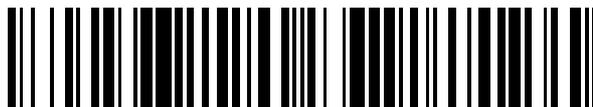


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 698**

21 Número de solicitud: 201831084

51 Int. Cl.:

C07C 401/00 (2006.01)

A61K 31/592 (2006.01)

A61K 31/593 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

09.11.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.05.2020

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (50.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
UNIVERSITÉ DE STRASBOURG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ROCHEL-GUIBERTEAU, Natasha;
LAVERNY, Gilles;
METZGER, Daniel;
MOURIÑO MOSQUERA, Antonio y
SIGÜEIRO PONTE, Rita**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASANCHEZ, Susana

54 Título: **COMPUESTOS DERIVADOS DE LA VITAMINA D**

57 Resumen:

Compuestos derivados de la vitamina D. La presente invención se refiere a compuestos derivados de vitamina D. Más en concreto, se refiere a derivados complejos de la vitamina D con sustituciones múltiples, procedimientos de obtención y usos de los mismos. Estos derivados presentan mayor rigidez en ciertas posiciones.

ES 2 759 698 A1

DESCRIPCIÓN

Compuestos derivados de la Vitamina D

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a compuestos derivados de vitamina D. Más en concreto, se refiere a derivados complejos de la vitamina D con sustituciones múltiples, procedimientos
5 de obtención y usos de los mismos.

Antecedentes de la invención

La 1,25 α -dihidroxitamina D₃ (1,25D) es el metabolito más activo de la vitamina D. Ejerce sus acciones biológicas uniéndose de forma específica a su receptor nuclear, el receptor de la vitamina D (VDR). El sistema endocrino de la vitamina D juega un papel fundamental en
10 una amplia gama de acciones biológicas. Por ejemplo, en la regulación del metabolismo fosfo-cálcico, estimulando la absorción intestinal de estos minerales esenciales y su movilización en el tejido óseo, promueve la diferenciación celular e inhibe la proliferación celular de varias células tumorales, lo que sugiere su posible uso en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, como agente antitumoral encuentra graves limitaciones debido a su actividad
15 calcémica.

Por otro lado, se han sintetizado algunos derivados de la vitamina D con elevadas restricciones de rotación en la cadena lateral mediante la introducción de un grupo alquino en dicha cadena lateral (Org.Lett., 2003, vol.5, 22, 4033-4036). Sin embargo, este tipo de estructuras aunque son capaces de estabilizar el complejo formado con el receptor VDR, no
20 activan la transcripción génica tanto como la 1,25D.

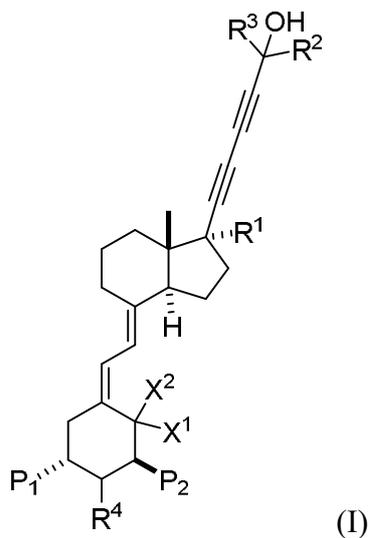
Así, todavía persiste la necesidad de disponer de derivados no hipercalcémicos de la vitamina D que se enlacen al receptor VDR con el fin de conseguir una mayor eficacia en la hora de obtener análogos selectivos.

Descripción breve de la invención

25 Los autores de la presente invención han diseñado nuevos compuestos derivados de la vitamina D. En concreto, han diseñado compuestos derivados de la vitamina D que poseen mayor sustitución en la posición C-17. Además uno de los sustituyentes de la posición C-17 es una cadena con mayor rigidez que la de la vitamina. Una de las ventajas de estos compuestos al presentar mayor rigidez e impedimento estérico en la cadena lateral, bien

porque uno de los sustituyentes aporta mayor rigidez dada su conformación, bien porque en la posición C-17 hay dos sustituyentes es que permite una mayor estabilidad en la complejación con el receptor VDR.

Así, un aspecto de la invención se dirige a un compuesto de fórmula (I) o uno de sus estereoisómeros, o sus sales farmacéuticamente aceptables,



donde R¹ es (C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)alquenilo, (C₁-C₁₂)alquinilo, (C₁-C₁₂)heteroalquilo, (C₂-C₁₂)heteroalquenilo o (C₁-C₁₂)heteroalquinilo,

10 cada uno de R² y R³ se selecciona independientemente de entre (C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)alquenilo, (C₁-C₁₂)alquinilo,

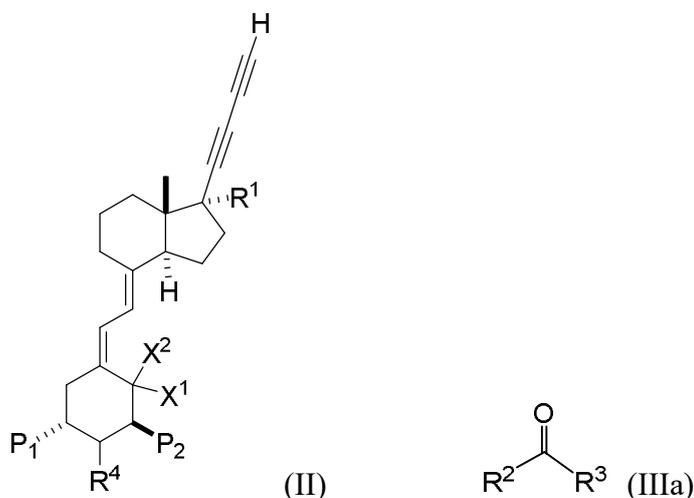
R⁴ se selecciona de entre hidrógeno, (C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)hidroxialquilo, (C₂-C₁₂)alquenilo, (C₂-C₁₂)hidroxialquenilo, (C₂-C₁₂)alquinilo, (C₂-C₁₂)hidroxialquinilo, (C₁-C₁₂)heteroalquilo, (C₂-C₁₂)heteroalquenilo, (C₁-C₁₂)heteroalquinilo, (C₆-C₁₀)arilo, (C₃-C₁₅)heteroarilo, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)alquilacilo, (C₆-C₁₀)arilacilo, (C₁-C₁₂)alcoxilo, (C₆-C₁₀)ariloxilo, (C₁-C₁₂)alquilcarboxi, (C₆-C₁₀)arilcarboxi, (C₁-C₁₂)carbociclo, (C₃-C₁₅)heterociclo, -O-(C₁-C₁₂)alquilo y -O-(C₁-C₁₂)heteroalquilo,

15 cada uno de P¹ y P² se selecciona independientemente de entre hidrógeno, -OH, (C₁-C₁₂)alcoxilo, (C₆-C₁₀)ariloxilo, (C₁-C₁₂)alquilcarboxi, (C₆-C₁₀)arilcarboxi y -OSiR^aR^bR^c, donde cada uno de R^a, R^b y R^c se seleccionan de entre (C₁-C₁₂)alquilo,

(C₆-C₁₀)arilo, (C₆-C₁₀)aril, (C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)alcoxilo, (C₆-C₁₀)ariloxilo y (C₃-C₁₅)heterociclo, y

X¹ y X² son hidrógeno o bien forman conjuntamente con el átomo de carbono al que están unidos un grupo metileno (=CH₂).

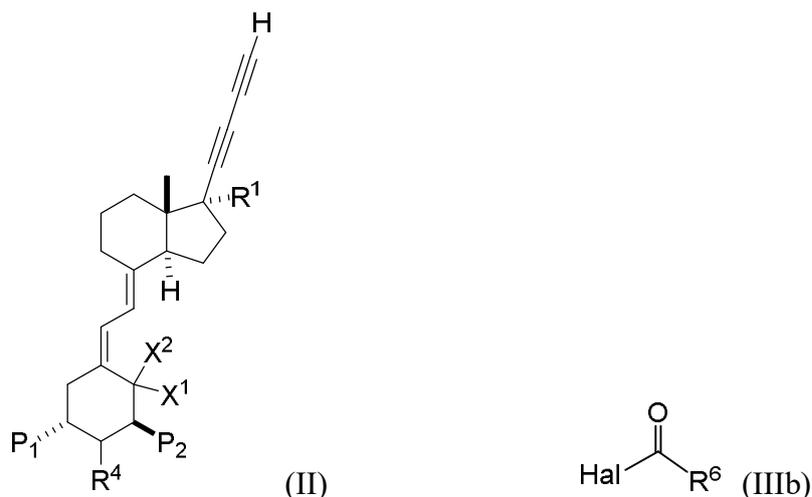
- 5 Otro aspecto de la invención se dirige a un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I), que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (IIIa) en presencia de una base,



- 10 donde R¹, R², R³, R⁴, P₁, P₂, X¹, X² son como se han descrito anteriormente.

Otro aspecto de la invención se dirige a un procedimiento alternativo para la preparación de un compuesto de fórmula (I) que comprende:

- (a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (IIIb) en presencia de una base, y
- 15 (b) reacción del intermedio obtenido en la etapa (a) con un compuesto de fórmula R²M y/o R³M,



donde R^6 se selecciona de (C_1-C_{12}) alquilo y (C_6-C_{10}) arilo,

Hal es un halógeno de entre cloro, bromo, yodo,

5 M es un metal o un haluro metálico, y

$R^1, R^2, R^3, R^4, P_1, P_2, X^1, X^2$ son como se han descrito anteriormente.

Otro aspecto de la invención se dirige a un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente, para uso como medicamento.

En otro aspecto la invención se dirige a un compuesto de fórmula (I), para su uso en el
 10 tratamiento de enfermedades o condiciones relacionadas con la deficiencia de vitamina D. En una realización particular, las enfermedades o condiciones relacionadas con la deficiencia de vitamina D se seleccionan del grupo que consiste en raquitismo, osteoporosis, osteodistrofia, osteomalacia y fracturas.

En otra realización particular, la invención se dirige a un compuesto de fórmula (I), como se
 15 ha descrito anteriormente, para su uso en el tratamiento de psoriasis, diabetes, enfermedades autoinmunes, degenerativas, endocrinológicas, cardiovasculares, metabólicas, infecciosas, o tumorales. En otra realización particular, la invención se dirige a un compuesto de fórmula (I), como se ha descrito anteriormente, para su uso en el tratamiento de enfermedades neoplásicas. En una realización más particular, las enfermedades neoplásicas se seleccionan
 20 del grupo que consiste en cáncer de mama, ovario, próstata, pulmón, leucemia, tumores sólidos y tumores hematológicos.

En otra realización particular, la invención se dirige a la combinación de al menos un compuesto de fórmula (I), como se ha descrito anteriormente, y al menos un compuesto antineoplásico.

En un aspecto adicional la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I), tal como se ha descrito anteriormente, junto con uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

Descripción de las figuras

Figura 1: (A) Actividad transcripcional. Células HEK 293 transfectadas transitoriamente con vectores de expresión que codifican el hVDR de longitud completa y un plásmido indicador de luciferasa que abarca la región promotora de hCYP24A1 (gen diana VDR) en presencia de la concentración indicada de análogos. (B) Actividad pro calcémica. La cantidad indicada de análogos de vitamina D se administró diariamente por os durante 4 días y se determinó la calcemia. Las barras rayadas representan dosis normo-calcémicas. La línea punteada corresponde a niveles normo-calcémicos.

Figura 2: Estructura cristalina del complejo zVDR LBD-R2. (A) El mapa de densidad de electrones de 2Fo-Fc correspondiente al compuesto **23** se contornea a 1.0 sigma. (B) Superposición de **23** (naranja), con 1,25 (OH) 2D₃ (gris) y XE4 (cian) dentro de las LBP de VDR. (C) Detalles de las interacciones entre LBP y R2 que muestran las interacciones de Van-der-Waals formadas por los átomos de flúor en el corte 4.4 Å (líneas grises). (D) Superposición de complejos zVDR LBD con **23** (naranja) y 1,25 (OH)₂D₃ (gris). Los enlaces NH-F y los enlaces de hidrógeno se muestran como líneas de puntos (rojo para **23** y gris para 1,25(OH)₂D₃). El compuesto **23** estabiliza la conformación del agonista a través de numerosas interacciones adicionales con residuos de I11 y H12.

Figura 3: (A) Actividad antiinflamatoria in vitro (cultivo celular). Se cultivaron durante 6 h células ThP1 derivadas de leucemia en presencia de LPS y de la concentración indicada de análogos de vitamina D, y se determinaron los niveles de transcripción de IL12 / 23p40. (B) Actividad antiinflamatoria in vivo. Los ratones se trataron por os 3 días con la dosis indicada de análogos de vitamina D y los niveles séricos de IL-6 se determinaron 6 h después de la

administración de LPS. Las barras sombreadas representan supuestas dosis normocalcémicas.

Figura 4: Ensayo de proliferación en células PC3 derivadas de un tumor de próstata metastásico, que se sabe que es resistente a la vitamina D. La células PC3 se trataron con diferentes análogos durante 96 horas. Las barras sombreadas representan supuestas dosis normocalcémicas.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

“(C₁-C₁₂)Alquilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, formada por átomos de carbono e hidrógeno, sin insaturaciones, de 1 a 12, preferiblemente seis, más preferiblemente de uno a cuatro átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, que opcionalmente puede estar marcado isotópicamente de modo que uno o más hidrógenos se sustituyen por deuterio (²H) o tritio (³H) y/o uno o más carbonos se sustituyen por carbono-11 (¹¹C), carbono-13 (¹³C) o carbono-14 (¹⁴C), opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo (C₁-C₁₂)alquilcarboxi, un grupo (C₆-C₁₀)arilcarboxi, un grupo (C₁-C₁₂)alcoxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo (C₁-C₁₂)tioalcoxilo, un grupo (C₁-C₁₂)heteroalquilo, un grupo (C₃-C₁₅)heterocíclico o CF₃. Ejemplos de grupos alquilo incluyen sin limitación metilo, trifluorometilo, trideuterometilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo, ciclopropilo, etc.

“(C₁-C₁₂)Carbociclo” se refiere a una cadena hidrocarbonada cerrada formada por átomos de carbono e hidrógeno, sin insaturaciones, de 1 a 12, preferiblemente ocho, más preferiblemente de cinco a ocho átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, que opcionalmente puede estar marcado isotópicamente de modo que uno o más hidrógenos se sustituyen por deuterio (²H) o tritio (³H) y/o uno o más carbonos se sustituyen por carbono-11 (¹¹C), carbono-13 (¹³C) o carbono-14 (¹⁴C).

“(C₂-C₁₂)Alquenilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, formada por átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos una insaturación, conjugada o no, de 2 a 12, preferiblemente de dos a ocho, más preferiblemente de dos a cuatro átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo y que

opcionalmente puede estar marcado isotópicamente de modo que uno o más hidrógenos se sustituyen por ^2H o ^3H y/o uno o más carbonos se sustituyen por ^{11}C , ^{13}C o ^{14}C . Los radicales alqueno pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un átomo de halógeno, un grupo carboxi, un grupo ($\text{C}_1\text{-C}_{12}$)alcoxilo, un grupo ciano, un grupo
5 nitro, un grupo ($\text{C}_1\text{-C}_{12}$)tioalcoxilo, un grupo ($\text{C}_1\text{-C}_{12}$)heteroalquilo, un grupo ($\text{C}_3\text{-C}_{15}$)heterocíclico o CF_3 . Ejemplos de grupos alqueno incluyen sin limitación vinil, alil, butenil (por ejemplo, 1-butenil, 2-butenil, 3-butenil), o pentenil (por ejemplo, 1-pentenil, 2-pentenil, 3-pentenil, 4-pentenil).

"($\text{C}_2\text{-C}_{12}$)Alquino" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, formada por
10 átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono, conjugado o no, de dos a doce, preferiblemente de dos a ocho, más preferiblemente de dos a cuatro átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, tal como $-\text{CCH}$, $-\text{CH}_2\text{CCH}$, $-\text{CCCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CCCH}_3$, y que opcionalmente puede estar marcado isotópicamente de modo que uno o más hidrógenos se sustituyen por ^2H o ^3H y/o
15 uno o más carbonos se sustituyen por ^{11}C , ^{13}C o ^{14}C . Los radicales alquino pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un átomo de halógeno, un grupo carboxi, un grupo ($\text{C}_1\text{-C}_{12}$)alcoxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo ($\text{C}_1\text{-C}_{12}$)tioalcoxilo, un grupo ($\text{C}_3\text{-C}_{15}$)heterocíclico o CF_3 .

"($\text{C}_1\text{-C}_{12}$)Hidroalquilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, cíclica
20 o acíclica formada por átomos de carbono e hidrógeno, sin insaturaciones, de 1 a 12, preferiblemente de uno a ocho átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, que está sustituido por un grupo hidroxilo, opcionalmente protegido mediante un grupo protector como se describe en Wuts, P. G. M., Greene, T. W.; "Protective Groups in Organic Synthesis", 4rd Ed., John Wiley & Sons, Inc. 2007, New
25 Jersey, páginas 24-222. Preferiblemente, la cadena es ramificada y el grupo hidroxilo está protegido con alquiléteres y ésteres, como por ejemplo metoximetiléter, metoximetiléter, benciloximetiléter, metiltiometiléter, trimetilsilietoximetiléter, acetato, pivalato, benzoato, p-nitrobenzoato. Ejemplos de hidroalquilos sustituidos, incluyen sin limitación, 5-metil-5-hidroxihexilo y 6-metil-6-hidroxiheptilo, 5-etil-5-hidroxiheptilo y 6-etil-6-hidroxiocetilo.
30 Ejemplos de hidroalquilos no sustituidos incluyen sin limitación 5-hidroxihexilo y 6-hidroxiheptilo, 5-hidroxiheptilo y 6-hidroxiocetilo.

“(C₁-C₁₂)Hidroalqueno” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, formada por átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos una insaturación, conjugada o no, de 2 a 12, preferiblemente de dos a ocho, más preferiblemente de dos a cuatro átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo
 5 y que opcionalmente puede estar marcado isotópicamente de modo que uno o más hidrógenos se sustituyen por ²H o ³H y/o uno o más carbonos se sustituyen por ¹¹C, ¹³C o ¹⁴C. Los radicales alqueno pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un átomo de halógeno, un grupo carboxi, un grupo (C₁-C₁₂)alcoxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo (C₁-C₁₂)tioalcoxilo, un grupo
 10 (C₁-C₁₂)heteroalquilo, un grupo (C₃-C₁₅)heterocíclico.

“(C₁-C₁₂)Hidroalquino” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, formada por átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono, conjugado o no, de dos a doce, preferiblemente de dos a ocho, más preferiblemente de dos a cuatro átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace
 15 sencillo, tal como -CCH, -CH₂CCH, -CCCH₃, -CH₂CCCH₃, y que opcionalmente puede estar marcado isotópicamente de modo que uno o más hidrógenos se sustituyen por ²H o ³H y/o uno o más carbonos se sustituyen por ¹¹C, ¹³C o ¹⁴C. Los radicales alquino pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un átomo de halógeno, un grupo carboxi, un grupo (C₁-C₁₂)alcoxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo (C₁-
 20 C₁₂)tioalcoxilo, un grupo (C₃-C₁₅)heterocíclico o CF₃.

“(C₆-C₁₀)Arilo” se refiere a un hidrocarburo aromático de 6 a 10 átomos de carbono, tal como fenilo o naftilo, y que opcionalmente puede estar marcado isotópicamente de modo que uno o más hidrógenos se sustituyen por ²H o ³H y/o uno o más carbonos se sustituyen por ¹¹C, ¹³C o ¹⁴C. Los radicales arilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más
 25 sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo (C₁-C₁₂)alcoxilo, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo (C₁-C₁₂)tioalcoxilo, un grupo (C₁-C₁₂)alquilo o CF₃.

“(C₆-C₁₀)Aril(C₁-C₁₂)alquilo” se refiere a uno o varios grupos arilo unidos al resto de la molécula mediante un radical alquilo, por ejemplo, bencil, 3-(fenil)-propil, etc.

“(C₃-C₁₅)Heterociclo” se refiere a un anillo estable de 3 a 15 miembros formado por átomos de carbono y entre 1 a 5 heteroátomos escogidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre,

- preferiblemente un anillo de 4 a 8 miembros formado por uno o más heteroátomos, y más preferiblemente un anillo de 5 a 6 miembros con uno o más heteroátomos. Para los propósitos de esta invención, los grupos heterocíclicos pueden ser sistemas monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos, que pueden incluir anillos fusionados; y el átomo de nitrógeno o de azufre en el
- 5 anillo heterocíclico puede estar opcionalmente oxidado; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuartenarizado; y el radical heterocíclico puede estar parcial o totalmente saturado. Los radicales (C₃-C₁₅)heterocíclicos pueden ser aromáticos (por ejemplo, pueden tener uno o más anillos aromáticos) en cuyo caso se consideran como "(C₃-C₁₅)heteroarilos" para los propósitos de la presente invención. El anillo heterocíclico puede estar sustituido
- 10 por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo (C₁-C₁₂)alcoxilo, un grupo (C₁-C₁₂)alquilo, un grupo (C₁-C₁₂)tioalcoxilo, un grupo ciano, un grupo nitro o CF₃. Ejemplos de tales heterociclos incluyen sin limitación, furano, tiofeno, pirrol, imidazol, triazol, isotiazol, benzotiofeno, benzofurano, indol, benzoimidazol, tetrahydrofurano.
- 15 "(C₁-C₁₂)Alcoxilo" se refiere a un radical de fórmula -O-(C₁-C₁₂)alquilo, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi, etc.
- "(C₁-C₁₂)Tioalcoxilo" se refiere a un radical de fórmula -S-(C₁-C₁₂)alquilo, por ejemplo, tiometoxi, tioetoxi, tiopropoxi, etc.
- "(C₆-C₁₀)Ariloxilo" se refiere a un radical de fórmula -O-(C₆-C₁₀)arilo, por ejemplo fenoxi,
- 20 benciloxi, etc.
- "(C₁-C₁₂)Alquilcarboxi" se refiere a un grupo alquilo que se une al resto de la molécula mediante el oxígeno de un grupo carboxi (-CO₂-).
- "(C₆-C₁₀)Arilcarboxi" se refiere a un grupo arilo que se une al resto de la molécula mediante el oxígeno de un grupo carboxi (-CO₂-).
- 25 "(C₁-C₁₂)Alquilacilo" se refiere a un grupo alquilo que se une al resto de la molécula mediante un grupo carbonilo (-CO-).
- "(C₆-C₁₀)Arilacilo" se refiere a un grupo arilo que se une al resto de la molécula mediante un grupo carbonilo (-CO-).

“(C₁-C₁₂)Heteroalquilo” se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más carbonos están sustituidos por heteroátomos, preferentemente de 1 a 5, donde el heteroátomo se puede seleccionar de entre oxígeno, azufre, selenio, telurio, nitrógeno, fósforo, arsénico.

5 “(C₁-C₁₂)Heteroalquenilo” se refiere a un grupo alquenilo en el que uno o más carbonos están sustituidos por heteroátomos, preferentemente de 1 a 5, donde el heteroátomo se puede seleccionar de entre oxígeno, azufre, selenio, telurio, nitrógeno, fósforo, arsénico.

“(C₁-C₁₂)Heteroalquinilo” se refiere a un grupo alquinilo en el que uno o más carbonos están sustituidos por heteroátomos, preferentemente de 1 a 5, donde el heteroátomo se puede seleccionar de entre oxígeno, azufre, selenio, telurio, nitrógeno, fósforo, arsénico.

10 Los compuestos de la presente invención pueden incluir diastereoisómeros y/o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales, o isómeros dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo *Z*, *E*). Dichos isómeros, diastereómeros, enantiómeros y sus mezclas están dentro del alcance de la presente invención.

La frase “sal farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en la presente descripción, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico; y ácidos orgánicos tales como ácido metansulfónico, ácido bencensulfónico, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido etansulfónico, ácido aspártico y ácido glutámico.

15
20

Las sales de ejemplo incluyen, pero sin limitación, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tannato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metansulfonato “mesilato”, etansulfonato, bencensulfonato, p-toluensulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede comprender la inclusión de otra molécula tales como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser una parte orgánica o inorgánica que

25
30

estabilice la carga del compuesto principal. Por otra parte, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por ello, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

Si el compuesto de la invención es una base, es posible preparar la sal farmacéuticamente aceptable deseada mediante cualquier método disponible en la técnica, por ejemplo, mediante el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metansulfónico, ácido fosfórico, y similares, o con un ácido orgánico, tales como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido piranosidílico, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un ácido α -hidroxi, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluensulfónico o ácido etanosulfónico, o similares.

Si el compuesto de la invención es un ácido, es posible preparar la sal farmacéuticamente aceptable deseada mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, mediante tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un dióxido de metal alcalino o un hidróxido de metal alcalinotérreo, o similares. Los ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, pero sin limitación, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoníaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfolina y piperazina, y las sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, hierro, cobre, zinc, aluminio y litio.

Típicamente la sal es un mesilato, un clorhidrato, un fosfato, un bencensulfonato, oxalacetato o un sulfato. Más típicamente, la sal es un mesilato o un clorhidrato.

Las sales, por ejemplo, sales con cualquiera de los ácidos inorgánicos u orgánicos mencionados arriba, pueden ser monosales o bis-sales. Por lo tanto, por ejemplo, la sal mesilato puede ser el mono-mesilato o el bis-mesilato.

Compuestos de fórmula (I)

Los compuestos de fórmula (I) de la presente invención se unen específicamente al receptor de la vitamina VDR. Además están altamente funcionalizados y dicha funcionalización les aporta rigidez y mayor estabilidad en su unión con el receptor.

- 5 En una realización particular, P^1 y P^2 en un compuesto de fórmula (I) son $-OH$ o $-OSiR^aR^bR^c$, donde cada uno de R^a , R^b y R^c son como se han descrito anteriormente.

En otra realización particular, X^1 y X^2 en un compuesto de fórmula (I) forman conjuntamente con el átomo de carbono al que están unidos un grupo metileno ($=CH_2$).

En otra realización particular, R^2 y R^3 en un compuesto de fórmula (I) son un (C_1-C_{12}) alquilo.

- 10 De especial interés para la invención son los compuestos de fórmula (I) donde R^2 y R^3 son trifluorometil- (C_1-C_6) alquilo, y más en particular, trifluorometilo.

Los derivados isotópicos de los compuestos de la invención son útiles para su uso como patrones internos en diferentes técnicas de espectrometría de masas o cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a resonancia magnética nuclear. Los compuestos de la invención que incorporan 2H o 3H son útiles además como radiofármacos, por ejemplo pero sin limitarnos, para llevar a cabo técnicas de diagnóstico e investigación "in vivo" por imagen, permitiendo la detección externa de la biodistribución del radiofármaco dentro del organismo.

- 15 En la presente invención, un compuesto que "incorpora marcaje isotópico" se refiere a un compuesto de la invención en donde de entre 1 y 6 átomos de hidrógeno están sustituidos por isótopos de hidrógeno, deuterio o tritio, y/o de entre 1 a 3 átomos de carbono están sustituidos por isótopos, como por ejemplo ^{11}C , ^{13}C o ^{14}C .

- 25 Así, en una realización particular los compuestos de fórmula (I), según se han definido anteriormente, incorporan marcaje isotópico. En una realización más preferida, el marcaje isotópico se selecciona de entre 2H , 3H y ^{13}C .

En una realización particular, un compuesto de fórmula (I) incorpora marcaje isotópico en R^2 y R^3 . En una realización particular, el marcaje isotópico en R^2 y R^3 son iguales y selecciona de entre el grupo constituido por $^2H_n-(C_1-C_{12})$ alquilo, $^3H_n-(C_1-C_{12})$ alquilo, donde n tiene un valor entre 1 y 6. En una realización particular, el marcaje isotópico en R^2 y R^3 se

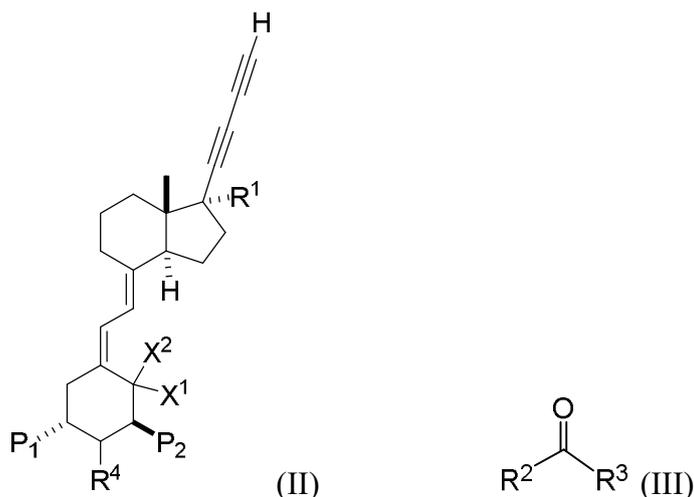
selecciona de entre el grupo constituido por (C₁-C₄)alquilo. En una realización más particular, R² y R³ son trideuterometilo.

5 En otro aspecto la invención se dirige al uso de compuestos de fórmula (I) según se han definido anteriormente, caracterizados porque incorporan marcaje isotópico, como patrones internos en técnicas espectroscópicas y espectrométricas. La invención también se refiere a los compuestos de fórmula (I) según se han definido anteriormente, caracterizados porque incorporan marcaje isotópico, para su uso como patrones internos en técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

10 En otro aspecto, la invención se refiere a los compuestos de fórmula (I), según se han definido anteriormente, caracterizados porque incorporan marcaje isotópico seleccionado de entre ²H y ³H para su uso como radiofármacos. Un radiofármaco puede servir por ejemplo pero sin limitarnos, para llevar a cabo técnicas de diagnóstico e investigación "in vivo" por imagen, permitiendo la detección externa de la biodistribución del radiofármaco dentro del organismo. Alternativamente, la invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula
15 (I), según se han definido anteriormente, caracterizados porque incorporan marcaje isotópico seleccionado de entre ²H y ³H como radiofármacos.

Preparación de los compuestos de fórmula (I)

20 Los compuestos de fórmula (I) de la presente invención, se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (III) en presencia de una base,



donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , P_1 , P_2 , X^1 , X^2 son como se han descrito anteriormente.

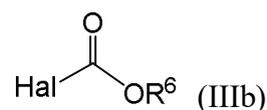
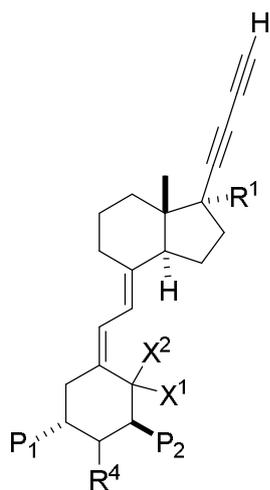
En una realización particular, la base puede ser una base orgánica como por ejemplo, (C1-
C12) alquil litio, alcóxidos potásicos, hidruros alcalinos o hidruros alcalino-térreos. En una
5 realización preferida la base es hexil litio o butil litio. En otras realizaciones, la base puede
ser una base inorgánica, como por ejemplo, *t*-butóxido potásico o hidruro de sodio.

En una realización particular el compuesto de fórmula (III) está marcado isotópicamente. En
una realización más particular, de entre 1 a 3 carbonos de un compuesto de fórmula (III)
están sustituidos por isótopos ^{11}C , ^{13}C y ^{14}C .

10 Otro aspecto de la invención se dirige a un procedimiento alternativo para la preparación de
un compuesto de fórmula (I) que comprende:

(a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (IIIb)
en presencia de una base, y

(b) reacción del intermedio obtenido en la etapa (a) con un compuesto de fórmula R^2M
15 y/o R^3M ,



donde R^6 se selecciona de (C_1-C_{12}) alquilo y (C_6-C_{10}) arilo,

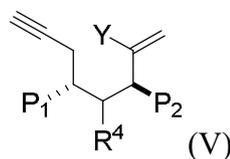
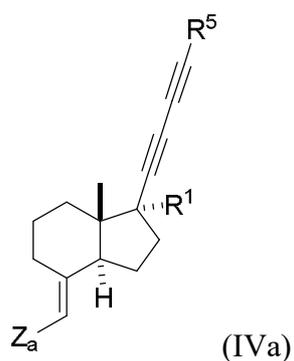
Hal es un halógeno de entre cloro, bromo, yodo,

5 M es un metal o un haluro metálico, y

$R^1, R^2, R^3, R^4, P_1, P_2, X^1, X^2$ son como se han descrito anteriormente.

En una realización particular, los compuestos de fórmula R^2M o R^3M se seleccionan de entre alquil-litio, haluros de magnesio y dialquileincatos.

Los compuestos de fórmula (II) donde X^1 y X^2 forman conjuntamente con el átomo de
 10 carbono al que están unidos un grupo metileno ($=CH_2$), se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende un acoplamiento entre un compuesto de fórmula (IVa) con un compuesto de fórmula (V) en presencia de un catalizador metálico,



15 donde R^5 se selecciona de entre hidrógeno y $-SiR^aR^bR^c$, donde cada uno de R^a, R^b y R^c se seleccionan de entre (C_1-C_{12}) alquilo, (C_6-C_{10}) arilo, (C_6-C_{10}) aril, (C_1-C_{12}) alquilo, (C_1-C_{12}) alcoxilo, (C_6-C_{10}) ariloxilo y (C_3-C_{15}) heterociclo,

Z_a se selecciona de entre di(C₁-C₁₂)alcoiboro, di(C₁-C₁₂)alquilboro, haluro de indio, di(C₁-C₁₂)alquilindio, di(C₁-C₁₂)arilindio, (C₁-C₁₂)alquil(C₆-C₁₀)arilindio, litio, haluro de cinc y (C₁-C₁₂)alquilocinc.

- 5 Y es un halógeno o un grupo atractor de carga seleccionado del grupo que comprende (C₁-C₁₂)alquilsulfonato, (C₆-C₁₀)arilsulfonato, triflato y fosfato, R¹, R⁴, P₁ y P₂ son como se han descrito anteriormente.

Los compuestos de fórmula (V) pueden prepararse según se describe en ES2331289B2, J.Med.Chem., 2000, 43, 4247-4265 y Chem. Eur. J. 2010, 16, 1432 – 1435 que quedan incorporados por referencia.

- 10 Los compuestos de fórmula (II) donde X¹ y X² son hidrógeno, se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende un acoplamiento entre un compuesto de fórmula (IVb) y un compuesto de fórmula (VI) en presencia de un catalizador metálico,



- 15 donde R⁵ se selecciona de entre hidrógeno y -SiR^aR^bR^c, donde cada uno de R^a, R^b y R^c se seleccionan de entre (C₁-C₁₂)alquilo, (C₆-C₁₀)arilo, (C₆-C₁₀)aril, (C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)alcoxilo, (C₆-C₁₀)ariloxilo y (C₃-C₁₅)heterociclo, Z_b se selecciona de entre cloro, bromo yodo, W se selecciona de entre (C₁-C₁₂)alquilsulfonato, (C₆-C₁₀)arilsulfonato, halógeno, metilen alquilsulfona y metilen arilsulfona,
- 20 R¹, R⁴, P₁ y P₂ son como se han descrito anteriormente.

En una realización particular, el catalizador metálico de la reacción de acoplamiento se selecciona de entre el grupo típico de catalizadores para una reacción de acoplamiento, por ejemplo y sin sentido limitativo, (Ph₃P)₂PdCl₂, Pd(OAc)₂, PdCl₂, Pd(PPh₃)₄, Pd(dba)₂, Ni(PPh₃)₄, Pd₂(dba)₃, compuestos de Cu y compuestos de Hf.

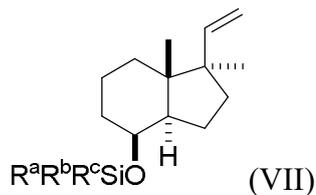
Los compuestos (VI) pueden prepararse según se describe en “*Novel synthetic approach to 19-nor-1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and its derivatives by Suzuki-Miyaura coupling in solution and on solid support*”, *Organic Letters* (2001), 3(24), 3975-3977 y “*Preparation of 2-hydroxy A-ring precursors for synthesis of vitamin D3 analogues from lyxose*”,
5 *Tetrahedron Letters*, (2015), 56(18), 2315-2318, que se incorporan como referencia.

Un compuesto de fórmula (IVb) puede transformarse en un compuesto de fórmula (IVa) mediante la transformación del grupo funcional Z. Así, en una realización particular la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un compuesto de fórmula (IVa) a partir de un compuesto de fórmula (IVb) mediante a) una reacción de metalación, y b)
10 intercambio del metal por un grupo seleccionado de entre dialcoxiboro, dialquilboro, haluro de indio, diarilindio, alquilarilindio y haluro de cinc.

Un experto en la materia conoce las condiciones para realizar dicha transformación, como por ejemplo, la sustitución del bromuro se puede llevar a cabo por metalación con un organolítico, posterior atrapado con isopropóxido de boro e intercambio de los sustituyentes
15 del boro (*Org. Lett.* **2003** (5) 523-525), también se puede llevar a cabo mediante una reacción de Suzuki por acoplamiento, por ejemplo con bis(pinacol)diborano en presencia de un catalizador de paladio, como por ejemplo, Pd(OAc)₂, Pd(PPh₃)₄, Pd(dppf)Cl₂, en presencia de una base como por ejemplo carbonato de sodio, hidróxido de bario, fosfato potásico, carbonato de cesio, carbonato potásico, hidróxido de talio, fluoruro de cesio, fluoruro de
20 potasio, hidróxido sódico. (*J. Am. Chem. Soc.* **2002** (27) 8001-8006). Un experto en la materia también conoce otras posibilidades como por ejemplo, la sustitución del bromuro se puede llevar a cabo por metalación con un organolítico, posterior reacción con tricloruro de indio (*Org. Lett.* **2004** (6) 4555-4558). En otro ejemplo, la sustitución del bromuro se puede llevar a cabo por metalación con un organolítico, posterior reacción con dicloruro de cinc
25 (*Synlett* **2003** 861-863). En otro ejemplo, la sustitución del yoduro se puede llevar a cabo por metalación directa con cinc, posterior reacción con el complejo cianuro de cobre(I)-cloruro de litio (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2006** (45) 6040-6044).

La invención también se dirige al procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula (IVb) que comprende:

30 a) epoxidación de un compuesto de fórmula (VII),



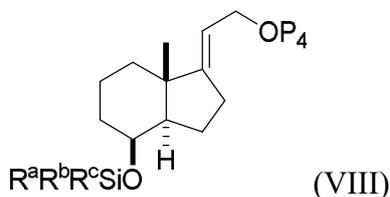
- b) apertura del epóxido obtenido en la etapa a) con un reactivo reductor,
 c) oxidación del hidroxilo resultante en la etapa b),
 d) desprotonación hasta la obtención de un grupo alquínilo,
 5 e) yodación,
 f) acoplamiento con $\text{HC}\equiv\text{CSiR}^a\text{R}^b\text{R}^c$,
 g) oxidación,
 h) halogenación,

y opcionalmente entre algunas de las etapas descritas se lleva a cabo protecciones y
 10 desprotecciones de grupos hidroxilo,

donde R^a , R^b y R^c son como se han descrito anteriormente.

Las protecciones y desprotecciones son habituales para los expertos en la materia en el sector
 de la síntesis de compuestos orgánicos y las condiciones de reacción se describen en Wuts,
 P. G. M., Greene, T. W.; "Protective Groups in Organic Synthesis", 4rd Ed., John Wiley &
 15 Sons, Inc. 2007, New Jersey.

La invención también se dirige al procedimiento de preparación de los compuestos de
 fórmula (VII) que comprende la reacción de un compuesto de fórmula (VIII) con un
 compuesto $\text{R}^1\text{-Li}$,

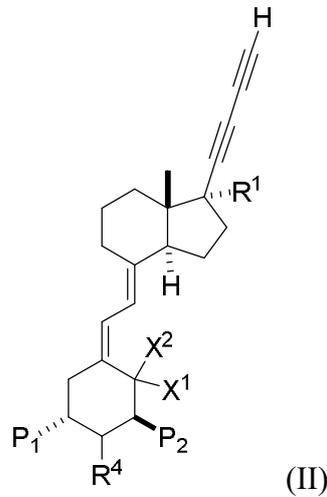


20 donde P_4 es un buen grupo saliente, y

R^1 , R^a , R^b y R^c son como se han descrito anteriormente.

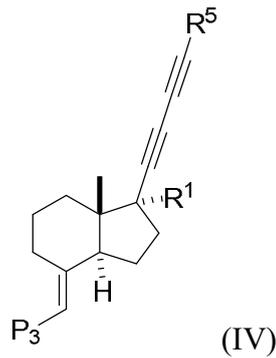
En una reacción particular, P_4 es fenilcarbamato, *o*-metoxifenilcarbamato, *p*-
 metoxifenilcarbamato, *o*-diphenylphosphanylbenzoato, benzoato, pivalato.

La invención también se dirige a los compuestos de fórmula (II)



donde R^1 , R^4 , P_1 , P_2 , X^1 y X^2 son como se han descrito anteriormente.

La invención también se dirige a los compuestos de fórmula (IV)



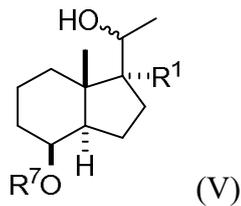
5

donde R^5 se selecciona de entre hidrógeno y $-\text{SiR}^a\text{R}^b\text{R}^c$, donde cada uno de R^a , R^b y R^c se seleccionan de entre (C₁-C₁₂)alquilo, (C₆-C₁₀)arilo, (C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)alcoxilo, (C₆-C₁₀)ariloxilo y (C₃-C₁₅)heterociclo,

10

P_3 se selecciona de entre di(C₁-C₁₂)alcoxiboro, di(C₁-C₁₂)alquilboro, haluro de indio, di(C₁-C₁₂)alquilindio, di(C₁-C₁₂)arilindio, (C₁-C₁₂)alquil(C₆-C₁₀)arilindio, litio, haluro de cinc, (C₁-C₁₂)alquilcinc, cloro, bromo y yodo, y R^1 como se ha descrito anteriormente.

La invención también se dirige a los compuestos de fórmula (V)



donde R^7 es $-\text{SiR}^a\text{R}^b\text{R}^c$, donde cada uno de R^a , R^b y R^c se seleccionan de entre (C_1 - C_{12})alquilo, (C_6 - C_{10})arilo, (C_6 - C_{10})aril, (C_1 - C_{12})alquilo, (C_1 - C_{12})alcoxilo, (C_6 - C_{10})ariloxilo y (C_3 - C_{15})heterociclo, y

R^1 como se ha descrito anteriormente.

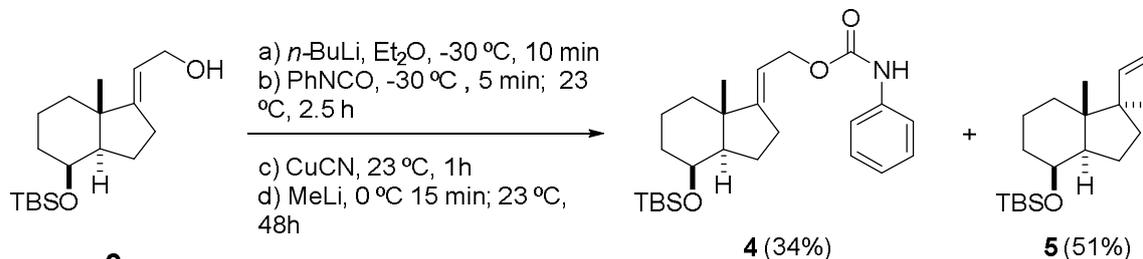
5

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención, aunque no se deben de considerar una limitación de la misma.

Procedimientos generales.

- 10 Para determinar la pureza de los análogos de la vitamina D sintetizados se utilizó un análisis por HPLC (>95%). Todos los análogos sintetizados presentan un único pico en HPLC (Phenomenex Luna 5u Silica(2) 100A, 250x21.2 mm, fase normal, isocrático).

Preparación de *tert*-butil{[(1*R*,3*aR*,4*S*,7*aS*)-1,7*a*-dimetil-1-viniloctahidro-1*H*-inden-4-*il*]oxi} dimetilsilano (5)



15

Una disolución de *n*BuLi en hexanos (2.6 mL, 1.3 M) se añadió gota a gota sobre una disolución del alcohol **3** (1 g, 3.22 mmol) en Et₂O (30 mL) enfriada a -30 °C. Tras 10 min, se goteó isocianato de fenilo (PhNCO, 0.40 mL, 3.54 mmol). La mezcla de reacción se retiró del baño y se agito a temperatura ambiente durante 2.5 h. A continuación, se añadió en una

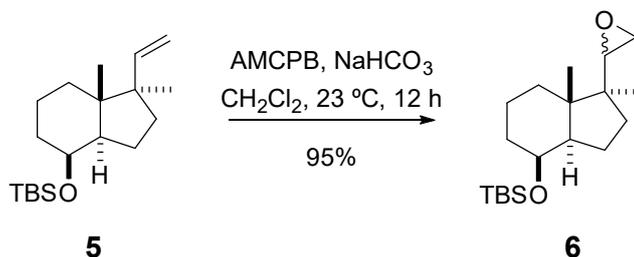
20 única porción CuCN (0.29 g, 3.22 mmol). La mezcla se agito a temperatura ambiente durante 1h y luego se enfrió a 0 °C. Después de 5 min, una disolución de MeLi en Et₂O (2.4 mL, 1.5 M) se añadió lentamente y gota a gota. Tras 15 min, la suspensión amarilla se retiró del baño y se agito a temperatura ambiente protegida de la luz durante 48 h. La reacción de color negro se detuvo por adición de una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (20 mL). La fase

25

acuosa se extrajo con MTBE (50 mL) y la fase orgánica combinada se secó, filtró y

concentro. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna SiO₂, 0-5% AcOEt/hexanos) para dar el carbamato **4** (0.474 g, 34%, aceite amarillo) y el alqueno **5** (0.506 g, 51%, aceite incoloro). **5**: ¹H RMN (250 MHz, CDCl₃): δ 5.92 (dd, *J*₁ = 17.2, *J*₂ = 10.3, 1H, =CH), 4.94 (d, *J* = 10.3, 1H, =CH₂ *cis*), 4.92 (d, *J* = 17.2, 1H, =CH₂ *trans*), 4.10 (sa, 1H, H-8), 2.01 (t, *J* = 10.5, 1H, H-9), 1.85-1.56 (m, 4H), 1.51-1.23 (m, 6H), 0.94 (s, 6H, Me-28 y Me-18), 0.90 (s, 9H, Me₃CSi), 0.03 (s, 3H, MeSi), 0.02 (s, 3H, MeSi).

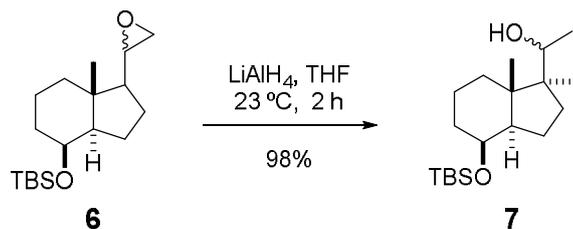
Preparación de *tert*-butil-[(1*S*,3*aR*,4*S*,7*aS*)-1,7*a*-dimetil-1-(oxiran-2-il)octahidro-1*H*-inden-4-il]oxi} dimetilsilano (6**)**



10 NaHCO₃ (0.480 g, 5.71 mmol) se añadió sobre una disolución del alqueno **5** (1.1 g, 3.57 mmol) en CH₂Cl₂ (35 mL). Después de 5 min, se añadió ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*CPBA, 0.740 g, 4.28 mmol) en una única porción. La suspensión blanca resultante se agitó a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 12 h. La reacción se detuvo por adición de H₂O (20 mL). La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (60 mL) y la fase orgánica combinada

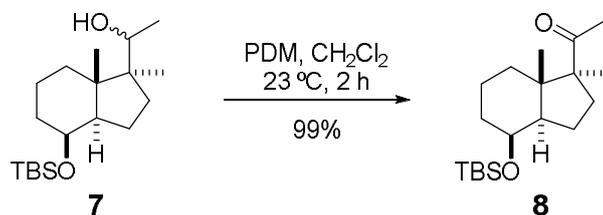
15 se secó, filtró y concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, 5% AcOEt/hexanos) para la mezcla de epóxidos **6** (1.10 g, 95%, aceite incoloro). ¹H RMN (250 MHz, CDCl₃): δ 4.06 (sa, 2H, 2xH-8), 2.89 (t, *J* = 3.4, 1H, H-22), 2.81 (t, *J* = 3.5, 1H, H-22), 2.74 (t, *J* = 3.7, 1H, H-22), 2.66 (t, *J* = 4.2, 1H, H-22), 2.59 (t, *J* = 4.6, 1H, H-20), 2.25 (dd, *J*₁ = 4.8, *J*₂ = 3.0, 1H, H-20), 1.89-1.20 (m, 2x11H), 1.10 (s, 3H, Me-28), 1.09 (s, 3H, Me-28), 0.88 (s, 9H, Me₃CSi), 0.87 (s, 9H, Me₃CSi), 0.87 (s, 3H, Me-18), 0.85 (s, 3H, Me-18), 0.00 (s, 3H, MeSi), 0.02 (s, 3H, MeSi), -0.01 (s, 3H, MeSi), -0.02 (s, 3H, MeSi).

Preparación de 1-[(1*S*,3*aR*,4*S*,7*aS*)-4-(*tert*-butildimetilsililoxi)-1,7*a*-dimetiloctahidro-1*H*-inden-1-il] etan-1-ol (7**)**



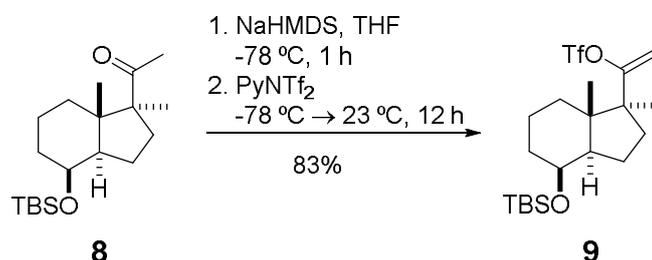
Una disolución de LiAlH_4 (3.3 mL, 2M) en THF se goteo cuidadosamente sobre una disolución de los epóxidos **6** (0.850 g, 2.62 mmol) en THF (10 mL). La mezcla de la reacción se agito a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se enfrió a 0 °C y se añadió una disolución acuosa de HCl (15 mL, 10%). La fase acuosa se extrajo con MTBE (30 mL) y la fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO_2 , 5% AcOEt/hexanos) para dar la mezcla de alcoholes **7** (0.843 g, 98%, aceite incoloro). **EMBR** ([ESI-TOF]⁺, m/z, %): 349.2 ([M+Na]⁺, 17), 347.2 ([M+Na-2H]⁺, 100), 309.2 ([M-OH]⁺, 4), 281.0 ([M-Me₃]⁺, 11), 279 ([M-Me₂-OH]⁺, 13). **EMAR** ([ESI-TOF]⁺, m/z): calculado para C₁₉H₃₈O₂SiNa (M+Na), 349.2539; encontrado 349.2546.

Preparación de 1-{(1*S*,3*aR*,4*S*,7*aS*)-4-(*tert*-butildimetilsililoxi)-1,7*a*-dimetiloctahidro-1*H*-inden-1-il} etan-1-ona (8**)**



Peryodinano de Dess-Martin (DMP, 1.6 g, 3.70 mmol) se añadió sobre una disolución de los alcoholes **7** (0,460 g, 3.37 mmol) en CH_2Cl_2 (30 mL). La mezcla de reacción se agito a temperatura ambiente durante 1.5 h. La reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa saturada de NaCl (15 mL). La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (45 mL) y la fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO_2 , 3% AcOEt/hexanos) para dar la cetona **8** (1.1 gr, 99%). ¹H RMN (250 MHz, CDCl_3): δ 4.03 (sa, 1H, H-8), 2.62 (dd, $J_1 = 13.5$, $J_2 = 10.5$, 1H, H-9), 2.05 (s, 3H, Me-22), 1.83-1.29 (m, 9H), 1.21-1.11 (m, 1H), 1.06 (s, 3H, Me-28), 0.87 (s, 3H, Me-18), 0.82 (s, 9H, Me₃CSi), -0.03 (s, 3H, MeSi), -0.05 (s, 3H, MeSi).

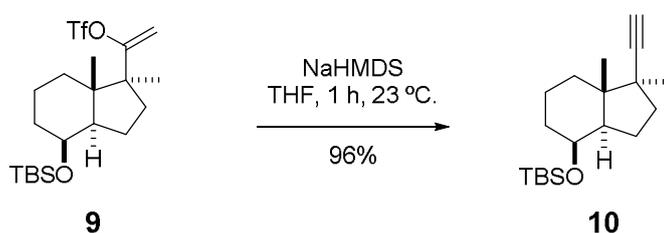
Preparación de trifluorometanosulfonato de 1-{(1*S*,3*aR*,4*S*,7*aS*)-4-(*tert*-butildimetilsililo)-1,7*a*-dimetiloctahidro-1*H*-inden-1-ilo}-vinilo (9).



Una disolución de bis(trimetilsilil)amiduro de sodio en hexanos (NaHMDS, 1.5 mL, 2M) se goteó sobre una disolución de la cetona **8** (0.650 g, 2.0 mmol) en THF (20 mL) enfriada a -78 °C. Al cabo de 1 h, se añadió una disolución de *N*-(2-piridil)-triflimida (2.15 g, 6.0 mmol) en THF (10 mL). La temperatura de la mezcla de la reacción se dejó subir lentamente a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa saturada de NaCl (30 mL). La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (60 mL) y la fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, hexanos) para dar el triflato **9** (0.728 g, 83%).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.12 (d, *J* = 4.5, 1H, =CH₂), 4.95 (d, *J* = 4.5, 1H, =CH₂), 4.07 (sa, 1H, H-8), 2.08 (tt, *J*₁ = 11.5, *J*₂ = 7.9, 1H, H-9), 1.89-1.59 (m, 4H), 1.55-1.28 (m, 5H), 1.17 (s, 3H, Me-28), 1.03 (s, 3H, Me-18), 0.89 (s, 9H, Me₃CSi), 0.02 (s, 3H, MeSi), 0.01 (s, 3H, MeSi).

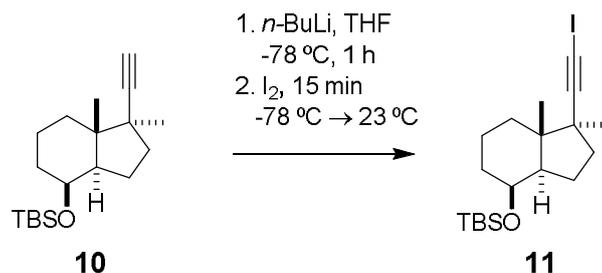
Preparación de *tert*-butildimetilsililo de (1*R*,3*aR*,4*S*,7*aS*)-1-etinil-1,7*a*-dimetiloctahidro-1*H*-inden-4-ilo (10).



Una disolución de hexametildisilazano de sodio (NaHMDS, 1.5 mL, 3.1 mmol, 2M) en hexanos se goteó sobre una disolución enfriada a -78 °C del triflato **9** (0.710 g, 1.55 mmol) en THF (15 mL). Tras 15 min, se retiró el baño y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa saturada de NaCl (20 mL). La fase acuosa se extrajo con MTBE (40 mL) y la fase orgánica combinada se secó,

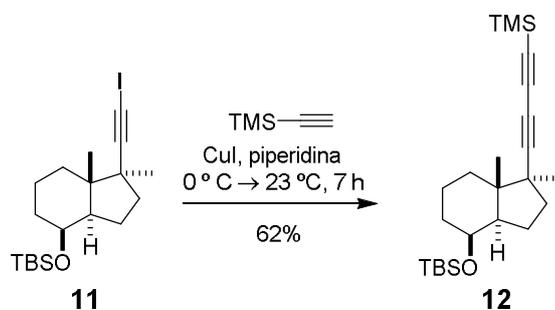
filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO_2 , hexanos) para dar el alquino **10** (0.460 g, 96%). ^1H RMN (250 MHz, CDCl_3): δ 4.08 (s, 1H, H-8), 2.11 (m, 1H, H-9), 2.12 (s, 1H, C-22), 1.89-1.03 (m, 16H), 1.20 (s, 3H, Me-28), 1.15 (s, 3H, Me-18), 0.89 (s, 9H, Me_3CSi), 0.02 (s, 3H, MeSi), 0.00 (s, 3H, MeSi).

5 **Preparación de *tert*-butildimetilsililoxi de (1*S*,3*aR*,4*S*,7*aS*)-1-(iodoetil)-1,7*a*-dimetiloctahidro-1*H*-inden-4-ilo (**11**)**



Una disolución de *n*-BuLi en hexanos (8.3 mL, 12.4 mmol, 1.5M) se goteó sobre una disolución enfriada a -78 °C del alquino **10** (0.9 g, 3.1 mmol) en THF (30 mL). Después de
10 1h, se añadió en una sola porción yodo (3.9 g, 15.5 mmol). La mezcla de reacción se dejó
agitando que viniese a temperatura ambiente durante 12 h. La reacción se detuvo por adición
de una disolución acuosa saturada de NaCl (20 mL). La fase acuosa se extrajo con MTBE
(40 mL) y la fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por
cromatografía rápida en columna (SiO_2 , hexanos) para dar el yoduro **11** (1.20 g, 95%). ^1H
15 RMN (250 MHz, CDCl_3): δ 4.07 (s, 1H, H-8), 2.12 (t, $J = 12.2$, 1H, H-9), 1.84-1.07 (m,
10H), 1.18 (s, 3H, Me-28), 1.15 (s, 3H, Me-18), 0.89 (s, 9H, Me_3CSi), 0.02 (s, 3H, MeSi),
0.00 (s, 3H, MeSi).

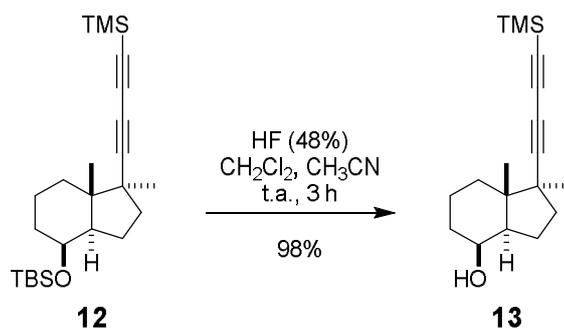
Preparación de *tert*-butil{[(1*S*,3*aR*,4*S*,7*aS*)-1,7*a*-dimetil-1-((trimetilsilil)buta-1,3-diin-1-il)octahidro-1*H*-inden-4-il]oxi} dimetilsilano (12**).**



20

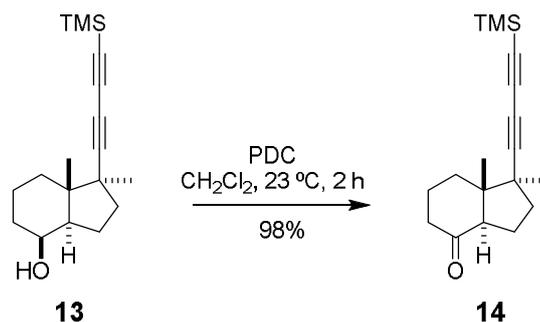
CuI (88 mg, 0.46 mmol) se añadió sobre una disolución del compuesto **11** (1.0 g, 2.32 mmol) y trimetilsililacetileno (1 mL, 6.96 mmol) en piperidina (10 mL) enfriada a 0 °C. Al cabo de 5 min, se retira del baño y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 7 h. La reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (8 mL). La fase acuosa se extrajo con MTBE (40 mL) y la fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, hexanos) y posteriormente por HPLC preparativo (columna Luna 5µm, SiO₂, 250x210 mm, hexanos) para dar el diino **12** (0.576 g, 62%). ¹H RMN (250 MHz, CDCl₃): δ 4.06 (sa, 1H, H-8), 2.13 (t, *J* = 12.2, 1H, H-9), 1.85-1.07 (m, 10H), 1.19 (s, 3H, Me-28), 1.14 (s, 3H, Me-18), 0.88 (s, 9H, Me₃CSi), 0.17 (s, 9H, Me₃Si), 0.02 (s, 3H, MeSi), 0.00 (s, 3H, MeSi).

Preparación de (1*S*,3*aR*,4*S*,7*aS*)-1,7*a*-dimetil-1-((trimetilsilil)buta-1,3-diin-1-il)octahidro-1*H*-inden-4-ol (13**)**



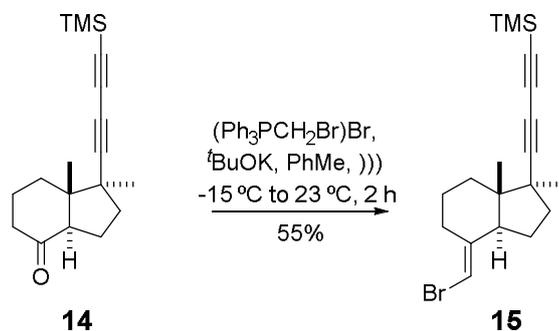
HF (2 mL, 48% ac.) se añadió a una disolución de **12** (0.350 g, 0.87 mmol) en CH₃CN (6 mL) y CH₂Cl₂ (3 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se detuvo por adición lenta de una disolución saturada de NaHCO₃ (20 mL). La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (20 mL) y la fase orgánica combinada se secó, filtró y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO₂, 5% EtOAc-hexanos) proporcionando **13** (0.247 g, 98%). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ 4.12 (br s, 1H, H-8), 2.12 (br t, *J* = 12.1, 1H, H-9), 1.90-1.01 (m, 11H), 1.18 (s, 3H, Me-28), 1.14 (s, 3H, Me-18), 0.15 (s, 9H, Me₃Si).

Preparación de (1*S*,3*aR*,7*aS*)-1,7*a*-dimetil-1-[(trimetilsilil)buta-1,3-diin-1-il]octahidro-4*H*-inden-4-ona (14**)**



Dicromato de piridinio (PDC, 960 mg, 2.55 mmol) se añadió sobre una disolución del alcohol **13** (245 mg, 0.85 mmol) en CH_2Cl_2 (15 mL). La suspensión se agitó a $23\text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 h. La mezcla de reacción se diluyó con Et_2O , se agitó durante 15 min y se filtró a través de una capa de Celita[®]. El filtrado orgánico se concentró a vacío y el residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO_2 , 5% EtOAc /hexanos) proporcionando la cetona **14** (247 mg, 98%). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 2.64 (t, $J = 9.1$, 1H, H-9), 2.39-1.79 (m, 6H), 1.76-1.50 (m, 4H), 1.26 (s, 3H, Me-28), 0.86 (s, 3H, Me-18), 0.17 (s, 9H, Me_3Si).

Preparación de [(1*S*,3*aR*,7*aS*,*E*)-4-(bromometilen)-1,7*a*-dimetiloctahidro-1*H*-inden-1-il]buta-1,3-diin-1-il} trimetilsilano (15**).**

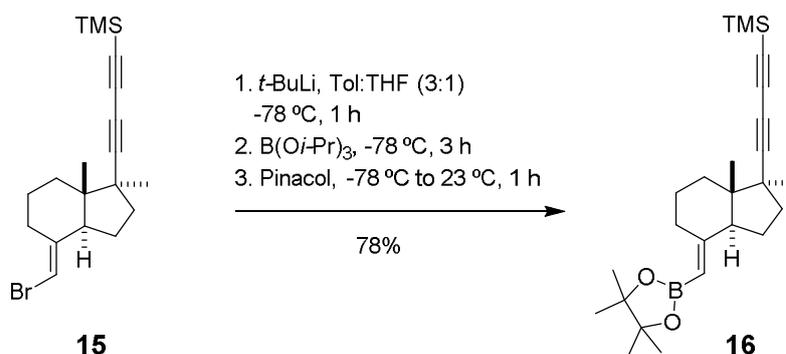


Una suspensión de $(\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{Br})\text{Br}$ (2.45 g, 5.58 mmol) en tolueno (20 mL) se sonicó durante 30 min (dos periodos de 15 min). La suspensión se enfrió a $-15\text{ }^\circ\text{C}$ y se añadió gota a gota una disolución de $\text{KO}t\text{Bu}$ en THF (5.5 mL, 1M). La mezcla se agitó durante 2 h a $-15\text{ }^\circ\text{C}$, entonces se atemperó a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y se volvió a enfriar a $-15\text{ }^\circ\text{C}$ y se agitó por 15 min. Una disolución de la cetona **14** (0.2 g, 0.70 mmol, 1 equiv) en THF (5 mL) se enfrió a $0\text{ }^\circ\text{C}$ y se transfirió con un cánula sobre la suspensión del iluro enfriada a $-15\text{ }^\circ\text{C}$. La mezcla se agitó a $-15\text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h, y a $0\text{ }^\circ\text{C}$ durante otra hora. La reacción se detuvo por adición lenta de una disolución saturada de NH_4Cl (1 mL). La mezcla se purificó directamente por cromatografía rápida en columna (SiO_2 , hexanos) proporcionando **15** (0.140 g, 55%).

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 5.67 (s, 1H, H-7), 2.91 (d, $J = 10.7$, 1H, H-9), 2.20 (m, 2H), 1.76-1.40 (m, 8H), 1.23 (s, 3H, Me-28), 0.81 (s, 3H, Me-18), 0.18 (s, 9H, Me_3Si).

Preparación de {[(1*S*,3*aS*,7*aS*,*E*)-1,7*a*-dimetil-4-[(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)metilen]-octahidro-1*H*-inden-1-il]buta-1,3-diin-1-il} trimetilsilano

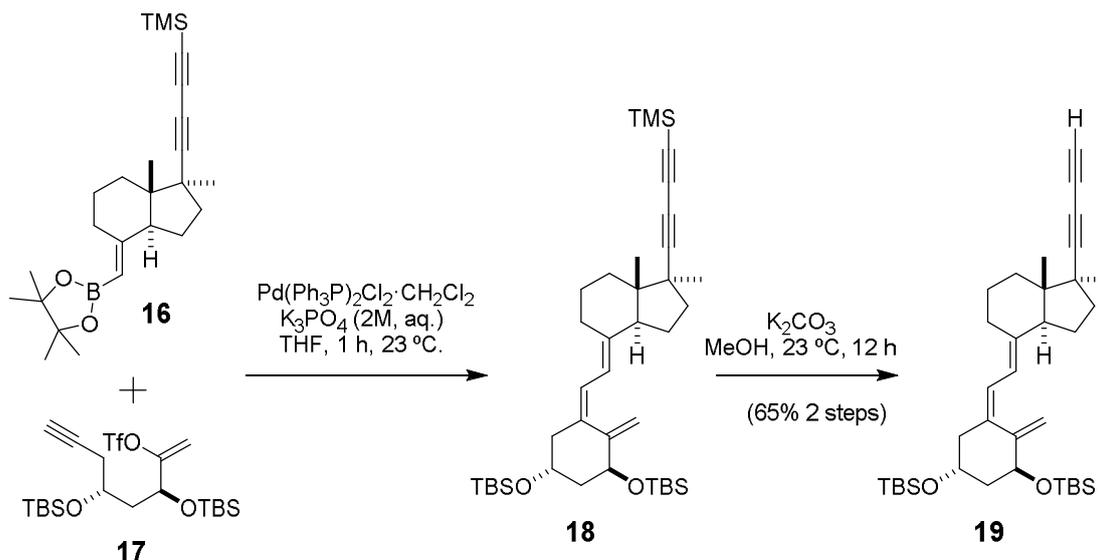
5 (16)



Una disolución de *t*-BuLi en pentano (0.48 mL, 1.46M) se añadió lentamente a una disolución de **15** (120 mg, 0.33 mmol) en THF/tolueno (6 mL, 1:3) enfriada a -78 °C. La mezcla de reacción amarilla se agitó a -78 °C durante 1 h y entonces se añadió lentamente gota a gota B(*O**i*-Pr)₃ (0.12 mL, 0.50 mmol). Después de 2h, pinacol (0.051 g, 0.43 mmol) se añadió. El baño criogénico se retiró y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se detuvo por adición de H₂O (10 mL). La fase acuosa se extrajo con MTBE (30 mL). La fase orgánica conjunta se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO_2 , 1% EtOAc/Hexano) para dar **16** (0.106 g, 78%). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 4.93 (s, 1H, H-7), 3.19 (dd, $J_1 = 9.8$, $J_2 = 3.8$, 1H), 2.28 (t, $J = 7.3$, 1H), 2.13 (br t, $J_1 = 11.3$, 1H), 1.74-1.41 (m, 8H), 1.25 (s, 12H, 2 x Me₂COB), 1.23 (s, 3H, Me-28), 0.78 (s, 3H, Me-18), 0.16 (s, 9H, Me₃Si).

Preparación de {[(1*R*,3*S*,*Z*)-5-{2-[(1*S*,3*aS*,7*aS*,*E*)-1-(buta-1,3-diin-1-il)-1,7*a*-dimetiloctahidro-4*H*-inden-4-iliden]etiliden}-4-metileneciclohexano-1,3-diil]bis(oxi)} bis(tert-butildimetilsilano) (19).

20

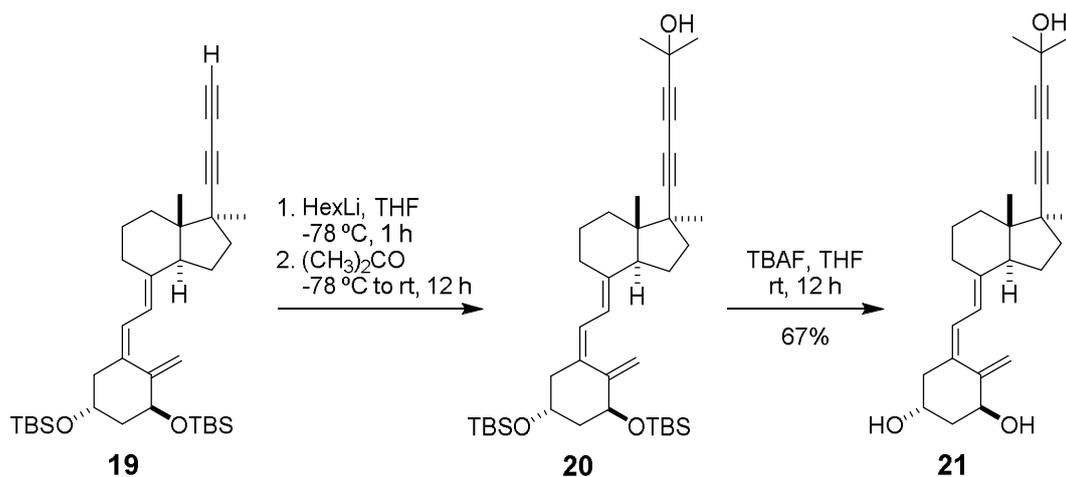


Una disolución acuosa de K_3PO_4 (1.5 mL, 2 M) se añadió a una disolución de **16** (70 mg, 0.17 mmol) y del enoltrifalato **17** (100 mg, 0.193 mmol) en THF (2.5 mL). Entonces se añadió $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (6.0 mg, 0.0085 mmol, 0.05 equiv). La mezcla de reacción se agitó

5 durante 1 h. La reacción se detuvo por adición de H_2O (10 mL). La fase acuosa se extrajo con hexanos (30 mL). La fase orgánica conjunta se secó, filtró, concentró y se filtró a través de una capa de gel de sílice. El residuo (**18**) se redisolvió en MeOH (2 mL) y THF (1 mL). Entonces se añadió K_2CO_3 (70 mg, 0.51 mmol). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La reacción se detuvo por adición de disolución

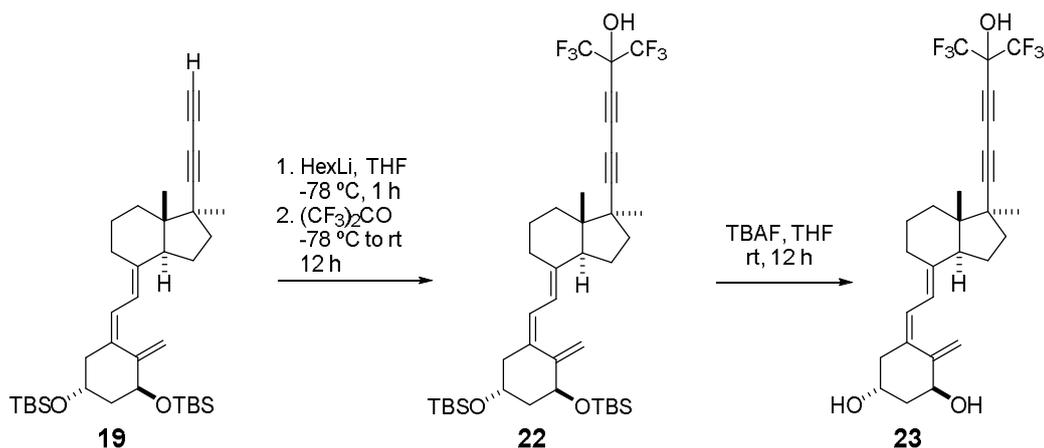
10 acuosa saturada de NH_4Cl (5 mL) y de H_2O (5 mL). La mezcla se concentró hasta un pequeño volumen y se extrajo con MTBE (30 mL). La fase orgánica conjunta se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO_2 , hexanos) proporcionando **19** [63 mg, 65% (2 pasos)]. $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 6.23 (d, $J = 11.1$, 1H, H-7), 6.03 (d, $J = 11.1$, 1H, H-6), 5.17 (s, 1H, H-19), 4.85 (s, 1H, H-19), 4.36 (dd, $J_1 = 6.0$, $J_2 = 3.9$, H-1), 4.20 (dt, $J_1 = 10.7$, $J_2 = 3.6$, 1H, H-3), 2.85 (m, 1H), 2.46 (dd, $J_1 = 13.1$, $J_2 = 3.4$, 1H), 2.34-2.08 (m, 2H), 2.03 (s, 1H, $\equiv\text{C-H}$), 1.95-1.39 (m, 10H), 1.25 (s, 3H, Me-28), 0.87 (s, 18H, $2 \times \text{Me}_3\text{CSi}$), 0.79 (s, 3H, Me-18), 0.06 (s, 12H, $4 \times \text{MeSi}$).

Preparación de (1R,3S,Z)-5-{2-[(1S,3aS,7aS,E)-1-(5-hidroxi-5-metilhexa-1,3-diin-1-il)-1,7a-dimetiloctahidro-4H-inden-4-iliden]etiliden}-4-metilen-ciclohexano-1,3-diol (21**)**



- Una disolución de *n*-HexLi en hexanos (0.045 mL, 2.3M) se añadió gota a gota sobre una disolución enfriada a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ del compuesto **19** (0.030 g, 0.052 mmol) en THF (1 mL). Después de agitar durante 1 h, acetona seca se añadió gota a gota (0.020 mL, 0.273 mmol).
- 5 La mezcla de reacción se agitó mientras alcanzaba lentamente temperatura ambiente. La reacción se detuvo por adición de disolución acuosa saturada de NH_4Cl (10 mL). La mezcla se concentró hasta un pequeño volumen y se extrajo con MTBE (3x10 mL). La fase orgánica conjunta se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO_2 , 5% EtOAc/hexanos) proporcionando **21** [0.030 g, 93%]. El análogo protegido **20** (30 mg, 0.047 mmol) se disolvió en THF (1 mL) bajo argón. Se añadió una disolución de TBAF en THF (0.140 mL, 1M). La mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 48 h, la reacción se detuvo por adición de disolución acuosa saturada de NH_4Cl (5 mL). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (15 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO_2 , 50%
- 10 EtOAc/hexanos) y se repurificó por HPLC (Phenomenex SiO_2 , Luna preparativa 5 μm , 20% *i*-PrOH/Hexanes) para dar **21** (0.014 g, 67%). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 6.36 (d, $J = 11.0$, 1H, H-7), 6.03 (d, $J = 11.4$, 1H, H-6), 5.32 (s, 1H, H-19), 4.98 (s, 1H, H-19), 4.43 (t, $J = 5.7$, H-1), 4.23 (m, 1H, H-3), 2.85 (d, $J = 10.9$, 1H), 2.60 (d, $J = 11.4$, 1H), 2.39-1.85 (m, 5H), 1.74-1.44 (m, 11H), 1.52 (s, 6H, Me-26 y Me-27), 1.24 (s, 3H, Me-28), 0.79 (s, 3H,
- 15 Me-18).
- 20

Preparación de (1*R*,3*S*,*Z*)-5-{2-[(1*S*,3*aS*,7*aS*,*E*)-1,7*a*-dimetil-1-(6,6,6-trifluoro-5-hidroxi-5-(trifluorometil)hexa-1,3-diin-1-il)octahidro-4*H*-inden-4-iliden]etiliden}-4-metilen-ciclohexano-1,3-diol (23)



Una disolución de *n*-HexLi en hexanos (0.060 mL, 2.3M) se añadió gota a gota sobre una disolución enfríada a -78°C del compuesto **19** (0.040 g, 0.069 mmol) en THF (1 mL). Después de agitar durante 1 h, se añadió via cánula una disolución enfríada a -78°C de hexafluoroacetona en THF (1 mL), obtenida por disolución de la hexafluoroacetona (10 gotas) recogida en una trampa enfríada con hielo seco en THF (2 mL) enfríado a -78°C . La mezcla de reacción se agitó durante 30 min a -78°C en la oscuridad. La reacción se detuvo por adición de disolución acuosa saturada de NH_4Cl (10 mL). La mezcla se concentró hasta un pequeño volumen y se extrajo con MTBE (30 mL). La fase orgánica conjunta se secó, filtró y concentró. El residuo (**22**, 33 mg, 0.044 mmol) se disolvió en THF (1 mL) bajo argón. Se añadió una disolución de TBAF en THF (0.150 mL, 1M). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de 24 h, la reacción se detuvo por adición de disolución acuosa saturada de NH_4Cl (5 mL). La fase acuosa se extrajo con EtOAc (15 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (SiO_2 , 60% EtOAc/hexanos) y se repurificó por HPLC (Phenomenex SiO_2 , Luna preparativa 5 μm , 20% *i*-PrOH/Hexanes) para dar **23** (0.020 g, 57%). $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ 6.36 (d, $J = 11.2$, 1H, H-7), 6.03 (d, $J = 11.4$, 1H, H-6), 5.33 (s, 1H, H-19), 4.99 (s, 1H, H-19), 4.44 (t, $J = 6.0$, H-1), 4.25 (m, 1H, H-3), 2.85 (d, $J = 11.7$, 1H), 2.60 (d, $J = 13.5$, 1H), 2.43-2.10 (m, 3H), 2.10-1.84 (m, 3H), 1.84-1.41 (m, 10H), 1.27 (s, 3H, Me-28), 0.80 (s, 3H, Me-18).

Estudios in vitro e in vivo

Materiales y Métodos

Ratones

Ratones macho C57/BL6J se adquirieron a Charles River (Francia) y los experimentos se llevaron a cabo a las 10-12 semanas de edad.

Análogos de Vitamina D

5 Se resuspendieron 1 mg de calcitriol (Sigma Aldrich) y de los compuestos **21** y **23** en etanol 100% a una concentración de 10mM y se mantuvieron a -20°C. Los ligandos se administraron por vía oral en 100 µL en aceite de maíz (Auchan, Francia).

Determinación de niveles séricos de calcio

10 Se preparó suero de ratón como se describe en Laverny et al, 2010 (Laverny G, Penna G, Vetrano S, Correale C, Nebuloni M, Danese S, Adorini L. (2010) Efficacy of a potent and safe Vitamin D receptor agonist for the treatment of inflammatory bowel disease. *Immunol Lett.* 131(1):49-58), y se determinaron los niveles de calcio en suero utilizando un ensayo colorimétrico de calcio (MAK022, Sigma Aldrich) siguiendo el protocolo del fabricante.

Administración de LPS a ratones

15 Se inyectó intraperitonealmente a los ratones 100 ng de LPS (E. coli 055B5, ref L6529, lote 105M4134V, Sigma Aldrich) en solución salina (100 µL) y la sangre se recogió 6 horas después.

Determinación de los niveles de IL-6

Los niveles de IL-6 en suero de ratones se determinaron mediante una prueba ELISA (ELISA IL-6 de ratón, ref: 88-7064-88, lote: 4300713) siguiendo el protocolo del fabricante.

20 Estimulación de células THP-1 mediante LPS

Se cultivaron un millón de células THP-1 derivadas de leucemia (ATCC) en 2 ml de medio (RPMI 1640 sin rojo de fenol + 10% FCS + HEPES 10 mM + Glucosa 2,5 g/L + piruvato de sodio 1 mM + Gentamicina 40 µg / mL) y se estimuló durante 6 h con 2 µg de LPS (E. coli 055B5, ref L6529, lote 105M4134V, Sigma Aldrich).

25 Determinación de niveles de transcriptor IL12/23p40

Las células THP-1 se recolectaron en 500 µl de Trizol y se aisló el ARN total siguiendo el protocolo del fabricante. Dos µg de ARN se retro-transcribieron siguiendo el protocolo del fabricante (SuperScript II, Ref 18064071, Fischer Scientific), y los niveles de transcripción de IL12 / 23p40 se determinaron usando la mezcla SyberGreen Master (Roche) y los
 5 cebadores 5'-ATCTGCCGCAAATGCCAG-3 '(sens) y 5'-TCAGAACCTAACTGCAGGGC-3' (antisens) en un LightCycler LC480 (Roche). Se usó la transcripción RPLP0 amplificada con los cebadores 5'-CGTCCTCGTGGAAGTGACAT-3 '(sens) y 5'-TAGTTGGACTTCCAGGTCGC-3' (antisens) para la normalización.

Cultivo de células PC-3

10 Diez mil células PC-3 (ATCC) se cultivaron en una placa de 96 pocillos en 200 mL de medio ((DMEM/F12 + 10 % FCS + 40 µg / mL gentamicina).

Ensayo de proliferación

La proliferación se evaluó utilizando bromuro de tiazolil azul tetrazolio (M5655, Sigma Aldrich), según lo descrito por el fabricante.

15 Ensayo con Luciferasa

Las células HEK293 EBNA se sembraron en placas de 24 pocillos (10⁵ células por pocillo) y se cultivaron durante la noche en DMEM sin rojo de fenol complementado con suero bovino fetal (FCS) tratado con carbón al 10%, gentamicina al 5% e insulina 0,6 mg / mL y se transfectaron con el vector de expresión hVDR de longitud completa, el plásmido
 20 indicador de luciferasa dirigido por la región promotora proximal (-414 a -64) del gen CYP24a1 humano fusionado con el promotor de la timidina quinasa y el vector pCH110 β-galactosidasa (utilizado como control interno para normalizar la variación en la transfección), como se describe en Huet T, Laverny G, Ciesielski F, Molnár F, Gali Ramamoorthy T, Belorusova AY, Antony P, Potier N, Metzger D, Moras D, Rochel N.
 25 (2015) Complete Vitamin D receptor ligand binding deficiency impairs more mineral and bone homeostasis than full receptor deficiency. *Cell reports*. 10(4):516-26. Cuatro horas después de las transfecciones, las células se lavaron con PBS. Se añadieron ligandos a las células en DMEM libre de rojo de fenol, complementado con FCS al 10%. Veinticuatro horas después del inicio de la estimulación, las células se lavaron en PBS y se lisaron en 100

μL de tampón de lisis del gen informador (Roche Diagnostics). Las actividades de la luciferasa se determinaron según lo recomendado por el proveedor (Perkin-Elmer) y se normalizaron a la actividad de la β-galactosidasa.

Cristalización y determinación de estructura

5 El pez cebra VDR LBD (aa 154-456) se expresó y purificó como se describió anteriormente (Huet et al, 2015). El ligando R2 y el péptido coactivador (686-KHKILHRLQLDSS-698) se agregaron a zVDR en un exceso de 3 veces para saturar los receptores. Los experimentos de cristalización se llevaron a cabo mediante la difusión de vapor de gota colgante a una temperatura de 290 K mezclando igual volumen de complejo proteína-ligando y de solución de reservorio (0.1 M BTP pH 7.0, 3 M NaOAc). Los cristales del complejo se transfirieron a licor madre artificial que contenía glicerol al 15% y se enfriaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Los datos de los cristales de zVDR-R2 se recolectaron en la línea de luz Proxima2 en el sincrotrón Soleil. Los datos brutos se procesaron y escalaron con el paquete de programas HKL2000 (Otwinowski Z, Minor W (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* 276:307–326 Academic Press (New York)). La estructura se disolvió y se refinó utilizando Buster (Bricogne G, Blanc E, Brandl M, Flensburg C, Keller P, Paciorek W, Roversi P, Sharff A, Smart OS, Vonrhein C, Womack TO. BUSTER version 2.11.2. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd 2011) y Phenix (Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D* 66:213-221) y la construcción de modelos iterativos utilizando COOT (Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D* 60:2126–2132).

Resultados

Para determinar la actividad transcripcional inducida por el calcitriol y por los compuestos **21** y **23**, las células HEK 293 transfectadas transitoriamente con vectores de expresión que codifican el hVDR de longitud completa y un plásmido informador de luciferasa que abarca la región promotora de hCYP24A1 (gen diana VDR) se trataron con varias concentraciones

de ligando. Los resultados muestran que el calcitriol induce una fuerte actividad transcripcional VDR de 10^{-8} a 10^{-6} M. Sin embargo, mientras que el calcitriol casi no induce actividad transcripcional a 10^{-10} M, el compuesto **21** a esta concentración induce una transcripción similar a la del calcitriol a 10^{-6} M. Además, el compuesto **23** a 10^{-12} M induce una actividad transcripcional similar al compuesto **21** a 10^{-10} M (Figura 1A). Por lo tanto, **21** y **23** inducen una mayor actividad transcripcional VDR que el calcitriol en bajas concentraciones.

Para determinar su actividad calcémica, se determinaron los niveles de calcio en suero después de la administración de diversas concentraciones de calcitriol, **21** y **23** a ratones. Los resultados muestran que $0,3 \mu\text{g} / \text{kg}$ de calcitriol o de **23**, y $0,03 \mu\text{g} / \text{kg}$ de **21**, no inducen hipercalcemia (Figura 1B). Por lo tanto, mientras **21** y **23** inducen actividades transcripcionales en concentraciones de 10^4 a 10^6 veces más bajas que el calcitriol, **23** no aumenta los niveles de calcio en suero en una concentración correspondiente a la concentración normocalcémica más alta de calcitriol. Además, **21** sigue siendo normocalcémico a una dosis 10 veces menor que **23** y calcitriol.

La estructura cristalina del pez cebra VDR LBD en complejo con **23** y un péptido coactivador se determinó y resolvió a una resolución de $2,9 \text{ \AA}$ con el procedimiento descrito en (Huet et al, 2015). El complejo conserva el pliegue general y una conformación agonista activa canónica. La estructura revela que el ligando **23** forma más contactos de van-der-Waals con el LBP de VDR que el calcitriol, en particular con las hélices H12 (Figura 2). Estos contactos adicionales junto con los enlaces triples de la cadena lateral bloquean la conformación activa de la cadena lateral, lo que explica la actividad transcripcional mejorada del ligando.

Para determinar su potencia antiinflamatoria, se determinaron los niveles de transcripción de IL12 / 23p40 en células THP1 estimuladas con LPS. Nuestros resultados muestran que **21** y **23** son tan eficientes como el calcitriol en una dosis 10 veces menor y 100 veces más baja, respectivamente (Figura 3A). Tenga en cuenta que el análogo de vitamina D Bxl-62, que se sabe que exhibe mayores actividades antiinflamatorias que el calcitriol en células mononucleares de sangre periférica humana tiene una actividad similar a la del calcitriol en las células THP-1 (Laverny G, Penna G, Vetrano S, Correale C, Nebuloni M, Danese S,

Adorini L. (2010) Efficacy of a potent and safe Vitamin D receptor agonist for the treatment of inflammatory bowel disease. *Immunol Lett.* 131(1):49-58; Laverny G, Penna G, Uskokovic M, Marczak S, Maehr H, Jankowski P, Ceailles C, Vouros P, Smith B, Robinson M, Reddy GS, Adorini L. (2009) Synthesis and anti-inflammatory properties of 1alpha, 25-dihydroxy-16-ene-20-cyclopropyl-24-oxo-vitamin D3, a hypocalcemic, stable metabolite of 1alpha, 25-dihydroxy-16-ene-20-cyclopropyl-vitamin D3. *J Med Chem.* 52(8):2204-13).

Además, en ratones, **21** y **23** reducen los niveles séricos de IL-6 estimulada por LPS en concentraciones 100 y 1000 veces más bajas que la dosis normocalcémica más alta probada, respectivamente (Figura 3B y 1B). Por lo tanto, **21** y **23** tienen propiedades antiinflamatorias más potentes que el calcitriol y un análogo potente conocido de la vitamina D.

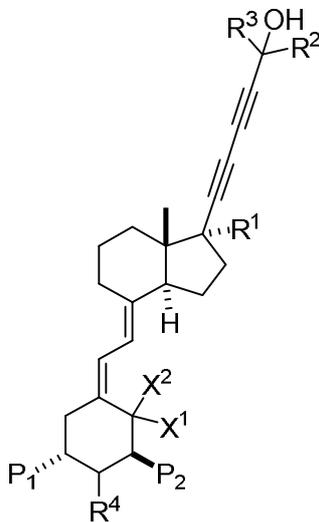
Para determinar la potencia antiproliferativa del calcitriol, **21**, **23** y Gemini-72, un análogo antiproliferativo bien conocido de la vitamina D (Huet et al, 2015), se cultivaron PC-3 durante 96 horas en presencia de ligando 1 nM. Los resultados muestran que **23** reduce la proliferación de PC-3 en un 50%, mientras que el calcitriol, **21** y Gemini-72 no tienen ningún efecto (Figura 4). Por lo tanto, **23** tiene una potente potencia antiproliferativa..

Tomados en conjunto, nuestros resultados muestran que **21** y **23** exhiben mayores actividades antiinflamatorias y antiproliferativas que el calcitriol y los análogos descritos previamente en concentraciones normocalcémicas, y por lo tanto muestran una ventana terapéutica mayor.

20

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I), o uno de sus estereoisómeros, o sus sales farmacéuticamente aceptables,

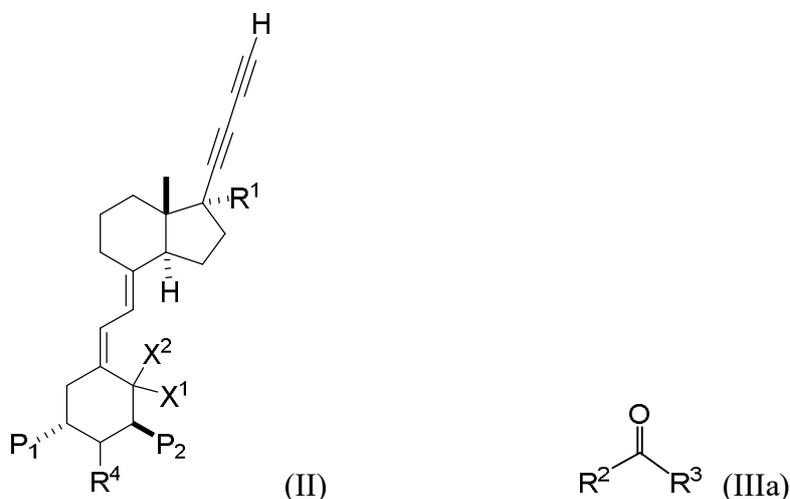


(I)

- 5 donde R¹ es (C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)alquenilo, (C₁-C₁₂)alquinilo, (C₁-C₁₂)heteroalquilo, (C₂-C₁₂)heteroalquenilo y (C₁-C₁₂)heteroalquinilo, cada uno de R² y R³ se selecciona independientemente de entre (C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)alquenilo, (C₁-C₁₂)alquinilo,
- 10 R⁴ se selecciona de entre hidrógeno, (C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)hidroxialquilo, (C₂-C₁₂)alquenilo, (C₂-C₁₂)hidroxialquenilo, (C₂-C₁₂)alquinilo, (C₂-C₁₂)hidroxialquinilo, (C₁-C₁₂)heteroalquilo, (C₂-C₁₂)heteroalquenilo, (C₁-C₁₂)heteroalquinilo, (C₆-C₁₀)arilo, (C₃-C₁₅)heteroarilo, (C₆-C₁₀)aril(C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)alquilacilo, (C₆-C₁₀)arilacilo, (C₁-C₁₂)alcoxilo, (C₆-C₁₀)ariloxilo, (C₁-C₁₂)alquilcarboxi, (C₆-C₁₀)arilcarboxi, (C₁-C₁₂)carbociclo, (C₃-C₁₅)heterociclo, O-
- 15 (C₁-C₁₂)alquilo y O-(C₁-C₁₂)heteroalquilo, cada uno de P¹ y P² se selecciona independientemente de entre hidrógeno, -OH, (C₁-C₁₂)alcoxilo, (C₆-C₁₀)ariloxilo, (C₁-C₁₂)alquilcarboxi, (C₆-C₁₀)arilcarboxi y -OSiR^aR^bR^c, donde cada uno de R^a, R^b y R^c se seleccionan de entre (C₁-C₁₂)alquilo, (C₆-C₁₀)arilo, (C₆-C₁₀)aril, (C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)alcoxilo, (C₆-C₁₀)ariloxilo y
- 20 (C₃-C₁₅)heterociclo, y

X^1 y X^2 son hidrógeno o bien forman conjuntamente con el átomo de carbono al que están unidos un grupo metileno ($=CH_2$).

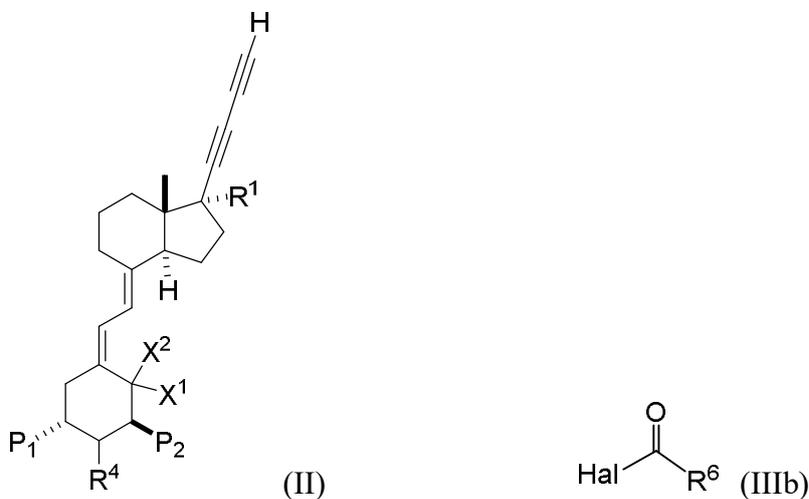
2. Compuesto según la reivindicación 1, donde P^1 y P^2 son $-OH$ o $-OSiR^aR^bR^c$, donde cada uno de R^a , R^b y R^c son como se han descrito en la reivindicación 1.
- 5 3. Compuesto según la reivindicación 1, donde X^1 y X^2 forman conjuntamente con el átomo de carbono al que están unidos un grupo metileno ($=CH_2$).
4. Compuesto según la reivindicación 1, donde R^2 y R^3 son un (C_1-C_{12}) alquilo.
5. Compuesto según la reivindicación 1, donde R^2 y R^3 son trifluorometilo.
6. Compuesto según la reivindicación 1, que incorpora marcaje isotópico.
- 10 7. Compuesto según la reivindicación 1, donde R^2 y R^3 son iguales y se seleccionan de entre el grupo constituido por $^2H_n-(C_1-C_{12})$ alquilo, $^3H_n-(C_1-C_{12})$ alquilo, donde n tiene un valor entre 1 y 6.
8. Procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I), como se ha descrito en la reivindicación 1, que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (IIIa) en presencia de una base,
- 15



donde R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , P_1 , P_2 , X^1 , X^2 son como se han descrito en la reivindicación 1.

9. Procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I), como se ha descrito en la reivindicación 1, que comprende:
- 20 (a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II) con un compuesto de fórmula (IIIb) en presencia de una base, y

(b) reacción del intermedio obtenido en la etapa (a) con un compuesto de fórmula R^2M y/o R^3M ,



5

donde R^6 se selecciona de (C_1-C_{12}) alquilo y (C_6-C_{10}) arilo,

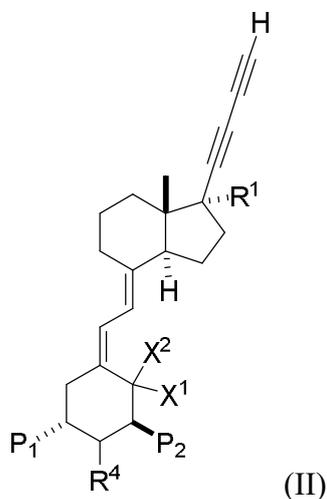
Hal es un halógeno de entre cloro, bromo, yodo,

M es un metal o un haluro metálico, y

$R^1, R^2, R^3, R^4, P_1, P_2, X^1, X^2$ son como se han descrito en la reivindicación 1.

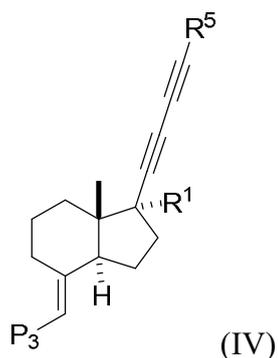
- 10 10. Compuesto de fórmula (I) según se ha descrito en la reivindicación 1, para uso como medicamento.
11. Compuesto de fórmula (I) según se ha descrito en la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de enfermedades o condiciones relacionadas con la deficiencia de vitamina D.
- 15 12. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 11, donde las enfermedades o condiciones relacionadas con la deficiencia de vitamina D se seleccionan del grupo que consiste en raquitismo, osteoporosis, osteodistrofia, osteomalacia y fracturas.
13. Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de psoriasis, diabetes, enfermedades autoinmunes, degenerativas,
- 20 endocrinológicas, cardiovasculares, metabólicas, infecciosas, o tumorales.
14. Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

15. Compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 14, donde las enfermedades neoplásicas se seleccionan del grupo que consiste en cáncer de mama, ovario, próstata, pulmón, leucemia, tumores sólidos y tumores hematológicos.
16. Combinación de al menos un compuesto de fórmula (I), como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y al menos un compuesto antineoplásico.
- 5 17. Uso de un compuesto de fórmula (I), como se ha definido en la reivindicación 6 o 7, como patrón interno en técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
18. Uso de un compuesto de fórmula (I), como se ha definido en la reivindicación 6 o 7, para la preparación de un radiofármaco.
- 10 19. Compuesto de fórmula (II)



donde R¹, R⁴, P₁, P₂, X¹, X² son como se han descrito en la reivindicación 1.

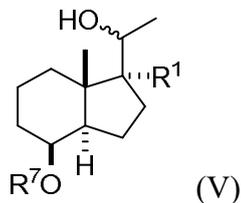
20. Compuesto de fórmula (IV)



- 15 donde R⁵ se selecciona de entre hidrógeno y -SiR^aR^bR^c, donde cada uno de R^a, R^b y R^c se seleccionan de entre (C₁-C₁₂)alquilo, (C₆-C₁₀)arilo, (C₆-C₁₀)aril, (C₁-C₁₂)alquilo, (C₁-C₁₂)alcoxilo, (C₆-C₁₀)ariloxilo y (C₃-C₁₅)heterociclo,

P_3 se selecciona de entre di(C_1 - C_{12})alcoiboro, di(C_1 - C_{12})alquilbora, haluro de indio, di(C_1 - C_{12})alquilindio, di(C_1 - C_{12})arilindio, (C_1 - C_{12})alquil(C_6 - C_{10})arilindio, litio, haluro de cinc, (C_1 - C_{12})alquilcinc, cloro, bromo y yodo, y R^1 como se ha descrito en la reivindicación 1.

5 21. Compuesto de fórmula (V)



donde R^7 es $-SiR^aR^bR^c$, donde cada uno de R^a , R^b y R^c se seleccionan de entre (C_1 - C_{12})alquilo, (C_6 - C_{10})arilo, (C_6 - C_{10})aril, (C_1 - C_{12})alquilo, (C_1 - C_{12})alcoxilo, (C_6 - C_{10})ariloxilo y (C_3 - C_{15})heterociclo, y

10 R^1 como se ha descrito en la reivindicación 1.

22. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I), tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, junto con uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

15

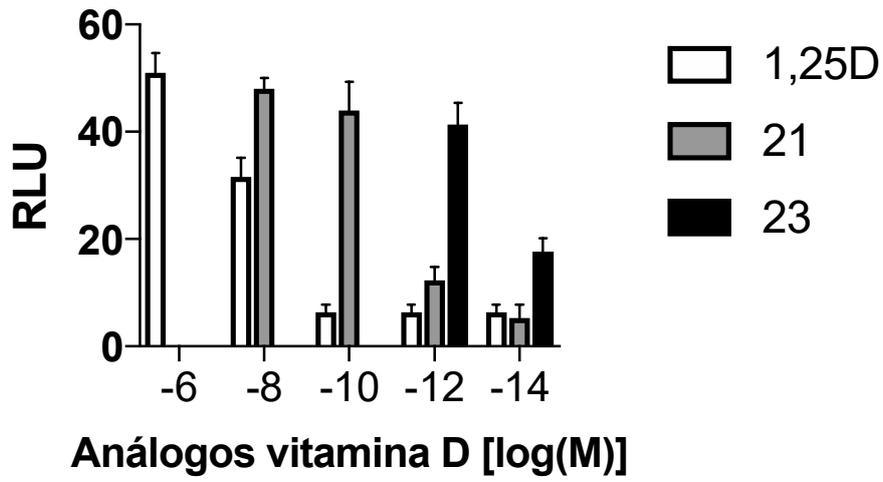


Figura 1 A

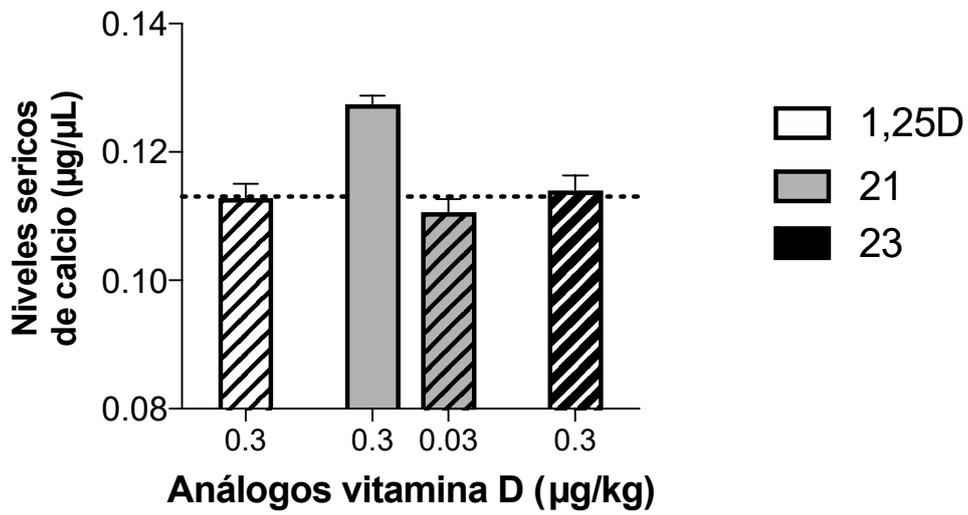


Figura 1 B

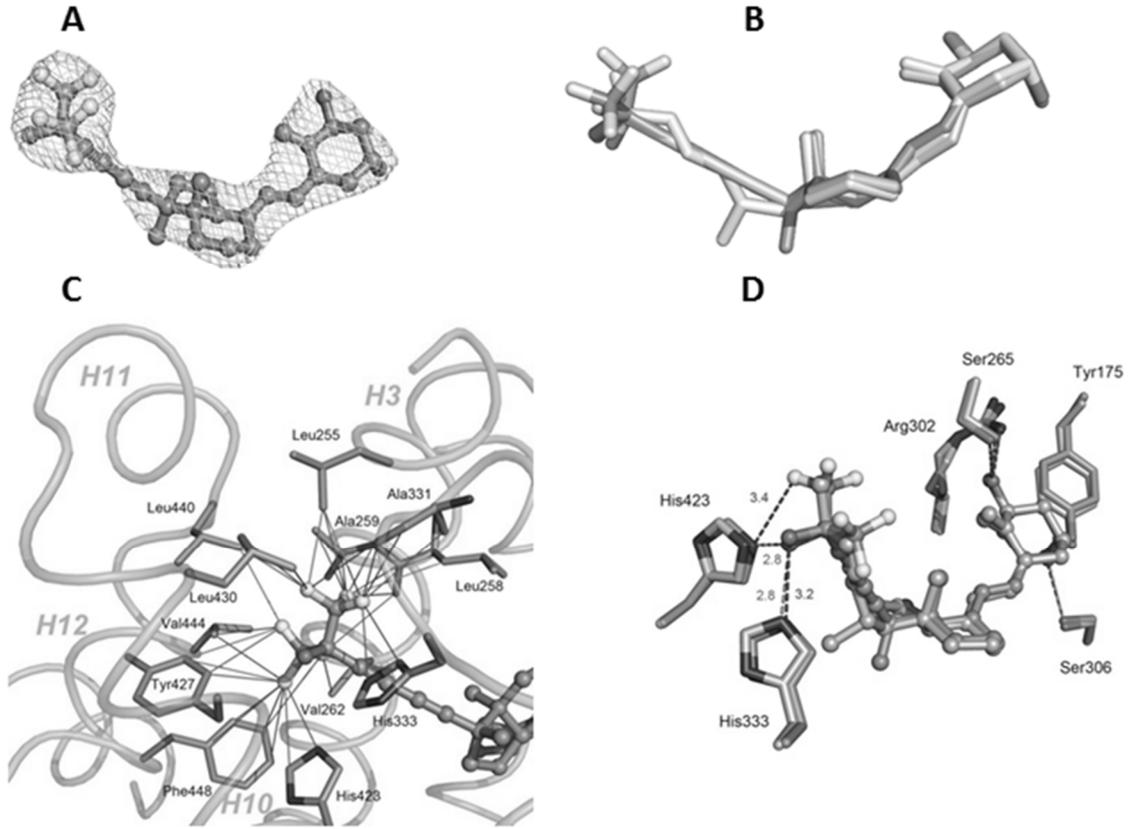


Figura 2

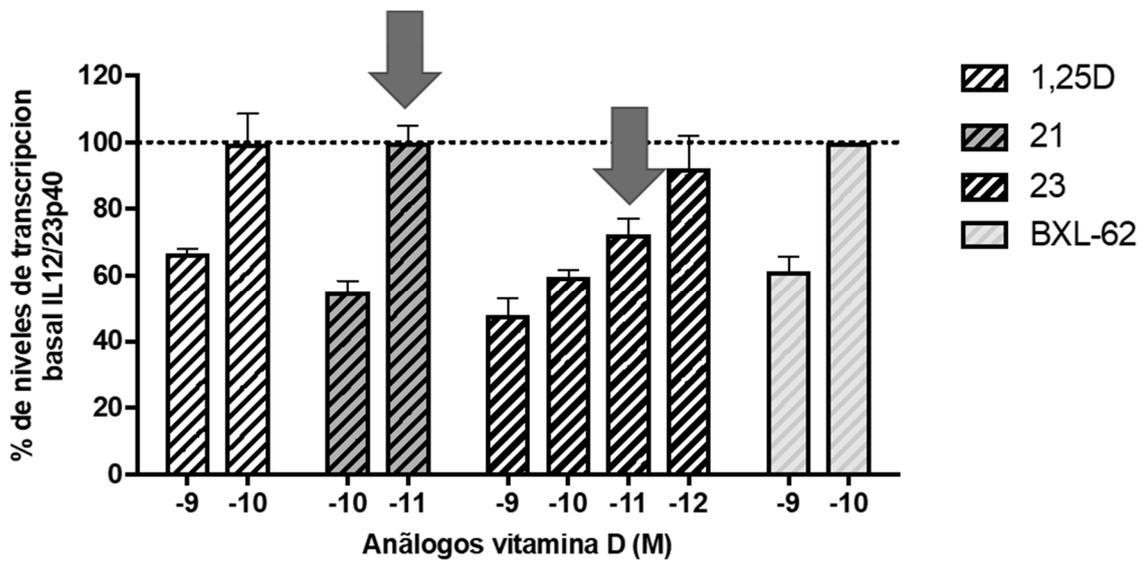


Figura 3 A

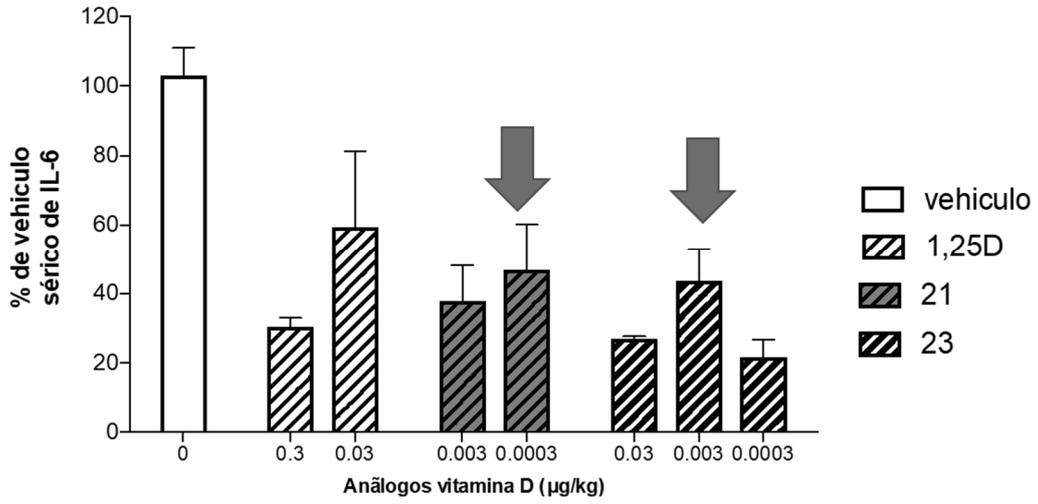


Figura 3 B

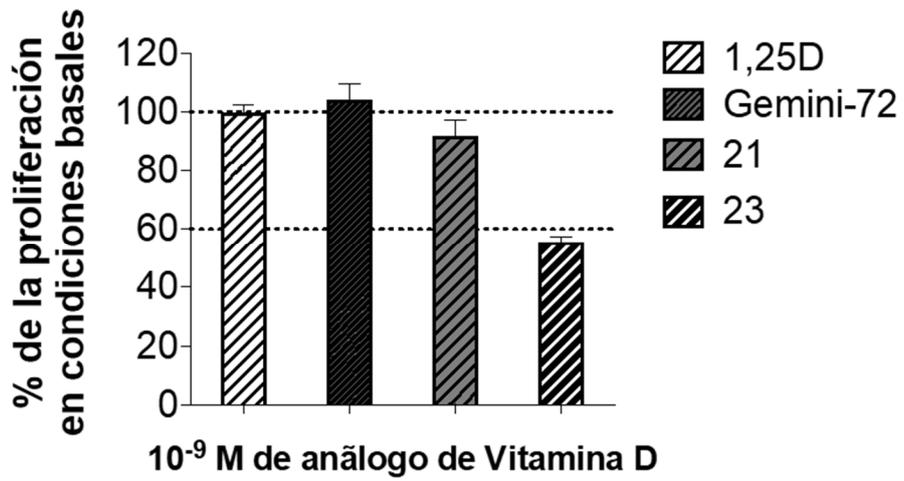


Figura 4



- ②① N.º solicitud: 201831084
②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.11.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2004/098612 A2 (AB SCIENCE) 18/11/2004, reivindicaciones 1-4, compuestos de fórmula (III)	1-22
A	EP 2682386 A1 (UNIVERSITY NIHON) 08/01/2014, reivindicación 1, página 19 esquema de síntesis	1-22
A	X PÉREZ-GARCÍA et al. The first locked side-chain analogues of calcitriol (1-alpha,25-dihydroxy vitamin D3) induce vitamin D receptor transcriptional activity. Organic Letters, 2003, Vol. 5, Páginas 4033-4036 todo el documento	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.02.2019

Examinador
M. Fernández Fernández

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C401/00 (2006.01)

A61K31/592 (2006.01)

A61K31/593 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07C, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, ESPACENET, CAS, REGISTRY, NPL, BIOSIS