



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 914**

51 Int. Cl.:
A61K 31/59 (2006.01)
C07C 401/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05849207 .5**
96 Fecha de presentación : **18.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1827452**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **2-metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxi-bishomopregnacalciferol.**

30 Prioridad: **22.11.2004 US 629958 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2011

73 Titular/es:
WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
614 North Walnut Street Post Office Box 7365
Madison, Wisconsin 53707-7365, US

72 Inventor/es: **Deluca, Hector F.;**
Plum, Lori A. y
Clagett-Dame, Margaret

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 914 T3

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

DESCRIPCIÓN

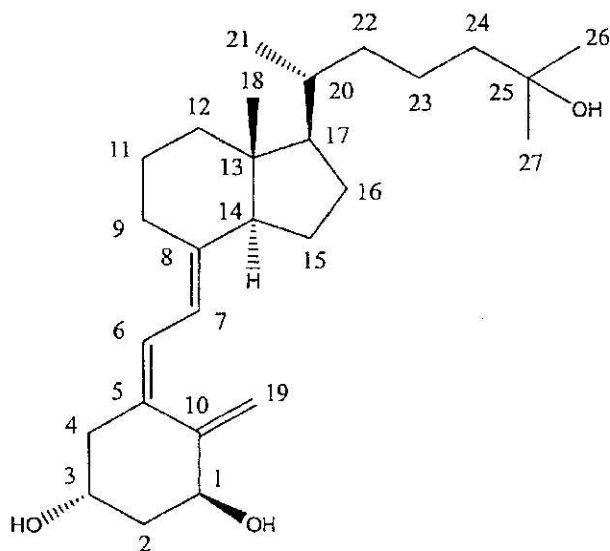
2-Metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxi-bishomopregnacalciferol

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a compuestos de vitamina D, y más particularmente a 2-metileno-19,21-1 α -hidroxi-bishomopregnacalciferol y a formulaciones farmacéuticas que incluyen este compuesto. La invención se refiere también al uso de 2-metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxi-bishomopregnacalciferol o sus sales en la preparación de medicamentos para uso para tratar diversas enfermedades.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Se sabe que la hormona natural 1 α ,25-dihydroxivitamina D₃ (también denominada 1 α ,25-dihidroxicolecalciferol y calcitriol) y su análoga en la serie de ergosterol, es decir, 1 α ,25-dihydroxivitamina D₂, son reguladores muy potentes de la homeostasis del calcio en animales y seres humanos, y se ha establecido también su actividad en la diferenciación celular, Ostrem et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2610 (1987). Se han preparado y ensayado muchos análogos estructurales de estos metabolitos, incluyendo 1 α -hidroxivitamina D₃, 1 α -hidroxivitamina D₂, varias vitaminas homologadas de cadena lateral, y análogos fluorados. Algunos de estos compuestos exhiben una interesante separación de actividades en diferenciación celular y regulación de calcio. Esta diferencia de actividad puede ser útil en el tratamiento de varias enfermedades como osteodistrofia renal, raquitismos resistentes a vitamina D, osteoporosis, psoriasis, y ciertas neoplasias malignas. La estructura de 1 α ,25-dihydroxivitamina D₃ y el sistema de numeración usado para denotar los átomos de carbono en este compuesto se muestran a continuación.



20 1 α ,25-dihydroxivitamina D₃ = 1 α ,25-dihidroxicolecalciferol = calcitriol

25 Otra clase de análogos de vitamina D, es decir, los llamados compuestos de 19-norvitamina D, están caracterizados por la sustitución del grupo metileno exocíclico del anillo A (carbono 19), típico del sistema de la vitamina D, por dos átomos de hidrógeno. El ensayo biológico de tales 19-nor-análogos (por ejemplo, 1 α ,25-dihidroxi-19-nor-vitamina D₃) reveló un perfil de actividad selectiva con alta potencia para inducir diferenciación celular, y muy baja actividad de movilización de calcio. De este modo, estos compuestos son potencialmente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de neoplasias malignas, o el tratamiento de diversos trastornos de la piel. Se han descrito dos diferentes modos de síntesis de tales análogos de 10-nor-vitamina D (Perlman et al., Tetrahedron Lett. 31, 1823 (1990); Perlman et al., Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991), y DeLuca et al., U.S. Pat. No. 5.086.191).

30 En la patente de EE.UU. No. 4.666.634, se han descrito y examinado análogos 2 β -hidroxi y alcoxi (por ejemplo, ED-71) de 1 α ,25-dihydroxivitamina D₃ por el grupo de Chugai como fármacos potenciales para la osteoporosis y como agentes antitumorales. Véase también Okano et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 1444 (1989). Se han preparado y ensayado también otros análogos de anillo A substituidos en 2 (con hidroxialquilo, por ejemplo, ED-120, y grupos floroalquilo) de 1 α ,25-dihydroxivitamina D₃ (Miyamoto et al., Chem. Pharm. Bull. 41, 1111 (1993); Nishii et al., Osteoporosis Int. Suppl. 1, 190 (1993); Posner et al., J. Org. Chem. 59, 7855 (1994), y J. Org. Chem. 60, 4617 (1995)).

35 Se han sintetizado también varios análogos 2-substituidos de 1 α ,25-dihidroxi-19-nor-vitamina D₃, es decir,

5 compuestos sustituidos en la posición 2 con grupos hidroxilo o alcoxi (DeLuca et al., U.S. Pat. No. 5.536.713), con grupos 2-alquilo (DeLuca et al., U.S. Patent No. 5.945.410), y con grupos 2-alquilideno (DeLuca et al., U.S. Patent No. 5.843.928), que exhiben interesantes y selectivos perfiles de actividad. Todos estos estudios indican que los sitios de unión en los receptores de vitamina D pueden acomodar diferentes sustituyentes en C-2 en los análogos de vitamina D sintetizados.

10 En un esfuerzo continuo para explorar la clase 19-nor de compuestos de vitamina D farmacológicamente importantes, se han sintetizado y analizado también análogos que están caracterizados por la presencia de un sustituyente metileno en el carbono 2 (C-2), un grupo hidroxilo en el carbono 1 (C-1), y una cadena lateral acortada unida al carbono 20 (C-20). El 1 α -hidroxil-2-metileno-19-nor-pregnacalciferol se describe en la patente de EE.UU. No. 6.566.352 mientras que el 1 α -hidroxil-2-metileno-19-nor-(20S)-homopregnacalciferol se describe en la patente de EE.UU. No. 6.579.861 y el 1 α -hidroxil-2-metileno-19-nor-bis-homopregnacalciferol se describe en la patente de EE.UU. No. 6.627.622. Todos estos tres compuestos tienen relativamente alta actividad de unión a receptores de vitamina D y relativamente alta actividad de diferenciación celular, pero poca, si acaso, actividad calcémica comparados con la 1 α ,25-hidroxivitamina D₃. Sus actividades biológicas hacen a estos compuestos excelentes candidatos para varios usos farmacéuticos, como se expone en las patentes 6.566.352, 6.579.861 y 6.627.622.

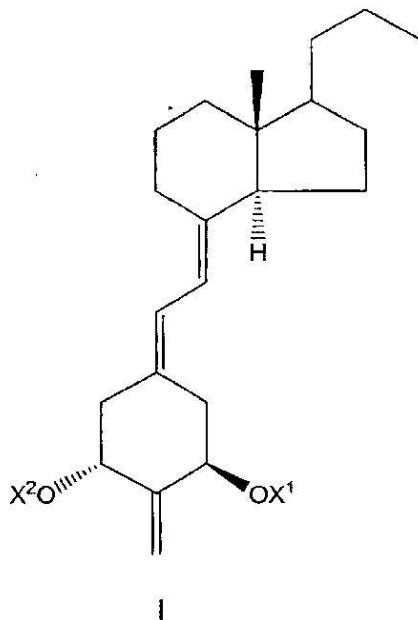
15 Plum et al. en Proc. Acad. Sci. USA, 101(18), (04-05-2004), páginas 6900-6904 describe análogos no calcémicos biológicamente activos de 1 α ,25-dihidroxivitamina D con una cadena lateral acortada que no contiene hidroxilo. Los compuestos tienen una cadena lateral etilo en la posición 17.

20 El documento WO 03/075932 proporciona 1 α -hidroxil-2-metileno-19-nor-pregnacalciferol y su uso como agente anticancerígeno y para el tratamiento de enfermedades de la piel tales como psoriasis.

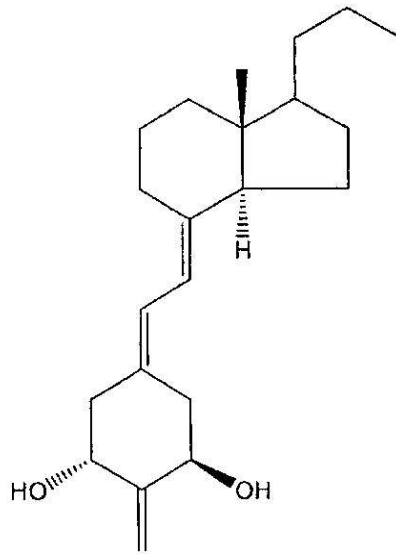
SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona 2-metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxil-bishomopregnacalciferol y compuestos relacionados, formulaciones farmacéuticas que incluyen 2-metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxil-bishomopregnacalciferol, y el uso de este compuesto en la preparación de medicamentos para uso para tratar varios estados de enfermedad.

25 Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula I mostrada a continuación.



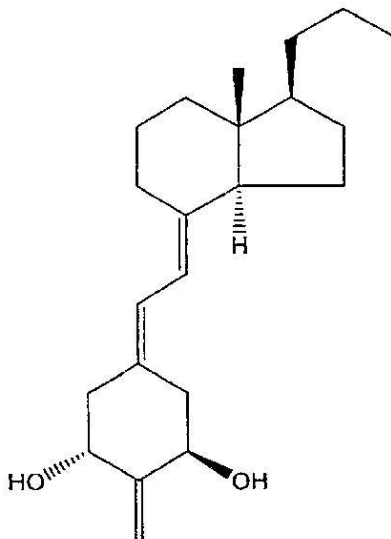
30 en la que X¹ y X² pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de H o grupos protectores de hidroxilo. En algunas realizaciones, X¹ y X² son ambos grupos protectores de hidroxilo tales como grupos sililo. En algunas de tales realizaciones, X¹ y X² son ambos grupos 1-butildimetilsililo. En otras realizaciones, X¹ y X² son ambos H de tal modo que el compuesto es 2-metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxil-bishomopregnacalciferol que tiene la fórmula IA como se muestra a continuación:



IA

En algunas de tales realizaciones, el compuesto de fórmula IA es un compuesto de fórmula IB y tiene la estructura mostrada a continuación:

5



IB

El compuesto anterior exhibe un deseado y muy ventajoso patrón de actividad biológica. Este compuesto está caracterizado por una relativamente alta unión a receptores de vitamina D, pero muy baja actividad de transporte de calcio intestinal, comparado con la de 1 α ,25-dihidroxitamina D₃, y tiene muy baja capacidad para movilizar calcio óseo, comparado con la 1 α ,25-dihidroxitamina D₃. Por consiguiente, este compuesto se puede caracterizar por tener poca, si acaso, actividad calcémica. De este modo, puede ser útil como terapia para la supresión del hiperparatiroidismo secundario y osteodistrofia renal.

El compuesto de la invención es también especialmente apropiado para el tratamiento y profilaxis de trastornos humanos que están caracterizados por un desequilibrio en el sistema inmune, por ejemplo, en enfermedades autoinmunes, que incluyen esclerosis múltiple, lupus, diabetes melitus, reacción del receptor al injerto, y rechazo de

trasplantes de órganos; y adicionalmente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, asma, y enfermedades inflamatorias intestinales tales como enfermedad celíaca, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. El acné, la alopecia y la hipertensión son otros estados que se pueden tratar con el compuesto de la invención.

5 El compuesto anterior está también caracterizado por la relativamente alta actividad de diferenciación celular. De este modo, este compuesto proporciona también un agente terapéutico para el tratamiento de psoriasis, o como agente anticancerígeno, especialmente contra leucemia, cáncer de colon, cáncer de pecho y cáncer de próstata. Además, debido a su relativamente alta actividad de diferenciación celular, este compuesto proporciona un agente terapéutico para el tratamiento de distintos estados de la piel que incluyen arrugas, carencia de adecuada hidratación dérmica, es decir, piel seca, carencia de adecuada firmeza de la piel, es decir, piel laxa, e insuficiente secreción de sebo. El uso de este compuesto de este modo no solo da como resultado el humedecimiento de la piel sino también mejora la función de barrera de la piel.

10 Los compuestos de la invención se pueden usar para preparar formulaciones farmacéuticas o medicamentos que incluyen un compuesto de la invención en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales formulaciones farmacéuticas y medicamentos se pueden usar para tratar varios trastornos biológicos tales como los descritos aquí. Los métodos para tratar tales trastornos incluyen típicamente administrar una cantidad efectiva del compuesto o una cantidad apropiada de una formulación farmacéutica o un medicamento que incluye el compuesto a un sujeto que padece un trastorno biológico. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas de tales reivindicaciones, el mamífero se selecciona de un roedor, un primate, un bovino, un equino, un canino, un felino, un úrsido, un porcino, un conejo, o una cobaya. En algunas de tales reivindicaciones, el mamífero es una rata o es un ratón. En algunas reivindicaciones, el sujeto es un primate tal como, en algunas reivindicaciones, un ser humano.

15 El compuesto puede estar presente en una composición para tratar las anteriormente mencionadas enfermedades y trastornos en una cantidad de alrededor de 0,01 $\mu\text{g/g}$ a alrededor de 1 mg/g de la composición, preferentemente de alrededor de 0,1 $\mu\text{g/g}$ a 500 $\mu\text{g/g}$ de la composición, y se puede administrar tópicamente, transdérmicamente, oralmente, o parenteralmente en dosis de alrededor de 0,01 $\mu\text{g/día}$ a alrededor de 1 mg/día , preferentemente de alrededor de 0,1 $\mu\text{g/día}$ a alrededor de 500 $\mu\text{g/día}$.

Los objetivos, características y ventajas adicionales de la invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada y dibujos.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1-7 ilustran varias actividades biológicas de 2-metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxi-bishomopregnacalciferol (denominado "19,21-dinor" en las Figuras) comparadas con las de la hormona nativa 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (denominada "1,25(OH)₂D₃" en las Figuras).

35 La Figura 1 es un gráfico que compara la actividad relativa de 19,21-dinor y 1,25(OH)₂D₃ para competir por la unión con [³H]-1,25-(OH)₂-D₃ en toda la longitud del receptor recombinante de vitamina D de rata.

La Figura 2 es un gráfico que compara el porcentaje de diferenciación de células HL-60 como función de la concentración de 19,21-dinor con el de 1,25(OH)₂D₃.

La Figura 3 es un gráfico que compara la actividad de transcripción in vitro de 19,21-dinor con la de 1,25-(OH)₂D₃.

40 La Figura 4 es un gráfico de barras que compara la actividad de movilización de calcio óseo de 19,21-dinor con la de 1,25(OH)₂D₃.

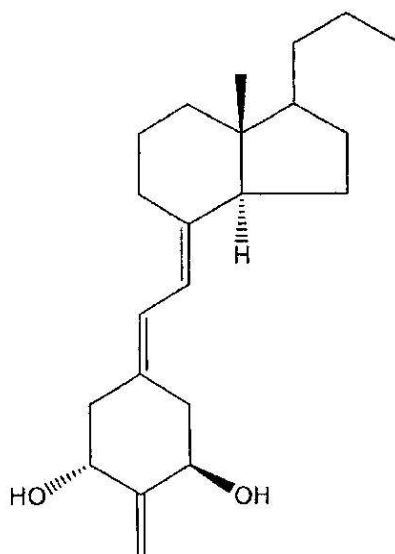
La Figura 5 es un gráfico de barras que compara la actividad de transporte de calcio intestinal de 19,21-dinor con la de 1,25(OH)₂D₃.

La Figura 6 es un gráfico de barras que compara los niveles de calcio en suero en ratas adultas después de la administración de 19,21-dinor y 1,25(OH)₂D₃.

45 La Figura 7 es un gráfico de barras que compara el porcentaje de supresión de la hormona paratiroidea (PTH) en ratas adultas de 19,21-dinor con 1,25(OH)₂D₃.

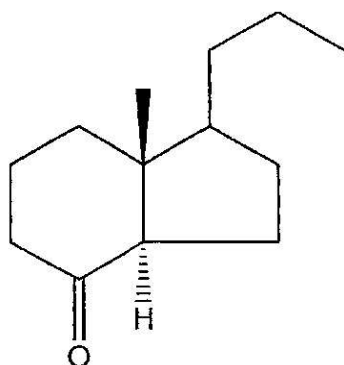
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 Se sintetizó y analizó 2-metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxi-bishomopregnacalciferol, y se encontró que era útil para tratar varios estados biológicos como se describe aquí. Estructuralmente, este compuesto tiene la fórmula IA como se muestra a continuación:

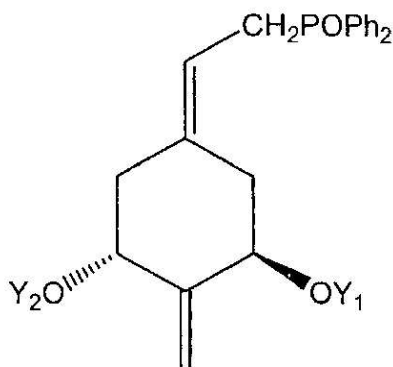


IA

La preparación de 2-metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxi-bishomopregnacalciferol se puede conseguir condensando una cetona (II) bicíclica apropiada del tipo de Windaus-Grundmann con el óxido de fosfina alílica III seguido de desprotección (retirada de los grupos Y₁ e Y₂).



II



III

5

10

En el óxido de fosfina III, Y₁ e Y₂ son preferentemente grupos protectores de hidroxi tales como grupos protectores sililo. El grupo t-butildimetilsililo (TBDMS) es un ejemplo de un grupo protector de hidroxi particularmente útil. El procedimiento descrito anteriormente representa una aplicación del concepto de síntesis convergente, que se ha aplicado efectivamente para la preparación de numerosos compuestos de vitamina D (véase Lythgoe et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 590 (1978); Lythgoe, Chem. Soc. Rev. 9, 449 (1983); Toh et al., J. Org. Chem. 48, 1414 (1983); Baggiolini et al., J. Org. Chem. 51, 3098 (1986); Sardina et al., J. Org. Chem. 51, 1264 (1986); J. Org. Chem. 51, 1269 (1986); DeLuca et al., U.S. Patent No. 5.086.191; DeLuca et al., U.S. Patent No. 5.536.713; y DeLuca et al., U.S. Patent No. 5.843.928 todas las cuales por la presente se incorporan como referencia en su totalidad y para todos los propósitos como si se expusieran aquí completamente).

15

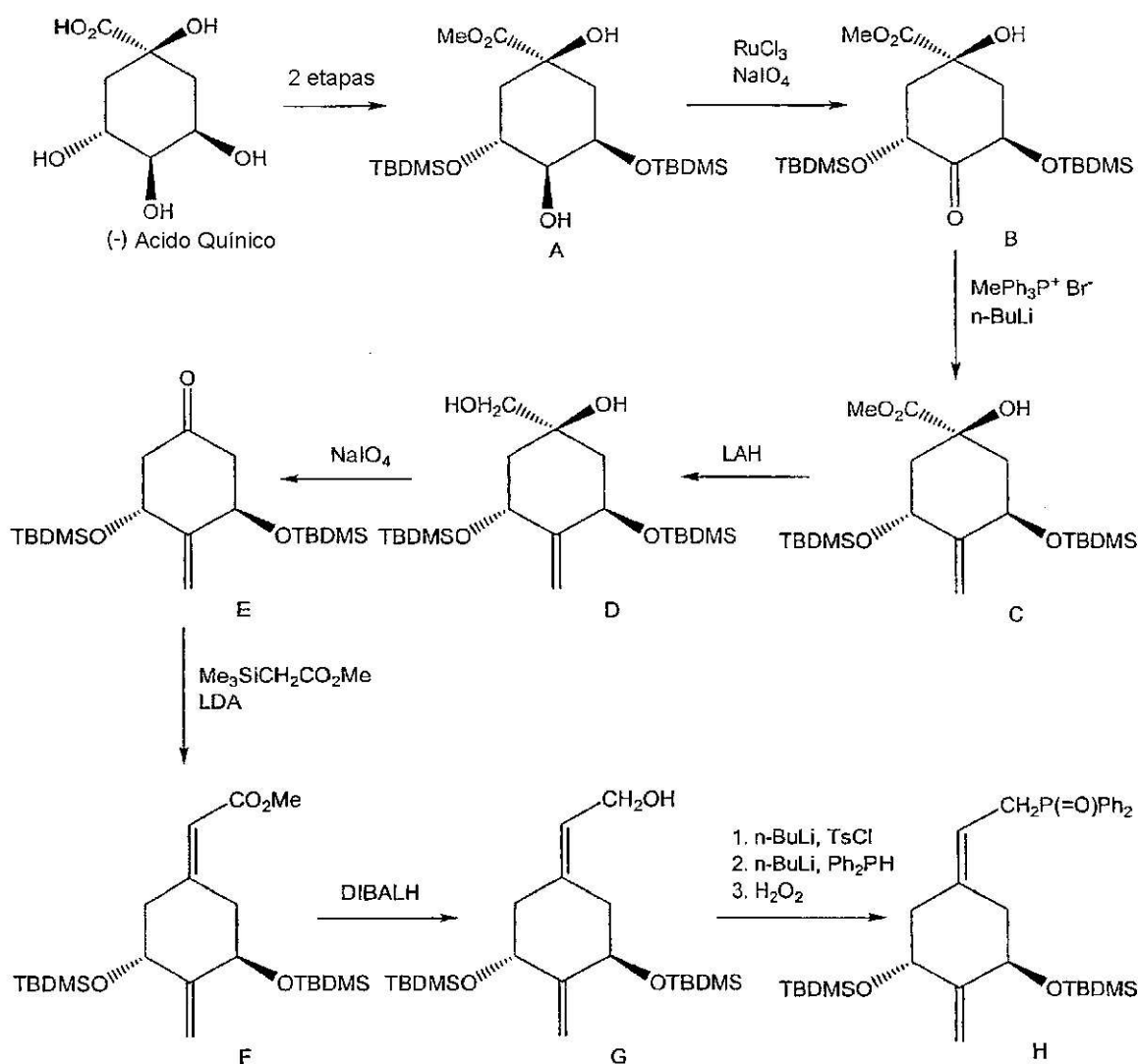
20

El óxido de fosfina III es un reactivo conveniente que se puede usar para preparar un gran número de compuestos de 19-norvitamina D y se puede preparar según los procedimientos descritos por Sicinski et al., J. Med. Chem., 41, 4662 (1998), DeLuca et al., U.S. Patent No. 4.843.928; Perlman et al., Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991); y DeLuca et al., U.S. Patent No. 5.086.191. El esquema I muestra el procedimiento general para sintetizar óxido de fosfina III según se resume en la patente de EE.UU. No. 5.843.928 que por la presente se incorpora como referencia en su totalidad como si se expusiera aquí completamente. La modificación del método mostrado en el Esquema I se puede usar para producir un gran número de análogos de vitamina D como será evidente para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar una amplia variedad de compuestos de fosfonio en lugar del MePh₃P⁺Br⁻ usado para

5 convertir la cetona B en alqueno C. Los ejemplos de tales compuestos incluyen $\text{EtPh}_3\text{P}^+\text{Br}^-$, $\text{PrPh}_3\text{P}^+\text{Br}^-$, y compuestos generalmente preparados por reacción de trifenilfosfina con un haluro de alquilo, un haluro de alqueno, un haluro de hidroxialquilo protegido, un haluro de hidroxialqueno protegido. Los alquenos preparados usando este procedimiento se pueden transportar a continuación para preparar un óxido de fosfina de una manera análoga a la usada para preparar óxido de fosfina H en el Esquema I. Alternativamente, un alqueno análogo al compuesto C del Esquema I se puede reducir con $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$ e H_2 para proporcionar otros análogos de vitamina D. Véase la patente de EE.UU. No. 5.945.410 y Sicinski, R.R. et al., J. Med. Chem., 41, 4662-4674 (1998) las cuales por la presente se incorporan como referencia en su totalidad y para todos los propósitos. Por lo tanto, el procedimiento para formar el óxido de fosfina mostrado en el Esquema I se puede usar para preparar una amplia variedad de análogos de vitamina D además del compuesto de la presente invención.

10

Esquema I



15 Las hidraindanonas de estructura II se pueden preparar por métodos conocidos o métodos adaptados como será fácilmente evidente para un experto en la técnica y se describen aquí. Los ejemplos específicos de algunas cetonas bicíclicas importantes usadas para sintetizar análogos de vitamina D son aquellos descritos en Mincione et al., Synth. Commun 19, 723 (1989); y Peterson et al., J. Org. Chem. 51, 1948 (1986).

Un procedimiento general para sintetizar compuestos de 2-alkilideno-19-nor-vitamina D se ilustra y describe en la patente de EE.UU. No. 5.843.928 que por la presente se incorpora como referencia en su totalidad y para todos los propósitos como si se expusiera aquí completamente.

Tal como se usa aquí, la expresión “grupo protector de hidroxilo” significa cualquier grupo comúnmente usado para la protección temporal del grupo funcional hidroxilo (-OH), tales como, pero no está limitado a, grupos alcoxicarbonilo, acilo, alquilsililo o alquilarilsililo (denominados aquí a continuación para simplificar grupos “sililo”), y grupos alcoxialquilo. Los grupos protectores alcoxicarbonilo son grupos alquil-O-CO- tales como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxicarbonilo, isopropoxicarbonilo, butoxicarbonilo, isobutoxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo o aliloxicarbonilo. El término “acilo” significa un grupo alcanilo de 1 a 6 átomos de carbono, en todas sus formas isómeras, o un grupo carboxialcanilo de 1 a 6 carbonos, tal como un grupo oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, o un grupo acilo aromático tal como benzoilo, o un grupo halo, nitro o benzoilo substituido con alquilo. Los grupos protectores alcoxialquilo son grupos tales como metoximetilo, etoximetilo, metoxietoximetilo, o tetrahidrofuranilo y tetrahidropiranilo. Los grupos protectores sililo preferidos son trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, dibutilmetilsililo, difenilmetilsililo, fenildimetilsililo, difenil-t-butilsililo y radicales sililo alquilados análogos. El término “arilo” especifica un grupo fenilo substituido con fenilo, o un alquilo, nitro o halo. Una extensa lista de grupos protectores para la funcionalidad hidroxilo se puede encontrar en Protective Groups in Organic Synthesis, Greene, T.W.; Wuts, P.G.M., John Wiley & Sons, New York, NY (3rd Edition, 1999) que se pueden añadir o retirar usando los procedimientos expuestos aquí y que por la presente se incorpora como referencia en su totalidad y para todos los propósitos como si se expusiera aquí completamente.

Un grupo “hidroxilo protegido” es un grupo hidroxilo derivado o protegido por cualquiera de los grupos anteriores comúnmente usados para la protección temporal o permanente de grupos funcionales hidroxilo, por ejemplo, los grupos sililo, alcoxialquilo, acilo o alcoxicarbonilo, como se define previamente.

20 Ejemplos

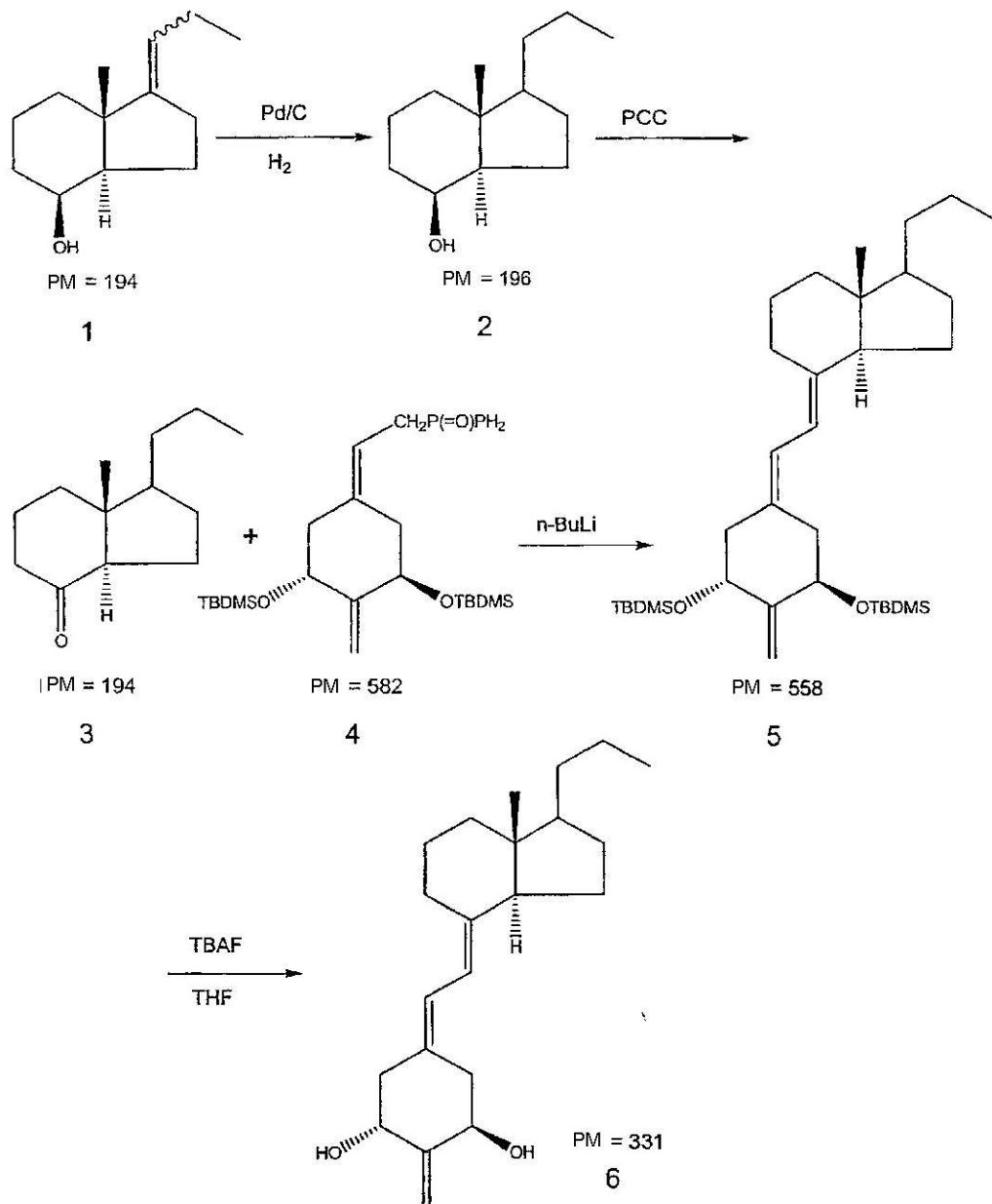
Síntesis de 2-metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxibishomopregnacalciferol

La síntesis y características de varios análogos de 19-nor-vitamina D se describen en numerosas patentes de EE.UU. que incluyen la patente de EE.UU. No. 5.843.928, patente de EE.UU. No. 6.627.622, patente de EE.UU. No. 6.579.861, patente de EE.UU. No. 5.086.191, patente de EE.UU. No. 5.585.369, y patente de EE.UU. No. 6.537.981. Cada una de las referencias anteriormente descritas por la presente se incorpora como referencia en su totalidad y para todos los propósitos como si se expusiera aquí completamente.

Los compuestos de fórmula I, fórmula IA, y fórmula IB se prepararon usando los métodos mostrados en los Esquemas I y II. El material de partida, compuesto 1, se preparó usando el procedimiento expuesto por Andrzej R. Daniewski y Wen Liu (J. Org. Chem. 66, 626-628 (2001) usando $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{PrBr}^-$ en lugar de $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{EtBr}^-$ en la etapa para convertir el compuesto 7 en compuesto 8 en el Esquema I del artículo que por la presente se incorpora como referencia en su totalidad y para todos los propósitos como si se expusiera aquí completamente. El material de partida 1 se hidrogenó a continuación usando paladio sobre carbono como catalizador para dar el compuesto 2 saturado que tiene un peso molecular de 196. La reacción se siguió usando cromatografía en capa fina (TLC) usando un sistema disolvente de 20% de acetato de etilo en hexano. El compuesto 2 se oxidó a continuación con clorocromato de piridinio como se describe en la publicación de patente de EE.UU. No. 2004/0220418, publicada el 4 de noviembre de 2004 (solicitud de patente de EE.UU. No. 10/847.040), por la presente incorporada como referencia en su totalidad y para todos los propósitos como si se expusiera aquí completamente, para dar 3 como se siguió por TLC usando el mismo sistema disolvente. El compuesto 4 óxido de fosfina de anillo A se sintetizó como se muestra en el Esquema I. La condensación se llevó a cabo de nuevo como se describe en los documentos de patente anteriormente referenciados con n-butil-litio y fue seguida por TLC usando un disolvente de 5% de acetato de etilo en hexano para dar el compuesto 5. Los grupos protectores t-butildimetilsililo se retiraron usando tetrabutilamonio como se describe en la publicación de patente de EE.UU. No. 2004/0220418 para dar el compuesto 6 (2-metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxibishomopregnacalciferol).

Se usó TLC para seguir la finalización de la reacción usando el sistema disolvente descrito anteriormente. El producto final se caracterizó totalmente como se describe a continuación.

Esquema II



2-metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxi-bishomopregnacalciferol

- 5 UV (en EtOH) λ_{max} 244, 252, 262 nm; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3), 0,451 (3H, s, 18- H_3), 0,898 (3H, t, $J=6,8$ Hz, 23- H_3), 1,8-2,05 (2H, m), 2,29 (1H, dd, $J=13,2, 8,7$ Hz, 10 α -H), 2,33 (1H, dd, $J=13,5, 5,7$ Hz, 4 β -H), 2,58 (1H, dd, $J=13,5, 3,8$ Hz, 4 α -H), ca. 2,84 (1H, solapado con 10 β -H, 9 β -H), 2,86 (1H, dd, $J=13,2, 4,5$ Hz, 10 β H), 4,49 (2H, m, 1 β - y 3 α -H), 5,10 y 5,11 (1H y 1H, cada s, = CH_2), 5,89 y 6,37 (1H y 1H, cada d, $J=11,4$ Hz, 7- y 6-H); MS (APCI) m/z (intensidad relativa) 331 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 7), 313 ($[\text{M}+\text{H}]^+-\text{H}_2\text{O}$, 100), 295 ($[\text{M}+\text{H}]^+-2\text{H}_2\text{O}$, 92).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

- 10 Unión al receptor de vitamina D

Material de ensayo

Fuente de proteínas

- El receptor recombinante de rata de longitud completa se expresó en células E. coli BL21(DE3) Codon Plus RIL y se purificó hasta homogeneidad usando dos diferentes sistemas de cromatografía en columna. El primer sistema era una resina de afinidad de níquel que utiliza una etiqueta de histidina C-terminal en esta proteína. La proteína que se eluyó de esta resina se purificó adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico (S-sefrosa de flujo rápido). Las alícuotas de la proteína purificada se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para su uso en ensayos de unión, la proteína se diluyó en TEDK₅₀ (Tris 50 mM, EDTA 1,5 mM, pH 7,4, DTT 4,5 mM, KCl 150 mM) con detergente Chaps al 0,1%. Se optimizó la concentración de proteína receptora y ligando de tal modo que no más del 20% del ligando radiomarcado añadido estuviera unido al receptor.
- Fármacos de estudio
- 10 Se disolvieron ligandos sin marcar en etanol y se determinaron las concentraciones usando espectrofotometría de UV (1,25(OH)₂D₃: coeficiente de extinción molar = 18,200 y λ_{\max} =265 nm; análogos: coeficiente de extinción molar = 42.000 y λ_{\max} =252 nm). Se añadió ligando radiomarcado (³H-1,25(OH)₂D₃, ~159 Ci/mmol) en etanol a una concentración final 1 nM.
- Condiciones de ensayo
- 15 Se añadieron ligandos radiomarcados y sin marcar a 100 µl de proteína diluida a una concentración final de etanol ≤10%, se mezcló e incubó durante la noche en hielo para llegar al equilibrio de unión. Al día siguiente, se añadieron 100 µl de suspensión de hidroxilapatita (50%) a cada tubo y se mezclaron a intervalos de 10 minutos durante 30 minutos. La hidroxilapatita se recogió por centrifugación y a continuación se lavó tres veces con tampón de Tris-EDTA (Tris 50 mM, EDTA 1,5 mM, pH 7,4) que contenía 0,5% de Titron X-100. Después del lavado final, los pellets se transfirieron a viales de centelleo que contienen 4 ml de cóctel de centelleo Biosafe II, se mezclaron y se colocaron en un contador de centelleo. Se determinó la unión total de los tubos que contienen solo ligando radiomarcado.
- Diferenciación de HL-60
- Material de ensayo
- 25 Fármacos del estudio
- Los fármacos de estudio se disolvieron en etanol y las concentraciones se determinaron usando espectrofotometría UV. Se prepararon diluciones en serie de modo que se pudiese ensayar un intervalo de concentraciones de fármaco sin cambiar la concentración final de etanol (≤0,2%) presente en los cultivos celulares.
- Células
- 30 Se cultivaron células de leucemia promielocítica humana (HL60) en medio RPMI 1640 que contiene suero fetal bovino al 10%. Las células se incubaron a 37°C en presencia de 5% de CO₂.
- Condiciones de ensayo
- 35 Se depositaron células HL60 en una placa a 1,2 x 10⁵ células/ml. Ochenta y cuatro horas después de depositar en la placa, las células se trataron por duplicado con fármaco. Cuatro días después, se recogieron las células y se realizó un ensayo de reducción con nitroazul de tetrazolio (Collins et al., 1979; J. Exp. Med. 149:969-974). Se determinó el porcentaje de células diferenciadas contando un total de 200 células y registrando el número que contenía depósitos intracelulares de formazan negro-azulados. La verificación de la diferenciación en células monocíticas se determinó midiendo la actividad fagocítica (no se muestran datos)
- Ensayo de transcripción in vitro
- 40 Se midió la actividad de transcripción en células ROS 17/2.8 (hueso) que fueron establemente transfectadas con un promotor de gen 24-hidroxilasa (24Ohasa) cadena arriba de un gen informador de luciferasa (Arbour et al., 1998). A las células se les dio un intervalo de dosis. Dieciséis horas después de la dosis la células se recogieron y se midieron las actividades de luciferasa usando un luminómetro. RLU = del inglés relative luciferase units (unidades relativas de luciferasa).
- 45 Transporte de calcio intestinal y movilización de calcio óseo
- 50 Ratas macho destetadas Sprague-Dawley se pusieron a Dieta 11 (Ca al 0,47%) + AEK durante una semana seguida por Dieta 11 (Ca al 0,02%) + AEK durante 3 semanas. A continuación a las ratas se les cambió a una dieta que contenía Ca al 0,47% durante una semana seguido de dos semanas a una dieta que contenía Ca al 0,02%. La administración de la dosis comenzó durante la última semana de dosis de Ca al 0,02%. Se les administraron cuatro dosis ip consecutivas separadas aproximadamente 24 horas. Veinticuatro horas después de la última dosis, se recogió sangre del cuello cortado y se determinó la concentración de calcio en suero como medida de la movilización del calcio óseo. También se recogieron los 10 primeros cm del intestino para el análisis del transporte

de calcio intestinal usando el método del saco intestinal dado la vuelta.

Supresión de PTH e hipercalcemia

Especies

Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley hembra adultas de Harlan (Madison, WI)

5 Cuidado de los animales

Al recibirlos, los animales se identificaron por medio de marcas individuales en la cola. Los animales se encerraron en jaulas de fondo de alambre de acero inoxidable suspendidas. Cada jaula contenía un animal. Las habitaciones de los animales se mantuvieron a una temperatura 20 a 22,2°C y una humedad relativa de 25 a 75%. Las habitaciones que los contienen se dispusieron para que proporcionasen 12 horas de luz al día. Se les proporcionó ad libitum agua y una dieta de roedor purificada (Suda et al., Purified Rodent Diet-Diet 11) que contiene fósforo al 0,47% y 0,3% y vitaminas A, D, E y K solubles en grasas.

10

Grupos de tratamiento

Los animales se asignaron al azar a grupos de tratamiento (5 animales por grupo). Todas las dosis fueron administradas intraperitonealmente en 100 microlitos de propilenglicol. Se les dio de cuatro a siete dosis consecutivas separadas 24 horas aproximadamente. La dosificación se inició después de que se había dejado aclimatar a los animales durante por lo menos una semana.

15

Preparación de la dosis

Material de control

A. Material de control negativo

El material de control negativo se preparó midiendo volumétricamente etanol (<5%) y propilenglicol, mezclando, y colocándolo a continuación en un almacén de 2 a 8°C.

20

B. Material de control positivo.

Se preparó 1,25(OH)₂D₃ determinando la concentración de una disolución patrón de etanol usando espectrofotometría UV (coeficiente de extinción = 18,200; λ_{max}=265 nm). La cantidad requerida de 1,25(OH)₂D₃ se midió volumétricamente en propilenglicol de modo que había menos de 5% de etanol en la disolución final. La disolución se mezcló y a continuación se almacenó de 2 a 8°C.

25

Material de ensayo

Se prepararon los análogos determinando primero la concentración de disolución patrón de etanol usando espectrofotometría UV (coeficiente de extinción = 42,000; λ_{max}=252 nm). Las disoluciones de análogo se añadieron a continuación volumétricamente a propilenglicol de modo que hubiera menos de 5% de etanol en la disolución final. La disolución se mezcló y almacenó de 2 a 8°C.

30

Método de administración de la dosis

Tanto el control como los artículos de ensayo se administraron por inyección intraperitoneal en 100 microlitros durante 4-7 días consecutivos separada aproximadamente 24 horas. Se administró 1,25(OH)₂D₃ durante 4 días consecutivos, mientras que, los fármacos de ensayo se administraron durante 7 días consecutivos.

35

Niveles de PTH en suero

Veinticuatro horas después de la dosis final, se recogió sangre de la arteria de la cola y se midió la concentración de PTH en suero bioactivo usando el kit ELISA "rat Bioactive Intac PTH" de Immunotopics, Inc. (San Clemente, CA)

Análisis de calcio en suero

Veinticuatro horas después de la dosis final, se recogió aproximadamente 1 ml de sangre de la arteria de la cola de cada animal experimental. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y a continuación se centrifugó a 3000xg durante 15 minutos. El suero se transfirió a un tubo de polipropileno y se almacenó congelado a -20°C. Se determinó el nivel de Ca diluyendo el suero en cloruro de lantano al 0,1% y midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer Model 3110, Shelton, CT).

40

El 2-metileno-19,21-dinor-1α-hidroxi-bishomopregnacalciferol se une al receptor de vitamina D recombinante, pero es alrededor de 5 veces menos activo que la 1α,25-dihidroxitamina D₃ en este aspecto (véase Figura 1). Además, es activo para estimular la transcripción de un gen informador establemente transfectedo en células Ros17/2.8

45

(hueso), indicando actividad biológica significativa (véase Figura 3). Sin embargo, es alrededor de 15 veces menos activo que la 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ para inducir la diferenciación de células HL-60 (véase Figura 2). No tiene actividad calcémica cuando se mide por el transporte de calcio intestinal o movilización de calcio óseo incluso cuando se administra 100 veces la dosis de la 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (véase Figuras 4 y 5). Sin embargo, posee actividad significativa para suprimir los niveles de hormona paratiroidea en ratas normales (véase Figura 7). Este compuesto debe encontrar sus usos en el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple, diabetes de tipo I, artritis reumatoide, lupus, y otras enfermedades degenerativas similares. También debe tener actividad significativa para tratar el crecimiento maligno tal como cánceres colorectal, de pecho y de próstata. Todas estas actividades deben ser evidentes en ausencia de concentraciones crecientes de calcio en suero (véase Figura 6). Este compuesto también debe ser útil para tratar el hiperparatiroidismo secundario encontrado en pacientes que han perdido la función renal tales como aquellos en hemodiálisis o diálisis peritoneal.

Los compuestos de la invención son también útiles para prevenir o tratar la obesidad, inhibir la diferenciación de adipocitos, inhibir la transcripción del gen SCD-1, y/o reducir la grasa corporal en sujetos animales. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un método de prevenir o tratar la obesidad, inhibir las diferenciaciones de adipocitos, inhibir la transcripción del gen SCD-1, y/o reducir la grasa corporal en un sujeto animal incluye administrar al sujeto animal, una cantidad efectiva del compuesto o una composición farmacéutica que incluye el compuesto. La administración del compuesto o la composición farmacéutica al sujeto inhibe la diferenciación de adipocitos, inhibe la transcripción génica, y/o reduce la grasa corporal en el sujeto animal.

Para propósitos de tratamiento, los compuestos definidos por la fórmula I, fórmula IA, y fórmula IB se pueden formular para aplicaciones farmacéuticas como disolución en disolventes inocuos, o como emulsión, suspensión o dispersión en disolventes o vehículos apropiados, o como píldoras, comprimidos, o cápsulas, junto con vehículos sólidos, según métodos convencionales conocidos en la técnica. Cualquiera de tales formulaciones puede contener también otros excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables tales como estabilizantes, antioxidantes, aglomerantes, agentes colorantes o emulsionantes o agentes modificadores del sabor. Los excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables son generalmente conocidos por los expertos en la técnica y de este modo están incluidos en la presente invención. Tales excipientes y vehículos se describen, por ejemplo, en "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991), que se incorpora por la presente como referencia en su totalidad y para todos los propósitos como si se expusiera aquí totalmente.

Los compuestos se pueden administrar oralmente, tópicamente, parenteralmente, o transdérmicamente. Los compuestos se administran ventajosamente por inyección o por infusión intravenosa de disoluciones estériles apropiadas, o en la forma de líquido o dosis sólidas vía el canal alimentario, o en la forma de cremas, pomadas, parches, o similares vehículos para aplicaciones transdérmicas. En algunas realizaciones, dosis de 0,001 μ g a alrededor de 1 mg por día del compuesto son apropiadas para propósitos de tratamiento. En algunas de tales realizaciones una dosis efectiva apropiada puede variar de 0,01 μ g a 1 mg por día del compuesto. En otras de tales realizaciones una dosis efectiva y apropiada puede variar de 0,1 μ g a 500 μ g por día del compuesto. Tales dosis se ajustarán según el tipo de enfermedad o estado que se va a tratar, la severidad de la enfermedad o estado, y la respuesta del sujeto como es bien entendido en la técnica. El compuesto se puede administrar apropiadamente solo, o junto con otro compuesto de vitamina D activa.

Las composiciones para uso en la invención incluyen una cantidad efectiva de 2-metileno-19,21-dinor-1 α -hidroxibishomopregnacalciferol como ingrediente activo, y un vehículo apropiado. Una cantidad efectiva del compuesto para uso según algunas realizaciones de la invención será generalmente una cantidad de dosis tal como las descritas aquí, y se puede administrar tópicamente, transdérmicamente, oralmente, nasalmente, rectalmente, o parenteralmente.

Los compuestos de fórmula IA y IB, se pueden administrar ventajosamente en cantidades suficientes para efectuar la diferenciación de promielocitos a macrófagos normales. Son apropiadas las dosis como las descritas anteriormente, entendiendo que las cantidades dadas se van a ajustar según la severidad de la enfermedad, y el estado y respuesta del sujeto como es bien entendido en la técnica.

El compuesto se puede formular en forma de cremas, lociones, pomadas, aerosoles, supositorios, parches tópicos, píldoras, cápsulas o comprimidos, o en forma líquida como disoluciones, emulsiones, dispersiones, o suspensiones en disolventes o aceites farmacéuticamente inocuos y aceptables, y tales preparaciones pueden contener, además otros componentes farmacéuticamente inocuos o beneficiosos, tales como estabilizantes, antioxidantes, emulsionantes, agentes colorantes, aglomerantes o agentes modificadores del sabor.

Las formulaciones de la presente invención comprenden un ingrediente activo en asociación con uno de sus vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de las formulaciones y no perjudicial para su receptor.

Las formulaciones de la presente invención apropiadas para la administración oral pueden estar en la forma de unidades discretas o cápsulas, saquitos, comprimidos o pastillas, que cada una contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo, en la forma de un polvo o gránulos; en la forma de una disolución o una

suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o en la forma de una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite.

Las formulaciones para administración rectal pueden estar en la forma de un supositorio que incorpora el ingrediente activo y vehículo tal como mantequilla de cacao, o en la forma de un enema.

- 5 Las formulaciones apropiadas para administración parenteral convenientemente comprenden una preparación acuosa o aceitosa estéril del ingrediente activo que es preferentemente isotónica con la sangre del receptor.

Las formulaciones apropiadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas tales como linimentos, lociones, aplicaciones tópicas, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite tales como cremas, pomadas o empastes, o disoluciones o suspensiones tales como gotas; o como pulverizaciones.

- 10 Para la administración nasal, se puede usar la inhalación de polvo, formulaciones de autopropulsoras o de pulverización, dispensadas con un pulverizador, un nebulizador o un atomizador. Las formulaciones, cuando se dispensan, tienen preferentemente un tamaño de partícula en el intervalo de 10 a 100 micrómetros.

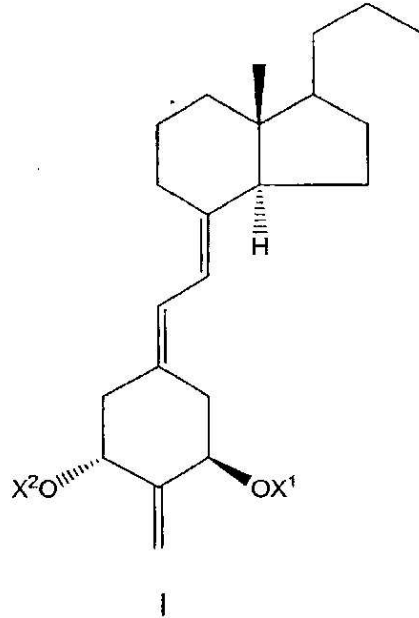
- 15 Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de unidad de dosificación y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Por la expresión "dosis unitaria" se entiende una unidad, es decir, una dosis única que es capaz de ser administrada a un paciente en forma de dosis unitaria física y químicamente estable que comprende el ingrediente activo como tal o una mezcla de él con diluyentes o vehículos farmacéuticos sólidos o líquidos.

Todas las referencias citadas aquí se incorporan específicamente como referencia en su totalidad y para todos los propósitos como si se expusieran aquí completamente.

- 20 Se entiende que la invención no está limitada a las realizaciones expuestas aquí para ilustración, sino que abarca todas sus formas tales que están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

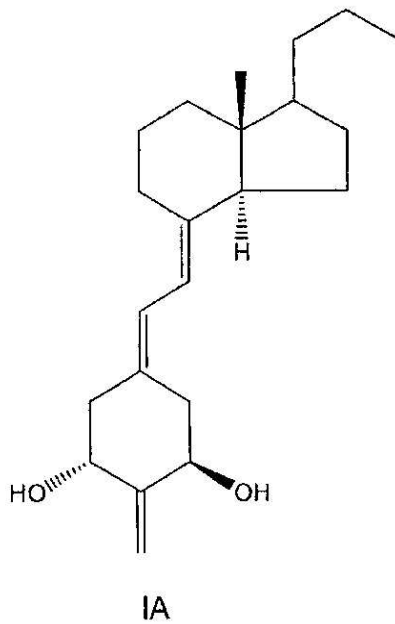
1. Un compuesto que tiene la fórmula I



5

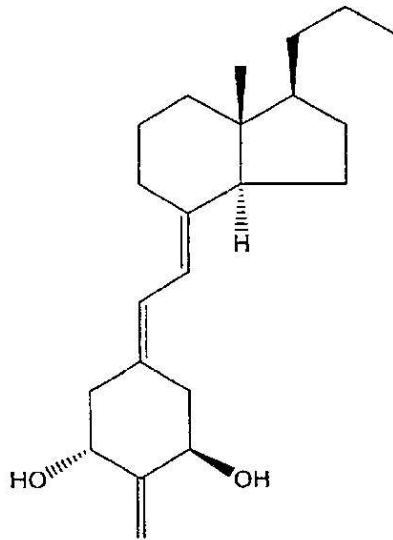
en la que X^1 y X^2 se seleccionan independientemente de H y grupos protectores de hidroxilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X^1 y X^2 son ambos grupos protectores de hidroxilo.
3. El compuesto de la reivindicación 2, en el que X^1 y X^2 son ambos grupos t-butildimetilsililo.
4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X^1 y X^2 son ambos H y el compuesto tiene la fórmula IA.



10

5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X^1 y X^2 son ambos H y el compuesto tiene la fórmula IB.

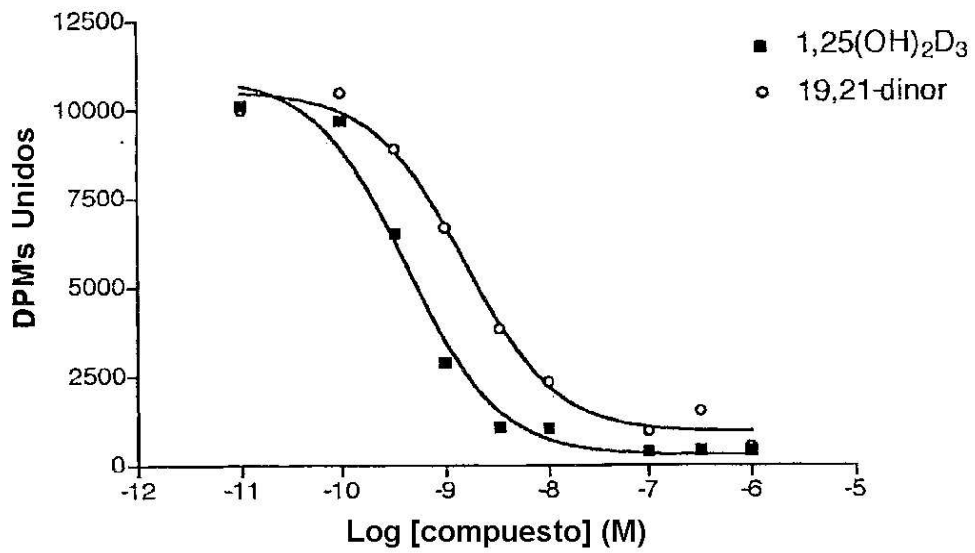


1B

6. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad efectiva del compuesto de la reivindicación 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que la cantidad efectiva comprende de 0,01 μg a 1 mg del compuesto por gramo de la composición.
8. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que la cantidad efectiva comprende de 0,1 μg a 500 μg del compuesto por gramo de la composición.
- 10 9. El uso de una cantidad efectiva del compuesto de la reivindicación 4 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un estado biológico seleccionado de psoriasis; leucemia; cáncer de colon; cáncer de pecho; cáncer de próstata; esclerosis múltiple; lupus; diabetes melitus; reacción del huésped frente al injerto; rechazo de trasplantes de órganos; una enfermedad inflamatoria seleccionada de artritis reumatoide, asma, o enfermedades inflamatorias del intestino; un estado de la piel seleccionado de arrugas, carencia de firmeza adecuada de la piel, carencia de hidratación dérmica adecuada, o insuficiente secreción de sebo; osteodistrofia renal; u osteoporosis.
- 15 10. El uso según la reivindicación 9, en el que el compuesto se va a administrar oralmente, parenteralmente, transdérmicamente o tópicamente al sujeto.
11. El uso según la reivindicación 9, en el que el compuesto se va a administrar en una dosis de 0,01 μg por día a 1 mg por día.

FIGURA 1

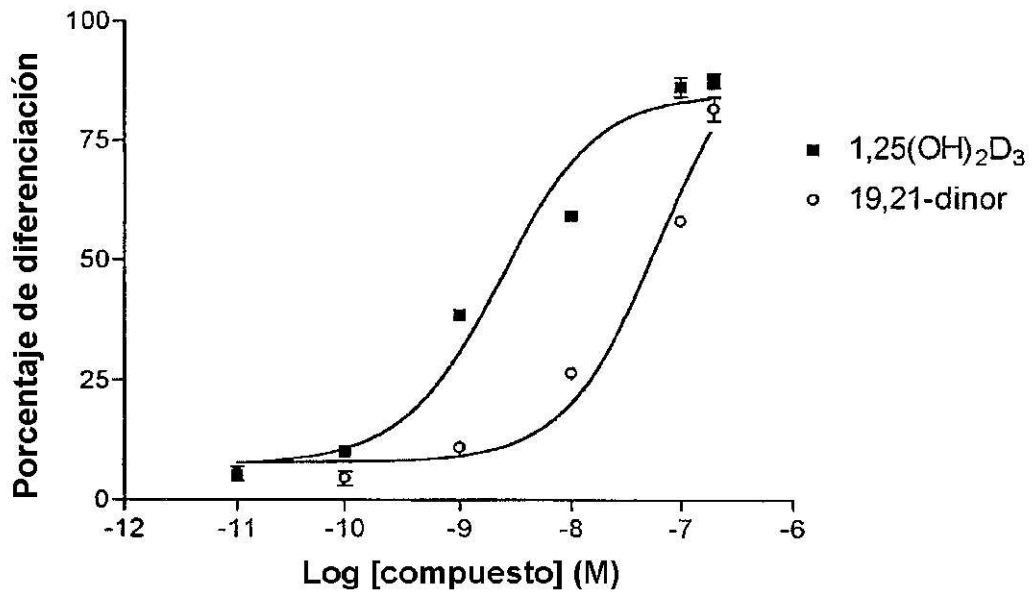
Unión competitiva al VDR



K_i : 1,25(OH)₂D₃ = 7.2×10^{-11} M
19,21-dinor = 2.6×10^{-10} M

FIGURA 2

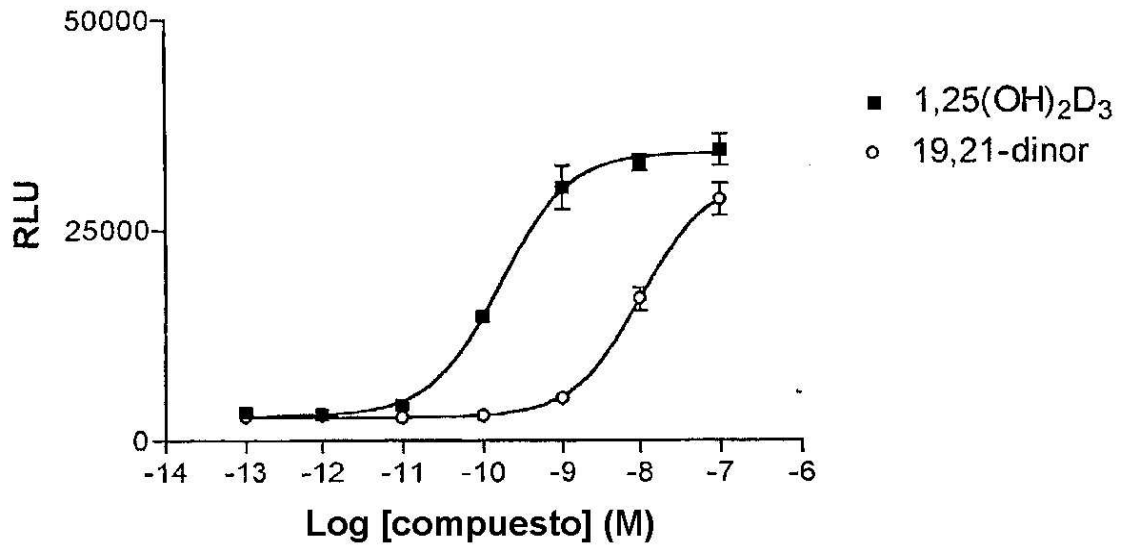
Diferenciación de células HL-60



EC₅₀: 1,25(OH)₂D₃ = 2.3×10^{-9} M
19,21-dinor = 6.6×10^{-8} M

FIGURA 3

Transcripción de 24-OHasa



EC₅₀: 1,25(OH)₂D₃ = 1.7 x 10⁻¹⁰ M
19,21-dinor = 1.0 x 10⁻⁸ M

FIGURA 4

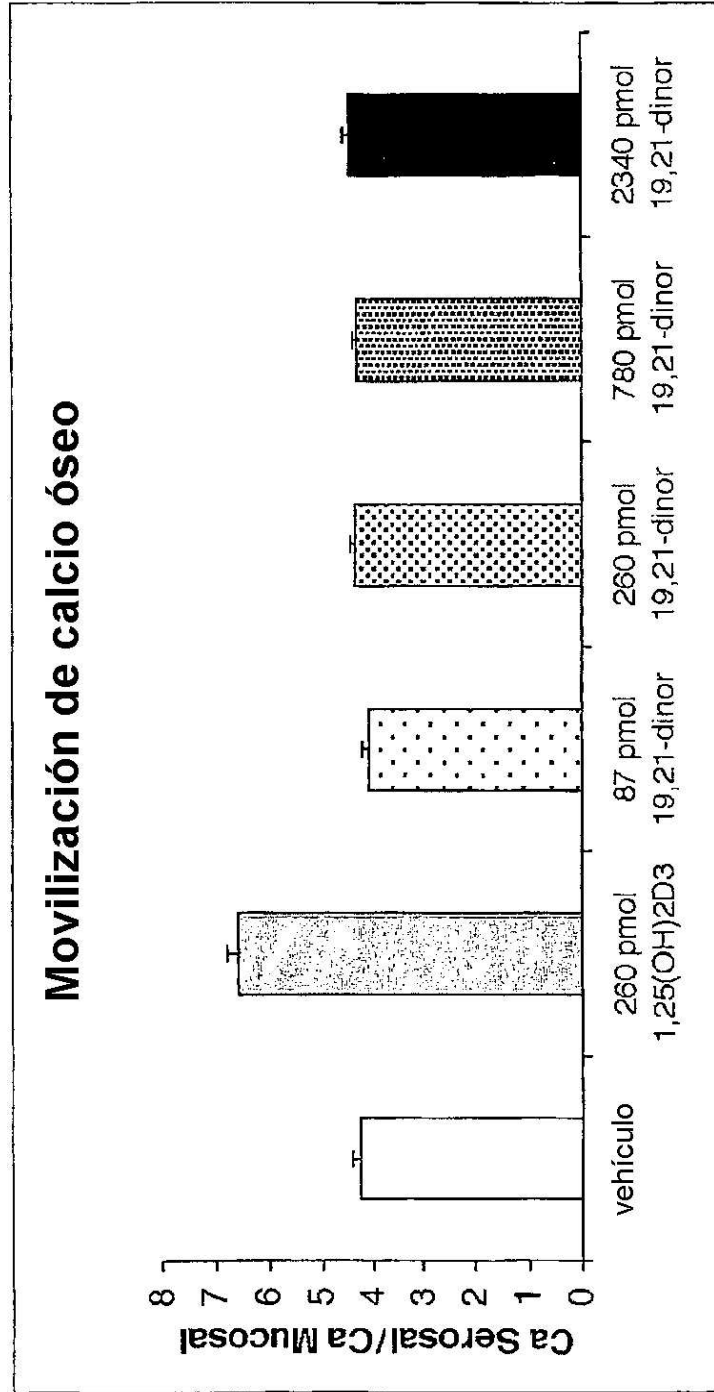


FIGURA 5

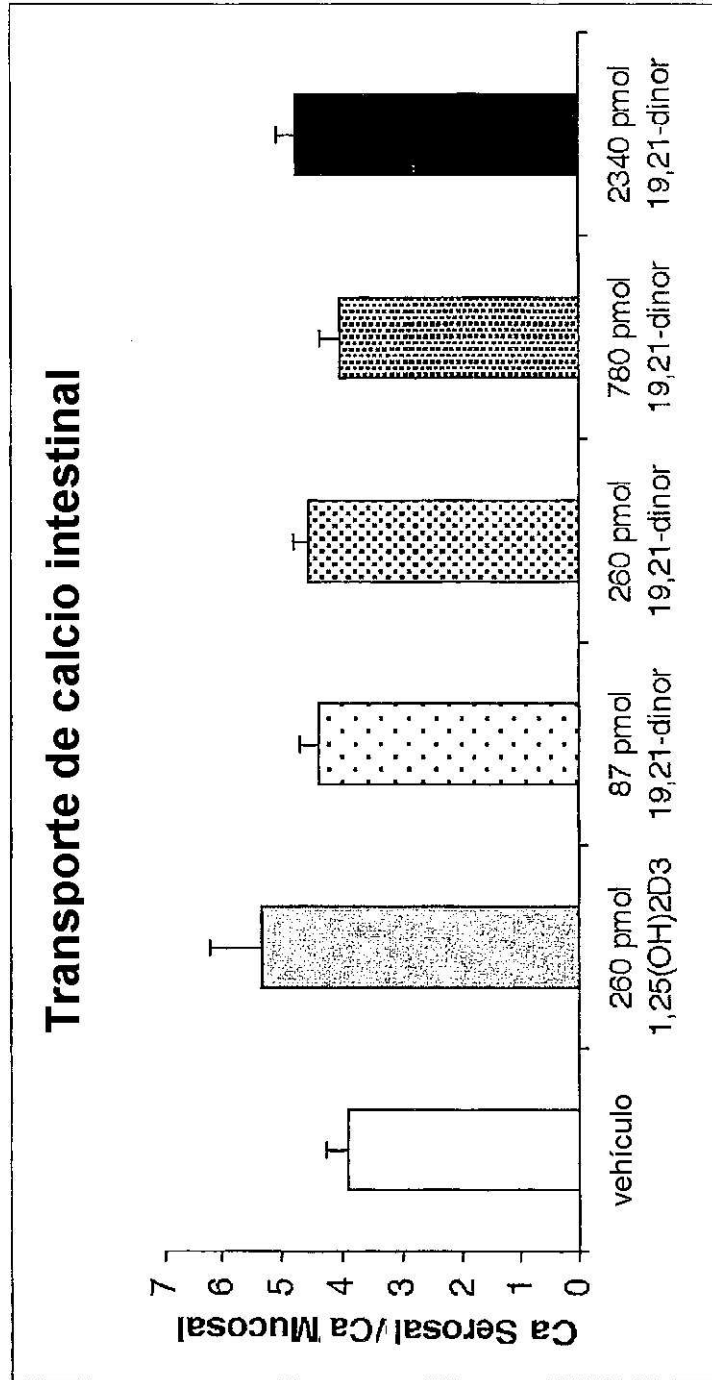


FIGURA 6

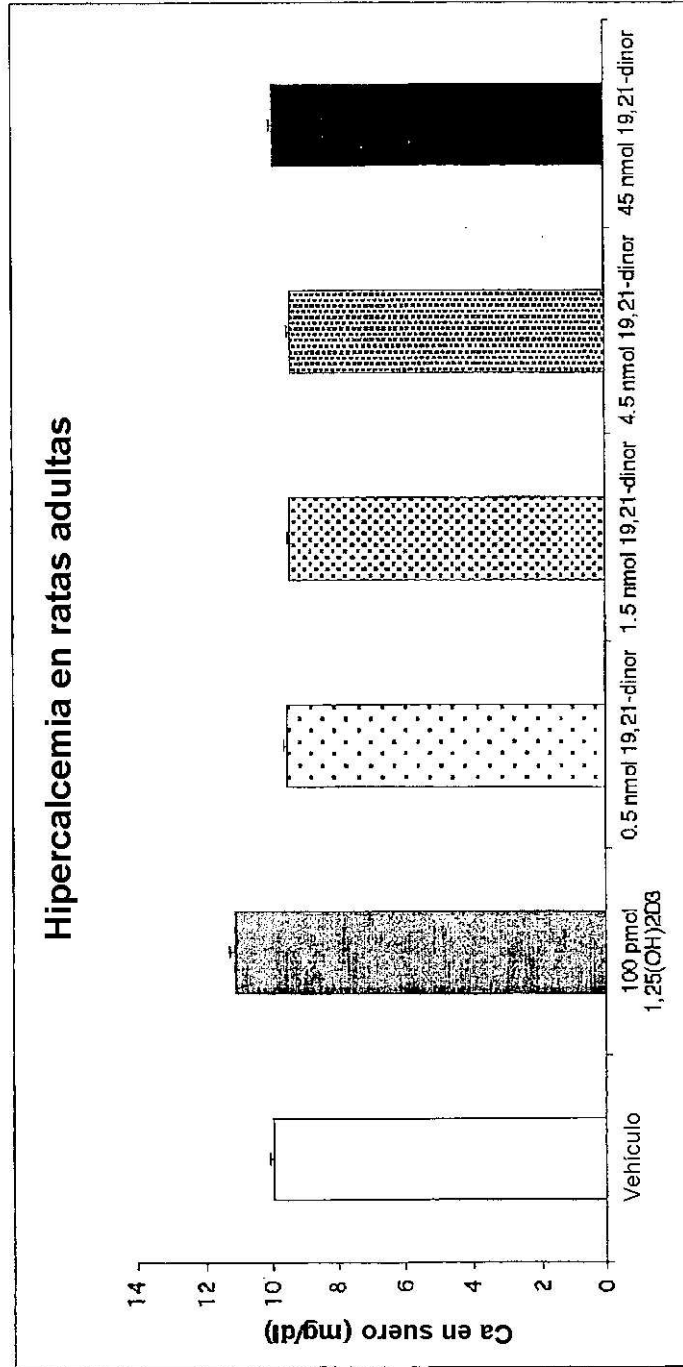


FIGURA 7

Supresión de PTH en ratas adultas

