

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 719**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/045** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2006 E 06814063 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 1931324**

54 Título: **Análogos Des-C,D de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-19-norvitamina D<sub>3</sub>**

30 Prioridad:

**30.08.2005 US 712365 P**

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

**14.04.2015**

73 Titular/es:

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

**614 WALNUT STREET, P.O. BOX 7365  
MADISON, WI 53707-7365, US**

72 Inventor/es:

**DELUCA, HECTOR F.;  
PLONSKA-OCYPA, KATARZYNA;  
SICINSKI, RAFAL;  
GRZYWACZ, PAWEL;  
PLUM, LORI A. y  
CLAGETT-DAME, MARGARET**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 533 719 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Análogos *Des-C,D* de  $1\alpha,25$ -dihidroxi-19-norvitamina  $D_3$

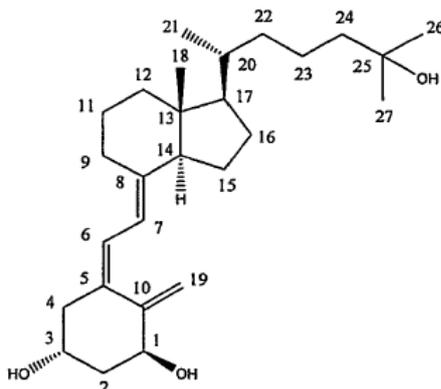
## Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a análogos de compuestos de la vitamina D que no incluyen los anillos C y D, más particularmente a análogos *des-C,D* de  $1\alpha,25$ -dihidroxi-19-norvitamina  $D_3$ , y aún más particularmente a análogos *des-C,D* de 2-metilen- $1\alpha,25$ -dihidroxi-19-norvitamina  $D_3$  y a formulaciones farmacéuticas que incluyen estos compuestos o mezclas de los mismos. La invención también se refiere al uso de los compuestos, y sus mezclas en la preparación de medicamentos para usar en el tratamiento de varias enfermedades.

## Antecedentes de la invención

10 La hormona natural  $1\alpha,25$ -dihidroxi-19-norvitamina  $D_3$  (también denominada  $1\alpha,25$ -dihidroxicolecalciferol y calcitriol) y su análogo en la serie del ergosterol, es decir  $1\alpha,25$ -dihidroxi-19-norvitamina  $D_2$ , son conocidas por ser reguladores muy potentes de la homeostasis del calcio en animales y seres humanos, y también se ha establecido su actividad en la diferenciación celular, Ostrem *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 2610 (1987). Se han preparado y ensayado muchos análogos estructurales de estos metabolitos, que incluyen  $1\alpha$ -hidroxi-19-norvitamina  $D_3$ ,  $1\alpha$ -hidroxi-19-norvitamina  $D_2$ , varias vitaminas homologadas de cadena lateral, y análogos fluorados. Algunos de estos compuestos exhiben una separación interesante 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 como la osteodistrofia renal, raquitismo resistente a la vitamina D, osteoporosis, psoriasis, y ciertos tumores malignos. La estructura de la  $1\alpha,25$ -dihidroxi-19-norvitamina  $D_3$  y el sistema de numeración usado para denotar los átomos de carbono en este compuesto se muestran a continuación.

20



$1\alpha,25$ -dihidroxivitamina  $D_3$  =  $1\alpha,25$ -dihidroxicolecalciferol = Calcitriol

Otra clase de análogos de la vitamina D, es decir los denominados compuestos derivados de la 19-norvitamina D, se caracteriza por el reemplazamiento del grupo metileno exocíclico del anillo A (átomo de carbono 19), típico del sistema de la vitamina D, por dos átomos de hidrógeno. El ensayo biológico de tales 19-nor-análogos (por ejemplo,  $1\alpha,25$ -dihidroxi-19-norvitamina  $D_3$ ) reveló un perfil de actividad selectivo con alta potencia para inducir la diferenciación celular, y una actividad muy baja de movilización del calcio. Así, estos compuestos son potencialmente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de tumores malignos, o el tratamiento de varios trastornos de la piel. Se han descrito dos métodos diferentes de síntesis de tales análogos de la 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

30

También se han sintetizado varios análogos 2-sustituidos de  $1\alpha,25$ -dihidroxi-19-norvitamina  $D_3$ , es decir compuestos sustituidos en la posición 2 con grupos hidroxilo o alcoxi (DeLuca *et al.*, Patente de EE.UU. No. 5.536.713), con grupos 2-alquilo (DeLuca *et al.*, Patente de EE.UU. No. 5.945.410), y con grupos 2-alquilideno (DeLuca *et al.*, Patente de EE.UU. No. 5.843.928), los cuales exhiben interesantes y selectivos perfiles de actividad. Todos estos estudios indican que los sitios de enlace en los receptores de la vitamina D pueden acomodar diferentes sustituyentes en la posición C-2 en los análogos de la vitamina D.

35

La Patente de EE.UU. No. 4.666.634 describe análogos 2 $\beta$ -hidroxilo y alcoxi (por ejemplo, ED-71) de la  $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina  $D_3$  como fármacos potenciales para usar en el tratamiento de la osteoporosis y para usar como agentes antitumorales. Véase también Okano *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1444 (1989). Se han preparado y ensayado otros análogos de  $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina  $D_3$  2-sustituidos (con grupos hidroxialquilo, por ejemplo, ED-120, y fluoroalquilo) en el anillo A (Miyamoto *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* 41, 1111 (1993); Nishii *et al.*,

40

*Osteoporosis Int. Suppl. 1*, 190 (1993); Posner *et al.*, *J. Org. Chem.* 59, 7855 (1994), y *J. Org. Chem.* 60, 4617 (1995)).

5 En un esfuerzo continuo para explorar la clase 19-nor de compuestos de la vitamina D farmacológicamente importantes, recientemente se han sintetizado y ensayado sus análogos (Sicinski *et al.*, *J. Med. Chem.*, 41, 4662 (1998); Sicinski *et al.*, *Steroids* 67, 247 (2002); Deluca *et al.*, Patentes de EE.UU. Nos. 5.843.928, 5.936.133 y 6.382.071) que se caracterizan por la transposición del grupo metileno exocíclico del anillo A del átomo de carbono 10 (C-10) al átomo de carbono 2 (C-2), es decir compuestos 2-metilen-19-nor-vitamina D. Estudios de mecánica molecular realizados sobre estos análogos mostraron que puede esperarse un cambio de la conformación del anillo A dando lugar al "aplanamiento" del anillo de ciclohexanodiol. A partir de cálculos de mecánica molecular y estudios de RMN de estos compuestos se estableció que el equilibrio conformacional del anillo era aproximadamente 6:4 a favor del conformero que tiene un 1 $\alpha$ -OH ecuatorial. La introducción del grupo 2-metileno en el esqueleto de átomos de carbono de la 19-nor-vitamina D cambia el carácter de sus grupos hidroxilo (1 $\alpha$ - y 3 $\beta$ -) del anillo A; ambos están ahora en las posiciones alílicas, similares al grupo 1 $\alpha$ -hidroxilo (importante para la actividad biológica) en la hormona natural, 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Los análogos 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-2-metileno-19-norvitamina D se caracterizan por una potencia biológica significativa la cual se acrecienta en compuestos con la configuración (20S) "no natural".

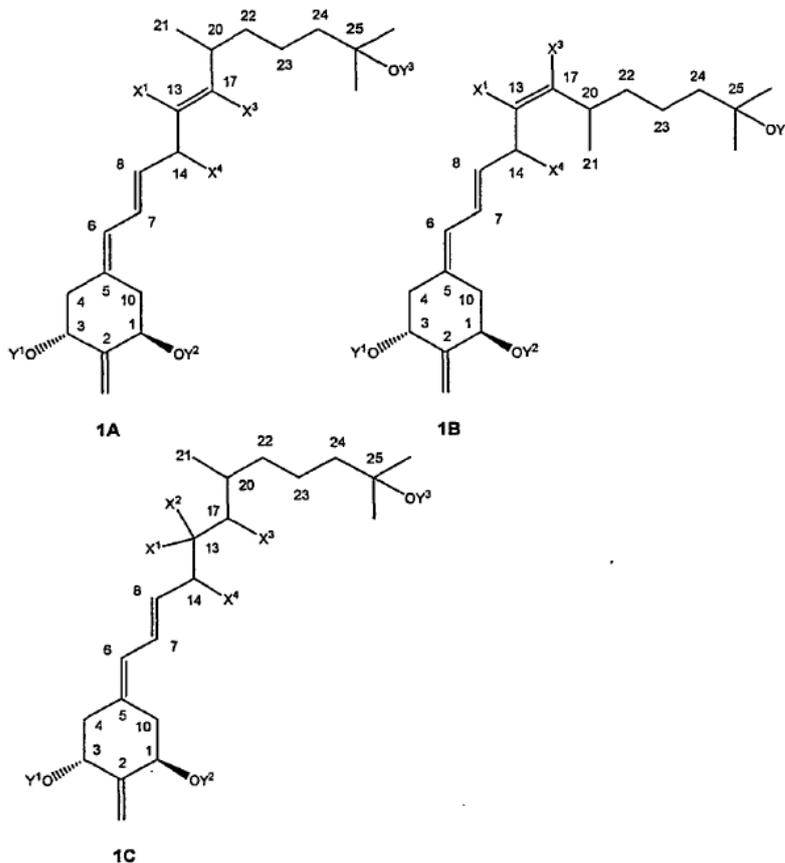
10 En un esfuerzo continuo para explorar la clase 19-nor de compuestos de la vitamina D farmacológicamente importantes, se han sintetizado y ensayado análogos que se caracterizan por la presencia de un sustituyente metileno en el átomo de carbono 2 (C-2), un grupo hidroxilo en el átomo de carbono 1 (C-1), y una cadena lateral acortada unida al átomo de carbono 20 (C-20). El 1 $\alpha$ -hidroxi-2-metileno-19-nor-pregnacalciferol se describe en la Patente de EE.UU. No. 6.566.352 mientras que el 1 $\alpha$ -hidroxi-2-metileno-19-nor-(20S)-homopregnacalciferol se describe en la Patente de EE.UU. No. 6.579.861 y el 1 $\alpha$ -hidroxi-2-metileno-19-nor-bishomopregnacalciferol se describe en la Patente de EE.UU. No. 6.627.622. Todos estos tres compuestos tienen una actividad enlazante relativamente alta para el receptor de la vitamina D y una actividad de diferenciación celular relativamente alta, pero poca, si alguna, actividad calcémica en comparación con la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>. Sus actividades biológicas hacen de estos compuestos excelentes candidatos para una variedad de usos farmacéuticos, como se pone manifiesto en las patentes '352, '861 y '622.

20 Una interesante modificación del esqueleto de la vitamina D es la eliminación de sus anillos C y D. El primer compuesto (retiferol) que carece de la subestructura C,D fue descrito hace diez años por Kutner *et al.* (Kutner *et al.*, *Bioorg. Chem.*, 23, 22 (1995). Se han descrito varios otros derivados de *des-C,D* vitamina D<sub>3</sub>, que incluyen 19-nor análogos, (Bauer *et al.*, Patente de EE.UU. No. 5.969.190; Barbier *et al.*, Patente de EE.UU. No. 6.184.422) y se ha informado que algunos de ellos (Ro 65-2299) muestran mejores actividades biológicas [Hilpert y Wirz, *Tetrahedron*, 57, 681 (2001)].

### Sumario de la invención

35 La invención proporciona compuestos que son análogos de 1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-19-norvitamina D<sub>3</sub> que carecen de los anillos C y D tales como análogos *des-C,D* de 2-metileno-19-norvitamin D<sub>3</sub>, formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos, y el uso de estos compuestos o sus mezclas en la preparación de medicamentos para usar en el tratamiento de varios estados patológicos.

La invención proporciona compuestos que tienen las fórmulas 1A, 1B, 1C, o una de sus mezclas como se muestra a continuación:



En las que:

- 5  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  y  $X^4$  se seleccionan independientemente de H y grupos alquilo de cadena lineal y ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono que incluyen grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo;

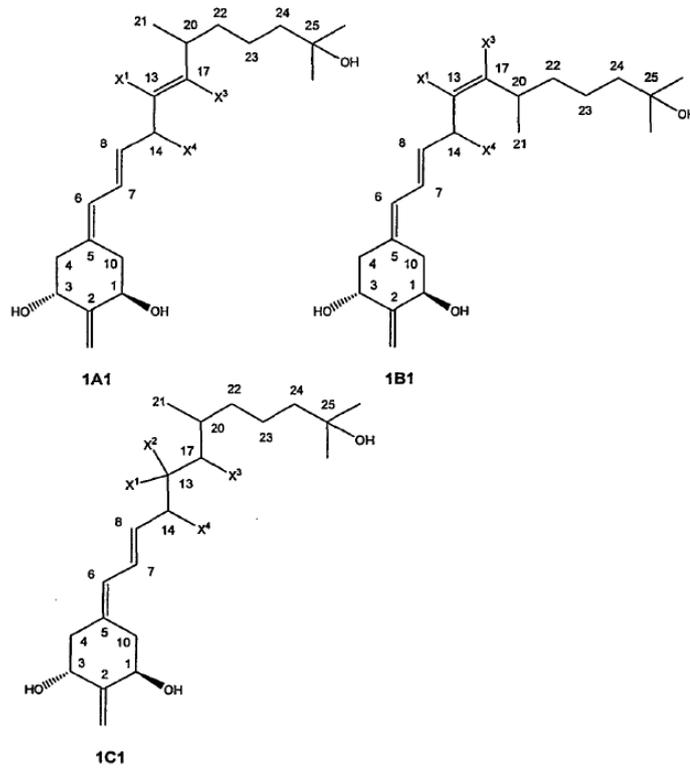
$Y^1$ ,  $Y^2$ , e  $Y^3$  se seleccionan independientemente de H o grupos protectores del grupo hidroxilo;

Los átomos de carbono en las posiciones 14 y 20 pueden tener independientemente la configuración R o S en los compuestos de fórmula 1A y 1B; y

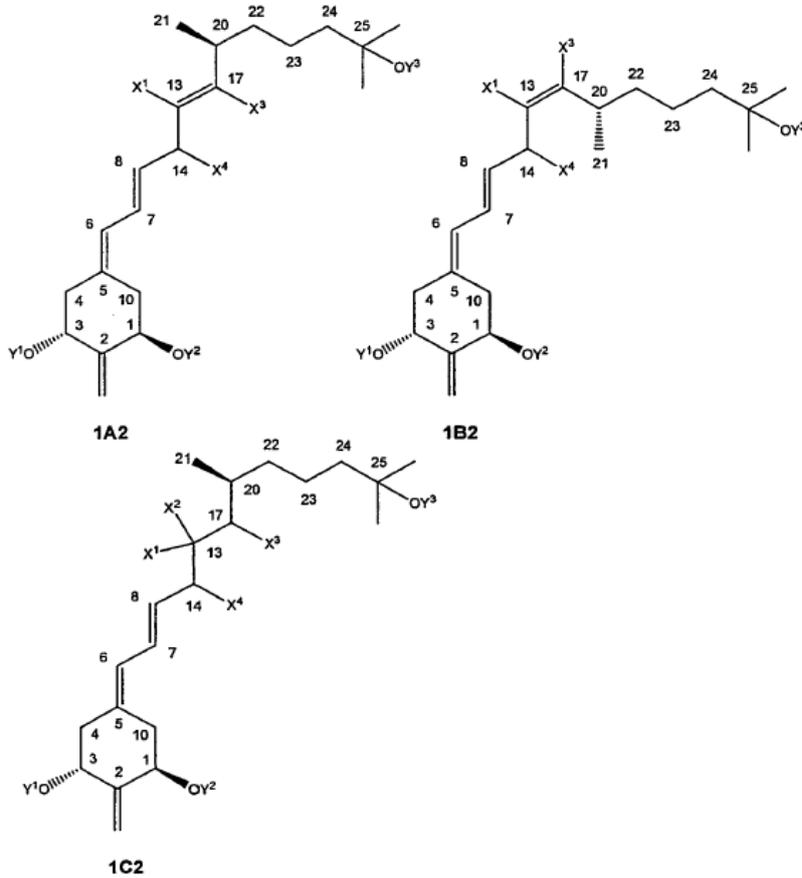
- 10 Los átomos de carbono en las posiciones 13, 14, 17 y 20 pueden tener independientemente la configuración R o S en los compuestos de fórmula 1C.

En algunas realizaciones,  $Y^1$  e  $Y^2$  son ambos grupos protectores del grupo hidroxilo tales como grupos sililo. En algunas realizaciones,  $Y^1$  e  $Y^2$  son ambos grupos t-butildimetilsililo. En algunas realizaciones,  $Y^3$  es un grupo trialquilsililo tal como un grupo trimetilsililo o trietilsililo. En otras realizaciones,  $Y^1$ ,  $Y^2$ , e  $Y^3$  son todos H tal que el compuesto tiene las fórmulas 1A1, 1B1 o 1C1 que se muestran más adelante. En algunas realizaciones, cada uno de  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  y  $X^4$  se seleccionan independientemente de H o un grupo metilo.

- 15



En algunas realizaciones, los compuestos de fórmula 1A, 1B1 y 1C1 tienen las fórmulas 1A2, 1B2 o 1C2 que se muestran a continuación:



En las que:

$X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  y  $X^4$  se seleccionan independientemente de H y grupos alquilo de cadena lineal y ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono;

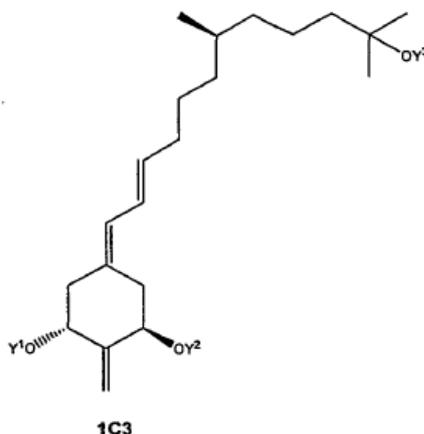
$Y^1$ ,  $Y^2$ , e  $Y^3$  se seleccionan independientemente de H o grupos protectores del grupo hidroxilo;

- 5 Los átomos de carbono en la posición 14 tienen independientemente la configuración R o S en los compuestos de fórmula 1A2 y 1B2; y

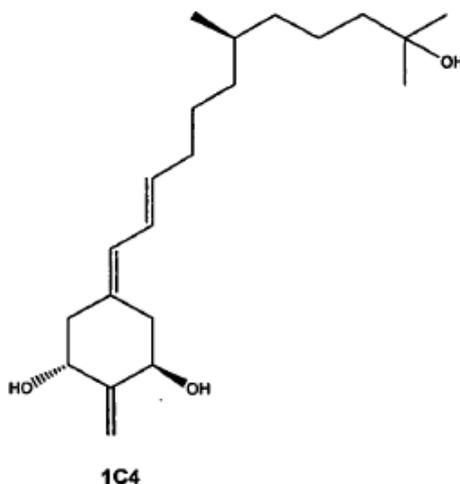
Los átomos de carbono en las posiciones 13, 14 y 17 pueden tener independientemente la configuración R o S en los compuestos de fórmula 1C2.

- 10 En algunas de tales realizaciones cada uno de  $Y^1$ ,  $Y^2$ , e  $Y^3$  es H. En algunas realizaciones cada uno de  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  y  $X^4$  se selecciona independientemente de H o un grupo metilo.

En algunas realizaciones, la invención proporciona compuestos de fórmula 1C que tienen la fórmula 1C3 que se muestra a continuación:



- 15 En la que  $Y^1$ ,  $Y^2$ , e  $Y^3$  se seleccionan independientemente de H o grupos protectores del grupo hidroxilo. En algunas de tales realizaciones  $Y^1$ ,  $Y^2$ , e  $Y^3$  son todos grupos protectores del grupo hidroxilo tales como grupos sililo. En algunas de tales realizaciones  $Y^1$  e  $Y^2$  son grupos t-butildimetilsililo e  $Y^3$  es un grupo trialkilsililo tal como un grupo trietilsililo. En otras realizaciones,  $Y^1$ ,  $Y^2$ , e  $Y^3$  son todos H tal que el compuesto tiene la fórmula 1C4 que se muestra a continuación:



- 20 En algunas realizaciones, los compuestos de cualquiera de las realizaciones pueden estar presentes en una forma purificada. En otras realizaciones, los compuestos en una composición pueden estar presentes como una mezcla. En algunas realizaciones, la mezcla incluye un primer compuesto de la invención y un segundo compuesto de la invención, y la relación del primer compuesto al segundo compuesto varía de 50:50 a 99,9:0,1. En algunas de tales realizaciones, la relación del primer compuesto al segundo compuesto varía de 70:30 a 99,9:0,1, de 80:20 a 99,9:0,1, de 90:10 a 99,9:0,1, o de 95:5 a 99,9:0,1.
- 25

Los anteriores compuestos fueron/son ensayados y se encontró que exhibían patrones deseables y muy ventajosos de actividad biológica con respecto a la actividad del transporte intestinal del calcio, la capacidad de movilizar al calcio del hueso y la capacidad de enlazar al receptor de la vitamina D. Los compuestos pueden así encontrar uso en el tratamiento del cáncer, las afecciones de la piel y los trastornos autoinmunes. Por lo tanto, en algunas realizaciones estos compuestos o formulaciones farmacéuticas, que incluyen uno o más compuestos de la invención, pueden emplearse como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades o trastornos tales como el cáncer, las enfermedades autoinmunes, afecciones de la piel e hiperparatiroidismo secundario. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser transdérmico, oral o parenteral.

Los compuestos de la invención también pueden ser especialmente adecuados para el tratamiento y la profilaxis de trastornos del ser humano que se caracterizan por un desequilibrio en el sistema inmune, por ejemplo, en enfermedades autoinmunes, que incluyen esclerosis múltiple, diabetes mellitus, reacción anfitrión contra injerto, y rechazo de trasplantes; y adicionalmente, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide y asma, así como la mejora de la curación de la fractura del hueso y mejores injertos óseos. Otras afecciones que pueden ser tratadas con los compuestos de la invención son el acné, la alopecia, enfermedades de la piel tales como piel seca (carencia de hidratación dérmica), laxitud indebida de la piel (insuficiente firmeza de la piel), insuficiente secreción de sebo y arrugas, e hipertensión.

Los compuestos descritos en la presente memoria también fueron ensayados y se encontró que moderaban la actividad de diferenciación celular. Así, estos compuestos también pueden usarse como agentes terapéuticos para el tratamiento de la psoriasis y/o como agentes anticancerosos, especialmente contra la leucemia, el cáncer de colon, el cáncer de mama y el cáncer de próstata. En algunas realizaciones, los compuestos y las composiciones de la invención se usan para tratar una afección biológica seleccionada de psoriasis; leucemia; cáncer de colon; cáncer de mama; cáncer de próstata; esclerosis múltiple; lupus; diabetes mellitus; reacción anfitrión contra injerto; rechazo de trasplantes de órganos; una enfermedad inflamatoria seleccionada de artritis reumatoide, asma, eczema o enfermedades inflamatorias de los intestinos; una afección de la piel seleccionada de arrugas, falta de adecuada firmeza de la piel, falta de adecuada hidratación dérmica, o insuficiente secreción de sebo; o hiperparatiroidismo secundario.

En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el compuesto o la composición farmacéutica se administra oral, rectal, parenteral, transdérmica o tópicamente. En otras realizaciones, el compuesto o las composiciones farmacéuticas se administran en un aerosol el cual puede conseguirse usando un inhalador o un nebulizador.

Los compuestos de la invención pueden usarse para preparar formulaciones farmacéuticas o medicamentos que incluyan un compuesto o una mezcla de los compuestos en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales formulaciones farmacéuticas y medicamentos pueden usarse para tratar varios trastornos biológicos tales como los descritos en la presente memoria. Los métodos para tratar tales trastornos típicamente incluyen administrar una cantidad efectiva del compuesto o una cantidad apropiada de una formulación farmacéutica o un medicamento que incluya el compuesto, a un sujeto que padece el trastorno biológico. Cuando se usa en la presente memoria "sujeto" se refiere a cualquier animal que pueda experimentar los efectos beneficiosos de un compuesto de la invención tras la administración del compuesto al animal. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas otras realizaciones, el mamífero se selecciona de un roedor, un bovino, un equino, un canino, un felino, un osuno, un porcino, un conejo, o una cobaya. En algunas realizaciones, el mamífero es una rata o es un ratón. En algunas realizaciones, el sujeto es un primate tal como, en algunas realizaciones, un ser humano. En algunas realizaciones, los compuestos se usan para preparar un aerosol el cual puede incluir un compuesto tipo glicol tal como propilenglicol.

Los compuestos pueden estar presentes en una composición para tratar las enfermedades anteriormente señaladas en una cantidad de aproximadamente 1 mg/g de la composición, preferiblemente de aproximadamente 0,1 µg/g a aproximadamente 500 µg/g de la composición, y puede administrarse tópicamente, transdérmica, oral, rectal o parenteralmente en dosificaciones de aproximadamente 0,01 µg/día a aproximadamente 1 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 0,1 µg/día a aproximadamente 500 µg/día.

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

#### **Breve descripción de los dibujos**

Las Figuras 1-4 ilustran varias actividades biológicas del compuesto de fórmula 1C4 (en las figuras denominado "Des-C,D") comparadas con las de la hormona natural  $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina  $D_3$  (en las figuras denominada " $1,25(OH)_2D_3$ ").

La Figura 1 es un gráfico que compara la actividad relativa de Des-C,D y  $1,25(OH)_2D_3$  en competir con [ $^3H$ ]- $1,25(OH)_2D_3$  para enlazarse al receptor recombinante de vitamina D de longitud completa de rata.

La Figura 2 es un gráfico que compara el porcentaje de diferenciación de células HL-60 en función de la concentración de Des-C,D con el de  $1,25(OH)_2D_3$ .

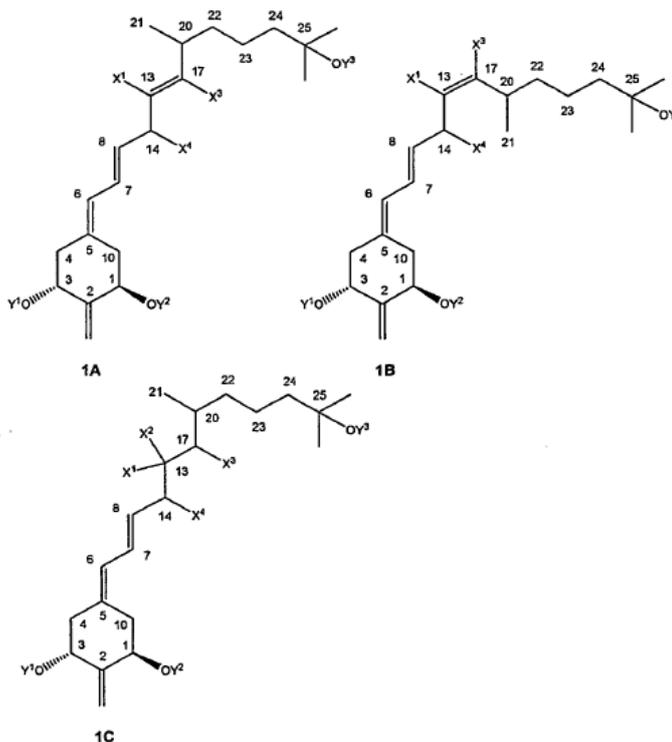
La Figura 3 es un gráfico que compara la actividad de transcripción *in vitro* de Des-C,D con la de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

La Figura 4 es un gráfico de barras que compara la actividad de movilización del calcio del hueso de Des-C,D con la de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

**Descripción detallada de la invención**

5 En general, la invención proporciona compuestos que son análogos de la 1α,25-dihidroxi-19-norvitamina D<sub>3</sub> que carecen de los anillos C y D (compuestos *des-C,D*) tales como análogos *des-C,D* de 2-metilen-1α,25-dihidroxi-19-norvitamina D<sub>3</sub>, formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos y el uso de los compuestos o sus mezclas en la preparación de medicamentos para usar en el tratamiento de varios estados patológicos.

10 La invención proporciona compuestos que tienen las fórmulas 1A, 1B, 1C, o una de sus mezclas como se muestra a continuación:



En las que:

X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup>, X<sup>3</sup> y X<sup>4</sup> se seleccionan independientemente de H y grupos alquilo de cadena lineal y ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono que incluyen grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo y butilo;

15 Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, e Y<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de H o grupos protectores del grupo hidroxilo;

Los átomos de carbono en las posiciones 14 y 20 pueden tener independientemente la configuración R o S en los compuestos de fórmula 1A y 1B; y

Los átomos de carbono en las posiciones 13, 14, 17 y 20 pueden tener independientemente la configuración R o S en los compuestos de fórmula 1C.

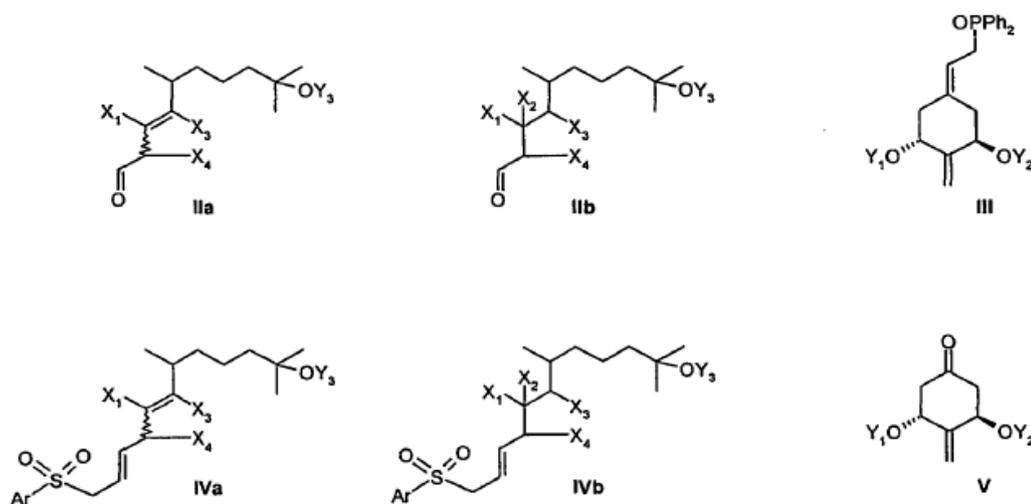
20 Cuando se usa en la presente memoria, la frase "grupos alquilo de cadena lineal y ramificada" se refiere a grupos que incluyen átomos de carbono e hidrógeno que sólo incluyen enlaces simples carbono-carbono y enlaces simples carbono-hidrógeno. Así, la frase "grupos alquilo de cadena lineal y ramificada" que tiene 1 a 4 átomos de carbono incluye grupos alquilo tales como metilo, etilo, propilo, i-propilo y butilo.

25 Cuando se usa en la presente memoria, la expresión "grupo protector del grupo hidroxilo" significa cualquier grupo comúnmente usado para la protección temporal del grupo funcional hidroxilo (-OH), tales como, pero no limitados a, los grupos alcóxicarbonilo, acilo, alquilsililo o alquilarilsililo (de aquí en adelante simplemente denominados grupos "sililo"), y alcóxialquilo. Los grupos protectores alcóxicarbonilo con grupos alquil-O-CO- tales como metóxicarbonilo, etóxicarbonilo, propóxicarbonilo, isopropóxicarbonilo, butóxicarbonilo, isobutóxicarbonilo, terc-butóxicarbonilo, bencilóxicarbonilo o alilóxicarbonilo. El término "acilo" significa un grupo alcanóilo de 1 a 6 átomos de carbono, en

5 todas sus formas isómeras, o un grupo carboxialcanoilo de 1 a 6 átomos de carbono, tal como un grupo oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, o un grupo acilo aromático tal como benzoilo, o un grupo benzoilo sustituido con grupos halo, nitro o alquilo. Los grupos protectores alcoialquilo son grupos 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 análogos alquilados. El término "arilo" especifica un grupo fenilo o un grupo fenilo alquil-, nitro- o halo-sustituido. Una lista extensa de grupos protectores de la funcionalidad hidroxilo puede encontrarse en Protective Groups in Organic Synthesis, Greene, T.W.; Wuts, P. G. M., John Wiley & Sons, Nueva York, NY, (3ª Edición, 1999) los cuales pueden añadirse o eliminarse usando los procedimientos puestos de manifiesto en el mismo y que de este modo se incorporan a la presente memoria por referencia en su totalidad y para todos los fines como si se hubieran desarrollado completamente en la presente memoria.

Un grupo "hidroxi protegido" es un grupo hidroxilo derivatizado o protegido por cualquiera de los grupos anteriores comúnmente usados para la protección temporal o permanente de grupos funcionales hidroxilo, por ej., los grupos sililo, alcoialquilo, acilo o alcoxicarbonilo que se definieron previamente.

15 La preparación de compuestos *Des*-C,D-19-norvitamina D de fórmulas 1A, 1B y 1C puede conseguirse usando cualquiera de los dos métodos generales. En el primer método se emplea la condensación Wittig-Horner de un aldehído (IIa o IIb) con un óxido de fosfina alílica (III). En un procedimiento alternativo, se lleva a cabo la olefinación de Julia e incluye la condensación de una sulfona insaturada (IVa o IVb), fácilmente preparada a partir de los aldehídos IIa o IIb, con el derivado V de ciclohexanona. Los compuestos IIA, IIB, III, IVa y V se muestran a continuación, en los que las variables tienen los mismos significados que se definieron anteriormente con respecto a los compuestos de fórmula 1A, 1B y 1C, y las líneas onduladas indican que ambos isómeros *cis* y *trans* están representados en la fórmula IIA y IVA:



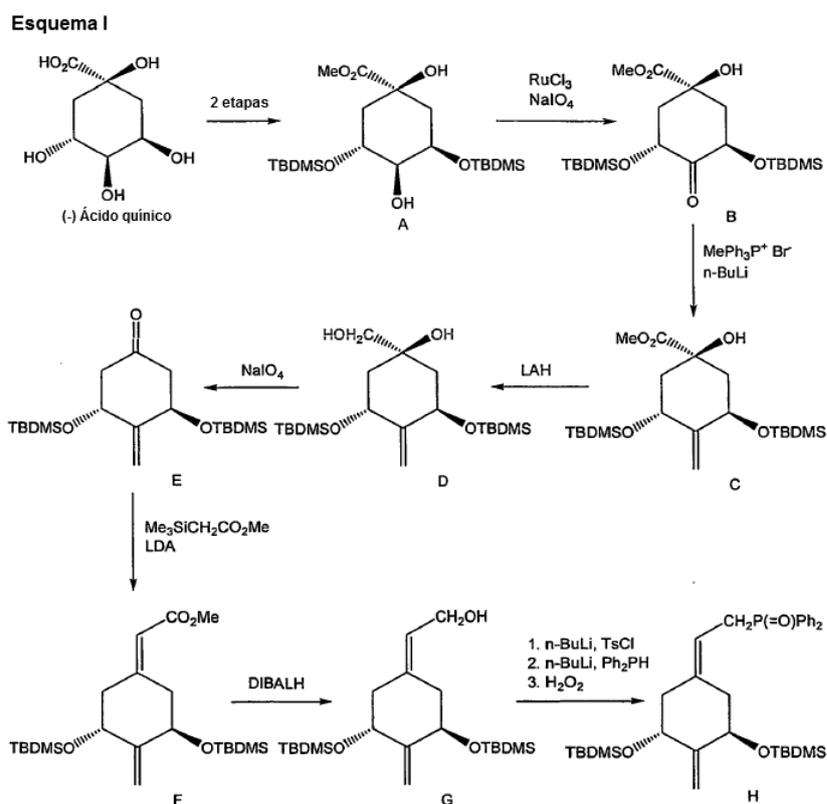
25 En las estructuras mostradas anteriormente, Ar representa un grupo aromático tal como un grupo fenilo, un grupo fenilo sustituido, un grupo 2-feniltetrazolilo, un grupo 2-benzotiazolilo, y otros grupos aromáticos que son adecuados para el procedimiento de olefinación de Julia. Los expertos en la técnica reconocerán que debe evitarse cualquier funcionalidad en el grupo Ar que pudiera ser sensible a, o interferir con, la reacción de condensación

30 En el óxido de fosfina III y la ciclohexanona V, Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub> son preferiblemente grupos protectores del grupo hidroxilo tales como grupos protectores sililo. El grupo t-butildimetilsililo (TBDMS) es un ejemplo de un grupo protector del grupo hidroxilo particularmente útil. Los procedimientos generales descritos anteriormente representan una aplicación del concepto de síntesis convergente, el cual ha sido efectivamente aplicado para la preparación de compuestos derivados de vitamina D (por ej. Kittaka et al., Synlett, 8, 1175 (2003), y J. Org. Chem., 68, 7407 (2003).

35 El óxido de fosfina III y la ciclohexanona V son reactivos convenientes que pueden usarse para preparar un gran número de compuestos derivados de 19-nor vitamina D que incluyen análogos *des*-C,D. Estos compuestos pueden prepararse según los procedimientos descritos por Sicinski et al., J. Med. Chem., 41, 4662 (1998), DeLuca et al., Patente de EE.UU. No. 5.843.928; Perlman et al., Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991); y DeLuca et al., Patente de EE.UU. No. 5.086.191. El Esquema 1 muestra el procedimiento general para sintetizar el óxido de fosfina III (véase el esquema 1, compuesto H) y la ciclohexanona V (véase el esquema 1, compuesto D) que se delinean en la Patente de EE.UU. No. 5.843.928 la cual se incorpora por este medio por referencia en su totalidad como si como si se hubiera desarrollado completamente en la presente memoria. La modificación del método mostrado en el Esquema 1 puede usarse para producir un gran número de análogos de la vitamina D como será evidente para los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse una gran variedad de compuestos de fosfonio en lugar del MePh<sub>3</sub>P<sup>+</sup>Br<sup>-</sup> usado para convertir la cetona B en el alqueno C. Ejemplos de tales compuestos incluyen EtPh<sub>3</sub>P<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>, PrPh<sub>3</sub>P<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>, MePh<sub>3</sub>P<sup>+</sup>Br<sup>-</sup> y compuestos en general preparados por reacción de trifenilfosfina con un haluro de alquilo,

un haluro de alqueno, un haluro de hidroxialquilo protegido, y un haluro de hidroxialqueno protegido. Los alquenos preparados usando este procedimiento pueden entonces usarse para preparar un óxido de fosfina de una manera análoga a la usada para preparar el óxido de fosfina H en el Esquema 1. Alternativamente, un alqueno análogo al compuesto C del Esquema 1 puede reducirse con  $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$  e  $\text{H}_2$  para dar otros análogos de la vitamina D. Véanse la Patente de EE.UU. No. 5.945.410 y Sicinski *et al.*, *J. Med. Chem.*, 41, 4662-4674 (1998) ambos de las cuales se incorporan por este medio por referencia en su totalidad y para todos los fines. Por lo tanto, el procedimiento para formar el óxido de fosfina mostrado en el esquema 1 puede usarse para preparar una amplia variedad de análogos de la vitamina D además de los compuestos de la presente invención.

Debe hacerse referencia a la siguiente descripción así como a los Esquemas 1, 2 y 3 para una ilustración detallada de la preparación de compuestos de fórmulas 1A, 1B y 1C y específicamente 2-metilen-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-des-C,D-19-norvitamina D<sub>3</sub>



### Ejemplos

La síntesis y características de varios análogos de la 19-nor vitamina D es descrita en numerosas patentes de los Estados Unidos que incluyen la Patente de EE.UU. No. 5.843.928, la Patente de EE.UU. No 6.627.622, la Patente de EE.UU. No 6.579.861, la Patente de EE.UU. No 5.086.191, la Patente de EE.UU. No 5.585.369, y la Patente de EE.UU. No 6.537.981. Cada una de las anteriormente descritas referencias se incorpora por este medio a la presente memoria por referencia en su totalidad y para todos los fines como si se hubiera desarrollado completamente en la presente memoria.

Los puntos de fusión (sin corregir) se determinaron usando un aparato de punto de fusión capilar Thomas-Hoover. Los espectros de absorción ultravioleta (UV) se registraron en etanol con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 3B UV-VIS. Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN) se registraron a 400 y 500 MHz en  $\text{CDCl}_3$  usando espectrómetros de consola Bruker Instruments DMX-400 y DMX-500 Avance. Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  se registraron a 125 MHz en  $\text{CDCl}_3$  con espectrómetros de consola Bruker Instruments DMX-500 Avance. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se dan campo abajo del patrón interno  $\text{Me}_4\text{Si}$  ( $\delta$  0,00). Los espectros de masas por impacto electrónico (EI) se obtuvieron con un instrumento Micromass AutoSpec (Beverly, MA). La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se realizó con un cromatógrafo de líquidos Water Associates equipado con un sistema de suministro de disolventes Modelo 6000A, un inyector modelo U6K Universal y un detector de absorbancia sintonizable Modelo 486. El THF se destiló justo antes de usarlo en benzofenona cetil de sodio en argón.

Los esquemas 1, 2 y 3 esbozan los procedimientos sintéticos descritos a continuación en detalle.

### Preparación del análogo 19 de 2-metilen-1 $\alpha$ ,25-dihidroxi-des-C,D-19-norvitamina D<sub>3</sub>

#### A. Protección del grupo hidroxilo del éster 1 (Esquema 2)

##### Éster de metilo del ácido (2R)-3-benciloximetoxi-2-metil-propiónico (2)

5 A una disolución de *R*-(-)-metil-3-hidroxi-2-metilpropionato **1** (4 mL, 4,26 g, 0,036 moles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (30 mL) se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (11,8 mL, 8,75 g, 0,06 moles) a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a -78°C y se añadió gota a gota bencil clorometil éter (5,6 mL, 6,29 g, 0,04 moles) vía una cánula. Se separó el baño de refrigeración y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. A continuación, se añadió yoduro de tetrabutilamonio (50 mg) y bencil clorometil éter (2 mL, 3,15 g, 0,02 moles) a la mezcla de reacción. La  
10 mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, se vertió sobre agua y se extrajo con cloruro de metileno. Las capas orgánicas combinadas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice usando hexano/EtOAc (9:1) como eluyente para dar el producto **2** (8,29 g, 97%) como un aceite incoloro.

15 **2**: [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> -3° (c 0,17, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,19 (3H, d, J = 7,1 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 2,77 (1 H, m, CH-CH<sub>3</sub>), 3,64 (1 H, dd, J = 9,4, 5,4 Hz, uno de CH<sub>2</sub>-CH), 3,70 (3H, s, CH<sub>3</sub>O), 3,78 (1 H, dd, J = 9,4, 7,8 Hz, uno de CH<sub>2</sub>-CH), 4,57 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4,74 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 7,29 (1 H, m, Ar-H<sub>para</sub>), 7,35 (4H, m, Ar-H<sub>orto,meta</sub>); <sup>13</sup>C RMN (125 MHz) δ 13,91 (CH<sub>3</sub>), 39,99 (C,H-CH<sub>3</sub>), 51,70 (CH<sub>3</sub>O), 69,22 y 69,60 (CH<sub>2</sub>CH y CH<sub>2</sub>-Ph), 94,50 (OCH<sub>2</sub>O), 127,63, 127,84 y 128,33 (Ar<sub>orto,meta,para</sub>), 137,61 (Ar<sub>ipso</sub>); MS (EI) m/z (intensidad relativa) ningún M<sup>+</sup>, 207 (M<sup>+</sup> - OCH<sub>3</sub>, 2), 131 (34), 120 (64), 91 (1 00); HRMS (ESI) masa exacta calculada para C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>Na (M<sup>+</sup> + Na) 261,1103, medida 261,1110.

#### 20 B. Reducción del éster 2

##### (2R)-3-Benciloximetoxi-2-metil-propan-1-ol (3)

Se añadió gota a gota una disolución del éster **2** (0,5 g, 2,1 mmoles) en THF anhidro (4 mL) a una suspensión de hidruro de litio y aluminio (0,16 g, 4,2 mmoles) en THF anhidro (10 mL) a 0°C. Se separó el baño de refrigeración y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche, se inactivó con agua fría y se extrajo con EtOAc. Los disolventes se separaron a vacío y el aceite bruto se purificó por cromatografía de gel de sílice usando hexano/EtOAc (8:2) como eluyente para dar el diol **3** aceitoso (0,29 g, 66%).

30 **3**: [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> -3° (c 0,17, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,92 (3H, d, J = 7,1 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 2,02 (1H, m, CH-CH<sub>3</sub>), 2,39 (1H, s, OH), 3,54 (1H, dd, J = 9,4, 7,6 Hz, uno de CH<sub>2</sub>-CH), 3,60 (d, J = 9,4 Hz, CH<sub>2</sub>OH), 3,65 (1 H, dd, J = 9,4, 4,8 Hz, uno de CH<sub>2</sub>-CH), 4,6 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4,75 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 7,30 (1 H, m, Ar-H<sub>para</sub>), 7,35 (4H, d, J = 4,3 Hz, Ar-H<sub>orto,meta</sub>); <sup>13</sup>C RMN (125 MHz) δ 13,61 (CH<sub>3</sub>), 35,62 (CH-CH<sub>3</sub>), 67,19 (CH<sub>2</sub>OH), 69,58 (CH<sub>2</sub>CH), 72,38 (CH<sub>2</sub>-Ph), 94,79 (OCH<sub>2</sub>O), 127,82, 127,90 y 128,49 (Ar<sub>orto,meta,para</sub>), 137,58 (Ar<sub>ipso</sub>); MS (EI) m/z (intensidad relativa) ningún M<sup>+</sup>, 180 (8), 120 (100), 108 (95), 89 (72); HRMS (ESI) masa exacta calculada para C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>Na (M<sup>+</sup> + Na) 233,1154, medida 233,1158.

#### C. Tosilación del hidroxilo compuesto 3

##### 35 Éster de 3-benciloximetoxi-2-metil-propilo del ácido (R)-toluen-4-sulfónico (4)

A una mezcla del diol **3** (29,2 mmoles, 6,13 g), DMAP (0,82 mmoles, 100 mg) y trietilamina (116,7 mmoles, 16,2 mL, 11,8 g) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (60 mL) se añadió cloruro de tosilo (37,9 mmoles, 7,23 g) a 0°C. Se dejó que la mezcla de reacción se calentara a temperatura ambiente y se continuó la agitación durante toda la noche. La mezcla se diluyó a continuación con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) y a continuación se lavó con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en un gel de sílice usando hexano/EtOAc (7:3) como eluyente para dar el tosilato **4** aceitoso (10,2 g, 97%).

45 **4**: [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> -5° (c 0,15, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,94 (3H, d, J = 7,1 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 2,09 (1 H, m, CH-CH<sub>3</sub>), 2,42 (3H, s, CH<sub>3</sub>Ph), 3,42 (1 H, dd, J = 9,4, 6,6 Hz, uno de CH<sub>2</sub>-CH), 3,47 (1 H, dd, J = 9,4, 5,1 Hz, uno de CH<sub>2</sub>-CH), 3,97 (1 H, dd, J = 9,4, 5,8 Hz, uno de CH<sub>2</sub>-OTs), 4,03 (1 H, dd, J = 9,4, 5,8 Hz, uno de CH<sub>2</sub>-OTs), 4,51 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4,65 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 7,30 (7H, br m, Ar-H), 7,78 (2H, d, J = 8,2 Hz, Ar<sub>orto</sub> de tosilo); <sup>13</sup>C RMN (125 MHz) δ 13,58 (CH<sub>3</sub>), 21,60 (Ph-CH<sub>3</sub>), 33,45 (CH-CH<sub>3</sub>), 68,61 (CH<sub>2</sub>CH), 69,27 (CH<sub>2</sub>OTs), 71,96 (CH<sub>2</sub>-Ph), 94,56 (OCH<sub>2</sub>O), 127,68, 127,82, 128,36, 129,75, 132,6, 137,58 y 144,66 (Ar); MS (EI) m/z (intensidad relativa) ningún M<sup>+</sup>, 257 (M<sup>+</sup> - OCH<sub>2</sub>Ph, 65), 245 (55), 227 (81), 86 (100); HRMS (ESI) masa exacta calculada para C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub>Na (M<sup>+</sup> + Na) 387,1242, medida 387,1252.

50

**D. Reacción del tosilato 4 con el reactivo de Grignard****(S)-1-Benciloximetoxi-2,6-dimetil-hept-5-eno (5)**

Se añadió gota a gota 4-cloro-2-metil-2-butano (15,5 mL, 14,4 g, 137,5 mmoles) a virutas de magnesio agitadas (6,75 g, 225 mmoles) en THF anhidro (465 mL) en argón a 0°C. La agitación se continuó a 0°C durante 1 hora. Se separó el baño de refrigeración y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda unas 1,5 horas adicionales. A continuación, la mezcla se enfrió a -78°C y el reactivo de Grignard formado se añadió vía una cánula a una disolución del tosilato **4** (10 g, 27,5 mmoles) en THF anhidro (70 mL). A continuación, se añadió a la mezcla de reacción Li<sub>2</sub>CuCl<sub>4</sub> (160 mL) [previamente preparado a partir de LiCl (1,36 g, 32,1 mmoles) y CuCl<sub>2</sub> (2,17 g, 16,1 mmoles)]. El baño de refrigeración se separó y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas. La mezcla se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la capa orgánica se lavó con disoluciones acuosas de NH<sub>4</sub>Cl y NaHCO<sub>3</sub>, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía de gel de sílice usando hexano/EtOAc (7:3) como eluyente para dar el producto **5** aceitoso (5,65 g, 78%).

**5:** [α]<sup>24</sup><sub>D</sub> +2° (c 0,24, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,94 (3H, d, J = 6,6 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 1,18 y 1,46 (1H y 1H, cada m), 1,60 y 1,68 [3H y 3H, cada s, =C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 1,87 (1H, m, CH-CH<sub>3</sub>), 2,05 (2H, m, =CCH<sub>2</sub>), 3,37 (1H, dd, J = 9,4, 6,8 Hz, uno de CH<sub>2</sub>-CH), 3,44 (1H, dd, J = 9,4, 5,8 Hz, uno de CH<sub>2</sub>-CH), 4,60 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4,76 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 5,10 (1H, br t, J ~ 7Hz, CH=C), 7,30 (1H, m, Ar-H<sub>para</sub>), 7,34 (4H, m, Ar-H<sub>orto,meta</sub>); <sup>13</sup>C RMN (125 MHz) δ 16,96 (CH-CH<sub>3</sub>), 17,53 (uno de CH<sub>3</sub>C=), 25,60 (uno de CH<sub>3</sub>C=), 32,92 (CH-CH<sub>3</sub>), 33,57 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH), 69,27 (CH<sub>2</sub>-Ph), 73,37 (CH<sub>2</sub>CH), 94,64 (OCH<sub>2</sub>O), 124,49 (C-CH<sub>3</sub>), 127,52, 127,77, 128,28 (Ar<sub>orto,meta,para</sub>), 137,95 [=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]; MS (EI) m/z (intensidad relativa) 262 (M<sup>+</sup>, 22), 232,2 (65), 154,1 (100); HRMS (ESI) masa exacta calculada para C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>Na (M<sup>+</sup> + Na) 285,1830, medida 285,1837.

**E. Epoxidación de la olefina 5****(2S)-1-Benciloximetoxi-2,6-dimetil-5,6-epoxi-heptano (6)**

Se disolvió la olefina **5** (3,2 g, 12,2 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (60 mL) y se añadió NaHCO<sub>3</sub> (1,6 g, 18,4 mmoles). A continuación, se añadió ácido 3-cloropeoxibenzoico (60%, 12,6 g, 36,6 mmoles) a temperatura ambiente con agitación. Se continuó la agitación durante 24 h y la mezcla se diluyó con éter, y se agitó mediante sacudidas con agua y NaOH 2M. La capa orgánica se lavó con agua y disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>Cl, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice usando hexano/EtOAc (9:1) como un eluyente para dar el producto **6** oleoso (2,5 g, 74%).

**6:** [α]<sup>24</sup><sub>D</sub> -1,7° (c 0,88, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,96 (3H, d, J = 6,7 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 1,25 (1H, m), 1,27 y 1,31 [3H y 3H, cada uno s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 1,5 - 1,7 (3H, br m), 1,79 (1H, m, CH-CH<sub>3</sub>), 2,73 (1H, m, CH<sub>2</sub>CHO), 3,45 (2H, br m, CH<sub>2</sub>-CH), 4,60 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4,76 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 7,29 (1H, m, Ar-H<sub>para</sub>), 7,34 (4H, d, J = 4,3 Hz, Ar-H<sub>orto,meta</sub>).

**F. reducción del epóxido 6****(2S)-7-Benciloximetoxi-2,6-dimetil-heptan-2-ol (7)**

A una disolución del epóxido **6** (2,5 g, 9 mmoles) en éter anhidro (75 mL) a 0°C se añadió hidruro de litio y aluminio (1,7 g, 67,5 mmoles). Se separó el baño de refrigeración y la reacción se agitó a temperatura durante toda la noche. A continuación, la reacción se inactivó con agua fría y una disolución acuosa de NH<sub>4</sub>Cl y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los disolventes se separaron a presión reducida y el aceite bruto se sometió a cromatografía de gel de sílice usando hexano/EtOAc (9:1) como eluyente para dar el alcohol **7** aceitoso (2 g, 80%).

**7:** [α]<sup>24</sup><sub>D</sub> -4° (c 0,19, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (200 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,94 (3H, d, J = 6,5 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 1,20 [6H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>COH], 1,75 (1H, m, CH-CH<sub>3</sub>), 3,38 (1H, dd, J = 10,8, 6,6 Hz, uno de CH<sub>2</sub>-CH), 3,46 (1H, dd, J = 10,8, 6,0 Hz, uno de CH<sub>2</sub>-CH), 4,60 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O), 4,76 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), aprox. 7,3 (5H, m, Ar-H); HRMS (ESI) masa exacta calculada para C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>Na (M<sup>+</sup> + Na) 303,1936, medida 303,1947.

**F. Separación del grupo protector BOM****2,6-Dimetil-heptan-1,6-diol (8)**

A una disolución de un alcohol **7** (1,8 g, 0,01 moles) en acetato de etilo (20 mL) se añadió Pd/C (10%, 100 mg) a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El aceite bruto se sometió a cromatografía de gel de sílice usando hexano/EtOAc (1:1) como eluyente para dar el diol **8** aceitoso (0,95 g, 92%).

**8:** [α]<sup>24</sup><sub>D</sub> +11° (c 1,28, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (200 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,93 (3H, d, J = 6,6 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 1,20 [6H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>COH], 1,65 (1H, m, CH-CH<sub>3</sub>), 3,45 (2H, br m, CH<sub>2</sub>-CH); <sup>13</sup>C RMN (50 MHz) δ 16,63 (CH-CH<sub>3</sub>), 21,64 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 29,19 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 29,29 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 33,62 (CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 35,68 (CH-CH<sub>3</sub>), 44,03 (CH<sub>2</sub>COH), 68,19 (CH<sub>2</sub>OH), 71,16 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]; MS (ES) 183 (M<sup>+</sup> + Na); HRMS (ESI) masa exacta calculada para C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>Na (M<sup>+</sup> + Na) 183,1361, medida 183,1351.

**H. Oxidación del diol 8****(S)-6-Hidroxi-2,6-dimetil-heptanal (9)**

Se añadió dicromato de piridinio (1,5 g, 3,75 mmoles) a una disolución agitada del diol **8** (110 mg, 0,69 mmoles) y p-toluensulfonato de piridinio (33 mg, 0,11 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL). La suspensión resultante se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente en argón. La reacción se filtró a continuación a través de celite y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía de gel de sílice usando hexano/EtOAc (9:1) como eluyente para dar un aldehído **9** aceitoso (65 mg, 60%).

**9**: [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> -10,5° (c 1,1, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (400 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,06 (3H, d, J = 7,0 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 1,21 [6H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>COH], 2,37 (1H, m, CH-CH<sub>3</sub>), 9,62 (1H, d, J = 1,9 Hz, CHO); <sup>13</sup>C RMN (25 MHz) δ 13,33 (CH-CH<sub>3</sub>), 21,70 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 29,21 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 30,89 (CH-CH<sub>2</sub>), 43,70 (CH<sub>2</sub>COH), 46,30 (CHCH<sub>3</sub>), 71,16 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 205,25 (CHO).

**I. Sililación del hidroxi-aldehído 9****(S)-2,6-Dimetil-6-trietilsilaniloxi-heptanal (10)**

A una disolución del aldehído **9** (93,4 mg, 0,6 mmoles) y 2,6-lutidina (170 μL, 1,5 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (3,7 mL) se añadió gota a gota Et<sub>3</sub>SiOTf (161 μL, 0,72 mmoles) a 0°C en argón. La disolución se agitó a 10°C durante 3 horas y a continuación a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se inactivó con agua fría y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El disolvente se separó a presión reducida, y el residuo se sometió a cromatografía en un cartucho de sílice Sep-Pak usando hexano/EtOAc (99,7:0,3) como eluyente para dar el aldehído **10** aceitoso (130 mg, 81%).

**10**: [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> + 4,2° (c 1,75, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,56 (6H, q, J = 7,8 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>), 0,94 (9H, t, J = 7,8 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,10 (3H, d, J = 6,8 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 1,19 [6H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO], 2,37 (1 H, d sextuplete, J = 1,9, 6,8 Hz, CH-CHO), 9,62 (1 H, d, J = 1,95 Hz, CHO).

**J. Reacción de Wittig del aldehído 10****(Z)-(S)-1-(*t*-Butil-dimetil-silaniloxi)-5,9-dimetil-9-trietilsilaniloxi-dec-3-eno (12)**

A una del bromuro de fosfonio **11** (275 mg, 0,54 mmoles) en THF anhidro (12 mL) se añadió gota a gota n-BuLi (1M en ciclohexano, 270 μL, 0,54 mmoles) a -20°C. Después de 15 minutos de agitación a -20°C, la reacción se enfrió a -50°C y vía una cánula se añadieron 2/3 de la disolución naranja del reactivo de Wittig formado a la disolución agitada del aldehído **10** (50 mg, 0,18 mmoles) en THF anhidro (2 mL). Después de 1 hora de agitación a -50°C se añadieron salmuera y HCl 1M, y la mezcla se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se lavó con agua y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía en un cartucho de sílice Sep-Pak eluido con hexano/EtOAc (98,5:1,5) para dar un compuesto **12** oleoso (59,3 mg, 75%).

**12**: [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> -5,5° (c 0,48, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H RMN (500 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,058 (6H, s, 2 x CH<sub>3</sub>Si), 0,55 (6H, q, J = 7,8 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>), 0,89 [9H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C], 0,93 (3H, d, J = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub>CH), 0,94 (9H, t, J = 7,8 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,27 (2H, m, CH<sub>2</sub>-CH=), 2,42 (1 H, m, CH-CH<sub>3</sub>), 3,59 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 5,20 (dd, J = 10,8, 9,7 Hz, =CH-CHCH<sub>3</sub>), 5,29 (1H, dt, J = 10,8, 7,4 Hz, CH<sub>2</sub>CH=CH); <sup>13</sup>C RMN (125 MHz) δ -5,28 [SiCH<sub>3</sub>], 6,75 (SiCH<sub>2</sub>), 7,10 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>Si), 18,37 [SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 21,29 [SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 22,32 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 25,95 (CH-CH<sub>3</sub>), 29,80 y 29,89 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 31,41 (CH<sub>2</sub>CH=), 31,90 (CH-CH<sub>3</sub>), 38,06 (CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 45,20 (CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub>CO), 63,23 (CH<sub>2</sub>O), 73,23 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 123,82 (CH<sub>2</sub>-CH=), 138,34 (=CHCH); MS (ES) 451 (M<sup>+</sup> + Na); HRMS (ESI) masa exacta calculada para C<sub>24</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>Na (M<sup>+</sup> + Na) 451,3404, medida 451,3414.

**K. Hidrólisis de grupos protectores sililo en el diéter 12 (Esquema 3)****(3Z)-(5S)-5,9-Dimetil-dec-3-eno-1,9-diol (13)**

Se añadió ácido fluorhídrico (48%, 6 mL) a una disolución agitada del compuesto **12** (201 mg, 0,4 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (10 mL). Después de 40 minutos de agitación a temperatura ambiente se añadió agua y la capa orgánica se separó, se lavó con agua y NaHCO<sub>3</sub>, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía en un cartucho de sílice Sep-Pak usando hexano/EtOAc (6:4) como eluyente para dar un diol **13** aceitoso (76,4 mg, 92%).

**13**: <sup>1</sup>H RMN (500 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,95 (3H, d, J = 6,7 Hz, CH<sub>3</sub>CH), 1,19 y 1,20 [3H y 3H, cada uno s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2,33 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH=), 2,48 (1 H, br m, CH-CH<sub>3</sub>), 3,64 (2H, t, J = 6,4 Hz, CH<sub>2</sub>OH), 5,31 (2H, m, CH=CH); <sup>13</sup>C RMN (50 MHz) δ 21,63 (CH-CH<sub>3</sub>), 22,26 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 29,25 y 29,60 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 31,27 (CH<sub>2</sub>CH=), 31,87 (CH-CH<sub>3</sub>), 37,96 (CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 44,00 (CH<sub>2</sub>CO), 62,55 (CH<sub>2</sub>OH), 71,29 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 124,09 (CH<sub>2</sub>-CH=), 139,70 (=CHCH).

**L. Hidrogenación del diol insaturado 13****(5R)-5,9-Dimetil-decano-1,9-diol (14)**

Se añadió Pd/C (10%, 50 mg) a una disolución del diol **13** (55 mg, 0,27 mmoles) en acetato de etilo (10 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas en una corriente continua de hidrógeno a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto oleoso bruto se sometió a cromatografía en un cartucho de sílice Sep-Pak eluido con hexano/EtOAc (8:2) para dar el diol **14** aceitoso (55 mg, 45%).

**14:**  $[\alpha]_D^{24} -5,9^\circ$  (c 0,27, CHCl<sub>3</sub>), <sup>1</sup>H RMN (200 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,87 (3H, d, J = 6,4 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 1,21 [6H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 1,56 (1 H, br m, CH-CH<sub>3</sub>), 3,64 (2H, t, J = 6,4 Hz, CH<sub>2</sub>OH); <sup>13</sup>C RMN (50 MHz) δ 19,61 (CH-H<sub>3</sub>), 21,75 (CH<sub>2</sub>), 23,22 (CH<sub>2</sub>), 29,24 y 29,29 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 32,75 (CH-CH<sub>3</sub>), 33,10 (CH<sub>2</sub>), 36,76 (CH<sub>2</sub>), 37,48 (CH<sub>2</sub>), 44,22 (CH<sub>2</sub>CO), 63,07 (CH<sub>2</sub>OH), 71,11 [C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]; MS (ES) 225 (M<sup>+</sup> + Na); HRMS (ESI) masa exacta calculada para C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>Na (M<sup>+</sup> + Na) 225,1831, medida 225,1823.

**M. Oxidación del diol 14****9-Hidroxi-5,9-dimetil-decanal (15)**

Se añadió reactivo de Dess-Martin (73 mg, 0,15 mmoles) a una disolución agitada del diol **14** (25 mg, 0,12 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (3,5 mL) a temperatura ambiente. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. A continuación, se añadieron una disolución acuosa de tiosulfato de sodio (6 mL) y NaHCO<sub>3</sub> (6 mL). La reacción se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, los disolventes se separaron a presión reducida y el aceite bruto se purificó en sílice Sep-Pak usando hexano/EtOAc (7:3) como eluyente para dar un aldehído **15** aceitoso (16,5 mg, 67%).

**15:** <sup>1</sup>H RMN (200 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,88 (3H, d, J = 6,4 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 1,21 [6H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2,41 (2H, dt, J = 1,7, 7,3 Hz, CH<sub>2</sub>CHO), 9,77 (1H, t, J = 1,7 Hz, CHO).

**N. Sililación del hidroxi-aldehído 15****5,9-Dimetil-9-trietilsilaniloxi-decanal (16)**

A una disolución del aldehído **15** (16,5 mg, 82,5 mmoles) y 2,6-lutidina (24 µL, 206 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (1,1 mL) se añadió gota a gota Et<sub>3</sub>SiOTf (42 µL, 165 mmoles) a -78°C. La mezcla se agitó durante 2 horas a -78°C y durante una hora adicional a -50°C. Se añadieron agua y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía en un cartucho de sílice Sep-Pak usando hexano/EtOAc (99,7:0,3) como eluyente para dar un aldehído **16** aceitoso (22 mg, 85%). Se obtuvo una muestra analítica usando HPLC (columna Zorbax-Sil 10 mm x 25 cm, 4 mL/min) con un sistema disolvente de hexano/EtOAc (98:2). El aldehído **16** analíticamente puro se obtuvo a R<sub>v</sub> = 33 mL.

**16:** <sup>1</sup>H RMN (500 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,55 (6H, q, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,88 (3H, d, J = 6,4 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 0,94 (9H, t, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,19 [6H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2,41 (2H, m, CH<sub>2</sub>CHO), 9,77 (1H, t, J = 1,8 Hz, CHO).

**O. Reacción de Wittig-Horner del aldehído 16****(1R,3R,7'R)-1,3-Bis-(terc-butil-dimetil-silaniloxi)-5-(7',11'-dimetil-11'-trietilsilaniloxi-dodec-2'-enilideno)-2-metileno-ciclohexano (18)**

A una del óxido de fosfina **17** (45,7 mg, 78,5 µmoles) en THF anhidro (0,6 mL) se añadió lentamente n-BuLi (51 µL, 81,8 µmoles) a -78°C en argón con agitación. Tras la adición, la disolución se volvió de color naranja intenso. La agitación se continuó durante 20 minutos a -78°C y a continuación se añadió lentamente una disolución preenfriada del aldehído **16** (22 mg, 70 µmoles) en THF anhidro (10 µL). La mezcla se agitó durante 3 horas a -78°C y a 6°C durante 16 horas. A continuación, se añadieron al reactor una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera. La capa orgánica se lavó con agua, se secó y se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en hexano y se aplicó a un cartucho de sílice Sep-Pak usando hexano/EtOAc (99,8:0,2) como eluyente para dar la vitamina **18** bruta protegida. A continuación, el producto se purificó por HPLC (columna Zorbax-Sil 10 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando un sistema disolvente de hexano/EtOAc (99,9:0,1). El compuesto **18** (21,2 mg, 45%) derivado de vitamina D analíticamente puro se recogió a R<sub>v</sub> = 18 mL.

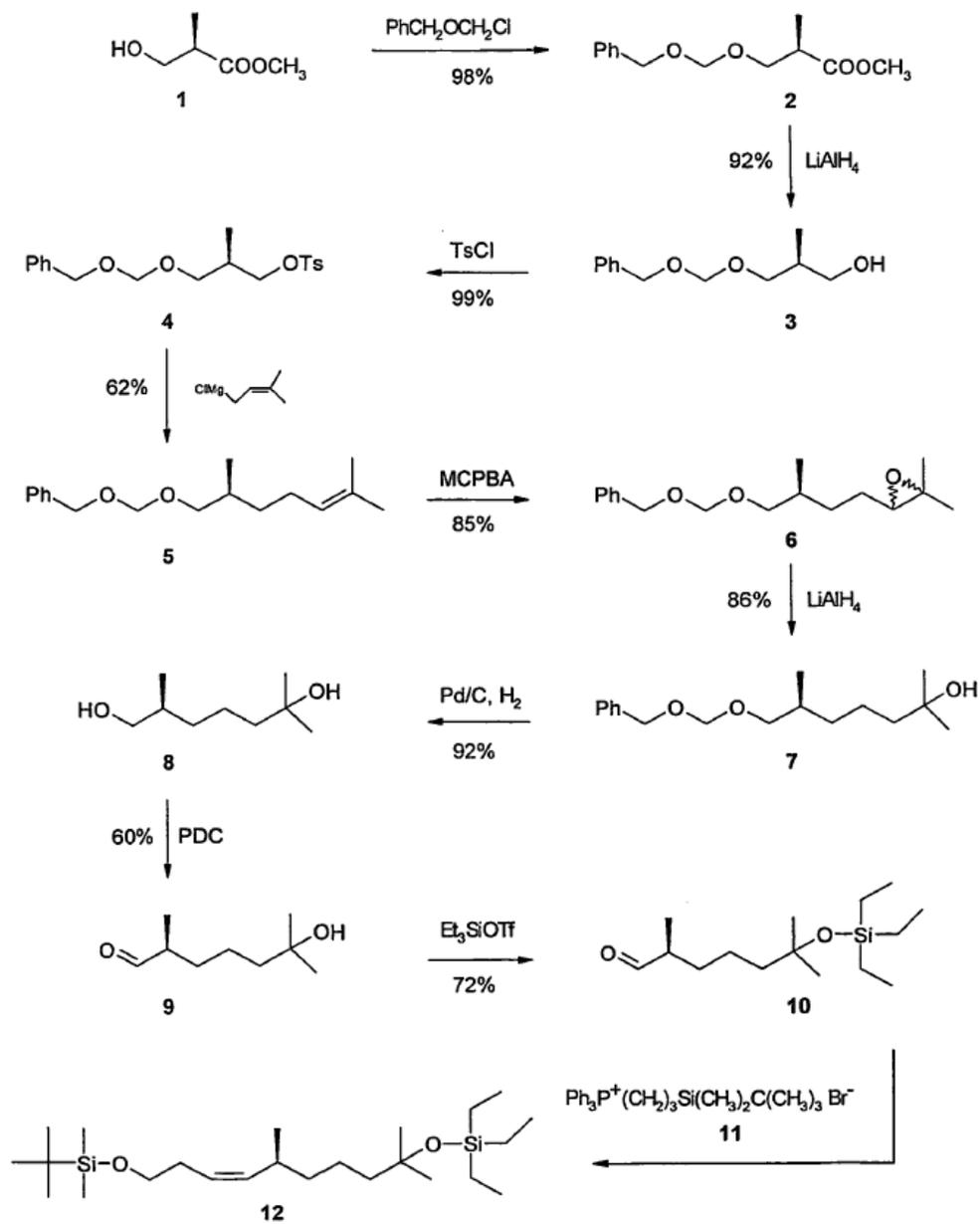
**18:** UV (hexano) λ<sub>max</sub> 235,0 (ε 15 900), 242,0 (ε 24 800), 250,0 (ε 22 600) nm; <sup>1</sup>H RMN (500 Hz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0,04, 0,05, 0,07 y 0,08 (cada uno 3H, cada uno s, 4 x SiCH<sub>3</sub>), 0,57 (6H, q, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0,86 (3H, d, J = 7,4 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 0,87 y 0,90 [9H y 9H, cada uno s, 2 x (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi], 0,95 (9H, t, J = 7,9 Hz, 3 x SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,19 [6H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2,07 (2H, m, 4'-H<sub>2</sub>), 2,15 (1H, dd, J = 12,5, 8,1 Hz), 2,35- 2,5 (3H, br m), 4,43 (2H, m, 1- y 3'-H), 4,94 y 4,95 (1H y 1H, cada uno s, C=CH<sub>2</sub>); 5,63 (1H, dt, J = 15,0, 6,9 Hz, 3'-H), 5,90 (1H, d, J = 10,9 Hz, 1'-H), 6,24 (1H, dd, J = 15,0, 10,9 Hz, 2'-H); MS (EI) m/z (intensidad relativa) 678 (M<sup>+</sup>, 10), 649 (M<sup>+</sup> - Et, 5), 621 (M<sup>+</sup> - tBu, 12), 546 (12), 73 (100); HRMS (ESI) masa exacta calculada para C<sub>39</sub>H<sub>78</sub>O<sub>3</sub>Si<sub>3</sub> 678,5259, medida 678,5272.

**P. Eliminación de los grupos protectores de 12****(1*R*,3*R*,7'*R*)-5-(11-Hidroxi-7,11-dimetil-dodec-2'-enilideno)-2-metileno-ciclohexano-1,3-diol (19)**

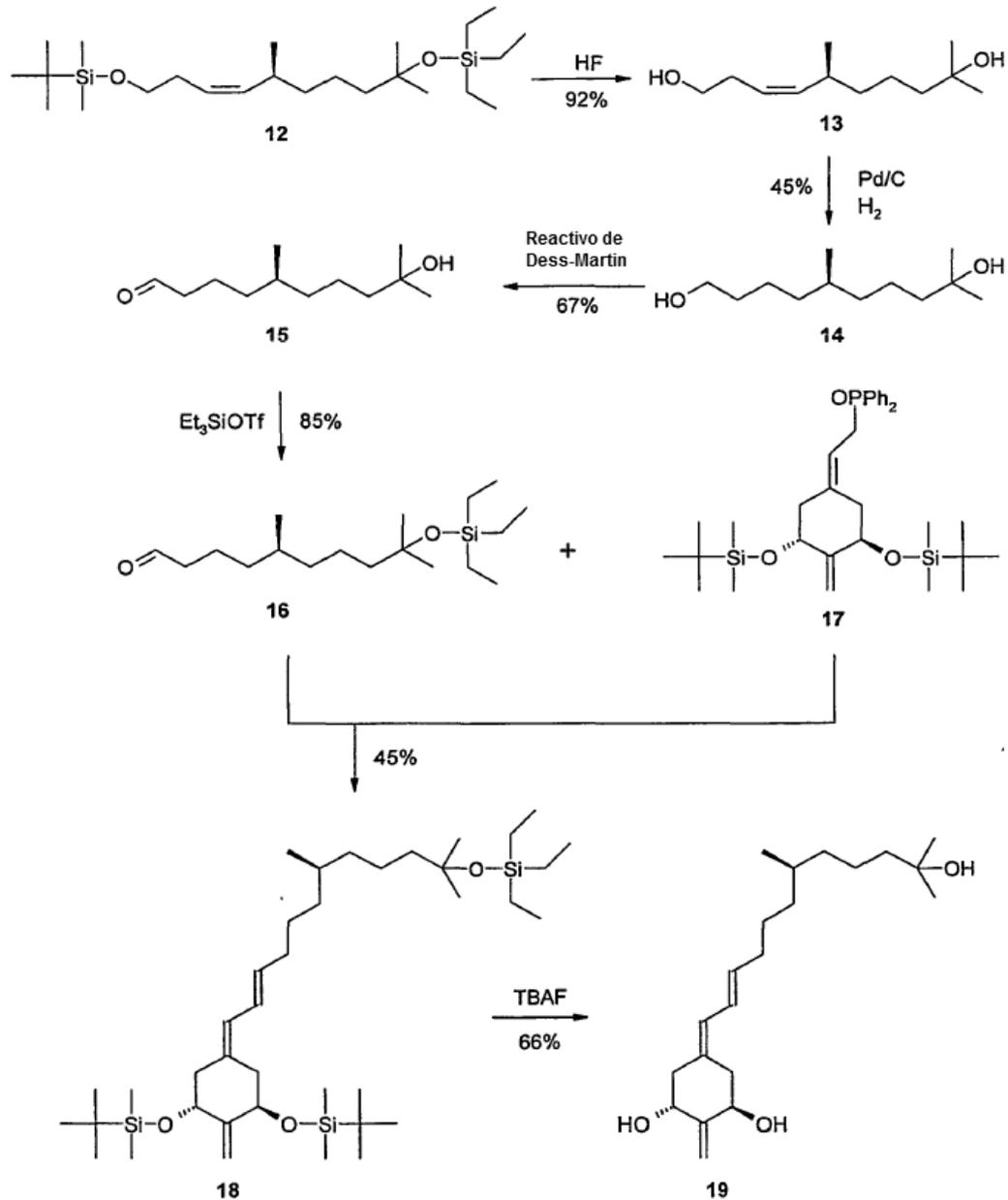
5 Se añadió fluoruro de tetrabutilamonio (1 M en THF, 370  $\mu$ L, 0,37 mmoles) a una disolución agitada de **18** (21,2 mg, 31,2  $\mu$ moles) en THF anhidro (3 mL). La mezcla resultante se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente. El disolvente se separó a vacío, y el residuo se disolvió en hexano/EtOAc (9:1) y se aplicó a un cartucho de sílice Sep-Pak. La elución con hexano/EtOAc (1:1) dio el producto bruto **19**. La vitamina se purificó adicionalmente por HPLC (columna Zorbax-Sil 10 mm x 25 cm, 4 mL/min) usando un sistema disolvente de hexano/2-propanol (8:2). El compuesto vitamina D **19** analíticamente puro (6,9 mg, 66%) se recogió a Rv = 21 mL.

10 **19**: UV (hexano)  $\lambda_{\max}$  234,0 ( $\epsilon$  27 800), 241,0 ( $\epsilon$  30 200), 248,5 (sh,  $\epsilon$  19 900) nm;  $^1\text{H}$  RMN (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,86 (3H, d, J = 6,5 Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 1,21 [6H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], 2,08 (2H, q, J = 6,9 Hz, 4'-H<sub>2</sub>), 2,26 (1 H, dd, J = 13,1, 7,1 Hz), 2,39 (1 H, dd, J = 13,4, 7,2 Hz), 2,56 (1H, dd, J = 13,5, 4,2 Hz), 2,70 (1 H, dd, J = 13,3, 4,3 Hz), 4,48 (2H, m, 1- y 3-H), 5,10 (2H, s, C=CH<sub>2</sub>); 5,70 (1 H, dt, J = 15,0, 6,9 Hz, 3'-H), 6,03 (1H, d, J = 10,8 Hz, 1'-H), 6,29 (1H, dd, J = 15,0, 10,8 Hz, 2'-H); MS (EI) m/z (intensidad relativa) ningún M<sup>+</sup>, 318 (M<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O, 19), 300 (8), 285 (4), 59 (100); HRMS (ESI) masa exacta calculada para C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> (M<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O) 318,2559, medida 318,2570.

Esquema 2



## Esquema 3



## ACTIVIDAD BIOLÓGICA

## Enlace al receptor de la vitamina D

## Material de ensayo

## 5 Fuente de proteínas

El receptor recombinante de longitud completa de rata se expresó en células de *E. coli* BL21 Codón Plus (DE3) RIL y se purificó hasta homogeneidad usando dos sistemas de cromatografía en columna diferentes. El primer sistema fue una resina de afinidad por el níquel que utiliza la etiqueta histidina C-terminal sobre esta proteína. La proteína que fue eluida de esta resina se purificó adicionalmente usando cromatografía de intercambio de iones (S-Sepharose Fast Flow). Partes alícuotas de la proteína purificada se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido a -80°C hasta su uso. Para usar en ensayos de enlace la proteína se diluyó en TEDK<sub>50</sub> (Tris 50 mM, EDTA 1,5 mM, pH 7,4, DTT 5 mM, KCl 150 mM) con detergente Chaps al 0,1%. La proteína receptora y la concentración de ligando se optimizó tal que no se enlaza al receptor más del 20% del ligando radiomarcado añadido.

10

Fármacos del estudio

Ligandos no marcados se disolvieron en etanol y las concentraciones se determinaron usando espectrofotometría UV ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , coeficiente de extinción molar = 18.200 y  $\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm}$ ). El ligando radiomarcado ( $^3\text{H}$ - $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , ~ 159 Ci/mmol) se añadió en etanol a una concentración final de 1 nM.

5 **Condiciones de ensayo**

Los ligandos radiomarcados y no marcados se añadieron a 100 µl de la proteína diluida a una concentración final de etanol de  $\leq 10\%$ , se mezclaron e incubaron durante toda la noche con hielo hasta alcanzar el equilibrio de enlace. Al día siguiente se añadieron 100 µl de suspensión de hidroxilapatita (50%) a cada tubo y se mezclaron a intervalos de 10 minutos durante 30 minutos. La hidroxilapatita se recogió por centrifugación y a continuación se lavó tres veces con tampón Tris-EDTA (Tris 50 mM, EDTA 1,5 mM, pH 7,4), que contenía Tritón X-100 al 0,5%. Después del lavado final, los pellets se transfirieron a viales de centelleo que contenían 4 mL de cóctel de centelleo Biosafe II, se mezclaron y colocaron en un contador de centelleo. El enlace total se determinó a partir de los tubos que contenían sólo ligando radiomarcado.

**Diferenciación de HL-60**

15 **Material de ensayo**

Fármacos del estudio

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

20 **Células**

Se hicieron crecer células de leucemia promielocítica de ser humano (HL60) en medio RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 10%. Las células se incubaron a 37°C en presencia de  $\text{CO}_2$  al 5%.

**Condiciones de ensayo**

Las células HL60 se extendieron en una placa en una concentración de  $1,2 \times 10^5$  células/mL. Dieciocho horas después de la extensión las células se trataron por duplicado con el fármaco. Cuatro días después las células se cosecharon y se realizó un ensayo de reducción con azul de nitrotetrazolio (Collins et al., 1979, *J. Exp. Med.* 149:969-974). El porcentaje de células diferenciadas se determinó contando un total de 200 células y registrando el número que contiene depósitos intracelulares de formazán azul-negro. La verificación de la diferenciación en células monocíticas se determinó midiendo la actividad fagocítica.

30 **Ensayo de transcripción in vitro**

La actividad de transcripción se midió en células ROS 17/2.8 (hueso) que fueron establemente transfectadas con un gen promotor 24-hidrolasa (24OHasa) aguas arriba de un gen reportero luciferasa (Arbour et al., 1998). A las células se las dio una serie de dosis. Dieciséis horas después de la dosificación, las células se cosecharon y se midieron las actividades de la luciferasa usando un luminómetro. RLU = unidades relativas de luciferasa.

35 El antagonismo se ensayó añadiendo una combinación de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y el compuesto en el mismo pocillo manteniendo la misma concentración final de etanol.

**Transporte intestinal del calcio y movilización del calcio del hueso**

Ratas macho Sprague-Dawley destetadas se pusieron a dieta 11 (Suda et al. *J. Nutr.* 100:1049, 1970) (Ca 0,47%) + vitaminas AEK durante una semana seguida de dieta 11 (Ca 0,02%) + AEK durante 3 semanas. A continuación se cambió la dieta de las ratas a una que contenía Ca 0,47% durante una semana seguida por dos semanas con una dieta que contenía Ca 0,02%. La administración de las dosis comenzó durante la última semana en la dieta de calcio 0,02%. Se dieron cuatro dosis ip consecutivas con una diferencia de aproximadamente 24 horas. Veinticuatro horas después de la última dosis se extrajo sangre del cuello cortado y se determinó la concentración de calcio en el suero como medida de la movilización del calcio del hueso. Los primeros 10 cm del intestino también se extrajeron para analizar el transporte intestinal del calcio usando el método del saco intestinal evertido. El antagonismo se ensayó administrando simultáneamente al animal una combinación de  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  y el compuesto.

Los compuestos de la invención se prepararon y estudiaron usando los métodos descritos anteriormente. Se encontró/encontra que los compuestos exhibían/exhiben patrones deseados y muy ventajosos con respecto a la actividad de transporte intestinal del calcio, capacidad de movilizar el calcio del hueso y capacidad de enlazarse al receptor de la vitamina D. También se encontró que los compuestos moderaban la actividad de diferenciación celular.

El compuesto de fórmula 1C4 (Des-C,D) no se enlaza al receptor de la vitamina D tan fuertemente como la hormona nativa  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  como se muestra en la Figura 1. Des-C,D no muestra tanta actividad como  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en inducir la diferenciación de células HL-60 (Figura 2). A este respecto, como se muestra en la Figura 3 Des-C,D tampoco muestra tanta actividad en provocar la transcripción como  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Finalmente, como se muestra en la Figura 4, Des-C,D no tiene una actividad medible de movilización del calcio del hueso incluso a la muy alta dosis de 12.480 pmol/día.

Con fines de tratamiento, los compuestos de la invención 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 píldoras, comprimidos o cápsulas, junto con vehículos sólidos, según métodos convencionales conocidos en la técnica. Cualquiera de tales formulaciones también puede contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables y no tóxicos tales como agentes estabilizantes, antioxidantes, ligantes, agentes colorantes o agentes emulsionantes o modificadores del sabor. Los excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables son en general conocidos por los expertos en la técnica y están por tanto incluidos en la presente invención. Tales excipientes y vehículos están, por ejemplo, descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., Nueva Jersey (1991), el cual se incorpora a la presente memoria por referencia en su totalidad y para todos los fines como si se hubiera desarrollado completamente en la presente memoria.

Los compuestos pueden administrarse oral, tópica, parenteral, rectal o transdérmicamente. Los compuestos se administran ventajosamente por inyección o por infusión intravenosa o por disoluciones estériles adecuadas, o en la forma de dosis líquidas o sólidas vía el canal alimentario, o en la forma de cremas, pomadas, parches o vehículos similares adecuados para aplicaciones transdérmicas. En algunas realizaciones, dosis de 0,001  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 1 mg por día del compuesto son apropiadas con fines de tratamiento. En algunas de tales realizaciones, una dosis apropiada y efectiva puede variar de 0,01  $\mu\text{g}$  a 1 mg del compuesto por día. En otras de tales realizaciones una dosis apropiada y efectiva puede variar de 0,1  $\mu\text{g}$  a 500  $\mu\text{g}$  del compuesto por día. Tales dosis se ajustarán según el tipo de enfermedad o afección a tratar, la gravedad de la enfermedad o afección y la respuesta del sujeto como es bien entendido en la técnica. El compuesto puede administrarse adecuadamente solo, o junto con otro compuesto activo derivado de la vitamina D.

Las composiciones para usar en la invención incluyen una cantidad efectiva de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones como el ingrediente o ingredientes activos, y un vehículo adecuado. Una cantidad efectiva del o de los compuestos para usar según algunas realizaciones de la invención será en general una cantidad de dosificación tal como las descritas en la presente memoria, y puede administrarse tópica, transdérmica, oral, nasal, rectal o parenteralmente.

Las dosificaciones que se describieron anteriormente son adecuadas entendiéndose que las cantidades dadas han de ajustarse según la gravedad de la enfermedad y el estado y respuesta del sujeto como es bien entendido en la técnica. Como se advirtió, los compuestos de la invención pueden estar presentes como una mezcla de dos o más compuestos. En algunas mezclas, la mezcla puede incluir un primer compuesto de la invención y un segundo compuesto de la invención. En algunas realizaciones, la mezcla incluye el primer compuesto y el segundo compuesto, y la relación del primer compuesto al segundo compuesto varía de 50:50 a 99,9:0,1. En algunas realizaciones, la relación del primer compuesto al segundo compuesto varía de 70:30 a 99,9:0,1, de 80:20 a 99,9:0,1, de 90:10 a 99,9:0,1, o de 95:5 a 99,9:0,1.

El compuesto o compuestos pueden formularse como cremas, lociones, pomadas, aerosoles, supositorios, 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 agentes estabilizantes, antioxidantes, emulsionantes, agentes colorantes, ligantes o agentes modificadores del sabor.

Por lo tanto, 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 dañino a los beneficiarios de los mismos.

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

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

Las formulaciones adecuadas para la administración comprenden convenientemente una preparación oleosa o acuosa estéril del ingrediente activo que es preferiblemente isotónica con la sangre del beneficiario.

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

5 Para la administración nasal pueden usarse la inhalación de polvos, formulaciones autopropulsantes o de pulverización, dispensadas con un pulverizador, un nebulizador o un atomizador. Las formulaciones, cuando están dispensadas, tienen preferiblemente un tamaño de partícula en el intervalo de 10 a 100 micrómetros.

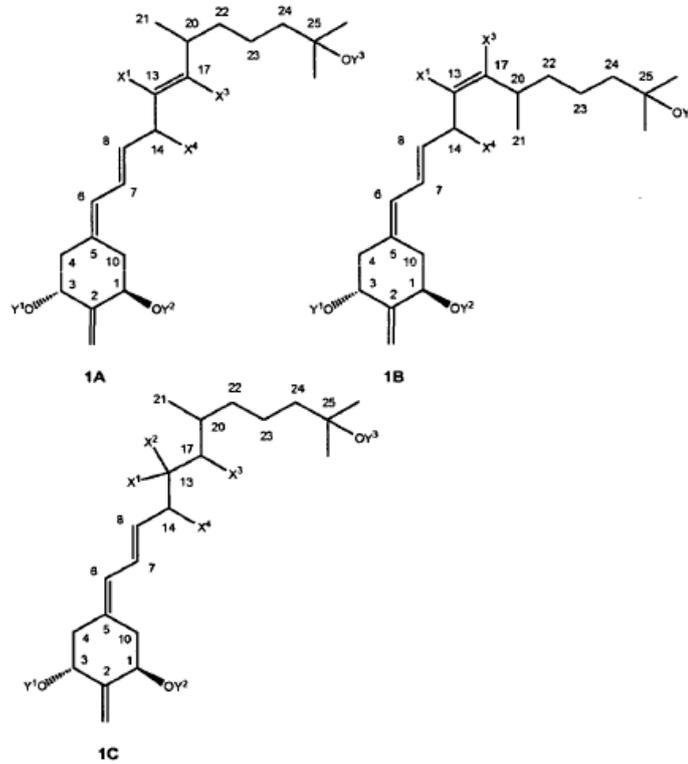
10 Las formulaciones pueden convenientemente presentarse en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Mediante la expresión "unidad de dosificación" se entiende una dosis unitaria, es decir una dosis única que es 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 farmacéuticos sólidos o líquidos.

Se entiende que la invención no está limitada a las realizaciones puestas de manifiesto en la presente memoria para ilustrar, sino que abarca todas tales formas de las mismas como vienen dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

15

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula 1A, 1B o 1C:



5 En las que:

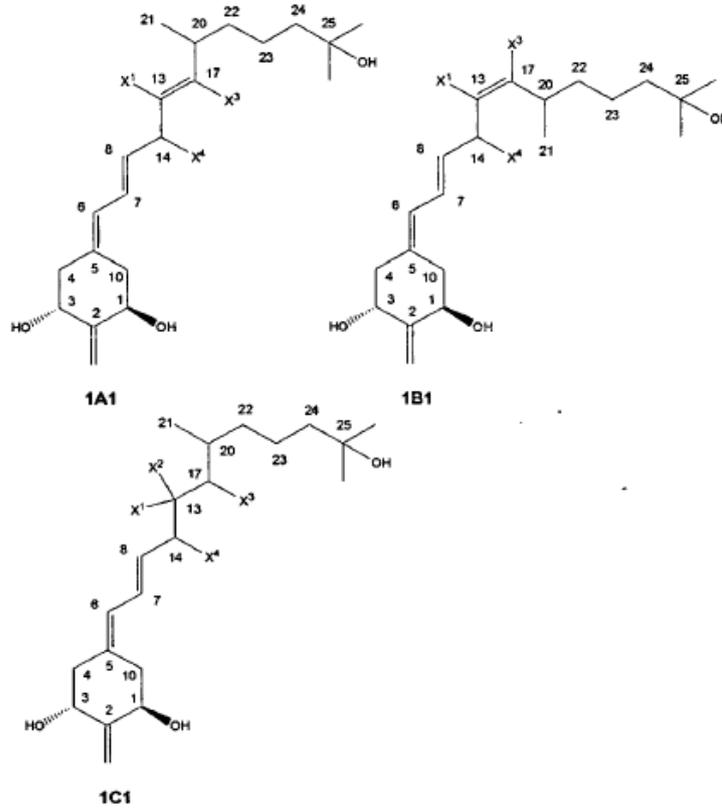
$X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  y  $X^4$  se seleccionan independientemente de H o grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 4 átomos de carbono;

$Y^1$ ,  $Y^2$ , e  $Y^3$  se seleccionan independientemente de H o grupos protectores del grupo hidroxilo;

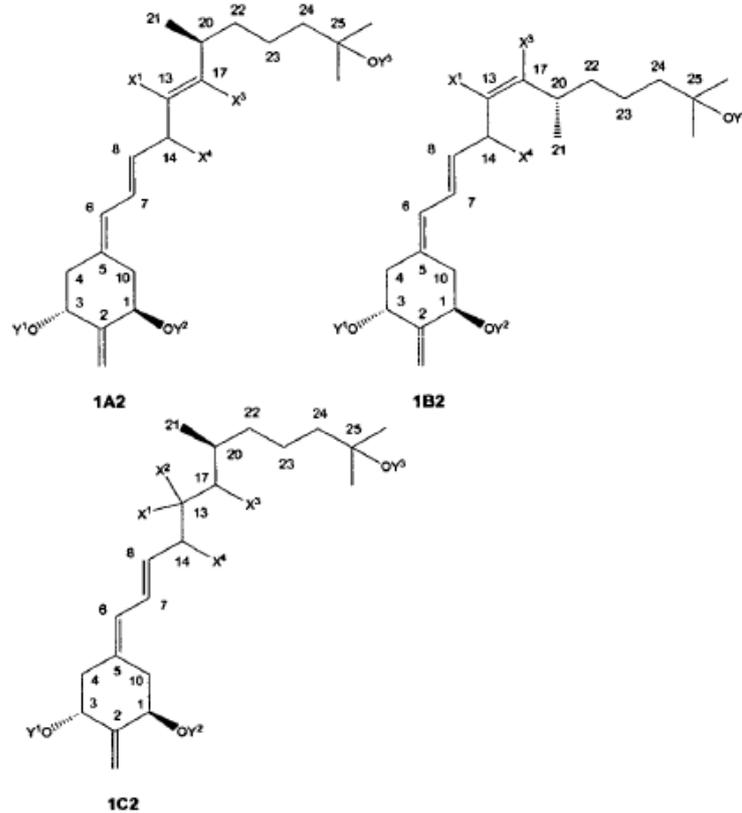
10 Los átomos de carbono en las posiciones 14 y 20 pueden tener independientemente la configuración R o S en el compuesto de fórmula 1A y fórmula 1B; y

Los átomos de carbono en las posiciones 13, 14, 17 y 20 pueden tener independientemente la configuración R o S en el compuesto de fórmula 1C.

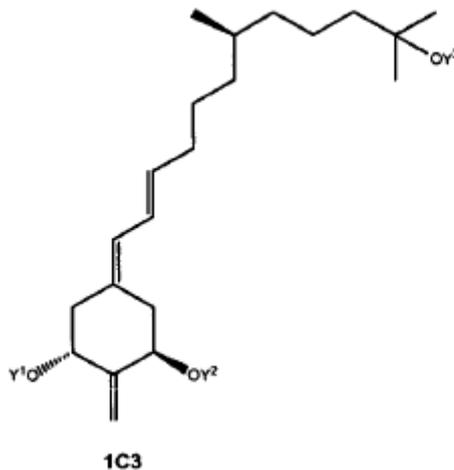
2. El compuesto según la reivindicación 1, donde  $Y^1$ ,  $Y^2$ , e  $Y^3$  son todos H y el compuesto tiene la fórmula 1A1, 1B1, o 1C1.



3. El compuesto según la reivindicación 1, donde el compuesto tiene la fórmula 1A2, 1B2, o 1C2



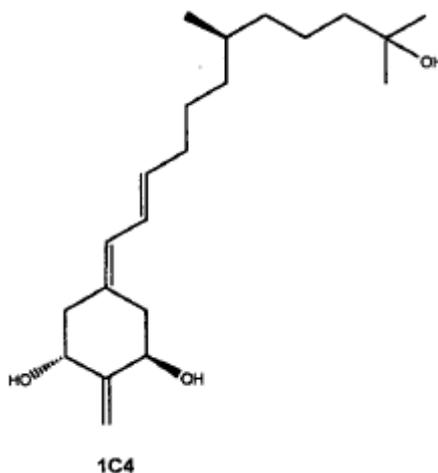
4. El compuesto según la reivindicación 1, donde  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  y  $X^4$  se seleccionan independientemente de H o grupos metilo.
5. El compuesto según la reivindicación 4, donde  $X^1$ ,  $X^2$ ,  $X^3$  y  $X^4$  son todos H.
6. El compuesto según la reivindicación 1, donde el compuesto tiene la fórmula 1C3



7. El compuesto según la reivindicación 1, donde  $Y^1$  e  $Y^2$  son ambos grupos protectores del grupo hidroxilo.
8. El compuesto según la reivindicación 7, donde  $Y^1$  e  $Y^2$  son ambos grupos t-butildimetilsililo.
9. El compuesto según la reivindicación 1, donde  $Y^3$  es un grupo trialquilsililo.

10

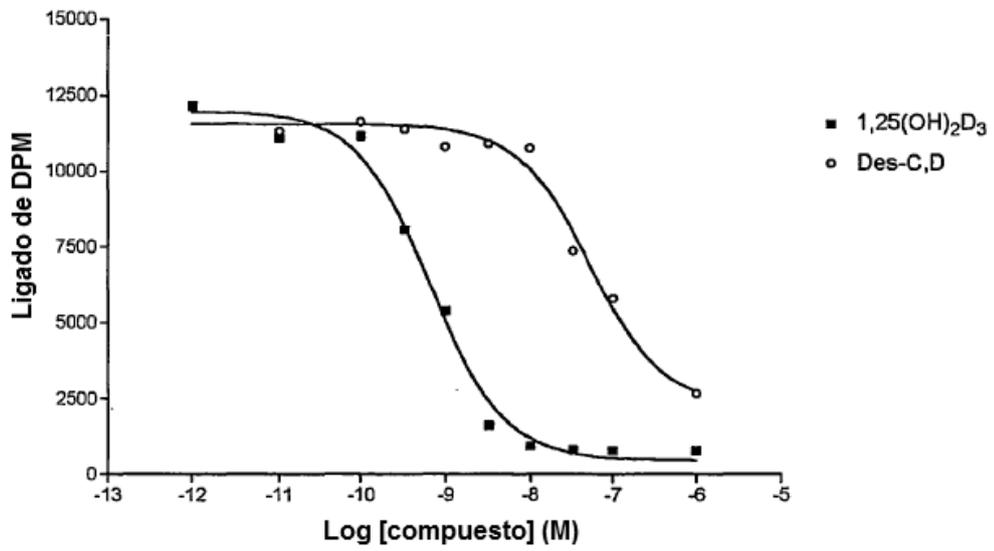
10. El compuesto según la reivindicación 9, donde Y<sup>3</sup> es un grupo trietilsililo.
11. El compuesto según la reivindicación 1, donde el compuesto tiene la fórmula 1C4



- 5 12. Una formulación farmacéutica, que comprende un compuesto según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. La formulación farmacéutica según la reivindicación 12, en la que la cantidad del compuesto en la formulación farmacéutica varía de 0,01 µg a 1 mg por gramo de la formulación farmacéutica.
14. La formulación farmacéutica según la reivindicación 12, en la que la cantidad del compuesto en la formulación farmacéutica varía de 0,1 µg a 500 µg por gramo de la formulación farmacéutica.
- 10 15. Una cantidad efectiva de un compuesto según la reivindicación 1 o una formulación farmacéutica según la reivindicación 12, para usar en el tratamiento de un trastorno biológico escogido de psoriasis; leucemia; cáncer de colon; cáncer de mama; cáncer de próstata; esclerosis múltiple; lupus; diabetes mellitus; reacción anfitrión contra injerto; rechazo de trasplantes de órganos; una enfermedad inflamatoria seleccionada de artritis reumatoide, asma, eczema o enfermedades inflamatorias de los intestinos; una afección de la piel seleccionada de arrugas, falta de adecuada firmeza de la piel, falta de adecuada hidratación dérmica, o insuficiente secreción de sebo; o hiperparatiroidismo secundario.
- 15 16. El compuesto o la formulación farmacéutica para usar según la reivindicación 15, en la que el compuesto o la formulación farmacéutica son para administrar al sujeto oral, tópica, parenteral, rectal, transdérmica, o tópicamente.
- 20 17. El compuesto o la formulación farmacéutica para usar según la reivindicación 15, en la que el compuesto o la formulación farmacéutica son para administrar suministrando el compuesto en la composición en un aerosol.

FIGURA 1

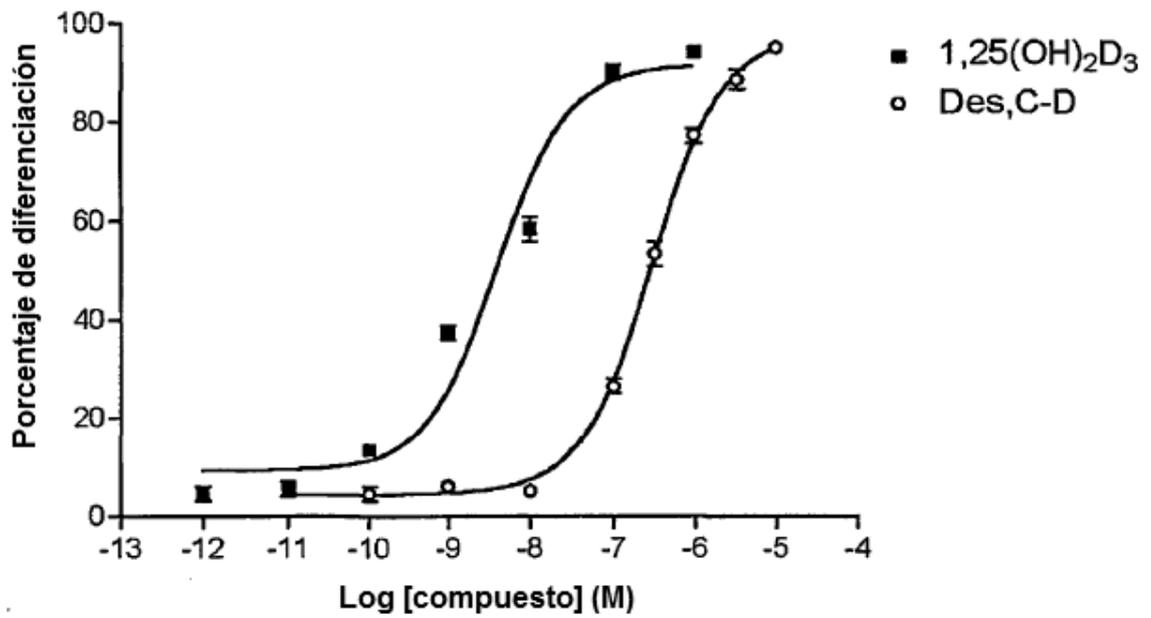
Enlace competitivo a VDR



K<sub>i</sub>: 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> = 9.6 x 10<sup>-11</sup> M  
 Des-C,D = ~7.5 x 10<sup>-9</sup> M

**FIGURA 2**

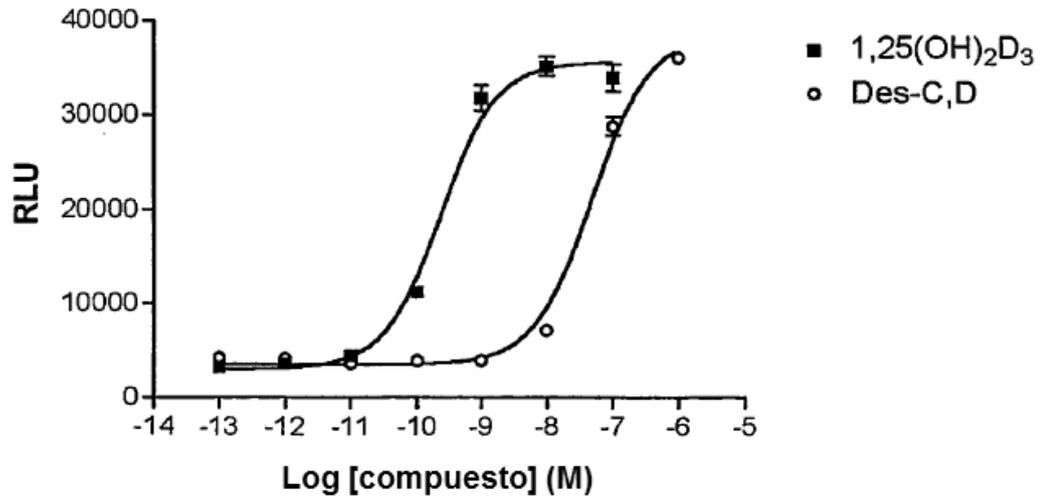
**Diferenciación de células HL-60**



EC<sub>50</sub>: 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> = 4 x 10<sup>-9</sup> M  
 Des,C-D = 3 x 10<sup>-7</sup> M

**FIGURA 3**

**Transcripción de 24-OHasa**



EC<sub>50</sub>: 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> = 2 x 10<sup>-10</sup> M  
 Des-C,D = 5 x 10<sup>-8</sup> M

FIGURA 4

