

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 510**

51 Int. Cl.:  
**C07D 263/56** (2006.01)  
**A61K 31/423** (2006.01)  
**A61P 17/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05854993 .2**  
96 Fecha de presentación: **19.12.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1836177**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2007**

54 Título: **MODULADORES DEL RECEPTOR DE LA VITAMINA D.**

30 Prioridad:  
**21.12.2004 US 638029 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2011**

73 Titular/es:  
**ELI LILLY AND COMPANY  
LILLY CORPORATE CENTER  
INDIANAPOLIS IN 46285, US**

72 Inventor/es:  
**SHEN, Quanrong;  
WARSAWSKY, Alan, M. y  
YEE, Ying, Kwong**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 510 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

Moduladores del receptor de la vitamina D.

**Referencia a solicitud relacionada**

5 El Receptor de la Vitamina D (VDR) es un factor de transcripción dependiente de ligando que pertenece a la superfamilia de los receptores hormonales nucleares. La proteína VDR tiene 427 aminoácidos con un peso molecular de -50 kDa. El ligando VDR, 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (la forma hormonalmente activa de la Vitamina D) cumple su acción mediante su interacción con el receptor nuclear conocido como receptor de la Vitamina D ("VDR"). El ligando VDR, 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) actúa sobre una gran variedad de tejidos y células, relacionados y no relacionados con la homeostasis del calcio y el fosfato.

10 La actividad de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> en diversos sistemas sugiere una amplia aplicabilidad clínica. Sin embargo, el uso de ligandos VDR convencionales se ve afectado por su toxicidad asociada, a saber, hipercalcemia (calcio en suero elevado). Actualmente, 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, comercializada como agente farmacéutico Rocaltrol® (producto de Hoffmann-La Roche) se administra a pacientes con deficiencia renal sometidos a diálisis renal crónica para tratar la hipocalcemia y la enfermedad ósea metabólica resultante. Otros agentes terapéuticos, como por  
15 ejemplo Calcipotriol® (análogo sintético de 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), exhiben una mayor separación de afinidad ligante sobre VDR de la actividad hipercalcémica.

Las modificaciones químicas de 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> han producido análogos con efectos atenuados de movilización de calcio (R. Bouillon *et. al.*, *Endocrine Rev.* 1995, 16, 200-257). Uno de estos análogos, el agente farmacéutico Dovonex® (producto de Bristol-Meyers Squibb Co.), se usa actualmente en Europa y los Estados Unidos como  
20 tratamiento tópico para la psoriasis leve a moderada (K. Kragballe *et. al.*, *Br. J. Dermatol.* 1988, 119, 223-230).

En la publicación, Vitamin D Analogs: Mechanism of Action of Therapeutic Applications, de Nagpal, S.; Lu, J.; Boehm, M. F., *Curr. Med. Chem.* 2001, 8, 1661-1679, se describen otras imitaciones de la Vitamina D<sub>3</sub>.

Si bien se ha logrado cierto grado de separación entre la acción benéfica y los efectos (calcémicos) de aumento del calcio con estos ligandos VDR, hasta la fecha la separación no ha sido suficiente para permitir la administración oral  
25 para tratar trastornos como por ejemplo, la osteoporosis, el cáncer, la leucemia y la psoriasis aguda.

Un ejemplo de una clase importante de trastorno que podría beneficiarse de la eficacia biológica mediada por VDR en ausencia de hipercalcemia es la osteoporosis. La osteoporosis es un trastorno sistémico caracterizado por la disminución de masa ósea y la deterioración microarquitectural del tejido óseo que conlleva fragilidad ósea y mayor susceptibilidad a las fracturas de cadera, columna y muñeca (Organización Mundial de la Salud WHO 1994). La  
30 osteoporosis afecta a unos 75 millones de personas en los Estados Unidos, Europa y Japón.

En los últimos años, se han introducido diversas terapias antiresorptivas. Estas incluyen bisfosfonatos, terapia de reemplazo hormonal (HRT), un modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM) y calcitoninas. Estos tratamientos reducen la resorción ósea y la formación ósea y aumentan la densidad ósea. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos aumenta el volumen óseo real ni puede recuperar la arquitectura ósea perdida.

35 Otro trastorno importante que podría beneficiarse de la actividad biológica mediada por VDR es la psoriasis. La psoriasis es una de las enfermedades dermatológicas más comunes y es una afección crónica de inflamación de la piel que se caracteriza por eritematosis, pápulas claramente demarcadas y placas redondeadas cubiertas por escama micáceas plateadas.

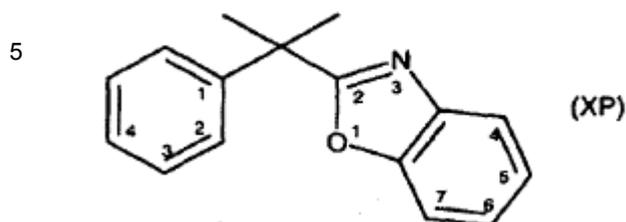
Se han sintetizado ligandos VDR sintéticos con potencial calcémico reducido. Por ejemplo, una clase de compuestos bis-fenol establecidos para imitar 1 $\alpha$ , 25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6,218,430 y el artículo: "Novel nonsecosteroidal vitamin D mimics exert VDR-modulating activities with less calcium mobilization than 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>" por Marcus F. Boehm, *et. al.*, *Chemistry & Biology* 1999, Vol 6, No. 5, págs. 265-275.  
40

Los ligandos VDR sintéticos que tienen un núcleo aril-tiofeno se describen en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos SN 60/384,151, presentada el 29 de mayo de 2002 (WO 03/101,978), y los ligandos VDR sintéticos que tienen un núcleo aril-naftalino se describen en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos SN 60/637,930, presentada el 21 de diciembre de 2004.  
45

Existe la necesidad de contar con tratamientos mejorados que utilicen agentes farmacéuticos alternativos o mejorados que imiten la 1 $\alpha$ , 25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> para estimular la formación ósea, restaurar la calidad ósea y  
50 tratar otras enfermedades sin la desventaja concomitante de la hipercalcemia.

**Sumario de la invención**

Se ha encontrado que los compuestos nuevos que tienen un núcleo fenil-benzoxazol de fórmula "(XP)" son efectivos como moduladores del Receptor de la Vitamina D (VDRM):



10 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen cantidades farmacéuticamente efectivas de compuestos de fórmula C1-C16 o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado de éster de estos, solos o en combinación, junto con vehículos y/o agentes auxiliares farmacéuticamente aceptables.

Los ligandos VDR sintéticos que tienen un núcleo benzofurano se describen en WO 05/51938, publicada el 6 de septiembre de 2005.

15 Otro aspecto de la invención es una formulación farmacéutica para tratamiento o prevención de la osteoporosis que contiene cantidades farmacéuticamente efectivas del compuesto modulador del receptor de la vitamina D de fórmula C1-C16 solo o junto con cantidades farmacéuticamente efectivas de coagentes utilizados convencionalmente para el tratamiento de la osteoporosis.

20 Otro aspecto de la invención es una formulación farmacéutica para tratamiento o prevención de la psoriasis que contiene cantidades farmacéuticamente efectivas del compuesto modulador del receptor de la vitamina D de fórmula C1-C16 solo o junto con cantidades farmacéuticamente efectivas de coagentes utilizados convencionalmente para el tratamiento de la psoriasis.

25 Otro aspecto de la invención es una formulación farmacéutica para tratamiento o prevención del cáncer de próstata que contiene cantidades farmacéuticamente efectivas del compuesto modulador del receptor de la vitamina D de fórmula C1-C16 solo o junto con cantidades farmacéuticamente efectivas de co-agentes utilizados convencionalmente para el tratamiento del cáncer de próstata.

30 Otro aspecto de la invención es el uso de un compuesto de fórmula C1-C16 para la fabricación de un medicamento para la prevención y tratamiento de acné, queratosis actínica, alopecia, enfermedad de Alzheimer, diabetes autoinmune inducida, hiperplasia prostática benigna, cáncer de vejiga, curado de fractura ósea, cáncer de mama, enfermedad de Crohn, cáncer de próstata, cáncer de colon, diabetes Tipo 1, rechazo receptor-injerto, hipercalcemia, diabetes Tipo II, leucemia, esclerosis múltiple, secreción sebácea insuficiente, osteomalacia, osteoporosis, firmeza dérmica insuficiente, enfermedad periodontal, hidratación dérmica insuficiente, síndrome mielodisplásico, artritis psoriática, psoriasis, osteodistrofia renal, artritis reumatoidea, escleroderma, dermatitis seborreica, cáncer de piel, eritematosis de lupus sistémico, daño de las células de la piel por vesicantes mostaza, colitis ulcerativa y arrugas.

**35 Descripción detallada de la invención**

Definiciones:

El término "absceso" se refiere a complicaciones adversas asociadas, con frecuencia, con la cirugía, trauma o enfermedades que predisponen al receptor a formar abscesos a partir de linfocitos bacterianos encapsulados, macrófagos, etc.

40 El término "adhesión" se refiere a la unión adversa y anormal de superficies normalmente separadas debido a la formación de nuevos tejidos fibrosos resultantes de un proceso inflamatorio.

El término "compuesto de la invención" se refiere a un compuesto representado por la fórmula C1-C16 o como se indica como productos de los ejemplos o esquemas de síntesis descritos en la presente.

El término "ingrediente activo" significa un compuesto de la invención.

45 El término "mostaza" incluye tanto las mostazas de azufre como las mostazas de nitrógeno, solas o en cualquier combinación. Ejemplos de estos compuestos son los vesicantes; azufre de bis(2-cloroetil) (símbolo de agente

químico HD),  $C1(CH_2)_2S(CH_2)_2Cl$  1,2-bis(2-cloroetil)etano (símbolo de agente químico Q),  $Cl(CH_2)_2S(CH_2)_2S(CH_2)_2Cl$ ; éter de bis(2-cloroetil)etoil,  $Cl(CH_2)_2S(CH_2)O(CH_2)_2S(CH_2)_2Cl$  (símbolo de agente químico T); tris(2-cloroetil)amina (símbolo de agente químico HN3)  $N(CH_2CH_2Cl)_3$ ; N-metil-2,2'-diclorodietilamina (símbolo de agente químico NH2); y 2,2'-diclorotrietilamina,  $CH_3CH_2N(CH_2CH_2Cl)_2$  (símbolo de agente químico NH1).

- 5 Algunos compuestos de la invención existen en configuraciones isoméricas con centros quirales, es decir, diastereoisómeros y enantiómeros. Cada una de las formas isoméricas de los compuestos se consideran dentro del alcance de la presente invención. Cada uno de los diversos isómeros puede prepararse como isómeros simples y/o separados en isómeros únicos mediante procesos conocidos por los entendidos en la técnica. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención pueden usarse tanto como isómeros simples o como forma isomérica o
- 10 alternativamente los compuestos de la presente invención pueden utilizarse como una combinación de isómeros. El enlace "dentado" ilustrado a continuación se utiliza para representar que el carbono al cual se encuentra unido puede existir en cualquiera de las configuraciones, es decir, R o S.

15



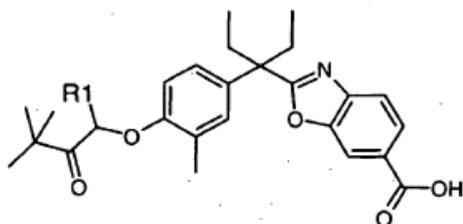
Los entendidos en la técnica también entenderán que los compuestos de la presente invención pueden existir de dos o más formas tautoméricas. Todas estas formas tautoméricas se consideran incluidas dentro del alcance de la presente invención.

#### Compuestos de la invención

- 20 Los compuestos de la invención con actividad moduladora del receptor de la vitamina (VDRM) se representan con una sal de fórmula C1 a C16 farmacéuticamente aceptable o un éster derivado de esta:

C1)

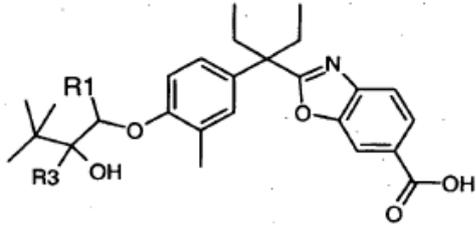
25



30

C2)

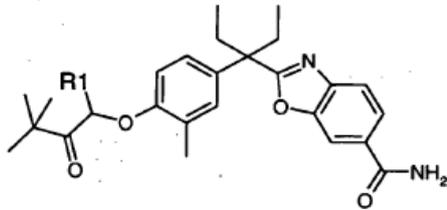
5



10

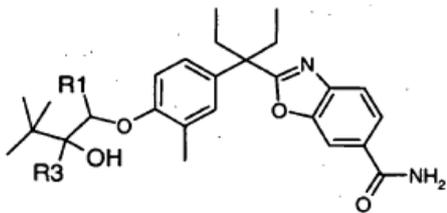
C3)

15



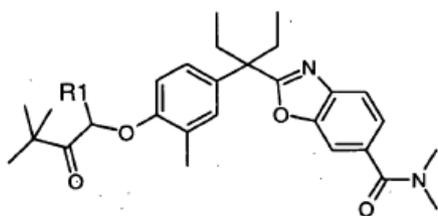
C4)

20



C5)

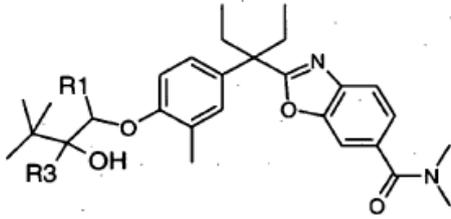
25



30

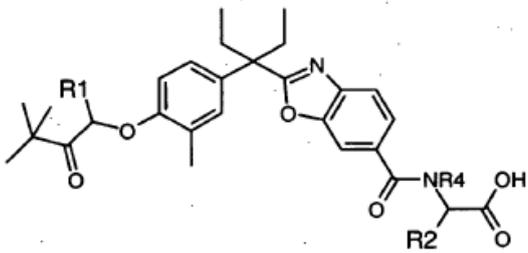
C6)

5



C7)

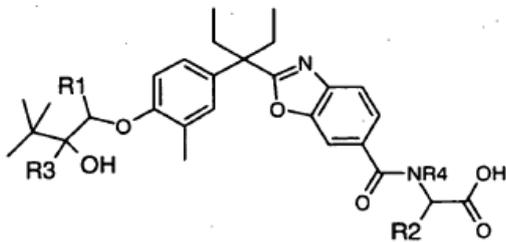
10



15

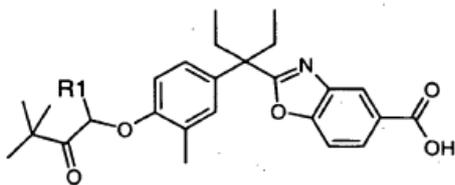
C8)

20



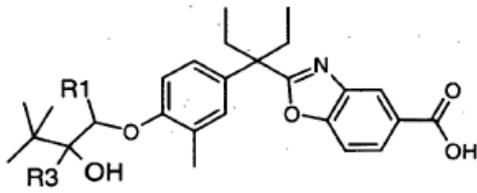
C9)

25



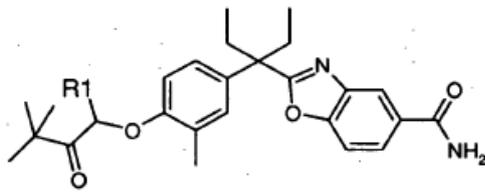
C10)

5



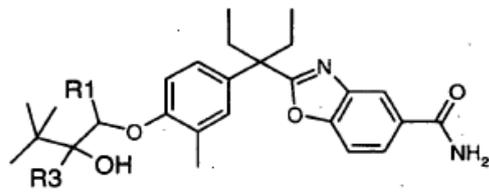
C11)

10



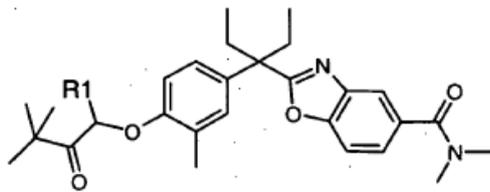
C12)

15



C13)

20



25



## ES 2 369 510 T3

La cromatografía de capa fina se lleva a cabo en placas de gel de sílice con UV y/o solución de tinción apropiada.

Los espectros NMR se obtienen con espectrómetros de 300 ó 400MHz.

Los datos NMR se enumeran para indicar que el espectro es coherente con la estructura asignada.

La indicación "NMR" sin datos indica que el espectro es coherente con la estructura asignada.

5 HRMS – espectrometría de masa de alta resolución

ES-MS – espectrometría de masa por electrospray

Abreviaciones:

- Ac - acuosa
- d - día
- 10 • eq - equivalente
- h - hora
- m - minuto
- sat - saturado
- disp - dispersión
- 15 • cuant - cuantitativo
- rt para tiempo de retención (ambas en minúsculas para evitar la confusión con RT)
- RT – temperatura ambiente

TABLA 1:

Términos  
químicos

Término	Definición	Término	Definición
BF <sub>3</sub> -OEt <sub>2</sub>	eterato de trifluoruro de boro	MeOH	metanol
BnBr	bromuro de bencilo	NMO	N-óxido de 4-metilmorfolina
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano	NMP	N-metilpirrolidin-2-ona
DMAP	4-(dimetilamino)piridina	Na-S-R <sub>3</sub>	alquilmercáptido de sodio
DMF	N,N-dimetilformamida	PBr <sub>3</sub>	tribromuro de fósforo
DMSO	Dimetilsulfóxido	Pd(DPPF)	dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno paladio
DPPB	1,4-bis(difenilfosfino)butano	Pd(TPP) <sub>2</sub>	acetato de paladio (II)

# ES 2 369 510 T3

(CONT.)

Términos  
químicos

Término	Definición	Término	Definición
DPPF	dicloro[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno	Pd(OAc) <sub>4</sub>	tetrakis(trifenilfosfina) de paladio
EDCI	Hidrocloruro de 3-Etil-1-(3-(dimetilamino)propil]carbodiimida	Pd-C	paladio sobre carbono
EEDC	dietil cianamida	Pd-C/H <sub>2</sub>	paladio sobre carbono con presión de hidrógeno
EtMgBr	bromuro de etil magnesio	pTSA	ácido para-toluenosulfónico
EtOAc	acetato de etilo	Pyr	piridina
EtOH	etanol	Red-Al	hidruro de sodio bis(2-metoxietoxi)aluminio
H <sub>2</sub>	presión de hidrógeno	R <sub>2</sub> MgBr	bromuro de alquil magnesio
H <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> CO	glicinato de metilo	R <sub>3</sub> MgBr	bromuro de alquil magnesio
Hept	heptano	R <sub>5</sub> MgBr	bromuro de alquil magnesio
Hex	hexanos	R <sub>3</sub> S(O) <sub>2</sub> C <sub>1</sub>	cloruro de alquilsulfonilo
HN(OMe)Me	N-metil-O-metil hidroxilamina	R <sub>2</sub> S(O) <sub>2</sub> N	alquilsulfonamida
HNMe <sub>2</sub>	dimetil amina	H <sub>2</sub>	
HATU	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametil uronio	TBSCI	cloruro de terc-butildimetilsililo
HOAT	7-aza-1h-idroxi benzotriazol	tBuC(O)C H <sub>2</sub> Br -	1-bromopinacolona
		Tf <sub>2</sub> O	anhídrido triflico

## ES 2 369 510 T3

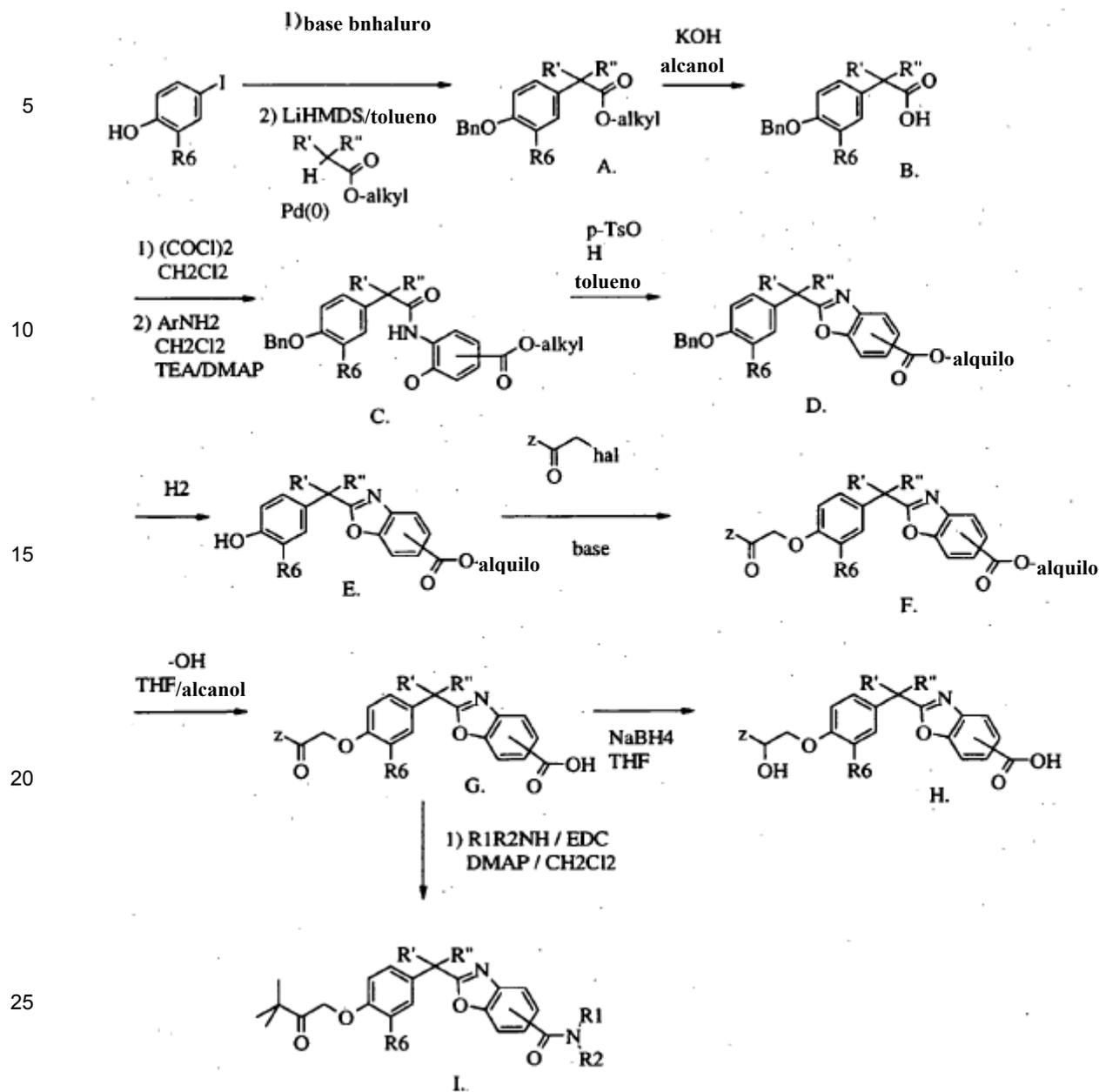
(CONT.)

Términos  
químicos

Término	Definición	Término	Definición
HOBT	1-hidroxibenzotriazol	TFA	ácido trifluoroacético
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de potasio	THF	tetrahidrofurano
LAH	hidruro de aluminio y litio	Ti(OiPr) <sub>4</sub>	tetraisoprópoxido de titanio
LiHMDS	hexametil disilazida de litio	TMS- acetileno	trimetilsilil acetileno
catalizador Lindlar	Pd-CaCO <sub>3</sub> -PbO	TPAP	perrutenato de tetrapropilamonio
mCPBA	ácido meta-cloroperbenzoico	Zn(OTf) <sub>2</sub>	trifluorometano sulfonato de zinc
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanóilo (Sigma)	PHA	fitohemaglutinina (Sigma)
TEA	triethylamina	NMM	N metilmorfolina

Procedimientos generales

Esquema I

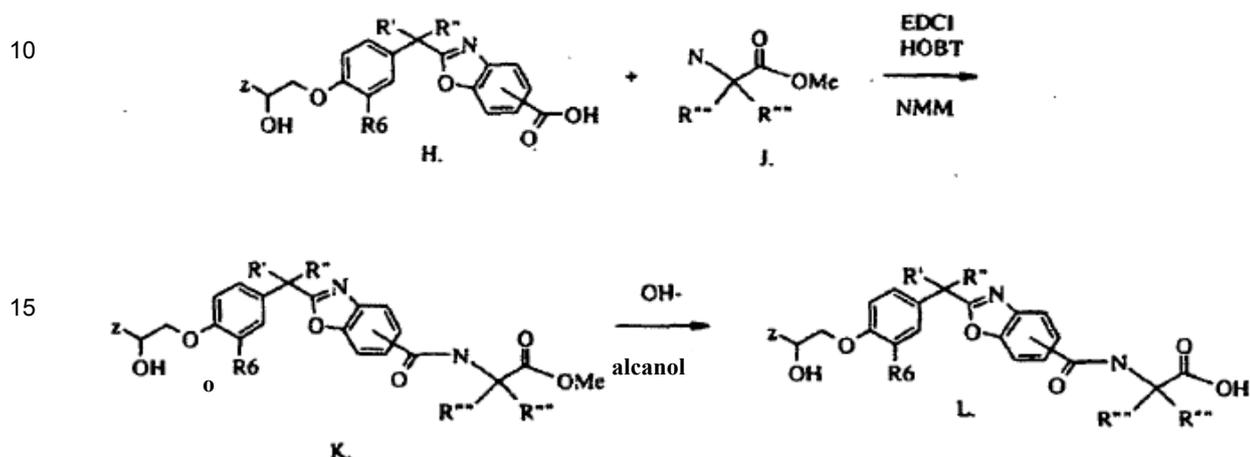


Esquema I

Se protege un 4-yodofenol 2-sustituido con haluro de bencilo en base como, por ejemplo, carbonato de potasio en un solvente aprótico polar, por ejemplo, acetona o acetonitrilo y la temperatura de reflujo de la mezcla de reacción para producir un intermediario de fenol protegido con bencilo. Este se acopla en presencia de un catalizador de paladio con el alfa anión de un alfa alcanoato de alquilo utilizando LiHMDS de 100 a 160°C para producir el éster A. El éster A se saponifica con hidróxido de litio, potasio o sodio en un alcohol a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y la temperatura de reflujo de la mezcla para producir el ácido B. El ácido B se convierte en el haluro de ácido, por ejemplo con fosgeno o fosgeno/DMF y se hace reaccionar con una o-hidroxianilina sustituida en presencia de base, por ejemplo TEA para producir la carboxanilida C. La carboxanilida C se deshidrata, por ejemplo con ácido/tolueno a una temperatura de reflujo de mezcla para producir benzoxazol D. Se elimina la protección bencílica del benzoxazol D mediante hidrogenación con un catalizador de paladio, por ejemplo, Pd-C para producir el benzoxazol E. El hidroxilo libre del benzoxazol E se alquila con una alfa-halocetona (z-C(O)CH2hal, donde z es un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido) en base, por ejemplo, carbonato de potasio en un solvente aprótico polar

como por ejemplo, acetona o acetonitrilo a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y la temperatura de reflujo de la mezcla para producir un benzoxazol alquilado F. La saponificación del benzoxazol F con hidróxido de litio, potasio o sodio en un alcohol a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y la temperatura de reflujo de la mezcla produce el ácido G. El ácido G se reduce con borohidruro o cianoborohidruro de litio o sodio en un alcohol o THF para producir el carbinol H. Como se sabe en la técnica, tanto el ácido G como el H, se asociaron a aminas primarias o secundarias, por ejemplo, EDC para producir carboxamidas tales como I o los derivados de carbinol de I.

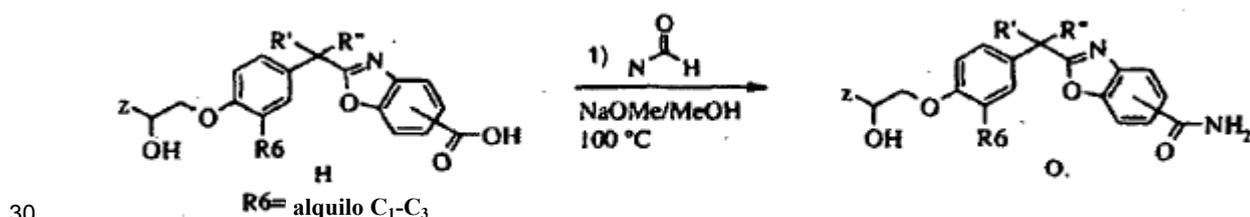
Esquema II.



20 Esquema II

El carbinol H se acopla con éster de aminoácido J, utilizando agentes de acoplamiento, como por ejemplo, EDCI, HOBT y N-metilmorfolina para producir éster de amida K. La asociación de carbonil H con éster de aminoácido cíclico J ( $R'''$  y  $R''''$  para formar un anillo) produce el éster de amida cíclica K correspondiente. El éster de amida K se trata con un hidróxido alcalino y un alcohol para producir amida de ácido L.

25 Esquema III.

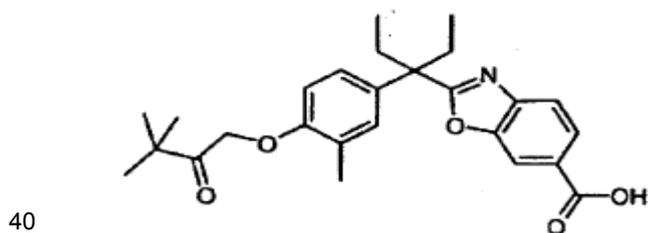


Esquema III

El carbinol H se hace reaccionar con formamida y NaOMe a 100°C para producir amida O.

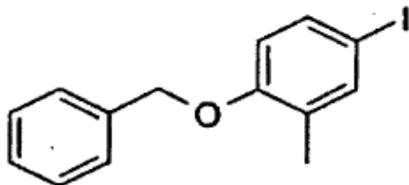
### Ejemplos

35 Ejemplo 1. Preparación de ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzoxazol-6-carboxílico



## A. 1-Benciloxi-4-yodo-2-metil-benceno

5

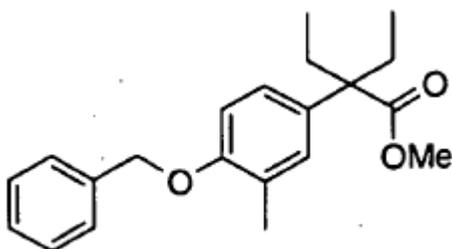


10

Una mezcla agitada mecánicamente de 4-yodo-2-metilfenol (1,62 moles; 391 g), carbonato de cesio (1,99 moles; 650 g) y 1,75 L de acetona se trata con bromuro de bencilo (1,70 moles; 203 mL; 291 g) durante 15 m. La mezcla de reacción se agita durante 21 h a temperatura ambiente y se filtra. La torta de filtrado se lava con 1L de acetona y los filtrados combinados se concentran. El semisólido bruto se recristaliza a partir de pentano para proporcionar 475 gramos (90%) del producto deseado como un sólido blanco.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 7,40 (m, 7H), 6,64 (d,  $J = 8,6$  Hz, 1H), 5,06 (s, 2H), 2,24 (s, 3H).

## B. Éster metílico del ácido 2-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-2-etil-butírico

15



20

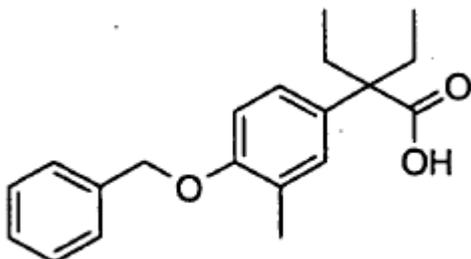
A una mezcla de 1-benciloxi-4-yodo-2-metil-benceno (494 mmoles; 160 g) y litio bis(trimetilsilil)amida (1,20 moles; 200 g) en 250 mL de tolueno a 0-5 °C se agrega una solución de éster metílico del ácido 2-etil-butírico (988 mmoles; 129 g, Síntesis, 1985 (3), 320) en 250 mL de tolueno durante 30 m, ocasionando la pérdida de calor de la reacción a 18 C. La solución amarilla turbia se deja calentar a temperatura ambiente y en agitación durante 20 m. Se agregan secuencialmente tri-terc-butilfosfina (4,94 mmoles; 1,30 mL; 1,00 g) en 200 mL de tolueno y bis(dibencilidanoacetona)paladio (7,90 mmoles; 4,54 g) y la mezcla oscura se agita a temperatura ambiente durante 62 h. La mezcla se diluye con 1L de EtOAc, se filtra a través un lecho Hyflo y se lava con 1L adicional de EtOAc. El filtrado se concentra. El aceite anaranjado oscuro (~200g) se purifica mediante cromatografía ultrarrápida (10% de EtOAc/hexanos, 1 kg de sílice) para proporcionar el compuesto del título como un aceite anaranjado claro (72,4 g). Las fracciones mezcladas se combinan y se someten nuevamente a las mismas condiciones de cromatografía para proporcionar la otra partida del compuesto del título como un aceite amarillo (50,6 g).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,40 (m, 5H), 7,02 (m, 2H), 6,83 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 5,06 (s, 3H), 3,64 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,02 (m, 4H), 0,73 (t,  $J = 7,4$  Hz, 6H).

25

30

## C. Ácido 2-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-2-etil-butírico

35



40

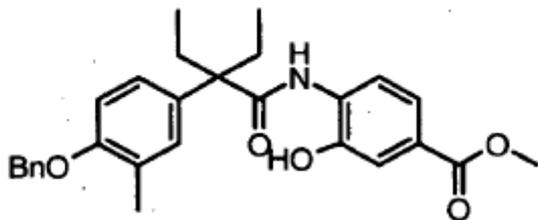
A una mezcla de ácido 2-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-2-etil-butírico (265 mmoles; 86,4 g), 860 mL de etanol al 95% y 300 mL de agua se agrega hidróxido de potasio (2,05 moles; 115 g). La solución amarilla turbia se calienta a 70 °C durante la noche. La mezcla se concentra y el residuo se reparte entre 1,5 L de MTBE y 1,5 L de HCl 1N. La capa orgánica se lava con 1 L de HCl 1N, se seca sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentra. El producto en bruto (~80 g) se agrega a hexanos (350 ml). Después de agitarse durante 1 h, el sólido se filtra, se lava con hexanos y se seca al vacío a 35 °C para proporcionar 57,2 g (69%) del compuesto del título como un sólido blanco.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,38 (m, 5H), 7,09

45

(m, 2H), 6,84 (d,  $J = 9,2$  Hz, 1H), 5,06 (s, 2H), 2,28 (s, 3H), 2,04 (m, 4H), 0,77 (t,  $J = 7,4$  Hz, 6H).

D. Éster metílico del ácido 4-[2-(4-Benciloxi-3-metil-fenil)-2-etil-butirilamino]-3-hidroxi-benzoico

5



10

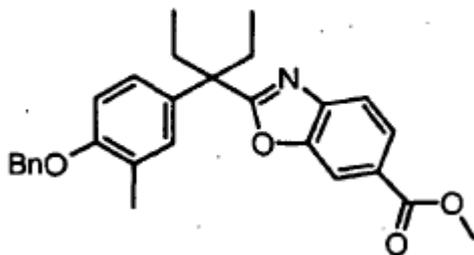
Una solución de ácido 2-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-2-etil-butirilo (5,20 g, 16,6 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) a  $0^\circ\text{C}$  se trata con  $(\text{COCl})_2$  (6,34 g, 49,9 mmol), seguido de la adición de DMF (0,2 mL). La mezcla de reacción se agita durante 10 m y el baño de enfriamiento se elimina. La mezcla se continúa agitando durante 2 h a temperatura ambiente y se concentra hasta obtener un intermediario cloruro de 2-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-2-etil-butirilo (5,40 g, 98%).

15

La solución del ácido cloruro (5,40 g, 16,3 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL) se agrega a éster metílico del ácido 4-amino-3-hidroxi-benzoico (3,27 g, 19,6 mmol). Se agrega TEA (6,90 ml, 48,9 mmol) y DMAP (100 mg, 0,82 mmol) a la mezcla y se agita a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se desactiva con agua (100 mL) y la capa acuosa se extrae con EtOAc (2 x 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se concentran y purifican mediante cromatografía en columna (25% EtOAc/Hex) para proporcionar el compuesto del título (5,30 g, 70%). MS (ES)  $m/e$ : 462,3 (M+1), 460,2 (M-1)

E. Éster metílico del ácido 2-[1-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-1-etil-propil]-benzooxazol-6-carboxílico

20



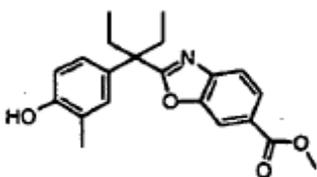
25

Una solución de éster metílico del ácido 4-[2-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-2-etil-butirilamino]-3-hidroxi-benzoico (2,15 g, 4,66 mmol) en tolueno (50 mL) se trata con  $\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (443 mg, 2,33 mmol). La reacción se calienta hasta  $160^\circ\text{C}$  durante 60 m. La mezcla de reacción se enfría y se elimina el tolueno al vacío. El residuo se purifica mediante cromatografía en columna (10% EtOAc/Hex) para proporcionar el compuesto del título como un aceite (1,50 g, 72%) MS (ES)  $m/e$ : 444,2 (M+1).

30

F. Éster metílico del ácido 2-(1-etil-1-(4-hidroxi-3-metil-fenil)-propil)-benzooxazol-6-carboxílico.

35

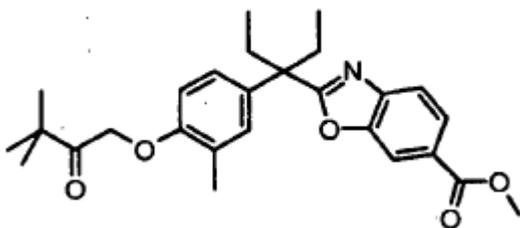


40

Una solución de éster metílico del ácido 2-[1-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-1-etil-propil]-benzooxazol-6-carboxílico (1,50 g, 3,38 mmol) en MeOH (20 mL) se agrega a una suspensión de Pd-C (150 mg, 10%) en THF (20 mL) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agita bajo presión de globo de hidrógeno durante 12 h. La mezcla se filtra a través una almohadilla de celite y el filtrado se concentra. El residuo se purifica con un 20% de EtOAc/Hex para proporcionar el compuesto del título (1,20 g, 100%). H-NMR (ppm,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 8,11 (1 H, s), 8,03 (1 H, dd,  $J=1,8, 8,4$ , Hz), 7,73 (1 H, d,  $J=8,4$  Hz), 6,97 (1 H, d,  $J=2,2$  Hz), 6,92 (1 H, dd,  $J=2,2, 8,4$  Hz), 6,70 (1 H, d,  $J=8,4$  Hz), 3,93 (3 H, s), 2,40 (2 H, q,  $J=7,5$  Hz), 2,30 (2 H, q,  $J=7,5$  Hz), 2,20 (3 H, s), 0,76 (6 H, t,  $J=7,5$  Hz).

G. Éster metílico del ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-6-carboxílico

5



10

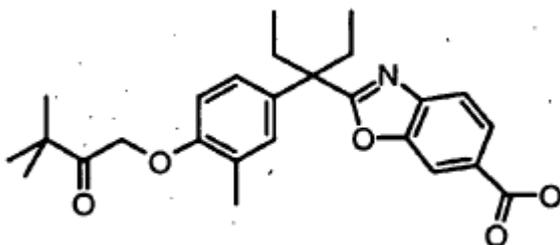
Se trata éster metílico del ácido 2-[1-Etil-1-(4-hidroxi-3-metil-fenil)-propil]-benzooxazol-6-carboxílico (1,20 g, 3,38 mmol) en acetona (40 mL) con 1-bromopinacolona (0,73 g, 4,06 mmol) y  $K_2CO_3$  (0,93 g, 6,76 mmol). La suspensión se agita a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla se filtra y el filtrado se concentra. El residuo se purifica utilizando cromatografía en columna de gel de sílice (15% EtOAc/Hex) para proporcionar el compuesto del título como un aceite amarillo claro (1,50 g, 98%).

15

H-NMR (ppm,  $EDCl_3$ )  $\delta$ : 8,14 (1 H, d,  $J=2,4$  Hz), 8,07 (1 H, dd,  $J=1,2, 8,4$  Hz), 7,78 (1 H, d,  $J=8,4$  Hz), 7,05 (1 H, d,  $J=1,6$  Hz), 7,00 (1 H, dd,  $J=2,4, 8,4$  Hz), 6,56 (1 H, d,  $J=8,4$  Hz), 4,87 (2 H, s), 3,96 (3 H, s), 2,40 (2 H, q,  $J=7,5$  Hz), 2,30 (2 H, q,  $J=7,5$  Hz), 2,28 (3 H, s), 1,27 (9 H, s), 0,77 (6 H, t,  $J=7,5$  Hz).

H. Ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-6-carboxílico.

20



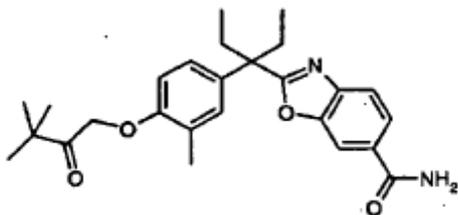
25

Se trata éster metílico del ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-6-carboxílico (1,50 g, 3,32 mmol) en MeOH (10 mL) y THF (10 mL) con NaOH (2,0 M, 20,0 mL). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla concentrada se acidifica con HCl (5 N) hasta llegar a un pH-3 y se extrae con EtOAc (100 mL, después 50 mL). La capa orgánica se seca sobre  $Na_2SO_4$ , se filtra y se concentra para proporcionar el compuesto del título (1,40 g, 97%). H-NMR (ppm,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 8,16 (1 H, d,  $J=1,3$  Hz), 8,11 (1 H, dd,  $J=1,3, 8,4$  Hz), 7,78 (1 H, d,  $J=8,4$  Hz), 7,02 (1 H, d,  $J=1,8$  Hz), 6,97 (1 H, dd,  $J=2,2, 8,4$  Hz), 6,54 (1 H, d,  $J=8,4$  Hz), 4,85 (2 H, s), 2,40 (2 H, q,  $J=7,5$  Hz), 2,30 (2 H, q,  $J=7,5$  Hz), 2,26 (3 H, s), 1,25 (9 H, s), 0,77 (6 H, t,  $J=7,5$  Hz). MS (ES) $m/e$ : 438,2 (M+1), 436,2 (M-1).

30

**Ejemplo 2.** Preparación de amida del ácido 2-{1-[4-(3,3-Dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-6-carboxílico

35

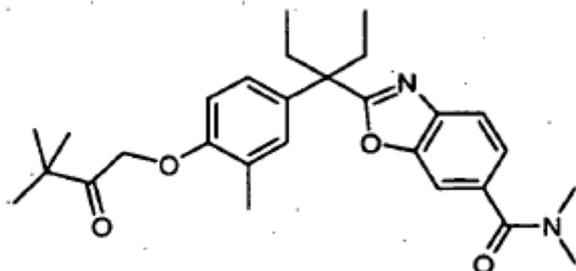


40

Una solución de ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-6-carboxílico (150 mg, 0,343 mmol) en  $CH_2Cl_2$  (5,0 mL) se trata con DMAP (125 mg, 1,03 mmol) y EDC (99 mg, 0,514 mmol). La mezcla se agita durante 15 m a temperatura ambiente antes de la adición de hidróxido de amonio acuoso (1,0 mL, 30%). La reacción se agita durante 18 h y se desactiva con  $NH_4Cl$  acuoso (5,0 mL). La capa orgánica se carga en una columna de gel de sílice y se purifica con un 50% de EtOAc/Hex para proporcionar el compuesto del título (40 mg, 27%). MS (ES)  $m/e$ : 437,3 (M+1).

**Ejemplo 3.** Preparación de dimetilamina del ácido 2-{ 1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil }-benzooxazol-6-carboxílico

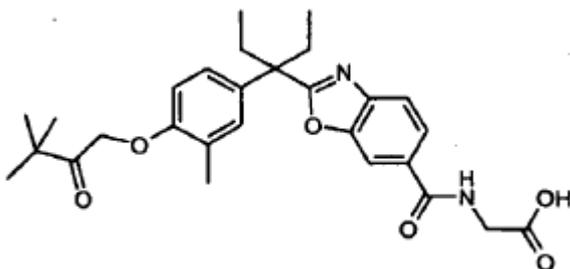
5



Se trata ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-6-carboxílico (150 mg, 0,343 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5,0 mL) con DMAP (125 mg, 1,03 mmol) y EDC (99 mg, 0,514 mmol). La mezcla se agita durante 15 m a temperatura ambiente y se agrega hidrocloreuro de dimetilamina (42 mg, 0,514 mmol). La reacción se agita durante 18 h y se desactiva con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  acuoso (5,0 mL). La capa orgánica se carga en una columna de gel de sílice y se purifica con un 50% de EtOAc/Hex para proporcionar el compuesto del título (125 mg, 79%). MS (ES) *m/e*: 465,3 (M+1).

**Ejemplo 4.** Preparación de ácido [(2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-6-carbonil)-amino]-acético

20

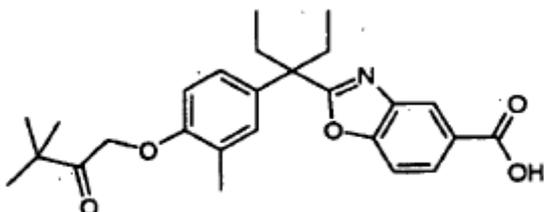


Se trata ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-6-carboxílico (150 mg, 0,343 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5,0 mL) con DMAP (125 mg, 1,03 mmol) y EDC (99 mg, 0,514 mmol). La mezcla se agita durante 15 m a temperatura ambiente y se agrega hidrocloreuro de éster metílico de glicina (64 mg, 0,514 mmol). La reacción se agita durante 18 h y se desactiva con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5,0 mL). La capa orgánica se carga en una columna de gel de sílice y se purifica con un 20-50% de EtOAc/Hex para proporcionar el intermediario éster amida.

El intermediario se disuelve en metanol (2,0 mL) y THF (2,0 mL) y se trata con NaOH (2,0 M, 5,0 mL). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla concentrada se acidifica con HCl (1 N) hasta un pH de ~3 y se extrae con EtOAc (2 x 20 mL). La capa orgánica se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentra para proporcionar el compuesto del título (95 mg, 56%). MS (ES) *m/e*: 495,2 (M+1), 493,3 (M-1).

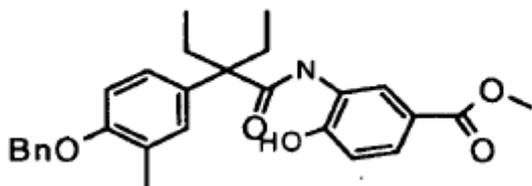
**Ejemplo 5.** Preparación de ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-penil]-1-etil-propil}-benzooxazol-5-carboxílico

35



## A. Éster metílico del ácido 3-[2-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-2-etil-butirilamino]-4-hidroxi-benzoico

5



10

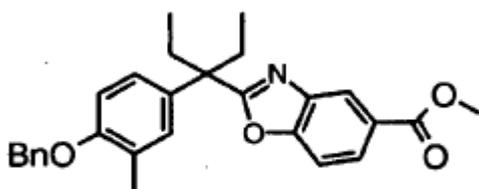
Una solución de ácido 2-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-2-etil-butirilo (4,60 g, 14,7 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL) a  $0^\circ\text{C}$  se trata con  $(\text{COCl})_2$  (6,73 g, 35,3 mmol), seguido de la adición de DMF (0,2 mL). La mezcla de reacción se agita durante 10 m y el baño de enfriamiento se elimina. La mezcla se continúa agitando durante 2 h a temperatura ambiente y se concentra hasta obtener cloruro de 2-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-2-etil-butirilo (5,40 g, 98%).

15

A la solución de ácido cloruro (5,40 g, 16,3 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL) se agrega éster metílico del ácido 3-amino-4-hidroxi-benzoico (2,95 g, 17,7 mmol). A la mezcla se agrega TEA (6,18 mL, 44,1 mmol) y DMAP (100 mg, 0,82 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se desactiva con agua (100 mL) y la capa acuosa se extrae con EtOAc (2 x 50 mL). Las capas orgánicas combinadas se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se concentran y purifican mediante cromatografía en columna (25% EtOAc/Hex) para proporcionar el compuesto del título (5,80 g, 86%): MS (ES) *m/e*: 462,3 (M+1), 460,2 (M-1)

## B. Éster metílico del ácido 2-[1-(4-Benciloxi-3-metil-fenil)-1-etil-propil]-benzooxazol-5-carboxílico

20

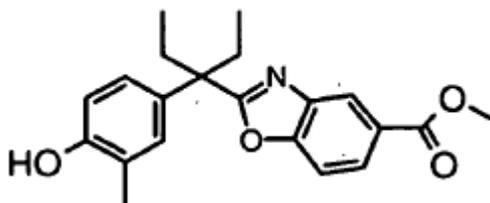


25

Se hacen reaccionar éster metílico del ácido 3-[2-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-2-etil-butirilamino]-4-hidroxi-benzoico (5,80 g, 12,6 mmol) y TsOH- $\text{H}_2\text{O}$  (478 mg, 2,51 mmol) en tolueno (100 mL) de manera análoga al ejemplo 1, etapa E para proporcionar el producto del título (5,08 g, 91%). MS (ES) *m/e*: 444,2 (M+1).

## C. Éster metílico del ácido 2-[1-etil-1-(4-hidroxi-3-metil-fenil)-propil]-benzooxazol-5-carboxílico (PF1-A05244-036A)

30

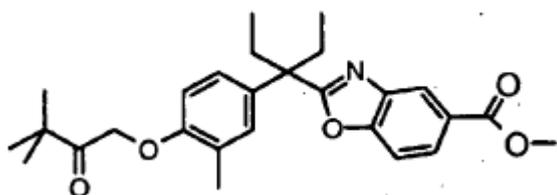


35

Se hidrogena éster metílico del ácido 2-[1-(4-benciloxi-3-metil-fenil)-1-etil-propil]-benzooxazol-5-carboxílico (3,28 g, 7,39 mmol) y Pd-C (300 mg, 10%) de manera análoga al ejemplo 1, etapa F para proporcionar el producto del título (2,10 g, 80%). MS (ES) *m/e*: 354,2 (M+1), 352,2 (M-1).

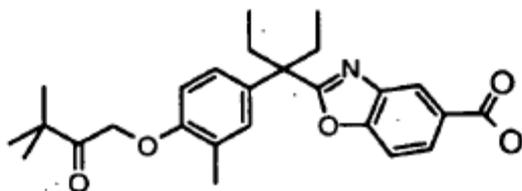
## D. Éster metílico del ácido 2-[1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil]-benzooxazol-5-carboxílico

40



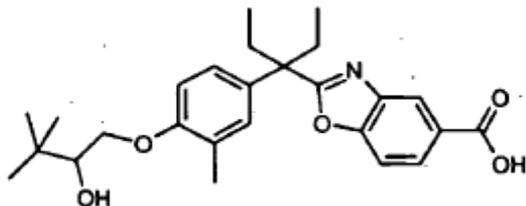
Se hacen reaccionar éster metílico del ácido 2-[1-etil-1-(4-hidroxi-3-metil-fenil)-propil]-benzooxazol-5-carboxílico (2,10 g, 5,94 mmol) y 1-bromopinacolona (1,59 g, 8,87 mmol) y  $K_2CO_3$  (2,04 g, 14,8 mmol) de manera análoga al ejemplo 1, etapa G para proporcionar el compuesto del título como un aceite amarillo claro (2,55 g, 95%). H-NMR (ppm,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 8,43 (1 H, d,  $J=1,3$  Hz), 8,01 (1 H, dd,  $J=1,8, 8,8$  Hz), 7,42 (1 H, d,  $J=8,4$  Hz), 7,01 (1 H, d,  $J=2,2$  Hz), 6,96 (1 H, dd,  $J=2,2, 8,4$  Hz), 6,51 (1 H, d,  $J=8,8$  Hz), 4,84 (2 H, s), 3,95 (3 H, s), 2,38 (2 H, q,  $J=7,5$  Hz), 2,32 (2 H, q,  $J=7,5$  Hz), 2,25 (3 H, s), 1,25 (9 H, s); 0,76 (6 H, t,  $J=7,5$  Hz).

E. Ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-5-carboxílico.



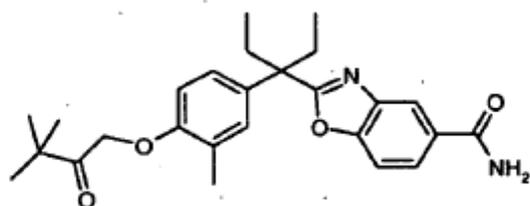
Se hidrogena éster metílico del ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-5-carboxílico (2,55 g, 5,65 mmol) de manera análoga al ejemplo 1, etapa H para proporcionar el compuesto del título como un aceite amarillo claro (2,46 g, 99%). H-NMR (ppm,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 8,51 (1 H, d,  $J=1,8$  Hz), 8,08 (1 H, dd,  $J=1,8, 8,4$  Hz), 7,45 (1 H, d,  $J=8,8$  Hz), 7,02 (1 H, d,  $J=2,2$  Hz), 6,96 (1 H, dd,  $J=2,2, 8,4$  Hz), 6,52 (1 H, d,  $J=8,8$  Hz), 4,84 (2 H, s), 2,38 (2 H, q,  $J=7,5$  Hz), 2,32 (2 H, q,  $J=7,5$  Hz), 2,26 (3 H, s), 1,25 (9 H, s), 0,76 (6 H, t,  $J=7,5$  Hz). MS (ES)  $m/e$ : 438,2 (M+1), 436,2 (M-1).

**Ejemplo 6.** Preparación de ácido 2-{1-[4-(2-hidroxi-3,3-dimetil-butoxi)-3-metilfenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-5-carboxílico



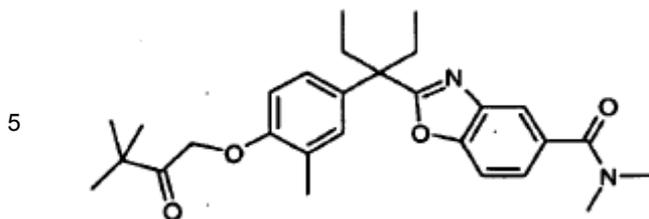
Se trata ácido 2-{1-[4-(3,3-Dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-5-carboxílico (0,58 g, 1,33 mmol) en THF (30 mL) a temperatura ambiente con  $NaBH_4$  (100 mg, 2,65 mmol). La mezcla resultante se agita durante 1 h. La reacción se desactiva con HCl (1,0 N, 5,0 mL) y se extrae con EtOAc (3 x 50 mL). La capa orgánica se seca sobre  $Na_2SO_4$  y se concentra para proporcionar el compuesto del título (0,58 g, 100%). MS (ES)  $m/e$ : 440,3 (M+1), 438,2 (M-1).

**Ejemplo 7.** Preparación de amida del ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-5-carboxílico



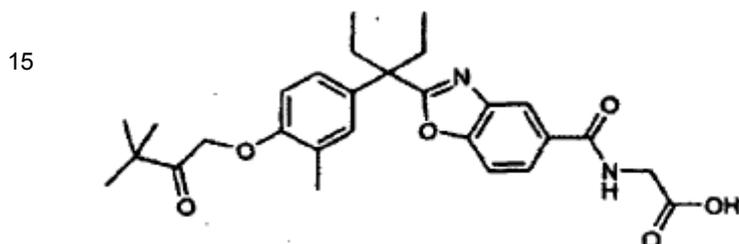
Se hace reaccionar ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-5-carboxílico (150 mg, 0,343 mmol), DMAP (125 mg, 1,03 mmol) y EDC (99 mg, 0,514 mmol) e hidróxido de amonio acuoso (1,0 mL), 30% de manera análoga al ejemplo 2 para proporcionar el producto del título (10 mg, 7%). MS (ES)  $m/e$ : 437,3 (M+1).

**Ejemplo 8.** Preparación de dimetilamina del ácido 2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-5-carboxílico



10 Se hacen reaccionar ácido 2-{1-[4-(3,3-Dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-5-carboxílico (150 mg, 0,343 mmol), DMAP (125 mg, 1,03 mmol), EDC (99 mg, 0,514 mmol) e hidrocloreto de dimetilamina (42 mg, 0,514 mmol) de manera análoga al ejemplo 3 para proporcionar el producto del título (80 mg, 50%). MS (ES) *m/e*: 465,3 (M+1).

**Ejemplo 9.** Preparación de ácido [(2-{1-[4-(3,3-dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-5-carbonil)-amino]-acético



20 Se hacen reaccionar y se hidrolizan ácido 2-{1-[4-(3,3-Dimetil-2-oxo-butoxi)-3-metil-fenil]-1-etil-propil}-benzooxazol-5-carboxílico (150 mg, 0,343 mmol), DMAP (125 mg, 1,03 mmol), EDC (99 mg, 0,514 mmol) e hidrocloreto de éster metílico glicina (64 mg, 0,514 mmol) de manera análoga al ejemplo 4 para proporcionar el producto del título (130 mg, 76%). MS (ES) *m/e*: 495,3 (M+1), 493,3 (M-1).

Compuestos de la invención - Sales, estereoisómeros y profármacos:

25 Las sales de los compuestos representados por la fórmula C1-C16 constituyen un aspecto adicional de la invención. El entendido en la técnica también entenderá que la familia de compuestos de fórmula C1-C16 incluye miembros ácidos y básicos y que la presente invención incluye sales farmacéuticamente aceptables de estos.

30 En los casos en los que los compuestos de la invención tienen grupos funcionales ácidos o básicos, se pueden formar diversas sales que son más solubles en agua y más fisiológicamente adecuadas que el compuesto de partida. Las sales farmacéuticamente aceptables representativas incluyen, sin limitación, las sales alcalinas y alcalinotérricas como, por ejemplo, litio, sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, zinc y similares. Las sales de sodio y potasio se prefieren particularmente. Las sales se preparan convenientemente a partir de ácido libre tratando el ácido en una solución con una base o exponiendo el ácido a una resina de intercambio iónico. Por ejemplo, un sustituyente de ácido carboxílico en el compuesto de fórmula C1-C16 puede seleccionarse como -CO<sub>2</sub>H y se pueden formar sales mediante reacción con bases apropiadas (por ejemplo, NaOH, KOH) para producir la sal de sodio y potasio correspondiente.

35 Incluidas dentro de la definición de sales farmacéuticamente aceptables se encuentran las sales de adición de base orgánicas e inorgánicas, relativamente no tóxicas, de los compuestos de la presente invención, por ejemplo, amonio, amonio cuaternario y cationes de amina, derivadas de bases nitrogenadas con suficiente basicidad para formar sales con los compuestos de esta invención (véase, por ejemplo S. M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," J. Phar. Sci., 66: 1-19 (1977)). Asimismo, los grupos básicos del compuesto de la invención pueden someterse a reacción con ácidos orgánicos o inorgánicos adecuados para formar sales como por ejemplo, acetato, benzenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, bitartrato, borato, bromuro, camsilato, carbonato, cloruro, colina, clavulanato, citrato, cloruro, cloroprocaina, colina, dietanolamina, dihidrocloruro, difosfato, edetato, edisilato, estolato, esilato, etilendiamina, fluoruro, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromuro, cloruro, hidrobromuro, hidrocloreto, hidroxinaftoato, yoduro, isotionato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, malseato, mandelato, meglumina, mesilato, mesviato, metilbromuro, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pantotenato, fosfato, poligalacturonato, procano, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato, teocato, tosilato, trifluoroacetato, sulfonato de trifluorometano y valerato.

Algunos compuestos de la invención pueden poseer uno o más centros quirales y pueden por consiguiente existir en formas ópticamente activas. De igual manera, cuando los compuestos contienen un grupo alqueno o alqueniño existe la posibilidad de formas *cis*- y *trans*- isoméricas de los compuestos. Esta invención contempla los isómeros R- y S- y las mezclas de estos, incluidas las mezclas racémicas así como también las mezclas *cis*- y *trans*- isómeros. Pueden encontrarse átomos de carbono asimétricos adicionales en un grupo sustituyente como por ejemplo un grupo alquilo. Se pretende que todos estos isómeros así como las mezclas de éstos estén incluidos en la invención. Si se desea un estereoisómero particular, puede prepararse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica empleando reacciones estereoespecíficas con materiales de partida que contienen los centros asimétricos y ya están resueltos, o alternativamente, mediante procedimientos que conducen a las mezclas de estereoisómeros y la resolución posterior mediante medios conocidos. Por ejemplo, puede usarse una columna quiral como, por ejemplo, las comercializadas por Daicel Chemical Industries identificadas con las marcas comerciales:

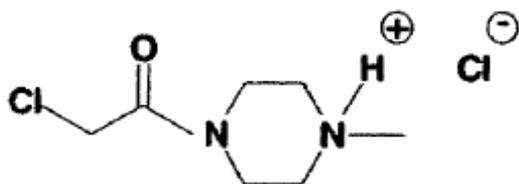
- CHIRALPAK AD, CHIRALPAK AS, CHIRALPAK OD, CHIRALPAK OJ,
- CHIRALPAK OA, CHIRALPAK OB, CHIRALPAK OC, CHIRALPAK OF,
- CHIRALPAK OG, CHIRALPAK OK y CHIRALPAK CA-1.

Mediante otro procedimiento convencional, puede someterse a reacción una mezcla racémica con un enantiómero único de algún otro compuesto. Esto convierte la forma racémica en una mezcla de diastereoisómeros. Al tener diferentes puntos de fusión, diferentes puntos de ebullición y diferentes solubilidades estos diastereoisómeros pueden separarse mediante medios convencionales como, por ejemplo, cristalización.

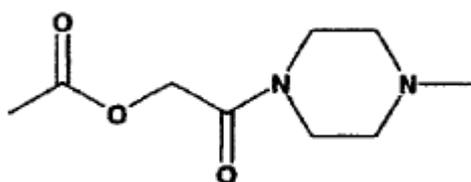
Los profármacos son derivados de los compuestos de la invención que tienen grupos escindibles química o metabólicamente y se convierten mediante solvolisis o bajo condiciones fisiológicas en los compuestos de la invención farmacéuticamente activos in vivo. Los derivados de los compuestos de la presente invención tienen actividad tanto en su forma derivada ácida como básica, pero la forma derivada ácida ofrece a menudo ventajas de solubilidad, compatibilidad tisular o liberación retardada en un organismo mamífero (véase Bundgard, H., Design of Prodrugs, pág. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985). Los profármacos incluyen derivados de ácidos, ampliamente conocidos para los entendidos en la técnica. Los derivados de éster de conformidad con la invención se preparan haciendo reaccionar el compuesto ácido original con un alcohol adecuado. Las amidas se preparan haciendo reaccionar el compuesto ácido original con una amina adecuada. Los profármacos preferidos son ésteres alifáticos o aromáticos simples derivados de grupos ácidos pendientes de los compuestos de la presente invención. En algunos casos, es deseable preparar profármacos de tipo éster doble como, por ejemplo, ésteres (aciloxi) alquilo o ésteres ((alcoxycarbonil)oxi)alquilo. Los ésteres particularmente preferidos para usar como profármacos son: metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, morfolinoetilo y N,N-dietilglicolamido.

Los profármacos de éster N,N-dietilglicolamido pueden prepararse haciendo reaccionar la sal de sodio de un compuesto de fórmula C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub> (en un medio como, por ejemplo, dimetilformamida) con 2-cloro-N,N-dietilacetamida (disponible en Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.; art. No. 25,099-6).

Los profármacos de éster morfoliniletilo pueden prepararse haciendo reaccionar la sal de sodio de un compuesto de fórmula C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub> (en un medio como por ejemplo amida en forma de dimetilo) con hidrocloreto 4-(2-cloroetil)morfolina (disponible en Aldrich Chemical Co. Milwaukee, Wisconsin, EE.UU., art. No. C5.220-3). Por ejemplo, los profármacos pueden prepararse haciendo reaccionar la sal de sodio para un compuesto de fórmula I con;



y yoduro de sodio para proporcionar el grupo pendiente del profármaco de éster.



Asimismo, los profármacos de éster alquilo inferior (*viz.*, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) pueden prepararse mediante medios convencionales

como, por ejemplo, haciendo reaccionar la sal de sodio o potasio (derivada formando la sal de cualquier compuesto ácido de la invención; viz., reacción de una base como por ejemplo KOH con un grupo ácido como por ejemplo -CO<sub>2</sub>H) de un compuesto de fórmula C1-C16 con un yoduro alquilo como por ejemplo yoduro de metilo, yoduro de etilo, yoduro de n-propilo y yoduro de isopropilo.

5 Formulaciones farmacéuticas que contienen los nuevos compuestos de la invención:

Las formulaciones farmacéuticas de la invención se preparan combinando (por ejemplo, mezclando) una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención (compuestos de fórmula C1-C16) con un soporte o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones farmacéuticas de la presente se preparan mediante procesos conocidos usando ingredientes ampliamente conocidos y de fácil acceso.

- 10 Al preparar las composiciones de la presente invención, los compuestos de la invención a menudo se mezclarán con un soporte o se diluirán mediante un vehículo o incluirán en un vehículo que puede estar en forma de cápsula, *sachet*, papel u otro recipiente. Cuando el vehículo sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido que actúa como vehículo o puede tener forma de comprimidos, píldoras, polvos, grageas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido) o ungüento, que  
15 contiene por ejemplo hasta un 10% en peso del compuesto. Los compuestos de la presente invención se formulan preferentemente antes de la administración.

Los compuestos de la invención también pueden suministrarse mediante formulaciones adecuadas incluidas en un parche transdérmico. Alternativamente, los compuestos de la invención pueden suministrarse a un paciente mediante administración sublingual.

- 20 Para las formulaciones farmacéuticas puede emplearse cualquier vehículo conocido en la técnica. En esa formulación, el soporte puede ser un sólido, un líquido o una mezcla de un sólido y un líquido. Las formulaciones sólidas incluyen polvos, tabletas y cápsulas. Un soporte sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como agentes saborizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, aglutinantes, agentes disgregantes de comprimidos y material de encapsulación.

- 25 Las tabletas para administración oral pueden contener excipientes adecuadas como, por ejemplo, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio, junto con agentes disgregantes como, por ejemplo, maíz, almidón o ácido alginico y/o agentes aglutinantes, por ejemplo, gelatina o acacia y agentes lubricantes como por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

- En polvos, el vehículo es un sólido finamente molido que se encuentra mezclado con el ingrediente activo finamente  
30 molido. En comprimidos, un compuesto de la invención se mezcla con un vehículo que posee las propiedades aglutinantes necesarias en proporciones adecuadas y se compacta de la forma y tamaño deseados. Los polvos y comprimidos contienen preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 99 % en peso del compuesto de la presente invención. Los vehículos sólidos adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, lactosa de azúcar, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, celulosa de metilo, celulosa de sodio  
35 carboximetilo, ceras de baja fusión y manteca de cacao.

Las formulaciones líquidas estériles incluyen suspensiones, emulsiones, jarabes y elixires.

- El ingrediente activo puede disolverse o suspenderse en un vehículo farmacéuticamente aceptable, como por ejemplo agua estéril, disolvente orgánico estéril o una mezcla de ambos. Los compuestos pueden disolverse a  
40 menudo en un solvente orgánico adecuado, por ejemplo, glicol propileno acuoso. Otras composiciones pueden prepararse dispersando los compuestos finamente molidos de la invención en almidón acuoso o solución de carboximetil celulosa de sodio o en un aceite adecuado.

Procedimientos para usar los compuestos de la invención:

- Muchas enfermedades se benefician del tratamiento con los compuestos de fórmula C1-C16, incluidas, sin limitación, caracterizadas por: regulación anormal del calcio, proliferación anormal celular, diferenciación anormal celular,  
45 respuesta inmune anormal, condiciones dermatológicas anormales, afección neurodegenerativa, inflamación, sensibilidad a la vitamina D y/o trastornos hiperproliferativos.

- Algunas enfermedades específicas se benefician del tratamiento con los compuestos de fórmula C1-C16 incluidas, sin limitación: acné, queratosis actínica, alopecia, enfermedad de Alzheimer, hiperplasia prostática benigna, cáncer de vesícula, mantenimiento óseo en gravedad cero, cura de fractura ósea, cáncer de mamas, quimioprevención de  
50 cáncer, enfermedad de Crohn, cáncer de colon, diabetes Tipo I, rechazo receptor-injerto, hipercalcemia, diabetes Tipo II, leucemia, esclerosis múltiple, síndrome mielodisplástico, secreción sebácea insuficiente, osteomalacia, osteoporosis, firmeza dérmica insuficiente, enfermedad periodontal, hidratación dérmica insuficiente, artritis psoriática, cáncer de próstata, psoriasis, osteodistrofia renal, artritis reumatoidea, escleroderma, cáncer de piel,

lupus sistémico, eritematosis, daño celular en la piel por vesicantes mostaza, colitis ulcerativa, vitiligo y arrugas.

Particularmente preferido es el tratamiento de la psoriasis y/o osteoporosis. Por "cantidad farmacéuticamente aceptable" se entiende la cantidad de agente farmacéutico correspondiente a la fórmula C1-C16 que previene, elimina o reduce los efectos perjudiciales de una enfermedad en mamíferos, incluidos los seres humanos.

- 5 La dosis específica de un compuesto administrado de conformidad con esta invención para obtener efectos terapéuticos o profilácticos se determinará, por supuesto, según las circunstancias particulares de cada caso incluidos, por ejemplo, el compuesto que se administre, la vía de administración y la afección que se trate. Las dosis diarias típicas contendrán una cantidad farmacéuticamente efectiva típicamente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 0,0001mg/kg/día y aproximadamente 50mg/kg/día de peso corporal de un compuesto activo de la presente invención. Preferentemente, la dosis de compuestos de la invención estará comprendida entre 0,0001 y 10 5mg/kg/día de peso corporal.

- Preferentemente, los compuestos de la invención o las formulaciones farmacéuticas que contienen estos compuestos son dosis unitarias para administrar a mamíferos. La dosificación unitaria puede ser una cápsula o comprimido en sí misma o la cantidad apropiada de cualquiera de estas. La cantidad de ingrediente activo en una 15 composición de dosis unitaria puede variarse o ajustarse entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 1000 miligramos o más de conformidad con cada tratamiento particular. Puede apreciarse que es necesario realizar variaciones rutinarias a la dosis, en función de la edad y afección del paciente. La dosificación también dependerá de la vía de administración. Los compuestos de la invención pueden administrarse mediante una variedad de vías incluidas, oral, aerosol, rectal, transdérmica, sublingual, subcutánea, intravenosa, intramuscular e intranasal. 20 Particularmente preferido es el tratamiento de la psoriasis con una formulación tipo ungüento que contiene los compuestos de la invención. La formulación de ungüento puede aplicarse como sea necesario, típicamente de una a seis veces al día.

- El tratamiento de la psoriasis se lleva a cabo preferentemente con una aplicación tópica mediante una formulación en forma de crema, aceite, emulsión, pasta o ungüento que contiene una cantidad terapéuticamente efectiva de un 25 compuesto de la invención. La formulación para tratamiento tópico contiene entre un 0,5 y un 0,00005 % en peso, preferentemente entre un 0,05 y un 0,0005 % en peso y más preferentemente entre un 0,025 y un 0,001 de un ingrediente activo.

Por ejemplo, dos preparaciones tópicas semisólidas útiles como vehículos para los moduladores VDR en el tratamiento y prevención de la psoriasis son las siguientes:

- 30 Ungüento polietilenglicol USP (p. 2495)

Preparar ungüento polietilenglicol de la siguiente manera:

Polietilenglicol 3350	400g.
-----------------------	-------

Polietilenglicol 400	600g.
----------------------	-------

Para preparar	1.000g.
---------------	---------

Calentar los dos ingredientes a baño maría a 65°C. Dejar enfriar y agitar hasta congelar. Si se desea una preparación más firme, reemplazar hasta 100g del polietilenglicol 400 con una cantidad igual de polietilenglicol 3350.

- 35 Ungüento hidrofílico USP (p. 1216)

Preparar ungüento hidrofílico de la siguiente manera:

Metilparabeno	0,25 g.
---------------	---------

Propilparabeno	0,15 g.
----------------	---------

## ES 2 369 510 T3

Lauril sulfato de sodio	10 g.
Propilenglicol	120 g.
Alcohol estearilo	250 g.
Petrolato blanco	250 g.
Agua purificada	370 g.
<hr/>	
Para preparar aprox.	1.000 g.

El alcohol estearílico y la vaselina se fusionan en un baño a vapor y se calientan a aproximadamente 75°C. Se agregan los otros ingredientes, disueltos previamente en el agua, se calientan a 75°C y se agita la mezcla hasta que se coagula.

5 Para cada una de las formulaciones anteriores se agrega el Ingrediente Activo durante la fase de calentamiento en una cantidad entre un 0,5 y un 0,00005 % en peso, preferentemente entre un 0,05 y un 0,0005 % en peso y "USP" más preferentemente entre 0,025 y 0,001 % en peso del total del peso del ungüento, (Fuente: - United States Pharmacopoeia 24, United States Pharmacopoeial Convention, 1999)

10 La terapia convencional de la osteoporosis incluye: i) estrógenos, (ii) andrógenos, (iii) suplementos de calcio, (iv) metabolitos de vitamina D, (v) diuréticos tiazídicos, (vi) calcitonina, (vii) bisfosfonatos, (viii) SERMS, (ix) fluoruros y (x) hormona paratiroidea (PTH) (ver, Harrison's Principles of Internal Medicine, 13ª edición, 1994, publicado por McGraw Hill Publ., ISBN 0-07-032370-4, págs. 2172-77; cuya divulgación se incorpora a la presente a modo de referencia). Cualquiera de estas terapias convencionales o sus combinaciones pueden usarse en combinación con el tratamiento utilizando compuestos de fórmula C1-C16 como se indica en la presente. Por ejemplo, en el tratamiento de la osteoporosis, los compuestos moduladores del receptor de la vitamina D de la invención pueden administrarse de forma separada o simultánea con una terapia convencional. Alternativamente, los compuestos moduladores del receptor de vitamina D de la invención pueden combinarse con agentes terapéuticos convencionales en una formulación para el tratamiento de osteoporosis como se indica a continuación:

Una formulación para el tratamiento de la osteoporosis que comprende:

- 20 • Ingrediente (A1): un modulador del receptor de la vitamina A representado por la fórmula C1-C16 o una sal farmacéuticamente aceptable o un derivado de profármaco de este;
- Ingrediente (B1): uno o más co-agentes convencionales para el tratamiento de la osteoporosis seleccionado del grupo que consiste en: estrógenos, andrógenos, suplementos de calcio, metabolitos de la vitamina D, diuréticos tiazídicos, calcitonina, bisfosfonatos, SERMS, fluoruros y PTH.
- Ingrediente (C1): opcionalmente un vehículo o diluyente.

25 Típicamente las formulaciones útiles son aquellas en las que la relación de peso de (A1) y (B1) es de 10:1 a 1:1000 y preferentemente de 1:1 a 1:100.

### Terapia de combinación para psoriasis:

30 La terapia convencional para psoriasis incluye glucocorticoides tópicos, ácido salicílico, alquitrán de hulla bruto, luz ultravioleta y metotrexato (véase, Harrison's Principles of Internal Medicine, 13ª edición, 1994, publicado por McGraw Hill Publ., ISBN 0-07-032370-4, págs. 2172-77). Cualquiera, de estas terapias convencionales, o cualquier combinación de estas, puede usarse en combinación con el tratamiento utilizando compuestos de fórmula C1-C16 como se indica en la presente. Por ejemplo, en el tratamiento de la psoriasis, los compuestos moduladores del receptor de la vitamina D de la invención pueden administrarse tópicamente de forma separada o simultánea con una terapia convencional. Alternativamente, los compuestos moduladores del receptor de vitamina D de la invención pueden combinarse con agentes terapéuticos convencionales en una formulación de aplicación tópica para el tratamiento de psoriasis como se indica a continuación:

Una formulación para el tratamiento de la psoriasis que comprende:

- Ingrediente (A2): un modulador del receptor de la vitamina D representado por la fórmula C1-C16 o una sal farmacéuticamente aceptable o profármaco derivado de este;
- Ingrediente (B2): uno o más co-agentes convencionales para el tratamiento de la psoriasis seleccionado del grupo que consiste en: glucocorticoides tópicos, ácido salicílico o alquitrán de hulla bruto.

5 • Ingrediente (C2): opcionalmente un vehículo o diluyente.

Típicamente las formulaciones útiles son aquellas donde la relación de peso de (A2) y (B2) es de 1:10 a 1:100000 y preferentemente de 1:100 a 1:10000.

Resultados experimentales:

Tabla 2:

Resumen de los resultados experimentales			
Comp. ensayo <sup>1</sup>	Heterodimer RXR-VDR <sup>2</sup> EC50 (nM)	Promotor de OCN <sup>3</sup> EC50 (nM)	Prolif. querat. CI50 (nM) <sub>4</sub>
Ej. 1	1117	376	
Ej. 2	73	289	>1000
Ej. 3	701	1642	
Ej. 4	700	1174	
Ej. 5	37	8	>1000
Ej. 6	5		36
Ej. 7	177		>1000
Ej. 8	117		>1000
Ej. 9	150		>1000

Explicación de los superíndices numéricos de las columnas de la Tabla 2:

1. Los números de los compuestos del ensayo se refieren a los productos de los Nos. de ejemplos correspondientes, es decir, compuestos dentro del alcance de la invención.

15 2. El ensayo de heterodimerización RXR-VDR (células SaOS-2) se describe en la sección "Ensayos" de la descripción, *infra*.

3. El ensayo de promotor de OCN se describe en la sección "Ensayos" de la descripción, *infra*.

4. El ensayo de proliferación de queratinocitos se describe en la sección "Ensayos" de la descripción, *infra*.

Procedimientos de ensayo

20 Uso de los procedimientos de ensayo:

La evaluación de los nuevos compuestos de la invención para osteoporosis y otras enfermedades relacionadas se lleva a cabo utilizando una pluralidad de resultados de ensayos. El uso de múltiples ensayos es beneficioso ya que se prefiere que las propiedades combinadas de (i) la actividad alta del receptor de vitamina D y (ii) la prevención de hipercalcemia tengan efecto sobre las enfermedades tratadas, las cuales también constituyen aspectos de la invención. Se cree que algunos de los ensayos descritos a continuación están relacionados con otros ensayos y propiedades relativas a la medición de los compuestos. Por consiguiente, puede considerarse que un compuesto es útil en la práctica de la invención si cumple con al menos uno o preferentemente dos, si no todos, los criterios de aceptación de los ensayos descritos anteriormente.

30 La evaluación de los nuevos compuestos de la invención para la psoriasis se lleva a cabo utilizando el ensayo de proliferación de queratinocitos en combinación con otros ensayos que miden la inhibición de la producción de IL-2 y

la estimulación de la producción de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Breve descripción, utilidad y criterios de aceptación de los procedimientos de ensayo:

1. Ensayo de heterodímero RXR-VDR:

5 Este ensayo proporciona la actividad VDR de un compuesto de ensayo. Es deseable que los compuestos de este ensayo tengan valores EC50 bajos. Cuanto más bajo sea el valor CE50, más activo será el compuesto como agonista de VDR. Los resultados de ensayo deseados son valores EC50 menores o iguales a 600nM. Los resultados de ensayo preferidos son menores a 250nM y más preferentemente menores a 150nM.

(1) Materiales y procedimiento de transfección del ensayo de heterodimerización RXR-VDR

Procedimiento: Reactivos: Reactivo de transfección FuGENE (Roche Cat # 1 814 443);

10 Medios de cultivo: Glucosa alta D-MEM (Gibco BRL Cat # 11054-020), 10% de FBS inactivado por calor (Gibco BRL Cat # 10092-147), 1% de antibiótico-antimicótico (Ab-Am); (Gibco BRL Cat # 15240-062).

Células: Cultivar células SaOS-2 en recipientes de cultivo T-150cm<sup>2</sup> en medios de cultivo que mantienen la densidad a 5-6x10<sup>5</sup> células/ml. Células de paso 1:3 dos veces por semana. Agregar tripsina EDTA (Gibco BRL Cat # 25300-020) e incubar. Volver a suspender las células en medios de cultivo en placas y transferir a medios de cultivo.

15 Medios de lavado: Glucosa baja sin rojo de fenol HBSS (Gibco BRL Cat # 14175-095), 1% de Ab-Am. Medios de cultivo en placas: Glucosa baja sin rojo de fenol D-MEM (Gibco BRL Cat # 11054-020), 1% de Ab-Am; D-MEM; 10 % de FBS depurado (Hyclone Cat# SH30068.03 Lot # AHM9371).

Medios de transfección/tratamiento: Únicamente glucosa baja sin rojo de fenol D-MEM; recipiente de cultivo T-150cm<sup>2</sup>: Utilizar recipiente de cultivo T-150cm<sup>2</sup> Corning Costar (Cat # 430825) para cultivar las células.

20 Reactivo de ensayo luciferasa: Utilizar reactivo de luciferasa Steady-Glo de Promega (Cat # E2550). Consiste en: Sustrato de ensayo E2533, producto liofilizado y tampón de ensayo E2543. Descongelar a temperatura ambiente y almacenar.

25 Recuento/cosecha celular: Aspirar los medios del recipiente de cultivo, lavar las células con HBSS y aspirar. Agregar tripsina e incubar. Cuando las células parecen disgregadas, volver a suspender las células en medio de cultivo. Transferir a un nuevo recipiente con medio de cultivo fresco para pasaje de células. Colocar en placas de 96 pocillos y dos placas extra. Mezclar la suspensión celular utilizando una pipeta. Para contar las células usar un hematocitómetro.

30 Siembra en placas: Utilizar medios de cultivo de placas con 10 % de FBS depurado en glucosa baja D-MEM, sin rojo de fenol, 1% de Ab-Am. Cultivar 14 placas a 165µl/pocillo. Agregar suspensión celular a un recipiente esterilizado para medio de cultivo y mezclar. Agregar células/pocillo. Colocar las células en la incubadora. Las células deben ser aproximadamente confluentes en un 75% antes de la transfección. DÍA 2: Transfección: Etapa 1, ADN y medios: Agregar medios DMEM comunes a los tubos para mezclar el ADN; agregar el gen indicador pFR-LUC; y agregar Gal4-RXR-DEF y VP16-VDR-LBD. Etapa 2, Complejo de FuGENE y medios: Preparar medio DMEM normal en un tubo para mezclar FuGENE, agregar reactivo de transfección FuGENE 6 e incubar. Etapa 3, Complejo de FuGENE, ADN y medios: Agregar complejo de medios FuGENE del paso 2 al complejo de medios ADN de la etapa 1 e incubar. Etapa 4, complejo de FuGENE, ADN y medios a placas de 96 pocillos: Agregar complejo FuGENE-ADN-medios de la etapa 3 a cada placa. Incubar.

DÍA 3: Dosificación: Preparación del tratamiento. Disponer un tiempo de transfección.

40 Preparar una solución madre de los compuestos en DMSO y agitar hasta que todos los compuestos estén disueltos. Volver a diluir en D-MEM (glucosa baja-sin rojo de fenol)

Agregar compuestos en cuadruplicado para producir el volumen final deseado, después incubar.

45 DÍA 4: Ensayo de luciferasa: Leer las placas después del tratamiento de fármacos. Eliminar parte de los medios de todos los pocillos y dejar un remanente. Agregar la mezcla de reactivo de luciferasa Steady-Glo/pocillos e incubar. Contar cada pocillo utilizando un contador de luminiscencia, preferentemente, Top Count NXT de Packard fijar un desfase entre las placas para reducir la interferencia.

Ensayo de co-transfección celular caco-2:

En ensayo celular caco-2 es un indicador de la afección indeseada de hipercalcemia. Este ensayo de co-transfección es un ensayo de sustitución de la actividad calcémica *in vivo* de los ligandos VDR. Es deseable que los compuestos de este ensayo tengan valores EC50 altos. Cuanto más altos sean los valores EC50 de un compuesto menos calcémico será *in vivo*. Los resultados de ensayo deseados son valores EC50 mayores o iguales a 300nM. Los resultados de ensayos preferidos son mayores a 1000 nM.

Las células caco-2, cultivadas en DMEM sin rojo de fenol (Invitrogen, Carlsbad, CA) que contiene un 10% de FBS depurado con carbón (Hyclone, Logan, UT), se transfectan con reactivo Fugene 6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Se cultivan células (5000/pocillo) en placas 18h antes de la transfección en placas de 96 pocillos. Las células se transfectan con indicador que responde a pFRLuc Gal4 (150ng, Stratagene, La Jolla CA) y el vector de expresión receptor pGal4-VDR-LBD (10ng), junto con el reactivo Fugene 6 (0,2µl/pocillo). El complejo ADN-Fugene se forma incubando la mezcla durante 30 m a temperatura ambiente. Las células se transfectan en triplicado durante 5h y se tratan con diversas concentraciones de ligandos VDR (en un intervalo de concentración comprendido entre 0,01nM y 10.000nM) 18 h después de la transfección. La actividad luciferasa se cuantifica utilizando el kit de reactivo Steady-Glo (Promega, Madison, WI) de conformidad con las indicaciones del fabricante.

Ensayo de promotor de OCN (osteocalcina)

El ensayo de promotor de OCN es un indicador y marcador de la osteoporosis. Los resultados de ensayo deseados son valores EC50 menores o iguales a 325nM. Los resultados de ensayos preferidos son menores a 50nM.

La activación de osteocalcina por los ligandos VDR se evalúa en un una línea celular tipo osteoblasto de rata RG-15 (ROS 17/2.8) que expresa establemente el promotor de osteocalcina de rata fusionado con el gen indicador de luciferasa. Las líneas celulares estables se establecen e informan anteriormente (la transcripción de la activación de osteocalcina supone la interacción de las rutas dependientes de la proteína quinasa A y la proteína quinasa C. Boguslawski, G., Hale, L. V., Yu, X.-P., Miles, R. R., Onyia, J. E., Santerre R. F., Chandrasekhar, S. J Biol. Chem. 275, 999-1006, 2000). Las células RG-15 confluyentes conservadas en medio DMEM/F-12 (3:1) que contiene FBS al 5%, 300 µg/ml G418 y a 37°C bajo atmósfera de aire CO<sub>2</sub> al 5%/95%, se tripsinizan (0,25% tripsina) y se colocan en placas de cultivo de células de 96 pocillos color blanco opaco (25000 células/pocillo). Después de 24h, las células (en medio DMEM/F-12 + FBS al 2%) se tratan con diversas concentraciones de compuestos, disueltos en DMSO. La concentración final de DMSO permanece en 0,01% (v/v). Después de 48h de tratamiento, se elimina el medio, las células se lisan con 50 µl de tampón de lisis (sistema de ensayo indicador de luciferasa, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) y luego se someten a ensayo para determinar la actividad luciferasa utilizando un kit de ensayo de genes indicador de luciferasa de Boehringer Mannheim de conformidad con las indicaciones del fabricante.

Ensayo de hipercalcemia en ratones

El ensayo de hipercalcemia en ratones es un ensayo de hipercalcemia de seis días de duración para determinar la toxicidad y selectividad. Los resultados de ensayo aceptables tienen niveles superiores a 30 µg/kg/día. Los resultados de ensayo preferidos tienen niveles superiores a 300 µg/kg/día.

Para todos los estudios se emplearon ratones DBF hembras de cinco a seis semanas de edad, sin anticuerpos virales, destetadas (Harlan, Indianapolis, IN). Se permitió que los animales se aclimataran a las condiciones de *vivarium* locales durante 2 días. Los ratones se mantuvieron en un ciclo luz/oscuridad de 12h a 22°C con acceso *ad lib* a la comida (TD 5001 con Ca al 1,2% y P al 0,9%, Teklad, Madison, WI) y agua. Después los animales se dividieron en grupos de 4-5 ratones por grupo. Las diferentes dosis de los compuestos de los ensayos preparadas en etanol al 10% y aceite de sésamo al 90% o en una suspensión acuosa de laurilsulfato de sodio y CMC (esta última formulación para compuestos ácidos) se administraron a los ratones por sonda durante 6 días. A uno de los grupos de ratones también se administró  $\alpha$ 1-25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 0,5µg/kg/d como control positivo. Se evaluó el calcio de suero ionizado a las 6hs luego de la última dosificación bajo anestesia de isoflurano con el Analizador Ciba-Coming Ca<sup>++</sup>/PH (Modelo 634, Chiron Diagnostics Corp., East Walpole, MA). Los datos brutos de las diferencias grupales se evalúan mediante análisis de varianza (ANOVA) usando la diferencia menos significativa protegida de Fisher (PLSD) donde el nivel de significancia fue de P<0,05. La dosis más alta no causó hipercalcemia, como se define por la distribución de referencia del 97,5% de la población de control, se considera el "nivel sin efecto".

Ensayo de proliferación de queratinocito

Este ensayo es indicativo para el tratamiento de la psoriasis. Un resultado de ensayo aceptable es el valor CI50 menor o igual a 300nM. Los resultados de ensayos preferidos son valores CI50 menores a 100nM.

Las células KERtr (queratinocito de piel humana) se transforman con un vector retrovirus, que se obtiene de ATCC, después se colocan en placas de 96 pocillos de fondo plano (3000 células/pocillo) en 100 µl de medio libre de suero

## ES 2 369 510 T3

de queratinocito suplementado con extracto pituitario bovino en ausencia de EGF (Life Technologies, Rockville, MD) y se incuban a 37°C durante 72 h. Las células se tratan con varias concentraciones de ligandos VDR (dilución décuple en serie de 10.000nM a 0,1nM en triplicado), se disuelve en 100µl de medio libre de suero de queratinocito suplementado con extracto pituitario bovino en ausencia de EGF y se incuban a 37°C durante 72h. Se analiza la incorporación de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) como medida de la replicación de ADN (kit ELISA de proliferación celular, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) y se mide la absorbancia a 405nm. Los valores de potencia (IC50) se determinaron como la concentración (nM) de compuesto que obtuvo una respuesta media máxima.

### Ensayo de inducción de IL-10

Este es un ensayo de eficacia *in vitro* para la psoriasis, del absceso y la adhesión. La psoriasis involucra tanto las células queratinocitos como las inmune. La IL-10 es una citoquina única ya que es anti-inflamatoria e inmunosupresora. Este ensayo indica si un VDRM es apto para funcionar como un agonista en las PBMC (células sanguíneas mononucleares primarias) o no. Un valor EC50 menor es deseable en este ensayo ya que un compuesto con un valor EC50 más bajo será un mejor agonista en las PBMC. Un resultado de ensayo aceptable es un valor de EC50 menor a 200nM. Los resultados de ensayos preferidos son valores EC50 menores a 100nM.

15 Aislación de las células sanguíneas mononucleares primarias (PBMC):

Recolectar 50ml de sangre humana y diluir con medios, RPMI-1640. Agregar sangre diluida a tubos estériles con ficol. Centrifugar los tubos. Descartar la capa superior y recolectar las células de la capa intermedia. Dividir las células en cuatro tubos y agregar medios. Centrifugar; aspirar los medios y volver a suspender las células. Recolectar las células. Centrifugar a 1200 pm durante 10 m. Volver a suspender las células en RPMI-1640 con FBS al 2% y luego recontar las células.

Estimulación de PBMC: Preparar TPA en DMSO. Disolver PHA en agua. Colocar PBMC tratadas en TPA/PHA en placas de pocillos. Incubar las células.

25 Tratamiento: Preparar todas las diluciones de compuestos en medios RPMI-1640 comunes. Agregar compuestos diluidos e incubar. Recolección y ensayo de muestras: Eliminar todas las células mediante centrifugación y ensayar el supernadante con respecto a IL-10 mediante el inmuno ensayo empleando perlas recubiertas de anticuerpos IL-10 antihumano, de la forma descrita por el fabricante (Linco Research Inc., St. Charles, MO).

### Otros estándares de ensayos de compuestos

Una medida alternativa del índice terapéutico (eficacia ósea vs. hipercalcemia) de los compuestos de la invención para el tratamiento de la osteoporosis es una relación numérica calculada de la siguiente manera:

30 Umbral de dosificación necesario para inducir la hipercalcemia dividido por el umbral de dosificación necesario para la eficacia ósea.

Una medida alternativa del índice terapéutico (proliferación de queratinocitos *in vivo* c. hipercalcemia) de los compuestos de la invención para el tratamiento de la psoriasis es una relación numérica calculada de la siguiente manera:

35 Umbral de dosificación necesario para inducir la hipercalcemia dividido por el umbral de dosificación necesario para la proliferación de queratinocitos.

Para las relaciones anteriores, los umbrales de dosificación se determinan a partir de los datos de la curva de respuesta a la dosificación.

### Ensayo de CaT1 (transportador de calcio 1)

40 El ensayo de CaT1 es un indicador de la afección indeseada de hipercalcemia. Cuanto más altos sean los valores EC50 de un compuesto menos calcémico será *in vivo*. Los resultados de ensayo deseados son valores EC50 mayores o iguales a 500nM. Los resultados de ensayos preferidos son mayores a 1000nM.

45 Las células de carcinoma de colon humana, células Caco-2, conservadas en DMEM (glucosa alta con 25mM de tampón Hepes; Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con FBS al 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA) se colocan en placas de 96 pocillos, 5.500 células por pocillo en un volumen total de 100 µl/pocillo. Las células se mantienen en placas de 96 pocillos durante 6 días para diferenciarlas de las células intestinales pequeñas que expresa el transportador de calcio, CaT1. Trascorridos tres días desde la colocación en placas, se eliminan los medios viejos y se reemplazan con medios frescos (150 µl/pocillo). En el día 6 se eliminan los medios viejos y las células se conservan en medios de tratamiento (180 µl/pocillo) que contienen un 10 % de FBS depurado con carbón (Hyclone, Logan, UT) en DMEM (glucosa baja, sin rojo de fenol; Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se tratan con diversas

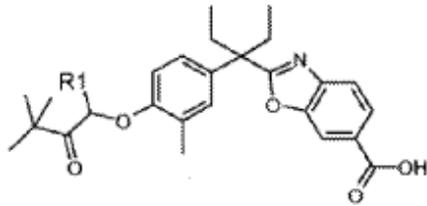
concentraciones de ligandos VDR (en el intervalo de concentración comprendido entre 0,01 nM a 10.000 nM) preparadas en medios de tratamiento (20µl/pocillo). Veinte horas después del tratamiento, se prepara el total de ARN mediante el procedimiento RNeasy 96 de conformidad con las indicaciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). El ARN se transcribe al reverso y se amplifica para mensajes CaT1 y GAPDH humanas (control) mediante RT-PCR cuantitativo empleando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7900HT de conformidad con las indicaciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los pares y sondas base optimizadas para los genes CaT1 y GAPDH humanos se obtienen a nivel comercial (Applied Biosystems, Foster City, CA). Cada reacción de 20 µl RT-PCR cuantitativa en una placa Taqman PCR de 384 pocillos consiste en adelantar y revertir las bases (900 nM), sonda Taqman (200 nM), ARN total (4µl de cada pocillo de las placas de cultivo de 96 pocillos) y 10 µl de Taqman Universal PCR Master Mix (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Las reacciones se incuban a 48°C durante 30m seguido por 10m a 95°C y se someten a 40 ciclos de PCR (95°C durante 15 segundos seguido por 60°C durante 1 m). Se usa GAPDH como un control interno y su configuración de base y sonda se obtienen comercialmente (Applied Biosystems, Foster City, CA).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por las fórmulas (C1) a (C16) o una sal farmacéuticamente aceptable o un éster derivado del mismo:

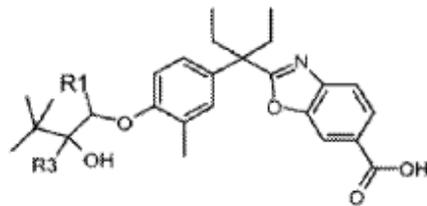
5

C1)



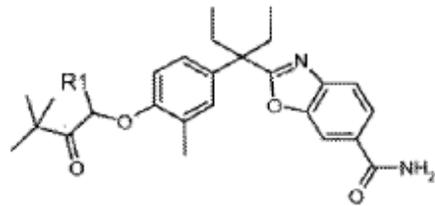
10

C2)



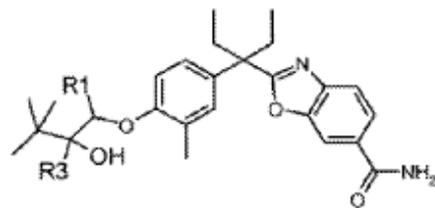
15

C3)



20

C4)



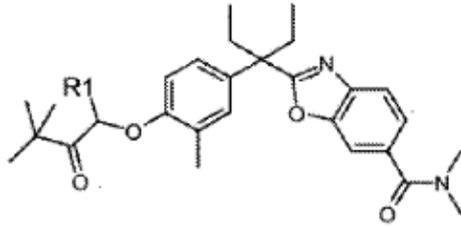
25

30

35

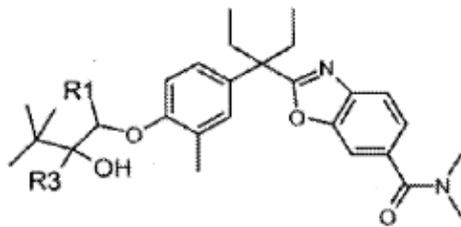
C5)

5



C6)

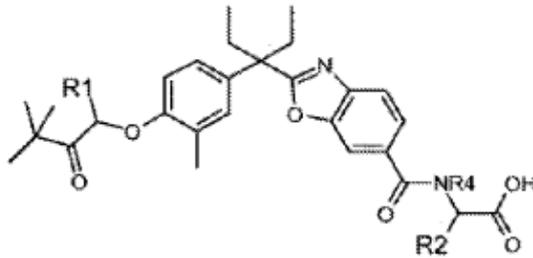
10



15

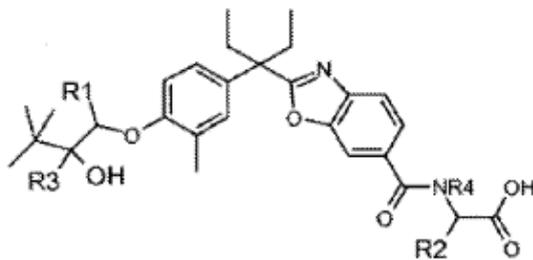
C7)

20



C8)

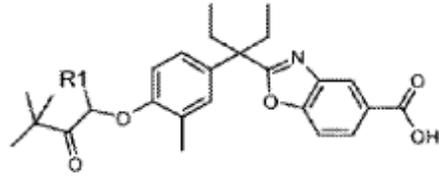
25



30

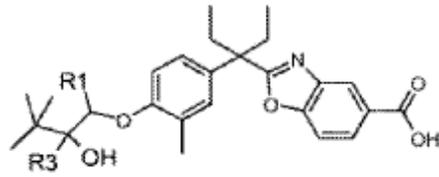
35

C9)



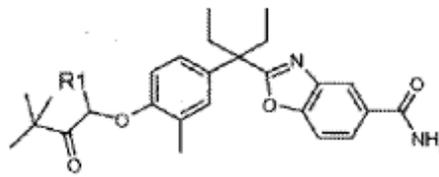
5

C10)



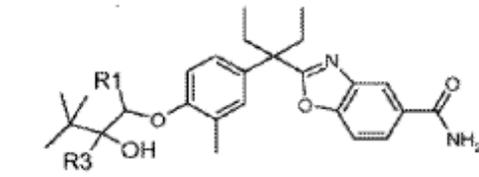
10

C11)



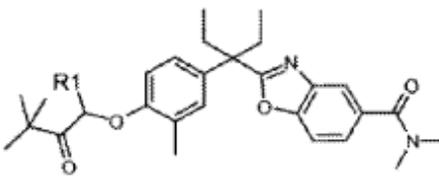
15

C12)



20

C13)



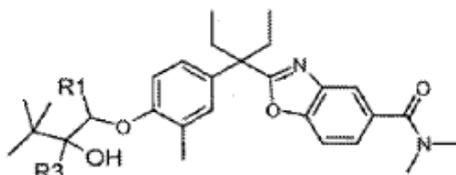
25

30

35

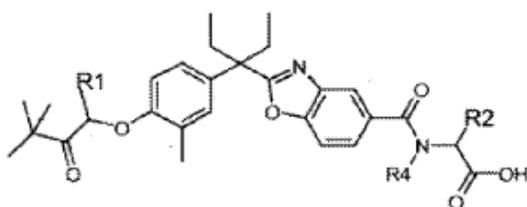
C14)

5



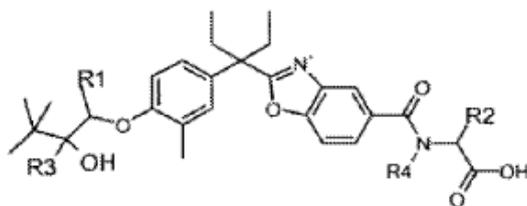
C15)

10



C16)

15



20 en las que R1 es H, metilo o etilo; R2 es H o Me; R3 es H, metilo o etilo; y R4 es H o metilo.

2. Los compuestos de la reivindicación 1 o sales o derivados de éster farmacéuticamente aceptables de los mismos, en los cuales R1 es metilo o etilo y R2 es H o metilo.

3. El compuesto de la reivindicación 1 representado por la fórmula estructural (C2) o una sal o derivado de éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

25 4. Un compuesto de la reivindicación 1 representado por la fórmula estructural (C1) o una sal o derivado de éster farmacéuticamente aceptables del mismo.

5. Un derivado de éster de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el derivado de éster es un éster de metilo; éster de etilo; éster N,N-dietilglicolamido; o éster de morfoliniletilo.

6. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el contraión de sal es sodio o potasio.

30 7. Una formulación farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal o derivado de éster farmacéuticamente aceptables del mismo, con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables.

8. Una formulación para el tratamiento de la osteoporosis, que comprende:

35 un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal o derivado de éster farmacéuticamente aceptables del mismo;

uno o más coagentes seleccionados del grupo que consiste en: estrógenos, andrógenos, suplementos de calcio, metabolitos de vitamina D, diuréticos tiazídicos, calcitonina, bisfosfonatos, SERMS, fluoruros; y

opcionalmente un vehículo o diluyente.

9. La formulación de la reivindicación 8, en la cual la relación de peso de un compuesto de fórmula C1-C16 y

uno o más coagentes es de 10:1 a 1:1000.

10. Una formulación para el tratamiento de la psoriasis, que comprende:

un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal o derivado de éster farmacéuticamente aceptables del mismo;

5 uno o más coagentes seleccionados del grupo que consiste en: glucocorticoides tópicos, ácido salicílico o alquitrán de hulla bruto; y

opcionalmente un vehículo o diluyente.

11. La formulación de la reivindicación 10, en la cual la relación de peso de la fórmula C1-C16 y uno o más coagentes es de 1:10 a 1:100000.

10 12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula 1 en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una sal o derivado de éster farmacéuticamente aceptables del mismo, para tratar la osteoporosis.

15 13. El uso de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una sal o derivado de éster farmacéuticamente aceptables del mismo, para la fabricación de un medicamento para tratamiento de acné, queratosis actínica, alopecia, enfermedad de Alzheimer, mantenimiento óseo en gravedad cero, cura de fractura ósea, cáncer de mama, quimioprevención de cáncer, enfermedad de Crohn, cáncer de colon, diabetes Tipo I, rechazo receptor-injerto, hipercalcemia, diabetes Tipo II, leucemia, esclerosis múltiple, síndrome mielodisplástico, secreción sebácea insuficiente, osteomalacia, osteoporosis, firmeza dérmica insuficiente, hidratación dérmica insuficiente, artritis psoriática, cáncer de próstata, psoriasis, osteodistrofia renal, artritis reumatoidea, escleroderma, 20 cáncer de piel, lupus sistémico, eritematosis, daño celular en la piel por vesicantes mostaza, colitis ulcerativa, vitiligo o arrugas.

14. El uso de conformidad con la reivindicación 13 o una sal o derivado de éster farmacéuticamente aceptables del mismo, para fabricar un medicamento para tratar la psoriasis.

25 15. El uso de conformidad con la reivindicación 13 o una sal o derivado de éster farmacéuticamente aceptables del mismo, para fabricar un medicamento para tratar la osteoporosis.

16. El uso de conformidad con la reivindicación 13 o una sal o derivado de éster farmacéuticamente aceptables del mismo, para fabricar un medicamento para tratar o prevenir o aliviar el daño celular de la piel causado por vesicantes mostaza.

30 17. Un compuesto como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal o derivado de éster farmacéuticamente aceptables del mismo, para su uso como medicamento.