

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 328**

51 Int. Cl.:

A61P 19/10 (2006.01)

A61K 31/593 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2004** **E 04814798 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012** **EP 1722856**

54 Título: **Uso de 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ para la profilaxis de enfermedades óseas**

30 Prioridad:

19.02.2004 US 782337

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2013

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
614 NORTH WALNUT STREET
MADISON, WI 53705, US**

72 Inventor/es:

**DELUCA, HECTOR, F.;
PLUM, LORI, A. y
CLAGETTE-DAME, MARGARET**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 399 328 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

Uso de 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ para la profilaxis de enfermedades óseas

Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de la vitamina D y más específicamente a usos farmacéuticos para 2-metilen -19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃.

La hormona natural, 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ y su análogo en serie ergocalciferol, es decir, 1 α ,25-dihidroxitamina D₂ son conocidos por ser reguladores muy potentes de la homeostasis del calcio en animales y seres humanos y más recientemente se ha demostrado su actividad en la diferenciación celular, Ostrem *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 2610 (1987). Se han preparado y probado muchos análogos estructurales de estos metabolitos, incluyendo 1 α -hidroxivitamina D₃, 1 α -hidroxivitamina D₂, varias vitaminas homologadas con cadena lateral y análogos fluorados. Algunos de estos compuestos presentan una separación interesante de actividades en la diferenciación celular y en la regulación de calcio y Esta diferencia en actividad puede ser útil en el tratamiento de diversas enfermedades como la osteodistrofia renal, raquitismo resistente a vitamina D, osteoporosis, psoriasis y determinados tumores malignos.

Otra nueva clase de análogos de la vitamina D, es decir, los compuestos denominados 19-nor-vitamina D, se caracteriza por la sustitución del grupo metileno exocíclico del anillo A (carbono 19), típico del sistema de vitamina D, por dos átomos de hidrógeno. Pruebas biológicas de dichos 19-nor-análogos (p. ej., 1 α ,25-dihidroxi-19-nor-vitamina D₃) pusieron de manifiesto un perfil de actividad selectiva con gran potencia en la inducción de diferenciación celular y movilización de actividad y muy baja actividad de movilización de calcio. Por lo tanto, estos compuestos son potencialmente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de tumores malignos, o el tratamiento de varios trastornos de la piel. Se han descrito dos métodos diferentes de síntesis de dichos análogos de 19-nor-vitamina D (Perlman *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 31, 1823 (1990); Perlman *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 7663, 32 (1991) y DeLuca *et al.*, Pat. de Estados Unidos. N° 5.086.191).

En la Pat. de Estados Unidos. n° 4.666.634, los análogos 2 β -hidroxi y alcoxi (p. ej., ED-71) de 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ se han descrito y examinado por el grupo de Chugai como posibles fármacos para la osteoporosis y como agentes antitumorales. Véase también Okano *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1444 (1989). Otros análogos del anillo A sustituidos en 2 (con hidroxialquil, p. ej., ED-120, y grupos fluoroalquil) de 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ también se han preparado y probado (Miyamoto *et al.*, *Chem Pharm. Bull.* 41, 1111 (1993); Nishii *et al.*, *Osteoporosis Int. Supl.* 1, 190 (1993); Posner *et al.*, *J. Org. Chem.* 59, 7855 (1994) y *J. Org. Chem.* 60, 4617 (1995)).

Recientemente, análogos sustituidos en 2 de 1 α ,25-dihidroxi-19-nor-vitamina D₃ también se han sintetizado, es decir, compuestos sustituidos en la posición 2 con grupos hidroxi o alcoxi (DeLuca *et al.*, Pat de Estados Unidos. n° 5.536.713), que presenta perfiles de actividad interesantes y selectivos. Todos estos estudios indican que los puntos de enlace en los receptores de vitamina D puede acomodar diferentes sustituyentes en C-2 en los análogos sintetizados de vitamina D.

En un esfuerzo continuo para explorar la clase 19-nor de compuestos farmacológicamente importantes de vitamina D, se ha sintetizado y probado un análogo que se caracteriza por la presencia de un sustituyente de metileno en el carbono 2 (C-2). De particular interés es el análogo que se caracteriza por la configuración anormal del grupo metilo en el carbono 20 (C-20), es decir, 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃. Este análogo de la vitamina D se da a conocer en DeLuca *et al.* patente de EE.UU. n° 5.843.928 y su utilización para el tratamiento de una enfermedad metabólica ósea en el que se desea mantener o aumentar la masa ósea se da a conocer en la misma.

Como se acepta normalmente, los huesos humanos están sometidos a un proceso de remodelación constante y dinámico que incluye la reabsorción ósea y la formación ósea. La reabsorción ósea se basa en la destrucción de la matriz ósea y está controlada por células especializadas denominadas osteoclastos. La formación ósea la realizan células formadoras de hueso conocidas como osteoblastos que funcionan para reemplazar el hueso reabsorbido por los osteoclastos.

Desde la infancia hasta la adolescencia (es decir, hasta aproximadamente los 20 años de eada), el modelado y el remodelado óseo se controla de modo que el crecimiento esquelético está en un ritmo acelerado a fin de coincidir con el crecimiento de otros órganos del cuerpo. La acumulación esquelética continúa a lo largo de la madurez del joven (desde aproximadamente 20 a los 30 años de edad) aunque a un ritmo más lento. En adultos maduros sanos normales (entre las edades de alrededor de 30 años a unos 50 años (y en ausencia de embarazo en las mujeres) el proceso de remodelado óseo suele estar en equilibrio entre la formación ósea y la reabsorción ósea. A partir de entonces y como consecuencia normal del envejecimiento, se desarrolla un desequilibrio en el proceso de remodelado ósea, dando como resultado la pérdida de hueso. Si dicho desequilibrio continúa a lo largo del tiempo, la masa ósea y en consecuencia la resistencia ósea se reduce lo que conduce a mayor potencial para fracturas.

La mayoría de enfermedades metabólicas óseas se basan en un desequilibrio en el proceso de remodelado, es decir, un equilibrio perturbado entre la reabsorción ósea y la formación ósea ya sea a partir de una aceleración de la

actividad de reabsorción ósea por los osteoclastos o por reducción en la actividad de formación ósea por los osteoblastos. En cualquier caso, el resultado es una disminución en la cantidad de masa ósea y una consiguiente disminución de la resistencia de los huesos, que en última instancia se convierte en un trastorno óseo o una enfermedad ósea. La enfermedad metabólica ósea más frecuente es la osteoporosis. La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por la masa de los huesos y la gran fragilidad de los huesos que da como resultado un aumento del riesgo de fracturas. Es el resultado de un desequilibrio en el proceso de remodelado óseo en curso, y debido a la naturaleza extremadamente compleja el proceso de remodelado, no se interrumpe o invierte fácilmente.

La osteoporosis puede desarrollarse como consecuencia de numerosas causas diferentes. Generalmente se clasifica como osteoporosis inducida por insuficiencia hormonal (p. ej., la insuficiencia de estrógenos comúnmente denominada osteoporosis posmenopáusica) y la edad avanzada (p. ej., osteoporosis senil) así como la osteoporosis adquirida inducida por varias terapias farmacéuticas (p. ej., osteoporosis inducida por esteroides como resultado del tratamiento con fármacos glucocorticoides antiinflamatorios) y la que se conoce como osteoporosis de recambio óseo bajo.

El tratamiento convencional de la osteoporosis incluye, por ejemplo, la administración de estrógenos, estrógeno/progesterona (hace referencia a la terapia de reemplazo hormonal), calcitonina, análogos de la vitamina D, bifosfonatos, hormona paratiroidea y fluoruro de sodio. Cada uno de estos tratamientos tiene sus limitaciones debido a la naturaleza multifacética y compleja de la osteoporosis. Además, algunos de estos tratamientos implican graves efectos secundarios indeseables que limitan su utilidad.

La osteoporosis y otras enfermedades caracterizadas por la necesidad de aumentar la resistencia de un hueso, se producen cada vez con mayor frecuencia a medida que las personas envejecen, especialmente después de la madurez. Estos tipos de enfermedades son algunos de los más importantes trastornos que afectan a los ancianos y debido a la alta frecuencia de las fracturas y sus costes relativamente elevados, su prevención sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública no resuelto a los que se enfrenta la sociedad. Debido a que la pérdida de hueso ha sucedido a lo largo de muchos años y posiblemente décadas, antes que las fracturas comenzaran a ocurrir, cualquier programa farmacéutico de intervención dirigido a prevenir el desarrollo de enfermedades metabólicas óseas tal como la osteoporosis deberían comenzar más temprano cuanto antes en la vida.

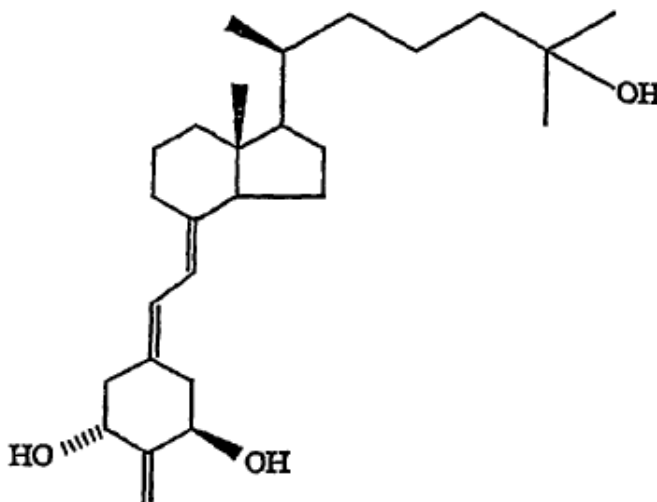
El documento WO 02/05823 se refiere al uso de 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α , 25-dihidroxitamina D₃ en el tratamiento de enfermedades en las que se desea la formación ósea, especialmente la osteoporosis.

El documento US 5843928 se refiere a los derivados de 2-alkilideno-19-nor vitamina D y a su uso como agentes anticancerígenos y para el tratamiento de enfermedades tal como la psoriasis.

Compendio de la invención

La presente invención está dirigida a usos farmacéuticos para 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃, (en adelante también conocida como 2MD).

Estructuralmente este análogo de 19-nor se caracteriza por la fórmula general I mostrada a continuación:



La línea llena en forma de cuña del sustituyente metilo en el C-20 indica que el carbono 20 tiene la configuración S.

El compuesto anterior (2MD) presenta unas características deseadas, y muy ventajosas, de actividad biológica. 2MD se caracteriza por la actividad de transporte de calcio intestinal, similar a la de 1 α ,25-dihidroxitamina D₃, pero presenta una actividad muy alta, en comparación con 1 α ,25-dihidroxitamina D₃, en su capacidad para movilizar

calcio del hueso. Este último hallazgo indica que 2MD muestra actividad preferente sobre los osteoblastos (células formadoras de hueso), confirmado por experimentos directos de cultivo de osteoblastos (Shevde *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 13487 (2002)). Por lo tanto, 2MD es muy específico en su actividad. Su actividad preferencial en la movilización de calcio del hueso permite la administración *in vivo* de 2MD para la profilaxis de enfermedades metabólicas óseas en las que la pérdida ósea es una preocupación importante. Debido a su actividad preferencial sobre el hueso, 2MD sería un agente terapéutico preferido para la profilaxis de enfermedades en las que se desea la formación ósea, tales como la osteoporosis, especialmente la osteoporosis de bajo recambio óseo, la osteoporosis inducida por esteroides, la osteoporosis senil o la osteoporosis posmenopáusica, así como la osteomalacia. La administración de 2MD para el tratamiento y la profilaxis de dichas enfermedades puede ser transdérmica, oral o parenteral. 2MD puede estar presente en una composición en una cantidad de aproximadamente 0,01 µg/µg a aproximadamente 50 µg/µg de la composición, y puede administrarse a humanos en dosificaciones de aproximadamente 0,01 mg/día a aproximadamente 100 mg/día y preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/día a aproximadamente 10 mg/día en los seres humanos.

La presente invención proporciona 2MD para su utilización en la profilaxis de una enfermedad o trastorno caracterizado por una necesidad de aumentar la resistencia de un hueso, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de 2MD. Por lo tanto, 2MD podría utilizarse para construir la masa ósea y aumentar la resistencia ósea de individuos con masa y resistencia ósea normal (medida a partir de y en comparación con las lecturas del contenido mineral óseo (por sus siglas en inglés, BMC) de la referencia y/o la densidad mineral ósea (DMO)) de modo que puedan sostener esta última pérdida de hueso causada por diversas enfermedades o trastornos del hueso, sin incurrir en las fracturas. A los individuos podría administrarse 2MD a largo de su vida (por ejemplo, en la infancia, adolescencia, la edad adulta joven y la edad adulta madura) o en cualquier parte de la misma, para desarrollar mayor masa y resistencia óseas. Preferentemente, en el momento de la administración a dichos individuos no están afectados por una enfermedad ósea metabólica o que no han sido diagnosticados de la misma. Por lo tanto, al comienzo de la osteoporosis producida por insuficiencia hormonal (p. ej., osteoporosis posmenopáusica en mujeres), o edad avanzada (osteoporosis senil en hombres y mujeres) o terapia farmacéutica (p. ej., osteoporosis producida por esteroides como resultado del tratamiento con fármacos antiinflamatorios glucocorticoides) o el desarrollo de la osteoporosis de bajo recambio óseo, las personas que han construido su masa ósea pueden soportar la pérdida de hueso causada por la misma. Además de la osteoporosis, otras circunstancias en las que podría utilizarse 2MD como un método de profilaxis incluyen el tratamiento de mujeres amenorreicas por lo general las atletas, los atletas y trabajadores que necesitan esqueletos fuertes, los caballos especialmente los caballos de carrera (en dosis de aproximadamente 0,01 µg/día a aproximadamente 700 µg/día), y los astronautas en condiciones de ingravidez. Puede ser aplicable también en agricultura para gallinas ponedoras (en dosis de alrededor de 0,0001 µg/día a aproximadamente 4 µg/día), vacas especialmente vacas lactantes (en dosis de aproximadamente 0,01 µg/día a aproximadamente 550 µg/día), y cerdos especialmente cerdas que se utiliza para parto rápido (en dosis de alrededor de 0,005 µg/día a aproximadamente 225 µg/día). La gente mayor podría beneficiarse de una intervención farmacéutica prematura o del programa de profilaxis para la prevención de fracturas óseas. Preferentemente, sin embargo, la presente invención se refiere a un método para la profilaxis de la osteoporosis, especialmente a la osteoporosis posmenopáusica, que comprende administrar a un paciente antes de la menopausia una cantidad eficaz de 2MD para aumentar la masa ósea.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico que ilustra la actividad relativa de 2-metilen-19-nor-20(S)-1α,25-dihidroxitamina D₃ (2MD) y 1α,25-dihidroxitamina D₃ para competir por la unión de [³H]-1α,25-(OH)₂-D₃ al receptor nuclear de la vitamina D;

la figura 2 es un gráfico que ilustra la actividad de transporte de calcio intestinal de 2-metilen-19-nor-20 (S)-1α,25-dihidroxitamina D₃ (2MD) en comparación con 1α,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃);

la figura 3 es un gráfico que ilustra la actividad de movilización de calcio óseo de 2-metilen-9-nor-20(S)-1α,25-dihidroxitamina D₃ (2MD) en comparación con 1α,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃);

la figura 4 es un gráfico que ilustra el cambio en la densidad mineral ósea en ratas hembra viejas ovariectomizadas como resultado del tratamiento con 2-metilen-19-nor-20(S)-α,25-dihidroxitamina D₃ (2MD) en comparación con 1α,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃);

la figura 5 es un gráfico que ilustra el porcentaje de diferenciación de células HL-60 en función de la concentración de 2-metilen-19-nor-20(S)-1α,25-dihidroxitamina D₃ (2MD) y 1α,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃);

la figura 6A es un gráfico de barras que ilustra la restauración y la construcción ósea en ratas hembra viejas ovariectomizadas como resultado del tratamiento con 2-metilen-19-nor-20(S)-1α,25-dihidroxitamina D₃ (2MD) en comparación con 1α,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃);

la figura 6B es un gráfico de barras que ilustra el aumento de la resistencia ósea en ratas hembra viejas ovariectomizadas como resultado del tratamiento con 2-metilen-19-nor-20(S)-1α,25-dihidroxitamina D₃ (2MD) en comparación con 1α,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃);

la figura 7 es un gráfico de barras que ilustra las concentraciones de calcio en el suero sanguíneo en ratas hembra después de 6 semanas de tratamiento con diferentes dosis diarias de 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (2MD) en comparación con 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃);

5 la figura 8 es un gráfico que ilustra el crecimiento de las ratas hembra a diversas dosis de 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (2MD) en comparación con 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃);

la figura 9 es un gráfico que ilustra las cenizas de riñón de ratas hembra después de 6 semanas de tratamiento con diferentes dosis diarias de 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (2MD) en comparación con 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃);

10 la figura 10 es un gráfico de líneas que ilustra las concentraciones de calcio en el suero sanguíneo 24 horas después de la dosis en monos Rhesus a los que se ha administrado un solo bolo oral de 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (2MD) a concentraciones variables;

15 la figura 11 es un gráfico de barras que ilustra el aumento de la densidad mineral del hueso del cuerpo (DMO) en el tiempo en ratas hembra adultas, como resultado del tratamiento con 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (2MD, 2,5 ng/kg/día) en comparación con la referencia, y que también incorpora un gráfico de líneas que ilustra el cambio de porcentaje en DMO;

la figura 12A es un gráfico que ilustra el aumento de la densidad mineral ósea (DMO) a lo largo del tiempo en el hueso esponjoso de ratas hembra adultas utilizadas para obtener los datos para la figura 11;

la figura 12B es un gráfico que ilustra el aumento de la densidad mineral ósea (DMO) a lo largo del tiempo en el hueso cortical de ratas hembra adultas utilizadas para obtener los datos para la figura 11;

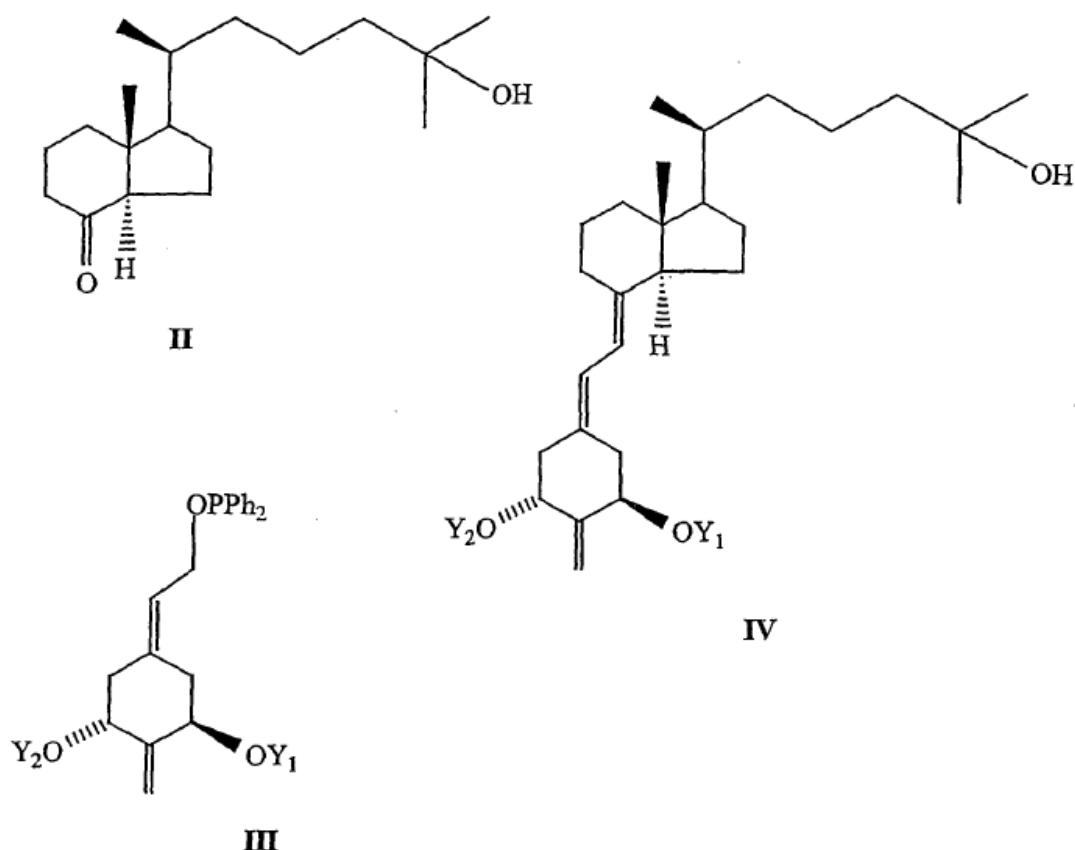
20 la figura 13A es un gráfico que ilustra el peso corporal a lo largo del tiempo de las ratas hembra adultas utilizadas para obtener los datos para la figura 11 y las figuras 12A y 12B; y

la figura 13B es un gráfico que ilustra las concentraciones de calcio en el suero sanguíneo a lo largo del tiempo de las ratas hembra adultas utilizadas para obtener los datos para la figura 11 y las figuras 12A y 12B.

Descripción detallada de la invención

25 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (denominado en la presente memoria 2MD) se sintetizó y probó. Estructuralmente, este análogo de 19-nor se caracteriza por la fórmula general I ilustrada anteriormente en la presente memoria.

30 La preparación de 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ que tiene la estructura básica I puede realizarse por un método general común, es decir, la condensación de una cetona II bicíclica tipo Windaus-Grundmann con el óxido de fosfina alílico III para el correspondiente análogo IV de 2-metilen-19-nor-vitamina D seguido de desprotección en C-1 y C-3 en este último compuesto:



En las estructuras II, III y IV los grupos Y_1 e Y_2 son grupos protectores de hidroxilo, entendiéndose también que cualquier funcionalidad que pueda ser sensible, o que interfiera con la reacción de condensación, se protege adecuadamente como es bien sabido en la técnica. El proceso mostrado anteriormente representa una aplicación del concepto de síntesis convergente, que se ha aplicado eficazmente para la preparación de compuestos de vitamina D (p. ej., Lythgoe *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 590 (1978); Lythgoe, *Chem. Soc. Rev.* 9, 449 (1983); Toh *et al.*, *J. Org. Chem.* 48, 1414 (1983); Baggiolini *et al.*, *J. Org. Chem.* 51, 3098 (1986); Sardina *et al.*, *J. Org. Chem.* 51, 1264 (1986); *J. Org. Chem.* 51, 1269 (1986); DeLuca *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.086.191; DeLuca *et al.*, patente de EE.UU. nº 5.536.713).

Las hidrindanonas de la estructura general II son conocidas, o se pueden preparar por métodos conocidos.

Para la preparación de los óxidos de fosfina requeridos de estructura general III, se ha desarrollado una nueva ruta sintética a partir de un derivado de quinicato de metilo que se obtiene fácilmente a partir del ácido (1R,3R,4S,5R)-(-)-quinico comercial como describe Perlman *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 32, 7663 (1991) y DeLuca *et al.*, Patente de EE.UU. nº 5.086.191.

El proceso global de la síntesis del compuesto I se ilustra y describe más completamente en la patente de EE.UU. nº 5.843.928 expedida el 1 de diciembre de 1998 y titulada "Compuestos de 2-alkilideno-19-nor-vitamina D".

Actividad biológica de 2-metileno-20(S)-19-nor-1,25-(OH)₂D₃ (Figs. 1-8)

La introducción de un grupo metileno en la posición 2 del isómero 20(S) de 19-nor-1,25-(OH)₂D₃ tuvo poco o ningún efecto sobre la unión al receptor intestinal porcino de vitamina D. Este compuesto unido igualmente bien al receptor de rata recombinante completo en comparación con el patrón 1,25-(OH)₂D₃ (Figura 1). Se encontraron resultados similares cuando se estudió el receptor natural de intestino porcino. Se podría esperar a partir de estos resultados que este compuesto tendría actividad biológica equivalente. Sorprendentemente, sin embargo, las sustituciones de 2 metileno y 20(S) produjeron un análogo muy selectivo, con su acción primaria sobre el hueso.

La figura 2 demuestra que 2MD tiene una actividad similar a la de 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃), hormona natural, en la estimulación del transporte de calcio intestinal en ratas que carecen de vitamina D a las que se les ha administrado una dosis de fármaco por sonda nasogástrica oral durante 7 días consecutivos, seguido del ensayo utilizando la técnica del saco intestinal dado la vuelta. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar.

La figura 3 demuestra claramente que 2MD es 100 veces más potente que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en el hueso, es decir, la movilización del calcio óseo. Se midió el calcio en el suero sanguíneo 24 horas después de la última dosis en las ratas como se describe en la figura 2. Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar.

5 La figura 4 demuestra que 2MD es extraordinariamente eficaz en la construcción de la masa ósea en ratas ovariectomizadas, en comparación con la hormona natural sin aumentar la concentración de calcio en el suero (Tabla 1). Esto es todavía un nuevo hallazgo sin precedentes para un compuesto de vitamina D.

La figura 5 ilustra que 2MD es 10 a 50 veces más potente que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la diferenciación de las células HL-60, haciéndolo un excelente candidato para el tratamiento de la psoriasis y el cáncer, especialmente contra la leucemia, neuroblastoma, retinoblastoma, melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata.

10 La tabla 1 y la figura 6A ilustran que 2MD es muy eficaz en el aumento óseo de ratas hembra viejas ovariectomizadas, a 32 pmol a las que se administra 2 veces por semana en comparación con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, a altas dosis (250 o 500 pmol) 3 veces por semana. Nota: 2MD también aumenta el % de cenizas del fémur. Los valores de la figura son la media $\pm$ desviación estándar.

15 La tabla 2 y la figura 6B demuestran que 2MD aumenta la resistencia a la rotura en los fémures (resistencia cortical) y la resistencia al aplastamiento en las vértebras (resistencia trabecular) de los animales mostrados en la Tabla 1. Los valores de la figura son la media $\pm$ desviación estándar.

20 Las figuras 7 a 9 muestran un estudio de toxicidad de seis semanas en ratas y demuestran que 2MD parece segura hasta 35 pmol/día. La figura 10 demuestra que en los monos Rhesus, una dosis oral única de 29 mg (1,73 $\mu\text{g/kg}$) no producen elevación significativa de la concentración sérica de calcio, lo que sugiere una mayor seguridad en primates.

25 Las figuras 11, 12A y 12B muestran que 2MD administrada a 1,8 pmol/día es muy eficaz en el aumento de la densidad ósea en ratas hembra adultas normales. No sólo 2MD aumenta el hueso (trabecular) esponjoso, sino que además aumenta la densidad del hueso cortical (hueco) también. Las figuras 13A y 13B demuestran que el aumento notable tanto en el hueso cortical como esponjoso se consigue sin efecto adverso ni en el peso corporal ni en las concentraciones de calcio en el suero de los animales. Por lo tanto, este trabajo demuestra que 2MD puede usarse de manera segura no sólo en animales ovariectomizados, sino también en animales normales a una dosis que es eficaz en el aumento de la densidad ósea.

La unión competitiva de los análogos al receptor intestinal porcino se llevó a cabo por el método descrito por Dame *et al.* (*Biochemistry* 25, 4523-4534, 1986).

30 La diferenciación de las células HL-60 promielocíticas en monocitos se determinó como describe Ostrem *et al.* (*J. Biol. Chem.* 262, 14164-14171, 1987).

Se llevaron a cabo estudios de transporte de calcio intestinal y movilización ósea como describe Sicinski *et al.* (*J. Med. Chem.* 41, 4662-4674, 1998) y Suda *et al.* (*J. Nutr.* 100, 1049-1052, 1970).

Interpretación de los datos de la actividad biológica (figuras 1 a 13)

35 Algunas referencias al tratamiento se incluyen a continuación únicamente como referencia. Las pruebas *in vivo* de aumento de calcio en el suero de ratas en una dieta de calcio cero proporciona una visión de la actividad osteoblástica o del hueso de 2MD. Las curvas de respuesta a la dosis demuestran que 2MD es al menos 80 a 100 veces más potente que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en el aumento de calcio en el plasma a través de la estimulación de los osteoblastos (Figura 3). Al mismo tiempo, la actividad de 2MD sobre el transporte intestinal de calcio es aproximadamente igual que la de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Figura 2). Por lo tanto, estos datos demuestran que 2MD tiene actividad selectiva sobre el hueso.

40 2MD es casi tan activa como $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la unión al receptor de la vitamina D (Figura 1). Sin embargo, es entre 10 a 50 veces más activa que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en provocar la diferenciación del promielocito, HL-60, en el monocito (Figura 5). Este resultado sugiere que 2MD será muy eficaz en la psoriasis porque tiene actividad celular directa al provocar la diferenciación y la supresión del crecimiento. Esto también indica que tendrá actividad significativa como agente anticanceroso, especialmente contra la leucemia, neuroblastoma, retinoblastoma, melanoma, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata.

50 El resultado más importante, sin embargo, es que 2MD es extremadamente eficaz no sólo para restablecer la masa ósea de ratas hembra reproductoras viejas, ovariectomizadas como se muestra en las figuras 4 y 6 y en las Tablas 1 y 2, pero provoca un aumento en la masa ósea por encima de la de las referencias de operación simulada. Esto ilustra que 2MD es muy probable que tenga un efecto anabólico sobre el hueso o que aumente la formación ósea. Curiosamente, el aumento de masa ósea proporcionado por 2MD se traduce en un notable incremento en la resistencia ósea. Este aumento de resistencia a la fractura en el fémur presenta resistencia cortical, mientras que el aumento de la resistencia a las fracturas por aplastamiento de vértebras ilustra la resistencia ósea (esponjoso) trabecular (Tabla 2 y figuras 6A y 6B). Curiosamente, incluso el porcentaje de cenizas ha aumentado

inesperadamente más por 2MD. De gran importancia es que a los niveles de dosificación utilizados en este estudio, no hubo cambios en el calcio sérico en los animales que presentaban la marcada elevación de la masa ósea. Esto indica que existe un margen de seguridad entre el uso de 2MD para aumentar el contenido mineral óseo y la acción de 2MD en la elevación del calcio sérico.

- 5 Las pruebas preliminares de seguridad llevadas a cabo en dos ocasiones diferentes han puesto de manifiesto que las ratas hembras en una dieta de pienso rica en calcio toleran 35 pmol/día de 2MD sin elevar el calcio sérico, reduciendo el peso corporal o provocando mineralización del riñón (véanse las Figs. 7 a 9). Además, los estudios preliminares en monos Rhesus indican que los primates toleran 2MD extremadamente bien ya que una dosis igual a 29 µg de este compuesto se administró como una dosis única a un mono rhesus de 8 kg sin elevar apreciablemente la concentración de calcio sérico (Figura 10). Estas y otras pruebas indican que los primates tolerarán sumamente bien 2MD que puede dar un margen muy grande entre la eficacia y el peligro de hipercalcemia en el hombre.

- 10
- 15 Estos resultados ilustran que 2MD es un excelente candidato para una terapia contra la osteoporosis (tanto en la prevención como en el tratamiento) y que puede ser útil en numerosas otras circunstancias tales como enfermedades autoinmunitarias, el cáncer y la psoriasis. Los estudios descritos en las figuras 11 a 13 demuestran que 2MD también puede aumentar la masa ósea en ratas hembra normales (véase el apartado titulado: "CONSTRUCCIÓN DE LA MASA ÓSEA DE INDIVIDUOS NORMALES" más adelante).

Tabla 1

Tratamiento de ratas ovariectomizadas con 1,25-(OH) ₂ D ₃ y 2MD									
Grupo	Tratamiento	Duración del tratamiento (semanas)	DMO (g/cm ²)	BMC (g)	Peso corporal (g)	BMC/peso corporal (mg/g)	Ca sérico (mg/dl)	Cenizas del fémur (%)	Cenizas del fémur (mg)
Referencia OVX	Vehículo aceitoso/5x/semana	8	0,294±0,004	8,64±3,30	414±15	21,4±1,20	-	-	-
		17	0,296±0,003	9,34±0,50	422±19	22,3±1,69	-	-	-
		30	0,296±0,003	9,41±0,45	404±24	23,4±1,60	11,1±0,17	59,2±0,82	386±21,6
Operación simulada	Vehículo aceitoso/5x/semana	8	0,302±0,003	9,34±0,38	356±14	26,3±0,76			
		17	0,300±0,002	9,14±0,54	351±15	26,4±0,82			
		30	0,297±0,004	9,20±0,53	340±13	26,7±1,20	11,8±0,20	81,5±1,20	400±18,0
1,25-(OH) ₂ D ₃	250 pmol/d/5x/semana	8	0,297±0,001	8,90±0,40	399±9,3	22,4±0,48			
		17	0,308±0,008	9,6±0,39	394±11	24,5±0,87			
		30	0,310±0,007	10,1±0,30	392±16	26,1±0,97	11,4±0,21	60,8±1,1	417±23
1,25-(OH) ₂ D ₃	500 pmol/d/5x/semana 3x/semana x/semana	8	0,312±0,005	10,2±0,40	397±14,2	26,3±0,57			
		17	0,331±0,008	11,5±0,25	421±12,8	27,6±0,68			
		30	0,328±0,003	11,8±0,23	432±23,0	28,0±0,69	11,9±0,20	61,4±1,3	478±7,5
2MD	32 pmol/d/2x/semana	8	0,295±0,009	8,4±0,13	375±8,2	22,4±0,64			
		17	0,313±0,011	9,7±0,19	373±11,0	26,2±0,92			
		30	0,331±0,006	11,6±0,40	346±11,0	33,4±1,60	10,8±0,22	65,6±1,7	462±21,4
2MD	65 pmol/d/1x/semana	8	0,293±0,004	8,5±0,23	408±10,5	22,2±0,53			
		17	0,312±0,005	9,6±0,24	402±11,3	24,0±0,80			
		30	0,310±0,009	10,2±0,33	393±15,0	26,0±1,10	10,7±0,46	62,5±0,57	443±11,6
Todos los animales fueron ovariectomizados, excepto las referencias simulando operación. Los valores se expresan como media ± SEM.									

Tabla 2

Resistencia de fémures y vertebrados al estrés mecánico			
Grupo	Tratamiento	Valor de resistencia del fémur	Valor de resistencia de las vértebras
OVX de referencia	Vehículo aceitoso/5x/semana	109,31±19,60	14,26±3,58
Operación simulada	Vehículo aceitoso/5x/semana	121,36±12,5	13,67±1,79
1,25(OH)2D3	250 pmol/día/5x/semana	118,21±19,85	19,24±5,66
1,25(OH)2D3	500 pmol/día/3-5x/semana	116,47±16,20	17,14±0,52
2MD	32 pmol/día/2x/semana	134,84±14,12	23,93±6,59
2MD	65 pmol/día/1x/semana	133,71±14,06	17,07±5,73

Construcción de la masa ósea de individuos normales

Objetivo: Determinar si ratas hembra adultas jóvenes responden al agente anabólico, 2MD, al aumentar la DMO.

Diseño Experimental:

5 Animales

Se simuló que se operaba a todas las ratas Sprague-Dawley nulíparas de 7 meses, (Harlan Sprague-Dawley, Madison, WI) a los 7 meses de vida.

Dieta

- 10 A partir de su llegada a las instalaciones, las ratas se alimentaron con una dieta de roedores purificada ("Dieta 11"), preparada en la empresa (Suda *et al.*, 1970, *J. Nutr.*, 100:1049-1052) y que contiene 0,47% de calcio, 0,3% de fósforo y 1,6 UI de vitamina D₃/g. Para mantener pesos corporales constantes (seguimiento semanal), las ratas se alimentaron con una dieta total de 150 g/semana, es decir 21,5 g/día/rata.

Compuestos

Compuesto	Proveedor	Lote
Vehículo (Neobee M-5 Oil)	Spectrum, New Brunswick, NJ	SN0332
2MD	Tetronics, Madison, WI	010745111

Régimen de dosificación

Grupo	Dosis	Número de animales
SIMULADO + vehículo	Vehículo	10
SIMULADO + 2MD	2,5 ng/kg/día	9

- 15 Se administró dosis diarias a las ratas comenzando 5 a 6 semanas después de la intervención quirúrgica. Se administró aceite Neobee (vehículo) o 2MD a la parte posterior de la lengua en 100µl. Las concentraciones de la solución de dosificación se ajustaron mensualmente basándose en los pesos corporales promedios del grupo.

Análisis de calcio en suero

- 20 Antes de la dosis y 1, 2, 4, 6, 10, 11, 18 y 25 semanas después de la dosis, se extrajo sangre 24 h después de la dosis más reciente de la arteria de la cola de ratas anestesiadas con éter. El suero se diluyó en cloruro de lantano al 0,1% y la concentración de calcio se determinó por espectrometría de absorción atómica. Los valores mostrados son los promedios para todas las ratas e incluyen las desviaciones estándar.

Densidad mineral ósea (DMO). Determinaciones

Tanto la DMO corporal total como la DMO de las extremidades (fémur derecho distal y proximal) se determinaron por absorciometría de rayos X de doble energía (Lunar DPXα-Madison, WI; Small Animal Software versión 1.0e) en las semanas 0, 8, 16 y 24. La DMO de las extremidades se realizó tal como se describe (Haffa *et al.*, 2000, *J. Bone Min.. Res.* 15:872). Los valores mostrados son los promedios para todas las ratas e incluyen desviaciones estándar.

Resultados:

La DMO corporal total aumentó por encima de los animales con vehículo de referencia en ratas hembras adultas a las que se administró 2MD por vía oral (Figura 11). Este aumento se observó antes de ocho semanas y continuó durante 24 semanas. Los aumentos en la DMO del hueso esponjoso fueron los más pronunciados, con un aumento de 14% observado después de 24 semanas en ratas a las que se administró 2MD (Figura 12A). La DMO del hueso cortical también aumentó de manera similar a la observada en todo el cuerpo (figura 12B). Estos efectos positivos de 2MD ocurrieron en ausencia de cualquier cambio en el peso corporal (figura 13A) o cualquier cambio en el calcio sérico (figura 13B).

Conclusión:

2MD es obviamente eficaz para aumentar la masa ósea de ratas hembra sanas normales. Por "normal" se entiende un sujeto que no está afectado o no ha sido diagnosticado con una enfermedad ósea metabólica o cualquier otra enfermedad/trastorno que provoca una disminución a lo largo del tiempo de la masa ósea. Además, 2MD aumenta tanto el hueso esponjoso (14%) como el cortical (6%). Debido a que se ha demostrado anteriormente que 2MD actúa anabólicamente sobre el hueso, se cree que 2MD se puede utilizar para aumentar la masa ósea de niños, adolescentes, adultos jóvenes y/o adultos maduros normales sanos. Esto daría como resultado un esqueleto que sobreviviría a la pérdida de hueso del envejecimiento y la menopausia. En ese sentido, se puede utilizar como profilaxis o medida preventiva contra fracturas resultantes de la pérdida de hueso de enfermedades óseas metabólicas, especialmente la osteoporosis. Además de la osteoporosis, las circunstancias en las que podría utilizarse 2MD como un método de profilaxis incluyen el tratamiento de hembras con amenorrea. Además, 2MD podría utilizarse en pacientes normales cuando se desea masa ósea máxima, tales como los atletas. Se prevé que 2MD puede utilizarse para aumentar la masa ósea de los caballos especialmente caballos de carreras y en los astronautas que se preparan para un largo viaje en condiciones de ingravidez.

El compuesto 2MD se puede administrar por vía oral, tópica, parenteral o transdérmica. El compuesto 2MD se administra ventajosamente por inyección o por infusión intravenosa o soluciones estériles adecuadas, o en forma de dosis líquidas o sólidas por el canal alimenticio, o en forma de cremas, pomadas, parches, o vehículos similares adecuados para aplicaciones transdérmicas. Las dosis de desde aproximadamente 0,01 µg al día a alrededor de 100 µg al día, preferiblemente desde aproximadamente 0,1 µg al día a aproximadamente 10 µg al día de los compuestos 2MD apropiados para el tratamiento en los seres humanos, ajustándose dichas dosis según la enfermedad a prevenir o tratar, su gravedad y la respuesta del sujeto como se entiende bien en la técnica. Las dosis desde aproximadamente 0,0001 µg al día a aproximadamente 700 µg al día del compuesto 2MD son apropiadas para tratamiento en animales. Puesto que el compuesto presenta especificidad de acción, cada uno puede administrarse adecuadamente solo, o junto con dosis escalonadas de otro compuesto activo de vitamina D - p. ej., 1α-hidroxivitamina D₂ o D₃, o 1α,25-dihidroxivitamina D₃ - en situaciones en la que diferentes grados de diferenciación celular, la movilización mineral ósea y/o la estimulación del transporte de calcio se encuentra que es ventajoso.

Las composiciones para su utilización en la profilaxis mencionada anteriormente de los seres humanos o los animales destinados a mantener o aumentar la masa ósea o en otras aplicaciones tales como la psoriasis y otras enfermedades malignas comprenden una cantidad eficaz del compuesto 2-metilen-20(S)-19-nor-vitamina D como se define por la fórmula I anterior como el principio activo, y un vehículo adecuado. Una cantidad eficaz de dicho compuesto para su utilización de acuerdo con esta invención es de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 50 µg por gramo de composición, y puede administrarse por vía tópica, transdérmica, oral o parenteral en dosis de aproximadamente 0,01 µg al día a aproximadamente 100 µg al día en seres humanos, y preferiblemente de aproximadamente 0,1 µg al día a aproximadamente 10 mg al día en los seres humanos. En los animales, una cantidad eficaz de dicho compuesto para su utilización de acuerdo con esta invención es de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 50 µg por g de composición, y puede administrarse por vía tópica, transdérmica, oral o parenteral en dosis de aproximadamente 0,0001 µg al día a aproximadamente 700 µg al día.

El compuesto 2MD se puede formular en forma de cremas, lociones, pomadas, parches tópicos, píldoras, cápsulas o comprimidos, o en forma líquida como soluciones, emulsiones, dispersiones, o suspensiones en aceites o disolventes farmacéuticamente inocuos y aceptables, y dichas preparaciones pueden contener además otros componentes farmacéuticamente inocuos o beneficiosos, tales como estabilizantes, antioxidantes, emulsionantes, agentes colorantes, aglutinantes o agentes modificadores del sabor.

El compuesto 2MD se administra mejor en cantidades suficientes para efectuar la diferenciación de promielocitos a macrófagos normales, y/o en cantidades necesarias para prevenir la pérdida ósea, mantener la masa ósea o

aumentar la masa ósea. Las dosis descritas anteriormente son adecuadas, entendiéndose que las cantidades dadas deben ajustarse de acuerdo con la gravedad de la enfermedad, y la estado y respuesta del sujeto como es bien entendido en la técnica.

- 5 Las formulaciones de la presente invención comprenden un principio activo junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. El vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de las formulaciones y no ser perjudicial para el receptor de los mismos.

- 10 Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden estar en forma de unidades discretas como cápsulas, sobres, comprimidos o grageas, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del ingrediente activo; en forma de un polvo o gránulos; en forma de una solución o una suspensión en un líquido acuoso o líquido no acuoso, o en forma de una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite.

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

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral comprenden convenientemente una preparación oleosa o acuosa estéril del principio activo que es preferentemente isotónica con la sangre del receptor.

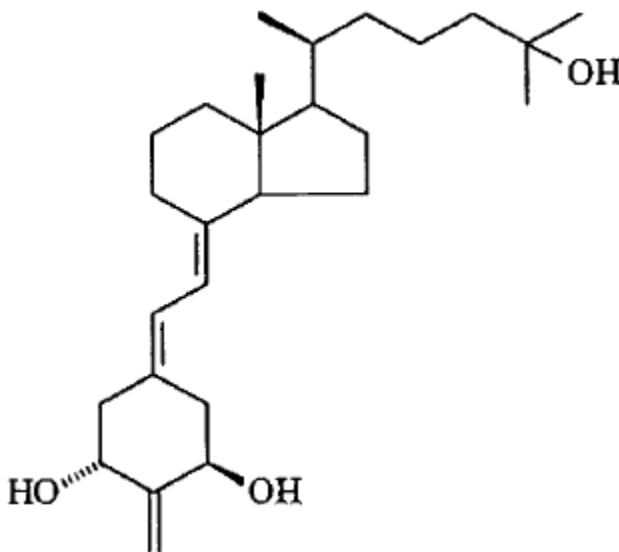
- 15 Las formulaciones adecuadas para inyectables comprenden una preparación oleosa o acuosa estéril, o una suspensión o conjugado del principio activo.

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

- 20 Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de unidad de dosificación y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por la expresión "unidad de dosificación" se entiende una dosis unitaria, es decir, una dosis única que es capaz de administrarse a un paciente como una dosis unitaria física y químicamente estable que comprende el principio activo como tal o una mezcla del mismo con diluyentes o vehículos farmacéuticos sólidos o líquidos.

REIVINDICACIONES

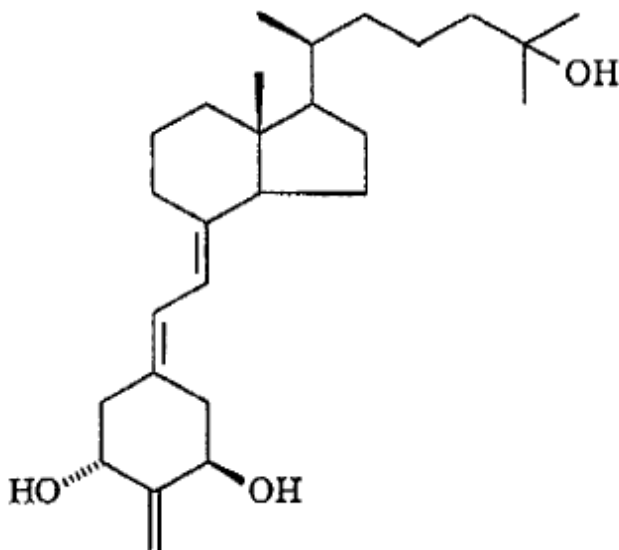
1. Un compuesto que es la 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ que tiene la fórmula:



para su utilización en profilaxis de una enfermedad caracterizada por la necesidad de aumentar la resistencia de los huesos.

5 2. Un compuesto para su utilización según la reivindicación 1, en el que la resistencia ósea es la resistencia cortical o la resistencia trabecular.

3. Un compuesto que es la 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ que tiene la fórmula:



10 para su utilización en la prevención del desarrollo o del retardo del comienzo de una enfermedad caracterizada por la necesidad de aumentar la resistencia de los huesos.

4. Un compuesto para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el dicha enfermedad se selecciona entre la osteoporosis y la osteomalacia.

5. Un compuesto para su utilización según la reivindicación 4, en el que la enfermedad es la osteoporosis de bajo recambio óseo, la osteoporosis producida por esteroides, la osteoporosis senil o la osteoporosis posmenopáusica.

15 6. Un compuesto que es la 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ para su utilización en la prevención de fracturas óseas.

7. Un compuesto para su utilización según la reivindicación 6, para la prevención de fracturas óseas en una mujer amenorreica, un astronauta o un atleta.
8. Un compuesto para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ es para ser administrada a una persona a una dosis de 0,01 μ g a 100 μ g al día.
- 5 9. Un compuesto para su utilización según la reivindicación 8, en el que la 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ es para ser administrada a una persona a una dosis de 0,1 μ g a 10 μ g al día.
10. Un compuesto para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ es para ser administrada a un animal a una dosis de 0,0001 μ g a 700 μ g al día.
- 10 11. Un compuesto para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ es para ser administrada por vía oral, parenteral o transdérmica.

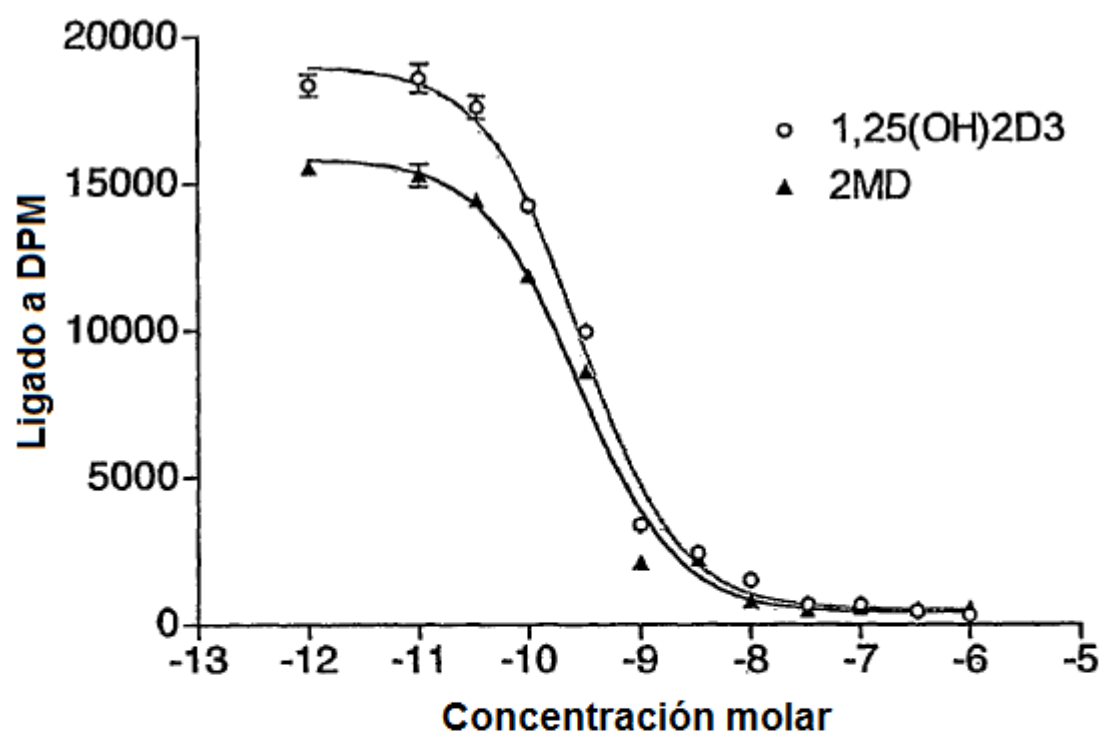


Figura 1

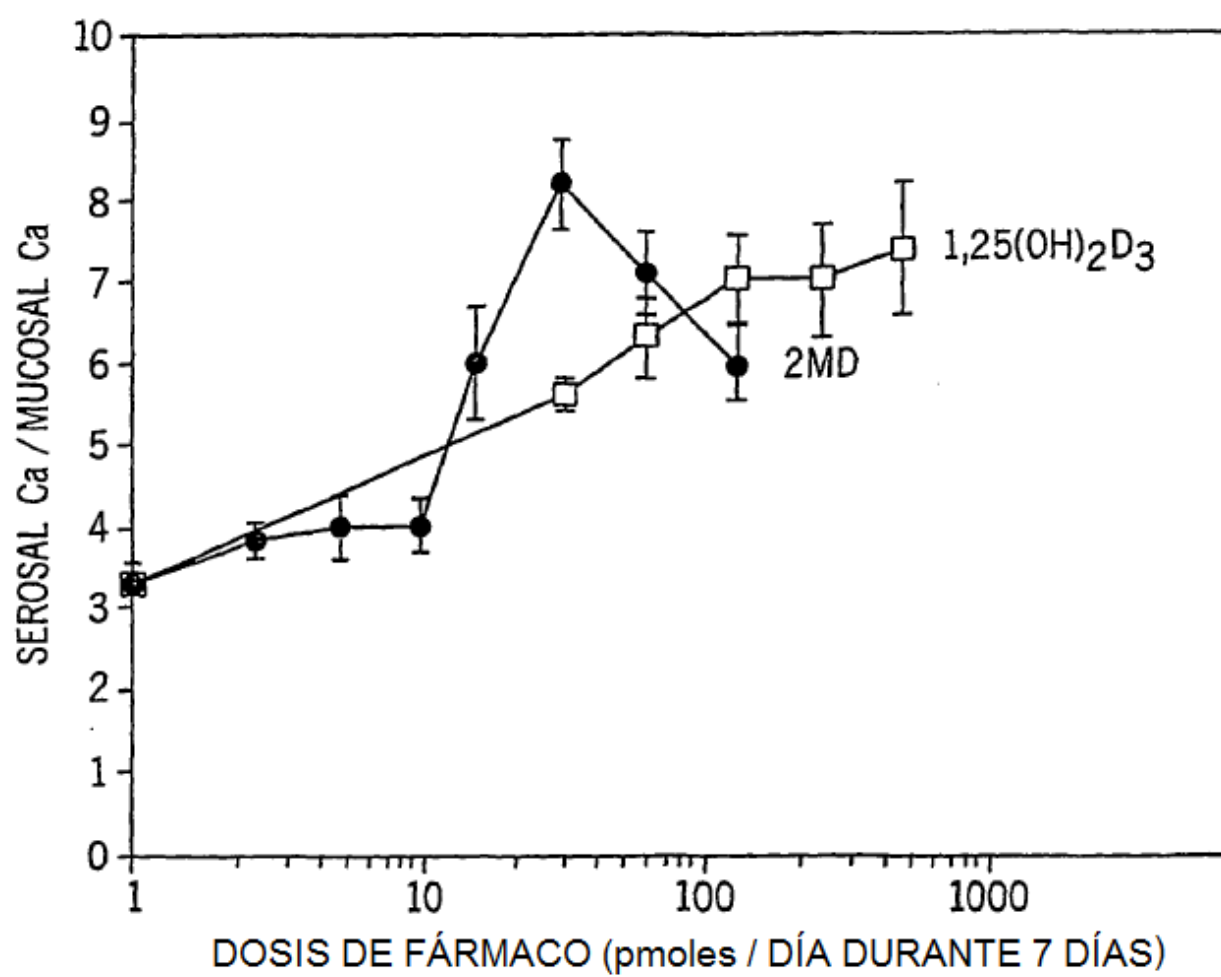


Figura 2

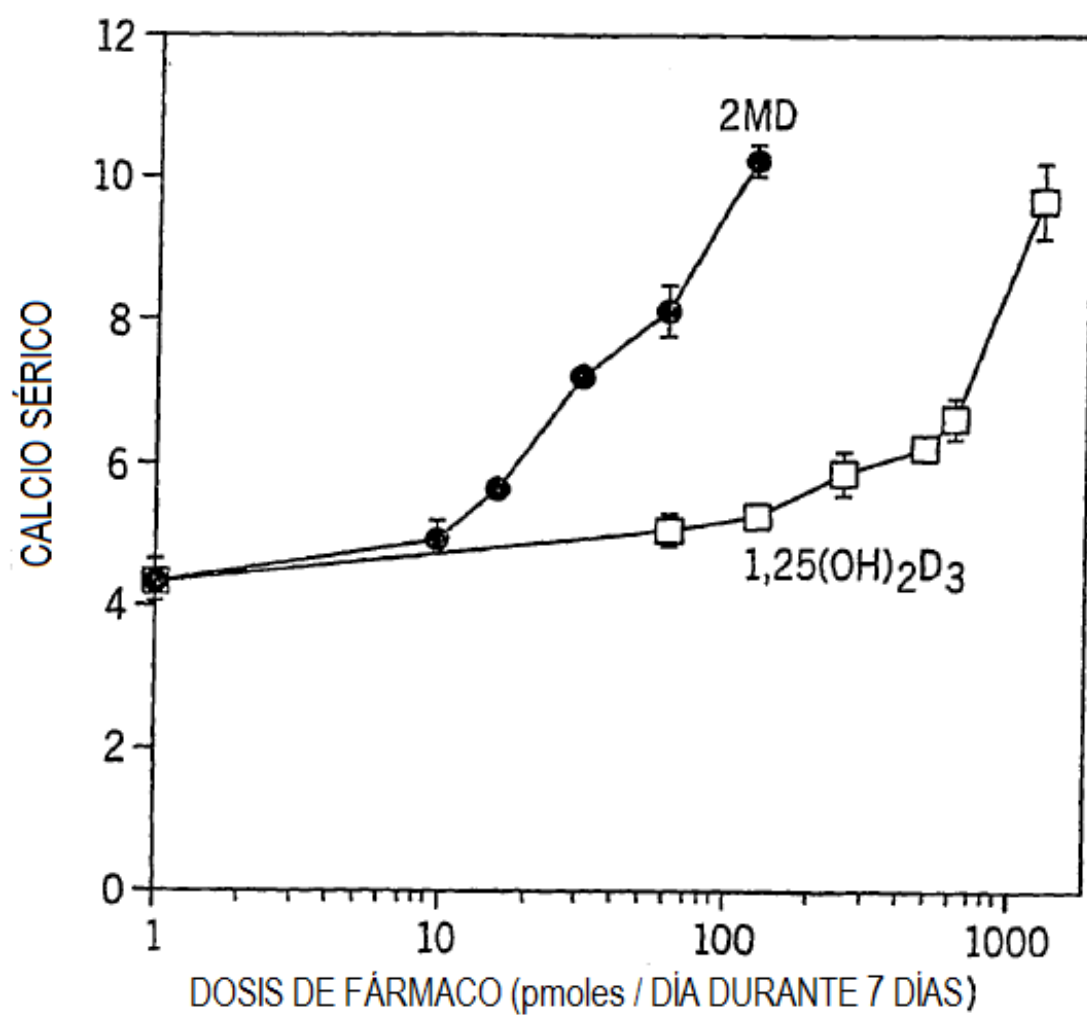


Figura 3

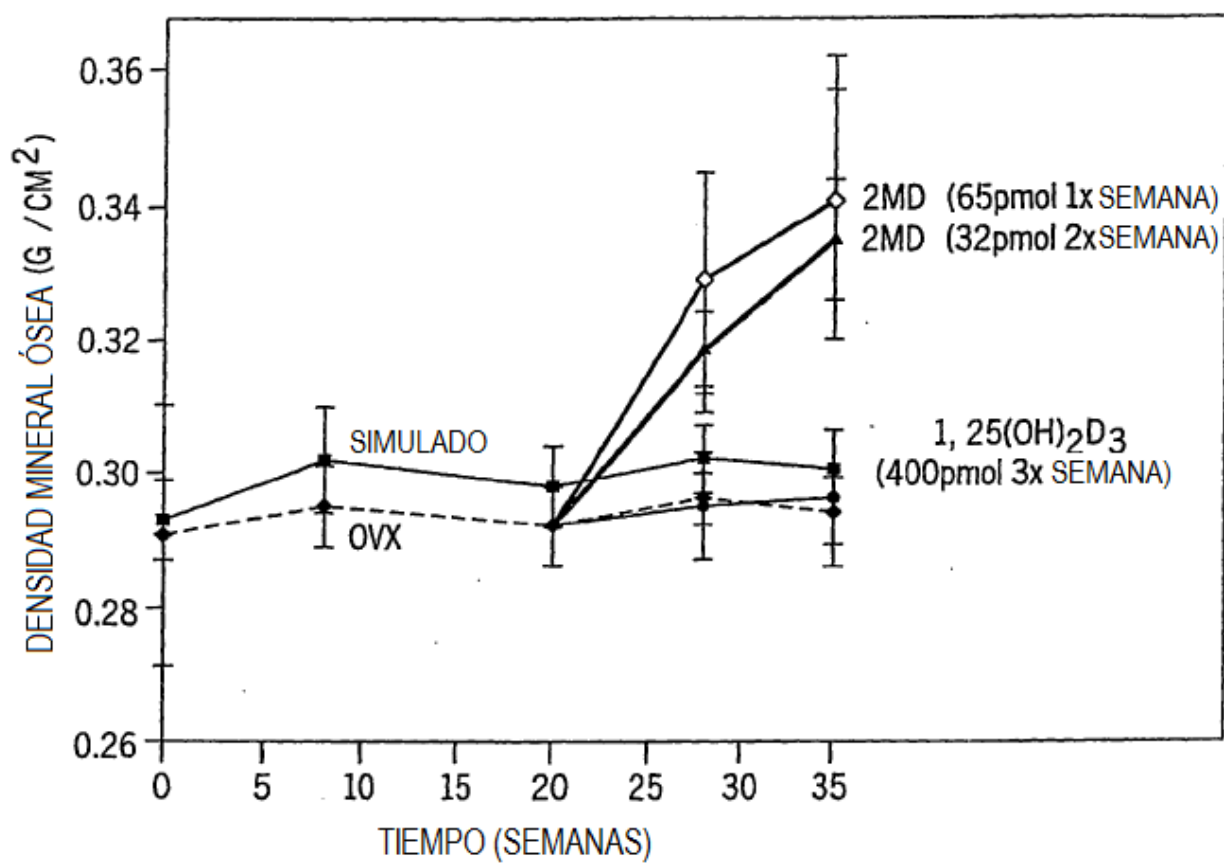


Figura 4

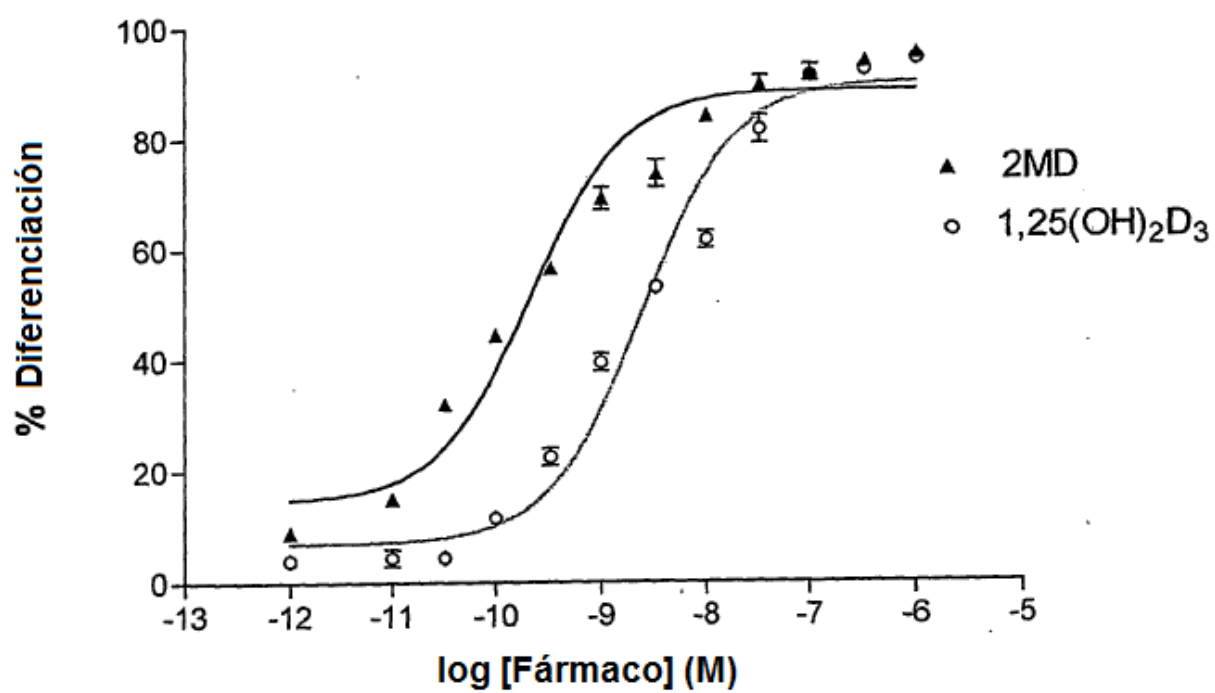


Figura 5

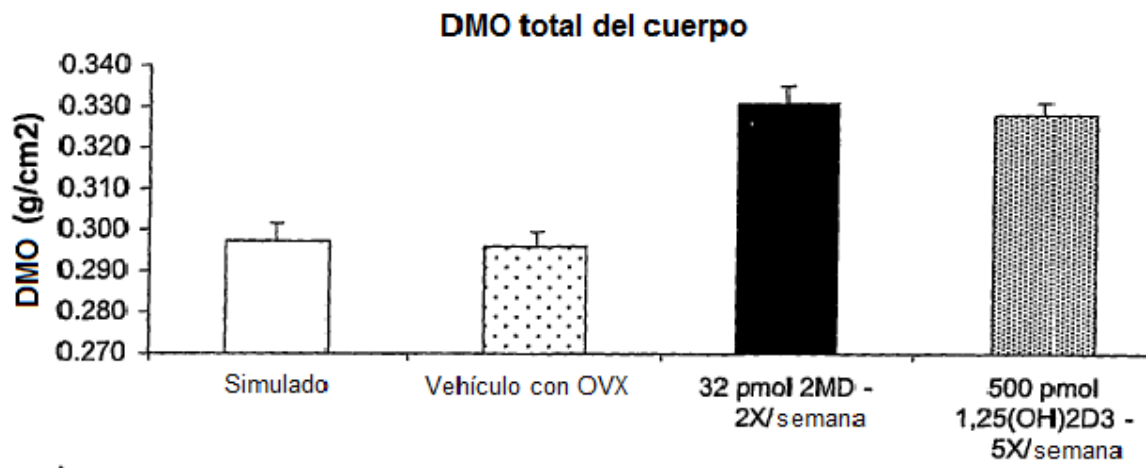


Figura 6A

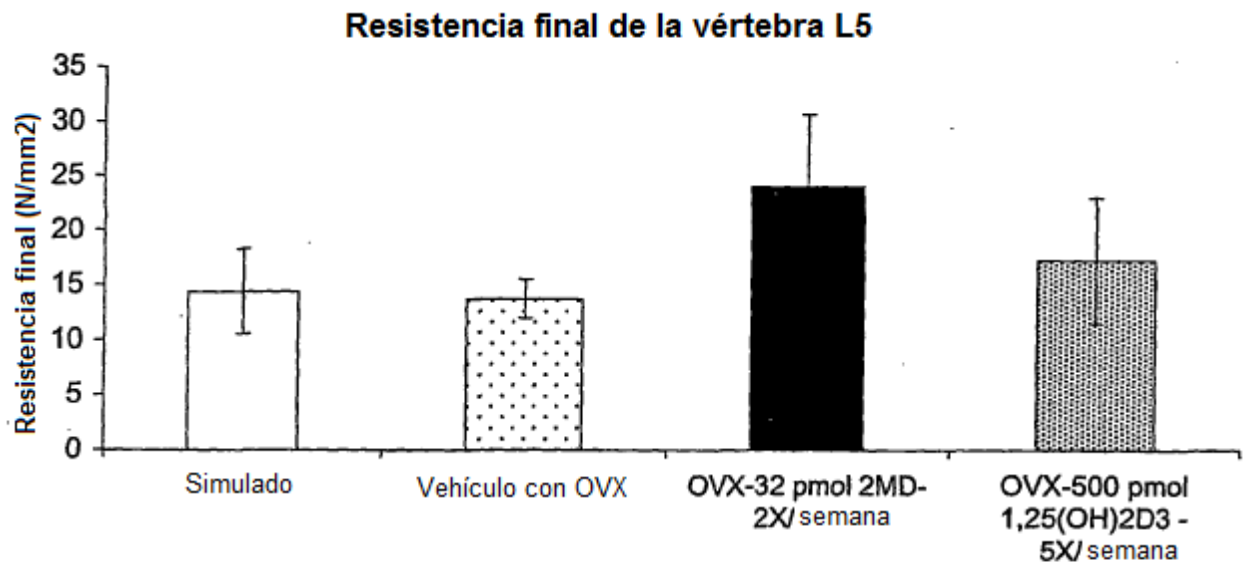


Figura 6B

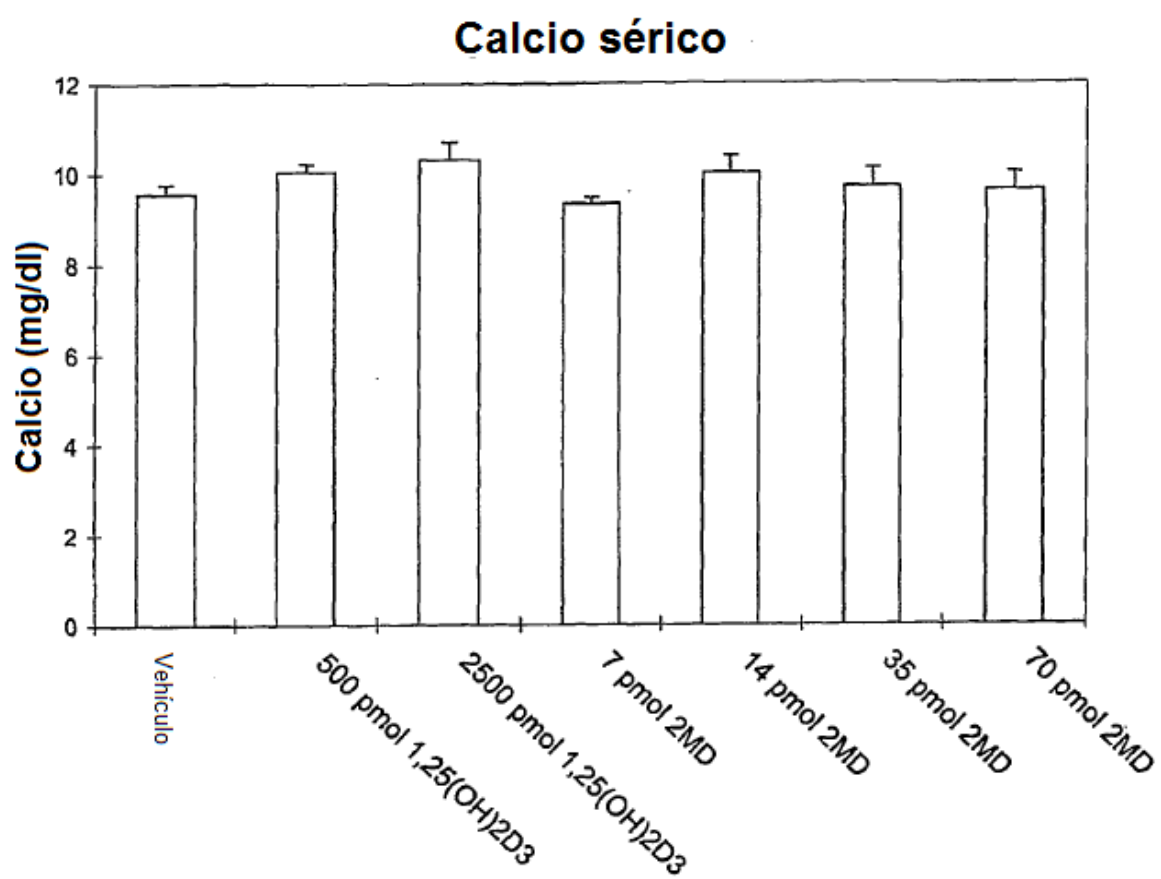


Figura 7

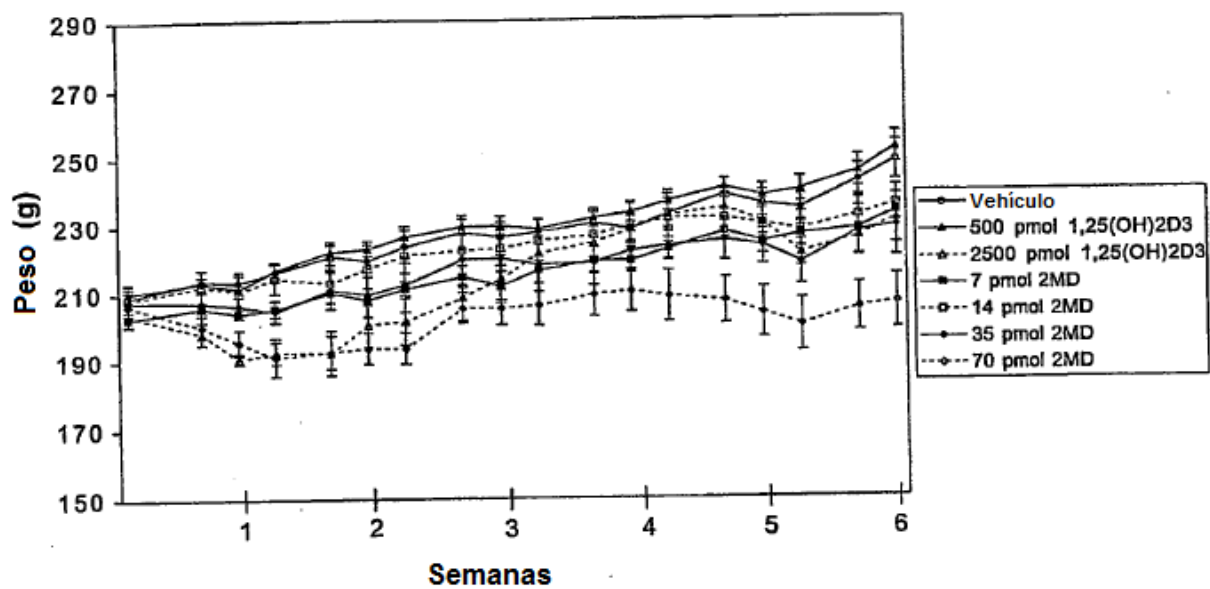


Figura 8

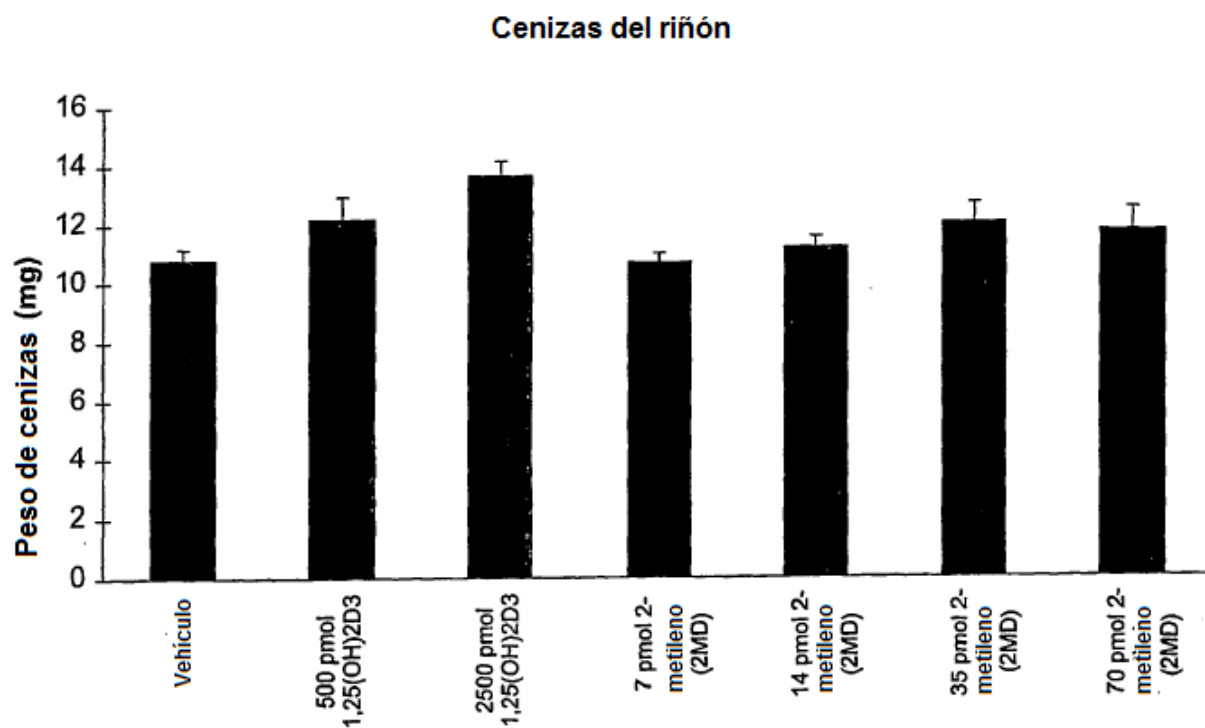


Figura 9

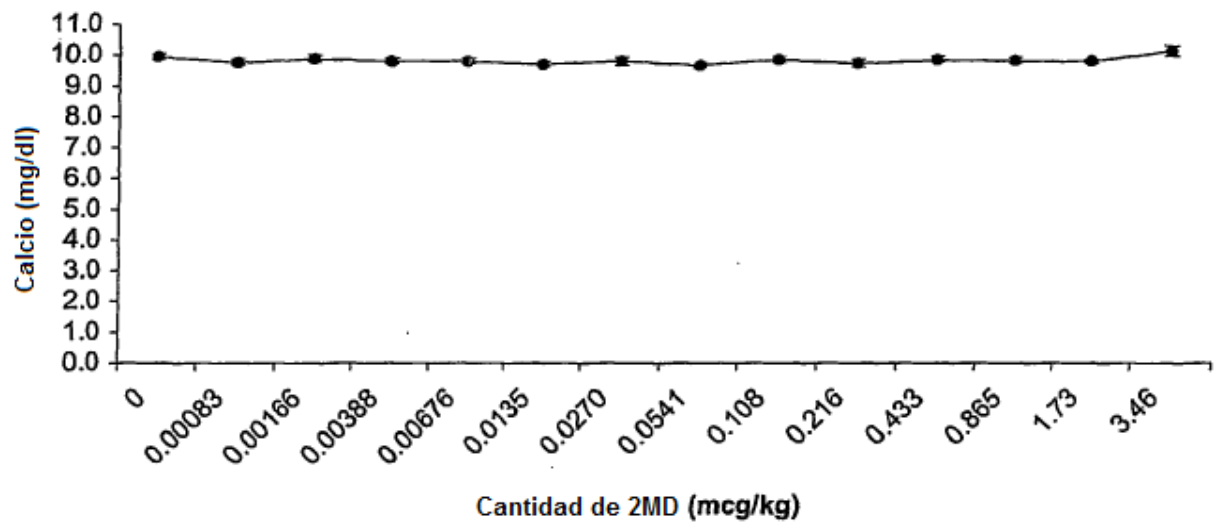


Figura 10

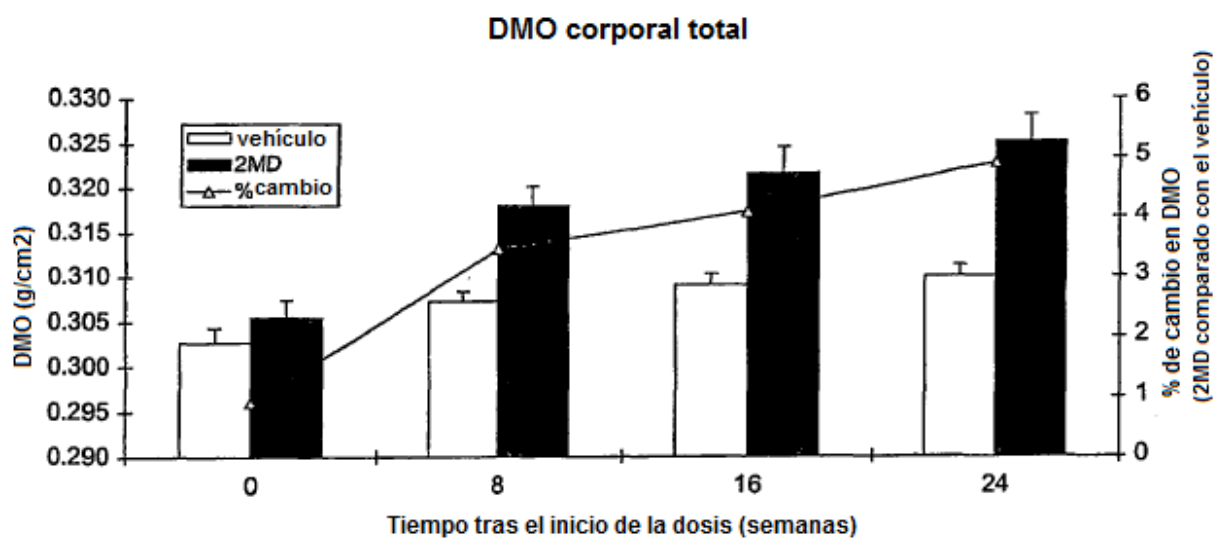


Figura 11

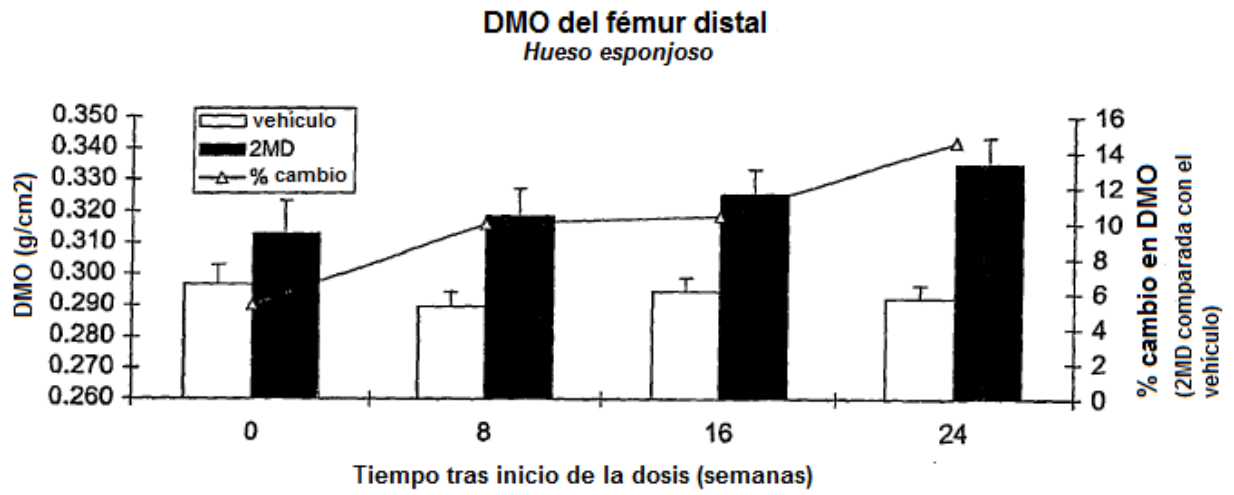


Figura 12A

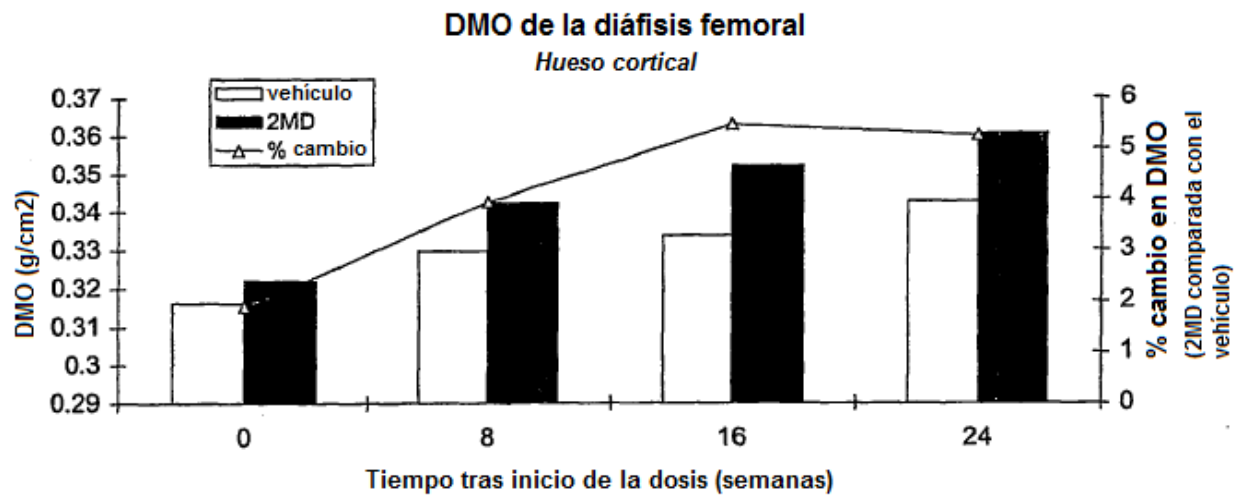


Figura 12B

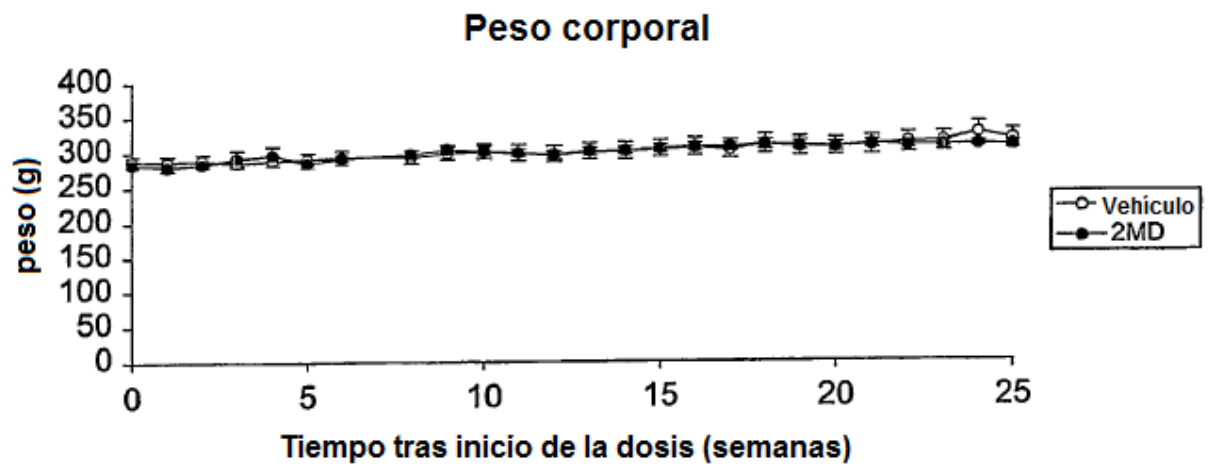


Figura 13A

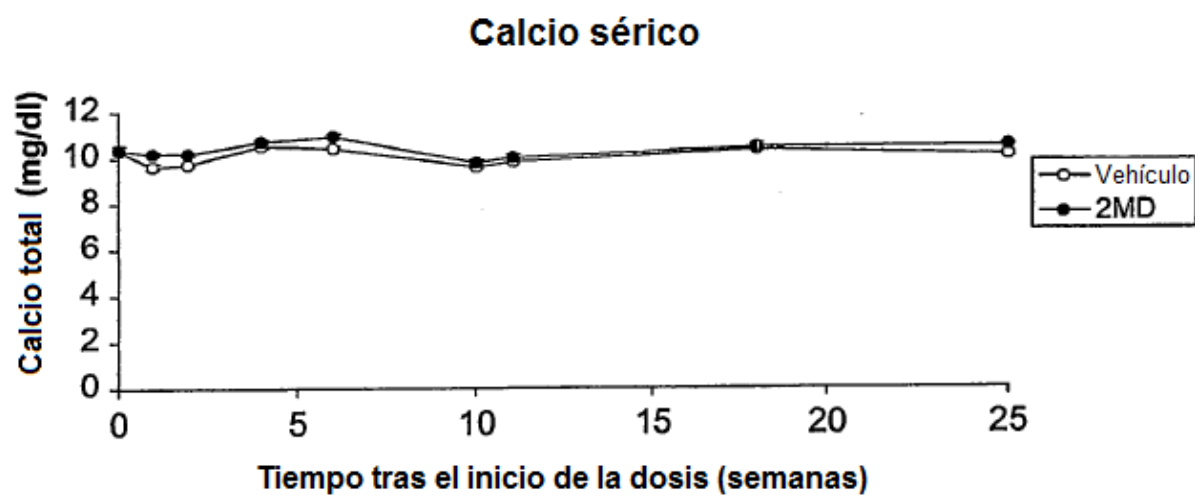


Figura 13B