetz A, Stuetz P, Vorisek G. *Steroids* **2001**, *66*(3-5), 409-422.
- (27) Ishizuka S, Norman AW. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 7165.

- (28) (a) Ishizuka S, Miura D, Ozono K, Saito M, Eguchi H, Chokki M, Norman AW. *Steroids* **2001**, *66*, 227-237. (b) Ishizuka S, Miura D, Ozono K, Saito M, Eguchi H, Chokki M, Norman AW. *Endocrinology* **2001**, *142*, 59-67. (c) Miura D, Manabe K, Ozono K, Saito M, Gao G, Norman AW, Ishizuka S. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 16392-9
- (29) Brown AI, Ritter C, Slatopolsky R, Muralidharan KR, Okamura WH, Reddy GS, *J. Cell Biochem.* **1999**, *73*, 106
- (30) Kamao M, Hatakeyama S, Sakaki T, Sawada N, Inouye K, Kubodera N, Reddy GS, Okano T. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *436*, 196.
- (31) Verboven C, Rabijns A, De Maeyer M, Van Baelen H, Bouillon R, De Ranter C. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 131-136.
- (32) (a) White P, Cooke N. *Trends Endocrinol. Metab.* **2000**, *16*, 320-327. (b) Safadi FF. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 239-251.
- (33) (a) Spiess YH, Price PA, Deftos JL, Manolagas SC. *Endocrinology* **1986**, *16*, 1340-1346. (b) Norman AW. *Vitamin D, the Calcium Homeostatic Steroid Hormone*, **1979**, Academic Press: New York. (c) Chen TC, Castillo L, Korycka-Dahl M, DeLuca HF. *J. Nutr.* **1974**, *104*, 1056-1060.
- (34) (a) Holick MF, Editor. *Vitamin D: Physiology, Molecular Biology and Clinical Applications* **1999**, Humana press, Totowa NJ, USA. (b) Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 1193-1231. (c) DeLuca HF, Zeierld C. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 54-75. (d) Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. *Endocr. Rev.* **1995**, *16*, 200-257.
- (35) Fogh K, Kragballe K. *Curr. Pharm. Des.* **2000**, *6*, 961-972.
- (36) Slatopolsky E, Brown AJ. *Blood Purif.* **2002**, *20*, 109-112.
- (37) Richey F, Ethgen O, Bruyere O, Reginster JY. *Osteoporos Int.* **2004**, *15*, 301-310.
- (38) Mathieu C, Adorini L. *Trends Mol. Med.* **2002**, *8* (4), 174-179.
- (39) Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. *Endocr. Rev.* **2005**, *26* (5), 662-687.
- (40) Roger B, Guy E, Lieve V, Chantal M, Geert C, Annemieke V. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *102*, 203-211.
- (41) Hellerstedt BA, Pienta KJ. *CA Cancer J. Clin.* **2002**, *52*, 154-179.
- (42) (a) Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. *Endocrinology* **1993**, *132*, 1952-1960. (b) Feldman D, Skowronski RJ, Peehl DM. *Diet and cancer*. New York: Plenum Press. **1995**, 53-63. (c) Kivineva M, Blauer M, Syvala H, Tammela T, Tuohimaa P. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *66*, 121-127.
- (43) Schwartz GG, Hulka BS. *Anticancer Res.* **1990**, *10*, 1307-1311.
- (44) Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, Hakama M, Tuohimaa P. *Cancer Causes & Control.* **2000**, *11*, 847-852.
- (45) Yang ES, Maiorino CA, Roos BA, Knight SR, Burnstein KL. *Mol. Cell Endocrinol.* **2002**, *186*, 69-79.
- (46) (a) Peehl DM, Skowronski RJ, Leung GK, Wong ST, Stamey TA, Feldman D. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 805-810. (b) Krishnan AV, Peehl DM, Feldman D. *J. Cell Biochem.* **2003**, *88*, 363-371.
- (47) (a) Polek TC, Murthy S, Blutt SE, Boehm MF, Zou A, Weigel NL, Allegretto EA. *Prostate.* **2001**, *49*, 224-233. (b) Vegesna V, O'Kelly J, Said J, Uskokovic M, Binderup L, Koeffler HP. *Anticancer Res.* **2003**, *23*, 283-289.
- (48) Peehl DM, Seto E, Hsu JY, Feldman D. *J. Urol.* **2002**, *168*, 1583-1588.
- (49) Crescioli C, Ferruzzi P, Caporali A, Mancina R, Comerci A, Muratori M, Scaltriti M, Vannelli GB, Smirolto S, Mariani R, Villari D, Bettuzzi S, Serio M, Adorini L, Maggi M. *Endocrinology* **2003**, *144*, 3046-3057.

- (50) Polar MK, Gennings C, Park M, Gupta MS, Gewirtz DA. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**, *51*, 415–421.
- (51) Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Young JF. *Prev. Med.* **1990**, *19*, 614–622. (b) John EM, Schwartz GG, Dreon DM, Koo J. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1999**, *8*, 399–406.
- (52) Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW, Pinkel D. *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 144–146.
- (53) Mawer EB, Walls J, Howell A, Davies M, Ratcliffe WA, Bundred NJ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 118–122.
- (54) (a) Bortman P, Folgueira MAAK, Katayama MLH, Snitcovsky IML, Brentani MM. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2002**, *35*, 1–9 201.(b) Friedrich M, Axt-Flidner R, Villena-Heinsen C, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J. *Histochem. J.* **2002**, *34*, 35–40.
- (55) (a) Pinette KV, Yee YK, Amegadzie BY, Nagpal S. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 193–204.
- (56) (a) Vandewalle B, Adenis A, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. *Cancer Lett.* **1994**, *86*, 67–73. (b) Kallay E, Pietschmann P, Toyokuni S, Bajna E, Hahn P, Mazzucco K, Bieglmayer C, Kato S, Cross HS. *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 1429–1435.
- (57) Vandewalle B, Adenis A, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. *Cancer Lett.* **1994**, *86*, 67–73.
- (58) (a) Evans SRT, Soldatenkov V, Shchepotin EB, Bogrash E, Shechepotin IB. *Int. J. Oncol.* **1999**, *14*, 979–985. (b) Palmer HG, Gonzalez-Sancho J, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herrerros AG, Lafarga M, Munoz A. *J. Cell. Biol.* **2001**, *154*, 369–387.
- (59) Gaschott T, Steinhilber D, Milovic V, Stein J. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 1839–1843.
- (60) (a) Honma Z, Nandan D, Sly L, Knutson KL, Herrera-Velit P, Reiner NE. *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 1583–1594. (b) Niitsu N, Umeda M, Honma Y. *Leuk. Res.* **2000**, *24*, 1–9.
- (61) (a) James SY, Williams MA, Newland AC, Colston KW. *Gen. Pharmacol.* **1999**, *32*, 143–154. (b) Kanatani Y, Makishima M, Ishikawa I, Ogasawara Y, Kawahara N, Motoyoshi K, Nagata N, Honma Y. *Exp. Hematol.* **1998**, *26*, 198–206. (c) Funato K, Miyazawa K, Yaguchi M, Gotoh A, Ohyashiki K. *Leukemia.* **2002**, *16*, 1519–1527.
- (62) (a) Motomura S, Kanamori H, Maruta A, Kodama F, Ohkubo T. *Am. J. Hematol.* **1991**, *38*, 67–68. (b) Mellibovsky L, Diez A, Perez-Vila E, Serrano S, Nacher M, Aubia J, Supervia A, Recker RR. *Br. J. Hematol.* **1998**, *100*, 516–520. (c) Santini V, Ferrini PR. *Br. J. Hematol.* **1998**, *102*, 1124–1138.
- (63) (a) Hershberger PA, Yu W-D, Modzelewski RA, Rueger RM, Johnson CS, Trump DL. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1043–1051. (b) Enepekides DJ, Black MJ, White JH. *J. Otolaryngol.* **1999**, *28*, 83–89. (c) Lin R, Nagai Y, Sladek R, Bastien Y, Ho J, Petrecca K, Sotiropoulou G, Diamandis EP, Hudson TJ, White JH. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 1243–1256.
- (64) (a) Jenner RG, Maillard K, Cattini N, Weiss RA, Boshoff C, Wooster R, Kellam P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**, *100*, 10399–10404. (b) Masood R, Nagpal S, Zheng T, Cai J, Tulpule A, Smith DL, Gill PS. *Blood* **2000**, *96*, 3188–3194.
- (65) (a) DeLuca HF, Cantorna MT. *FASEB J.* **2001**, *15*, 2579–2585. (b) Mathieu C, Adorini L. *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, 174–179. (c) Adorini L. *Int. Immunopharmacol.* **2002**, *2*, 1017–1028.
- (66) (a) Koizumi T, Nakao Y, Matsui T, Nakagawa T, Matsuda AS, Komoriya K. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1985**, *77*, 396–404. (b) Mathieu C, Casteels K, Waer M, Laureys J, Valckx D, Bouillon R. *Transplant Proc.* **1998**, *30*, 541.
- (67) (a) Gysemans C, Van Etten E, Overbergh L, Verstuyf A, Waer M, Bouillon R, Mathieu C. *Clin. Exp. Immunol.* **2002**, *128*, 213. (b) Overbergh L, Decallonne B, Waer M, Rutgeerts O, Valckx D, Casteels KM, Laureys J, Bouillon R, Mathieu C. *Diabetes* **2000**, *49*, 1301–1307. (c) Mauricio D, Mandrup-Poulsen T, Nerup J. *Diabetes Metab. Rev.* **1996**, *12*, 57–68. (d) Mathieu C, Waer M, Casteels K, Laureys J, Bouillon R. *Endocrinology* **1995**, *136*, 866–872. (e) Gregori S, Giarratana N, Smirolto S, Uskokovic M, Adorini L. *Diabetes* **2002**, *51*, 1367–1374.
- (68) (a) Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 68–72 (b) Larsson P, Mattsson L,

- Klareskog L, Johnsson C. *Clin. Exp. Immunol.* **1998**, *114*, 277–283. (c) Tsuji M, Fujii K, Nakano T, Nishii Y. *FEBS Lett.* **1994**, *337*, 248–250.
- (69) (a) Garcion E, Sindji L, Nataf S, Brachet P, Darcy F, Montero-Menei CN. *Acta Neuropathol.* **2003**, *105*, 438–448. (b) Meehan TF, DeLuca HF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2002**, *99*, 5557–5560. (c) Nashold FE, Hoag KA, Goverman J, Hayes CE. *J. Neuroimmunol.* **2001**, *119*, 16–29. (d) Nashold FE, Miller DJ, Hayes CE. *J. Neuroimmunol.* **2000**, *103*, 171–179. (e) Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, DeLuca HF. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 5314–5319. (f) Hayes CE, Cantorna MT, DeLuca HF. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1997**, *216*, 21–27.
- (70) Cantorna MT, Munsick C, Bemiss C, Mahon BD. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2648–2652.
- (71) (a) Provedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. *Science* **1983**, *221*, 1181–1183. (b) Feldman D, Chen T, Hirst M, Colston K, Karasek M, Cone C. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1980**, *51*, 1463–1465.
- (72) Morimoto S, Kumahara Y. *Med. J. Osaka Univ.* **1985**, *35*, 51–54.
- (73) Nagpal S, Lu J, Boehm MF. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1661–1679.
- (74) (a) Langner A, Stapor W, Ambroziak M. *Br. J. Dermatol.* **2001**, *144*, 11–16. (b) Barker JN, Berth-Jones J, Groves R, Omerod AD, Rizova E, Griffiths CE. *J. Dermatolog. Treat.* **2003**, *14*, 14–21.
- (75) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. *Endocr. Rev.* **1999**, *20*, 345–357.
- (76) Lutzow-Holm C, De Angelis P, Clausen OP. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **1996**, *1*, 54–59.
- (77) (a) Hirata M, Makibayashi K, Katsumata K, Kusano K, Watanabe T, Fukushima N. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2002**, *17*(12), 2132–2137. (b) Makibayashi K, Tatematsu M, Hirata M, Fukushima N, Kusano K, Ohashi S, Abe H, Kuze K, Fukatsu A, Kita T, Doi T. *Am. J. Pathol.* **2001**, *158*(5), 1733–1741.
- (78) Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, Lazarus JM, Hernan MA, Camargo CA, Thadhani R. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, *16*(4), 1115–1125.
- (79) Mangedorf DJ, Thummel C, Besto M, Herrfich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. *Cell.* **1995**, *83*, 835.
- (80) (a) Pike JW, Haussler MR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1979**, *76*, 5488. (b) Haussler MR, Pike JW, Chandler JS, Manolagas SC, Deftos LJ. *Ann. NY Acad. Sci.* **1981**, *372*, 502.
- (81) Shaffer PL, Gewirth DT. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *89-90*, 215–219.
- (82) (a) Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H, Tavakkoli P, Galligan MA, Dang HT, Haussler CA, Haussler MR. *Mol. Endocrinol.* **2000**, *14*, 401. (b) Sunn KL, Cock TA, Crofts LA, Eisman JA, Gardiner EM. *Mol. Endocrinol.* **2001**, *15*, 1599.
- (83) McDonnell DP, Scout RA, Kerner RA, O'Malley BW, Pike JW. *Mol. Endocr.* **1989**, *3*, 635.
- (84) Khorasanizadeh S, Rastinejad F. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 384.
- (85) Berg JM. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 99.
- (86) Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Singler PB. *Nature* **1995**, *375*, 203.
- (86) Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Singler PB. *Nature* **1995**, *375*, 203–211.
- (87) Shaffer PL, McDonnell DP, Gewirth DT. *Biochemistry* **2005**, *44*, 2678.
- (88) Allegretto RA, Pike JW, Haussler MR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *147*, 479.
- (89) Mizwicki MT, Norman AW. *J. Bone Miner. Res.* **2003**, *18*, 795.
- (90) Choi M, Yamamoto K, Masuno H, Nakashima K, Taga T, Yamada S. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1721–1730.

- 
- (90) Choi M, Yamamoto K, Masuno H, Nakashima K, Taga T, Yamada S. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1721-1730.
- (91) (a) Sone T, Ozono K, Pike IW. *Mol. Endocrinol.* **1991**, *5*, 1578. (b) Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM. *Nature* **1992**, *355*, 446. (c) Carlberg C, Bendik I, Wyss A, Meier R, Sturzenbecker LJ, Grippo IF, Hunziker W. *Nature* **1993**, *361*, 657.
- (92) (a) Jin CH, Kerner SA, Hong MH, Pike JW. *Mol. Endocrinol.* **1996**, *10*, 945. (b) Freedman LP. *Endocr. Rev.* **1992**, *13*, 129.
- (93) Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG. *EMBO J.* **1992**, *11*, 1025.
- (94) Whitfield GK, Hsieh JC, Nakajima S, Mac Donald PN, Thompson PD, Jurutka PW, Haussler CA, Haussler MR. *Mol. Endocr.* **1995**, *9*, 1166.
- (95) Rochel N, Tocchini-Valentini G, Egea PF, Juntunen K, Garnier JM, Vihko P, Moras D. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 971-979.
- (96) Miyamoto T, Kakizawa T, Ichikawa K, Nishio S, Takeda T, Suzuki S, Kaneko A, Kumagai M, Mori J, Yamashita K, Sakuma T, Hashizume K. *Mol. Cell. Endocrinology* **2001**, *181*, 229-238.
- (98) (a) Suhara Y, Nihei KI, Kurihara M, Kittaka A, Yamaguchi K, Fujishima T, Konno K, Miyata N, Takayama H. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8760-8771. (b) Fujishima T, Konno K, Nakagawa K, Tanaka M, Okano T, Kurihara M, Miyata N, Takayama H. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1011-1024. (c) Masuno H, Yamamoto K, Xinxiang W, Mihwa C, Hiroshi O, Toshimasa S, Yamada S. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1825-1834.
- (99) Kawata M. *Arch. Histol. Cytol.* **2001**, *64*, 353-368.
- (100) Van der Bemd GJ, Jhamai M, Staal A, Van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Pols HA, Van Leeuwen JP. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 14539-14546.
- (102) Lemon B, Freedman LP. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 1006-1016.
- (103) Jurutka WP, MacDonald PN, Nakajima S, Hsieh J-C, Thompson PD, Whitfield GK, Galligan MA, Haussler CA, Haussler MR. *J. Cell. Biochem.* **2002**, *85*, 435-457.
- (104) Takeshita A, Ozawa Y, Chin WW. *Endocrinology* **2000**, *141*, 1281-1284.
- (105) Rachez C, Freedman LP. *Gene* **2000**, *246*, 9-21.
- (106) (a) Blanco JCC, Wang IM, Tsai SY, Tsia MJ, O'Malley BW, Jurutka PW, Haussler MR, Ozato K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1535-1539. (b) MacDonald PN, Sherman DR, Dowd DR, Jefcoat JR, Delisle RK. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 4748-4752.
- (107) Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. *Nature* **1998**, *395*, 828-832.
- (108) Polly P, Herdick M, Moehren U, Baniahmad A, Heinzel T, Carlberg C. *FASEB J.* **2000**, *14*, 1455-1463.
- (109) (a) Chen JD, Evans RM. *Nature* **1995**, *377*, 454-457. (b) Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Glass J, Kurokawa R, Ryan A, Kameyama Y, Soderstrom M, Glass KC, et al. *Nature* **1995**, *377*, 397-404.
- (110) (a) Baran DT. *J. Cell. Biochem.* **1994**, *56*, 303-306. (b) Baran DT, Sorensen AM, Shalhoub V, Owen T, Stein G, Lian J. *J. Cell. Biochem.* **1992**, *50*, 124-129.
- (111) (a) Hedlund TE, Moffatt KA, Miller GJ. *Endocrinology* **1996**, *137*, 1554-1561 (b) Khoury R, Ridall AL, Norman AW, Farach-Carson MC. *Endocrinology* **1994**, *135*, 2446-2453.
- (112) Norman AW, Mizwicki MT, Norman DPG. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 27-41.
- (113) Norman AW. In: Feldman D, Pike JW, Glorieux FH, eds. *Vitamin D*. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press **2005**, 381-407.
- (114) Razani B, Woodman SE, Lisanti MP. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 431-467.

- (115) Norman AW, Okamura WH, Hammond MW, Bishop JE, Dormanen MC, Bouillon R, Van Baelen H, Ridall AL, Daane E, Khoury R, Farach-Carson MC. *Mol. Endocrinol.* **1997**, *11*, 1518–1531.
- (116) Norman AW. *Endocrinology* **2006**, *147*(12), 5542–5548.
- (117) Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW. *Mol. Endocrinol.* **2004**, *18*, 2660–2671.
- (117) Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW. *Mol. Endocrinol.* **2004**, *18*, 2660–2671.
- (118) Nguyen TM, Lieberherr M, Fritsch J, Guillozo H, Alvarez ML, Fitouri Z, Jehan F, Garabedian M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 7591–7597.
- (119) (a) Zhou LX, Nemere I, Norman AW. *J. Bone Miner. Res.* **1992**, *7*, 457. (b) Norman AW, Okamura WH, Hammond MW, Bishop JE, Dormanen MC, Bouillon R, Van Baelen H, Ridal AL, Daane E, Khoury R, Farah-Carson MC. *Mol. Endocr.* **1997**, *11*, 1518.
- (120) Mizwicki MT, Keidel D, Bula CM, Bishop JE, Zanello LP, Wurtz JM, Moras D, Norman AW. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12876–12881.
- (122) Este esquema fue construido por Mathew T. Mizwicki del grupo de Anthony Norman del Departamento de Ciencias Bioquímicas y Biomédicas de la Universidad de California.
- (123) Tadakatsu T, Kazumi M. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1303-1316.
- (124) Masuda S, Byford V, Kremer R, Makin HLJ, Kubodera N, Nishii Y, Okazaki A, Okano T, Kobayashi T, Jones G. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8700-8708.
- (125) Shimizu K, Kawase A, Haneishi T, Kato Y, Kobayashi T, Sekiguchi N, Yamamoto T, Ishigai M, Tokuda K, Matsushita T, Shimaoka S, Morikawa K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**
- (126) (a) Posner GH, Crawford KR, Yang HW, Kahraman M, Jeon HB, Li H, Lee JK, Suh BC, Hatcher MA, Labonte T, Usera A, Dolan PM, Kensler TW, Peleg S, Jones G, Zhang A, Korczak B, Saha U, Chuang SS. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *89-90*, 5-12. (b) Kahraman M, Sinishtaj S, Dolan PM, Kensler TW, Peleg S, Saha U, Chuang SS, Bernstein G, Korczak B, Posner GH. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6854-6863.
- (127) Plum LA, Pahl JM, Ma X, Sicinski RR, Gowlugari S, Clagett-Dame M, DeLuca HF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 6900-6904.
- (128) Collins ED, Bishop JE, Bula CM, Acevedo A, Okamura WH, Norman AW. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *94*, 279-288.
- (129) Perez-Garcia X, Rumbo A, Larriba MJ, Ordoñez P, Muñoz A, Mouriño A. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4033-4036.
- (130) Shimizu H, Shimizu K, Uchiyama Y, Sugita A, Mikami T, Yamauchi T, Kato M, Morikawa K. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7837-7841.
- (131) Pinette Karen V, Yee Ying K, Amegadzie BY, Nagpal S. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 193-204.
- (132) (a) Verlinden L, Verstuyf A, Verboven C, Eelen G, De Ranter C, Gao LJ, Chen YJ, Murad I, Choi M, Yamamoto K, Yamada S, Van Haver D, Vandewalle M, De Clercq PJ, Bouillon R. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35476-35482. (b) Chen YJ, Gao LJ, Murad I, Verstuyf A, Verlinden L, Verboven C, Bouillon R, Viterbo D, Milanese M, Van Haver D, Vandewalle M, De Clercq PJ. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 257-267.
- (133) Gonzalez-Avion XC, Mourino A. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2291-2293.
- (134) Saito N, Suhara Y, Kurihara M, Fujishima T, Honzawa S, Takayanagi H, Kozono T, Matsumoto M, Ohmori M, Miyata N, Takayama H, Kittaka A. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7463-7471.
- (135) Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, Haussler MR, Mangelsdorf DJ. *Science* **2002**, *296*, 1313-1316.
- (136) Adachi R, Honma Y, Masuno H, Kawana K, Shimomura I, Yamada S, Makishima M. *J. Lipid.*

Res. **2005**, 46, 46-57.

- (137) (a) Sun J, Meyers MJ, Fink BE, Rajendran R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. *Endocrinology* **1999**, 140, 800-804. (b) Yin D, He Y, Perera MA, Hong SS, Marhefka C, Stourman N, Kirkovsky L, Miller DD, Dalton JT. *Mol. Pharmacol.* **2003**, 63, 211-223. (c) Einstein M. et al. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2004**, 92, 345-356
- (138) (a) Boehm MF, Fitzgerald P, Zou A, Elgort MG, Bischoff ED, Mere L, Mais DE, Bissonnette RP, Heyman RA, Nadzan AM, Reichman M, Allegretto EA. *Chem. Biol.* **1999**, 6, 265-275. (b) Swann SL, Bergh J, Farach-Carson MC, Ocasio CA, Koh JT. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13795-13805.
- (139) Polek TC, Murthy S, Blutt SE, Boehm MF, Zou A, Weigel NL, Allegretto EA. *Prostate* **2001**, 49, 224-233.
- (140) Peraekylae M, Malinen M, Herzig KH, Carlberg C. *Mol. Endocrinol.* **2005**, 19, 2060-2073.
- (141) Verstuyf A, Verlinden L, Van Baelen H, Sabbe K, D'Hallewyn C, De Clercq P, Vandewalle M, Bouillon R. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, 13, 549.
- (142) Verstuyf A, Verlinden L, Van Etten E, Shi L, Wu Y, D'Halleweyn C, Van Haver D, Zhu GD, Chen YJ, Zhou X, Haussler MR, De Clercq P, Vandewalle M, Van Baelen H, Mathieu C, Bouillon R. *J. Bone Miner. Res.* **2000**, 15, 237.
- (143) Bury Y, Herdick M, Uskokovic MR, Carlberg C. *J. Cell Biochem.* **2001**, 81, 179.
- (144) O'Kelly J, Uskokovic M, Lemp N, Vadgama J, Koeffler HP. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2006**, 100, 107.
- (145) Binderup L, Binderup E, Godtfresden WO, Kissmeyer AM. In *Vitamin D, 2<sup>nd</sup> Ed.* Feldman D, Pike J, Glorieux F, eds. Elsevier Academic Press **2005**, 1489.
- (146) Peleg S, Khan F, Navone NM, Cody DD, Johnson EM, Van Pelt CS, Posner GH. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, 97, 203.
- (147) Sharabani H, Izumchenko E, Wang Q, Kreinin R, Steiner M, Barvish Z, Kafka M, Sharoni Y, Levy J, Uskokovic M, Studzinski GP, Danilenko M. *Int. J. Cancer* **2006**, 118, 3012.
- (148) Reddy CD, Patti R, Guttapalli A, Maris JM, Yanamandra N, Rachamalla A, Sutton LN, Phillips PC, Posner GH. *J. Cell Biochem.* **2006**, 97, 198.
- (149) Mehta RG, Hussain EA, Mehta RR, Das Gupta TK. *Mutat. Res.* **2003**, 523-524:253-64., 253.
- (150) Kabat MM, Radinov R. *Curr. Opin. Drug Disc. Der.* **2001**, 4, 808-833.
- (151) SHERING AKTIENGESELLSCHAFT:WO00107405 **2000**.
- (152) Andrews DR, Barton DHR, Hesse RH. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 4819-4828.
- (153) Calverley MJ. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 43, 4609.
- (154) Hammond ML, Mouriño A, Okamura WH. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 4907.
- (155) (a) Castedo L, Mascareñas JL, Mouriño A, Sarandeses LA. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1203-1206. (b) Mascareñas JL, Sarandeses LA, Castedo L, Mouriño A. *Tetrahedron* **1991**, 20, 3485-3489.
- (156) Okamura WH, Aurrecochea JM, Gibbs RA, Norman AW. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4072-4083.
- (157) Trost BM, Dumas J, Villa M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9836-9845.
- (157) Trost BM, Dumas J, Villa M. New strategies for the synthesis of vitamin D metabolites via palladium-catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9836-9845.
- (157) Trost BM, Dumas J, Villa M. New strategies for the synthesis of vitamin D metabolites via palladium-catalyzed reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9836-9845.
- (158) Gómez-Reino C, Vitale C, Maestro M, Mouriño A. *Org. Lett.* **2005**, 7, 5885.
- (158) Gómez-Reino C, Vitale C, Maestro M, Mouriño A. Pd-Catalyzed Carbocyclization-Negishi Cross-

- Coupling Cascade: A Novel Approach to 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Analogues. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5885-5887.
- (158) Gómez-Reino C, Vitale C, Maestro M, Mouriño A. Pd-Catalyzed Carbocyclization-Negishi Cross-Coupling Cascade: A Novel Approach to 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Analogues. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5885-5887.
- (159) (a) Bouillon R, Verstuyf A, Verlinden L, Eelen G, & Mathieu C. *Recent Results Cancer Res.* **2003**, *164*, 353-356. (b) Norman AW, Mizwicki MT, & Norman DP. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 27-41. (c) DeLuca HF. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 1689S-1696S.
- (160) Yamamoto K, Inaba Y, Yoshimoto N, Choi M, Deluca HF & Yamada S. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 932-939.
- (161) Eelen G, Verlinden L, Rochel N, Claessens F, De Clercq P, Vandewalle M, Tocchini-Valentini G, Moras D, Bouillon R & Verstuyf A. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1566-1573.
- (162) Krammer A, Kirchhoff PD, Jiang X, Venkatachalam CM, Waldman M. LigScore: A novel scoring function for predicting binding affinities. *J. Mol. Graph. Model.* **2005**, *23*, 395-407.
- (163) (a) Gehlhaar DK, Bouzida D, Rejto PA, Parrill L, Rami RM. Rational Drug Design: Novel Methodology and Practical Applications (ACS symposium series, 719). *Am. Chem. Soc.* Washington, DC. **1999**, 292-311. (b) Gehlhaar DK, Verkhivker GM, Rejto PA, Sherman CJ, Fogel DB, Fogel LJ, Freer ST. Molecular Recognition of the Inhibitor AG-1343 by HIV-1 Protease: Conformationally Flexible Docking by Evolutionary Programming. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 317.
- (164) Jain AN. Scoring noncovalent protein-ligand interactions: A continuous differentiable function tuned to compute binding affinities. *J. Comp. Aided Molec. Design* **1996**, *10*, 427-440.
- (165) Muegge I, Martin YC. A General and Fast Scoring Function for Protein-Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 791.
- (166) (a) Böhm HJ. Prediction of binding constants of protein ligands: A fast method for the prioritization of hits obtained from the de novo design or 3D database search programs. *J. Comp. Aided Molec. Design* **1998**, *12*, 309-323. (b) Böhm HJ. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J. Comp. Aided Molec. Design* **1994**, *8*, 243-256.
- (167) Mouriño A, Torneiro M, Vitale C, Fernández S, Pérez-Sestelo J, Anne A, Gregorio C. Efficient and versatile synthesis of A-ring precursors of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> and analogues. Application to the synthesis of Lythgoe-Roche phosphine oxide. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4713-4716.
- (168) Fernandez B, Martinez PJA, Granja JR, Castedo L, Mouriño A. Synthesis of hydrindan derivatives related to vitamin D. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3173-3178.
- (169) Bedford SB, Bell KE, et. all. Model studies of the overall 5-endo-trig iodocyclization of homoallylic alcohols. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, *15*, 2143-2153.
- (170) (a) Still WC. Stannylation/destannylation. Preparation of  $\alpha$ -alkoxy organolithium reagents and synthesis of dendrolasin via a carbanyl carbanion equivalent. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1481-1487. (b) Still WC, Mitra A. A highly stereoselective synthesis of Z-trisubstituted olefins via [2,3]-sigmatropic rearrangement. Preference for a pseudoaxially substituted transition state. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1927-1928. (c) Broka CA, Lee WJ, Shen T. Anionic cyclizations of  $\alpha$ -alkoxy lithiums. New, stereoselective routes to substituted tetrahydrofurans. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1336-1338. (d) Broka CA, Shen T. Reductive lithiation mediated anionic cyclizations and [2,3]-sigmatropic rearrangements. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2981-2984. (e) Tomooka K, Komine N, and Nakai T. Cyclization of enantio-enriched  $\alpha$ -(homoallyloxy)alkyllithiums: Evidence for retention of configuration at the carbanion center. *Tetrahedron Lett.* *38*, **1997**, 8939-8942. (f) Nobuyuki K, Katsuhiko T, Takeshi N. Modified cyclization of enantio-enriched  $\alpha$ -homoallyloxy-alkyllithiums generated by Sn-Li transmetalation: effects of additives and structural requirement. *Heterocycles*, **2000**, *52*, 1071-1074.
- (171) (a) Alonso E, Ramon DJ, Yus M. Preparation of biologically active hydroxy ketones and analogous systems through masked lithium enolates generated by a naphthalene-catalyzed lithiation. *Anal. de Quim. Int. Ed.* **1998**, *94*, 56-61. (b) Alonso F, Meléndez J, and Yus M. A new 3-methylidenepentane-1,5-dianion synthon: synthesis of perhydropyrano[2,3-b]pyrans and 1,7-

- dioxaspiro[4.5]decanes. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6519-6524
- (172) Lorenzo E, Alonso F, Yus M. New Trimethylenemethane Dianion Synthons: Application to the Preparation of Substituted Perhydrofuro[2,3-b]furans. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1745-1757.
- (173) (a) Mukund KG, Ravi N, Ramana CV, Sukhen K, Debendra MK. Ring-closing metathesis mediated total synthesis of microcarpalide and herbarumin III. *ARKIVOC*, **2005**, *3*, 237-257. (b) Mukund KG, Nagaprasad R, Ramana CV. Total synthesis of microcarpalide. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2873-2875.
- (174) (a) Corey EJ, Gras JL, Ulrico P. A new general method for protection of the hydroxyl function. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 809-812. (b) Ribes C, Falomir E, Murga J. Selective cleavage of acetals with ZnBr<sub>2</sub> in dichloromethane. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1239-1244. (c) Williams JR, Chai D, Bloxton JD, Solvibile GH. Synthesis of the aglycone of 26-O-deacetyl pavoninin-5. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3183-3188.
- (175) (a) Turki T, Villieras J, Amri H. An efficient synthesis of alkyl  $\alpha$ -(hydroxymethyl) acrylates induced by DABCO in an aqueous medium. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3071-3072. (b) Bruce HL, Joseph JP.  $\beta$ -(Trimethylsilyl)ethoxymethyl chloride. A new reagent for the protection of the hydroxyl group. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 3343-3346. (c) Stork G, Takahashi T. Chiral synthesis of prostaglandins (PGE<sub>1</sub>) from D-glyceraldehyde. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1275-1276. (d) Bulliard M, Heinz-Georg Z, Bernd G. Reversal of Diastereoselectivity in Reactions of Acyclic and Cyclic Radicals. *Synlett* **1991**, *1991*, 423-425.
- (176) Byun HSB, Reddy KC, Bittman R. Improved syntheses of ethyl  $\alpha$ -(bromomethyl)acrylate and 2-methylene-1,3-propanediol via ethyl  $\alpha$ -(hydroxymethyl)acrylate. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1371-1374.
- (177) Villieras J, Rambaud M. Wittig-Horner Reaction in heterogeneous media; an easy synthesis of ethyl  $\alpha$ -hydroxymethylacrylate and ethyl  $\alpha$ -halomethylacrylates using formaldehyde in water. *Synthesis* **1982**, *1982*, 924-926.
- (177) Villieras J, Rambaud M. Wittig-Horner Reaction in heterogeneous media; an easy synthesis of ethyl  $\alpha$ -hydroxymethylacrylate and ethyl  $\alpha$ -halomethylacrylates using formaldehyde in water. *Synthesis* **1982**, *1982*, 924-926.
- (178) Dursina B. *et al.* Identification and Specificity Profiling of Protein Prenyltransferase Inhibitors Using New Fluorescent Phosphoisoprenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2822-2835.
- (178) Dursina B. *et al.* Identification and Specificity Profiling of Protein Prenyltransferase Inhibitors Using New Fluorescent Phosphoisoprenoids. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2822-2835.
- (179) (a) Meyers AI, Collington EW. Facile and specific conversion of allylic alcohols to allylic chlorides without rearrangement. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 3044-3045. (b) Snyder EI. Conversion of allylic alcohols to chlorides without rearrangement. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 1466-1466.
- (179) (a) Meyers AI, Collington EW. Facile and specific conversion of allylic alcohols to allylic chlorides without rearrangement. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 3044-3045. (b) Snyder EI. Conversion of allylic alcohols to chlorides without rearrangement. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 1466-1466.
- (180) Moman E, Nicoletti D, Mouriño A. Strained polycycles by H<sup>5</sup>C<sup>5x</sup> free-radical cascades. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1249-1251.
- (181) Nilsson K, Vallés MJ, Castedo L, Mouriño A, Halkes SJ, van de Velde JP. Synthesis and biological evaluation of 18-substituted analogs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1855-1858.
- (182) (a) Araki S, Ito H, Butsugan Y. Indium in organic synthesis: indium-mediated allylation of carbonyl compounds. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1831-1833. (b) Chan TH, Lee M-C. Indium-mediated coupling of  $\alpha$ -(bromomethyl)acrylic acid with carbonyl compounds in aqueous media. concise syntheses of (+)-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid and N-acetylneuraminic acid. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4228-4232.
- (183) (a) Trost BM, Bonk PJ. Diastereoselective [3 + 2]-type heterocyclic synthesis via [2-(acetoxymethyl)-3-allyl]tri-n-butylstannane. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1778-1781. (b) Stork G, Poirier JM. 2-Substituted tetrahydrofurans of known absolute stereochemistry by ScN<sup>+</sup> chirality transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1073-1074.

- (186) H.C. Brown *Organic Synthesis via boranes* Wiley, New York, **1975**, pg 17
- (187) (a) Castedo L, Mascareñas JL, Mouriño A. An improved synthesis of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D A synthons. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2099-2102. (b) Snider BB, Vo NH, O'Neil SV, Foxman BM. Synthesis of ( $\pm$ )-Allocyathin B2 and (+)-Erinacine A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7644-7645.
- (188) Tsuda T, Hayashi T, Satomi H, Kawamoto T, Saegusa T. Methylcopper(I)-catalyzed selective conjugate reduction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds by di-iso-butylaluminum hydride in the presence of hexamethylphosphoric triamide. *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 537-540.
- (190) (a) Hatakeyama S, Satoh K, Sakurai K, Takano S. Efficient ester exchange reaction of phosphonoacetates. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2713-2716. (b) Page PCB, Moore JPG, Mansfield I, McKenzie MJ, Bowler WB, Gallagher JA. Synthesis of bone-targeted oestrogenic compounds for the inhibition of bone resorption. *Tetrahedron* **2001**, 57, 1837-1847.
- (191) Koole LH, Moody HM. Synthesis of phosphate-methylated DNA fragments using 9-fluorenylmethoxycarbonyl as transient base protecting group. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 1657-1664.
- (192) Tanaka K, Ohta Y, Fuji K, Taga T. Differentiation of enantiotopic carbonyl groups by the Horner-Wadsworth-Emmons reaction. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 4071-4074.
- (193) Brunel JM, Buono G. A new and efficient method for the resolution of 1,1'-binaphthalene-2,2'-diol. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7313-7314.
- (193) Brunel JM, Buono G. A new and efficient method for the resolution of 1,1'-binaphthalene-2,2'-diol. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 7313-7314.
- (194) Touchard FP. Phosphonate modification for a highly (*Z*)-selective synthesis of unsaturated esters by Horner-Wadsworth-Emmons olefination. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 9, 1790-1794.
- (195) Jurkauskas V, Buchwald SL. Dynamic Kinetic Resolution via Asymmetric Conjugate Reduction: Enantio- and Diastereoselective Synthesis of 2,4-Dialkyl Cyclopentanones. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2892-2893.
- (196) (a) Hughes G, Kimura M, Buchwald SL. Catalytic Enantioselective Conjugate Reduction of Lactones and Lactams. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11253-11258. (b) Lipshutz BH, Papa P. Copper-Catalyzed Reductive Alkylations of Enones: A Novel Transmetalation Protocol. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4355-4594.
- (198) Takai K, Nitta K, Utimoto K. Simple and selective method for aldehydes (RCHO)  $\rightarrow$  (*E*)-haloalkenes (RCH:CHX) conversion by means of a haloform-chromous chloride system. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108; 7408-7410.
- (199) Balczewski P, Mikolajczyk M. Phosphorus containing radicals. 1. Free radical reaction of  $\alpha$ -haloalkylphosphonates with alkenes and alkynes: a new approach to modified phosphonates. *Synthesis* **1995**, 4, 392-396.
- (200) Savignac P, Coutrot P. Preparation of 1,1-dibromoalkenes by halogen exchange. *Synthesis* **1976**, 3, 197-199.
- (201) Porskamp PAT, Lammerink Ben HM, Zwanenburg B. Synthesis and Reactions of Phosphoryl-Substituted Sulfines. *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 263-268.
- (202) (a) Andersen MW, Hildebrandt B, Köster G, Hoffmann RW. Stereoselective synthesis of alcohols, XXX: *E*- and *Z*-pentenylboronates, reagents for simple diastereoselection on addition to aldehydes. *Chem. Ber.* **1989**, 122, 1777-1782. (b) Wallace RH, William B. The in situ generation and use of iodomethyl lithium for the one-carbon homologation of boronic esters and epoxide formation from carbonyl compounds. *Synth. Comm.* **1995**, 25, 127-33. (c) Pergament I, Srebnik M. Arbuzov reaction of 1-iodoboronates as a means of preparing C1-bridged phosphonoboronates. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 3895-3898.
- (203) Matteson DS, Majumdar D.  $\alpha$ -Trimethylsilyl boronic esters. Pinacol lithio (trimethylsilyl) methaneboronate, homologation of boronic esters with [chloro(trimethylsilyl)methyl] lithium, and comparisons with some phosphorus and sulfur analogs. *Organometallics* **1983**, 2, 230-236.
- (207) Danishefsky SJ, Mantlo N. Total synthesis of ( $\pm$ )-heptelidic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110,

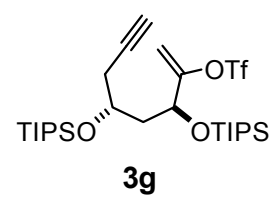
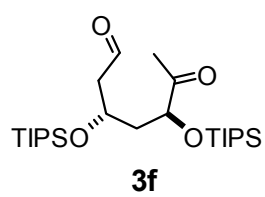
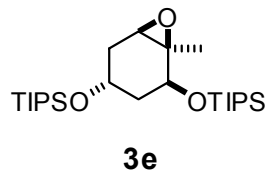
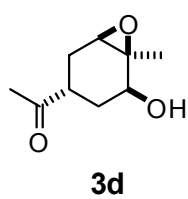
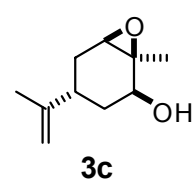
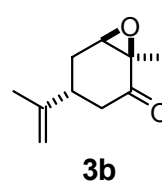
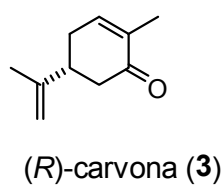
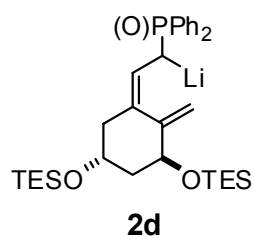
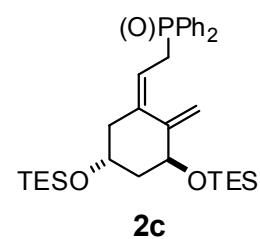
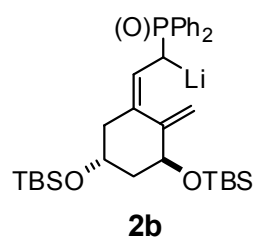
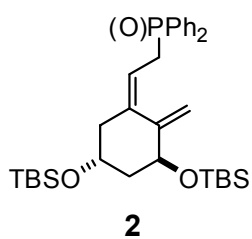
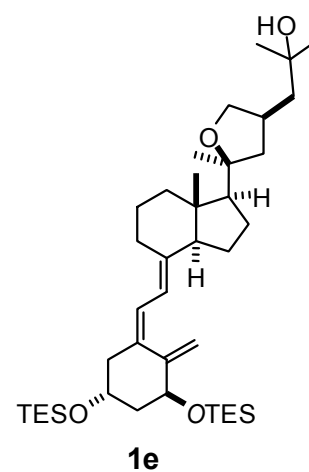
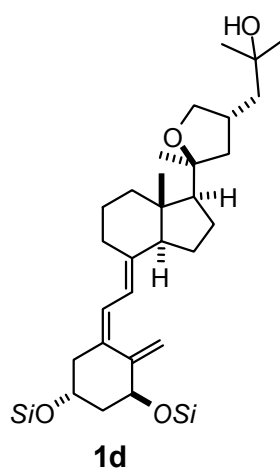
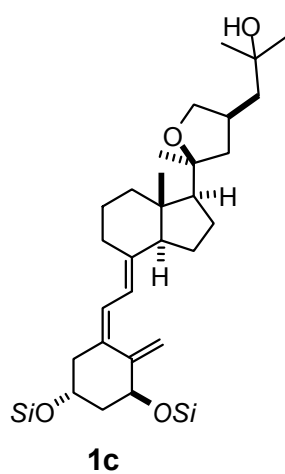
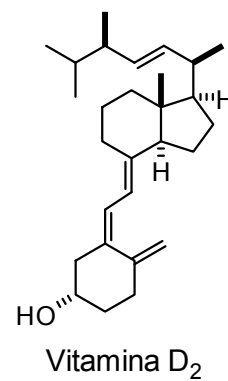
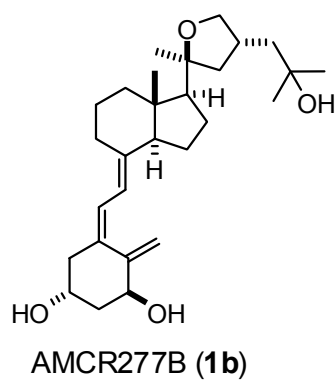
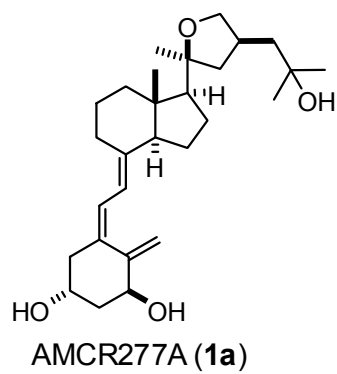
8129-8133.

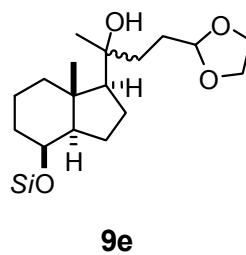
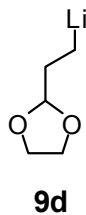
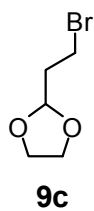
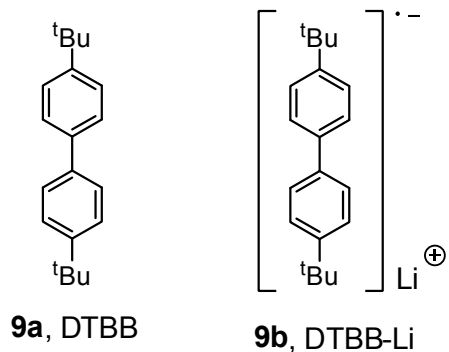
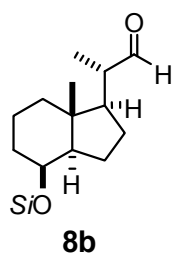
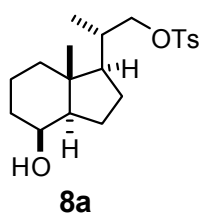
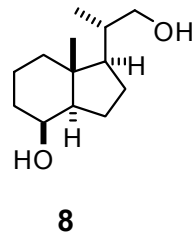
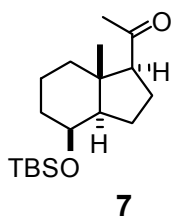
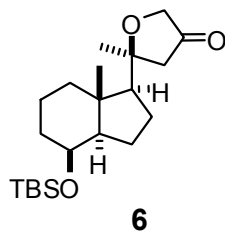
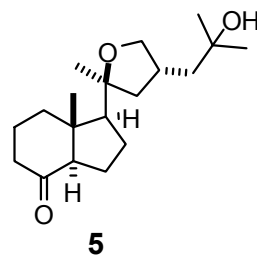
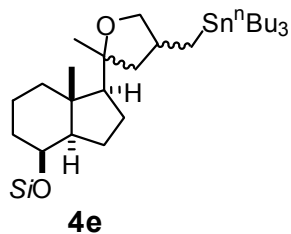
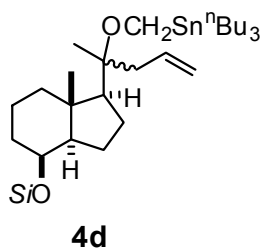
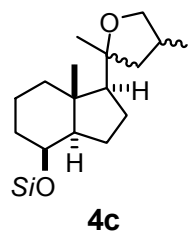
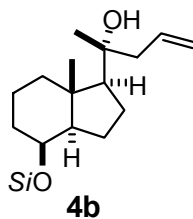
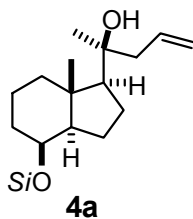
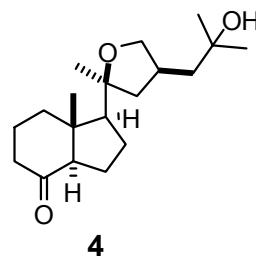
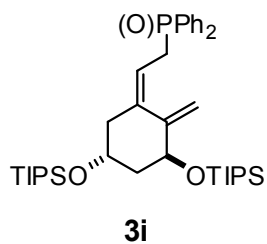
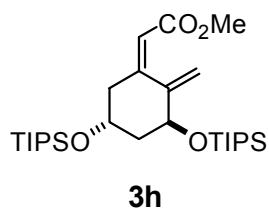
- (208) Bassetti M, D'Annibale A, Fanfoni A, Minissi F. Synthesis of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated 4,5-Disubstituted  $\gamma$ -Lactones via Ring-Closing Metathesis Catalyzed by the First-Generation Grubbs' Catalyst. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1805-1808.
- (209) Sascha B, Hans-Dieter G, Stefanie D, Wibke DE. Facile synthesis of substituted 2,3,4,7-tetrahydro-1H-azepines via ring-closing metathesis. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1777-1786.
- (210) Fürstner TA, Krause H. Flexible Synthesis of Metacycloprodigiosin and Functional Derivatives. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8281-8286.
- (211) Crimmins MT, Brown BH, Plake HR. An Intramolecular Diels-Alder Approach to the Eunicellins: Enantioselective Total Syntheses of Ophirin B and Astrogorin. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1371-1378.
- (212) Jue CX, Zheng ZH, Kang YL, Chi HY, Chu TC. An improved method for the resolution of 1,1'-binaphthalene-2,2'-diol via a phosphite using (-)-menthol as a resolving agent. *Phos. Sulf. Silic. and Rel. Elem.* **2002**, *177*, 189-193.
- (214) (a) Touchard FP. Phosphonate modification for a highly (*Z*)-selective synthesis of unsaturated esters by Horner-Wadsworth-Emmons olefination. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *9*, 1790-1794. (b) Tanaka K, Ohta Y, Fuji K, Taga T. Differentiation of enantiotopic carbonyl groups by the Horner-Wadsworth-Emmons reaction. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4071-4074.

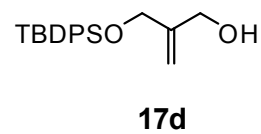
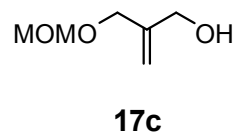
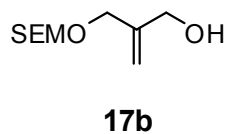
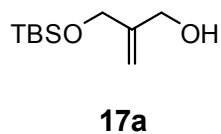
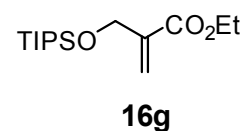
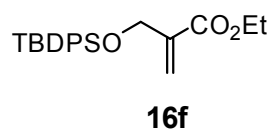
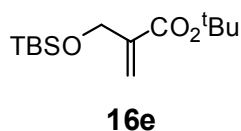
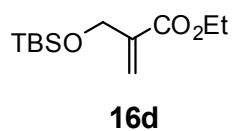
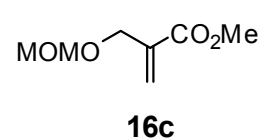
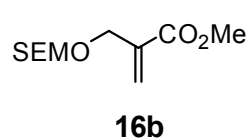
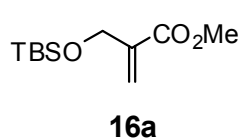
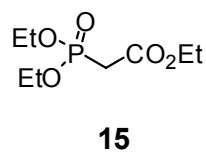
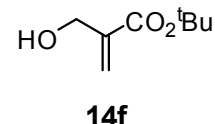
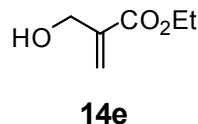
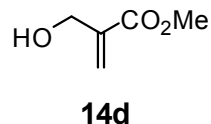
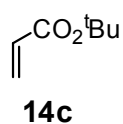
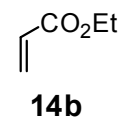
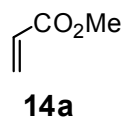
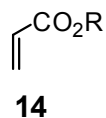
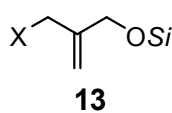
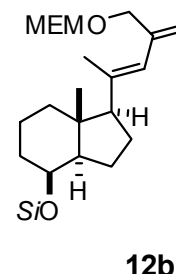
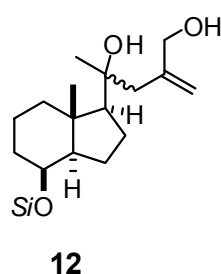
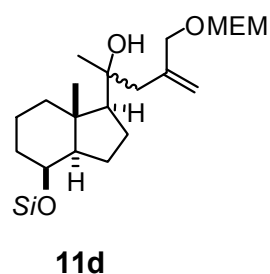
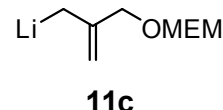
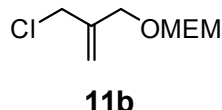
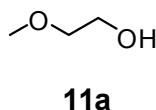
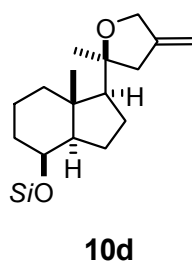
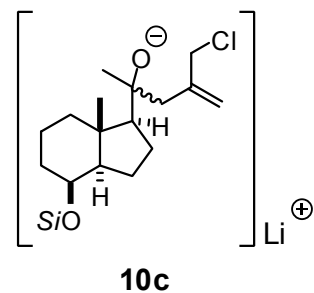
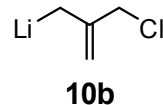
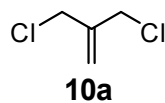
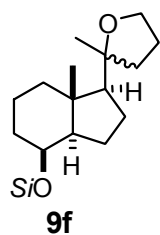


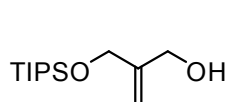
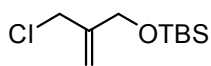
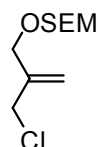
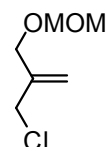
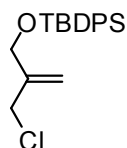
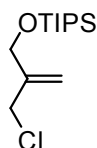
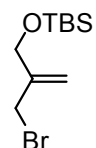
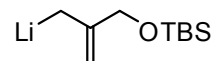
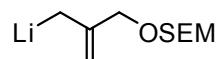
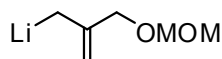
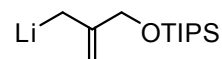
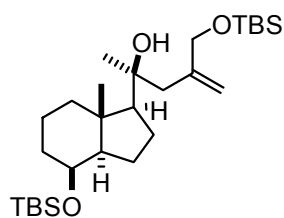
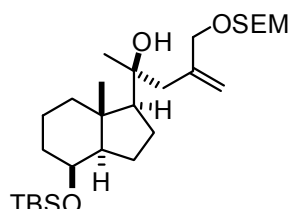
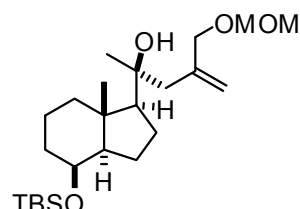
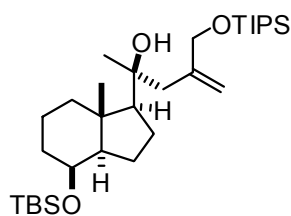
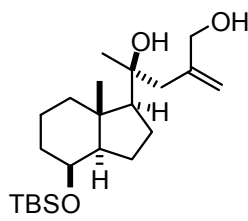
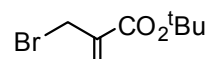
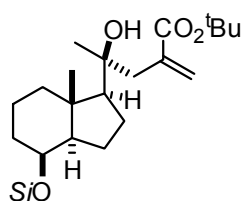
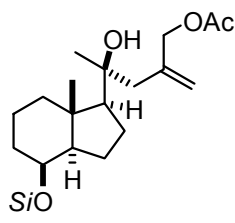
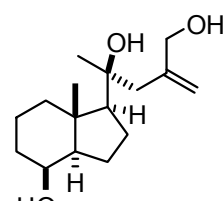
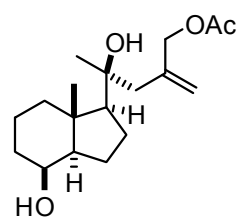
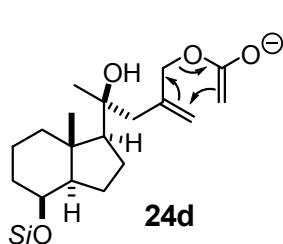
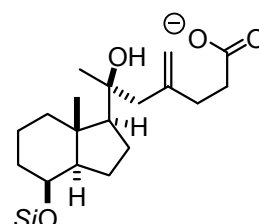
# **ÍNDICE DE ESTRUCTURAS**









**17e****18a****18b****18c****18d****18e****18f****19a****19b****19c****19e****20a****20b****20c****20e****21****22****23****24a****24b****24c****24d****24e**

