

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 403**

51 Int. Cl.:

C07C 401/00 (2006.01)

C07F 7/18 (2006.01)

A61K 31/59 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2011 E 11711237 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2556053**

54 Título: **(20S)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ y (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-hidroxitamina D₃**

30 Prioridad:

23.03.2010 US 316631 P

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

10.09.2015

73 Titular/es:

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
Post Office Box 7365
Madison, WI 53707-7365, US**

72 Inventor/es:

**DELUCA, HECTOR F.;
FLORES, AGNIESZKA;
GRZYWACZ, PAWEL;
PLUM, LORI A. y
CLAGETT-DAME, MARGARET**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 545 403 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

(20S)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ y (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-hidroxitamina D₃.

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

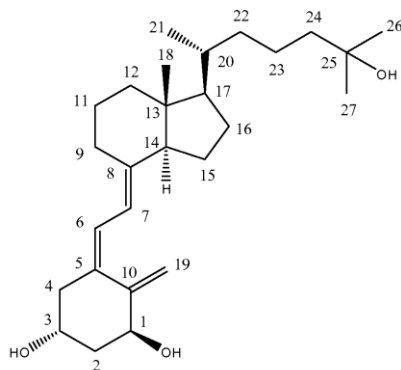
Esta solicitud reivindica prioridad con la solicitud provisional de los Estados Unidos No. 61/316.631 presentada el 23 de marzo de 2001.

Campo de la técnica

Esta presente tecnología se relaciona con compuestos de vitamina D, y más particularmente con (20S)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ y (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1,25-dihidroxitamina D₃ y sus derivados, y con formulaciones farmacéuticas que incluyen este compuesto. La presente tecnología también se refiere al uso de estos compuestos en el tratamiento de diferentes enfermedades y en la preparación de medicamentos para uso en el tratamiento de diferentes enfermedades.

Antecedentes de la invención

La hormona natural, 1,25-dihidroxitamina D₃ (también denominada como 1,25-dihidroxicolecalciferol y calcitriol) y su análogo en la serie del ergosterol, es decir 1 α ,25-dihidroxitamina D₂, son conocidos por ser reguladores muy potentes de la homeostasis del calcio en animales y humanos, y también se ha establecido su actividad en la diferenciación celular, Ostrem y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 84, 2610 (1987). Se han preparado y probado muchos análogos estructurales es estos metabolitos, incluyendo 1 α -hidroxitamina D₃, 1- hidroxitamina D₂, 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 (US 2005/0080059-A1). Esta diferencia en actividad puede ser útil en el tratamiento de una variedad de enfermedades tales como osteodistrofia renal, raquitismo resistente a la vitamina D, osteoporosis, psoriasis, y ciertas neoplasias. La estructura de la 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ y el sistema de numeración utilizado para denotar los átomos de carbono en este compuesto se muestran a continuación.

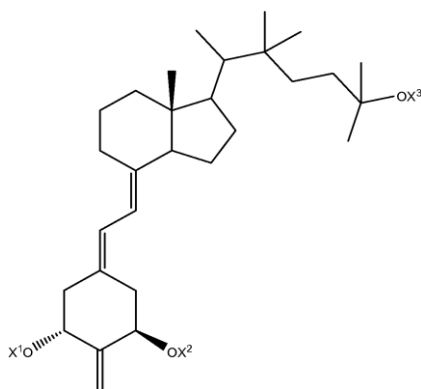


1 α ,25-Dihidroxitamina D₃ = 1 α ,25-Dihidroxicolecalciferol = Calcitriol

Resumen

La presente tecnología proporciona (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ y (20S)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ y compuestos relacionados, formulaciones farmacéuticas que incluyen (20S)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ o (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃, métodos de tratamiento de diferentes estados de enfermedad usando este compuesto, y el uso de este compuesto en la preparación de medicamentos para el tratamiento de diversos estados de enfermedad.

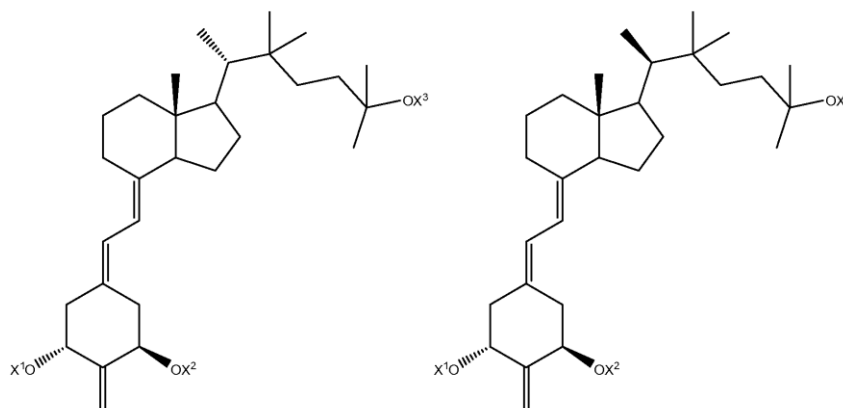
Por lo tanto, en un aspecto, la presente tecnología proporciona un compuesto que tiene la fórmula I mostrada a continuación:



I

donde X^1 , X^2 se seleccionan independientemente de H o grupos protectores de hidroxilo y X^3 es H.

- 5 En algunas realizaciones, el carbono en posición 20 tiene la configuración S como se muestra en el compuesto de fórmula IA y en otro tiene la configuración R como se muestra en el compuesto de fórmula IB:

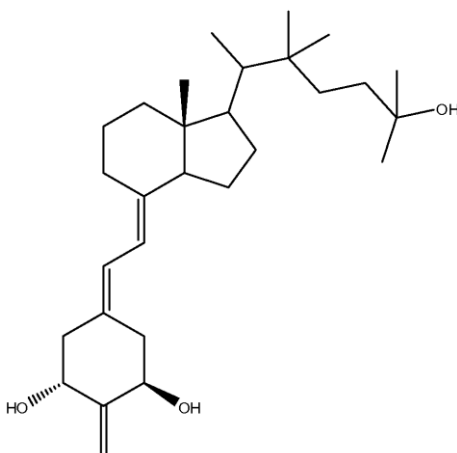


IA

IB

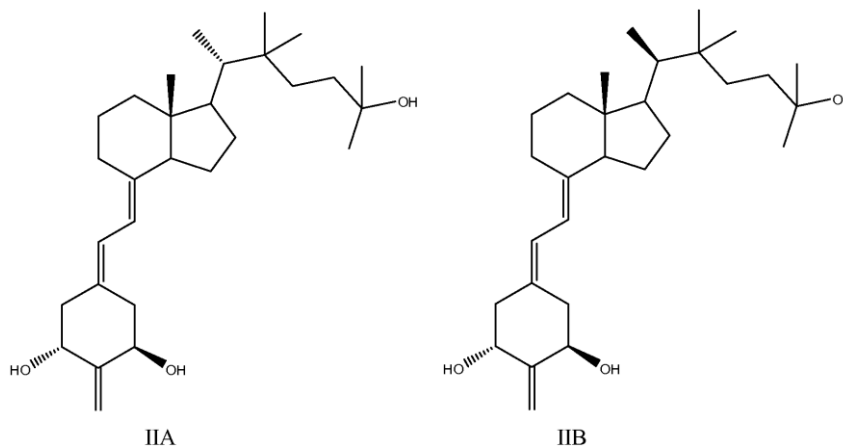
- 10 En algunas realizaciones de compuestos de formulas I, IA, o IB, X^1 , X^2 son ambos grupos protectores de hidroxilo tales como grupos sililo. En algunas de tales realizaciones, X^1 y X^2 son ambos grupos t-butildimetilsililo y X^3 es un grupo trietilsililo.

- 15 En algunas realizaciones, el compuesto tiene la fórmula II.

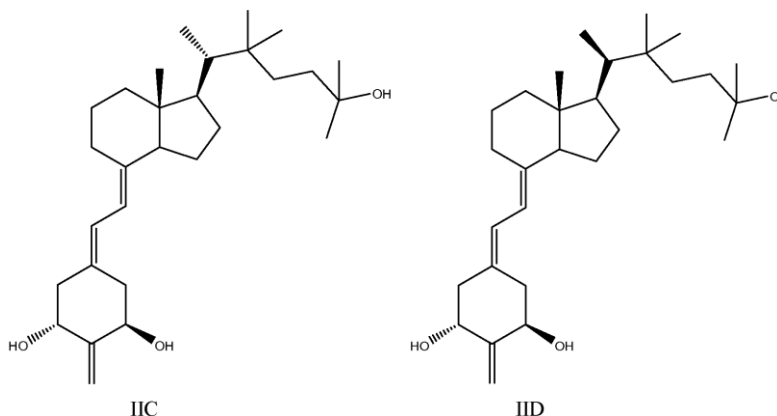


II

- 20 En algunas realizaciones, el compuesto es (20S)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ que tiene la fórmula IIA como se muestra a continuación o el compuesto es (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ que tiene la fórmula IIB como se muestra a continuación:



En algunas realizaciones, el compuesto de fórmula IIA es un compuesto de fórmula IIC (MET-1), y en otras realizaciones, el compuesto de fórmula IIB es un compuesto de fórmula IID (MET-2) y tiene las estructuras mostradas a continuación:



Los compuestos de la presente tecnología muestran un patrón muy conveniente de actividad biológica, incluyendo un fuerte enlazamiento con el receptor de vitamina D, una fuerte diferenciación celular e inducción de la actividad de la 24-hidroxilasa, incluso una actividad calcémica desde baja hasta muy baja. Por lo tanto, los presentes compuestos pueden ser usados en métodos de tratamiento de un sujeto que padece de ciertas condiciones biológicas. Los métodos incluyen la administración de una cantidad eficaz de un compuesto de la presente tecnología al sujeto, donde la condición biológica se selecciona de psoriasis; leucemia; cáncer de colon; cáncer de mama; cáncer de próstata; esclerosis múltiple; lupus; diabetes mellitus; reacción huésped versus injerto; rechazo de trasplantes de órganos; una enfermedad inflamatoria seleccionada entre artritis reumatoide, asma, o enfermedades inflamatorias del intestino; osteodistrofia renal; u osteoporosis.

Un compuesto de la presente tecnología puede estar presente en una composición para tratar las enfermedades y trastornos anteriormente mencionados y en una cantidad eficaz y que incluye opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la cantidad de compuesto incluye de 0,01 µg por gramo de la composición a 1 mg por gramo de la composición, preferiblemente de 0,1 µg por gramo hasta 500 µg por gramo de la composición, y puede administrarse por vía tópica, transdérmica, oral, o parenteral en dosis de 0,01 µg por día a 1 mg por día, preferiblemente de 0,1 µg por día a 500 µg por día.

Otras características y ventajas de la presente tecnología serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y dibujos.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1-5 ilustran diferentes actividades biológicas de (20S)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (denominada como "MET-1" en las figuras) comparado con aquellas de la hormona nativa 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (denominada como "1,25(OH)₂D₃" en las figuras). Las Figuras 6-10 ilustran diferentes actividades biológicas de (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (denominada como "MET-2" en las figuras) comparado con aquellas de la hormona nativa, 1,25(OH)₂D₃.

La Fig. 1 muestra un gráfico de enlazamiento competitivo con el receptor de la hormona de la vitamina D nuclear entre

MET-1 y la hormona nativa, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. MET-1 se enlaza con el receptor de la hormona de la vitamina D nuclear con la misma afinidad como $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

La Fig. 2 es un gráfico que compara el porcentaje de diferenciación de las células HL-60 en función de la concentración de MET-1 con aquella de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. MET-1 tiene aproximadamente cuatro veces la potencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en provocar la diferenciación de las células HL-60 en monocitos.

La Fig. 3 es un gráfico que compara la actividad de transcripción *in vitro* de MET-1 con aquella de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. MET-1 es aproximadamente diez veces más potente que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en aumentar la transcripción del gen de la 24-hidroxilasa.

La Fig. 4 es un gráfico de barras que compara la actividad de movilización de calcio en los huesos de MET-1 con aquella de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en ratas. MET-1 es aproximadamente 20 veces menos potente que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la liberación de las reservas de calcio de los huesos.

La Fig. 5 es un gráfico de barras que compara la actividad de transporte de calcio intestinal de MET-1 con aquella de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. MET-1 es menos potente que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en promover el transporte activo de calcio en el intestino de la rata.

La Fig. 6 muestra un gráfico de enlazamiento competitivo con el receptor de la hormona de la vitamina D nuclear entre MET-2 y la hormona nativa, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. MET-2 se enlaza con el receptor de la hormona de la vitamina D nuclear con la misma afinidad que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

La Fig. 7 es un gráfico que compara el porcentaje de diferenciación de las células HL-60 en función de la concentración de MET-2 con aquella de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. MET-2 tiene aproximadamente tres veces la potencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en provocar la diferenciación de las células HL-60 en monocitos.

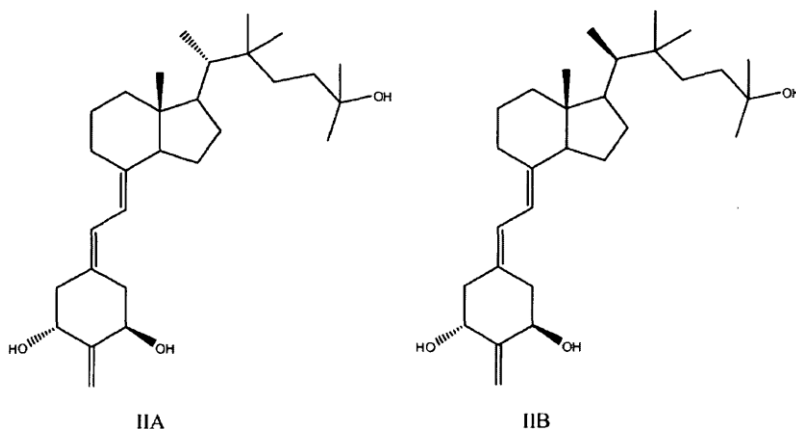
La Fig. 8 es un gráfico que compara la actividad de transcripción *in vitro* de MET-2 con aquella de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. MET-2 es aproximadamente tres veces más potente que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en aumentar la transcripción del gen de la 24-hidroxilasa.

La Fig. 9 es un gráfico de barras que compara la actividad de movilización del calcio de los huesos de MET-2 con aquella de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en rata. MET-2 es aproximadamente 16 veces menos potente que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la liberación de los depósitos de calcio de los huesos.

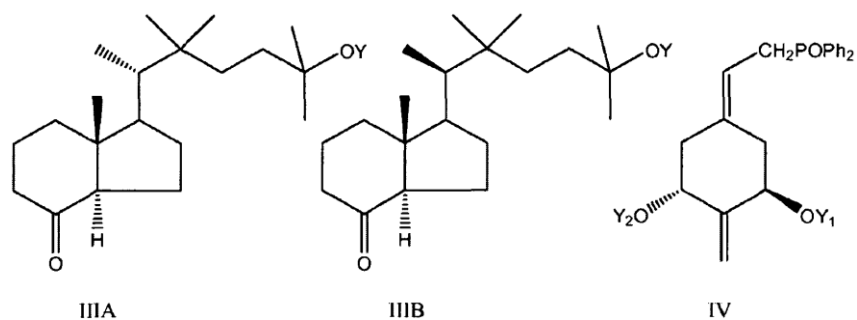
Fig. 10 es un gráfico de barras que compara la actividad de transporte de calcio intestinal de MET-2 con aquella de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. MET-2 es menos potente que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en promover el transporte activo de calcio en el intestino de la rata.

Descripción detallada

Se sintetizaron (20S)-2-Metilen-19-nor-22-dimetil- $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 y (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil- $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 , y probaron, y se encontró que era útil en el tratamiento de una variedad de condiciones biológicas como las descritas aquí. Estructuralmente, estos compuestos tienen las fórmulas IIA y IIB como se muestra a continuación:



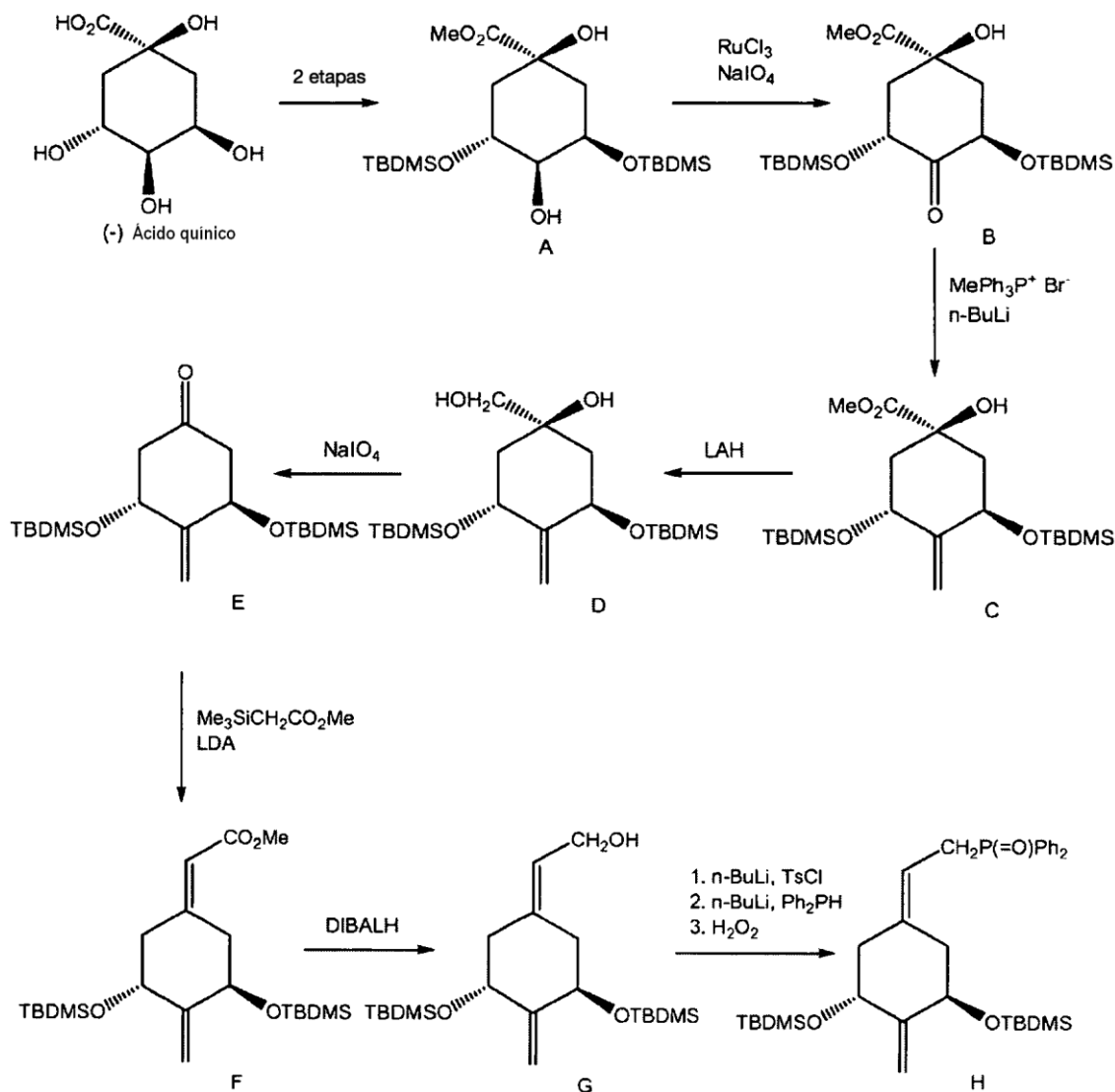
La preparación de (20S)-2-metilen-19-nor-22-dimetil- $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 y (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil- $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 se puede lograr mediante la condensación de una cetona bicíclica apropiada tipo Windaus-Grundmann (IIIA o IIIB) con el óxido de fosfina alílico IV seguido de desprotección (remoción de los grupos protectores de hidroxilo Y, Y_1 y Y_2).



5 Las hidraindanonas de estructura IIIA y IIIB se pueden preparar mediante una ligera modificación de métodos conocidos como será fácilmente evidente para alguien capacitado en la materia y descrito aquí. Los ejemplos específicos de métodos usados para sintetizar cetonas bicíclicas para análogos de vitamina D son aquellos descritos en Mincione y colaboradores, Synth. Commun 19, 723, (1989); y Peterson y colaboradores, J. Org. Chem. 51,1948, (1986). Un proceso global para sintetizar compuestos de 2-alkiliden-19-nor-vitamina D se ilustra y se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5.843.928. Los detalles de la preparación de hidraindanonas IIIA y IIIB se encuentran los Ejemplos en el presente documento.

10 En el óxido de fosfina IV, Y₁ y Y₂ son grupos protectores de hidroxilo tales como grupos protectores de sililo. El grupo t-butildimetilsililo (TBDMS) es un ejemplo de un grupo protector de hidroxilo particularmente útil. El proceso descrito anteriormente representa una aplicación del concepto de síntesis convergente, que ha sido aplicado efectivamente a la preparación de numerosos compuestos de vitamina D (véase Lythgoe y colaboradores, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 590 (1978); Lythgoe, Chem. Soc. Rev. 9, 449 (1983); Toh y colaboradores, J. Org. Chem. 48, 1414 (1983); Baggiolini y colaboradores, J. Org. Chem. 51, 3098 (1986); Sardina y colaboradores, J. Org. Chem. 51, 1264 (1986); J. Org. Chem. 51, 1269 (1986); DeLuca y colaboradores, patente de los Estados Unidos No. 5.086.191; DeLuca y colaboradores, patente de los Estados Unidos No. 5.536.713; y DeLuca y colaboradores, patente de los Estados Unidos No. 5.843.928).

Esquema 1



- 5 El óxido de fosfina IV es un reactivo conveniente que puede ser preparado de acuerdo con los procedimientos descritos por Sicinski y colaboradores, *J. Med. Chem.*, 41, 4662 (1998), DeLuca y colaboradores, patente de los Estados Unidos No. 5.843.928; Perlman y colaboradores, *Tetrahedron Lett.* 32, 7663 (1991); y DeLuca y colaboradores, patente de los Estados Unidos No. 5.086.191. El esquema 1 muestra el procedimiento general para la síntesis del óxido de fosfina IV como se expone en la patente de los Estados Unidos No. 5.843.928.
- 10 Como se utiliza aquí, el término "grupo protector de hidroxilo" significa cualquier grupo comúnmente utilizado para la protección temporal del grupo funcional hidroxilo (-OH), tal como, los grupos alcóxicarbonilo, acilo, alquilsililo o alquilarilsililo (de ahora en adelante denominado simplemente como grupos "sililo"), y grupos alcóxialquilo. Los grupos protectores de alcóxicarbonilo son grupos alquil-O-CO tales como metóxicarbonilo, etóxicarbonilo, propóxicarbonilo, isopropóxicarbonilo, butóxicarbonilo, isobutóxicarbonilo, tert-butóxicarbonilo, benciloxicarbonilo o aliloxicarbonilo. El término "acilo" significa un grupo alcanoilo de 1 a 6 carbonos, en todas sus formas isoméricas, o un grupo carboxialcanoilo de 1 a 6 carbonos, tal como un grupo oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, o un grupo acilo aromático tal como benzoilo, o un grupo benzoilo sustituido con halo, nitro o alquilo. Los grupos protectores de alcóxialquilo son grupos tales como metoximetilo, etoximetilo, metoxietoximetilo, o tetrahidrofuranilo y tetrahidropiranilo. Los grupos preferidos protectores de sililo son trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, dibutilmetilsililo, difenilmetilsililo, fenildimetilsililo, difenil-t-butilsililo y radicales sililo análogos alquilados. El término "arilo" especifica un grupo fenilo sustituido con fenilo, o un alquilo, nitro o halógeno. Una lista extensiva de grupos protectores para la funcionalidad del grupo hidroxilo puede encontrarse en *Protective Groups in Organic Synthesis*, Greene, T.W.; Wuts, P. G. M., John Wiley & Sons, New York, NY, (3ra Edición, 1999) que pueden añadirse o removerse utilizando los procedimientos expuestos allí.
- 20
- 25 Un grupo "hidroxilo protegido" es un grupo hidroxilo del cual se ha formado un derivado o protegido por cualquiera de

los grupos anteriores comúnmente utilizados para la protección temporal o permanente de los grupos funcionales hidroxilo, por ejemplo, los grupos sililo, alcoxilalquilo, acilo o alcoxicarbonilo, como se definió previamente.

Los compuestos de la presente tecnología exhiben patrones de actividad biológica deseables, y muy ventajosos. Estos compuestos se caracterizan por un enlazamiento relativamente alto con receptores de vitamina D (véanse las Figs. 1 y 5) y alta actividad en la diferenciación de HL-60, pero muy baja capacidad para movilizar calcio desde los huesos (véanse las Figs. 4 y 9) y actividad de transporte de calcio intestinal relativamente baja (véanse las Figs. 5 y 10), comparado con aquella de 1,25-dihidroxitamina D₃. Por lo tanto, estos compuestos se pueden caracterizar por tener poca actividad calcémica, si la hay, en dosis en las que 1,25-dihidroxitamina D₃ exhibe una actividad calcémica significativa. Por lo tanto, puede ser útil como terapia para la supresión de hiperparatiroidismo secundario del tipo osteodistrofia renal.

Los Compuestos de la presente tecnología también son adecuados para el tratamiento y profilaxis de trastornos humanos que se caracterizan por un desequilibrio en el sistema inmune, por ejemplo, en enfermedades autoinmunes, incluyendo esclerosis múltiple, lupus, diabetes mellitus, reacción de injerto contra huésped, rechazo de trasplantes de órganos; y adicionalmente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, asma, y enfermedades inflamatorias del intestino tales como la enfermedad celíaca, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. El acné, la alopecia y la hipertensión son otras afecciones que pueden ser tratadas con los compuestos de la presente tecnología.

Los compuestos anteriores también se caracterizan por actividad de diferenciación celular ya sea igual a o significativamente mayor que la de 1 α ,25(OH)₂ D₃ (véanse las Figs. 2 y 7). Por lo tanto, este compuesto también proporciona un agente terapéutico para el tratamiento de psoriasis, o como agente anticancerígeno, especialmente contra la leucemia, cáncer de colon, cáncer de próstata y cáncer de mama. Además, debido a su diferenciación celular relativamente alta.

Los Compuestos de la presente tecnología se pueden usar para preparar formulaciones farmacéuticas o medicamentos que incluyen un compuesto de la presente tecnología en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales formulaciones farmacéuticas y medicamentos se pueden usar para tratar diversos trastornos biológicos tales como los descritos en el presente documento. Los métodos para tratar dichos trastornos típicamente incluyen administrar una cantidad eficaz del compuesto o una cantidad apropiada de una formulación farmacéutica o un medicamento que incluye el compuesto a un sujeto que padece el trastorno biológico. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas de tales realizaciones, el mamífero se selecciona a partir de un roedor, un primate, un bovino, un equino, un canino, un felino, un osuno, un cerdo, un conejo, o un conejillo de indias. En algunas de tales 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.

Para los propósitos de tratamiento, los compuestos definidos por las fórmulas I, IA, IB, II, IIA, IIB, IIC, y IID pueden formularse para aplicaciones farmacéuticas tales como una solución en disolventes inocuos, o como una emulsión, suspensión o dispersión en disolventes adecuados o portadores, o como píldoras, comprimidos o cápsulas, junto con vehículos sólidos, de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica. Cualquiera de dichas formulaciones también pueden contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables y no tóxicos tales como estabilizadores, antioxidantes, aglutinantes, agentes colorantes o agentes emulsionantes o agentes modificadores del sabor. Los excipientes farmacéuticamente aceptables y portadores son generalmente conocidos para los expertos en la técnica y por lo tanto se incluyen en la presente tecnología. Tales excipientes Y portadores se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991).

Los compuestos se pueden administrar por vía oral, tópica, parenteral, o transdérmica. Los compuestos se administran convenientemente mediante inyección o infusión intravenosa o por soluciones estériles adecuadas, o en forma de dosis líquida o sólida a través del tubo digestivo, o en forma de cremas, ungüentos, parches, o vehículos similares adecuados para aplicaciones transdérmicas. En algunas realizaciones, dosis de 0,001 μ g a 1 mg por día del compuesto son adecuadas para los propósitos del tratamiento. En algunas de tales realizaciones una dosis efectiva y apropiada puede variar de 0,01 μ g a 1 mg por día del compuesto. En otras de tales realizaciones una dosis eficaz y apropiada puede variar de 0,1 μ g a 500 μ g por día del compuesto. Tales dosis se ajustarán de acuerdo con el tipo de condición o enfermedad a tratar, la severidad de la enfermedad o condición, y la respuesta del sujeto como es bien entendido en la técnica. El compuesto puede ser convenientemente administrado solo, o junto con otro compuesto activo de vitamina D.

Las composiciones para uso en la presente tecnología incluyen una cantidad eficaz de (20S)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ y/o (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ como el ingrediente activo, y un portador adecuado. Una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención para uso de acuerdo con algunas realizaciones de la presente tecnología será generalmente una cantidad de dosificación tal como aquella descrita en el presente documento, y se pueden administrar por vía tópica, transdérmica, oral, nasal, rectal, o parenteral.

Los compuestos de fórmula IIA, IIB, IIC y IID se pueden administrar ventajosamente en cantidades suficientes para efectuar la diferenciación de los promielocitos en macrófagos normales. Las dosificaciones como se ha descrito anteriormente son adecuadas, entendiéndose que las cantidades dadas deben ser ajustadas de acuerdo con la severidad de la enfermedad, y la condición y respuesta del sujeto como es bien entendido en la técnica.

5 Los compuestos se pueden formular en forma de cremas, lociones, pomadas, aerosoles, supositorios, parches tópicos, píldoras, cápsulas o tabletas, o en forma líquida como soluciones, emulsiones, dispersiones, o suspensiones en disolventes o aceites aceptables y farmacéuticamente inocuos, y tales preparaciones pueden contener, además, otros componentes beneficiosos o farmacéuticamente inocuos, tales como agentes estabilizantes, antioxidantes, emulsionantes, colorantes, agentes aglutinantes o modificadores del sabor.

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

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

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

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

25 Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas tales como linimentos, lociones, aplicadores, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite tales como cremas, ungüentos o pastas; o soluciones o suspensiones tales como gotas; o como atomizadores.

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

35 Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Por el término "unidad de dosificación" se entiende una dosis unitaria, es decir, una sola dosis, que puede ser administrada a un paciente como una dosis unitaria física y químicamente estable que comprende ya sea el ingrediente activo como tal o una mezcla de él con diluyentes o vehículos farmacéuticos sólidos o líquidos.

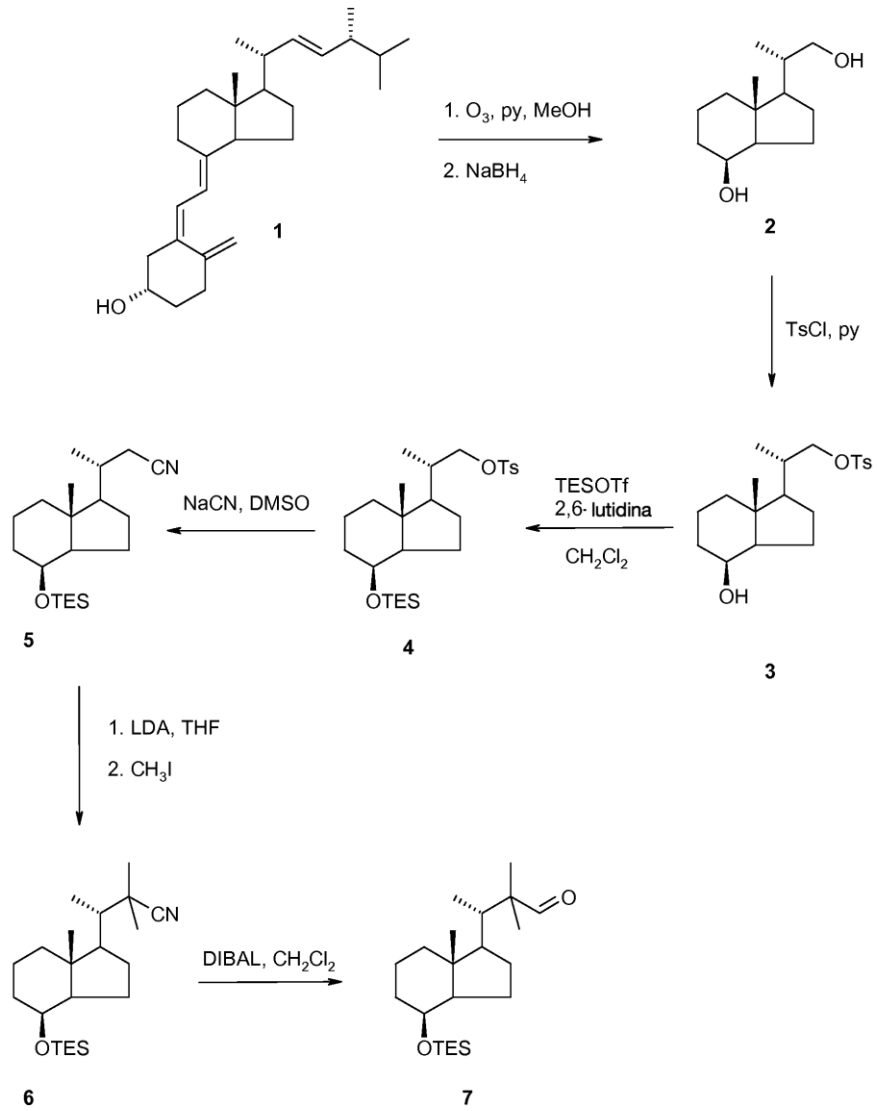
Ejemplos

40 Ejemplo 1: Síntesis de (20S)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 a,25- dihidroxivitamina

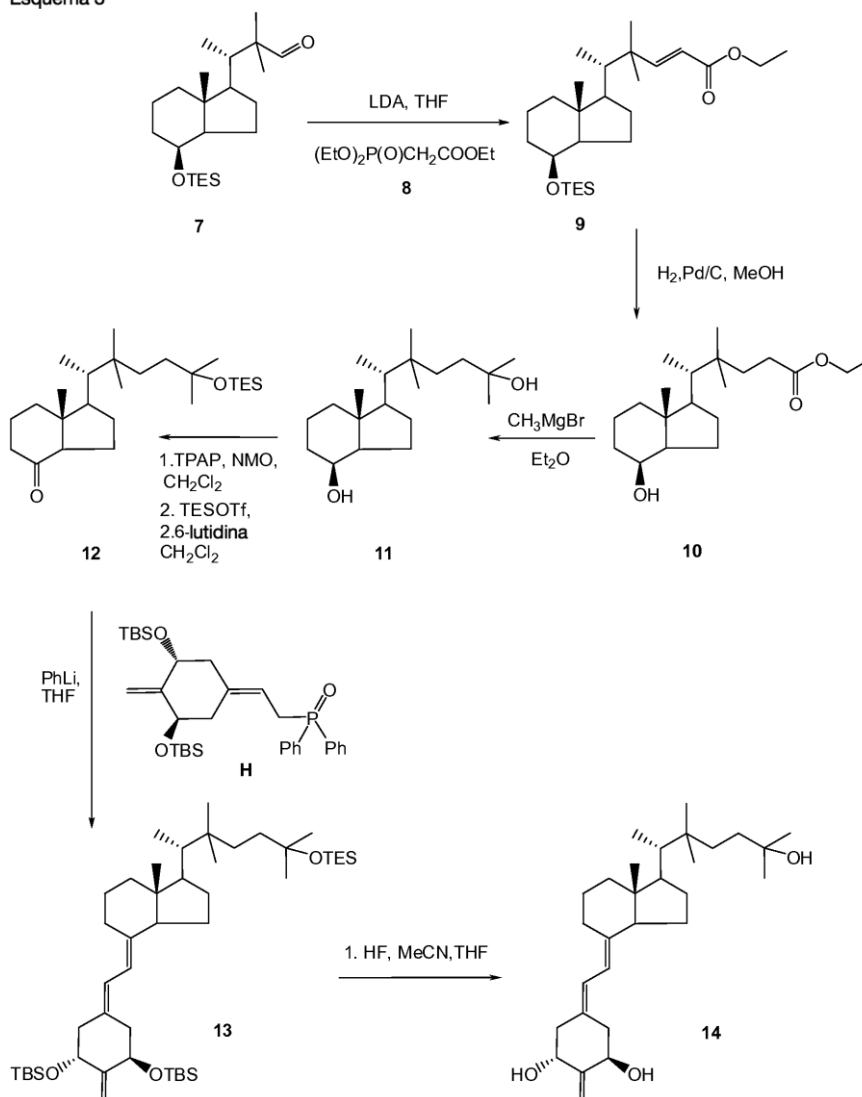
45 Los compuestos de la presente tecnología, incluyendo (20S)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxivitamina D₃, fueron preparados utilizando los métodos mostrados en los Esquemas 1-3. Como se muestra en el Esquema 2, el compuesto 2 se obtiene por lisis con ozono de la vitamina D₂ (compuesto 1) como lo describen Sicinski y colaboradores (J. Med. Chem. 41, 4662-4672, 1998), seguido por reducción con borohidruro. El tratamiento del dialcohol 2 con cloruro de tosilo en piridina proporciona el compuesto 3 tosionato. El compuesto 3 es protegido mediante tratamiento con el triflato trietilsililo (TESOTf) y 2,6-lutidina en diclorometano para producir el compuesto 4. El tosionato del compuesto 4 fue desplazado con cianuro en dimetil sulfóxido (DMSO) para producir un compuesto 5 ciano. La reacción del compuesto 5 con litio diisopropil amida (LDA) en tetrahidrofurano (THF) y alquilación con yoduro de metilo produjo el compuesto 6, que fue posteriormente reducido con hidruro de diisobutil aluminio (DIBAL) en diclorometano para proporcionar el aldehído 7.

55 El esquema 3 ilustra la conversión del compuesto 7 al compuesto del título de Fórmula IIA (compuesto 14). Primero, el aldehído 7 reacciona con trietilfosfonoacetato 8 en presencia de LDA para proporcionar el alqueno 9. Se hidrogenó el compuesto 9 sobre Pd/C en metanol para producir el compuesto 10, y este último compuesto reaccionó con reactivo de Grignard con metilo para producir el alcohol terciario, 11. La oxidación con perrutenato de tetrapropilo en presencia de N-óxido de N-metilmorfolina, seguido por la protección del alcohol restante con TESOTf bajo las mismas condiciones que antes condujeron a la cetona 12. Se acopló el compuesto 12 con la sal fosfonio del anillo A (compuesto H del Esquema 1) usando fenil litio para producir el compuesto 13, el derivado de la vitamina protegido con sililo (un compuesto de fórmula I y IA). La remoción de todos los grupos protegidos con sililo se efectuó con HF en acetonitrilo (ACN) para producir el compuesto 14 (un compuesto de fórmula I y IIA). Este producto se caracterizó completamente como se describe a continuación.

Esquema 2



Esquema 3



(8S,20S)-Des-A,B-20-(hidroximetil)-pregnan-8-ol (2)

5 Se pasó ozono a través de una solución de vitamina D₂ 1 (5 g, 12,6 mmol) y piridina (5 mL, 4,89 g, 62 mmol) en metanol (400 mL) a -78°C. Cuando la mezcla de reacción se tornó azul oscura se la trató con oxígeno durante 15 min para remover el ozono residual y luego se la trató con NaBH_4 (1,5 g, 40 mmol). Después de 15 min, se añadió la segunda
 10 porción de NaBH_4 (1,5 g, 40 mmol) y se dejó calentar la mezcla a temperatura ambiente. Se añadió la tercera porción de NaBH_4 (1,5 g, 40 mmol) y se agitó la mezcla de reacción durante 18 horas. Se detuvo la reacción con agua, se la concentró a presión reducida y se extrajo con diclorometano. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl acuoso 1 M, NaHCO_3 acuoso saturado y se secó (Na_2SO_4) y se concentró. Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice (30%, luego 50% de acetato de etilo/hexano) para producir el diol 2 (2,61 g, 49%) como cristales incoloros.

15 p.f. 107 °C (de acetato de etilo/hexano); $[\alpha]_D^{+32.9}$ (c 1.0, CHCl_3); RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 4.07 (1H, d, J = 2.5 Hz), 3.62 (1H, dd, J = 10.5, 3.2 Hz), 3.37 (1H, dd, J = 10.5, 6.8 Hz), 1.98 (1H, m), 1.80 (3H, m), 1.02 (3H, d, J = 6.6 Hz), 0.94 (3H, s); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 69.21, 67.81, 52.91, 52.34, 41.84, 40.20, 38.22, 33.55, 26.64, 22.55, 17.38, 16.60, 13.56; MS (EI) m/z 212 (1, M^+), 194 (28, $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 179 (29), 163 (22), 147 (15), 135 (42), 125 (48), 111 (100), 97 (51); masa exacta calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}$ ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$) 194.1671, encontrada 194,1673.

20 (8S,20S)-Des-A,B-20-[(p-toluenosulfonil)oxi]metil-pregnan-8-ol (3)

25 Se añadió una solución previamente enfriada (-20 °C) de cloruro de tosilo (0,9 g, 4,73 mmol) en piridina (2 mL) a una mezcla del diol 2 (0,52 g, 2,45 mmol) en piridina seca (5 mL) a -20 °C. Se agitó la mezcla de reacción durante 3 h a -20 °C, luego se la calentó a 0 °C y agitó durante 18 h. Se colocó la mezcla en una solución acuosa saturada de CuSO_4 y se extrajo con diclorometano. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con una solución acuosa saturada de CuSO_4 y

se secó (Na_2SO_4) y concentró. Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice (20% de acetato de etilo/hexano) para la producción de tosilato 3 (0,86 g, rendimiento del 96%) como cristales incoloros.

p.f. 95 °C (de acetato de etilo/hexano); $[\alpha]_D^{+17.4}$ (c 1.0, CHCl_3); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.34 (2H, d, J = 8.2 Hz), 4.06 (1H, s), 3.94 (1H, dd, J = 9.2, 3.1 Hz), 3.80 (1H, dd, J = 9.2, 6.2 Hz), 2.44 (3H, s), 1.90 (1H, m), 1.78 (2H, m), 0.95 (3H, d, J = 6.6 Hz), 0.88 (3H, s); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 144.59, 133.01, 129.73, 127.86, 75.56, 68.98, 52.18, 41.81, 40.00, 35.66, 33.50, 26.36, 22.40, 21.60, 17.29, 16.69, 13.43; MS (EI) m/z 367 (6, MH^+), 348 (5, $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 307 (2), 194 (18), 179 (23), 150 (17), 135 (16), 125 (34), 111 (100), 91 (50); MS (ESI) m/z 389 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 755 (90, $[2\text{M}+\text{Na}]^+$), 1121 (60, $[3\text{M}+\text{Na}]^+$); masa exacta (ESI) calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 389,1763, encontrada 389,1758.

(8S,20S)-Des-A,B-8-[(trietilsilil)oxi]-20-[(p-toluenosulfonil)oxi]metil-pregnano (4)

Se añadió trietilsilil trifluorometanosulfonato (0,6 mL, 0,70 g, 2,65 mmol) a una solución del tosilato 3 (0,65 g; 1,78 mmol) y 2,6-lutidina (0,3 mL, 0,28 g, 2,58 mmol) en diclorometano (6 mL) a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción durante 15 min y se la diluyó con diclorometano. Se lavó la fase orgánica con agua, se secó (Na_2SO_4) y concentró. Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice (20% de acetato de etilo/hexano) para producir el producto 4 (0,84 g, rendimiento del 99%) como un aceite de color amarillo claro.

$[\alpha]_D^{+20.6}$ (c 1.0, CHCl_3); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.78 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.34 (2H, d, J = 8.2 Hz), 4.01 (1H, d, J = 2.0 Hz), 3.96 (1H, dd, J = 9.2, 3.0 Hz), 3.79 (1H, dd, J = 9.2, 6.5 Hz), 2.45 (3H, s), 1.87 (1H, m), 0.94 (3H, d, J = 5.9 Hz), 0.93 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.86 (3H, s), 0.54 (6H, q, J = 7.9 Hz); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 144.55 (0), 133.10 (0), 129.73 (1), 127.91 (1), 75.76 (2), 69.11 (1), 52.70 (1), 52.36 (1), 42.12 (0), 40.39 (2), 35.72 (1), 34.47 (2), 26.52 (2), 22.88 (2), 21.63 (3), 17.56 (2), 16.76 (3), 13.46 (3), 6.91 (3), 4.89 (2); MS (EI) m/z no M^+ , 319 (46), 291 (9), 265 (9), 246 (5), 217 (100), 189 (81), 161 (69), 133 (54), 103 (38), 94 (39); MS (ESI) m/z 503 (100, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 983 (40, $[2\text{M}+\text{Na}]^+$), 1463 (71, $[3\text{M}+\text{Na}]^+$); masa exacta (ESI) calculada para $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{SSiNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 503,2627, encontrada 503,2629.

(8S,20R)-Des-A,B-8-[(trietilsilil)oxi]-20-(cianometil)-pregnano (5)

Se añadió cianuro de sodio (2 g, 41 mmol) a una solución de tosilato 4 (0,84 g, 1,75 mmol) en DMSO seco (8 mL). Se agitó la mezcla resultante a 90 °C durante 3 h, luego se enfrió, se diluyó con agua y extrajo con acetato de etilo. Se secaron las fases orgánicas combinadas (Na_2SO_4) y concentró. Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice (10% de acetato de etilo/hexano) para producir el cianuro 5 (0,57 g, rendimiento del 97%) como un aceite incoloro.

$[\alpha]_D^{+16.6}$ (c 1.0, CHCl_3); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4.04 (1H, d, J = 2.1 Hz), 2.34 (1H, dd, J = 16.6, 3.7 Hz), 2.23 (1H, dd, J = 16.6, 7.0 Hz), 1.92 (1H, m), 1.13 (3H, d, J = 6.6 Hz), 0.942 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.921 (3H, s), 0.55 (6H, q, J = 7.9 Hz); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 119.09 (0), 69.12 (1), 55.34 (1), 52.86 (1), 42.18 (0), 40.35 (2), 34.40 (2), 33.09 (1), 27.19 (2), 24.69 (2), 22.82 (2), 19.23 (3), 17.53 (2), 13.63 (3), 6.91 (3), 4.89 (2); MS (EI) m/z 335 (10), 320 (3), 306 (100), 292 (28), 225 (7), 202 (20), 188 (10), 161 (17), 135 (14), 103 (55); masa exacta calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{ONSi}$ (M^+) 335,2644, encontrada 335,2656.

(8S,20S)-Des-A,B-8-[(trietilsilil)oxi]-20-(1'-metil-1'-ciano-etil)-pregnano (6)

Se añadió n-butil-litio (1,6 M en hexano, 3,4 mL, 5,4 mmol) a una solución de diisopropilamina (0,76 mL, 0,544 g, 5,4 mmol) en THF (1 mL) a 0°C. Se agitó la mezcla resultante a 0°C durante 30 min, luego se enfrió a -78°C y se añadió una solución de cianuro 5 (0,45 g, 1,34 mmol) en THF (2 mL). Se agitó la mezcla a -78 °C durante 30 min y luego se añadió yodometano (0,9 mL, 2,04 g, 14,4 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a -78°C durante 1 h y luego a temperatura ambiente durante 1 h. Se la detuvo con solución acuosa saturada de NH_4Cl y extrajo con acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera, se secó (Na_2SO_4) y concentró. Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice (10%, luego 20% de acetato de etilo/hexano) para producir el producto 6 (0.49 g, rendimiento del 100%).

$[\alpha]_D^{+34.5}$ (c 1.0, CHCl_3); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 4.04 (1H, d, J = 2.5 Hz), 1.37 (3H, s), 1.28 (3H, s), 0.99 (3H, d, J = 6.9 Hz), 0.97 (3H, s), 0.95 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.55 (6H, q, J = 7.9 Hz); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 127.28 (0), 69.26 (1), 54.06 (1), 52.33 (1), 43.55 (0), 42.77 (1), 41.17 (2), 35.67 (0), 34.48 (2), 27.97 (2), 27.43 (3), 23.45 (2), 22.70 (3), 17.69 (2), 14.60 (3), 13.17 (3), 6.92 (3), 4.91 (2); MS (EI) m/z 363 (28, M^+), 349 (14), 334 (100), 321 (65), 306 (27), 261 (11), 225 (27), 183 (14), 163 (36), 135 (47), 103 (99), 75 (58); masa exacta calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{ONSi}$ (M^+) 363,2957, encontrada 363,2957.

(8S,20S)-Des-A,B-8-[(trietilsilil)oxi]-20-(1'-metil-1'-formil-etil)-pregnano (7)

Se añadió hidruro de diisobutilaluminio (1,0 M en diclorometano, 2,5 mL, 2,5 mmol) a una solución del compuesto 6 (0,49 g, 1,35 mmol) en diclorometano (3 mL) a -10°C. Se agitó la mezcla de reacción a -10 °C durante 1 hora, luego se la detuvo con una solución acuosa saturada de tartrato de sodio y potasio (5 mL). Se extrajo la fase acuosa con diclorometano. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera y se secó (Na_2SO_4) y concentró. Se purificó el

residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice (10%, luego 20% de acetato de etilo/hexano) para producir el aldehído 7 (0,47 g, rendimiento del 95%) como cristales incoloros. p.f. 71-72°C (EtOAc); $[\alpha]_D +12.8$ (c 1.0, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 9.48 (1H, s), 4.00 (1H, d, J = 2.2 Hz), 2.00 (1H, m), 0.95 (6H, s), 0.94 (9H, t, J = 7.8 Hz), 0.94 (3H, d, J = 6.9 Hz), 0.93 (3H, s), 0.54 (6H, q, J = 7.8 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 207.03 (1), 69.30 (1), 54.46 (1), 52.65 (1), 50.05 (0), 43.02 (0), 41.22 (2), 40.21 (1), 34.57 (2), 28.73 (2), 23.34 (2), 22.74 (3), 17.72 (2), 15.20 (3), 13.61 (3), 13.22 (3), 6.92 (3), 4.92 (2); MS (EI) m/z 366 (3, M+), 337 (10), 323 (4), 295 (10), 281 (5), 253 (6), 239 (8), 225 (38), 203 (6), 186 (22), 163 (100), 135 (56), 103 (87), 75 (63); masa exacta (ESI) calculada para C₂₂H₄₂O₂SiNa [M+Na]⁺ 389,2852, encontrada 389,2855.

10 (8S,20S)-Des-A,B-8-[(trietilsilil)oxi]-20-(1'-dimetil-3'-etiloxicarbonil-2'-propenil)-pregnano (9)

Se añadió n-butil-litio (1,6 M en hexano, 1,1 mL, 1,76 mmol) a una solución de diisopropilamina (0,24 mL, 0,172 g, 1,70 mmol) en THF seco (1mL) a 0 °C. Después de 30 min se enfrió la mezcla a -10 °C y se añadió trietilfosonoacetato 8 (0,38 mL, 0,426 g, 1,9 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a -10 °C durante 30 min y luego se añadió una solución de aldehído 7 (31,4 mg, 0,086 mmol) en THF anhidro (1 mL + 0,5 mL) a través de una cánula. Se agitó la mezcla bajo una atmósfera de argón a -10°C durante 1 h, luego se la calentó a 37°C durante 2,5 h y después se la agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió diclorometano y se lavó la fase orgánica con agua, se secó (Na₂SO₄) y concentró. Se purificó el producto sobre un cartucho Sep-Pak (5 g). Se lavó el cartucho con hexano/acetato de etilo (2%) para producir 9 (34,1 mg, rendimiento del 91%) como un aceite incoloro. $[\alpha]_D -4.6$ (c 1.0, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.07 (1H, d, J = 16.0 Hz), 5.64 (1H, d, J = 16.0 Hz), 4.19 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.00 (1H, d, J = 2.1 Hz), 2.00 (1H, m), 1.30 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.00 (3H, s), 0.98 (3H, s), 0.94 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.93 (3H, s), 0.93 (3H, d, J = 8.0 Hz), 0.54 (6H, q, J = 7.9 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 167.52 (0), 162.38 (1), 115.17 (1), 69.44 (1), 60.04 (2), 54.44 (1), 52.45 (1), 45.28 (1), 43.45 (0), 41.30 (2), 40.91 (0), 34.59 (2), 29.75 (2), 27.44 (3), 23.79 (2), 21.34 (3), 17.74 (2), 15.03 (3), 14.29 (3), 13.01 (3), 6.92 (3), 4.92 (2); MS (EI) m/z 437 (4, MH+), 421 (4), 407 (43), 366 (5), 337 (5), 295 (42), 281 (13), 256 (42), 225 (18), 191 (27), 163 (100); MS (ESI) m/z 459 (81, [M+Na]⁺), 895 (75, [2M+Na]⁺), 1331 (94, [3M+Na]⁺), masa exacta (ESI) calculada para C₂₆H₄₈O₃SiNa [M+Na]⁺ 459,3270, encontrada 459,3254.

(8S,20S)-Des-A,B-20-(1'-dimetil-3'-etiloxicarbonil-propil)-pregnan-8-ol (10)

Se hidrogenó una solución del éster 9 (34,1 mg, 0,078 mmol) en metanol (5 mL) en presencia de 10% de paladio sobre carbón en polvo (10 mg) a temperatura ambiente durante 20 h. Se filtró la mezcla de reacción a través un cartucho de sílice Sep-Pak de Waters (2 g), que fue lavado adicionalmente con metanol. Después de la remoción del solvente, se obtuvo el éster 10 (24,0 mg, 95%) como un aceite incoloro. $[\alpha]_D +7.1$ (c 1.0, CHCl₃); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 4.12 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.07 (1H, d, J = 2.1 Hz), 2.25 (2H, m), 2.10 (1H, m), 1.26 (3H, t, J = 7.1 Hz), 0.99 (3H, s), 0.92 (3H, d, J = 7.1 Hz), 0.91 (3H, s), 0.86 (3H, s); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 174.60 (0), 69.47 (1), 60.23 (2), 53.30 (1), 51.90 (1), 43.53 (0), 43.14 (1), 40.90 (2), 36.34 (0), 36.25 (2), 33.57 (2), 29.94 (2), 29.44 (2), 27.49 (3), 26.21 (3), 23.36 (2), 17.48 (2), 14.89 (3), 14.22 (3), 13.08 (3); MS (EI) m/z 325 (3, MH⁺), 306 (5), 278 (8), 261 (7), 224 (7), 181 (15), 163 (56), 143 (100), 111 (76), 97 (62); MS (ESI) m/z 347 (85, [M+Na]⁺), 671 (9, [2M+Na]⁺), masa exacta calculada para NaC₂₀H₃₆O₃Na [M+Na]⁺ 347,2562, encontrada 347,2556.

(8S,20S)-Des-A,B-22-dimetil-colestan-8,25-diol (11)

Se añadió bromuro de metilmagnesio (solución 3,0 M en éter dietílico, 65 µL, 0,195 mmol) a una solución del éster 10 (24 mg, 0,074 mmol) en éter dietílico anhidro (1,8 mL) a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 2 h y luego a temperatura ambiente durante 18 h. Se la detuvo con solución acuosa saturada de NH₄Cl, se extrajo con acetato de etilo, se secó (Na₂SO₄) y concentró. Se aplicó el residuo a un cartucho de sílice Sep-Pak de Waters (5 g). La elución con acetato de etilo/hexano (1:1) produjo el diol 11 (19,2 mg, 84%). $[\alpha]_D +4.8$ (c 1.0, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4.07 (1H, d, J = 2.1 Hz), 2.10 (1H, m), 1.21 (6H, s), 0.99 (3H, s), 0.91 (3H, s), 0.90 (3H, d, J = 8.2 Hz), 0.84 (3H, s); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 71.19 (0), 69.51 (1), 53.43 (1), 51.91 (1), 43.51 (0), 42.65 (1), 40.91 (2), 37.59 (2), 36.29 (2), 36.24 (0), 33.55 (2), 29.89 (2), 29.23 (3), 29.17 (3), 28.04 (3), 26.29 (3), 23.38 (2), 17.49 (2), 14.87 (3), 13.10 (3); MS (EI) m/z no M⁺, 292 (5), 259 (2), 223 (3), 205 (7), 181 (8), 163 (28), 129 (25), 111 (100), 95 (23); MS (ESI) m/z 333 (95, [M+Na]⁺), 643 (11, [2M+Na]⁺), masa exacta (ESI) calculada para NaC₂₀H₃₈O₂Na [M+Na]⁺ 333,2770, encontrada 333,2774.

(20S)-Des-A,B-22-dimetil-25-[(trietilsilil)oxi]-cholestan-8-one (12)

Se añadieron tamices moleculares A4 (100 mg) a una solución de óxido 4-metilmorfolina (150 mg, 1,28 mmol) en diclorometano (600 µL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min y se añadió perrutenato de tetrapropilamonio (8 mg, 22,8 µmol), seguido por una solución de diol 11 (19 mg, 0,061 mmol) en diclorometano (400 + 200 µL). Se agitó la suspensión resultante a temperatura ambiente durante 1 h. Se filtró la mezcla de reacción a través de un cartucho de sílice Sep-Pak de Waters (2 g) que fue lavado adicionalmente con acetato de etilo. Después de la remoción del solvente se obtuvo la cetona (19 mg) como un aceite incoloro.

Se añadió gota a gota trietilsilil trifluorometanosulfonato (20 µL, 23 mg, 0,088 mmol) a una solución de la cetona (19 mg, 0,062 mmol) y 2,6-lutidina (60 µL, 55 mg, 0,515 mmol) en diclorometano (1,2 mL) a -40 °C. Se agitó la mezcla de reacción a -40 °C durante 15 min, luego se diluyó con diclorometano y se lavó con agua. Se secó la capa orgánica

(Na₂SO₄) y concentró. Se aplicó el residuo a un cartucho de sílice Sep-Pak de Waters (5 g). La elución con hexano/acetato de etilo (1%, luego 2%) produjo la cetona protegida 12 (20,2 mg, rendimiento del 78%).

[α]_D -19.2 (c 1.0, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.33 (1H, d, J = 11.5, 7.5 Hz), 2.24 (3H, m), 1.19 (6H, s), 0.95 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.95 (3H, d, J = 6.9 Hz), 0.89 (3H, s), 0.84 (3H, s), 0.71 (3H, s), 0.56 (6H, q, J = 7.9 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 212.46 (0), 73.40 (0), 61.73 (1), 53.18 (1), 51.09 (0), 43.36 (1), 41.08 (2), 39.48 (2), 38.77 (2), 36.15 (0), 35.76 (2), 30.76 (2), 29.87 (3), 27.70 (3), 26.24 (3), 23.94 (2), 19.96 (2), 14.72 (3), 12.87 (3), 7.14 (3), 6.81 (2); MS (EI) m/z no M⁺, 407 (10), 393 (28), 364 (11), 294 (12), 273 (10), 173 (48), 163 (28), 111 (100); MS (ESI) m/z 445 (8, [M+Na]⁺), masa exacta (ESI) calculada para C₂₆H₅₀O₂SiNa [M+Na]⁺ 445,3478, encontrada 445,3486.

(20S)-2-Metilen-19-nor-22-dimetil-1α,25-dihidroxitamina D₃ (14)

Se añadió fenil-litio (1,83 M en di-n-butiléter, 0,1 mL, 0,183 mmol) a una solución agitada del óxido de fosfina H (110 mg, 0,189 mmol) en THF anhidro (1 mL) a -30 °C. Después de 30 min se enfrió la mezcla a -78 °C y se añadió una solución previamente enfriada de la cetona 12 (20 mg, 47,4 μmol) en THF anhidro (200 + 100 μL). Se agitó la mezcla de reacción bajo atmósfera de argón a -78 °C durante 4 horas y luego a +4 °C durante 19 h. Se añadió acetato de etilo y se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y concentró. Se aplicó el residuo a un cartucho de sílice Sep-Pak de Waters (5 g). Se lavó el cartucho con hexano y de acetato de etilo/hexano (1:99) para producir el producto crudo. Se purificó adicionalmente la vitamina por HPLC en fase directa [columna de sílice de 9,4 X 250 mm Zorbax, 4 mL/min, sistema solvente hexano/2-propanol (0,1%), R_t = 3,4 min] para producir el compuesto 13 protegido puro (33,83 mg, rendimiento del 91%).

UV (en hexano) 263.5, 253.5, 245.5 nm; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6.22 (1H, d, J = 11.1 Hz, 6-H), 5.85 (1H, d, J = 11.1 Hz, 7-H), 4.97 (1H, s, =CH₂), 4.92 (1H, s, =CH₂), 4.43 (2H, m, 1β-H y 3α-H), 2.81 (1H, dm, J = 12.6 Hz), 2.52 (1H, dd, J = 13.3, 5.9 Hz, 10α-H), 2.47 (1H, dd, J = 12.6, 4.5 Hz, 4α-H), 2.34 (1H, dd, J = 13.3, 2.8 Hz, 10β-H), 2.18 (1H, dd, J = 12.6, 8.3 Hz, 4β-H), 2.09 (1H, m), 1.97 (2H, m), 1.19 (6H, bs, 26-H3, 27-H3), 0.95 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.93 (3H, d, J = 6.8 Hz, 21-H3), 0.897 (9H, s, t-BuSi), 0.868 (9H, s, t-BuSi), 0.889 y 0.833 (cada 3H, cada s, 28-H3, 30-H3), 0.62 (3H, s, 18-H3), 0.57 (6H, q, J = 7.9 Hz), 0.080 (3H, s, SiMe), 0.068 (3H, s, SiMe), 0.049 (3H, s, SiMe), 0.027 (3H, s, SiMe); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 152.98 (0, C-2), 141.40 (0, C-8), 132.77 (0, C-5), 122.46 (1, C-6), 116.43 (1, C-7), 106.25 (2, =CH₂), 73.52 (0, C-25), 72.53 y 71.64 (cada 1, C-1, C-3), 56.02 (1), 52.84 (1), 47.60 (2), 46.96 (0, C-13), 44.18 (1), 41.14 (2), 38.84 (2), 38.57 (2), 36.23 (0, C-22), 35.85 (2), 31.28 (2), 29.91 y 29.86 (cada 3, C-26, C-27), 28.84 (2), 27.75 (3), 26.22 (3), 25.84 (3), 25.78 (3), 23.53 (2), 23.17 (2), 18.25 (0), 18.17 (0), 14.70 (3), 12.53 (3), 7.15 (3), 6.84 (2), -4.86 (3), -5.10 (3); MS (ESI) m/z 809 (2, [M+Na]⁺), masa exacta (ESI) calculada para C₄₇H₉₀O₃Si₃Na [M+Na]⁺ 809,6096, encontrada 809,6086.

El compuesto 13 protegido (33.82 mg, 43.0 μmol) se disolvió en THF (4 mL) y acetonitrilo (3 mL). Se añadió una solución de HF acuoso al 48% en acetonitrilo (relación 1:9, 4 mL) a 0°C y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 h. Se añadió una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrajo la mezcla de reacción con diclorometano. Se secaron las fases orgánicas combinadas (Na₂SO₄) y concentró bajo presión reducida. Se diluyó el residuo con 2 mL de hexano/acetato de etilo (7:3) y aplicó a un cartucho de sílice Sep-Pak de Waters (5 g). La elución con hexano/acetato de etilo (7:3, luego 1:1) produjo el producto crudo 14. Se purificó adicionalmente la vitamina 14 por HPLC en fase directa [columna de sílica de 9,4 X 250 mm Zorbax, 4 mL/min, sistema solvente hexano/2-propanol (85:15), R_t = 7,8 min.] y HPLC en fase inversa [columna RX-C18 de 9,4 X 250 mm Zorbax, 3 mL/min, sistema solvente metanol/agua (85:15), R_t = 15,7 min] para producir el compuesto 14 puro (14,336 mg, rendimiento del 75%).

UV (en EtOH) λ_{máx} 261.5, 252.0, 244.5 nm; RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 6.35 (1H, d, J = 11.2 Hz, 6-H), 5.89 (1H, d, J = 11.2 Hz, 7-H), 5.10 (1H, s, =CH₂), 5.08 (1H, s, =CH₂), 4.48 (2H, m, 1β-H y 3α-H), 2.84 (1H, dd, J = 13.0, 4.3 Hz, 10β-H), 2.80 (1H, dd, J = 13.3, 4.1 Hz, 9β-H), 2.56 (1H, dd, J = 13.4, 3.3 Hz, 4α-H), 2.32 (1H, dd, J = 13.4, 6.1 Hz, 4β-H), 2.28 (1H, dd, J = 13.0 Hz, 8.4 Hz, 10α-H), 2.08 (1H, m), 1.21 (6H, s, 26-H3, 27-H3), 0.92 (3H, d, J = 7.0 Hz, 21-H3), 0.91 y 0.84 (cada 3H, cada s, 28-H3, 30-H3), 0.62 (3H, 18-H3); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 151.97 (0, C-2), 143.44 (0, C-8), 130.52 (0, C-5), 124.23 (1, C-6), 115.65 (1, C-7), 107.71 (2, =CH₂), 71.79 y 70.63 (cada 1, C-1, C-3), 71.23 (0, C-25), 56.01 (1), 52.77 (1), 47.07 (0, C-13), 45.77 (2), 43.90 (1), 40.98 (2), 38.15 (2), 37.64 (2), 36.28 (0, C-22), 36.00 (2), 31.20 (2), 29.23 y 29.20 (cada 3, C-26, C-27), 29.02 (2), 27.77 (3), 25.97 (3), 23.55 (2), 23.22 (2), 14.71 (3), 12.59 (3); MS (EI) m/z 444 (30, M⁺), 426 (7, M+ H₂O), 411 (2), 341 (4), 315 (20), 297 (10), 269 (12), 247 (20), 223 (4), 192 (4), 175 (6), 161 (14), 135 (40), 111 (56), 91 (100), 69 (24); MS (ESI) m/z 467 (49, [M+Na]⁺), 911 (11, [2M+Na]⁺), masa exacta (ESI) calculada para C₂₉H₄₈O₃Na [M+Na]⁺ 467,3501, encontrada 467,3507.

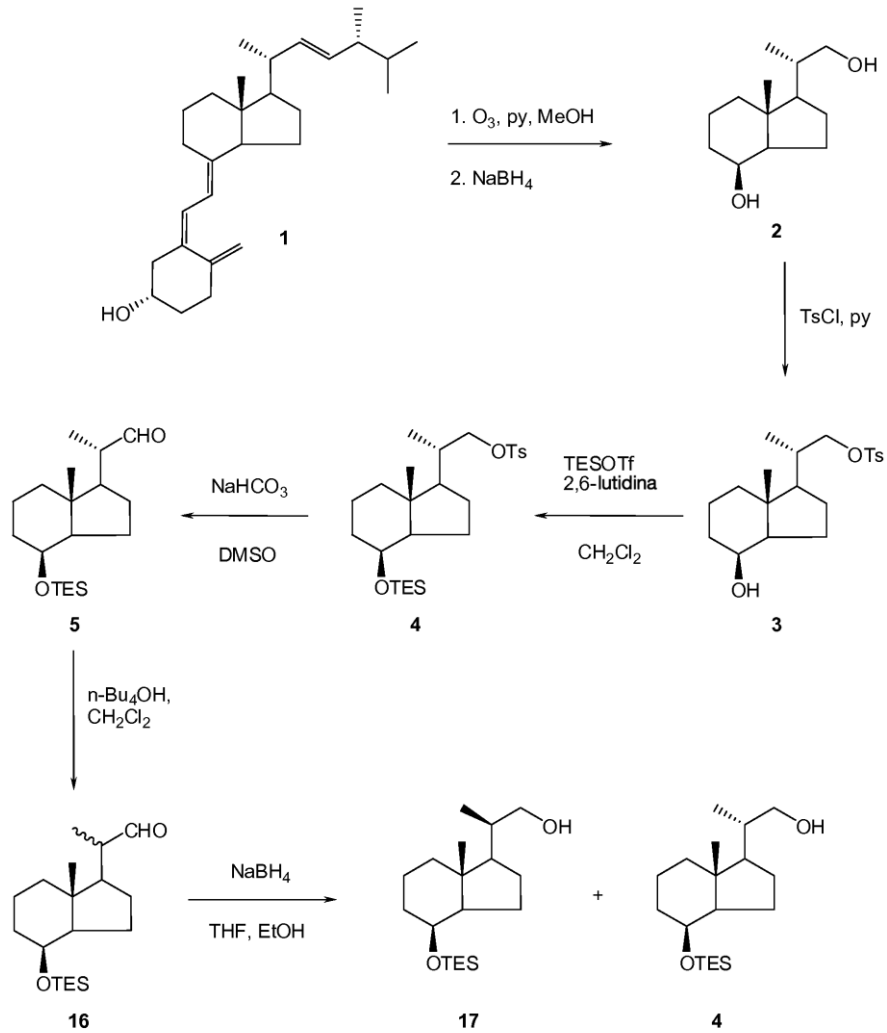
Ejemplo 2: Síntesis de (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1α,25-dihidroxitamina D₃

Los compuestos de la presente tecnología, incluyendo (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1α,25-dihidroxitamina D₃, fueron preparados utilizando los métodos mostrados en los Esquemas 4-6. Como se muestra en el Esquema 4, se obtiene el compuesto 4 mediante las mismas etapas mostradas en el Esquema 2 y descritas en el Ejemplo 1. La oxidación de Kornblum de tosilato 4 con bicarbonato de sodio en DMSO produjo aldehído 15. Se epimerizó el compuesto 15 en la posición 20 por tratamiento con hidróxido de tetrabutilamonio para producir el compuesto 16 y se lo redujo con borohidruro de sodio para producir una mezcla de diastereómeros, a partir de la cual se aisló el compuesto 17, con la estereoquímica 20R.

5

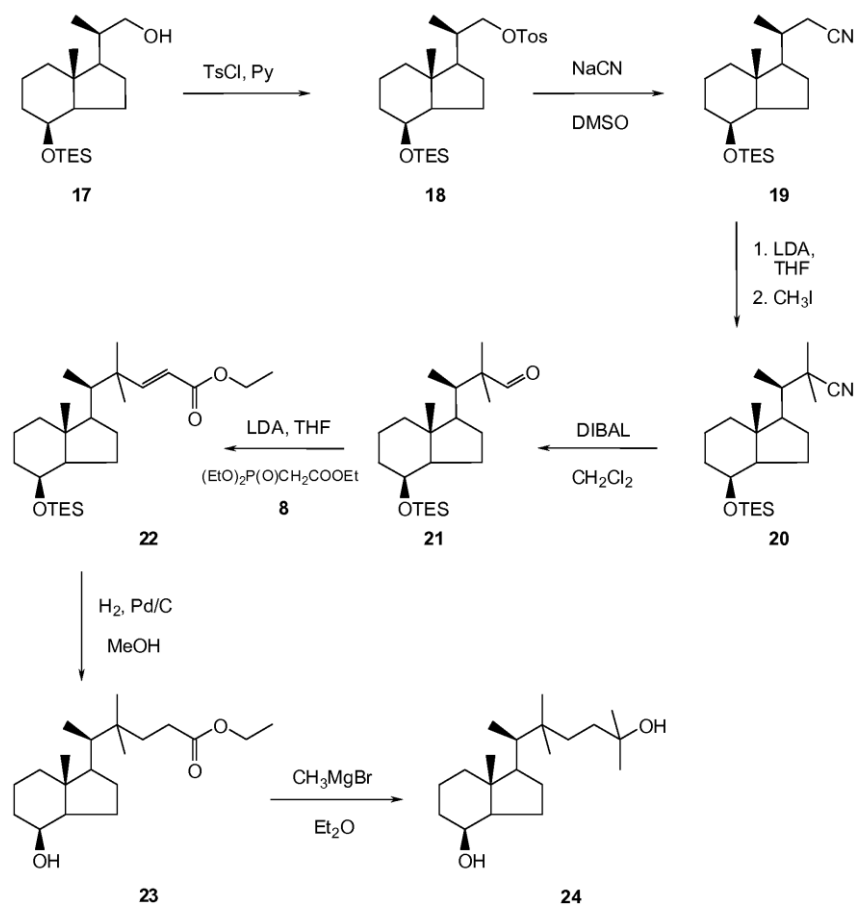
Como se muestra en el Esquema 5, se sometió el compuesto 17 a una serie análoga de etapas de síntesis como aquellas mostradas en los Esquemas 2 y 3 para proporcionar el compuesto 25, el diastereómero 20R del compuesto 11. Igualmente, como se muestra en el Esquema 6, se sometió el compuesto 25 a la misma serie de etapas de oxidación, protección, condensación de trietilfosonoacetato y desprotección que el compuesto 11 en el Esquema 3, para proporcionar el compuesto 28, (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃. Este producto fue completamente caracterizado como se describe a continuación.

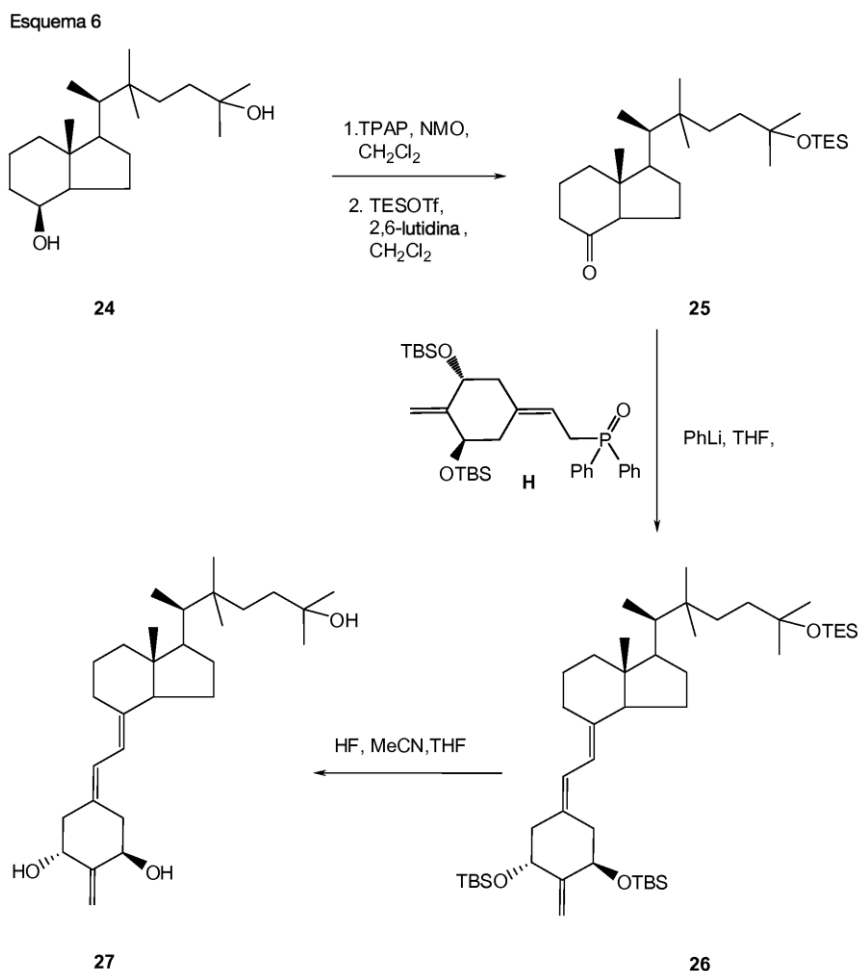
Esquema 4



10

Esquema 5





(8S,20S)-Des-A,B-8-[(trietilsilil)oxi]-20-(formil)-pregnano (15)

5 Se añadió bicarbonato de sodio (5 g, 59,5 mmol) a una solución de tosilato 4 (2,31g, 4,81 mmol) en DMSO (15 mL). Se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora 15 min a 120 °C y se diluyó con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y concentró. Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice (5% de acetato de etilo/hexano) para producir el producto 5 (1,19 g, rendimiento del 76%) como un aceite incoloro.

10 [α]_D +41.4 (c 1.0, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 9.58 (1H, d, J = 3.2 Hz), 4.06 (1H, d, J = 2.4 Hz), 2.36 (1H, m), 1.09 (3H, d, J = 6.8, 3.0 Hz), 0.96 (3H, s), 0.94 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.56 (6H, q, J = 7.9 Hz); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 205.40 (1), 69.01 (1), 52.38 (1), 51.69 (1), 49.17 (1), 42.64 (0), 40.49 (2), 34.54 (2), 26.20 (2), 23.28 (2), 17.58 (2), 13.89 (3), 13.32 (3), 6.92 (3), 4.90 (2); MS (EI) m/z 324 (5, M⁺), 295 (100, M⁺ - EtOH), 281 (30), 246 (12), 191 (36), 175 (99), 135 (54), 103 (76); MS (ESI) m/z 671 (100, [2M+Na]⁺), 995 (49, [3M+Na]⁺); masa exacta calculada para C₁₇H₃₁O₂Si [M-Et]⁺ 295,2093, encontrada 295,2103.

(8S,20R)-Des-A,B-8-[(trietilsilil)oxi]-20-(hidroximetil)-pregnano (17)

20 Se añadió hidróxido de tetrabutilamonio (solución al 40% en peso en agua, 4 mL, 3,98 g, 0,015 mol) a una solución de aldehído 5 (0,97 g, 2,99 mmol) en diclorometano (20 mL). Se agitó la mezcla de reacción durante 18 horas a temperatura ambiente y se diluyó con diclorometano. Se lavó la fase orgánica con agua, se secó (Na₂SO₄) y concentró. Se purificó el producto por cromatografía en columna sobre gel de sílice (3%, luego 5% de acetato de etilo/hexano) para producir una mezcla de isómeros 16 (0,69 g, rendimiento del 71%). Se añadió borohidruro de sodio (0,2 g, 5,29 mmol) a una solución de aldehídos 16 (0,69 g, 2,13 mmol) en THF (10 mL) y etanol (10 mL). Se agitó la mezcla de reacción durante 45 min, se la detuvo con NH₄Cl saturado, se extrajo con acetato de etilo y se secó (Na₂SO₄). Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice (4%, luego 20% de acetato de etilo/hexano) para producir el isómero 17 puro (0,326 g, rendimiento del 47%) y una mezcla de ambos isómeros 17 y 4 (0,277 g, rendimiento del 40%).

25 [α]_D +33.6 (c 1.0, CHCl₃); RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 4.03 (1H, d, J = 2.5 Hz), 3.72 (1H, dd, J = 10.7, 3.6 Hz), 3.44 (1H, dd, J = 10.7, 7.0 Hz), 0.95 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.94 (3H, d, J = 6.6 Hz), 0.93 (3H, s), 0.55 (6H, q, J = 7.9 Hz); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 69.25 (1), 66.84 (2), 53.01 (1), 41.91 (0), 40.20 (2), 37.49 (1), 34.58 (2), 26.73 (2), 22.81 (2), 17.67 (2), 16.58 (3), 13.88 (3), 6.93 (3), 4.91 (2); MS (EI) m/z 326 (7, M⁺), 311 (3, M⁺-CH₃), 297 (100, M⁺-Et), 283 (41), 265 (8), 225 (23), 193 (41), 177 (41), 135 (57), 103 (99); MS (ESI) m/z 327 (100, [M+H]⁺); masa exacta calculada para C₁₇H₃₃O₂Si [M-Et]⁺ 297,2250, encontrada 297,2244.

30

(8S,20R)-Des-A,B-8-[(trietilsilil)oxi]-20-[(p-toluenosulfonil)oxi]metil-pregnano (18)

Se transfirió una solución de cloruro de tosilo (0,38 g, 2 mmol) en piridina (3 mL) a través de una cánula a una solución de alcohol 17 (0,326 g, 1 mmol) en piridina (5 mL) a -20 °C. Se agitó la mezcla de reacción a -20 °C durante 1 hora y luego a +4°C durante la noche. Se diluyó con cloruro de metileno, se lavó con una solución acuosa saturada de CuSO₄ y secó (Na₂SO₄). Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice (5%, luego 10% y 20% de acetato de etilo/hexano) para producir el tosilato 18 (427 mg, rendimiento del 89%) como un aceite incoloro.

[α]_D +8.8 (c 1.0, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.34 (1H, d, J = 8.2 Hz), 4.11 (1H, dd, J = 9.3, 3.4 Hz), 4.00 (1H, d, J = 2.0 Hz), 3.77 (1H, dd, J = 9.3, 7.4 Hz), 2.45 (3H, s), 0.93 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.87 (3H, d, J = 6.7 Hz), 0.81 (3H, s), 0.53 (6H, q, J = 7.9 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 144.53 (0), 133.18 (0), 129.70 (1), 127.93 (1), 74.30 (2), 69.09 (1), 52.74 (1), 52.60 (1), 41.77 (0), 39.95 (2), 34.66 (1), 34.40 (2), 26.61 (2), 22.64 (2), 21.62 (3), 17.54 (2), 16.65 (3), 13.82 (3), 6.91 (3), 4.89 (2); MS (EI) m/z 480 (18, M⁺), 465 (2), 437 (14), 348 (2, M⁺ - Et₃SiOH), 309 (1, M⁺ - CH₃C₆H₄SO₃), 257 (91), 225 (23), 177 (100), 135 (19), 121 (24); MS (ESI) m/z 503 (7, [M+Na]⁺), 983 (4, [2M+Na]⁺), 1463 (10, [3M+Na]⁺); masa exacta calculada para C₂₆H₄₄O₄SSiNa [M+Na]⁺ 503,2627, encontrada 503,2639.

(8S,20S)-Des-A,B-8-[(trietilsilil)oxi]-20-(cianometil)-pregnano (19)

Se añadió cianuro de sodio (0,9 g, 18,4 mmol) a una solución de tosilato 18 (0,412 g, 0,858 mmol) en DMSO (5 mL). Se agitó la mezcla resultante a 90 °C durante 2 h, luego se enfrió, se diluyó con agua y extrajo con acetato de etilo. Se secaron las fases orgánicas combinadas (Na₂SO₄) y concentró. Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice (10% de acetato de etilo/hexano) para producir cianuro 19 (0,242 g, rendimiento del 85%) como un aceite incoloro.

[α]_D +17.3 (c 1.0, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4.04 (1H, d, J = 2.2 Hz), 2.44 (1H, dd, J = 16.7, 4.0 Hz), 2.38 (1H, dd, J = 16.7, 6.6 Hz), 1.06 (3H, d, J = 6.7 Hz), 0.94 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.91 (3H, s), 0.55 (6H, q, J = 7.9 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 118.90 (0), 69.07 (1), 54.96 (1), 52.74 (1), 41.91 (0), 40.23 (2), 34.29 (2), 31.79 (1), 27.01 (2), 24.00 (2), 22.68 (2), 19.58 (3), 17.53 (2), 13.81 (3), 6.90 (3), 4.88 (2); MS (EI) m/z 335 (3, M⁺), 320 (1, M⁺ - Me) 306 (76, M⁺ - Et), 292 (15), 271 (2), 225 (3), 202 (30), 161 (13), 103 (100), 75 (38); MS (ESI) m/z 336 (7, [M+H]⁺), 358 (4, [M+Na]⁺), 693 (100, [2M+Na]⁺), 1028 (40, [3M+Na]⁺); masa exacta calculada para C₁₈H₃₂NOSi [M+Et]⁺ 306,2253, encontrada 306,2253.

(8S,20R)-Des-A,B-8-[(trietilsilil)oxi]-20-(1'-metil-1'-ciano-etil)-pregnano (20)

Se añadió n-butil-litio (1,6 M en hexano, 2,4 mL, 3,8 mmol) a una solución de diisopropilamina (0,54 mL, 0,384 g, 3,8 mmol) en THF (2 mL) a 0°C. Se agitó la mezcla resultante a 0°C durante 30 min, luego se enfrió a -78 °C y se añadió una solución del compuesto 19 (0,326 g, 0,973 mmol) en THF (2 mL). Se agitó la mezcla a -78 °C durante 30 min y luego se añadió yodometano (1,2 mL, 2,73 g, 19,2 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a -78 °C 1 h y luego a temperatura ambiente durante 1 h. Se la detuvo con solución acuosa saturada de NH₄Cl y se extrajo con acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y concentró. Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice (5%, luego 10% de acetato de etilo/hexano) para producir el producto 20 (0,197 g, rendimiento del 56%).

[α]_D + 30.9 (c 1.0, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4.06 (1H, d, J = 2.2 Hz), 1.30 (3H, s), 1.26 (3H, s), 0.97 (3H, d, J = 7.1 Hz), 0.95 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.84 (3H, s), 0.55 (6H, q, J = 7.9 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 126.16 (0), 68.91 (1), 52.01 (1), 50.84 (1), 42.88 (0), 37.84 (1), 37.77 (2), 34.88 (2), 24.97 (3), 23.88 (3), 23.17 (2), 21.81 (2), 17.36 (2), 14.54 (3), 13.03 (3), 6.92 (3), 4.90 (2); MS (EI) m/z 363 (13, M⁺), 334 (72, M⁺-Et), 320 (12), 295 (4), 261 (4), 249 (15), 234 (29), 191 (100), 163 (72), 111 (81), 93 (28), 81 (39), 57 (49); MS (EI) m/z 363 (12, M⁺), 334 (71), 320 (12), 295 (4), 234 (28), 191 (100), 163 (71), 135 (42), 111 (80); MS (ESI) m/z 364 (11, [M+H]⁺), 749 (62, [2M+Na]⁺), 1113 (100, [3M+Na+H]²⁺); masa exacta calculada para C₂₂H₄₂ONSi [M+H]⁺ 364.3031, encontrada 364,3044.

(8S,20R)-Des-A,B-8-[(trietilsilil)oxi]-20-(1'-metil-1'-formyl-etil)-pregnano (21)

Se añadió hidruro de diisobutil aluminio (1,0 M en diclorometano, 3,1 mL, 3,1 mmol) a una solución del compuesto 20 (0,197 g, 0,543 mmol) en diclorometano (4 mL) a -10 °C. Se agitó la mezcla de reacción a -10 °C durante 1 hora, luego se la detuvo con una solución acuosa saturada de tartrato de sodio y potasio (5 mL). Se extrajo la fase acuosa con diclorometano. Se lavaron las capas orgánicas combinadas con salmuera y se secó (Na₂SO₄) y concentró. Se purificó el residuo sobre un cartucho Sep-Pak (5 g). Se lavó el cartucho con hexano/acetato de etilo (9:1) para producir el aldehído 21 como un aceite incoloro (0,15 g, rendimiento del 75%).

[α]_D +35.0 (c 1.0, CHCl₃). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 9.40 (1H, s), 4.04 (1H, d, J = 2.2 Hz), 0.95 (6H, s), 0.94 (9H, t, J = 7.8 Hz), 0.85 (3H, d, J = 7.00 Hz), 0.85 (3H, s), 0.55 (6H, q, J = 7.8 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 207.49 (1), 68.91 (1), 51.96 (1), 50.79 (1), 50.68 (0), 42.89 (0), 38.34 (2), 34.88 (2), 33.78 (1), 23.18 (2), 22.13 (2), 19.41 (3), 18.09 (3), 17.40 (2), 14.48 (3), 12.29 (3), 6.92 (3), 4.90 (2); MS (EI) m/z 366 (1, M+), 337 (31, M+-Et), 307 (37), 295 (12), 251 (13), 225 (30), 203 (22), 186 (9), 171 (14), 163 (74), 135 (43), 103 (100); MS (ESI) m/z 389 (29, [M+Na]⁺), 755 (73, [2M+Na]⁺), 1121 (15, [3M+Na]⁺); masa exacta (ESI) calculada para C₂₂H₄₂O₂SiNa [M+Na]⁺ 389,2847, encontrada 389,2838.

(8S,20R)-Des-A,B-8-[(trietilsilil)oxi]-20-(1'-dimetil-3'-etiloxycarbonil-2'-propenil)-pregnano (22)

5 Se añadió n-Butil-litio (1,6 M en hexano, 5,2 mL, 8,3 mmol) a una solución de diisopropilamina (1,2 mL, 0,840 g, 8,3 mmol) en THF seco (2 mL) a 0 °C. Después de 30 min se enfrió la mezcla a -10°C y se añadió trietilfosfonoacetato 8 (1,9 mL, 2,13 g, 9,5 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a -10°C durante 30 min y se añadió una solución del aldehído 21 (0,15 g, 0,41 mmol) en THF anhidro (5 mL + 3 mL) a través de una cánula. Se agitó la mezcla bajo atmósfera de argón a -10 °C durante 1 h, luego se calentó a +37 °C durante 3 h y después se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Se añadió diclorometano y se lavó la fase orgánica con agua, se secó (Na₂SO₄) y concentró. Se purificó el producto sobre un cartucho Sep-Pak (5 g). Se lavó el cartucho con hexano/acetato de etilo (2%, luego 3% y 5%) para producir el producto 22 (99 mg, rendimiento del 55%) como un aceite incoloro. [α]_D +18.1 (c 1.0, CHCl₃); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6.92 (1H, d, J = 15.9 Hz), 5.69 (1H, d, J = 15.9 Hz), 4.19 (2H, m), 4.03 (1H, d, J = 2.0 Hz), 1.29 (3H, t, J = 7.1 Hz), 0.98 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.94 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.81 (3H, d, J = 7.0 Hz), 0.80 (3H, s), 0.54 (6H, q, J = 7.9 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 167.19 (0), 159.65 (1), 117.69 (1), 69.04 (1), 60.07 (2), 52.08 (1), 50.18 (1), 42.83 (0), 41.16 (0), 38.53 (1), 38.19 (2), 35.00 (2), 24.64 (3), 23.30 (3), 22.14 (2), 17.49 (2), 14.50 (3), 14.29 (3), 13.02 (3), 6.94 (3), 4.93 (2); MS (EI) m/z 436 (0.3, M⁺), 407 (3, M⁺-Et), 334 (2), 286 (10), 257 (18), 229 (100), 206 (16), 191 (99), 163 (26), 142 (16); MS (ESI) m/z 459 (99, [M+Na]⁺), 896 (100, [2M+Na+H]²⁺), 1332 (47, [3M+Na+H]²⁺), masa exacta (ESI) calculada para C₂₆H₄₈O₃SiNa [M+Na]⁺ 459,3265, encontrada 459,3259.

(8S,20R)-Des-A,B-20-(1'-dimetil-3'-etiloxicarbonil-propyl)-pregnan-8-ol (23)

20 Se hidrogenó una solución del éster 22 (99 mg, 0,23 mmol) en metanol (5 mL) en presencia de 10% de paladio sobre carbón en polvo (10 mg) a temperatura ambiente durante 20 h. Se filtró la mezcla de reacción a través un cartucho de sílice Sep-Pak de Waters (2 g), que fue lavado adicionalmente con metanol. Después de la remoción del solvente, se obtuvo el éster 23 (50,4 mg, 68%) como un aceite incoloro. [α]_D +15.3 (c 1.0, CHCl₃). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4.12 (2H, q, J = 7.1 Hz), 4.09 (1H, s), 2.25 (3H, m), 1.26 (3H, t, J = 7.1 Hz), 0.85 (3H, s), 0.80 (3H, s), 0.79 (3H, d, J = 7.6 Hz), 0.78 (3H, s); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 174.60 (0), 69.07 (1), 60.21 (2), 51.69 (1), 49.40 (1), 42.60 (0), 37.93 (2), 37.07 (1), 36.04 (0), 34.57 (2), 33.92 (2), 29.54 (2), 24.82 (3), 24.56 (3), 22.90 (2), 22.26 (2), 17.26 (2), 14.49 (3), 14.20 (3), 12.62 (3); MS (EI) m/z 324 (3, M⁺), 278 (7), 261 (8), 224 (7), 210 (5), 181 (15), 163 (70), 143 (100), 129 (33), 111 (72), 97 (44), 69 (48); MS (ESI) m/z 342 (100, [M+NH₄]⁺), 671 (11, [2M+Na]⁺), masa exacta calculada para C₂₀H₃₇O₃ [M+H]⁺ 325,2738, encontrada 325,2727.

30 (8S,20R)-Des-A,B-22-dimetil-colestan-8,25-diol (24)

35 Se añadió bromuro de metilmagnesio (3,0 M solución en éter dietílico, 130 µL, 0,39 mmol) a una solución del éster 23 (50 mg, 0,154 mmol) en éter dietílico anhidro (3 mL) a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 2 h y luego a temperatura ambiente durante 18 h. Se la detuvo con una solución acuosa saturada de NH₄Cl, se extrajo con acetato de etilo, se secó (Na₂SO₄) y concentró. Se aplicó el residuo a un cartucho de sílice Sep-Pak de Waters (5 g). La elución con acetato de etilo/hexano (1:1) produjo el diol 24 (48 mg, 100%) como cristales incoloros. p.f. 122-124 °C (a partir de acetato de etilo/hexano); [α]_D +21.2 (c 0.988, CHCl₃). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 4.10 (1H, d, J = 1.8 Hz), 1.21 (6H, s), 0.85 (3H, s), 0.81 (3H, s), 0.78 (3H, d, J = 7.3 Hz), 0.76 (3H, s); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 71.15 (0), 69.13 (1), 51.71 (1), 49.44 (1), 42.62 (0), 38.06 (2), 37.73 (2), 36.96 (1), 35.90 (0), 34.17 (2), 33.92 (2), 29.24 (3), 29.15 (3), 25.38 (3), 24.81 (3), 22.94 (2), 22.36 (2), 17.27 (2), 14.50 (3), 12.62 (3); MS (EI) m/z 292 (5, M⁺-H₂O), 223 (3), 205 (9), 163 (43), 149 (9), 135 (21), 129 (41), 111 (100), 95 (25), 81 (20); MS (ESI) m/z 310 (84, [M]⁺), 328 (88, [M+NH₄]⁺), 643 (24, [2M+Na]⁺), masa exacta (ESI) calculada para NaC₂₀H₃₈O₂Na [M+Na]⁺ 333,2765, encontrada 333,2764.

45 (20R)-Des-A,B-22-dimetil-25-[(trietilsilil)oxi]-colestan-8-ona (25)

50 Se añadieron tamices moleculares A4 (100 mg) a una solución de óxido de 4-metilmorfolina (90 mg, 0,77 mmol) en diclorometano (400 µL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 min y se añadió perrutenato de tetrapropilamonio (9,7 mg, 27,6 µmol), seguido por una solución de diol 24 (29,4 mg, 0,095 mmol) en diclorometano (300 + 100 µL). Se agitó la suspensión resultante a temperatura ambiente durante 1 h. Se filtró la mezcla de reacción a través de un cartucho de sílice Sep-Pak de Waters (2 g) que fue lavado adicionalmente con acetato de etilo. Después de la remoción del solvente se obtuvo la cetona (29,5 mg) como un aceite incoloro.

55 Se añadió gota a gota trietilsilil trifluorometanosulfonato (30 µL, 35,1 mg, 0,133 mmol) a una solución de la cetona (29,2 mg, 0,095 mmol) y 2,6-lutidina (40 µL, 37 mg, 0,343 mmol) en diclorometano (1,6 mL) a -50 °C. Se agitó la mezcla de reacción a -40 °C durante 15 min, luego se diluyó con diclorometano y se lavó con agua. Se secó la capa orgánica (Na₂SO₄) y concentró. Se aplicó el residuo a un cartucho de sílice Sep-Pak de Waters (5 g). La elución con hexano/acetato de etilo (1%, luego 2%) produjo la cetona protegida 25 (34,4 mg, rendimiento del 86%). [α]_D -8.8 (c 1.0, CHCl₃). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2.44 (1H, dd, J = 11.5, 7.5 Hz), 1.20 (6H, s), 0.95 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.82 (3H, s), 0.79 (3H, d, J = 7.5 Hz), 0.78 (3H, s), 0.58 (3H, s), 0.57 (6H, q, J = 7.9 Hz); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 212.18 (0), 73.42 (0), 60.66 (1), 51.10 (0), 49.73 (1), 41.01 (2), 38.88 (2), 38.26 (1), 36.76 (2), 35.95 (0), 33.93 (2), 29.89 (3), 25.17 (3), 24.91 (3), 23.66 (2), 22.68 (2), 19.47 (2), 12.99 (3), 12.33 (3), 7.14 (3), 6.82 (2); MS (EI) m/z no M⁺, 407 (33), 393 (68), 364 (54), 323 (11), 293 (25), 253 (42), 173 (82), 163 (70), 111 (78), 107 (100); MS (ESI) m/z 423 (27, [M+H]⁺), 445 (47, [M+Na]⁺), 867 (26, [2M+Na]⁺), 1290 (8, [3M+Na+H]²⁺), masa exacta (ESI) calculada para C₂₆H₅₁O₂Si [M+H]⁺ 423,3653, encontrada 423,3649.

65 (20R)-2-Metilen-19-nor-22-dimetil-1α,25-dihidroxivitamina D₃ (27)

Se añadió fenil-litio (1,70 M en di-n-butil-éter, 105 μ L, 0,178 mmol) a una solución agitada del óxido de fosfina H (73,6 mg, 0,126 mmol) en THF anhidro (500 μ L) a -30 °C. Después de 30 min se enfrió la mezcla a -78 °C y se añadió una solución previamente enfriada (-78 °C) de la cetona 25 (35 mg, 82,9 μ mol) en THF anhidro (400 + 300 μ L). Se agitó la mezcla de reacción bajo una atmósfera de argón a -78 °C durante 4 horas y luego a +4 °C durante 19 h. Se añadió acetato de etilo y se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó (Na_2SO_4) y concentró. Se aplicó el residuo a un cartucho de sílice Sep-Pak de Waters (5 g). Se lavó el cartucho con hexano y acetato de etilo/hexano (1:99) para producir el producto crudo. Se purificó adicionalmente la vitamina mediante HPLC en fase directa [columna de sílice de 9,4 X 250 mm Zorbax, 4 mL/min, sistema solvente hexano/2-propanol (0,1%), $R_t = 3,2$ min] para producir el compuesto 26 puro protegido (51,09 mg, rendimiento del 78%).

UV (en hexano) $\lambda_{\text{máx}}$ 262.5, 252.5, 244.5 nm; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 6.22 (1H, d, J = 11.1 Hz, 6-H), 5.84 (1H, d, J = 11.1 Hz, 7-H), 4.97 (1H, s, =CH₂), 4.92 (1H, s, =CH₂), 4.42 (2H, m, 1 β -H y 3 α -H), 2.85 (1H, dd, J = 12.8, 3.6 Hz, 9 β -H), 2.52 (1H, dd, J = 13.2, 6.0 Hz, 10 α -H), 2.46 (1H, dd, J = 12.6, 4.3 Hz, 4 α -H), 2.34 (1H, dd, J = 13.2, 2.7 Hz, 10 β -H), 2.18 (1H, dd, J = 12.6, 8.4 Hz, 4 β -H), 1.96 (1H, m), 1.19 (6H, s, 26-H₃, 27-H₃), 0.95 (9H, t, J = 7.9 Hz), 0.897 (9H, s, t-BuSi), 0.866 (9H, s, t-BuSi), 0.80 y 0.77 (cada 3H, cada s, 28-H₃, 30-H₃), 0.79 (3H, d, J = 8.2 Hz, 21-H₃), 0.57 (6H, q, J = 7.9 Hz), 0.46 (3H, s, 18-H₃), 0.080 (3H, s, SiMe), 0.069 (3H, s, SiMe), 0.049 (3H, s, SiMe), 0.029 (3H, s, SiMe); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 152.98 (0, C-2), 141.35 (0, C-8), 132.64 (0, C-5), 122.44 (1, C-6), 115.77 (1, C-7), 106.24 (2, =CH₂), 73.51 (0, C-25), 72.50 y 71.64 (cada 1, C-1, C-3), 55.06 (1), 49.61 (1), 47.59 (2), 46.71 (0, C-13), 38.92 (2), 38.55 (2), 38.29 (2), 38.09 (1), 35.96 (0, C-22), 34.08 (2), 29.93 y 29.88 (cada 3, C-26, C-27), 28.93 (2), 25.84 (3), 25.77 (3), 25.25 (3), 25.02 (3), 23.05 (2), 22.68 (2), 22.63 (2), 18.26 (0), 18.17 (0), 12.81 (3), 12.44 (3), 7.16 (3), 6.84 (2), -4.86 (3), -4.91 (3), -5.08 (3); MS (ESI) m/z 809 (40, [M+Na]⁺), masa exacta (ESI) calculada para C₄₇H₉₀O₃Si₃Na [M+Na]⁺ 809,6091, encontrada 809,6101.

Se disolvió el compuesto 26 protegido (50,94 mg, 64,8 μ mol) en THF (5 mL) y acetonitrilo (3 mL). Se añadió una solución de HF acuoso al 48% en acetonitrilo (relación 1:9, 4 mL) a 0 °C y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió solución acuosa saturada de NaHCO_3 y se extrajo la mezcla de reacción con diclorometano. Se secaron las fases orgánicas combinadas (Na_2SO_4) y se concentraron a presión reducida. Se diluyó el residuo con 2 mL de hexano/acetato de etilo (7:3) y se lo aplicó a un cartucho de sílice Sep-Pak de Waters (5 g). Una elución con hexano/acetato de etilo (7:3, luego 1:1) produjo el producto 20 crudo. Se purificó adicionalmente la vitamina 20 por HPLC en fase directa [columna de sílice de 9,4 X 250 mm Zorbax, 4 mL/min, sistema solvente hexano/2-propanol (85:15), $R_t = 7,4$ min] y HPLC en fase inversa [columna RX-C18 de 9,4 X 250 mm Zorbax, 3 mL/min, sistema solvente metanol/agua (85:15), $R_t = 13,3$ min] para producir el compuesto 27 puro (22,71 mg, rendimiento del 79%).

p.f. 154 °C (a partir de 2-propanol/hexano); UV (en EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ 261.0, 252.0, 244.0 nm; RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6.35 (1H, d, J = 11.2 Hz, 6-H), 5.88 (1H, d, J = 11.2 Hz, 7-H), 5.11 (1H, s, =CH₂), 5.08 (1H, s, =CH₂), 4.48 (2H, m, 1 β -H y 3 α -H), 2.86 (1H, dd, J = 13.0, 4.7 Hz, 10 β -H), 2.84 (1H, m, 9 β -H), 2.56 (1H, dd, J = 13.3, 3.5 Hz, 4 α -H), 2.33 (1H, dd, J = 13.3, 6.0 Hz, 4 β -H), 2.28 (1H, dd, J = 13.0 Hz, 8.4 Hz, 10 α -H), 1.96 (2H, m), 1.88 (1H, m), 1.21 (6H, s, 26-H₃, 27-H₃), 0.83 y 0.78 (cada 3H, cada s, 28-H₃, 30-H₃), 0.79 (3H, d, J = 7.4 Hz, 21-H₃), 0.48 (3H, 18-H₃); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 151.98 (0, C-2), 143.27 (0, C-8), 130.51 (0, C-5), 124.09 (1, C-6), 115.02 (1, C-7), 107.66 (2, =CH₂), 71.74 y 70.51 (cada 1, C-1, C-3), 71.23 (0, C-25), 55.05 (1), 49.52 (1), 46.81 (0, C-13), 45.70 (2), 38.10 (2 3 2), 37.73 (1 y 2), 35.95 (0, C-22), 34.17 (2), 29.20 (3), 29.13 (3), 29.06 (2), 25.35 (3), 24.83 (3), 23.05 (2), 22.65 (2 3 2), 12.82 (3), 12.41 (3); MS (EI) m/z 444 (6, M⁺), 426 (3, M⁺ - H₂O), 393 (2), 341 (2), 313 (6), 269 (5), 251 (6), 199 (6), 191 (15), 161 (10), 145 (19), 111 (43), 107 (100), 89 (80), 79 (78), 75 (43); MS (ESI) m/z 467 (100, [M+Na]⁺), 911 (55, [2M+Na]⁺), 1355 (15, [3M+Na]⁺), masa exacta (ESI) calculada para C₂₉H₄₈O₃Na [M+Na]⁺ 467,3496, encontrada 467,3483.

Ejemplo 3: Actividad biológica

Enlazamiento del receptor de vitamina D

50 Material de prueba

Fuente de proteína

Se expresó el receptor de rata recombinante de longitud completa en células BL21(DE3) Codon Plus RIL de *E. coli* y se purificaron hasta homogeneidad usando dos sistemas de cromatografía en columna diferentes. El primer sistema era una resina de afinidad de níquel que utiliza la etiqueta de histidina en el terminal C en esta proteína. La proteína que se eluyó de esta resina se purificó adicionalmente usando cromatografía de intercambio iónico (flujo rápido en Sefarosa S). Las alícuotas de la proteína purificada se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y almacenaron a -80 °C hasta su uso. Para uso en ensayos de enlazamiento, se diluyó la proteína en TEDK₅₀ (Tris 50 mM, EDTA 1,5 mM, pH 7,4, DTT 5 mM, KCl 150 mM) con 0.1% de detergente Chaps. La concentración de proteína del receptor y del ligando se optimizó de tal manera que no más de 20% de ligando marcado en forma radioactiva se enlazara al receptor.

Fármacos del estudio

65 Se disolvieron los ligandos no marcados en etanol y se determinaron las concentraciones utilizando espectrofotometría UV (1,25(OH)₂D₃: coeficiente de extinción molar = 18.200 y $\lambda_{\text{máx}}$ = 265 nm; Análogos: coeficiente de extinción molar =

42.000 y $\lambda_{\text{máx}} = 252 \text{ nm}$). Se añadió ligando marcado en forma radioactiva (^3H -1,25(OH) $_2\text{D}_3$, ~159 Ci/mmol) en etanol a una concentración final de 1 nM.

5 Condiciones del ensayo

Se añadieron ligandos marcados en forma radioactiva y no marcados a 100 μL de la proteína diluida a una concentración final de etanol de $\leq 10\%$, se mezcló e incubó durante la noche sobre hielo para alcanzar el equilibrio de enlazamiento. Al siguiente día, se añadieron 100 μl de suspensión de hidroxilapatita (50%) a cada tubo y se mezcló a intervalos de 10 minutos durante 30 minutos. Se recolectó la hidroxilapatita por centrifugación y luego se lavó tres veces con regulador Tris-EDTA (Tris 50 mM, EDTA 1,5 mM, pH 7,4) que contenía 0,5% de Triton X-100. Después del lavado final, se transfirieron los sedimentos a viales de centelleo que contenían 4 mL de cóctel de centelleo Biosafe II, se mezcló y colocó en un contador de centelleo. Se determinó el enlazamiento total a partir de los tubos que contenían sólo ligando marcado en forma radioactiva.

15 Diferenciación de HL-60

Material de prueba

20 Fármacos del estudio

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

25 Las células

Se cultivaron células de leucemia promielocítica humana (HL60) en medio RPMI-1640 que contenía 10% de suero fetal bovino. Las células se incubaron a 37°C en presencia de 5% de CO $_2$.

30 Condiciones del ensayo

Se sembraron en placa células HL60 a razón de $1,2 \times 10^5$ células/mL. Diez y ocho horas después de la siembra en la placa, se trataron las células por duplicado con el fármaco. Cuatro días después, se recolectaron las células y se llevó a cabo un ensayo de reducción con nitroazul de tetrazolio (Collins y colaboradores, J. Exp. Med. (1979) 149: 969-974). Se determinó el porcentaje de células diferenciadas mediante el recuento de un total de 200 células y registrando el número que contenían depósitos intracelulares de formazán negro-azul. Se determinó la verificación de la diferenciación en células monocíticas mediante la medición de la actividad fagocítica (no se muestran los datos).

40 Ensayo de transcripción *in vitro*

Se midió la actividad de transcripción en células ROS 17/2.8 (hueso) que fueron establemente transfectadas con un promotor del gen de la 24-hidroxilasa (24O $_{\text{hase}}$) secuencia arriba de un gen reportero de luciferasa (Arbour y colaboradores, Analytical Biochem. (1998) 255(1): 148-154). A las células se les administró un intervalo de dosis. Diez y seis horas después de la dosificación se recolectaron las células y se midieron las actividades de luciferasa usando un luminómetro. RLU = unidades relativas de luciferasa.

Transporte de calcio en el intestino y movilización de calcio en los huesos

Se pusieron ratas macho destetadas Sprague-Dawley en una dieta Diet 11 (0,47% de Ca) + aceite AEK durante una semana seguido por una Diet 11 (0,02% de Ca) + aceite AEK durante 3 semanas. Se cambió luego la dieta de las ratas a una dieta que contenía 0,47% de Ca durante una semana seguido por dos semanas con una dieta que contenía 0,02% de Ca. La administración de la dosis comenzó durante la última semana con una dieta de 0,02% de calcio. Se administraron cuatro dosis intraperitoneales consecutivas separadas aproximadamente 24 horas. Veinticuatro horas después de la última dosis, se recolectó sangre del cuello cortado y se determinó la concentración de calcio en el suero como una medida de la movilización del calcio de los huesos. También se recogieron los primeros 10 cm del intestino para análisis del transporte de calcio en el intestino usando el método del saco intestinal volteado al revés.

Resultados de la actividad biológica

60 La (20S)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D $_3$ (MET-1) es aproximadamente igualmente efectiva que 1,25-(OH) $_2\text{D}_3$ en el enlazamiento con el receptor recombinante de la vitamina D como se muestra en la Fig. 1 (K_i de $4 \times 10^{-11} \text{ M}$ y $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ respectivamente). Sin embargo, MET-1 es 4 veces más potente que 1,25-(OH) $_2\text{D}_3$ en la inducción de la diferenciación de las células HL-60 en cultivo como se muestra en la Fig. 2 ($7 \times 10^{-10} \text{ M}$ y $3 \times 10^{-9} \text{ M}$ respectivamente). MET-1 es 10 veces más potente en la estimulación de la expresión del gen de la 24-O $_{\text{hase}}$ en células de hueso que 1,25-(OH) $_2\text{D}$ como se muestra en la Fig. 3 ($3 \times 10^{-11} \text{ M}$ y $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ respectivamente). Por el contrario, el análisis *in vivo* demostró que MET-1 es 20 veces menos activo que 1,25-(OH) $_2\text{D}_3$ en la movilización del

calcio de los huesos (Fig. 4), y notablemente menos activo que 1,25-(OH)₂D₃ en provocar el transporte de calcio en el intestino (Fig. 5).

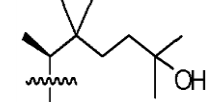
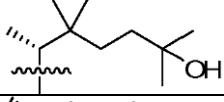

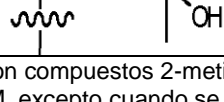
5 (20R)-2-metilen-19-nor-22-dimetil-1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (MET-2) es tan efectiva como 1,25-(OH)₂D₃ en el enlazamiento con el receptor recombinante de la vitamina D como se muestra en la Fig. 6 (ambas muestran una K_i de 5 X 10⁻¹¹ M). MET-2 es 3 veces más potente que 1,25-(OH)₂D₃ en la inducción de la diferenciación de las células HL-60 en cultivo como se muestra en la Fig. 7 (7 x 10⁻¹⁰ M y 3 x 10⁻⁹ M respectivamente). Sin embargo, MET-2 es aproximadamente 3 veces menos potente en la estimulación de la expresión del gen de 24-OHase en células de hueso que 1,25-(OH)₂D₃ como se muestra en la Fig. 8 (3 x 10⁻¹¹ M y 2 x 10⁻¹⁰ M respectivamente). El análisis *in vivo* demostró que MET-2 es 16 veces menos activa que 1,25-(OH)₂D₃ en la movilización del calcio de los huesos (Fig. 4), y notablemente menos activa que 1,25-(OH)₂D₃ en provocar el transporte del calcio en el intestino (Fig. 5).

15 Ejemplo comparativo: la Tabla 1 muestra datos biológicos para 2-metilen-19-nor-11 α ,25-dihidroxitamina D₃ y su isómero 20R en comparación con compuestos de la presente divulgación (MET-1 y MET-2). Los compuestos anteriores se diferencian de este último en que ellos tienen dos grupos metilo unidos a la posición del carbono 22 en vez de dos hidrógenos. Aunque el enlazamiento del receptor de la vitamina D y la diferenciación de HL-50 está generalmente en un orden de magnitud para cada compuesto, los presentes compuestos demuestran efectos sorprendentes e inesperados sobre la actividad calcémica. Mientras que los compuestos 2MD muestran una actividad de movilización neta del calcio de los huesos extremadamente potente en el intervalo de 4,5 mg/dL en el isómero 20R a 9,3 mg/dL en el isómero 20S, los presentes compuestos MET no muestran virtualmente actividad calcémica. Por otra parte, aunque los compuestos 2MD demuestran actividad calcémica intestinal menor que aquella del vehículo, los presentes compuestos muestran una relación significativa pero más pequeña del calcio seroso con respecto al calcio de la mucosa, es decir, 1,2 a 2,3 para MET-2 y MET-1, respectivamente.

25 Estas propiedades ilustran que ambos compuestos deben ser muy útiles en el tratamiento de enfermedades en donde un aumento en el calcio sérico no es deseable. Por lo tanto, estos compuestos deben encontrar utilidad en el tratamiento de hiperparatiroidismo secundario de pacientes que sufren de insuficiencia renal crónica debido a que es indeseable elevar el calcio sérico por encima de lo normal en estos pacientes por temor de la calcificación del corazón, la aorta y otros órganos vitales aunque suprime la proliferación y transcripción de la glándula paratiroidea del gen preparatiroide. Asimismo, estos compuestos deben ser útiles en el tratamiento de una neoplasia, tal como cánceres de mama, de próstata y colorrectal, o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple, lupus, artritis reumatoide, diabetes tipo 1, y enfermedad inflamatoria intestinal. También deben ser útiles en la prevención del rechazo de trasplantes.

35

Tabla 1

Ejemplo*	Donde	Cadena lateral	Enlazamiento competitivo de VDR (K_i , nM)	Diferenciación de HL-60 (EC_{50} , nM)	Transcripción de 24-OHase (EC_{50} , nM)	Movilización neta de Ca^{2+} en el hueso (mg/dL) ¹	Transporte neto de Ca^{2+} en el intestino (S/M) ²
MET-1	Presente		0,04	0,7	0,03	0,4	2,3
MET-2	Presente		0,05	1	0,6	0,2	1,2
2MD ³ (20R)	US 5.843.928		0,12	4,2	-	4,5 ⁴	-0,6 ⁴
2MD ³ (20S)	US 5.843.928		0,10	0,15	-	9,3 ⁴	-0,9 ⁴

* Todos los compuestos son compuestos 2-metilen-19-nor

¹ Con una dosis de 780 pM, excepto cuando se indique otra cosa

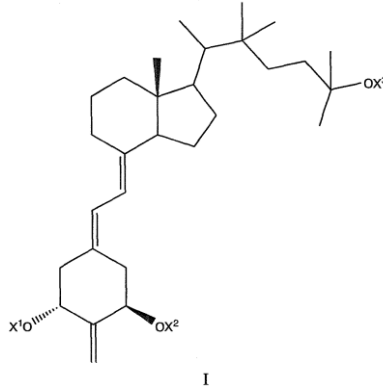
² S/M = Ca^{2+} seroso / Ca^{2+} en mucosa; con una dosis de 780 pM, excepto cuando se indique otra cosa

³ Datos de la US 5.843.928 y J. Med. Chem. 1998, 41, 4662

⁴ Con una dosis de 260 pM

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula I:



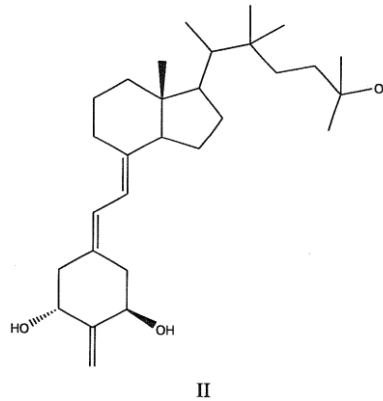
5

donde X^1 y X^2 se seleccionan independientemente de H y grupos protectores de hidroxilo, y X^3 es H.

2. El compuesto de la reivindicación 1, donde X^1 y X^2 son ambos grupos protectores de hidroxilo.

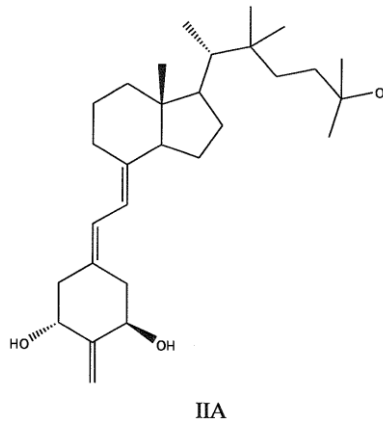
10

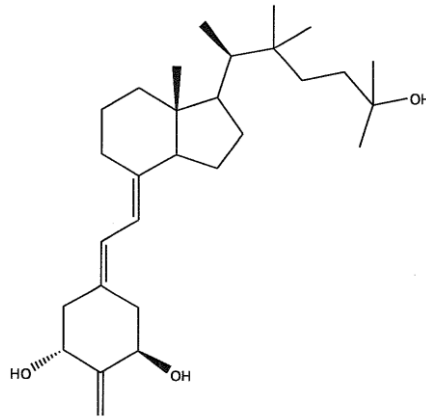
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde X^1 , X^2 y X^3 representan H y el compuesto tiene la fórmula II:



15

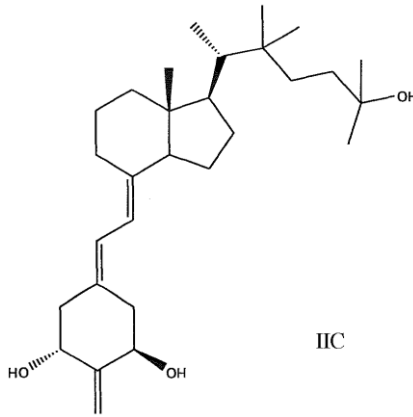
4. El compuesto de la reivindicación 3, que tiene la fórmula IIA o IIB:





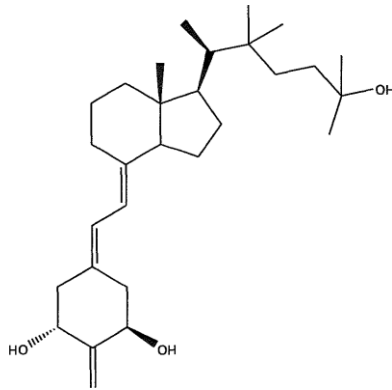
IIB

5. El compuesto de la reivindicación 3, que tiene la fórmula IIC o IID



IIC

5



IID

10

6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde la cantidad eficaz comprende de 0,01 µg a 1 mg del compuesto por gramo de la composición, generalmente de 0,1 µg a 500 µg del compuesto por gramo de la composición.

15

8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 para uso en el tratamiento de un sujeto que padece una condición biológica, en donde la condición biológica se selecciona de entre psoriasis; leucemia; cáncer de colon; cáncer de mama; cáncer de próstata; esclerosis múltiple; lupus; diabetes mellitus; reacción de injerto versus huésped; rechazo de trasplantes de órganos; una enfermedad inflamatoria seleccionada de artritis reumatoide, asma, o enfermedades inflamatorias del intestino; osteodistrofia renal; u osteoporosis.

20

9. El compuesto de la reivindicación 8, en donde la condición biológica es psoriasis.

10. El compuesto de la reivindicación 8, en donde la condición biológica se selecciona de leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama, o cáncer de próstata.
- 5 11. El compuesto de la reivindicación 8, en donde la condición biológica se selecciona de esclerosis múltiple, lupus, diabetes mellitus, reacción de injerto versus huésped, o rechazo de trasplantes de órganos.
12. El compuesto de la reivindicación 8, en donde la condición biológica se selecciona de artritis reumatoide, asma, o enfermedades inflamatorias del intestino seleccionadas de enfermedad celíaca, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.
- 10 13. El compuesto de la reivindicación 8, en donde el compuesto se administra por vía oral, parenteral, transdérmica o tópica al sujeto.
- 15 14. El compuesto de la reivindicación 8, en donde el compuesto se administra en una dosis de 0,01 µg por día a 1 mg por día.

FIG. 1

Enlazamiento competitivo de VDR

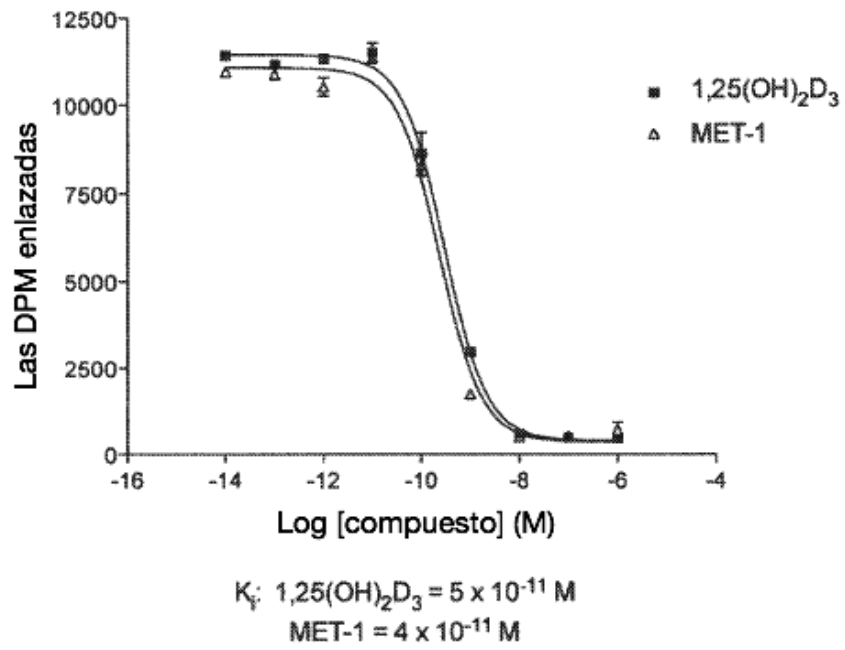
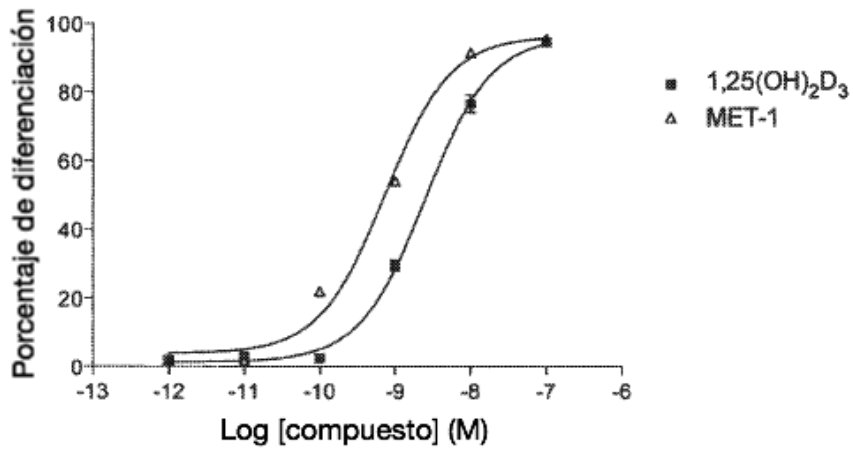


FIG. 2

Diferenciación de células HL-60



EC₅₀: 1,25(OH)₂D₃ = 3 × 10⁻⁹ M
 MET-1 = 7 × 10⁻¹⁰ M

FIG. 3

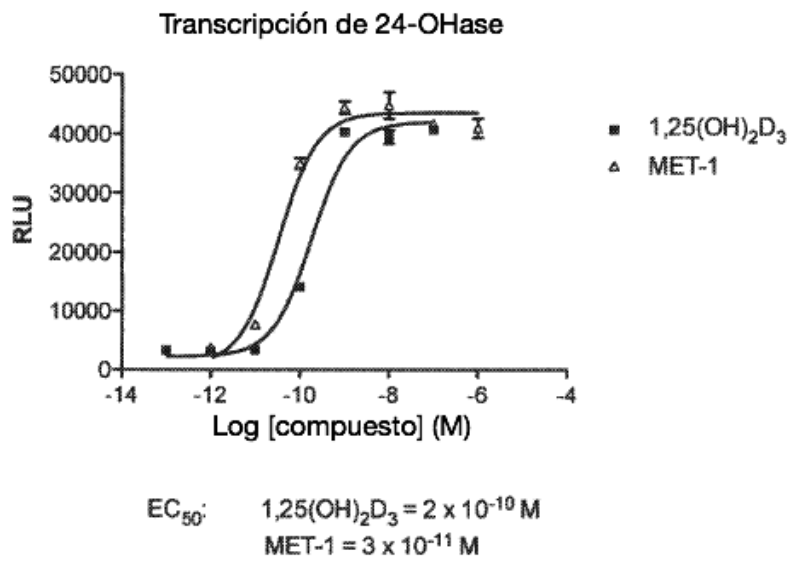


FIG. 4

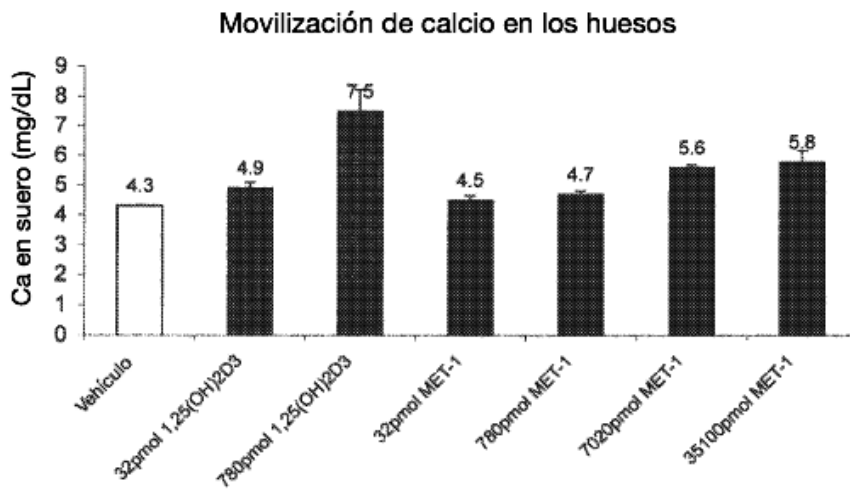


FIG. 5

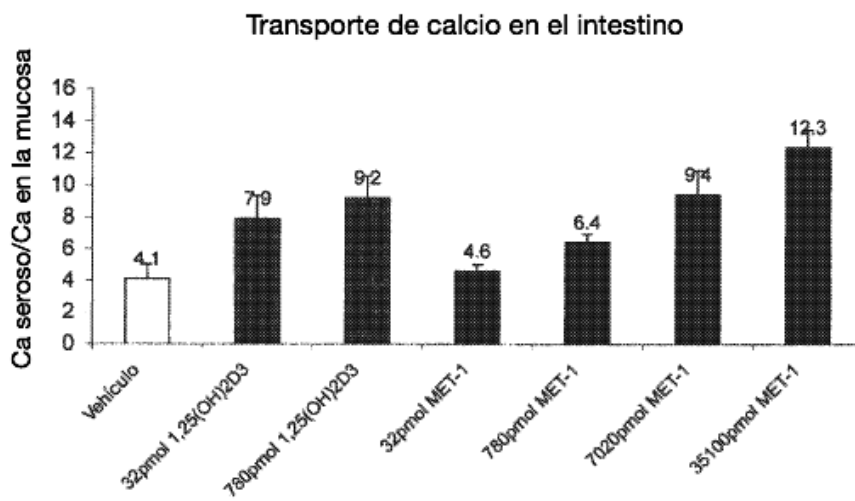
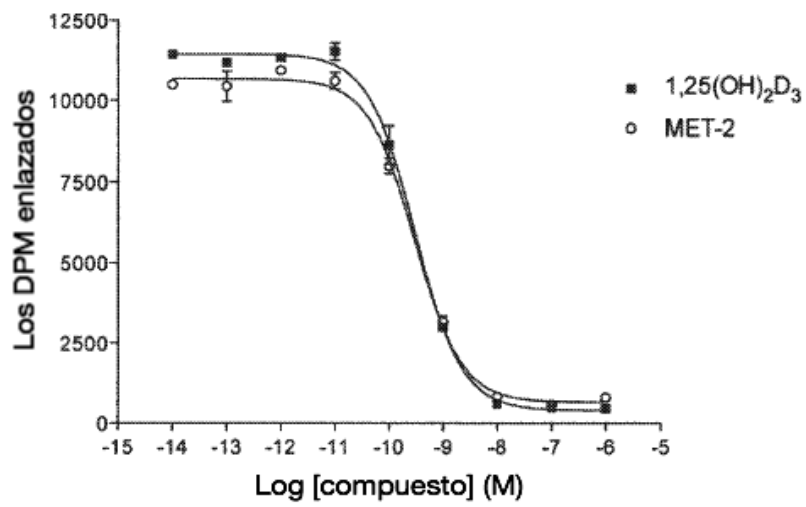


FIG. 6

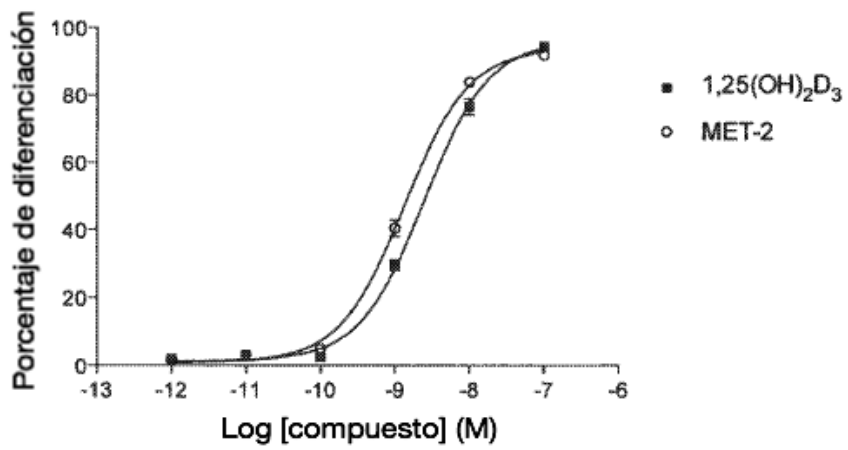
Enlazamiento competitivo de VDR



K_d: 1,25(OH)₂D₃ = 5 x 10⁻¹¹ M
 MET-2 = 5 x 10⁻¹¹ M

FIG. 7

Diferenciación de células HL-60



EC₅₀: 1,25(OH)₂D₃ = 3 × 10⁻⁹ M

MET-2 = 1 × 10⁻⁹ M

FIG. 8

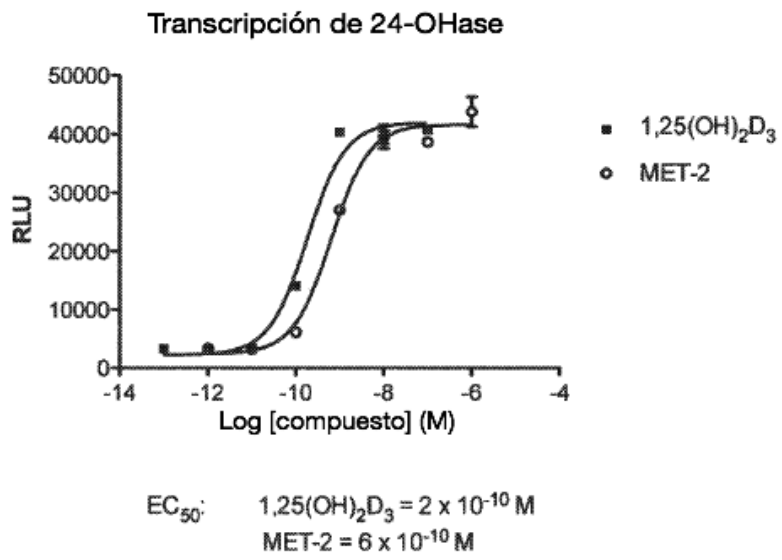


FIG. 9

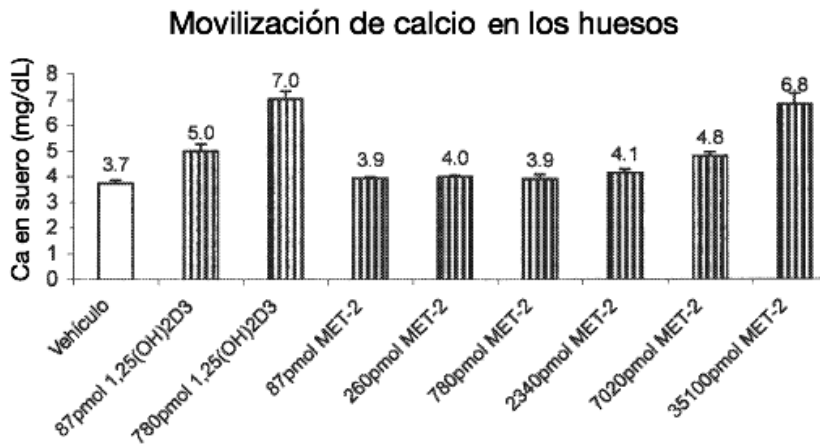


FIG. 10

