



# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

## TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

Síntesis de nuevos análogos del Calcitriol ( $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ )  
fósforo funcionalizados. Estudio de una nueva metodología para la  
formación del sistema triénico.

Evangelina Mascaró

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2011



## **PREFACIO**

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 10 de agosto de 2004 y el 20 de diciembre de 2011, bajo la dirección del Dr. Cristian Alejandro Vitale como Director, y el Dr. Gabriel Eduardo Radivoy como Director Adjunto.

Evangelina Mascaró



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .... / .... / ..... , mereciendo la calificación de .....(.....)



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas que de alguna u otra manera me acompañaron, contuvieron, animaron y/o contribuyeron al desarrollo de este trabajo, en especial

A mis directores de tesis Cristian y Gabriel

A mis compañeras de trabajo Yanina y Fabiana

A Olgui y a Vuano

A Vivi

A mi familia

A Sergio

Al Prof. Yagamare Fall y todo su grupo de trabajo

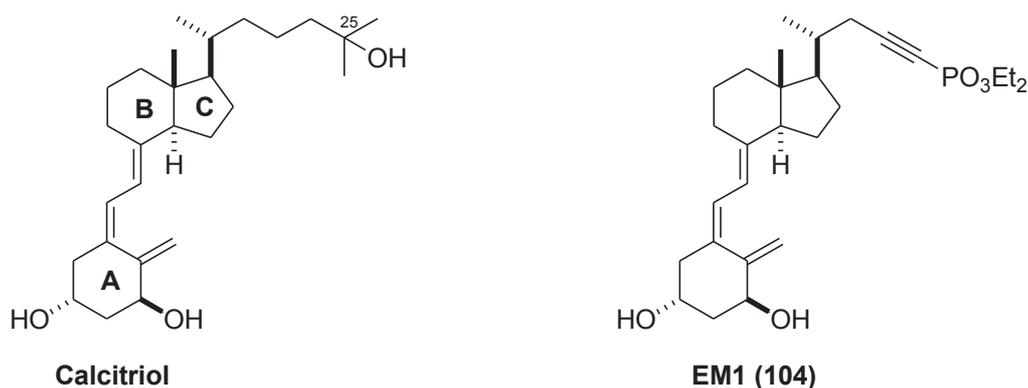
A los Dres. María Marta Facchinetti y Alejandro Curino, y su grupo de investigación

Y Finalmente, a la Secretaría General de Ciencia y Tecnología y Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas otorgadas, y al Departamento de Química.



## **RESUMEN**

En la presente Tesis Doctoral se describe la síntesis, caracterización y evaluación biológica de EM1, un nuevo tipo de análogo del Calcitriol, forma hormonal de la vitamina D<sub>3</sub>. EM1 presenta como principales características, una cadena lateral modificada como un alquínifosfonato que, restringe la libertad conformacional de la misma y limita la acción de la 24-hidroxilasa, responsable del catabolismo de dicha hormona. Además muestra una actividad biológica destacable ya que posee, por un lado, efectos antiproliferativos *in vitro* en varias líneas celulares cancerosas, y por otro, muestra ser selectivo ejerciendo su acción antiproliferativa sólo en la línea celular cancerosa de Sarcoma de Kaposi. Así mismo, en lo que se refiere a la actividad calcémica, principal limitación de los análogos con potencial aplicación terapéutica, EM1 no presentó efectos hipercalcemiantes *in vivo* en ratones, tanto en la dosis efectiva *in vitro* como en dosis superiores.

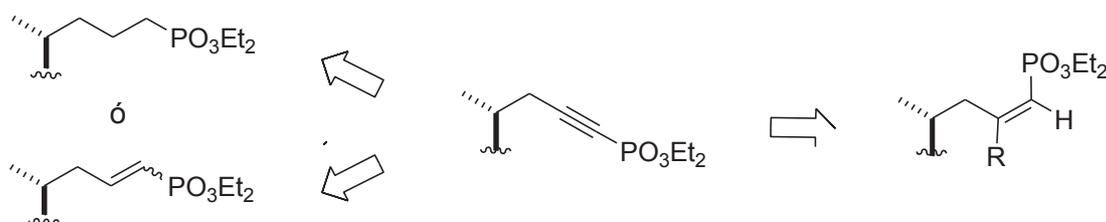


El perfil biológico relevante de EM1 fue evaluado en el Laboratorio de Biología Básica del Cáncer, dirigido por los Dres. María Marta Facchinetti y Alejandro Curino (INIBIBB, Bahía Blanca), donde se aborda además el estudio de los mecanismos de acción de dicho análogo así como ensayos en modelos animales de experimentación en cáncer.

Se describe la estrategia utilizada para la selección y construcción de la cadena lateral, tanto en su longitud como en la metodología con la que se incorpora la funcionalidad de fósforo. La cadena lateral se sintetiza en 5 pasos con un rendimiento global excelente (40%), y resulta ser un carbono más corta originando el triple enlace a través de métodos reproducibles y con buenos rendimientos; como ser la reacción de Corey-Fuchs para generar el alquínifosfonato que emula la posición C25 del calcitriol. Por otra parte, se detallan los métodos elegidos para la preparación de los precursores del biciclo CD, como el diol de Inhoffen y del óxido de fosfina correspondiente al anillo A, así como el tipo de acoplamiento que permite construir el sistema triénico de dicho análogo a través de la

reacción de Wittig-Horner, constituyendo un método eficiente y convergente para la síntesis de este tipo de análogos.

Se estudiaron modificaciones estructurales sobre el sistema del alquililfosfonato, mediante reacciones de reducción y de carbocupración en presencia o ausencia del sistema triénico, con el propósito de evaluar la posibilidad de generar bibliotecas de análogos que permitan realizar estudios que relacionen estructura con actividad.



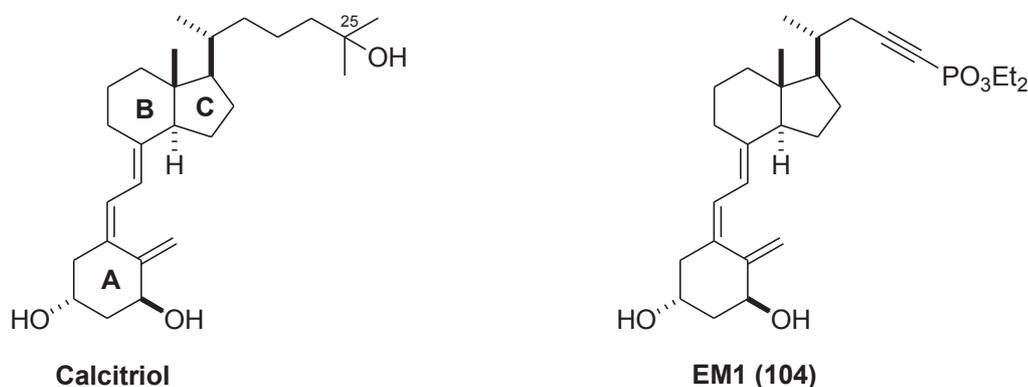
Por otra parte, se describen los estudios realizados para encontrar nuevas herramientas sintéticas que permitan acceder a las subunidades de la vitamina D, como ser el sistema triénico o la cadena lateral, empleando nanopartículas metálicas. En particular, las nanopartículas de titanio generadas a través del sistema  $\text{TiCl}_4\text{-Li-areno}(\text{cat.})$ , resultan ser eficientes en reacciones de homoacoplamiento de compuestos carbonílicos, permitiendo obtener sistemas olefínicos cíclicos, alicíclicos, y poliolefínicos conjugados. La metodología empleada presentó limitaciones en los acoplamientos cruzados para una serie de compuestos carbonílicos, por lo que no pudo aplicarse en forma directa para la construcción del sistema triénico de la vitamina.

Finalmente, se describe la cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos terminales catalizada por nanopartículas de cobre preparadas in situ a través del sistema  $\text{CuCl}_2\text{-Li-areno}(\text{cat.})$ , para rendir 1,2,3-triazoles con excelente regioselectividad. Este sistema fue aplicado exitosamente para el desarrollo de una nueva metodología que permite incorporar un triazol y un fosfonato, constituyendo un nuevo tipo de cadena lateral híbrida. El amplio espectro de aplicación, las condiciones suaves de reacción y la purificación sencilla de los productos de reacción, cubren los requerimientos de la denominada *click chemistry*, una herramienta sumamente útil en química medicinal.



**ABSTRACT**

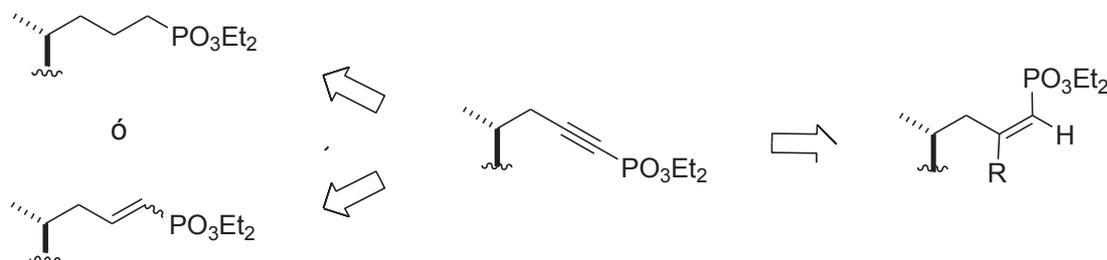
In the present Doctoral Thesis, the design and synthesis of EM1, a new calcitriol analog, as well as the study of its biological activity is described. EM1 presents as main structural features a modified alkynylphosphonate side chain that both restricts its conformational freedom and limits the activity of 24-hydroxylase, the enzyme that initiates calcitriol catabolism. EM1 exhibits remarkable biological activity, having in vitro antiproliferative effects in several cancer cell lines, as well as selective antiproliferative effect on Kaposi's sarcoma cells. Furthermore, EM1 analog was evaluated for hypercalcemic activity, the major side effect that hampered the therapeutic application of many vitamin D analogues, showing lack of calcemic activity in vivo, even at doses higher than the in vitro effective dose.



The relevant biological profile of this novel analog was evaluated at the Laboratorio de Biología Básica del Cáncer, under the direction of Dr. Facchinetti, M. M. and Dr. Curino, A. (INIBIBB, Bahía Blanca), where is undertaken the study of the mechanisms of action of EM1 as well as different tests using animal models for cancer research.

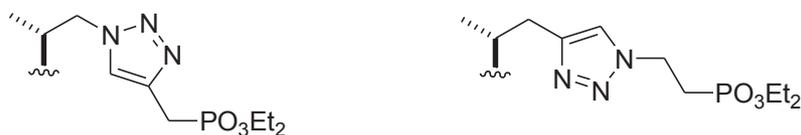
The strategy utilized for the choice and construction of the side chain is described. The length of the side chain is one carbon atom shorter, and the C-C triple bond is created through reproducible methods and in good yields, as in the case of the Corey-Fuchs reaction utilized to generate the alkynylphosphonate which emulates the C25 position of the calcitriol. The synthesis of afore mentioned fragment is achieved after five steps with excellent overall yield of 40%. On the other hand, the chosen methods for the synthesis of CD-ring precursors, as well as the Inhoffen diol and the A-ring phosphine oxide are detailed. It is also described the convergent Wittig-Horner coupling reaction employed for the construction of the triene system of this analog, which proceeds under mild conditions and with good yields.

The structural modifications on the alkynylphosphonate moiety were studied by reduction and carbocupration reactions, both in the presence and in the absence of the triene system, with the goal of generating small libraries of analogues to carry out structure-activity studies.



On the other hand, it is described the development of new synthetic tools to approach the vitamin D main subunits, based on the use of metal nanoparticles (NPs). For example, titanium nanoparticles generated in situ from the  $\text{TiCl}_4\text{-Li-arene}(\text{cat.})$  system, showed to be effective in the homocoupling of a series of carbonyl compounds leading to the corresponding cyclics and alicyclic alkenes, as well as conjugated polyolefin products. The main drawback of this methodology being the poor selectivity in the corresponding cross-coupling reactions, making it impossible to be applied for the construction of the vitamin D triene system.

Finally, it is described the application of the 1,3-dipolar cycloaddition reaction between azides and terminal alkynes catalysed by in situ generated CuNPs from the  $\text{CuCl}_2\text{-Li-arene}(\text{cat.})$  system, which led to the corresponding 1,2,3-triazoles with excellent yield and regioselectivity. This reactive system was successfully applied in the development of a new methodology to incorporate a triazole and a phosphonate unit, building a new type of hybrid side chain. The remarkable advantages of this new methodology, such as its wide applicability, mild reaction conditions and simple purification of the reaction products; fulfil the requirements of the click chemistry, an extremely useful tool in medicinal chemistry.



---

## ABREVIATURAS

---

**AcOH:** Ácido acético  
**AcOEt:** Acetato de etilo  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**ARN:** Ácido ribonucleico  
**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero  
**Ar:** Arilo  
**ATP:** Adenosin trifosfato  
**Bu:** Butilo  
***n*-BuLi:** *n*-Butil litio  
**c:** Cuadruplete  
**CG-EM:** Cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas  
**CoA:** Coactivadores  
**CoR:** Corepresores  
**δ:** Desplazamiento químico en ppm  
**d:** Doblete  
**dd:** Doble doblete  
**DBP:** Proteína de transporte de la vitamina D  
**DIBAL-H:** Hidruro de diisobutilaluminio  
**DME:** 1,2-Dimetoxietano  
**DMF:** N,N-Dimetilformamida  
**DMPA:** 4-N,N-Dimetilaminopiridina  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**DTBB:** 4,4'-di-*tert*-butilbifenilo  
**eq.:** Equivalentes  
**EDX:** Espectrometría de Dispersión de energía de Rayos X  
**EM:** Espectrometría de masas  
**FGF23:** Factor de crecimiento fibroblástico 23  
**g:** Gramo  
**h:** Horas  
**Hex:** Hexano  
**HRMS:** Espectrometría de masas de alta resolución  
**Hz:** Hertzio  
***i*-PrOH:** Isopropanol  
***J*:** Constante de acoplamiento en Hz  
**LDA:** Diisopropilamido de litio  
**LVT:** Titanio en bajo estado de valencia  
**m:** Multiplete  
**M:** Molar  
**μL:** Microlitro  
**min:** Minutos  
**mL:** Mililitro  
**mmol:** Milimol

**m/z:** Relación masa/carga  
**nm:** Nanómetro  
**NOE:** Efecto Nuclear Overhauser  
**NPs:** Nanopartículas  
**p.:** Página  
**PDC:** Dicromato de piridinio  
**ppm:** Partes por millón  
**PPTS:** *p*-toluensulfonato de piridinio  
**PTH:** Hormona paratiroidea  
**R<sub>f</sub>:** Factor de retención  
**<sup>13</sup>C-RMN:** Resonancia magnética nuclear de carbono 13  
**<sup>1</sup>H-RMN:** Resonancia magnética nuclear de protón  
**<sup>31</sup>P-RMN:** Resonancia magnética nuclear de fósforo 31  
**Rto.:** Rendimiento  
**RXR:** Receptor del ácido 9-cis-retinoico  
**s:** Singulete  
**t:** Triplete  
**t:** Tiempo  
**t.a.:** Temperatura ambiente  
**TBAF:** Fluoruro de tetrabutilamonio  
**TBSCI:** Cloruro de *tert*-butildimetilsililo  
**TEM:** Microscopia Electrónica de Transmisión  
**TESCI:** Cloruro de trietilsililo  
**THF:** Tetrahidrofurano  
**TLC:** Cromatografía en capa fina  
***p*-TsCl:** Cloruro de *p*-toluensulfonilo  
**UV:** Ultravioleta  
**VDR:** Receptor nuclear de la vitamina D  
**VDREs:** Elementos de respuesta de la vitamina D

<b>RESUMEN/ABSTRACT</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>V</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 VITAMINA D: estructura y nomenclatura.</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Metabolismo de la vitamina D<sub>3</sub>.</b>	<b>7</b>
1.2.1 Bioactivación de la vitamina D <sub>3</sub> .	8
1.2.2 Degradación de la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D <sub>3</sub> .	10
1.2.3 Regulación de la hormona calcitriol.	12
1.2.4 Transporte en sangre de la hormona.	13
<b>1.3 Mecanismo de acción de la hormona 1<math>\alpha</math>,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.</b>	<b>14</b>
1.3.1 Mecanismo genómico.	15
1.3.1.1 Receptor de la Vitamina D (VDR)	16
1.3.1.2 Mecanismo molecular de transcripción.	18
1.3.2 Mecanismo no genómico.	20
<b>1.4 Acciones fisiológicas y usos terapéuticos de la hormona y sus análogos.</b>	<b>23</b>
1.4.1 Acción de la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D <sub>3</sub> sobre la homeostasis del calcio.	24
1.4.1.1 Hiperparatiroidismo secundario (HPT 2) en enfermedad crónica de riñón.	28
1.4.1.2 Osteoporosis.	30
1.4.2 Acción de la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D <sub>3</sub> sobre el sistema inmunológico.	31
1.4.2.1 Enfermedades Autoinmunes.	32
1.4.2.2 Transplante de órganos y tejidos.	33
1.4.3 Vitamina D y el cáncer.	33
1.4.3.1 Cáncer de Mama.	34
1.4.3.2 Cáncer de Próstata.	36
1.4.3.3 Cáncer de Colon.	37
1.4.4 Mecanismos de Selectividad.	38
<b>1.5 Síntesis de análogos de la vitamina D.</b>	<b>40</b>
1.5.1 Ruta Biomimética.	43
1.5.2 Rutas convergentes. Formación del sistema triénico	45
1.5.2.1 Acoplamiento de Wittig-Horner.	45
Síntesis de cetonas tipo Grundmann.	46
Síntesis del Óxido de Fosfina.	48
1.5.2.2 Ruta dienínica.	52
1.5.2.3 Ruta de acoplamiento-ciclación catalizada por Pd(0).	53
1.5.3 Otras estrategias.	55
1.5.3.1 Acoplamiento por olefinación de Julia.	55
1.5.3.2 Modificación directa de la vitamina D y sus análogos.	56
<b>2. OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO</b>	<b>59</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>63</b>
<b>3.1 Síntesis de análogos fosfónicos del calcitriol.</b>	<b>65</b>

3.1.1	Antecedentes.	65
3.1.2	Planeamiento sintético	66
3.1.2.1	Síntesis del diol de Inhoffen-Lythgoe.	69
3.1.2.2	Construcción y funcionalización de la cadena lateral.	71
3.1.2.3	Síntesis de la cetona tipo Grundmann 102.	79
3.1.2.4	Construcción del sistema triénico.	83
3.1.2.5	Síntesis de derivados de alquini fosfonatos por carbocupación.	85
3.1.2.6	Síntesis de derivados de alquini fosfonatos por hidrogenación catalítica.	93
3.1.3	Ensayos biológicos del análogo 104 (EM1).	96
3.1.3.1	Evaluación del efecto antiproliferativo <i>in vitro</i> .	97
3.1.3.2	Evaluación del efecto hipercalcémico <i>in vivo</i> .	100
<b>3.2</b>	<b>Aplicación de nuevas metodologías sintéticas en el campo de la vitamina D basadas en la utilización de nanopartículas metálicas.</b>	<b>102</b>
3.2.1	Antecedentes.	102
3.2.2	Reacciones de acoplamiento tipo McMurry promovidas por nanopartículas de titanio.	104
3.2.2.1	Homoacoplamiento reductivo de compuestos carbonílicos.	107
3.2.2.2	Acoplamiento cruzado entre compuestos carbonílicos $\alpha,\beta$ -insaturados y alifáticos.	111
3.2.3	Reacciones de cicloadición promovidas por nanopartículas de cobre para la síntesis de los triazolilfosfonatos 135 y 138.	116
3.2.3.1	Síntesis del triazolilfosfonato 135.	124
3.2.3.2	Síntesis del triazolilfosfonato 138.	126
<b>4.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>131</b>
<b>4.1</b>	<b>PROCEDIMIENTOS GENERALES.</b>	<b>133</b>
4.1.1	Solventes y reactivos.	133
4.1.2	Cromatografía.	134
4.1.3	Instrumentos y equipos.	134
4.2	Síntesis de Des-A,B-23,24-dinorcolan-8 $\beta$ ,22-diol (diol de Inhoffen-Lythgoe) (21).	136
4.3	Síntesis de (3 $\beta$ ,5Z,7R,8 $\alpha$ ,22E)-9,10-secoergosta-5,10(19),22-trien-3,7,8-triol (74).	137
4.4	Síntesis de (3 $\beta$ ,5Z,7R,8 $\alpha$ ,22E)-3-( <i>tert</i> -butildimetilsililoxi)-9,10-secoergosta-5,10(19),22-trien-7,8-diol (75).	138
4.5	Síntesis de (24R, 22E)-Des-A,B-ergost-22-en-8 $\beta$ -ol (76) y (S,Z)-2-[5'-( <i>tert</i> -butildimetilsililoxi)-2'-metilenciclohexiliden] etanol (28).	139
4.5.1	(S,Z)-2-[5'-( <i>tert</i> -butildimetilsililoxi)-2'-metilenciclohexiliden] etanol (28).	139
4.5.2	(24R, 22E)- Des-A,B-ergost-22-en-8 $\beta$ -ol (76).	140
4.6	Síntesis de (24 R, 22 E)- Des- A,B-8 $\beta$ - ( <i>tert</i> -butildimetilsililoxi)-ergost-22-eno (77).	141
4.7	Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -( <i>tert</i> -butildimetilsililoxi)-23,24-dinorcolan-22-ol (78a).	142
4.8	Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ ,22-di(trietilsililoxi)-23,24-dinorcolano (95).	143
4.9	Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(trietilsililoxi)-23,24-dinorcolan-22-ol (78b).	144
4.10	Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(trietilsililoxi)-22-tosiloxi-23,24-dinorcolano (96b).	145
4.11	Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(trietilsililoxi)-22-ciano-23,24-dinorcolano (97b).	146
4.12	Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(trietilsililoxi)-24-norcolan-23-al (98b).	147
4.13	Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(trietilsililoxi)-24,24-dibromo-23-coleno (99b).	148

4.14 Síntesis de (Des-A,B-8 $\beta$ -trietilsililoxi-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo (100b).	149
4.15 Síntesis de (Des-A,B-8 $\beta$ -hidroxi-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo (101).	150
4.16 Síntesis de (Des-A,B-8-oxo-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo (102).	151
4.17 Síntesis de [(5Z,7E)-(1S,3R)-1,3bis-1,1-dimethylethyl]dimethylsililoxi-9,10-secocola-5,7,10(19)-trien-23-in-24-il] fosfonato de dietilo (103).	152
4.18 Síntesis de [(5Z,7E)-(1S,3R)-1,3-dihidroxi-9,10-secocola-5,7,10(19)-trien-23-in-24-il] fosfonato de dietilo (104).	154
4.19 Reacción de carbocupración del alquiniilfosfonato 100b.	155
4.20 Reacción de carbocupración del alquiniilfosfonato 94a.	156
4.21 Reducción de los alquiniilfosfonatos 94a y 101. Método general:	157
4.21.1 Reducción del (4,8-dimetil-7-nonen-1-inil)fosfonato de dietilo (94a).	157
4.21.2 Reducción del alquiniilfosfonato de dietilo 101.	159
4.22 Síntesis de 2-bromoetilfosfonato de dietilo (123).	160
4.23 Síntesis de 2-azidoetilfosfonato de dietilo (124).	161
4.24 Síntesis de 2-propinilfosfonato de dietilo (121).	162
4.25 Síntesis de los triazoles 126, 128a y 130b.	163
4.25.1 Procedimiento general para la preparación de las nanopartículas de cobre (NPsCu).	163
4.25.2 Procedimiento general para la reacción de cicloadición.	163
4.25.2.1 2-(4-butil-1,2,3-triazol-1-il)etilfosfonato de dietilo (126).	163
4.25.2.2 (1-bencil-1,2,3-triazol-4-il)metanol (130a).	164
4.25.2.3 (1-octil-1,2,3-triazol-4-il)metanol (130b).	165
4.26 Síntesis de (1-bencil-1,2,3-triazol-4-il)metilfosfonato de dietilo (128a).	166
4.27 Síntesis de (1-octil-1,2,3-triazol-4-il)metilfosfonato de dietilo (128b).	167
4.28 Síntesis de 4-(iodometil)-1-octil-1,2,3-triazol (132b).	168
4.29 Síntesis de 4-(bromometil)-1-octil-1,2,3-triazol (131b).	168
4.30 Síntesis de Dimetil (1-octil-1,2,3-triazol-4-il)metilfosfonato (133).	170
4.31 Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -trietilsililoxi-23-colino (134).	171
4.32 Síntesis de 2-[4-(Des-A,B-8 $\beta$ -trietilsililoxi-23,24-dinorcolanil)-1,2,3-triazol-1-il] etilfosfonato de dietilo (135).	172
4.33 Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -trietilsililoxi-22-azido-23,24-dinorcolano (136).	173
4.34 Síntesis de [1-(Des-A,B-8 $\beta$ -trietilsililoxi-23,24-dinorcolanil)-1,2,3-triazol-4-il]metanol (137).	174
4.35 Síntesis de [1-(Des-A,B-8 $\beta$ -trietilsililoxi-23,24-dinorcolanil)-1,2,3-triazol-4-il] metilfosfonato de dietilo (138).	175
4.36 Acoplamiento McMurry. Reacción de olefinación de compuestos carbonílicos $\alpha,\beta$ -insaturados y alifáticos promovida por nanopartículas de titanio.	176
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>177</b>
<b>APÉNDICES</b>	<b>181</b>
Publicaciones originadas en la presente Tesis	183
Índice de compuestos	187
Selección de espectros	191





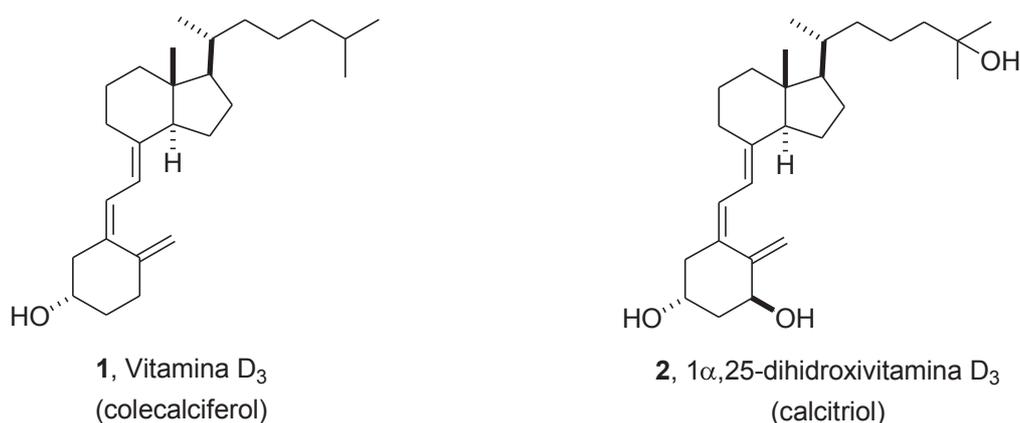


# 1. INTRODUCCIÓN

---



En el siglo pasado, uno de los descubrimientos más importantes en la investigación en el campo de la vitamina D fue la apreciación de que la vitamina D<sub>3</sub> representa sólo un precursor de su forma biológicamente activa, la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>. El descubrimiento de los dos pasos de activación metabólica de dicha vitamina hacia su forma hormonalmente activa, determinó el camino para la elucidación del rol de la vitamina D en los eventos fisiológicos involucrados en la homeostasis del calcio y del fósforo.

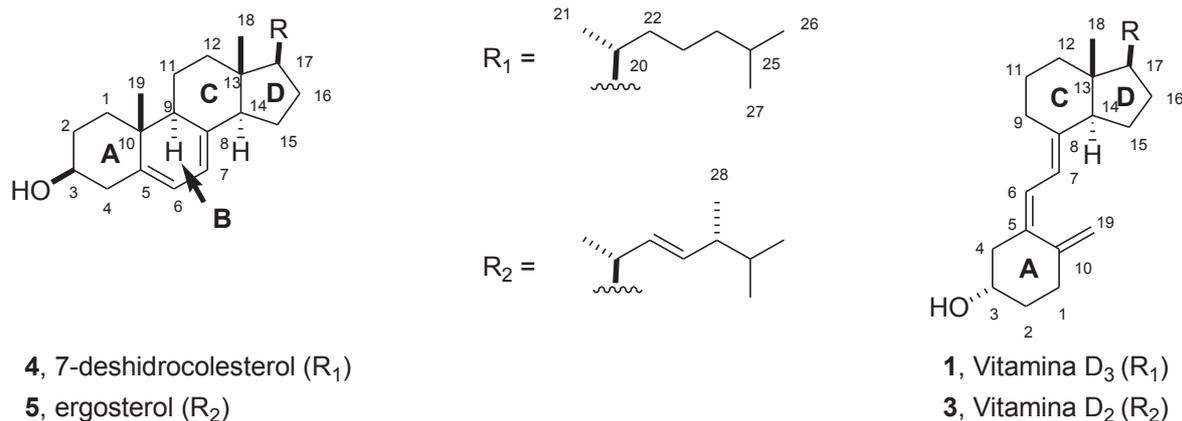


**Figura 1.** Estructura de la vitamina D<sub>3</sub> y de su forma activa la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (Calcitriol).

La comprensión de la importancia de los metabolitos de la vitamina D, puso el foco de atención sobre los eventos moleculares circundantes al mecanismo de acción de la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, hecho que impulsó el descubrimiento del receptor de la vitamina D (VDR) y su maquinaria transcripcional dentro de las células blanco. Subsecuentemente, esto permitió la demostración de nuevas acciones biológicas de la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, en particular, sus efectos en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular de ciertos tipos de células, los cuales implican la intervención de la vitamina D de una manera que nadie había imaginado, incluso al momento de ser descubierta su forma hormonalmente activa. Además de esto, el conocimiento del metabolismo de la vitamina D impulsó también el estudio de la regulación de las enzimas del citocromo P450 involucradas en dichos procesos. Esta serie de descubrimientos estimuló la síntesis química de una amplia variedad de análogos de esta vitamina, con la expectativa de poder intervenir y modular alguno de estos procesos, en particular, aquellos que estuvieran relacionados con desordenes o enfermedades hiperproliferativas, como el cáncer, la psoriasis y otras.

## 1.1 VITAMINA D: estructura y nomenclatura.

Durante la década 1930-1940 se determinó la estructura química de la vitamina D, identificándose dos estructuras distintas, la vitamina D<sub>3</sub> ó colecalfiferol (**1**)<sup>1</sup> y la vitamina D<sub>2</sub> ó ergocalciferol (**3**).<sup>2</sup> Las mismas se obtuvieron al irradiar con luz ultravioleta los precursores esteroidales 7-deshidrocolesterol (**4**) y ergosterol (**5**), respectivamente (**Figura 2**).



**Figura 2.** Estructura de la vitamina D<sub>2</sub>, vitamina D<sub>3</sub> y de sus precursores esteroides.

A efectos de la nomenclatura las vitaminas D se consideran como *seco*-B esteroides, ya que su esqueleto proviene de la ruptura de un anillo del núcleo esteroidal, en particular para este caso del enlace C9-C10 correspondiente al anillo B del esteroide precursor. La numeración original del esteroide se mantiene en la vitamina D y sus metabolitos, conservando además la denominación  $\alpha$  ó  $\beta$  para los grupos situados por debajo y por encima del plano de los anillos, respectivamente, de acuerdo a la orientación de los mismos en el esteroide precursor.<sup>3</sup> Sin embargo, dado que la denominación esteroidal  $\alpha$  ó  $\beta$  puede resultar confusa, la IUPAC recomienda utilizar la convención *R/S* para indicar la estereoquímica de los sustituyentes del anillo A, así como el sistema *Z/E* para indicar la geometría de los enlaces dobles. Además, de acuerdo a dichas recomendaciones, las vitaminas D y sus derivados pueden nombrarse según la nomenclatura sistemática esteroidal o utilizando nombres triviales, según lo requiera la complejidad de la estructura.<sup>4</sup> En la **Tabla 1** se muestran algunos ejemplos.

<sup>1</sup> Brockmann, H. *Physiol. Chem.* **1936**, 241, 104-115.

<sup>2</sup> Windaus, A.; Linsert, O.; Luttringhaus, A.; Weidlinch, G. *Justis. Liebigs. Ann. Chem.* **1932**, 492, 226-231.

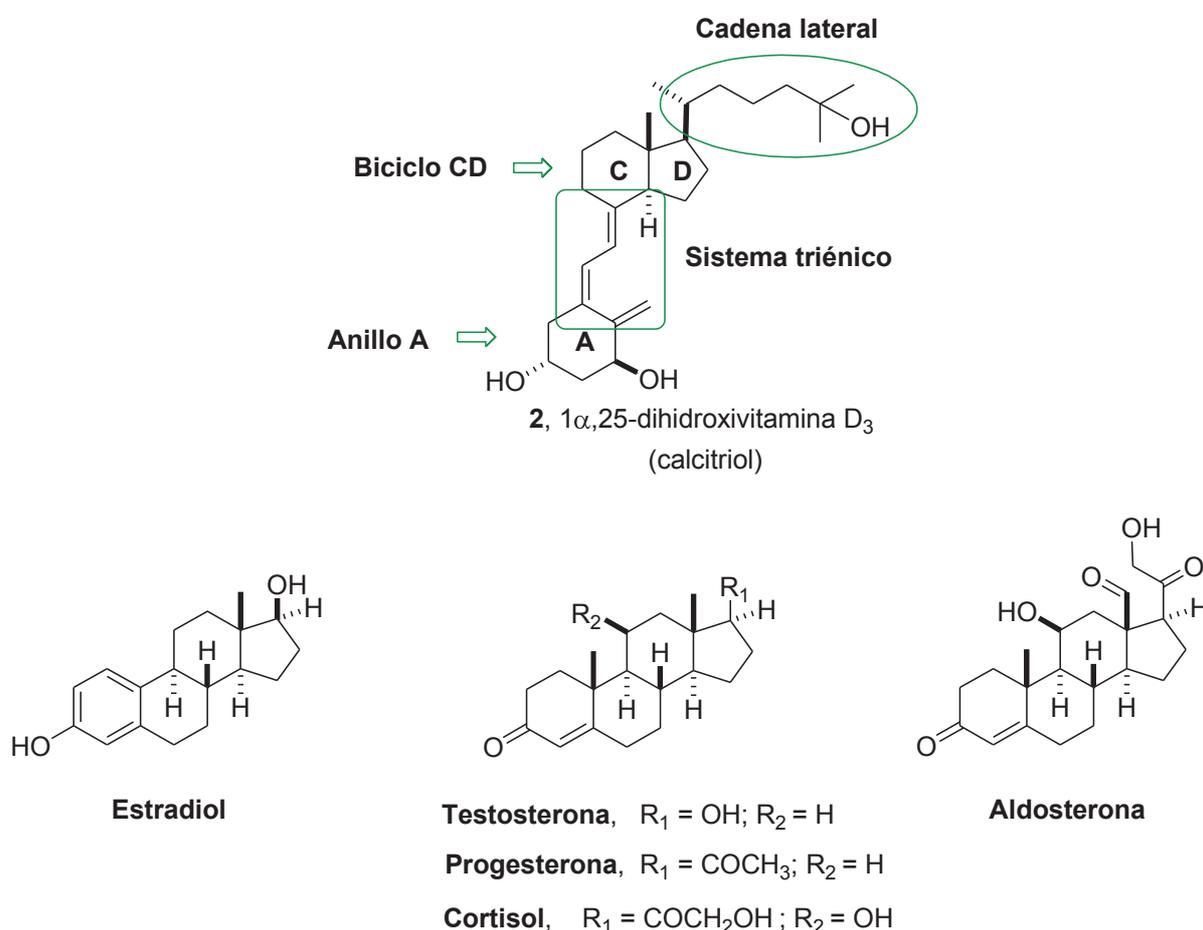
<sup>3</sup> IUPAC-IUB (JCBN), *Pure Appl. Chem.* **1989**, 61, 1783-1822. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/steroid>.

<sup>4</sup> IUPAC-IUB (JCBN), *Pure Appl. Chem.* **1982**, 54, 1511. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/D.html>.

Tabla 1. Nomenclatura para compuestos de la vitamina D.

Nombre trivial (recomendado)	Nombre esteroidal sistemático
Colecalciferol ó Calcíol	(5Z,7E)-(3S)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trien-3-ol
Calcitriol	(5Z,7E)-(1S,3R)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trien-1,3,25-triol
Ergocalciferol ó Ercalcíol	(5Z,7E,22E)-(3S)-9,10-secoergosta-5,7,10(19),22-teraen-3-ol

Desde el punto vista estructural, en la vitamina D y sus metabolitos, se pueden diferenciar cuatro partes: un sistema rígido central formado por el biciclo CD, con una fusión de tipo *trans*-hidrindánica, al cual están unidas dos partes más flexibles, la cadena lateral y el dieno *s-trans* procedente del anillo *seco*-B; el cual conforma con el doble enlace exocíclico del anillo A un sistema triénico, y por último, el mencionado anillo A. Esta división puede apreciarse claramente en la **Figura 3**.



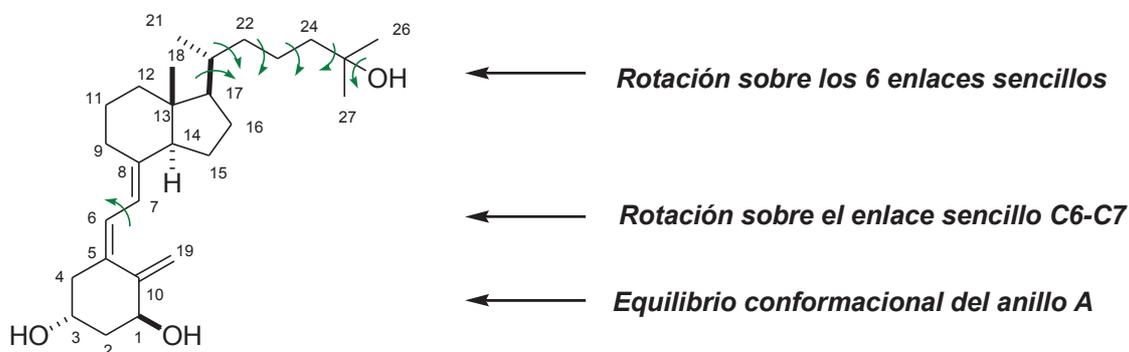
**Figura 3.** Estructura de la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y otras hormonas esteroideas.

De acuerdo a la estructura y al modo de acción del metabolito hormonalmente activo de la vitamina D<sub>3</sub>, la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> se clasifica en la misma familia que las hormonas esteroideas clásicas, tales como el estradiol, testosterona, progesterona, cortisol

y aldosterona, entre otros (**Figura 3**). Sin embargo, presenta tres características estructurales que lo diferencian:

1. Posee una cadena lateral con 8 carbonos mientras que las hormonas esteroideas clásicas no tienen cadena lateral o, si la tienen, consta únicamente de dos carbonos.
2. Es un *seco*-esteroide, es decir, presenta uno de los anillos de la estructura cicloperhidrofenantrénica abierto (enlace C9-C10).
3. Presenta una flexibilidad inusual en su estructura con respecto a las hormonas esteroideas clásicas, que lo hace conformacional y constitucionalmente dinámico.

Los aspectos estructurales que contribuyen a la mencionada flexibilidad conformacional y constitucional de la vitamina D<sub>3</sub> y sus metabolitos, resumidos en la **Figura 4**, se comentan a continuación:<sup>5</sup>

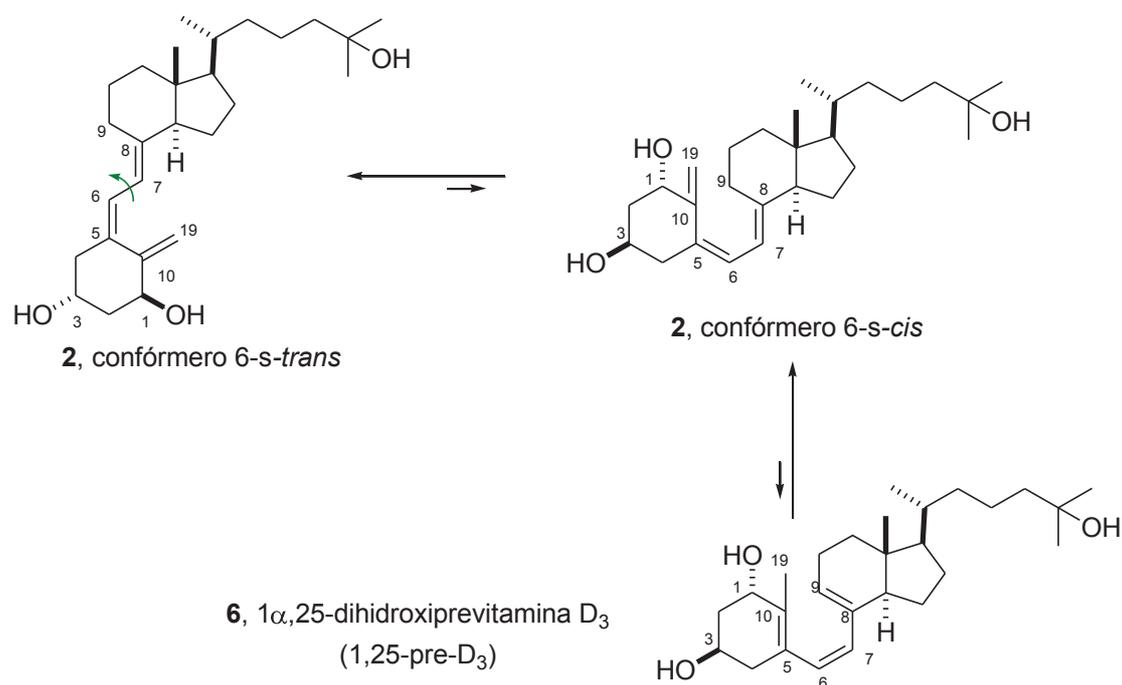


**Figura 4.** Aspectos estructurales de la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> que contribuyen a su flexibilidad conformacional.

- 3a. La rotación libre a lo largo de los 6 enlaces sencillos de la cadena lateral, constituida por ocho carbonos y un hidroxilo en posición C25, genera un número elevado de posibles conformaciones ( $3^6 = 729$ , **Figura 4**). Los cálculos usando mecánica molecular realizados para definir la orientación más estable de la cadena lateral, indican que hay 394 conformeros cuya energía se encuentra dentro de las 4 kcal/mol con respecto al mínimo global de energía. La cadena lateral es entonces la unidad estructural más flexible de la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.
- 3b. El enlace simple C6-C7 permite la rotación sin restricción para generar un continuo de rotámeros entre las dos conformaciones planas extremas, la conformación 6-*s-trans* y la conformación 6-*s-cis* (**Figura 5**). Aunque se carece de evidencia concreta sobre el isómero conformacional 6-*s-cis*, su existencia está fuertemente respaldada por el hecho que la isomerización hacia la forma previtamínica (6, Pre-1,25-D<sub>3</sub>) vía el

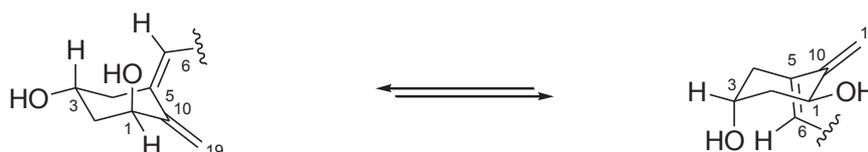
<sup>5</sup> (a) Okamura, W.; Midland, M. M.; Hammond, M. W.; Abd.Rahman, N.; Dormanen, M. C.; Nemere, I.; Norman, A. W. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 53, 603-613. (b) Okamura, W.; Do, S.; Kim, H.; Jeganathan, S.; Vu, T.; Zhu, G.; Norman, A. W. *Steroids* **2001**, 66, 239-247.

desplazamiento sigmatrópico [1,7] de hidrógeno, debe ocurrir a través de la conformación 6-s-*cis*.



**Figura 5.** Equilibrio conformacional y constitucional de la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-*vit*-vitamina D<sub>3</sub>.

**3c.** El anillo A experimenta un rápido intercambio entre los dos conformeros silla del anillo. En este equilibrio dinámico entre las dos conformaciones silla, los hidroxilos 1 $\alpha$  y 3 $\beta$  se orientan en las posiciones axial y ecuatorial, de manera que cuando el hidroxilo 1 $\alpha$  es axial, el 3 $\beta$  es ecuatorial, y a la inversa.



**Figura 6.** Equilibrio entre las dos conformaciones silla del anillo A.

## 1.2 Metabolismo de la vitamina D<sub>3</sub>.

La vitamina D puede ser obtenida a través de la dieta o puede ser sintetizada en la piel por el organismo. La vitamina D está disponible en los alimentos en dos formas: como vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) de origen vegetal, y como vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) de origen animal. Los alimentos con mayor contenido de Vitamina D<sub>3</sub> son principalmente el aceite de hígado de pescado y los pescados grasos (salmón, atún, arenque, sardinas, etc.). También se encuentra disponible en menor proporción en la leche, manteca, quesos, yema de huevo y champiñones; actualmente muchos de estos productos se comercializan fortificados con

vitamina D. Sin embargo, la escasa variedad de alimentos que contienen una significativa cantidad de vitamina D, sumado al hecho de que los alimentos representan un pequeño aporte a la cantidad total de esta vitamina en el cuerpo, hace que su biosíntesis en la piel, a partir de la exposición solar, sea considerada la principal fuente de la misma.

La vitamina D, en la forma de vitamina D<sub>3</sub>, es producida en la piel a partir del 7-deshidrocolesterol (**4**) por exposición a la luz ultravioleta en el rango de 290-315 nm (UVB). Se cree que este proceso es puramente fotoquímico, y no requiere de enzimas.<sup>6</sup> El paso inicial es la apertura electrocíclica del anillo B por ruptura del enlace C9-C10 para producir la previtamina D<sub>3</sub> (**7**). En una segunda etapa se produce la isomerización térmica espontánea de la previtamina D<sub>3</sub>, vía desplazamiento sigmatrópico antarafacial [1,7] de hidrógeno,<sup>7</sup> dando lugar a la vitamina D<sub>3</sub> en su forma 6-s-*cis* que rápidamente rota alrededor del enlace C6-C7 para dar lugar a su conformero más estable 6-s-*trans* (**Esquema 1**).<sup>8</sup>

La producción fotoquímica de la previtamina D<sub>3</sub> es rápida y su nivel alcanza un máximo en cuestión de horas. Si la exposición a la luz UV persiste, su nivel no aumenta, ya que se transforma en lumisterol y taquisterol, evitándose la toxicidad que produciría un exceso de vitamina D<sub>3</sub>. La formación de lumisterol es reversible y contribuye a un suministro continuo de vitamina D<sub>3</sub> cuando cesa la exposición a la luz solar (UV).

La vitamina D<sub>3</sub> sintetizada en la piel o ingerida en la dieta, no tiene ninguna función biológica conocida en el organismo, por lo que unida a una proteína específica, DBP (vitamin D-binding protein), es transportada a través del torrente sanguíneo para su almacenamiento en el tejido adiposo o hacia las células diana para su futura bioactivación. Dicha bioactivación implica dos alteraciones bioquímicas secuenciales mediante las que incorpora los grupos hidroxilos en las posiciones C1 y C25.

### 1.2.1 Bioactivación de la vitamina D<sub>3</sub>.

La activación metabólica de la vitamina D<sub>3</sub> comienza con la hidroxilación en la cadena lateral en la posición C25, (**Esquema 1**), dando lugar a la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> o Calcidiol (**8**). Hasta ahora, fueron identificadas cuatro enzimas distintas del citocromo P450 que muestran sustancial actividad vitamina D-25-hidroxilasa,<sup>9</sup> entre las que se destacan la CYP27A1 mitocondrial<sup>10</sup> y la CYP2R1 microsomal.<sup>11</sup> La primera se localiza principalmente en el hígado, mientras que la segunda está presente en un amplio rango de tejidos. Esta transformación está pobremente regulada, por lo cual la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> es el principal

<sup>6</sup> Holick, M. F. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *60*, 619-630.

<sup>7</sup> DeLuca, H. F.; Holick, M. F.; Schnoes, H. K.; Suda, T.; Cousins, R. J. *Biochem.* **1971**, *10*, 2799-2804.

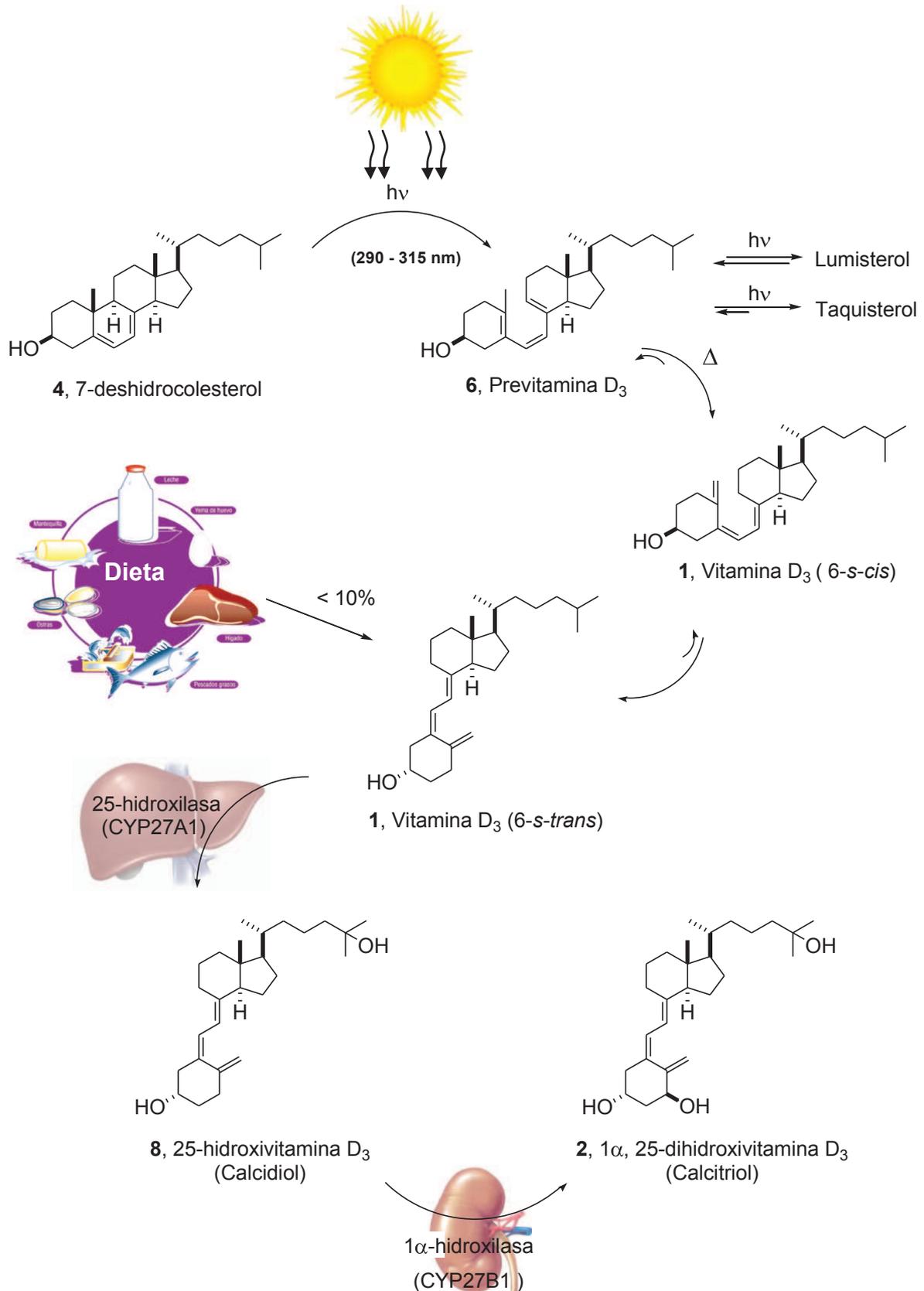
<sup>8</sup> Holick, M. F.; Tian, X. Q.; Allen, M. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3124-3126.

<sup>9</sup> Jones, G.; Strugnell, S. A.; DeLuca, H. F. *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 1193-1231.

<sup>10</sup> Usui, E.; Noshiro, M.; Okuda, K. *FEBS Lett.* **1990**, *274*, 174-177.

<sup>11</sup> Cheng, J. B.; Motola, D. L.; Mangelsdorf, D. J.; Russell, D. W. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 38084 -38093.

metabolito circulante de la vitamina D<sub>3</sub> y es considerado un indicador clínicamente útil sobre el estado nutricional de vitamina D en el organismo.



Esquema 1. Metabolismo de la Vitamina D<sub>3</sub>.

El segundo paso para la bioactivación requiere la introducción del grupo hidroxilo en la posición  $1\alpha$  del anillo A de la 25-hidroxitamina  $D_3$  para dar lugar al metabolito  $1\alpha,25$ -hidroxivitamina  $D_3$  o Calcitriol (**2**), considerado la forma hormonalmente activa de la vitamina  $D_3$ . Esta segunda hidroxilación es atribuida a una única enzima 25-hidroxitamina  $D_3$ - $1\alpha$ -hidroxilasa, CYP27B1 mitocondrial,<sup>12</sup> ubicada principalmente en los túbulos renales, aunque también se la ha encontrado en otros tejidos.

El Calcitriol es una hormona muy potente por lo cual este último paso está estrechamente regulado, principalmente por la hormona paratiroidea (PTH), el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23), el calcio, el fósforo, y la misma  $1\alpha,25$ -hidroxivitamina  $D_3$ .

### 1.2.2 Degradación de la hormona $1\alpha,25$ -dihidroxitamina $D_3$ .

Las formas biológicamente activas de la vitamina D tienen generalmente una vida corta en las células blanco o diana. La hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  atenúa o limita su función induciendo rápidamente su degradación metabólica a través del VDR, vía 24-hidroxilasa (CYP24A1). Esta enzima es responsable de la degradación metabólica de la hormona a través de múltiples oxidaciones en la cadena lateral, para dar lugar a una amplia variedad de metabolitos con polaridad creciente y eventual pérdida de su actividad hormonal (**Esquema 2**).<sup>13</sup>

La 24-hidroxilasa (CYP24A1) es una enzima multicatalítica capaz de realizar oxidaciones sucesivas, y pertenece a la misma subfamilia del citocromo P-450 que las otras enzimas relacionadas con la vitamina D.<sup>14</sup>

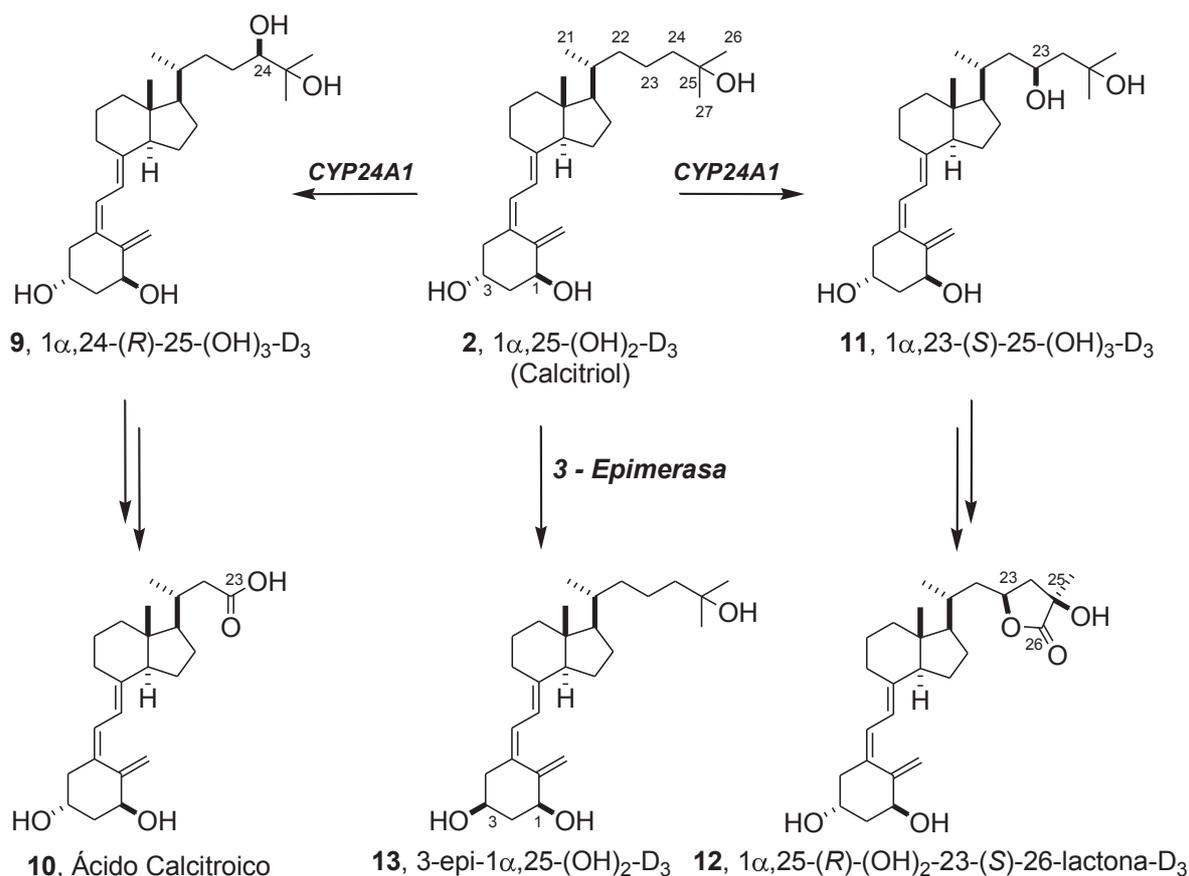
La degradación oxidativa de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  comienza con la hidroxilación en posición 24. A continuación se produce la oxidación del grupo hidroxilo a carbonilo en el C-24 y la hidroxilación en C23, con la posterior ruptura del enlace C23-C24, conduciendo finalmente al ácido de calcitroico (**10**), principal metabolito sin actividad biológica excretado en la orina. Otros dos caminos catabólicos implican hidroxilaciones en los carbonos C23 y C26 conduciendo a la formación de  $1\alpha,25$ -(*R*)-dihidroxitamina-23-(*S*)-26-lactona- $D_3$  (**12**) como producto final.<sup>15</sup>

<sup>12</sup> Takeyama, K.; Kitanaka, S.; Sato, T.; Kobori, M.; Yanagisawa, J.; Kato, S. *Science* **1997**, 277, 1827 - 1830.

<sup>13</sup> (a) Reddy, G. S.; Tserng, K-Y. *Biochemistry* **1989**, 28, 1763-1769. (b) Makin, G.; Lohnes, D.; Byford, V.; Ray, R.; Jones, G. *Biochem. J.* **1989**, 262, 173-180.

<sup>14</sup> (a) Chen, K. S.; Prah, J. M.; DeLuca, H. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 4543-4547. (b) Beckman, M.; Tadikonda, P.; Werner, E.; Prah, J. M.; Yamada, S.; DeLuca, H. F. *Biochemistry* **1996**, 35, 8465-8472.

<sup>15</sup> Ishizuka, S.; Norman, A. W. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 7165-70.



**Esquema 2.** Catabolismo de la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.

La enzima 24-hidroxilasa (CYP24A1) requiere estructuralmente para su acción del grupo hidroxilo en posición 25, pudiendo hidroxilar la posición C24 tanto de la prehormona, Calcidiol, como de su forma hormonal, el Calcitriol, aunque la afinidad por esta última es mayor. Por otro lado CYP24A1, además de ser altamente expresado en los túbulos renales, está ampliamente distribuida en otros tejidos incluyendo intestino, osteoblastos, placenta, keratinocitos, y próstata; lo cual sugiere que esta enzima es un medio eficiente para eliminar 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, jugando un papel clave en la protección del organismo contra el exceso de dicha hormona.

Más recientemente, se ha descrito una ruta alternativa para la degradación del Calcitriol en algunos tejidos, la cual consiste en la epimerización del hidroxilo en posición C3 para dar 3-epi-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (**13**).<sup>16</sup>

Se conocen en total 37 metabolitos de la Vitamina D<sub>3</sub>, entre los cuales 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> es el metabolito al cual se le atribuyen la mayoría de las acciones biológicas, por lo tanto se lo considera la forma hormonalmente activa de la vitamina D<sub>3</sub>.<sup>9</sup>

<sup>16</sup> (a) Kamao, M.; Tatematsu, S.; Reddy, G. S.; Hatakeyama, S.; Sugiura, M.; Ohashi, N.; Kubodera, N.; Okatno, T. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2001**, *47*, 108-115. (b) Reddy, G. S.; Muralidharan, K. R.; Okamura, W. H.; Tserng, K. Y.; McLane, J. A. *Steroids* **2001**, *66*, 441-450.

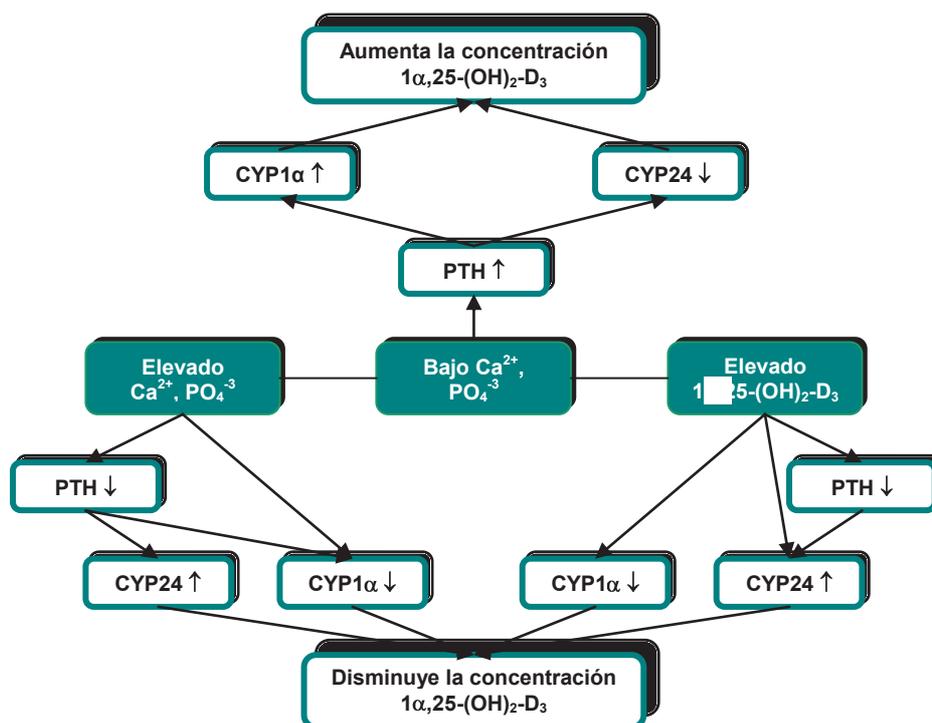
### 1.2.3 Regulación de la hormona calcitriol.

La regulación de la concentración en sangre de la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  es fundamental para la homeostasis del calcio; ya que esta hormona ejerce una intensa acción en la absorción de calcio a nivel del intestino, regulando el depósito y la reabsorción del calcio óseo.

El sitio primario de producción de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  son los túbulos renales, desde los cuales la hormona es vertida en el sistema circulatorio para cumplir con su función endocrina. En el riñón los principales reguladores de la concentración de la hormona en sangre son la hormona paratiroidea (PTH), el calcio, el fósforo y la propia hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  (**Esquema 3**). La glándula paratiroidea controla la concentración de calcio en sangre y segrega PTH en respuesta a una hipocalcemia. La hormona paratiroidea aumenta los niveles de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  incrementando la transcripción del gen de  $1\alpha$ -hidroxilasa (CYP27B1), y disminuyendo la degradación de la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ , inhibiendo la actividad de la enzima 24-hidroxilasa. El calcio y el fósforo regulan los niveles de la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  de forma independiente a la hormona paratiroidea. Así, a bajas concentraciones de calcio y fósforo, se incrementa la actividad de la enzima  $25$ -dihidroxitamina  $D_3$ - $1\alpha$ -hidroxilasa y disminuye la correspondiente a la enzima  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ - $24$ -hidroxilasa. Por el contrario, una alta concentración de calcio y fósforo inhibe la actividad de la enzima  $25$ -hidroxivitamina  $D_3$ - $1\alpha$ -hidroxilasa y activa la enzima  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ - $24$ -hidroxilasa. Por otro lado, la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  regula negativamente sus propios niveles induciendo a su catabolismo mediante la enzima 24-hidroxilasa e inhibiendo la expresión de la enzima  $25$ -hidroxivitamina  $D_3$ - $1\alpha$ -hidroxilasa.

Actualmente se encuentra claramente establecida la producción extrarrenal de la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  en muchos tipos de células en el cuerpo. Estas células sirven además de tejido diana para la acción de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  como un regulador autocrino/paracrino de las funciones celulares. En contraste con el sistema endocrino de la vitamina D, la regulación local de los niveles de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  es independiente de la estimulación de la PTH sobre la expresión renal de  $1\alpha$ -hidroxilasa; dependiendo en cambio de factores específicos del tejido en cuestión y de los niveles en sangre de su sustrato, la prehormona  $25$ -hidroxivitamina  $D_3$ . Algunos de los sitios extrarenales importantes incluyen al tracto gastrointestinal, páncreas, epidermis, distintas células del sistema inmune, paratiroides, distintos sitios del cerebro, células endoteliales, tejido adiposo y placenta.<sup>17</sup>

<sup>17</sup> Morris, H. A.; Anderson, P. H. *Clin. Biochem. Rev.* **2010**, *31*, 129-138.



**Esquema 3.** Factores que controlan la concentración de la hormona calcitriol ( $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ ).

#### 1.2.4 Transporte en sangre de la hormona.

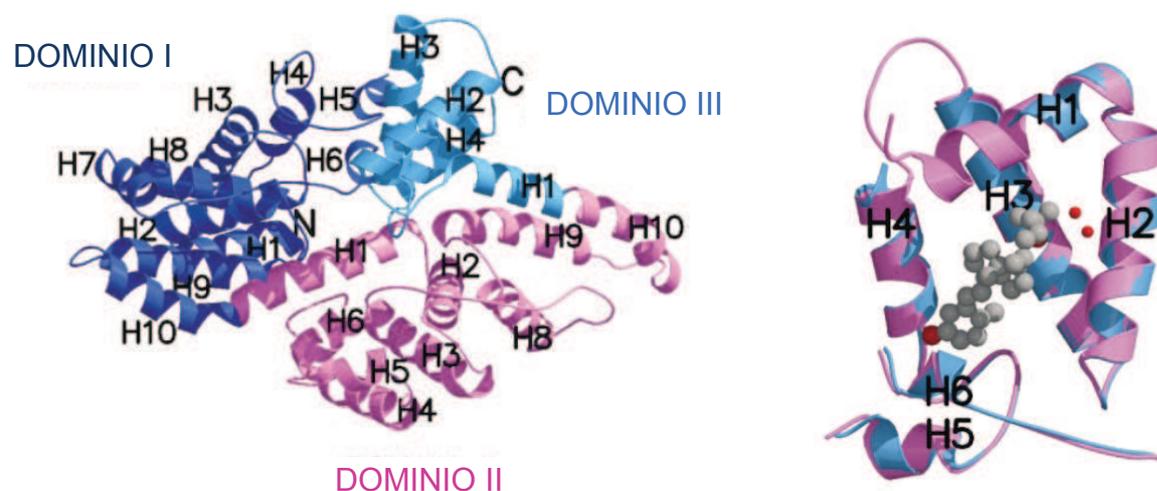
La vitamina D y sus metabolitos activos son moléculas altamente lipofílicas por lo que se encuentran generalmente en el torrente sanguíneo unidas a una proteína de transporte. La DBP (*Vitamin D Binding Protein*) es la proteína de transporte específica para los metabolitos de la vitamina D, a los cuales se une con una alta afinidad (85-88%); aunque también otras proteínas transportadoras no específicas o de baja afinidad (12-15%) como la albúmina pueden cumplir con esta función.<sup>18</sup> El rol primario de la DBP parece ser secuestrar los metabolitos de la vitamina D en sangre, proveyendo de esta manera una reserva estable de los mismos (principalmente de 25-hidroxitamina  $D_3$ ), ya que prolonga su vida media protegiéndolos de su rápida degradación metabólica.<sup>19</sup>

La DBP es una proteína plasmática de 458 aminoácidos (58 kDa) perteneciente a la misma familia que la albúmina, la afamina y la  $\alpha$ -fetoproteína. En su estructura tridimensional (**Figura 7a**) se pueden diferenciar 3 dominios: I, II y III; localizándose en el dominio I el sitio de unión a la vitamina D (**Figura 7 b**). En esta región, concretamente entre las hélices 1 a 4, se forma una grieta donde hay predominantemente aminoácidos

<sup>18</sup> Bikle, D. D.; Gee, E.; Halloran, B.; Kowalski, M. A.; Ryzen, E.; Haddad, J. G. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1986**, *63*, 954–959.

<sup>19</sup> (a) Safadi, F. F.; Thornton, P.; Magiera, H.; Hollis, B. W.; Gentile, M.; Haddad, J. G.; *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 239–251. (b) Zella, L. A.; Shevde, N. K.; Hollis, B. W.; Cooke, N. E.; J. W. Pike *Endocrinology* **2008**, *149*, 3656–3667.

hidrofóbicos y aromáticos que permiten una interacción favorable con la vitamina D o sus metabolitos.<sup>20</sup>



**Figura 7.** (a) Estructura cristalina de la proteína transportadora DBP; (b) Sitio de unión de la vitamina D y sus metabolitos.

Los distintos metabolitos de la vitamina D se unen a DBP con una afinidad variable, en el orden que se indica a continuación: 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> = 24,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> > 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> > vitamina D<sub>3</sub>. La velocidad de metabolización de los mismos es inversamente proporcional a su afinidad por la DBP. Aquellos metabolitos con una fuerte afinidad por DBP poseen los valores de vida media en sangre en el orden de días; mientras que los metabolitos con menor afinidad como la 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> poseen valores de vida media del orden de horas.<sup>21</sup>

Si bien DBP es la proteína especializada en el transporte de la vitamina D y sus metabolitos, se conocen además otras funciones como el transporte de ácidos grasos, la unión a la actina y la activación de macrófagos.<sup>22</sup>

### 1.3 Mecanismo de acción de la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub>.

La forma hormonalmente activa de la vitamina D<sub>3</sub>, 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub>, es el mediador clave en el sistema endocrino de la vitamina D cuyo principal rol es la regulación de la concentración de calcio y fósforo en sangre a través de acciones en hueso, glándula paratiroidea, riñón e intestino, los cuales son considerados como los órganos diana clásicos. Sin embargo la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> produce efectos biológicos en más de 28 tejidos,

<sup>20</sup> Verboven, C.; Rabijns, A.; De Maeyer, M.; Van Baelen, H.; Bouillon, R.; De Ranter, C.; *Nature Struct. Biol.* **2002**, *9*, 131-136.

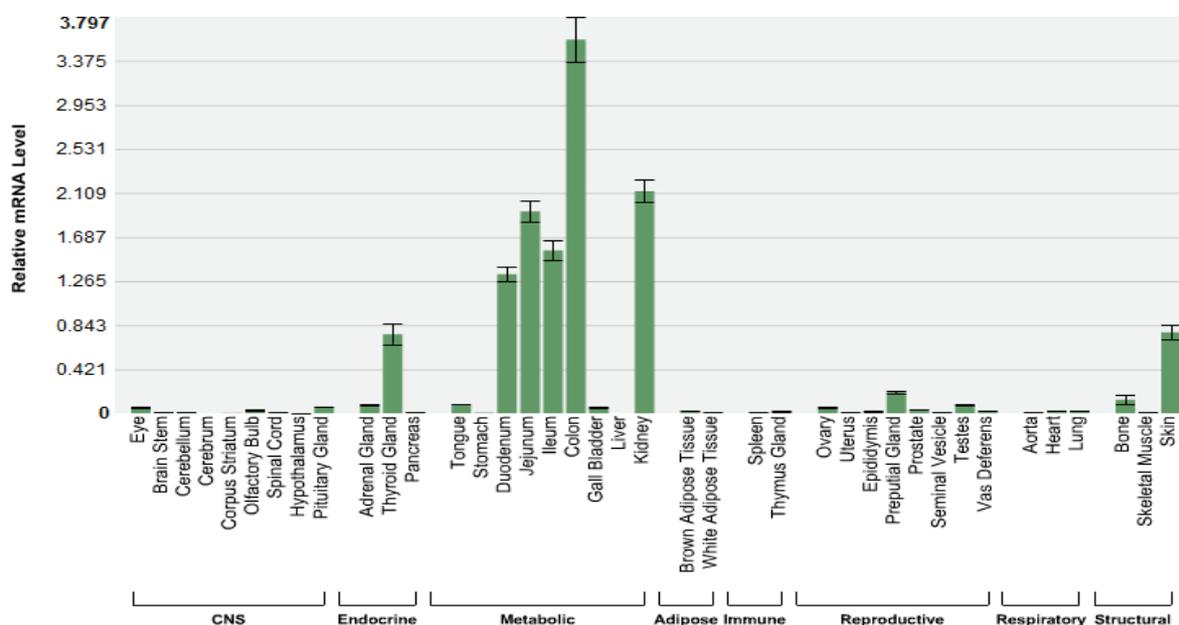
<sup>21</sup> Cooke, N. E.; Haddad, J. G. *Endocr. Rev.* **1989**, *10*, 294-307.

<sup>22</sup> (a) White, P.; Cooke, N. *Trends Endocrinol. Metab.* **2000**, *11*, 320-327. (b) Yamamoto, N.; Homma, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 8539-8543.

siendo capaz de generar muchas otras respuestas biológicas no relacionadas con la homeostasis mineral, conocidas como acciones no clásicas de la Vitamina D. En esos tejidos diana, las respuestas biológicas pueden ser generadas por dos mecanismos diferentes de transducción de señales: el clásico *mecanismo genómico*, que modula la transcripción de genes mediante un receptor nuclear para la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  (VDR); y el *mecanismo no genómico* que regula las respuestas biológicas rápidas a través de la interacción con un receptor de membrana.<sup>23</sup>

### 1.3.1 Mecanismo genómico.

Esta bien establecido que la acción molecular primaria de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  es iniciar la transcripción de genes por unión al Receptor de la Vitamina D (VDR), por lo cual éste es esencial para mediar dichos eventos. El VDR se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos del cuerpo, principalmente en el tracto gastrointestinal y riñón, y con niveles moderados en tiroides, hueso y piel (**Figura 8**) indicando que estos tejidos son blancos para las acciones de la hormona.<sup>24</sup> De esta manera, la forma hormonal de la vitamina D, regula la expresión de más de 900 genes, alrededor del 5% del genoma humano, involucrando un amplio espectro de importantes funciones fisiológicas.<sup>25</sup>



**Figura 8.** Distribución del VDR por RT-PCR en tejidos de ratones (C57Bl/6J).<sup>24b</sup>

<sup>23</sup> (a) Dusso, A. S.; Brown, A. J.; Slatopolsky *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2005**, *289*, F8-F28 (b) Bouillon, R.; Carmeliet, G.; Verlinden, L.; van Etten, E.; Verstuyf, A.; Luderer, H.F.; Lieben, L.; Mathieu, C.; Demay, M. *Endocr. Rev.* **2008**, *29*, 726–776.

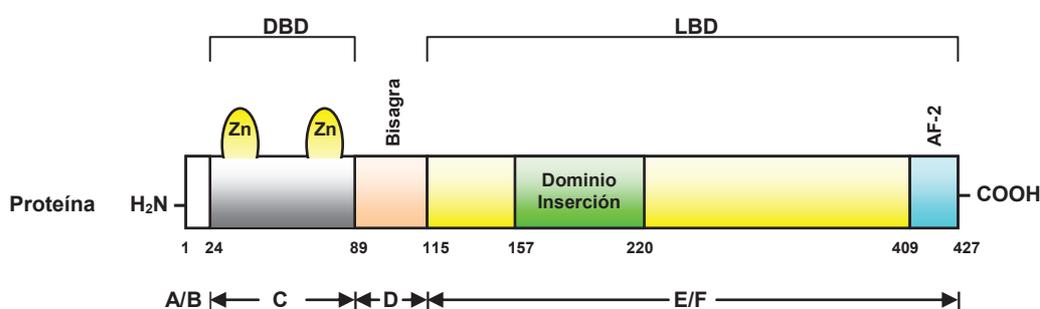
<sup>24</sup> (a) Bookout, A. L.; Jeong, Y.; Downes, M.; Yu, R. T.; Evans, R. M.; Mangelsdorf, D. J. *Cell* **2006**, *126*, 789–799. (b) Nuclear Receptor Signaling Atlas (NURSA): [www.nursa.org/10.1621/datasets.02001](http://www.nursa.org/10.1621/datasets.02001).

<sup>25</sup> Wang, T. T.; Tavera-Mendoza, L. E.; Laperriere, D.; Libby, E.; MacLeod, N. B.; Nagai, Y.; Bourdeau, V.; Konstorum, A.; Lallemand, B.; Zhang, R.; Mader, S.; White, J. H. *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19*, 2685–2695.

### 1.3.1.1 Receptor de la Vitamina D (VDR)

El Receptor de la Vitamina D (VDR), es un factor transcripcional dependiente de ligando, que media la transcripción o represión de determinados genes que regulan la síntesis de proteínas. Este receptor pertenece a la superfamilia de Receptores Nucleares (RN), entre los que se incluyen receptores para hormonas esteroideas, tiroideas y el ácido retinoico. Estos pueden encontrarse tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células diana, sin embargo desarrollan su función en el núcleo celular, por lo que en general se los denomina receptores nucleares (nVDR).

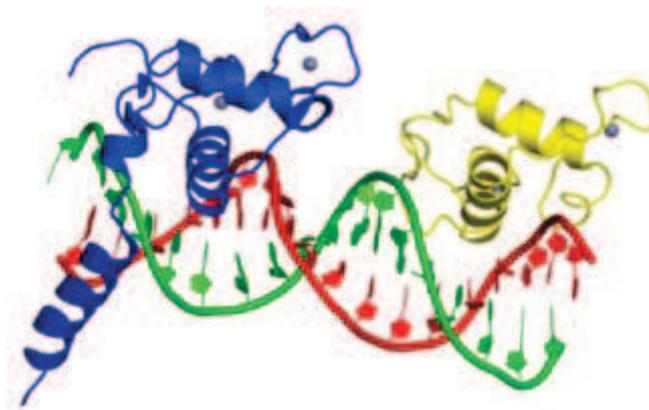
El VDR mantiene una alta homología estructural y de unión de ligando entre varias especies. En particular el receptor para la vitamina D humano (hVDR) es un péptido de 427 aminoácidos (48 kDa). Al igual que otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares, el VDR presenta una estructura modular en la que se pueden diferenciar seis regiones (A-F) (**Figura 9**): un dominio N-terminal (región A/B), un dominio de unión del ADN (región C, DBD), una región bisagra flexible (región D), y un dominio de unión del ligando (región E/F, LBD). La región A/B contiene una función de activación autónoma, AF-1, que es la más divergente entre los receptores nucleares. El VDR, en particular, muestra una región A/B más bien pequeña sin la función AF-1, de modo que se lo puede considerar conformado por dos dominios funcionales: LBD y DBD.



**Figura 9.** Estructura y organización del Receptor de la vitamina D (VDR).

El *Dominio de Unión al ADN* (DBD o región C) es el responsable de la vital interacción con secuencias específicas de ADN, llamadas elementos de respuesta a la vitamina D (VDREs), además de participar en la dimerización del receptor. El DBD es el dominio más conservado entre los receptores hormonales nucleares en general, y la estructura tridimensional de los mismos es muy similar. Este dominio contiene dos módulos o dedos de zinc, donde cada uno de los átomos de zinc está tetrahedricamente coordinado con cuatro residuos de cisteína. Los átomos de zinc y los residuos de cisteína son necesarios para mantener la estructura tridimensional en donde las dos hélices (H1 y H2) están orientadas a 90° aproximadamente una de otra. La hélice H1, más próxima al extremo

N-terminal, es crítica en la especificidad para la unión al ADN, mientras que la hélice H2 y la región que le sigue proveen, al menos en parte, uno de los sitios para la heterodimerización del VDR con el receptor retinoico X (RXR).<sup>26</sup>



**Figura 10.** Estructura cristalina del DBD del VDR (azul) y del RXR (amarillo) unidos a un VDRE (rojo 5' → 3'; verde 3' → 5').<sup>27</sup>

El *Dominio de Unión al Ligando* (LBD) es un dominio globular multifuncional que se localiza en la posición C-terminal del VDR. Este dominio es el responsable de la unión a la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ , la dimerización del receptor y la interacción con proteínas coactivadoras.

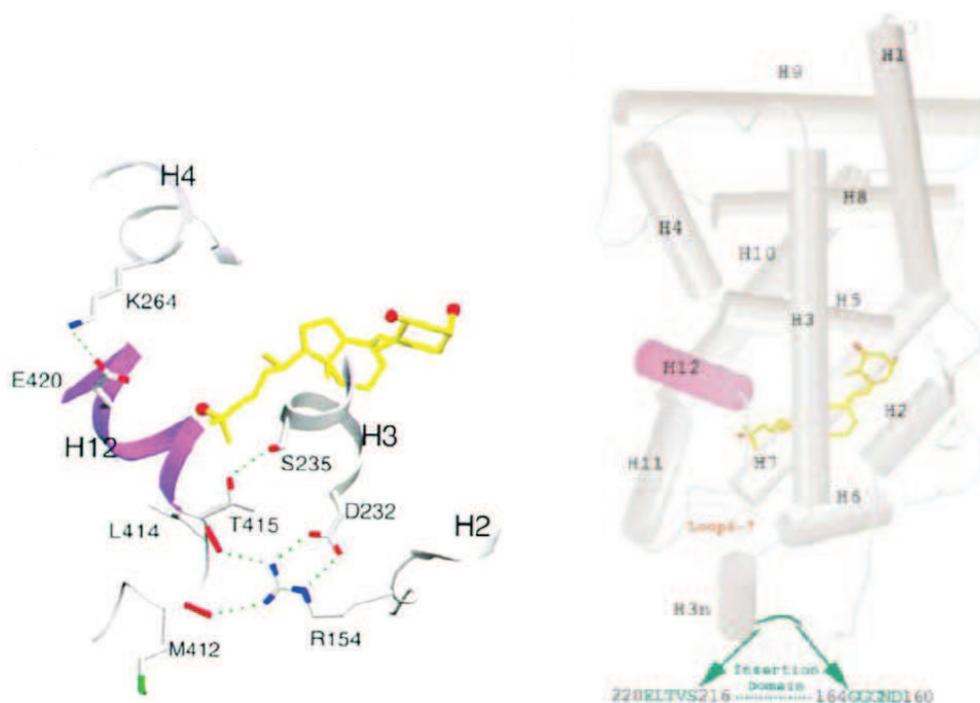
A diferencia de otros receptores hormonales nucleares, el LBD del VDR contiene una región anormalmente extensa y desordenada, conocida como dominio de inserción, cuya flexibilidad conformacional afecta a la solubilidad de la proteína dificultando los esfuerzos de obtención de una estructura cristalina de dicho receptor o del dominio de unión al ligando. La remoción de un fragmento de este dominio de inserción, entre los aminoácidos 157-220, permitió en el año 2000 una eficiente cristalización del complejo del LBD del VDR mutado con la hormona, y la determinación de su estructura cristalina (**Figura 11**). El VDR mutado muestra una unión del ligando  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  normal y conserva las mismas propiedades de transactivación, por lo cual la ausencia de dicha secuencia de inserción no altera significativamente la conformación del VDR como para comprometer su función.<sup>28</sup>

La estructura tridimensional del LBD del receptor VDR mutado es similar a la de otros receptores nucleares, y está compuesta por 13 hélices  $\alpha$  y tres láminas  $\beta$ , las cuales en conjunto forman una cavidad hidrofóbica de unión del ligando, llamada *bolsillo G de unión del ligando*. Se encontró que esta cavidad es mayor que en otros receptores nucleares, y que el ligando natural ocupa menos de la mitad de su volumen.

<sup>26</sup> (a) Khorasanizadeh, S.; Rastinejad, F. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 384-390. (b) Shaffer, P. L.; Gewirth, D. T. *EMBO J.* **2002**, *21*, 2242-2252.

<sup>27</sup> EMBL-EBI's Protein Data Bank in Europe (PDB); código de la estructura: 1ynw.

<sup>28</sup> Rochel, N.; Wurtz, J. M.; Mitschler, A.; Klaholz, B.; Moras, D. *Mol. Cell* **2000**, *5*, 173-179.



**Figura 11.** Estructura cristalina del LBD del receptor VDR unido a la hormona calcitriol.<sup>28</sup>

La hélice 12 contiene la función de activación de AF-2, de crucial importancia para activar la transcripción, ya que es la superficie de interacción con los coactivadores. Dado que muchos residuos de H12 entran en contacto directamente con el ligando, la unión de dicho ligando induce un cambio conformacional de la hélice H12 de tal manera que la misma se reposiciona completamente. Este rearrreglo estructural activa al receptor para la transcripción, desestabilizando la unión de los corepresores y permitiendo el reclutamiento de las proteínas coactivadoras.<sup>29</sup>

Las regiones DBD y LDB están unidas por una región bisagra (dominio D), que se cree confiere flexibilidad rotacional entre estas dos regiones permitiendo la dimerización e interacción del ADN.<sup>30</sup>

### 1.3.1.2 Mecanismo molecular de transcripción.

La unión de la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  al VDR inicia una cascada de interacciones macromoleculares que en última instancia conducen a la transcripción de determinados genes blanco.<sup>31</sup> Las respuestas biológicas que resultan de esta vía de señalización genómica no son inmediatas, sino que implican procesos que pueden durar horas o días.

<sup>29</sup> Freedman, L.P. *Cell*. **1999**, 97, 5–8.

<sup>30</sup> Mangelsdorf, D. J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schutz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P.; Evans, R. M. *Cell* **1995**, 83, 835–839.

<sup>31</sup> (a) Haussler, M. R.; Whitfield, G. K.; Haussler, C. A.; Hsieh, J. C., Thompson, P. D.; Selznick, S. H.; Dominguez, C. E., Jurutka, P. W. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, 13, 325–349. (b) Christakos, S.; Dhawan, P., Liu, Y.; Peng, X., Porta, A. *J. Cell. Biochem.* **2003**, 88, 695–705

Como se mencionó anteriormente la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  llega a las células diana unida a la proteína DBP. Una vez que atraviesa la membrana plasmática, la hormona se une al VDR con una elevada afinidad ( $K_d \sim 0,1$  nM; 100 veces mayor que otros metabolitos). Luego de la unión del ligando, el VDR sufre un cambio conformacional que promueve la asociación con otro receptor nuclear, principalmente el receptor retinoico X (RXR), siendo el heterodímero VDR-RXR el factor de transcripción funcionalmente activo en la transcripción mediada por la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ . Esta heterodimerización es requerida para la migración del complejo  $1,25$ -(OH) $_2D_3$ -VDR-RXR del citoplasma al núcleo (**Figura 12**). Una vez en el núcleo el heterodímero se une con una alta afinidad a secuencias específicas de ADN en las regiones promotoras de los genes que regula.<sup>32</sup> Estas secuencias específicas de ADN, llamadas elementos de respuesta a la vitamina D (VDREs), generalmente consisten en dos secuencias repetidas de 6 nucleótidos separados por 3 bases no específicas (DR-3) o como palíndromos invertidos separados por 9 nucleótidos (IP9). La secuencia general para la mitad de un VDRE sería (A/G)G(G/T)TCA aunque también existen subclases con alguna variación en su secuencia.<sup>24a,33</sup> Ambos receptores del heterodímero se unen a los VDREs, el receptor RXR por la posición 5' y el VDR por la posición 3'.

La regulación de la expresión de genes depende además, de la capacidad del heterodímero VDR/RXR de reclutar una serie de complejos de proteínas coreguladoras, que pueden activar (coactivantes) o reprimir (corepresores) la transcripción.<sup>34</sup> Dichos complejos interactúan con el heterodímero en el dominio de activación AF-2 de ambos receptores.

Los complejos coactivantes (SRC/ p160, DRIP, etc) permiten alterar el grado de empaquetamiento de la cromatina conduciendo eventualmente al reclutamiento de la ARN polimerasa II para iniciar la transcripción (**Figura 12 a y b**). Mientras que los co-represores (N-CoR, SMRT, Alien y Hr) reprimen la transcripción de genes, manteniendo cerrada la estructura de la cromatina (**Figura 12 c**).<sup>35</sup>

En resumen, el mecanismo de acción de la forma activa de la vitamina D es similar al de otras hormonas esteroideas y es mediado por su unión al VDR. El VDR funciona como un heterodímero, generalmente con el receptor RXR, para regular los genes blanco de la vitamina D. Dicho complejo interactúa con secuencias específicas de ADN (VDRE), y el control de la transcripción requiere el reclutamiento adicional de co-reguladores que pueden ser inhibitorios (co-supresores) o estimulatorios (co-activantes). Los diferentes tejidos tienen

<sup>32</sup> (a) Rachez, C.; Freedman, L. P. *Gene* **2000**, *246*, 9-21. (b) Sutton, A. L.; MacDonald, P. N. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17*, 777-791.

<sup>33</sup> Pike, J. W.; Meyer, M. B.; Martowicz, M. L.; Bishop, K. A.; Lee, S. M.; Nerenz, R. D.; Goetsch, P. D. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *121*, 130-135.

<sup>34</sup> (a) McKenna, N. J.; Lanz, R. B.; O'Malley, B. W. *Endocr. Rev.* **1999**, *20*, 321-344. (b) McKenna, N. J.; O'Malley, B. W. *Cell* **2002**, *108*, 465-474.

<sup>35</sup> Heinzl, T.; Lavinsky, R. M.; Mullen, T. M.; Soderstrom, M.; Laherty, C. D.; Torchia, J.; Yang, W. M.; Brard, G.; Ngo, S. D.; Davie, J. R.; Seto, E.; Eisenman, R. N.; Rose, D. W.; Glass, C. K.; Rosenfeld, M. G. *Nature* **1997**, *387*, 43-48.

niveles variables de esos co-reguladores, proveyendo algún grado de especificidad tisular para la acción de la vitamina D. Además, los diferentes genes son selectivos para el co-regulador, que en combinación con el VDR, regulan la transcripción.<sup>36</sup> Por lo tanto, la apreciación de la habilidad de tejidos individuales, para producir su propia  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  y responder a su vez a dicha hormona de manera específica según el tejido, provee las bases para comprender el concepto de que la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  regula muchas funciones en diversos tejidos y de manera selectiva.

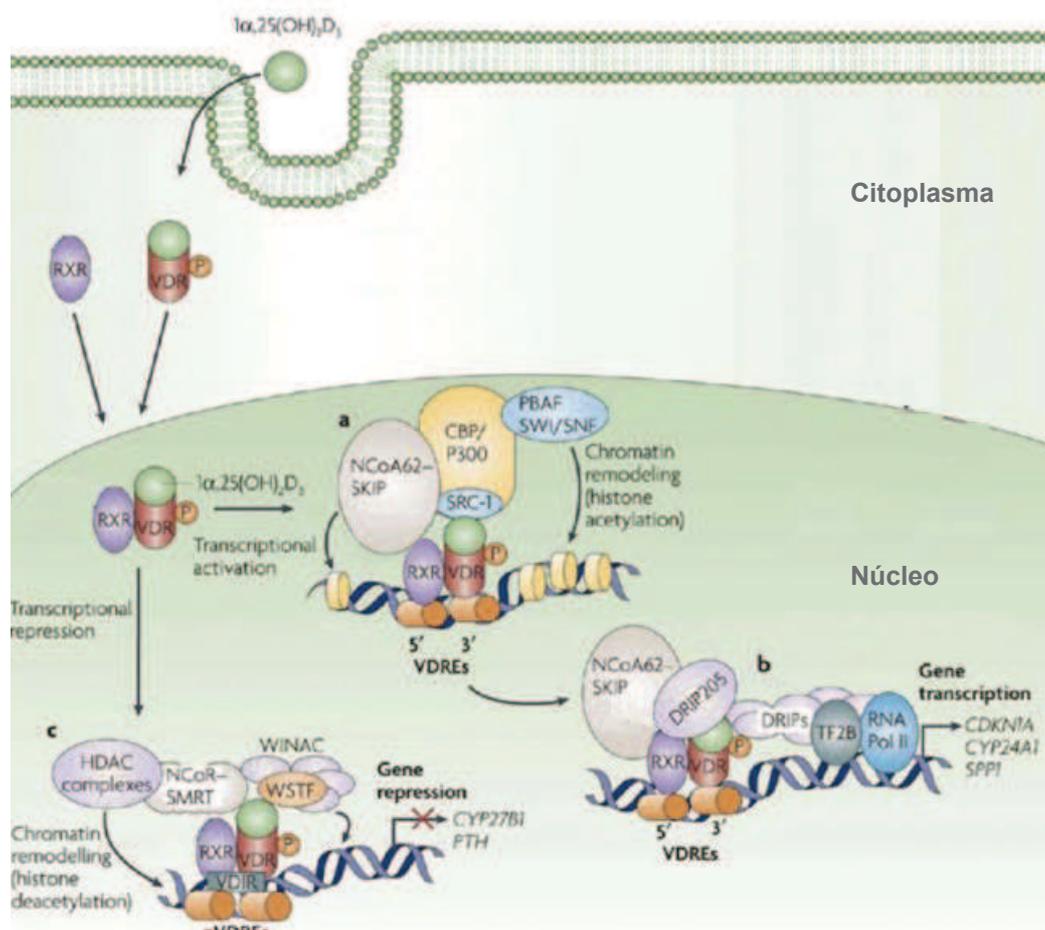


Figura 12. Mecanismo de acción genómico del calcitriol.<sup>37</sup>

### 1.3.2 Mecanismo no genómico.

Aunque la mayoría de los efectos clásicos de la hormona implican una vía genómica, también fueron observados otros efectos muy rápidos, de segundos a minutos, los cuales no son bloqueados por inhibidores de transcripción, sugiriendo una acción más directa de la hormona a nivel de la membrana celular. Estos efectos incluyen cambios transitorios en el

<sup>36</sup> Sánchez-Martínez, R.; Zambrano, A.; Castillo, A. I.; Aranda, A. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 3817-3829.

<sup>37</sup> Figura adaptada de la cita 48.

flujo transmembrana de iones (calcio y cloruro)<sup>38</sup> o en las vías de señalización intracelular (tales como cambios en cAMP, proteinquinasa A y C, fosfolipasa C, fosfoinositol-3 quinasa, y en la vía MAP quinasas).<sup>39</sup>

La naturaleza del receptor de membrana que media los efectos rápidos de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ , no ha sido determinada en forma definitiva. Actualmente los dos candidatos principales para actuar como receptores de membrana son: el VDR y la proteína  $1,25D_3$ -MARRS (Membrane Associated Rapid Response Steroid-binding).

Los primeros estudios de los efectos rápidos de la hormona en relación a la rápida absorción de calcio desde el duodeno, proceso conocido como trascaltaquia, llevó a identificar una proteína de unión para  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  en la membrana basolateral de células intestinales de pollo.<sup>40</sup> Este receptor alternativo llamado  $1,25D_3$ -MARRS, muestra una afinidad por la hormona comparable a la del receptor VDR clásico ( $K_d = 0,7$  nM), uniéndose preferentemente a  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  por sobre otros metabolitos [ $25(OH)D_3$  o  $24,25(OH)_2D_3$ ].  $1,25D_3$ -MARRS, previamente identificada como ERp57 o GRp58, es una proteína multifuncional de la familia de las enzimas tiorredoxinas.

Por otro lado, varios estudios en distintos tipos de células muestran que los efectos rápidos de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  requieren de la presencia del VDR.<sup>41</sup> En relación a esta hipótesis del VDR como la proteína de unión de la hormona en la membrana, se encontró al VDR asociado a la caveola de la membrana plasmática, localizándose sitios de unión específicos y saturables para  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ .<sup>42</sup> Por otro lado, Mizwicki y colaboradores proponen un bolsillo de unión alternativo al previamente definido en el dominio de unión (LBD) del VDR clásico, el cual aceptaría ligandos con una conformación distinta para dar lugar a las respuestas rápidas.<sup>43</sup> Sin embargo, el rol del VDR en los efectos rápidos de la hormona no está claro todavía, ya que los datos aportados por distintos estudios resultan controvertidos, dado que las acciones rápidas de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  pueden ocurrir también en células que carecen de VDR.<sup>44</sup>

Una diferencia importante entre el modo de acción genómico y el no genómico es la especificidad que muestran los receptores respecto a los requerimientos estructurales de los ligandos. La flexibilidad conformacional de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  permite generar

<sup>38</sup> Cancela, L.; Nemere, I.; Norman, A. W. *J. Steroid Biochem.* **1988**, *30*, 33-39.

<sup>39</sup> (a) Farach-Carson, M. C.; Ridall, A. L.; *Am. J. Kidney Dis.* **1998**, *31*, 729-742. (b) Boyan, B. D.; Schwartz, Z. *Steroids* **2004**, *69*, 591-597.

<sup>40</sup> Nemere, I.; Farach-Carson, M. C.; Rohe, B.; Sterling, T. M.; Norman, A. W.; Boyan, B. D.; Safford, S. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7392-7397.

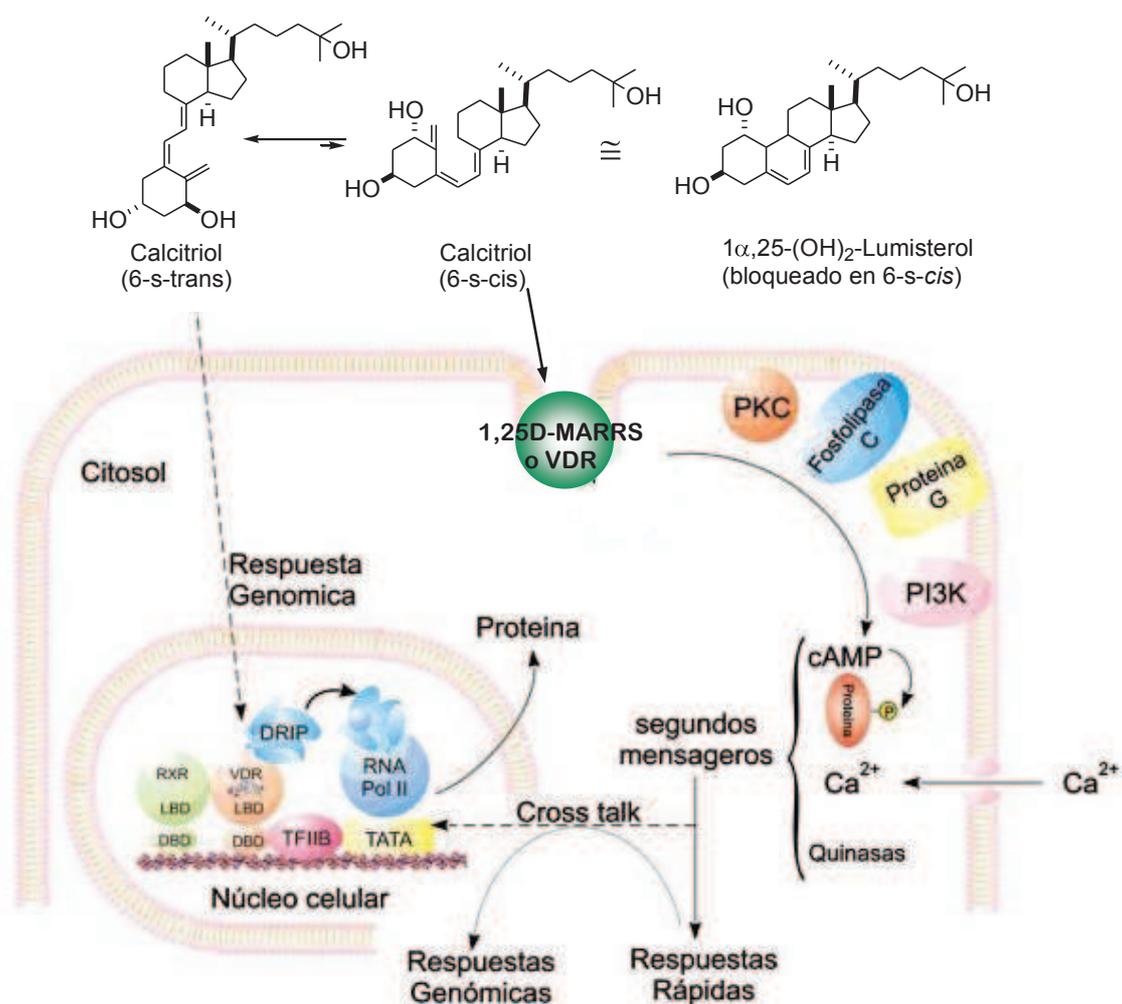
<sup>41</sup> (a) Zanello, L. P.; Norman, A. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 1589-1594; (b) Nguyen, T. M.; Lieberherr, M.; Fritsch, J.; Guillozo, H.; Alvarez, M. L.; Fitouri, Z.; Jehan F.; Garabedian, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *279*, 7591-7597.

<sup>42</sup> Huhtakangas, J. A.; Olivera, C. J.; Bishop, J. E.; Zanello, L. P.; Norman, A. W. *Mol. Endocrinol.* **2004**, *18*, 2660-2671.

<sup>43</sup> (a) Mizwicki, M. T.; Keidel, D.; Bula, C. M.; Bishop, J. E.; Zanello, L. P.; Wurtz, J. M.; Moras, D.; Norman, A. W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12876-12881; (b) Mizwicki, M. T.; Menegaz, D.; Yaghmaei, S.; Henry, H. L.; Norman, A. W.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *121*, 98-105.

<sup>44</sup> (a) Wali, R. K.; Kong, J.; Sitrin, M. D.; Bissonnette, M.; Li, Y. C. *J. Cell Biochem.* **2003**, *88*, 794-801. (b) Boyan, B. D.; Sylvia, V. L.; Mckinney, N.; Schwartz, Z. *J. Cell Biochem.* **2003**, *90*, 1207-1223.

una amplia variedad de conforméromos del ligando. Los estudios de relación estructura-actividad realizados con varios análogos de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  restringidos en una conformación particular (p.ej.  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -lumisterol), sugieren que la conformación preferida para el receptor de membrana asociado a respuestas rápidas es la 6-s-*cis*, mientras que la conformación 6-s-*trans* media preferentemente respuestas genómicas via el nVDR (**Figura 13**).<sup>45</sup>



**Figura 13.** *Diferentes mecanismos de transducción de señales mediados por la  $1\alpha,25$  dihidroxitamina  $D_3$ .*<sup>46</sup>

Se ha propuesto además, que los eventos de señalización intracelular pueden modular acciones genómicas de la hormona. Numerosos estudios presentan evidencias de que mediante vías de señalización rápidas la hormona puede regular un repertorio de quinasas citosólicas y sistemas de segundos mensajeros para activar, por ejemplo por

<sup>45</sup> Norman, A. W.; Henry, H. L.; Bishop, J. E.; Song, X. D.; Bula, C.; Okamura, W. H. *Steroids* **2001**, *66*, 147–158.

<sup>46</sup> Figura adaptada de Rodrigues, Luis C., *Tesis Doctoral*, Santiago de Compostela, **2007**, p. 64.

fosforilación, el VDR y amplificar su actividad genómica.<sup>47</sup> La regulación de la transcripción de genes por *cross-talk* de esas cascadas de quinasas con el VDR/VDRE, puede influenciar respuestas biológicas celulares específicas hacia la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ , involucradas en diversos procesos fisiológicos y patobiológicos.<sup>48</sup>

#### 1.4 Acciones fisiológicas y usos terapéuticos de la hormona y sus análogos.<sup>49</sup>

La hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  regula numerosos procesos fisiológicos además de mantener la homeostasis del calcio y fósforo a través de su acción en huesos, intestino y riñón. Esas acciones “no clásicas” de la hormona varían ampliamente, e incluyen la regulación de la producción y secreción de varias hormonas, el control sobre la proliferación y diferenciación celular, y la modulación de la respuesta inmune tanto adaptativa como innata. La ubicua presencia del VDR en muchos otros tejidos y tipos de células, que no están involucrados en el metabolismo mineral, indican un amplio rol fisiológico para dicha hormona. Además, muchos de esos sitios contienen la enzima  $1\alpha$  hidroxilasa (CYP27B1), siendo capaces de producir  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  de manera autócrina/paracrina, regulados por factores celulares específicos y no por requerimientos minerales.

La intervención de la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  en esta gran variedad de funciones biológicas, la convierten en un potencial fármaco para el tratamiento de enfermedades relacionadas con anomalías óseas, desequilibrios proliferativos y desórdenes del sistema inmunológico, entre otros (**Figura 14**).<sup>50</sup>

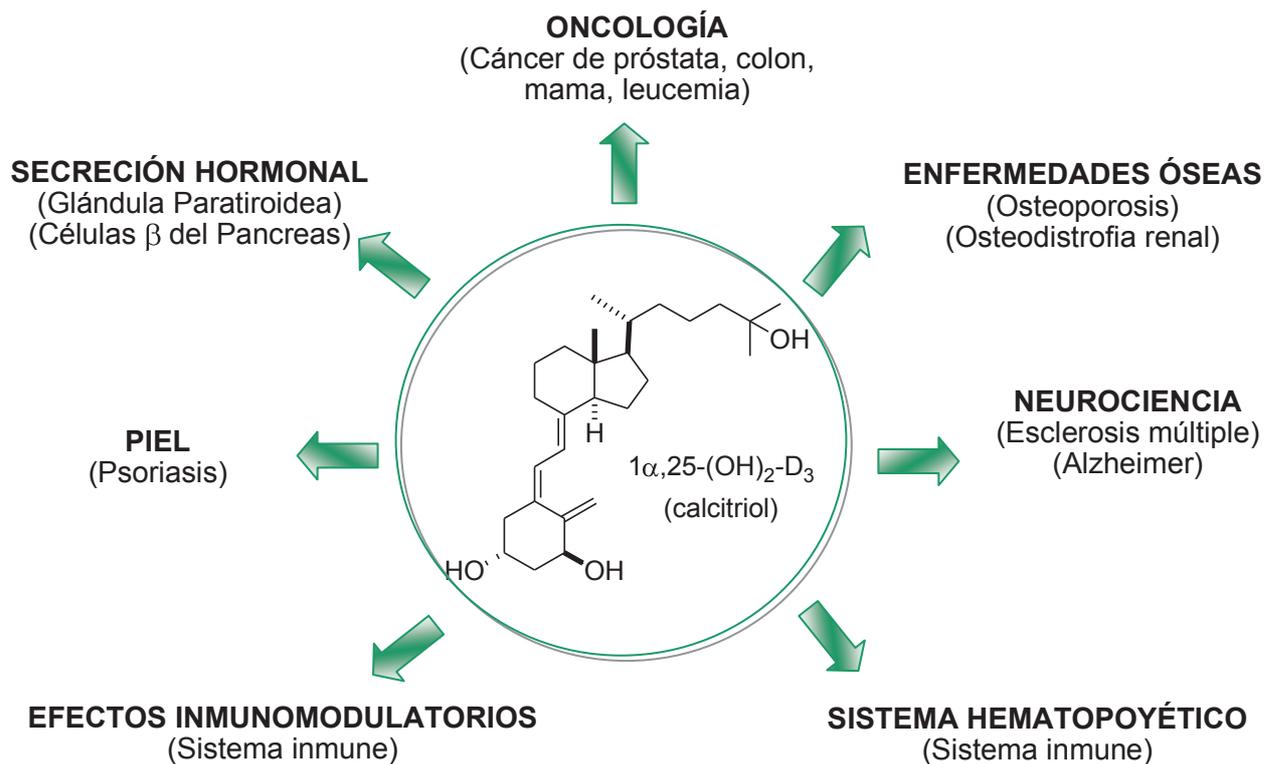
Sin embargo, la relación entre la dosis necesarias para verificar efectos y la capacidad de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  para incrementar el calcio y el fósforo en suero limita su aplicación terapéutica en la mayoría de los casos. En respuesta a esta limitación se han desarrollado análogos de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  con mayor selectividad (**Tabla 2**), los cuales permiten una intervención más efectiva minimizando los efectos secundarios tóxicos (hipercalcemia).

<sup>47</sup> (a) Norman, A. W.; Okamura, W. H.; Bishop, J. E.; Henry, H. L. *Mol. Cell Endocrinol.* **2002**, *197*, 1-13. (b) Boyan, B. D.; Wang, L.; Wong, K. L.; Jo, H.; Schwartz, Z. *Steroids* **2006**, *71*, 286-90.

<sup>48</sup> Campell, F. C.; Xu, H.; El-Tanani, M.; Crowe, P.; Bingham, V. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79*, 1-9.

<sup>49</sup> (a) Brown, A. J.; Slatopolsky, E. *Mol. Aspects Med.* **2008**, *29*, 433-452. (b) Plum, L. A.; DeLuca, H. F. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2010**, *9*, 941-955.

<sup>50</sup> Bikle, D. D. *Trends Endocrinol. Metabol.* **2010**, *21*, 375-384.



**Figura 14.** Relación entre las múltiples funciones de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  y sus aplicaciones terapéuticas.

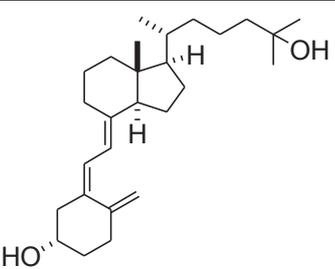
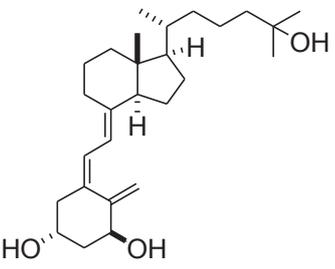
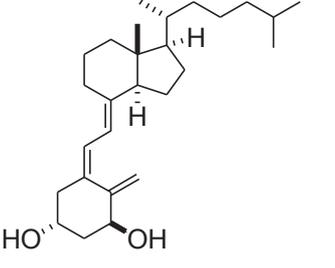
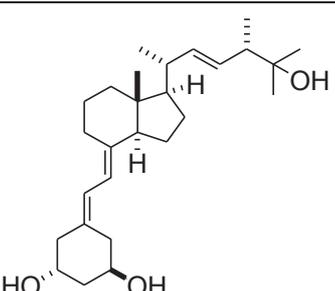
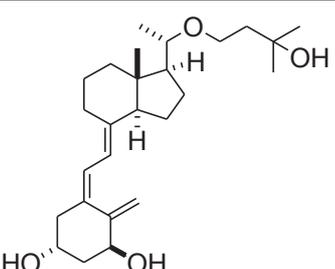
#### 1.4.1 Acción de la hormona $1\alpha,25$ -dihidroxitamina $D_3$ sobre la homeostasis del calcio.

La homeostasis del calcio es el proceso mediante el cual el organismo mantiene constante la concentración de calcio en sangre (0,10 mg/mL). El calcio es necesario para varias funciones críticas como la transmisión neuronal, la contracción muscular, la construcción del esqueleto, la coagulación sanguínea y la adhesión celular; además de jugar un papel único en procesos de transmisión de señales intracelulares y estar involucrado en la regulación de numerosas enzimas. Por lo tanto, el calcio es una de las sustancias más estrechamente reguladas en el organismo.

Este proceso está regulado por las hormonas genéricamente llamadas calciotrópicas, cuyos efectos sobre los órganos diana (intestino, riñón y huesos) determinan el contenido corporal de calcio, magnesio y fósforo. Las principales hormonas que gobiernan la homeostasis del calcio son:  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ , la hormona paratiroidea (PTH) y calcitonina (CT). De estas hormonas, las dos primeras tienden a conservar minerales y a elevar su concentración en plasma, mientras que calcitonina tiende a disminuir la concentración de los mismos. Las principales funciones de los órganos diana

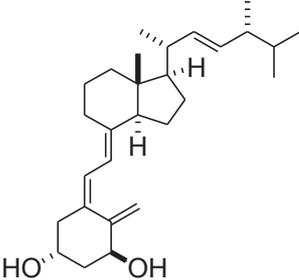
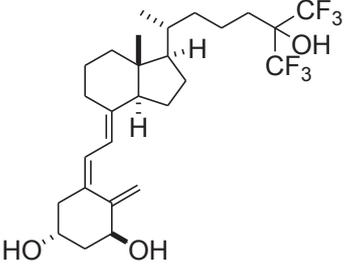
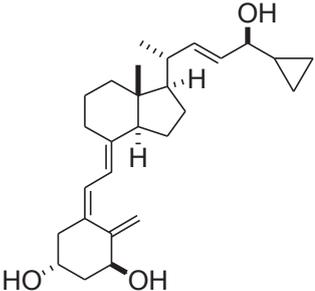
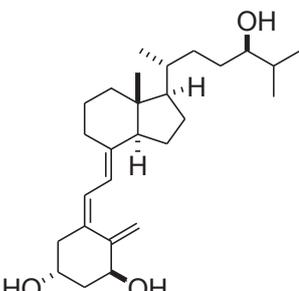
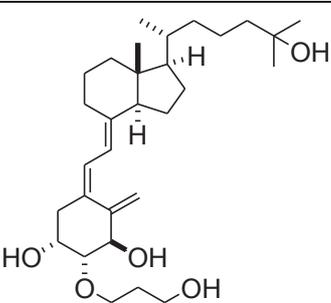
son la adquisición de minerales a partir de la dieta, su remoción o almacenamiento en las reservas corporales y su eliminación o conservación en los líquidos corporales.

**Tabla 2. Análogos de la vitamina D comerciales.**<sup>51</sup>

Compuesto	Estructura Química	Nombre Comercial	Compañía	Indicado para
25-hidroxi-vitamina D <sub>3</sub> (calcidiol)		Calderol	Upjohn	Osteodistrofia renal
			Organon	Osteoporosis
		Didrogyl, Dedrogyl	Rousseland others	Raquitismo, espasmofilia y otras
		Hidroferol	Faes Farma	Osteodistrofia renal, raquitismo y otras
1 $\alpha$ ,25-dihidroxi- vitamina D <sub>3</sub> (calcitriol)		Rocaltrol	Roche	Osteodistrofia renal
				Osteoporosis
		Calcijex	Abbott	Osteodistrofia renal
		Silkis Vectical	Galderma	Psoriasis
1 $\alpha$ -hidroxi-vitamina D <sub>3</sub> (alfacalcidol)		Alfarol	Chugai	Osteoporosis
		Alfarol	Chugai	Osteodistrofia renal, hiperparatiroidismo secundario, raquitismo
		One-Alpha, EinsAlpha, Etalpha	Leo Pharma	Osteodistrofia renal
		Alpha D <sub>3</sub>	Teva Pharmaceuticals	Osteoporosis
1,25-(OH) <sub>2</sub> -19-nor- dihidroxi-vitamina D <sub>2</sub> (paricalcitol)		Zemplar	Abbott	Hiperparatiroidismo secundario
22-oxa-1,25-dihidroxi- vitamina D <sub>3</sub> (maxacalcitol)		Oxarol injection	Chugai	Hiperparatiroidismo secundario
		Oxarol injection	Chugai	Psoriasis

<sup>51</sup> Plum, L. A.; DeLuca, H. F. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2010**, 9, 941-955.

Tabla 2. Análogos de la vitamina D comerciales. (continuación)

Compuesto	Estructura Química	Nombre Comercial	Compañía	Indicado para
1 $\alpha$ ,hidroxi-vitamina D <sub>3</sub> (doxercalciferol)		Hectorol	Bone Care International Genzyme	Hiperparatiroidismo secundario
1,25-(OH) <sub>2</sub> -26,27 - F <sub>6</sub> -vitamina D <sub>3</sub> (falecalcitriol)		Hornel	Taisho Pharmaceuticals Sumitomo Pharmaceuticals	Hiperparatiroidismo secundario
MC-903 (calcipotriol)		Daivonex, Dovonex	Leo Pharmaceuticals Warner Chilcott	Psoriasis
1,24-dihidroxi-vitamina D <sub>3</sub> (tacalcitol)		Bonalfa	Teijin	Psoriasis
		Curatoderm	Merck KgaA	Psoriasis
ED-71 (eldecalcitol)		Edirol	Chugai Taisho Pharmaceuticals	Osteoporosis

La función primaria de la hormona de la Vitamina D es incrementar el calcio y el fósforo en plasma a niveles normales y sobresaturados que conducen a la mineralización del esqueleto. La hormona de la vitamina D eleva las concentraciones de calcio en plasma a través de tres mecanismos separados:

1) Induce la absorción intestinal del calcio y fósforo aportado por la dieta. Este es el rol más crítico de la hormona en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , donde participa en varios pasos del proceso, incrementando la entrada de calcio a través de la membrana plasmática en los enterocitos, mejorando el movimiento de calcio desde el citoplasma y a través de la membrana basolateral hacia la circulación.

2) Estimula la resorción ósea, es decir, permite la movilización de calcio y fósforo desde el hueso hacia la circulación. La hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $\text{D}_3$  activa los osteoblastos que a su vez estimulan los osteoclastos para que éstos transporten el calcio acumulado en los huesos hasta el plasma sanguíneo. Para que tenga lugar la movilización del calcio es necesario que las hormonas PTH y  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $\text{D}_3$  actúen conjuntamente.

3) Reduce la excreción de calcio por orina, incrementando la reabsorción de calcio filtrado en los riñones. Ambas hormonas, la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $\text{D}_3$  y la PTH son requeridas.

Un aspecto importante del sistema endocrino de la vitamina D para mantener la concentración de calcio, es que bajo circunstancias normales utiliza primero el calcio proveniente de la dieta. Cuando este mecanismo falla, especialmente por un inadecuado aporte de calcio al organismo, el sistema utiliza las reservas internas para satisfacer las necesidades del organismo reabsorbiendo calcio desde el hueso y el riñón.

Cuando la concentración de calcio y fósforo es menor al nivel de sobresaturación, la mineralización falla, resultando en raquitismo en los niños, y en osteomalacia en los adultos.

Por otro lado, cuando los niveles de calcio en sangre se elevan por encima de lo normal produce una serie de signos y síntomas que pueden llevar a la muerte. Este proceso conocido como hipercalcemia implica el deterioro neuromuscular, poliuria y subsiguiente deshidratación, y la mineralización de los tejidos blandos. Los síntomas dependen del nivel de calcio en plasma y afectan principalmente al riñón, arteria aorta, intestino, sistema nervioso y corazón.

### 1.4.1.1 Hiperparatiroidismo secundario (HPT 2) en enfermedad crónica de riñón.

El Hiperparatiroidismo Secundario (HPT 2) se produce cuando existe un metabolismo anormal de la vitamina D<sub>3</sub>, incrementando los niveles de la hormona paratiroidea (PTH); lo cual produce pérdida de masa ósea, defectos en la mineralización y un aumento de las fracturas óseas.

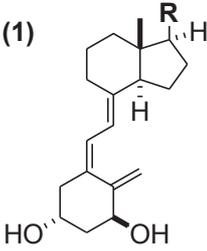
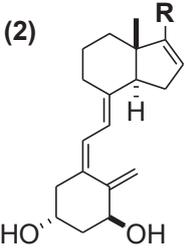
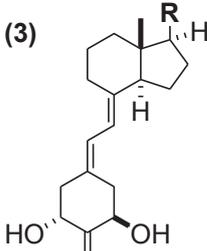
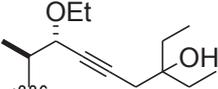
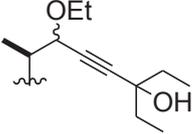
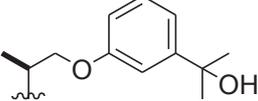
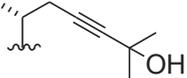
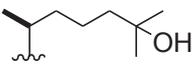
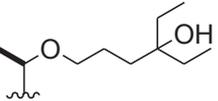
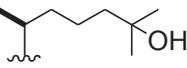
Los pacientes con Enfermedad Crónica de Riñón (ECR) generalmente desarrollan progresivamente esta enfermedad, siendo los factores patogénicos primarios la retención de fósforo y la disminución de la síntesis de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> por el riñón. Ambos factores reducen los niveles de calcio en sangre, y de esta manera estimulan la síntesis y secreción de la hormona paratiroidea (PTH). Los elevados niveles de PTH conducen a una alta incidencia en enfermedades óseas y a una pérdida neta de calcio y fósforo. Los minerales liberados desde el hueso contribuyen a la calcificación vascular y la Enfermedad de la Arteria Coronaria, causando la muerte en pacientes con ECR.

La terapia de reemplazo con 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> a mostrado ser generalmente efectiva reduciendo los niveles de PTH, pero la alta potencia de la hormona natural para estimular la absorción de calcio resulta en una ventana terapéutica relativamente estrecha, especialmente cuando son administradas oralmente sales de calcio para reducir la absorción de fósforo de la dieta. La hipercalcemia no sólo promueve la calcificación ectópica, sino que puede “sobre-suprimir” la PTH, generando una enfermedad ósea adinámica. Este motivo fomentó el desarrollo de análogos de la vitamina D con mayor selectividad, es decir que retengan el efecto supresor de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> sobre la glándula paratiroidea pero con una menor actividad calcémica y fosfatémica, a fin de proveer un tratamiento más seguro y efectivo para controlar el HPT 2. Actualmente, cuatro análogos de la vitamina D se encuentran disponibles comercialmente para el tratamiento de la HPT 2 en pacientes con ECR: Maxacalcitol, Paricalcitol, Doxercalciferol, y Falecalcitriol (**Tabla 2**).<sup>52</sup>

La búsqueda por análogos de la vitamina D más efectivos continúa, por lo cual varios nuevos análogos desarrollados para el tratamiento de HPT 2 fueron evaluados en modelos animal (**Tabla 3**). Entre ellos, los más destacados son 1,25(OH)<sub>2</sub>-dihydrotaquisterol, análogos 20-epi de Leo Pharmaceuticals (CB1093, EB1213, GS1725), 1,25(OH)<sub>2</sub>-16-eno-23-ino-D<sub>3</sub> (Ro-23-7553), 3-epi-1 $\alpha$ (OH)-D<sub>3</sub> (análogo del alfalcidol), (20S)-1 $\alpha$ -hidroxi-2-metileno-19-nor-bishomopregnacalciferol (2Mbisp).<sup>52</sup>

<sup>52</sup> Brown, A. J.; Slatopolsky, E. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2007**, 3, 134-144.

**Tabla 3.** Estructura de algunos análogos del Calcitriol evaluados para el tratamiento de distintas afecciones.

Compuesto	Estructura	Cadena Lateral (R)	Compañía	Posible aplicación
	(1) 			
	(2) 			
	(3) 			
CB1093	(1) 		Leo Pharmaceuticals	HPT 2
GS1725	(1) 		Leo Pharmaceuticals	HPT 2
EB1213	(1) 		Leo Pharmaceuticals	HPT 2
Ro 23-7553	(2) 		Roche	HPT 2
2MbisP	(3) 		Deltanoid Pharmaceuticals	HPT 2
2MD	(3) 		Deltanoid Pharmaceuticals	Osteoporosis
KH1060	(1) 		Leo Pharmaceuticals	Diabetes tipo I Transplantes
MC1288	(1) 		Leo Pharmaceuticals	Artritis Reumatoidea Transplantes

### 1.4.1.2 Osteoporosis.

La osteoporosis es una enfermedad en la cual disminuye la cantidad de minerales en el hueso como resultado de un desbalance entre la resorción y la formación ósea, dando una pérdida neta de masa ósea y susceptibilidad a fracturas. La  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  puede regular ambos aspectos en los cambios óseos, a través de mecanismos directos o indirectos. Por lo tanto, la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  y sus análogos tienen un gran potencial para el tratamiento y la prevención de la osteoporosis.

Teniendo en cuenta que la osteoporosis no es una enfermedad con una única patogénesis, el rol terapéutico de la vitamina D debe ser evaluado en cada una de las diferentes clases de osteoporosis (posmenopáusicas, inducida por esteroides, osteoporosis masculina), considerando que aún dentro de cada una de esas categorías es probable una gran heterogeneidad entre pacientes.<sup>53</sup>

En casi todos los estudios con la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  o con su precursor,  $1\alpha$ -hidroxivitamina  $D_3$  (alfacalcidol), se encontraron incrementos en la densidad mineral ósea. Esto puede deberse, al menos en parte, a una mejor absorción de calcio; sin embargo la hipercalcemia fue un incidente común. Más recientemente, la combinación de alfacalcidol con un bis-fosfonato anti-reabsortivo (alendronato) mejoró la masa ósea, y redujo la incidencia de caídas y fracturas.<sup>54</sup> Por otro lado, entre los análogos de la vitamina D desarrollados para el tratamiento de la osteoporosis, los más prometedores resultan ser aquellos que incorporan sustituyentes en el carbono 2 del anillo A, ya que se ha observado que promueven la formación ósea y una reabsorción lenta con una menor tendencia a producir hipercalcemia. El análogo ED-71 (eldecalcitol) desarrollado por Chugai Pharmaceutical Co. fue recientemente aprobado para el tratamiento de la osteoporosis en Japón (**Tabla 2**).<sup>55</sup> Este análogo tiene efectos más fuertes sobre la densidad mineral ósea que  $1\alpha(OH)D_3$  (alfacalcidol) o  $1,25(OH)_2D_3$ , demostrando reducir la incidencia de fracturas óseas en los ensayos clínicos de fase III a gran escala. Otro análogo sintético de la vitamina D con sustitución en C2, 2-metileno-19-nor-20-epi- $1,25(OH)_2D_3$  (2MD), completó recientemente los ensayos clínicos de fase II en mujeres postmenopáusicas (**Tabla 3**).<sup>56</sup>

<sup>53</sup> Feldman, D.; Malloy, P. J.; Krishnan, A. V.; Balint, E.; *Osteoporosis*; Feldman, D.; Marcus, R.; Nelson, D.; Rosen, C. J., Ed. Elsevier Inc, **2008**, pág. 317.

<sup>54</sup> Ringe, J. D.; Farahmand, P.; Schacht, E.; Rozehnal, A. *Rheumatol. Int.* **2007**, *27*, 425-434.

<sup>55</sup> (a) Matsumoto, T.; Takano, T.; Yamakido, S.; Takahashi, F.; Tsuji, N.; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *121*, 261-264. (b) <http://www.chugai-pharm.co.jp/hc/ss/english/news/detail/20110121150000.html>.

<sup>56</sup> (a) Ke, H. Z.; Qi, H.; Crawford, D. T.; Simmons, H. A.; Xu, G.; Li, M.; Plum, L.; Clagett-Dame, M.; DeLuca, H. F.; Thompson, D. D.; Brown, T. A. *J. Bone Miner. Res.* **2005**, *20*, 1742-1755. (b) U. S. National Institutes of Health: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00715676>.

### 1.4.2 Acción de la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> sobre el sistema inmunológico.

La presencia de VDR en linfocitos humanos fue una de las primeras observaciones que relacionaron a la vitamina D o sus metabolitos en respuestas no calciotrópicas.<sup>57</sup> La expresión del VDR en la mayoría de las células del sistema inmune, especialmente en células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas) y en linfocitos, proporcionó la evidencia de un papel funcional para la vitamina D como modulador de la respuesta inmune. Existen dos formas de inmunidad, la adaptativa y la innata, y ambas son reguladas por la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.<sup>58</sup>

La respuesta inmune adaptativa involucra a los linfocitos T y B para combatir específicamente la fuente del antígeno que les presentan las células dendríticas y macrófagos. La 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> ejerce efectos directos mediados por el VDR en los linfocitos B, inhibiendo su proliferación, diferenciación y producción de inmunoglobulina; lo cual sugirió un potencial campo de acción para la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y sus análogos en el tratamiento de desordenes relacionados con las células B, tales como lupus eritematoso sistémico. Por otro lado, la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> modula la proliferación y función del linfocito T, actuando tanto directamente sobre dichos linfocitos como indirectamente sobre células presentadoras de antígeno (APCs). La 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> influye en este proceso, inhibiendo el desarrollo de los linfocitos Th1 y Th17, mientras que promueve el de los linfocitos Th2 y Treg (linfocitos regulatorios).<sup>58b</sup>

Estos potentes efectos de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> para promover de manera preferencial la respuesta inmune celular, mediada por linfocitos T, antes que la respuesta inmune mediante anticuerpos (humoral) mediada por linfocitos B, parece ser uno de los mecanismos por los cuales la vitamina D puede ejercer efectos beneficiosos en enfermedades autoinmunes. En particular, la inducción de los Treg por parte de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> o sus análogos, parece ser una consideración clave no sólo en el combate de enfermedades autoinmunes sino también para promover la tolerancia inmunológica seguida al trasplante de órganos.<sup>59</sup>

Por otro lado, la respuesta inmune innata es activada por una gran variedad de estímulos ambientales y es la primera línea de defensa contra patógenos invasores. La activación de macrófagos por patógenos, a través de receptores tipo Toll, induce la

<sup>57</sup> Provvedini, D. M.; Tsoukas, C. D.; Deftos, L. J.; Manolagas, S. C. *Science* **1983**, *221*, 1181-1183.

<sup>58</sup> (a) van Etten, E.; Mathieu, C. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *97*, 93-101. (b) Adams, J. S.; Hewison, M. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2008**, *4*, 80-90.

<sup>59</sup> Gregori, S.; Casorati, M.; Amuchastegui, S.; Smioldo, S.; Davalli, A. M.; Adorini, L. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 1945-1953.

expresión de la  $1\alpha$ -hidroxilasa y del VDR.<sup>60</sup> En presencia de suficiente  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ , la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  producida endógenamente puede inducir el péptido antimicrobiano catelicidina, el cual tiene acción directa sobre la muerte de los patógenos.<sup>61</sup>

#### 1.4.2.1 Enfermedades Autoinmunes.

Aunque las enfermedades autoinmunes están caracterizadas por una predisposición genética, actualmente resultan de interés los factores ambientales que puedan contribuir al desarrollo de estos desórdenes, tales como la deficiencia de vitamina D. Los estudios epidemiológicos evidencian una correlación entre la deficiencia de vitamina D y enfermedades autoinmunes, como diabetes tipo I, artritis reumatoidea, esclerosis múltiple y lupus eritematoso sistémico.<sup>62</sup>

La capacidad de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  y de sus análogos para prevenir o retardar la progresión de enfermedades autoinmunes ha sido estudiada extensivamente en distintos modelos animales, apropiados para cada caso.<sup>63</sup> En la siguiente tabla se resumen los análogos estudiados que mostraron además, ser menos calcémicos que la hormona natural.

**Tabla 4.** Análogos del calcitriol evaluados en distintas enfermedades autoinmunes.

<b>Diabetes tipo I</b>	20-epi-22-oxa-26a,27a-bishomo- $1,25(OH)_2D_3$ (KH1060) <sup>a</sup> 1,25(OH) <sub>2</sub> -16,23-dieno-26,27-F <sub>6</sub> -19-nor- $D_3$ 19-nor-14,20-bisepi-23-ino- $1,25(OH)_2D_3$
<b>Esclerosis Múltiple</b>	1,25(OH) <sub>2</sub> -24-bishomo-23,24-dieno- $D_3$ 19-nor-14,20-bisepi-23-ino- $1,25(OH)_2D_3$
<b>Lupus Eritematoso Sistémico</b>	Tacalcitol <sup>b</sup> Maxacalcitol <sup>b</sup>
<b>Artritis Reumatoidea</b>	20-epi- $1,25(OH)_2D_3$ (MC1288) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Tabla 3. <sup>b</sup> Tabla 2.

La *Psoriasis* es una enfermedad autoinmune de la piel. Si bien su patogénesis no está completamente entendida, parece estar mediada por células T e involucrar la

<sup>60</sup> Liu, P. T.; Stenger, S.; Li, H.; Wenzel, L.; Tan, B. H.; Krutzik, S. R.; Ochoa, M. T.; Schaubert, J.; Wu, K.; Meinken, C.; Kamen, D. L.; Wagner, M.; Bals, R.; Steinmeyer, A.; Zugel, U.; Gallo, R. L.; Eisenberg, D.; Hewison, M.; Hollis, B. W.; Adams, J. S.; Bloom, B. R.; Modlin, R. L., *Science* **2006**, *311*, 1770-1773.

<sup>61</sup> (a) Lagishetty, V.; Chun, R. F.; Liu, N. Q.; Lisse, T. S.; Adams, J. S.; Hewison, M. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *121*, 228-233. (b) Hewison, M. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2010**, *321*, 103-111.

<sup>62</sup> (a) Cutolo, M.; Otsa, K.; Uprus, M.; Paolino, S.; Serio, B. *Autoimmun. Rev.* **2007**, *7*, 59-64. (b) Doria, A.; Arienti, S.; Rampudda, M.; Canova, M.; Tonon, M.; Sarzi-Puttini, P. *Autoimmun. Rev.* **2008**, *7*, 192-197.

<sup>63</sup> Adorini, L. *Cell. Immunol.* **2005**, *233*, 115-124.

hiperproliferación de queratinocitos, lo cual causa una queratinización prematura e incompleta. La habilidad de los metabolitos de la vitamina D, descubierta en los años 80, para suprimir la inflamación y bloquear la proliferación, impulsó el desarrollo y la síntesis de análogos menos tóxicos o calcémicos, de los cuales el Calcipotriol (MC903) fue el primero en ser introducido en el mercado. Dicho análogo tiene la misma afinidad por el VDR que la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ , y comparte sus habilidades para inducir la diferenciación terminal de queratinocitos proliferantes. El Calcipotriol (**Tabla 2**) está actualmente aprobado para el tratamiento tópico de la psoriasis en Europa y Estados Unidos, y representa casi el 50% de las drogas usadas para combatir esta enfermedad. Otros análogos de la vitamina D introducidos posteriormente para el tratamiento de la psoriasis son el Tacalcitol y el Maxacalcitol (**Tabla 2**). El primero mostró ser tan efectivo como la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ , aunque sólo levemente menos calcémico. Mientras que el Maxacalcitol, es menos calcémico y más efectivo que la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  en la diferenciación terminal de queratinocitos *in vivo*. Actualmente se encuentra disponible en Japón para el tratamiento de este desorden.

#### 1.4.2.2 Transplante de órganos y tejidos.

Otra aplicación, en la inmunosupresión mediada por vitamina D, se da en el caso de transplante de órganos y tejidos. En animales experimentales, la supervivencia de los alotransplantes de aorta, hueso, hueso marrón, corazón, riñón, hígado, islas pancreáticas, piel e intestino delgado, fue significativamente aumentada por la administración de varios metabolitos y/o análogos de la vitamina D.<sup>64</sup> Además, al menos dos estudios mostraron que una combinación de análogos de la vitamina D (KH1060 y MC1288) y ciclosporina A mejora la sobrevida de los alotransplantes.<sup>65</sup> De esta manera el uso de análogos de la vitamina D para inmunosupresión permitiría administrar dosis menores, menos tóxicas, de ciclosporina A, proveyendo una alternativa a los glucocorticoides en regímenes terapéuticos combinados.

#### 1.4.3 Vitamina D y el cáncer.

Se conoce que la hormona de la vitamina D participa, en cierta medida, del control de la proliferación y la diferenciación de muchos tipos de células. Este hecho, impulsó el interés por el potencial de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  en la prevención y/o el tratamiento

<sup>64</sup> Adorini, L.; Amuchastegui, S.; Daniel, K. C. *Immunol. Lett.* **2005**, *100*, 34-41.

<sup>65</sup> (a) Veyron, P.; Pamphile, R.; Binderup, L.; Touraine, J. L. *Transpl. Immunol.* **1993**, *1*, 72-76. (b) Johnsson, C.; Binderup, L.; Tufveson, G. *Transpl. Immunol.* **1995**, *3*, 245-250.

de condiciones donde dicha regulación fracasa, centrando el foco de atención en enfermedades o desórdenes como el cáncer.

Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> desempeña un papel importante en el control de la proliferación, diferenciación y muerte celular (apoptosis) de muchos tipos de células normales y carcinomas tales como cánceres de mama, próstata, colon, piel, cerebro y leucemia mieloide, entre otros.<sup>66</sup> La hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> puede además interferir en pasos específicos para inhibir la progresión del cáncer, bloqueando la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos),<sup>67</sup> inhibiendo la invasión de células cancerosas<sup>68</sup> y moderando las respuestas inmunes (autofagia).<sup>66</sup> Los múltiples mecanismos por los que actúa la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> son complejos y parecen depender del tipo de célula y del ambiente de crecimiento de éstas. El receptor de la vitamina D (VDR), detectado en la mayoría de las células y tejidos, probablemente juega un rol general en el control del crecimiento celular.

La evidencia epidemiológica apoya la importancia de un adecuado nivel nutricional de vitamina D, incluida la exposición solar, para la prevención de un extenso número de cánceres.<sup>69</sup> Aunque son numerosos los tipos de cáncer que muestran una reducción, la mayor atención ha sido puesta en el cáncer de mama, colon y próstata.

#### 1.4.3.1 Cáncer de Mama.

El cáncer de mama es el cáncer más diagnosticado en mujeres en todo el mundo, con una mayor incidencia en Norte América, Australia y Europa del Este y del Norte. Los estudios epidemiológicos muestran una relación inversa entre la exposición a la radiación solar y la incidencia y/o mortalidad por cáncer de mama.<sup>70</sup> La hormona 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y sus análogos inhiben la proliferación de las células de cáncer de mama *in vitro* y la progresión del tumor *in vivo*, ya sea en ratones inmunosuprimidos con cáncer de mama humano o en ratas con cáncer de mama inducido con nitrosometilurea (NMU). El VDR se encuentra presente tanto en las líneas celulares normales como de cáncer de mama.<sup>71</sup> Además, las células epiteliales mamarias pueden sintetizar calcitriol, sugiriendo un sistema autocrino para el control de proliferación dependiente de la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> circulante, lo cual acentúa la importancia de mantener los niveles nutricionales de la vitamina D. El calcitriol o sus análogos exhiben efectos antiproliferativos

<sup>66</sup> Brown, A. J.; Slatopolsky, E. *Mol. Aspects Med.* **2008**, *29*, 433-452.

<sup>67</sup> Hansen, C. M.; Frandsen, T. L.; Brunner, N.; Binderup, L. *Clin. Exp. Metastasis* **1994**, *12*, 195-202.

<sup>68</sup> Koli, K.; Keski-Oja, J. *Cell Growth Differ.* **2000**, *11*, 221-229.

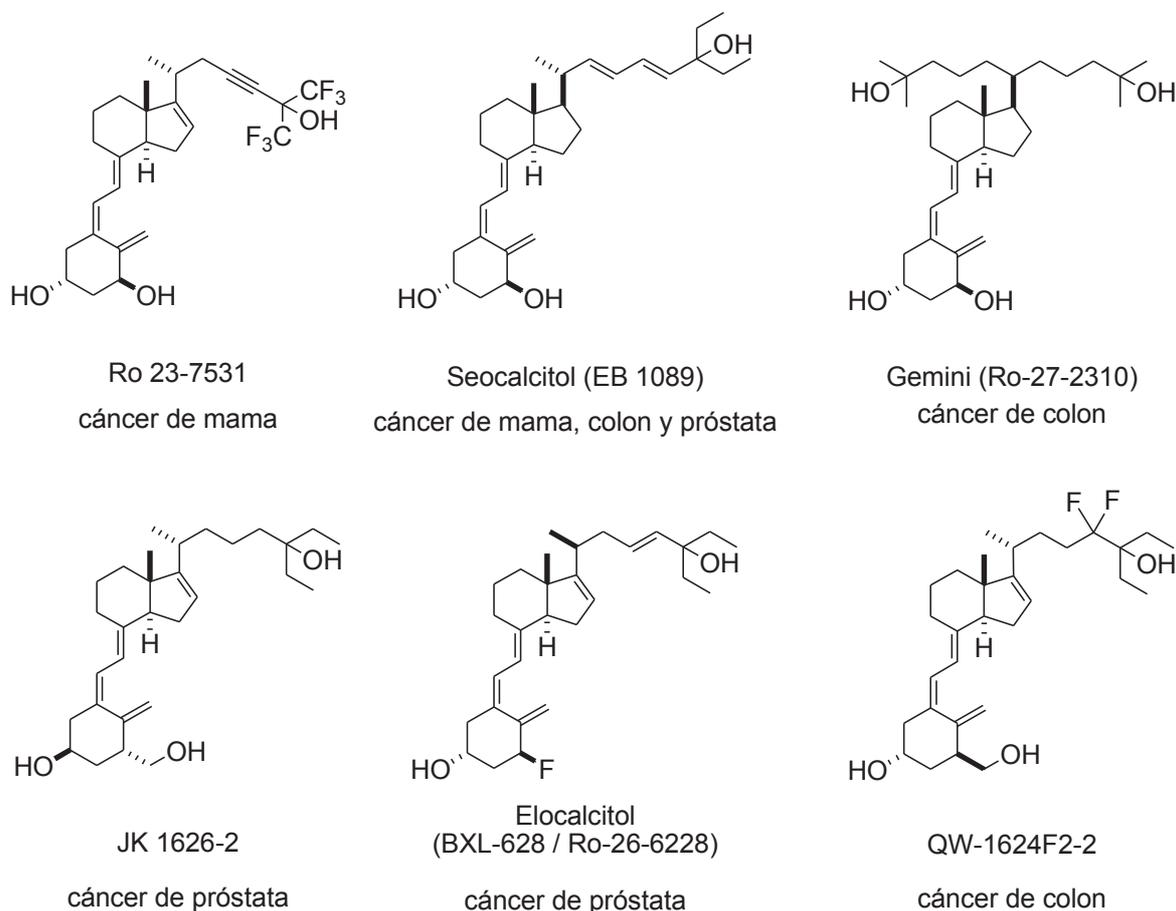
<sup>69</sup> (a) Giovannucci, E. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *624*, 31-42. (b) Garland, C. F.; Gorham, E. D.; Mohr, S. B.; Garland, F. C. *Ann. Epidemiol.* **2009**, *19*, 468-483.

<sup>70</sup> Bertone-Johnson, E. R. *Ann. Epidemiol.* **2009**, *19*, 462-467.

<sup>71</sup> Welsh, J.; Wietzke, J. A.; Zinser, G. M.; Byrne, B.; Smith, K.; Narvaez, C. J. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 2425S-2433S.

en células de cáncer de mama por diferentes mecanismos.<sup>72</sup> Uno de los ellos implica al receptor  $\alpha$  de estrógeno, sobre el cual el calcitriol actúa disminuyendo sus niveles, inhibiendo de esta manera el estímulo del estrógeno sobre el crecimiento de las células cancerosas.<sup>73</sup> Además de sus efectos antiproliferativos, el calcitriol estimula la apoptosis en algunas líneas de este cáncer y mejora la receptividad de células cancerosas a agentes citotóxicos convencionales.<sup>74</sup>

Los análogos Maxacalcitol, Ro-24-5531 y EB1089 mostraron disminuir la progresión del tumor en distintos modelos *in vivo* en dosis no calcémicas (**Figura 15**). El potencial terapéutico del análogo EB1089 se evaluó en un pequeño estudio de fase I con pacientes de cáncer de mama. Si bien no se observaron efectos antitumorales claros, algunos pacientes mostraron una estabilización de la enfermedad durante algunos meses.<sup>75</sup>



**Figura 15.** Estructura de algunos análogos del calcitriol evaluados en cáncer.

<sup>72</sup> Welsh, J.; Wietzke, J. A.; Zinser, G. M.; Smyczek, S.; Romu, S.; Tribble, E.; Welsh, J. C.; Byrne, B.; Narvaez, C. J. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *83*, 85-92.

<sup>73</sup> (a) Davoodi, F.; Brenner, R. V.; Evans, S. R.; Schumaker, L. M.; Shabahang, M.; Nauta, R. J.; Buras, R. R. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *54*, 147-153. (b) Swami, S.; Krishnan, A. V.; Feldman, D. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 3371-3379.

<sup>74</sup> (a) Welsh, J.; Van Weelden, K.; Flanagan, L.; Byrne, I.; Nolan, E.; Narvaez, C. J. *Subcell. Biochem.* **1998**, *30*, 245-270. (b) Lowe, L.; Hansen, C. M.; Senaratne, S.; Colston, K. W. *Recent Results Cancer Res.* **2003**, *164*, 99-110.

<sup>75</sup> Gulliford, T.; English, J.; Colston, K. W.; Menday, P.; Moller, S.; Coombes, R. C. *Br. J. Cancer* **1998**, *78*, 6-13.

### 1.4.3.2 Cáncer de Próstata.

El cáncer de próstata es el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado en hombres. Las proyecciones para el 2007 indicaban 782.600 nuevos casos, de los cuales unas tres cuartas partes esperaban ser diagnosticados en países desarrollados económicamente.<sup>76</sup>

Varios estudios han mostrado que la baja exposición a la luz UV o el bajo nivel sérico de la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> aumentan el riesgo de desarrollar cáncer de próstata.<sup>77</sup>

Las células de próstata contienen tanto el VDR como la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa, por lo tanto sintetizan calcitriol de manera autocrina. Se encontró que muchas líneas celulares de cáncer de próstata tienen disminuída la expresión de la 1 $\alpha$ -hidroxilasa, lo cual se correlaciona con una menor inhibición del crecimiento en respuesta a la 25-OHD<sub>3</sub>. Sin embargo, debido a que conservan el VDR, las células cancerosas de próstata responden al tratamiento con calcitriol o sus análogos (**Figura 15**).<sup>78</sup>

La hormona 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tiene un potente efecto antiproliferativo y prodiferenciador *in vitro* en muchas líneas celulares de cáncer de próstata, e *in vivo* en múltiples modelos animales para este tipo de cáncer. Los mecanismos por los que 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> suprime el crecimiento incluyen la inhibición de la síntesis y acción de prostaglandinas, incluyendo una disminución en la expresión de la molécula proinflamatoria, COX-2 (ciclooxigenasa-2).<sup>79</sup> Dicha hormona también puede inhibir el crecimiento de algunas líneas celulares de cáncer de próstata mediante la inducción de apoptosis, bloqueando la autofosforilación de los receptores KGF y IGF-1 y reduciendo la proteína antiapoptótica bcl-2.<sup>80</sup>

Varios análogos como el BXL-628 (elocalcitol), EB1089 (seocalcitol), Maxacalcitol y JK-1626-2 presentan resultados similares o superiores al Calcitriol *in vivo* en el tratamiento de la enfermedad pero con un menor efecto calcémico.<sup>81</sup> Varios ensayos clínicos utilizando análogos de vitamina D ya han sido completados o están en camino.<sup>82a</sup> Entre ellos, se destacan los estudios de fase II con el análogo BXL628, en pacientes con hiperplasia prostática benigna,<sup>82b</sup> y con Paricalcitol, en pacientes con cáncer de próstata avanzado y metástasis ósea.<sup>82c</sup> Por otro lado, la combinación de calcitriol con la droga quimioterapéutica

<sup>76</sup> American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2010*. Atlanta: American Cancer Society; **2010**. URL: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/acspc-024113.pdf>

<sup>77</sup> Li, H.; Stampfer, M. J.; Hollis, J. B. W.; Mucci, L. A.; Gaziano, J. M.; Hunter, D.; Giovannucci, E. L.; Ma, J. *PLoS Med* **2007**, *4*, e103.

<sup>78</sup> Schwartz, G. G. *Ann. Epidemiol.* **2009**, *19*, 96-102.

<sup>79</sup> Krishnan, A. V.; Moreno, J.; Nonn, L.; Malloy, P.; Swami, S.; Peng, L.; Peehl, D. M.; Feldman, D. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *103*, 694-702.

<sup>80</sup> Crescioli, C.; Ferruzzi, P.; Caporali, A.; Scaltriti, M.; Bettuzzi, S.; Mancina, R.; Gelmini, S.; Serio, M.; Villari, D.; Vannelli, G. B.; Colli, E.; Adorini, L.; Maggi, M. *Eur. J. Endocrinol.* **2004**, *150*, 591-603.

<sup>81</sup> Chiang, K.; Chen, T. C. *World J. Gastroenterol.* **2009**, *15*, 3349-3354.

<sup>82</sup> (a) Chen, T. C.; Holick, M. F.; Lokeshwar, B. L.; Burnstein, K. L.; Schwartz, G. G. *Recent Results Cancer Res.* **2003**, *164*, 273-288. (b) Adorini, L.; Penna, G.; Amuchastegui, S.; Cossetti, C.; Aquilano, F.; Mariani, R.; Fibbi, B.; Morelli, A.; Uskokovic, M.; Colli, E.; Maggi, M. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *103*, 689-693. (c) ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00634582.

docetaxel produce efectos favorables en la progresión de la enfermedad. Un ensayo clínico de fase III se está llevando a cabo a fin de probar la eficacia y seguridad de esta combinación.<sup>83</sup>

### 1.4.3.3 Cáncer de Colon.

El cáncer de colon es la tercera causa de muerte en los países occidentales. Los estudios epidemiológicos indican que existe una relación inversa entre calcio, vitamina D, ingesta láctea, exposición solar, niveles en sangre de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y la incidencia y/o mortalidad de cáncer de colon.<sup>84</sup> Estos estudios indican que personas que poseen niveles en sangre de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> menores a 12,5 nmol/L poseen de 2 a 3 veces más riesgo de padecer cáncer de colon.<sup>85</sup>

Las células del colon poseen el receptor VDR y además tienen la capacidad de sintetizar la hormona calcitriol por la acción de 1 $\alpha$ -hidroxilasa, lo cual indica que el Calcitriol y sus análogos pueden ser importantes objetivos terapéuticos en la prevención y tratamiento de este tipo de cáncer. La hormona calcitriol, y sus análogos, inducen la diferenciación de líneas celulares de cáncer en fases tempranas e inhiben la proliferación celular además de inducir la expresión de E-cadherina (reduce la posibilidad de movilización de células cancerosas).<sup>86</sup>

Estudios recientes demuestran que el análogo QW-1624F2-2 es más efectivo en la inhibición y diferenciación celular y posee menores efectos calcémicos que el análogo EB-1089 (**Figura 15**).<sup>87</sup> Otro análogo de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> con dos cadenas laterales, llamado en forma genérica Gemini, y su forma deuterada, muestran una alta potencia antiproliferativa con una muy baja actividad calcémica. En particular, el Gemini deuterado redujo un 50% el crecimiento del tumor y evitó la metástasis en cáncer de colon *in vivo*, sin efectos calcémicos.<sup>88</sup> Estos resultados impulsaron ensayos clínicos de Fase I para este tipo de cáncer.

<sup>83</sup> Beer, T. M.; Ryan, C. W.; Venner, P. M.; Petrylak, D. P.; Chatta, G. S.; Ruether, J. D.; Redfern, C. H.; Fehrenbacher, L.; Saleh, M. N.; Waterhouse, D. M.; Carducci, M. A.; Vicario, D.; Dreicer, R.; Higano, C. S.; Ahmann, F. R.; Chi, K. N.; Henner, W. D.; Arroyo, A.; Clow, F. W. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 669–674.

<sup>84</sup> Tangpricha, V.; Spira, C.; Yao, M.; Chen, T. C.; Wolfe, M. M.; Holick, M. F. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2350-2354.

<sup>85</sup> Giovannucci, E. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *121*, 349-354.

<sup>86</sup> Palmer, H. G.; Sanchez-Carbayo, M.; Ordoñez-Moran, P.; Larriba, M. J.; Cordon-Cardo, C.; Muñoz, A. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 7799-7806.

<sup>87</sup> Reddy, C. D.; Ratnakar, P.; Guttapalli, A.; Maris, J. M.; Yanamandra, N.; Rachamalla, A.; Phillips, P. C.; Posner, G. H. *J. Cell. Biochem.* **2005**, *97*, 198-206.

<sup>88</sup> Spina, C. S.; Ton, L.; Yao, M.; Maehr, H.; Wolfe, M. M.; Uskokovic, M.; Adorini, L.; Holick, M. F. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *103*, 757-762.

#### 1.4.4 Mecanismos de Selectividad.<sup>66,89</sup>

Los análogos de la vitamina D que actualmente se encuentran en uso clínico, surgen a partir de modificaciones químicas en su estructura y subsecuente *screening* para actividades específicas. Los mecanismos por los cuales estos análogos resultan ser más o menos efectivos que la hormona natural no se conocen en todos los casos.

La elucidación de los factores responsables de la selectividad terapéutica de los análogos de la vitamina D permitiría facilitar el desarrollo de derivados más efectivos. Los distintos pasos que llevan a la activación o desactivación de la vitamina D o sus metabolitos están determinados por la interacción con un grupo de proteínas relativamente pequeño: el receptor nVDR, la proteína de unión de la vitamina D en suero (DBP), la 24-hidroxilasa y otras enzimas metabolizantes, el receptor de membrana y proteínas de unión intracelulares. Las modificaciones estructurales en los análogos de la vitamina D pueden afectar esas interacciones y, en última instancia, la actividad biológica de dichos compuestos, explicando en algunos casos las actividades selectivas observadas *in vivo*.

La actividad biológica de los derivados de la vitamina D se encuentra casi enteramente mediada por el receptor nuclear VDR, por lo tanto un requerimiento fundamental es que los análogos retengan una significativa afinidad por el VDR. Los ensayos de unión al VDR permitieron determinar que el grupo hidroxilo en posición 1 $\alpha$  del anillo A es una parte estructural clave para la unión al VDR. Otras partes como la cadena lateral, pueden ser modificadas ampliamente con un mínimo efecto sobre la afinidad de unión al VDR. Sin embargo, aunque una alta afinidad es importante, los ensayos de correlación estructura-afinidad no demuestran una relación lineal entre la afinidad al VDR y la selectividad de un compuesto a nivel celular. Las estructuras cristalinas del dominio de unión al ligando (LBD) del VDR mutado, publicadas primero por Moras y colaboradores<sup>90</sup> y más recientemente por Vanhooke,<sup>91</sup> revelaron que el bolsillo de VDR para la hormona de vitamina D es grande y puede acomodar una variedad de análogos. Se ha hecho además un gran esfuerzo en trabajo de modelado *in silico*,<sup>92</sup> pero hasta ahora no hay indicios claros por los cuales los análogos de vitamina D puedan ser diseñados a partir de las conclusiones que surgen de los estudios de la estructura cristalina. De hecho, compuestos de la vitamina D con marcadas diferencias en actividad biológica no producen un cambio en la estructura cristalina del LBD del VDR.<sup>90,91</sup> Es posible, sin embargo, que en solución el ligando pueda afectar notablemente la estructura del LBD, determinando si se unen ciertos co-activadores o co-represores y por lo tanto si un gen es transcrito o no.

<sup>89</sup> Bouillon, R.; Verlinden, L.; Eelen, G.; De Clercq, P.; Vandewalle, M.; Mathieu, C.; Verstuyf, A. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *97*, 21-30.

<sup>90</sup> Mitschler, A.; Moras, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5491-5496.

<sup>91</sup> Vanhooke, J. L.; Benning, M. M.; Bauer, C. B.; Pike, J. W.; DeLuca, H. F. *Biochem.* **2004**, *43*, 4101-4110.

<sup>92</sup> Vanhooke, J. L.; Tadi, B. P.; Benning, M. M.; Plum, L. A.; DeLuca, H. F. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *460*, 161-165.

La afinidad por la interacción con el DBP puede influenciar, en gran medida, la actividad de los análogos de la vitamina D desde el punto de vista farmacológico. Los análogos con mayor afinidad al DBP que la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  tienden a tener mayor vida media circulante y menor accesibilidad a los tejidos blanco. Los elementos estructurales de los compuestos de la vitamina D que afectan la unión al DBP son diferentes a los correspondientes a la interacción con el VDR. El grupo  $1\alpha$ -hidroxilo no es requerido para la unión con el DBP, mientras que las modificaciones de la cadena lateral tienden a alterar la asociación con el DBP causando que el análogo sea removido o pobremente absorbido en la circulación.

Por otro lado, el metabolismo diferencial puede jugar un rol muy importante en la selectividad de los análogos de la vitamina D, ya que las vías involucradas pueden activar o desactivar los metabolitos correspondientes. Las prodrogas  $1\alpha$ -hidroxivitamina  $D_2$  y  $1\alpha$ -hidroxivitamina  $D_3$ , por ejemplo, requieren la hidroxilación en el carbono 25 o en el carbono 24, según el caso, a fin de unirse al VDR con mayor afinidad. Las mismas son eficientemente hidroxiladas en la posición 25 en el hígado rindiendo compuestos activados "circulantes". Sin embargo, estas no se unen bien, o nada en absoluto, al DBP por lo que pueden ser rápidamente tomadas por tejidos periféricos. Esta activación diferencial en varias células blanco puede proveer un mecanismo para la selectividad de células específicas. Las vías catabólicas, en cambio, juegan un rol importante en la atenuación de la actividad de compuestos de la vitamina D. La vía más importante es la oxidación de la cadena lateral catalizada por la 24-hidroxilasa. La importancia de esta enzima es evidente en estudios que demuestran la gran potencia de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  cuando la 24-hidroxilasa es químicamente inhibida o silenciada epigenéticamente. Las diferencias en la velocidad o en los productos finales de este metabolismo pueden afectar en gran medida la actividad biológica, ya que los análogos que son más rápidamente catabolizados tendrán menores niveles intracelulares que los compuestos catabolizados de forma más lenta.

La  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  puede actuar en la membrana celular de células blanco para producir respuestas rápidas aparentemente no-genómicas, además de promover la activación del VDR para controlar la transcripción de genes. Si bien la identidad de estos receptores es un tema todavía en debate, debido a que la evidencia actual indica roles tanto para los VDR localizados en la membrana como para el receptor MARRS (Membrane-Associated Rapid Response Steroid binding), la especificidad del ligando para las acciones rápidas es distinta al de la transcripción de genes. Análogos tales como el  $1,25(\text{OH})_2$ -lumisterol que están fijos en la configuración 6-*cis* activan las vías de respuesta rápida y compiten con la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  por la unión al receptor MARRS, pero no compiten con la  $1,25(\text{OH})_2D_3$  por la unión al VDR ni tampoco por regular la transcripción de

genes. En vista de la exclusiva especificidad de ligando para las respuestas rápidas, esta vía es un potencial blanco para el diseño de fármacos.

Finalmente, las proteínas de unión intracelulares representan otro mecanismo a través de los cuales los análogos de la vitamina D pueden ejercer sus acciones selectivas. Estudios recientes indican que estas proteínas pueden unirse con una alta afinidad a compuestos de la vitamina D e influenciar su metabolismo y actividad, jugando probablemente un rol en la modulación de las acciones endocrinas y autocrina/paracrina.

Respecto a los mecanismos de selectividad involucrados en los análogos de vitamina D con aplicación clínica, se sabe por ejemplo, que el Calcipotriol, utilizado tópicamente para el tratamiento de psoriasis, ejerce sus acciones sólo en queratinocitos, ya que tiene una vida media de minutos una vez que ha entrado a la circulación, lo que significa que es catabolizado antes de tener la oportunidad de activar la absorción de calcio y la movilización de calcio desde el hueso. Un mecanismo semejante se supone que ocurre con el maxacalcitol. Los análogos con la cadena lateral de la vitamina D<sub>2</sub> parecen ser menos efectivos en la activación de los sistemas necesarios para aumentar la absorción de calcio en el intestino y/o elevar el calcio en suero. Por su parte, el Falecalcitriol tiene una vida media mayor en la circulación debido a que sus grupos fluorados bloquean la actividad de la 24-hidroxilasa.<sup>51</sup>

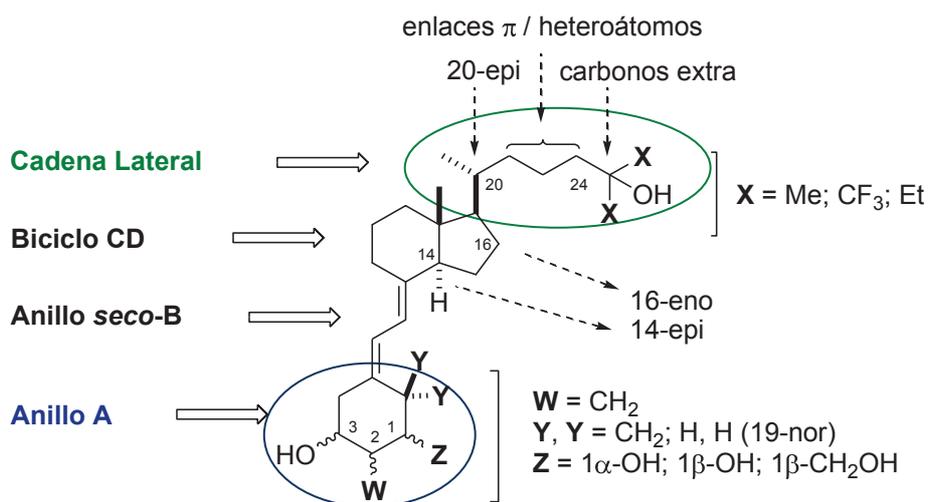
## 1.5 Síntesis de análogos de la vitamina D.

El creciente número de potenciales aplicaciones terapéuticas de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, se ha visto paralelamente limitado por la inducción de efectos hipercalcémicos a las dosis efectivas. A partir de los años '80, cuando Abe y colaboradores informaron por primera vez las propiedades pro-diferenciadoras de la hormona,<sup>93</sup> el descubrimiento de nuevas funciones no clásicas de la misma estimuló la búsqueda constante de análogos de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>. Se estima que se han sintetizado más de 3000 compuestos con el principal objetivo de diseñar análogos del calcitriol con actividades biológicas comparables o superiores, pero con menor acción calcémica.<sup>94</sup> De esta manera, la estructura del calcitriol ha sido objeto de modificaciones en cada parte de la molécula (**Figura 16**), siendo la cadena lateral el principal objetivo de esas modificaciones, y en menor medida el anillo A.

La historia de la búsqueda de análogos de la vitamina D y su uso como productos farmacéuticos puede dividirse en tres generaciones:

<sup>93</sup> Abe, E.; Miyaura, C.; Sakagami, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4990-4994.

<sup>94</sup> (a) Bouillon, R.; Okamura, W. H.; Norman, A. W. *Endocr. Rev.* **1995**, *16*, 200-256. (b) Carlberg, C.; Mouriño, A. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2003**, *13*, 761-772.

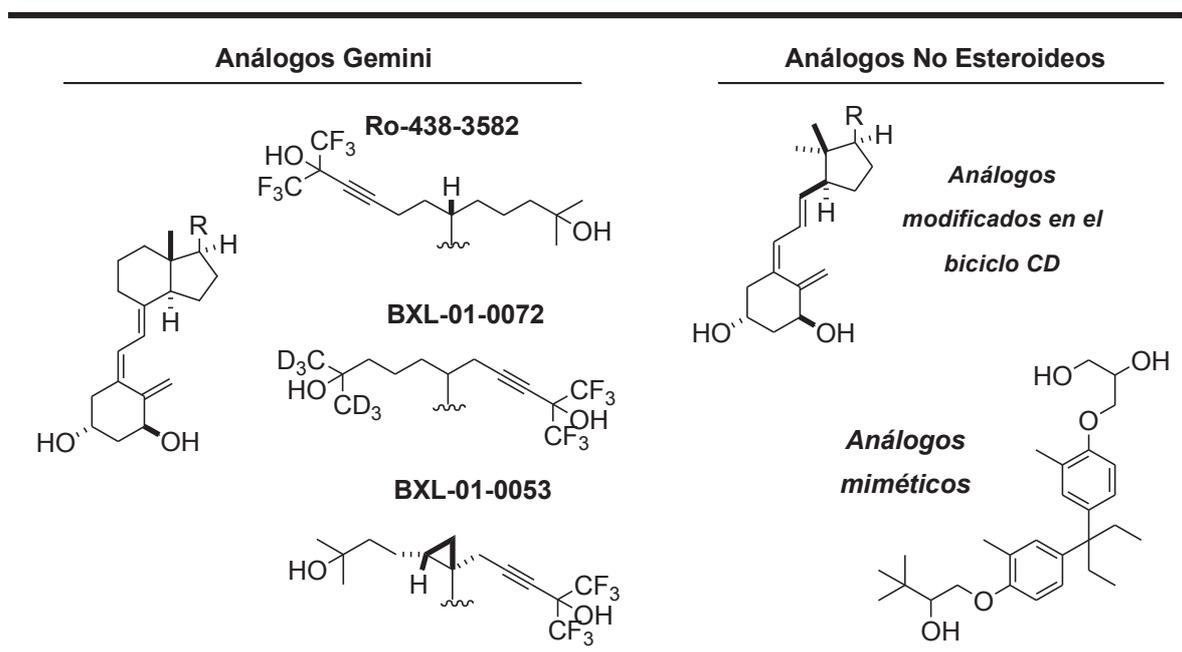


**Figura 16.** Principales modificaciones estructurales del calcitriol.

1) La primera generación de análogos de vitamina D, son los que se usan como agentes calcémicos que evitan la hipocalcemia y las anomalías óseas. Inicialmente se utilizaron para paliar los efectos causados por estados carenciales de vitamina D. Entre los análogos que más destacan se encuentran:  $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ ,  $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ ,  $1\alpha,24(\text{OH})_2\text{D}_3$ ,  $26,27\text{-F}_6\text{-}1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ .

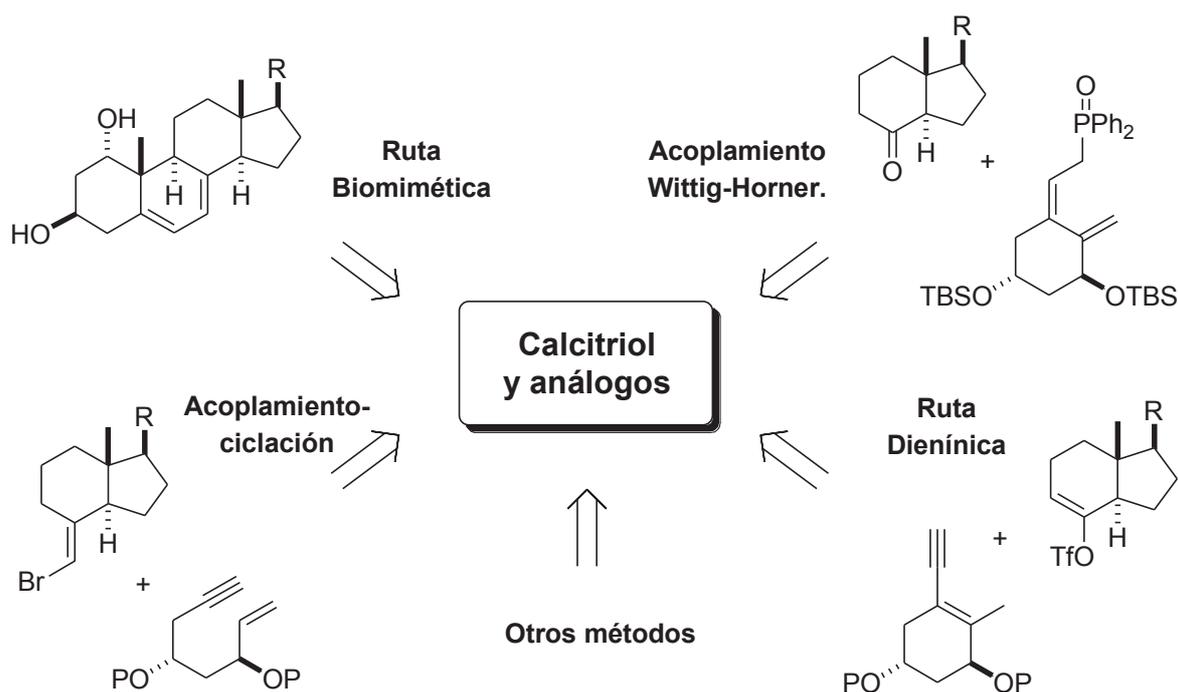
2) La segunda generación de análogos de la vitamina D surge a partir de la modificación de la estructura del calcitriol [ $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ] con el fin de encontrar análogos que posean una elevada capacidad de diferenciación celular y una baja acción calciotrópica. En esta línea se incluyen el Calcipotriol y Maxacalcitol que se utilizan para el tratamiento de la psoriasis.

**Tabla 5.** Estructuras representativas de algunos análogos Gemini y no esteroideos.



3) Más recientemente surge una tercera generación de análogos en la cual las modificaciones que se introducen tienden a producir análogos que se diferencian considerablemente en su estructura respecto a la de la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$ . Así surgen los análogos Gemini, que presentan una segunda cadena lateral unida a C20; y los análogos no esteroideos, entre los que se incluyen análogos con modificaciones drásticas del biciclo CD. En la **Tabla 5** se muestran algunas estructuras representativas de este tipo de análogos.

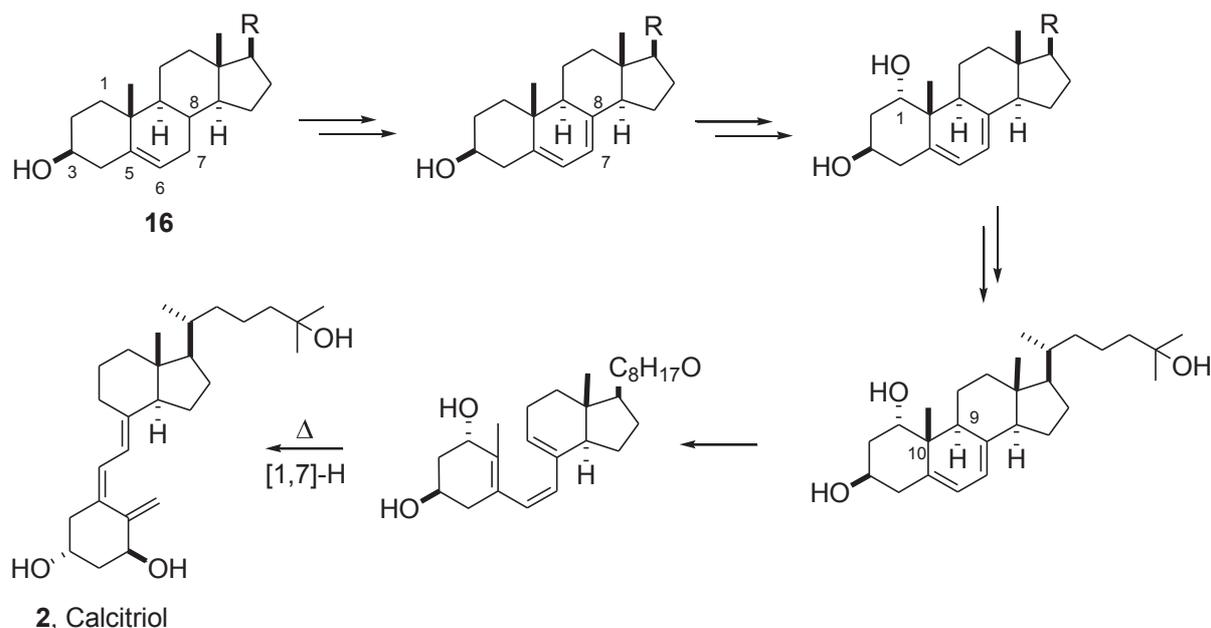
Se han desarrollado numerosas rutas sintéticas con el objetivo de acceder en forma rápida y versátil a los metabolitos de la vitamina D y a la mayor cantidad posible de análogos.<sup>95</sup> En la **Figura 17** se resumen las principales metodologías utilizadas para la obtención de los mismos. La mayoría de estas metodologías se caracterizan por ser rutas convergentes, basadas en la construcción del sistema triénico en las últimas etapas de la síntesis. El acoplamiento de las subunidades correspondientes al biciclo CD-cadena lateral y al anillo A, debidamente funcionalizados, permite acceder a una gran variedad de análogos de la vitamina D y a sus metabolitos.



**Figura 17.** Principales rutas sintéticas utilizadas para acceder al calcitriol y sus análogos.

<sup>95</sup> (a) Dai, H.; Posner, G. H. *Synthesis* **1994**, 12, 1383-1398. (b) Zhu, G. D.; Okamura, W. H. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 1877-1952. (c) Posner, G. H.; Kahraman, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 3889-3895.





**Esquema 5.** Esquema general de la ruta biomimética para la obtención del calcitriol.

De estos cuatro pasos el menos eficiente es la conversión fotoquímica del esteroide en la correspondiente vitamina vía la previtamina, ya sea en la preparación comercial de la vitamina D<sub>3</sub> o en su aplicación para la síntesis de metabolitos biológicamente activos y análogos. Como se observa en el **Esquema 4** para la vitamina D<sub>3</sub>, este paso implica la apertura fotoquímica del enlace C9-C10 del anillo B del 7-DHC para dar lugar a la correspondiente previtamina D<sub>3</sub>, la cual se convierte fácilmente en 6-*s-cis*-vitamina D<sub>3</sub> mediante una transposición térmica sigmatrópica antarafacial [1,7] de hidrógeno. En general el rendimiento de previtamina, y por consiguiente de vitamina, es bajo debido a la conversión de dicha previtamina en taquisterol, lumisterol y otros subproductos de irradiación.

Para la generación del doble enlace C7-C8 en 1 $\alpha$ -hidroxicolesterol, el procedimiento más usado es la bromación/desbromación utilizando 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína o N-bromosuccinimida (NBS). La introducción del grupo 1 $\alpha$ -hidroxilo resulta más difícil y se han descrito al menos cinco métodos a partir de colesterol. El procedimiento de Kaneko,<sup>98</sup> mejorado luego por Whalley,<sup>99</sup> provee una ruta simple para obtener dichos derivados 1 $\alpha$ -hidroxilados. La posibilidad de modificar o introducir la cadena lateral en las últimas etapas en esta ruta de síntesis, implica una apropiada protección del dieno entre C5-C7 utilizando

<sup>98</sup> Kaneko, C.; Sugimoto, A.; Eguchi, Y.; Yamada, S.; Ishikawa, M.; Sasaki, S.; Suda, T. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2701-2705.

<sup>99</sup> (a) Emke, A.; Hands, D.; Midgley, J. M.; Whalley, W. B.; Ahmad, R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 820-822. (b) Guest, D. W.; Williams, D. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, 1695-1697.

la estrategia de Barton, que emplea una reacción Diels-Alder/retro Diels-Alder con una 1,2,4-triazolina-3,5-diona.<sup>100</sup>

Una de las principales ventajas que ofrece esta estrategia lineal es que, al partir del esteroide precursor completo, se dispone de la mayor parte del esqueleto del nuevo análogo o metabolito, incluyendo su estereoquímica, lo cual implica menores costos y tiempo que una síntesis en múltiples pasos. Sin embargo la linealidad del proceso, sumada a los bajos rendimientos de la etapa fotoquímica, hacen que esta estrategia resulte en general ineficiente para la preparación de nuevos análogos de la vitamina D.<sup>101</sup>

## 1.5.2 Rutas convergentes. Formación del sistema triénico

Este tipo de aproximaciones agrupa una serie de estrategias que en general abarcan, por un lado la síntesis de los correspondientes fragmentos funcionalizados, ya sea la subunidad biciclo CD-cadena lateral o el anillo A apropiados, y por otro la reacción de acoplamiento de dichas subunidades que permita construir el sistema triénico. Se enumeran a continuación las reacciones de acoplamiento más utilizadas en el campo de la vitamina D. En el presente trabajo se ha optado por la estrategia sintética convergente correspondiente al acoplamiento de Wittig-Horner, para el cual se detallan los métodos de síntesis más frecuentemente utilizados para obtener los fragmentos involucrados en este tipo de acoplamiento.

### 1.5.2.1 Acoplamiento de Wittig-Horner.

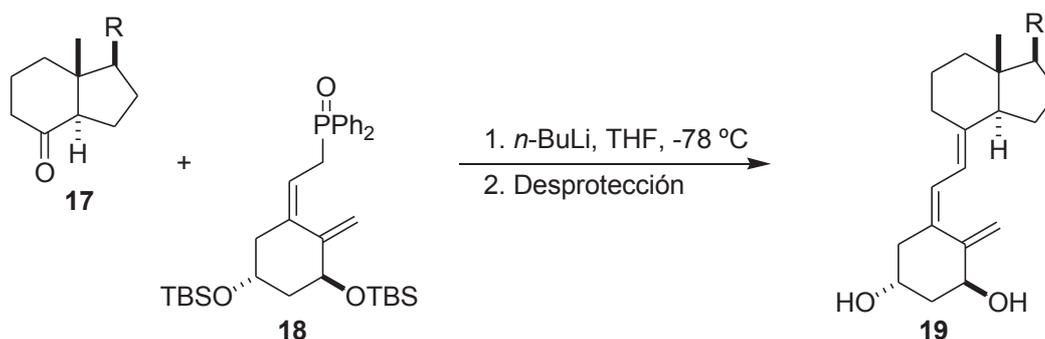
Esta ruta sintética, desarrollada inicialmente por Lythgoe y colaboradores en el año 1975, se basa en una reacción de Wittig-Horner entre el anión del óxido de fosfina **18**, precursor del anillo A, y una cetona tipo Grundmann (**17**) que contiene el biciclo CD y la cadena lateral previamente funcionalizada (**Esquema 6**).<sup>102</sup> La estrategia fue posteriormente optimizada por el grupo Hoffmann-La Roche a fin de conseguir la primera síntesis total del Calcitriol, partiendo de un óxido de fosfina previamente obtenido a partir del producto natural (S)-(+)-Carvona.<sup>103</sup>

<sup>100</sup> (a) Barton, D. H. R.; Shioiri, T.; Widdowson, D. A. *J. Chem. Soc. (C)* **1971**, 1968-1974. (b) Barton, D. H. R.; Lusinchi, X.; Ramirez, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2995-2998.

<sup>101</sup> Kubodera, N.; Watanabe, H.; Kawanishi, T.; Matsumoto, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1494-1499.

<sup>102</sup> Lythgoe, B.; Moran, T. A.; Nambudiry, M. E.; Ruston, S.; Tideswell, J.; Wright, P. W. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *44*, 3863-3866.

<sup>103</sup> Baggiolini, E. G.; Iacobelli, J. A.; Hennessy, B. M.; Batcho, A. D.; Sereno, J. F.; Uskokovic, M. R. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3098-3108.



### Esquema 6. Acoplamiento Wittig-Horner.

Esta metodología es probablemente la más utilizada entre todas las estrategias convergentes. La reacción de acoplamiento procede rápidamente, en condiciones suaves, con muy buenos rendimientos, y permite construir el sistema triénico de manera estereoselectiva en un sólo paso. El doble enlace generado entre C7 y C8 asume exclusivamente la geometría natural *E*, mientras que el doble enlace C5-C6 retiene la geometría natural *Z* del precursor. De esta forma, el acoplamiento de Wittig-Horner constituye un método eficiente y altamente convergente para la síntesis de la hormona calcitriol y sus análogos. A continuación se describen las estrategias sintéticas más frecuentemente utilizadas en la preparación de las subunidades cetona tipo Grundmann y óxido de fosfina.

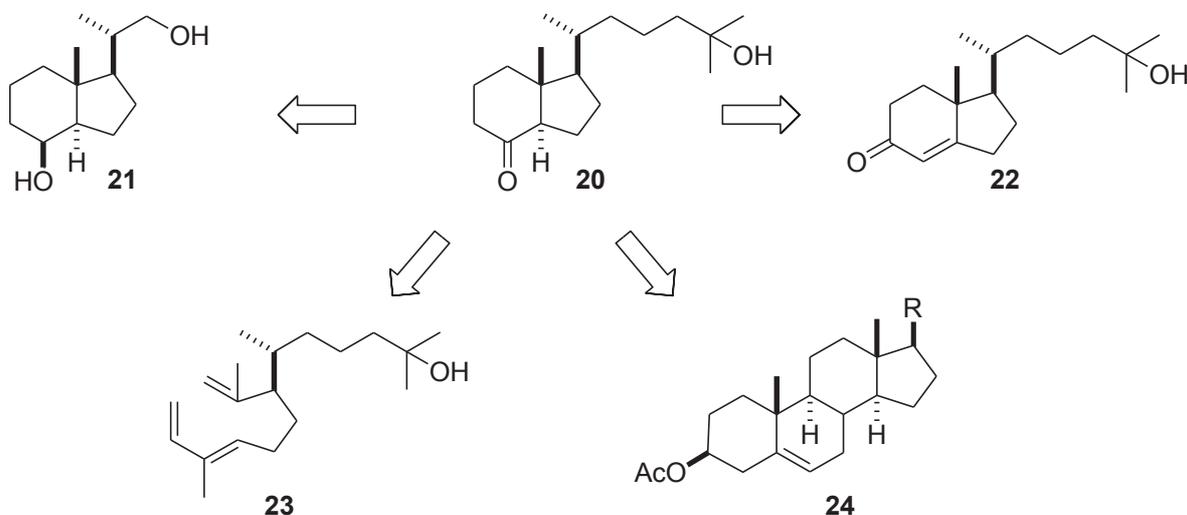
### Síntesis de cetonas tipo Grundmann.

El fragmento correspondiente al biciclo CD implica en general, la síntesis de cetonas de Windaus-Grundmann con la cadena lateral modificada. La síntesis total de este fragmento es quizás la más difícil, debido a varias consideraciones a tener en cuenta respecto al biciclo CD:

- la fusión *trans*-hidrindánica, termodinámicamente menos estable que la forma *cis*,
- la configuración relativa de los estereocentros C17 y C20,
- y una funcionalidad adecuada en C8 para permitir el acoplamiento del sistema triénico.

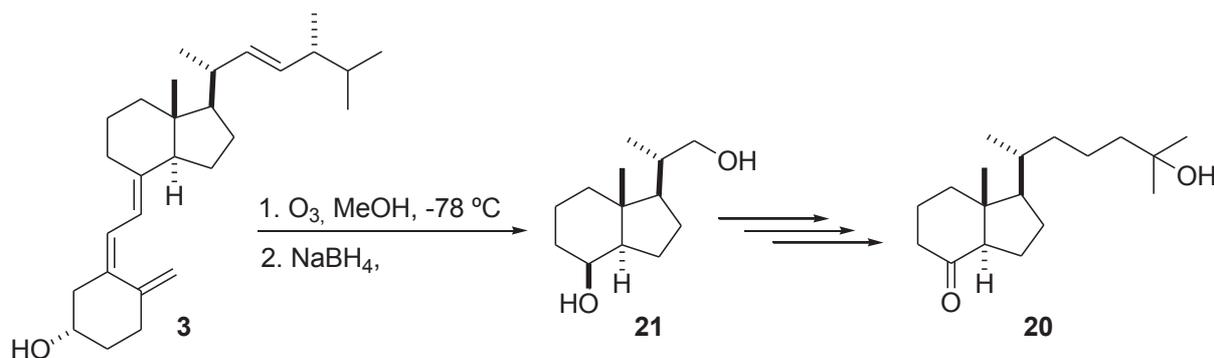
Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores se han desarrollado numerosas rutas sintéticas para la construcción del biciclo CD, las cuales se resumen de manera general en el **Esquema 7**. Entre las distintas estrategias se destacan: a) las que tienen como intermedio clave el diol de Inhoffen-Lythgoe (**21**); b) aquellas en las cuales el intermedio clave es una hidrindenona tipo **22**; c) las que implican una reacción de ciclación Diels-Alder intramolecular de nonatrienos **23**; y d) las que se basan en la degradación de

productos naturales como el o-quinodimetano o esteroides (**24**). Cabe mencionar que, en general, estas estrategias implican un elevado número de etapas sintéticas.<sup>104</sup>



**Esquema 7.** Rutas sintéticas para la síntesis de las cetonas de Grundmann.

La estrategia más corta y eficiente, y probablemente la más utilizada, es aquella en la que el diol de Inhoffen-Lythgoe se obtiene a partir de la degradación de la vitamina D<sub>2</sub>. De esta manera, la ozonólisis de la vitamina D<sub>2</sub> (**3**) en metanol a -78 °C, seguida de tratamiento con NaBH<sub>4</sub>, conduce al diol de Inhoffen-Lythgoe (**21**) con un rendimiento del 88% y puede ser utilizada a gran escala.<sup>105</sup>



**Esquema 8.** Degradación de la vitamina D<sub>2</sub> para la síntesis del diol de Inhoffen-Lythgoe.

La cadena lateral, tanto para la obtención de diferentes análogos como para la obtención de la hormona natural, puede introducirse fácilmente siguiendo distintas estrategias sintéticas (**Esquema 8**).<sup>106,107</sup> Alternativamente, la degradación de la vitamina D<sub>3</sub>

<sup>104</sup> Chapelon, A-S.; Moraléda, D.; Rodríguez, R.; Ollivier, C.; Santelli, M. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11511-11616.

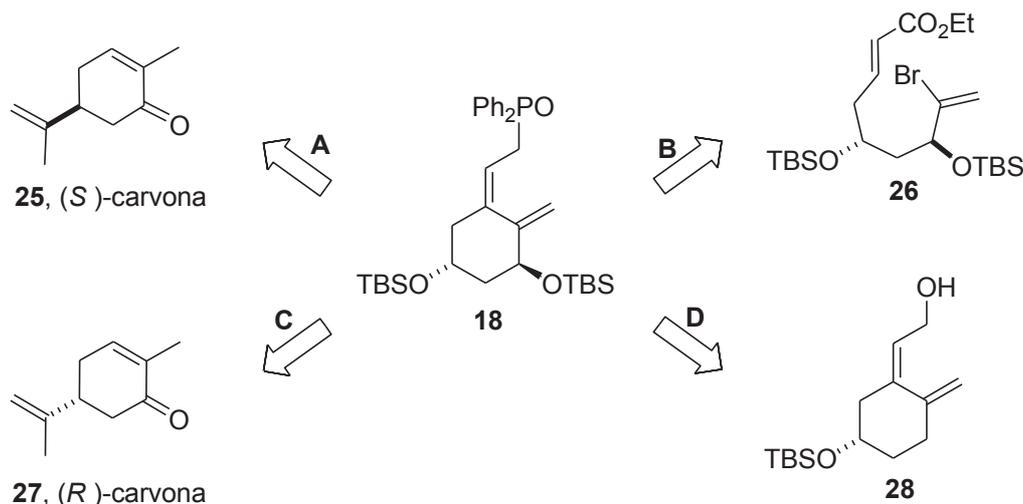
<sup>105</sup> (a) Leyes, G. A.; Okamura, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6099-6105. (b) Sardina, F.J.; Mouriño, A.; Castedo, L. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1264-1269.

<sup>106</sup> Zhu, G.D.; Okamura, W. H. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1877-1952.

conduce a la cetona de Grundmann, cuya posterior hidroxilación en posición C25 permite obtener **20**.<sup>108</sup>

### Síntesis del Óxido de Fosfina.

La obtención del óxido de fosfina **18** portador del anillo A, ha sido descrita a través de numerosas rutas sintéticas. A continuación se mencionan las más relevantes (**Esquema 9**):



**Esquema 9.** Rutas sintéticas para la síntesis del óxido de fosfina.

**A.-** La ruta desarrollada por el grupo de Hoffmann-La Roche es una de las rutas más eficientes para la preparación del óxido de fosfina.<sup>103,109</sup> Numerosas aproximaciones desarrolladas posteriormente están basadas en esta ruta de síntesis.<sup>110</sup>

Esta estrategia utiliza el producto natural (S)-(+)-Carvona (**25**) para obtener el óxido de fosfina **18** con un rendimiento global del 21% después de 14 etapas (**Esquema 10**). Partiendo de (S)-(+)-Carvona, los principales pasos de esta ruta implican la epoxidación de **25** y posterior apertura del epóxido **29**, ambas de manera regio- y estereoselectiva para generar el grupo 1 $\alpha$ -hidroxilo (**30**). La ruptura oxidativa del grupo isoprenilo y posterior oxidación en condiciones de Baeyer-Villiger da lugar al grupo 3 $\beta$ -hidroxilo en **31**. El éster insaturado **32**, introducido mediante la reacción de Horner-Emmons en **29**, permite obtener el óxido de fosfina **18** por reducción, cloración y subsecuente sustitución con LiPPh<sub>2</sub> y

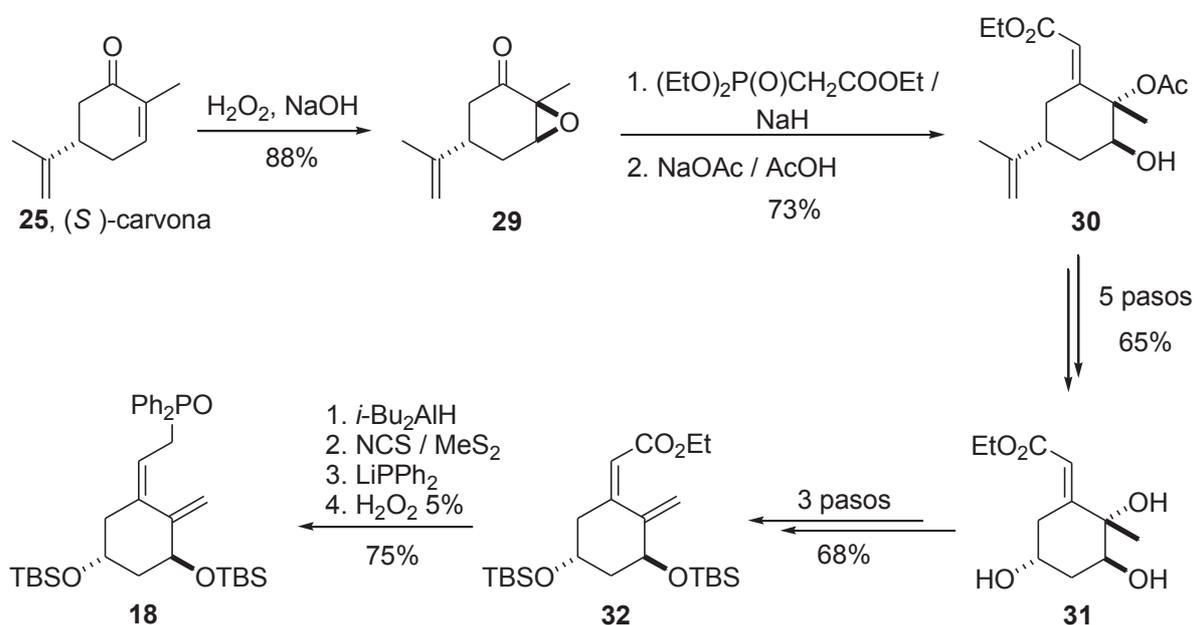
<sup>107</sup> (a) Daniewski, A. R.; Liu, W. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 626-628. (b) Van Gool, M.; Vandewalle, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3427-3431. (c) Fall, Y.; Vitale, C.; Mouriño, A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7337-7340. (d) Stork, G.; Ra, C. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1997**, *18*, 137-139. (e) Jankowski, P.; Marczak, S.; Wicha, J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 12071-12150.

<sup>108</sup> Ver ref. 106 citas 173-177.

<sup>109</sup> Baggiolini, E. G.; Iacobelli, J. A.; Hennessy, B. M.; Uskokovic, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2945-2948.

<sup>110</sup> (a) Mouriño, A.; Torneiro, M.; Vitale, C.; Fernández, S.; Pérez-Sestelo, J.; Anné, S.; Gregorio, C. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4713-4716. (b) Koiwa, M.; Hareau, G. P. J.; Sato, F. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2389-2390.

oxidación. Estas cuatro últimas transformaciones a partir de **32** han sido adoptadas en otras rutas sintéticas.



**Esquema 10.** Síntesis del óxido de fosfina por la ruta Hoffmann-La Roche.

Cabe destacar una optimización más reciente de esta estrategia, la cual permite obtener el óxido de fosfina **18** con un rendimiento global similar, pero empleando un menor número de pasos y purificaciones intermedias (9 pasos, 25 %). En base a esta estrategia se preparó el óxido de fosfina empleado en la presente Tesis Doctoral.<sup>111</sup>

**B.-** La síntesis desarrollada por Shimizu plantea una estrategia basada en una reacción de ciclación tipo Heck catalizada por paladio, a partir de un precursor acíclico (**26**) (**Esquema 11**).<sup>112</sup> De esta manera se logra preparar el intermediario clave **32** partiendo de  $\alpha$ -bromoacroleína en 10 etapas (19%), recurriendo a la reacción aldólica asimétrica de Braun para introducir los dos centros quirales.<sup>113</sup> La ventaja de esta estrategia es la fácil accesibilidad de los compuestos acíclicos de partida.

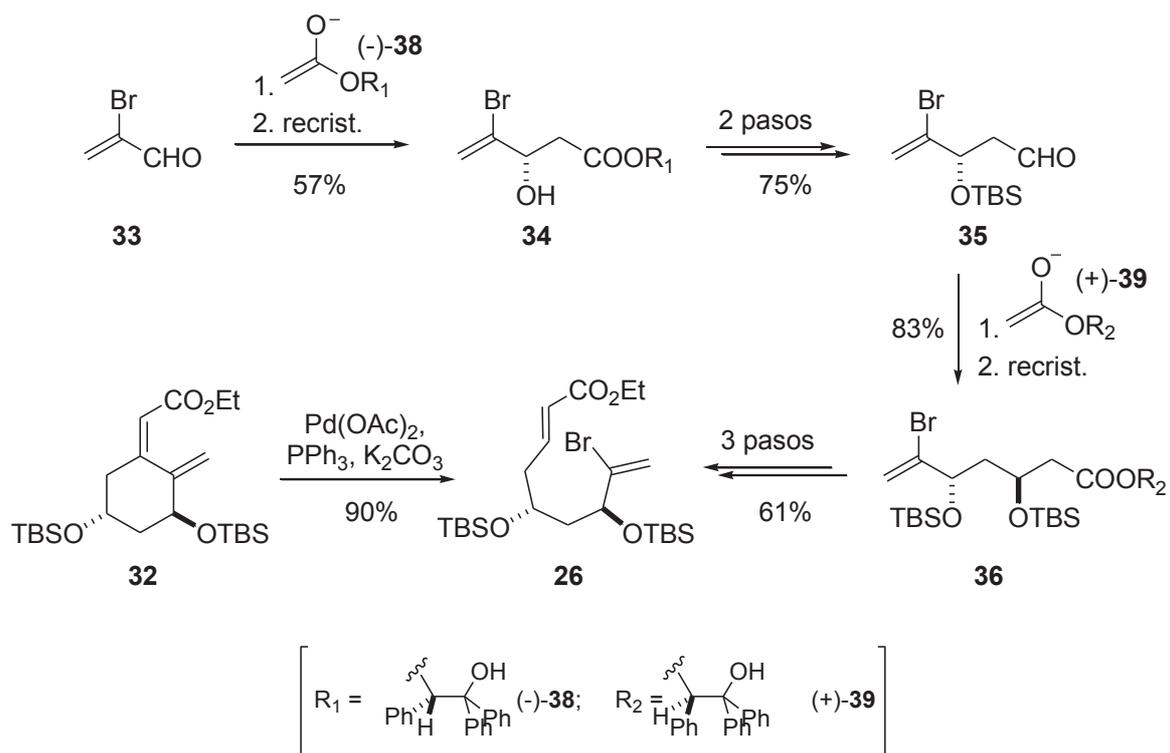
Posteriormente se desarrollaron varias estrategias similares, involucrando precursores acíclicos y la ciclación intramolecular tipo Heck, que permiten obtener el óxido de fosfina **18** o el intermediario **32** más eficientemente (8-9 etapas, 23-26%).<sup>114</sup>

<sup>111</sup> Daniewski, A. R.; Garofalo, L. M.; Hutchings, S. D.; Kabat, M. M.; Liu, W.; Okabe, M.; Radinov, R.; Yiannikouros, G. P. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1580-1587.

<sup>112</sup> Nagasawa, K.; Zako, Y.; Ishihara, H.; Shimizu, I. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4937-4940.

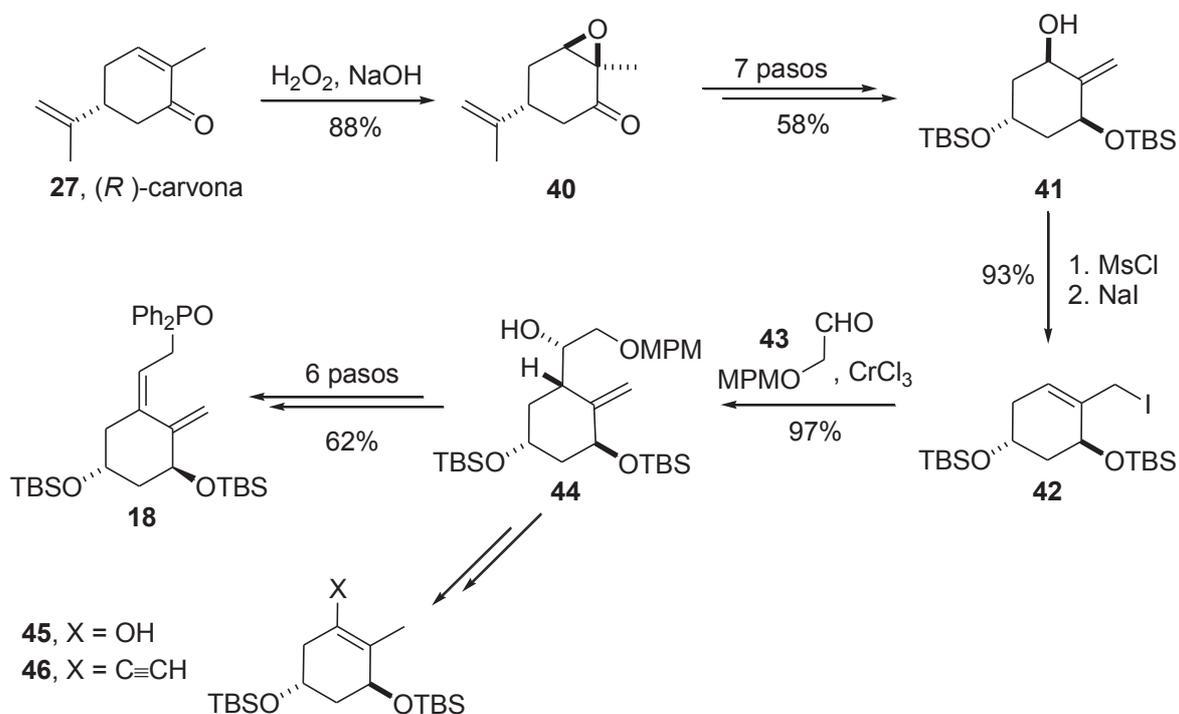
<sup>113</sup> Nagasawa, K.; Ishihara, H.; Zako, Y.; Shimizu, I. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2523-2529.

<sup>114</sup> (a) Mascareñas, J. L.; Garcia, A. M.; Castedo, L.; Mouriño, A. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4365-4368. (b) Chen, C.; Crich, D. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 7943-7954. (c) Yokoyama, H.; Miyamoto, K.; Hirai, Y.; Takahashi, T. *Syn Lett.* **1997**, 187-188. (d) Hiyamizu, H.; Ooi, H.; Inomoto, Y.; Esumi, T.; Iwabuchi, Y.; Hatakeyama, S. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 473-475.



**Esquema 11.** Síntesis del óxido de fosfina por la ruta de Shimizu.

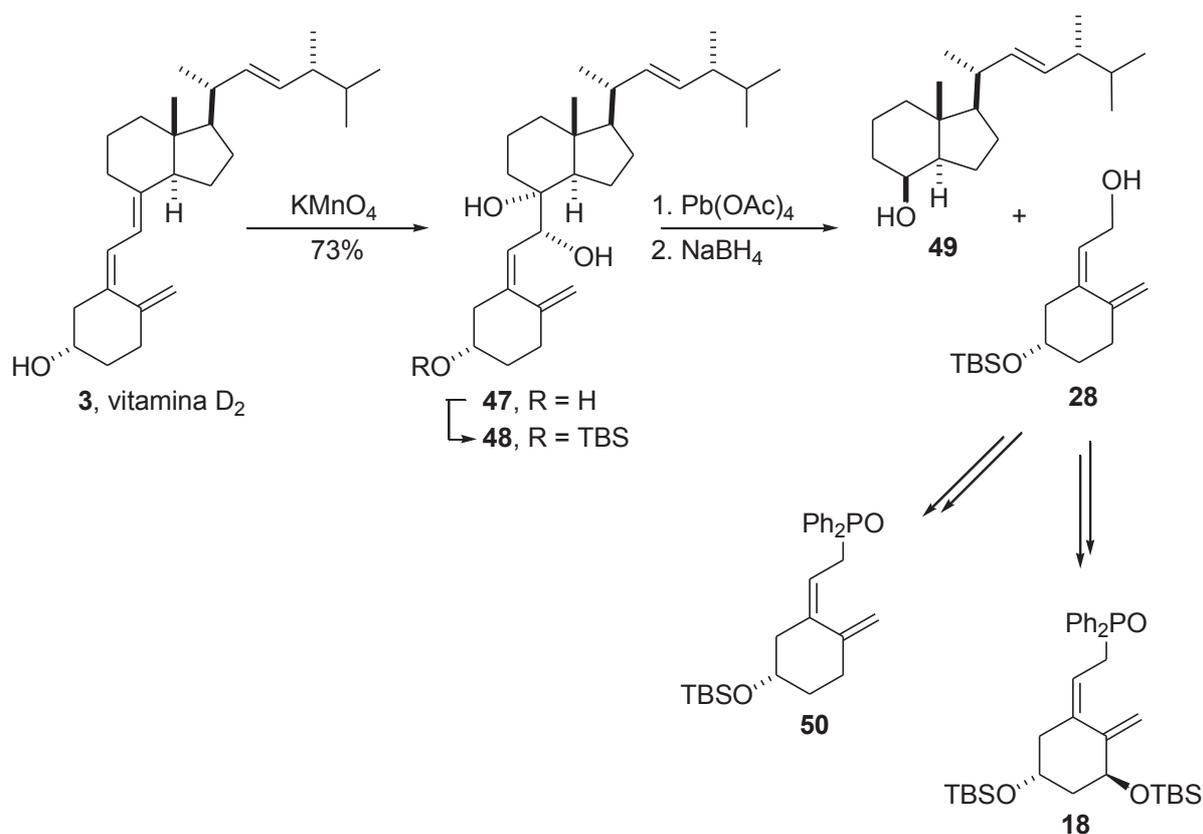
C.- En la ruta desarrollada por Takano, el óxido de fosfina del anillo A (**18**) se prepara a partir de (*R*)-(-)-Carvona a través del intermediario clave **44** (Esquema 12).



**Esquema 12.** Síntesis del óxido de fosfina por la ruta de Takano.

La etapa clave de esta ruta implica la adición diastereoselectiva del haluro alílico **42** sobre el aldehído **43** utilizando un complejo de Cr (III) para obtener el alcohol **44** como único producto (**Esquema 12**).<sup>115</sup> Esta estrategia es comparable a la de Hoffmann-La Roche en cuanto al rendimiento global (25%, 15 pasos), con la ventaja de que el intermediario **44** permite acceder a otros precursores del anillo A, tales como **45** y **46**, útiles en otras rutas de síntesis del calcitriol.

D.- Lythgoe<sup>116</sup> en 1974, y posteriormente Okamura<sup>117</sup> en 1983, publicaron la obtención del óxido de fosfina sin el hidroxilo en C1 por degradación de las vitaminas D<sub>3</sub> o D<sub>2</sub>. Esta aproximación permite obtener, por ruptura oxidativa del sistema triénico, el fragmento del biciclo CD y el alcohol **28** correspondiente al anillo A de la vitamina, el cual posteriormente puede ser transformado en el óxido de fosfina **18** con el hidroxilo 1 $\alpha$ <sup>118</sup> (9 etapas, 10%) o sin él (**50**, 3 etapas, 47%) (**Esquema 13**).



**Esquema 13.** Síntesis del óxido de fosfina por degradación de la vitamina D<sub>2</sub>.

El procedimiento consiste en la oxidación selectiva del enlace C7-C8 con KMnO<sub>4</sub>; luego el triol obtenido selectivamente protegido en el hidroxilo C1, es sometido a una

<sup>115</sup> Hatakeyama, S.; Numata, H.; Osanai, K.; Takano, S. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3515-3517.

<sup>116</sup> (a) Frosch, J. V.; Harrison, I. T.; Lythgoe, B.; Saksena, A. K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1974**, 2005-2009. (b) Lythgoe, B.; Moran, T. A.; Nambudiry, M. E.; Tideswell, J.; Wright, P. W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, 590-595.

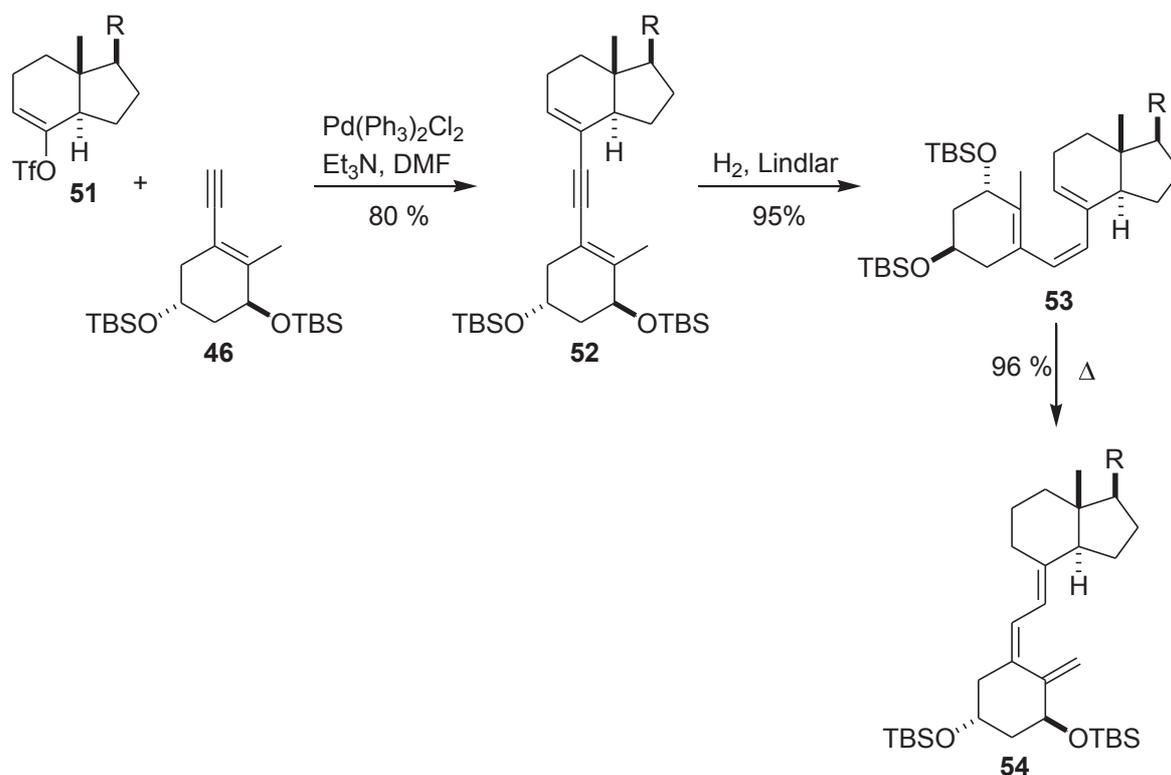
<sup>117</sup> Toh, H. T.; Okamura, W. H. *J. Org. Chem.* **1983**, *42*, 1414-1417.

<sup>118</sup> (a) Martin, M. G.; Ganem, B. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 251-254. (b) Kiegiel, J.; Wovkulich, P. M.; Uskokovic, M. R. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6057-6060.

ruptura oxidativa seguida de reducción para dar el fragmento del biciclo CD (87%) y del alcohol protegido **39** (56%).

### 1.5.2.2 Ruta dienínica.

Esta ruta se basa en la preparación del sistema previtamínico mediante hidrogenación parcial del triple enlace de compuestos dienínicos tipo **52**. La posterior isomerización térmica de la previtamina **53**, mediante la transposición sigmatrópica antarafacial [1,7] de hidrógeno, da lugar al correspondiente sistema triénico (**Esquema 14**).<sup>119</sup> Esta estrategia adquiere relevancia a partir de la mejora desarrollada por el grupo de Mouriño, en cuanto a la obtención del dienino **52** usando el acoplamiento de Stille. Este acoplamiento involucra el enino portador del anillo A (**46**) y el enol triflato cinético de la cetona tipo Grudmann (**51**), empleando cantidades catalíticas de  $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_2\text{Cl}_2$ .<sup>120</sup>



**Esquema 14.** Ruta dienínica modificada por Mouriño.

Una mejora importante a esta ruta, aportada por Okamura, permite obtener el enino del anillo A (**46**) a partir de (S)-(+)-carvona comercial, mediante un esquema sintético de cinco etapas y con un rendimiento global del 37%.<sup>121</sup> Con posterioridad a estas

<sup>119</sup> Harrison, R. G.; Lythgoe, B.; Wright, P. W. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* **1974**, 2654-2657.

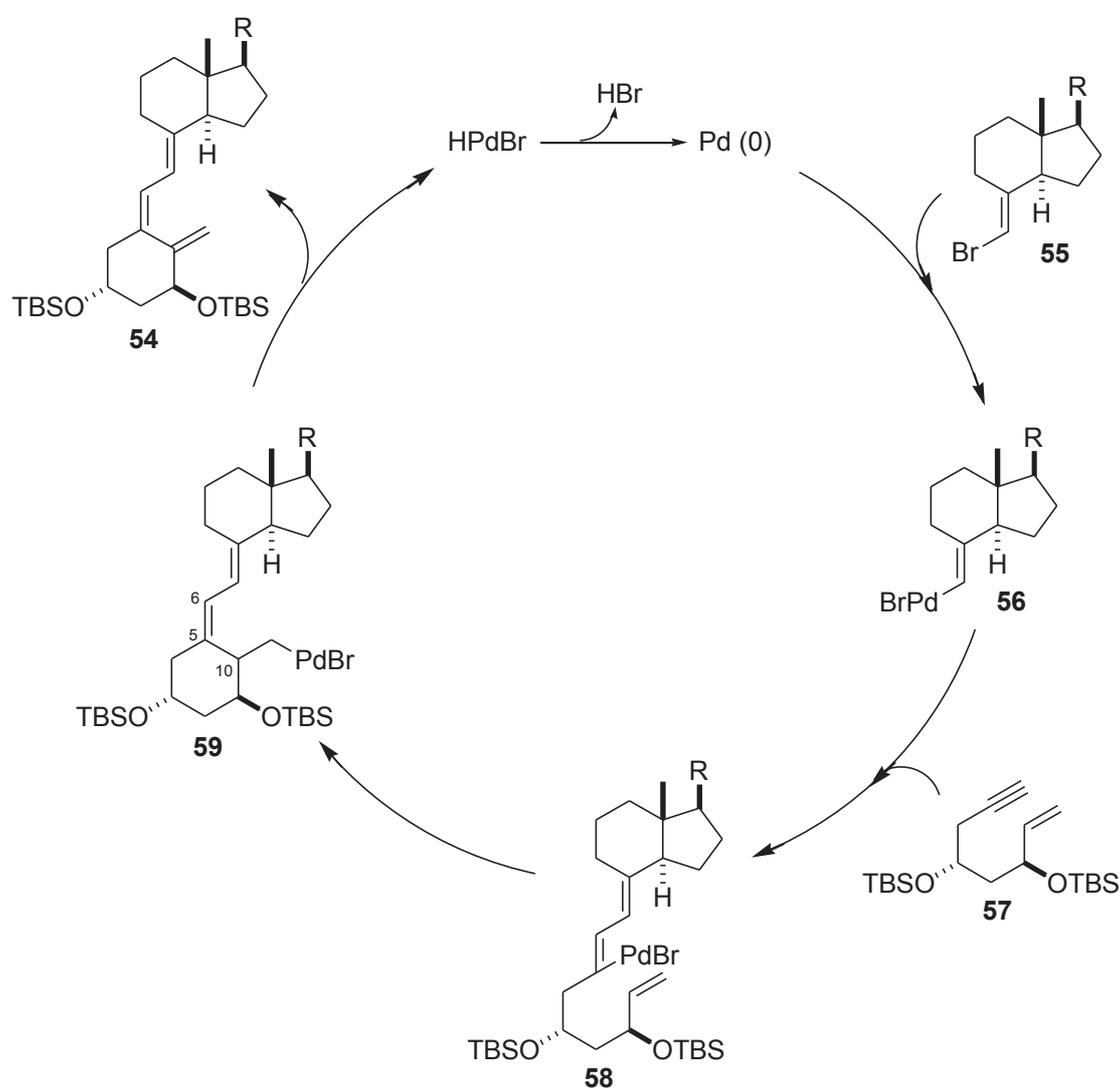
<sup>120</sup> (a) Castedo, L.; Mouriño, A.; Sarandeses, L. A. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 1523-1526. (b) Castedo, L.; Mascareñas, J. L.; Mouriño, A.; Sarandeses, L. A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1203-1206. (c) Mascareñas, J. L.; Sarandeses, L. A.; Castedo, L.; Mouriño, A. *Tetrahedron* **1991**, 47, 3485-3498.

<sup>121</sup> (a) Aurrecochea, J. M.; Okamura, W. H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 4947-4950. (b) Okamura, W.H.; Aurrecochea, J. M.; Gibas, R. A.; Norman, A. W. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4072-4083.

contribuciones se han desarrollado otras estrategias para la preparación del mencionado enino.<sup>122</sup>

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

Esta ruta, desarrollada por Trost, ofrece una metodología conceptualmente distinta a las rutas mencionadas anteriormente.<sup>123</sup> Se basa en un acoplamiento catalizado por Pd(0) entre un bromuro vinílico (**55**), portador del fragmento biciclo CD-cadena lateral, y un enino acíclico (**57**). En esta estrategia, la formación del anillo A y la construcción del sistema triénico, con la consecuente unión del fragmento CD, se realiza en una única etapa con rendimientos elevados (**Esquema 15**).



**Esquema 15.** Ruta de acoplamiento-ciclación catalizada por Pd(0) desarrollada por Trost.

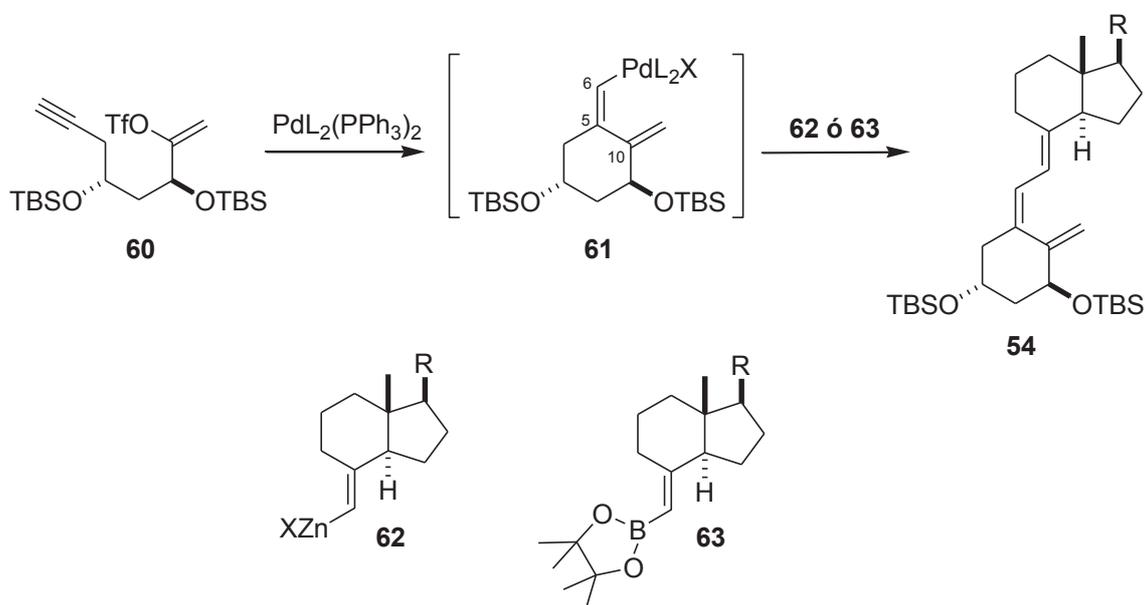
<sup>122</sup> (a) Mascareñas, J. L.; Sarandeses, L. A.; Castedo, L.; Mouriño, A. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3485-3498. (b) Oves, D.; Ferrero, M.; Fernandez, S.; Gotor, V. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1154-1157. (c) Rodriguez, R.; Ollivier, C.; Stantelli, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2289-2292. (d) Chen, Y.; Ju, T. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 86-89.

<sup>123</sup> (a) Trost, B.M. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 34-42. (b) Trost, B. M.; Pfrengle, W.; Urabe, H.; Dumas, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1923-1924. (c) Trost, B. M.; Dumas, J.; Villa, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9836-9845.

La carbometalación intramolecular de **58** da lugar a la formación del enlace C5-C10, correspondiente a la ciclación del anillo A, de manera regioselectiva y con completo control sobre la geometría del doble enlace C5-C6. Debido a la necesidad de utilizar temperaturas elevadas (reflujo en una mezcla de tolueno-trietilamina) los productos obtenidos consisten en una mezcla de vitamina y previtamina (10:1), lo cual puede considerarse una limitación del método en la preparación de análogos sensibles a la temperatura, cuyo equilibrio se encuentre desplazado hacia la forma previtamínica.<sup>124</sup>

La estrategia de Trost constituye una alternativa adecuada para construir análogos de la hormona calcitriol modificados en el anillo A. En particular, las compañías japonesas Chugai y Teijin emplearon esta ruta para el desarrollo del análogo ED-71 (Eldecalcitol), y otros análogos modificados en C2.<sup>125</sup>

Más recientemente, Mouriño desarrolló alternativas conceptualmente similares a la de Trost, en las cuales la reacción de acoplamiento catalizada por paladio procede en el sentido opuesto (**Esquema 16**). Así, primero se genera el anillo A por carbometalación intramolecular de un precursor acíclico (**60**), y luego tiene lugar el acoplamiento con el fragmento que aporta al biciclo CD (**62** ó **63**). De esta manera, la reacción transcurre mediante el acoplamiento de Negishi<sup>126</sup> a partir del alquenilzincato **62** y el enoltriflato **60**, o mediante el acoplamiento de Suzuki,<sup>127</sup> si se emplea el alquenilboronato **63**, en lugar de **62**.



**Esquema 16.** Ruta de acoplamiento-ciclación catalizada por Pd(0) desarrollada por Mouriño.

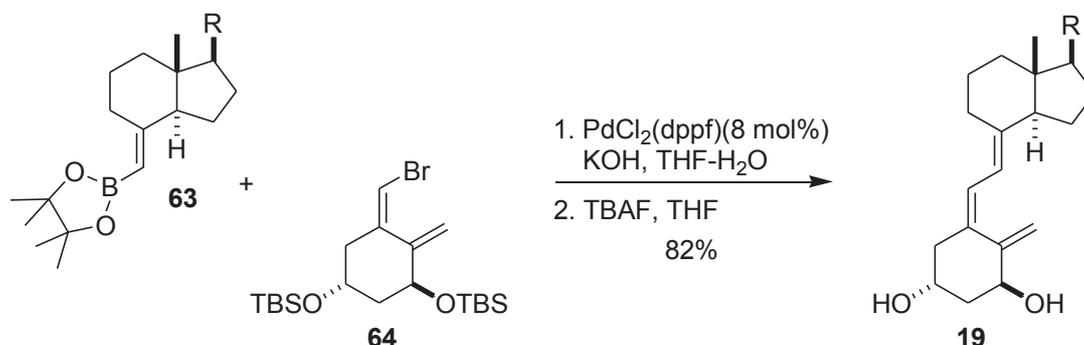
<sup>124</sup> Daniel, D.; Middleton, R.; Henry, H. L.; Okamura, W. H. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5617-5626.

<sup>125</sup> (a) Miyamoto, K.; Murayama, E.; Ochi, K.; Watanabe, H.; Kubodera, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1111-1113. (b) Kittaka, A.; Suhara, Y.; Takayanagi, H.; Fujishima, T.; Kurihara, M.; Takayama, H. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2619-2622; (c) 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.

<sup>126</sup> Gomez-Reino, C.; Vitale, C.; Maestro, M.; Mouriño, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5885-5887.

<sup>127</sup> Gogoi, P.; Sigúeiro, R.; Eduardo, S.; Mouriño, A. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 1432-1435.

Sato y colaboradores<sup>128</sup> desarrollaron otro método catalizado por Pd para la síntesis de análogos de la hormona calcitriol, basado en el acoplamiento de Suzuki-Miyaura.<sup>129</sup> La reacción de acoplamiento se lleva a cabo entre el (*E*)-bromuro vinílico **64**, portador del anillo A, y el (*E*)-boronato vinílico **63** portador del anillo CD con elevados rendimientos (**Esquema 17**).

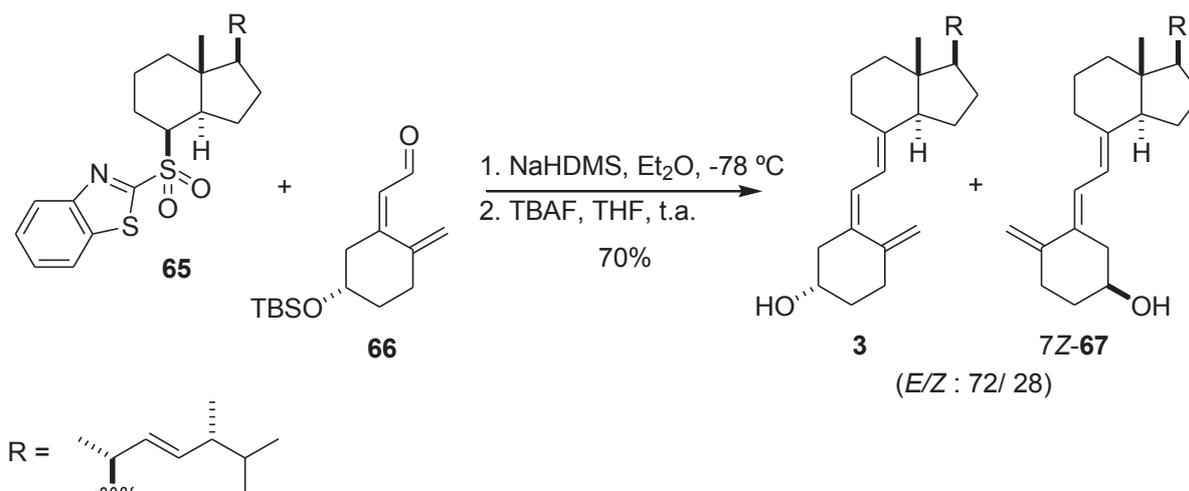


**Esquema 17.** Ruta de acoplamiento-ciclación catalizada por Pd(0) desarrollada por Sato.

### 1.5.3 Otras estrategias.

#### 1.5.3.1 Acoplamiento por olefinación de Julia.

La reacción de olefinación de Julia es una ruta conceptualmente similar a la reacción de Wittig-Horner.<sup>130</sup> Esta estrategia se basa en el acoplamiento del anión de la sulfona correspondiente al biciclo CD, con el aldehído portador del anillo A.



**Esquema 18.** Acoplamiento de Julia-Kocienski en la síntesis de la vitamina D<sub>2</sub>.

<sup>128</sup> (a) Hanazawa, T.; Wada, T.; Masuda, T.; Okamoto, S.; Sato, F. *Org. Lett.* **2001**, *24*, 3975-3977. (b) Hanazawa, T.; Koyama, A.; Nakata, K.; Okamoto, S.; Sato, F. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9767-9772;

<sup>129</sup> (a) Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483. (b) Miyaura, N. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653*, 54-57.

<sup>130</sup> Kocienski, P. J.; Lythgoe, B.; Ruston, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, 1290-1293.

Sin bien la clásica reacción de Julia implica varios pasos y el uso de una amalgama de sodio, recientes modificaciones utilizando una benzotiazolilsulfona permiten llevar a cabo la reacción en un solo paso y con mejores rendimientos (**Esquema 18**).<sup>131</sup>

En este caso, la reacción de acoplamiento da lugar a la vitamina D<sub>2</sub> (**3**) con muy buen rendimiento, permitiendo recuperar los sustratos de partida que quedan sin reaccionar. Si bien **3** se obtiene acompañada de su esteroisómero 7Z (**67**), el mismo puede ser fotoisomerizado al isómero 7E.<sup>132</sup> Esta estrategia también se ha utilizado para sintetizar eficientemente análogos del calcitriol 19-*nor* y sustituidos en C2 del anillo A.<sup>133</sup>

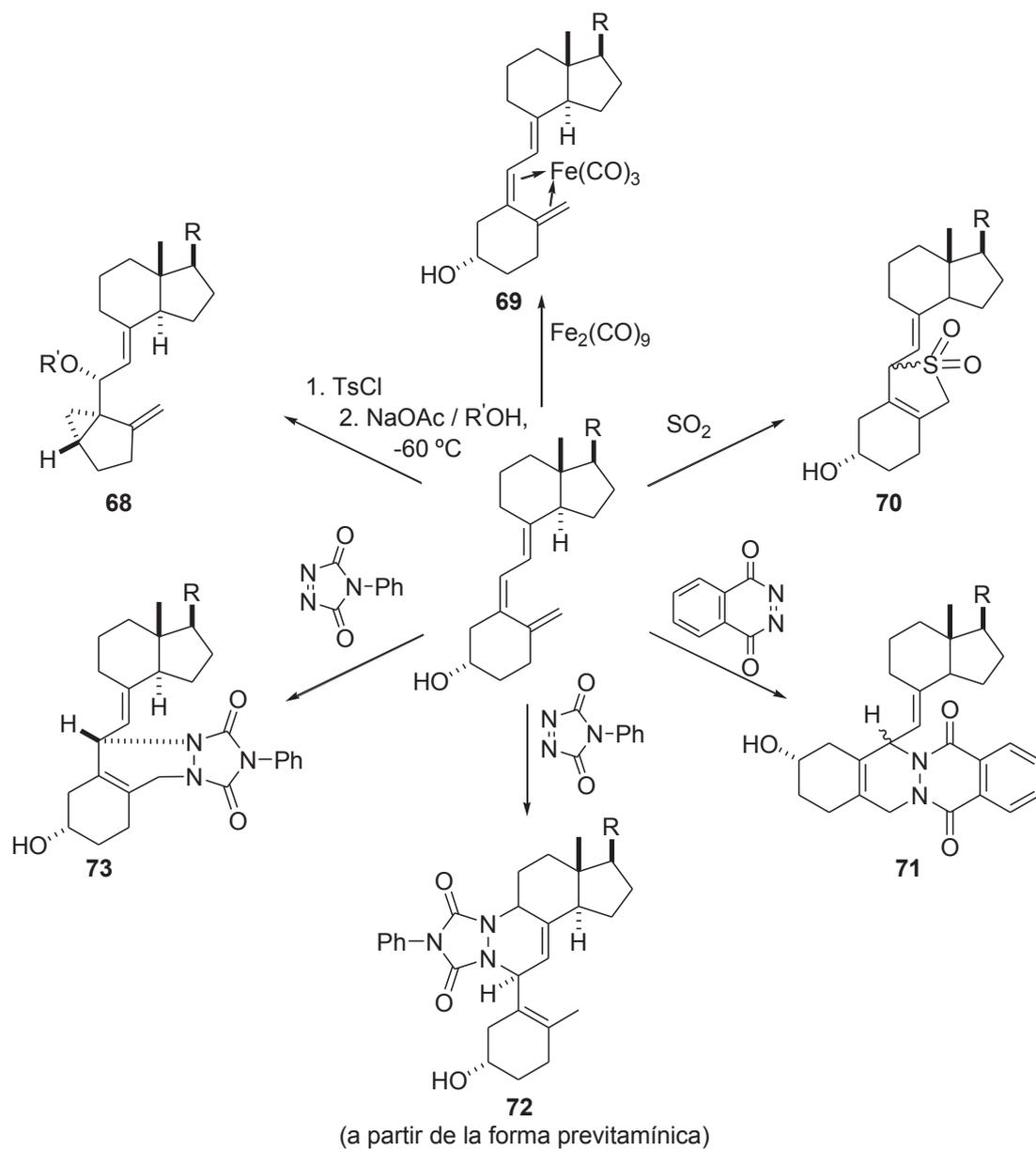
### 1.5.3.2 Modificación directa de la vitamina D y sus análogos.

Este método se basa en la protección del sistema triénico para que sea estable frente a la luz, al calor, al aire y a las condiciones de reacción. El sistema triénico debe ser fácilmente recuperable después de realizar las modificaciones deseadas. Los grupos protectores utilizados más frecuentemente se muestran en el **Esquema 19**.<sup>106</sup>

<sup>131</sup> (a) Baudin, J. B.; Hareau, G.; Julia, S. A.; Ruel, O. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1175-1178.

<sup>132</sup> Blakemore, P. R.; Kocienski, P. J.; Marczyk, S.; Wicha, J. *Synthesis* **1999**, 7, 1209-1215.

<sup>133</sup> (a) Hilpert, H.; Wirz, B. *Tetrahedron* **2001**, 57, 681-694. (b) Keiichiro Ono, K.; Yoshida, A.; Saito, N.; Fujishima, T.; Honzawa, S.; Suhara, Y.; Kishimoto, S.; Sugiura, T.; Waku, K.; Takayama, H.; Kittaka, A. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 7407-7415.



Esquema 19. Modificación directa de la vitamina D vía protección del sistema triénico.



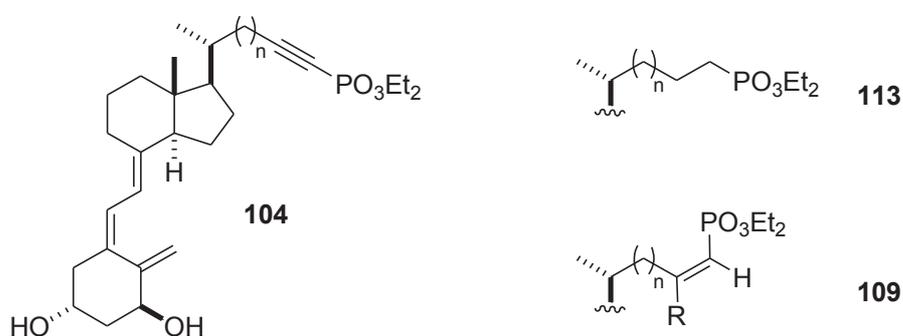
## **2.OBJETO DEL PRESENTE TRABAJO**

---



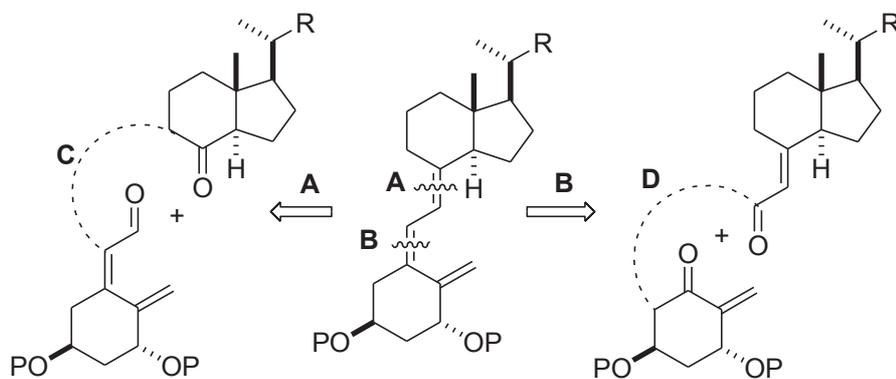
El presente trabajo se enmarca dentro de los objetivos generales de nuestro grupo de investigación dirigidos tanto a la síntesis de análogos de la  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  modificados en la cadena lateral, como a la aplicación de metodologías sintéticas en el campo de la catálisis por nanopartículas metálicas. Como objetivos concretos nos hemos propuesto:

1. Desarrollar una ruta de síntesis versátil y sencilla que permita acceder a análogos del calcitriol tipo **104**, incorporando una funcionalidad de fósforo en la cadena lateral, y a los correspondientes derivados **109** y **113** por modificación de la cadena lateral del alquinilfosfonato **104**.



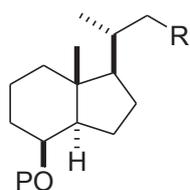
2. Aplicar metodologías basadas en la utilización de nanopartículas metálicas generadas a partir de sistemas del tipo  $MX_n$ -Li-areno(cat.), en el desarrollo de nuevas aproximaciones en la construcción del sistema triénico y nuevos tipos de cadenas laterales de la vitamina.

- 2.1. En el caso particular de los sistemas conjugados, estudiar la aplicación de este tipo de metodología en reacciones de acoplamiento de McMurry, a fin de evaluar una ruta alternativa para la preparación del sistema triénico.

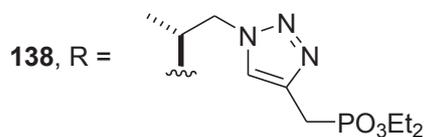
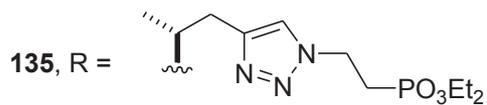


P = Grupo Protector

2.2. Desarrollar una ruta sintética que permita obtener los fragmentos CD-cadena lateral **135** y **138** modificados como triazolifosfonatos, incorporando en un solo paso ambas funcionalidades aplicando la cicloadición 1,3-dipolar catalizada por nanopartículas de cobre. La posterior transformación de estos fragmentos en los correspondientes análogos, darían lugar a una interesante serie de compuestos con potencial interés biológico, combinando las propiedades de los triazoles y los fosfonatos en una misma cadena lateral.



P = Grupo Protector



## **3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



### 3.1 Síntesis de análogos fosfónicos del calcitriol.

#### 3.1.1 Antecedentes.

Los compuestos organofosforados han conseguido un reconocido lugar dentro de la química medicinal en lo que se refiere a la búsqueda de nuevas drogas. En particular, los compuestos con enlace C-P (fosfonatos y fosfinatos) presentan características químicas y estructurales, cuyas propiedades biológicas condujeron al desarrollo de numerosos compuestos para su uso en medicina y agricultura.<sup>134</sup> Entre los compuestos fosfónicos, los vinilfosfonatos constituyen una interesante familia de compuestos con un amplio rango de aplicaciones, entre las cuales su marcada actividad biológica como anticancerígenos, antivirales, así como antibacterianos y antifúngicos, hacen que resulten biomoléculas cruciales en distintos procesos metabólicos.<sup>135</sup>

Dentro del campo de la vitamina D, los primeros análogos con átomos de fósforo en la cadena lateral fueron sintetizados por W. Dauben, y en ellos se incorporaba una unidad de óxido de fosfina o un fosfonato en la posición 24 de la cadena lateral.<sup>136</sup> Estas modificaciones estructurales reducían considerablemente la actividad de la vitamina D tanto *in vitro* como *in vivo*. Posteriormente, A. Steinmeyer llevó a cabo un estudio más amplio sobre este tipo de derivados, incorporando fosfonatos y bisfosfonatos en la cadena lateral de la vitamina D. De esta manera sintetizó una variedad de análogos del tipo que se muestran en la **Figura 18**.<sup>137</sup>

La posterior evaluación biológica de estos compuestos, con particular interés en la actividad sobre el tejido óseo, mostró que el grado de disociación o acción selectiva en hueso depende de la subestructura de la cadena lateral de los análogos fosfónicos. Mientras que en la evaluación de la actividad calcémica *in vivo* se observó una tendencia mucho menor a producir hipercalcemia comparada con el calcitriol. Los resultados prometedores y el interés generado en este tipo de análogos motivaron el patentamiento de los mismos.<sup>138</sup>

<sup>134</sup> Metcalf, W. W.; van der Donk, W. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 65-94.

<sup>135</sup> (a) Smeyers, Y.; Sanchez, F.; Laguna, A.; Ibanez, N.; Ruano, E.; Perez, S. *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 753. (b) Harnden, M. R.; Parkin, A.; Parratt, M. J.; Perkins, R. M. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1343. (c) Smith, P.; Chamiec, A.; Chung, G.; Cobley, K.; Duncan, K.; Howes, P.; Whittington, A.; Wood, M. *J. Antibiot. Tokyo* **1995**, *48*, 73. (d) Holstein, S.; Cermak, D.; Wiemer, D.; Lewis, K.; Hohl, R. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 687. (e) Lu, X.; Sun, C.; Valentine, W. J.; E, S.; Liu, J.; Tigyi, G.; Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3192-3195. (f) Shie, J.-J.; Fang, J.-M.; Wang, S.-Y.; Tsai, K.-C.; Cheng, Y.-S. E.; Yang, A.-S.; Hsiao, S.-C.; Su, C.-Y.; Wong, C.-Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11892-11893.

<sup>136</sup> Dauben, W. G.; Ollman, R. R.; Funhoff, A. S.; Leung, S. S.; Norman, A. W.; Bishop, J. E. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4643-4646.

<sup>137</sup> Steinmeyer, A.; Schwarz, K.; Haberey, M.; Langer, G.; Wiesinger, G. *Steroids* **2001**, *66*, 257-266.

<sup>138</sup> Steinmeyer, A.; Neef, G.; Kirsch, G.; Schwarz, K.; Wiesinger, H.; Haberey, M.; Fähnrich, M.; Langer, G.; US Patent 6531459, **2003**.

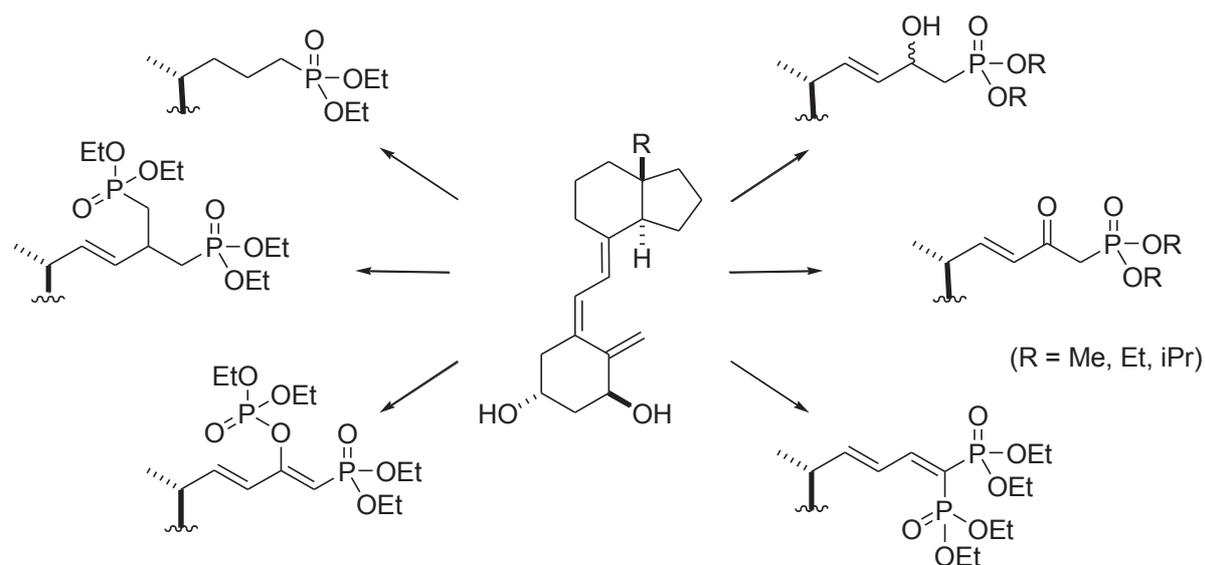
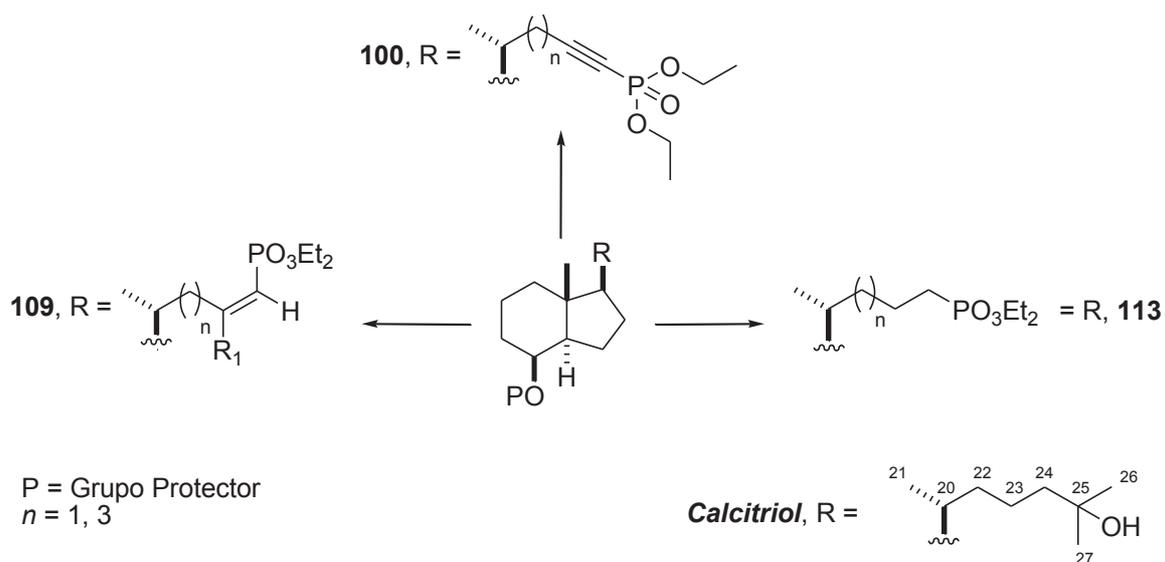


Figura 18. Fosfonatos y bisfosfonatos análogos del calcitriol sintetizados por Steinmeyer.

### 3.1.2 Planeamiento sintético

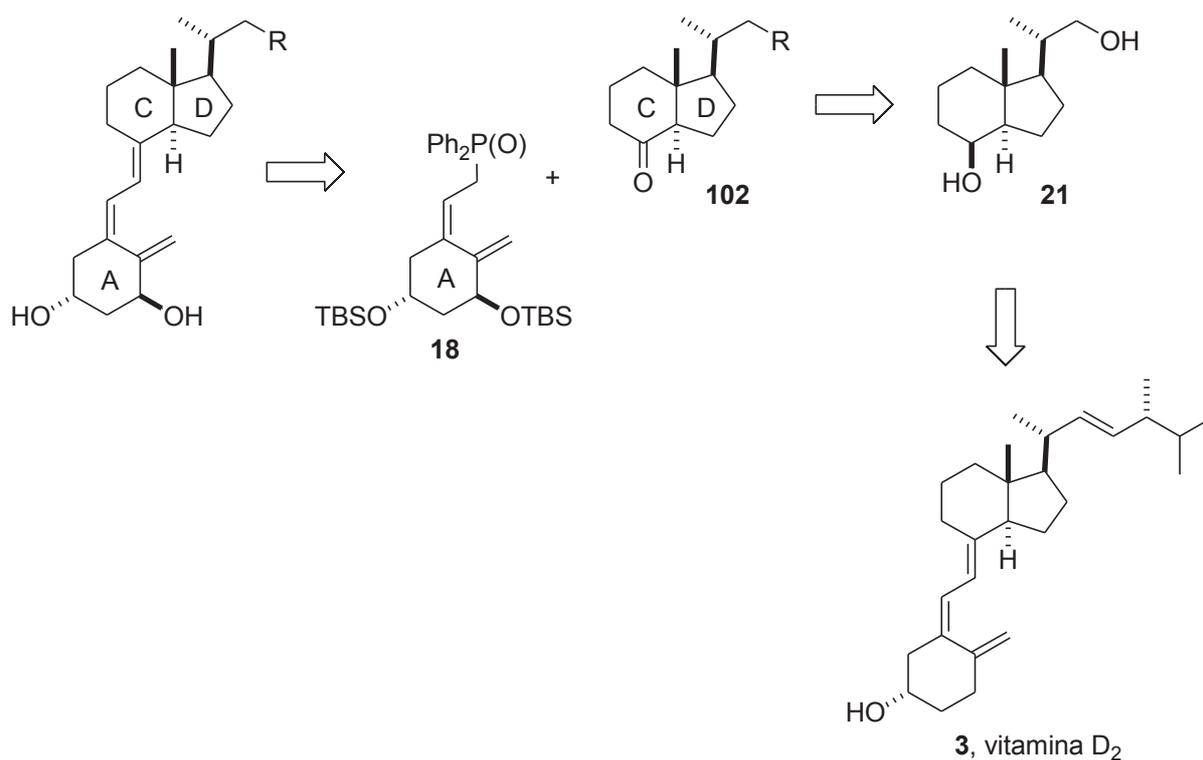
Por nuestra parte, nos propusimos desarrollar una estrategia de síntesis versátil y flexible, que nos permita acceder a una serie de derivados fosfónicos con distinta longitud en la cadena lateral (**100**, **109**, **113**), a fin de obtener en última instancia una pequeña biblioteca de análogos fosfónicos de la hormona de la vitamina D (**Esquema 20**).



Esquema 20.

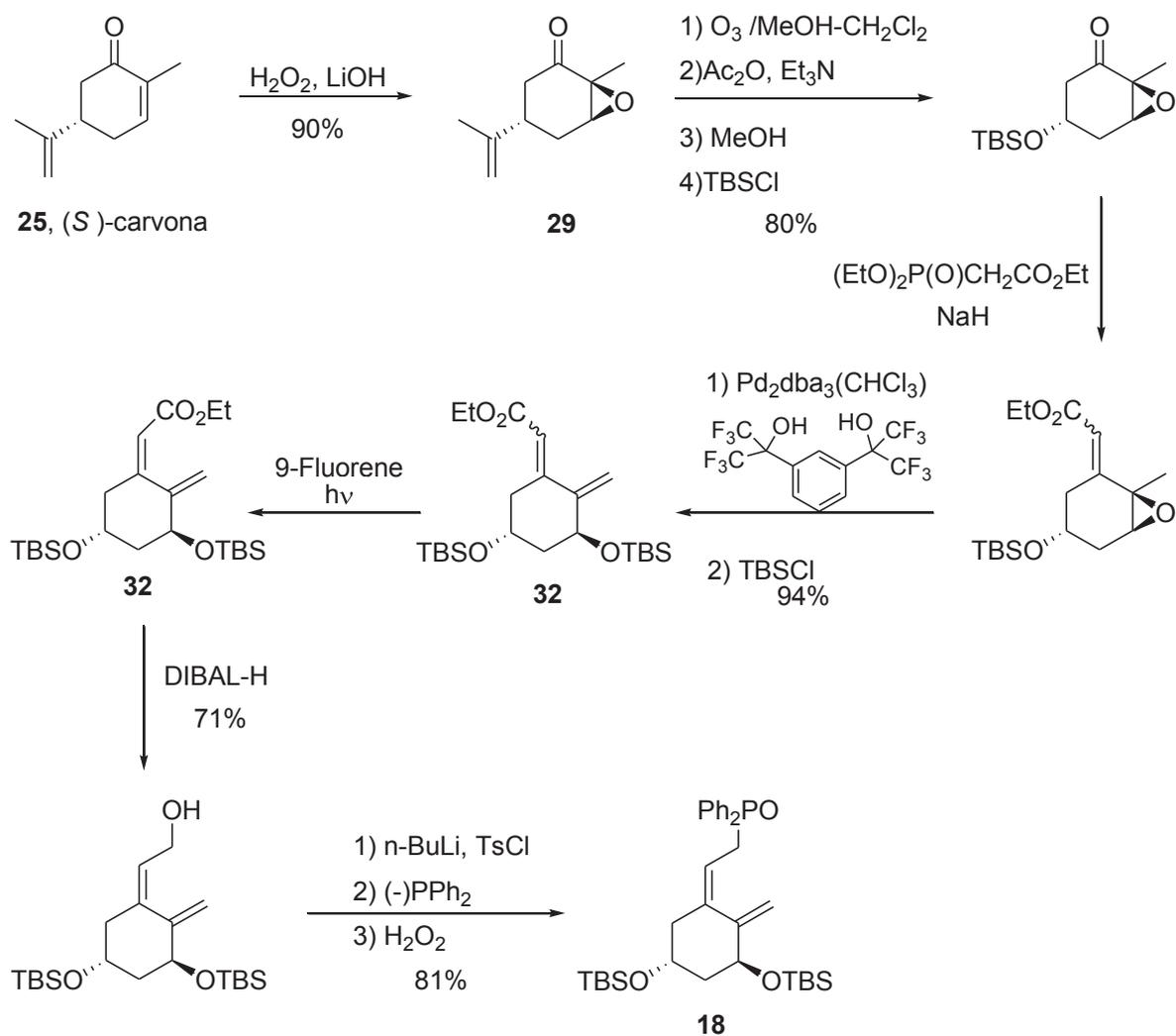
Teniendo en cuenta los objetivos sintéticos planteados, se optó por una estrategia convergente, que por un lado permitiera trabajar sobre el bicyclo CD, realizando las

modificaciones necesarias en la cadena lateral, para después formar el sistema triénico y dar lugar a los análogos correspondientes. Para la construcción de dicho sistema nos resultó particularmente atractiva la ruta de Lythgoe, basada en el acoplamiento de Wittig-Horner entre el anión del óxido de fosfina portador del anillo A (**18**, **Esquema 21**) y las correspondientes cetonas de Grundmann con la cadena lateral modificada (**102**). Este método permite construir el sistema triénico de manera eficiente y en condiciones suaves en las últimas etapas de la síntesis.



**Esquema 21.** Esquema retrosintético para la preparación de los análogos fosfónicos.

Para la síntesis de las cetonas con la cadena lateral modificada (**102**) se seleccionó como sustrato de partida el diol de Inhoffen **21**, el cual se obtuvo por degradación de la vitamina D<sub>2</sub> (**Esquema 21**), según se describe a continuación en el punto 3.1.2.1. Por otro lado, el óxido de fosfina correspondiente al fragmento del anillo A (**18**) se sintetizó de acuerdo al procedimiento optimizado en los laboratorios del Prof. Y. Fall, basado en la estrategia de Daniewski, A.<sup>111</sup> En el siguiente esquema se resume la síntesis de **18** obtenido en 7 etapas a partir de la S-carvona (**Esquema 22**).

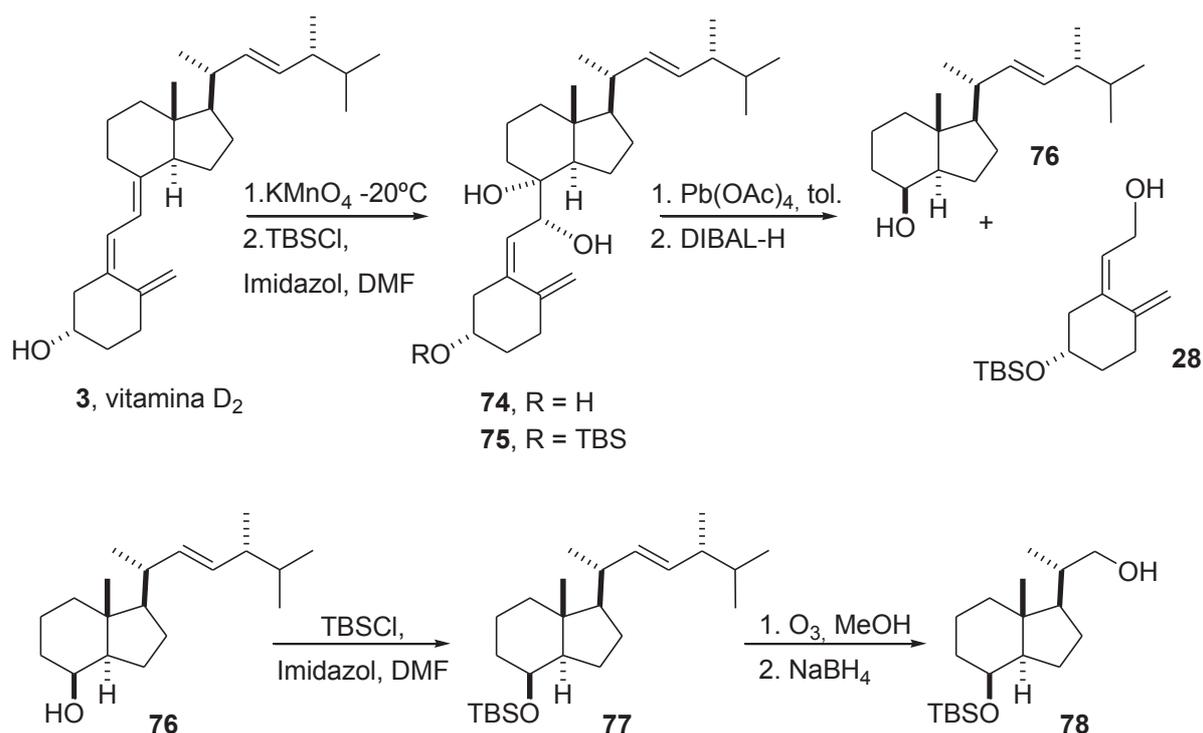


Esquema 22. Síntesis del Óxido de Fosfina 18.

### 3.1.2.1 Síntesis del diol de Inhoffen-Lythgoe.

Durante el transcurso del trabajo de tesis, el diol de Inhoffen-Lythgoe (**21**) fue obtenido a partir de la vitamina D<sub>2</sub> (comercial) mediante dos procedimientos distintos: a) por ruptura oxidativa del sistema triénico y b) por ozonólisis reductora directa.

El primer procedimiento, aunque más extenso, permite obtener el fragmento **28** además del bicyclo CD **76** (Esquema 23).<sup>116</sup> Siguiendo el procedimiento descrito en la literatura,<sup>117</sup> se oxidó selectivamente el enlace C7-C8 con KMnO<sub>4</sub>, y a continuación el triol obtenido (**74**) fue protegido de manera selectiva en el hidroxilo C1 del anillo A. El diol **75** fue sometido a una ruptura oxidativa con tetraacetato de plomo seguida de reducción, para la cual usamos DIBAL-H en lugar de Red-Al. De esta manera se obtuvo el fragmento del bicyclo CD **76** (94%) y el alcohol correspondiente al anillo A **28** (63%). Luego de proteger el grupo hidroxilo en el C8 del bicyclo CD **76**, la ozonólisis reductora de la cadena lateral de **77** dio lugar finalmente al diol de Inhoffen protegido en C8 **78** con 51% de rendimiento.<sup>139</sup>

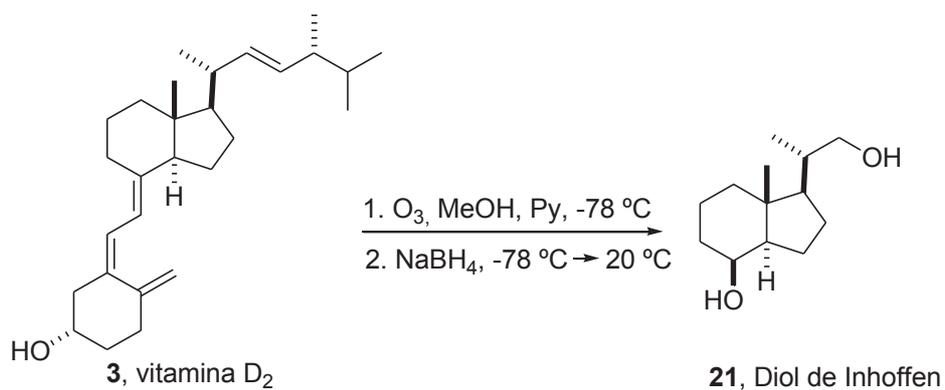


**Esquema 23.** Obtención del diol de Inhoffen-Lythgoe por ruptura oxidativa de la vitamina D<sub>2</sub>.

Por otro lado, como parte del trabajo realizado durante una estancia predoctoral en la Universidad de Vigo (España), se obtuvo el diol de Inhoffen-Lythgoe por degradación directa de la vitamina D<sub>2</sub> de acuerdo a los procedimientos desarrollados por el grupo del Prof. Y. Fall. De esta manera, la ozonólisis de la vitamina D<sub>2</sub> en metanol a -78 °C seguida de

<sup>139</sup> Sardina, F. J.; Mouriño, A.; Castedo, L. J. *Org. Chem.* **1986**, *51*, 1264-1269.

reducción con  $\text{NaBH}_4$  condujo al diol de Inhoffen-Lythgoe **21** con un rendimiento del 88% (Esquema 24).<sup>139</sup>



**Esquema 24.** Obtención del diol de Inhoffen-Lythgoe por ozonólisis reductora de la vitamina D<sub>2</sub>.

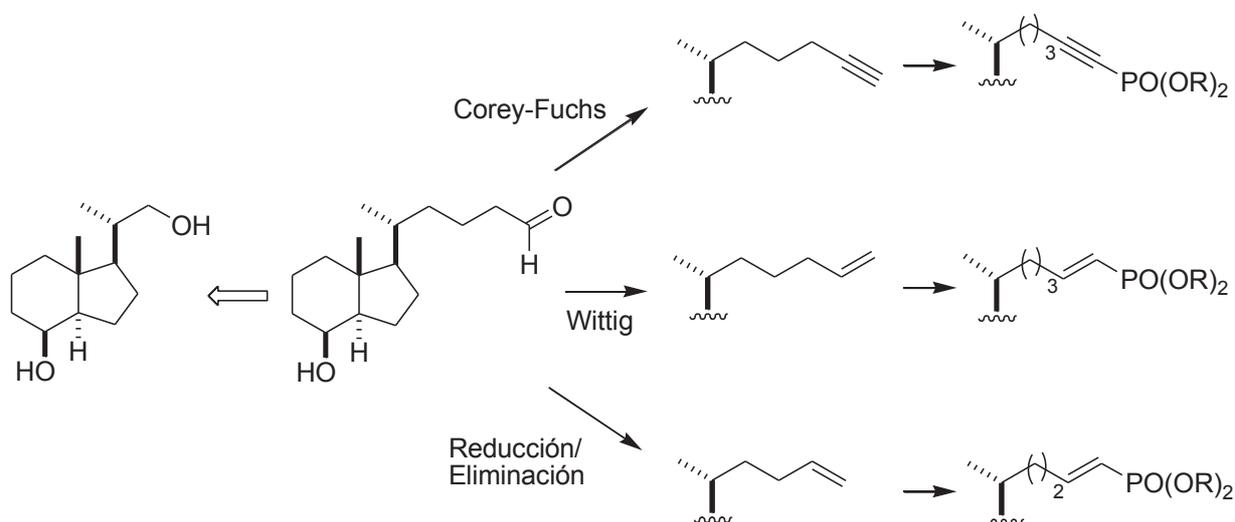
### 3.1.2.2 Construcción y funcionalización de la cadena lateral.

Se conocen varios métodos para la síntesis de vinilfosfonatos, los cuales se pueden dividir en:

- los denominados métodos no catalíticos,<sup>140</sup> como la olefinación de fosfonatos con un grupo metileno activo, por deshidratación o deshalogenación de los correspondientes alquilfosfonatos; y
- numerosos métodos basados en reacciones promovidas por metales de transición.<sup>141</sup> Entre estos últimos se destaca la carbocupración de alquini fosfonatos como un procedimiento atractivo, ya que permite la preparación de una amplia variedad de alqueni fosfonatos con distinto grado de sustitución, de manera estereoselectiva y partiendo de reactivos y sustratos fácilmente asequibles.<sup>142</sup>

En la mayoría de los métodos de ambos tipos de aproximaciones, el aldehído resulta ser el precursor común, permitiendo incorporar la funcionalidad de fósforo a través de un doble o triple enlace. Por otro lado, este grupo funcional ofrece la posibilidad de modificar la longitud de la cadena lateral de manera tal de poder generar una pequeña biblioteca de análogos que permitan evaluar relaciones entre estructura y actividad.

En el esquema siguiente se encuentran resumidas las estrategias elegidas para abordar los objetivos sintéticos planteados precedentemente.



**Esquema 25.** Cadena lateral normal con el fosfonato en C26 y homologadas en un átomo de carbono.

<sup>140</sup> Minami, T.; Motoyoshiya, J. *Synthesis* **1992**, 333-349.

<sup>141</sup> Maffei, M. *Curr. Org. Synth.* **2004**, *1*, 355-375.

<sup>142</sup> (a) Gil, J. M.; Oh, D. Y.; *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2950-2953. (b) Cristau, H-J.; Mbianda, X. Y.; Beziat, Y.; Gasc, M-B *J. Organomet. Chem.*, **1997**, *529*, 301-311.

Para la construcción de la cadena lateral a partir del diol de Inhoffen (**21**), se abordó la homologación de la misma en 3 átomos de carbono con una función aldehído en el extremo, de manera tal que permitiera su posterior funcionalización.

Con este fin se recurrió, como primera opción, a distintas metodologías basadas en reacciones de sustitución nucleofílica y de adición conjugada, empleadas en el campo de la vitamina D para la construcción de la cadena lateral.<sup>143</sup> Las alternativas evaluadas y los resultados obtenidos en cada caso se resumen en la **Tabla 6**. En un principio, se empleó como sustrato (**Tabla 6**, entrada 1) el biciclo CD **79**. Sin embargo dado que no se obtuvieron los resultados esperados, a continuación se evaluaron y ensayaron las condiciones de reacción utilizando primero sustratos modelo más sencillos (**Tabla 6**, entradas 2, 3, 5 y 6), para luego, en función de los resultados obtenidos aplicar el procedimiento sobre el sustrato bicíclico (**Tabla 6**, entrada 4).

En la entrada 1 se utilizó la estrategia desarrollada originalmente por Lythgoe<sup>144</sup> y modificada luego por Okamura<sup>145</sup> para la construcción de la cadena lateral de la hormona natural. Esta estrategia implica el acoplamiento del reactivo de Grignard del 4-cloro-2-metil-1-buteno con el tosilato **79** en presencia de tetraclorocuprato de dilutio, donde el grupo hidroxilo de la posición 8 $\beta$  puede o no estar protegido.<sup>146</sup> En nuestro caso, la reacción de acoplamiento entre el tosilato **79** y un reactivo de Grignard (**80**) con una reactividad diferente, generado a partir de 2-(2-cloroetil)-1,3-dioxolano,<sup>147</sup> condujo al diol de Inhoffen **21** recuperándose de esta manera el sustrato (**Tabla 6**, entrada 1).<sup>148</sup> Como una alternativa a la estrategia anterior, se llevó a cabo la reacción de acoplamiento cruzado entre el mismo organomagnesiano **80** y el tosilato **81** catalizada por un complejo de níquel, utilizando butadieno como aditivo (**Tabla 6**, entrada 2).<sup>149</sup> El resultado fue un bajo rendimiento con un pobre porcentaje de conversión, ya que gran parte del sustrato de partida quedó sin reaccionar.

Otra estrategia conocida para la construcción de la cadena lateral son las reacciones de adición conjugada de un grupo alquilo sobre olefinas  $\pi$  deficientes, bajo distintas condiciones: a) por sonicación en presencia de Zn y CuI, y b) mediante complejos de Ni(0). El primer procedimiento, mejorado por Mouriño, se utilizó en las entradas 3 y 4 de acuerdo a las condiciones descritas en la literatura.<sup>150</sup> Como resultado de la reacción entre 1-iodononano y el dioxolano **84** como olefina  $\pi$  deficiente (entrada 3), se obtuvo el producto de acoplamiento esperado (**85**) con rendimientos moderados.

<sup>143</sup> Ver ref. 106, p. 1924.

<sup>144</sup> Lythgoe, B.; Roberts, D. A.; Waterhouse, I. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 2608-2612.

<sup>145</sup> Leyes, G. A.; Okamura, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6099-6105.

<sup>146</sup> Barrack, S. A.; Gibbs, R. A.; Okamura, W. H. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1790-1796.

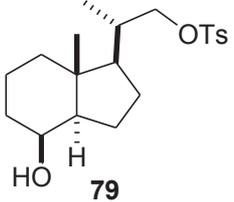
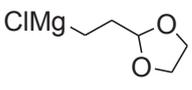
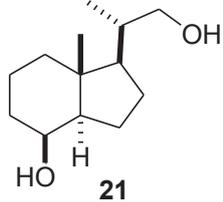
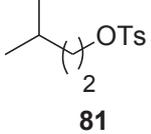
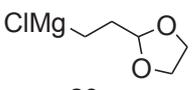
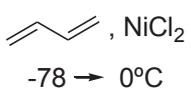
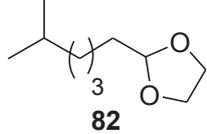
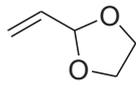
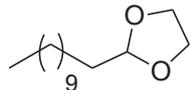
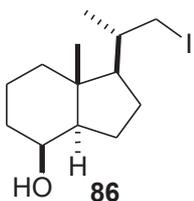
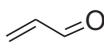
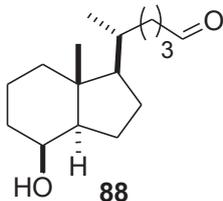
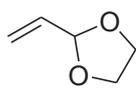
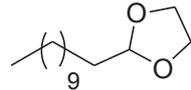
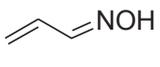
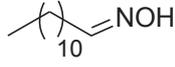
<sup>147</sup> Sintetizado a partir de **84** (44%): (a) Buchi, G.; Wuest, H. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 1122-1123. (b) Vogel A. I. *Practical Organic Chemistry*. 3<sup>a</sup> Ed., Ed. Longman. **1966**, pág. 179-180.

<sup>148</sup> DeLuca, H. F.; Grzywacz, P. K. USP 6894037, **2005**.

<sup>149</sup> Terao, J.; Watanabe, H.; Ikumi, A.; Kuniyasu, H.; Kambe, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4222-4223.

<sup>150</sup> Pérez Sestelo, J.; Mascareñas, J. L.; Castedo, L.; Mouriño, A. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 118-123.

**Tabla 6.** Reacciones de sustitución nucleofílica y adición conjugada para la homologación de la cadena lateral.

Entrada	Reactivos <sup>a</sup>	Cond. de Reac.	Producto <sup>b</sup>	Rend. [%] <sup>c</sup>	
1	 <b>79</b>	 <b>80</b>	Li <sub>2</sub> CuCl <sub>4</sub> , THF t.a.	 <b>21</b>	90
2	 <b>81</b>	 <b>80</b>	 , NiCl <sub>2</sub> -78 → 0°C	 <b>82</b>	23
3	 <b>83</b>	 <b>84</b>	CuI, Zn / )))) EtOH:H <sub>2</sub> O (7:3)	 <b>85</b>	40
4	 <b>86</b>	 <b>87</b>	CuI, Zn / )))) EtOH:H <sub>2</sub> O (7:3)	 <b>88</b>	10
5	 <b>83</b>	 <b>84</b>	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, Zn / piridina, t.a.	 <b>85</b>	— <sup>d</sup>
6	 <b>83</b>	 <b>89</b>	NiCl <sub>2</sub> anh., Zn / piridina, t.a.	 <b>90</b>	40

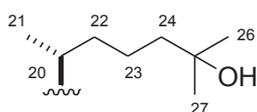
<sup>a</sup> Compuestos preparados: **80**, **87** y **89** a partir de **84**; **81** a partir del alcohol amílico; **86** a partir de **79**, y **79** a partir del diol de Inhoffen **21**. <sup>b</sup> Para la asignación estructural de los compuestos se utilizó <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN y/o GL-EM. <sup>c</sup> Rendimiento de producto aislado por cromatografía de columna (sílica gel, Hex/AcOEt). <sup>d</sup> Se obtuvo mayoritariamente el producto de homoacoplamiento de **83**.

Teniendo en cuenta este resultado, en la entrada 4 se llevó a cabo la reacción sobre el bicyclo **86** pero utilizando acroleína (**87**), ya que la consideramos una olefina  $\pi$  deficiente más adecuada. Sin embargo la reacción dio lugar al producto de acoplamiento deseado con muy bajo rendimiento. Por otro lado, en las entradas 5 y 6 se utilizaron complejos de Ni(0) para la reacción de adición de 1-iodononano sobre el dioxolano **84** y la oxima **89**

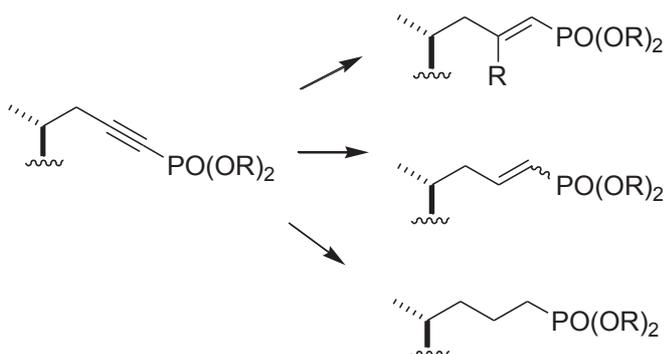
respectivamente.<sup>151</sup> En este último caso se utilizó la oxima de la acroleína como un intento por mejorar la reactividad de la misma, obteniéndose el correspondiente producto de acoplamiento **90** con un rendimiento moderado. Sin embargo, se encontró que además se generaban varios subproductos, debido principalmente a la inestabilidad de la oxima **89**.

En vista de que los resultados no fueron lo suficientemente satisfactorios como para incorporarlos al esquema de síntesis planteado para acceder a los análogos fósforo-funcionalizados con la longitud de la cadena lateral propuesta, se consideró apropiado construir una cadena lateral un carbono más corta donde un grupo fosfonato emulara la posición C25 con el hidroxilo correspondiente (**Esquema 26**). Este nuevo enfoque sintético plantea la posibilidad de preparar un análogo funcionalizado como alquínifosfonato, y a partir del mismo generar distintos alquil y alquenilfosfonatos análogos del calcitriol, a través de distintas alternativas de reducción y/o carbocupración sobre el sistema mencionado.

**Cadena lateral de la  
Homona Natural**



**Longitud de la cadena  
propuesta para los análogos**



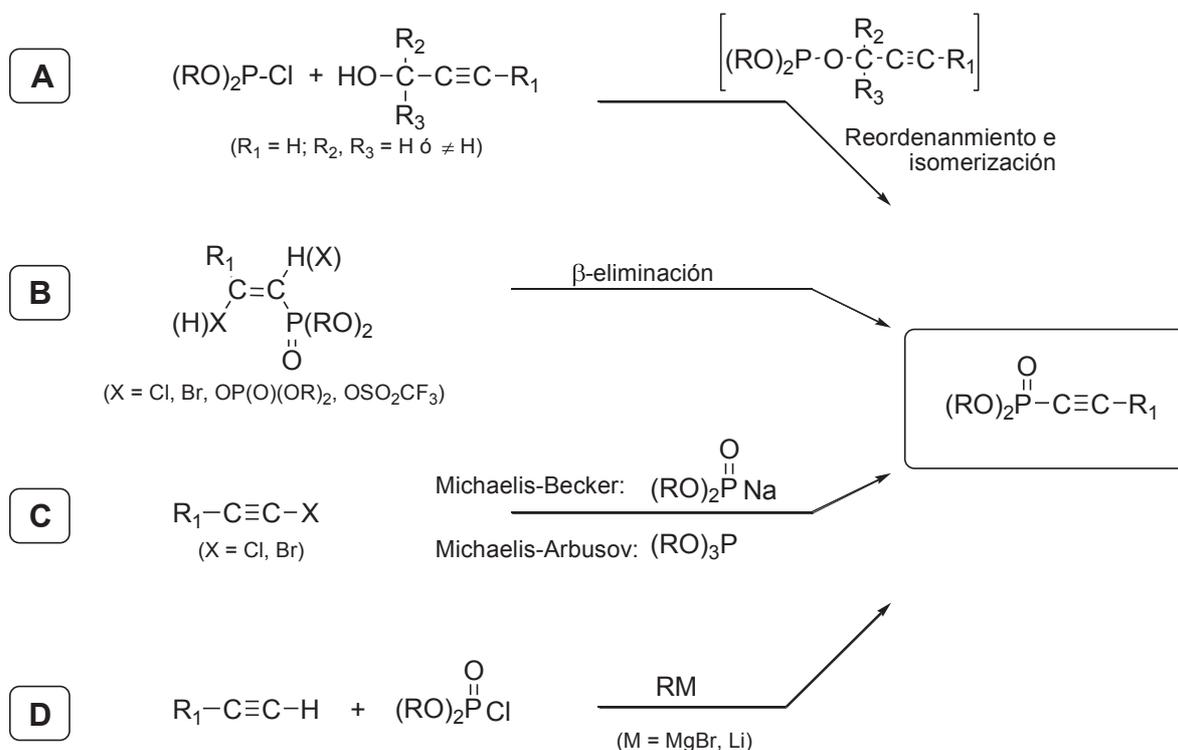
**Esquema 26.** Cadena lateral funcionalizada como alquínifosfonato y derivados.

De acuerdo a la bibliografía las principales metodologías para la preparación de alquínifosfonatos se pueden clasificar en cuatro categorías, tal como se resume en el **Esquema 27**.

De los distintos métodos para la preparación de los alquínifosfonatos, los métodos **A** y **B** tienen un alcance limitado debido principalmente a la estrecha variedad estructural del sustrato de partida (en general  $R=H$ ), o a que proceden con bajos rendimientos (46-50%). Los últimos dos procedimientos sintéticos, **C** y **D**, se basan en una reacción de sustitución nucleofílica para la formación del enlace C-P e implican la preparación y reacción del alquino terminal o el halogenuro de 1-alquínilo correspondiente. Según se ha demostrado en varias síntesis paralelas, el método **D**, en el cual la reacción ocurre a través de acetiluros de litio, presenta varias ventajas sobre el método **C** relacionados principalmente con los

<sup>151</sup> Manchand, P. S.; Yiannikouros, G. P.; Belica, P. S.; Madan, P. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6574-6581.

buenos rendimientos (70-80%) y productos de reacción fácilmente purificables.<sup>152</sup> Por otro lado, la comparación de las secuencias de síntesis utilizando acetiluros de litio y magnesio con respecto al empleo de clorofosfato de dietilo, bajo las mismas condiciones experimentales, revela que el uso de acetiluros de litio resulta en rendimientos significativamente mayores.<sup>153</sup>



**Esquema 27.** Distintas metodologías para la síntesis de alquiniolfosfonatos.

Consideramos que este último método, y en particular el procedimiento desarrollado por Oh y colaboradores,<sup>154</sup> era el más simple y aplicable para la preparación de los alquiniolfosfonatos. El procedimiento original implica desprotonar un alquino terminal con *n*-BuLi y seguidamente atrapar el anión formado con clorofosfato de dietilo para generar los correspondientes alquiniolfosfonatos.

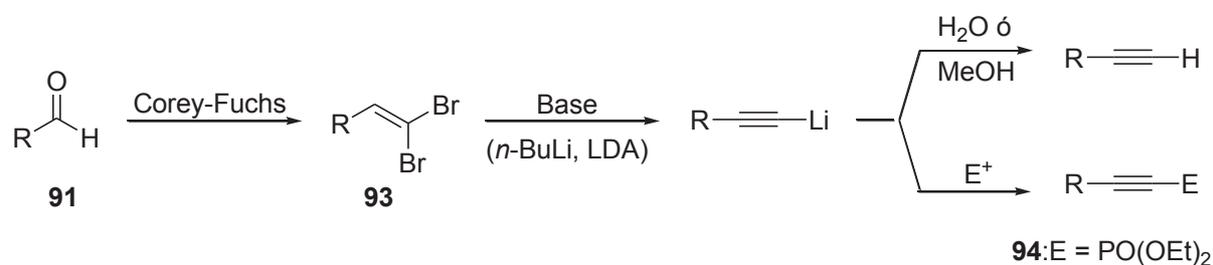
Planteamos entonces la preparación de alquinos terminales a partir de aldehídos empleando la reacción de Corey-Fuchs (**Esquema 28**). Esta metodología implica la formación de un *gem*-dihaloalqueno mediante una reacción tipo Wittig, homologando en un carbono el aldehído de partida. El posterior tratamiento de dicho dihaloalqueno intermediario con una base de litio (*n*-BuLi, LDA), da lugar a un alquiniol-litio por deshidrohalogenación y subsecuente intercambio metal-halógeno. A continuación este alquiniol-litio permite obtener un alquino terminal en las condiciones de elaboración de la reacción (MeOH, H<sub>2</sub>O), o

<sup>152</sup> Rudinkas, A. J.; Hullar, T. L. *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 1367-1371.

<sup>153</sup> Tronchet, J. M. J.; Bonenfant, A. P. *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, 205-217.

<sup>154</sup> Gil, J. M.; Sung, J. W.; Park, C. P.; Oh, D. Y. *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 3171-3174.

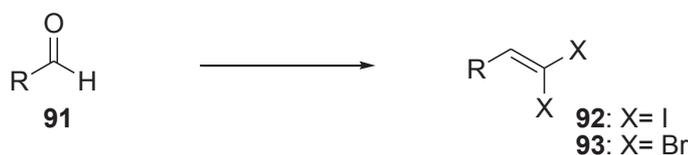
alternativamente, distintos derivados según el electrófilo utilizado para atrapar el alquil-litio. En nuestro caso, agregando el clorofosfato de dietilo previo a la elaboración de la reacción, nos permitiría obtener el alquilfosfonato deseado en una secuencia de tres pasos a partir del aldehído.



**Esquema 28.** Preparación de alquinos terminales y derivados a partir de aldehídos.

A fin de optimizar el procedimiento para esta secuencia de reacciones, en una primera etapa se ensayaron las condiciones de reacción utilizando sustratos sencillos como modelo (citronelal y *p*-anisaldehído). Se probaron distintas metodologías para obtener el *gem*-dibromoalqueno **93** según las condiciones descritas en la literatura, entre las cuales se incluyó como alternativa la preparación del *gem*-diiodoalqueno **92** vía el correspondiente iluro (**Tabla 7**).<sup>155</sup>

**Tabla 7.** Metodologías ensayadas para la preparación de los *gem*-dihaloalquenos.



Entrada	Aldehído (R)	Condiciones de Reacción	<i>gem</i> -dihaloalqueno (X)
1	<b>91b</b>	1. (Ph <sub>3</sub> P-CHI <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> I <sup>-</sup> 2. <i>n</i> -BuLi, -40 °C	<b>92b</b> (I)
2	<b>91a</b>	CBr <sub>4</sub> , PPh <sub>3</sub> , Zn (polvo), Piridina, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<b>93a</b> (Br)
3	<b>91a</b> y <b>91b</b>	CBr <sub>4</sub> , PPh <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 0° → 20°C	<b>93a</b> y <b>93b</b> (Br)

<sup>155</sup> Fall, Y.; Vitale, C; Mouriño, A *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 7337-7340.

De las metodologías ensayadas (**Tabla 7**, entradas 1-3) para la obtención de los *gem*-dihaluros intermediarios, la que se muestra en la entrada 3 nos permitió obtener los correspondientes *gem*-dibromoalquenos **93a-b** con rendimientos del 75-95%;<sup>156</sup> mientras que según las condiciones de la entrada 2 la reacción no se completó, dando rendimientos muy bajos.<sup>157</sup> Por otro lado, el *gem*-diiodoalqueno **92b** (**Tabla 7**, entrada 1) se obtuvo con rendimientos cercanos al 40% en el mejor de los casos, lo cual fue atribuido a cierta dificultad en la obtención del correspondiente iluro lo suficientemente puro, y a la inestabilidad del propio *gem*-diioduro. En vistas de estos resultados, para llevar a cabo la síntesis de los alquenos dibromados deseados se optó por la metodología ensayada en la entrada 3 (**Tabla 7**). Cabe destacar que este método presenta ventajas adicionales, entre ellas tiempos de reacción cortos (30-50 min), condiciones suaves y la posibilidad de obtener el producto prácticamente puro luego de filtrar la mezcla de reacción a través de sílica gel, prescindiendo de una posterior purificación.

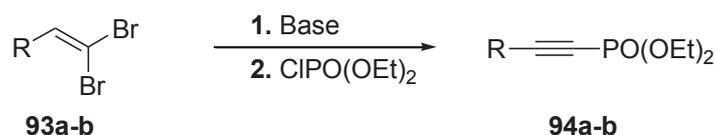
A continuación se trabajó en la optimización de las dos etapas subsiguientes para la obtención de los alquiniulfosfonatos a partir de *gem*-dibromoalquenos (**Esquema 28**), con el objetivo de encontrar las mejores condiciones para un procedimiento *one-pot*. En la **Tabla 8** se resumen los distintos ensayos realizados en los cuales se probaron distintas bases (*n*-BuLi y LDA), relaciones molares y orden de agregado de reactantes.

Se observó que utilizando *n*-BuLi como base, empleando las condiciones de Oh y colaboradores,<sup>13</sup> se forma butilfosfonato de dietilo como producto secundario de reacción, el cual tiene un *R<sub>f</sub>* muy similar al de los alquiniulfosfonatos deseados, dificultando la separación cromatográfica de los mismos. Este mismo resultado se observó cuando se llevó a cabo la reacción con 1-octino, en lugar del dibromoalqueno correspondiente, en las mismas condiciones detalladas en la entrada 2 de la **Tabla 8**. Utilizando LDA en lugar de *n*-BuLi se consiguió eliminar el subproducto mencionado. La relación estequiométrica *gem*-dibromoalqueno/base/clorofosfato de dietilo más adecuada resultó ser 1:3:2,1 (**Tabla 8**, entradas 5 y 6), obteniéndose los alquiniulfosfonatos con rendimientos aceptables. No obstante, al invertir el orden de agregado y añadir el dibromoalqueno sobre la base (LDA), el rendimiento de la reacción mejoró sensiblemente (**Tabla 8**, entrada 7).

Finalmente, la optimización de esta secuencia de tres reacciones dio lugar a los alquiniulfosfonatos **94a** y **94b** con rendimientos globales muy buenos (74%), evitando la purificación del dibromoalqueno intermediario y con un procedimiento *one-pot* para la segunda etapa (**Esquema 29**).

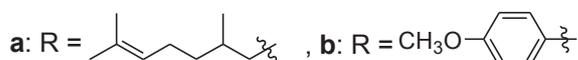
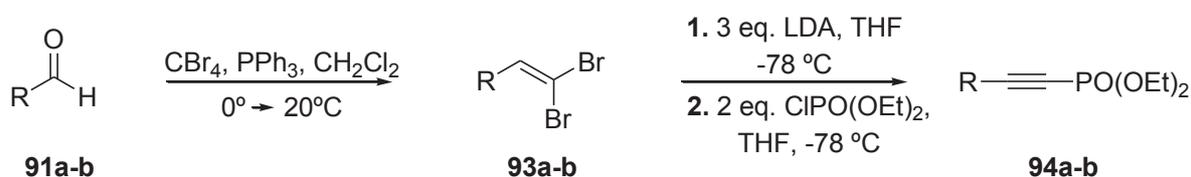
<sup>156</sup> Corey, E. J.; Fuchs, P. L. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 3769-3772.

<sup>157</sup> Mascareñas, J. L.; Sarandeses, L. A.; Castedo, L.; Mouriño, A. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3485-3498.

Tabla 8. Preparación de los alquiniolfosfonatos a partir de gem-dibromoalquenos.<sup>a</sup>

Entrada	93 (R)	Base	93 / Base / CIPO(OEt) <sub>2</sub>	94 (Rend.%) <sup>b</sup>
1 <sup>c</sup>	<b>93a</b>	<i>n</i> -BuLi	1 / 2 / 1	<b>94a</b> (25) <sup>d</sup>
2 <sup>c</sup>	<b>93b</b>	<i>n</i> -BuLi	1 / 1,15 / 1,15	<b>94b</b> (30) <sup>d</sup>
3	<b>93a</b>	LDA	1 / 1 / 2	<b>94a</b> (40) <sup>e</sup>
4	<b>93b</b>	LDA	1 / 1 / 2	<b>94b</b> (50) <sup>e</sup>
5	<b>93a</b>	LDA	1 / 3 / 2,1	<b>94a</b> (66)
6	<b>93b</b>	LDA	1 / 3 / 2,1	<b>94b</b> (66)
7 <sup>f</sup>	<b>93a</b>	LDA	1 / 3 / 2,1	<b>94a</b> (80)

<sup>a</sup> Condiciones de Reacción: sobre la solución de **93** en THF a -78 °C se agregó la base, y luego de 1 h se agregó CIPO<sub>3</sub>Et<sub>2</sub> a -78 °C. <sup>b</sup> Rendimiento de producto aislado por cromatografía en columna (sílica gel, Hex/AcOEt). <sup>c</sup> El agregado de *n*-BuLi se hizo a -50 °C. <sup>d</sup> Se aisló además butilfosfonato de dietilo (30 y 67% respectivamente). <sup>e</sup> se recuperó de un 7-15% de sustrato sin reaccionar. <sup>f</sup> Se agregó el sustrato disuelto en THF sobre el LDA.



74 % para los 3 pasos

Esquema 29. Procedimiento optimizado para la preparación de alquiniolfosfonatos.

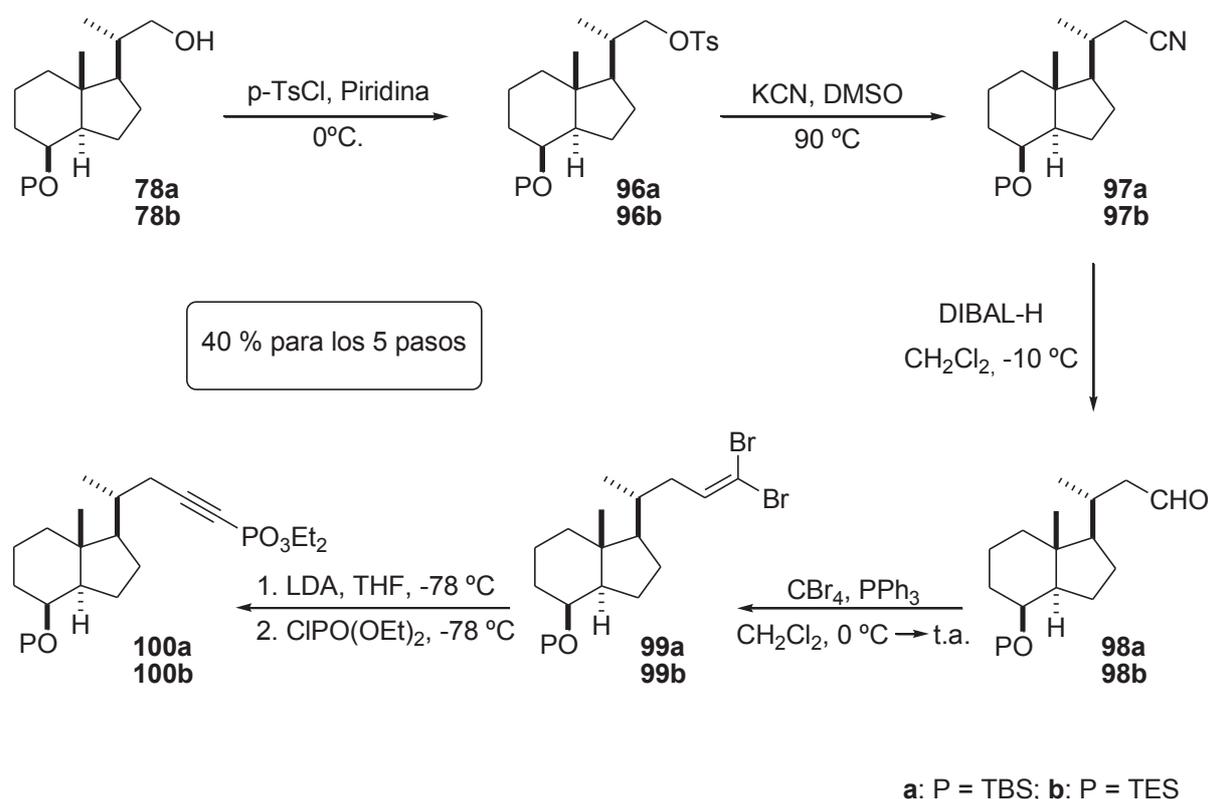
La asignación estructural de los alquiniolfosfonatos **94a** y **94b**, así como de los correspondientes dibromoalquenos intermedios, se realizó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H- y <sup>13</sup>C.

### 3.1.2.3 Síntesis de la cetona tipo Grundmann 102.

En función de las condiciones optimizadas con los sustratos modelo se consideró elongar la cadena y generar el aldehído, a través de la incorporación de un grupo nitrilo y su posterior reducción. Comparada con la estrategia planteada inicialmente, esta modificación le suma un paso adicional al esquema de síntesis (**Esquema 25**), sin embargo implica transformaciones sencillas que proceden con buenos rendimientos.

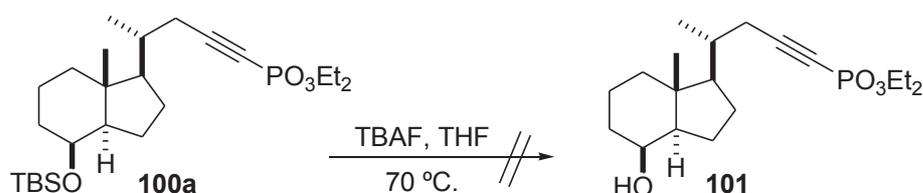
Tal como se muestra en el **Esquema 30**, la cadena lateral se construyó a partir del diol de Inhoffen protegido **78a**, obtenido previamente mediante la degradación oxidativa de la vitamina D<sub>2</sub> (**Esquema 23**). La tosilación de **78a**, de acuerdo a las condiciones descritas en la literatura,<sup>106</sup> proporcionó el correspondiente tosilato **96a** prácticamente puro. La posterior sustitución nucleofílica con cianuro de potasio, calentado a reflujo durante 3 h, rindió el nitrilo **97a**, el cual por reducción con DIBAL-H dio lugar al correspondiente aldehído **98a**. Cabe destacar que las mencionadas transformaciones proceden con la conversión total de los sustratos, según se observó por TLC. Además, el análisis por <sup>1</sup>H-RMN de los productos crudos obtenidos en cada paso, muestra que los mismos se obtienen prácticamente puros, de manera tal que las tres reacciones se llevaron a cabo sucesivamente prescindiendo de las etapas de purificación.

Una vez obtenido el aldehído **98a**, la incorporación de la funcionalidad de fósforo se realizó a través del procedimiento optimizado previamente (**Esquema 29**). Así el dibromoalqueno intermediario **99a** se obtuvo por reacción del aldehído **98a** con trifenilfosfina y tetrabromuro de carbono, utilizando un exceso (50%) de ambos reactivos respecto a las condiciones previamente establecidas. Al cabo de 40 min la reacción se completó (TLC), tras lo cual **99a** se aisló simplemente por filtración de la mezcla de reacción a través de sílica gel, lavando con hexano para arrastrar todo el producto. A continuación el dibromoalqueno se trató con LDA (3 eq.) en las condiciones que se muestran en el **Esquema 30**. Una vez observada la conversión total del sustrato de partida por TLC (aprox. 1 h), se agregó sobre la mezcla de reacción el clorofosfato de dietilo (2 eq). De esta manera luego de elaborar la reacción, y purificar el producto por cromatografía en columna, se obtuvo el alquilfosfonato **100a** con un rendimiento global muy bueno (40%) para las cinco etapas (**78a -100a**).



### Esquema 30.

A continuación, la desprotección del éter de *ter*-butildimetilsililo **100a** utilizando fluoruro de tetra-*n*-butilamonio (TBAF) en THF a reflujo,<sup>158</sup> no proporcionó el alcohol **101** como era previsible sino que se obtuvo una mezcla de compuestos que involucraban la ruptura del enlace C-P (**Esquema 31**).

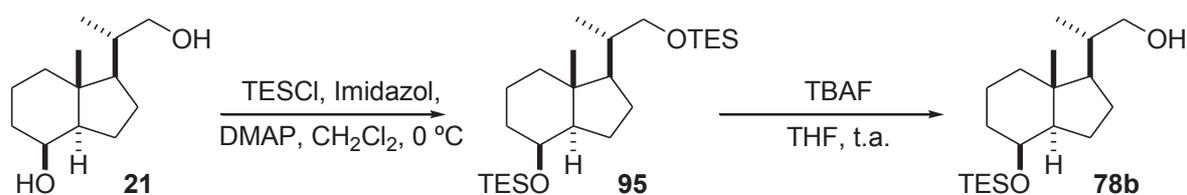


### Esquema 31.

Para evitar este resultado se decidió cambiar el grupo protector *t*-butilsililo (TBS) por el grupo trietilsililo (TES), ya que éste es mucho más lábil que el TBS, pero lo suficientemente estable en las condiciones de reacción y purificación planteadas.

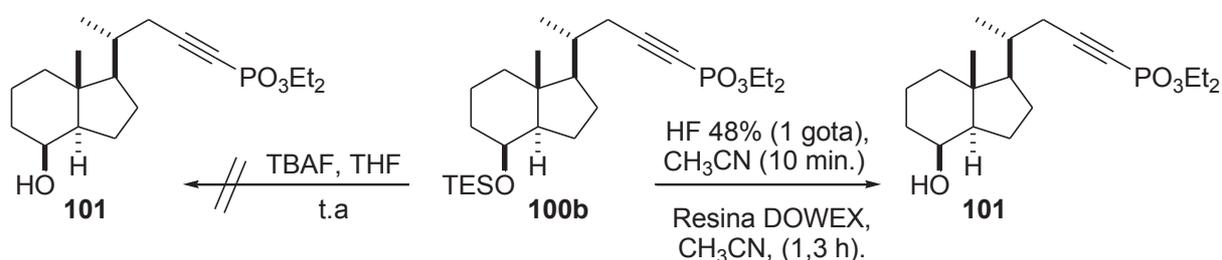
La protección del hidroxilo C-8 como trietilsilil éter para obtener el alcohol **78b** se llevó a cabo en dos pasos a partir del diol de Inhoffen **21**, mediante la protección de ambos grupos hidroxilos y la consecuente desprotección selectiva en C-22 según se muestra en el **Esquema 32**.

<sup>158</sup> Torneiro, Mercedes, *Tesis Doctoral*, Santiago de Compostela, 1994, p. 103.



Esquema 32.

A continuación, partiendo de **78b** se reprodujeron las condiciones experimentales detalladas en el **Esquema 30**, obteniéndose el correspondiente alquiniulfosfonato **100b** con el mismo rendimiento global (40%). Seguidamente se ensayó la desprotección del hidroxilo en C-8 de **100b** a temperatura ambiente, tanto en condiciones básicas como ácidas (**Esquema 33**).



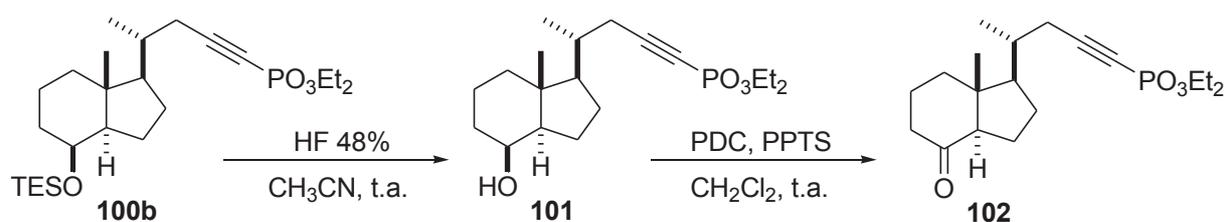
Esquema 33.

En el primer caso se utilizó TBAF, corroborándose el mismo resultado que para la desprotección de **100a**, esto es, subproductos correspondientes a la ruptura del enlace C-P.<sup>159</sup> Dado que en condiciones anhidras el TBAF es una fuente eficiente de ión fluoruro nucleofílico (“desnudo o no solvatado”),<sup>160</sup> la fuerte afinidad del mismo por el fósforo parece ser la causa de la desfosforilación observada.<sup>161</sup> Sin embargo, cuando la reacción de desprotección se ensayó en condiciones ácidas, ya sea utilizando HF 48% o la resina DOWEX,<sup>137</sup> se obtuvo el alcohol esperado **101** con rendimientos excelentes en ambos casos (98 y 85% respectivamente). Considerando que la desprotección con HF 48% demandó un tiempo considerablemente menor, a continuación se emplearon estas condiciones para la desprotección del grupo trietilsililo de **100b**. (**Esquema 34**). El alcohol **101** obtenido de esta manera, y sin previa purificación, se oxidó utilizando PDC y cantidades catalíticas de PPTS. Así, se obtuvo la cetona tipo Grundmann **102** con la cadena lateral fósforo funcionalizada, con rendimientos excelentes luego de su purificación por cromatografía en columna (90%).

<sup>159</sup> Posner, G. H.; Kim, H. J.; Kahraman, M.; Jeon, H. B.; Suh, B. C.; Li, H.; Dolanb, P.; Kensler, T. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5569-5580.

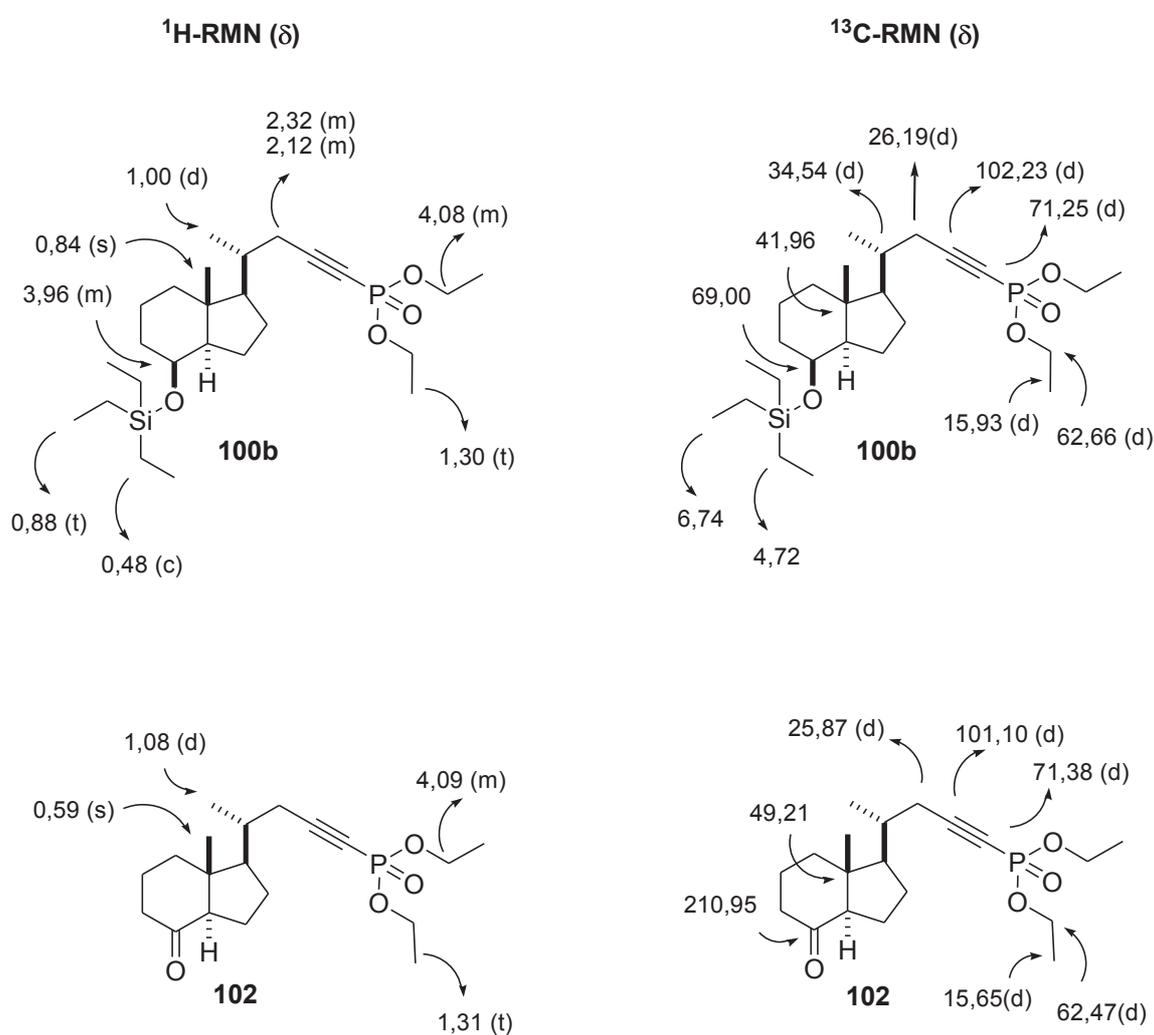
<sup>160</sup> (a) Cox, P. D.; Terpinski, J.; Lawrynowicz, W. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3216-3219. (b) Sun, H.; DiMagno, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2050-2051.

<sup>161</sup> (a) Berry, J. B.; Arnold, J. R. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 1664-1665. (b) Ishihara, T.; Maekawa, T.; Ando, T. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1377-1378.



Esquema 34.

En la **Figura 19** se indican las señales más representativas de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN de los compuestos **100b** y **102**.

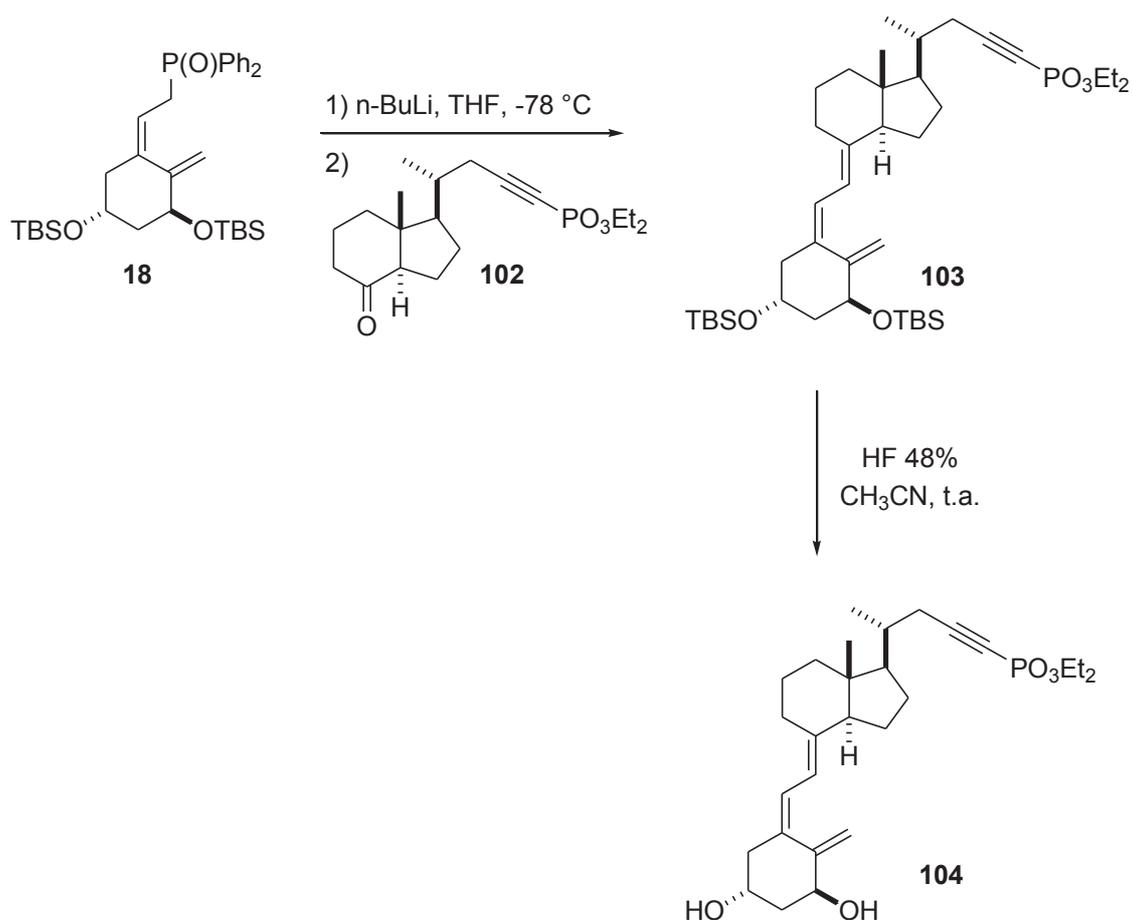


**Figura 19.** Señales más representativas de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN **100b** y **102**.

### 3.1.2.4 Construcción del sistema triénico.

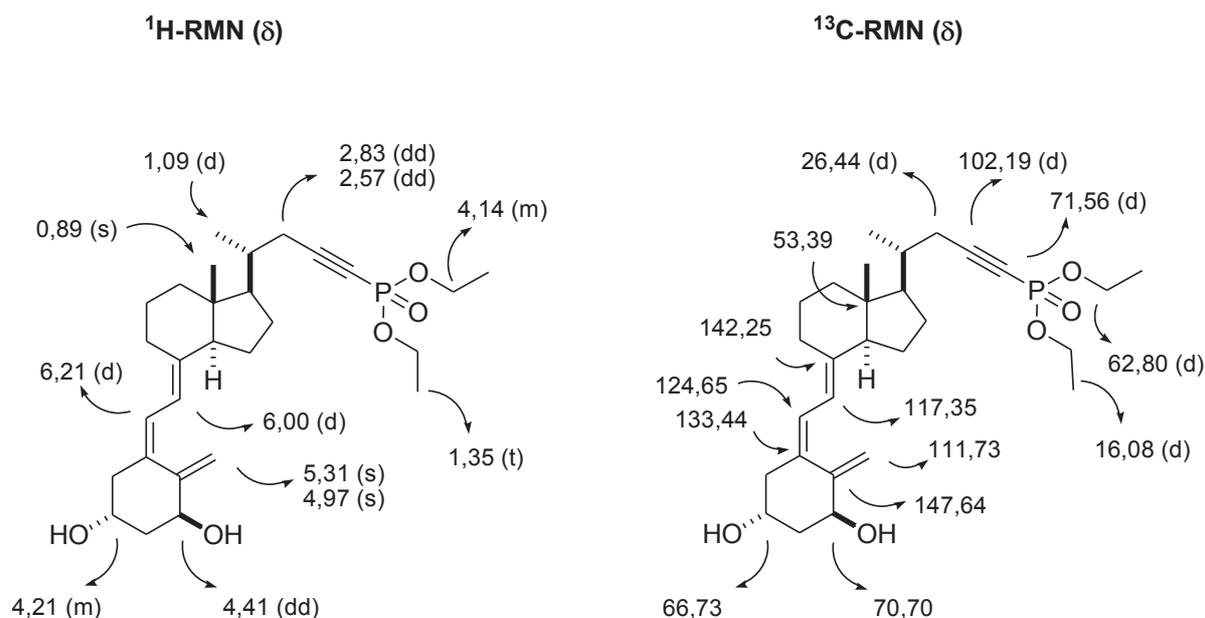
El acoplamiento de Wittig-Horner entre la cetona **102** con la cadena lateral modificada y el óxido de fosfina **18**, permitió la construcción del sistema triénico que dió lugar al análogo protegido **103**. La reacción se llevó a cabo utilizando un exceso del iluro correspondiente al óxido de fosfina **18** (2:1 respecto de **102**), generado en las condiciones que se muestran en el **Esquema 35**. Sobre la solución del mencionado iluro, cuya coloración roja intensa evidencia su formación, se agregó a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  la cetona **102**. Luego de 5 horas de reacción en ausencia de luz, se aisló por cromatografía en columna el análogo **103** con un 60% de rendimiento, recuperándose además el exceso de óxido de fosfina.

Teniendo en cuenta la experiencia previamente adquirida, la desprotección de los grupos hidroxilos en C-1 y C-3 del anillo A de **103** se llevó a cabo a temperatura ambiente y en condiciones ácidas empleando HF 48%. Luego de la correspondiente purificación mediante cromatografía en columna, se obtuvo finalmente el análogo **104** con un rendimiento del 85% para esta etapa.



Esquema 35.

En la **Figura 20** se indican los principales datos espectrocópicos de  $^1\text{H}$ - y  $^{13}\text{C}$ -RMN del análogo **104**. El análisis de  $^{31}\text{P}$ -RMN de **104** muestra una única señal en -6,18 ppm, la cual se corresponde con el desplazamiento esperado para el átomo de fósforo unido a un carbono con hibridación sp. Por otro lado, el análisis de **104** por HRMS confirma su composición, encontrándose una relación m/z igual a 491,29209 correspondiente a M+H ( $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{O}_5\text{P}$ ).



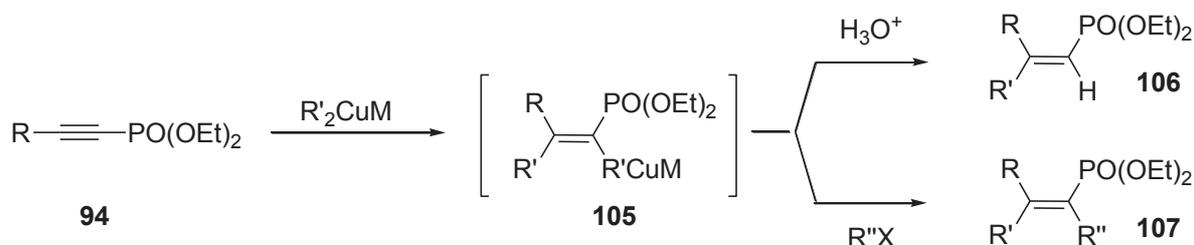
**Figura 20.** Señales más representativas de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN del análogo **104**.

De esta manera conseguimos la síntesis de un nuevo análogo del calcitriol modificado en la cadena lateral como alquiniolfosfonato, mediante una estrategia sintética convergente, en 9 etapas desde el alcohol **78b** y con un rendimiento global del 17 %.

### 3.1.2.5 Síntesis de derivados de alquini fosfonatos por carbocupración.

Como se mencionó anteriormente la carbocupración de alquini fosfonatos constituye un procedimiento atractivo y ventajoso para la modificación de la cadena lateral del alquini fosfonato análogo **103** y su transformación en distintos vinil fosfonatos di- y trialquil sustituidos.

De acuerdo a la literatura, los reactivos organocúpricos ( $R_2CuM$ ;  $M = MgX, Li$ ) reaccionan con alquini fosfonatos de manera regio y estereoselectiva, dando lugar a los correspondientes vinil fosfonatos alquilados con excelentes rendimientos (77-95 %).<sup>142</sup> Se ha observado que el reactivo organocúprico se adiciona al triple enlace alquilando exclusivamente el carbono  $\beta$  con respecto al grupo fosfónico (**Esquema 36**). Esto puede ser explicado asumiendo la formación del fosfonoalquenilcuprato intermediario **105** en el cual la coordinación entre el grupo fosfónico y el cobre probablemente favorece la estabilidad observada de este intermediario a temperatura ambiente.<sup>162</sup> Por otro lado, cuando la adición involucra la posible formación de isómeros geométricos se ha observado la formación estereoespecífica del producto de adición *syn* (**106**) cuando  $R = H, n\text{-Pr}, n\text{-Bu}, n\text{-Hex}, CH_2O\text{Bn}$  y  $Ph$ ; mientras que se ha obtenido exclusivamente el producto de adición *anti* cuando  $R = t\text{-Bu}$ .<sup>163</sup> Esta metodología permite además, la síntesis estereocontrolada de vinil fosfonatos trisustituidos (**107**), a través de la captura del fosfonoalquenilcuprato **105** con distintos electrófilos ( $I_2, TMSCl, MeI, CH_2=CHCH_2Br, PhCH_2Br$ ) con buenos rendimientos (56-86 %).<sup>142</sup>



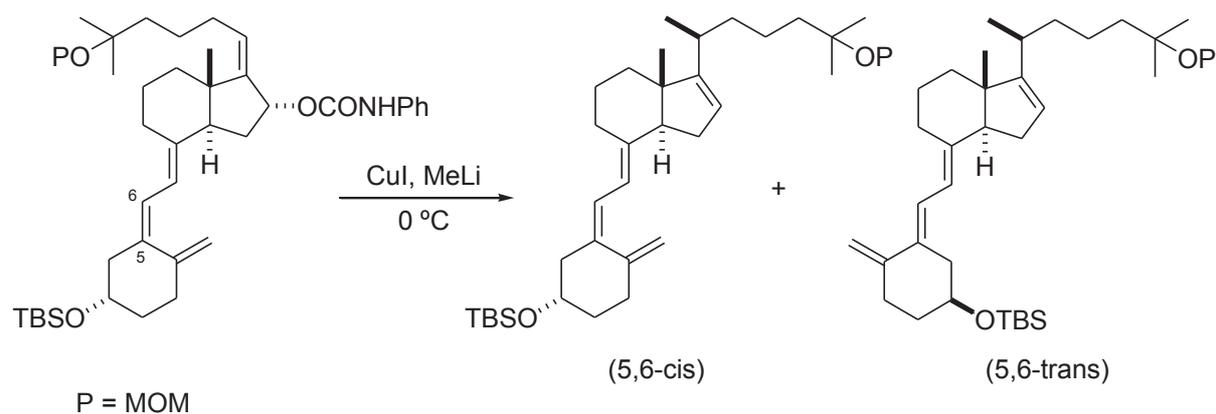
**Esquema 36.** Reacción de carbocupración de alquini fosfonatos.

Por otro lado, los antecedentes sobre la química de cupratos en el campo de la síntesis de análogos de vitamina D, en particular en la preparación de análogos con modificaciones en C-20 mediante reacciones de sustitución  $S_N2'$ , muestra que el sistema triénico es estable frente a los cupratos. De esta manera, el empleo de cupratos para introducir distintos sustituyentes en la cadena lateral de un análogo precursor, en presencia del sistema triénico y en la última etapa de la síntesis, aportó gran versatilidad a la

<sup>162</sup> Mori, S.; Nakamura, E.; Morokuma, K. *Organometallics* **2004**, 23, 1081-1088.

<sup>163</sup> Gil, J. M.; Oh, D. Y. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 2950-2953.

estrategia sintética para acceder a los mencionados análogos.<sup>164</sup> Sin embargo se ha observado que cuando el cuprato es generado a partir de CuI se produce isomerización del doble enlace 5,6-*cis* obteniéndose una mezcla 1:1 de los correspondientes análogos 5,6-*cis* y 5,6-*trans* (**Esquema 37**). Cuando en las mismas condiciones se utiliza CuBr para preparar el cuprato, la geometría del sistema triénico no experimenta ningún cambio.<sup>165</sup> Esta diferencia en el comportamiento respecto a la sal de cobre utilizada, se atribuye a la posible existencia de trazas de I<sub>2</sub> en el medio de reacción cuando se utiliza CuI para generar el correspondiente cuprato.<sup>166</sup>



### Esquema 37.

Teniendo en cuenta estos antecedentes resulta interesante evaluar el comportamiento del alquínifosfonato análogo **103** frente a la química de cupratos, en reacciones de carbocupración sobre el triple enlace en presencia del sistema triénico. Este objetivo sintético de máxima presentaría la ventaja de realizar un único acoplamiento para generar el sistema triénico y después, *via* química de cupratos poder sintetizar una pequeña biblioteca de análogos, evitando *n* desprotecciones, oxidaciones y acoplamientos individuales para los *n* compuestos que se deseen obtener, otorgándole a esta estrategia una gran eficiencia.

Para ello se llevó a cabo una serie de reacciones de adición al triple enlace de alquínifosfonatos sencillos (**94a**, **94c** y **94d**) con el fin de ensayar las condiciones de reacción, como paso previo a su aplicación sobre el análogo de la vitamina. Se evaluó la reacción de adición de cupratos de dibutilo y de dimetilo, y su correspondiente preparación a partir de CuBr. En la siguiente tabla se resumen las condiciones y los resultados obtenidos:

<sup>164</sup> Rey, M. A.; Martínez, J. A.; Fernández-Gacio, A.; Halkes, K.; Fall, Y.; Granja, J.; Mouriño, A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3196-3206

<sup>165</sup> Rey Liste, M. de los Ángeles, *Tesis Doctoral*, Santiago de Compostela, **1997**, p. 91.

<sup>166</sup> Mouriño, A.; Okamura, W. H. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1653-1656.

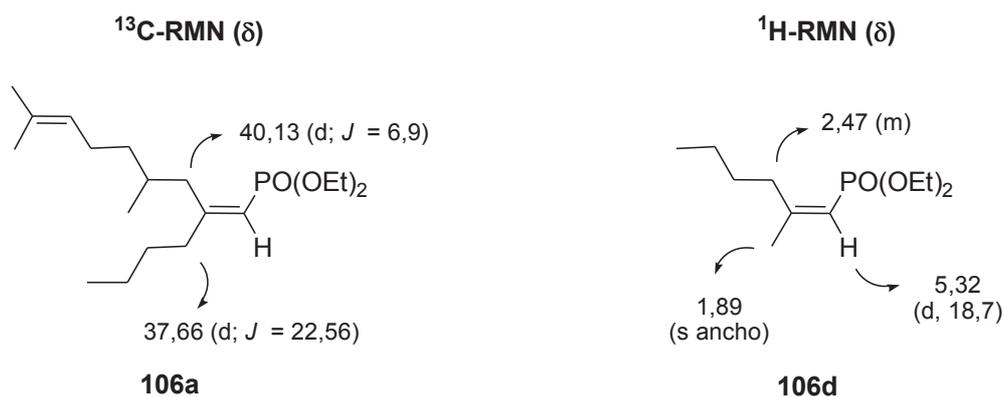


El reactivo organocúprico de metilo, a diferencia del cuprato de dibutilo, se preparó a partir del correspondiente reactivo de Grignard (**Tabla 9**, entradas 6 y 7).<sup>167</sup> Como puede apreciarse en la entrada 6 de la **Tabla 9**, se utilizó un exceso del reactivo de Grignard con respecto de la sal de cobre (5:1), obteniéndose el producto de adición deseado **106d** con muy buenos rendimientos (75%). Cuando la reacción se llevó a cabo con el cuprato generado a partir del reactivo de Grignard y el CuBr en relación estequiométrica (2:1), se obtuvo una mezcla de productos (**Tabla 9**, entrada 7). El análisis del crudo de reacción por <sup>31</sup>P-RMN y <sup>1</sup>H-RMN muestra que se obtiene el producto de adición **Z-106d** junto con su isómero *E*, además de otro producto no identificado. Esta pérdida de estereoselectividad al variar la relación estequiométrica entre el reactivo de Grignard y la sal de cobre en la preparación del cuprato, fue previamente observada por Cristau, H-J et. al.<sup>167</sup>

El desplazamiento químico de la señal de <sup>31</sup>P-RMN del vinilfosfonato varía de acuerdo a los cambios estructurares en el carbono unido a fósforo. Para los productos de carbocupración **106a**, **106c**, **106d** la señal de <sup>31</sup>P-RMN aparece en 18,53; 18,75 y 17,84 ppm respectivamente, indicando que el fósforo está unido a un carbono sp<sup>2</sup>. Cuando el fósforo está unido a un carbono sp la señal se encuentra a campos mayores en el rango de 0 a -9 ppm, mientras que cuando está unido a un carbono sp<sup>3</sup> de una cadena alquílica la señal se desplaza a campos menores, en el rango de 30 a 38 ppm.<sup>168</sup> Por otro lado, en los espectros de <sup>1</sup>H-RMN, los protones olefínicos aparecen alrededor de 5,3 ppm como dobletes, con una constante de acoplamiento en el rango de 18,00 a 18,72 Hz, que se corresponden con la <sup>2</sup>J<sub>P-H</sub>, confirmando la regioquímica de la adición. La estereoquímica *Z* del producto de adición **106d** se estableció teniendo en cuenta los valores de desplazamiento informados para los protones alílicos, los cuales aparecen a campos menores cuando se encuentran *cis* con respecto al grupo fosfónico (**Figura 21**).<sup>163</sup> En el caso del alquenilfosfonato **106a** la estereoquímica *Z* se confirmó por <sup>13</sup>C-RMN de acuerdo a los valores de la constante de acoplamiento <sup>3</sup>J<sub>P-C</sub>, ya que la constante <sup>3</sup>J<sub>P-C</sub> *trans* (14,22 - 22,64 Hz) es mucho mayor que la constante <sup>3</sup>J<sub>P-C</sub> *cis* (5,0 - 8,5 Hz) (**Figura 21**).<sup>167</sup>

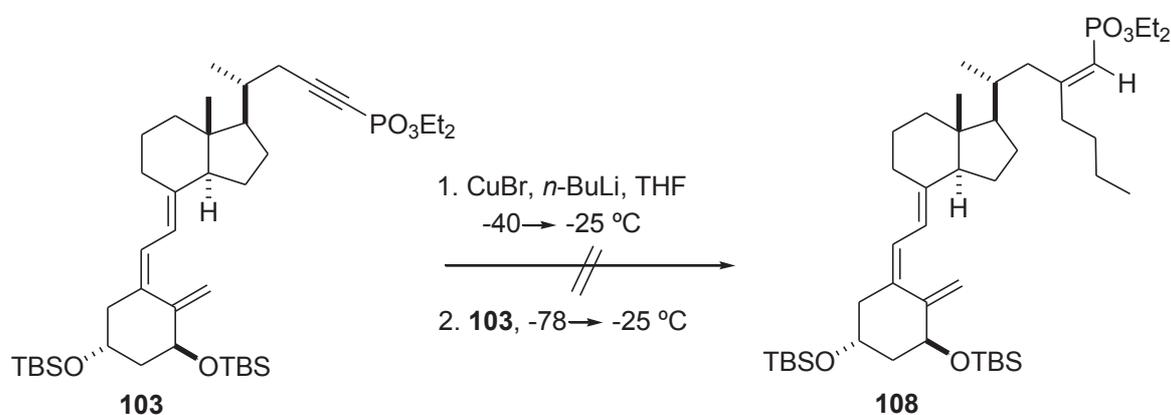
<sup>167</sup> Cristau, H-J.; Mbianda, X. Y.; Beziat, Y.; Gasc, M-B. *J. Organomet. Chem.*, **1997**, 529, 301-311.

<sup>168</sup> Quin, L. D. *A Guide to Organophosphorus Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc: New York, **2000**; Cap. 6, pág. 196.



**Figura 21.** Señales espectroscópicas correspondientes a la asignación estereoquímica de **106a** y **106d**.

A continuación se empleó la metodología optimizada sobre el análogo protegido **103** con el fin de modificar la cadena lateral mediante la adición de cuprato de dibutilo para generar el correspondiente vinilfosfonato análogo. De acuerdo a las condiciones de reacción previamente optimizadas (**Tabla 9**, entrada 4) (**Esquema 38**), se preparó una solución 0,075 M del cuprato de dibutilo a partir de CuBr y *n*-BuLi (1:2) a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , utilizando THF como solvente. Se dejó en agitación durante 1 hora, protegido de la luz, permitiendo que aumente la temperatura hasta  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A fin de confirmar la formación del cuprato se utilizó como testigo la reacción en paralelo del mismo cuprato con 1-hexinilfosfonato de dietilo (**94c**). Luego de verificar el progreso de la reacción con el hexinilfosfonato (TLC), se agregó el análogo **103** sobre la solución del cuprato (1,2 eq) a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Transcurridas 5 h de reacción, durante las cuales se controló que la temperatura no superara los  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , no se observó progreso alguno (TLC), recuperando el análogo **103** luego de elaborar la reacción. Se repitió la reacción bajo las mismas condiciones, pero utilizando un exceso de 5 equivalentes del reactivo organocúprico. Nuevamente, luego de 5 h de reacción no se observó el progreso de la misma recuperándose el sustrato de partida **103** en un 70%.

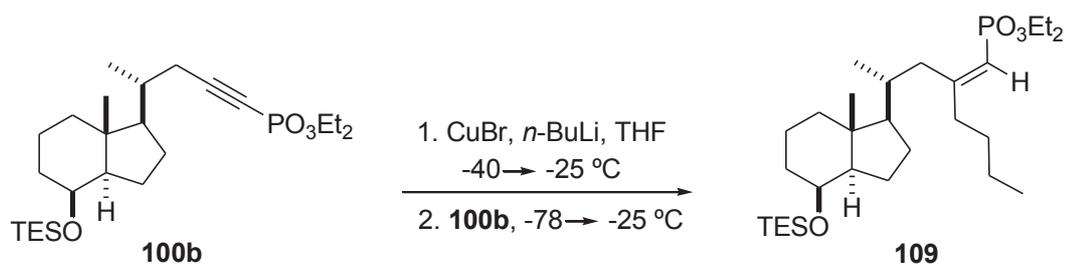


**Esquema 38.**

La imposibilidad de obtener **108** a partir de **103**, nos llevó a plantearnos las posibles causas que motivaron estos resultados negativos. Los antecedentes existentes en la literatura científica con respecto a la utilización de química de cupratos, tanto en la preparación de alquenilfosfonatos sustituidos, como el empleo de los mencionados cupratos en la síntesis de análogos a partir de subestructuras portadoras del sistema triénico de la vitamina D, nos llevaron a pensar que tanto la temperatura de reacción como el tipo y las relaciones estequiométricas de los cupratos empleados podrían estar afectando el progreso de la reacción. Por un lado, el uso de cupratos de orden superior ( $\text{Li}_2\text{Cu}_3\text{R}_5$ ), en reacciones de sustitución nucleofílica sobre sistemas reactivos, como los fosfatos y carbamatos alílicos, se ha llevado a cabo empleando un rango amplio de temperaturas (-78 a 0 °C), en presencia de grandes excesos de reactivo. En nuestro caso particular, la temperatura no puede ser superior a los -25 °C debido a la inestabilidad térmica de **103**, relacionada con la ruptura del enlace C-P. Esta limitación de la temperatura afecta sensiblemente a la reactividad del sistema alquiniilfosfonato en la reacción de adición, factor que al intentar ser mitigado utilizando exceso de cuprato, redundó en la ruptura de la unión C-P. Por otra parte, el empleo cupratos de orden inferior ( $\text{R}_2\text{CuLi}$ ), cuya esfera de coordinación se encuentra incompleta, podría permitir en cierto modo la coordinación con el sistema triénico presente en el sustrato.

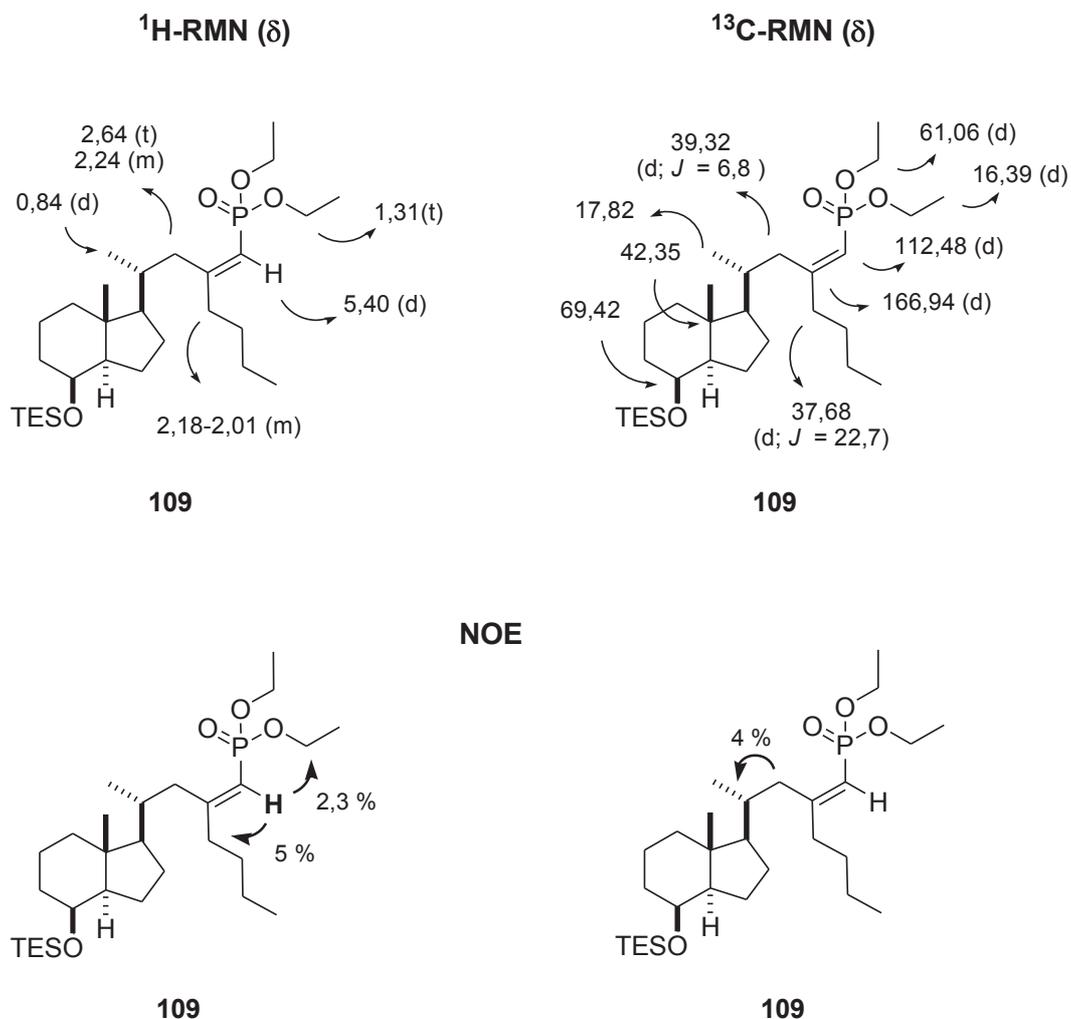
Estos resultados demostraron que no era viable llevar a cabo las modificaciones planeadas sobre la cadena lateral con el sistema triénico presente, tal como se había planteado en un primer momento. Con el propósito de verificar alguno de los motivos mencionados, se decidió realizar la reacción de cupratos sobre el alquiniilfosfonato del biciclo CD, en ausencia del sistema triénico mencionado (**Esquema 39**).

La reacción de adición del cuprato de dibutilo sobre **100b** se llevó a cabo repitiendo el mismo procedimiento que para **103**, de acuerdo a las condiciones de reacción previamente optimizadas, utilizando un 20% de exceso de cuprato de dibutilo y controlando que la temperatura no sobrepase los -25 °C. Luego de tres horas se elaboró la reacción, verificándose la obtención del vinilfosfonato esperado **109** con un rendimiento del 40%. La purificación en columna de **109** permitió recuperar sustrato de partida sin reaccionar, además de subproductos de reacción, cuya formación se había observado previamente durante el seguimiento de la reacción por TLC, y por  $^{31}\text{P}$ -RMN del crudo de reacción.



## Esquema 39.

En la **Figura 22** se muestran los datos espectroscópicos más representativos del vinilfosfonato **109**, los cuales se establecieron mediante RMN monodimensional ( $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT) y bidimensional de correlación C-H (HSQC) y H-H (COSY). La estereoquímica *Z* del compuesto se estableció por  $^{13}\text{C}$ -RMN a partir de los valores de la constante de acoplamiento  $^3J_{\text{P-C}}$ , y se corroboró mediante estudios NOE.



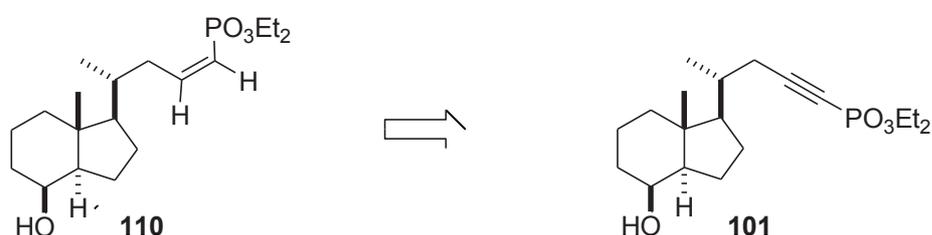
**Figura 22.** Señales más representativas de  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -RMN y NOE de **109**.

De estos estudios se desprende que a diferencia de las reacciones de sustitución  $S_N2$  y  $S_N2'$ , los reactivos organocúpricos no permiten llevar a cabo las modificaciones de la cadena lateral mediante reacciones de carbocupración sobre el alquiniulfosfonato análogo (**103**) con el sistema triénico presente, al menos en las condiciones ensayadas. Sin embargo, la reacción de adición procede cuando se lleva a cabo sobre el alquiniulfosfonato intermediario **100b**, obteniéndose el producto de adición esperado **109**, con rendimientos aceptables para las limitaciones mencionadas. De esta manera, para obtener los distintos análogos la estrategia sintética implicaría modificar primero la cadena lateral del intermediario **100b**, para luego abordar, en cada caso particular, la secuencia de reacciones correspondientes a la desprotección, oxidación y acoplamiento del biciclo CD con el correspondiente óxido de fosfina. Si bien estos resultados le restan convergencia a la estrategia sintética, la misma continúa siendo interesante dadas las amplias posibilidades de modificación que permite el triple enlace carbono-carbono.

Por otro lado, se detectaron varios inconvenientes en la preparación y aplicación de reactivos organocúpricos como estrategia metodológica para llevar a cabo las mencionadas transformaciones. Por ejemplo, se tornaba necesario verificar la formación y reactividad de los cupratos con reacciones testigo y en paralelo a las realizadas sobre el biciclo CD. Si bien las condiciones establecidas para realizar la carbocupración dan lugar a los resultados esperados, e informados en la literatura para sustratos sencillos, su consecuente aplicación sobre el intermediario **100b** no resultó suficientemente satisfactoria. La formación de subproductos observada durante la optimización de las condiciones de reacción, se torna relevante cuando la reacción se lleva a cabo sobre el sustrato de interés, marcando la necesidad de buscar otras estrategias sintéticas para llevar a cabo las transformaciones deseadas.

### 3.1.2.6 Síntesis de derivados de alquini fosfonatos por hidrogenación catalítica.

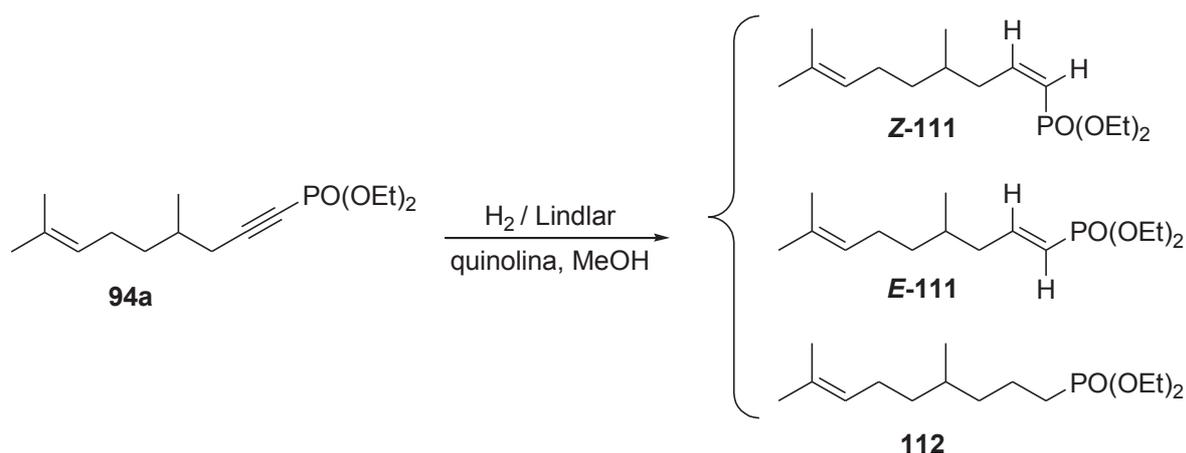
La hidrogenación catalítica del triple enlace carbono-carbono permite la conversión selectiva de 1-alquini fosfonatos en *cis*-1-alqueni fosfonatos.<sup>169</sup> De acuerdo a la literatura,<sup>167</sup> la hidrogenación parcial del alquini fosfonato **101** en presencia del catalizador de Lindlar posibilitaría la obtención del *Z*-vinil fosfonato monosustituido **110** (**Esquema 40**). En los casos en los que se obtienen mezclas de los isómeros geométricos correspondientes, el isómero *Z* puede ser fácilmente separado por cromatografía en columna con rendimientos que oscilan entre el 70-80%.



**Esquema 40.** Esquema retrosintético para la obtención de *cis*-1-alqueni fosfonatos.

A fin de ensayar las condiciones de hidrogenación, nuevamente se recurrió a sustratos modelos sencillos. En este caso se utilizó el 1-alquini fosfonato **94a**, el cual fue hidrogenado en presencia del catalizador de Lindlar y quinolina, en metanol como solvente (**Esquema 41**). El progreso de la reacción se siguió cuidadosamente por TLC, y luego de 3 h se dio por finalizada. Tras la elaboración del crudo de reacción, se separaron tres productos por cromatografía en columna, cuyo análisis por  $^{31}\text{P}$ -RMN y  $^1\text{H}$ -RMN permitió identificar al *Z*-alqueni fosfonato **111** esperado con rendimientos moderados (41%), junto con un 15% del isómero *E* de **111** y un 10% del correspondiente alquini fosfonato **112** producto de la hidrogenación completa de **94a**.

<sup>169</sup> Iorga, B.; Eymery, F.; Carmichael, D.; Savignac, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 3103-3115.



### Esquema 41.

La estereoquímica de los productos se estableció por  $^{31}\text{P}$ -RMN, y a partir de las constantes de acoplamiento vecinales  $^3J_{\text{P-H}}$  y  $^3J_{\text{H-H}}$  en  $^1\text{H}$ -RMN (Tabla 10), ya que la señal correspondiente al  $^{31}\text{P}$  en los isómeros *Z* aparecen a campos mayores que en los isómeros *E*, mientras que las constantes de acoplamientos  $^3J_{\text{P-H}}$  asociadas a dobles enlaces *cis* se encuentran en el rango de 45-55 Hz.<sup>170,167</sup>

**Tabla 10.** Señales espectroscópicas correspondientes a la asignación estereoquímica de los isómeros **111 Z y E**.

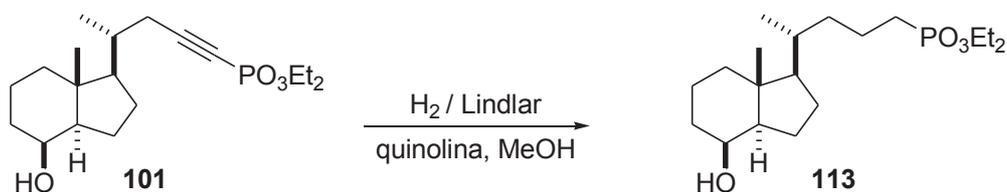
111	$^{31}\text{P}$ -RMN $\delta$ (ppm)	$^1\text{H}$ -RMN $\delta$ (ppm) - <i>J</i> (Hz)				
		H <sub>1</sub>	$^2J_{\text{P-H1}}$	H <sub>2</sub>	$^3J_{\text{P-H2}}$	$^3J_{\text{H1-H2}}$
( <i>Z</i> )	17,28	5,61	19,8	6,48	53,2	13,1
( <i>E</i> )	18,66	5,66	21,5	6,78	21,9	17,1

De acuerdo a los resultados obtenidos con el sustrato modelo **94a**, se decidió llevar a cabo la hidrogenación de **101**, aún cuando se obtuviera una mezcla de los isómeros geométricos correspondientes. La separación de ambos isómeros permitiría obtener, en última instancia, los vinilfosfonatos análogos con geometría *Z* y *E* en la cadena lateral.

Desafortunadamente, la hidrogenación sobre el alquínifosfonato **101** en las mismas condiciones que el sustrato modelo, dio lugar al correspondiente alquínifosfonato **113** como

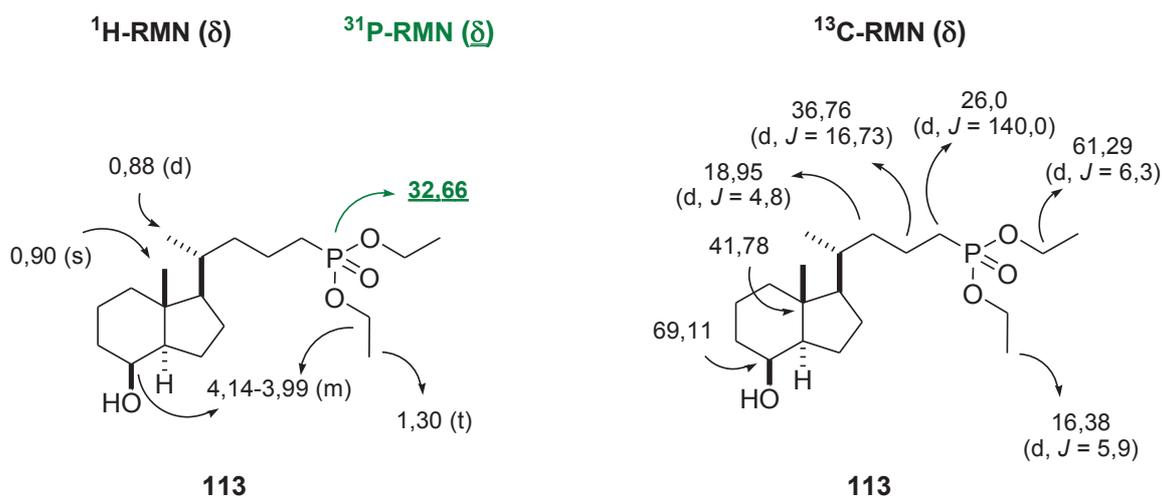
<sup>170</sup> Quin, L. D. *A Guide to Organophosphorus Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc: New York, **2000**; Cap. 7, pág. 207.

único producto (89%), según se estableció por  $^1\text{H}$ - y  $^{31}\text{P}$ -RMN (**Esquema 42**). En este caso, la evaluación del grado de avance de la hidrogenación por cromatografía en capa fina resultó más dificultosa, ya que el alquínilfosfonato **101** y el vinilfosfonato **110** tienen valores de  $R_f$  muy próximos, lo cual impidió advertir el momento en cual detener la reacción para evitar la hidrogenación total del vinilfosfonato.



**Esquema 42.**

En la **Figura 23** se presentan los datos espectroscópicos más representativos del compuesto **113**.



**Figura 23.** Señales más representativas de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y  $^{31}\text{P}$ -RMN de **113**.

### 3.1.3 Ensayos biológicos del análogo 104 (EM1).

Como se mencionó en el Capítulo 1, el calcitriol es una hormona pleiotrópica capaz de controlar múltiples procesos biológicos relacionados con la homeostasis del calcio y el fósforo, la integridad ósea, y el crecimiento, la diferenciación y supervivencia celular. El potente efecto inhibitorio del crecimiento, combinado con la presencia del receptor de la vitamina D (VDR) en una amplia variedad de células, hace del calcitriol un compuesto ideal para el tratamiento de desórdenes hiperproliferativos como el cáncer. Sin embargo, su principal efecto secundario, la hipercalcemia, limita su aplicación terapéutica. Esto impulsó el desarrollo de diversos análogos de vitamina D con el objeto de mejorar su potencia ( $EC_{50}$ ), y/o su selectividad, disminuyendo los efectos hipercalcemiantes respecto a los obtenidos con el calcitriol. La mayoría de estos análogos han sido evaluados en distintas líneas celulares y en modelos de experimentación animal, en algunos casos con resultados prometedores. Sin embargo, se ha observado una considerable variación en la respuesta antitumoral de los análogos entre los diferentes tipos de células y de tumores. Los mecanismos que subyacen esas diferencias en la acción de los análogos generalmente no se conocen en su totalidad. Los mismos podrían involucrar diferencias en la unión al VDR resultando en cambios en la estabilidad del complejo activo del VDR o en la habilidad del VDR para reclutar diferentes coreguladores. Por otro lado, las diferencias en la actividad biológica pueden deberse a la diferente susceptibilidad de los análogos a las vías metabólicas de activación o degradación. Esta característica es especialmente relevante *in vivo*.

A fin de evaluar la actividad biológica del análogo de la vitamina D **104** se llevaron a cabo distintos ensayos biológicos en colaboración con el Laboratorio de Biología Básica del Cáncer, del Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca (INIBIBB), dirigido por los Dres. María Marta Facchinetti y Alejandro Curino. Los mismos fueron desarrollados por la Lic. Débora Salomón como parte de su trabajo de tesis doctoral.

La actividad biológica del alquiniolfosfonato análogo **104** se evaluó comparativamente con la hormona natural (calcitriol) respecto a su efecto hipercalcémico *in vivo* y a su efecto antiproliferativo *in vitro* en varias líneas celulares cancerosas humanas y de ratón (murinas). Con este fin, previo a los ensayos biológicos se purificaron ambos compuestos, el análogo **104** y el calcitriol, por sucesivas cromatografías preparativas en placa. La pureza se determinó en función de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN y por HPLC analítico.

### 3.1.3.1 Evaluación del efecto antiproliferativo *in vitro*.

Los efectos antiproliferativos del alquini fosfonato análogo **104** fueron evaluados en las líneas celulares tumorales humanas y murinas detalladas en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.** Líneas celulares cancerosas humanas y murinas sobre las que se evaluó **104**.

Especie	Línea celular	Tipo de cáncer
 HUMANAS	T98G	Glioma
	HN12	Carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello
	T47D	Adenocarcinoma mamario
	HCT116	Carcinoma colorrectal
 MURINAS	SVEC vGPCR	Sarcoma de Kaposi
	LM3	Adenocarcinoma mamario
	LM05e	Adenocarcinoma mamario

Luego de un ensayo preliminar con la línea celular de carcinoma celular escamoso HN12, donde se evaluó la respuesta antiproliferativa del análogo **104** en función del tiempo (0-72 h) y a distintas concentraciones (0,1-100 nM), se determinó una disminución significativa del conteo celular a partir de una concentración 1nM ( $10^{-9}$  M) y a las 72 h de tratamiento.

A continuación se llevó a cabo un análisis sobre todas las líneas celulares (**Tabla 11**) durante 72 horas, mediante el cual se evaluó en paralelo la respuesta del análogo **104** y del calcitriol en función de la dosis ( $10^{-7}$  a  $10^{-11}$  M). De esta manera, se determinó que las líneas de carcinoma celular escamoso HN12, glioma T98G, Sarcoma de Kaposi SVEC vGPCR, y las de adenocarcinoma mamario T47D y LM05e responden al tratamiento con el alquini fosfonato análogo **104** disminuyendo la supervivencia celular (**Figura 24**). Por el contrario, las líneas de carcinoma colorrectal HCT116 y de adenocarcinoma mamario LM3 no respondieron al tratamiento con **104**. En la **Tabla 12** se muestra el valor de la concentración inhibitoria al 50% ( $IC_{50}$ ) para el análogo y el calcitriol en las mencionadas líneas celulares que respondieron al tratamiento.

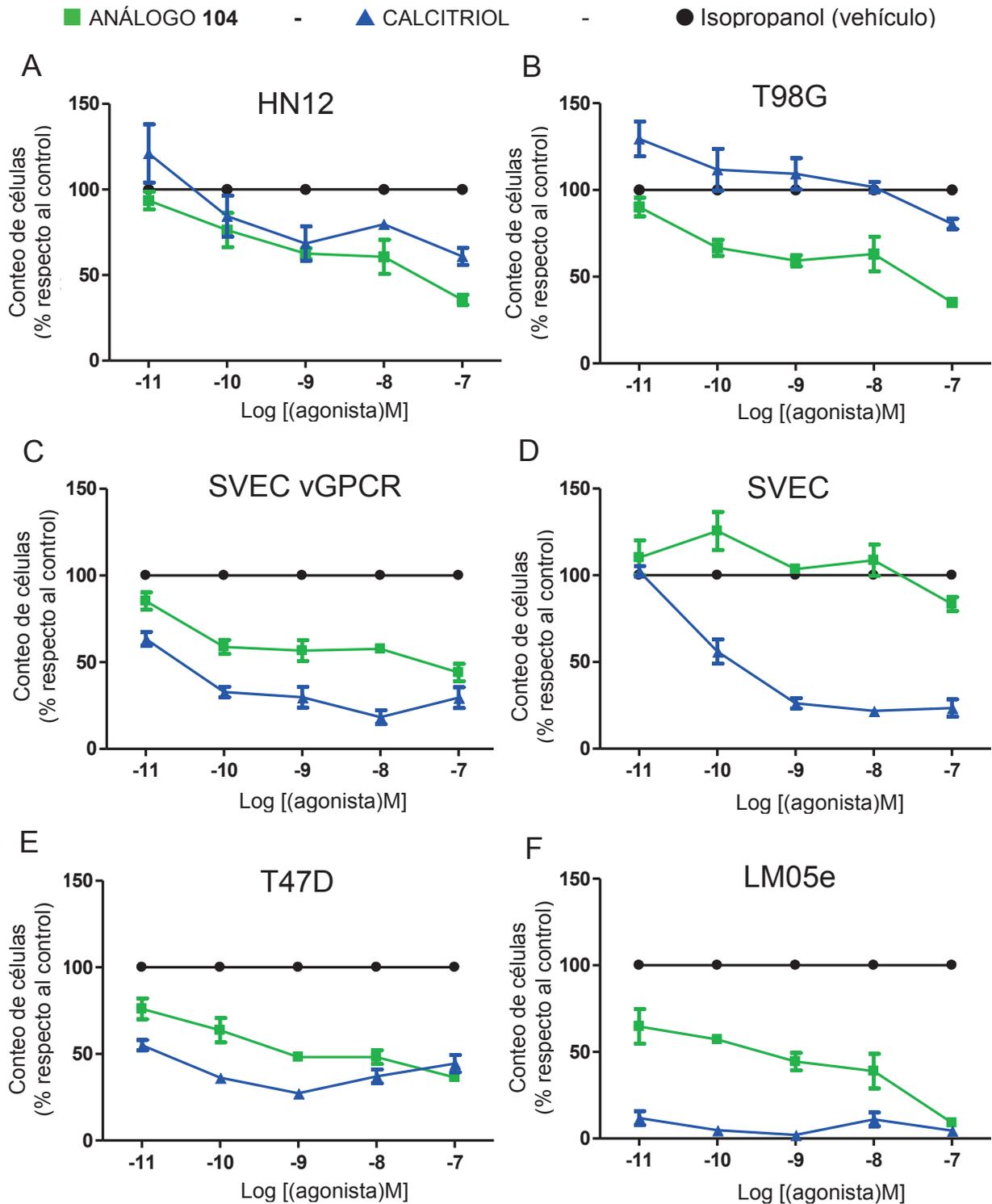
**Tabla 12.** Concentración inhibitoria al 50% ( $IC_{50}$ ) de las líneas celulares que respondieron al tratamiento con el análogo **104**.

Línea Celular	$IC_{50}$ (nM) <sup>a</sup>	
	Análogo <b>104</b>	Calcitriol
HN12	22,3	553
SVEC vGPCR	113	0,52
T98G	36,1	-
LM05e	1,68	0,03
T47D	4,78	1,30

<sup>a</sup> Valores promedio de al menos tres experimentos.

De acuerdo a los valores de  $IC_{50}$  y como puede observarse en la **Figura 24**, el análogo **104** ejerce mayor efecto antiproliferativo que el calcitriol sobre las líneas de carcinoma celular escamoso (HN12, **Figura 24-A**) y glioma (T98G, **Figura 24-B**). Por otro lado, cabe destacar que si bien el análogo **104** es menos potente que el calcitriol para inhibir el crecimiento de la línea celular de Sarcoma de Kaposi (SVEC vGPCR, **Figura 24-C**), cuando el análisis se reprodujo sobre la misma línea celular no cancerosa (SVEC, **Figura 24-D**), esta no respondió al tratamiento con el análogo lo cual demuestra un efecto selectivo por parte del mismo.

Por otro lado, los resultados de los ensayos antiproliferativos alentaron el interés por dilucidar los mecanismos moleculares de acción del análogo **104**. Con este objetivo, fue evaluada en células de glioma la participación del receptor de calcitriol (VDR); y por otro lado la expresión de distintas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, como ser los inhibidores p21 y p27, el regulador de la progresión celular ciclina D1 y la proteína supresora tumoral p53. Los ensayos sobre esta línea celular mostraron que el análogo **104** ejerce los efectos antiproliferativos aumentando los niveles de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27, y disminuyendo los de ciclina D1 de manera independiente al VDR ya que este parece no ser necesario. Sin embargo, no se descarta que la activación de vías genómicas, con participación de VDR, esté implicada en otros procesos celulares.



**Figura 24.** Efecto de la dosis sobre la proliferación celular del análogo 104 y su comparación con el calcitriol. Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada línea celular. (A) Carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello ( $p=0.0499$ ); (B) Glioma ( $p=0.0014$ ); (C) Sarcoma de Kaposi ( $p \leq 0.0001$ ) y (D) su contraparte no maligna SVEC; (E) adenocarcinoma mamario ( $p \leq 0.0001$ ) y (F) adenocarcinoma mamario ( $p \leq 0.0001$ ).

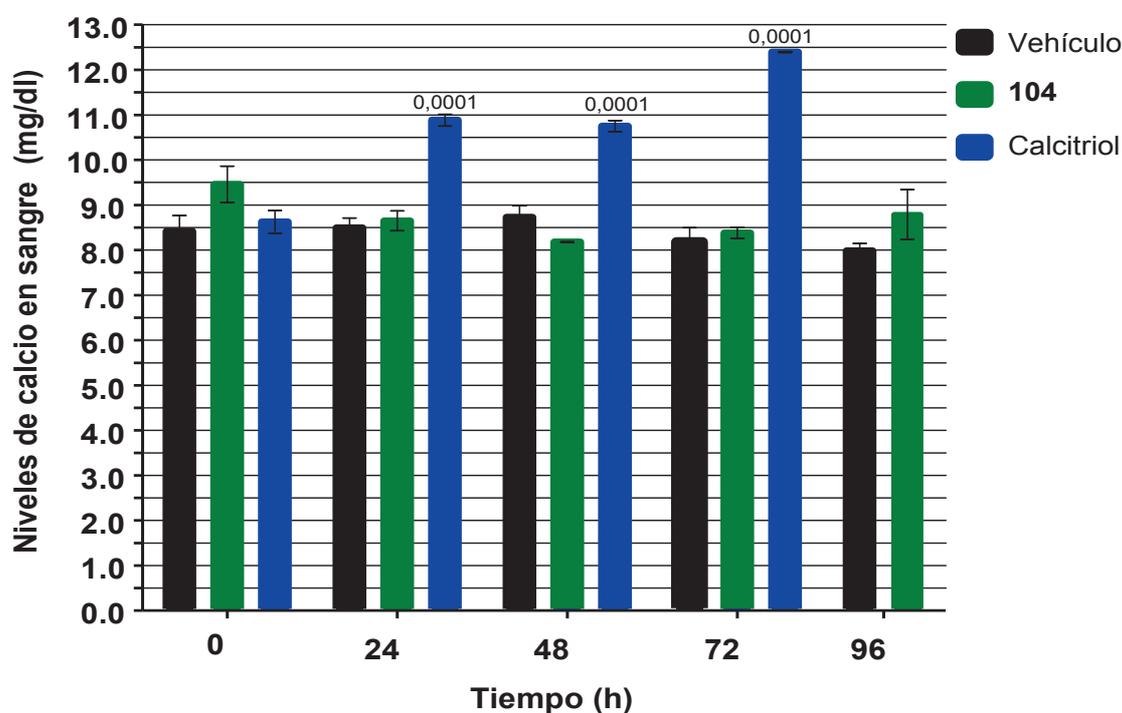
### 3.1.3.2 Evaluación del efecto hipercalcémico *in vivo*.

Debido a la significativa actividad *in vitro* en algunas líneas celulares tumorales, el compuesto **104** fue evaluado también para su actividad hipercalcémica *in vivo* en ratones.

El efecto calcémico fue evaluado en función de las dosis necesarias para la actividad antitumoral *in vivo*, por lo cual en base a datos informados sobre estudios farmacocinéticos del calcitriol,<sup>171</sup> se eligieron dosis de 5 y 20  $\mu\text{g/Kg}$  de peso. El ensayo se realizó dividiendo a los ratones en tres grupos ( $n = 5$ ); cada grupo se trató en paralelo con una inyección intraperitoneal diaria de calcitriol, análogo **104** o vehículo (isopropanol) con una dosis de 5 o 20  $\mu\text{g/Kg}$  de peso durante 5 días. Se extrajeron muestras de sangre previo a la administración de las dosis y luego a 24, 48, 72 y 96 horas.

Los resultados de este estudio muestran, que mientras el calcitriol produce un incremento efectivo de los niveles de calcio en plasma causando incluso la muerte de los ratones luego de 3 días de tratamiento, el alquinilfosfonato análogo **104** no produce efectos calcémicos. Como puede observarse en el gráfico de la

**Figura 25** para dosis de 5  $\mu\text{g/Kg}$ , durante el tratamiento con el análogo los niveles de calcio en plasma se mantuvieron dentro de los valores fisiológicos normales, obteniéndose resultados similares a dosis de 20  $\mu\text{g/Kg}$ .



**Figura 25.** Niveles de calcio en plasma en ratones como respuesta al tratamiento con el vehículo (isopropanol), el análogo **104** o el calcitriol (5  $\mu\text{g/Kg}$ ).

<sup>171</sup> Muindi, J. R.; Modzelewski, R. A.; Peng, Y.; Trump, D. L.; Johnson, C. S. *Oncology* **2004**, *66*, 62–66.

Cabe destacar, que los ratones tratados con el análogo permanecieron vivos durante todo el período de examen. Además, la posterior inspección visual de los órganos internos de los animales tales como hígado, duodeno, pulmones y riñones, no mostraron alteraciones morfológicas macroscópicas.

En conjunto, estos resultados sugieren que el alquinilfosfonato análogo **104** produce una considerable actividad antiproliferativa, siendo bien tolerado incluso a dosis elevadas sin causar hipercalcemia. Por lo cual, este nuevo análogo (**104**) posee un remarcado potencial terapéutico para el tratamiento de diferentes desórdenes proliferativos.

Actualmente, dados los promisorios resultados obtenidos *in vitro*, se están llevando a cabo ensayos *in vivo* en modelos de ratón con tumores de cáncer de mama, junto con el estudio de las vías de señalización molecular que darían lugar a los efectos antitumorales.



## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

---



## 4.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES.

Todas las reacciones sensibles a la humedad o al aire se realizaron bajo atmósfera inerte de nitrógeno o argón.

El material de vidrio se secó antes de su empleo, aplicando calor, evacuando el sistema bajo vacío (1 mmHg), y permitiendo luego llegar a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno.

Para las mezclas frigoríficas a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  se utilizó acetona/nitrógeno líquido o acetona/hielo seco ( $\text{CO}_2$ ), y para aquellas a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se empleó hielo/agua. Para las reacciones a alta temperatura se emplearon refrigerantes y baños de aceite de silicona.

Las reacciones en la que los compuestos poseen en su estructura el sistema triénico, las oxidaciones con PDC, y las reacciones con cupratos a partir de  $\text{CuBr(I)}$ , se realizaron en ausencia de luz.

Para el secado de las disoluciones procedentes de la elaboración de las diversas reacciones se utilizó  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro.

### 4.1.1 Solventes y reactivos.

Los solventes utilizados en las reacciones se purificaron siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía<sup>199</sup> y se secaron por calentamiento a reflujo utilizando un agente desecante adecuado, en atmósfera inerte, y destilados inmediatamente antes de su uso. Los agentes desecantes utilizados fueron: Na/Benzofenona (THF y  $\text{Et}_2\text{O}$ ),  $\text{CaH}_2$  ( $\text{Et}_3\text{N}$  e *i*- $\text{Pr}_2\text{NH}$ ), KOH (piridina),  $\text{P}_2\text{O}_5$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). DMF y DMSO se destilaron sobre  $\text{CaH}_2$  y se almacenaron sobre tamices moleculares de 4Å.

Los tamices moleculares (4Å, MS) se activaron inmediatamente antes de su utilización, por calentamiento a  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  con una corriente de nitrógeno, en una columna de vidrio recubierta con cintas calefactoras.

Para las reacciones de cicloadición se utilizó cloruro de cobre(II) anhidro (Aldrich); y en las reacciones de olefinación se utilizó  $\text{TiCl}_4$  (Merck), ambos comercialmente asequibles. El DTBB (4,4'-di-*tert*-butilbifenilo) utilizado como areno fue de la mejor calidad disponible (Aldrich, Fluka). El litio (Aldrich) se utilizó en polvo.

Para las reacciones de cupratos el bromuro de cobre(I) (Aldrich) y el yoduro de cobre(I) (Aldrich) se purificaron de acuerdo a los procedimientos descritos en la bibliografía<sup>199,200</sup>, y se manipularon en atmósfera inerte y protegiéndolos de la luz.

<sup>199</sup> Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. y Perrin, D. R. "Purification of Laboratory Chemicals", 4<sup>ta</sup> Ed., Butterworth-Heinemann, **1996**.

<sup>200</sup> (a) Liaw, D.-J.; Huang, C.-C.; Kang, E.-T. *Polymer* **2006**, *47*, 3057-3064. (b) Taylor, Richard J. K. "Organocopper Reagents, A practical approach", Oxford University Press, **1994**.

Los reactivos organometálicos empleados fueron de origen comercial, MeMgBr (3 M) (Aldrich) y *n*-BuLi (2,5 M) (Aldrich); o se prepararon inmediatamente antes de ser utilizados (*n*-BuLi 1,47 - 1,53 M).<sup>201</sup>

El fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) anhidro en THF (1M) se preparó a partir de la solución acuosa por destilación azeotrópica benceno/acetonitrilo (1:1) a 40 °C y a presión reducida. El sólido blanco obtenido se secó bajo vacío y luego se disolvió en THF (seco).

Aquellos sustratos no asequibles en forma comercial, fueron sintetizados empleando reactivos de la mayor pureza posible, y se purificaron por destilación, cristalización o cromatografía en columna.

#### 4.1.2 Cromatografía.

Para las cromatografías en capa fina (TLC) se utilizaron cromatofolios de 20 x 20 cm de área y 0,2 mm de espesor de gel de sílice 60 GF<sub>254</sub> sobre soporte de aluminio. El revelado de los cromatogramas se realizó por visualización con luz UV (254 y 366 nm), y/o con diversas soluciones reveladoras. Como reveladores se utilizaron: (a) solución de ácido fosfomolibdico al 5% en etanol; (b) solución de *p*-anisaldehído (0,5 mL) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mL), ácido acético glacial (10 mL) y metanol (85 mL), (c) solución acuosa de permanganato de potasio 1%, y (d) solución de molibdato de amonio (96%) y sulfato de cerio (4%) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%.

La cromatografía flash en columna se realizó en columnas de vidrio, utilizándose como fase estacionaria gel de sílice Merck 60, con un tamaño de partícula de 0,040-0,063 μm (240-400 mesh). Empleando con este fin mezclas de polaridad creciente de hexano/acetato de etilo, diclorometano/acetato de etilo o diclorometano/metanol, según se especifica en cada caso.

Para las cromatografías en capa fina preparativas, se emplearon placas de vidrio de 20 x 20cm de área Macherey-Nagel Sil G 25-UV254, previamente activadas en estufa a 100 °C durante 1 hora. El revelado de las placas se realizó por visualización con luz UV (254 y 366 nm).

#### 4.1.3 Instrumentos y equipos.

La evaporación de solventes de las disoluciones procedentes de la elaboración de las reacciones se realizó en un evaporador rotatorio Büchi a presión reducida (15 mmHg).

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron registrados con un espectrómetro Bruker ARX-300 (300 MHz para <sup>1</sup>H-NMR, 75 MHz para <sup>13</sup>C-NMR, y 121

<sup>201</sup> Dorn, V. B.; *Tesis Doctoral*, Universidad Nacional del Sur, 2007, p. 129.

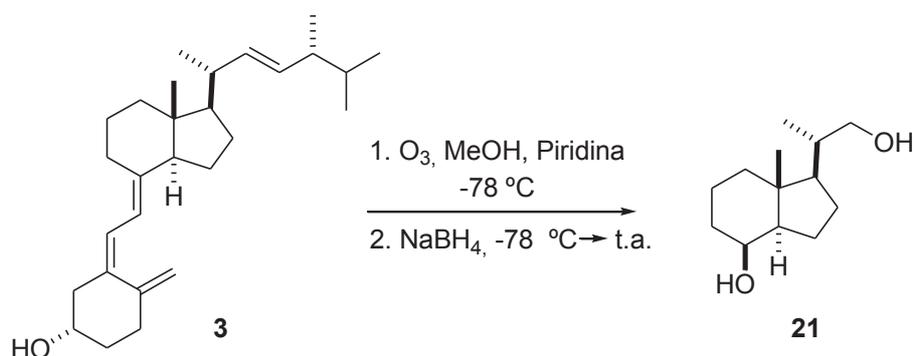
MHz para  $^{31}\text{P}$ -RMN) y/o Bruker Avance DPX 400 (400 MHz para  $^1\text{H}$ -NMR, 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ -NMR, y 161 MHz para  $^{31}\text{P}$ -RMN), empleando como solvente cloroformo deuterado, y como referencia interna tetrametilsilano (TMS) o la señal residual de  $\text{CHCl}_3$  en  $^1\text{H}$ - y  $^{13}\text{C}$ -NMR; y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  como referencia externa en  $^{31}\text{P}$ -NMR. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están expresados en ppm y entre paréntesis se informa la integración, multiplicidad y las constantes de acoplamiento  $J$  en Hz.

Los análisis mediante espectrometría de masas se realizaron introduciendo la mezcla, por inyección, en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP-5890 equipado con detector selectivo de masas HP-5972; provisto de una columna capilar HP5-MS (30m x 0.25mm x 0,25 $\mu\text{m}$ ), en la modalidad de impacto electrónico (EI), a 70 eV. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se realizaron en la Unidad de Espectrometría de Masas del C.A.C.T.I de la Universidad de Vigo (España), con un espectrómetro MicroTOF (Bruker Daltonics) o APEX-Qe (Bruker Daltonics), utilizando la técnica ESI (electron spray ionization).

Para el análisis por HPLC en fase reversa se utilizó un equipo Waters 600E provisto de una columna analítica Spherisorb ODS 2 (C18) (250 x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ), y de un detector Waters 2998 PDA. El espectro ultravioleta se registró en un espectrofotómetro Merck Spectroquant Pharo 300.

A continuación se presentan las reacciones más significativas de este trabajo de tesis doctoral. En el caso de los compuestos **96** a **100**, en que se ha utilizado el mismo procedimiento para preparar los compuestos protegidos con TBS (**96-100a**) ó TES (**96-100b**), se detalla la ruta completa sólo para la serie **b**. Para nombrar los compuestos se utilizó la nomenclatura IUPAC, excepto para nombrar los biciclos CD y los análogos del calcitriol, para los cuales se empleó la nomenclatura esteroideal.

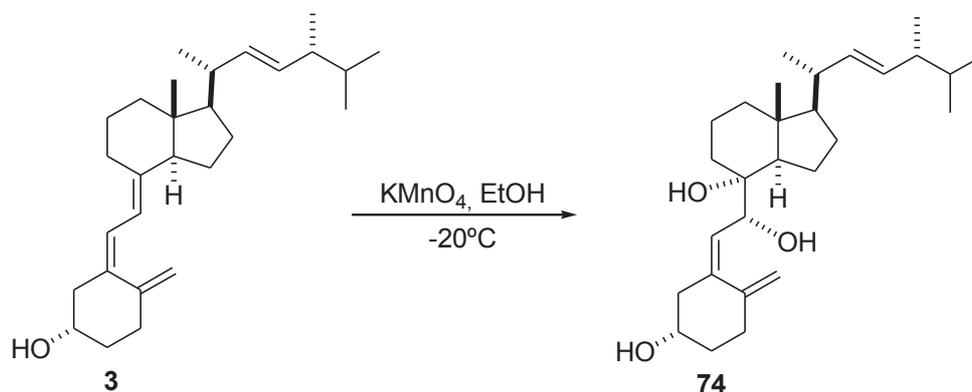
## 4.2 Síntesis de Des-A,B-23,24-dinorcolan-8 $\beta$ ,22-diol (diol de Inhoffen-Lythgoe) (**21**).



En un reactor de vidrio con difusor de vidrio poroso, seco y purgado con argón, se preparó una disolución de la vitamina D<sub>2</sub>, **3**, (1g; 2,52 mmol) en metanol (60 mL) y piridina (75  $\mu$ L). La disolución se enfrió a -78 °C en atm. de argón, y a continuación se hizo pasar una mezcla de ozono/oxígeno (0,6 A; 1,5 L/h) durante 15 min. hasta que la solución se tornó color azul (exceso de ozono). Se detuvo el flujo de ozono y la solución se purgó con argón hasta eliminar el ozono remanente (test de KI). Seguidamente se hizo un primer agregado de NaBH<sub>4</sub> (168 mg; 4,4 mmol) a -78 °C, y la mezcla de reacción se dejó en agitación permitiendo que suba la temperatura hasta -20 °C. Luego de 3 h se realizó un segundo agregado de NaBH<sub>4</sub> (168 mg; 4,4 mmol), se dejó alcanzar t.a., y se agregó NaBH<sub>4</sub> (100 mg; 2,6 mmol) una vez más. La mezcla se dejó en agitación durante toda la noche a t.a. A continuación se concentró la mezcla de reacción, se extrajo con *t*-BuOEt (5 x 50 mL), se secó, se filtró y concentró al vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (3 x 18 cm, eluyente Hex/AcOEt 40%) obteniéndose el diol **21** [0,47 g; 88%;  $R_f$  = 0,31 (Hex/AcOEt 40%), sólido blanco].<sup>139</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 4,05 (1H, s ancho, H-8); 3,60 (1H, dd <sup>2</sup> $J_{HH}$  = 10,5 Hz; <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 3,1 Hz; H-22); 3,32 (1H, dd <sup>2</sup> $J_{HH}$  = 10,4; <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 6,9 Hz, H-22); 1,00 (3H, d <sup>3</sup> $J_{HH}$  = 6,6 Hz; H-21); 0,92 (3H, s, H-18).

### 4.3 Síntesis de (3 $\beta$ ,5Z,7R,8 $\alpha$ ,22E)-9,10-secoergosta-5,10(19),22-trien-3,7,8-triol (**74**).

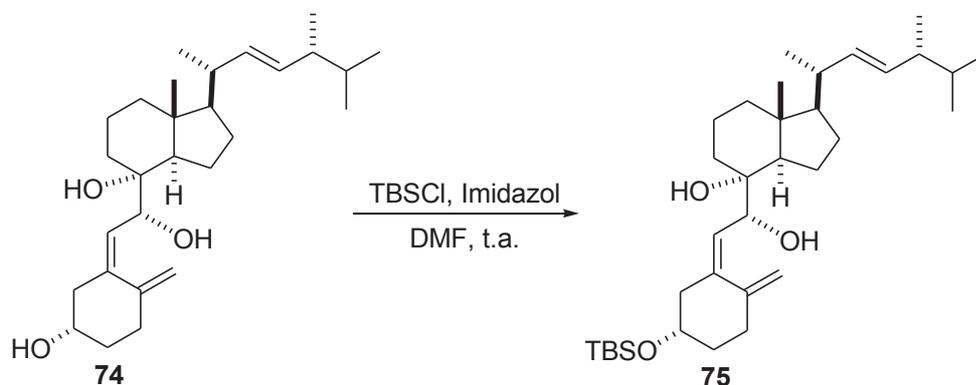


En un balón de dos bocas provisto de termómetro y ampolla de decantación, se preparó una disolución de vitamina D<sub>2</sub> en etanol absoluto. Sobre la solución enfriada a -20 °C con agitación se agregó lentamente una solución de KMnO<sub>4</sub> (4,0 g; 25,0 mmol) en H<sub>2</sub>O (120 mL) de manera tal que la temperatura no se eleve por encima de -10 °C. Finalizado el agregado, la suspensión marrón se dejó con agitación durante 1 h más, y luego se calentó a 40 °C en un baño de agua con ocasionales remolinos a fin de facilitar la coagulación del MnO<sub>2</sub>. Se dejó decantar, la solución sobrenadante se separó y se filtró a través de sílica gel, y la suspensión restante se centrifugó a fin de separar el etanol. Las soluciones etanólicas combinadas se concentraron a presión reducida. Sobre el residuo sólido se agregó hexano caliente (100 mL), se agitó y se filtró a través de un embudo Buchner para eliminar sustrato que pudiera quedar sin reaccionar. El producto sólido obtenido se purificó por cristalización con acetato de etilo obteniéndose el triol **74**. A su vez el concentrado del líquido madre se purificó por cromatografía flash en columna (AcOEt) recuperándose una cantidad adicional del producto. [3,30 g; 60 %; R<sub>f</sub>:0,4 (Hex/AcOEt 80%), sólido cristalino blanco].<sup>117</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  ppm: 5,55 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,7 Hz, H-6 ); 5,20 (2H, m, H-22 y H-23); 5,00 (1H, s ancho, H-19); 4,92 (1H, s ancho, H-19); 4,90 (1H, d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,7 Hz, H-7); 3,78 (1H, m, H-3); 1,01 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,6 Hz, H-21 ó 28); 0,90 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,8 Hz, H-21 ó 28); 0,74-0,86 (9H, m, H-18, H-26, H-27).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  ppm: 145,37 (=C); 140,72 (=C); 135,45 (=CH); 132,13 (=CH); 124,30 (=CH); 111,37 (=CH<sub>2</sub>); 74,97 (C-8); 70,75 (CH-3); 70,48 (CH-7); 59,65 (CH); 57,40 (CH); 46,53 (CH<sub>2</sub>-4); 44,05 (C-13); 42,88 (CH); 40,00 (CH); 39,94 (CH<sub>2</sub>); 36,07 (CH<sub>2</sub>); 33,17 (CH<sub>2</sub>); 33,11 (CH); 27,72 (CH<sub>2</sub>); 21,86 (CH<sub>2</sub>); 20,65 (CH<sub>3</sub>); 20,46 (CH<sub>2</sub>); 19,94 (CH<sub>3</sub>); 19,63 (CH<sub>3</sub>); 17,64 (CH<sub>3</sub>); 13,08 (CH<sub>3</sub>).

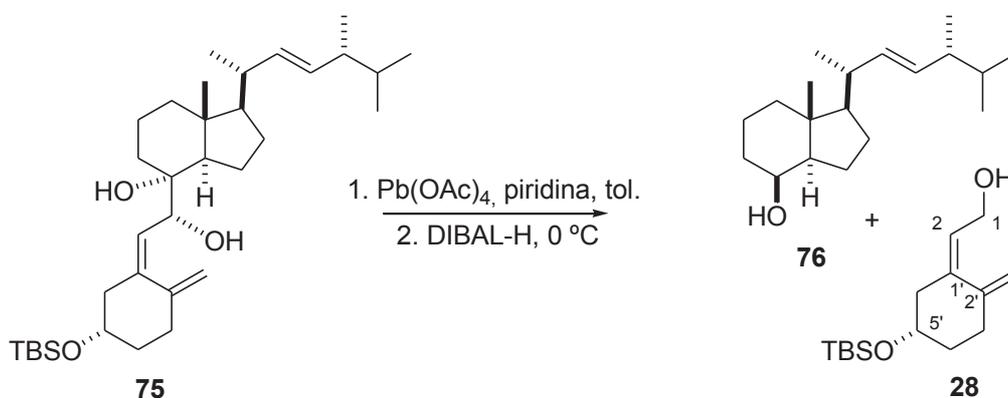
#### 4.4 Síntesis de (3 $\beta$ ,5Z,7R,8 $\alpha$ ,22E)-3-(*tert*-butildimetilsililoxi)-9,10-secoergosta-5,10(19),22-trien-7,8-diol (**75**).



A una solución del triol **74** (3,30 g; 7,7 mmol) en DMF (30 mL) a t.a., se agregó imidazol (1,20 g; 17,4 mmol) y TBSCl (1,32 g; 8,8 mmol). La mezcla de reacción se dejó con agitación durante toda la noche. Se agregó H<sub>2</sub>O helada (40 mL), la fase acuosa se extrajo con CHCl<sub>3</sub> (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (4 x 18 cm, eluyente Hex/AcOEt 15%) obteniéndose el diol **75** [3,65 g; 87%;  $R_f$  = 0,30 (Hex/AcOEt 15%), aceite incoloro].

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  ppm: 5,48 (1H, d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6,8 Hz, H-6 ); 5,22 (2H, m, H-22 y H-23); 4,92 (1H, s ancho, H-19); 4,83 (1H, d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6,8 Hz, H-7); 4,81 (1H, s ancho, H-19); 3,65 (1H, m, H-3); 0,91 (3H, d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6,7 Hz, H-21 ó 28); 0,84 (3H, d,  $^3J_{\text{HH}}$  = 6,8 Hz, H-21 ó 28); 0,80 (9H, s, *t*-ButilSi); 0,79-0,61 (9H, m, H-18, H-26, H-27); 0,05 (3H, s, CH<sub>3</sub>Si); 0,01 (3H, s, CH<sub>3</sub>Si).

#### 4.5 Síntesis de (24*R*, 22*E*)-Des-A,B-ergost-22-en-8β-ol (**76**) y (*S,Z*)-2-[5'-(*tert*-butildimetilsililoxi)-2'-metilenciclohexiliden] etanol (**28**).



A una solución del diol **75** (3,65 g; 6,7 mmol) en tolueno (40 mL) a t.a., se agregó piridina (1,5 mL) y luego el tetraacetato de plomo (3,55 g; 8,0 mmol) en porciones. La mezcla de reacción se dejó en agitación hasta observar la desaparición del sustrato (TLC), observándose la formación de una suspensión blanca. El sólido blanco se filtró y se lavó con tolueno (2 x 5 mL). A continuación el filtrado y los lavados combinados se enfriaron a 0 °C y se agregó lentamente DIBAL-H (1 M solución en Hex; 24 mL), la solución se fue oscureciendo hasta tornarse color negro. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1,5 h (TLC), luego se agregó  $\text{H}_2\text{O}$  (2 mL), y el precipitado formado se filtró y se lavó varias veces con  $\text{Et}_2\text{O}$ . El filtrado y los lavados combinados se lavaron con una solución saturada de  $\text{CuSO}_4$  (3 x 20 mL) y una solución saturada de NaCl (30 mL), se secaron, filtraron y evaporaron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (4 x 18 cm) obteniéndose los alcoholes **76** (eluyente Hex/AcOEt 7%) y **28** (eluyente Hex/AcOEt 10%) [**76**: 1,75 g; 94%;  $R_f = 0,67$  (Hex/AcOEt 30%), líquido incoloro; y **28**: 1,13 g; 63%;  $R_f = 0,50$  (Hex/AcOEt 30%), líquido incoloro].

##### 4.5.1 (*S,Z*)-2-[5'-(*tert*-butildimetilsililoxi)-2'-metilenciclohexiliden] etanol (**28**).

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  ppm: 5,44 (1H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,7$  Hz, H-2); 4,95 (1H, s ancho,  $=\text{CH}_2$ ); 4,63 (1H, s ancho,  $=\text{CH}_2$ ); 4,30-4,12 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3,84 (1H, m, H-5'); 2,46-2,32 (2H, m); 2,20 (1H, m); 2,07 (1H, m); 1,91-1,84 (1H, m); 1,64-1,52 (1H, m); 1,43 (1H, s ancho); 0,88 (9H, s, *t*-ButilSi); 0,06 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ); 0,05 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

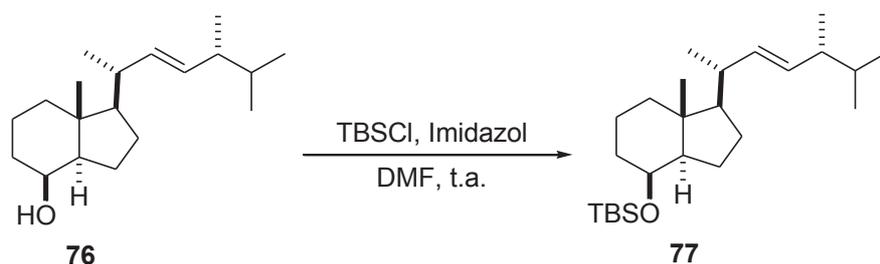
**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  ppm: 144,98 ( $=\text{C}$ ); 140,51 ( $=\text{C}$ ); 124,97 ( $=\text{CH-2}$ ); 111,76 ( $=\text{CH}_2$ ); 70,12 (CH-5'); 59,78 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 46,07 ( $\text{CH}_2\text{-6'}$ ); 36,03 ( $\text{CH}_2\text{-4'}$ ); 32,27 ( $\text{CH}_2\text{-3'}$ ); 25,82 [ $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ]; 18,11 [ $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ]; -4,66 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ); -4,70 ( $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

**4.5.2 (24R, 22E)- Des-A,B-ergost-22-en-8 $\beta$ -ol (76).**

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  ppm: 5,18 (2H, m, H-22 y H-23); 4,06 (1H, s, H-8); 0,99 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,60 Hz, H-21 ó 28); 0,94 (3H, s, H-18); 0,91 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,8 Hz, H-21 ó 28); 0,83 (3H d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,7 Hz, H-26 ó 27); 0,82 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,7 Hz, , H-26 ó 27).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  ppm: 135,65 (=CH); 131,87 (=CH); 69,38 (CH-8); 56,61 (CH); 52,77 (CH); 42,83 (CH); 41,76 (C-13); 40,36 (CH<sub>2</sub>); 39,72 (CH); 33,63 (CH<sub>2</sub>); 33,08 (CH); 27,57 (CH<sub>2</sub>); 22,52 (CH<sub>2</sub>); 20,77 (CH<sub>3</sub>); 19,91 (CH<sub>3</sub>); 19,61 (CH<sub>3</sub>); 17,60 (CH<sub>3</sub>); 17,45 (CH<sub>2</sub>); 13,70 (CH<sub>3</sub>).

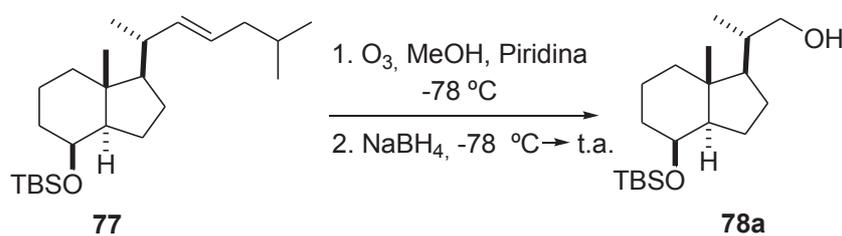
#### 4.6 Síntesis de (24 *R*, 22 *E*)-Des- A,B-8 $\beta$ - (*tert*-butildimetilsililoxi)-ergost-22-eno (**77**).



A una solución de **76** (1,75 g; 6,3 mmol) en DMF (20 mL) a t.a., se agregó imidazol (1,07 g; 15,75 mmol) y TBSCl (1,42 g; 9,45 mmol). La mezcla de reacción se dejó con agitación durante toda la noche. Se agregó H<sub>2</sub>O helada (40 mL), la fase acuosa se extrajo con CHCl<sub>3</sub> (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (3 x 15 cm, eluyente hexano) obteniéndose **77** [1,98 g; 80%; *R<sub>f</sub>* = 0,90 (Hex/AcOEt 5%), aceite incoloro].

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  ppm: 5,19 (2H, m, H-22 y H-23); 4,03 (1H, s, H-8); 0,98 (3H, d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,6 Hz, H-21 ó 28); 0,93 (3H, s, H-18); 0,89 (12H, s, *t*-butilSi y H-21 ó 28); 0,82 (3H d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,7 Hz, H-26 ó 27); 0,80 (3H, d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,7 Hz, H-26 ó 27); 0,04 (3H, s, CH<sub>3</sub>Si); 0,01 (3H, s, CH<sub>3</sub>Si).

#### 4.7 Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(*tert*-butildimetilsililoxi)-23,24-dinorcolan-22-ol (78a).

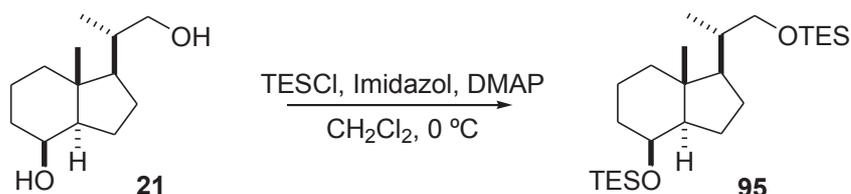


En un reactor de vidrio con difusor de vidrio poroso, seco y purgado con argón, se preparó una disolución de **77** (1,98 g; 5 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL), metanol (160 mL) y piridina (2 mL). La disolución se enfrió a -78 °C en atm. de N<sub>2</sub>, y a continuación se hizo pasar una mezcla de ozono/oxígeno durante 25 min. El exceso de ozono se desplazó con N<sub>2</sub> (test de KI). El NaBH<sub>4</sub> (1,0 g; 26 mmol) se agregó en pequeñas porciones y la mezcla resultante se dejó en agitación permitiendo que suba la temperatura hasta t.a. Luego se realizó un segundo agregado de NaBH<sub>4</sub> (1,0 g; 26 mmol) en porciones, se continuó la agitación durante 12 h más a t.a. A continuación la mezcla de reacción se concentró hasta un volumen más pequeño, se agregó H<sub>2</sub>O (40 mL) y se extrajo con Et<sub>2</sub>O (2 x 40 mL). Las fases etéreas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (4 x 18 cm, eluyente Hex/AcOEt 15%) obteniéndose el alcohol **78a** [0,83 g; 51%; *R<sub>f</sub>* = 0,40 (Hex/AcOEt 25%), sólido blanco].<sup>202</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 4,01 (1H, s ancho, H-8); 3,63 (1H, dd <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10,5 Hz; <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 3,2 Hz; H-22); 3,37 (1H, dd <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10,5; <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,7 Hz, H-22); 1,02 (3H, d <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,6 Hz; H-21); 0,93 (3H, s, H-18); 0,89 (9H, s, *t*-butilSi); 0,01 (3H, s, CH<sub>3</sub>Si), 0,00 (3H, s, CH<sub>3</sub>Si).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  ppm: 69,38 (CH-8); 68,01 (CH<sub>2</sub>-22); 53,19 (CH); 52,89 (CH); 42,18 (C-13); 40,63 (CH<sub>2</sub>); 38,30 (CH); 34,45 (CH<sub>2</sub>); 26,81 (CH<sub>2</sub>); 25,82 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi]; 23,13 (CH<sub>2</sub>); 18,04 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C $\underline{S}$ i]; 17,65 (CH<sub>2</sub>); 16,67 (CH<sub>3</sub>-21); 13,77 (CH<sub>3</sub>-18); -4,80 (CH<sub>3</sub>Si); -5,15(CH<sub>3</sub>Si).

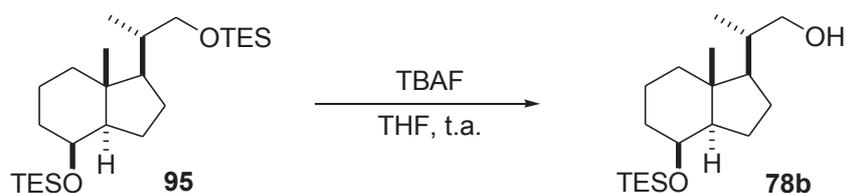
<sup>202</sup> Mascareñas, J. L.; Mouríño, A.; Castedo, L. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1269-1272.

**4.8 Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ ,22-di(trietilsililoxi)-23,24-dinorcolano (95).**

A una solución del diol **21** (2,0 g; 9,42 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) a 0 °C y bajo atm. de Ar, se agregó sucesivamente imidazol (1,92; 28,3 mmol), una cantidad catalítica de DMAP y luego TESCO (3,2 mL; 19,3 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1 h. Se agregó H<sub>2</sub>O (20 mL), se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (30 mL) y con H<sub>2</sub>O (30 mL). Luego de secar, filtrar y concentrar se obtuvo el producto **95**, el cual fue utilizado para la siguiente reacción sin previa purificación. [*R*<sub>f</sub> = 0,84 (Hex/AcOEt 30%), sólido blanco].

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 4,00 (1H, s ancho, H-8); 3,62 (1H, m, H-22); 3,2 (1H, m, H-22); 2,00 (1H, m, H-14); 0,98 (18H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 0,60 (12H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

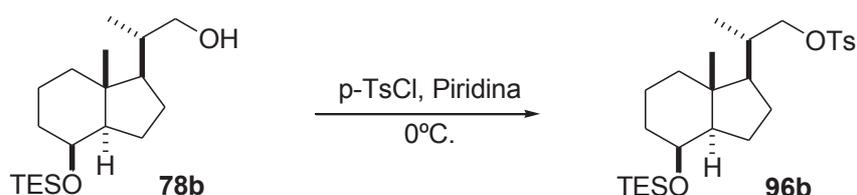
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 69,31 (CH-8); 67,56 (CH<sub>2</sub>-22); 53,50 (CH-17); 52,87 (CH-14); 42,24 (C-13); 40,68 (CH<sub>2</sub>); 38,80 (CH<sub>2</sub>); 34,68 (CH-21); 26,86 (CH<sub>2</sub>); 23,17 (CH<sub>2</sub>); 17,69 (CH<sub>2</sub>); 16,79 (CH<sub>3</sub>-21); 13,60 (CH<sub>3</sub>-18); 6,94 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 6,83 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 4,94 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 4,44 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

4.9 Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(triethylsililoxi)-23,24-dinorcolan-22-ol (**78b**).

A una solución del compuesto **95** (4,14 g; 9,42 mmol) en THF (50 mL) se agregó una solución de TBAF en THF (1 M; 9,42 mL). La mezcla de reacción se dejó en agitación bajo atm. de Ar y a t.a. La reacción se detuvo por adición de H<sub>2</sub>O (20 mL), se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (4 x 15 cm, eluyente Hex/AcOEt 10%) obteniéndose el alcohol **78b** [2,81 g; 91% para los dos pasos a partir de **21**,  $R_f$  = 0,44 (Hex/AcOEt 30%), líquido incoloro].

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 4,00 (1H, s ancho, H-8); 3,62 (1H, dd  $^2J_{\text{HH}} = 10,4$  Hz;  $^3J_{\text{HH}} = 3,2$  Hz; H-22); 3,36 (1H, dd  $^2J_{\text{HH}} = 10,4$ ;  $^3J_{\text{HH}} = 6,8$  Hz, H-22); 1,02 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,6$  Hz, 3H, H-20); 0,95 (12H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$  y H-18); 0,55 (6H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 7,9$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ).

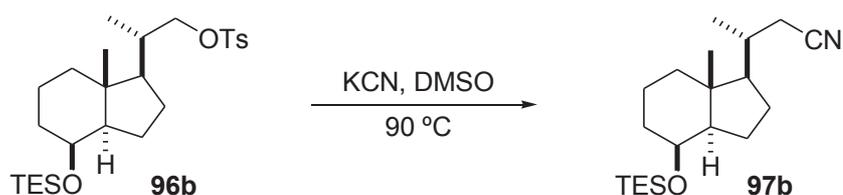
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 69,23 (CH-8); 67,60 (CH<sub>2</sub>-22); 53,07 (CH-17); 52,79 (CH-14); 42,07 (C-13); 40,57 (CH<sub>2</sub>); 38,26 (CH<sub>2</sub>); 34,55 (CH-20); 26,75 (CH<sub>2</sub>); 23,01 (CH<sub>2</sub>); 17,58 (CH<sub>2</sub>); 16,59 (CH<sub>3</sub>-21); 13,47 (CH<sub>3</sub>-18); 6,83 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ); 4,91 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ).

**4.10 Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(triethylsililoxi)-22-tosiloxi-23,24-dinorcolano (96b).**

Sobre una solución del alcohol **78b** (1,39 g; 4,26 mmol) en piridina (20 mL) a 0 °C, se agregó *p*-TsCl (1,20 g; 6,38 mmol). La mezcla se dejó en agitación a 0 °C durante 2 h y luego se dejó en la heladera toda la noche. La reacción se elaboró agregando H<sub>2</sub>O helada y la fase acuosa resultante se extrajo con una mezcla de Hex/AcOEt (1:1) (2 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con HCl al 5% (2 x 30 mL), con una disolución saturada de CuSO<sub>4</sub> (3 x 20 mL), y con H<sub>2</sub>O (40 mL); a continuación se secaron, filtraron y concentraron a presión reducida. El compuesto **96b** obtenido se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación [1,76 g;  $R_f = 0,38$  (Hex/AcOEt 10%), sólido blanco].

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 7,78 (2H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 8,2$  Hz, H-Ar); 7,33 (2H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 8,0$  Hz, H-Ar); 4,02 (1H, m, H-8); 3,79 (1H, dd  $^2J_{\text{HH}} = 9,2$ ;  $^3J_{\text{HH}} = 6,4$  Hz, H-22); 3,97 (1H, dd  $^2J_{\text{HH}} = 9,2$ ;  $^3J_{\text{HH}} = 3,1$  Hz, H-22); 2,44 (3H, s, Me-Ar); 0,94 (12H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$  y H-21); 0,87 (3H, s, H-18); 0,56 (6H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ).

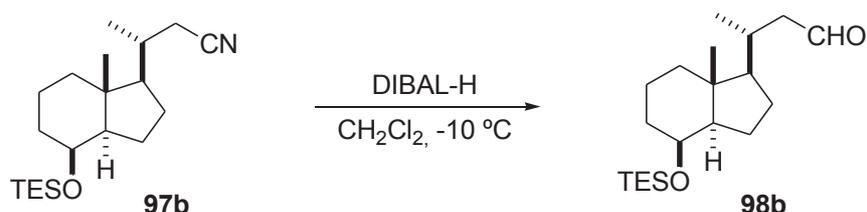
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 144,47 (C-Ar); 133,34 (C-Ar); 129,70 (CH-Ar); 127,88 (CH-Ar); 75,69 (CH<sub>2</sub>-22); 69,17 (CH-8); 52,75 (CH-17); 52,51 (CH-14); 42,16 (C-13); 40,45 (CH<sub>2</sub>); 35,74 (CH-20); 34,51 (CH<sub>2</sub>); 26,51 (CH<sub>2</sub>); 22,91 (CH<sub>2</sub>); 21,55 (CH<sub>3</sub>-Ar); 17,57 (CH<sub>2</sub>); 16,75 (CH<sub>3</sub>-21); 13,45 (CH<sub>3</sub>-18); 6,86 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ); 4,94 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ).

4.11 Síntesis de Des-A,B-8β-(trietilsililoxi)-22-ciano-23,24-dinorcolano (**97b**).

Sobre una disolución del tosilato **96b** (1,76; 3,67 mmol) en DMSO (5 mL) se agregó KCN (0,36; 5,50 mmol), y la mezcla se dejó en agitación a 90 °C. Luego de 3 h, cuando se observó la conversión total del sustrato (TLC), se agregó H<sub>2</sub>O (10 mL) y se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 5 mL) la fase acuosa resultante. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de NaCl (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron a presión reducida. El producto **97b** así obtenido se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación [1,27 g;  $R_f$  = 0,5 (Hex/AcOEt 10%), líquido incoloro].

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ ppm: 4,02 (1H, s ancho, H-8); 2,31 (1H, dd <sup>2</sup> $J_{\text{HH}}$  = 16,6 Hz; <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 3,8 Hz, H-22); 2,20 (1H, dd <sup>2</sup> $J_{\text{HH}}$  = 16,6 Hz; <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 7,0 Hz, H-22); 1,11 (3H, d <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 6,6 Hz, H-21); 0,91 (3H, s, H-18); 0,93 (9H, t <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 8,0 Hz,  $\underline{\text{CH}}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ); 0,54 (6H, c <sup>3</sup> $J_{\text{HH}}$  = 7,9 Hz  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ).

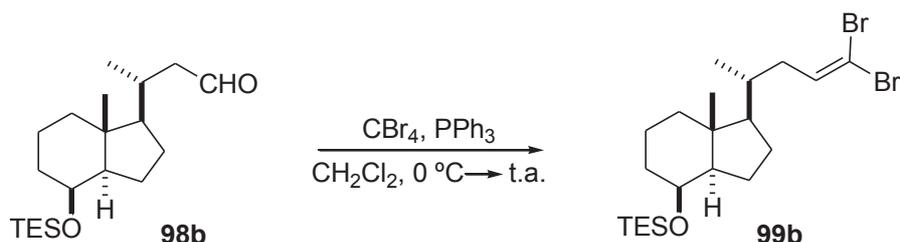
<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ ppm: 118,99 (CN); 69,16 (CH-8); 55,41 (CH-17); 52,89 (CH-14); 42,10 (C-13); 40,40 (CH<sub>2</sub>); 34,43 (CH<sub>2</sub>); 33,11 (CH-20); 27,18 (CH<sub>2</sub>); 24,64 (CH<sub>2</sub>); 22,86 (CH<sub>2</sub>); 19,19 (CH<sub>3</sub>-21); 17,55 (CH<sub>2</sub>); 13,62 (CH<sub>3</sub>-18); 6,88 ( $\underline{\text{CH}}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ); 4,92 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ).

**4.12 Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(triethylsililoxi)-24-norcolan-23-al (98b).**

A una solución del nitrilo **97b** (1,27 g; 3,61 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) a  $-10\text{ }^\circ\text{C}$ , se agregó lentamente gota a gota una solución de DIBAL-H 1 M en hexano (7,0 mL; 6,90 mmol). Al cabo de 30 min. se detuvo la reacción por agregado de HCl 10% (60 mL) y  $\text{Et}_2\text{O}$  (30 mL). Se dejó en agitación 15 min. y luego se extrajo la fase acuosa con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y concentraron. El aldehído **98b** obtenido se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación. [1,12 g;  $R_f = 0,64$  (Hex/AcOEt 10%), líquido incoloro].

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 9,7 (1H, s ancho, -CHO); 4,02 (1H, s ancho, H-8); 2,45-2,41 (1H, m, H-22); 2,16-2,09 (1H, m, H-22); 0,98 (3H, d  $^3J_{\text{HH}} = 6,5$  Hz, H-21); 0,96-0,92 (3H, s, H-18 y 9H, t,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ); 0,54 (6H, c  $^3J_{\text{HH}} = 7,8$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ).

**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 203,66 (CHO); 69,20 (CH-8); 56,49 (CH-17); 53,00 (CH-14); 50,74 (CH<sub>2</sub>-22); 42,22 (C-13); 40,57 (CH<sub>2</sub>); 34,47 (CH<sub>2</sub>); 31,21 (CH-20); 27,53 (CH<sub>2</sub>); 22,87 (CH<sub>2</sub>); 19,87 (CH<sub>3</sub>-21); 17,57 (CH<sub>2</sub>); 13,46 (CH<sub>3</sub>-18); 6,89 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ); 4,87 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$ ).

4.13 Síntesis de Des-A,B-8 $\beta$ -(triethylsililoxi)-24,24-dibromo-23-coleno (**99b**).

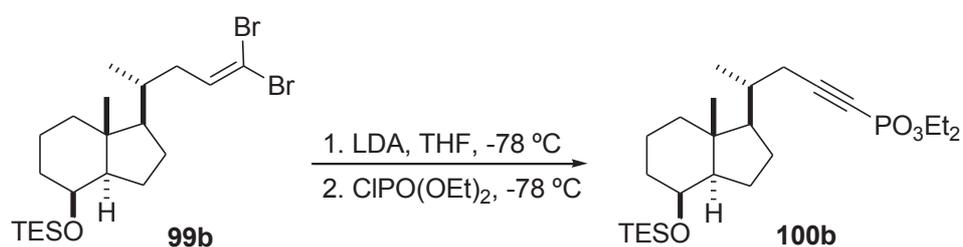
A una solución del aldehído **98b** (1,12 g; 3,31 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (35 mL) se agregó CBr<sub>4</sub> (1,76 g; 5,30 mmol). A continuación, sobre la disolución enfriada a 0 °C se añadió PPh<sub>3</sub> (2,75 g; 10,48 mmol) en seis porciones en intervalos de 2 min, observándose que la mezcla de reacción se tornaba color amarillo. Finalizado el agregado de PPh<sub>3</sub>, se retiró el baño de hielo y se dejó la mezcla de reacción en agitación a t.a.; al cabo de unos minutos la solución se volvió turbia. Finalizada la reacción (TLC) a los 40 min., se agregó hexano (50 mL) y se dejó con buena agitación 10 min. más. Luego se filtró la suspensión blanca a través de sílica gel mediante una placa filtrante y se lavó con hexano hasta arrastrar todo el producto (TLC). El filtrado se concentró bajo presión reducida obteniéndose el compuesto **99b**, el cual fue utilizado para la siguiente reacción sin previa purificación [1,14 g; *R<sub>f</sub>* = 0,8 (Hex/AcOEt 5%), líquido incoloro].<sup>203</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 6,39 (1H, dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8,0 Hz; <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,6, H-23); 4,03 (1H, m, H-8); 2,17 (1H, ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 3,4 Hz; <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,5 Hz; <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 14,7 Hz, H-22); 0,95 (12H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si y H-21); 0,91 (3H, s, H-18); 0,56 (6H, c <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7,9 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 137,84 (CH-23); 88,58 (C-24); 69,32 (CH-8); 56,49 (CH-17); 53,05 (CH-14); 42,26 (C-13); 40,65 (CH<sub>2</sub>); 39,56 (CH<sub>2</sub>); 35,22 (CH-20); 34,59 (CH<sub>2</sub>); 27,41 (CH<sub>2</sub>); 23,00 (CH<sub>2</sub>); 18,92 (CH<sub>3</sub>-21); 17,65 (CH<sub>2</sub>); 13,53 (CH<sub>3</sub>-18); 6,94 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 4,95 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

<sup>203</sup> Wang, L.; Shen, W. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8873-8879.

#### 4.14 Síntesis de (Des-A,B-8β-trietilsililoxi-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo (100b).



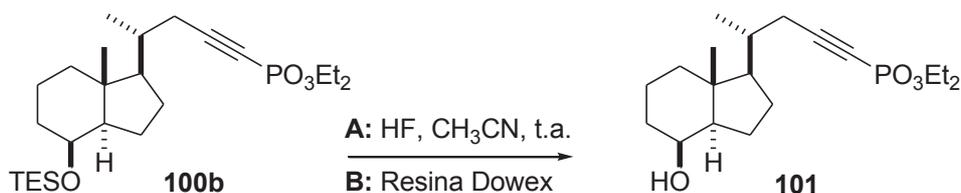
Sobre una disolución de *n*-BuLi en hexano (7,13 mmol; 1,53 M) a 0 °C, se agregó lentamente *i*-Pr<sub>2</sub>NH (0,90 mL; 6,90 mmol) y luego, THF (15 mL); se dejó en agitación durante 40 min. a la misma temperatura. A continuación sobre la solución de LDA a -78 °C, se agregó lentamente una solución del compuesto **99b** (1,14 g; 2,30 mmol) en THF (10 mL) y se dejó en agitación. La solución se fue tornando color rojo oscuro, observándose la desaparición del sustrato (TLC) luego de 1h. Seguidamente, se enfrió la mezcla de reacción nuevamente a -78 °C, y se agregó lentamente CIPO(OEt)<sub>2</sub> (0,36 mL; 2,53 mmol). Finalizado el agregado, la mezcla de reacción se dejó en agitación permitiendo que suba la temperatura. La reacción se detuvo agregando HCl 5% (20 mL) y la fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron, se filtraron y concentraron a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (20 x 3 cm, eluyente Hex/AcOEt 30%) obteniéndose el alquiniolfosfonato **100b** [0,79 g; 40 % para los cinco pasos a partir de **78b**; R<sub>f</sub> = 0,27 (Hex/AcOEt 30%); líquido incoloro].

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ ppm: 4,08 (4H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 3,96 (1H, s ancho, H-8); 2,32 (1H, m, H-22); 2,15 - 2,08 (1H, m, H-22); 1,30 (6H, t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,0 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 1,00 (3H, d <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,6 Hz, H-21); 0,88 (9H, t <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,9 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 0,84 (3H, s, H-18); 0,48 (6H, c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,0 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ ppm: 102,23 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 52,9 Hz, C-23); 71,25 (d, <sup>1</sup>J<sub>CP</sub> = 302,6 Hz, C-24); 69,0 (CH-8); 62,66 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 5,5 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 55,49 (CH-17); 52,80 (CH-14); 41,96 (C-13); 40,34 (CH<sub>2</sub>); 34,54 (d, <sup>4</sup>J<sub>HP</sub> = 2,4 Hz, CH-20); 34,32 (CH<sub>2</sub>); 27,04 (CH<sub>2</sub>); 26,19 (d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 4,3 Hz, CH<sub>2</sub>-22); 22,70 (CH<sub>2</sub>); 18,94 (CH<sub>3</sub>-21); 17,40 (CH<sub>2</sub>); 15,93 (d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 7,0 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 13,43 (CH<sub>3</sub>-18); 6,74 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 4,72 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

<sup>31</sup>P-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 161 MHz) δ ppm: -6,09.

HRMS (ESI): calculado para C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>O<sub>4</sub>PSi (M+H): 471,3059; encontrado: 471,3054.

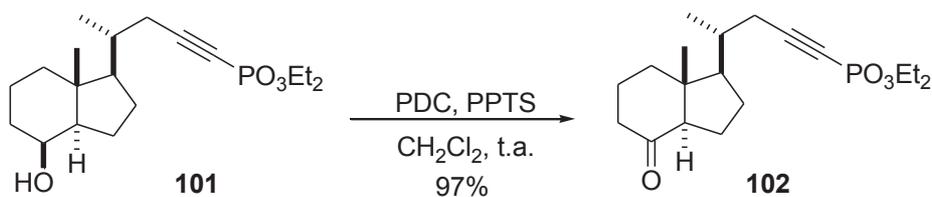
4.15 Síntesis de (Des-A,B-8β-hidroxi-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo (**101**).

**Método A:** Una disolución acuosa de HF (48 %, 2 gotas) se agregó lentamente sobre una solución de **100b** (0,23 g; 0,48 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (6 mL). Al cabo de 1 h, se agregó una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) y la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H<sub>2</sub>O, se secaron, filtraron y concentraron. El compuesto **101** fue obtenido prácticamente puro, por lo cual fue utilizado a continuación sin previa purificación [158 mg, 92%,  $R_f = 0,2$  (Hex/AcOEt 50%), líquido incoloro].

**Método B:** A una solución de **100b** (40 mg; 0,042 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (4 mL) se agregó resina ácida Dowex® (200 mg), y la mezcla de reacción se dejó en agitación a t.a.. Luego de 2 h, la mezcla de reacción se filtró y se lavó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 mL). A continuación se separó la fase orgánica, se secó y se concentró, obteniéndose el compuesto **101** [26 mg, 85 %].

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 4,08 - 4,11 (4H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 4,00 (1H, s ancho, H-8); 2,33 (1H, dt,  $^3J_{\text{HH}} = 3,9$  Hz;  $^2J_{\text{HH}} = 17,3$  Hz, H-22); 2,16 - 2,09 (1H, m, H-22); 1,3 (6H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 7,0$  Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 1,00 (3H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,6$  Hz, H-21); 0,87 (3H, s H-18).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  ppm: 102,07 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 53,0$  Hz; C-23); 71,09 (d,  $^1J_{\text{CP}} = 304,4$  Hz, C-24); 68,59 (CH-8); 62,56 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 5,49$  Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 55,22 (CH-14); 52,24 (CH-17); 41,59 (C-13); 39,89 (CH<sub>2</sub>); 34,27 (CH-20), 33,27 (CH<sub>2</sub>); 26,79 (CH<sub>2</sub>); 26,03 (d;  $^3J_{\text{CP}} = 4,3$  Hz; CH<sub>2</sub>-22); 22,14 (CH<sub>2</sub>); 18,76 (CH<sub>3</sub>-21); 17,06 (CH<sub>2</sub>); 15,79 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 6,94$  Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 13,31 (CH<sub>3</sub>-18).

4.16 Síntesis de (Des-A,B-8-oxo-23-colin-24-il)fosfonato de dietilo (**102**).

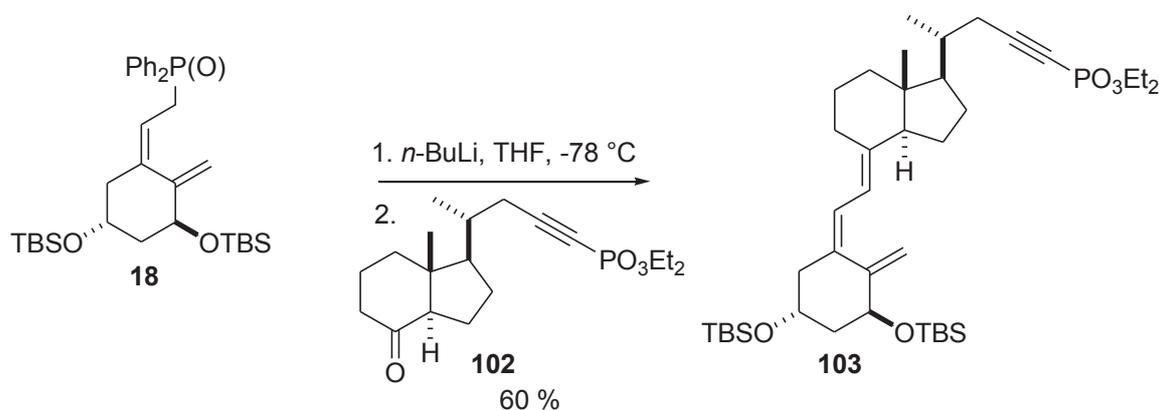
A una solución del alcohol **101** (0,184 g; 0,52 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (9 mL), se agregó sucesivamente PDC (0,54 g; 1,43 mmol) y una cantidad catalítica de PPTS. La mezcla de reacción se dejó en agitación a t.a. durante 3 hs en ausencia de luz. Luego se agregó una mezcla de Hex/AcOEt al 25%, se dejó 15 min. más en agitación y se filtró a través de celite® mediante una placa filtrante. Los sólidos se lavaron con Hex/AcOEt al 50% hasta arrastrar todo el producto (TLC). El filtrado se concentró y el residuo obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (10 x 2 cm, eluyente Hex/AcOEt 70%) obteniéndose el compuesto **102** [0,178 g, 97%,  $R_f = 0,13$  (Hex/AcOEt 40%), líquido incoloro].

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 4,09 (4H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 1,31 (6H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 7,0$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 1,08 (3H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,5$  Hz; H-21); 0,59 (3H, s, H-18).

**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 210,95 (C-8); 101,10 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 52,7$  Hz; C-23); 71,38 (d,  $^1J_{\text{CP}} = 303,9$  Hz; C-24); 62,47 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 4,0$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 61,15 (CH-14); 54,83 (CH-17); 49,21 (C-13); 40,34 ( $\text{CH}_2$ ); 38,15 ( $\text{CH}_2$ ); 34,19 (CH-20); 26,92 ( $\text{CH}_2$ ); 25,87 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 4,4$  Hz;  $\text{CH}_2$ -22); 23,44 ( $\text{CH}_2$ ); 18,73 ( $\text{CH}_3$ -21); 18,53 ( $\text{CH}_2$ ); 15,65 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 6,9$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 12,08 ( $\text{CH}_3$ -18).

**HRMS** (ESI): calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{P}$  (M+H): 355,20382; encontrado: 355,20327.

#### 4.17 Síntesis de [(5Z,7E)-(1S,3R)-1,3bis-1,1-dimethylethyl)dimethylsililoxi-9,10-secocola-5,7,10(19)-trien-23-in-24-il] fosfonato de dietilo (**103**).



Sobre una disolución del óxido de fosfina **18** (0,36 g; 0,61 mmol) en THF (8 mL) a  $-78 \text{ } ^\circ\text{C}$ , se agregó gota a gota *n*-BuLi 2,5 M en hexano (0,61 mmol), observándose la aparición progresiva de un color rojo intenso. Una vez finalizada la adición, la mezcla de reacción se mantuvo con agitación a la misma temperatura durante 1 h. Luego, en ausencia de luz, se agregó gota a gota una disolución de la cetona **102** (0,11 g; 0,30 mmol) en THF (5 mL) y se dejó en agitación durante 3 h en las mismas condiciones, y 2 h más permitiendo a la temperatura subir hasta  $-40^\circ\text{C}$ . La reacción se detuvo agregando una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mL), y la mezcla se extrajo con AcOEt (4 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (10 mL), se secaron, filtraron y concentraron. A continuación se purificó el residuo obtenido por cromatografía flash en columna (20 x 2 cm, eluyente Hex/AcOEt 30%), obteniéndose el análogo protegido **103**. [130 mg, 60%,  $R_f = 0,48$  (Hex/AcOEt 50%), líquido incoloro].

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 6,21 (1H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 11,2$  Hz; H-6); 5,99 (1H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 11,4$  Hz; H-7); 5,16 (1H, s ancho, H-19); 4,83 (1H, s ancho, H-19); 4,35 (1H, m, H-1); 4,20 - 4,10 (5H, m, H-3 y  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 2,8 (1H, m, H-22); 2,40 (2H, m, H-22 y H-20); 1,35 (6H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 1,24 (3H, m); 1,09 (3H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,6$  Hz; H-21); 0,85 (18H, s, *t*-butilSi); 0,52 (3H, s H-18); 0,03 (12H, m,  $\text{CH}_3\text{Si}$ ).

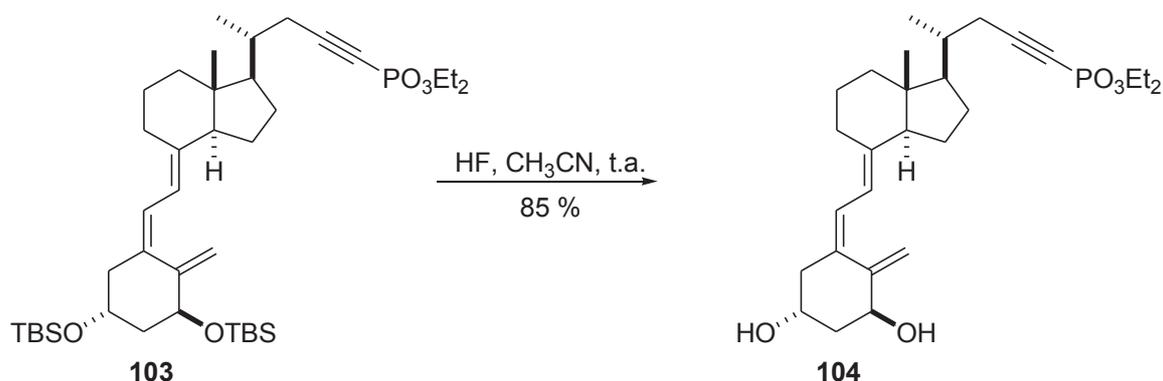
**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 148,18 (=C-10); 140,26 (=C-8); 135,24 (=C-5); 122,93 (=CH-6); 118,06 (=CH-7); 111,16 (=CH<sub>2</sub>-19); 102,16 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 53,1$  Hz; C-23); 71,94 (CH-1); 71,60 (d,  $^1J_{\text{CP}} = 302,8$  Hz; C-24); 67,41 (CH-3); 62,80 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 5,3$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 56,09 (CH-17); 55,34 (CH-14); 45,92 (CH<sub>2</sub>); 45,62 (C-13); 44,69 (CH<sub>2</sub>); 40,25 (CH<sub>2</sub>); 35,37 (CH-20); 28,68 (CH<sub>2</sub>); 27,52 (CH<sub>2</sub>); 26,40 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 4,1$  Hz; CH<sub>2</sub>-22); 25,77 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C-Si}$ ]; 25,73 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C-Si}$ ]; 23,27 (CH<sub>2</sub>); 21,98 (CH<sub>2</sub>); 19,29 (CH<sub>3</sub>-21); 18,15 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C-Si}$ ]; 18,07 [ $(\text{CH}_3)_3\text{C-Si}$ ].

Sij; 16,07 (d,  $^3J_{CP} = 7,2$  Hz;  $\underline{C}H_3CH_2OP$ ); 11,96 ( $CH_3$ -18); -4,76 ( $CH_3$ -Si); -4,87 ( $CH_3$ -Si); -5,15 ( $CH_3$ -Si).

$^{31}P$ -RMN ( $CDCl_3$ , 162 MHz)  $\delta$  ppm: -6,18.

HRMS (ESI): calculado para  $C_{40}H_{72}O_5PSi_2$  (M+H): 719,4656; encontrado: 719,46504

#### 4.18 Síntesis de [(5Z,7E)-(1S,3R)-1,3-dihidroxi-9,10-secocola-5,7,10(19)-trien-23-in-24-il] fosfonato de dietilo (**104**).



Sobre una solución de **103** (0,04 g; 0,06 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (3 mL) se agregó HF (48 %, 2 gotas) lentamente. Transcurridos 35 min, se agregó una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con H<sub>2</sub>O, se secaron, filtraron y concentraron. El residuo obtenido fue purificado por cromatografía flash en columna (5 x 2 cm, eluyente AcOEt), obteniéndose el análogo **104**. [0,023 g, 84%, *R<sub>f</sub>* = 0,13 (Hex/AcOEt 80%), sólido blanco].

Previo a los ensayos biológicos el compuesto **104** fue purificado por cromatografía en capa fina preparativa utilizando AcOEt grado HPLC como eluyente. La pureza del compuesto (98%) fue analizada por HPLC analítico fase reversa (gradiente: 5-95% CH<sub>3</sub>CN en H<sub>2</sub>O durante 30 min., 1 mL/min., 263 nm).

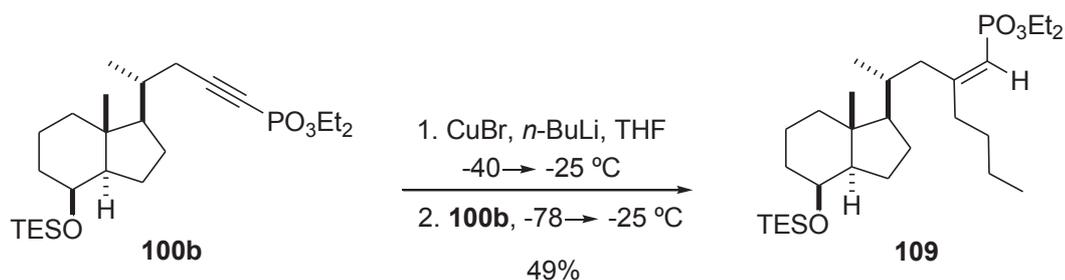
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ ppm: 6,21 (1H, d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 11,3 Hz, H-6); 6,00 (1H, d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 11,2 Hz; H-7); 5,31 (1H, s ancho, H-19); 4,97 (1H, s ancho, H-19); 4,41 (1H, m; H-1); 4,21 (1H, m, H-3); 4,14 (4H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 2,83 (1H, m, H-22); 2,57 (1H, m, H-22); 1,35 (6H, t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7,1 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 1,09 (3H, d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,6 Hz; H-21); 0,89 (3H, s, H-18).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ ppm: 147,64 (=C-10); 142,25 (=C-8); 133,44 (=C-5); 124,65 (=CH-6); 117,35 (=CH-7); 111,73 (CH<sub>2</sub>-19); 102,19 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CP</sub> = 53,02 Hz; C-23); 71,56 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CP</sub> = 303,3 Hz; C-24); 70,70 (CH-1); 66,73 (CH-3); 62,80 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CP</sub> = 5,5 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 56,14 (CH-17); 55,43 (CH-14); 53,39 (C-13); 45,18 (CH<sub>2</sub>); 42,83 (CH<sub>2</sub>); 40,18 (CH<sub>2</sub>); 35,36 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>CP</sub> = 1,2 Hz; CH-20); 28,91 (CH<sub>2</sub>); 27,48 (CH<sub>2</sub>); 26,44 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CP</sub> = 4,4 Hz; CH<sub>2</sub>-22); 23,39 (CH<sub>2</sub>); 22,15 (CH<sub>2</sub>); 19,30 (CH<sub>3</sub>-21); 16,08 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CP</sub> = 7,1 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 12,04 (CH<sub>3</sub>-18).

**<sup>31</sup>P-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 162 MHz) δ ppm: -6,18 ppm.

**HRMS** (ESI): calculado para C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>O<sub>5</sub>P (M+H): 491,2926, encontrado: 491,29209.

**UV** (*i*-PrOH): λ<sub>max</sub> 265 nm, λ<sub>min</sub> 212 nm.

4.19 Reacción de carbocupración del alquiniilfosfonato **100b**.

Sobre una suspensión de CuBr (60 mg; 0,42 mmol) en THF (4 mL) a -40 °C, se agregó lentamente *n*-BuLi (0,34 mL; 2,5 M), y luego se dejó en agitación durante 1 h permitiendo que suba la temperatura hasta -25 °C.

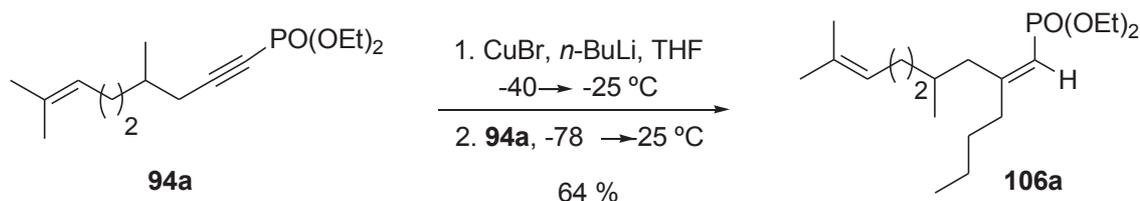
A continuación se trasvasó el volumen excedente de la solución de cuprato (3 mL; 0,1 M), y sobre la solución remanente a -78 °C se agregó el alquiniilfosfonato **100b** (40 mg; 0,085 mmol) en solución de THF (2 mL). La mezcla de reacción se dejó en agitación manteniendo la temperatura por debajo de -25 °C. El progreso de la reacción se siguió por TLC. La reacción se detuvo 3 h después agregando una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (5 mL) y la fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (5 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1 x 9,5 cm, eluyente Hex/AcOEt 20%), obteniéndose el alqueniilfosfonato **109** [17 mg, 40%, *R<sub>f</sub>* = 0,33 (Hex/AcOEt 30%), aceite incoloro].

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ ppm: 5,40 (1H, d, <sup>2</sup>*J*<sub>HP</sub> = 18,2 Hz, =CH-24); 4,08-3,99 (5H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP y H-8); 2,64 (1H, t, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 12,3 Hz, H-22); 2,24 (1H, m, H-22); 2,18-2,01 [2H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-]; 1,31 (6H, t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7,1 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 0,96-0,89 [12H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si, H-18, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-]; 0,84 (3H, d <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,5 Hz, H-21); 0,55 (6H, c, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7,9 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ ppm: 166,94 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CP</sub> = 6,8 Hz, =C-23); 112,48 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CP</sub> = 189,6 Hz, =CH-24); 69,42 (CH-8); 61,06 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CP</sub> = 5,4 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 57,58 (CH-17); 53,08 (CH-14); 42,35 (C-13); 40,68 (CH<sub>2</sub>); 39,32 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CP</sub> = 6,8 Hz, CH<sub>2</sub>-22); 37,68 [d, <sup>3</sup>*J*<sub>CP</sub> = 22,7 Hz, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-]; 34,59 (CH<sub>2</sub>); 34,22 (CH-20); 29,73 (CH<sub>2</sub>); 27,62 (CH<sub>2</sub>); 23,02 (CH<sub>2</sub>); 22,35 (CH<sub>2</sub>); 17,82 (CH<sub>3</sub>-21); 17,66 (CH<sub>2</sub>); 16,39 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CP</sub> = 6,5 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 13,91 (CH<sub>3</sub>); 13,63 (CH<sub>3</sub>); 6,93 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si); 4,96 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si).

**<sup>31</sup>P-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 162 MHz) δ ppm: 18,66 ppm.

**HRMS** (ESI): calculado para C<sub>29</sub>H<sub>58</sub>O<sub>4</sub>PSi (M+H): 529,38420; encontrado: 529,38365.

4.20 Reacción de carbocupración del alquiniilfosfonato **94a**.

Sobre una suspensión de CuBr (155 mg; 1,10 mmol) en THF (3 mL) a -40  $^{\circ}$ C, se agregó lentamente *n*-BuLi (0,87 mL; 2,5 M), y luego se dejó en agitación durante 1 h permitiendo que suba la temperatura hasta -25  $^{\circ}$ C.

A continuación sobre la solución remanente a -78  $^{\circ}$ C se agregó el alquiniilfosfonato **94a** (62 mg; 0,22 mmol) en solución de THF (2 mL). La mezcla de reacción se dejó en agitación manteniendo la temperatura por debajo de -20  $^{\circ}$ C. El progreso de la reacción se siguió por TLC. La reacción se detuvo 3 h después agregando una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (5 mL) y la fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de NaCl (5 mL), se secaron, filtraron y concentraron. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (2 x 7 cm, eluyente Hex/AcOEt 25%), obteniéndose el alqueniilfosfonato **106a** [44 mg, 64%, *R<sub>f</sub>* = 0,23 (Hex/AcOEt 40%), líquido incoloro].

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  ppm: 5,37 (1H, d, <sup>2</sup>*J*<sub>HP</sub> = 18,1 Hz; =CHP); 5,05 (1H, t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6,4 Hz, =CH-7); 4,05 (4H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 2,55 - 2,43 (2H, m, H-3); 2,15 (2H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 2,00 (2H, m, H-6); 1,64 (3H, s, H-9 ó CH<sub>3</sub>-8); 1,56 (3H, s, H-9 ó CH<sub>3</sub>-8); 1,40 (6H, t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7,0 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 0,86 [6H, m, CH<sub>3</sub>CH- y CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-].

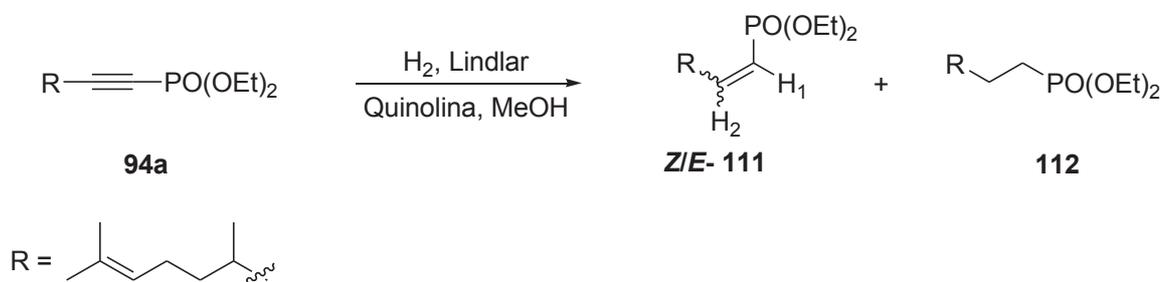
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  $\delta$  ppm: 166,24 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CP</sub> = 6,4 Hz, C=CHP); 131,01 (=C-8); 124,58 (=CH-7); 112,34 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>CP</sub> = 189,9 Hz, =CHP); 60,95 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>CP</sub> = 6,3 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 40,13 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CP</sub> = 6,9 Hz; CH<sub>2</sub>-3); 37,66 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CP</sub> = 22,56 Hz, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-); 36,88 (CH<sub>2</sub>); 30,93 (CH); 29,67 (CH<sub>2</sub>); 25,56 (CH<sub>2</sub>); 25,12 (CH<sub>3</sub>); 22,27 (CH<sub>2</sub>); 18,01 (CH<sub>3</sub>); 17,62 (CH<sub>3</sub>); 16,24 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>CP</sub> = 6,5 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 15,17 (CH<sub>3</sub>).

**<sup>31</sup>P-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 162 MHz)  $\delta$  ppm: 18,53 ppm.

#### 4.21 Reducción de los alquini fosfonatos **94a** y **101**. Método general:

Sobre una disolución del alquini fosfonato (**94a** o **101**) en metanol (10 mL) se agregó, en atmósfera inerte (Ar), quinolina y el catalizador de Lindlar. Luego de purgar el sistema con argón, la mezcla de reacción se dejó en agitación con atmósfera de hidrógeno (1 atm.). La reacción de hidrogenación se siguió cuidadosamente por TLC. La mezcla de reacción se filtró por celite® y se concentró. El residuo se retomó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se agregó una solución de HCl 10% y se dejó con agitación 15 min. La fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y las fases orgánicas combinadas se secaron, filtraron y concentraron.

##### 4.21.1 Reducción del (4,8-dimetil-7-nonen-1-ínil)fosfonato de dietilo (**94a**).



La reacción de hidrogenación de **94a** (51 mg; Lindlar: 20 mg; quinolina 25 µL) se llevó a cabo durante 3h. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna (1,5 x 10 cm, eluyente Hex/AcOEt 30%), aislándose puros los alqueni fosfonatos **Z-111** (21 mg) y **E-111** (7 mg), y el alquili fosfonato **112** (8 mg). [R<sub>f</sub> = 0,17; 0,10 y 0,07 respectivamente (Hex/AcOEt 40%), todos líquidos incoloros].

A continuación se describen los principales datos espectroscópicos (<sup>1</sup>H- y <sup>31</sup>P- RMN) a partir de los cuales se hizo la correspondiente asignación estructural.

##### (Z)-(4,8-dimetil-1,7-nonadienil)fosfonato de dietilo (**111**).

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ ppm: 6,48 (1H, ddt, <sup>3</sup>J<sub>HP</sub> = 53,2; <sup>cis</sup>J<sub>HH</sub> = 13,1; <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,6 Hz; H-2); 5,61 (1H, ddm, <sup>2</sup>J<sub>HP</sub> = 19,8; <sup>cis</sup>J<sub>HH</sub> = 13,1; H-1); 5,10-5,05 (1H, m, H-7); 4,06 (4H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 2,56-2,38 (2H, m, H-3); 1,98 (2H, m, H-6); 1,67 (3H, s, H-9 ó CH<sub>3</sub>-8); 1,59 (3H, s, H-9 ó CH<sub>3</sub>-8); 1,32 (6H, t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,0 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 0,92 (3H, d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,6 Hz, CH<sub>3</sub>-4).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ ppm: 153,18 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 4,54 Hz, HC=CHP); 131,30 (=C-8); 124,53 (=CH-7); 117,17 (d, <sup>1</sup>J<sub>CP</sub> = 184,3 Hz, =CHP); 61,28 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 6,3 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 37,66 (d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 7,9 Hz, CH<sub>2</sub>-3); 36,70 (CH); 32,65 (CH<sub>2</sub>); 25,68 (CH<sub>2</sub>); 25,52 (CH<sub>3</sub>); 19,17 (CH<sub>3</sub>); 17,62 (CH<sub>3</sub>); 16,35 (d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 6,5 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP).

$^{31}\text{P}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 162 MHz)  $\delta$  ppm: 17,28.

**(E)-(4,8-dimetil-1,7-nonadienil)fosfonato de dietilo (111).**

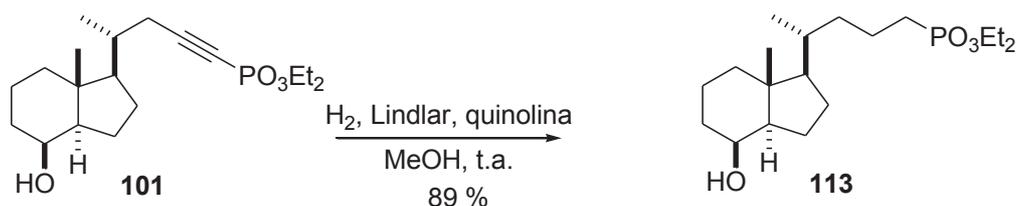
$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 6,76 (1H, ddt  $^3J_{\text{HP}} = 21,9$ ;  $^{\text{trans}}J_{\text{HH}} = 17,1$ ;  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz; H-2); 5,66 (1H, ddm  $^3J_{\text{HP}} = 21,5$ ;  $^{\text{trans}}J_{\text{HH}} = 17,1$ ; H-1); 5,12-5,06 (1H, m, H-7); 4,22-4,00 (4H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 2,32-2,21 (1H, m, H-3); 2,13-1,92 (3H, m, H-3 y H-6); 1,70 (3H, s, H-9 ó  $\text{CH}_3$ -8); 1,61 (3H, s, H-9 ó  $\text{CH}_3$ -8); 1,34 (6H, t  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 0,92 (3H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,7$  Hz,  $\text{CH}_3$ -4).

$^{31}\text{P}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 162 MHz)  $\delta$  ppm: 18,66.

**(4,8-dimetil-7-nonenil)fosfonato de dietilo (112).**

$^1\text{H}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 5,11-5,05 (1H, m, H-7); 4,15-4,02 (4H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 2,01-1,89 (2H, m, H-1); 1,68 (3H, s, H-9 ó  $\text{CH}_3$ -8); 1,60 (3H, s, H-9 ó  $\text{CH}_3$ -8); 1,32 (6H, t  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 0,87 (3H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,5$  Hz;  $\text{CH}_3$ -4).

$^{31}\text{P}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 162 MHz)  $\delta$  ppm: 32,54.

4.21.2 Reducción del alquini fosfonato de dietilo **101**.

La reacción de hidrogenación de **101** (65 mg; Lindlar: 60 mg; quinolina: 25  $\mu\text{L}$ ) se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento general descrito previamente. El producto obtenido se purificó por cromatografía flash en columna (1 x 7 cm, eluyente AcOEt), obteniéndose el alquifosfonato **113** [58 mg, 89,5 %;  $R_f = 0,17$  (TLC corrida dos veces en Hex/AcOEt 50%), líquido incoloro].

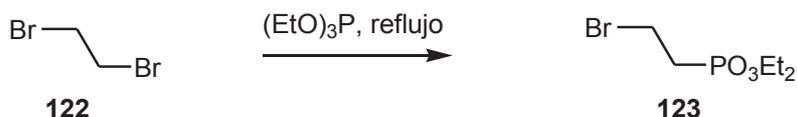
**(Des-A,B-8 $\beta$ -hidroxicolan-24-il)fosfonato de dietilo (113).**

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  ppm: 4,14-3,99 (5H, m, H-8 y  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 1,30 (6H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 0,90 (3H, s, H-18); 0,88 (3H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,6$  Hz; H-21).

**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  ppm: 69,11 (CH-8); 61,29 (d;  $^2J_{\text{CP}} = 6,3$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 56,30 (CH); 52,54 (CH); 41,78 (C-13); 40,32 ( $\text{CH}_2$ ); 36,76 (d,  $^2J_{\text{CP}} = 16,73$  Hz;  $\text{CH}_2\text{-23}$ ); 34,99 (CH); 33,54 ( $\text{CH}_2$ ); 27,07 ( $\text{CH}_2$ ); 26,01 (d,  $^1J_{\text{CP}} = 140,0$  Hz;  $\text{CH}_2\text{P}$ ); 22,42 ( $\text{CH}_2$ ); 18,95 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 4,80$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-22}$ ); 18,30 ( $\text{CH}_3$ ); 17,35 ( $\text{CH}_3$ ); 16,38 (d,  $^3J_{\text{CP}} = 5,9$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 13,40 ( $\text{CH}_3$ ).

**$^{31}\text{P-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 162 MHz)  $\delta$  ppm: 32,66.

**HRMS** (ESI): calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{P}$  (M+H): 361,25077; encontrado: 361,25022.

4.22 Síntesis de 2-bromoetilfosfonato de dietilo (**123**).

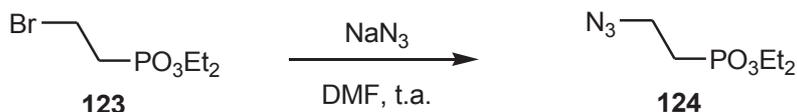
La mezcla de 1,2-dibromoetano **122** (5,0 mL; 58,0 mmol) y  $\text{P}(\text{OEt})_3$  (2,0 mL; 11,7 mmol) se calentó a 160 °C durante 24 hs. El exceso de reactantes se eliminó a 20 y 5 mmHg respectivamente. El compuesto **123** así obtenido fue utilizado en la siguiente reacción sin previa purificación [ $R_f = 0,17$  (Hex/AcOEt 60%); p.eb.<sup>192</sup>: 83-86°C/0,4 mmHg; líquido].

**<sup>1</sup>H-RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  ppm: 4,05 (4H, m,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 3,46 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 2,32 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{P}$ ); 1,26 (6H; t;  $^3J_{\text{HH}} = 7,0$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ).

**<sup>13</sup>C-RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  ppm: 61,93 (d;  $^2J_{\text{CP}} = 6,6$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ); 30,72 (d,  $^1J_{\text{CP}} = 134,9$  Hz;  $\text{CH}_2\text{P}$ ); 23,62 ( $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 16,28 (d;  $^3J_{\text{CP}} = 5,8$  Hz;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$ ).

**<sup>31</sup>P-RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 121 MHz)  $\delta$  ppm: 26,27.

**EM** [EI, m/z (%)] = 245/247 ( $\text{M}^+$ , 1,7/1,1), 217/219 (11/10), 189/191 (30/29), 171/173 (22/23), 165 (77), 143/145 (14/14), 138 (57), 137 (30), 111 (28), 110 (19), 109 (100), 93 (19), 91 (41), 83 (12), 82 (32), 81 (70), 65 (38).

**4.23 Síntesis de 2-azidoetilfosfonato de dietilo (124).**

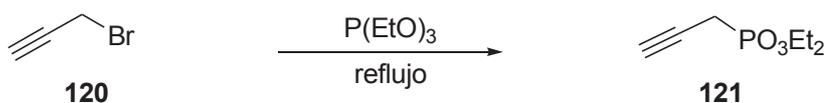
Sobre una solución del compuesto **123** (1,7 g; 7,0 mmol) en DMF (20,0 mL) se agregó NaN<sub>3</sub> (0,72 g; 11,0 mmol). La mezcla de reacción se dejó en agitación a t.a. durante 24 hs. Luego se agregó agua (25 mL) y se extrajo con AcOEt (3 x 25 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 20 mL) y con una solución saturada de NaCl (20,0 mL), luego se secaron, filtraron y concentraron. Como resultado se obtuvo un residuo que fue purificado por cromatografía flash en columna (2,5 x 10 cm, eluyente Hex/AcOEt 30 %) dando lugar a la azida **124** [1,10 g, 44% a partir de **122**, R<sub>f</sub> = 0,21 (Hex/AcOEt 70%), líquido incoloro].

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ ppm: 4,16 - 4,05 (4H, m, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 3,51 (2H, m, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>); 2,03 (2H, m, CH<sub>2</sub>P); 1,31 (6H; t <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,0 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP).

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) δ ppm: 61,86 (d; <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 6,5 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP); 45,38 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> = 1,5 Hz; CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>); 26,00 (d, <sup>1</sup>J<sub>CP</sub> = 140,9 Hz; CH<sub>2</sub>P); 16,32 (d; <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> = 5,9 Hz; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OP).

**<sup>31</sup>P-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz, δ): 27,52.

**EM** [EI, m/z (%)] = 152 (21), 125 (91), 137 (30), 109 (19), 108 (25), 106 (17), 97 (100), 96 (44), 91 (12), 81 (47), 80 (45), 79 (14), 78 (26), 65 (26).

4.24 Síntesis de 2-propinilfosfonato de dietilo (**121**).

La mezcla de bromuro de propargilo **120** (6,3 mL; 58,0 mmol) y  $P(OEt)_3$  (2,0 mL; 11,7 mmol) se calentó a 160 °C durante 24 h. El exceso de reactantes se eliminó a 20 mmHg. El producto obtenido fue purificado por cromatografía flash en columna (3 x 15 cm, eluyente Hex/AcOEt 40 %) dando lugar al compuesto **121** [0,91 g, 47%,  $R_f = 0,20$  (Hex/AcOEt 80%), líquido incoloro].

**$^1H$ -RMN** ( $CDCl_3$ , 300 MHz)  $\delta$  ppm: 5,22 (1H, t,  $^4J_{HH} = 6,9$  Hz;  $\equiv CH$ ); 4,91 (2H, dd,  $^2J_{HP} = 13,65$ ;  $^2J_{HH} = 6,87$  Hz,  $CH_2P$ ); 4,14-3,97 (m, 4H,  $CH_3CH_2OP$ ); 1,22 (t,  $^3J_{HH} = 6,8$  Hz; 6H,  $CH_3CH_2OP$ ).

**$^{13}C$ -RMN** ( $CDCl_3$ , 75 MHz)  $\delta$  ppm: 79,42 (d,  $^2J_{CP} = 198,1$  Hz,  $\equiv C$ ); 75,60 (d,  $^3J_{CP} = 15,8$  Hz,  $\equiv CH$ ); 62,18 (d,  $^2J_{CP} = 5,9$  Hz,  $CH_3CH_2OP$ ); 17,59 (d,  $^1J_{CP} = 145,84$  Hz,  $CH_2P$ ); 16,05 (d,  $^3J_{CP} = 6,53$  Hz,  $CH_3CH_2OP$ ).

**EM** [EI, m/z (%)] = 176 (15); 148 (42); 147 (21); 120 (91); 109 (58); 91 (33); 81 (100); 65 (21).

## **5. CONCLUSIONES**

---



Los resultados obtenidos a través de los estudios llevados a cabo en el presente trabajo de Tesis Doctoral constituyen un valioso aporte en el campo de la química de la vitamina D, tanto en el aspecto sintético como en el metodológico.

En lo que se refiere a la síntesis de análogos de la vitamina D, se ha logrado el análogo EM1 mediante una aproximación sencilla, accesible, convergente y en pocos pasos, con un excelente rendimiento global (17%). Un aspecto destacable de este análogo es la actividad biológica que presenta, ya que además de mostrar actividad antiproliferativa *in vitro* en varias líneas celulares cancerosas, ha demostrado ser selectivo entre células normales y cancerosas de la misma línea celular. A ello se suma la propiedad más significativa del mismo, que radica en el hecho de no presentar actividad hipercalcemiante *in vivo*, principal limitación que poseen los análogos en su potencial uso terapéutico. La importancia de los resultados obtenidos a cerca de la actividad biológica de este nuevo análogo ha establecido una colaboración interdisciplinaria con el grupo de investigación de Biología Básica del Cáncer dando lugar al desarrollo de una tesis doctoral en la que se continúan estos estudios. Este trabajo en conjunto ha generado una publicación en la revista Medicinal Chemistry Letters y cuatro presentaciones a congresos de la especialidad, promoviendo además colaboraciones tendientes a probar la potencialidad de EM1 en distintos modelos animales de cáncer.

La aplicación de la química de cupratos como metodología sintética para generar distintas modificaciones estructurales sobre la cadena lateral del análogo EM1 no dio los resultados esperados, limitando por lo tanto la versatilidad de la estrategia sintética para acceder a distintos alquenilfosfonatos análogos. Surge entonces como estrategia alternativa la modificación de la cadena lateral del intermediario clave **100b**, para luego en una segunda etapa realizar el acoplamiento de Wittig-Horner de los correspondientes fragmentos y acceder así a los distintos derivados alquenilfosfonatos. De esta manera, la aplicación de esta metodología sobre el fragmento superior **100b** (biciclo CD-cadena lateral), permitió modificar la cadena lateral y obtener el alquenilfosfonato **109** con rendimientos moderados (40%). Por otro lado, la reacción de hidrogenación catalítica sobre el alquenilfosfonato **101** dio lugar al alquifosfonato **113** con muy buenos rendimientos (89%). En ambos casos, las metodologías ensayadas presentaron limitaciones prácticas, sin embargo, resulta interesante la exploración de otras metodologías sintéticas que permitan realizar modificaciones estructurales sobre el triple enlace carbono-carbono para obtener pequeñas bibliotecas de compuestos análogos.

Además, se ha logrado el objetivo de aplicar, en el campo de la vitamina D, las metodologías desarrolladas en nuestro grupo de investigación, referidas a la preparación y uso de nanopartículas metálicas en síntesis orgánica mediante el sistema MX<sub>n</sub>-Li-areno(cat.). Para el caso particular de las nanopartículas de Titanio (TiCl<sub>4</sub>-Li-DTBB), se ha

desarrollado un nuevo procedimiento para la obtención de olefinas a través del homoacoplamiento de compuestos carbonílicos, el cual resulta una alternativa atractiva comparado con las condiciones tradicionales de los acoplamientos McMurry para la obtención de alquenos y polienos. Sin embargo, no se alcanzaron resultados significativos en el acoplamiento cruzado de compuestos carbonílicos diferentes, limitando la potencial aplicación de estos aportes en el caso concreto de la construcción del sistema triénico de la vitamina D.

Por otro lado, la cicloadición 1,3 dipolar catalizada por nanopartículas de cobre generadas mediante el sistema  $\text{CuCl}_2\text{-Li-areno(cat.)}$ , fue aplicado exitosamente en la construcción de la cadena lateral funcionalizada como triazolilfosfonato en el compuesto **135**, y permitió acceder al compuesto **138** mediante el triazol **137**, con muy buenos rendimientos y excelente regioselectividad. El esquema sintético desarrollado para la obtención de los mencionados triazoles a partir del alcohol **78b** permite construir una cadena lateral bifuncional en 6 pasos para **135** y en 3 pasos para **138** con muy buenos rendimientos globales (31% y 41% respectivamente). En ambos casos se destaca la amplia versatilidad y flexibilidad que permiten estas rutas en cuanto a la modificación de la longitud de la cadena según el precursor bifuncional empleado, así como el tipo de éster fosfónico.

## APÉNDICES

---



## **Publicaciones originadas en la presente Tesis**



**Título: “Novel Alkynylphosphonate Analogue of Calcitriol with Potent Antiproliferative Effects in Cancer Cells and Lack of Calcemic Activity”.**

**Autores:** Salomón, D. G.; Grioli, Silvina, M.; Buschiazzo, M.; Mascaró, E.; Vitale, C.; Radivoy, G.; Perez, M.; Fall, Y.; Mesri, E. A.; Curino, A. C.; Facchinetti, M. M.

**Revista:** ACS Medicinal Chemical Letters – ISSN 1948-5875.

**Volúmen:** 2      **Páginas:** 503-508      **Año:** 2011

**País:** Estados Unidos.

**Título: “Reductive Coupling of carbonyl compounds promoted by cobalt or titanium nanoparticles”**

**Autores:** Nador, F.; Mascaró, E.; Castro, M.; Vitale, C.; Radivoy, G.

**Revista:** ARKIVOC (Archive for Organic Chemistry) – ISSN 1424-6376.

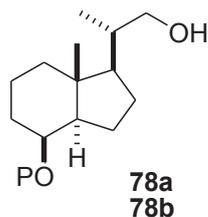
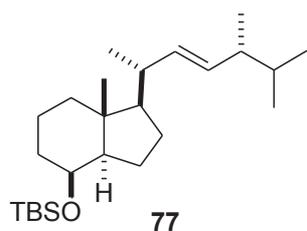
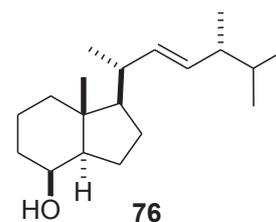
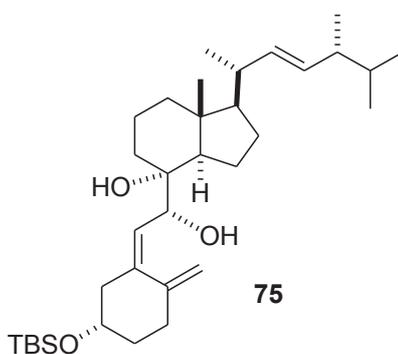
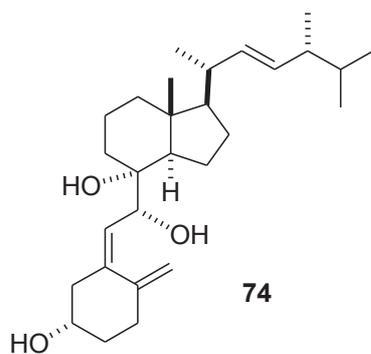
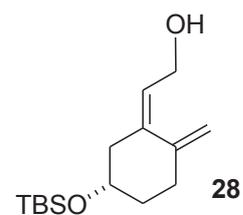
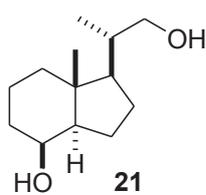
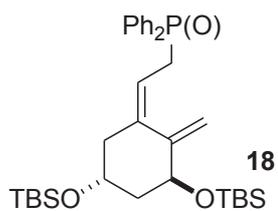
**Volúmen:** 7      **Páginas:** 312-326      **Año:** 2011

**País:** Estados Unidos.

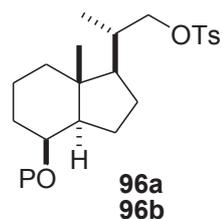
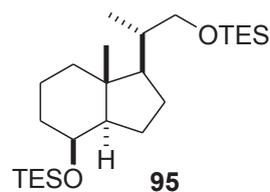


# Índice de compuestos

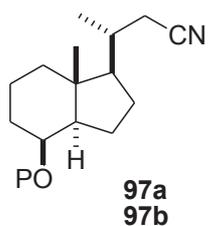




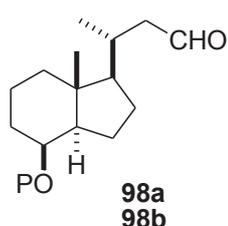
78b



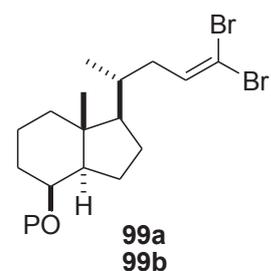
96b



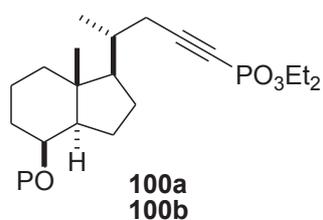
97b



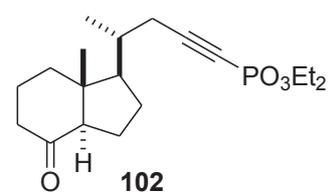
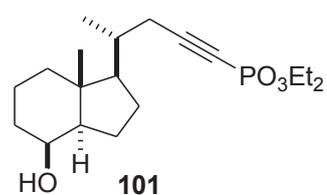
98b



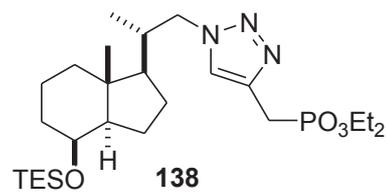
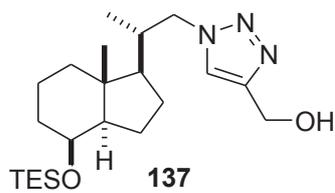
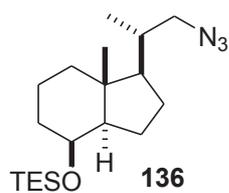
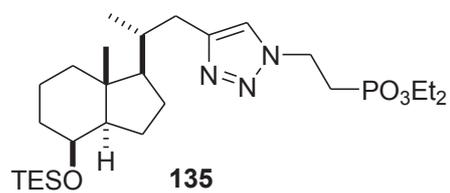
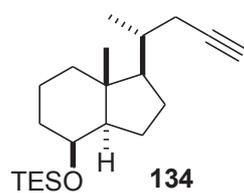
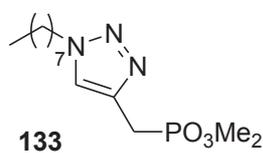
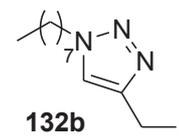
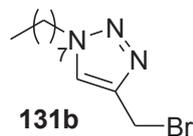
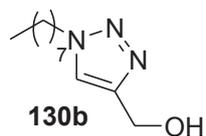
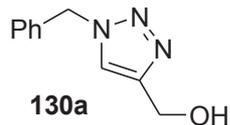
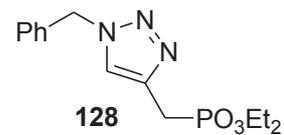
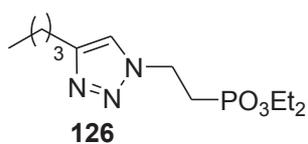
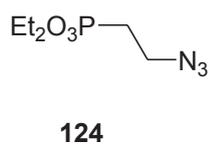
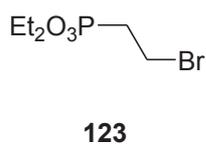
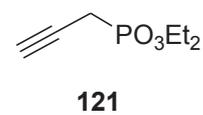
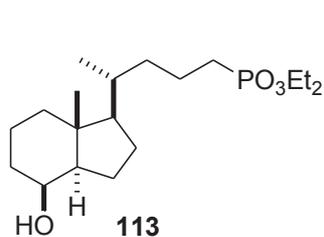
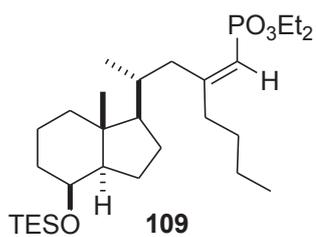
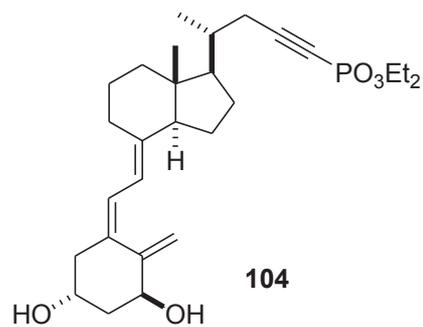
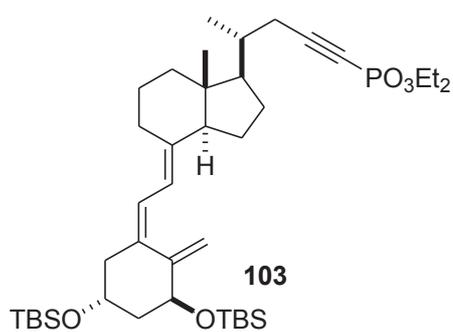
99b



100b

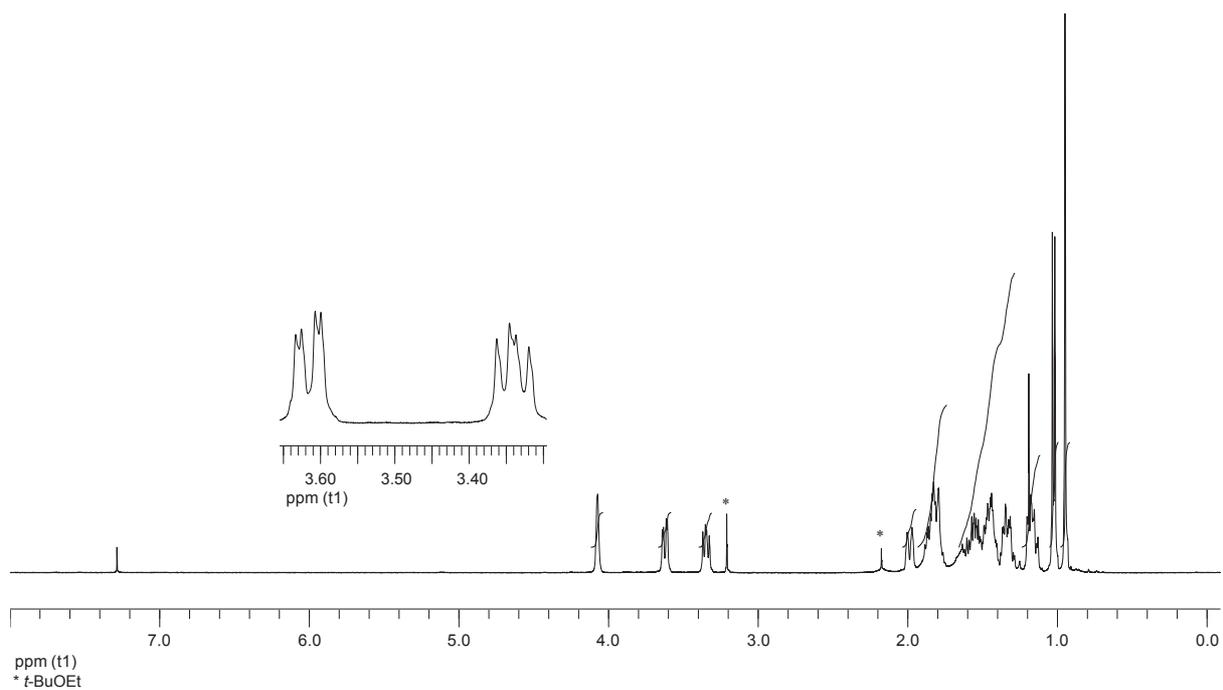
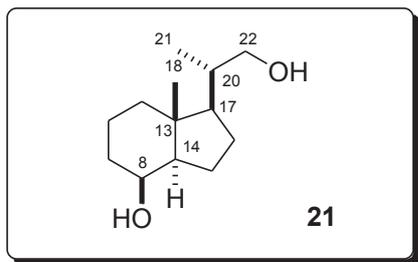


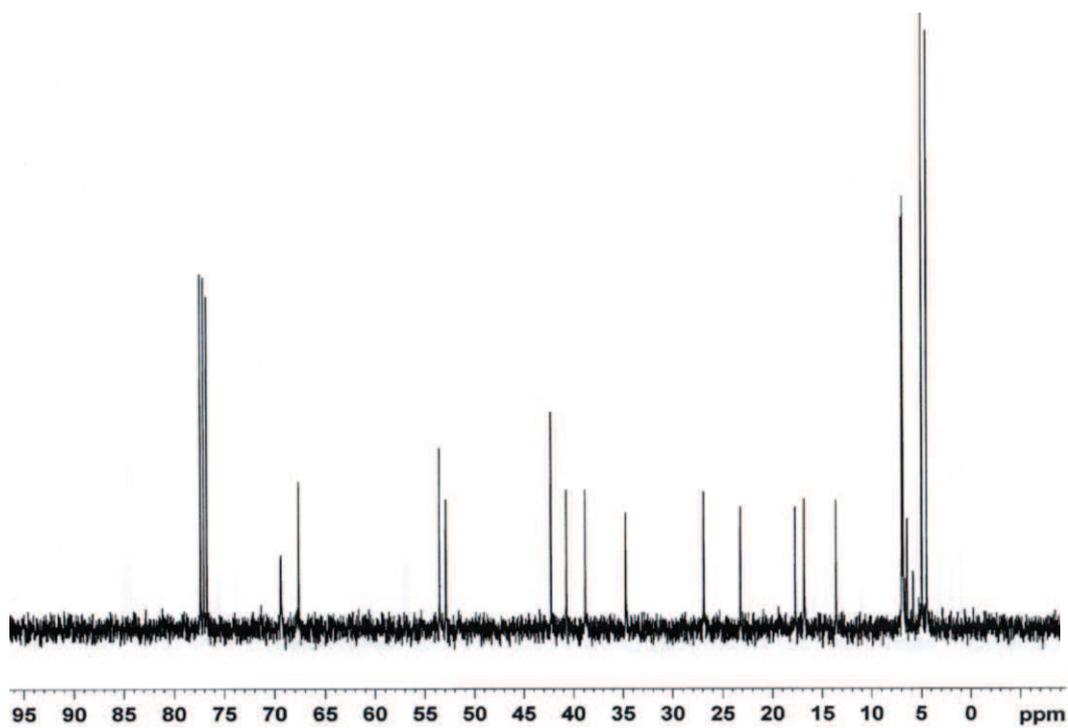
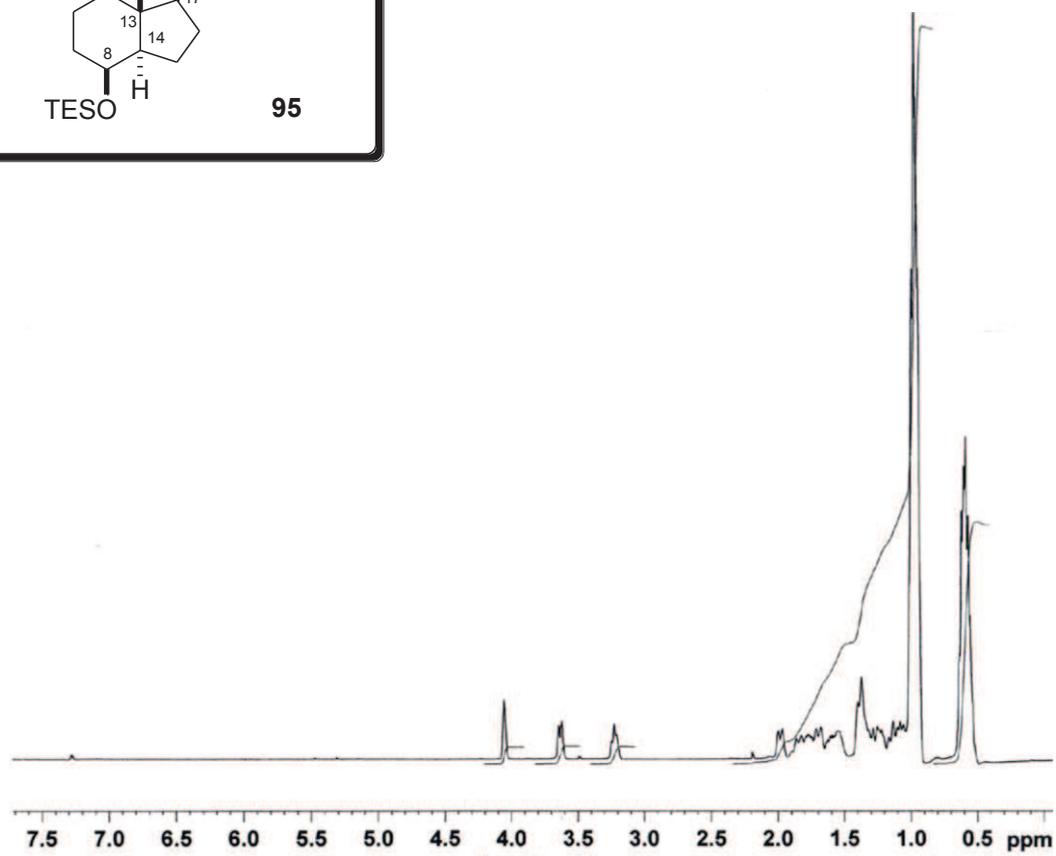
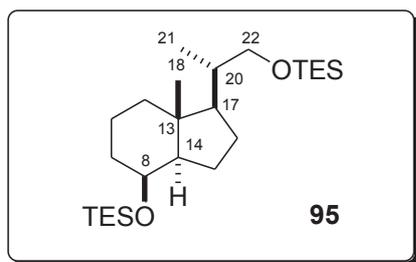
P= a: *t*-butildimetilsililo; b: trietilsililo

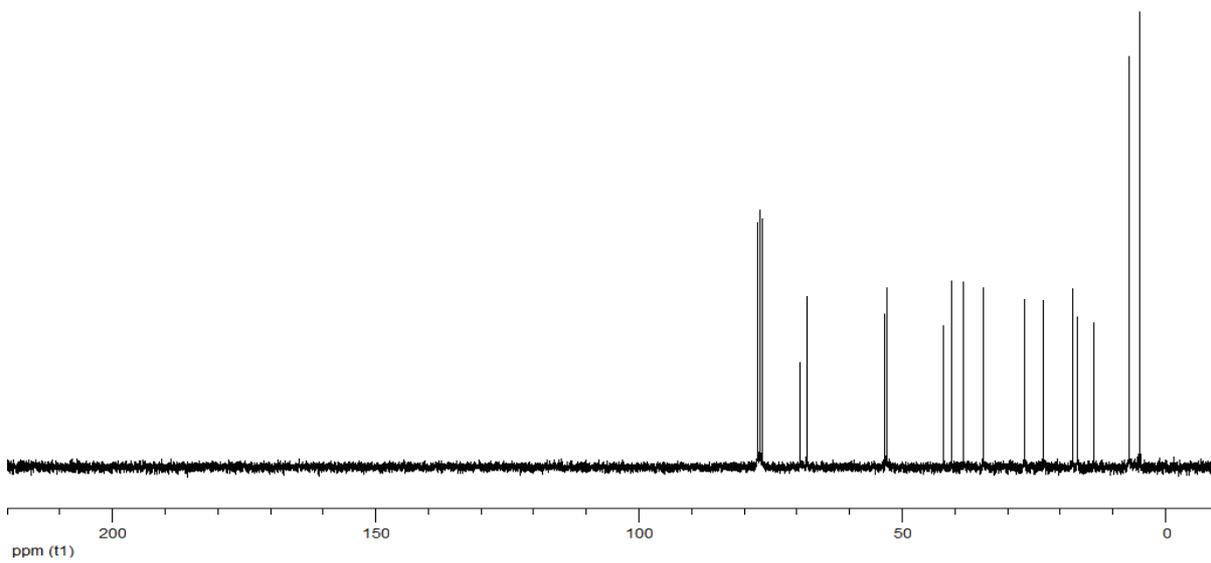
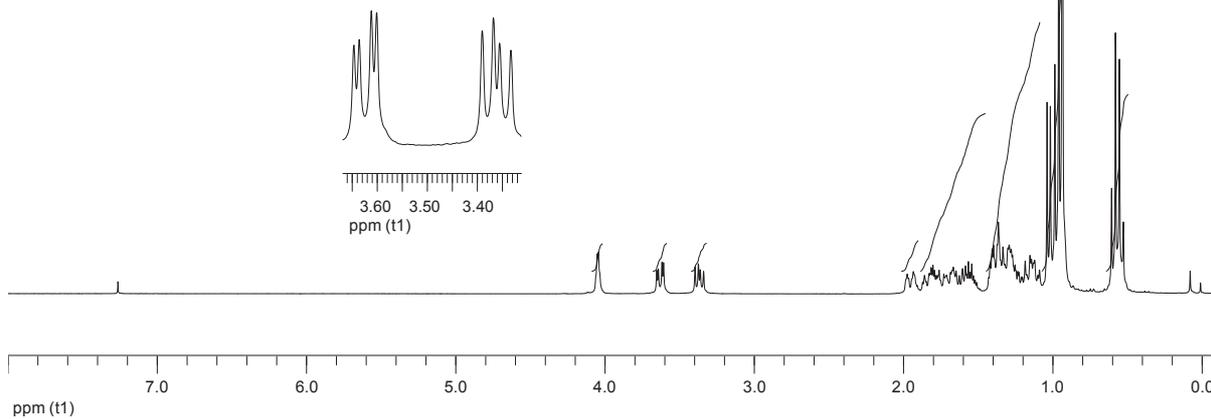
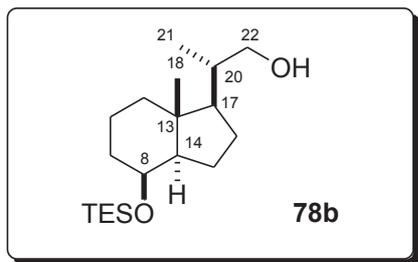


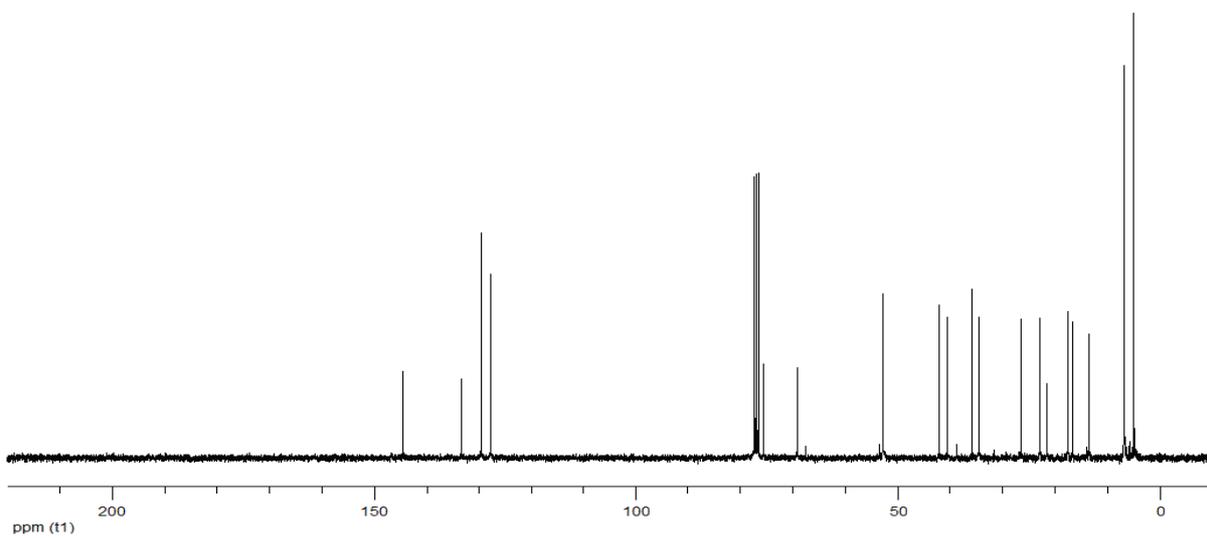
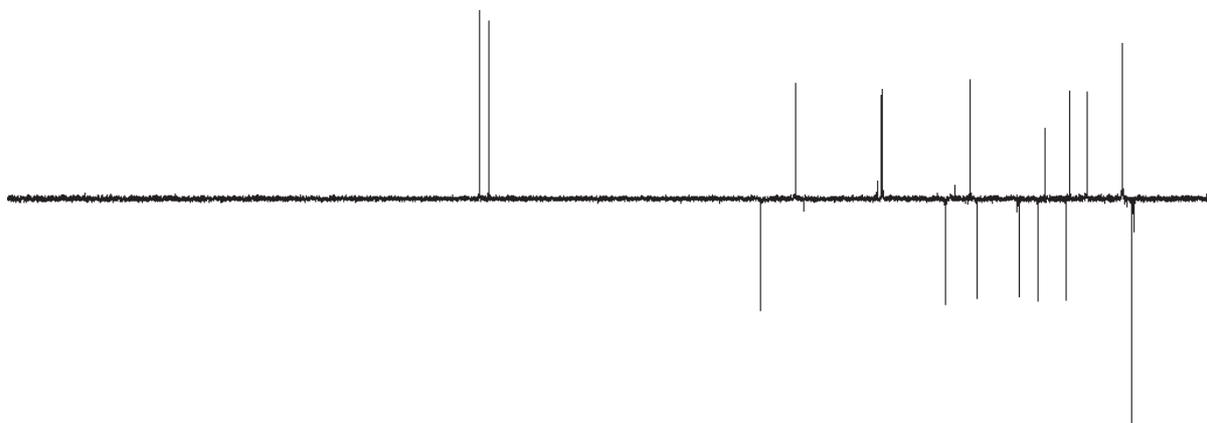
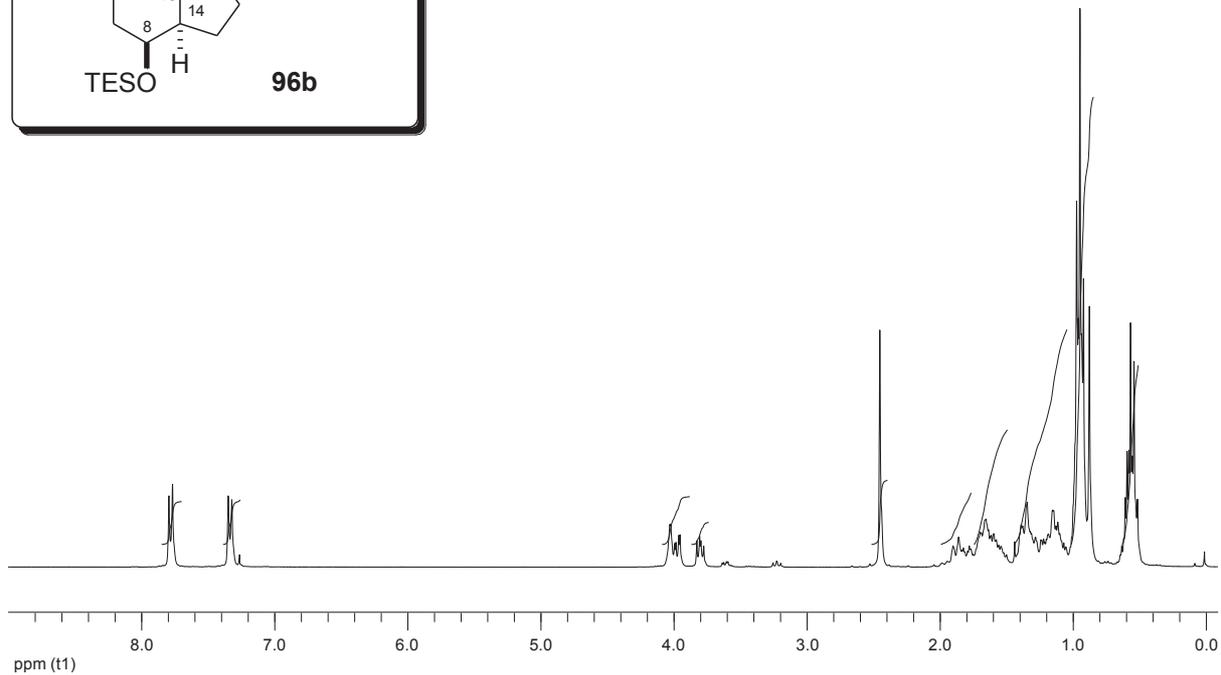
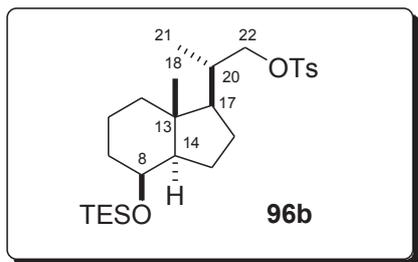
# **Selección de Espectros**

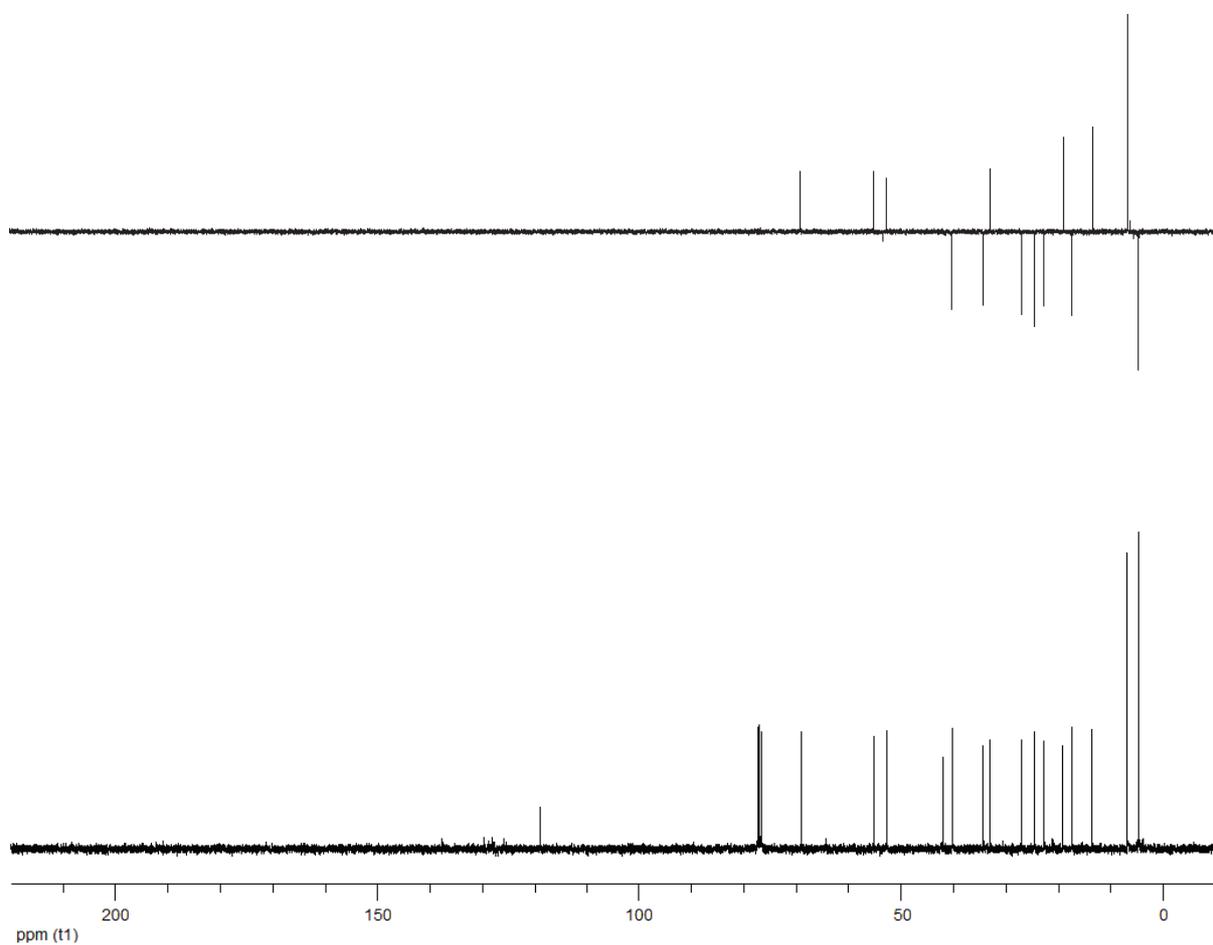
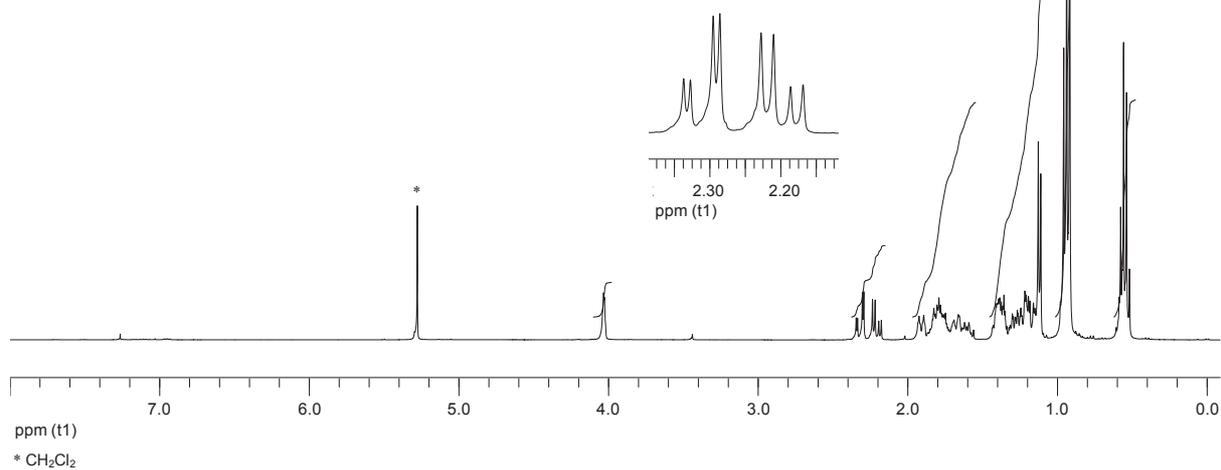
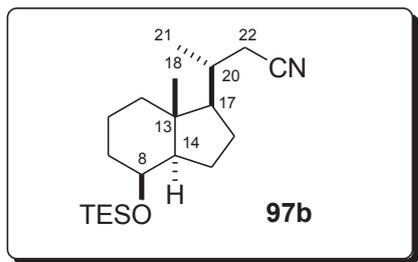


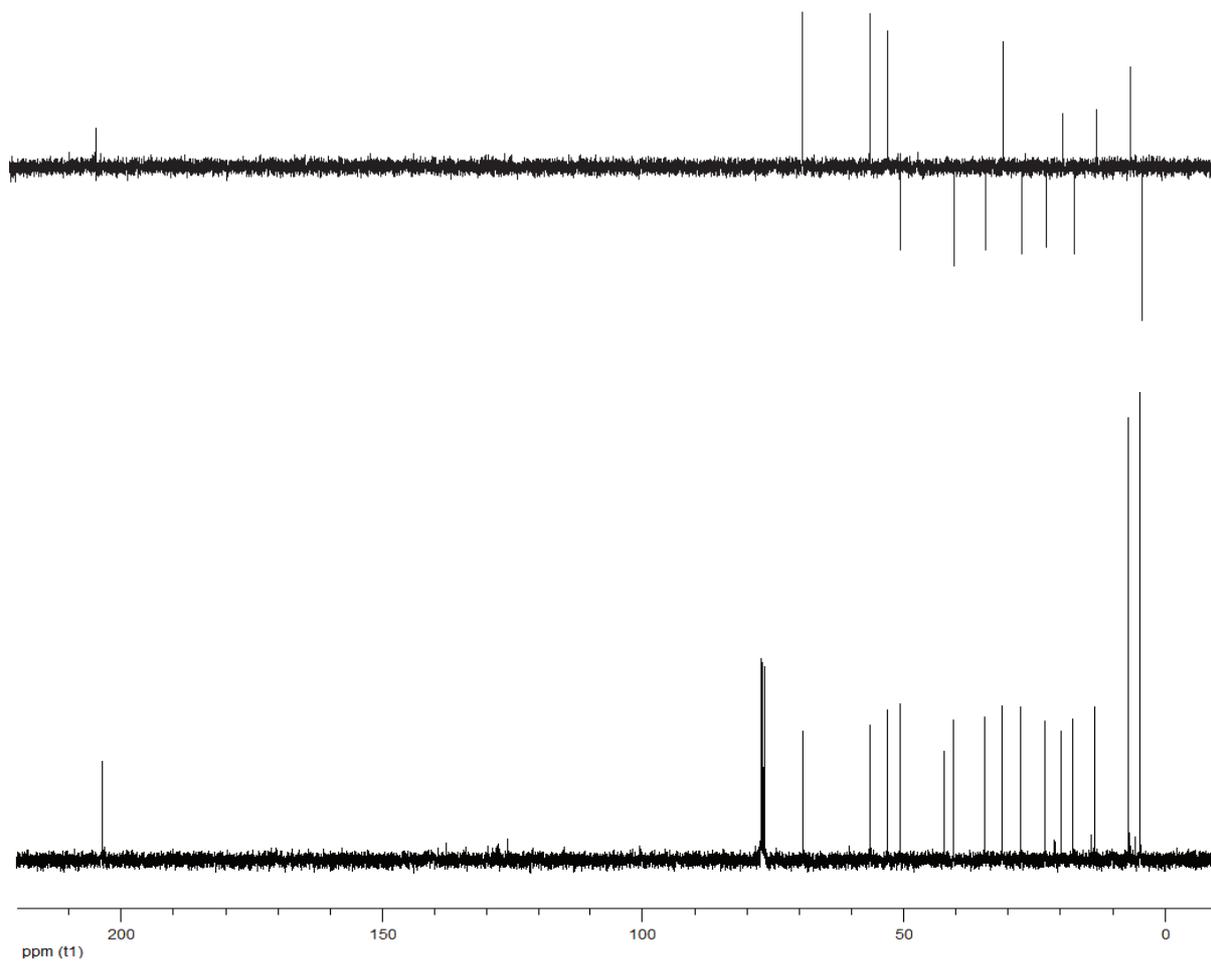
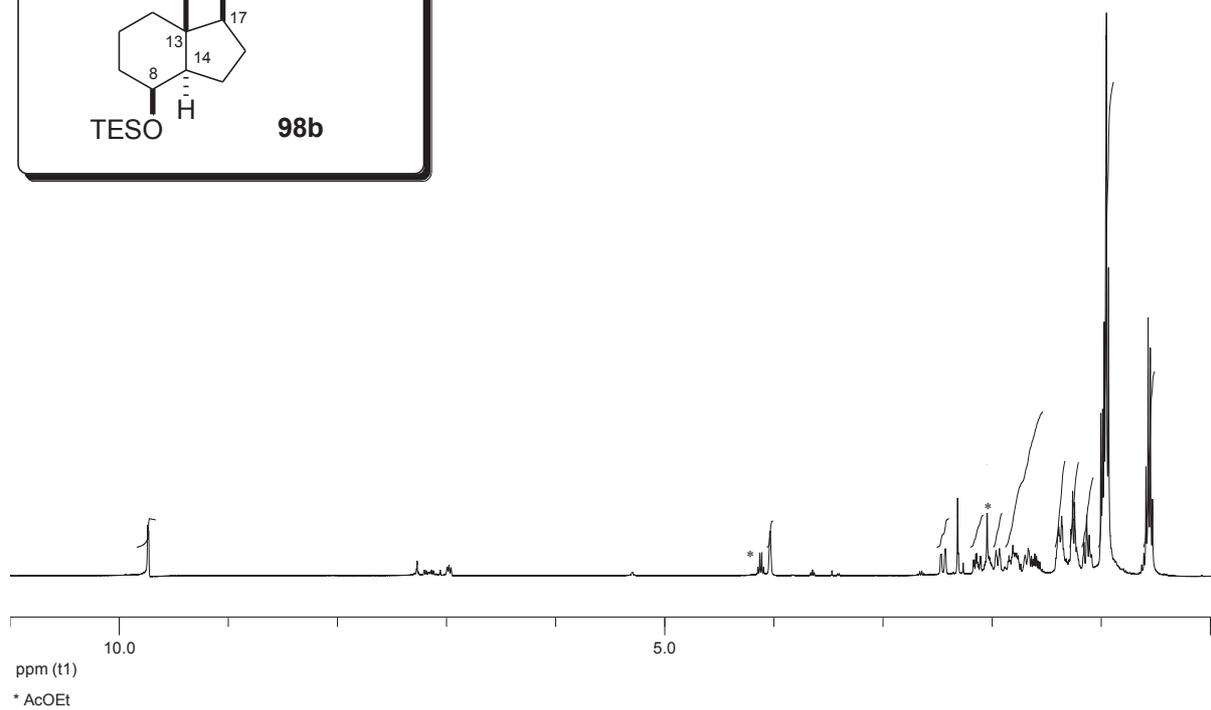
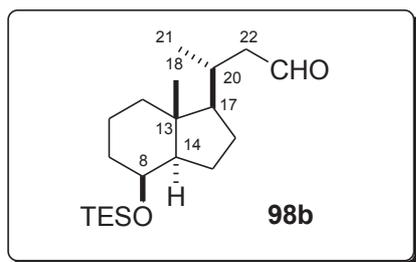


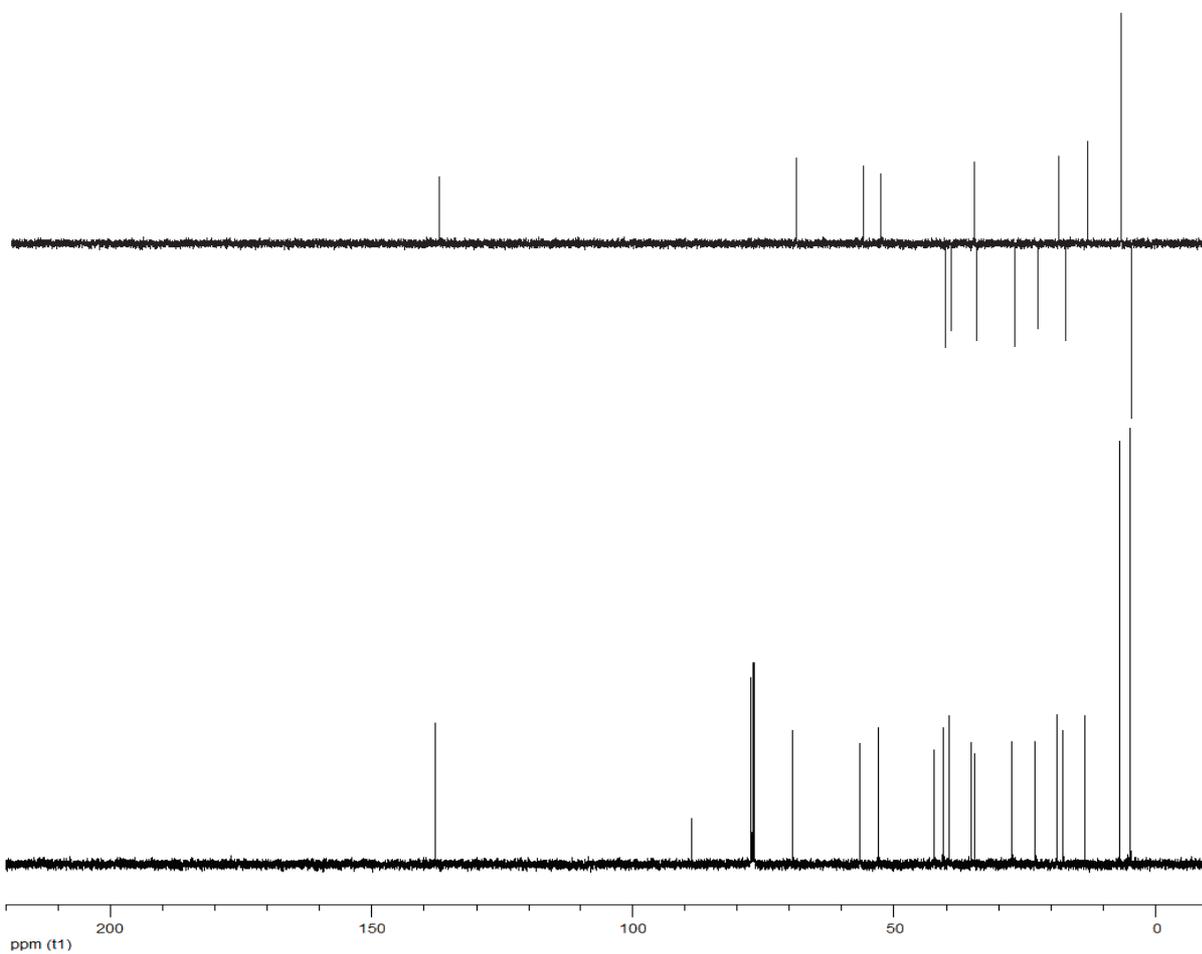
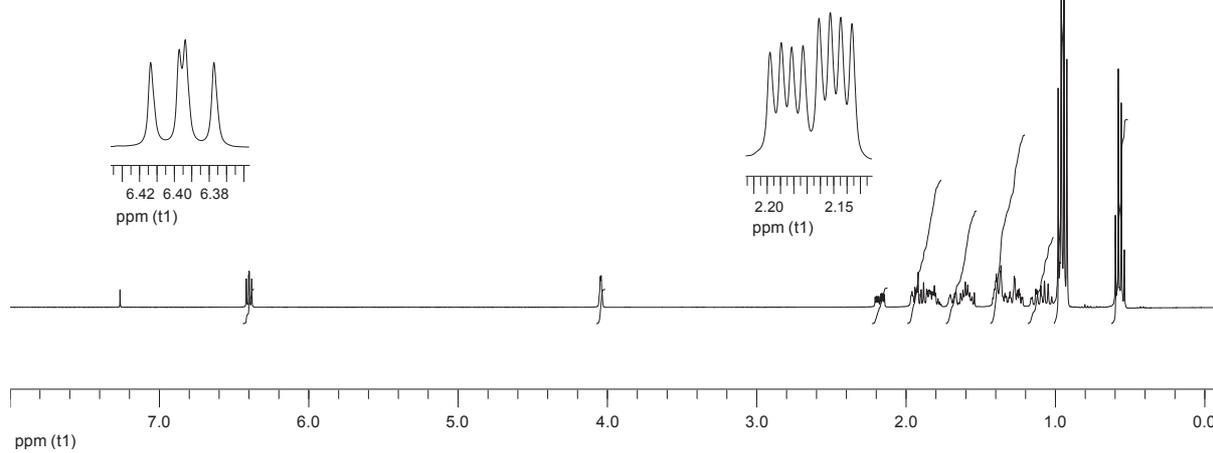
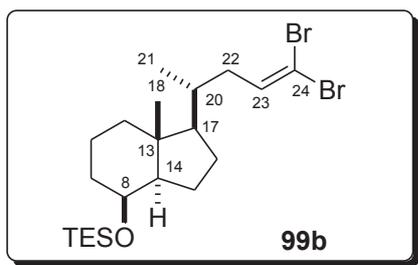


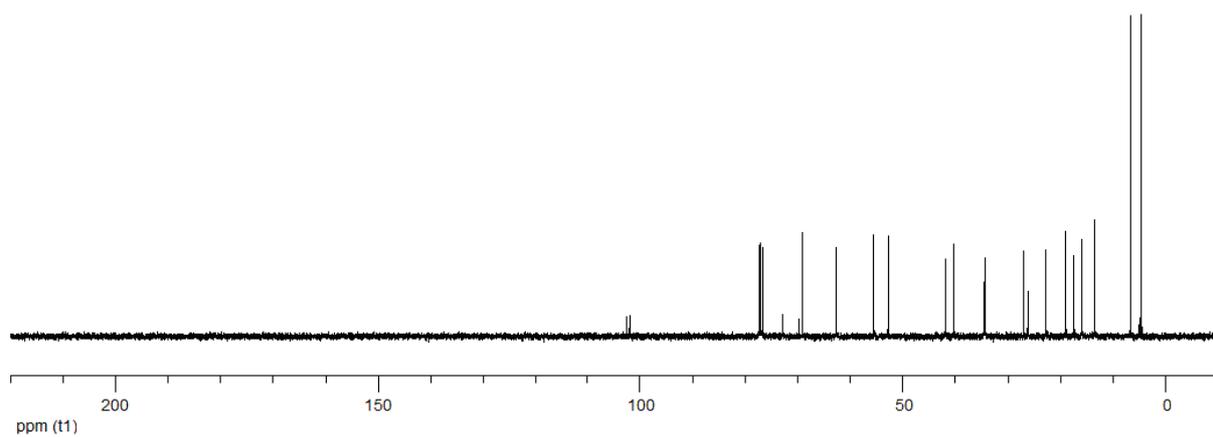
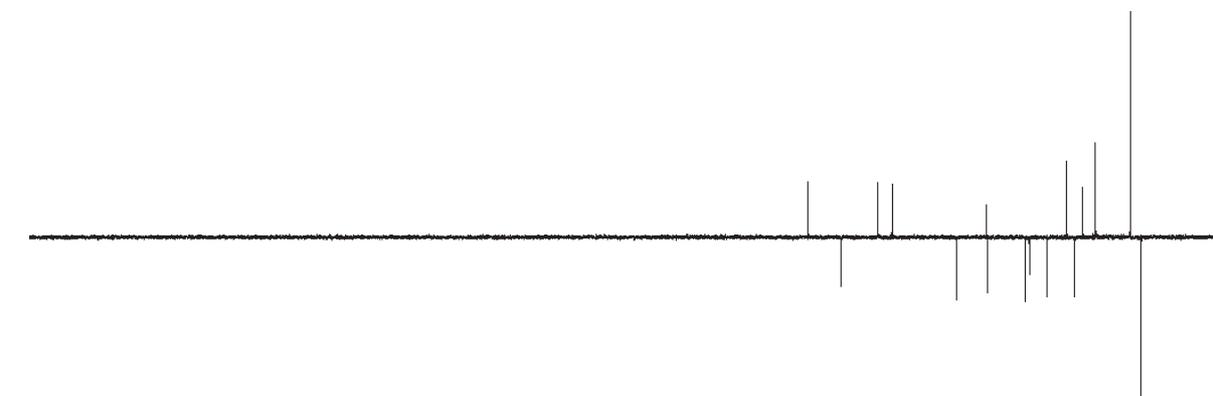
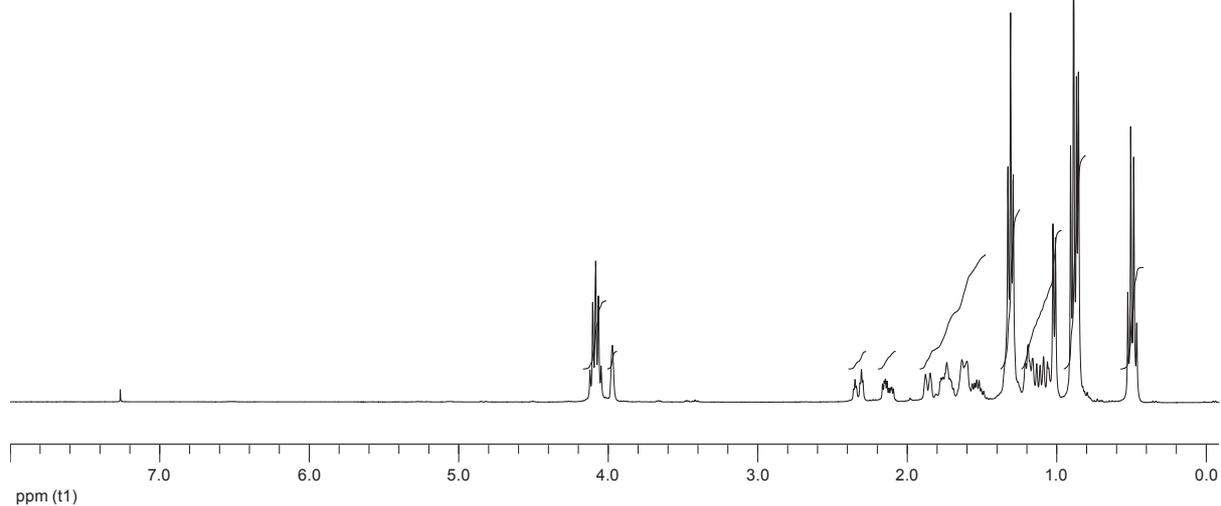
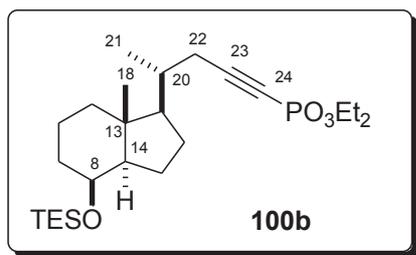


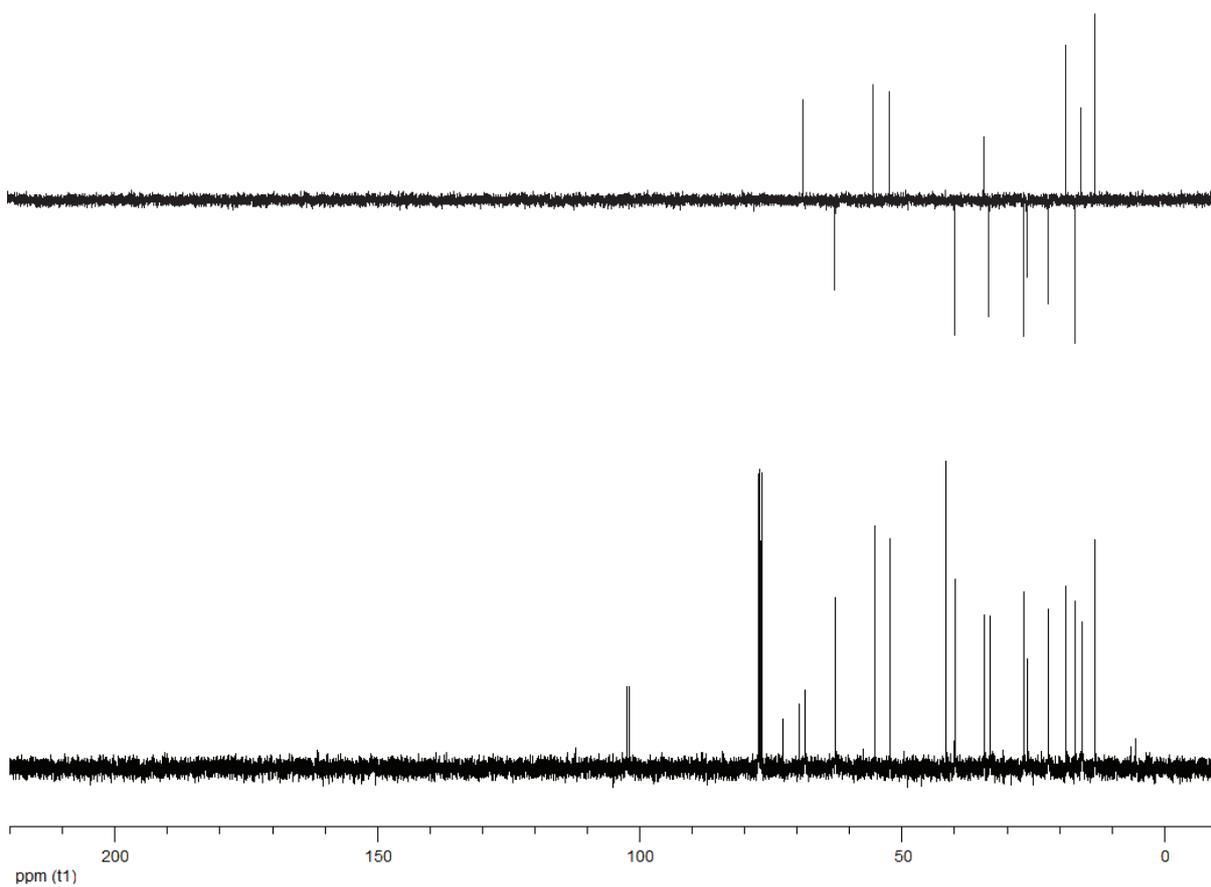
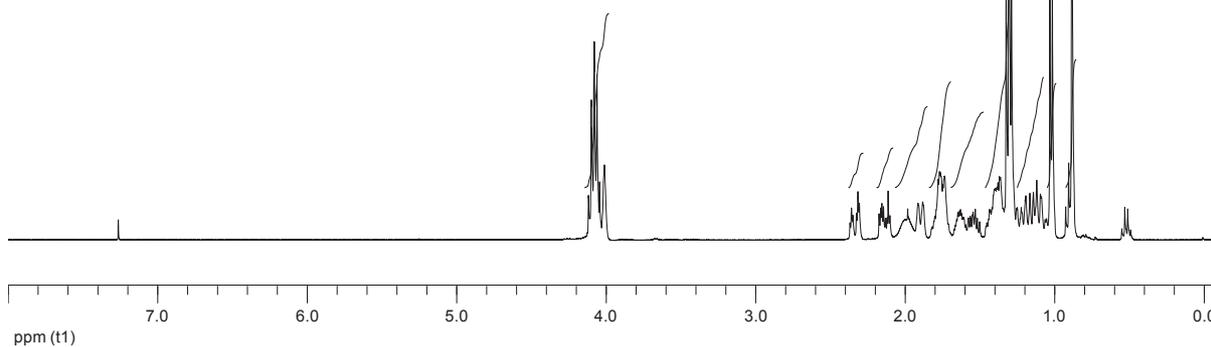
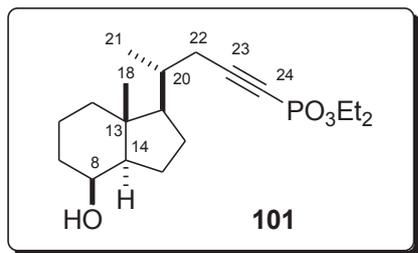


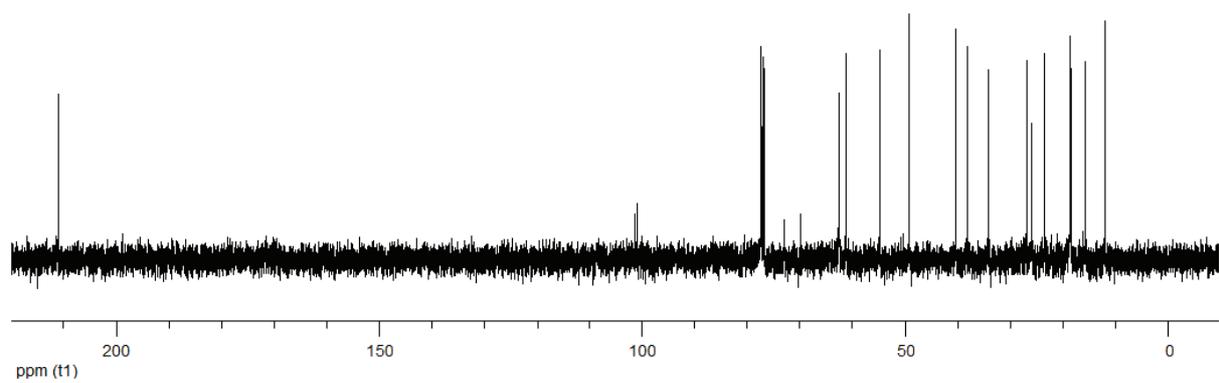
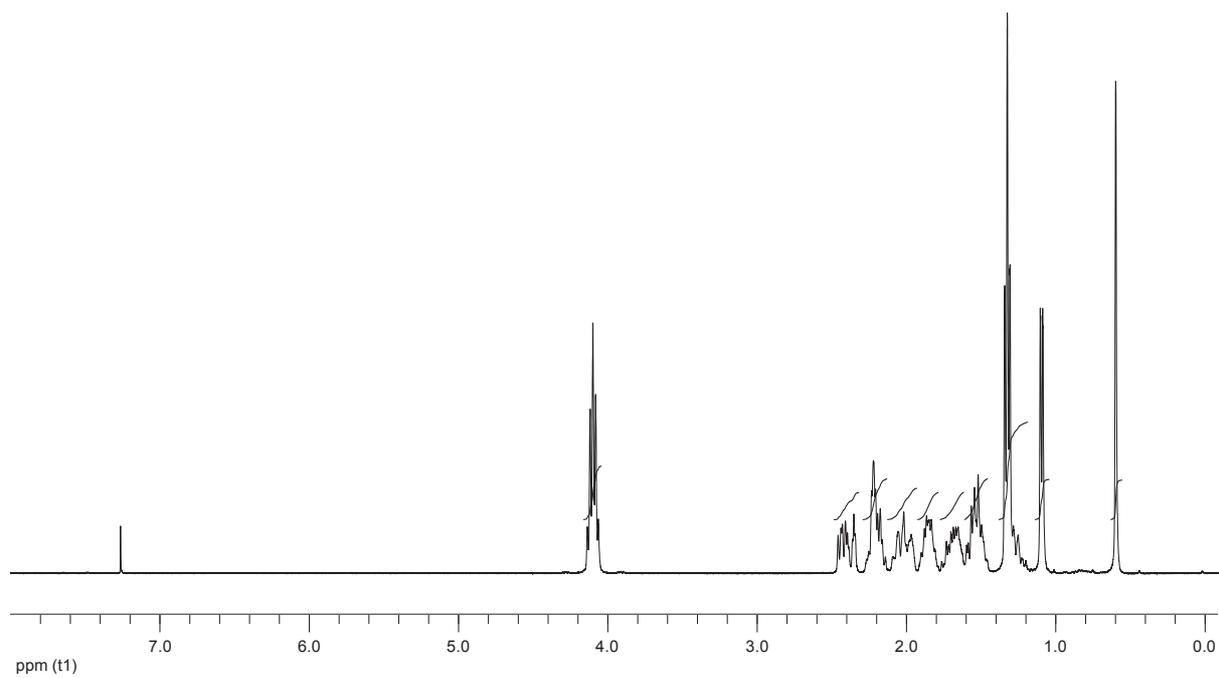
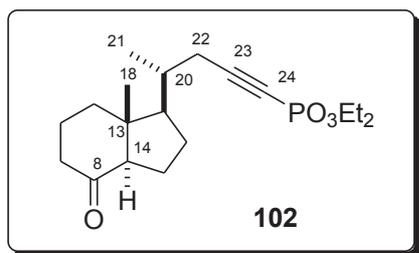


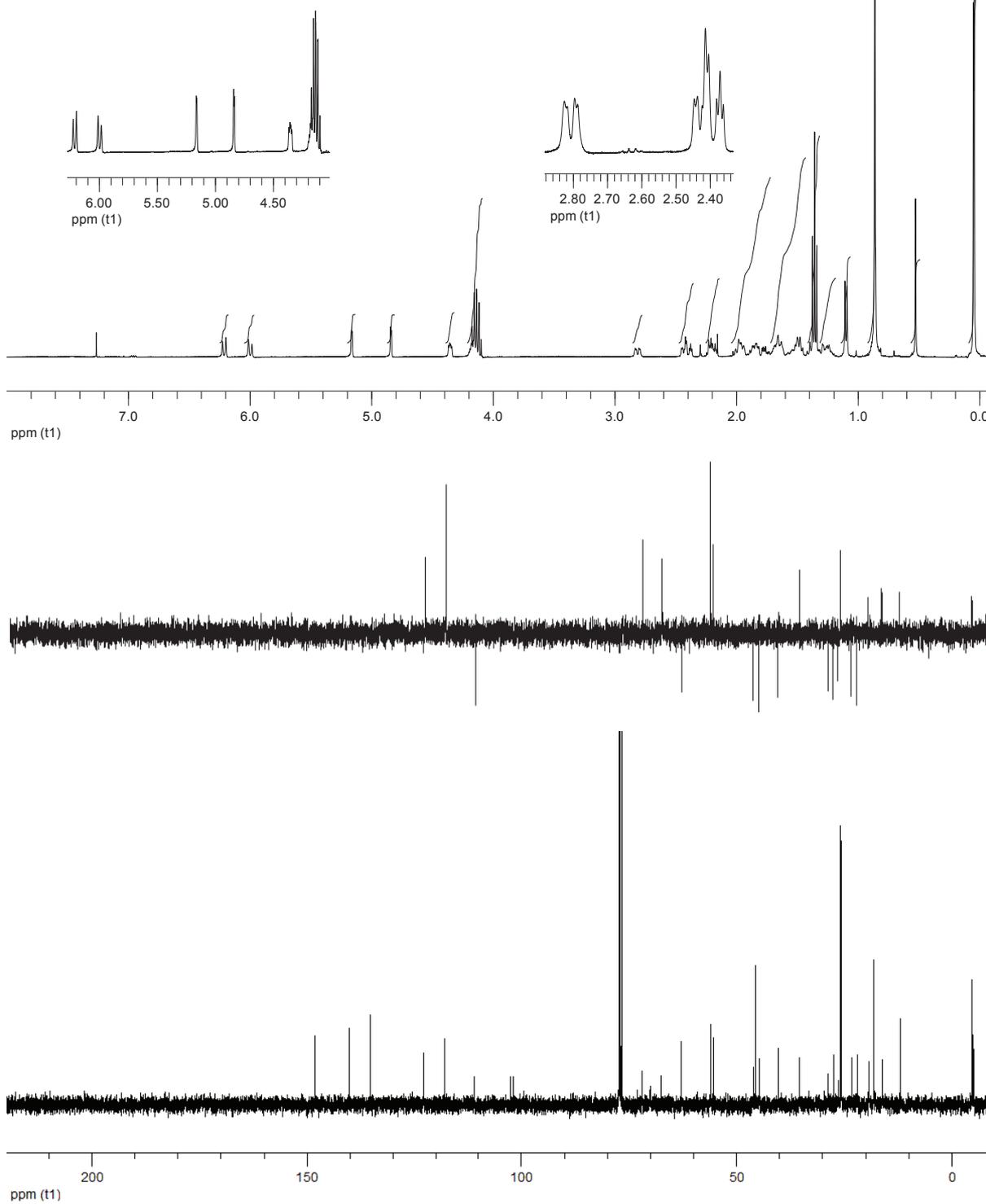
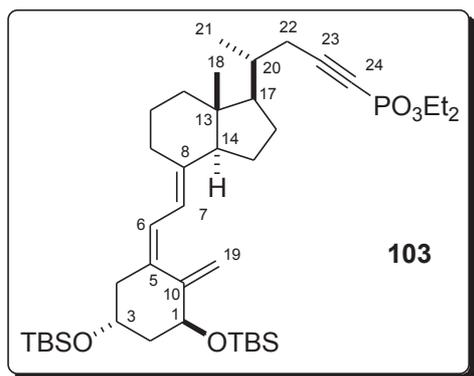


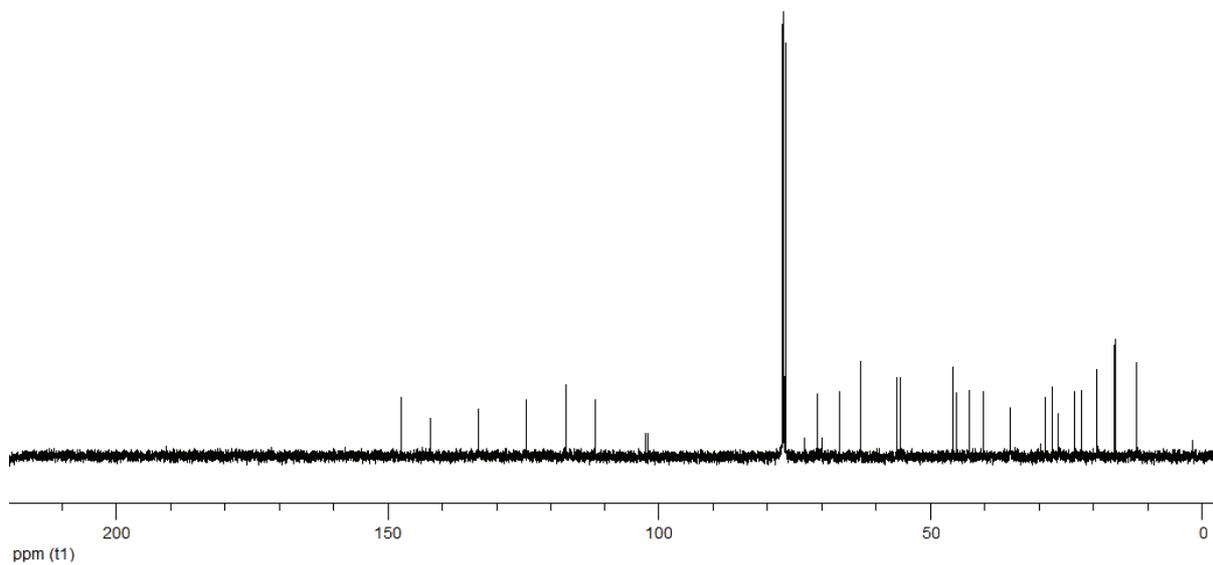
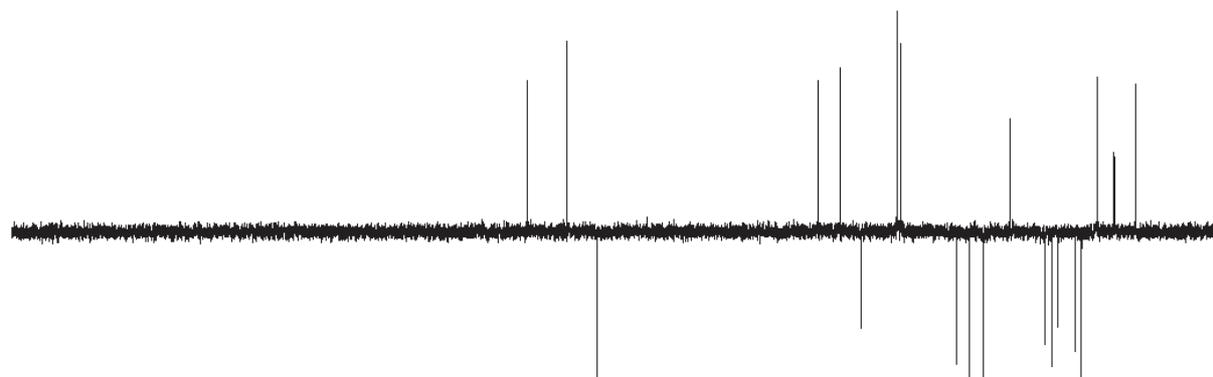
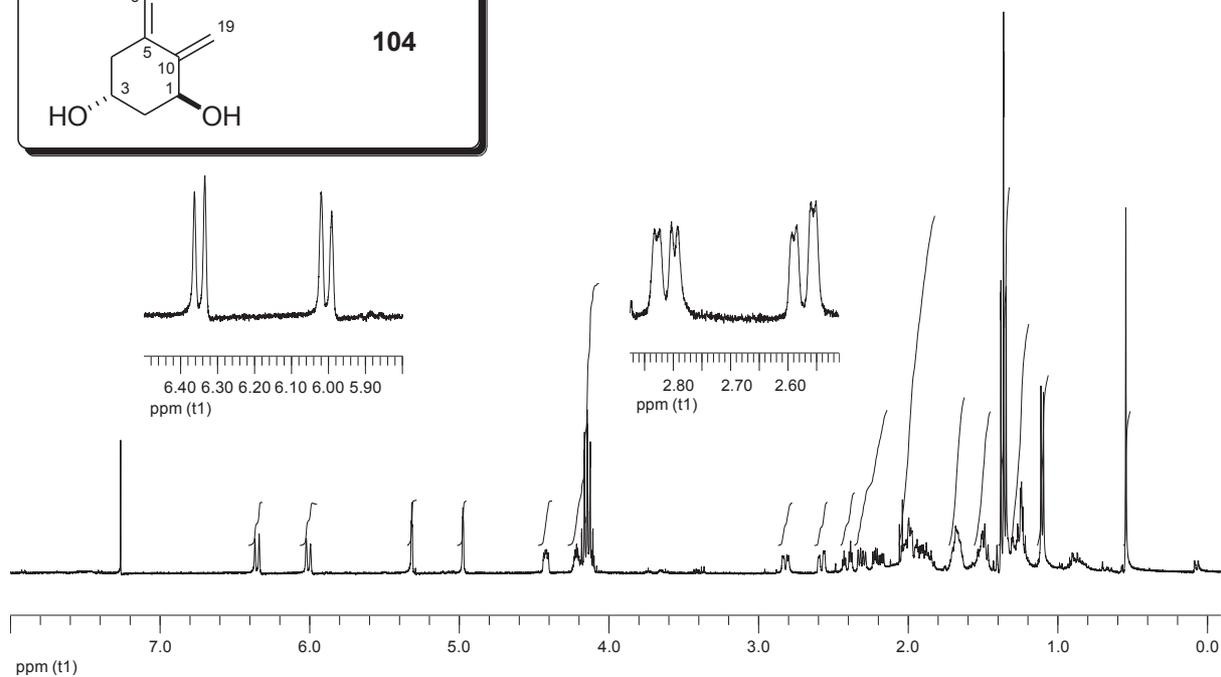
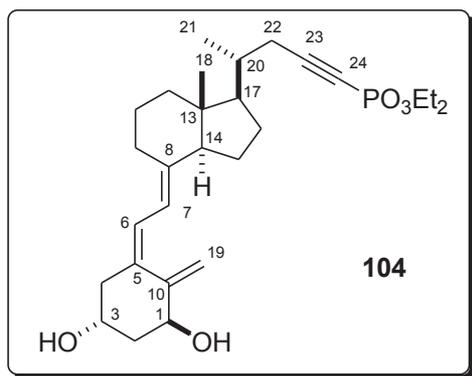


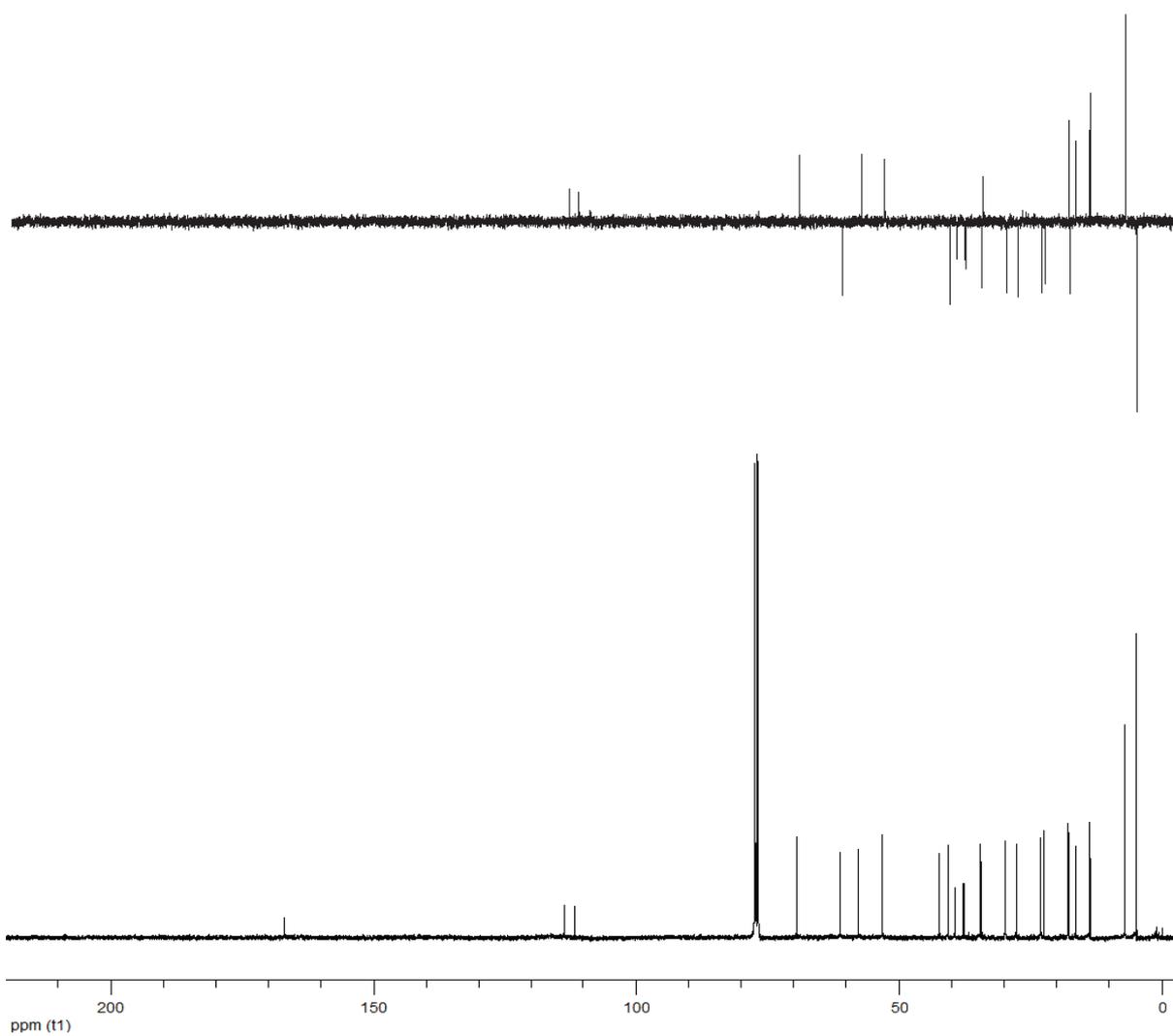
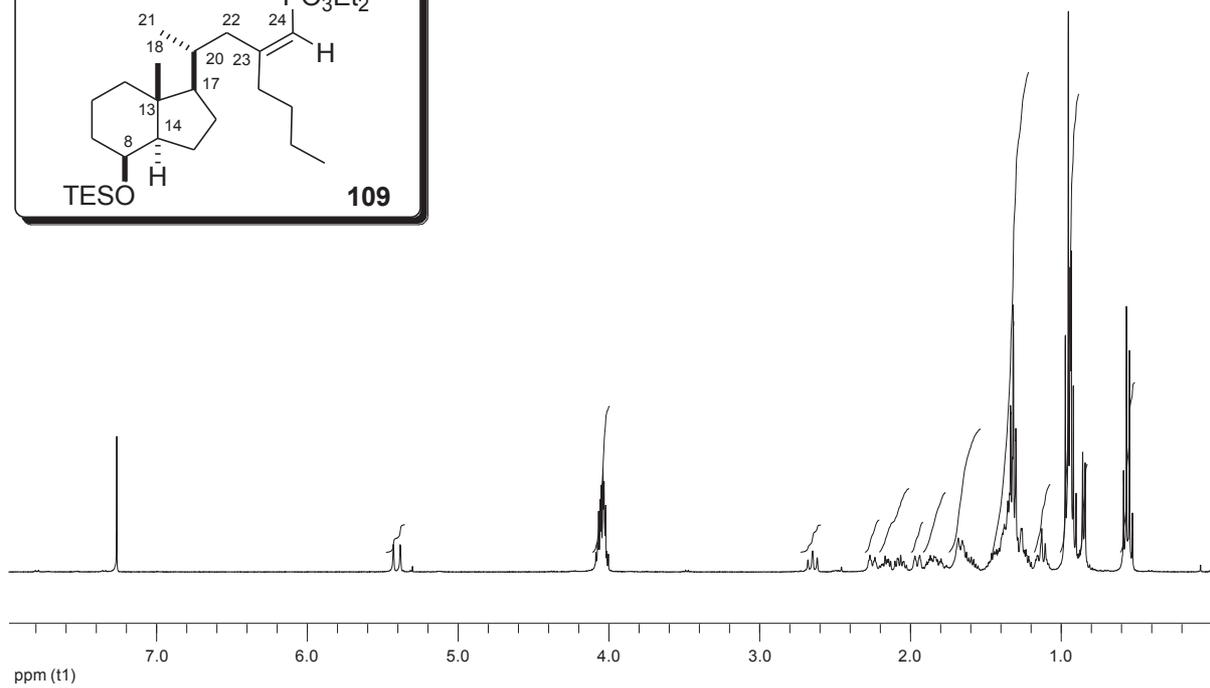
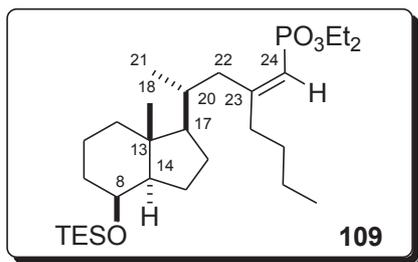




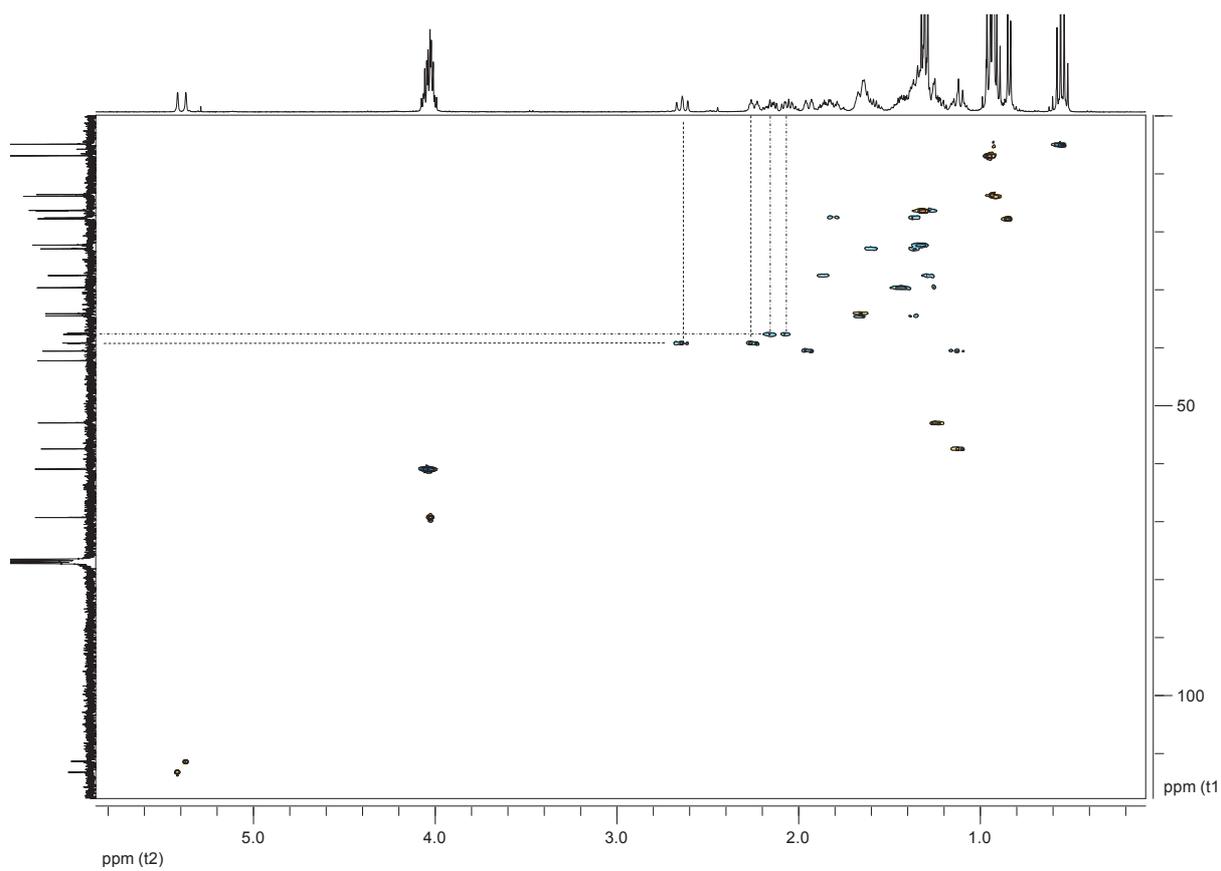




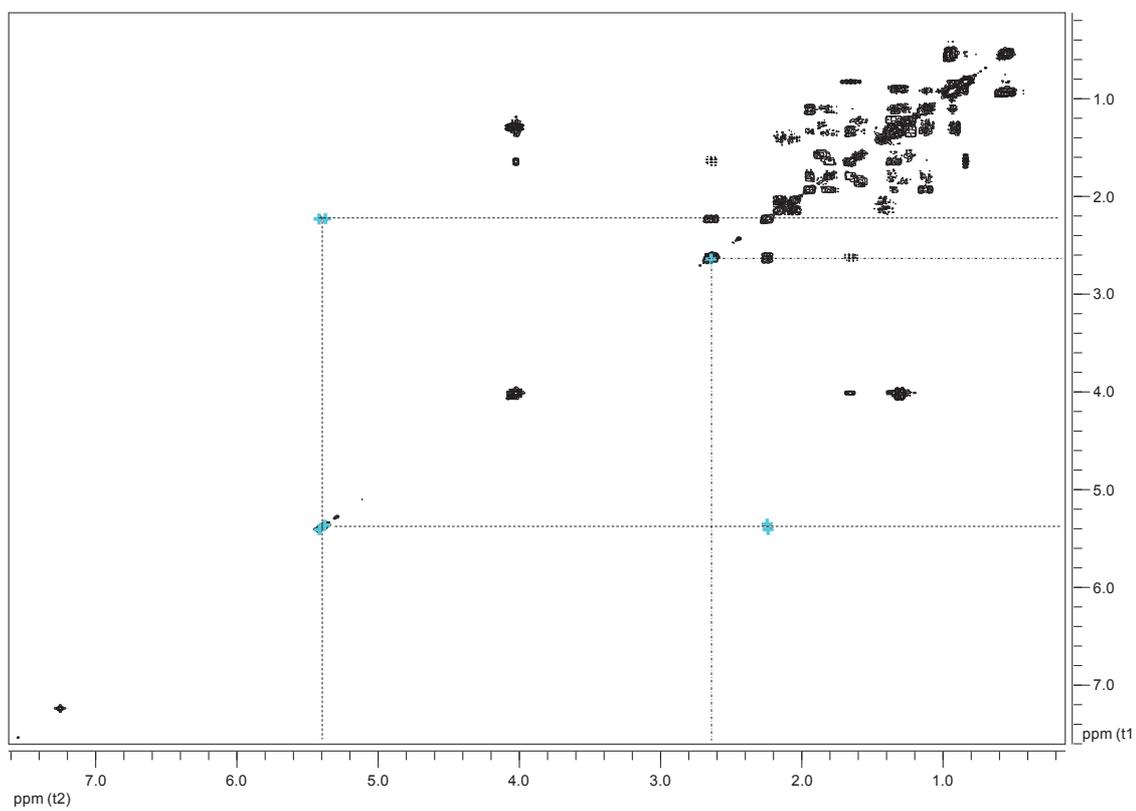




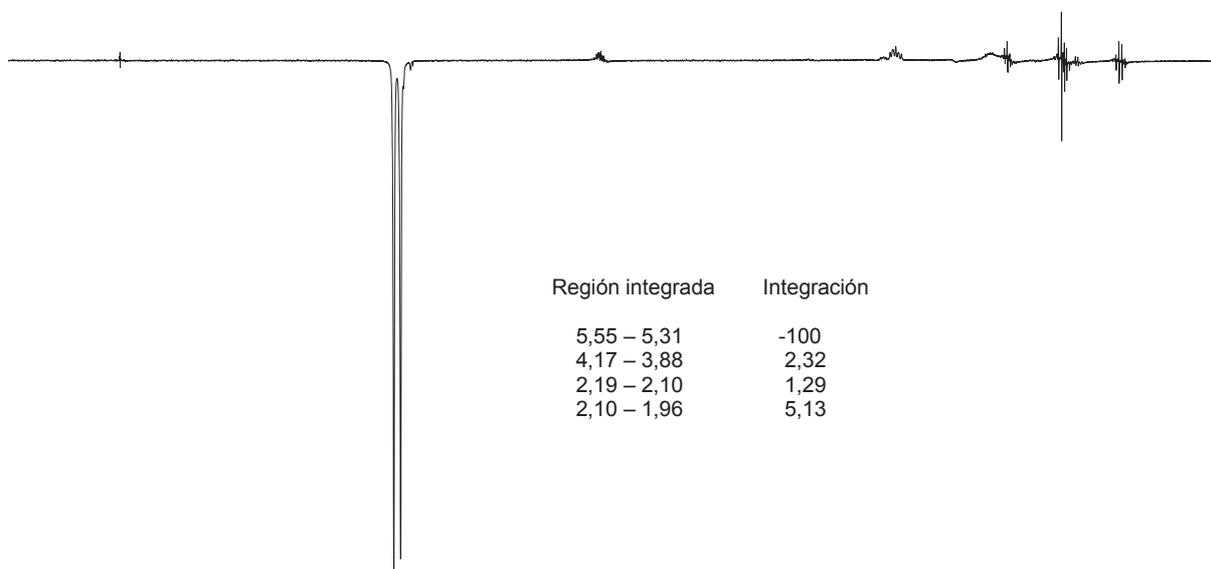
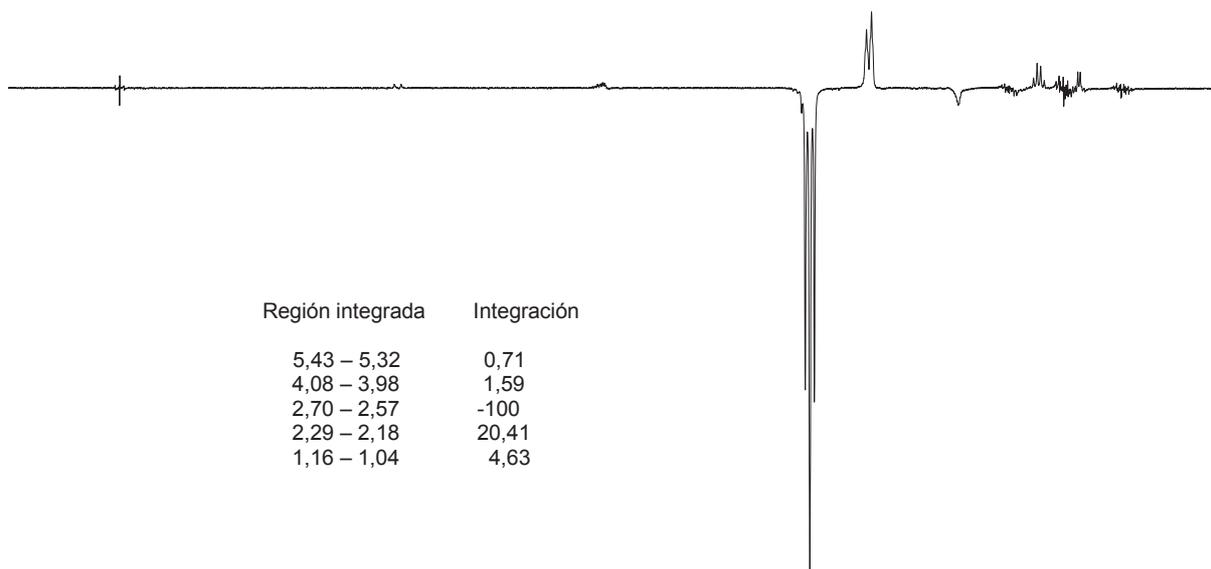
## HSQC-DEPT



## COSY



NOE



ppm (t1)

7.0

6.0

5.0

4.0

3.0

2.0

1.0

0.0

