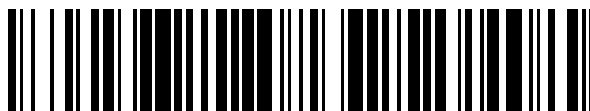


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 714**

51 Int. Cl.:
C07C 401/00 (2006.01)
A61K 31/593 (2006.01)
A61P 3/14 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08867299 .3**
96 Fecha de presentación: **24.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2240438**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2010**

54 Título: **Análogos de 2-metilen-20-metil-19,24,25,26,27-pentanor-vitamina D**

30 Prioridad:
28.12.2007 US 17233 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.09.2012

73 Titular/es:
**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
614 WALNUT STREET, 13TH FLOOR
MADISON, WI 53726, US**

72 Inventor/es:
**DELUCA, Hector F.;
CLAGETT-DAME, Margaret;
PLUM, Lori A.;
GLEBOCKA, Agnieszka y
SICINSKI, Rafal R.**

74 Agente/Representante:
Izquierdo Faces, José

ES 2 387 714 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

Análogos de 2-metilen-20-metil-19,24,25,26,27-pentano-3-ol-vitamina D

5 **[0001]** Esta invención se refiere a compuestos de vitamina D y, más particularmente, a análogos de 2-metilen-20-metil-19,24,25,26,27-pentano-3-ol-vitamina D y a sus usos farmacéuticos.

10 **[0002]** La hormona natural, $1\alpha,25$ -dihidroxitrihidroxivitamina D_3 y su análogo en la serie de ergosterol, es decir, $1\alpha,25$ -dihidroxitrihidroxivitamina D_2 se conocen por ser reguladores sumamente potentes de la homeostasis del calcio en animales y seres humanos, y también se ha establecido su actividad en la diferenciación celular, Ostrem et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2610 (1987). Se han preparado y ensayado muchos análogos estructurales de estos metabolitos, incluyendo 1α -hidroxivitamina D_3 , 1α -hidroxivitamina D_2 , diversas vitaminas homologadas de cadena lateral y análogos fluorados. Algunos de estos compuestos muestran una separación interesante de actividades en la diferenciación celular y la regulación de calcio. Esta diferencia en la actividad puede ser útil en el tratamiento de
15 varias enfermedades tales como osteodistrofia renal, raquitismo resistente a la vitamina D, osteoporosis, psoriasis y ciertos tumores malignos.

20 **[0003]** Otra clase de análogos de vitamina D, es decir, los denominados compuestos 19-nor-vitamina D, se caracterizan por la sustitución del grupo de metileno exocíclico del anillo A (carbono 19), característico del sistema de la vitamina D, por dos átomos de hidrógeno. Los ensayos biológicos de tales análogos 19-nor (por ejemplo, $\alpha,25$ -dihidroxi-19-nor-vitamina D_3) revelaron un perfil de actividad selectivo con una alta potencia en la inducción de la diferenciación celular y una actividad de movilización de calcio muy baja. Por consiguiente, estos compuestos son potencialmente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de tumores malignos o para el tratamiento de diversos trastornos de la piel. Se han descrito dos métodos diferentes de síntesis de tales análogos 19-nor-vitamina
25 D (Perlman et al., Tetrahedron Lett. 31, 1823 (1990); Perlman et al., Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991), y DeLuca et al., Patente de Estados Unidos N° 5.086.191).

30 **[0004]** En la Patente de Estados Unidos N° 4.666.634, los análogos 2β -hidroxi y alcoxi (por ejemplo, ED-71) de $1\alpha,25$ -dihidroxitrihidroxivitamina D_3 han sido descritos y examinados por el grupo Chugai como fármacos potenciales para la osteoporosis y como agentes antitumorales. Véase también Okano et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 1444 (1989). Otros análogos de anillo A 2-sustituídos (con hidroxialquilo, por ejemplo, ED-120, y grupos fluorualquilo) de $1\alpha,25$ -dihidroxitrihidroxivitamina D_3 también han sido preparados y ensayados (Miyamoto et al., Chem. Pharm. Bull. 41, 1111 (1993); Nishii et al., Osteoporosis Int. Suppl. 1, 190 (1993); Posner et al., J. Org. Chem. 59, 7855 (1994), y J. Org. Chem. 60, 4617 (1995)).
35

40 **[0005]** Los análogos 2-sustituídos de $1\alpha,25$ -dihidroxi-19-nor-vitamina D_3 también se han sintetizado, es decir, compuestos sustituidos en posición 2 con grupos hidroxilo o alcoxi (DeLuca et al., Patente de Estados Unidos N° 5.536.713), con dos grupos alquilo (DeLuca et al., Patente de Estados Unidos N° 5.945.410) y con grupos 2-alquilideno (DeLuca et al., Patente de Estados Unidos N° 5.843.928), que muestran perfiles de actividad interesantes y selectivos. Todos estos estudios indican que los sitios de unión en los receptores de vitamina D pueden dar cabida a diferentes sustituyentes en C-2 en los análogos de vitamina D sintetizados.

45 **[0006]** En un esfuerzo por explorar la clase 19-nor de los compuestos de vitamina D farmacológicamente importantes, los análogos que se caracterizan por la transposición del grupo de metileno exocíclico del anillo A del carbono 10 (C-10) al carbono 2 (C-2), es decir, compuestos 2-metilen-19-nor-vitamina D se han sintetizado y ensayado recientemente (Sicinski et al., J. Med. Chem., 41, 4662 (1998); Sicinski et al., Steroids 67, 247 (2002); DeLuca et al., Patente de Estados Unidos N° 5.843.928, 5.936.133 y 6.382.071). Los estudios de mecánica molecular, realizados sobre estos análogos, mostraron que se puede prever un cambio en la conformación del anillo A dando lugar al "aplanamiento" del anillo de ciclohexanodiol. De los cálculos de mecánica molecular y de los estudios RMN su equilibrio conformacional del anillo A se estableció para que fuera aprox. 6:4 a favor del
50 confórmero que tenga un 1α -OH ecuatorial. La introducción del grupo 2-metileno en el esqueleto de carbono de la 19-nor-vitamina D cambia el carácter de sus hidroxilos del anillo A (1α - y 3β -); ambos se encuentran ahora en las posiciones alílicas, del mismo modo, como el grupo 1α -hidroxilo (crucial para la actividad biológica) en la molécula de la hormona natural, $1\alpha,25$ -(OH) $_2$ D_3 . Se averiguó que los análogos de $1\alpha,25$ -dihidroxi-2-metilen-19-nor-vitamina D se caracterizan por una potencia biológica significativa, por lo que tales compuestos son unos excelentes candidatos para diversos usos farmacéuticos.
55

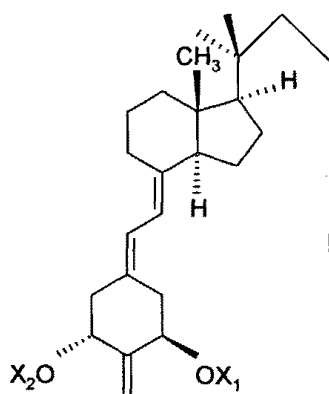
60 **[0007]** En un esfuerzo continuado por explorar la clase 19-nor de los compuestos de vitamina D farmacológicamente importantes, también se han sintetizado y ensayado los análogos que se caracterizan por la presencia de un sustituyente metileno en el carbono 2 (C-2), un grupo hidroxilo en el carbono 1 (C-1) y una cadena lateral reducida unida al carbono 20 (C-20). 1α -hidroxil-2-metilen-19-nor-pregnacalciferol se describe en la Patente de Estados Unidos 6.566.352 mientras que 1α -hidroxil-2-metilen-19-nor-homo-pregnacalciferol se describe en la Patente de Estados Unidos 6.579.861 y 1α -hidroxil-2-metilen-19-nor-bishomopregnacalciferol se describe en la Patente de Estados Unidos 6.627.622 y en los documentos US-A2005/0119242 y WO-A2006/057913. Todos estos tres
65 compuestos tienen una actividad de unión relativamente alta a los receptores de vitamina D así como una actividad

de diferenciación celular relativamente alta, pero poca o ninguna actividad calcémica en comparación con $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 . Sus actividades biológicas hacen que estos compuestos sean unos excelentes candidatos para diversos usos farmacéuticos, según se establece en las patentes 352, 861 y 622. También se conoce por Plum et al, PNAS, 101, 6900 (2004) que los análogos de 2-metilen- 1α -hidroxi-19-nor-vitamina D con cadenas laterales truncadas suprimen eficazmente los niveles de la hormona paratiroidea *in vivo*.

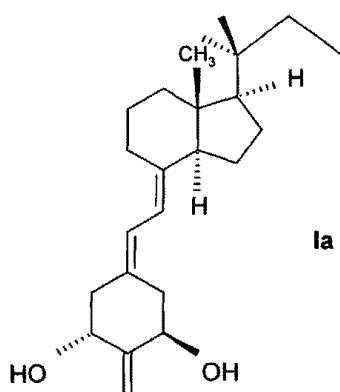
Sumario de la invención

[0008] La presente invención se dirige a análogos de 2-metilen-20-metil-19,24,25,26,27-pentanor-vitamina D, a su actividad biológica y a los diversos usos farmacéuticos de estos compuestos. Estos nuevos compuestos de vitamina D no conocidos hasta ahora son los análogos de 19-nor-vitamina D que tienen un grupo metileno en la posición 2 (C-2) y un grupo 1,1-dimetilpropilo sustituido en la posición 17 (C-17), es decir, el análogo tiene una cadena lateral alquílica ramificada (1,1-dimetilpropilo) que no contiene ningún grupo hidroxilo. El análogo preferido de vitamina D es el 2-metilen-20-metil- 1α -hidroxi-19,24,25,26,27-pentanor-vitamina D_3 .

[0009] Estructuralmente, estos dos análogos 2-metilen-20-metil-19,24,25,26,27-pentanor-vitamina D se caracterizan por la fórmula general I que se muestra a continuación:



donde X_1 y X_2 , que pueden ser iguales o diferentes, se seleccionan cada uno de hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo. El análogo preferido es 2-metilen-20-metil- 1α -hidroxi-19,24,25,26,27-pentanor-vitamina D_3 que tiene la siguiente fórmula Ia:



[0010] Los compuestos I anteriores, particularmente Ia, muestran un patrón deseado y muy ventajoso de actividad biológica. Estos compuestos se caracterizan por una unión relativamente alta a los receptores de vitamina D, pero por una muy baja actividad de transporte de calcio intestinal, en comparación con la de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 , y tienen una capacidad muy baja para movilizar el calcio desde el hueso, en comparación con $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 . Por consiguiente, estos compuestos pueden caracterizarse por tener poca o ninguna actividad calcémica. Es

indeseable elevar el calcio sérico a niveles suprafisiológicos al suprimir el gen de la hormona preproparatiroidea (Darwish & DeLuca, Arch. Biochem. Biophys. 365, 123-130, 1999) y la proliferación de la glándula paratiroidea. Se espera que estos análogos, teniendo poca o ninguna actividad calcémica pero siendo muy activos en la diferenciación, sean útiles como terapia para la supresión de hiperparatiroidismo secundario así como de osteodistrofia renal.

[0011] Se ha descubierto también que los compuestos I, particularmente la, de la invención son especialmente adecuados para el tratamiento y profilaxis de los trastornos humanos que se caracterizan por un desequilibrio del sistema inmune, por ejemplo, en enfermedades autoinmunes entre las que se incluyen la esclerosis múltiple, lupus, diabetes mellitus, enfermedad de hospedador contra injerto y rechazo de los trasplantes de órganos; y adicionalmente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como la artritis reumatoide, asma y enfermedades intestinales inflamatorias tales como enfermedad celíaca, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. El acné, la alopecia y la hipertensión son otras afecciones que podrían tratarse con los compuestos de la invención.

[0012] Los compuestos anteriores I, y particularmente los la, también se caracterizan por su actividad de diferenciación celular relativamente alta. Por consiguiente, estos compuestos también proporcionan un agente terapéutico para el tratamiento de la psoriasis, o como agente anticanceroso, especialmente contra leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de piel y cáncer de próstata. Además, debido a su actividad de diferenciación celular relativamente alta, estos compuestos proporcionan un agente terapéutico para el tratamiento de diversas afecciones de la piel incluyendo arrugas, falta de hidratación dérmica adecuada, es decir, piel seca, falta de firmeza adecuada de la piel, es decir, piel flácida y secreción de sebo insuficiente. Por consiguiente, el uso de estos compuestos no solo hidrata la piel sino que también mejora su función de barrera.

[0013] Los compuestos de la invención de fórmula I, y particularmente los de la, resultan también útiles en la prevención o tratamiento de la obesidad, inhibición de la diferenciación de adipocitos, inhibición de la transcripción del gen SCD-1 y/o reducción de la grasa corporal en sujetos animales. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el método para prevenir o tratar la obesidad, inhibir la diferenciación de adipocitos, inhibir la transcripción del gen SCD-1 y/o reducir la grasa corporal en sujetos animales incluye administrar al sujeto animal, una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos o una composición farmacéutica que incluya uno o más de los compuestos de la fórmula I. La administración de uno o más de los compuestos o las composiciones farmacéuticas al sujeto inhibe la diferenciación de adipocitos, inhibe la transcripción de genes y/o reduce la grasa corporal en el sujeto animal.

[0014] Uno o más de los compuestos pueden estar presentes en una composición para tratar las enfermedades y trastornos mencionados anteriormente en una cantidad 0,01 µg/g 1000 µg/g de la composición, preferentemente 0,1 µg/g 500 µg/g de la composición, y pueden administrarse por vía tópica, transdérmica, oral, rectal, nasal, sublingual o parenteral en dosificaciones 0,01 µ/día 1000 µg/día, preferentemente 0,1 µg/día 500 µg/día.

Breve descripción de los dibujos

[0015] En los dibujos:

[0016] Las figuras 1-5 ilustran diversas actividades biológicas de 2-metilen-20-metil-la-hidroxi-19,24,25,26,27-pentano-20-ol-vitamina D₃, en lo sucesivo en este documento denominado "20DCM", en comparación con la hormona nativa 1α,25-dihidroxit vitamina D₃, en lo sucesivo en este documento "1,25(OH)₂D₃".

[0017] La figura 1 es un gráfico que ilustra la actividad relativa de 20DCM y 1,25(OH)₂D₃ al competir por la unión con [³H]-1,25-(OH)₂-D₃ para el receptor de vitamina D de rata recombinante de longitud completa;

[0018] La figura 2 es un gráfico que ilustra el porcentaje HL-60 de diferenciación celular como función de la concentración de 20DCM y 1,25(OH)₂D₃;

[0019] La figura 3 es un gráfico que ilustra la actividad de transcripción *in vitro* de 1,25(OH)₂D₃ en comparación con 20DCM;

[0020] La figura 4 es un gráfico de barras que ilustra la actividad de movilización del calcio en el hueso de 1,25(OH)₂D₃ en comparación con 20DCM; y

[0021] La figura 5 es un gráfico de barras que ilustra la actividad de transporte de calcio intestinal de 1,25(OH)₂D₃ en comparación con 20DCM.

Descripción detallada de la invención

[0022] Se sintetizó y ensayó 2-metilen-20-metil-la-hidroxi-19,24,25,26,27-pentano-20-ol-vitamina D₃ (en lo sucesivo en este documento denominado "20DCM") un análogo de 19-nor vitamina D que se caracteriza por la presencia de un sustituyente metileno en el carbono 2 (C-2) y un grupo 1,1-dimetilpropilo sustituido en la posición 17 (C-17). Este análogo de vitamina D parecía una diana interesante porque el grupo de metileno relativamente pequeño en la

posición C-2 no debería interferir con la unión al receptor de vitamina D. Estructuralmente, este análogo 19-nor se caracteriza por la fórmula general **1a** previamente ilustrada en este documento y su profármaco (con forma hidroxil protegida) se caracteriza por la fórmula general I previamente ilustrada en este documento.

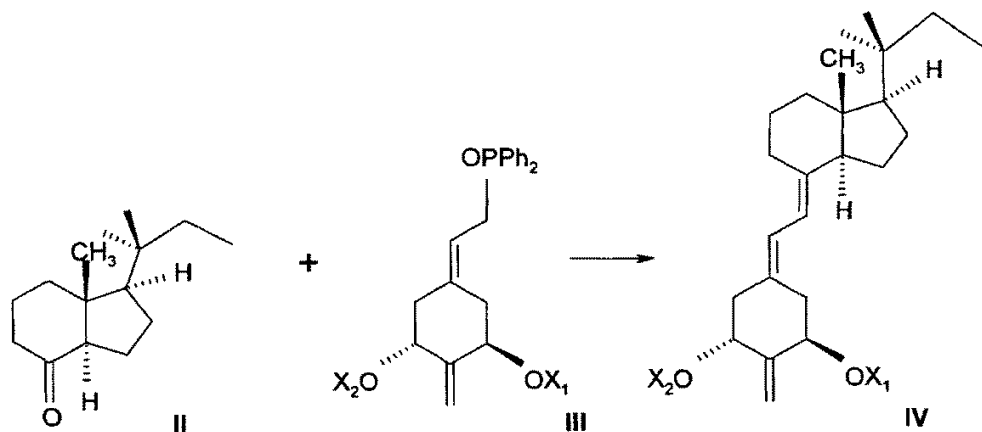
- 5 **[0023]** La preparación de análogos de 2-metilen-20-metil-19,24,25,26,27-pentano-vitamina D que tienen la estructura I puede conseguirse mediante un método general común, es decir, la condensación de una cetona **II** tipo Windaus-Grundmann bicíclica con el óxido de fosfina alílico **III** en el análogo de 2-metilen-20-metil-19,24,25,26,27-pentano-vitamina D **IV** correspondiente seguido de la desprotección en C-1 y C-3 del último compuesto:

10

15

20

25



30

En las estructuras **II**, **III** y **IV**, los grupos X_1 y X_2 son grupos protectores de hidroxil, preferentemente t-butildimetilsililo, entendiéndose también que cualquier funcionalidad que pueda ser sensible o que interfiera con la reacción de condensación, se protege adecuadamente como se conoce en la técnica. El proceso mostrado anteriormente representa una aplicación del concepto de síntesis convergente, que se ha aplicado de forma eficaz para la preparación de compuestos de vitamina D [por ejemplo, Lythgoe et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 590 (1978); Lythgoe, Chem. Soc. Rev. 9, 449 (1983); Toh et al., J. Org. Chem. 48, 1414 (1983); Baggionili et al., J. Org. Chem. 51, 3098 (1986); Sardina et al., J. Org. Chem. 51, 1264 (1986); J. Org. Chem. 51, 1269 (1986); DeLuca et al., Patente de Estados Unidos N° 5.086.191; DeLuca et al., Patente de Estados Unidos N° 5.536.713].

40

[0024] La hidrindanona de estructura general **II** no es conocida. Puede prepararse por el método que se muestra en el Esquema 1 de este documento (véase la preparación del compuesto 20DCM).

45

[0025] Para la preparación de la hidrindanona requerida de la estructura **II**, se ha desarrollado una nueva ruta sintética partiendo del 22-aldehído **1** conocido [Fall et al., Tetrahedron Lett., 43, 1433 (2002); Granja et al., J. Org. Chem., 58, 124 (1993)]. En el Esquema 1 se resume un proceso que implica la transformación del benzoiloxi aldehído **1** de partida en el sintón **8** deseado de los anillos C, D y su posterior acoplamiento con el óxido de fosfina **9**. Por lo tanto, el aldehído **1** se transformó en una mezcla de oximas isoméricas *E* y *Z* que, mediante el calentamiento con anhídrido acético, formó el nitrilo **2** esperado. El nitrilo se trató con LDA y el carbanión alquilado resultante por adición de bromuro de etilo. Las etapas posteriores de la síntesis comprenden la hidrólisis alcalina del grupo 8 β -benzoiloxi en el nitrilo **3** obtenido produciendo el hidroxil nitrilo **4** correspondiente. Este proceso se desea en vista a la siguiente transformación química, es decir, reducción con DIBALH del grupo ciano C-20 que lleva al hidroxil aldehído **5**. La reducción directa con DIBALH del benzoiloxi nitrilo **3** no proporciona **5** con un rendimiento satisfactorio, mientras que el procedimiento en dos etapas resultaría considerablemente más eficaz. Por lo tanto, el sustituyente formilo en C-20 se transformó en el grupo metilo mediante el siguiente procedimiento en dos etapas: formación de *p*-tosilhidrazona **6** y su reducción con cianoborohidruro de sodio. Posteriormente el alcohol 8 β **7** obtenido se oxidó con perrutenato de tetrapropilamonio en la hidrindanona **8**. El acoplamiento de Wittig-Horner de esta cetona de Grundmann con el carbanión fosfinoxi de litio generado a partir del óxido de fosfina **9** y fenilitio dio el compuesto de vitamina protegida **10** esperado. Éste, después de la desprotección con fluoruro de tetrapropilamonio proporcionó la 1 α -hidroxil-2-metilen-20-metil-19,24,25,26,27-pentano-vitamina D₃ (**11**). Debe mencionarse que otros análogos de 1 α -hidroxil-2-metilen-19-nor-vitamina D con las cadenas laterales alquílicas reducidas pueden sintetizarse por los métodos desvelados en este documento.

50

55

[0026] Para la preparación de los óxidos de fosfina requeridos de estructura general **III**, se ha desarrollado una ruta sintética partiendo de un derivado de quinicato de metilo que se obtiene fácilmente a partir del ácido quínico comercial (ácido 1R,3R,4S,5R)-(-)-quínico) como se describe en Perlman et al., Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991),

60

DeLuca et al., Patente de Estados Unidos N° 5.086.191 y en Sicinski et al., J. Med. Chem., 41, 4662 (1998).

[0027] El proceso global de la síntesis de los compuestos I y la se ilustra y describe más detalladamente en la Patente de Estados Unidos N° 5.843.928 titulada "2-Alkylidene-19-Nor-Vitamin D Compounds".

[0028] Tal y como se usa en la descripción y en las reivindicaciones, el término ("grupo protector de hidroxilo") significa cualquier grupo usado comúnmente para la protección temporal de funciones hidroxilo, tales como, por ejemplo, grupos alcoxicarbonilo, acilo, alquilsililo o alquilarilsililo (en lo sucesivo en este documento denominados para simplificar grupos "sililo") y grupos alcoxialquilo. Los grupos protectores de alcoxicarbonilo son agrupaciones alquilo-O-CO tales como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxicarbonilo, isopropoxicarbonilo, butoxicarbonilo, isobutoxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo o aliloxicarbonilo. El término "acilo" significa un grupo alcanóilo de 1 a 6 carbonos, en todas sus formas isoméricas, o un grupo carboxialcanóilo de 1 a 6 carbonos, tales como un grupo oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo o un grupo acilo aromático tal como benzoílo o un grupo benzoílo sustituido con halo, nitro o alquilo. El término "alquilo" como se usa en la descripción o en las reivindicaciones, denota un radical alquilo ramificado o de cadena lineal de 1 a 10 carbonos, en todas sus formas isoméricas. Los grupos protectores de alcoxialquilo son agrupaciones tales como metoximetilo, etoximetilo, metoxietoximetilo o tetrahidrofuranilo y tetrahidropiranilo. Los grupos protectores de sililo preferidos son trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, dibutilmetilsililo, difenilmetilsililo, fenildimetilsililo, difenil-t-butilsililo y radicales sililo alquilados análogos. El término "arilo" especifica un grupo fenilo o un grupo fenilo sustituido con alquilo, nitro o halo.

[0029] Un grupo "hidroxilo protegido" es un grupo hidroxilo derivatizado o protegido por cualquiera de los grupos anteriores usados comúnmente para la protección temporal o permanente de las funciones hidroxilo, por ejemplo, los grupos sililo, alcoxialquilo, acilo o alcoxicarbonilo, como se ha definido anteriormente. Los términos "hidroxialquilo", "deuteroalquilo" y "fluoroalquilo" se refieren a un radical alquilo sustituido con uno o más grupos hidroxilo, deuterio o flúor respectivamente.

[0030] Más específicamente, se ha de hacer una referencia al siguiente ejemplo ilustrativo y descripción, así como al Esquema 1 de este documento para una ilustración detallada de la preparación del compuesto 20DCM.

[0031] En este ejemplo concreto los productos identificados mediante números arábigos (1, 2, 3) se refieren a las estructuras específicas identificadas así en el Esquema 1.

Ejemplo

[0032] **Química.** Los puntos de fusión (sin corregir) se determinaron en un aparato Thomas-Hoover de puntos de fusión en capilar. Los espectros de absorción ultravioleta (UV) se registraron con un espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Lambda 3B en etanol. Los espectros de resonancia magnética nuclear ^1H (RMN) se registraron a 400 y 500 MHz con la consola de espectrómetros Bruker Instruments DMX-400 y DMX-500 Avance en deuterocloroformo. Los desplazamientos químicos (δ) se especifican campo abajo respecto al patrón Me_4Si (δ 0.00). Los espectros de masas por impacto electrónico (EI) se obtuvieron con un instrumento Micromass AutoSpec (Berkeley, MA). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos de Waters Associates equipado con un sistema de suministro de disolvente Modelo 6000, un inyector Modelo U6K Universal, y un detector de absorbancia sintonizable Modelo 486. El THF estaba recién destilado antes de usarlo a partir de cetil-benzofenona-sódica en atmósfera de argón.

[0033] Preparación de 1α -hidroxil-2-metil-20 metil-19,24, 25, 26, 27- pentanor-vitamina D_3 (11)

[0034] Haciendo referencia en primer lugar al Esquema 1 el aldehído bicíclico inicial **1** se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito, Fall et al., Tetrahedron Lett., 43, 1433 (2002).

[0035]

(a) Conversión del aldehído **1** en 22-nitrilo **2**

[0036] **(1R,3aR,4S,7aR)-1-((R)-ciano-metil-metil)-7a-metil-octahidro-inden-4-il éster del ácido benzoico (2).** A una solución de un benzoíloxi aldehído **1** (284 mg, 0,90 mmol) en piridina anhidra (5 ml) se le añadió $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (210 mg) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Posteriormente, se vertió en agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se separaron, se lavaron con solución saturada de NaHCO_3 , agua y solución saturada de CuSO_4 , se secaron (MgSO_4) y se evaporaron. El residuo oleoso se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice. La elución con hexano/acetato de etilo (9:1) dio la oxima *E* menos polar pura (167 mg) y la oxima *Z* más polar (105 mg, rendimiento total 89%).

[0037] **Oxima E:** ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 1,09 (3H, d, $J=6,7$ Hz, 18- H_3), 1,14 (3H, s, 21- H_3), 2,40 (1H, m, 20-H), 5,42 (1H, m e, 8 α -H), 7,27 (1H, d, $J=8,0$ Hz, 22-H), 7,45 (2H, t, $J \sim 7$ Hz, Ar-H), 7,56 (1H, t, $J=7,4$ Hz, Ar-H), 8,04 (2H, d, $J=7,4$ Hz, Ar-H).

[0038] Oxima Z: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 1,09 (3H, d, $J=6,7$ Hz, 18- H_3), 1,13 (3H, s, 21- H_3), 3,28 (1H, m, 20-H), 5,42 (1H, m e, 8 α -H), 6,25 (1H, d, $J=8,1$ Hz, 22-H), 7,45 (2H, t, $J \sim 7$ Hz, Ar-H), 7,56 (1H, t, $J=7,3$ Hz, Ar-H), 8,04 (2H, d, $J=7,3$ Hz, Ar-H).

5 **[0039]** La solución de las oximas (ambos isómeros, 248 mg, 0,75 mmol) en anhídrido acético (8 ml) se calentó a reflujo durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió, se vertió cuidadosamente en hielo y se extrajo con tolueno. Los extractos se combinaron, se lavaron con agua, NaHCO_3 y salmuera, se secaron (MgSO_4) y se evaporaron. El residuo se aplicó sobre un cartucho Sep-Pak de sílice (5 g). La elución con hexano/acetato de etilo (95:5) dio nitrilo semicristalino **2** puro (212 mg, 91%). **2:** $[\alpha]^{24}_D + 81,5^\circ$ (c 0,9 CHCl_3); ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 1,124 (3H, s, 18- H_3), 1,373 (3H, d, $J=7,1$ Hz, 21- H_3), 1,90 (1H, d a, $J=12,8$ Hz, 9 β -H), 2,68 (1H, pentet, $J=7,0$ Hz, 20-H), 5,43 (1H, m e, 8 α -H), 7,45 (2H, t, $J=7,5$ Hz, Ar-H), 7,57 (1H, t, $J=7,5$ Hz, Ar-H), 8,03 (2H, d, $J=7,4$ Hz, Ar-H); HRMS (ESI) masa exacta calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{ON}$ ($\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$) 206,1545, medida 206,1539.

[0040]

15 **(b) Alquilación del nitrilo 2 con bromuro de etilo**

[0041] (1S,3aR,4S,7aR)-1((S)-1-ciano-1-metil-propil)-7a-metil-octahidro-inden-4-il éster del ácido benzoico (3). *n*-BuLi (1,6 M en hexanos, 1,0 ml, 1,6 mmol) se añadió a 0°C al matraz que contenía diisopropilamina (262 μl , 1,54 mmol) y THF (2 ml). La solución se agitó a 0°C durante 20 min., se enfrió a -78°C y se sifonó a la solución **2** (430 mg, 1,31 mmol) en THF (1,5 ml). La mezcla amarilla resultante se agitó durante 30 minutos, posteriormente se añadió HMPA (600 μl) y se siguió agitando durante otros 15 minutos. Posteriormente se añadió $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Br}$ (310 μl , 4,08 mmol) y la solución se agitó a -78°C durante 40 minutos. Se añadió NH_4Cl saturado y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron (MgSO_4) y se evaporaron. El residuo se aplicó en una columna de sílice. La elución con hexano/acetato de etilo (95:5) dio como resultado un compuesto puro **3** (280 mg, 60%, 80% basado en el sustrato recuperado). La elución adicional con hexano/acetato de etilo (95:5) dio **2** no reaccionado (107 mg). **3:** $[\alpha]^{24}_D + 117,5^\circ$ (c 0,2 CHCl_3); ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 1,023 (3H, t, $J=7,4$ Hz, 23- H_3), 1,337 (3H, s, 18- H_3), 1,397 (3H, s, 21- H_3), 2,14 (1H, d a, $J=12,9$ Hz, 9 β -H), 5,40 (1H, m e, 8 α -H), 7,45 (2H, t, $J=7,4$ Hz, Ar), 7,57 (1H, t, $J=7,4$ Hz, Ar), 8,05 (2H, d, $J=7,4$ Hz, Ar).

30 **[0042]**

(c) Hidrólisis del benzoato 3

[0043] (S)-2-((1S,3aR,4S,7aR)-4-hidroxi-7a-metil-octahidro-inden-1-il)-2-metil-butironitrilo (4). Una solución del benzoiloilo nitrilo **3** (270 mg, 0,76 mmol) en KOH al 10% en MeOH (12 ml) se calentó a 50°C durante 18 h, se vertió en agua y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con NaHCO_3 , agua, se secó (MgSO_4) y se evaporó. El residuo oleoso se purificó sobre un cartucho Sep-Pak de sílice (2 g). La elución con hexano/acetato de etilo (8:2) dio hidroxi nitrilo **4** puro (179 mg, 99%). **4:** $[\alpha]^{24}_D + 26,5^\circ$ (c 0,33 CHCl_3); ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 1,004 (3H, t, $J=7,3$ Hz, 23- H_3), 1,349 (3H, s, 21- H_3), 1,240 (s, 18- H_3), 4,10 (1H, m e, 8 α -H).

40 **[0044]**

(d) Reducción del nitrilo 4 con DIBALH

[0045] (S)-2-((1S,3aR,4S,7aR)-4-hidroxi-7a-metil-octahidro-inden-1-il)-2-metil-butiraldehído (5). A la solución de nitrilo **4** (172 mg, 0,773 mmol) en cloruro de metileno anhidro (3,3 ml) se le añadió lentamente a -60°C una solución de DIBALH (1,5 M en cloruro de metileno, 1,66 ml, 2,3 mmol). La solución se agitó durante 1 h 30 min., posteriormente se dejó calentar hasta -30°C durante 1 h y se siguió agitando durante 50 minutos. La mezcla se vertió cuidadosamente en HCl al 5% y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO_3 y salmuera, se secaron (MgSO_4) y se evaporaron. El residuo restante se purificó sobre un cartucho Sep-Pak de sílice (2 g). La elución con hexano/acetato de etilo (8:2) dio hidroxi aldehído **5** puro (115 mg, 66%). **5:** $[\alpha]^{24}_D + 5^\circ$ (c 0,25 CHCl_3); ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 0,781 (3H, t, $J=7,3$ Hz, 23- H_3), 0,965 (3H, s, 21- H_3), 1,105 (3H, s, 18- H_3), 2,02 (1H, d a, $J=14,2$ Hz, 9 β -H), 4,09 (1H, m e, 8 α -H), 9,72 (1H, s, CHO); HRMS (ESI) masa exacta calc. para $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}$ ($\text{M}^+ + \text{Na}$) 261,1831, medida 261,1847.

[0046]

55 **(e) Conversión del hidroxi aldehído 5 en el hidrindanol 7**

[0047] (1R,3aR,4S,7aR)-1-(1,1-dimetil-propil)-7a-metil-octahidro-inden-4-ol (7). Una solución del aldehído **5** (10 mg, 0,42 μmol) e hidrazida de *p*-toluenosulfonilo (31 mg, 0,168 mmol) en metanol seco (0,5 ml) se agitó con tamices moleculares de 4 Å a 55°C durante 19 h. Posteriormente se enfrió, se vertió en agua y se extrajo con tolueno. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron (MgSO_4), se evaporaron y se aplicaron sobre un cartucho Sep-Pak de sílice (2 g). La elución con hexano/acetato de etilo (85:15) dio tosilihidrazona **6** (aprox. 12 mg, aprox. 67%) ligeramente contaminada con TsNHNH_2 . Esta tosilihidrazona en bruto se disolvió en DMF (0,15 ml) y se añadió *p*-TsOH (2 mg, evaporado dos veces con benceno) seguido de NaBH_3CN (8 mg, 0,126 mmol). La mezcla se agitó a 100°C durante 19 horas, posteriormente se enfrió, se vertió en agua y se extrajo con hexano y acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron (MgSO_4) y se evaporaron. El residuo oleoso

restante se aplicó sobre un cartucho Sep-Pak de sílice (2 g). La elución con hexano/acetato de etilo (98:2) dio un compuesto hidroxilo **7** (3 mg, 49%). **7**: $[\alpha]_D^{24} + 3^\circ$ (c 0,25 CHCl₃); ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 0,786 (3H,t, J=7,6 Hz, 23-H₃), 0,857 y 0,914 (3H y 3H, cada s, 20-CH₃ y 21-H₃), 1,056 (3H,s, 18-H₃), 2,05 (1H, d a, J ~10,5 Hz, 9□-H), 4,07 (1H, m e, 8α-H).

5

[0048]**(f) Oxidación de 7 a la hidrindanona 8**

[0049] (1R,3aR,7aR)-1-(1,1-dimetil-propil)-7a-metil-octahidro-inden-4-ona (8). La solución de NMO (7,2 mg) y tamices moleculares de 4 Å (41 mg) en cloruro de metileno (0,3 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 15 min., posteriormente se añadió la solución de **7** (6 mg, 27 μmol) en cloruro de metileno (0,15 ml) seguida de TPAP (0,8 mg). La mezcla oscura resultante se agitó durante 30 min., se diluyó con cloruro de metileno y se aplicó sobre un cartucho Sep-Pak de sílice (2 g). La elución con hexano/acetato de etilo (96:4) dio una cetona **8** pura (4,7 mg, 78%). **8**: $[\alpha]_D^{24} - 43^\circ$ (c 0,18 CHCl₃); ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 0,721 (3H,s, 18-H₃), 0,825 (3H,t, J=7,3 Hz, 23-H₃), 0,872 y 0,945 (3H y 3H, cada s, 20-CH₃ y 21-H₃), 2,41 (1H, dd, J=11,0, 7,5Hz, 14α-H).

10

15

[0050]**(g) Acoplamiento de Wittig-Horner de la cetona 8 con el óxido de fosfina 9**

[0051] terc-butildimetilsilil éter de 1α-[(terc-butildimetilsilil)oxi]-20-metil-2-metilen-19,24,25,26,27-pentanorvitamina D₃ (10). A una solución de óxido de fosfina **9** (104 mg, 181 μmol) en THF anhidro (2,0 ml) a -78°C se le añadió lentamente fenilitio (1,8 M en éter butílico, 101 μl, 182 μmol) en atmósfera de argón con agitación. La solución se volvió de color rojo intenso. La mezcla se agitó a -78°C durante 10 minutos y se añadió lentamente la solución enfriada previamente (-78°C) de la cetona **8** (20 mg, 90 μmol) en THF anhidro (0,2 ml). La mezcla se agitó en atmósfera de argón a -78°C durante 1 h. Se añadieron acetato de etilo y agua y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se evaporó. El residuo se disolvió en hexano, se aplicó sobre un cartucho Sep-Pak de sílice y se eluyó con hexano/acetato de etilo (99:1) para dar el compuesto 19-nor-vitamina D sililado **10** (39 mg, 74%). Posteriormente, el cartucho Sep-Pak se lavó con hexano/acetato de etilo (7:3) para recuperar el óxido de fosfina **9** no reaccionado (30 mg). **10**: ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ 0,029, 0,068 y 0,077 (3H, 3H, 3H y 3H, cada s, 4X SiCH₃), 0,627 (3H, s, 18-H₃), 0,814 (3H, t, J= 7,5 Hz, 23-H₃), 0,867 y 0,894 (cada 9H, cada s, 2X Si-t-Bu), 0,864 y 0,927 (3H y 3H, cada s, 20-CH₃ y 21-H₃), 2,18 (1H, dd, J=12,5, 8,5 Hz, 4β-H), 2,35 (1H, dd, J=13,5, 3,0 Hz, 10β-H), 2,46 (1H, dd, J=12,5, 4,0Hz, 4α-H), 2,50 (1H, dd, J=13,5, 6,0Hz, 10α-H), 2,81 (1H, dd, J~16, ~4 Hz, 9β-H), 4,42 (2H, m, 1β- y 3α-H), 4,92 y 4,97 (1h y 1H, cada s, H₂C=), 5,82 y 6,21 (1H y 1H, cada d, J=11,0Hz, 7- y 6-H).

20

25

30

35

[0052]**(h) Hidrólisis de los grupos protectores de sililo en el derivado de 19-norvitamina D 10**

[0053] 1α-hidroxi-20-metil-2-metilen-19,24,25,26,27-pentanorvitamina D₃ (11). A una solución de una vitamina protegida **10** (31 mg, 53 μmol) en THF anhidro (30 ml) se le añadió fluoruro de tetrabutilamonio (1,0 M en THF, 1,4 ml, 1,4 mmol) y trietilamina (260 μl). La mezcla se agitó en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 18 h, se vertió en salmuera y se extrajo con acetato de etilo y éter dietílico. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron. El residuo se purificó sobre un cartucho Sep-Pak (2 g). La elución con hexano/acetato de etilo (7:3) dio 19-norvitamina **11** (17 mg, 89%). El compuesto **11** se purificó adicionalmente mediante HPLC (columna Zorbax Sil, 9,4 mm X 25 cm, 4 ml/min) usando hexano/2-propanol (9:1) como sistema disolvente. Se recogió 19-norvitamina **11** pura a R_v 25,2 ml. En HPLC de fase inversa (columna Eclipse XDB-C 18, 9,4 mm x 25 cm, 3 ml/min) usando el sistema de disolvente metanol/agua (95:5) se recogió la vitamina **11** a R_v 30 ml. **11 (20DCM)**: UV (en EtOH) λ_{máx} 245,0, 252,5, 261,5 nm; ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) 0,637 (3H, s, 18-H₃), 0,814 (3H, t, J=7,0 Hz, 23-H₃), 0,861 y 0,924 (3H y 3H, cada s, 20-CH₃ y 21-H₃), 2,30 (1H, dd, J=13,0, 8,0 Hz, 10α-H), 2,34 (1H, dd, J=13,2, 6,0 Hz, 4β-H), 2,58 (1H, dd, J=13,2, 3,8 Hz, 4α-H), 2,80 (1H, d a, J~12,5 Hz, 9β-H), 2,85 (1H, dd, J=13,0, 5,0 Hz, 10β-H), 4,48 (2H, m, 1β- y 3α-H), 5,09 y 5,11 (1H y 1H, cada s, H₂C=), 5,87 y 6,36 (1H y 1H, cada d, J=11,5 Hz, 7- y 6-H).

40

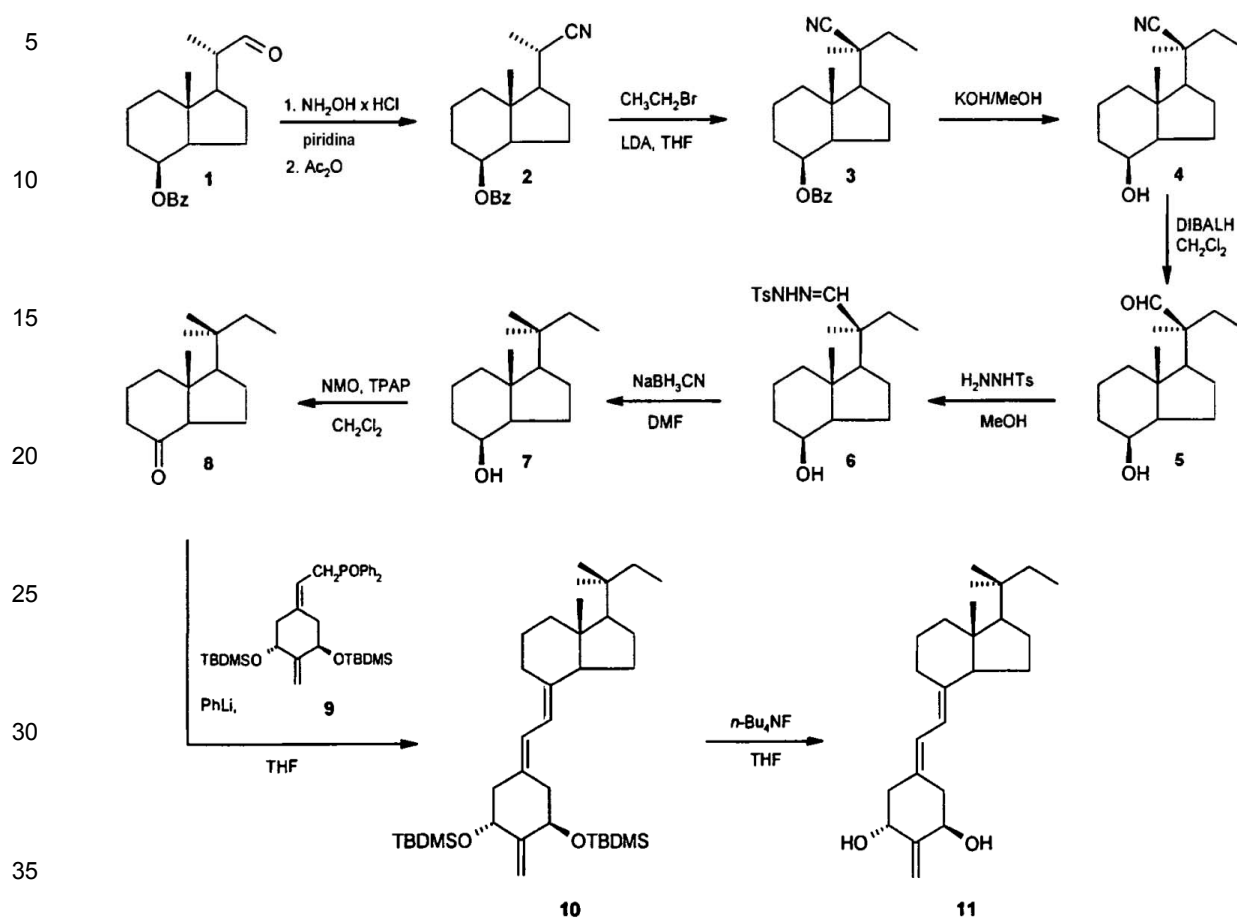
45

50

55

60

ESQUEMA 1



40 Actividad biológica de 2-metilen-20-metil-1 α -hidroxi-19,24,25,26,27-pentanor-vitamina D₃

[0054] La introducción de un grupo metileno en la posición 2 y un grupo 1,1-dimetilpropilo sustituido en la posición 17 (C-17), tuvo poco efecto sobre la unión de 20DCM al receptor de vitamina D de rata recombinante de longitud completa, en comparación con 1 α ,25-dihidroxitamina D₃. El compuesto 20DCM se une con una afinidad ligeramente inferior al receptor en comparación con el patrón 1,25-(OH)₂D₃ (Figura 1). 20DCM se une al receptor de vitamina D nuclear con una menor afinidad de aproximadamente la mitad con respecto a 1,25(OH)₂D₃. A partir de estos resultados sería de esperar que el compuesto 20DCM tuviera una actividad biológica equivalente. Sin embargo, sorprendentemente, el compuesto 20DCM es un análogo altamente selectivo con una actividad biológica única.

[0055] La figura 5 muestra que 20DCM tiene muy poca actividad en la estimulación del transporte de calcio intestinal en comparación con la 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃), la hormona natural. Se observa muy poco transporte de calcio intestinal en las ratas a las que se les administraron 4 dosis consecutivas de 20DCM por vía intraperitoneal.

[0056] La figura 4 demuestra que 20DCM tiene muy poca o ninguna actividad de movilización del calcio óseo, en comparación con 1,25(OH)₂D₃. 20DCM no tiene ninguna actividad medible en el hueso en los niveles de dosificación ensayados en este grupo de animales.

[0057] Por ello, las figuras 4 y 5 ilustran que 20DCM se caracterizaría por tener poca o ninguna actividad calcémica.

[0058] La figura 2 ilustra que, aunque 20DCM es unas 2,5 veces menos potente que 1,25(OH)₂D₃ en la diferenciación celular de HL-60, sigue siendo un buen candidato para el tratamiento de psoriasis y cáncer, particularmente contra leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de piel y cáncer de próstata. Además, debido a su actividad de diferenciación celular relativamente alta, este compuesto proporciona un agente terapéutico para el tratamiento de diversas afecciones cutáneas incluyendo arrugas, falta de hidratación dérmica adecuada, es

decir, piel seca, falta de firmeza adecuada de la piel, es decir, piel flácida y secreción de sebo insuficiente. Por consiguiente, el uso de este compuesto no solo hidrata la piel sino que mejora también su función de barrera.

5 [0059] La figura 3 ilustra que en las células óseas el compuesto 20DCM es aproximadamente 20 veces menos potente que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ para aumentar la transcripción del gen 24-hidroxilasa. Este resultado, junto con la actividad de diferenciación celular de la Figura 2, sugiere que 20DCM será muy eficaz en psoriasis porque tiene actividad celular directa en provocar diferenciación celular, transcripción de genes y supresión del crecimiento celular. Estos datos también indican que 20DCM podría tener una actividad significativa como agente anticanceroso, particularmente contra leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de piel y cáncer de próstata.

10 [0060] La fuerte actividad de 20DCM en la diferenciación celular de HL-60 sugiere que será activo en la supresión del crecimiento de las glándulas paratiroides y a la supresión del gen de la hormona preproparatiroidea.

15 Métodos experimentales

[0061] Unión al receptor de vitamina D

[0062] Material de ensayo

20 [0063] Fuente de proteínas

[0064] El receptor de rata recombinante de longitud completa se expresó en células E.coli BL21 (DE3) Codon Plus RIL y se purificó hasta la homogeneidad usando dos sistemas de cromatografía en columna diferentes. El primer sistema era una resina de afinidad de níquel que utiliza una etiqueta de histidina C-terminal en esta proteína. La proteína que se eluyó de esta resina se purificó adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico (S-Sepharose de flujo rápido). Las alícuotas de la proteína purificada se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para su uso en ensayos de unión, la proteína se diluyó en TEDK₅₀ (Tris 50 mm, EDTA 1,5 mm, pH 7,4, DTT 5 mm, KCl 150 mm) con detergente Chaps al 0,1%. La concentración de proteína receptora y ligando se optimizó de tal forma que no más del 20% del ligando radiomarcado añadido estuviera unido al receptor.

[0065] Fármacos de estudio

35 [0066] Se disolvieron ligandos sin marcar en etanol y las concentraciones se determinaron usando espectrofotometría UV ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: coeficiente de extinción molar = 18.200 y $\lambda_{\text{máx}}=265$ nm; Análogos: coeficiente de extinción molar = 42.000 y $\lambda_{\text{máx}}= 252$ nm). Se añadió ligando radiomarcado (^3H - $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ~159 Ci/mmol) en etanol a una concentración final de 1 nM.

[0067] Condiciones de ensayo

40 [0068] Se añadieron ligandos radiomarcados y sin marcar a 100 µl de proteína diluida a una concentración final de etanol de $\leq 10\%$, se mezcló e incubó durante la noche en hielo para alcanzar el equilibrio de unión. Al día siguiente, se añadieron 100 µl de suspensión de hidroxilapatita (50%) a cada tubo y se mezclaron a intervalos de 10 minutos durante 30 minutos. La hidroxilapatita se recogió por centrifugación y a continuación se lavó tres veces con tampón de Tris-EDTA (Tris 50 mm, EDTA 1,5 mm, pH 7,4) que contenía Titron X-100 al 0,5%. Después del lavado final, los gránulos se transfirieron a viales de centelleo que contenían 4 ml de cóctel de centelleo Biosafe II, se mezclaron y se colocaron en un contador de centelleo. La unión total se determinó de los tubos que contenían solo ligando radiomarcado.

50 [0069] Diferenciación de HL-60

[0070] Material de ensayo

[0071] Fármacos de estudio

55 [0072] Los fármacos de estudio se disolvieron en etanol y las concentraciones se determinaron usando espectrofotometría UV. Se prepararon diluciones en serie de modo que se pudiese ensayar un intervalo de concentraciones de fármaco sin cambiar la concentración final de etanol ($\leq 0,2\%$) presente en los cultivos celulares.

60 [0073] Células

[0074] Las células de leucemia promielocítica humana (HL60) se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía un 10% de suero bovino fetal. Las células se incubaron a 37°C en presencia de un 5% de CO_2 .

[0075] Condiciones de ensayo

[0076] Se depositaron células HL60 en una placa a $1,2 \times 10^5$ células/ml. Dieciocho horas después de depositarlas en la placa, las células se trataron por duplicado con fármaco. Cuatro días después, se recogieron las células y se realizó un ensayo de reducción con nitroazul de tetrazolio (Collins et al., 1979; J. Exp. Med. 149:969-974). El porcentaje de células diferenciadas se determinó contando un total de 200 células y registrando el número que contenía depósitos intracelulares de formazán negro-azulados. La verificación de la diferenciación en células monocíticas se determinó midiendo la actividad fagocítica (no se muestran datos).

[0077] Ensayo de transcripción *in vitro*

[0078] La actividad de transcripción se midió en células (óseas) ROS 17/2,8 que fueron transfectadas establemente con un promotor de gen 24-hidroxilasa (24Ohasa) cadena arriba de un gen informador de luciferasa (Arbour et al., 1998). A las células se les dio un intervalo de dosis. Dieciséis horas después de la dosificación las células se recogieron y se midieron las actividades de luciferasa usando un luminómetro.

[0079] RLU= unidades relativas de luciferasa.

[0080] Transporte de calcio intestinal y movilización de calcio óseo

[0081] Ratas macho destetadas Sprague-Dawley se pusieron a Dieta 11 (0,47% Ca) + aceite AEK durante una semana seguida por Dieta 11 (0,02% Ca) + aceite AEK durante 3 semanas. Posteriormente a las ratas se les cambió a una dieta que contenía 0,47% Ca durante una semana seguido de dos semanas de una dieta que contenía calcio al 0,02%. La administración de la dosis comenzó durante la última semana de dosis con una dieta de calcio de 0,02%. Se les administraron cuatro dosis *ip* consecutivas con aproximadamente 24 horas de diferencia entre ellas. Veinticuatro horas después de la última dosis, se recogió sangre del cuello cortado y se determinó la concentración de calcio sérico como medida de la movilización del calcio óseo. También se recogieron los 10 primeros centímetros del intestino para el análisis del transporte de calcio intestinal usando el método del saco intestinal evertido.

Interpretación de los datos

[0082] Sumario de los descubrimientos biológicos. Este compuesto se une al VDR con ligeramente menor afinidad en comparación con la hormona nativa. Mientras que el compuesto 20DCM también muestra aproximadamente de 2 a 4 veces menor actividad de diferenciación celular y 20 veces menos actividad de transcripción de gen *in vitro* en comparación con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, sigue siendo un compuesto potencialmente valioso para el desarrollo terapéutico ya que posee poca o ninguna actividad de transporte de calcio intestinal y de movilización de calcio óseo. Podría servir como un agente útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, cáncer, hiperparatiroidismo secundario, osteodistrofia renal, psoriasis u otras afecciones cutáneas.

[0083] Unión a VDR, diferenciación celular de HL60 y actividad de transcripción. El compuesto 20DCM ($K_i=8 \times 10^{-11}\text{M}$) es casi tan activo como la hormona natural $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 ($K_i=5 \times 10^{-11}\text{M}$) en su capacidad de competir con el $[\text{}^3\text{H}]-1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por la unión al receptor de vitamina D de rata recombinante de longitud completa (Figura 1). 20DCM es también unas 2,5 veces menos potente ($\text{CE}_{50}=1 \times 10^{-8}\text{M}$) en su capacidad (eficacia o potencia) para estimular la diferenciación celular de HL60 en comparación con la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 ($\text{CE}_{50}=4 \times 10^{-9}\text{M}$) (Véase la figura 2). Además, el compuesto 20DCM ($\text{CE}_{50}=4 \times 10^{-9}\text{M}$) tiene aproximadamente 20 veces menos actividad de transcripción *in vitro* en las células óseas que la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 ($\text{CE}_{50}=2 \times 10^{-10}\text{M}$) (Véase la figura 3). Estos resultados sugieren que 20DCM será muy eficaz en el tratamiento de psoriasis porque tiene actividad celular directa para provocar diferenciación celular, transcripción de genes y la supresión del crecimiento celular. Estos datos también indican que 20DCM tendrá una actividad significativa como agente anticanceroso, particularmente contra leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de piel y cáncer de próstata, así como contra afecciones cutáneas tales como piel seca (falta de hidratación dérmica), falta excesiva de firmeza de la piel (firmeza de la piel insuficiente), secreción de sebo insuficiente y arrugas. También sería de esperar que fuera muy activo en suprimir el hiperparatiroidismo secundario, particularmente en sujetos con enfermedades renales crónicas y sujetos sometidos a diálisis.

[0084] Movilización del calcio del hueso y absorción intestinal de calcio en animales con insuficiencia de vitamina D. Al usar ratas con insuficiencia de vitamina D con una dieta baja en calcio (0,02%), se ensayaron las actividades de 20DCM y de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en intestino y hueso. Como era de esperar, la hormona nativa ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) aumentó los niveles de calcio sérico en todas las dosis. (Figura 4). La Figura 4 muestra que 20DCM tiene poca o ninguna actividad en la movilización de calcio del hueso. La administración de 20DCM a 260 pmol/día durante 4 días consecutivos no tuvo como resultado la movilización del calcio en el hueso y tampoco se consiguió ningún resultado al aumentar la cantidad de 20DCM a 7020 pmol/día.

[0085] El transporte de calcio intestinal se evaluó en los mismos grupos de animales usando el método del saco intestinal evertido. (Figura 5). Estos resultados muestran que el compuesto 20DCM solo estimula el transporte de

calcio intestinal ligeramente cuando se administra a 260 pmol/día, mientras que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ presenta un incremento significativo con la dosis de 260 pmol/día. Incluso cuando se administraron 7020 pmol/día de 20DCM no se registró ninguna actividad significativa de transporte de calcio intestinal, un incremento de casi 30 veces más en la dosificación por encima de la dosis de 260 pmol/día. Por consiguiente, se puede concluir que 20DCM está desprovisto esencialmente de actividad de transporte de calcio intestinal a estas dosis.

[0086] Estos resultados ilustran que 20DCM es un excelente candidato para diversas terapias humanas como se describe en este documento, y puede ser particularmente útil en numerosas circunstancias, tales como la supresión del hiperparatiroidismo secundario de osteodistrofia renal, enfermedades autoinmunes, cáncer y psoriasis. 20DCM es un excelente candidato para tratar la psoriasis porque: (1) tiene una unión a VDR, actividad de transcripción y actividad de diferenciación celular significativas; (2) está desprovisto de propensión a hipercalcemia en dosis relativamente bajas, a diferencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; y (3) se sintetiza fácilmente. Ya que 20DCM tiene una actividad de unión significativa al receptor de vitamina D, pero tiene poca capacidad para aumentar el calcio sérico en sangre, también podría ser particularmente útil para el tratamiento de hiperparatiroidismo secundario, sobre todo en sujetos con diagnósticos de enfermedades renales crónicas y sujetos sometidos a diálisis, así como para el tratamiento de osteodistrofia renal.

[0087] Estos datos también indican que el compuesto 20DCM de la invención podría ser especialmente adecuado para el tratamiento y profilaxis de trastornos humanos caracterizados por un desequilibrio en el sistema inmune, por ejemplo, en enfermedades autoinmunes, incluyendo esclerosis múltiple, lupus, diabetes mellitus, enfermedad de hospedador contra injerto y rechazo de trasplantes de órganos; y adicionalmente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, asma y enfermedades intestinales inflamatorias tales como enfermedad celíaca, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. El acné, la alopecia, y la hipertensión son otras afecciones que pueden tratarse con el compuesto 20DCM de la invención.

[0088] Los compuestos de la invención de fórmula I, y especialmente los de fórmula Ia, resultan también útiles para prevenir o tratar la obesidad, inhibir la diferenciación de adipocitos, inhibir la transcripción del gen SCD-1 y/o reducir la grasa corporal en sujetos animales. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el método para prevenir o tratar la obesidad, inhibir la diferenciación de adipocitos, inhibir la transcripción del gen SCD-1 y/o reducir la grasa corporal en sujetos animales incluye administrar al sujeto animal, una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos o una composición farmacéutica que incluya uno o más de los compuestos de la fórmula I. La administración de uno o más de los compuestos o las composiciones farmacéuticas al sujeto inhibe la diferenciación de adipocitos, inhibe la transcripción de genes y/o reduce la grasa corporal en el sujeto animal. El animal puede ser un ser humano, un animal doméstico tal como un perro o un gato, o un animal agrícola, particularmente aquellos que proporcionan carne para el consumo humano, tales como aves de corral como pollos, pavos, faisanes o codornices, así como animales bovinos, ovinos, caprinos o porcinos.

[0089] Para fines de prevención y/o tratamiento, los compuestos de esta invención definidos por la fórmula I pueden formularse para aplicaciones farmacéuticas como una solución en disolventes inocuos, o como una emulsión, suspensión o dispersión en disolventes o excipientes adecuados, o como pastillas, comprimidos o cápsulas, junto con excipientes sólidos, de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica. Cualquiera de estas formulaciones también puede contener otros excipientes aceptados farmacéuticamente y no tóxicos tales como estabilizadores, antioxidantes, aglutinantes, agentes colorantes o agentes emulsionantes o modificadores del sabor.

[0090] Los compuestos de fórmula I y particularmente 20DCM, pueden administrarse por vía oral, tópica, parental, rectal, nasal, sublingual o transdérmica. El compuesto se administra ventajosamente por inyección, por infusión intravenosa o por soluciones estériles adecuadas, o en forma de dosis sólidas o líquidas a través del tubo digestivo, o en forma de cremas, pomadas, parches o vehículos similares adecuados para aplicaciones transdérmicas. Una dosis de 0,01 μg a 1000 μg al día de los compuestos I, particularmente 20DCM, preferentemente de 0,1 μg a 1000 μg al día, es apropiada para fines de prevención y/o tratamiento, ajustándose cada dosis de acuerdo con la enfermedad que ha de tratarse, su gravedad y la respuesta del sujeto como bien se entiende en la técnica. Ya que el compuesto muestra una especificidad de acción, cada uno se puede administrar solo o junto con dosis graduadas de otro compuesto de vitamina D activo, por ejemplo, $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_2 o D_3 o $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 , en situaciones donde se ha descubierto que diferentes grados de movilización mineral ósea y estimulación del transporte de calcio es ventajoso.

[0091] Las composiciones para su uso en los tratamientos mencionados anteriormente comprenden un cantidad eficaz de los compuestos I, particularmente 20DCM, como se ha definido en las formulas I y la anteriores como el principio activo, y un excipiente adecuado. Una cantidad eficaz de tal compuesto para su uso de acuerdo con la presente invención es de 0,01 μg a 1000 μg por gramo de composición, preferentemente de 0,1 μg a 500 μg por gramo de composición, y puede administrarse por vía tópica, transdérmica, oral, rectal, nasal, sublingual o parental en dosificaciones 0,01 $\mu\text{g}/\text{día}$ a 5000 $\mu\text{g}/\text{día}$, y preferentemente de 0,1 $\mu\text{g}/\text{día}$ a 500 $\mu\text{g}/\text{día}$.

[0092] Los compuestos I, particularmente 20DCM, pueden formularse como cremas, lociones, pomadas, parches tópicos, pastillas, cápsulas o comprimidos, supositorios, aerosoles o en forma líquida como soluciones, emulsiones,

dispersiones o suspensiones en disolventes farmacéuticamente aceptables e inocuos o aceites, y tales preparaciones pueden contener además otros componentes farmacéuticamente aceptables beneficiosos o inocuos tales como estabilizadores, antioxidantes, emulsionantes, agentes colorantes, aglutinantes o agentes modificadores del sabor.

5
[0093] Los compuestos I, particularmente 20DCM, pueden administrarse ventajosamente en cantidades suficientes para efectuar la diferenciación de promielocitos a macrófagos normales. Las dosificaciones descritas anteriormente son adecuadas, entendiéndose que las cantidades dadas tienen que ajustarse de acuerdo con la gravedad de la enfermedad y el estado y la respuesta del sujeto como bien se entiende en la técnica.

10
[0094] Las formulaciones de la presente invención comprenden un principio activo en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El excipiente debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de las formulaciones y no perjudicial para el destinatario del mismo.

15
[0095] Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de unidades discretas como cápsulas, sobres, comprimidos o pastillas, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada del principio activo; en forma de polvo o gránulos; en forma de una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o en forma de una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite.

20
[0096] Las formulaciones de administración rectal pueden estar en forma de supositorio incorporando el principio activo y un excipiente tal como manteca de cacao, o en forma de enema.

25
[0097] Las formulaciones adecuadas para la administración parental convenientemente comprenden una preparación acuosa u oleosa estéril del principio activo que es preferiblemente isotónica con la sangre del destinatario.

30
[0098] Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas tales como linimentos, lociones, aplicaciones, emulsiones de agua en aceite o de aceite en agua tales como cremas, pomadas o pastas; o soluciones o suspensiones tales como gotas o aerosoles.

35
[0099] Para la administración nasal, se puede usar polvo de inhalación, formulaciones de pulverizados o auto-propulsadas, dispensadas con una lata de pulverizador, un nebulizador o un atomizador. Las formulaciones, cuando se dispensan, tienen preferentemente un tamaño de partícula en el intervalo de 10 a 100 μ .

40
[0100] Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de unidad de dosificación y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Por el término "unidad de dosificación" se entiende una dosis unitaria, es decir, única, que se puede administrar al paciente como una dosis unitaria estable física y químicamente que comprende el principio activo como tal o una mezcla de este con diluyentes o excipientes farmacéuticos sólidos o líquidos.

45

50

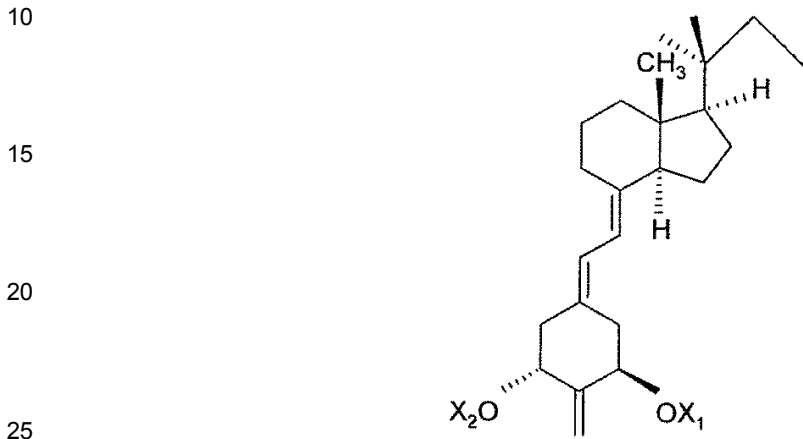
55

60

65

REIVINDICACIONES

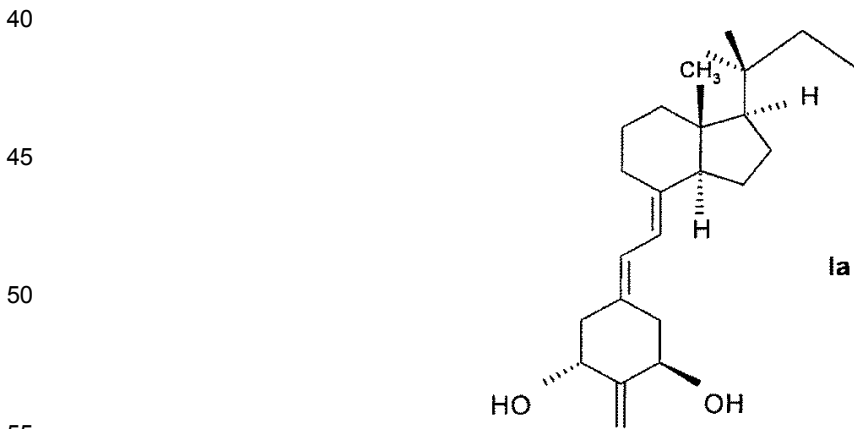
5 1. Un compuesto que tiene la fórmula:



30 donde X_1 y X_2 , que pueden ser iguales o diferentes, cada uno se selecciona entre hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo.

35 2. El compuesto de reivindicación 1 en el que X_2 es hidrógeno, o en el que X_1 es hidrógeno, o en el que X_1 y X_2 son ambos t-butildimetilsililo.

40 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es 2-metilen-20-metil-1 α -hidroxi-19,24,25,26,27-pentano- α -vitamina D_3 tiene la fórmula:



60 4. Una composición farmacéutica contiene una cantidad eficaz de al menos un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3 junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 en la que dicha cantidad eficaz comprende de 0,01 μg a 1000 μg por gramo de composición.

65 6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de psoriasis.

- 5 7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de piel o cáncer de próstata.
8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune seleccionada del grupo que consiste en esclerosis múltiple, lupus, diabetes mellitus, enfermedad de hospedador contra injerto y rechazo de trasplantes de órganos.
- 10 9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria seleccionada del grupo que consiste en artritis reumatoide, asma y enfermedades intestinales inflamatorias.
- 15 10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de una afección cutánea seleccionada del grupo que consiste en arrugas, falta de firmeza adecuada de la piel, falta de hidratación adecuada de la piel y secreción de sebo insuficiente.
- 20 11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de osteodistrofia renal.
12. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento o prevención de la obesidad animal, inhibición de la diferenciación de adipocitos, inhibición de la transcripción del gen SCD-1 y/o para la reducción de la grasa corporal en un animal.
- 25 13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario.
- 30 14. Un compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13 en el que el compuesto debe administrarse en una dosificación de 0,01 µg/día a 1000 µg/día.
- 35 15. Un compuesto para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 14 en el que el compuesto debe administrarse por vía tópica, o para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, en el que el compuesto debe administrarse por vía oral, parental, transdérmica, rectal, nasal o sublingual.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

5

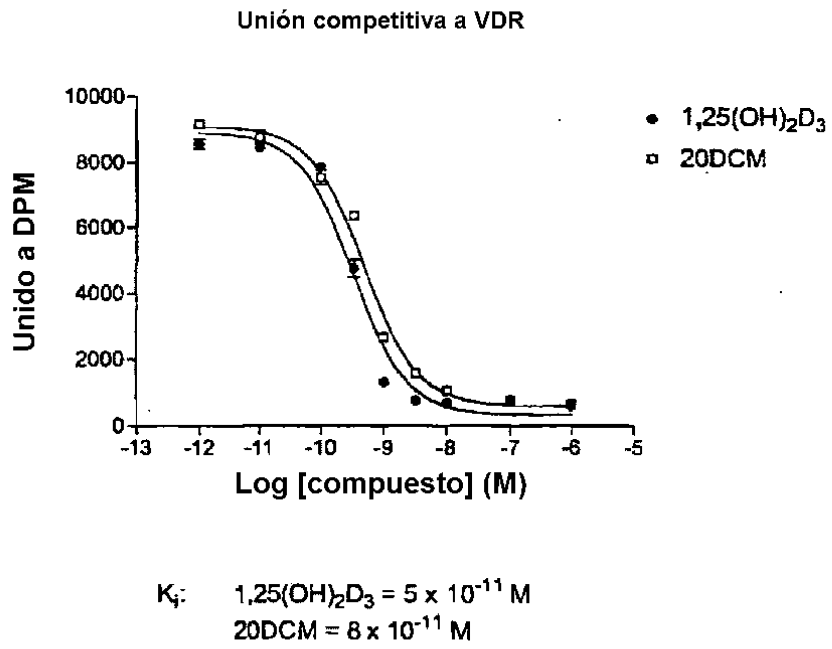


Figura 1

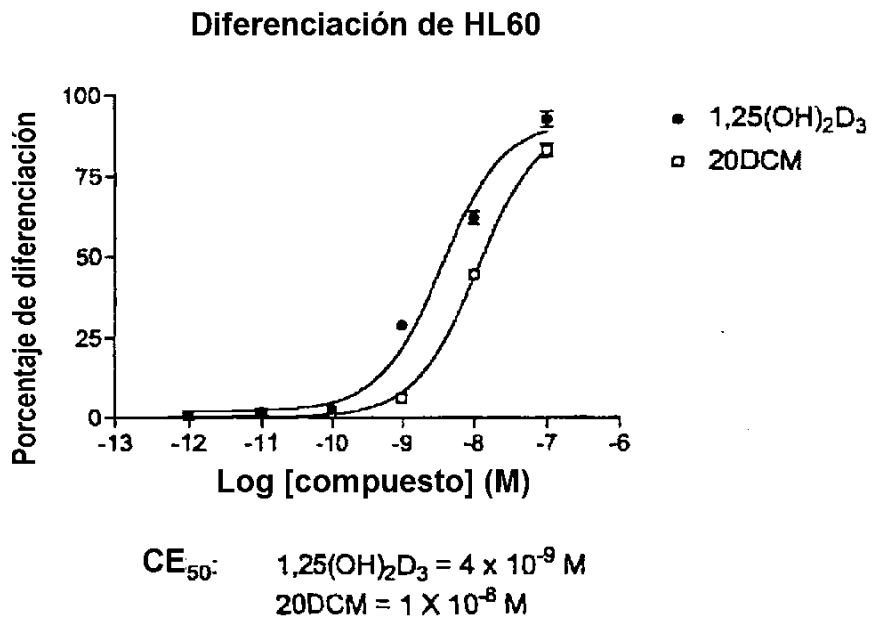


Figura 2

Transcripción de 24-OHasa

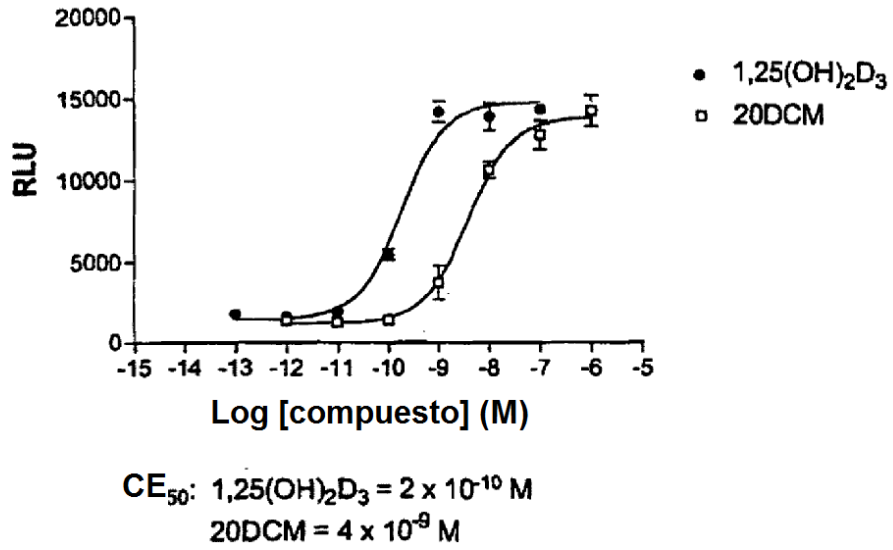


Figura 3

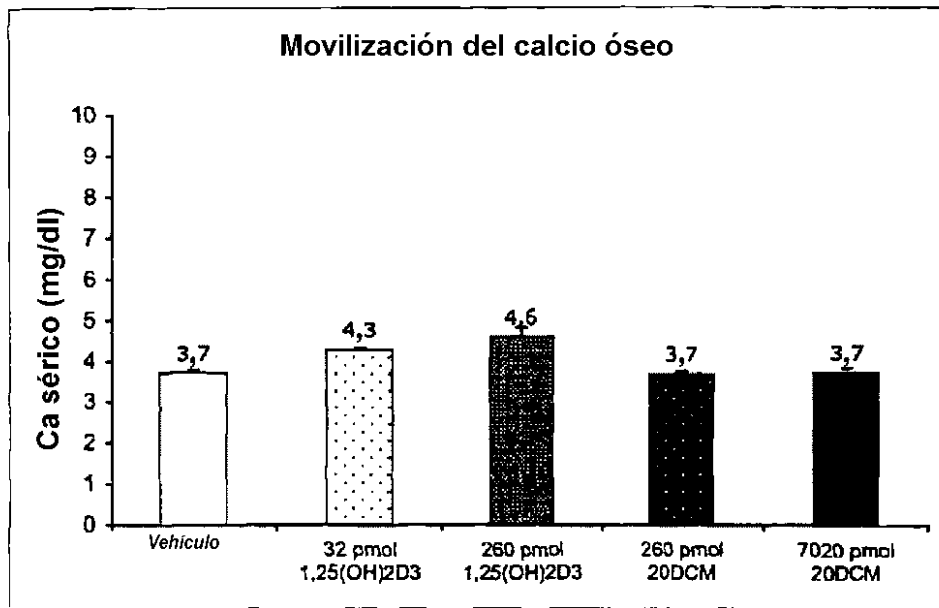


Figura 4

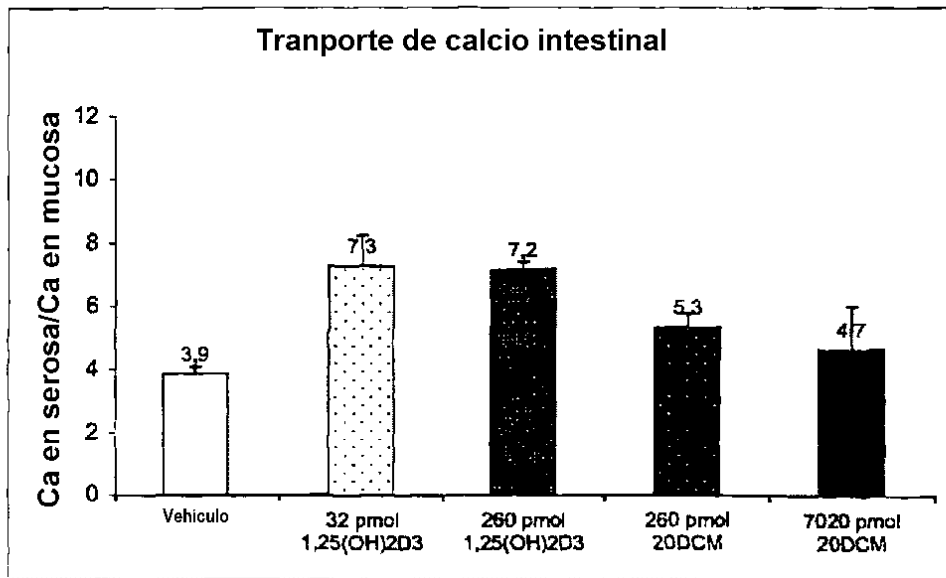


Figura 5