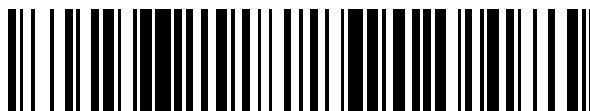


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 061**

51 Int. Cl.:

A61K 31/569 (2006.01)

C07C 401/00 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2006 E 06720601 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 1853274**

54 Título: **2-Metileno-19-nor-(20S-24S)-1-alfa,25-dihidroxivitamina-D2**

30 Prioridad:

11.02.2005 US 652473 P

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

23.05.2013

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)**

**POST OFFICE BOX 7365
MADISON, WI 53707-7365, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 404 061 T3

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

DESCRIPCIÓN

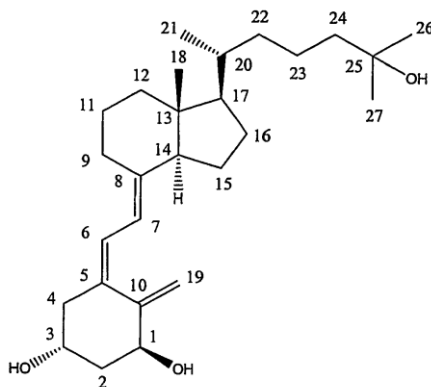
2-Metileno-19-nor-(20S-24S)-1-alfa,25-dihidroxitamina-D2

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a compuestos de vitamina D, y más particularmente a 2-metileno-19-nor-(20S-24S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₂ y a las formulaciones farmacéuticas que incluyen este compuesto. La invención también se refiere a el uso de 2-metileno-19-nor-(20S-24S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₂ o sales de la misma en la preparación de medicamentos para uso en el tratamiento de diversas enfermedades.

Antecedentes de la invención

10 La hormona natural, 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (también conocida como 1 α ,25-dihidroxicolecalciferol y calcitriol) y su análogo en la serie del ergosterol, es decir la 1 α ,25-dihidroxitamina D₂, son conocidas por ser reguladores muy potentes de la homeostasis del calcio en animales y seres humanos, y su actividad en la diferenciación celular se ha establecido también, Ostrem *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 2610 (1987). Se han preparado y probado muchos análogos estructurales de estos metabolitos, incluyendo la 1 α -hidroxivitamina D₃, 1 α -hidroxivitamina D₂,
15 varias vitaminas homologadas de cadena lateral y análogos fluorados. Algunos de estos compuestos muestran una separación interesante de las actividades de diferenciación celular y de regulación del calcio. Esta diferencia en actividad puede ser útil en el tratamiento de una variedad de enfermedades como la osteodistrofia renal, raquitismo resistente a la vitamina D, osteoporosis, psoriasis, y ciertos tumores malignos. La estructura de la 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ y el sistema de numeración usado para indicar los átomos de carbono en este compuesto se muestran a continuación.



20

1 α ,25-Dihidroxitamina D₃ = 1 α ,25-dihidroxicolecalciferol = calcitriol

Otra clase de análogos de la vitamina D, o sea los compuestos denominados 19-nor-vitamina D, se caracteriza por la sustitución del grupo metileno exocíclico en el anillo A (carbono 19), típico del sistema de la vitamina D, con dos átomos de hidrógeno. Las pruebas biológicas de dichos análogos 19-nor (por ejemplo, 1 α ,25-dihidroxi-19-nor-vitamina D₃) revelaron un perfil de actividad selectiva con elevada potencia para inducir la diferenciación celular, y muy baja actividad de movilización de calcio. Así, estos compuestos son útiles como agentes terapéuticos potencialmente para el tratamiento de tumores malignos, o el tratamiento de diversos trastornos cutáneos. Se han descrito dos métodos de síntesis diferentes de dichos 19-nor análogos de la vitamina D (Perlman *et al. Tetrahedron Lett.* 31, 1823 (1990), Perlman *et al. Tetrahedron Lett.* 32,7663 (1991), y DeLuca *et al.*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.086.191).

25

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

35

Se han sintetizado también varios análogos de la 1 α ,25-dihidroxi-19-nor-vitamina D₃ 2-sustituidos, es decir compuestos sustituidos en la posición 2 con grupos hidroxilo o alcoxi (DeLuca *et al.*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.536.713), con grupos 2-alquilo (DeLuca *et al.*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.945.410), y con grupos 2-alquilideno (DeLuca *et al.*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.843.928), que exhiben perfiles de actividad interesantes y selectivos. Todos estos estudios indican que los lugares de unión en los receptores de la vitamina D pueden acomodar diferentes sustituyentes en C-2 en los análogos de vitamina D sintetizados.

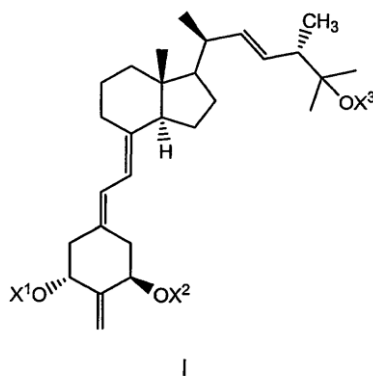
40

En un esfuerzo continuo para explorar la clase 19-nor de compuestos de vitamina D farmacológicamente importantes, se han sintetizado y probado también 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 acortada unida al carbono 20 (C-20). El 1 α -hidroxi-2-metileno-19nor-pregnacalciferol se describe en el documento de patente de Estados Unidos N^o 6.566.352 mientras que el 1 α -hidroxi-2-metileno-19nor-(20S)-homopregnacalciferol se describe en el documento de patente de Estados Unidos N^o 6.579.861 y el 1 α -hidroxi-2-metileno-19nor-bishomopregnacalciferol se describe en el documento de patente de Estados Unidos N^o 6.627.622. Todos estos tres compuestos tienen actividad de unión relativamente alta a los receptores de la vitamina D y actividad de diferenciación celular relativamente alta, pero poca o ninguna actividad calcémica comparados con la 1 α ,25-dihidroxitamina D₃. Sus actividades biológicas hacen que estos compuestos sean excelentes candidatos para una variedad de usos farmacéuticos, como se establece en las patentes 6.566.352, 6.579 861 y 6.627622.

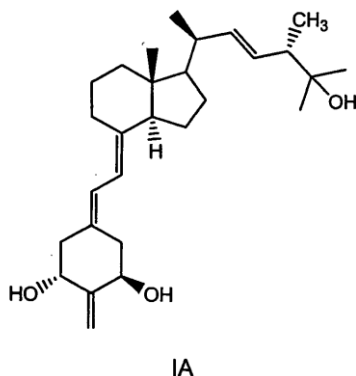
Compendio de la invención

La invención proporciona 2-metileno-19-nor-(20S-24S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₂, formulaciones farmacéuticas que incluyen 2-metileno-19-nor-(20S-24S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₂, y el uso de este compuesto en la preparación de medicamentos para uso en el tratamiento de diversos estados de enfermedad.

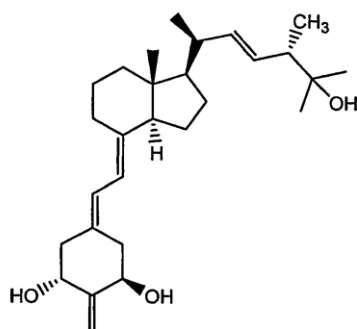
Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula I que se muestra a continuación



donde X¹, X², y X³ pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre H o grupos protectores de hidroxilo. En algunas realizaciones, X¹ y X² son ambos grupos protectores de hidroxilo tales como grupos sililo. En Tales realizaciones, X¹ y X² son ambos grupos t-butildimetilsililo. En otras realizaciones, X¹, X², y X³ son todos H tal que el compuesto es la 2-metileno-19-nor-(20S-24S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₂ que tiene la fórmula IA como se muestra a continuación:



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



IB

El compuesto anterior muestra un modelo deseado, y altamente ventajoso, de actividad biológica. Este compuesto se caracteriza por la unión relativamente elevada a los receptores de la vitamina D, en comparación con la de la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 , y actividad similar en el transporte de calcio intestinal. El compuesto anterior es comparable a la $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 en su capacidad de movilizar calcio desde el hueso. Por lo tanto, este compuesto puede caracterizarse por tener alguna actividad calcémica. Por lo tanto, puede ser útil como terapia para la supresión de hiperparatiroidismo secundaria de la osteodistrofia renal y para el tratamiento de otros trastornos de desequilibrio de calcio tales como la osteopenia.

El compuesto de la invención es también especialmente adecuado para el tratamiento y profilaxis de trastornos en seres humanos que se caracterizan por un desequilibrio en el sistema inmune, por ejemplo, en enfermedades autoinmunes, incluyendo la esclerosis múltiple, lupus, diabetes melitus, reacción del injerto contra el hospedante, y rechazo de los trasplantes de órganos, y adicionalmente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como la artritis reumatoide, asma, y enfermedades inflamatorias del intestino tales como la enfermedad celíaca, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. El acné, la alopecia y la hipertensión son otros trastornos que pueden ser tratados con el compuesto de la invención.

El compuesto anterior también se caracteriza por tener una actividad relativamente buena de diferenciación celular. Así, este compuesto también proporciona un agente terapéutico para el tratamiento de la soriasis, o como un anti-cáncer, especialmente contra la leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata. Además, debido a su actividad de diferenciación celular relativamente buena, este compuesto proporciona un agente terapéutico para el tratamiento de diversas afecciones cutáneas incluyendo las arrugas, ausencia de hidratación dérmica adecuada, es decir, piel seca, falta de firmeza cutánea adecuada, es decir, piel suelta, y secreción insuficiente de sebo. El uso de este compuesto no sólo produce la hidratación de la piel sino que también mejora la función de barrera de la piel.

Los compuestos de la invención pueden ser utilizados para la preparación de formulaciones farmacéuticas o medicamentos que incluyan un compuesto de la invención en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas formulaciones farmacéuticas y medicamentos se pueden usar para tratar diversos trastornos biológicos tales como los descritos en este documento. Métodos para tratar tales trastornos típicamente incluyen la administración de una cantidad eficaz del compuesto o una cantidad adecuada de una formulación farmacéutica o un medicamento que incluye el compuesto a un sujeto que padece el trastorno biológico. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas de tales realizaciones, el mamífero se selecciona entre un roedor, primate, bovino, equino, canino, felino, ursino, porcino, conejo, o una cobaya. En algunas de tales realizaciones, el mamífero es una rata o un ratón. En algunas realizaciones, el sujeto es un primate tal como, en algunas realizaciones, un ser humano.

El compuesto puede estar presente en una composición para el tratamiento de las enfermedades y trastornos anteriormente indicados en una cantidad de aproximadamente $0,01 \mu\text{g/g}$ a aproximadamente 1 mg/g de la composición, preferiblemente de aproximadamente $0,1 \mu\text{g/g}$ a aproximadamente $500 \mu\text{g/g}$ de la composición, y puede administrarse por vía tópica, transdérmica, oral, o parenteral en dosificaciones de aproximadamente $0,01 \mu\text{g/día}$ a aproximadamente 1 mg/día , preferiblemente de aproximadamente $0,1 \mu\text{g/día}$ a aproximadamente $500 \mu\text{g/día}$.

Otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y los dibujos siguientes.

40 Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1-5 ilustran diversas actividades biológicas de 2-metileno-19-nor-(20S-24S)- $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_2 (conocida como "(20S/24S) 2-MD₂" en las figuras), en comparación con las de la hormona natural $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 (mencionado como " $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ " en las figuras).

La Figura 1 es un gráfico que compara la actividad relativa de (20S/24S) 2-MD₂ y $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ para competir por la unión al receptor de longitud completa recombinante de la vitamina D de la rata con [³H] $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

La Figura 2 es un gráfico que compara el porcentaje de diferenciación de las células HL-60 como función de la concentración de (20S/24S) 2-MD₂ con el de la concentración de 1,25(OH)₂D₃.

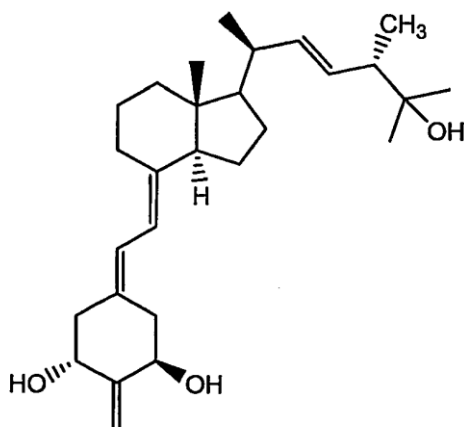
La Figura 3 es un gráfico que compara la actividad de transcripción *in vitro* de (20S/24S) 2-MD₂ con la de 1,25(OH)₂D₃.

- 5 La Figura 4 es un gráfico de barras que compara la actividad de movilización del calcio óseo de (20S/24S) 2-MD₂ con la de 1,25(OH)₂D₃.

La Figura 5 es un gráfico de barras que compara la actividad del transporte intestinal de calcio de (20S/24S) 2-MD₂ con la de 1,25(OH)₂D₃.

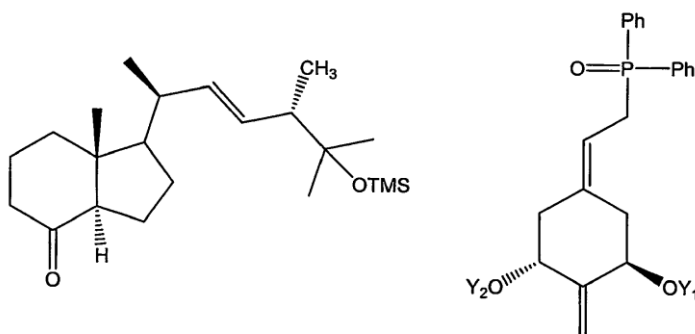
Descripción detallada de la invención

- 10 Se sintetizó, y probó, 2-metileno-19-nor-(20S-24S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₂, y se ha encontrado que es útil en el tratamiento de una variedad de condiciones biológicas como se describe en este documento. Estructuralmente, este compuesto tiene la fórmula IA que se muestra a continuación:



IA

- 15 La preparación de 2-metileno-19-nor-(20S-24S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₂ puede llevarse a cabo por condensación de una cetona bicíclica tipo Windaus-Grundmann (II) apropiada con el óxido de fosfina alílico III seguido de la desprotección (eliminación de los grupos Y₁ e Y₂).



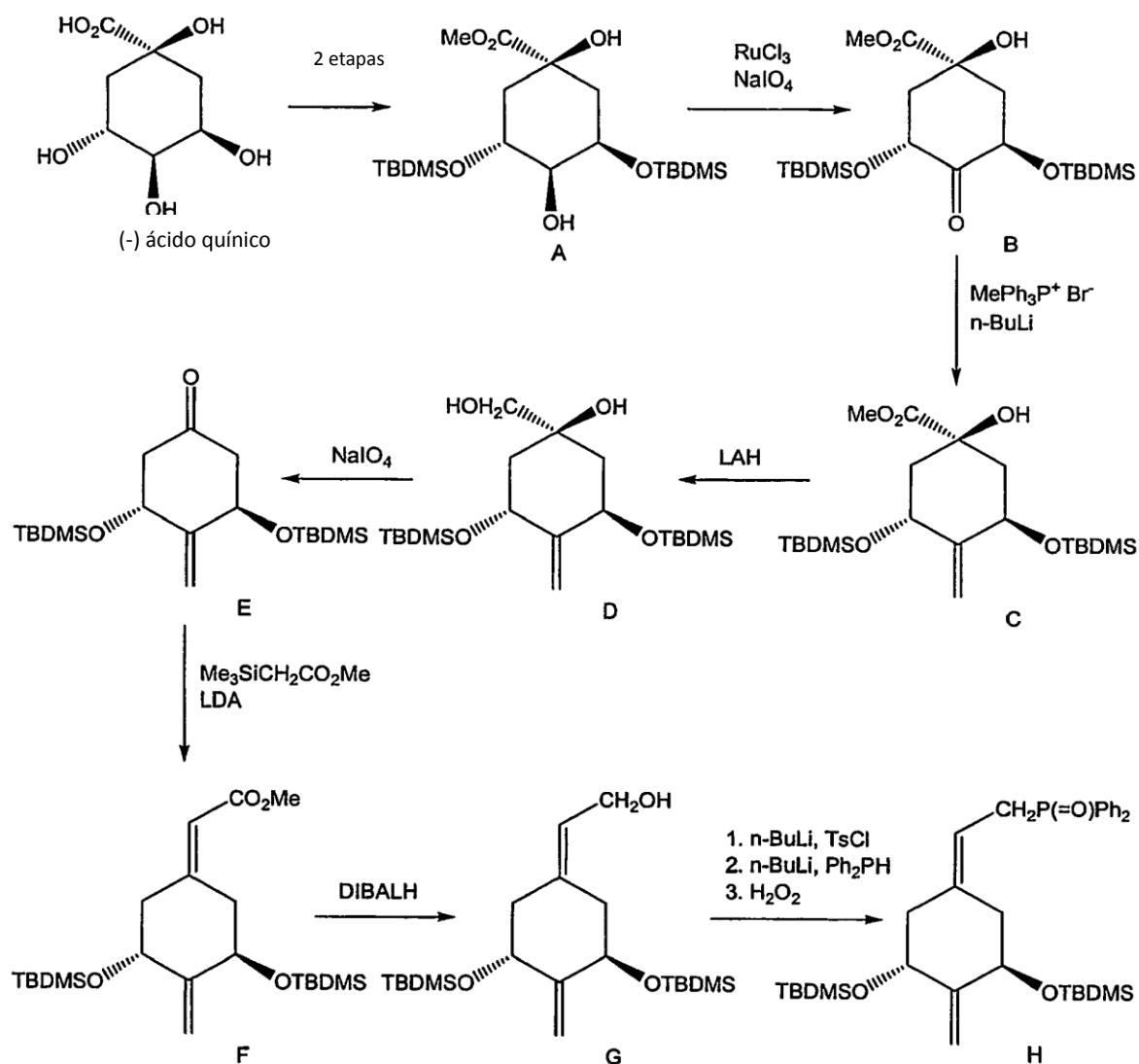
II

III

- 20 En el óxido de fosfina III, Y₁ e Y₂ son preferiblemente grupos protectores de hidroxilo, tales como grupos protectores de sililo. El t-butildimetilsililo (TBDMS) es un ejemplo de un grupo protector de hidroxilo particularmente útil. El proceso descrito anteriormente representa una aplicación del concepto de síntesis convergente, que ha sido efectivamente aplicado a la preparación de numerosos compuestos de la vitamina D (véase Lythgoe *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 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.*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.086.191; Deluca *et al.*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.536.713, y DeLuca *et al.*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.843.928.
- 25

El óxido de fosfina III es un reactivo conveniente que puede ser usado para preparar gran número de compuestos 19-nor de vitamina D y se puede preparar según los procedimientos descritos por Sicinski *et al.*, *J. Med. Chem.*, 41, 4662 (1998), DeLuca *et al.*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.843.928, Periman *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 32,7663 (1991), y DeLuca *et al.*, documento de patente de Estados Unidos N° 5.086.191. El esquema I muestra el procedimiento general para sintetizar el óxido de fosfina III como se describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.843.928. La modificación del método mostrada en el Esquema I se puede usar para producir un gran número de análogos de vitamina D como será evidente para los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden utilizarse una amplia variedad de compuestos de fosonio en lugar de $\text{MePh}_3\text{P}^+ \text{Br}^-$ usado para convertir la cetona B al alqueno C. Ejemplos de tales compuestos incluyen $\text{EtPh}_3\text{P}^+ \text{Br}^-$, $\text{PrPh}_3\text{P}^+ \text{Br}^-$, y compuestos preparados en general por reacción de la trifenilfosfina con un haluro de alquilo, un haluro de alquenilo, un haluro de hidroxialquilo protegido, y un haluro de hidroxialquenilo protegido. Los alquenos preparados usando este procedimiento después pueden llevarse a través de la preparación de óxido de fosfina de un modo análogo al usado para preparar el óxido de fosfina H en el Esquema I. Alternativamente, un alqueno análogo al compuesto C del Esquema I se puede reducir con $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$ e H_2 para proporcionar otros análogos de la vitamina D. Véase el documento de patente de Estados Unidos N° 5.945.410 y Sicinski, RR *et al.*, *J. Med. Chem.*, 41, 4662-4674 (1998). Por lo tanto, el procedimiento para formar el óxido de fosfina mostrado en el Esquema I se puede usar para preparar una gran variedad de análogos de la vitamina D además del compuesto de la presente invención.

Esquema 1



20 Pueden prepararse hidraindanonas de estructura II con métodos conocidos o métodos adaptados como será fácilmente evidente para un experto en la técnica y como está descrito en este documento. Ejemplos específicos de algunas cetonas bicíclicas importantes usadas para sintetizar análogos de la vitamina D son las descritas en Mincione *et al.*, *Synth Commun* 19, 723, (1989); y Peterson *et al.*, *J. Org. Chem.* 51, 1948 (1986).

Un procedimiento general para la síntesis de compuestos de 2-alquilideno-19-nor-vitamina D se ilustra y describe en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.843.928.

Tal como se utiliza en este documento, el término "grupo protector de hidroxilo" significa cualquier grupo usado habitualmente para la protección temporal del grupo funcional hidroxilo (-OH), tales como, alcoxicarbonilo, acilo, alquilsililo o grupos alquilarilsililo (en adelante denominado simplemente como "grupos sililo"), y grupos alcoxilquilo. Grupos protectores alcoxicarbonilo son los grupos alquilo-O-CO-ales como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxicarbonilo, isopropoxicarbonilo, butoxicarbonilo, isobutoxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo o aliloxicarbonilo. El término "acilo" significa un grupo alcanoilo de 1 a 6 carbonos, en todas sus formas isómeras, o un grupo carboxialcanoilo de 1 a 6 carbonos, tal como un grupo oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, o un grupo acilo aromático tal como benzoilo, o un grupo benzoilo sustituido con halo, nitro o alquilo. Grupos protectores alcoxilquilo son grupos tales como metoximetilo, etoximetilo, metoxietoximetilo, o tetrahidrofuranilo y tetrahidropiranilo. Grupos protectores de sililo preferidos son trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, dibutilmetilsililo, difenildimetilsililo, fenildimetilsililo, difenil-t-butilsililo y radicales sililo análogos alquilados. El término "arilo" especifica un fenilo, o un grupo fenilo alquil-, nitro- o halo-sustituido. Una extensa lista de grupos protectores para la funcionalidad hidroxilo puede encontrarse en *Protective Groups in Organic Synthesis*, Greene, TW, Wuts, PGM, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, (3ª Edición, 1999) que pueden añadirse o eliminarse utilizando los procedimientos presentados en este libro.

Un grupo "hidroxilo protegido" es un grupo hidroxilo protegido o derivatizado con cualquiera de los grupos anteriores habitualmente usados para la protección temporal o permanente de grupos funcionales hidroxilo, por ejemplo, los grupos sililo, alcoxilquilo, acilo o alcoxicarbonilo, como se definió previamente.

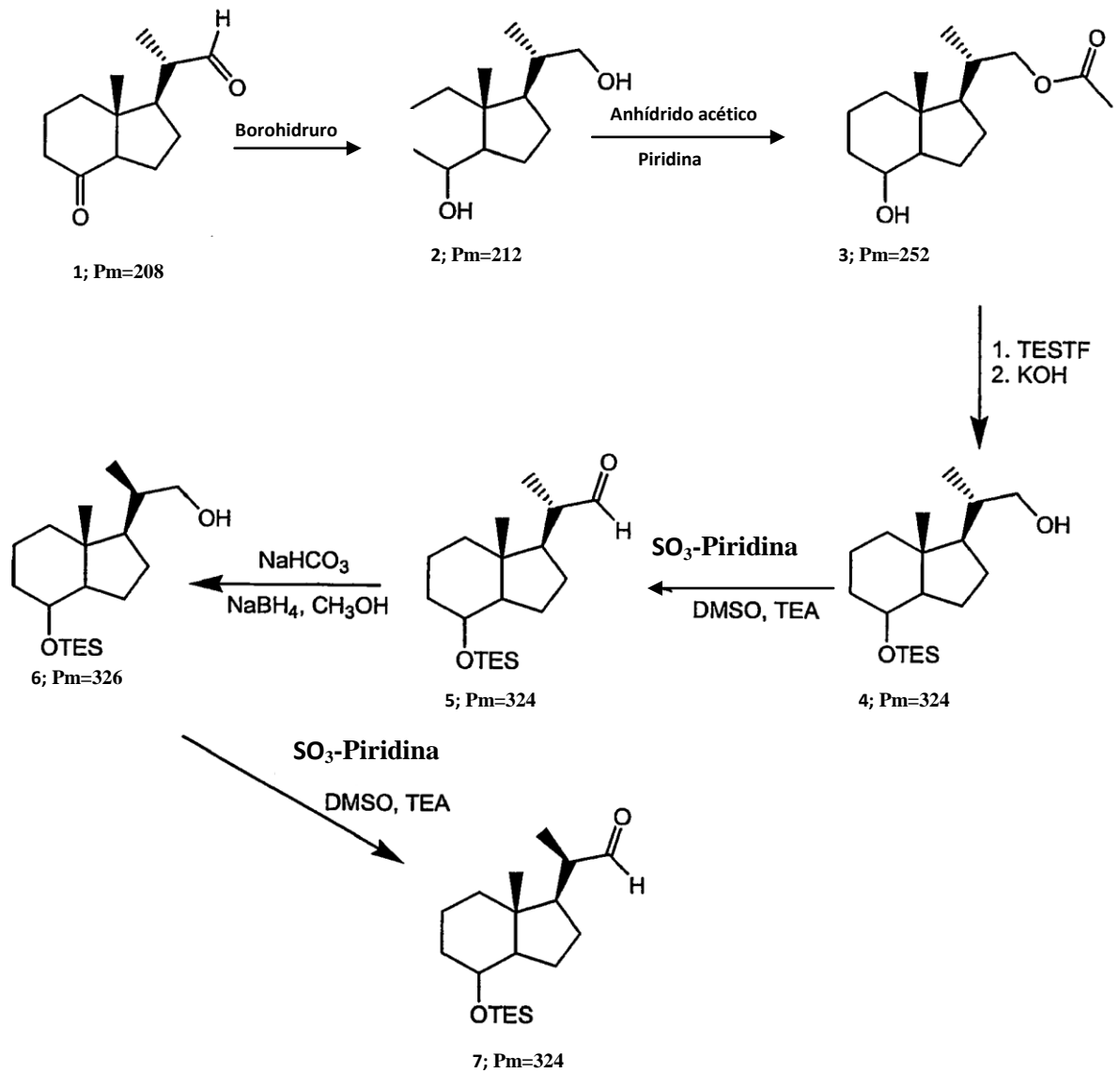
Ejemplos

Síntesis de 2-metileno-19-nor-(20S-24S)-1 α ,25-dihidroxxvitamina D₂

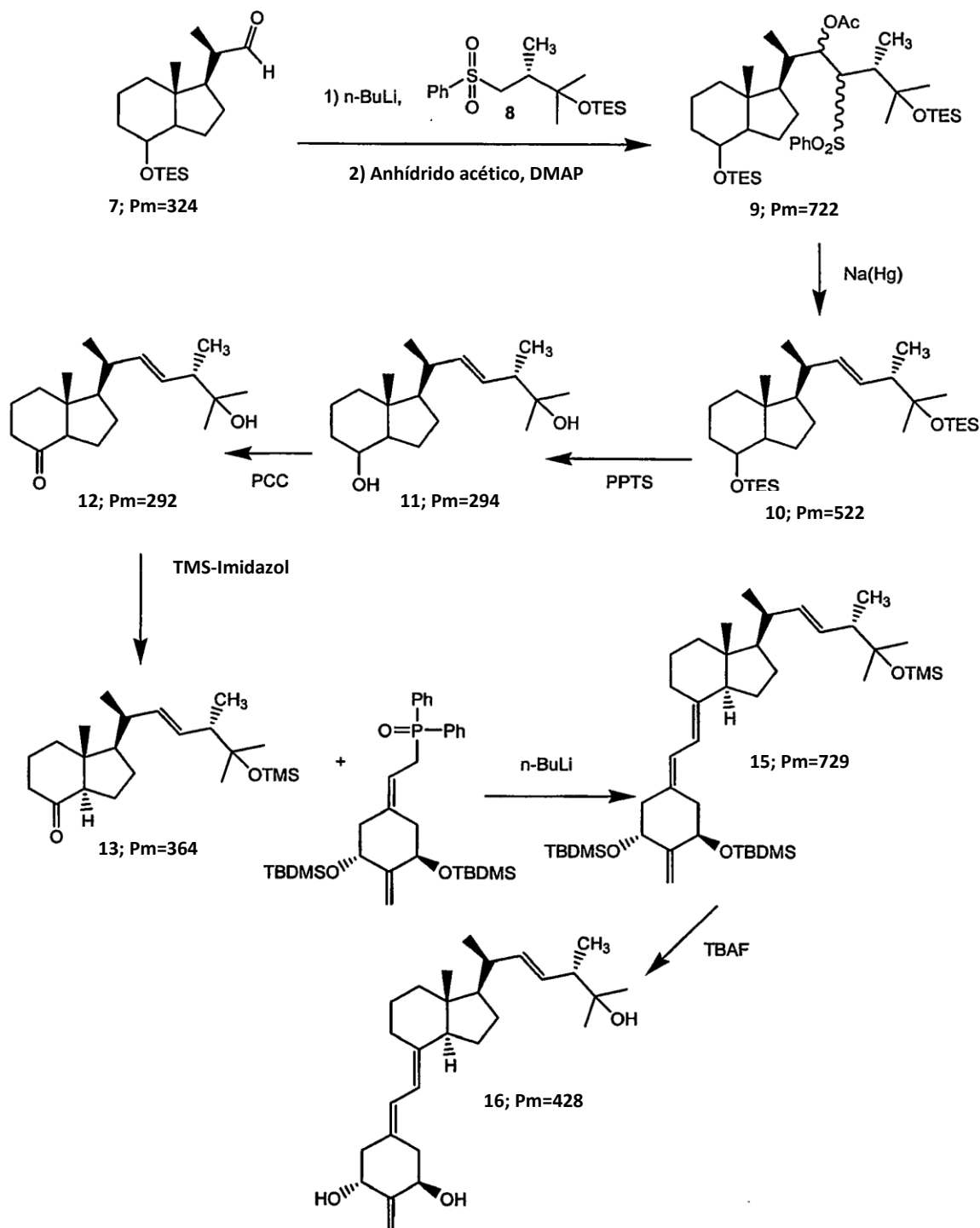
La síntesis y características de varios análogos de 19-nor vitamina D están descritas en numerosos documentos de patente de Estados Unidos incluyendo los documentos de patente N° 5.843.928, N° 6.627.622, N° 6.579.861, N° 5.086.191, N° 5.585.369, y N° 6.537.981.

Los compuestos de fórmula I, fórmula IA y fórmula IB se prepararon usando los métodos que se muestran en los Esquemas I, IIA, y IIB. El compuesto 1 se obtiene por ozonólisis del ergocalciferol o la vitamina D₂ como se ha descrito por Sicinski *et al.* (*J. Med. Chem.* 41, 4662-4672, 1998). El compuesto 1 se reduce con borohidruro para producir el compuesto dihidroxilo 2. Estas reacciones se pueden seguir mediante cromatografía en capa fina (CCF) usando un sistema disolvente de 10% de acetato de etilo en hexano. El tratamiento de 2 con anhídrido acético en piridina proporciona el compuesto de acetato 3. El compuesto 3 es entonces tratado con trietilsilil trifluorometanosulfonato seguido de hidrólisis básica (calefacción con KOH en metanol) para dar el compuesto 4. Una vez más, estas reacciones son seguidas por el mismo sistema de CCF anterior. El compuesto 4 se oxida con trióxido de azufre en piridina, dimetilsulfóxido y trietilamina para proporcionar 5. La reacción se sigue por CCF usando 10% en ácido acético. El tratamiento de 5 con bicarbonato de sodio para epimerizar el compuesto seguido por reducción con borohidruro sódico en metanol proporciona el alcohol 6 y se detecta por CCF con 20% de acetato de etilo en hexano. El compuesto 6 se oxida a continuación utilizando los reactivos mostrados en el Esquema IIA para producir el compuesto 7 que a su vez se hizo reaccionar con la sulfona estereoespecífica (compuesto 8) en presencia de n-BuLi (Esquema IIB). La sulfona 8 se preparó usando materiales de partida obtenidos de Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wisconsin), usando los procedimientos descritos en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.750.746, concedido a DeLuca et al. el 12 de mayo de 1998. La acetilación de este compuesto se realizó con anhídrido acético y piridina lo que proporcionó el compuesto 9, lo que fue confirmado por CCF (10% acetato de etilo en hexano). El compuesto 9 se convirtió después en el compuesto 10, por reacción con una amalgama de sodio. La presencia del compuesto 10 se confirmó por CCF (10% de acetato de etilo en hexano). La desprotección del compuesto 10 se llevó a cabo utilizando p-toluenosulfonato de piridinio, y la reacción se siguió por CCF con 35% de acetato de etilo en hexano. La oxidación del compuesto 11 se llevó a cabo por reacción con clorocromato de piridinio. A continuación se añadió un grupo trimetilsililo en presencia de imidazol para proporcionar el compuesto 13. Los productos 12 y 13 se detectaron por CCF con 35% de acetato de etilo en hexano. Se realizó una condensación de Wittig-Horner de la cetona de Grundmann protegida (compuesto 13) con el óxido de fosfina (compuesto 14) en presencia de n-BuLi. El producto resultante (compuesto 15) se confirmó por CCF (20% acetato de etilo en hexano). Finalmente, se generó el compuesto objetivo (compuesto 16) por la desprotección en presencia de fluoruro de tetrabutilamonio. La reacción se siguió por CCF con 10% de metanol en cloroformo. A continuación se describe confirmación adicional del producto final:

Esquema IIA



Esquema IIB



2-metileno-19-nor-(20S-24S) -1 α ,25-dihidroxitamina D₂

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0,524 (3H, s, 18-H₃), 0,938 (3H, d, J = 6,6 Hz, 21-H₃), 0,995 (3H, d, J = 7,2 Hz, 28-H₃), 1,142 y 1,169 (3H y 3H, cada uno s, 26- y 27-H₃), 1,8-2,2 (5H, m ancho), 2,28 (1H, dd, J = 13,2, 8,4 Hz, 10 α -H), 2,33 (1H, dd, J = 13,5, 6,3 Hz, 4 β -H), 2,57 (1H, dd, J = 13,5, 3,9 Hz, 4 α -H), 2,80 (1H, m, 9 β -H), 2,85 (1H, dd, J = 13,2, 4,5 Hz, 10 β -H), 4,49 (2H, m, 1 β - y 3 α -H), 5,09 y 5,11 (1H y 1H, cada uno s, = CH₂), 5,33 a 5,49 (2H, m ancho, 22- y 23-H), 5,88 y 6,35 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,4 Hz, 7- y 6-H); MS (APCI) m/z 411 [(M + H)⁺ - H₂O].

Actividad biológica

Unión al receptor de la vitamina D

Material de la prueba

Fuente de la proteína

5 El receptor de rata recombinante de longitud completa se expresó en células de *E. coli* BL21 (DE3) Codon Plus RIL y se purificó hasta homogeneidad usando dos sistemas diferentes de cromatografía en columna. El primer sistema fue una resina de afinidad de níquel que utiliza la etiqueta histidina C-terminal en esta proteína. La proteína que se eluyó de esta resina se purificó adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico (S-Sepharose Fast Flow). Alícuotas de la proteína purificada se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C hasta su uso. Para usar en los ensayos de la unión, la proteína se diluyó en TEDK₅₀ (50 mM Tris, 1,5 mM EDTA, pH 10 7,4, 5 mM DTT, 150 mM KCl) con 0,1% de detergente Chaps. La concentración de la proteína del receptor y la concentración del ligando se optimizó de forma que no más del 20% del ligando radiomarcado añadido se uniera al receptor.

Fármacos de estudio

15 Los ligandos no marcados se disolvieron en etanol y las concentraciones se determinaron usando espectrofotometría UV (1,25(OH)₂D₃: coeficiente de extinción molar = 18.200 y λ_{\max} = 265 nm; Análogos: coeficiente de extinción molar = 42.000 y λ_{\max} = 252 nm). Ligando radiomarcado ³H-1,25(OH)₂D₃, ~159 Ci/mmol) se añadió en etanol a una concentración final de 1 nM.

Condiciones del ensayo

20 Ligandos radiomarcados y no marcados se añadieron a 100 µl de la proteína diluida a una concentración final de etanol de ≤ 10%, se mezclaron e incubaron durante una noche en hielo para alcanzar el equilibrio de unión. Al día siguiente, 100 µl de suspensión de hidroxipatita (50%) se añadió a cada tubo y se mezcló a intervalos de 10 minutos durante 30 minutos. La hidroxipatita se recogió por centrifugación y después se lavó tres veces con tampón Tris-EDTA (50 mM Tris, 1,5 mM EDTA, pH 7,4) que contenía 0,5% Titron X-100. Después del lavado final, 25 las pelets 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 a partir de los tubos que contenían sólo ligando radiomarcado.

Diferenciación de HL-60

Material de la prueba

Fármacos de estudio

30 Los fármacos de estudio se disolvieron en etanol y las concentraciones se determinaron usando espectrofotometría UV. Se prepararon diluciones seriadas de manera que un intervalo de concentraciones del fármaco podría ser probado sin cambiar la concentración final de etanol (≤0,2%) presente en los cultivos celulares.

Células

35 Las células de leucemia promielocítica humana (HL60) fueron cultivadas en medio RPMI-1640 que contenía 10% de suero bovino fetal. Las células se incubaron a 37° C en presencia de 5% de CO₂.

Condiciones del ensayo

40 Células HL60 se sembraron a $1,2 \times 10^5$ células/ml. Dieciocho horas después de la siembra, las células por duplicado fueron tratadas con el fármaco. Cuatro días más tarde, se recogieron las células y se realizó un ensayo de reducción de nitro azul 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 de formazán intracelulares negro-azul. La verificación de la diferenciación a células monocíticas se determinó midiendo la actividad fagocítica (datos no mostrados).

Ensayo de transcripción *in vitro*

45 La actividad de transcripción se midió en células ROS 17/2,8 (hueso) que fueron transfectadas de manera estable con el promotor de genes 24-hidroxilasa (24Ohasa) corriente arriba de un gen reportero de luciferasa (Arbour *et al.*, 1998). Se les dio a las células un intervalo amplio de dosis. Dieciséis horas después de la dosificación se recogieron las células y se midieron las actividades de luciferasa usando un luminómetro. RLU = unidades relativas de luciferasa.

Transporte de calcio intestinal y movilización de calcio de los huesos

5 Ratas Sprague-Dawley macho destetadas fueron sometidas a la Dieta 11 (0,47% Ca) + AEK durante una semana seguida de la Dieta 11 (0,02% Ca) + AEK durante 3 semanas. Las ratas se cambiaron después a una dieta que contenía 0,47% Ca durante una semana seguido de dos semanas con una dieta que contenía 0,02% de Ca. La administración de la dosis comenzó durante la última semana con la dieta de calcio 0,02%. Se administraron cuatro
 10 dosis ip consecutivas aproximadamente con 24 horas de diferencia. Veinticuatro horas después de la última dosis, se recogió sangre de los cuellos cortados y la concentración de calcio en suero se determinó como medida de la movilización de calcio del hueso. Los primeros 10 cm del intestino se recogieron también para el análisis del transporte intestinal de calcio usando el método del saco intestinal invertido.

10 La 2-metileno-19-nor-(20S-24S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₂ es casi igual a la hormona natural en la unión al receptor de la vitamina D como se muestra en la Figura 1. La 2-metileno-19-nor-(20S-24S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₂ es también casi igual a la hormona natural en la inducción de la diferenciación de las células HL-60 (Figura 2), y es ligeramente más eficaz que 1,25-(OH)₂D₃ en causar la transcripción, como se muestra en la Figura 3. La 2-metileno-19-nor-(20S-24S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₂ tiene actividad de movilización del calcio del hueso comparable a 1,25(OH)₂D₃ (Figura 4), y el compuesto retiene cierta capacidad para elevar el transporte de calcio intestinal (Figura
 15 5.) Este compuesto encontrará uso como una terapia eficaz para el hiperparatiroidismo secundario de pacientes de diálisis y trastornos de desequilibrio de calcio tales como, pero no limitados a, la osteopenia, la osteoporosis, y similares. Puede ser utilizado también para el tratamiento de tumores malignos de colon, próstata y mama, y se puede utilizar en la terapia de enfermedades autoinmunes tales como la esclerosis múltiple, diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2, enfermedades inflamatorias del intestino, lupus, artritis reumatoide y enfermedad de Lou Gehrig.

20 Los compuestos de la invención también son útiles en la prevención o tratamiento de la obesidad, inhibiendo la diferenciación de adipocitos, inhibiendo la transcripción del gen SCD-1, y/o reduciendo la grasa corporal en sujetos animales. Por tanto, en algunas realizaciones, un 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 del compuesto o una composición farmacéutica que incluya el
 25 compuesto. La administración del compuesto o de la composición farmacéutica al sujeto inhibe la diferenciación de adipocitos, inhibe la transcripción génica, y / o reduce la grasa corporal en el sujeto animal.

30 Para fines del tratamiento, los compuestos definidos por la fórmula I, formula 1A y la fórmula 1B se pueden formular para aplicaciones farmacéuticas como una solución en disolventes inocuos, o como una emulsión, suspensión o dispersión en disolventes o vehículos adecuados, o como píldoras, comprimidos o cápsulas, junto con vehículos sólidos, de acuerdo con los métodos convencionales en la técnica conocida. Cualquiera de dichas formulaciones también puede contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, tales como estabilizadores, antioxidantes, aglutinantes, agentes colorantes o agentes emulsionantes o modificadores del sabor. Excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables son generalmente conocidos por los expertos en la técnica y por tanto se incluyen en la presente invención. Dichos excipientes y vehículos se describen, por ejemplo, en "Remington
 35 Pharmaceutical Sciences" Mack Publishing Company, New Jersey (1991).

Los compuestos se pueden administrar por vía oral, tópica, parenteral o transdérmica. Los compuestos se administran ventajosamente por inyección o por infusión intravenosa o soluciones estériles adecuadas, o en forma de dosis líquidas o sólidas vía el canal alimenticio, o en la forma de cremas, pomadas, parches, o vehículos similares adecuados para aplicaciones transdérmicas. En algunas realizaciones, dosis de 0,001 μ g a
 40 aproximadamente 1 mg por día del compuesto son apropiadas para propósitos de tratamiento. En algunas de tales realizaciones una dosis apropiada y eficaz puede estar en el intervalo de 0,01 μ g a 1 mg por día del compuesto. En otras de dichas realizaciones una dosis apropiada y eficaz puede variar de 0,1 μ g a 500 μ g por día del compuesto. Tales dosis se ajustarán según el tipo de enfermedad o afección a tratar, la gravedad de la enfermedad o afección, y la respuesta del sujeto como es bien entendido en la técnica. El compuesto puede administrarse adecuadamente
 45 solo, o junto con otro compuesto activo de vitamina D.

Las composiciones para uso en la invención incluyen una cantidad eficaz de 2-metileno-19-nor-(20S-24S)-1 α ,25-dihidroxitamina D₂ como el ingrediente activo, y un vehículo adecuado. Una cantidad del compuesto eficaz para uso de acuerdo con algunas realizaciones de la invención será una cantidad de dosificación en general tales como las descritas en este documento, y puede administrarse por vía tópica, transdérmica, oral, nasal, rectal, o parenteral.

50 El compuesto de la fórmula IA y fórmula 1B puede ser ventajosamente administrado en cantidades suficientes para efectuar la diferenciación de promielocitos a macrófagos normales. Las dosificaciones como las descritas anteriormente son adecuadas, entendiéndose que las cantidades dadas deben ser ajustadas de acuerdo con la gravedad de la enfermedad, y la condición y respuesta del sujeto como se comprende bien en la técnica.

55 El compuesto se puede formular en forma de cremas, lociones, pomadas, aerosoles, supositorios, 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 estabilizadores, antioxidantes, emulsionantes, agentes colorantes, aglutinantes o agentes modificadores del sabor.

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

5 Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden estar en forma de unidades discretas como cápsulas, sobres, comprimidos o pastillas, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo, en forma de un polvo o gránulos, en la 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.

10 Las formulaciones para administración rectal pueden estar en la 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 ingrediente activo que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor.

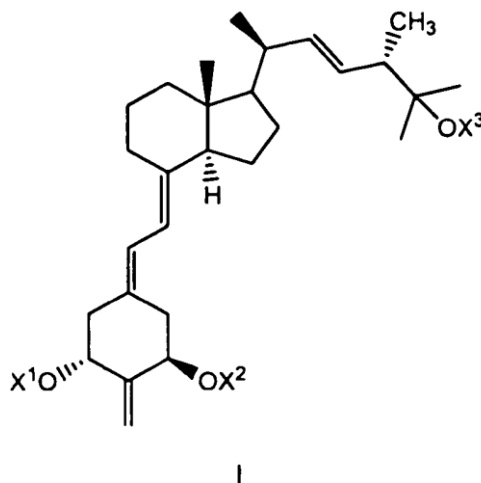
15 Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas tales como linimentos, lociones, aplicaciones, emulsiones de aceite-en-agua o agua-en-aceite tales como cremas, pomadas o pastas; o soluciones o suspensiones tales como gotas, o como pulverizaciones.

Para la administración nasal, se pueden utilizar la inhalación del polvo, formulaciones de autopropulsión o pulverización, dispensadas con una lata de aerosol, un nebulizador o un atomizador. Las formulaciones, cuando se dispensan, tienen preferiblemente un tamaño de partícula en el intervalo de 10 a 100 micras.

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

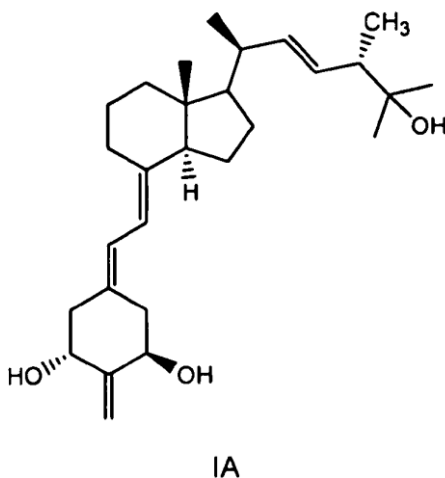
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto según la fórmula I,



en donde X¹, X², y X³ se seleccionan independientemente entre H y grupos protectores hidroxi.

- 5 2. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde X¹ y X² son ambos grupos protectores del grupo hidroxi.
3. Un compuesto según la reivindicación 2, en donde X¹ y X² son ambos el grupo t-butildimetilsililo.
4. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde X¹, X², y X³ son todos H y el compuesto tiene la fórmula IA

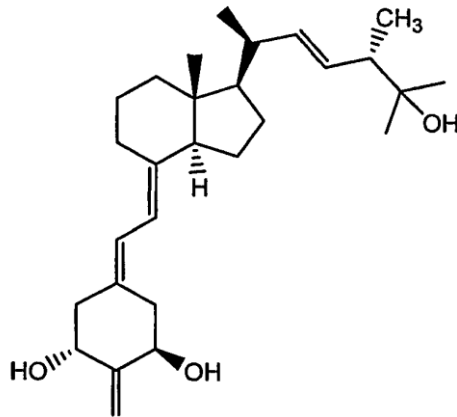


- 10 5. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad eficaz del compuesto según la reivindicación 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Una composición farmacéutica según la reivindicación 5, en donde la cantidad eficaz comprende de 0,01 µg a 1 mg del compuesto por gramo de la composición.
7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 6, en donde la cantidad eficaz comprende de 0,1 µg a 500 µg del compuesto por gramo de la composición.
- 15 8. Un compuesto según la reivindicación 4, para usar en el tratamiento de un sujeto que padece una afección biológica, en donde la afección biológica se selecciona de entre la psoriasis; leucemia; cáncer de colon; cáncer de mama; cáncer de próstata; esclerosis múltiple; lupus; diabetes mellitus; reacción del hospedante al injerto; rechazo de trasplantes de órganos; una enfermedad inflamatoria seleccionada entre la artritis reumatoide, asma, o enfermedades inflamatorias del intestino; una afección cutánea seleccionada entre arrugas, ausencia de firmeza cutánea adecuada, ausencia de hidratación dérmica adecuada, o secreción insuficiente de sebo; osteodistrofia renal; o osteoporosis.
- 20

9. Un compuesto para uso según la reivindicación 8, en donde el compuesto se administra por vía oral, parenteral, transdérmica o tópica al sujeto.

10. Un compuesto para uso según la reivindicación 8, en donde el compuesto se administra en una dosificación de 0,01 µg por día a 1 mg por día.

5 11. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde X^1 , X^2 , y X^3 son todos H y el compuesto tiene la fórmula IB



IB

10 12. Un compuesto según la reivindicación 4 o la reivindicación 11, para uso en el tratamiento de una afección biológica seleccionada entre la psoriasis; leucemia; cáncer de colon; cáncer de mama; cáncer de próstata; esclerosis múltiple; lupus; diabetes melitus; reacción del hospedante contra el injerto; rechazo de trasplantes de órganos; una enfermedad inflamatoria seleccionada entre la artritis reumatoide, asma, o enfermedades inflamatorias del intestino; una afección cutánea seleccionada entre las arrugas, ausencia de firmeza cutánea adecuada, ausencia de hidratación dérmica adecuada, o secreción insuficiente de sebo; osteodistrofia renal; o osteoporosis.

FIGURA 1
UNIÓN VDR COMPETITIVA

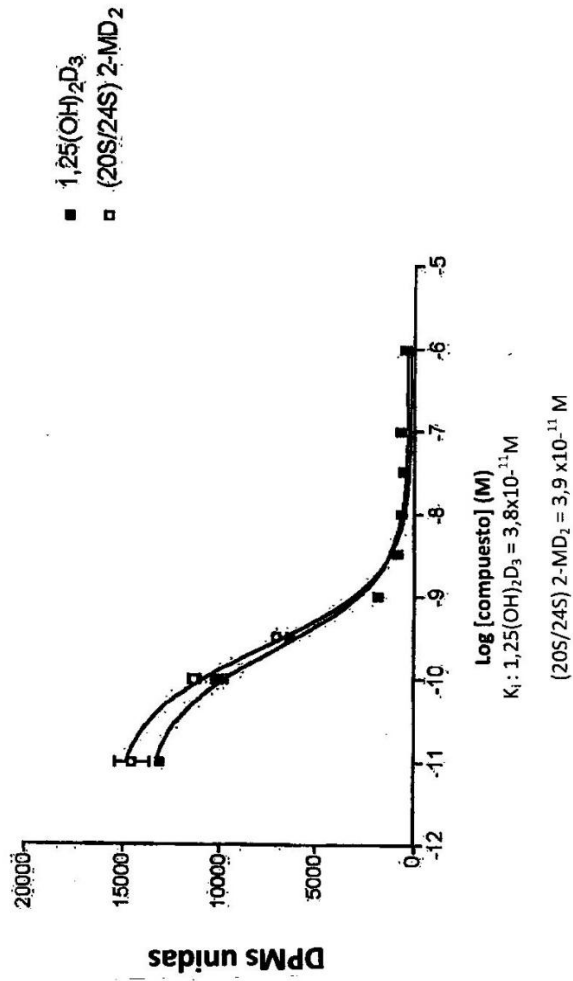


FIGURA 2

Diferenciación de células HL-60

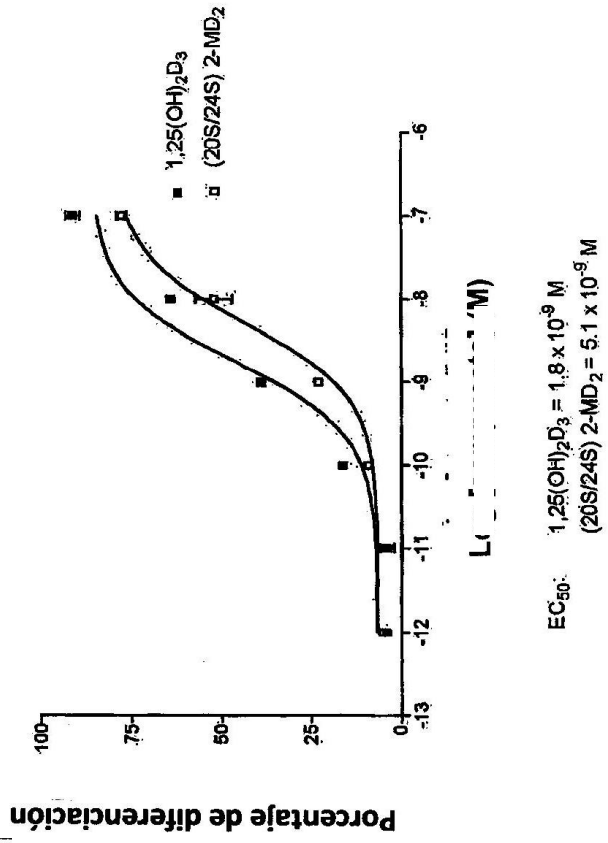
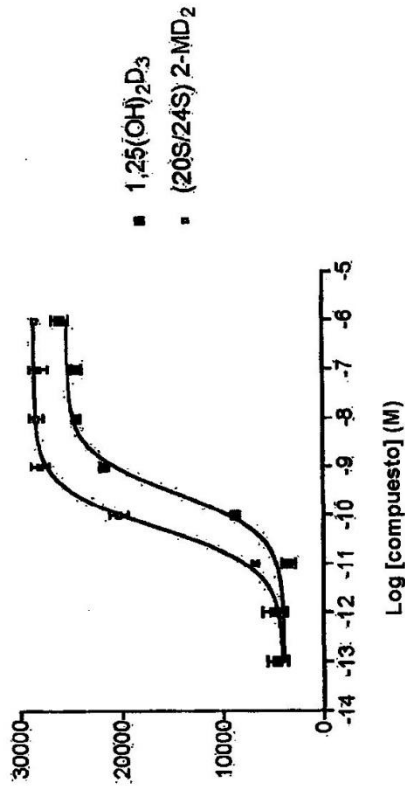


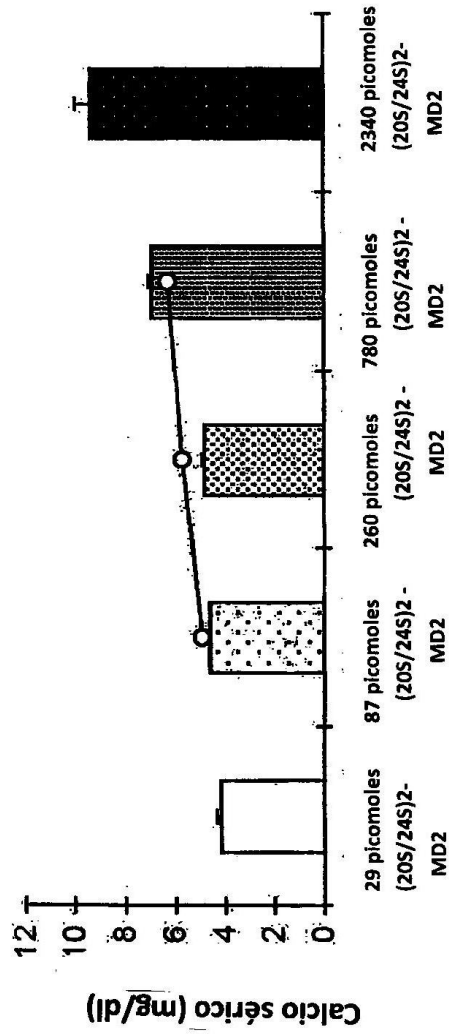
Figura 3
Transcripción 24-OHasa



EC₅₀: 1,25(OH)₂D₃ = 2.9×10^{-10} M
 (20S/24S) 2-MD₂ = 5.6×10^{-11} M

FIGURA 4

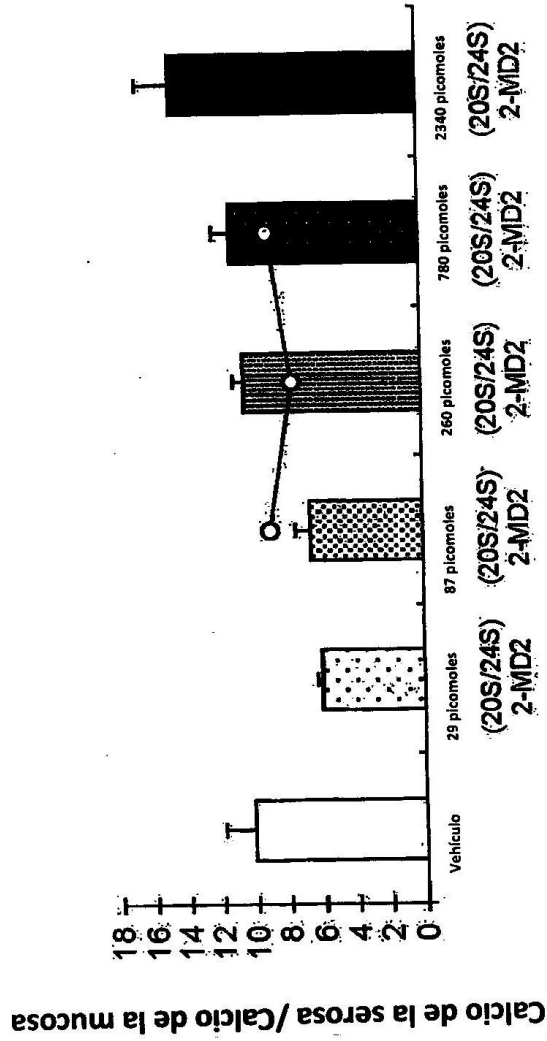
Mobilización del calcio del hueso



La línea que contiene los tres puntos representa los datos históricos obtenidos con 1,25(OH)₂D₃

FIGURA 5

Transporte del calcio intestinal



La línea que contiene los tres puntos representa los datos históricos obtenidos con 1,25(OH)₂D₃