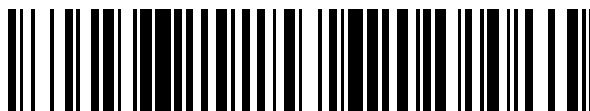


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 682**

51 Int. Cl.:

**C07C 401/00** (2006.01)

**A61K 31/59** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2001 E 01920863 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 1268415**

54 Título: **Compuestos tipo 26,27-homologada-20-epi-2-alquil-19-nor-vitamina D**

30 Prioridad:

**31.03.2000 US 541470**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.08.2013**

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION  
(100.0%)  
614 NORTH WALNUT STREET POST OFFICE  
BOX 7365  
MADISON WISCONSIN 53707-7365, US**

72 Inventor/es:

**DELUCA, HECTOR F. y  
SICINSKI, RAFAL R.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 420 682 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

Compuestos tipo 26,27-homologada-20-epi-2-alquil-19-nor-vitamina D

**Antecedentes de la técnica**

5 Esta patente de invención se refiere a compuestos derivados de vitamina D, y más particularmente a derivados de vitamina D sustituidos en la posición del átomo de carbono 2.

10 Se sabe que la hormona natural, 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y su análogo en la serie del ergosterol, es decir 1 $\alpha$ ,25 - dihidroxitamina D<sub>2</sub>, son reguladores muy potentes de la homeostasis del calcio en animales y seres humanos, y más recientemente 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 1 $\alpha$ -hidroxitamina D<sub>3</sub>,  $\alpha$ -hidroxitamina D<sub>2</sub>, varias vitaminas homologadas de cadena lateral y análogos fluorados. Algunos de estos compuestos exhiben una interesante separación de actividades en la diferenciación celular y la regulación del calcio. Esta diferencia de actividad puede ser útil en el tratamiento de una variedad de enfermedades tales como la osteodistrofia renal, raquitismo resistente a la vitamina D, osteoporosis, psoriasis, y ciertas neoplasias.

15 Recientemente, se ha descubierto una nueva clase de análogos de la vitamina D, a saber, los denominados compuestos 19-nor-vitamina D, los cuales se caracterizan por el remplazamiento del grupo metileno exocíclico del anillo A (átomo de carbono 19), típico del sistema de vitamina D, por dos átomos de hidrógeno. El análisis biológico de tales 9-nor-análogos (por ej., 1 $\alpha$ ,25 -dihidroxi-19-nor-vitamina D<sub>3</sub>) reveló un perfil selectivo de actividad con alta potencia en la inducción de la diferenciación celular, y muy baja actividad movilizadora del calcio. Por tanto, estos compuestos son potencialmente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de neoplasias, o el tratamiento de varios trastornos de la piel. Se han descrito dos métodos de síntesis diferentes de tales análogos 19-nor-vitamina D (Perlman et al., Tetrahedron Lett. 31, 1823 (1990); Perlman et al., Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991), y DeLuca et al., Patente de EE.UU. No. 5.086.191).

25 En la Patente de EE.UU. No. 4.666.634, el grupo de Chugai ha descrito y examinado análogo 2 -hidroxi y alcoxi (por ej., ED-71) de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> como fármacos potenciales para la osteoporosis y como agentes antitumorales. Véase también Okano et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 1444 (1989). También se han preparado y ensayado otros análogos 2-sustituidos (con grupos hidroxialquilo, por ej., ED-120, y fluoroalquilo) en el anillo A de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (Miyamoto et al., Chem. Farm. 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)).

30 Recientemente, también se han sintetizado análogos 2-sustituidos de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-19-norvitamina D<sub>3</sub>, es decir compuestos sustituidos en la posición 2 con grupos hidroxilo o alcoxi (DeLuca et al., Patente de EE.UU. No. 5.536.713), los cuales exhiben perfiles de actividad interesantes y selectivos. Todos estos estudios indican que sitios de enlace en receptores de la vitamina D pueden acomodar diferentes sustituyentes en C-2 en los análogos de la vitamina D sintetizados.

35 En un continuo esfuerzo en explorar la clase 19-nor de compuestos farmacológicamente importantes derivados de vitamina D, ahora se han sintetizado y ensayado sus análogos que están caracterizados por la presencia de un sustituyente alquilo (particularmente metilo) en el átomo de carbono 2 (C-2), es decir compuestos tipo 2-alquil-19-nor-vitamina D, y particularmente compuestos tipo 2-metil-19-nor-vitamina D. Tales análogos de la vitamina D parecieron dianas interesantes porque el grupo alquilo relativamente pequeño (particularmente metilo) en C-2 no debiera no debiera interferir con el enlace al receptor de la vitamina D. Por otra parte, es obvio que para estos nuevos análogos puede esperarse un cambio de conformación del anillo A de ciclohexanodiol.

El documento WO 98/41500 describe compuestos 2-alquil-19-nor-vitamina D, particularmente compuestos 2-metil-19-nor-vitamina D.

45 Sicinski et al., en J. Med. Chem. Vol. 41, No. 23 1998 páginas 4662 a 4674 proporcionan compuestos tipo 2,25 - dihidroxi-19-norvitamina D<sub>3</sub> y tratan la síntesis y evaluación biológica de 2-hidroximetil, 2-metil y 2-metileno análogos.

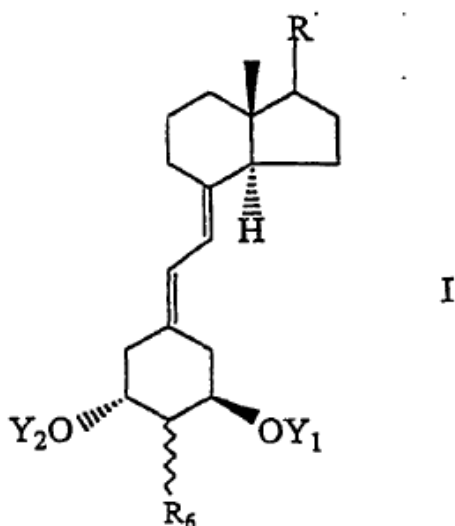
Mikami et al., en Synlett 1999 No. 12, 1899-1902, describen un método para la preparación de análogos tipo 2-metil-19-nor-22-oxa vitamina D<sub>3</sub>.

El documento WO 00/10548 proporciona análogos tipo 19-nor-vitamina D<sub>3</sub> 26 y/o 27-homologados que son útiles en el tratamiento de la osteoporosis.

50 El documento WO 90/00541 proporciona análogos ciclopentano-sustituidos de la vitamina D<sub>3</sub>.

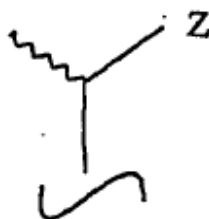
Una clase de compuestos tipo vitamina D 1 $\alpha$ -hidroxilada no conocida hasta el momento son los análogos 19-nor-vitamina D que tienen un grupo alquilo (particularmente metilo) en la posición 2, es decir 2-alquil-19-nor-vitamina D, particularmente 2-metil-19-nor-vitamina D.

Estructuralmente, estos nuevos análogos (que no son parte de la invención) se caracterizan por la fórmula general I mostrada a continuación:

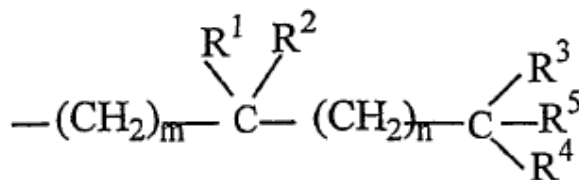


5 En la que Y1 e Y2, que pueden ser los mismos o diferentes, se seleccionan cada uno del grupo que consiste en hidrógeno y un grupo protector del resto hidroxilo, R6 se selecciona del grupo que consiste en alquilo, hidroxialquilo y fluoroalquilo, y en la que el grupo R representa cualquiera de las típicas cadenas laterales conocidas para los compuestos tipo vitamina D.

10 Más específicamente, R puede representar un radical hidrocarburo saturado o insaturado de 1 a 35 átomos de carbono, que puede ser de cadena lineal, ramificada o cíclica y que puede contener uno o más sustituyentes adicionales, tales como grupos hidroxilo o protectores de restos hidroxilo, fluoro, carbonilo, éster, epoxi, amino u otros grupos heteroatómicos. Las cadenas laterales preferidas de este tipo están representadas por la siguiente estructura



15 En la que el centro estereoquímico (correspondiente a C-20 en la numeración esteroide) puede tener la configuración R o S, (es decir, la configuración alrededor del átomo de carbono 20 ó la configuración 20-epi), y en la que Z se selecciona de Y, -OY, -CH2OY, -C≡CY, -CH=CHY, y -CH2CH2CH=CR3R4, en los que el doble enlace puede tener la geometría cis o trans, y en los que Y se selecciona de hidrógeno, metilo, -COR5 y un radical de la estructura:

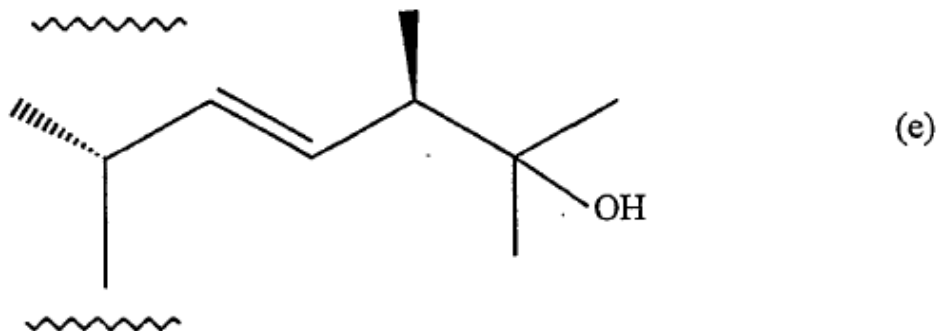
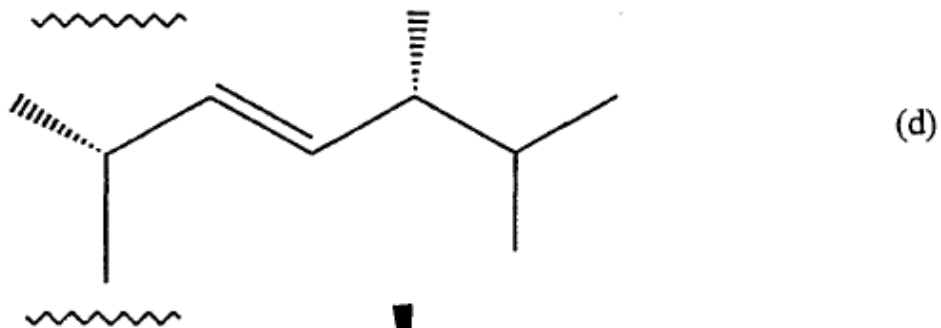
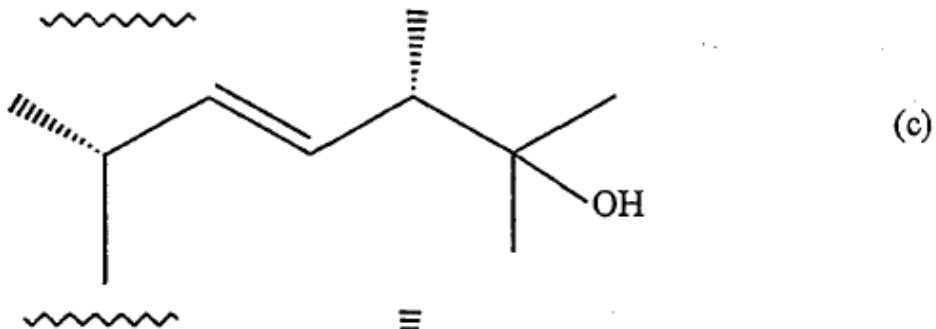
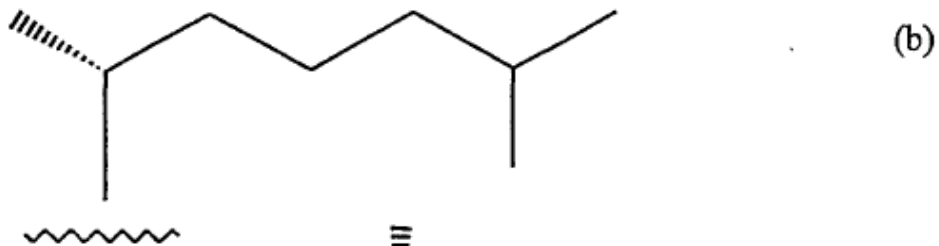
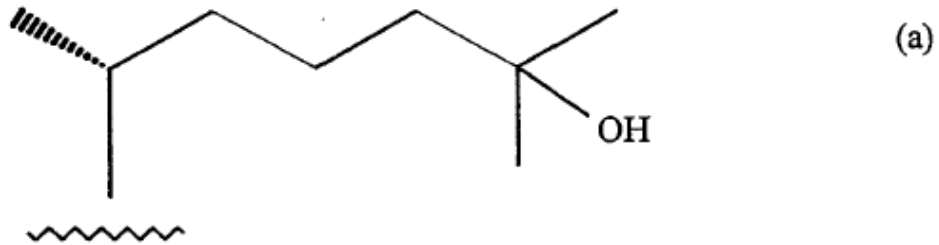


20 En la que m y n, independientemente, representan los números enteros de 0 a 5, en la que R1 se selecciona de hidrógeno, deuterio, hidroxilo, hidroxilo protegido, fluoro, trifluorometilo, y C1-5-alquilo, que puede ser de cadena lineal o ramificada y, opcionalmente, portar un sustituyente hidroxilo o hidroxilo protegido, y en la que cada uno de R2, R3, y R4 se selecciona, independientemente, de deuterio, deuterioalquilo, hidrógeno, fluoro, trifluorometilo y C1-5-alquilo, que puede ser de cadena lineal o ramificada, y, opcionalmente, portar un sustituyente hidroxilo o hidroxilo protegido, y en la que R1 y R2, tomados conjuntamente, representan un grupo oxo, o un grupo alquilideno, =CR2R3, o el grupo -(CH2)p-, en el que p es un número entero de 2 a 5, y en la que R3 y R4, tomados conjuntamente, representan un grupo oxo, o el grupo -(CH2)q-, en el que q es un número entero de 2 a 5, y en la que R5 representa hidrógeno, hidroxilo, hidroxilo protegido, C1-5-alquilo u -OR7 en el que R7 representa C1-5-alquilo, y en la que cualquiera de los grupos CH- en las posiciones 20, 22, ó 23 en la cadena lateral puede ser reemplazado por un átomo de nitrógeno, o en la que

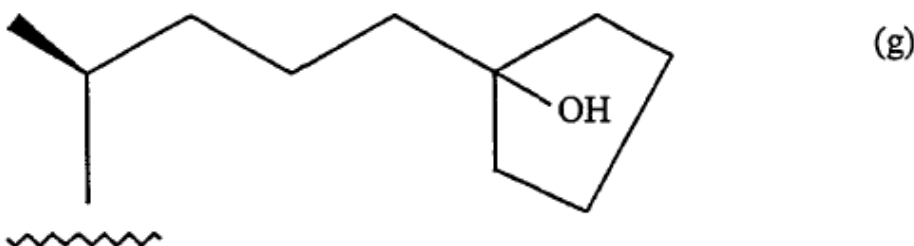
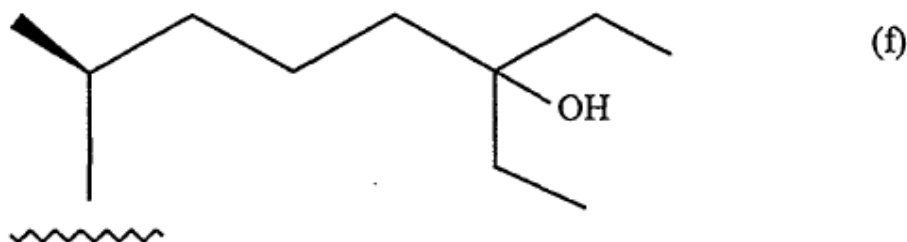
cualquiera de los grupos  $-\text{CH}(\text{CH}_3)-$ ,  $-\text{CH}(\text{R}_3)-$ , o  $-\text{CH}(\text{R}_2)-$  en las posiciones 20, 22, y 23, respectivamente, puede ser reemplazado por un átomo de oxígeno o de azufre.

Las líneas onduladas a los sustituyentes en C-2 y en C-20 indican que el átomo de carbono 2 y átomo de carbono 20 pueden tener configuración R o S.

- 5 Ejemplos específicos importantes de cadenas laterales con configuración 20R natural son las estructuras representadas por las fórmulas (a), b), (c), (d) y (e) siguientes. Es decir, la cadena lateral que se encuentra en 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> (a); vitamina D<sub>3</sub> (b); 25-hidroxitamina D<sub>2</sub> (c); vitamina D<sub>2</sub> (d); y el epímero C-24 de 25-hidroxitamina D<sub>2</sub> (e):



Ejemplos específicos importantes de cadenas laterales con la configuración no natural 20S (también denominada configuración 20-epi) son las estructuras representadas por las fórmulas (f) y (g) siguientes:



5

Los anteriores compuestos exhiben un patrón de actividad biológica deseado y muy ventajoso. Estos compuestos se caracterizan por una actividad de transporte de calcio intestinal relativamente alta, en comparación con la de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, mientras que también exhiben una actividad relativamente alta, en comparación con 25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, en su capacidad de movilizar el calcio de los huesos. Por lo tanto, estos compuestos son muy específicos en su actividad calcémica. Su actividad preferencial en movilizar el calcio de los huesos y su actividad de transporte de calcio intestinal alta o normal permite la administración in vivo de estos compuestos para el tratamiento de enfermedades metabólicas de los huesos en las que la pérdida de hueso es una preocupación principal. Debido a su actividad calcémica preferencial sobre los huesos, estos compuestos serían agentes terapéuticos preferidos para el tratamiento de enfermedades en las que se desea la formación de hueso, tales como la osteoporosis, especialmente la osteoporosis de bajo recambio óseo, la osteoporosis inducida por esteroides, la osteoporosis senil o la osteoporosis postmenopáusica, así como la osteomalacia y la osteodistrofia renal. El tratamiento puede ser transdérmico, oral o parenteral. Los compuestos pueden estar presentes en una composición en una cantidad de 0,1  $\mu$ g/g a 50  $\mu$ g/g de la composición, y pueden administrarse en dosificaciones de 0,01  $\mu$ g/día a 50  $\mu$ g/día.

Los compuestos también son especialmente adecuados para el tratamiento y profilaxis de trastornos en seres humanos que se caracterizan por un desequilibrio en el sistema inmune, por ej., en enfermedades autoinmunes, que incluyen la esclerosis, diabetes mellitus, reacción huésped contra injerto, y rechazo de trasplantes; y adicionalmente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como la artritis reumatoide y asma, así como la mejora de la cura de las fracturas y de los injertos óseos. El acné, la alopecia, las afecciones de la piel tales como la piel seca (falta de hidratación dérmica), la flojedad indebida de la piel (insuficiente firmeza de la piel), la insuficiente secreción de sebo, las arrugas y la hipertensión son otras afecciones que pueden tratarse con los compuestos de la invención.

Los anteriores compuestos también se caracterizan por una alta actividad de diferenciación celular.

La presente invención se refiere a los siguientes compuestos 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y 19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.

La invención además se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anteriores compuestos junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Así, estos compuestos son útiles en el tratamiento de la psoriasis, o como un agente anticanceroso contra la leucemia, cáncer de colon, cáncer de pecho y cáncer de próstata. Los compuestos pueden estar presentes en una composición para tratar la psoriasis en una cantidad de 0,01  $\mu$ g/g a 100  $\mu$ g/g de la composición, y pueden administrarse tópicamente, transdérmica, oral o parenteralmente en dosificaciones de 0,01  $\mu$ g/día a 100  $\mu$ g/día.

La invención además se refiere a los compuestos identificados anteriormente para usar en el tratamiento de enfermedades metabólicas de los huesos en las que se desea mantener o aumentar la masa ósea.

#### Breve descripción de los dibujos

(Las Figuras 1 a 6 no son parte de la invención)

La Figura 1 es un gráfico que ilustra la actividad relativa de una mezcla de 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ -metil-19-nor-20S-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, una mezcla de 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ -metil-19-nor-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> por competir por el enlace de [<sup>3</sup>H]-1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> al receptor nuclear intestinal de cerdo de la vitamina D;

- 5 La Figura 2 es un gráfico que ilustra el tanto por ciento de diferenciación de células HL-60 en función de la concentración de una mezcla of 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ -metil-19-nor-20S-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, una mezcla de 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ -metil-19-nor-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>;

10 La Figura 3 es un gráfico similar a la Fig. 1 excepto que ilustra la actividad relativa de los compuestos individuales 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ -metil-19-nor-20S-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ -metil-19-nor-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> por competir por el enlace de [<sup>3</sup>H]-1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> al receptor nuclear intestinal de cerdo de la vitamina D;

La Figura 4 es un gráfico similar a la Fig. 2 excepto que ilustra el tanto por ciento de diferenciación de células HL-60 en función de la concentración de los compuestos individuales 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ -metil-19-nor-20S-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ -metil-19-nor-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>;

- 15 La Fig. 5 es un gráfico que ilustra la actividad relativa de los compuestos individuales 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ -metil-19-nor-20S-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ -metil-19-nor-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> por competir por el enlace de [<sup>3</sup>H]-1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> al receptor nuclear intestinal de cerdo de la vitamina D; y

20 La Fig. 6 es un gráfico que ilustra el tanto por ciento de diferenciación de células HL-60 en función de la concentración de los compuestos individuales 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ -metil-19-nor-20S-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 2 $\alpha$  y 2 $\beta$ -metil-19-nor-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.

#### Descripción detallada de la invención

25 Cuando se usa en la descripción y en las reivindicaciones, la expresión "grupo protector del resto hidroxilo" significa cualquier grupo comúnmente usado para la protección temporal de funciones hidroxilo, tales como por ejemplo, grupos alcóxicarbonilo, acilo, alquilsililo o alquilarilsililo (de aquí en adelante denominados simplemente como grupos "sililo"), y grupos alcóxilalquilo. Grupos protectores alcóxicarbonilo con grupos alquil-O-CO- tales como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxicarbonilo, isopropoxicarbonilo, butoxicarbonilo, isobutoxicarbonilo, terc-  
30 butoxicarbonilo, bencilocarbonilo o aliloxicarbonilo. La expresión "acilo" significa un grupo alcanoilo de 1 a 6 átomos de carbono, en todas sus formas isómeras, o un grupo carboxialcanoilo de 1 a 6 átomos de carbono, tales como los grupos oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, o un grupo acilo aromático tal como benzoilo, o un grupo halo, nitro o benzoilo sustituido con grupos alquilo. La palabra "alquilo", cuando se usa en la descripción o en las reivindicaciones, denota un radical alquilo de cadena lineal o ramificada de 1 a 10 átomos de carbono, en todas sus formas isómeras. Grupos protectores alcóxilalquilo son agrupaciones tales como metoximetilo, etoximetilo, metoxietoximetilo, o tetrahidrofuranilo y tetrahidropiranilo. Los grupos protectores sililo preferidos son trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, dibutilmetilsililo, difenilmetilsililo, fenildimetilsililo, difenil-t-butilsililo y radicales sililo alquilados análogos. La expresión "arilo" especifica un grupo fenilo fenil-, alquil-, nitro- o halo-sustituido.

35 Un grupo "hidroxilo protegido" es un grupo hidroxilo derivatizado o protegido por cualquiera de los anteriores grupos comúnmente usados para la protección temporal o permanente de funciones hidroxilo, por ej., los grupos sililo, alcóxilalquilo, acilo o alcóxicarbonilo, que se definieron previamente. Las expresiones "hidroxialquilo", "deuteroalquilo" y "fluoroalquilo" se refieren a un radical alquilo sustituido por uno o más grupos hidroxilo, deuterio o fluoro, respectivamente.

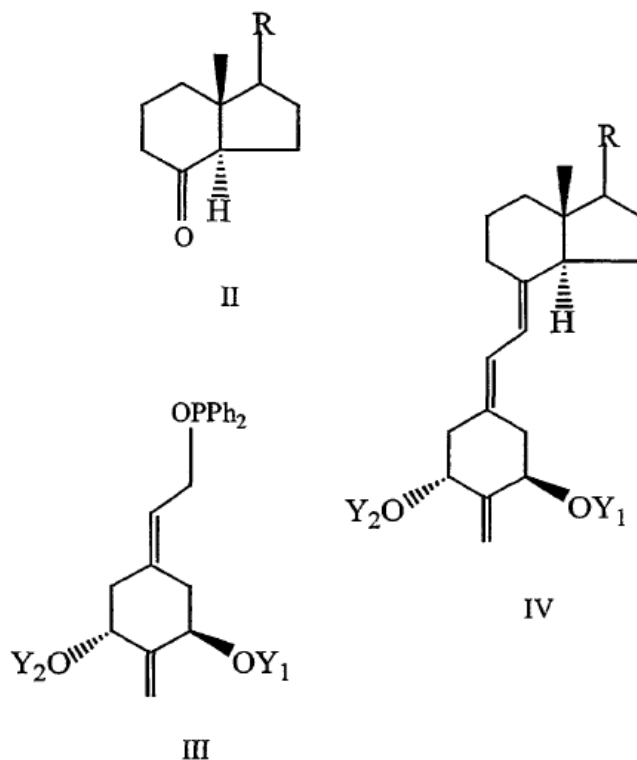
40 Debe advertirse en esta descripción que la expresión "24-homo" se refiere a la adición de un grupo metileno y la expresión "24-dihomo" se refiere a la adición de dos grupos metileno al átomo de carbono de la posición 24 en la cadena lateral. Asimismo, la expresión "trihomo" se refiere a la adición de tres grupos metileno. También, la expresión "26,27-dimetilo" se refiere a la adición de un grupo metilo a los átomos de carbono de las posiciones 26 y 27 para que, por ejemplo, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> sean grupos etilo. Asimismo, la expresión "26,27-dietilo" se refiere a la adición de un grupo etilo en las posiciones 26 y 27 para que R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> sean grupos propilo.

Los compuestos de la invención tienen una cadena lateral saturada y el sustituyente 2-alquilo apropiado y/o la configuración apropiada del átomo de carbono 20 añadidos a la nomenclatura.

Los compuestos de la invención son:

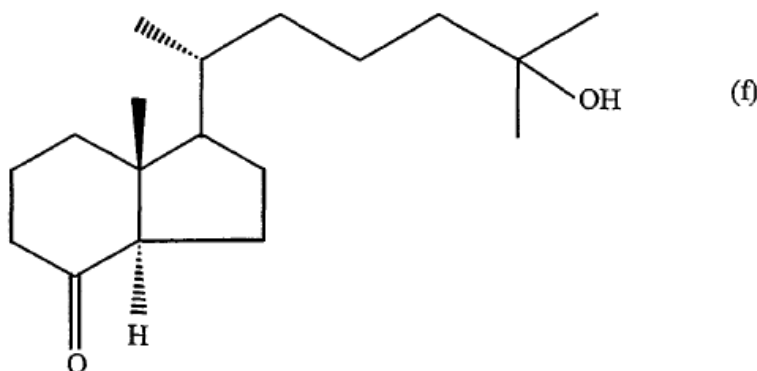
- 50 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>; y  
19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.

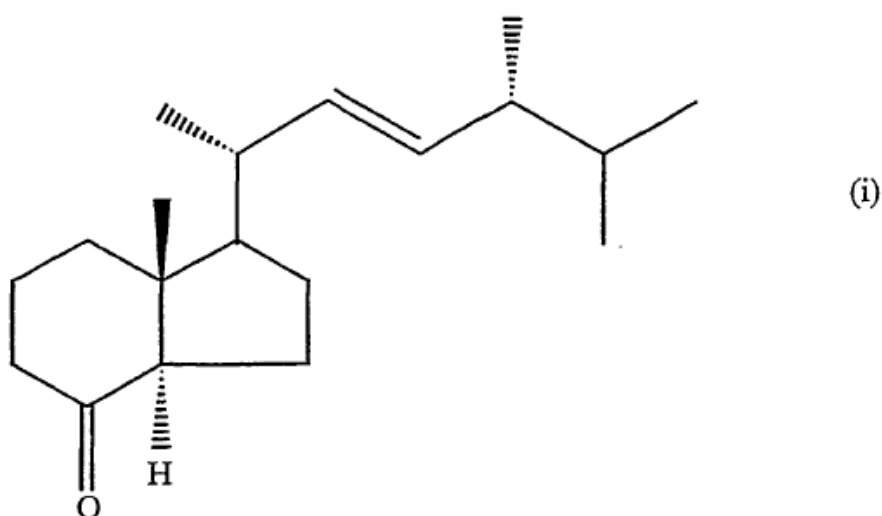
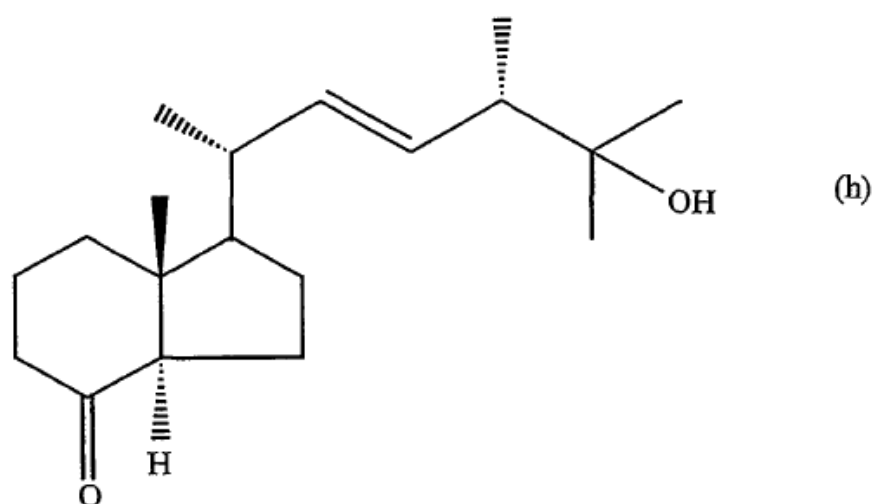
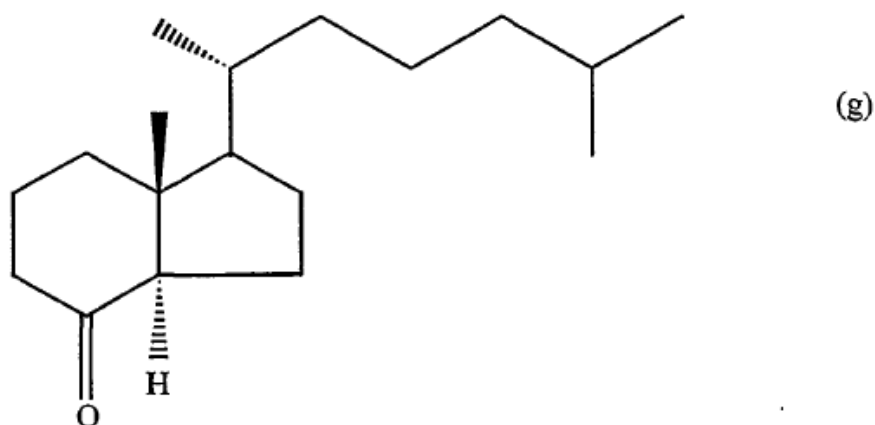
La preparación de compuestos tipo 1 $\alpha$ -hidroxi-2-alkil-19-nor-vitamina D, particularmente compuestos tipo 1 $\alpha$ -hidroxi-2-metil-19-norvitamina D que tengan la estructura básica I, puede conseguirse mediante un método general común, a saber, la condensación de una cetona bicíclica II tipo Windaus-Grundmann con el óxido de fosfina alílica III para dar los correspondientes análogos tipo 2-metilen-19-nor-vitamina D IV, seguido por una reducción selectiva del grupo exometileno en C-2 en los últimos compuestos:



En las estructuras II, III, y IV, los grupos Y<sub>1</sub> y Y<sub>2</sub> y R representan grupos definidos anteriormente; Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub> son preferiblemente grupos protectores del resto hidroxilo, entendiéndose asimismo que cualquier funcionalidad en R que pudiera ser sensible, o que pudiera interferir con la reacción de condensación, estaría adecuadamente protegida como es bien sabido en la técnica. El procedimiento mostrado anteriormente representa una aplicación del concepto de síntesis convergente, el cual ha sido eficazmente aplicado para la preparación de compuestos derivados de vitamina D [por 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); Baggolini 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 pueden prepararse por métodos conocidos. Ejemplos específicos importantes de tales cetonas bicíclicas son las estructuras con las cadenas laterales (a), (b), (c) y (d) anteriormente descritas, es decir la cetona 25-hidroxi (f) de Grundmann [Baggiolini et al., J. Org. Chem, 51, 3098 (1986)]; la cetona (g) de Grundmann [Inhoffen et al., Chem. Ber. 90, 664 (1957)]; la cetona 25-hidroxi (h) de Windaus [Baggiolini et al., J. Org. Chem., 51, 3098 (1986)] y la cetona (i) de Windaus [Windaus et al., Ann., 524, 297 (1936)]:





5

Para la preparación de los óxidos de fosfina requeridos de la estructura general III, se ha desarrollado una nueva ruta sintética partiendo del derivado quincato de metilo 1, fácilmente obtenido a partir del ácido (1R,3R,4S,5R)-(-)-quinico comercial como describen Perlman et al., *Tetrahedron Lett.* 32, 7663 (1991) y DeLuca et al., Patente de EE.UU. No. 5.086.191. El procedimiento de transformación global del éster de metilo 1 de partida en los sintones con anillo A deseados se resume mediante el ESQUEMA I. Así, el grupo 4-hidroxilo secundario de 1 se oxidó con RuO<sub>4</sub> (un método catalítico con RuCl<sub>3</sub> y NaIO<sub>4</sub> como co-oxidante). El uso de tal oxidante fuerte fue necesario para un procedimiento de oxidación efectivo de este grupo hidroxilo muy estéricamente impedido. Sin embargo, también pueden aplicarse otros oxidantes más comúnmente usados (por ej., dicromato de piridinio), aunque las reacciones



usualmente requieren un tiempo mucho más largo para finalizar. La segunda etapa de esta síntesis comprende la reacción de Wittig del 4-ceto compuesto 2 estéricamente impedido con un iluro preparado a partir de bromuro de metiltrifenilfosfonio y *n*-butil-litio. También pueden usarse otras bases para la generación del metileno fosforano reactivo, como *t*-BuOK, NaNH<sub>2</sub>, NaH, K/HMPT, NaN(TMS)<sub>2</sub>, etc. Para la preparación del 4-metilen compuesto 3 pueden usarse algunas modificaciones descritas del procedimiento de Wittig, por ej., reacción de 2 con metilentrifenil-fosforano activado [Corey et al., *Tetrahedron Lett.* 26, 555 (1985)]. Alternativamente, pueden aplicarse otros métodos ampliamente usados para la metilenoación de cetonas no reactivas, por ej., la reacción de Wittig-Horner con el PO-iluro obtenido a partir del óxido de metildifenilfosfina tras la desprotonación con *n*-butil-litio [Schosse et al., *Chimia* 30, 197 (1976)], o la reacción de la cetona con metilsulfinato de sodio [Corey et al., *J. Org. Chem.* 28, 1128 (1963)] y metilsulfinato de potasio [Greene et al., *Tetrahedron Lett.* 3755 (1976)]. La reducción del éster 3 con hidruro de litio y aluminio u otros agentes reductores adecuados (por ej., DIBALH) proporcionó el diol 4 el cual se oxidó subsiguientemente con peryodato de sodio para dar el derivado 5 de ciclohexanona. La siguiente etapa del procedimiento comprende la reacción de Peterson de la cetona 5 con acetato de metil(trimetilsililo). El éster alílico 6 resultante se trató con hidruro de diisobutilaluminio y el alcohol alílico 7 formado se transformó a su vez en el óxido de fosfina 8 con el anillo A. La conversión de 7 en 8 implicó 3 etapas, a saber, la tosilación *in situ* con *n*-butil-litio y cloruro de *p*-toluensulfonilo, seguida por reacción con la sal difenilfosfina de litio y oxidación con peróxido de hidrógeno.

Pueden sintetizarse varios compuestos tipo 2-metilen-19-nor-vitamina D de la estructura general IV usando el sintón 8 con el anillo A y la cetona II apropiada de Windaus-Grundmann que tenga la estructura de cadena lateral deseada. Así, por ejemplo, la condensación de Wittig-Horner del carbanión de fosfinoxi de litio generado a partir de 8 y *n*-butil-litio con la cetona 9 de Grundmann 25-hidroxi protegida preparada según un procedimiento publicado [Sicinski et al., *J. Med. Chem.* 37, 3730 (1994)] dio el compuesto 10 protegido tipo vitamina esperado. Éste, después de la desprotección con la resina de intercambio de cationes AG 50W-X4 dio la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-2-metilen-19-nor-vitamina D<sub>3</sub> (11).

La etapa final del procedimiento fue la hidrogenación catalítica homogénea selectiva de la unidad de exometileno en el átomo de carbono 2 en la vitamina 11 realizada eficientemente en presencia de cloruro de tris(trifenilfosfina)rodio(I) [catalizador de Wilkinson, (F<sub>3</sub>P)<sub>3</sub>RhCl]. Tales condiciones de reducción permitieron reducir solo la unidad C(2)=CH<sub>2</sub> dejando el resto butadieno C(5)-C(8) inafectado. El material aislado es una mezcla de epímeros (aprox. 1:1) de las 2-metil-19-nor-vitaminas 12 y 13 que difieren en la configuración en C-2. La mezcla puede usarse sin separación o, si se desea, los 2 $\alpha$ - y 2 $\beta$ -isómeros individuales pueden separarse mediante un sistema eficiente de HPLC.

También se observó una quimioselectividad similar en las reacciones de hidroboração para sintetizar los 2-hidroxielil derivados 20 y 21 (véase el Esquema III). Para este fin, como reactivo se usó 9-borabicyclo(3,3,1)nonano (9-BBN) condiciones de reacción análogas a las usadas por Okamura para la hidroboração de compuestos simples derivados de vitamina D. Véanse *J. Org. Chem.* 1978, 43, 1653-1656 y *J. Org. Chem.* 1977, 42, 2284-2291. Puesto que esta bibliografía precedente estaba relacionada con la hidroboração de 1-desoxi compuestos, a saber, (5E)- y (5Z)-isómeros de vitamina D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>, el procedimiento se ensayó en primer lugar usando 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> como compuesto modelo. El intermedio organoborano formado se oxidó subsiguientemente con peróxido de hidrógeno básico. Tales condiciones de hidroboração-oxidación permitieron la hidroxilación exclusiva de la unidad C(2)=CH<sub>2</sub> en la vitamina 11, dejando el resto dieno intercíclico C(5)=C(6)-C(7)=C(8) inafectado. La mezcla de epímeros aislados de los 2-hidroxielil derivados 20 y 21 (aprox. 1:2, 35% de rendimiento) se purificó y separó por HPLC de fase directa e inversa.

La epimerización de C-20 se consiguió mediante la condensación análoga del óxido de fosfina 8 con la cetona 15 de Grundmann 20(5)-25-hidroxi protegida (ESQUEMA II) y proporcionó la 19-nor-vitamina 16 la cual, después de la hidrólisis de los grupos protectores de los restos hidroxilo dio 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-2-metilen-19-nor-vitamina D<sub>3</sub> (17). La hidrogenación de 17 usando el catalizador de Wilkinson proporcionó la mezcla esperada de los análogos 2-metil-19-nor-vitamina D 18 y 19. La hidroboração subsiguiente con 9-BBN dio los 20(S)-2-hidroxielil derivados 22 y 23 (véase el Esquema III).

Como se advirtió anteriormente, pueden sintetizarse otros análogos de 2-metil-19-nor-vitamina D por el método descrito en la presente memoria. Por ejemplo, puede obtenerse 1 $\alpha$ -hidroxi-2-metilen-19-nor-vitamina D<sub>3</sub> proporcionando la cetona de Grundmann (g); la reducción subsiguiente del grupo exometileno del anillo A en el compuesto formado puede dar la correspondiente mezcla epímera de compuestos 1 $\alpha$ -hidroxi-2-metil-19-nor-vitamina D<sub>3</sub>.

También se conocen varios oxa-análogos de vitamina D<sub>3</sub> y sus síntesis. Por ejemplo, análogos 20-oxa son descritos por N. Kubodera et al., *Chem. Farm. Bull.*, 34, 2286 (1986), y Abe et al., *FEBS Lett.* 222, 58, 1987. Varios análogos 22-oxa son descritos por E. Murayama et al., *Chem. Farm. Bull.*, 34, 4410 (1986), Abe et al., *FEBS Lett.*, 226, 58 (1987), Solicitud PCT Internacional No. WO 90/09991 y Solicitud de Patente Europea, número de publicación 184 112, y un análogo 23-oxa es descrito en la Solicitud de Patente Europea, número de publicación 78704, así como en la Patente de EE.UU. 4.772.433.

Esta invención se describe mediante los siguientes ejemplos ilustrativos. En estos ejemplos, los productos específicos identificados mediante números arábigos (por ej., 1, 2, 3, etc.) se refieren a estructuras específicas así identificadas en la descripción precedente y en el ESQUEMA I y el ESQUEMA II.

Los ejemplos de preparación 1 y 2 no son parte de la invención.

## 5 Ejemplo de preparación 1

Preparación de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-2 $\alpha$ - y 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-2 $\beta$ -metil-19-nor-vitamina D<sub>3</sub> (12 y 13).

Con referencia en primer lugar al ESQUEMA I, el derivado quinicato de metilo 1 de partida se obtuvo a partir de ácido (-)-quinico comercial como se describió previamente [Perlman et al., *Tetrahedron Lett.* 32, 7663 (1991) y DeLuca et al., Patente de EE.UU. No. 5.086.191]. 1: p.f. 82-82,5°C (en hexano), <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,098, 0,110, 0,142, y 0,159 (cada uno 3H, cada uno s, 4 x SiCH<sub>3</sub>), 0,896 y 0,911 (9H y 9H, cada uno s, 2 x Si-*t*-Bu), 1,820 (1H, dd, J = 13,1, 10,3 Hz), 2,02 (1H, ddd, J = 14,3, 4,3, 2,4 Hz), 2,09 (1H, dd, J = 14,3, 2,8 Hz), 2,19 (1H, ddd, J = 13,1, 4,4, 2,4 Hz), 2,31 (1H, d, J = 2,8 Hz, OH), 3,42 (1H, m; después D<sub>2</sub>O dd, J = 8,6, 2,6 Hz), 3,77 (3H, s), 4,12 (1H, m), 4,37 (1H, m), 4,53 (1H, br s, OH).

(a) Oxidación del grupo 4-hidroxi en el derivado quinicato de metilo 1.

15 Éster de metilo del ácido (3R,5R)-3,5-bis[(*tert*-butildimetilsililo)oxi]-1-hidroxi-4-oxociclohexanocarboxílico (2). A una mezcla agitada de cloruro de rutenio(III) hidrato (434 mg, 2,1 mmoles) y peryodato de sodio (10,8 g, 50,6 mmoles) en agua (42 mL) se añadió una disolución de quinicato de metilo 1 (6,09 g, 14 mmoles) en CCl<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CN (1:1, 64 mL). Se continuó con agitación vigorosa durante 8 h. Se añadieron unas pocas gotas de 2-propanol, la mezcla se vertió en agua y se extrajo con cloroformo. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con agua, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporaron para dar un residuo oleoso oscuro (aprox. 5 g) el cual se purificó por cromatografía rápida. La elución con hexano/acetato de etilo (8:2) dio la 4-cetona 2 aceitosa y pura (3,4 g, 56%): <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,054, 0,091, 0,127, y 0,132 (cada uno 3H, cada uno s, 4 x SiCH<sub>3</sub>), 0,908 y 0,913 (9H y 9H, cada uno s, 2 x Si-*t*-Bu), 2,22 (1H, dd, J = 13,2, 11,7 Hz), 2,28 (1H, ~dt, J = 14,9, 3,6 Hz), 2,37 (1H, dd, J = 14,9, 3,2 Hz), 2,55 (1H, ddd, J = 13,2, 6,4, 3,4 Hz), 3,79 (3H, s), 4,41 (1H, t, J ~3,5 Hz), 4,64 (1H, s, OH), 5,04 (1H, dd, J = 11,7, 6,4 Hz); MS m/z (intensidad relativa) ningún M<sup>+</sup>, 375 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu, 32), 357 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu - H<sub>2</sub>O, 47), 243 (31), 225 (57), 73 (100).

(b) Reacción de Wittig de la 4-cetona 2.

30 Éster de metilo del ácido (3R,5R)-3,5-bis[(*tert*-butildimetilsililo)oxi]-1-hidroxi-4-metilenociclohexanocarboxílico (3). Se añadió gota a gota *n*-BuLi (2,5 M en hexanos, 6,0 mL, 15 mmoles) a bromuro de metiltrifenilfosfonio (2,813 g, 7,88 mmoles) en THF anhidro (32 mL) a 0°C en atmósfera de argón con agitación. A continuación, se añadió otra porción de MeF<sub>3</sub>P<sup>+</sup>Br<sup>-</sup> (2,813 g, 7,88 mmoles) y la disolución se agitó a 0°C durante 10 min y a temperatura ambiente durante 40 min. La mezcla rojo-naranja se enfrió otra vez a 0°C y se añadió al matraz de reacción con un sifón una disolución de 4-cetona 2 (1,558 g, 3,6 mmoles) en THF anhidro (16 + 2 mL) durante 20 min. La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 h y a temperatura ambiente durante 3 h. A continuación, la mezcla se vertió cuidadosamente en salmuera que contenía HCl al 1% y se extrajo con acetato de etilo y benceno. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con una disolución diluida de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporaron para dar un residuo aceitoso naranja (aprox. 2,6 g) el cual se purificó por cromatografía rápida. La elución con hexano/acetato de etilo (9:1) dio el 4-metilen compuesto 3 puro como un aceite incoloro (368 mg, 24%): <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,078, 0,083, 0,092, y 0,115 (cada uno 3H, cada uno s, 4 x SiCH<sub>3</sub>), 0,889 y 0,920 (9H y 9H, cada uno s, 2 x Si-*t*-Bu), 1,811 (1H, dd, J = 12,6, 11,2 Hz), 2,10 (2H, m), 2,31 (1H, dd, J = 12,6, 5,1 Hz), 3,76 (3H, s), 4,69 (1H, t, J = 3,1 Hz), 4,78 (1H, m), 4,96 (2H, m; después D<sub>2</sub>O 1H, br s), 5,17 (1H, t, J = 1,9 Hz); MS m/z (intensidad relativa) ningún M<sup>+</sup>, 373 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu, 57), 355 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu - H<sub>2</sub>O, 13), 341 (19), 313 (25), 241 (33), 223 (37), 209 (56), 73 (100).

(c) Reducción del grupo éster en el 4-metilen compuesto 3.

45 [(3'R,5'R)-3',5'-Bis[(*tert*-butildimetilsililo)oxi]-1-hidroxi-4'-metilenociclohexil]metanol (4). (i) A una disolución agitada del éster 3 (90 mg, 0,21 mmoles) en THF anhidro (8 mL) se añadió hidruro de litio y aluminio (60 mg, 1,6 mmoles) a 0°C en atmósfera de argón. El baño de refrigeración se separó después de 1 h y la agitación se continuó a 6°C durante 12 h y a temperatura ambiente durante 6 h. El exceso de reactivo se descompuso con disolución acuosa saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo y éter, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó. La cromatografía sùbita del residuo con hexano/acetato de etilo (9:1) dio el sustrato sin reaccionar (12 mg) y un diol cristalino puro 4 (35 mg, 48% basado en el éster 3 recuperado): <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O)  $\delta$  0,079, 0,091, 0,100, y 0,121 (cada uno 3H, cada uno s, 4 x SiCH<sub>3</sub>), 0,895 y 0,927 (9H y 9H, cada uno s, 2 x Si-*t*-Bu), 1,339 (1H, t, J ~ 12 Hz), 1,510 (1H, dd, J = 14,3, 2,7 Hz), 2,10 (2H, m), 3,29 y 3,40 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,0 Hz), 4,66 (1H, t, J ~ 2,8 Hz), 4,78 (1H, m), 4,92 (1H, t, J = 1,7 Hz), 5,13 (1H, t, J = 2,0 Hz); MS m/z (intensidad relativa) ningún M<sup>+</sup>, 345 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu, 8), 327 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu - H<sub>2</sub>O, 22), 213 (28), 195 (11), 73 (100). (ii) Se añadió hidruro de diisobutilaluminio (1,5 M en tolueno, 2,0 mL, 3 mmoles) a una disolución del éster 3 (215 mg, 0,5 mmoles) en éter anhidro (3 mL) a -78°C en atmósfera de argón. La mezcla se agitó a -78°C durante 3 h y a -24°C durante 1,5 h, se diluyó con éter (10 mL) y la reacción se paró rápidamente mediante la adición lenta de tartrato de potasio y sodio 2N. La disolución se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante 15 min, a continuación se vertió sobre salmuera y se extrajo con

acetato de etilo y éter. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con HCl diluido (aprox. 1%) HCl, y salmuera, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporaron. El residuo cristalino se purificó por cromatografía rápida. La elución con hexano/acetato de etilo (9:1) dio el diol 4 cristalino (43 mg, 24%).

(d) Escisión de diol vicinal 4.

- 5 (3R,5R)-3,5-Bis[(*tert*-butildimetilsililo)oxi]-4-metilenociclohexanona (5). Se añadió agua saturada de peryodato de sodio (2,2 mL) a una disolución del diol 4 (146 mg, 0,36 mmoles) en metanol (9 mL) a 0°C. La disolución se agitó a 0°C durante 1 h, se vertió sobre salmuera y se extrajo con éter y benceno. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporaron. El residuo aceitoso se disolvió en hexano (1 mL) y se aplicó sobre un cartucho de sílice Sep-Pak. El 4-metilenociclohexanona derivado 5 (110 mg, 82%) se eluyó con hexano/acetato de etilo (95:5) como un aceite incoloro: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,050 y 0,069 (6H y 6H, cada uno s, 4 x SiCH<sub>3</sub>), 0,881 (18H, s, 2 x Si-*t*-Bu), 2,45 (2H, ddd, J = 14,2, 6,9, 1,4 Hz), 2,64 (2H, ddd, J = 14,2, 4,6, 1,4 Hz), 4,69 (2H, dd, J = 6,9, 4,6 Hz), 5,16 (2H, s); MS m/z (intensidad relativa) ningún M<sup>+</sup>, 355 (M<sup>+</sup> - Me, 3), 313 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu, 100), 73 (76).

(e) Preparación del éster alílico 6.

- 15 Éster de metilo del ácido [(3'R,5'R)-3',5'-bis[(*tert*-butildimetilsililo)oxi]-4'-metilenociclohexilideno]acético (6). A una disolución de diisopropilamina (37 mL, 0,28 mmoles) en THF anhidro (200 mL) se añadió *n*-BuLi (2,5 M en hexanos, 113 mL, 0,28 mmoles) en atmósfera de argón a -78°C con agitación, y a continuación, se añadió acetato de metil(trimetilsililo) (46 mL, 0,28 mmoles). Después de 15 min, se añadió gota a gota el ceto compuesto 5 (49 mg, 0,132 mmoles) en THF anhidro (200 + 80 mL). La disolución se agitó a -78°C durante 2 h y la mezcla de reacción se trató con disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl, se vertió sobre salmuera y se extrajo con éter y benceno. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporaron. El residuo se disolvió en hexano (1 mL) y se aplicó sobre un cartucho de sílice Sep-Pak. La elución con hexano y hexano/acetato de etilo (98:2) dio el éster alílico 6 puro (50 mg, 89%) como un aceite incoloro: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,039, 0,064, y 0,076 (6H, 3H, y 3H, cada uno s, 4 x SiCH<sub>3</sub>), 0,864 y 0,884 (9H y 9H, cada uno s, 2 x Si-*t*-Bu), 2,26 (1H, dd, J = 12,8, 7,4 Hz), 2,47 (1H, dd, J = 12,8, 4,2 Hz), 2,98 (1H, dd, J = 13,3, 4,0 Hz), 3,06 (1H, dd, J = 13,3, 6,6 Hz), 3,69 (3H, s), 4,48 (2H, m), 4,99 (2H, s), 5,74 (1H, s); MS m/z (intensidad relativa) 426 (M<sup>+</sup>, 2), 411 (M<sup>+</sup> - Me, 4), 369 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu, 100), 263 (69).

(f) Reducción del éster alílico 6.

- 30 2-[(3'R,5'R)-3',5'-Bis[(*tert*-butildimetilsililo)oxi]-4'-metilenociclohexilideno]etanol (7). Se añadió lentamente hidruro de diisobutilaluminio (1,5 M en tolueno, 1,6 mL, 2,4 mmoles) a una disolución agitada del éster alílico 6 (143 mg, 0,33 mmoles) en tolueno/cloruro de metileno (2:1, 5,7 mL) a -78°C en atmósfera de argón. La agitación se continuó a -78°C durante 1 h y a -46°C (ciclohexanona/baño de hielo seco) durante 25 min. La mezcla se trató mediante la adición lenta de tartrato de potasio y sodio (2N, 3 mL), HCl ac. (2N, 3 mL) y H<sub>2</sub>O (12 mL), y luego se diluyó con cloruro de metileno (12 mL) y se extrajo con éter y benceno. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con HCl diluido (aprox. 1%), y salmuera, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía rápida. La elución con hexano/acetato de etilo (9:1) dio el alcohol alílico 7 cristalino (130 mg, 97%): <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,038, 0,050, y 0,075 (3H, 3H, y 6H, cada uno s, 4 x SiCH<sub>3</sub>), 0,876 y 0,904 (9H y 9H, cada uno s, 2 x Si-*t*-Bu), 2,12 (1H, dd, J = 12,3, 8,8 Hz), 2,23 (1H, dd, J = 13,3, 2,7 Hz), 2,45 (1H, dd, J = 12,3, 4,8 Hz), 2,51 (1H, dd, J = 13,3, 5,4 Hz), 4,04 (1H, m; después D<sub>2</sub>O dd, J = 12,0, 7,0 Hz), 4,17 (1H, m; después D<sub>2</sub>O dd, J = 12,0, 7,4 Hz), 4,38 (1H, m), 4,49 (1H, m), 4,95 (1H, br s), 5,05 (1H, t, J = 1,7 Hz), 5,69 (1H, ~ t, J = 7,2 Hz); MS m/z (intensidad relativa) 398 (M<sup>+</sup>, 2), 383 (M<sup>+</sup> - Me, 2), 365 (M<sup>+</sup> - Me - H<sub>2</sub>O, 4), 341 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu, 78), 323 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu - H<sub>2</sub>O, 10), 73 (100); masa exacta calculada para C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub> 416.3290, encontrada 416.3279.

(g) Conversión del alcohol alílico 7 en el óxido de fosfina 8.

- 45 Óxido de 2-[(3'R,5'R)-3',5'-bis[(*tert*-butildimetilsililo)oxi]-4'-metilenociclohexilideno]etil]difosfina (8). Se añadió *n*-BuLi (2,5 M en hexanos, 105 mL, 0,263 mmoles) al alcohol alílico 7 (105 mg, 0,263 mmoles) en THF anhidro (2,4 mL) en atmósfera de argón a 0°C. Se disolvió cloruro de tosilo recién recristalizado (50,4 mg, 0,264 mmoles) en THF anhidro (480 mL) y se añadió a la disolución de alcohol alílico-BuLi. La mezcla se agitó a 0°C durante 5 min y se dejó reposar a 0°C. En otro matraz secó en el que el aire se había reemplazado con argón, se añadió *n*-BuLi (2,5 M en hexanos, 210 mL, 0,525 mmoles) a Ph<sub>2</sub>Ph (93 mL, 0,534 mmoles) en THF anhidro (750 mL) a 0°C con agitación. La disolución roja se vertió con un sifón bajo presión de argón a la disolución de tosilo hasta que el color naranja persistió (aprox. se añadió 1/2 de la disolución). La mezcla resultante se agitó 30 min más a 0°C, y se paró rápidamente mediante la adición de H<sub>2</sub>O (30 mL). Los disolventes se evaporaron a presión reducida y el residuo se redisolvió en cloruro de metileno (2,4 mL) y se agitó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% a 0°C durante 1 h. La capa orgánica se separó, se lavó con una disolución acuosa fría de sulfito de sodio y H<sub>2</sub>O, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía rápida. La elución con benceno/acetato de etilo (6:4) dio el óxido de fosfina 8 semicristalino (134 mg, 87%): <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,002, 0,011, y 0,019 (3H, 3H, y 6H, cada uno s, 4 x SiCH<sub>3</sub>), 0,855 y 0,860 (9H y 9H, cada uno s, 2 x Si-*t*-Bu), 2,0 - 2,1 (3H, br m), 2,34 (1H, m), 3,08 (1H, m), 3,19 (1H, m), 4,34 (2H, m), 4,90 y 4,94 (1H y 1H, cada uno s.), 5,35 (1H, ~ q, J = 7,4 Hz), 7,46 (4H, m), 7,52 (2H, m), 7,72 (4H, m); MS m/z (intensidad relativa) ningún M<sup>+</sup>, 581 (M<sup>+</sup> - 1, 1), 567 (M<sup>+</sup> - Me, 3), 525 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu, 100), 450 (10), 393 (48).

(h) Condensación de Wittig-Horner de la 25-hidroxi cetona de Grundmann 9 protegida con el óxido de fosfina 8.

1 $\alpha$ ,25-Dihidroxi-2-metilen-19-nor-vitamina D<sub>3</sub> (11). A una disolución del óxido de fosfina 8 (33,1 mg, 56,8 mmoles) en THF anhidro (450 mL) a 0°C se añadió lentamente *n*-BuLi (2,5 M en hexanos, 23 mL, 57,5 mmoles) en atmósfera de argón con agitación. La disolución se volvió de color naranja oscuro. La mezcla se enfrió a -78°C y se añadió lentamente una disolución preenfriada (-78°C) en THF anhidro (200 + 100 mL) de la hidrox cetona 9 protegida (9,0 mg, 22,8 mmoles), preparada según un procedimiento publicado [Sicinski et al., J. Med. Chem. 37, 3730 (1994)]. La mezcla se agitó en atmósfera de argón a -78°C durante 1 h y a 0°C durante 18 h. Se añadió acetato de etilo, y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó. El residuo se disolvió en hexano y se aplicó sobre un cartucho de sílice Sep-Pak, y se lavó con hexano/acetato de etilo (99:1, 20 mL) para dar el 19-nor-vitamina derivado 10 (13,5 mg, 78%). A continuación, el cartucho Sep-Pak se lavó con hexano/acetato de etilo (96:4, 10 mL) para recuperar parte de la cetona 9 con los anillos C,D sin modificar (2 mg), y con acetato de etilo (10 mL) para recuperar el óxido de difenilfosfina (20 mg). Con fines analíticos, una muestra de la vitamina 10 protegida se purificó adicionalmente por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando el sistema disolvente hexano/acetato de etilo (99,9:0,1). El compuesto puro 10 se eluyó a R<sub>v</sub> 26 mL como un aceite incoloro: UV (en hexano)  $\lambda_{\max}$  244, 253, 263 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,025, 0,049, 0,066, y 0,080 (cada uno 3H, cada uno s, 4 x SiCH<sub>3</sub>), 0,546 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,565 (6H, q, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>), 0,864 y 0,896 (9H y 9H, cada uno s, 2 x Si-*t*-Bu), 0,931 (3H, d, J = 6,0 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 0,947 (9H, t, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,188 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 2,00 (2H, m), 2,18 (1H, dd, J = 12,5, 8,5 Hz, 4 $\beta$ -H), 2,33 (1H, dd, J = 13,1, 2,9 Hz, 10 $\beta$ -H), 2,46 (1H, dd, J = 12,5, 4,5 Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,52 (1H, dd, J = 13,1, 5,8 Hz, 10 $\alpha$ -H), 2,82 (1H, br d, J = 12 Hz, 9 $\beta$ -H), 4,43 (2H, m, 1 $\beta$ - y 3 $\alpha$ -H), 4,92 y 4,97 (1H y 1H, cada uno s, =CH<sub>2</sub>), 5,84 y 6,22 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,0 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 758 (M<sup>+</sup>, 17), 729 (M<sup>+</sup> - Et, 6), 701 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu, 4), 626 (100), 494 (23), 366 (50), 73 (92).

La vitamina 10 protegida (4,3 mg) se disolvió en benceno (150 mL) y se añadió la resina (AG 50W-X4, 60 mg; prelavada con metanol) en metanol (800 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 17 h, se diluyó con acetato de etilo/éter (1:1, 4 mL) y se decantó. La resina se lavó con éter (8 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporaron. El residuo se purificó por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando el sistema disolvente hexano/2-propanol (9:1). Se recogió la 2-metilen-19-nor-vitamina 11 (2,3 mg, 97%) analíticamente pura a R<sub>v</sub> 29 mL (la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> eluyó a R<sub>v</sub> 52 mL en el mismo sistema) como un sólido blanco: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  243,5, 252, 262,5 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,552 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,941 (3H, d, J = 6,4 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,222 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 2,01 (2H, m), 2,27 - 2,36 (2H, m), 2,58 (1H, m), 2,80 - 2,88 (2H, m), 4,49 (2H, m, 1 $\beta$ - y 3 $\alpha$ -H), 5,10 y 5,11 (1H y 1H, cada uno s, =CH<sub>2</sub>), 5,89 y 6,37 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,3 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 416 (M<sup>+</sup>, 83), 398 (25), 384 (31), 380 (14), 351 (20), 313 (100); masa exacta calculada para C<sub>27</sub>R<sub>44</sub>O<sub>3</sub> 416,3290, encontrada 416,3279.

(i) Hidrogenación de la 2-metilen-19-nor-vitamina 11.

1 $\alpha$ ,25-Dihidroxi-2 $\alpha$ - y 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-2 $\beta$ -metil-19-nor-vitamina D<sub>3</sub> (12 y 13). Se añadió cloruro de tris(trifenilfosfina)rodio(I) (2,3 mg, 2,5 mmoles) a benceno seco (2,5 mL) presurizado con hidrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se formó una disolución homogénea (aprox. 45 min). A continuación, se añadió una disolución de la vitamina 11 (1,0 mg, 2,4 mmoles) en benceno seco (0,5 mL) y se dejó que la reacción transcurriera bajo una corriente continua de hidrógeno durante 3 h. El benceno se separó a vacío, y al residuo se añadió hexano/acetato de etilo (1:1, 2 mL). La mezcla se aplicó sobre un cartucho de sílice Sep-Pak y ambas 2-metil vitaminas fueron eluidas con el mismo sistema disolvente (20 mL). Se consiguió una purificación adicional por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando hexano/2-propanol (9:1) como un sistema disolvente. La mezcla (aprox. 1:1) de 2-metil-19-nor-vitaminas (2 $\alpha$ - y 2 $\beta$ -epímeros 12 y 13; 0,80 mg, 80%) dio un único pico a R<sub>v</sub> 33 mL.

12 y 13: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  243, 251, 261,5 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,536 y 0,548 (3H y 3H, cada uno s, 2 x 18-H<sub>3</sub>), 0,937 (6H, d, J = 6,3 Hz, 2 x 21-H<sub>3</sub>), 1,133 y 1,144 (3H y 3H, cada uno d, J ~ 6 Hz, 2 x 2-CH<sub>3</sub>), 1,219 [12H, s, 2 x (26- y 27-H<sub>3</sub>)], 2,60 (1H, dd, J = 13,0, 4,6 Hz), 2,80 (3H, m), 3,08 (1H, dd, J = 12,6, 4,0 Hz), 3,51 (1H, dt, J = 4,6, 10,2 Hz), 3,61 (1H, dt, J = 4,5, 9,1 Hz), 3,90 (1H, estrecho m), 3,96 (1H, estrecho m), 5,82, 5,87, 6,26, y 6,37 (cada uno 1H, cada uno d, J = 11,2 Hz); MS m/z (intensidad relativa) 418 (M<sup>+</sup>, 100), 400 (25), 385 (15), 289 (30), 245 (25).

La separación de ambos epímeros se consiguió por HPLC de fase inversa (columna 10 mm x 25 cm Zorbax-ODS, 4 mL/min) usando metanol/agua (85:15) como sistema disolvente. La 2 $\beta$ -metil vitamina 13 (0,35 mg, 35%) se recogió a R<sub>v</sub> 41 mL y su 2 $\alpha$ -epímero 12 (0,34 mg, 34%) a R<sub>v</sub> 46 mL.

12: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  243, 251, 261 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,536 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,937 (3H, d, J = 6,4 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,134 (3H, d, J = 6,9 Hz, 2 $\alpha$ -CH<sub>3</sub>), 1,218 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 2,13 (1H, ~ t, J ~ 12 Hz, 4 $\beta$ -H), 2,22 (1H, br d, J = 13 Hz, 10 $\beta$ -H), 2,60 (1H, dd, J = 12,8, 4,3 Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,80 (2H, m, 9 $\beta$ - y 10 $\alpha$ -H), 3,61 (1H, m, w/2 = 24 Hz, 3 $\alpha$ -H), 3,96 (1H, m, w/2 = 12 Hz, 1 $\beta$ -H), 5,82 y 6,37 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,1 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 418 (M<sup>+</sup>, 62), 400 (32), 385 (17), 289 (36), 271 (17), 253 (20), 245 (43), 69 (100), 59 (74); masa exacta calculada para C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub> 418,3447, encontrada 418,3441.

13: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  242, 250,5, 261 nm;  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,548 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,940 (3H, d, J = 6,4 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,143 (3H, d, J = 6,8 Hz, 2 $\beta$ -CH<sub>3</sub>), 1,220 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 2,34 (1H, dd, J = 13,7, 3,3 Hz, 4 $\beta$ -H), 2,43 (1H, br d, J = 13,7 Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,80 (1H, dd, J = 12 y 4 Hz, 9 $\beta$ -H), 3,08 (1H, dd, J = 13,0, 4,2 Hz, 10 $\beta$ -H), 3,51 (1H, m, w/2 = 25 Hz, 1 $\beta$ -H), 3,90 (1H, m, w/2 = 11 Hz, 3 $\alpha$ -H), 5,87 y 6,26 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,2 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 418 ( $\text{M}^+$ , 63), 400 (47), 385 (16), 289 (40), 271 (32), 253 (27), 245 (47), 69 (100), 59 (64); masa exacta calculada para  $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_3$  418,3447, encontrada 418,3436.

### Ejemplo de preparación 2

Preparación de 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-2 $\alpha$ - y 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-2 $\beta$ -metil-19-nor-vitamina D<sub>3</sub> (18 y 19).

El ESQUEMA II ilustra la preparación de la cetona 15 de Grundmann 20(S)-25-hidroxi protegida, su condensación con el óxido de fosfina 8 (obtenido como se describió en el ejemplo 1) y la hidrogenación selectiva del grupo exometileno en el 2-metileno compuesto 17.

(a) Sililación de la hidroxi cetona 14.

20(S)-25-[(Trietilsilil)oxi]-des-A,B-colestán-8-ona (15). Una disolución de la cetona 14 (Tetronics, Inc.; 56 mg, 0,2 mmoles) e imidazol (65 mg, 0,95 mmoles) en DMF anhidro (1,2 mL) se trató con cloruro de trietilsililo (95 mL, 0,56 mmoles), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 4 h. Se añadieron acetato de etilo y agua, y la capa orgánica se separó. La capa de acetato de etilo se lavó con agua y salmuera, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se evaporó. El residuo se pasó a través de un cartucho de sílice Sep-Pak en hexano/acetato de etilo (9:1) y, después de evaporar, se purificó por HPLC (columna Zorbax-Sil de 9,4 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando hexano/acetato de etilo (9:1) como sistema disolvente. La cetona 15 hidroxi protegida pura (55 mg, 70%) fue eluida a R<sub>v</sub> 35 mL como un aceite incoloro:  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,566 (6H, q, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>), 0,638 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,859 (3H, d, J = 6,0 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 0,947 (9H, t, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,196 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 2,45 (1H, dd, J = 11,4, 7,5 Hz, 14 $\alpha$ -H).

(b) Condensación de Wittig-Homer de la cetona 15 de Grundmann 20(S)-25-hidroxi protegida con el óxido de fosfina 8.

20(S)-1 $\alpha$ ,25-Dihidroxi-2-metilen-19-nor-vitamina D<sub>3</sub> (17). A una disolución del óxido de fosfina 8 (15,8 mg, 27,1 mmoles) en THF anhidro (200 mL) a 0°C se añadió lentamente *n*-BuLi (2,5 M en hexanos, 11 mL, 27,5 mmoles) en atmósfera de argón con agitación. La disolución se volvió naranja intenso. La mezcla se enfrió a -78°C y se añadió lentamente una disolución preenfriada (-78°C) de la cetona 15 hidroxi protegida (8,0 mg, 20,3 mmoles) en THF anhidro (100 mL). La mezcla se agitó en atmósfera de argón a -78°C durante 1 h y a 0°C durante 18 h. Se añadió acetato de etilo, y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se evaporó. El residuo se disolvió en hexano y se aplicó sobre un cartucho de sílice Sep-Pak, y se lavó con hexano/acetato de etilo (99,5:0,5, 20 mL) para dar el 19-nor-vitamina derivado 16 (7 mg, 45%) como un aceite incoloro. A continuación, el cartucho de Sep-Pak se lavó con hexano/acetato de etilo (96:4, 10 mL) para recuperar parte de la cetona 15 con los anillos C,D sin modificar (4 mg), y con acetato de etilo (10 mL) para recuperar el óxido de difenilfosfina (9 mg). Con fines analíticos, una muestra de la vitamina 16 protegida se purificó adicionalmente por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando hexano/acetato de etilo (99,9:0,1) como sistema disolvente.

16: UV (en hexano)  $\lambda_{\max}$  244, 253,5, 263 nm;  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\lambda_{\max}$  0,026, 0,049, 0,066, y 0,080 (cada uno 3H, cada uno s, 4 x SiCH<sub>3</sub>), 0,541 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,564 (6H, q, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>), 0,848 (3H, d, J = 6,5 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 0,864 y 0,896 (9H y 9H, cada uno s, 2 x Si-*t*-Bu), 0,945 (9H, t, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,188 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 2,15 - 2,35 (4H, br m), 2,43 - 2,53 (3H, br m), 2,82 (1H, br d, J = 12,9 Hz, 9 $\beta$ -H), 4,42 (2H, m, 1 $\beta$ - y 3 $\alpha$ -H), 4,92 y 4,97 (1H y 1H, cada uno s, =CH<sub>2</sub>), 5,84 y 6,22 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,1 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 758 ( $\text{M}^+$ , 33), 729 ( $\text{M}^+$  - Et, 7), 701 ( $\text{M}^+$  - *t*-Bu, 5), 626 (100), 494 (25), 366 (52), 75 (82), 73 (69).

La vitamina 16 protegida (5,0 mg) se disolvió en benceno (160 mL) y se añadió la resina (AG 50W-X4, 70 mg; prelavada con metanol) en metanol (900 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 19 h, se diluyó con acetato de etilo/éter (1:1, 4 mL) y se decantó. La resina se lavó con éter (8 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ) y se evaporaron. El residuo se purificó por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando hexano/2-propanol (9:1) como sistema disolvente. La 2-metilen-19-nor-vitamina 17 analíticamente pura (2,6 mg, 95%) se recogió a R<sub>v</sub> 28 mL [El (20R)-análogo fue eluido a R<sub>v</sub> 29 mL y la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> a R<sub>v</sub> 52 mL en el mismo sistema] como un sólido blanco: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  243,5, 252,5, 262,5 nm;  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,551 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,858 (3H, d, J = 6,6 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,215 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 1,95 - 2,04 (2H, m), 2,27 - 2,35 (2H, m), 2,58 (1H, dd, J = 13,3, 3,7 Hz), 2,80 - 2,87 (2H, m), 4,49 (2H, m, 1 $\beta$ - y 3 $\alpha$ -H), 5,09 y 5,11 (1H y 1H, cada uno s, =CH<sub>2</sub>), 5,89 y 6,36 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,3 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 416 ( $\text{M}^+$ , 100), 398 (26), 380 (13), 366 (21), 313 (31); masa exacta calculada para  $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$  416,3290, encontrada 416,3275.

(c) Hidrogenación de la 2-metilen-19-nor-vitamina 17.

20(S)-1 $\alpha$ ,25-Dihidroxi-2 $\alpha$ - y 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-2 $\beta$ -metil-19-nor-vitamina D<sub>3</sub> (18 y 19). Se añadió cloruro de tris(trifenilfosfina)rodio(I) (2,3 mg, 2,5 mmoles) a benceno seco (2,5 mL) presurizado con hidrógeno. La mezcla se

- agitó a temperatura ambiente hasta que se formó una disolución homogénea (aprox. 45 min). A continuación, se añadió una disolución de la vitamina 17 (1,0 mg, 2,4 mmoles) en benceno seco (0,5 mL) y se dejó que la reacción transcurriera en una corriente continua de hidrógeno durante 3 h. El benceno se separó a vacío, y se añadió hexano/acetato de etilo (1:1, 2 mL) al residuo. La mezcla se aplicó sobre un cartucho de sílice Sep-Pak y ambas 2-metil vitaminas fueron eluidas con el mismo sistema disolvente (20 mL). Se consiguió una purificación adicional por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando hexano/2-propanol (9:1) como sistema disolvente. La mezcla (aprox. 1:1) de 2-metil-19-nor-vitaminas (epímeros 2 $\alpha$  y 2 $\beta$  18 y 19; 0,43 mg, 43%) dio un único pico a R<sub>v</sub> 31 mL.
- 18 y 19: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  243,251, 261 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,534 y 0,546 (3H y 3H, cada uno s, 2 x 18-H<sub>3</sub>), 0,852 y 0,857 (3H y 3H, cada uno d, J = 6,5 Hz, 2 x 21-H<sub>3</sub>), 1,133 (3H, d, J = 6,7 Hz, 2-CH<sub>3</sub>), 1,143 (3H, d, J = 6,5 Hz, 2-CH<sub>3</sub>), 1,214 [12H, s, 2 x (26- y 27-H<sub>3</sub>)], 2,60 (1H, dd, J = 12,7, 4,5 Hz), 2,80 (3H, m), 3,08 (1H, dd, J = 13,1, 4,3 Hz), 3,51 (1H, br m; después D<sub>2</sub>O dt, J = 4,5, 10,0 Hz), 3,61 (1H, br m; después D<sub>2</sub>O dt, J = 4,4, 9,2 Hz), 3,90 (1H, estrecho m), 3,96 (1H, estrecho m), 5,82, 5,87, 6,26, y 6,37 (cada uno 1H, cada uno d, J = 11,3 Hz); MS m/z (intensidad relativa) 418 (M<sup>+</sup>, 100), 400 (45), 385 (20), 289 (38), 245 (47).
- 15 La separación de ambos epímeros se consiguió por HPLC de fase inversa (columna Zorbax-ODS de 10 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando metanol/agua (85:15) como sistema disolvente. La 2 $\beta$ -metil vitamina 19 (16%) se recogió a R<sub>v</sub> 36 mL y su 2 $\alpha$ -epímero 18 (20%) at R<sub>v</sub> 45 mL.
- 18: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  242,5, 251, 261 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,534 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,852 (3H, d, J = 6,6 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,133 (3H, d, J = 6,9 Hz, 2 $\alpha$ -CH<sub>3</sub>), 1,214 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 2,13 (1H, ~ t, J ~ 12 Hz, 4 $\beta$ -H), 2,22 (1H, br d, J = 13 Hz, 10 $\beta$ -H), 2,60 (1H, dd, J = 12,8, 4,4 Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,80 (2H, m, 9 $\beta$ - y 10 $\alpha$ -H), 3,61 (1H, m, w/2 = 25 Hz, 3 $\alpha$ -H), 3,95 (1H, m, w/2 = 11 Hz, 1 $\beta$ -H), 5,82 y 6,37 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,2 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 418 (M<sup>+</sup>, 58), 400 (25), 385 (20), 289 (28), 271 (23), 253 (22), 245 (38), 69 (100), 59 (47)); masa exacta calculada para C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub> 418,3447, encontrada 418,3450.
- 19: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  242,5, 250,5, 261 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,547 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,857 (3H, d, J = 6,6 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,143 (3H, d, J = 6,8 Hz, 2 $\beta$ -CH<sub>3</sub>), 1,214 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 2,34 (1H, dd, J = 13,8, 3,1 Hz, 4 $\beta$ -H), 2,43 (1H, br d, J = 13,8 Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,80 (1H, dd, J = 12 y 4 Hz, 9 $\beta$ -H), 3,08 (1H, dd, J = 12,9, 4,4 Hz, 10 $\beta$ -H), 3,50 (1H, m, w/2 = 26 Hz, 1 $\beta$ -H), 3,89 (1H, m, w/2 = 11 Hz, 3 $\alpha$ -H), 5,86 y 6,26 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,2 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 418 (M<sup>+</sup>, 68), 400 (47), 385 (21), 289 (33), 271 (27), 253 (26), 245 (47), 69 (100), 59 (53); masa exacta calculada para C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub> 418,3447, encontrada 418,3448.
- 30 1 $\alpha$ ,25-Dihidroxi-2 $\alpha$ - y 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-2 $\beta$ -(hidroximetil)-19-norvitamina D<sub>3</sub> (20 y 21). Se añadió 9-borabicyclo[3,3,1]nonano (0,5 M en THF, 60 mL, 30 mmoles) a una disolución de la vitamina 11 (1,25 mg, 3 mmoles) en THF anhidro (50 mL) a temperatura ambiente (se observó evolución de hidrógeno). Después de 3 h de agitación, la mezcla se trató con metanol (20 mL), se agitó durante 15 min a temperatura ambiente, se enfrió a 0°C, y se trató sucesivamente con NaOH 6 M (10 mL, 60 mmoles) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (10 mL). La mezcla se calentó durante 1 h a 55°C, se enfrió, se añadieron benceno y salmuera, y la fase orgánica se separó, se secó y se evaporó. El residuo cristalino se disolvió en éter (0,5 mL) y se mantuvo en el congelador durante toda la noche. La disolución en éter se separó cuidadosamente de los cristales precipitados de ciclooctanodiol y se evaporó. La separación del residuo se consiguió por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando hexano/2-propanol (85:15) como sistema disolvente. Trazas del sustrato sin reaccionar 11 fueron eluidas at R<sub>v</sub> 16 mL, mientras que las 2-hidroximetil vitaminas 20 y 21 isómeras se recogieron a R<sub>v</sub> 33 mL y 40 mL, respectivamente. La purificación adicional de ambos productos por HPLC de fase inversa (columna Zorbax-ODS de 10 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando metanol/agua (9:1) como sistema disolvente dio la vitamina 20 analíticamente pura (0,14 mg, 11%) y su 2 $\beta$ -isómero 21 (0,31 mg, 24%) recogidas a R<sub>v</sub> 26 mL y 23 mL, respectivamente.
- 20: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  242,5, 250,5, 261 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,536 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,939 (3H, d, J = 6,4 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,214 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 2,13 (1H, br d, J = 13,5 Hz, 10 $\beta$ -H), 2,21 (1H, ~ t, J = 12 Hz, 4 $\beta$ -H), 2,64 (1H, dd, J = 12,7, 4,5 Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,80 (2H, br d, J = 12,7 Hz, 9 $\beta$ -H), 2,90 (1H, br d, J = 13,5 Hz, 10 $\alpha$ -H), 3,95 - 4,1 (3H, br m, 2 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>OH y 3 $\alpha$ -H), 4,23 (1H, m, w/2 = 11 Hz, 1 $\beta$ -H), 5,79 y 6,41 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,1 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 434 (M<sup>+</sup>, 37), 416 (33), 398 (16), 383 (10), 305 (12), 287 (25), 269 (26), 245 (40), 69 (100), 59 (74); masa exacta calculada para C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub> 434,3396, encontrada 434,3397.
- 21: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  242, 250,5, 260,5 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,553 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,942 (3H, d, J = 6,5 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,220 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 2,31 (1H, br d, J = 14 Hz, 4 $\beta$ -H), 2,45 (1H, br d, J = 14 Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,79 (1H, br d, J = 13 Hz, 9 $\beta$ -H), 3,17 (1H, dd, J = 12,8, 4,2 Hz, 10 $\beta$ -H), 3,95 - 4,1 (3H, br m, 1 $\beta$ -H y 2 $\beta$ -CH<sub>2</sub>OH), 4,17 (1H, m, w/2 = 10 Hz, 3 $\alpha$ -H), 5,89 y 6,26 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,0 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 434 (M<sup>+</sup>, 50), 416 (46), 398 (20), 383 (11), 305 (14), 287 (26), 269 (30), 245 (50), 69 (100), 59 (75); masa exacta calculada para C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub> 434,3396, encontrada 434,3402.
- 20(S)-1 $\alpha$ ,25-Dihidroxi-2 $\alpha$ - y 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-2 $\beta$ -(hidroximetilo)-19-norvitamina D<sub>3</sub> (22 y 23). La hidroboración de la 20(S)-vitamina 17 y la subsiguiente oxidación del aducto organoborano se realizaron usando el procedimiento análogo al anteriormente descrito para el (20R)-epímero 11. Los productos de reacción se separaron por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando hexano/2-propanol (87,5:12,5) como sistema disolvente,

y las 2-hidroximetil vitaminas 22 y 23 isómeras se recogieron a Rv 40 mL y 47 mL, respectivamente. La purificación adicional de ambos productos por HPLC de fase inversa (columna Zorbax-ODS de 10 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando metanol/agua (9:1) como sistema disolvente dio la vitamina 22 analíticamente pura (9%) y su 2 $\beta$ -isómero 23 (26%) recogidos a Rv 25 mL y 22 mL, respectivamente.

5 22: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  242,5, 250,5, 261 nm;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,532 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,853 (3H, d, J = 6,6 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,214 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 2,13 (1H, br d, J = 13,3 Hz, 10 $\beta$ -H), 2,21 (1H, ~ t, J = 12 Hz, 4 $\beta$ -H), 2,64 (1H, dd, J = 12,8, 4,3 Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,80 (1H, br d, J = 12 Hz, 9 $\beta$ -H), 2,90 (1H, br d, J = 13,3 Hz, 10 $\alpha$ -H), 3,95 - 4,1 (3H, br m, 2 $\alpha$ -CH<sub>2</sub>OH y 3 $\alpha$ -H), 4,24 (1H, m, w/2 = 10 Hz, 1 $\beta$ -H), 5,81 y 6,43 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,1 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 434 (M<sup>+</sup>, 41), 416 (34), 398 (16), 383 (10), 305 (10), 287 (28), 269 (26), 245 (51), 69 (100), 59 (82); masa exacta calculada para C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub> 434,3396, encontrada 434,3390.

10 23: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  242, 250,5, 260,5 nm;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,551 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,861 (3H, d, J = 6,4 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,215 (6H, s, 26- y 27-H<sub>3</sub>), 2,31 (1H, br d, J = 13,7 Hz, 4 $\beta$ -H), 2,45 (1H, br d, J = 13,7 Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,80 (1H, br d, J = 12,5 Hz, 9 $\beta$ -H), 3,17 (1H, dd, J = 12,7, 4,2 Hz, 10 $\beta$ -H), 3,95 - 4,1 (3H, br m, 1 $\beta$ -H y 2 $\beta$ -CH<sub>2</sub>OH), 4,17 (1H, m, w/2 = 10Hz, 3 $\alpha$ -H), 5,89 y 6,26 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,1 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 434 (M<sup>+</sup>, 35), 416 (29), 398 (15), 383 (8), 305 (10), 287 (18), 269 (23), 245 (48), 69 (100), 59 (93); masa exacta calculada para C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub> 434,3396, encontrada 434,3408.

#### Actividad biológica de compuestos 19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 2-metil-sustituídos y sus 20S-isómeros (no parte de la invención)

20 Las vitaminas 2-sustituídas sintetizadas se ensayaron respecto a su capacidad para enlazarse al receptor intestinal porcino de la vitamina D (véanse las Figs. 1, 3 y 5). La comparación entre la hormona natural 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y las 19-norvitaminas 12, 18 y 19 2-metil sustituidas muestra que son aproximadamente tan activas como 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, mientras que el 2 $\beta$ -metil isómero 13 en la serie 20R es 39 veces menos efectivo. El análogo 2 $\alpha$ -hidroximetil vitamina D 22 con la configuración "no natural" en C-20 fue casi equivalente a 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> con respecto al enlace al receptor, y el isómero 23 demostró que era menos potente (6-8x) que estos compuestos. El correspondiente análogo 2 $\alpha$ -hidroximetilo 20 que posee la configuración "natural" 20R exhibió aproximadamente la misma afinidad de enlace que 23, mientras que el 2 $\beta$ -isómero 21 fue aprox. 8 veces menos efectivo. Los resultados precedentes del análisis de enlace competitivo muestran que las vitaminas con el grupo 1 $\alpha$ -hidroxi en orientación axial exhiben una afinidad significativamente reforzada por el receptor.

30 Podría esperarse a partir de estos resultados que todos estos compuestos tuvieran una actividad biológica equivalente. Sin embargo, sorprendentemente, las 2-metil sustituciones produjeron análogos muy selectivos respecto a su acción primaria sobre el hueso. Cuando se administraron durante 7 días en un modo crónico, los compuestos más potentes ensayados fueron una mezcla de los  $\alpha$  y  $\beta$  isómeros de 2-metil 19-nor-20S-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Tabla 1). Cuando se administraron a 130 pmol/día, la actividad de esta mezcla de compuestos sobre la movilización del calcio en el hueso (calcio en suero) fue mucho mayor que la de la hormona natural, posiblemente tan alta como 10 ó 100 veces mayor. En condiciones idénticas, dos veces la dosis de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dio un valor de calcio en el suero de 7,2 mg/100 mL, mientras que una mezcla de 2-metil-( $\alpha$  y  $\beta$ )-19-nor-20S-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dio un valor de 9,6 mg/100 mL de calcio en el suero a la dosis de 130 pmol. Cuando se administró a 260 pmol/día, esta mezcla produjo el asombroso valor de 12,2 mg/100 mL de calcio en el suero a expensas del hueso. Para mostrar su selectividad, estos compuestos no produjeron ningún cambio significativo en el transporte de calcio intestinal a la dosis de 130 pmol a la vez que tuvieron una fuerte actividad movilizadora del calcio del hueso. A la mayor dosis, la mezcla 2-metil-20S produjo una respuesta en el transporte intestinal pero dio una enorme respuesta de movilización en el hueso. Una mezcla de los isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de 2-metil-19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> también tuvo una fuerte movilización de calcio en el hueso a ambos valores de dosis pero tampoco mostró ninguna actividad de transporte de calcio intestinal. Así, los 2-metil- $\alpha$  y  $\beta$  derivados administrados como una mezcla mostraron una fuerte actividad movilizadora preferencial del calcio del hueso, especialmente cuando la cadena lateral estaba en la configuración 20S. Estos resultados ilustran que los 2-metil y 20S-2-metil derivados de 19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> son selectivos respecto a la movilización del calcio del hueso. La Tabla 2 ilustra la respuesta del calcio tanto intestinal como del suero a una única dosis grande de los diversos compuestos, que, de nuevo, soporta las conclusiones derivadas de la Tabla 1.

50 Los resultados de la Figura 2 ilustran que una mezcla de los  $\alpha$  y  $\beta$  derivados de 2-metil-19-nor-20S-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> es extremadamente potente para inducir la diferenciación de las células HL-60 a los monocitos. Los 2-metil- $\alpha$  y  $\beta$  compuestos tuvieron una actividad similar a 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Estos resultados ilustran el potencial de los compuestos tipo 2-metil-19-nor-20S-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> como agentes anticancerosos, especialmente contra la leucemia, el cáncer de colon, el cáncer de mama y el cáncer de próstata, o como agentes para el tratamiento de la psoriasis.

55 El enlace competitivo de los análogos al receptor intestinal porcino se llevó a cabo mediante el método descrito por Dame et al. (Biochemistry 25, 4523-4534, 1986).

La diferenciación de HL-60 promielocíticos en monocitos se determinó como describieron Ostrem et al. (J. Biol. Chem. 262, 14164-14171, 1987).

Tabla 1. Respuesta de la actividad de transporte intestinal de calcio y del calcio en el suero (movilización del calcio del hueso) a dosis crónicas de 2-metil derivados de 19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y sus isómeros 20S.

Grupo	Dosis (pmol/día/7 días)	Transporte intestinal de calcio (S/M)	Calcio en el suero (mg/100 mL)
Deficiente en vitamina D	Vehículo	5,5 ± 0,2	5,1 ± 0,16
Tratado con 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	260	6,2 ± 0,4	7,2 ± 0,5
2-Metil (α y β) 19-nor-1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	130	5,0 ± 0,3	6,1 ± 0,1
	260	5,3 ± 0,6	6,7 ± 0,4
2-Metil (α y β) 19-nor-20S-1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	130	5,0 ± 0,9	9,6 ± 0,1
	260	6,9 ± 0,5	12,2 ± 0,3

5 Se obtuvieron ratas macho destetadas en Sprague Dawley Co. (Indianápolis, IN) y se alimentaron durante 1 semana con una dieta deficiente en vitamina D con un contenido de calcio de 0,47% y de fósforo de 0,3% y a continuación se les dio la misma dieta que contenía 0,02% de calcio y 0,3% de fósforo durante 2 semanas. Durante la última semana se les dio la dosis indicada de compuesto por inyección intraperitoneal en 0,1 mL de propilenglicol al 95% y etanol al 5% cada día durante 7 días. Los animales testigo sólo recibieron los 0,1 mL de propilenglicol al 95% y etanol al 5%. Veinticuatro horas después de la última dosis las ratas fueron sacrificadas y se determinó el transporte intestinal de calcio mediante la técnica del saco evertido como se describió previamente y se determinó el calcio en el suero por espectroscopía de absorción atómica con un instrumento Perkin Elmer modelo 3110 (Norwalk, CT). Había 5 ratas por grupo y los valores representan la media ± SEM.

Tabla 2. Respuesta de la actividad de transporte intestinal de calcio y del calcio en el suero (movilización del calcio del hueso) a una única dosis de los 2-metil derivados de 19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y sus isómeros 20S.

Grupo	Transporte intestinal de calcio (S/M)	Calcio en el suero (mg/100 mL)
Testigo D	4,2 ± 0,3	4,7 ± 0,1
1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	5,8 ± 0,3	5,7 ± 0,2
2-Metil (mezcla de α y β)-19-nor-1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	3,6 ± 0,4	5,4 ± 0,1
2-Metil (mezcla α y β)-19-nor-20S-1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	6,7 ± 0,6	8,1 ± 0,3

15 Se obtuvieron ratas macho destetadas de raza Holtzman en Sprague Dawley Co. (Indianapolis, IN) y se alimentaron con la dieta de 0,47% de calcio y 0,3% de fósforo descrita por Suda et al. (J. Nutr. 100, 1049-1052, 1970) durante 1 semana y a continuación se alimentaron con la misma dieta que contenía 0,02% de calcio y 0,3% de fósforo durante 2 semanas adicionales. En este momento, recibieron una única inyección intrayugular de la dosis indicada disuelta en 0,1 mL de propilenglicol al 95%/etanol al 5%. Veinticuatro horas después fueron sacrificadas y se determinó el transporte intestinal de calcio y el calcio en el suero como se describió en la Tabla 1. La dosis de los compuestos fue 650 pmol y hubo 5 animales por grupo. Los datos se expresan como la media ± SEM.

25 Cuando se les administró durante 7 días en un modo crónico, el compuesto individual más potente ensayado fue 2α-metil 19-nor-20S-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Tabla 3). Cuando se administraron a 130 pmol/día, la actividad de este compuesto sobre la movilización del calcio en el hueso (calcio en el suero) fue mucho mayor que la de la hormona natural, posiblemente tan alta como 10 ó 100 veces mayor. En idénticas condiciones, dos veces la dosis de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dio un valor de calcio en el suero de 6,6 ± 0,4 mg/100 mL, mientras que 2α-metil-19-nor-20S-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dio un valor de 8,3 ± 0,7 mg/100 mL de calcio en el suero a la misma dosis de 130 pmol. Cuando se administraron a 260 pmol/día, 2α-metil-19-nor-20S-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> produjo el asombroso valor de 10,3 ± 0,11 mg/100 mL de calcio en el suero a expensas del hueso. Para mostrar su selectividad, este compuesto también produjo un cambio significativo en el transporte intestinal de calcio a ambos niveles de dosis de 260 pmol y 130 pmol a la vez que tenía una fuerte actividad movilizadora de calcio del hueso. A la mayor dosis, el compuesto 2α-metil-20S produjo una significativa respuesta de transporte intestinal pero también dio una enorme respuesta de movilización en el hueso. Con respecto al compuesto 2β-metil-19-nor-20S, los datos de la Tabla 3 muestran que tiene poca, si alguna, actividad de transporte intestinal de calcio, y poca, si alguna, actividad de movilización en el hueso. Los datos de la Tabla 4 ilustran que 2α-metil-19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> también tuvo una movilización del calcio relativamente fuerte a ambos niveles de dosis y también mostró algo de actividad de transporte intestinal de calcio. En contraste, 2β-metil-19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> mostró poca, si alguna, actividad de transporte intestinal de calcio o de movilización de calcio en el hueso. Así, el 2α-metil-19-nor derivado mostró una fuerte y preferencial actividad movilizadora de calcio en el hueso, especialmente cuando la cadena lateral estaba en la configuración 20S. Estos resultados ilustran que los 2α-metil y 20S-2α-metil derivados de 19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> son selectivos respecto a la movilización del calcio del hueso.



Los resultados de la Figura 4 ilustran que 2 $\alpha$ -metil-19-nor-20S-1,25-(OH) $_2$ D $_3$  y 2 $\alpha$ -metil-19-nor-1,25-(OH) $_2$ D $_3$  son extremadamente potentes en la inducción de la diferenciación de células HL-60 en monocitos. Los 2 $\beta$ -metil compuestos tuvieron una actividad similar a 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ . Estos resultados ilustran el potencial del compuesto 2 $\alpha$ -metil-19-nor-20S-1,25-(OH) $_2$ D $_3$  como agente anticancerígeno, especialmente contra la leucemia, el cáncer de colon, el cáncer de mama y el cáncer de próstata, o como un agente en el tratamiento de la psoriasis.

El enlace competitivo de los análogos al receptor intestinal porcino se llevó a cabo mediante el método descrito por Dame et al. (Biochemistry 25, 4523-4534, 1986).

La diferenciación de HL-60 promielocíticos en monocitos se determinó como describieron Ostrem et al. (J. Biol. Chem. 262, 14164-14171, 1987).

10 Tabla 3. Respuesta de la actividad de transporte intestinal de calcio y del calcio en el suero (movilización del calcio del hueso) a dosis crónicas de isómeros 20S de 2-metil derivados de 19-nor-1,25-(OH) $_2$ D $_3$ .

Grupo	Dosis (pmol/día/7 días)	Transporte intestinal de calcio (S/M)	Calcio en el suero (mg/100 mL)
Deficiente en vitamina D	Vehículo	2,9 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,1
Tratado con 1,25-(OH) $_2$ D $_3$	260	4,6 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,4
2 $\alpha$ -Metil-19-nor-20(S)-1,25-(OH) $_2$ D $_3$	130	12,9 $\pm$ 1,9	8,3 $\pm$ 0,7
	260	8,4 $\pm$ 0,1	10,3 $\pm$ 0,11
2 $\beta$ -Metil-19-nor-20(S)-1,25-(OH) $_2$ D $_3$	130	2,9 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,1
	260	3,9 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 0,3

Con respecto a los datos en las Tablas 3 y 4, se obtuvieron ratas macho destetadas en Sprague Dawley Co. (Indianapolis, IN) y se alimentaron con una dieta de 0,47% de calcio y 0,3% de fósforo deficiente en vitamina D durante 1 semana y a continuación se les dio la misma dieta que contenía 0,02% de calcio y 0,3% de fósforo durante 2 semanas. Durante la última semana se les dio la dosis indicada de compuesto por inyección intraperitoneal en 0,1 mL propilenglicol al 95% y etanol al 5% cada día durante 7 días. Los animales testigo sólo recibieron los 0,1 mL de propilenglicol al 95% y etanol al 5%. Veinticuatro horas después de la última dosis las ratas fueron sacrificadas y se determinó el transporte intestinal de calcio mediante la técnica del saco evertido que se describió previamente y el calcio en el suero se determinó por espectrometría de absorción atómica en un instrumento Perkin Elmer modelo 3110 (Norwalk, CT). Hubo 5 ratas por grupo y los valores representan la media  $\pm$  SEM.

20 Tabla 4. Respuesta de la actividad de transporte intestinal de calcio y del calcio en el suero (movilización del calcio del hueso) a dosis crónicas de 2-metil derivados de 19-nor-1,25-(OH) $_2$ D $_3$ .

Grupo	Dosis (pmol/día/7 días)	Transporte intestinal de calcio (S/M)	Calcio en el suero (mg/100 mL)
Testigo -D	Vehículo	2,3 $\pm$ 0,8	3,9 $\pm$ 0,2
1,25-(OH) $_2$ D $_3$	260	5,6 $\pm$ 1,3	6,1 $\pm$ 0,5
2 $\alpha$ -Metil-19-nor-1,25-(OH) $_2$ D $_3$	130	4,3 $\pm$ 1,0	4,8 $\pm$ 0,2
	260	5,3 $\pm$ 1,3	5,8 $\pm$ 0,5
2 $\beta$ -Metil-19-nor-1,25-(OH) $_2$ D $_3$	130	4,4 $\pm$ 0,8	4,1 $\pm$ 0,1
	260	3,1 $\pm$ 0,9	3,8 $\pm$ 0,2

La Tabla 5 proporciona datos de transporte intestinal de calcio y movilización del calcio del hueso para 2-hidroxiometil derivados de 19-nor-1 $\alpha$ ,25-(OH) $_2$ D $_3$ . Estos derivados mostraron ser relativamente inactivos, incluyendo aquellos de la serie 20S, 22 y 23.

25

Tabla 5. Respuesta de la actividad de transporte intestinal de calcio y del calcio en el suero (movilización del calcio del hueso) a dosis crónicas de 2-hidroxi-metil derivados de 19-nor-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Grupo	Dosis (pmol/día/7 días)	Transporte intestinal de calcio (S/M)	Calcio en el suero (mg/100 mL)
Deficiente en vitamin D	Vehículo	4,0 ± 0,3	3,8 ± 0,12
Tratado con 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	260	6,6 ± 0,5	5,2 ± 0,1
2α-Hidroxi-metil-19-nor-20(S)-1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	130	5,0 ± 0,3	4,0 ± 0,1
	260	5,8 ± 0,4	3,9 ± 0,1
2β-Hidroxi-metil-19-nor-(20S)-1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	130	3,5 ± 0,7	3,6 ± 0,1
	260	3,5 ± 0,3	3,5 ± 0,2

En el siguiente ensayo, se estableció la actividad celular de los compuestos sintetizados estudiando su capacidad para inducir diferenciación de células HL-60 promielocíticas de ser humano en monocitos. Se encontró que todos los análogos de la vitamina D sintetizados con la configuración 20S "no natural" fueron más potentes que 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Por otra parte, se estableció la misma relación entre actividad celular y conformación de los compuestos derivados de vitamina D que en el caso del análisis del enlace al receptor y en estudios in vivo, es decir los análogos 2α-sustituidos de la vitamina D fueron considerablemente más activos que sus contrapartidas β -sustituidos con el grupo 1α-hidroxi ecuatorialmente orientado. Así, las 2 -metil vitaminas 12 y 18 probaron ser 100 y 10 veces, respectivamente, más activas que sus correspondientes 2β-isómeros 13 y 19 en los cultivos de HL-60 in vitro, mientras que en el caso de los 2-hidroxi-metil derivados (20, 22 frente a 21, 23) estas diferencias fueron ligeramente más pequeñas. Puesto que las vitaminas con el sustituyente β -metilo (13, 19) y ambos 2-hidroxi-metil análogos en la serie 20S (22, 23) tienen perfiles de actividad selectivos que combinan una alta potencia de diferenciación celular y la carencia de actividad calcémica, tales compuestos son potencialmente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer.

Estos resultados indican que la variación de sustituyentes en C-2 en la 19-nor-1α,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> padre puede cambiar completamente (y selectivamente) la potencia biológica de los análogos. Estos resultados sugieren que 2α-metil-19-nor-20S-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tiene una actividad preferencial sobre el hueso, lo que la hace candidata para el tratamiento de enfermedades del hueso.

### 20 Ejemplo 3

Preparación de 20(S)-1α,25-dihidroxi-2α- y 20(S)-1α,25-dihidroxi-2β-metil-26,27-dihomo-19-norvitamina D<sub>3</sub> (36 y 37). Se hace referencia al ESQUEMA IV.

20(S)-25-[(Trietil-sililo)oxi]-des-A,B-26,27-dihomocolestán-8-ona (32). Se añadieron 2,6-lutidina (17,4 mL, 0,15 mmoles) y trifluorometanosulfonato de trietil-sililo (20,3 mL, 0,09 mmoles) a una disolución del análogo 31 de la cetona 20(S)-25-hidroxi de Grundmann (*Tetronics*, Madison, WI; 18,5 mg, 0,06 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (60 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 1 h. Se añadieron benceno y agua, y la capa orgánica se separó, se lavó con disolución saturada de CuSO<sub>4</sub> y agua, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó. El residuo aceitoso se redisolvió en hexano y se aplicó sobre un cartucho de sílice Sep-Pak cartridge (2 g). La elución con hexano (10 mL) dio una pequeña cantidad de compuestos menos polares; la elución posterior con hexano/acetato de etilo (9:1) proporcionó la cetona sililada. La purificación final se consiguió por HPLC (columna Zorbax-Sil de 10-mm x 25-cm, 4 mL/min) usando hexano/acetato de etilo (95:5) como sistema disolvente. La cetona hidroxi protegida 32 (16,7 mg, 66%) fue eluida a R<sub>v</sub> 37 mL como un aceite incoloro: <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,573 (6H, q, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>), 0,639 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,825 (6H, t, J = 7,5 Hz, 26- y 27-CH<sub>3</sub>), 0,861 (3H, d, J = 6,1 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 0,949 (9H, t, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,45 (1H, dd, J = 11,4, 7,6 Hz, 14α-H).

20(S)-1α,25-Dihidroxi-2-metilen-26,27-dihomo-19-norvitamina D<sub>3</sub> (35). A una disolución del óxido de fosfina 33 (9,1 mg, 15,6 mmoles) en THF anhidro (150 mL) a 0°C se añadió lentamente *n*-BuLi (2,5 M en hexanos, 7 mL, 17,5 mmoles) en atmósfera de argón con agitación. La disolución se tornó naranja intenso. Se agitó durante 10 min a 0°C, a continuación se enfrió a -78°C y se añadió lentamente una disolución preenfriada (-78°C) de la cetona 32 hidroxi protegida (16,5 mg, 39,0 mmoles) en THF anhidro (300 + 100 mL). La mezcla se agitó en atmósfera de argón a -78°C durante 1,5 h y a 0°C durante 19 h. Se añadieron agua y acetato de etilo, y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó. El residuo se disolvió en hexano y se aplicó sobre un cartucho de sílice Sep-Pak, y se lavó con hexano/acetato de etilo (99,7:0,3, 20 mL) para dar el derivado 19-norvitamina 34 ligeramente impuro (aprox. 4 mg). A continuación, el cartucho Sep-Pak se lavó con hexano/acetato de etilo (96:4, 10 mL) para recuperar parte de la cetona con los anillos C,D sin modificar (contaminada con el 14β-isómero), y con acetato de etilo (10 mL) para recuperar el óxido de difenilfosfina 33 (aprox. 6 mg) que se purificó subsiguientemente por HPLC

(columna Zorbax-Sil de 10-mm x 25-cm, 4 mL/min) usando hexano/2-propanol (9:1) como sistema disolvente; el compuesto 33 puro (5,1 mg) fue eluido a R<sub>v</sub> 36 mL. La vitamina 34 protegida fue adicionalmente purificada por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2-mm x 25-cm, 4 mL/min) usando hexano/acetato de etilo (99,9:0,1) como sistema disolvente. El compuesto 34 puro (3,6 mg, 67% de rendimiento considerando la recuperación del compuesto 33 sin reaccionar) fue eluido a R<sub>v</sub> 19 mL como un aceite incoloro: UV (en hexano) λ<sub>max</sub> 244,0, 252,5, 262,5 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,026, 0,048, 0,066, y 0,079 (cada uno 3H, cada uno s, 4 x SiCH<sub>3</sub>), 0,544 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,570 (6H, q, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>), 0,821 (6H, t, J = 7,5 Hz, 26- y 27-CH<sub>3</sub>), 0,849 (3H, d, J = 6,7 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 0,864 y 0,896 (9H y 9H, cada uno s, 2 x Si-*t*-Bu), 0,946 (9H, t, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,99 (2H, m), 2,18 (1H, dd, J = 12,6, 8,2 Hz, 4β-H), 2,34 (1H, dd, J = 13,0, 2,9 Hz, 10β-H), 2,46 (1H, dd, J = 12,6, 4,3 Hz, 4α-H), 2,51 (1H, dd, J = 13,0, 6,2 Hz, 10α-H), 2,82 (1H, br d, J = 12 Hz, 9β-H), 4,43 (2H, m, 1β- y 3α-H), 4,92 y 4,97 (1H y 1H, cada uno s, =CH<sub>2</sub>), 5,84 y 6,22 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,2 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 786 (M<sup>+</sup>, 15), 757 (M<sup>+</sup> - Et, 22), 729 (M<sup>+</sup> - *t*-Bu, 5), 654 (100), 522 (15), 366 (43), 201 (31).

La vitamina protegida 34 (3,5 mg) se disolvió en benceno (150 mL) y se añadió la resina (AG 50W-X4, 40 mg; prelavada con metanol) en metanol (550 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 14 h, se diluyó con acetato de etilo/éter (1:1,4 mL) y se decantó. La resina se lavó con éter (8 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se secaron (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporaron. El residuo se purificó por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2-mm x 25-cm, 4 mL/min) usando hexano/2-propanol (9:1) como sistema disolvente. La 2-metilen-19-norvitamina 35 analíticamente pura (1,22 mg, 62%) se recogió a R<sub>v</sub> 21 mL como un sólido blanco: UV (en EtOH) λ<sub>max</sub> 243,5, 252,0, 262,0 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,550 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,855 (3H, d, J = 6,8 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 0,860 (6H, t, J = 7,5 Hz, 26- y 27-CH<sub>3</sub>), 2,00 (3H, m), 2,30 (1H, dd, J = 13,3, 8,6 Hz, 10α-H), 2,33 (1H, dd, J = 13,3, 6,3 Hz, 4α-H), 2,58 (1H, dd, J = 13,3, 3,9 Hz, 4β-H), 2,82 (1H, br d, J = 12 Hz, 9β-H), 2,85 (1H, dd, J = 13,3, 4,7 Hz, 10β-H), 4,48 (2H, m, 1β- y 3α-H), 5,09 y 5,11 (1H y 1H, cada uno s, =CH<sub>2</sub>), 5,89 y 6,36 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,3 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 444 (M<sup>+</sup>, 100), 426 (35), 408 (11), 397 (19), 379 (32), 341 (31), 287 (32), 273 (43), 269 (28), 251 (22); masa exacta calculada para C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub> 444,3603, encontrada 444,3602.

20(S)-1α,25-Dihidroxi-2α- y 20(S)-1α,25-dihidroxi-2β-metil-26,27-dihomo-19-norvitamina D<sub>3</sub> (36 y 37). Se añadió cloruro de tris(trifenilfosfina)rodio (I) (2,3 mg, 2,5 mmoles) a benceno seco (2,5 mL) presurizado con hidrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se formó una disolución homogénea (aprox. 45 min). A continuación, se añadió una disolución de vitamina 35 (1,0 mg, 2,3 mmoles) en benceno seco (0,5 mL) y se dejó que la reacción transcurriera en una corriente continua de hidrógeno durante 4,5 h. Se añadió una nueva porción del catalizador (2,3 mg, 2,5 mmoles) y se pasó hidrógeno durante 1 h adicional. El benceno se separó a vacío, el residuo se redisolvió en hexano/acetato de etilo (1:1, 2 mL) y se aplicó sobre el cartucho de sílice Waters Sep-Pak. Una mezcla de 2-metil vitaminas fue eluida con el mismo sistema disolvente (20 mL). Los compuestos se purificaron adicionalmente por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando hexano/2-propanol (9:1) como sistema disolvente. La mezcla (aprox. 1:1) de 2-metil-19-norvitaminas 36 y 37 (0,37 mg, 37%) dio un único pico a R<sub>v</sub> 23 mL. La separación de ambos epimeros se consiguió por HPLC de fase inversa (columna Zorbax-ODS de 6,2-mm x 25-cm, 2 mL/min) usando metanol/agua (85:15) como sistema disolvente. La 2β-metil vitamina 37 se recogió a R<sub>v</sub> 21 mL y su 2α-epímero 36 a R<sub>v</sub> 27 mL.

36: UV (en EtOH) λ<sub>max</sub> 242,5, 251,0, 261,0 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,534 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,851 (3H, d, J ~ 7 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 0,858 (6H, t, J = 7,5 Hz, 26- y 27-CH<sub>3</sub>), 1,133 (3H, d, J = 6,9 Hz, 2α-CH<sub>3</sub>), 2,13 (1H, ~ 1, J ~ 12 Hz, 4β-H), 2,23 (1H, br d, J = 13,4 Hz, 10β-H), 2,60 (1H, dd, J = 13,1, 4,4 Hz, 4α-H), 2,80 (2H, m, 9β- y 10α-H), 3,61 (1H, m, w/2 = 26 Hz, 3α-H), 3,96 (1H, m, w/2 = 13 Hz, 1β-H), 5,82 y 6,37 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,2 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 446 (M<sup>+</sup>, 53), 428 (46), 410 (12), 399 (35), 381 (17), 289 (35), 273 (48), 271 (30), 253 (24), 69 (100); masa exacta calculada para C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub> 446,3760, encontrada 446,3758.

45 [0091] 37: UV (en EtOH) λ<sub>max</sub> 242,5, 251,0, 261,0 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,546 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,855 (3H, d, J = 6,8 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 0,860 (6H, t, J = 7,4 Hz, 26- y 27-CH<sub>3</sub>), 1,143 (3H, d, J = 6,9 Hz, 2β-CH<sub>3</sub>), 2,34 (1H, dd, J = 13,7, 3,3 Hz, 4β-H), 2,43 (1H, br d, J = 13,7 Hz, 4α-H), 2,80 (1H, dd, J = 12 y 4 Hz, 9β-H), 3,08 (1H, dd, J = 12,8, 4,1 Hz, 10β-H), 3,50 (1H, m, w/2 = 26 Hz, 1β-H), 3,90 (1H, m, w/2 = 11 Hz, 3α-H), 5,87 y 6,26 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,2 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 446 (M<sup>+</sup>, 39), 428 (46), 410 (12), 399 (30), 381 (17), 289 (37), 273 (50), 271 (31), 253 (27), 69 (100); masa exacta calculada para C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub> 446,3760, encontrada 446,3740.

#### Actividad biológica de 20(S)-1α,25-dihidroxi-2α-metil-26,27-dihomo-19-nor-vitamina D<sub>3</sub> y 20(S)-1α,25-dihidroxi-2β-metil-26,27-dihomo-19-norvitamina D<sub>3</sub> (36 y 37)

El enlace competitivo de los análogos al receptor intestinal porcino se llevó a cabo mediante el método descrito por Dame et al., (Biochemistry 25, 4523-4534, 1986).

55 La diferenciación de HL-60 promielocíticos en monocitos se determinó como describieron Ostrem et al. (J. Biol. Chem. 262 14164-14171, 1987).

Tabla 6. Propiedades del enlace VDR<sup>a</sup> y actividades diferenciadoras de HL-60<sup>b</sup> de análogos 2-sustituídos de 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-26,27-dihomo-19-nor-vitamina D<sub>3</sub>

Compuesto	Comp. nº	VDR ED <sub>50</sub> (M)	Enlace Relación de enlace	Diferenciación de HL-60 ED <sub>50</sub> (M)	Relación de actividad
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>		8,7 x 10 <sup>-10</sup>	1	4,0 x 10 <sup>-9</sup>	1
2 $\alpha$ -metil-26,27-dihomo-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	36	3,1 x 10 <sup>-9</sup>	3,6	6,0 x 10 <sup>-11</sup>	0,01
2 $\beta$ -metil-26,27-dihomo-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	37	4,8 x 10 <sup>-9</sup>	5,5	1,1 x 10 <sup>-10</sup>	0,03

<sup>a</sup>Enlace competitivo de 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y de los análogos de vitamina D sintetizados al receptor intestinal porcino de la vitamina D. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en dos ocasiones diferentes. Los valores de ED<sub>50</sub> se derivan de las curvas dosis-respuesta y representan la concentración de análogo requerida para desplazar el 50% de 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> radiomarcada de la proteína receptora. La relación de enlace es la relación del ED<sub>50</sub> promedio del análogo al ED<sub>50</sub> de 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

<sup>b</sup>Inducción de la diferenciación de promielocitos de HL-60 en monocitos por 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y los análogos de la vitamina D sintetizados. El estado de diferenciación se determinó midiendo el porcentaje de células que redujeron el colorante nitro azul tetrazolio (NBT). El experimento se repitió tres veces. Los valores ED<sub>50</sub> se derivan de las curvas dosis-respuesta y representan la concentración del análogo capaz de inducir una maduración del 50%. La relación de actividad de diferenciación es la relación de la ED<sub>50</sub> promedio del análogo al ED<sub>50</sub> de 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Tabla 7. Soporte del transporte intestinal del calcio y de la movilización del calcio del hueso por análogos 2-sustituídos de 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-26,27-dihomo-19-nor-vitamina D<sub>3</sub> en ratas deficientes de vitamina D con una dieta baja en calcio

Compuesto	Comp. nº	Cantidad (pmol)	Transporte de Ca S/M (media $\pm$ SEM)	Ca en el suero (media $\pm$ SEM)
Uno (testigo)		0	2,7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	4,7 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	36	260	7,2 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	5,6 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>
2 $\alpha$ -metil-26,27-dihomo-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>		32	5,8 $\pm$ 0,4 <sup>d1</sup>	5,9 $\pm$ 0,2 <sup>d1</sup>
		65	8,4 $\pm$ 0,8 <sup>d2</sup>	9,3 $\pm$ 0,2 <sup>d2</sup>
Ninguno (testigo)		0	3,6 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	5,0 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	37	260	5,0 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	6,3 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>
2 $\beta$ -metil-26,27-dihomo-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>		65	4,7 $\pm$ 0,6 <sup>d1</sup>	5,0 $\pm$ 0,0 <sup>d1</sup>
		260	5,2 $\pm$ 0,6 <sup>d2</sup>	9,9 $\pm$ 0,3 <sup>d2</sup>

<sup>a</sup>Ratas macho destetadas fueron mantenidas con una dieta de 0,47% de Ca durante 1 semana y a continuación fueron desplazadas a una dieta baja en calcio que contenía 0,02% de Ca durante 3 semanas adicionales. Durante la última semana se les administró diariamente dosis del compuesto apropiado derivado de vitamina D durante 7 días consecutivos. Todas las dosis se administraron intraperitonealmente en 0,1 mL de propilenglicol/etanol (95:5). Los testigos recibieron el vehículo. Se hicieron determinaciones 24 h después de la última dosis. Había al menos 6 ratas por grupo. El análisis estadístico se hizo mediante el ensayo de la t de Student. Datos estadísticos: sérico/mucosal (S/M), panel 1, b desde c, y d2, p < 0,001, b desde d1, p = 0,001; panel 2, b desde c, d1, y d2, p < 0,05; calcio en el suero, panel 1, b desde c y d1, p < 0,05, b desde d2, p < 0,001; panel 2, b desde c, p < 0,01, b desde d1, NS, b desde d2, p < 0,001.

#### Ejemplo 4

Preparación de 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-26,27-dimetilen-2 $\alpha$ -metil-19-norvitamina D<sub>3</sub> y 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-26,27-dimetilen-2 $\beta$ -metil-19-norvitamina D<sub>3</sub> (48 y 49). Se hace referencia a los ESQUEMAS V y VI.

20(S)-25-[(Trietilsilil)oxi]-des-A,B-26,27-dimetilen-colestán-8-ona (42). A una disolución del análogo 41 tipo 20(S)-25-hidroxi cetona de Grundmann (*Tetronics*, Madison, WI; 15,0 mg, 0,049 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (50 mL) se

añadieron 2,6-lutidina (15 mL, 0,129 mmoles) y trifluorometanosulfonato de trietilsililo (17,0 mL, 0,075 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 1 h. Se añadieron benceno y agua, y la capa orgánica se separó, se lavó con una disolución acuosa saturada de  $\text{CuSO}_4$  y agua, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se evaporó. El residuo aceitoso se redisolvió en hexano y se aplicó sobre un cartucho de sílice Sep-Pak (2 g). La elución con hexano (10 mL) dio una pequeña cantidad de compuestos menos polares; la elución adicional con hexano/acetato de etilo (9:1) proporcionó la cetona sililada. La purificación final se consiguió por HPLC (columna Zorbax-Sil de 10-mm x 25-cm, 4 mL/min) usando hexano/acetato de etilo (95:5) como sistema disolvente. La cetona hidroxil protegida 42 pura (9,4 mg, 46%) fue eluida a Rv 39 mL como un aceite incoloro:  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,576 (6H, q,  $J = 7,9$  Hz, 3 x  $\text{SiCH}_2$ ), 0,638 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,865 (3H, d,  $J = 6,1$  Hz, 21-H<sub>3</sub>), 0,949 (9H, t,  $J = 7,9$  Hz, 3 x  $\text{SiCH}_2\text{CH}_3$ ), 2,45 (1H, dd,  $J = 11,4, 7,5$  Hz, 14 $\alpha$ -H).

20(S)-1 $\alpha$ ,25-Dihidroxi-26,27-dimetilen-2-metilen-19-norvitamina D<sub>3</sub> (47). A una disolución del óxido de fosfina 43 (17,7 mg, 30,4 mmoles) en THF anhidro (300 mL) a 0°C se añadió lentamente *n*-BuLi (2,5 M en hexanos, 13 mL, 32,5 mmoles) en atmósfera de argón con agitación. La disolución se tornó de color naranja intenso. Se agitó durante 10 min a 0°C, a continuación se enfrió a -78°C y se añadió lentamente una disolución preenfriada (-78°C) de la cetona hidroxil protegida 41 (17,8 mg, 42,3 mmoles) en THF anhidro (300 + 100 mL). La mezcla se agitó en atmósfera de argón a -78°C durante 1,5 h y a 0°C durante 18 h. Se añadieron agua y acetato de etilo, y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se evaporó. El residuo se disolvió en hexano y se aplicó sobre un cartucho de sílice Sep-Pak, y se lavó con hexano/acetato de etilo (99,7:0,3, 20 mL) para dar el 19-norvitamina derivado 44 ligeramente impuro (aprox. 11 mg). A continuación, el cartucho Sep-Pak se lavó con hexano/acetato de etilo (96:4, 10 mL) para recuperar parte de la cetona con anillos C,D sin cambiar (contaminada con 14 $\beta$ -isómero), y con acetato de etilo (10 mL) para recuperar el óxido de difenilfosfina 43 (aprox. 8 mg) que subsiguientemente se purificó por HPLC (columna Zorbax-Sil de 10-mm x 25-cm, 4 mL/min) usando hexano/2-propanol (9:1) como sistema disolvente; el compuesto 43 puro (7,6 mg) fue eluido a Rv 36 mL. La vitamina protegida 44 se purificó adicionalmente por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2-mm x 25-cm, 4 mL/min) usando hexano/acetato de etilo (99,9:0,1) como sistema disolvente. El compuesto 44 puro (10,1 mg, 74% de rendimiento considerando la recuperación de 43 sin reaccionar) fue eluido a Rv 27 mL como un aceite incoloro: UV (en hexano)  $\lambda_{\text{max}}$  244,0, 252,5, 262,5 nm;  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,027, 0,048, 0,067, y 0,080 (cada uno 3H, cada uno s, 4 x  $\text{SiCH}_3$ ), 0,544 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,575 (6H, q,  $J = 7,9$  Hz, 3 x  $\text{SiCH}_2$ ), 0,854 (3H, d,  $J = 6,1$  Hz, 21-H<sub>3</sub>), 0,866 y 0,896 (9H y 9H, cada uno s, 2 x  $\text{Si-}t\text{-Bu}$ ), 0,947 (9H, t,  $J = 7,9$  Hz, 3 x  $\text{SiCH}_2\text{CH}_3$ ), 1,99 (2H, m), 2,18 (1H, dd,  $J = 12,8, 8,6$  Hz, 4 $\beta$ -H), 2,34 (1H, dd,  $J = 13,2, 2,7$  Hz, 10 $\beta$ -H), 2,46 (1H, dd,  $J = 12,8, 4,4$  Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,51 (1H, dd,  $J = 13,2, 6,0$  Hz, 10 $\alpha$ -H), 2,82 (1H, br d,  $J = 12$  Hz, 9 $\beta$ -H), 4,42 (2H, m, 1 $\beta$ - y 3 $\alpha$ -H), 4,92 y 4,97 (1H y 1H, cada uno s, =CH<sub>2</sub>), 5,84 y 6,22 (1H y 1H, cada uno d,  $J = 11,2$  Hz, 7- y 6-H); MS  $m/z$  (intensidad relativa) 784 ( $\text{M}^+$ , 8), 755 ( $\text{M}^+$  - Et, 4), 727 ( $\text{M}^+$  - *t*-Bu, 6), 652 (100), 520 (31), 366 (49), 199 (23).

La vitamina protegida 44 (7,0 mg) se disolvió en benceno (220 mL) y se añadió la resina (AG 50W-X 4,95 mg; prelavada con metanol) en metanol (1,2 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 21 h, se diluyó con acetato de etilo/éter (1:1, 4 mL) y se decantó. La resina se lavó con éter (10 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se secaron ( $\text{MgSO}_4$ ) y se evaporaron. El residuo se separó por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2-mm x 25-cm, 4 mL/min) usando hexano/2-propanol (9:1) como sistema disolvente y se aislaron las siguientes 2-metilen-19-norvitaminas analíticamente puras: la 1 $\alpha$ -hidroxil-25-dehidrovitamina 45 (0,68 mg, 17%) se recogió a Rv 13 mL, la 1 $\alpha$ -hidroxil-25-metoxivitamina 46 (0,76 mg, 19%) se recogió a Rv 16 mL y la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina 47 (2,0 mg, 51 %) se recogió a Rv 21 mL.

45: UV (en EtOH)  $\lambda_{\text{max}}$  243,5, 251,5, 262,0 nm;  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,542 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,847 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,93-2,07 (4H, m), 2,18-2,25 (2H, m), 2,26-2,36 (4H, m), 2,58 (1H, dd,  $J = 13,3, 3,9$  Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,82 (1H, br d,  $J = 13$  Hz, 9 $\beta$ -H), 2,85 (1H, dd,  $J = 13,3, 4,5$  Hz, 10 $\beta$ -H), 4,48 (2H, m, 1 $\beta$ - y 3 $\alpha$ -H), 5,09 y 5,11 (1H y 1H, cada uno s, =CH<sub>2</sub>), 5,32 (1H, m,  $w/2 = 7$  Hz, 24-H), 5,88 y 6,36 (1H y 1H, cada uno d,  $J = 11,1$  Hz, 7- y 6-H); MS  $m/z$  (intensidad relativa) 424 ( $\text{M}^+$ , 100), 406 (7), 339 (16), 287 (16), 271 (24), 269 (17), 251 (12); masa exacta calculada para  $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_2$  424,3341, encontrada 424,3343.

46: UV (en EtOH)  $\lambda_{\text{max}}$  243,5, 252,0, 262,0 nm;  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,553 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,858 (3H, d,  $J = 6,5$  Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,95-2,05 (2H, m), 2,30 (1H, dd,  $J = 13,3, 8,3$  Hz, 10 $\alpha$ -H), 2,33 (1H, dd,  $J = 13,4, 6,0$  Hz, 4 $\beta$ -H), 2,58 (1H, dd,  $J = 13,4, 3,8$  Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,82 (1H, br d,  $J = 13$  Hz, 9 $\beta$ -H), 2,85 (1H, dd,  $J = 13,3, 4,4$  Hz, 10 $\beta$ -H), 3,13 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 4,48 (2H, m, 1 $\beta$ - y 3 $\alpha$ -H), 5,09 y 5,11 (1H y 1H, cada uno s, =CH<sub>2</sub>), 5,89 y 6,36 (1H y 1H, cada uno d,  $J = 11,2$  Hz, 7- y 6-H); MS  $m/z$  (intensidad relativa) 456 ( $\text{M}^+$ , 54), 424 (27), 406 (12), 339 (16), 287 (13), 271 (41), 99 (100); masa exacta calculada para  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$  456,3603, encontrada 456,3603.

47: UV (en EtOH)  $\lambda_{\text{max}}$  243,5, 252,0, 262,0 nm;  $^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,551 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,859 (3H, d,  $J = 6,6$  Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,95-2,05 (2H, m), 2,30 (1H, dd,  $J = 13,5, 8,4$  Hz, 10 $\alpha$ -H), 2,33 (1H, dd,  $J = 13,3, 6,3$  Hz, 4 $\beta$ -H), 2,58 (1H, dd,  $J = 13,3, 4,0$  Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,82 (1H, br d,  $J = 12$  Hz, 9 $\beta$ -H), 2,85 (1H, dd,  $J = 13,5, 4,4$  Hz, 10 $\beta$ -H), 4,48 (2H, m, 1 $\beta$ - y 3 $\alpha$ -H), 5,09 y 5,11 (1H y 1H, cada uno s, =CH<sub>2</sub>), 5,89 y 6,36 (1H y 1H, cada uno d,  $J = 11,3$  Hz, 7- y 6-H); MS  $m/z$  (intensidad relativa) 442 ( $\text{M}^+$ , 100), 424 (47), 406 (15), 339 (34), 287 (27), 271 (42), 269 (36), 251 (26); masa exacta calculada para  $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_3$  442,3447, encontrada 442,3442.

20(S)-1 $\alpha$ ,25-Dihidroxi-26,27-dimetilen-2 $\alpha$ - y 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-26,27-dimetilen-2 $\beta$ -metil-19-norvitamina D<sub>3</sub> (48 y 49).

Se añadió cloruro de tris(trifenilfosfina)rodio (I) (2,3 mg, 2,5 mmoles) a benceno seco (2,5 mL) presurizado con hidrógeno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que se formó una disolución homogénea (aprox. 45 min). A continuación, se añadió una disolución de la vitamina 47 (1,0 mg, 2,3 mmoles) en benceno seco (0,5 mL) y se dejó que la reacción transcurriera en una corriente continua de hidrógeno durante 3 h. Se añadió una nueva porción del catalizador (2,3 mg, 2,5 mmoles) y se pasó hidrógeno durante 2 h adicionales. El benceno se separó a vacío, el residuo se redisolvió en hexano/acetato de etilo (1:1,2 mL) y se aplicó sobre un cartucho de sílice Waters Sep-Pak. Una mezcla de las 2-metil vitaminas fue eluida con el mismo sistema disolvente (20 mL). Los compuestos se purificaron adicionalmente por HPLC (columna Zorbax-Sil de 6,2 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando hexano/2-propanol (9:1) como sistema disolvente. La mezcla (aprox. 1:1) de 2-metil-19-norvitaminas 48 y 49 (0,23 mg, 23%) dio un único pico a R<sub>v</sub> 23 mL. La separación de ambos epímeros se consiguió por HPLC de fase inversa (columna Zorbax-ODS de 6,2-mm x 25-cm, 2 mL/min) usando metanol/agua (85:15) como sistema disolvente. La 2 $\beta$ -metil vitamina 49 se recogió a R<sub>v</sub> 19 mL y su 2 $\alpha$ -epímero 48 a R<sub>v</sub> 24 mL.

48: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  242,5, 251,0, 261,5 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,534 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,853 (3H, d, J = 6,6 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,134 (3H, d, J = 6,8 Hz, 2 $\alpha$ -CH<sub>3</sub>), 2,13 (1H, ~ t, J ~ 12 Hz, 4 $\beta$ -H), 2,22 (1H, br d, J = 13 Hz, 10 $\beta$ -H), 2,60 (1H, dd, J = 12,8, 4,6 Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,80 (2H, m, 9 $\beta$ - y 10 $\alpha$ -H), 3,61 (1H, m, w/2 = 23 Hz, 3 $\alpha$ -H), 3,96 (1H, m, w/2 = 11 Hz, 1 $\beta$ -H), 5,82 y 6,37 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,3 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 444 (M<sup>+</sup>, 84), 426 (53), 289 (36), 271 (58), 253 (19); masa exacta calculada para C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub> 444,3603, encontrada 444,3602.

49: UV (en EtOH)  $\lambda_{\max}$  242,5, 251,0, 261,5 nm; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,547 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,859 (3H, d, J = 6,8 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,143 (3H, d, J = 6,8 Hz, 2 $\beta$ -CH<sub>3</sub>), 2,34 (1H, dd, J = 13,7, 3,3 Hz, 4 $\beta$ -H), 2,43 (1H, br d, J = 13,7 Hz, 4 $\alpha$ -H), 2,80 (1H, br d, J = 12 Hz, 9 $\beta$ -H), 3,08 (1H, dd, J = 12,9,4,4 Hz, 10 $\beta$ -H), 3,50 (1H, m, w/2 = 25 Hz, 1 $\beta$ -H), 3,90 (1H, m, w/2 = 12 Hz, 3 $\alpha$ -H), 5,87 y 6,26 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,3 Hz, 7- y 6-H); MS m/z (intensidad relativa) 444 (M<sup>+</sup>, 75), 426 (59), 289 (34), 271 (59), 253 (18); masa exacta calculada para C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub> 444,3603, encontrada 444,3611.

25 **Actividad biológica de 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-26,27-dimetilen-2 $\alpha$ -metil-19-norvitamina D<sub>3</sub> y 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-26,27-dimetilen-2 $\beta$ -metil-19-norvitamina D<sub>3</sub> (48 y 49).**

El enlace competitivo de los análogos al receptor intestinal porcino se llevó a cabo mediante el método descrito por Dame et al. (Biochemistry 25, 4523-4534, 1986).

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

Tabla 8. Propiedades del enlace VDR<sup>a</sup> y actividades diferenciadoras de HL-60<sup>b</sup> de análogos 2-sustituídos de 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-26,27-dimetilen-19-nor-vitamina D<sub>3</sub>

Compuesto	Comp. n <sup>o</sup>	VDR ED <sub>50</sub> (M)	Enlace Relación de enlace	HL-60 ED <sub>50</sub> (M)	Relación de actividad
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>		8,7 x 10 <sup>-10</sup>	1	4,0 x 10 <sup>-9</sup>	1
2 $\alpha$ -metil-26,27-dimetilen-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	48	3,5 x 10 <sup>-9</sup>	4,0	4,4 x 10 <sup>-11</sup>	0,01
2 $\beta$ -metil-26,27-dimetilen-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	49	2,3 x 10 <sup>-9</sup>	2,6	3,2 x 10 <sup>-10</sup>	0,08

<sup>a</sup>Enlace competitivo de 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y de los análogos de vitamina D sintetizados al receptor intestinal porcino de la vitamina D. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en dos ocasiones diferentes. Los valores de ED<sub>50</sub> se derivan de las curvas dosis-respuesta y representan la concentración de análogo requerida para desplazar el 50% de 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> radiomarcada de la proteína receptora. La relación de enlace es la relación del ED<sub>50</sub> promedio del análogo al ED<sub>50</sub> de 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

<sup>b</sup>Inducción de la diferenciación de promielocitos de HL-60 a monocitos por 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y los análogos de la vitamina D sintetizados. El estado de diferenciación se determinó midiendo el porcentaje de células que redujeron el colorante nitro azul tetrazolio (NBT). El experimento se repitió tres veces. Los valores ED<sub>50</sub> se derivan de las curvas dosis-respuesta y representan la concentración del análogo capaz de inducir una maduración del 50%. La relación de actividad de diferenciación es la relación de la ED<sub>50</sub> promedio del análogo al ED<sub>50</sub> de 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Tabla 9. Soporte del transporte intestinal del calcio y de la movilización del calcio del hueso por análogos 2-sustituidos de 20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-26,27-dimetilen-19-norvitamina D<sub>3</sub> en ratas deficientes de vitamina D con una dieta baja en calcio

Compuesto	Comp. nº	Cantidad (pmol)	Transporte de Ca S/M (media $\pm$ SEM)	Ca en el suero (media $\pm$ SEM)
Ninguno (testigo)		0	2,7 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	4,7 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>		260	7,2 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	5,6 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>
2 $\alpha$ -metil-26,27-dimetilen-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	48	32	5,8 $\pm$ 1,0 <sup>d1</sup>	6,9 $\pm$ 0,5 <sup>d1</sup>
		65	9,0 $\pm$ 1,0 <sup>d2</sup>	9,0 $\pm$ 0,3 <sup>d2</sup>
Ninguno (testigo)		0	3,6 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	5,0 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>		260	5,0 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>	6,3 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>
2 $\beta$ -metil-26,27-dimetilen-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	49	65	4,9 $\pm$ 0,6 <sup>d1</sup>	5,8 $\pm$ 0,2 <sup>d1</sup>
		260	5,4 $\pm$ 0,7 <sup>d2</sup>	9,5 $\pm$ 0,1 <sup>d2</sup>

<sup>a</sup> Ratas macho destetadas fueron mantenidas con una dieta de 0,47% de Ca durante 1 semana y a continuación fueron desplazadas a una dieta baja en calcio que contenía 0,02% de Ca durante 3 semanas adicionales. Durante la última semana se les administró diariamente dosis del compuesto apropiado derivado de vitamina D durante 7 días consecutivos. Todas las dosis se administraron intraperitonealmente en 0,1 mL de propilenglicol/etanol (95:5). Los testigos recibieron el vehículo. Se hicieron determinaciones 24 h después de la última dosis. Había al menos 6 ratas por grupo. El análisis estadístico se hizo mediante el ensayo de la t de Student. Datos estadísticos: sérico/mucosal (S/M), panel 1, b desde c, d1, y d2, p < 0,001; panel 2, b desde c, d1, y d2, p < 0,05; calcio en el suero, panel 1, b desde c, d1, p < 0,05, b desde d2, p < 0,001; panel 2, b desde c y d1 p < 0,01, b desde d2, p < 0,001.

- 5 Con fines de tratamiento, los nuevos compuestos de esta invención definidos por la fórmula I pueden formularse para aplicaciones farmacéuticas como una disolución en disolventes inocuos, o como una emulsión, suspensión o dispersión en disolventes o vehículos adecuados, o como pastillas, comprimidos o cápsulas, junto con vehículos sólidos, según métodos convencionales conocidos en la técnica. Cualquiera de tales formulaciones también puede contener otros excipientes farmacéuticos aceptables y no tóxicos tales como agentes estabilizantes, anti-oxidantes, ligantes, agentes colorantes y agentes emulsionantes o modificadores del sabor.
- 10 Los compuestos pueden administrarse oral, tópica, parenteral, sublingual, intranasal, o transdérmicamente. Los compuestos se administran ventajosamente por inyección o por infusión intravenosa o mediante disoluciones estériles adecuadas, o en forma de dosis líquidas o sólidas vía el canal alimentario, o en forma de cremas, pomadas, parches o vehículos similares adecuados para aplicaciones transdérmicas. Con fines de tratamiento son apropiadas dosis de 0,1  $\mu$ g a 50  $\mu$ g por día de los compuestos, ajustándose tales dosis según la enfermedad a tratar, su gravedad y la respuesta del sujeto, como es bien comprendido en la técnica. Puesto que los nuevos compuestos son específicos en la acción, cada uno puede administrarse adecuadamente solo o junto con dosis graduadas de otro compuesto con actividad de vitamina D -- por ej. 1 $\alpha$ -hidroxivitamina D<sub>2</sub> o D<sub>3</sub>, ó 1 $\alpha$ ,25 -dihidroxivitamina D<sub>3</sub> -- en situaciones en las que se encuentra que son ventajosos diferentes grados de movilización de minerales del hueso y estimulación del transporte del calcio
- 20 Las composiciones para usar en el tratamiento anteriormente mencionado de la psoriasis y de otras neoplasias comprenden una cantidad efectiva de uno o más compuestos tipo 2-sustituido-19-nor-vitamina D que se definen mediante la anterior fórmula I como el ingrediente activo, y un vehículo adecuado. Una cantidad efectiva de tales compuestos para usar según esta invención es de aproximadamente 0,01  $\mu$ g a aproximadamente 100  $\mu$ g por g de composición, y puede administrarse tópica, transdérmica, oral, sublingual, intranasal, o parenteralmente en
- 25 dosificaciones de aproximadamente 0,1  $\mu$ g/día a aproximadamente 100  $\mu$ g/día.
- Los compuestos pueden formularse como cremas, lociones, pomadas, parches tópicos, píldoras, cápsulas o comprimidos, o en forma líquida como disoluciones, emulsiones, dispersiones, o suspensiones en disolventes o aceites farmacéuticamente inocuos y aceptables, y tales preparaciones pueden contener además otros componentes farmacéuticamente inocuos o beneficiosos, tales como estabilizantes, antioxidantes, emulsionantes,
- 30 agentes colorantes, ligantes o agentes modificadores del sabor.

Los compuestos se administran ventajosamente en cantidades suficientes para efectuar la diferenciación de promielocitos en macrófagos normales. Son adecuadas dosificaciones como las anteriormente descritas,

entendiéndose que las cantidades dadas han de ajustarse según la gravedad de la enfermedad y del estado y respuesta del sujeto, como es bien entendido en la técnica.

Las formulaciones de la presente invención comprenden un ingrediente activo en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos. El vehículo tiene que ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de las formulaciones y no perjudiciales para los receptores del mismo.

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

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

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa o aceitosa estéril del ingrediente activo la cual es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor.

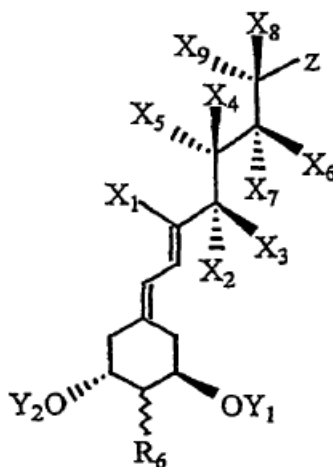
Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semi-líquidas tales como linimentos, lociones, dispositivos para aplicar, emulsiones aceite en agua o agua en aceite tales como cremas, pomadas o pastas; o disoluciones o suspensiones tales como gotas; o como pulverizaciones.

Para el tratamiento del asma, pueden usarse la inhalación de polvos, formulaciones auto-propulsantes o para pulverizar, dispensadas con un pulverizador, un nebulizador o un atomizador. Las formulaciones, cuando se dispensan, tienen preferiblemente un tamaño de partícula en el intervalo de 10 a 100  $\mu\text{m}$ .

Las formulaciones pueden convenientemente presentarse en una forma unitaria de dosificación y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Mediante la expresión "unidad de dosificación" se quiere decir una dosis unitaria, es decir 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 de él con diluyentes o vehículos líquidos farmacéuticos.

Compuestos relevantes son 19-nor-2-alkil análogos de la vitamina D que tienen el núcleo de la vitamina D. Por núcleo de vitamina D se quiere decir una parte central que consiste en una cadena sustituida de cinco átomos de carbono que corresponden a las posiciones 8, 14, 13, 17 y 20 de la vitamina D, y los extremos de los cuales están conectados en la posición 20 a un resto estructural que representa cualquiera de las cadenas laterales típicas conocidas para los compuestos tipo vitamina D (tales como R que se definió previamente en la presente memoria), y en la posición 8 el resto 5,7-dieno conectado al anillo A de un 1 $\alpha$ -hidroxi análogo activo de la vitamina D (como se ilustra mediante la fórmula I de la presente memoria).

Los ejemplos incluyen compuestos de las siguientes fórmulas la (no parte de la invención)



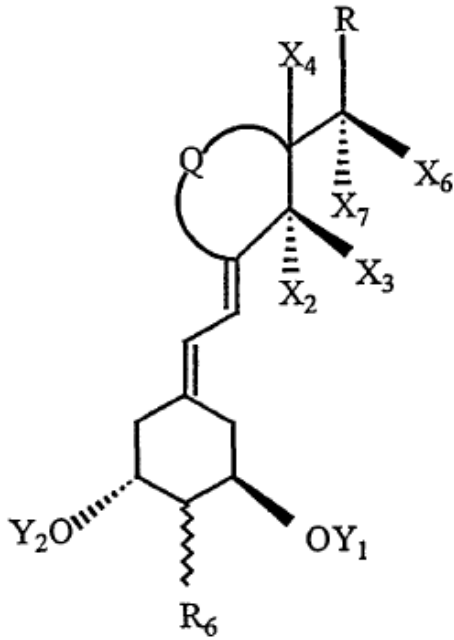
Ia

En la fórmula anterior, las definiciones de Y1, Y2, R6, y Z son como se pusieron previamente de manifiesto en la presente memoria. Con respecto a X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8 y X9, estos sustituyentes pueden ser los mismos o diferentes y se seleccionan de hidrógeno o alquilo inferior, es decir un C1-5-alquilo tal como metilo, etilo o n-propilo.

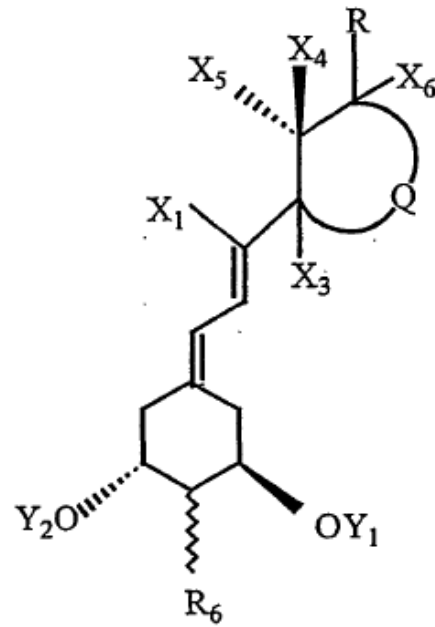


Además, los sustituyentes apareados  $X_1$  y  $X_4$  ó  $X_5$ ,  $X_2$  ó  $X_3$  y  $X_6$  ó  $X_7$ ,  $X_4$  ó  $X_5$  y  $X_8$  ó  $X_9$ , cuando se toman conjuntamente con los tres átomos de carbono adyacentes de la parte central del compuesto, que corresponden a las posiciones 8, 14, 13 ó 14, 13, 17 ó 13, 17, 20 respectivamente, pueden ser los mismos o diferentes y forman un anillo carbocíclico de 3, 4, 5, 6 ó 7 miembros, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido.

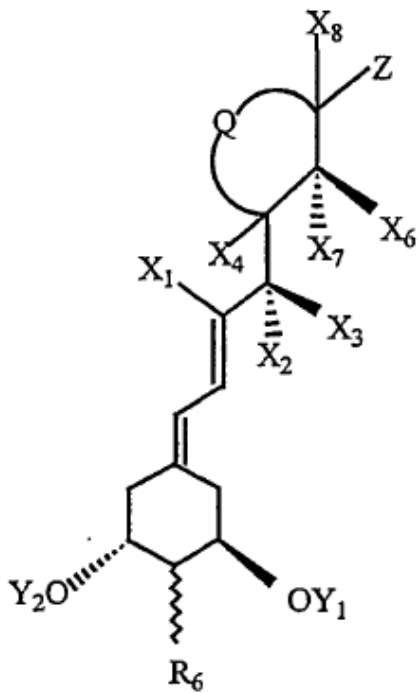
5 Ejemplos específicos de la fórmula la incluyen:



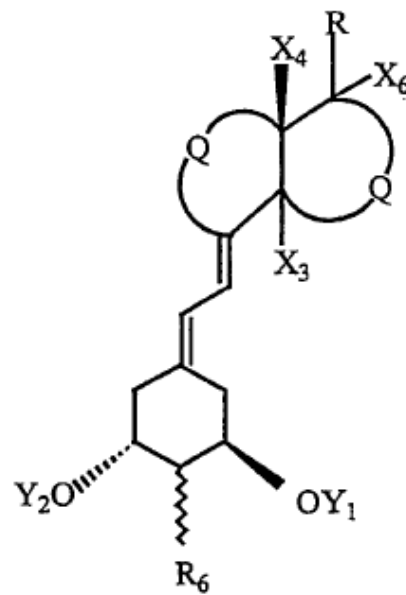
Ib



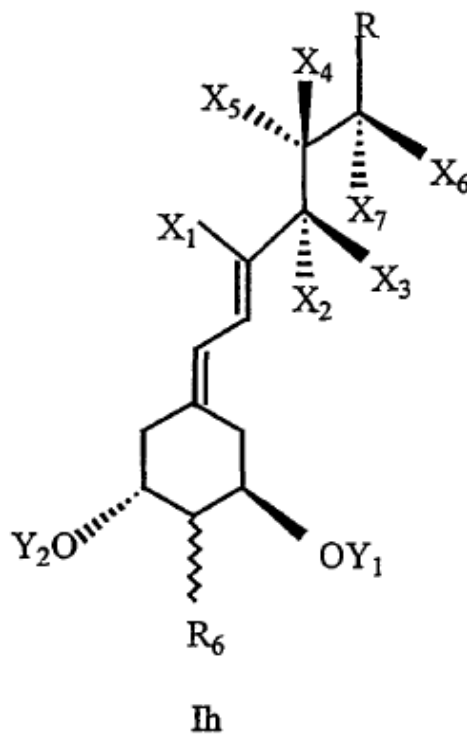
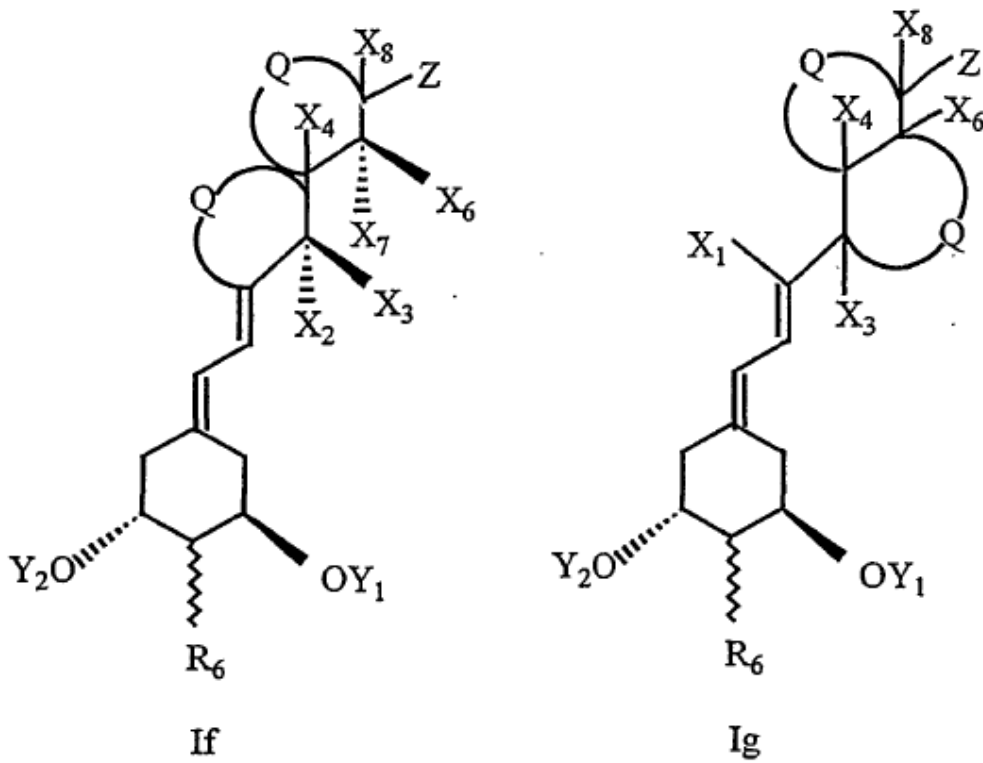
Ic



Id



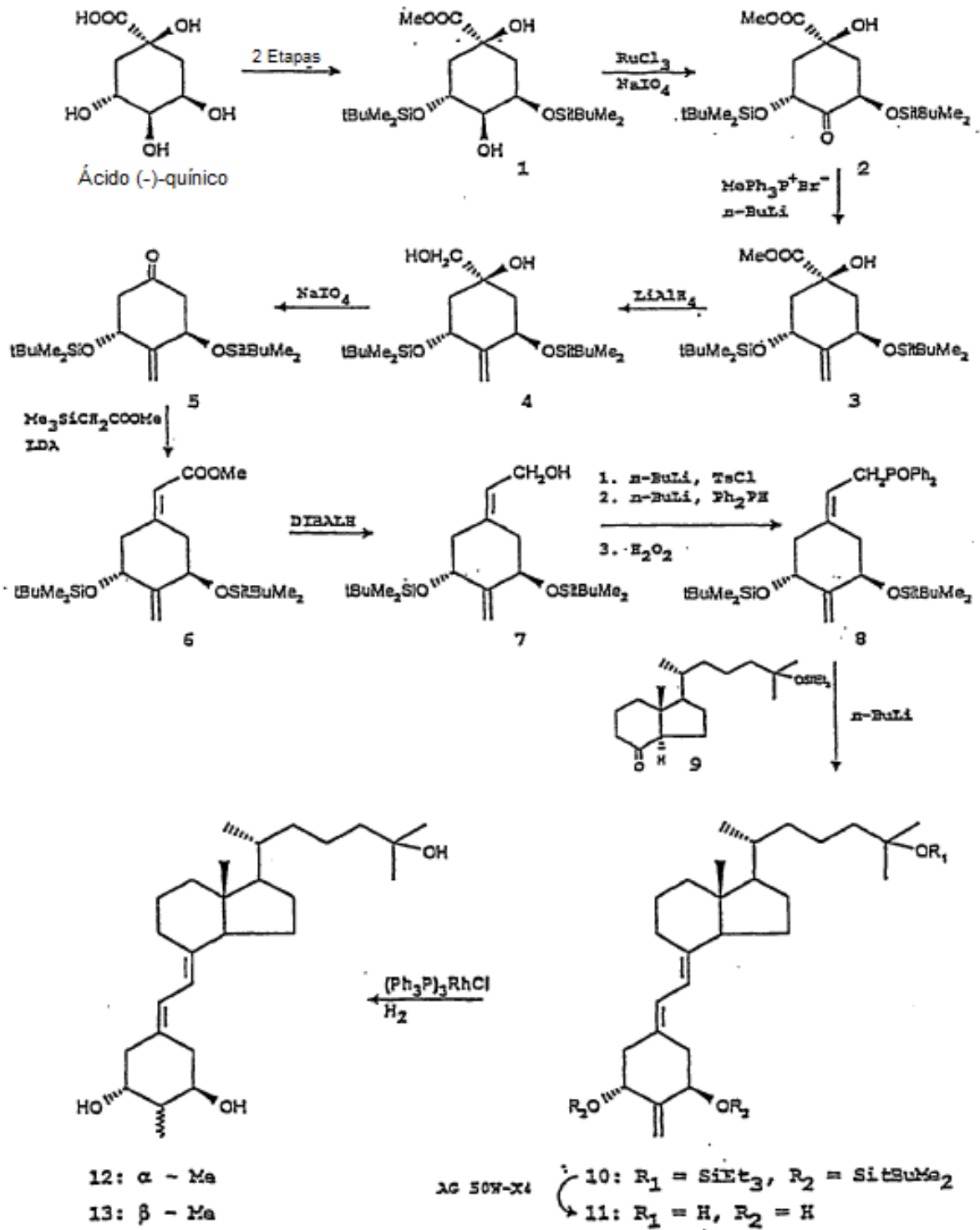
Ie



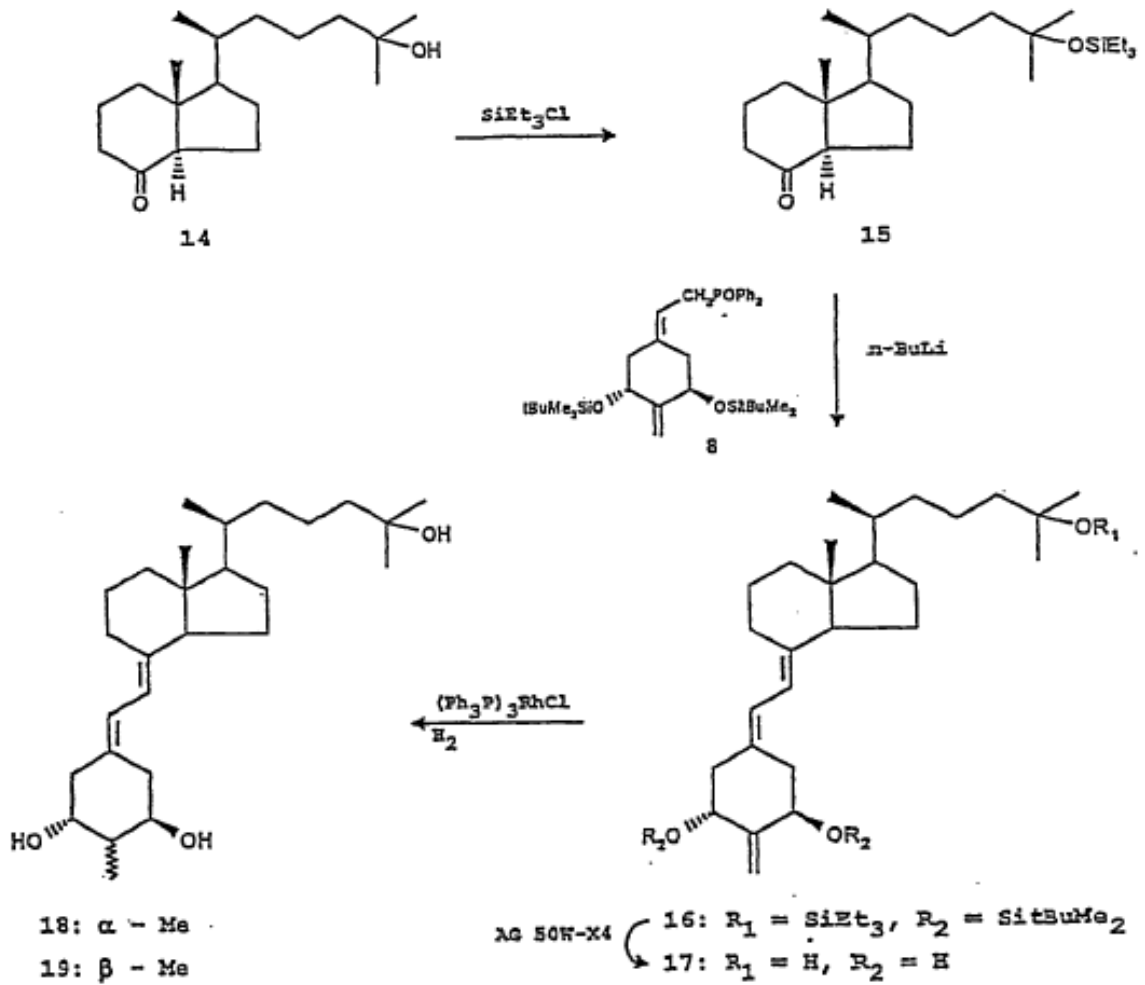
5 En las anteriores fórmulas Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig e Ih, las definiciones de Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, R<sub>6</sub>, R, Z, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub> y X<sub>8</sub> son las que previamente se pusieron de manifiesto en la presente memoria. El sustituyente Q representa una cadena hidrocarbonada saturada o no saturada, sustituida o no sustituida compuesta de 0, 1, 2, 3 ó 4 átomos de carbono, pero es preferiblemente el grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>- en la que k es un número entero igual a 2 ó 3.

Se conocen métodos para fabricar compuestos de las fórmulas Ia-Ih. Específicamente, se hace referencia al Número de Solicitud Internacional PCT/EP94/02294 registrada el 7 de julio de 1994 y publicada el 19 de enero de 1995 con el Número de Publicación Internacional WO95/01960.

ESQUEMA I (no parte de la invención)

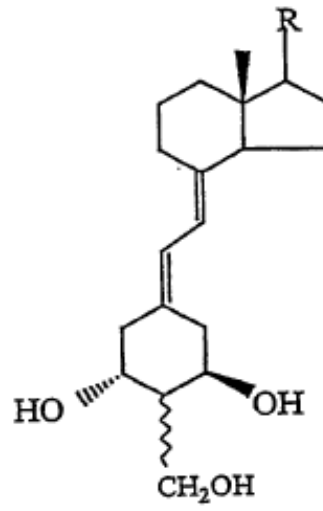
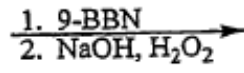


ESQUEMA II (no parte de la invención)



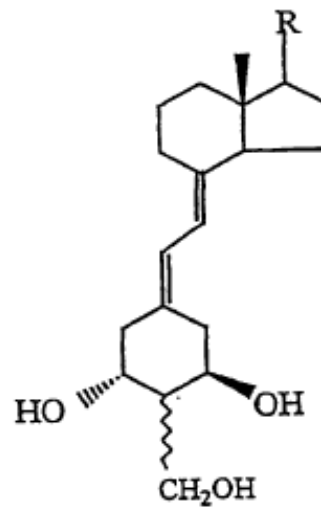
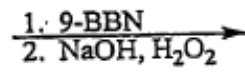
ESQUEMA III (no parte de la invención)

11: 20R



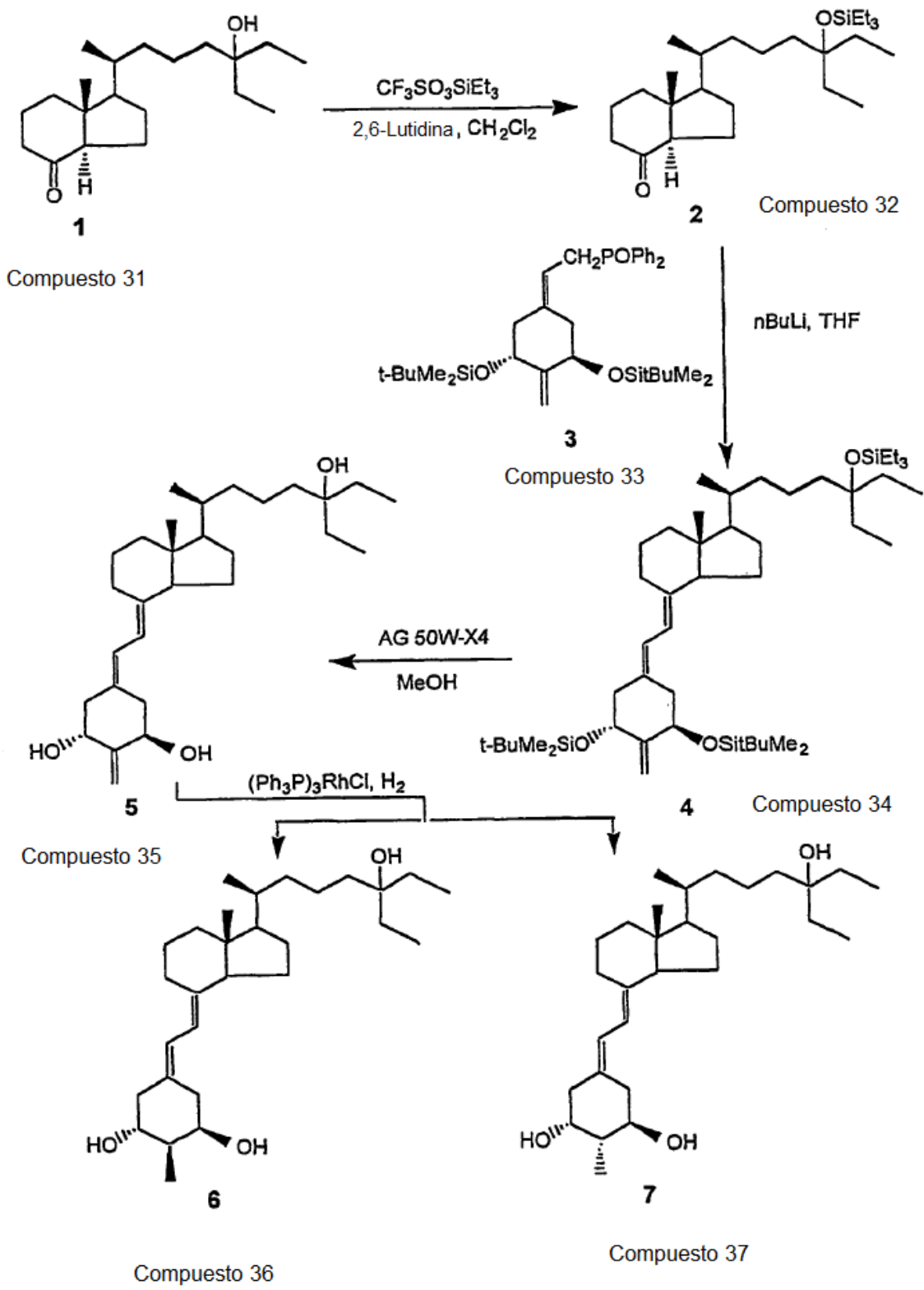
20: 2 $\alpha$   
21: 2 $\beta$

17: 20S

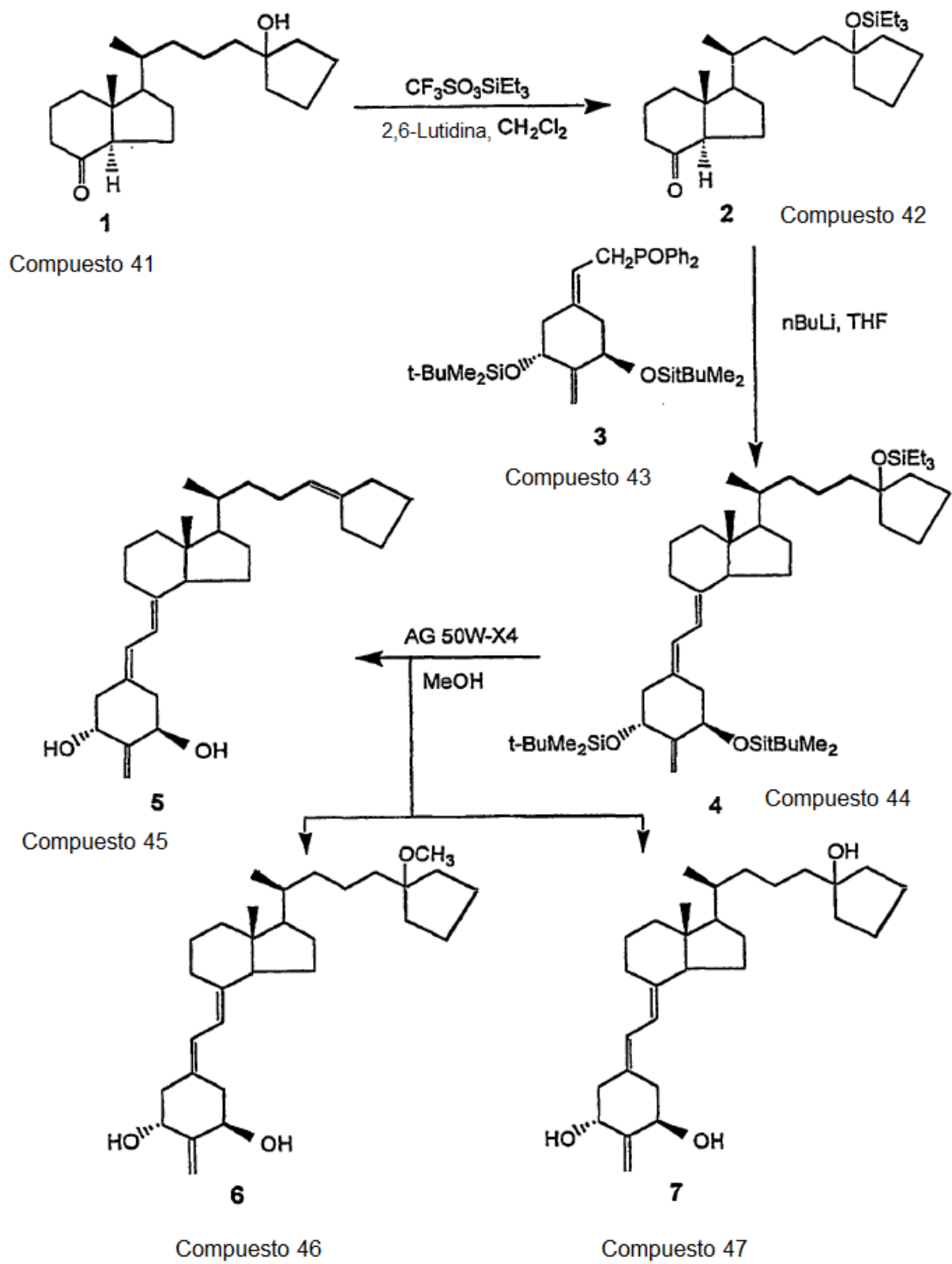


22: 2 $\alpha$   
23: 2 $\beta$

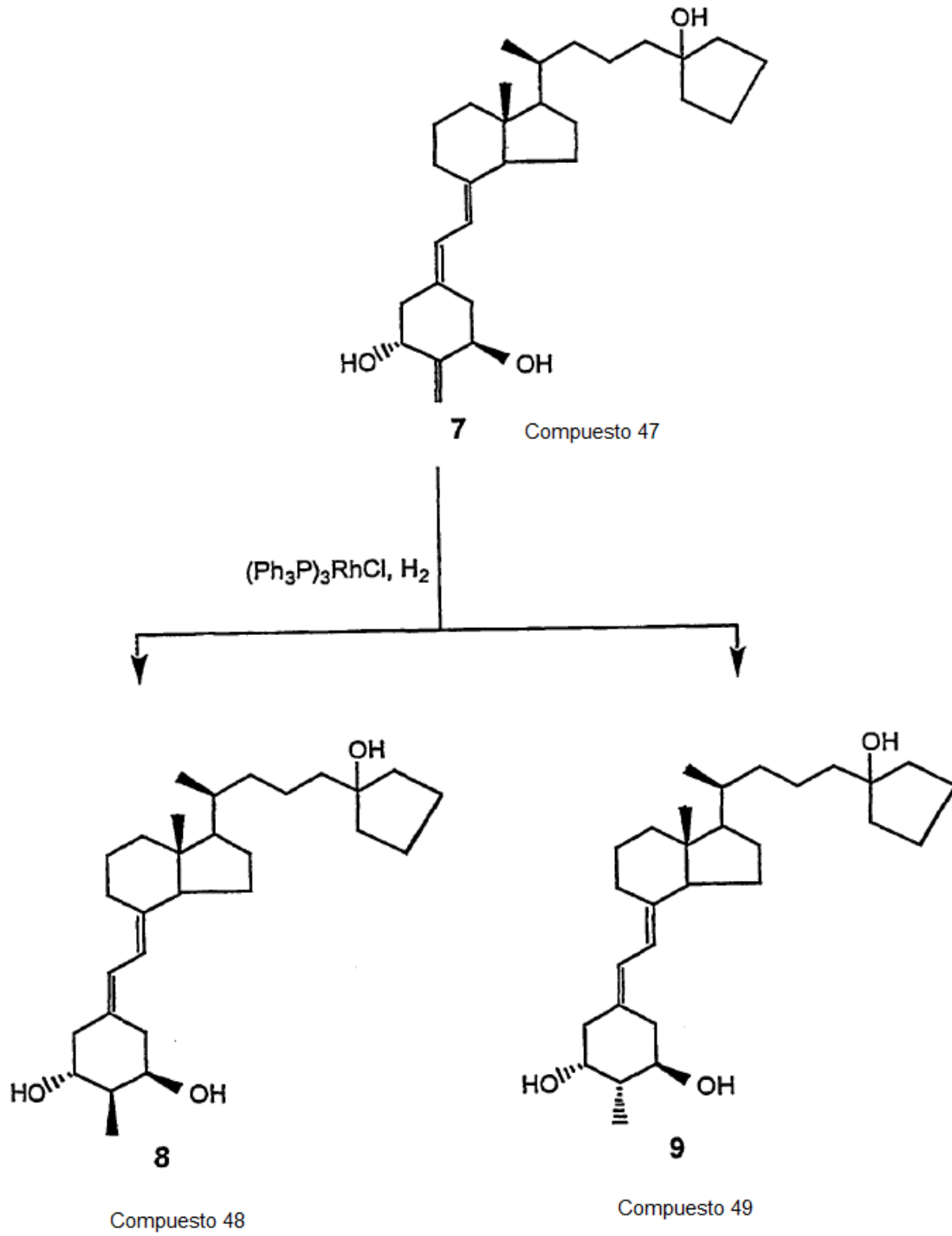
ESQUEMA IV



ESQUEMA V



ESQUEMA VI





## REIVINDICACIONES

1. 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.
2. 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.
3. 19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.
- 5 4. 19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.
5. Una composición farmacéutica, que al menos comprende un compuesto escogido de 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y 19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 6. Una composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que el compuesto está presente en una cantidad de 0,1  $\mu$ g/g a 50  $\mu$ g/g de la composición.
7. Un compuesto escogido de 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y 19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, para usar en el tratamiento de enfermedades metabólicas óseas en las que se desea mantener o aumentar la masa ósea.
- 15 8. El compuesto para usar según la reivindicación 7, en la que la enfermedad es osteoporosis senil, osteoporosis postmenopáusica, osteoporosis inducida por esteroides, osteoporosis de bajo recambio óseo, osteomalacia u osteodistrofia renal.
9. El compuesto para usar según la reivindicación 7, en la que el compuesto se administra oral, parenteral o transdérmicamente.
- 20 10. El compuesto para usar según la reivindicación 7, en la que el compuesto se administra en una dosificación de 0,1  $\mu$ g a 50  $\mu$ g por día.
11. Un compuesto escogido de 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y 19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, para usar en el tratamiento de la psoriasis.
- 25 12. El compuesto para usar según la reivindicación 11, en la que el compuesto es para administrar en una cantidad de 0,01  $\mu$ g/día a 100  $\mu$ g/día.
13. Un compuesto escogido de 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 19-nor-26,27-dihomo-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, 19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\alpha$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y 19-nor-26,27-dimetilen-20(S)-2 $\beta$ -metil-1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>, para usar en el tratamiento de la leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de próstata.
- 30 14. El compuesto para usar según la reivindicación 13, en la que el compuesto se administra oral, parenteral o transdérmicamente.
15. El compuesto para usar según la reivindicación 13, en la que el compuesto es para administrarse en una dosificación de 0,1  $\mu$ g a 50  $\mu$ g por día.
- 35

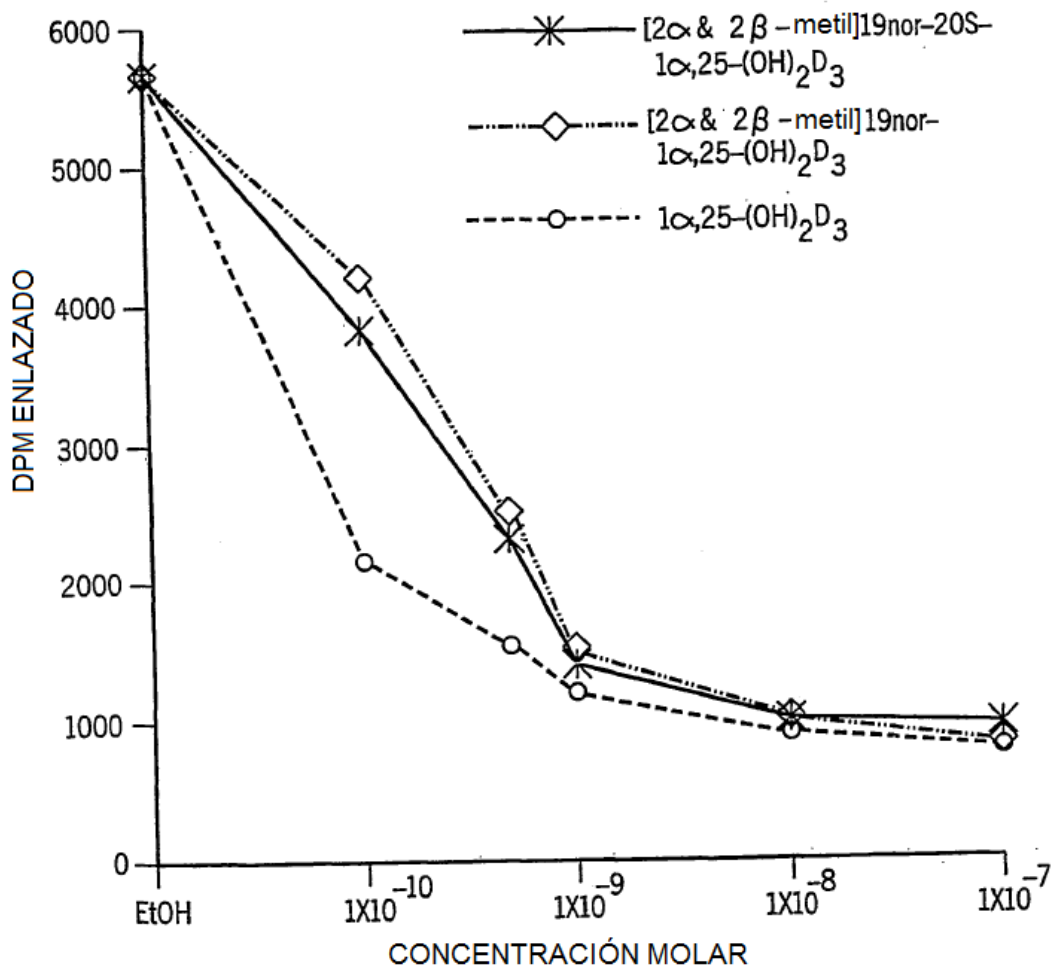


FIG. 1

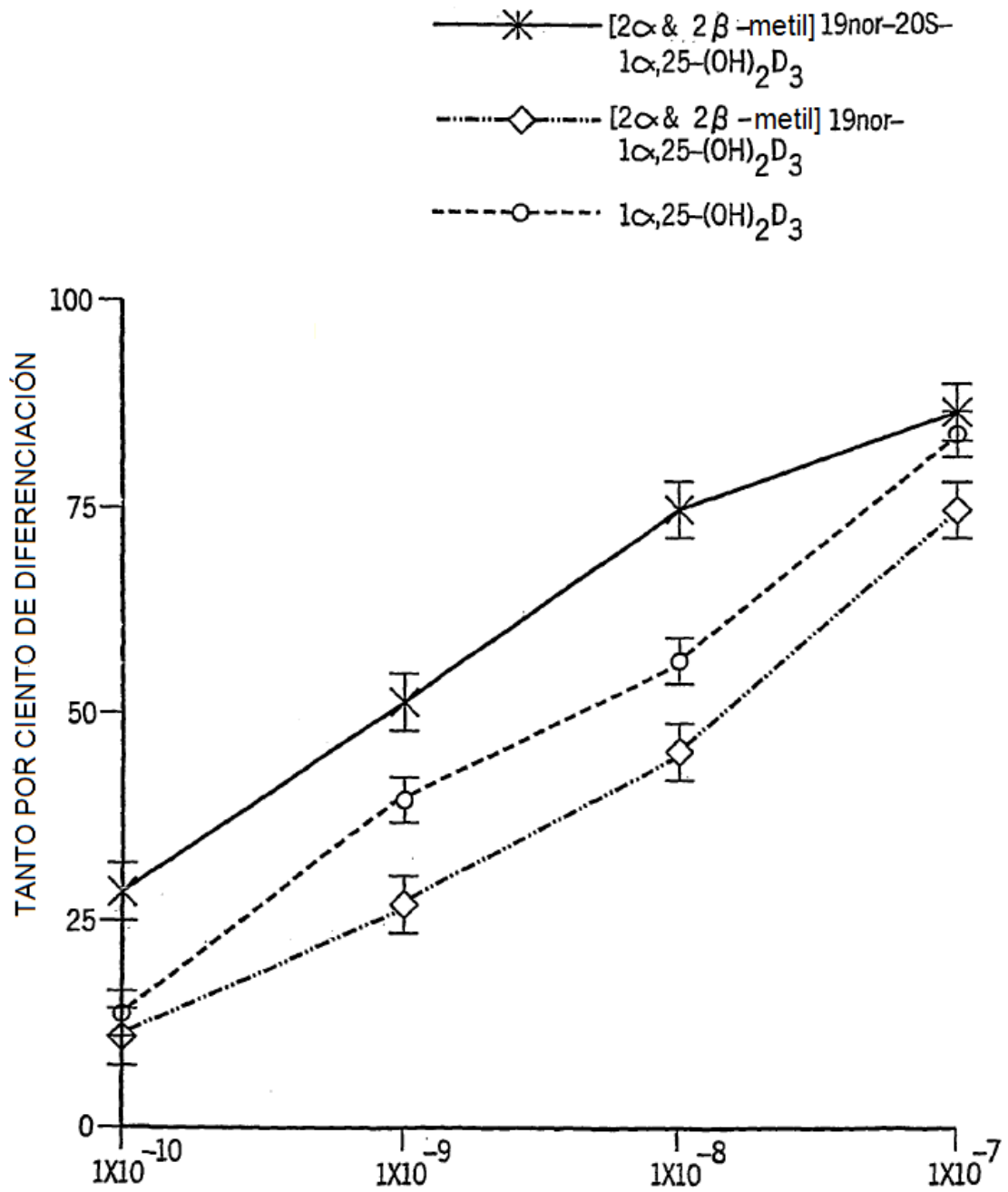


FIG. 2

CONCENTRACIÓN MOLAR

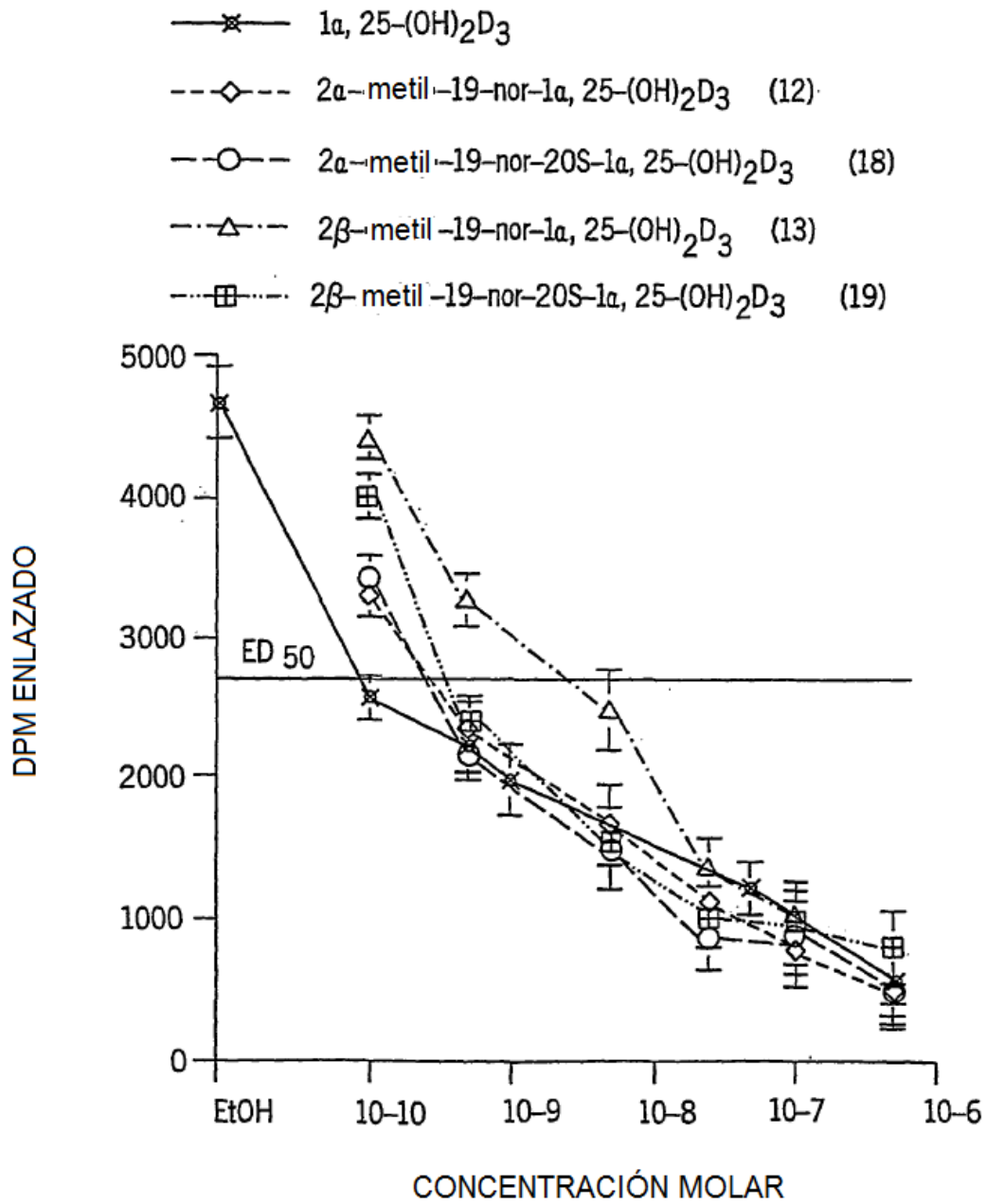


FIG. 3

- \*— 1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$
- -◇- - 2 $\alpha$ -metil-19-nor-1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  (12)
- -○- - 2 $\alpha$ -metil-19-nor-20S-1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  (18)
- -△- - 2 $\beta$ -metil-19-nor-1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  (13)
- -■- - 2 $\beta$ -metil-19-nor-20S-1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  (19)

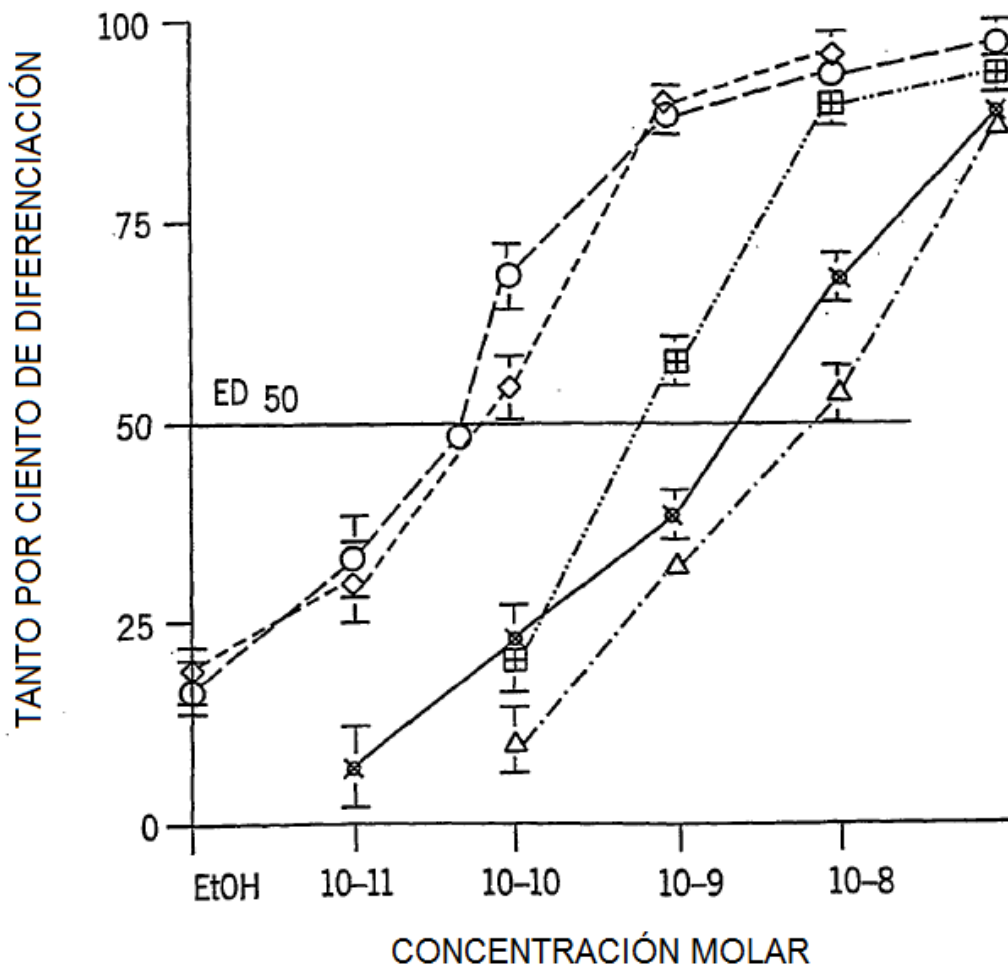


FIG. 4

- x— 1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$
- ◇--- 2 $\alpha$ -hidroximetil-19-nor-1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  (20)
- 2 $\alpha$ -hidroximetil-19-nor-20S-1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  (22)
- △--- 2 $\beta$ -hidroximetil-19-nor-1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  (21)
- 2 $\beta$ -hidroximetil-19-nor-20S-1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  (23)

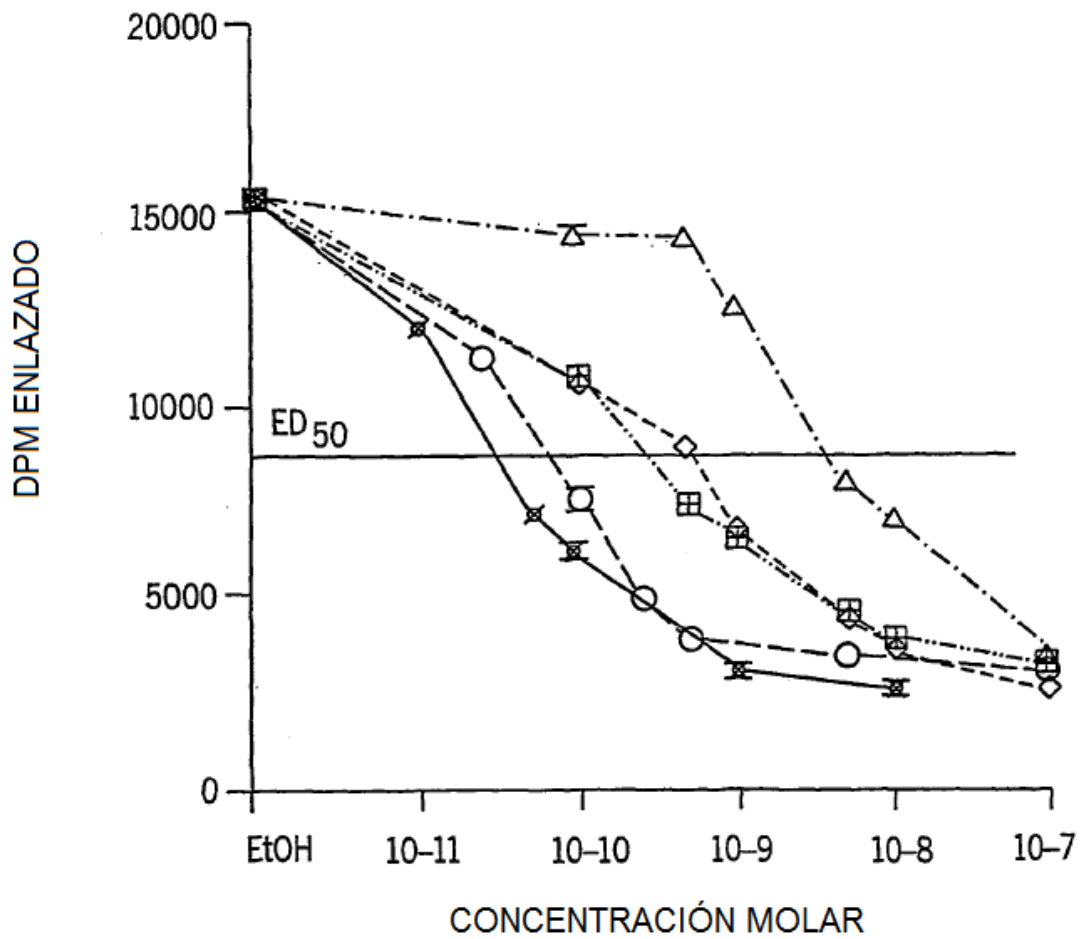


FIG. 5

- ×— 1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$
- ◇--- 2 $\alpha$ -hidroximetil-19-nor-1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  (20)
- 2 $\alpha$ -hidroximetil-19-nor-20S-1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  (22)
- △--- 2 $\beta$ -hidroximetil-19-nor-1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  (21)
- 2 $\beta$ -hidroximetil-19-nor-20S-1 $\alpha$ , 25-(OH) $_2$ D $_3$  (23)

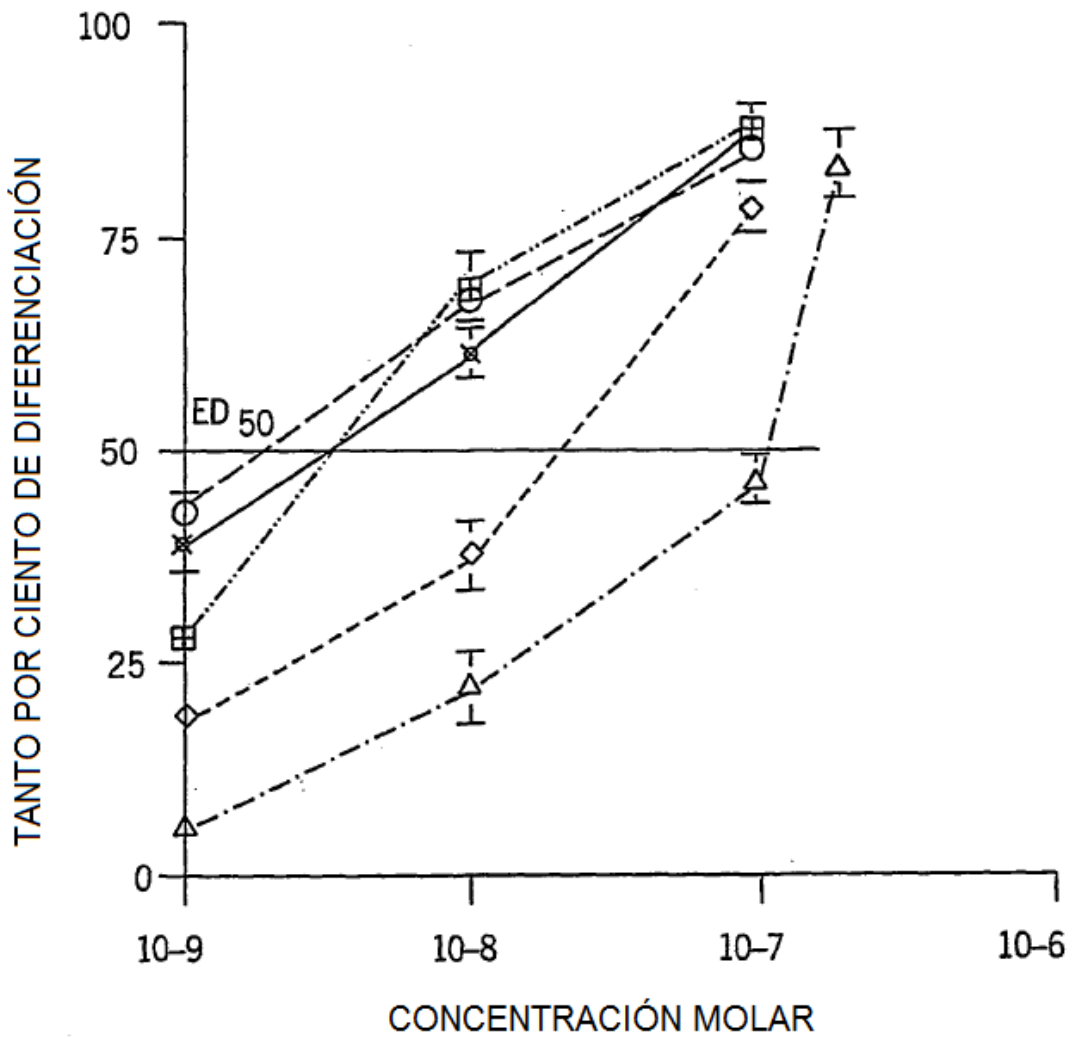


FIG. 6