

(11) Número de Publicação: **PT 1494680 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 31/59** (2007.10) **A61K 31/593** (2007.10)  
**A61P 3/14** (2007.10) **A61P 3/02** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

---

(22) Data de pedido: **2003.03.12**

(30) Prioridade(s): **2002.03.25 US 105826**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.01.12**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.09.03**  
**206/2008**

(73) Titular(es):

**WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION**  
**614 WALNUT STREET MADISON, WI 53705 US**

(72) Inventor(es):

**HECTOR F. DELUCA** US  
**J. WESLEY PIKE** US  
**NIRUPAMA K. SHEVDE** US

(74) Mandatário:

**ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA**  
**R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA** PT

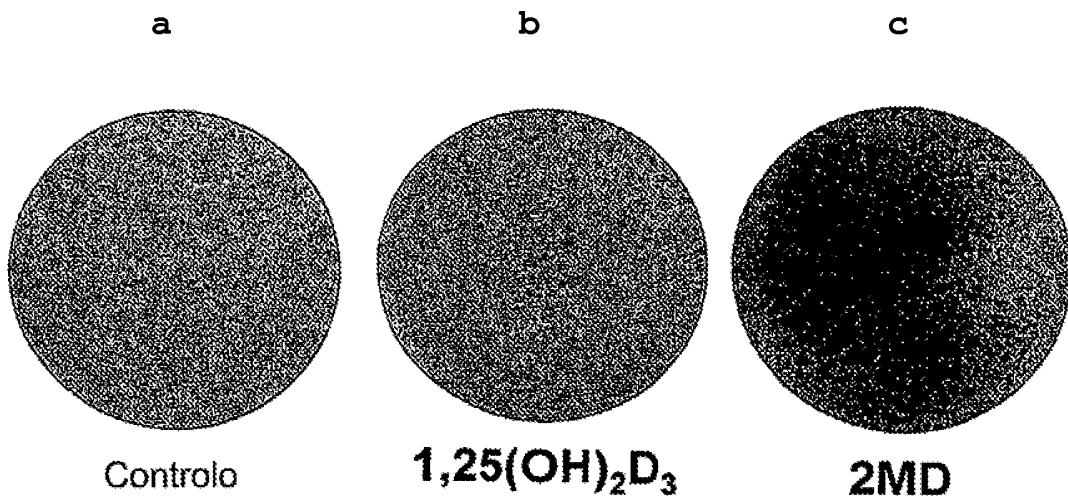
(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE ANÁLOGOS DA VITAMINA D, MODIFICADOS NO CARBONO 2, PARA INDUZIR A FORMAÇÃO DE NOVO OSSO**

(57) Resumo:

RESUMO

**"Utilização de análogos da vitamina D, modificados no carbono 2, para induzir a formação de novo osso"**

Verificou-se que os derivados modificados no carbono-2 da  $1\alpha$ ,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub> estimulam especificamente os osteoblastos para a formação de osso novo. A capacidade dos análogos da vitamina D modificada no carbono-2 para estimular a formação de osso novo sugere que estes compostos podem ser usados onde for requerida a síntese de osso novo. Assim, estes compostos podem ser usados, quer sistemicamente quer localmente, para estimular o crescimento de transplantes ósseos, para incrementar a velocidade de cura de fracturas e consequentemente reduzir o tempo necessário para a sua cura, para estimular o crescimento ósseo quando requerido em cirurgia de substituição e também para o crescimento do osso em implantes ou outros dispositivos necessários para manter o esqueleto ou os dentes nas posições devidas.



## DESCRIÇÃO

### **"Utilização de análogos da vitamina D, modificados no carbono 2, para induzir a formação de novo osso"**

#### Antecedentes do invento

O presente invento refere-se a compostos da vitamina D e, mais particularmente, a compostos da 19-norvitamina D substituída na posição do carbono 2 que são úteis para estimular o crescimento de osso novo.

A faculdade da vitamina D induzir a formação de osso normal foi reconhecida há mais de 75 anos. Assim, a vitamina D cura o raquitismo e a osteomalacia. No caso destas duas doenças, considera-se que os osteoblastos do osso são capazes de sintetizar a matriz orgânica do esqueleto mesmo na ausência de vitamina D mas que a vitamina D é necessária na matriz recentemente acamada. Nestas condições, acredita-se que a vitamina D geralmente cura o raquitismo e osteomalacia pelo aumento de cálcio e fósforo no plasma até aos níveis requeridos para prosseguir o processo de mineralização (DeLuca<sup>1</sup>, 1981). Assim, um trabalho anterior (Shipley, Kramer e Howland<sup>2,3</sup> 1925; 1926) sugere que o soro colhido de ratos normais pode curar lesões raquíticas em cultura, enquanto que o soro colhido de ratos raquíticos é incapaz de efectuar o mesmo processo de cura. Mais tarde descobriu-se que isto acontecia porque a vitamina D, em virtude da sua capacidade de elevar a absorção do cálcio e do fósforo no intestino delgado, é também capaz de elevar o cálcio e o fósforo do plasma até aos níveis de supersaturação requeridos para a mineralização do esqueleto. Além disso, foi previsto que a vitamina D também podia provocar a mobilização do cálcio dos ossos para elevar a concentração do cálcio no plasma (DeLuca<sup>1</sup>, 1981) ou estimular o rim para reabsorver o cálcio da urina formada (Yamamoto et al.<sup>4</sup>, 1984) elevando o cálcio do plasma e as substâncias fosforosas necessárias para o processo da mineralização. A prova final de que isto assim é foi estabelecida quando a infusão de cálcio e fósforo na corrente sanguínea de ratos deficientes em vitamina D conduziu à mineralização normal da matriz orgânica do osso e que a vitamina D contribuiu pouco mais do que nada (Underwood e DeLuca<sup>5</sup>, 1984).

No tempo intermédio entre o trabalho de Shipley, Kramer e Howland<sup>2,3</sup> (1925;1925) e o trabalho realizado por Underwood e DeLuca<sup>5</sup> (1984), foi obtida uma grande quantidade de informação relativa ao modo como a vitamina D realiza as suas funções. Presentemente é muito claro que a vitamina D deve primeiro ser 25-hidroxilada no fígado e subsequentemente 1 $\alpha$ -hidroxilada no rim, antes de poder actuar (DeLuca<sup>6</sup>, 1974). Estas duas reacções produzem a forma activa final da vitamina D, designadamente 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (DeLuca & Schnoes<sup>7</sup>, 1983). Este composto estimula então o intestino para absorver cálcio, o rim para reabsorver cálcio, o intestino para absorver fosfato e estimula os ossos para mobilizarem cálcio quando ordenado por altos níveis da hormona paratiróide. Destas acções resulta a subida dos níveis de cálcio e fósforo no plasma que leva à cura de lesões nos ossos, como o raquitismo e a osteomalacia, e evita os distúrbios neurológicos do tétano hipocalcémico.

Portanto, a 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> tem sido usada em várias doenças ósseas; entre elas está o tratamento da osteodistrofia renal, osteoporose, osteomalacia e vários tipos de raquitismo (Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, eds.<sup>8</sup>, 1997). Também foi usada para tratar a hipocalcemia de doentes com hipoparatiroidismo (Kooh et al.<sup>9</sup>, 1975). Para tratar o hiperparatiroidismo secundário da osteodistrofia renal é bem conhecido que esta hormona se une ao receptor da vitamina D (VDR) localizado nas glândulas paratiróide para suprimir tanto o crescimento como a proliferação das células paratiróides e a expressão do gene preproparatiróide (Demay et al.<sup>10</sup>, 1992; Darwish & DeLuca<sup>11</sup>, 1999). Contudo, o uso de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> para promover o crescimento do osso novo nunca foi previsto e, de facto, o tratamento da mulher post-menopausa com 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> irá diminuir a taxa de fractura mas não aumentará apreciavelmente a massa óssea (Aloia<sup>12</sup>, 1990; Tilyard et al.<sup>13</sup>, 1992). Portanto, não se conhece uma acção anabólica da 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> no osso e, de facto, o contrário era evidente.

A reposição óssea é um processo crítico normal que é homeostático por natureza e necessário para a renovação do osso defeituoso que ocorre como resultado do envelhecimento normal ou de trauma. Este processo é essencial para manter a

integridade do esqueleto adulto e é conduzido através da actividade de dois importantes tipos de células, os osteoblastos reabsorventes do osso e os osteoblastos formadores do osso. As hormonas esteróides como a vitamina D desempenham um importante papel modulador na regulação da produção e função dos osteoblastos.

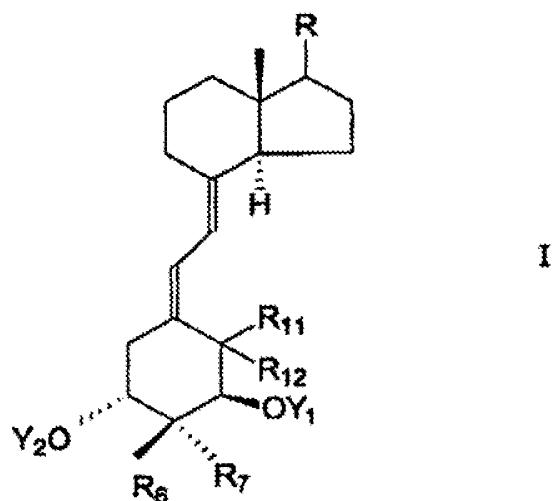
Correntemente, o tratamento das doenças de perda óssea utiliza substâncias anti-reabsorção. Os estrogénios, por exemplo, são usados para tratar a osteoporose post-menopausa devido à sua capacidade de bloquear a reabsorção óssea que resulta da falta de hormonas femininas. Os difosfatos que incluem Fosamax® actuam bloqueando a reabsorção do osso, motivando assim um aumento da massa óssea. No entanto é perfeitamente claro que os agentes anti-reabsorção não podem ser considerados para uso nas circunstâncias em que é requerido o desenvolvimento do osso novo.

Durante o curso de investigações de análogos da 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, foi descoberto que, modificando a hormona da vitamina D no carbono-2, poderiam surgir efeitos muito profundos na sua actividade biológica (Sicinski et al.<sup>14</sup>, 1998). Por exemplo, na U.S. Pat. Nº 4,666,634, os análogos 2-β-hidroxi e alcoxi (e.g., ED-71) da 1α,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> foram descritos e examinados como drogas potenciais para a osteoporose e como agentes anti-tumoriais. Ver também Okano et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 1444 (1989). Outros análogos 2-substituídos (com hidroxialquilo, e.g., ED-71, e grupos fluoroalquilo) anel-A da 1α,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> têm também sido preparados e testados (Miyamoto et al., Chem. Pharm. Bull. 41, 1111 (1993); Nishii et al., Osteoporosis Int. Suppl. 1, 190 (1993); Posner et al., J. Org. Chem. 59, 7855 (1994), e J. Org. Chem. 60, 4617 (1995)). Este facto foi especialmente evidente nos análogos 19-nor considerados compostos que aumentam a resistência óssea e aumentam a massa óssea em ratos ovariectomizados (ver DeLuca Patente U.S. No. 6306844) e é especialmente evidente para 2α-metil-19-nor-20S-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> e 2-metileno-19-nor-20S-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Não está clarificado em que medida estes compostos aumentam a massa óssea ou melhoram a resistência óssea. É, sem dúvida, possível que actuem como substâncias anti-reabsorção porque

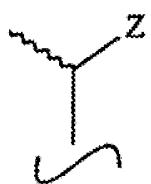
podem diminuir os níveis da hormona paratiróide por supressão das glândulas paratiróide que poderão, por sua vez, diminuir a absorção óssea. Outros análogos 2-substituídos da  $1\alpha,25$ -di-hidroxi-19-norvitamina D<sub>3</sub> também têm sido sintetizados, i.e., compostos substituídos na posição 2 com grupos hidroxi ou alcoxi (DeLuca et al., U.S. Pat. No. 5536713), que apresentam perfis de actividade interessante e selectiva. Além disso, os ensinamentos na literatura provam que os compostos de vitamina D não são necessários e não incrementam a síntese de osso novo.

#### Sumário do invento

Verificou-se que os compostos da vitamina D modificados no carbono-2 podem estimular acentuadamente a formação de osso novo quando adicionados a culturas primárias de osteoblastos e seus precursores. Esta actividade é selectiva porque a hormona nativa,  $1,25$ -(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, não produz este efeito. Estes resultados demonstram que este aspecto é uma propriedade única dos análogos modificados no carbono-2 da  $1,25$ -(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, e, mais especificamente, que estes compostos podem ser usados para estimular o crescimento de osso novo e para estimular o crescimento dos ossos mediado por osteoblastos. Daqui resulta que estes compostos podem ser usados para incrementar acentuadamente a velocidade de reparações do esqueleto como a reparação de fracturas, osseointegração de transplantes e solidificação de implantes, assim como a aceleração e melhoramento da qualidade dos ossos após procedimento cirúrgico de osteodistracção. Estes compostos também serão úteis no melhoramento dos resultados cirúrgicos que empregam uma variedade de dispositivos ortopédicos e implantes dentários. O presente invento está assim orientado para o uso de uma quantidade terapeuticamente efectiva de um composto de fórmula (I) na preparação de um medicamento para estimular, num mamífero, a osseointegração de um implante dentário, o crescimento do osso periodontal ou um melhoramento na qualidade do osso após procedimento cirúrgico de osteodistracção, estimulando o crescimento de osso novo no citado mamífero:

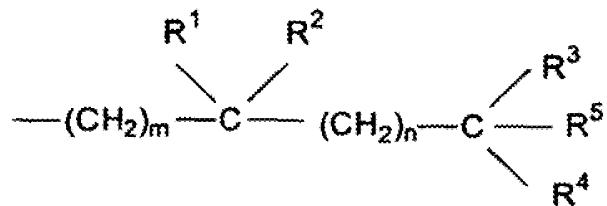


onde  $Y_1$  e  $Y_2$ , que podem ser iguais ou diferentes, são escolhidos, cada um, entre hidrogénio e um grupo hidroxi-protector, onde  $R_{11}$  e  $R_{12}$  são, cada um, hidrogénio ou, tomados em conjunto, são um grupo metíleno, onde  $R_6$  e  $R_7$ , que podem ser iguais ou diferentes, são escolhidos, cada um, entre hidrogénio, alquilo, hidroxialquilo, fluoroalquilo, hidroxi e alcoxi, com a condição de  $R_6$  e  $R_7$  não poderem ser ambos hidrogénio, ou  $R_6$  e  $R_7$  quando tomados em conjunto poderem representar o grupo  $-(CH_2)_x-$  onde  $X$  é um número inteiro de 2 a 5, ou  $R_6$  e  $R_7$  quando tomados em conjunto poderem representar o grupo  $=CR_8R_9$  onde  $R_8$  e  $R_9$ , que podem ser iguais ou diferentes, são escolhidos, cada um, entre hidrogénio, alquilo, hidroxialquilo, fluoroalquilo, hidroxi e alcoxi, ou quando tomados em conjunto  $R_8$  e  $R_9$  podem representar o grupo  $-(CH_2)_x-$  onde  $X$  é um número inteiro de 2 a 5 e onde o grupo  $R$  representa



onde o centro estereoquímico (correspondente a C-20 na numeração do esteróide) pode ter a configuração R ou S, (i.e., ou a configuração natural do carbono 20 ou a configuração 20-*epi*), e onde  $Z$  é escolhido entre  $Y$ ,  $-OY$ ,  $-CH_2OY$ ,  $-C\equiv CY$  e  $-CH=CHY$ , onde a dupla ligação pode ter a

geometria cis ou trans, e onde Y é escolhido entre hidrogénio, metilo, -COR<sup>5</sup> e um radical de estrutura

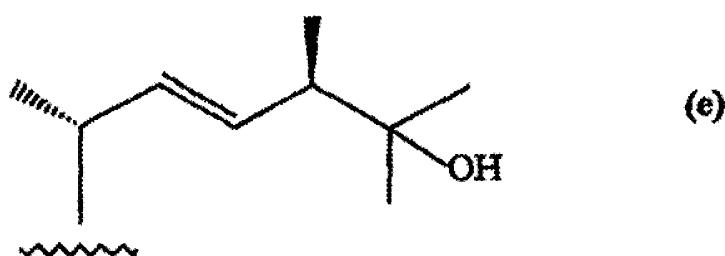
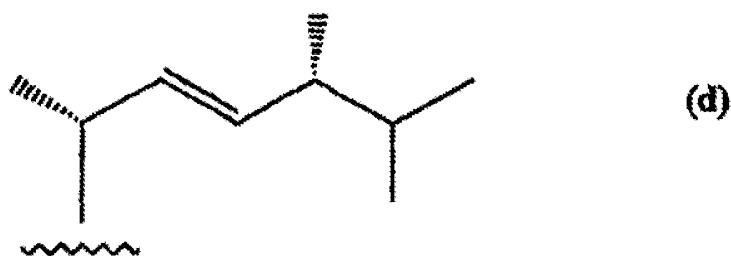
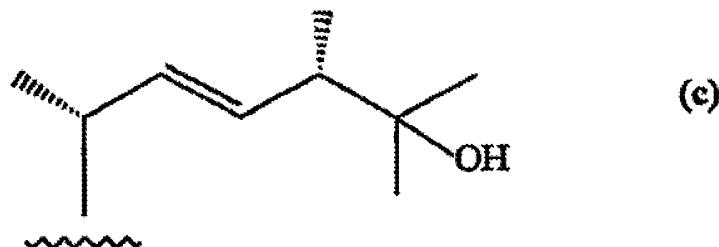
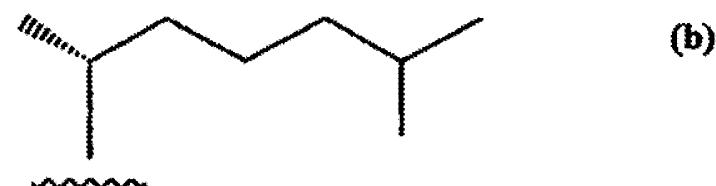
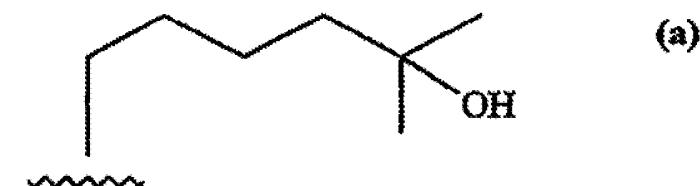


onde m e n, independentemente, representam números inteiros de 0 a 5, onde  $R^1$  é escolhido entre hidrogénio, deutério, hidroxi, hidroxi protegido, fluoro, trifluorometilo e C<sub>1-5</sub>-alquilo, que pode ser de cadeia linear ou ramificada e, opcionalmente, manter um substituinte hidroxi ou hidroxi-protegido, e, quando cada um de  $R^2$ ,  $R^3$ , e  $R^4$ , independentemente, é escolhido entre deutério, deuterio-alquilo, hidrogénio, fluoro, trifluorometilo e alquilo em C<sub>1-5</sub>, que pode ser de cadeia linear ou ramificada e, opcionalmente, manter um substituinte hidroxi ou hidroxi-protegido e onde  $R^1$  e  $R^2$ , tomados em conjunto, representam um grupo oxo, ou um grupo alquilideno, =CR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, ou o grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-, onde p é um número inteiro de 2 a 5, e onde  $R^3$  e  $R^4$ , tomados em conjunto, representam um grupo oxo, ou o grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-, onde q é um número inteiro de 2 a 5 e onde  $R^5$  representa hidrogénio, hidroxi, hidroxi protegido, ou alquilo em C<sub>1-5</sub> e onde qualquer dos grupos CH- nas posições 20, 22 ou 23 na cadeia lateral pode ser substituído por um átomo de azoto, ou onde qualquer dos grupos -CH(CH<sub>3</sub>)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>-, ou -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- nas posições 20, 22 e 23, respectivamente, podem ser substituídos por um átomo de oxigénio ou enxofre.

Além disso, o invento apresenta um composto de fórmula (I) como definido acima para usar na estimulação, num mamífero, da osseointegração de um implante dentário, crescimento do osso periodontal ou um melhoramento da qualidade do osso após procedimento cirúrgico de osteodistracção, estimulando o crescimento do novo osso no referido mamífero.

A linha ondulada para o substituinte metilo em C-20 indica que o carbono 20 pode ter configuração R ou S.

Exemplos importantes específicos de cadeias laterais com configuração natural 20R são as estruturas representadas pelas fórmulas (a), (b), (c), (d) e (e) abaixo, i.e., a cadeia lateral como ocorre em 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (a); vitamina D<sub>3</sub> (b); 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> (c); vitamina D<sub>2</sub> (d); e o epímero C-24 da 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> (e):



Os compostos preferidos são os análogos modificados no carbono-2 da 19-nor-1 $\alpha$ ,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, em particular 2-metileno-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> e 2 $\alpha$ -metil-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>. Também se pretendem formas de libertação lenta destes compostos, i.e. compostos que têm um grupo acilo nas posições 1, 3 e/ou 25, particularmente formas 25-acetato.

Os compostos acima apresentam um pretendido, e altamente vantajoso, modelo de actividade biológica. Estes compostos são caracterizados pela sua capacidade de estimular o crescimento de osso novo e podem assim ser usados para estimular o crescimento dos ossos mediado por osteoblastos. A sua acção na estimulação do crescimento de osso novo permite a administração *in vivo* destes compostos como agentes terapêuticos preferidos para a osseointegração de implantes dentários e estimular o crescimento do osso periodontal ou uma melhoria da qualidade do osso após procedimento cirúrgico de osteodistracção. O tratamento pode ser tópico, transdérmico, oral ou parentérico. Os compostos podem estar presentes na composição numa quantidade entre cerca de 0,01  $\mu$ g/g e cerca de 50  $\mu$ g/g da composição, e podem ser administrados em doses desde cerca de 0,01  $\mu$ g/dia até cerca de 50  $\mu$ g/dia.

#### Breve descrição dos desenhos

As figuras 1a, 1b e 1c são fotografias de culturas de osteoblastos após 14 dias de incubação apresentando o resultado em osteoblastos de controlo (Fig. 1a), e na concentração de 10<sup>-8</sup> molar de 1 $\alpha$ ,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (Fig. 1d), e uma concentração de 10<sup>-8</sup> molar de 2-metileno-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (Fig. 1c); e

As figuras 2a, 2b, 2c, 2d e 2e são fotografias de culturas de osteoblastos coradas pela técnica de Von Kossa apresentando um osso calcificado na forma de nódulos escuros como resultado do tratamento com controlo (Fig. 2a), uma concentração molar de 10<sup>-8</sup> de 1 $\alpha$ ,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (Fig. 2b), uma concentração molar de 10<sup>-10</sup> de 1 $\alpha$ ,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (Fig. 2c), uma concentração molar de 10<sup>-10</sup> de 2-metileno-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (Fig.

2d), e uma concentração molar de  $10^{-12}$  de 2-metileno-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (Fig. 2e).

#### Descrição detalhada do invento

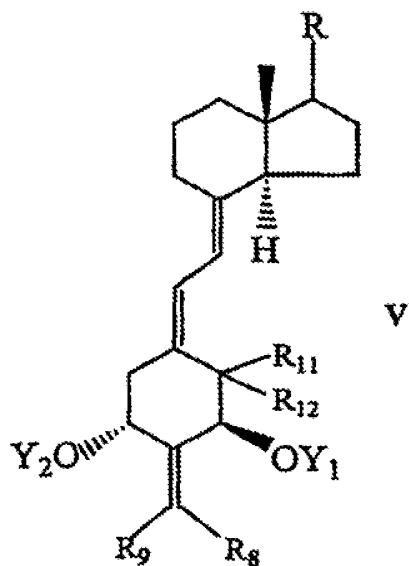
Conforme usado na descrição e nas reivindicações, os termos "grupo protector de hidroxi" significam qualquer grupo habitualmente usado para protecção temporária das funções hidroxi, como, por exemplo, grupos alcoxicarbonilo, acilo, alquilsililo ou alquilarilsililo (daqui em diante referidos simplesmente como grupos "sililo"), e grupos alcoxialquilo. Os grupos protectores alcoxicarbonilo são agrupamentos alquil-O-CO- como metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxicarbonilo, isopropoxicarbonilo, butoxicarbonilo, isobutoxicarbonilo, terc-butoxicarbonilo, benziloxicarbonilo ou aliloxicarbonilo. O termo "acilo" significa um grupo alcanoílo de 1 a 6 carbonos, em todas as suas formas isoméricas, ou um grupo carboxialcanoílo de 1 a 6 carbonos, como um grupo oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, ou um grupo acilo aromático como benzoílo, ou um grupo halo, nitro ou o grupo benzoílo alquil-substituído. A palavra "alquilo" conforme usada na descrição ou nas reivindicações, denota um radical alquilo de cadeia linear ou ramificada com 1 a 10 carbonos, em todas as suas formas isoméricas. Os grupos protectores alcoxialquilo são agrupamentos como metoximetilo, etoximetilo, metoxietoximetilo ou tetra-hidrofuranilo e tetra-hidropiranilo. Os grupos preferidos sililo-protectores são trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, dibutilmetilsililo, difenilmetilsililo, fenildimetilsililo, difenil-t-butilsililo e radicais análogos silil-alquilados. O termo "aril-" especifica um grupo fenil-, ou alquil-, nitro- ou fenil-halo-substituído e o termo "alcoxi" especifica um grupo -O-alquilo.

Um grupo "hidroxi-protégido" é um grupo hidroxi derivado ou protegido por qualquer um dos grupos acima habitualmente usados para a protecção temporária ou permanente das funções hidroxi, e.g., os grupos sililo, alcoxialquilo, acilo ou alcoxicarbonilo, como foi previamente definido. Os termos "hidroxialquilo", "deuteroalquilo" e "fluoroalquilo" referem-se a um radical alquilo substituído por um ou mais grupos hidroxi, deutério ou fluoro respectivamente.

Notar-se-á nesta descrição que o termo "24-homo" se refere à adição de um grupo metileno e o termo "24-di-homo" se refere à adição de dois grupos metileno na posição do carbono 24 na cadeia lateral. Analogamente, o termo "tri-homo" refere-se à adição de três grupos metileno. Também o termo "26,27-dimetil" se refere à adição de um grupo metilo nas posições do carbono 26 e 27 de maneira que, por exemplo, R<sup>3</sup> e R<sup>4</sup> sejam grupos etilo. Analogamente, o termo "26,27-dietil" refere-se à adição de um grupo etilo nas posições 26 e 27 de forma que R<sup>3</sup> e R<sup>4</sup> sejam grupos propilo. Quando R<sub>11</sub> e R<sub>12</sub> são ambos hidrogénio, os compostos são referidos aqui como compostos "19-nor".

#### Compostos 2-alquilideno

Estruturalmente, estes análogos 2-alquilideno são caracterizados pela fórmula V apresentada abaixo:



onde Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub>, que podem ser iguais ou diferentes, são escolhidos, cada um, entre o grupo constituído por hidrogénio e um grupo protector de hidroxi, R<sub>11</sub> e R<sub>12</sub> são ambos hidrogénio ou, tomados em conjunto, são um grupo metileno, R<sub>8</sub> e R<sub>9</sub>, que são iguais ou diferentes, são escolhidos, cada um, entre hidrogénio, alquilo, hidroxialquilo e fluoroalquilo ou, quando tomados em conjunto, representam um grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>- onde x é um número inteiro de 2 a 5, e onde o grupo R

representa qualquer das cadeias laterais normais conhecidas para os compostos do tipo da vitamina D como anteriormente aqui se descreveu.

Nas seguintes listas de compostos, o caso particular do substituinte alquilideno ligado na posição do carbono 2 deverá ser adicionado à nomenclatura. Por exemplo, se o grupo metileno for o substituinte do alquilideno, o termo "2-metileno" deverá preceder cada um dos compostos nomeados. Se um grupo etileno for o substituinte do alquilideno, o termo "2-etileno" deverá preceder cada um dos compostos nomeados, e por aí fora. Além disso, se o grupo metilo ligado na posição do carbono 20 estiver na sua configuração epi ou numa configuração não natural, o termo "20(S)" ou "20-epi" deverá ser incluído em cada um dos compostos nomeados seguintes. Igualmente, se a cadeia lateral contiver um átomo de oxigénio substituído em qualquer das posições 20, 22 ou 23, o termo "20-oxa", "22-oxa" ou "23-oxa", respectivamente, deverá ser adicionado ao composto nomeado. Os compostos nomeados podem também ser do tipo da vitamina D<sub>2</sub>, se tal for desejado.

São exemplos específicos e preferidos de compostos de 2-alquilideno de estrutura V, quando a cadeia lateral for insaturada e R<sub>11</sub> e R<sub>12</sub> forem ambos hidrogénio:

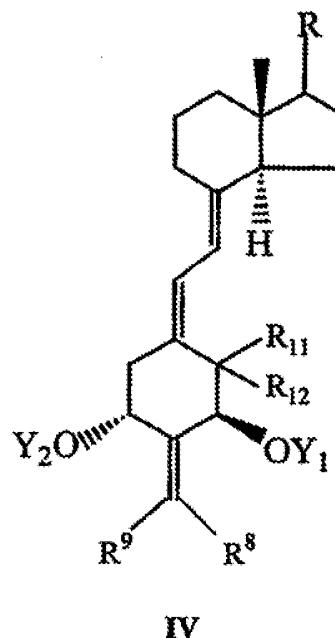
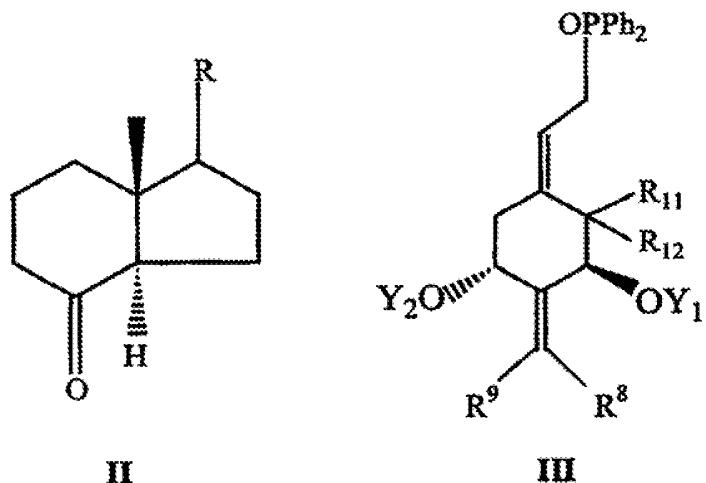
19-nor-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-24-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-24-di-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-24-tri-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dimetil-24-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dimetil-24-di-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dimetil-24-tri-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dietil-24-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dietil-24-di-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dietil-24-tri-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;

19-nor-26,27-dipropil-24-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidro-vitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dipropil-24-di-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidro-vitamina D<sub>3</sub>;  
e  
19-nor-26,27-dipropil-24-tri-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidro-vitamina D<sub>3</sub>.

São exemplos específicos e preferidos dos compostos de 2-alquilideno de estrutura V quando a cadeia lateral for saturada e R<sub>11</sub> e R<sub>12</sub> forem ambos hidrogénio:

19-nor-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-24-homo-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-24-di-homo-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-24-tri-homo-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dimetil-24-homo-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dimetil-24-di-homo-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dimetil-24-tri-homo-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dietil-24-homo-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dietil-24-di-homo-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dietil-24-tri-homo-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dipropil-24-homo-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dipropil-24-di-homo-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>;  
e  
19-nor-26,27-dipropil-24-tri-homo-1,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub>.

A preparação dos compostos 2-alquilideno-viamina D, particularmente a dos compostos 2-metileno-19-nor-vitamina D, com a estrutura básica V, pode ser realizada por um método geral comum, i.e., por condensação de uma cetona II bicíclica do tipo Windaus-Grundmann com o óxido III de fosfina alílica até aos correspondentes análogos IV da 2-alquilideno-vitamina D, seguida de desprotecção em C-1 e C-3 dos últimos compostos:



Nas estruturas II, III e IV, os grupos  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{12}$  e  $R$  representam os grupos acima definidos em relação à fórmula I;  $Y_1$  e  $Y_2$  são de preferência grupos protectores de hidroxi, entendendo-se que qualquer outra funcionalidade em  $R$  que possa ser sensível, ou que interfira com a reacção de condensação, esteja adequadamente protegida como é sabido na arte. O processo acima indicado representa uma aplicação do conceito de síntese convergente que tem sido eficazmente aplicada na preparação dos compostos da vitamina D [e.g. Lythgoe et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 590 (1978); Lythgoe, Chem. Soc. Rev. 9, 449 (1983); Toh et al., J. Org. Chem. 48, 1414 (1983); Baggolini et al., J. Org. Chem. 51,

3098 (1986); Sardina et al., J. Org. Chem. 51, 1264 (1986); J. Org. Chem. 51, 1269 (1986); DeLuca et al., Pat. U.S. nº 5086191; DeLuca et al., Pat. U.S. nº 5536,13; DeLuca et al., Pat. U.S. nº 5843928 e DeLuca et al., Pat. U.S. nº 5936133.

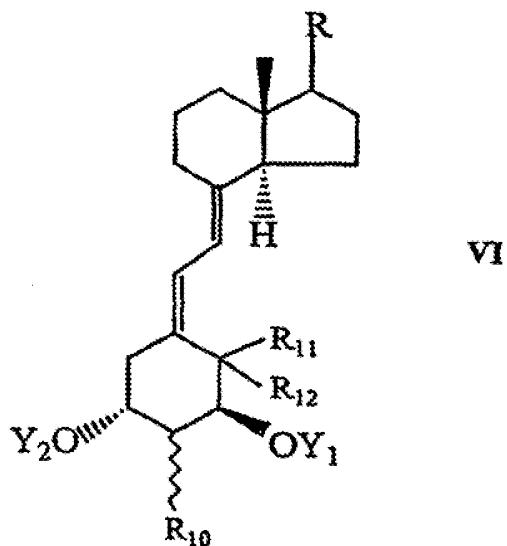
As hidrindanonas de estrutura geral II são já conhecidas ou podem ser preparadas por métodos já conhecidos.

Também a preparação dos óxidos de fosfina de estrutura geral III necessários foi desenvolvida a partir de um derivado de quinicato de metilo, facilmente obtido a partir do ácido (1R,3R,4S,5R)-(-)-quínico comercial como descrito por Perlman et al., Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991) e DeLuca et al., Pat. U.S. nº 5086191.

A epimerização C-20 pode obter-se pelo análogo acoplamento do óxido de fosfina III com uma cetona (20S) de Grundmann que, após hidrólise do grupo protector de hidroxi, dará o composto (20S)-2-alquilideno-vitamina D. Como se viu acima, outros análogos da 2-alquilideno-vitamina D podem ser sintetizados pelo método aqui descrito, especificamente por exemplo, pode ser obtida a 2-metileno-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> onde R<sub>11</sub> e R<sub>12</sub> seriam ambos hidrogénio.

#### Compostos 2-alquilo

Estruturalmente estes análogos 2-alquilo são caracterizados pela fórmula geral VI abaixo indicada:



onde  $Y_1$  e  $Y_2$ , que podem ser iguais ou diferentes, são escolhidos, cada um, entre hidrogénio e um grupo protector de hidroxi,  $R_{11}$  e  $R_{12}$  são ambos hidrogénio ou, tomados em conjunto, são um grupo metileno,  $R_{10}$  é escolhido entre alquilo, hidroxialquilo e fluoroalquilo, e onde o grupo R representa qualquer das cadeias laterais normais para os compostos do tipo da vitamina D, como anteriormente aqui se descreveu.

Na seguinte lista de compostos, o substituinte particular ligado à posição do carbono 2 deverá ser adicionado à nomenclatura. Por exemplo, se um grupo metilo é o substituinte alquilo, o termo "2-metil-" deverá preceder cada um dos compostos indicados. Se um grupo etilo for o substituinte alquilo, o termo "2-etil-" deverá preceder cada um dos compostos indicados, etc. Além disso, se o grupo metilo ligado à posição do carbono 20 tiver uma configuração epi ou uma configuração não natural, o termo "20(S)-epi-" deverá ser incluído em cada um dos compostos indicados seguintes. Também, se a cadeia lateral contiver um átomo de oxigénio substituído em qualquer das posições 20, 22 ou 23, o termo "20-oxa-", "22-oxa-" ou "23-oxa-", respectivamente, deverá ser adicionado ao composto indicado. Os compostos indicados podem também ser do tipo da vitamina D<sub>2</sub> se tal for desejado.

São exemplos específicos e preferidos de compostos 2-alquilo de estrutura VI quando a cadeia lateral é insaturada e  $R_{11}$  e  $R_{12}$  são ambos hidrogénio:

19-nor-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
 19-nor-24-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
 19-nor-24-di-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
 19-nor-24-tri-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
 19-nor-26,27-dimetil-24-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
 19-nor-26,27-dimetil-24-di-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
 19-nor-26,27-dimetil-24-tri-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
 19-nor-26,27-dietil-24-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;

19-nor-26,27-dietil-24-di-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dietil-24-tri-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dipropil-24-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dipropil-24-di-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;  
e  
19-nor-26,27-dipropil-24-tri-homo-1,25-di-hidroxi-22-desidrovitamina D<sub>3</sub>;

Em relação aos compostos insaturados acima referidos (ambos compostos 2-alquilideno e 2-alquilo, deverá notar-se que a dupla ligação localizada entre os átomos de carbono 22 e 23 da cadeia lateral poderá estar quer na configuração (E) quer na (Z). Assim, dependendo da configuração, o termo "22,23(E)" ou "22,23(Z)" deverá ser incluído em cada um dos compostos acima indicados. Também é costume designar a dupla ligação localizada entre os átomos de carbono 22 e 23 pela designação " $\Delta^{22}$ ". Assim, por exemplo, o segundo composto acima indicado pode também ser escrito como 19-nor-24-homo-22,23(E)- $\Delta^{22}$ -1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> onde a dupla ligação se encontra na configuração (E). Analogamente, se o grupo metilo ligado ao carbono 20 estiver na configuração não natural, este composto será escrito como 19-nor-20(S)-24-homo-22,23(E)- $\Delta^{22}$ -1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

São exemplos específicos e preferidos dos compostos 2-alquilo de estrutura VI quando a cadeia lateral é saturada e R<sub>11</sub> e R<sub>12</sub> são ambos hidrogénio:

19-nor-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-24-homo-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-24-di-homo-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-24-tri-homo-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dimetil-24-homo-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dimetil-24-di-homo-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dimetil-24-tri-homo-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dietil-24-homo-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dietil-24-di-homo-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dietil-24-tri-homo-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;

19-nor-26,27-dipropil-24-homo-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dipropil-24-di-homo-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;  
19-nor-26,27-dipropil-24-tri-homo-1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>;

A preparação de compostos de 2-alquil-vitamina D, em particular os compostos 2 $\alpha$ -metil-vitamina D, com a estrutura básica VI pode ser realizada por um método geral comum, i.e., a condensação de uma cetona bicíclica II do tipo Windaus-Grundmann com o óxido alílico de fosfina III para dar o correspondente análogo da 2-alquiliden-vitamina D IV seguida de uma redução selectiva do grupo exometileno em C-2 nos últimos compostos, obtendo-se os compostos 2-alquilo.

O processo (acima indicado) representa uma aplicação do conceito de síntese convergente que tem sido aplicada eficientemente na preparação de compostos da vitamina D. Além das referências anteriormente aqui citadas, vejam-se também DeLuca et al., Pat. U.S. nº 5945410; DeLuca et al., Pat. U.S. nº 6127559; e DeLuca et al., Pat. U.S. nº 6277837.

O passo final do processo é a hidrogenação catalítica homogénea selectiva da unidade exometileno no carbono 2 na vitamina IV, eficientemente realizada na presença de cloreto de tris(trifenilfosfina)ródio(1) [catalisador de Wilkinson, (Ph<sub>3</sub>P)<sub>3</sub>RhCl]. Estas condições de redução reduzem apenas a unidade C(2)-metileno não afectando a parte C(5)-C(8)-butadieno não afectada. O material isolado é uma mistura epimérica (ca. 1:1) de 2-alquil-19-nor-vitaminas que diferem na configuração em C-2. A mistura pode ser usada sem separação ou, se tal for desejado, podem separar-se os isómeros 2 $\alpha$ - e 2 $\beta$ - por um sistema eficiente de HPLC.

A epimerização C-20 pode ser realizada pelo acoplamento análogo do óxido de fosfina III com uma cetona (20S) de Grundmann que, após hidrólise dos grupos protectores de hidroxi, dará um composto (20S)-2-alquil-vitamina.

Como acima se fez notar, podem sintetizar-se outros análogos de 2-alquil-vitamina D pelo método aqui descrito, especificamente por exemplo, a 2 $\alpha$ -metil-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25-di-hidroxivitamina D<sub>3</sub> onde R<sub>11</sub> e R<sub>12</sub> seriam ambos hidrogénio.

São também já conhecidos vários análogos oxa- da vitamina D<sub>3</sub> e a sua síntese. Por exemplo os 20-oxa- análogos estão descritos em N. Kubodera et al., Chem. Pharm. Bull., 34, 2286 (1986) e em Abe et al., FEBS Lett. 222, 53, 1987. Vários 22-oxa- análogos estão descritos em E. Murayama et al., Chem. Pharm. Bull., 34, 4410 (1986), Abe et al. FEBS Lett. 226, 58 (1987), PCT International Application nº WO 90/09991 e European Patent Application, número da publicação 184 112 e está descrito um 23-oxa- análogo no pedido de patente europeia, publicação nº 78704, bem como em Pat. U.S. 4772433.

#### Compostos 2-substituídos de libertação lenta

Podem também ser aqui usados os compostos de vitamina D modificados que apresentem uma actividade biológica *in vivo* de tipo desejável e altamente vantajosa, nomeadamente os de fixação mais gradual e de actividade mais prolongada.

Estruturalmente a característica principal dos compostos de vitamina D modificados com os desejáveis atributos biológicos é que são derivados dos análogos de vitamina D 2-substituídos nos quais um grupo hidrolisável está ligado ao grupo hidroxi no carbono 25 e, opcionalmente, ligado a qualquer outro grupo hidroxi presente na molécula. Dependendo de vários factores estruturais (e.g. o tipo, tamanho, complexidade estrutural) do grupo ligado, estes derivados hidrolisam até ao análogo activo de vitamina D 2-substituída, a diferentes velocidades *in vivo*, obtendo-se assim a "libertação lenta" do composto de vitamina D biologicamente activo no corpo.

Os perfis da actividade de "libertação lenta" *in vivo* destes compostos podem evidentemente ser ainda mais modulados pelo uso de misturas dos derivados ou pelo uso de misturas que consistem em um ou mais derivados da vitamina D juntamente com compostos não derivados da vitamina D.

É importante frisar que a característica estrutural crítica dos derivados da vitamina D acima identificados é a presença de um grupo hidrolisável ligado ao grupo hidroxi no carbono 25 da molécula. A presença de um grupo hidrolisável

naquela posição confere ao resultante derivado o desejável perfil de actividade biológica de "libertação lenta". Outras funções hidroxi que ocorrem na molécula (e.g. funções hidroxi nos carbonos 1 ou 3) podem estar presentes como grupos hidroxi livres ou um ou mais deles podem tornar-se derivados com um grupo hidrolisável.

O "grupo hidrolisável" presente nos derivados acima mencionados é, de preferência, um grupo acilo, i.e. um grupo do tipo  $Q^1CO-$ , onde  $Q^1$  representa hidrogénio ou um radical de hidrocarboneto de 1 a 18 carbonos que podem ter cadeia linear, cíclica, ramificada, saturada ou insaturada. Assim, por exemplo, o radical de hidrocarboneto pode ser um grupo alquilo de cadeia linear ou ramificada, ou grupo alcenilo de cadeia linear ou ramificada com uma ou mais duplas ligações, ou pode ser um grupo cicloalquilo ou cicloalcenilo, opcionalmente substituídos, ou um grupo aromático, como um fenilo, benzilo ou naftilo, substituídos ou não substituídos. Os grupos acilo especialmente preferidos são os grupos alcanoílo ou alcenoílo, dos quais são alguns exemplos normais formilo, acetilo, propanoílo, hexanoílo, isobutirilo, 2-butenoílo, palmitoílo ou oleoílo. Um outro tipo adequado de grupo hidrolisável é o grupo hidrocarbilocarbonilo, i.e. um grupo do tipo  $Q^2-O-CO-$ , onde  $Q^2$  é um radical  $C_1$  a  $C_{18}$  de hidrocarboneto como foi acima definido. São exemplos destes radicais de hidrocarbonetos o metilo, etilo, propilo, e radicais superiores de alquilo e alcenilo de cadeia linear ou ramificada bem como radicais de hidrocarbonetos aromáticos como o fenilo ou o benzoílo.

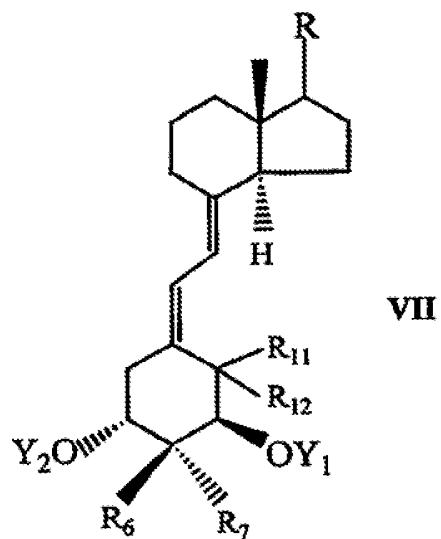
Estes compostos de vitamina D modificados são hidrolisáveis *in vivo* dando o análogo activo ao longo de um período de tempo após administração e, por consequência, regulam a disponibilidade *in vivo* do análogo activo, modulando também o seu perfil de actividade *in vivo*. Os termos "perfil de actividade" referem-se à resposta biológica, ao longo do tempo, dos compostos da vitamina D. Os compostos individuais modificados, ou as misturas destes compostos, podem ser administrados de modo a afinar o decurso de tempo de resposta desejado.

Os termos aqui usados "composto de vitamina D modificado" abrangem qualquer composto de vitamina D onde uma

ou mais funções hidroxi presentes nesse composto estejam modificadas pela derivação com um grupo hidrolisável. Um "grupo hidrolisável" é um grupo que modifica o hidroxi que pode ser hidrolisado *in vivo*, de modo a regenerar as funções hidroxi livres.

No contexto desta descrição, os termos grupo hidrolisável de preferência inclui grupos acilo e hidrocarbilocarbonílico, i.e. grupos do tipo  $Q^1CO-$  e  $Q^2-O-CO-$ , respectivamente onde  $Q^1$  e  $Q^2$  têm os significados anteriores.

Estruturalmente, os compostos de vitamina D modificados abrangidos podem ser representados pela fórmula VII abaixo indicada:



onde  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{12}$ ,  $R_6$  e  $R_7$  são como anteriormente aqui definidos em relação à fórmula I com exceção de  $R^5$  na cadeia lateral ser  $-OY_3$  e  $Y_3$  ser um grupo acilo ou um grupo hidrocarbilocarbonílico, como anteriormente aqui se definiu.

Alguns exemplos específicos destes compostos de vitamina D modificados incluem derivados 2-substituídos como:

2-metileno-19-nor-1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ -D $_3$ -1,3,25-triacetato, onde  $Y_1=Y_2=Y_3$  e é  $CH_3CO$ ; e  $R_6$  e  $R_7$  tomados em conjunto são  $=CH_2$ ; e  $R_{11}$  e  $R_{12}$  são ambos hidrogénio;

2-metileno-19-nor-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>-1,3,25-tri-hexanoato, onde Y<sub>1</sub>=Y<sub>2</sub>=Y<sub>3</sub> e é CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO; e R<sub>6</sub> e R<sub>7</sub>, tomados em conjunto, são =CH<sub>2</sub>; e R<sub>11</sub> e R<sub>12</sub> são ambos hidrogénio;

2-metileno-19-nor-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>-1,3,25-trinonanoato, onde Y<sub>1</sub>=Y<sub>2</sub>=Y<sub>3</sub> e é CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CO; e R<sub>6</sub> e R<sub>7</sub>, tomados em conjunto, são =CH<sub>2</sub>; e R<sub>11</sub> e R<sub>12</sub> são ambos hidrogénio;

2-metileno-19-nor-1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>-25-acetato onde Y<sub>1</sub>=Y<sub>2</sub> e é H, e Y<sub>3</sub> é CH<sub>3</sub>CO, e R<sub>6</sub> e R<sub>7</sub>, tomados em conjunto, são =CH<sub>2</sub>, e R<sub>11</sub> e R<sub>12</sub> são ambos hidrogénio.

Estes compostos podem ser preparados por métodos já conhecidos. Veja-se por exemplo WO 97/11053 publicada em 27 de Março de 1999.

Para fins de tratamento, os compostos aqui definidos pelas fórmulas podem ser formulados para aplicações farmacêuticas como soluções em solventes inócuos, ou como emulsões, suspensões ou dispersões em solventes ou veículos adequados, ou como comprimidos, pastilhas ou cápsulas, juntamente com veículos sólidos, de acordo com os métodos convencionais conhecidos na arte. Qualquer destas formulações pode também conter outros excipientes não tóxicos e farmaceuticamente aceitáveis como sejam os estabilizadores, anti-oxidantes, ligantes, corantes ou agentes emulsionantes ou modificadores do paladar. As formulações podem ser administradas oralmente, sistemicamente ou localmente. Se localmente, o composto pode ser administrado sob forma estabilizada, como é bem sabido na arte, ou por mini-bomba de Alzet.

Os compostos podem ser administrados por via oral, tópica, parentérica ou transdérmica. Os compostos são vantajosamente administrados por injecção ou por infusão intravenosa ou por soluções estéreis adequadas, ou sob a forma de doses líquidas ou sólidas por via do canal alimentar, ou sob a forma de cremes, ungamentos, pensos ou veículos semelhantes adequados para aplicações transdérmicas. São apropriadas para fins de tratamento doses desde 0,01 µg até 50 µg dos compostos, por dia, sendo estas doses ajustadas de acordo com a doença a ser tratada, a sua gravidade e a

resposta do paciente, como é bem sabido na arte. Como estes compostos aqui definidos apresentam especificidade de acção, cada um pode ser adequadamente administrado sozinho ou juntamente com doses reguladas de um outro composto activo da vitamina D, e.g.  $1\alpha$ -hidroxi-vitamina D<sub>2</sub> ou D<sub>3</sub> ou  $1\alpha,25$ -di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>, em situações onde os diferentes graus de mobilização de osso e o estímulo do transporte de cálcio possam ser vantajosos.

Os compostos podem ser formulados como cremes, loções, unguedtos, pensos tópicos, comprimidos, cápsulas ou pastilhas ou sob forma líquida como soluções, emulsões, dispersões ou suspensões num solvente ou óleo farmaceuticamente inócuo e aceitável, e estas preparações podem conter também outros componentes farmaceuticamente inócuos ou benéficos, como os estabilizadores, anti-oxidantes, emulsionantes, corantes, ligantes ou agentes modificadores do paladar.

Os compostos são vantajosamente administrados em quantidades suficientes para se obter o desejado efeito terapêutico para um estado específico e via de administração, i.e. "uma quantidade terapeuticamente efectiva". As dosagens acima descritas são adequadas, entendendo-se que as quantidades administradas devem ser ajustadas de acordo com a gravidade da doença, e o estado e resposta do paciente, como é bem sabido na arte.

As formulações compreendem um ingrediente activo associado com um veículo farmaceuticamente aceitável e, opcionalmente, outros ingredientes terapêuticos. O veículo deve ser "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes das formulações e de não prejudicar o seu recipiente.

As formulações adequadas para administração oral podem estar sob a forma de unidades discretas como cápsulas, saquetas, pastilhas ou losangos, contendo, cada uma, uma quantidade predeterminada do ingrediente activo; sob a forma de pó ou grânulos; sob a forma de solução ou suspensão num líquido aquoso ou num líquido não aquoso; ou sob a forma de emulsão óleo-em-água ou emulsão água-em-óleo.

As formulações para administração rectal podem estar sob a forma de supositório incorporando o ingrediente activo e um veículo como a manteiga de cacau, ou sob a forma de um enema.

As formulações adequadas para administração parentérica compreendem, convenientemente, uma preparação estéril, oleosa ou aquosa, do ingrediente activo que de preferência seja isotónico com o sangue do seu recipiente.

As formulações adequadas para administração tópica incluem preparações líquidas ou semi-líquida como os linimentos, loções, aplicadores, emulsões óleo-em-água ou emulsões água-em-óleo como cremes, unguedtos ou pastas; ou soluções ou suspensões como gotas; ou como aspersões.

Para o tratamento da asma pode ser usada a inalação de pós, formulações com propulsores ou de aspersão, dispensadas por um aspersor, nebulizador ou atomizador. As formulações quando assim dispensadas de preferência têm um tamanho de partícula de 10 a 100  $\mu$ .

As formulações podem ser convenientemente apresentadas sob a forma de unidade de dosagem e podem ser preparadas por qualquer dos métodos já bem conhecidos na arte de farmácia. Os termos "unidade de dosagem" significam uma dose unitária, i.e., simples que é capaz de ser administrada a um paciente como uma unidade de dosagem, física e quimicamente estável, compreendendo quer o ingrediente activo como tal quer uma mistura dele com diluentes ou veículos farmacêuticos, sólidos ou líquidos.

### Exemplo

Amostras de osso humano rejeitadas após procedimentos cirúrgicos em pacientes que sofreram cirurgias de substituição de osso ilíaco/joelho, foram obtidas sob a aprovação do protocolo IRB (Protocol #2001-055) e processadas como abaixo se descreve. Estas peças de osso de outro modo seriam deitadas fora durante a operação.

As peças de osso são intensamente lavadas e limpas sob condições estéreis usando soro salino tamponado com fosfato

(PBS). Estas peças são então cortadas para se obterem peças mais pequenas (1-2 mm<sup>3</sup>) e submetidas ao processo de digestão enzimática para isolar osteoblastos como acima se descreveu.

As células osteoblastos são obtidas a partir das peças de osso por digestão da colagenase. Resumidamente, as amostras de osso são lavadas duas vezes em PBS e dissecadas em fragmentos de 1 mm<sup>3</sup> que são depois sequencialmente digeridas por tripsina (1 mg/ml) durante 10 minutos, seguida de dispase (2 mg/ml) durante 20 minutos e por colagenase bacteriana [Colagenase A] (3 mg/ml) duas vezes por trinta minutos em PBS a 37°C em banho de água. As células libertadas por digestão pela colagenase são então lavadas, contadas e crescem até à sub-confluência em recipientes de cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> em meio de Eagle com modificação 1:1 de HamF12/Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células são cultivadas a 37°C em atmosfera humidificada de 5% CO<sub>2</sub>/95% ar. As substituições do meio são realizadas em cada 2-3 dias e as células são cultivadas até serem 80% confluentes. As células são depois tripsinizadas, lavadas e congeladas desde as primeiras passagens, para avaliação usando as técnicas abaixo descritas.

Com o fim de avaliar a capacidade dos osteoblastos formarem nódulos de osso *in vitro*, cultivam-se células em 6 placas de poços a 1-3x10<sup>5</sup> células/poço. Cultivam-se as células quer na presença de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> quer de análogos de vitamina D em várias doses durante 7 dias. Realizam-se substituições completas do meio duas vezes durante o período de 7 dias e suplementa-se o meio com compostos frescos (quer 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> quer com 2-metileno-19-nor-(20S)-1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> - 2MD) durante cada substituição do meio. Nos dias 10 e 13, realizam-se substituições completas do meio e os compostos são substituídos por tratamento com ácido ascórbico (50 µg/ml) e fosfato de  $\beta$ -glicerol (10 mM). Junta-se às culturas uma terceira dose de ácido ascórbico e de fosfato de  $\beta$ -glicerol no dia 15 se necessário. Após o período de cultura as células foram coradas usando a técnica de Von Kossa. Resumidamente, as células são coradas com 5% nitrato de prata durante 30 minutos no escuro, passadas por água destilada, reduzidas com solução de carbonato de sódio/formaldeído durante 2 min e lavadas com água da

torneira durante 10 minutos. As células são então coradas com pironina verde de metilo durante 20 minutos, lavadas com água e depois duas vezes com álcool absoluto. Por este método a formação *in vitro* de nódulo ósseo é confirmada pela presença de fosfato de cálcio (matriz calcificada) que cora de castanho-escuro a preto nas regiões nodulares da cultura (Marie<sup>15,16</sup>, 1994; 1995; Shevde et al.<sup>17</sup>, 2001). A formação *in vitro* de nódulos ósseos pode ser avaliada quantitativamente por vários procedimentos já publicados.

### Resultados e sua interpretação

A Figura 1 ilustra fotografias de culturas de osteoblastos após 14 dias de incubação e mostra claramente que muito poucas alterações são introduzidas pela 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> quando fornecida a 10<sup>-8</sup> molar. Assim a hormona vitamina D natural parece ter um efeito mínimo sobre os osteoblastos para formar osso mineralizado. A Figura 2 apresenta uma série de culturas coradas com a técnica de Von Kossa com diferentes concentrações de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ou de 2MD. Estes resultados mostram claramente que 2MD tem uma ação única e forte de estímulo das culturas de osteoblastos para formarem osso mineralizado como é revelado pela coloração de Von Kossa. Mesmo a uma concentração de 10<sup>-12</sup> molar, a 2MD produziu um grau de saturação na formação de osso novo. Estes resultados foram repetidos com diferentes culturas de osteoblastos humanos em ocasiões diversas com resultados e conclusões idênticos. Além disto, foram obtidos resultados semelhantes com culturas primárias de osteoblastos calvariais do rato. É evidente que 2MD induz, específica e marcadamente, a formação óssea mediada pelos osteoblastos. Estes resultados sugerem que este composto e seus análogos correlacionados podem ser usados para estimular o crescimento ósseo mediado pelos osteoblastos. Isto é confirmado pela capacidade deste composto estimular marcadamente a acumulação de massa óssea no animal ovariectomizado (DeLuca Patente U.S. n° 6306844). Estes resultados, contudo, demonstram que esta acumulação de massa óssea é devida ao marcado estímulo da formação de osso novo. Pode portanto prever-se que 2MD e os seus análogos podem ser extremamente úteis para estimular a formação de calos ósseos e cura de fracturas. Assim, um

paciente que tenha fracturado qualquer parte do seu esqueleto poderia ser tratado oralmente, sistematicamente ou directamente com 2MD para facilitar a cura da fractura. Pode prever-se o fornecimento de 2MD sob a forma de libertação lenta no local da fractura; ou o fornecimento sob uma forma de libertação lenta como o 2MD 25-acetato ou de uma mini-bomba osmótica para entregar uma pequena quantidade deste composto em cada hora, ou sob forma estabilizada implantada, ou injectada sob forma estabilizada na zona da fractura. Além disso, estes resultados sugerem que este composto quer fornecido sistematicamente quer colocado no local, pode estimular marcadamente o crescimento e a cura de transplantes ósseos como por exemplo nos procedimentos cirúrgicos da osteodistracção. Pode também prever-se que este composto pode ser muito útil em pacientes que tenham colocado implantes ou dispositivos que sejam usados para curar ou manter o osso no lugar.

Referências:

1. DeLuca, HF. The transformation of a vitamin into a hormone: The vitamin D story. *The Harvey Lectures, Series 75*, pp. 333-379. Academic Press, New York (1981).
2. Shipley PG, Kramer B, Howland J. Calcification of rachitic bones in vitro. *Am. J. Dis. Child.* 30:37-39, 1925.
3. Shipley PG, Kramer B, Howland J., Studies upon Calcification in vitro. *Biochem. J.* 20:379-387, 1926.
4. Yamamoto M, Kawanobe Y., Takahashi H, Shimazawa E, Kimura S, Ogata E, Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J. Clin. Invest.* 74, 507-513, 1984.
5. Underwood JL, DeLuca HF, Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. *Am. J. Physiol.* 246, E493-E498, 1984.
6. DeLuca HF, Vitamin D: The vitamin and the hormone. *Fed. Proc.* 33, 2211-2219, 1974.

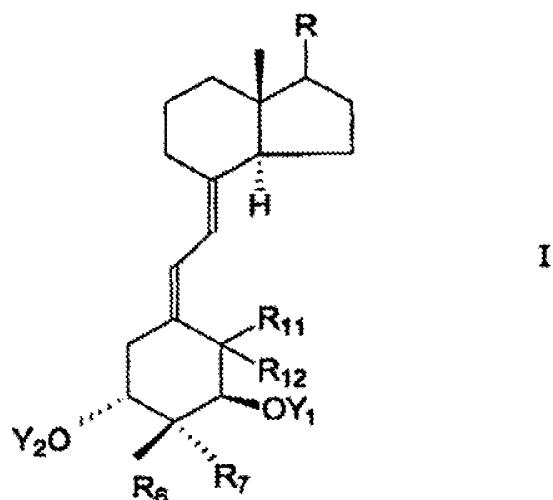
7. DeLuca HF, Schnoes HK, Vitamin D: Recent Advances, *Ann. Rev. Biochem.* 52, 411-439, 1983.
8. Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, eds. Vitamin D. Academic Press, San Diogo, CA. 1285 pp., 1997.
9. Kooh SW, Fraser D, DeLuca HF, Holick MF, Belsey RE, Clark MB, Murrai TM. Treatment of hypoparathyroidism and pseudohypoparathyroidism with metabolites of vitamin D. Evidence for impaired conversion of 25-hydroxyvitamin D to 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D. *New Engl. J. Med.* 293, 840-844, 1975.
10. Demay MB, Kiernan MS, DeLuca HF, Kronenberg HM. Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8097-8101, 1992.
11. Darwish HM, DeLuca HF. Identification of a transcription factor that binds to the promoter region of the human parathyroid hormone gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 123-130, 1999.
12. Aloia JF. Role of calcitriol in the treatment of postmenopausal osteoporosis, *Metabolism* 39, 35-38, 1990.
13. Tilyard MW, Sprars GFS, Thomson J, Dovey S. Treatment of postmenopausal osteoporosis with calcitriol or calcium. *New Engl. J. Med.* 326, 357-362, 1992.
14. Sicinski RR, Prahl JM, Smith CM, DeLuca HF. New 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-19-norvitamin D<sub>3</sub> compounds of high biological activity: Synthesis and biological evaluation of 2-hydroxymethyl, 2-methyl, and 2-methylene analogues. *J. Med. Chem.* 41, 4662-4674, 1998.
15. Marie PJ. Human osteoblastic cells: A potential tool to assess the etiology of pathologic bone formation. *J. Bone Miner Res.* 9(12): 1847-1850, 1994.

16. Marie PJ, Human osteoblastic cells: Relationship with bone formation. *Calcif. Tissue Int.* 56S:13-16, 1995.
17. Shevde NK, Bendixen AC, Maruyama M, Li BL and Billmire DA. Enhanced activity of Osteoblast Differentiation Factor (PEBP2 $\alpha$ A2/CBF $\alpha$ ) in Affected Sutural Osteoblasts from Patients with Nonsyndromic Craniosynostosis. *Cleft Palate-Craniofacial Journal* 38(6):606-614, 2001.

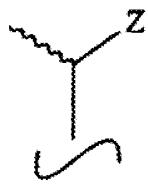
Lisboa, 2008-10-09

### REIVINDICAÇÕES

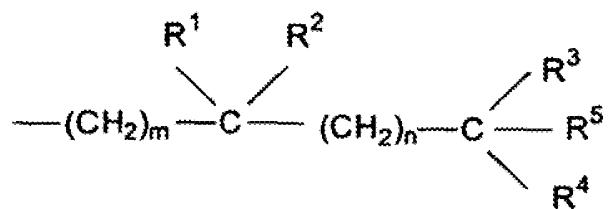
1. Utilização de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto de fórmula I, na preparação de um medicamento para estimular, num mamífero, a osteointegração de um implante dentário, o crescimento de osso periodontal ou um melhoramento na qualidade do osso após procedimento cirúrgico de osteodistracção, por meio da estimulação do crescimento de osso novo no referido mamífero:



onde  $Y_1$  e  $Y_2$ , que podem ser iguais ou diferentes, são cada um escolhidos entre hidrogénio e um grupo protector de hidroxi, onde  $R_{11}$  e  $R_{12}$  são cada um hidrogénio ou, tomados em conjunto, são um grupo metíleno, onde  $R_6$  e  $R_7$ , que podem ser iguais ou diferentes, são cada um escolhidos entre hidrogénio, alquilo, hidroxialquilo, fluoroalquilo, hidroxi e alcoxi, com a condição de  $R_6$  e  $R_7$  não poderem ser ambos hidrogénio, ou  $R_6$  e  $R_7$ , quando tomados em conjunto, podem representar o grupo  $-(CH_2)_x-$  onde  $x$  é um número inteiro de 2 a 5, ou  $R_6$  e  $R_7$ , quando tomados em conjunto, podem representar o grupo  $=CR_8R_9$  onde  $R_8$  e  $R_9$ , que podem ser iguais ou diferentes, são cada um escolhidos entre hidrogénio, alquilo, hidroxialquilo, fluoroalquilo, hidroxi e alcoxi ou, quando tomados em conjunto,  $R_8$  e  $R_9$  podem representar o grupo  $-(CH_2)_x-$  onde  $x$  é um número inteiro de 2 a 5, e onde o grupo R representa



onde o centro estereoquímico (correspondente a C-20 na numeração do esteróide) pode ter a configuração R ou S (i.e. quer a configuração natural acerca do carbono 20 quer a configuração 20-epi) e onde Z é escolhido entre Y, -OY, -CH<sub>2</sub>OY, -C≡CY e -CH=CHY, onde a dupla ligação pode ter geometria cis ou trans, e onde Y é escolhido entre hidrogénio, metilo, -COR<sup>5</sup> e um radical de estrutura:



onde m e n independentemente representam os números inteiros de 0 a 5, onde R<sup>1</sup> é escolhido entre hidrogénio, deutério, hidroxi, hidroxi protegido, fluoro, trifluorometilo e C<sub>1-5</sub>-alquilo, que pode ser de cadeia linear ou ramificada e, opcionalmente, suportar um substituinte hidroxi ou hidroxi-protegido e onde cada R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> e R<sup>4</sup> é independentemente escolhido entre deutério, deuteroalquilo, hidrogénio, fluoro, trifluorometilo e C<sub>1-5</sub>-alquilo, que pode ser de cadeia linear ou ramificada, e opcionalmente conter um substituinte hidroxi ou hidroxi-protegido, e quando R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup>, tomados em conjunto, representarem um grupo oxo, ou um grupo alquilideno, =CR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, ou o grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-, onde p é um número inteiro de 2 a 5, e onde R<sup>3</sup> e R<sup>4</sup>, tomados em conjunto, representam um grupo oxo, ou o grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>-, onde q é um número inteiro de 2 a 5, e onde R<sup>5</sup> representa hidrogénio, hidroxi, hidroxi protegido, ou C<sub>1-5</sub>-alquilo e onde qualquer dos grupos CH- nas posições 20, 22 ou 23 na cadeia lateral pode ser substituído por um átomo de azoto ou onde qualquer dos grupos -CH(CH<sub>3</sub>)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, -CR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>- ou -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- nas posições 20, 22 e 23, respectivamente, pode ser substituído por um átomo de oxigénio ou de enxofre.

**2.** Composto de fórmula I para uso na estimulação, num mamífero, da osteointegração de um implante dentário, do crescimento de osso periodontal ou de uma melhoria na

qualidade do osso após procedimento cirúrgico de osteodistracção, por estimulação do crescimento de osso novo no referido mamífero.

**3.** Uso de acordo com a reivindicação 1 ou um composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é administrado por via oral, parentérica, transdérmica ou tópica.

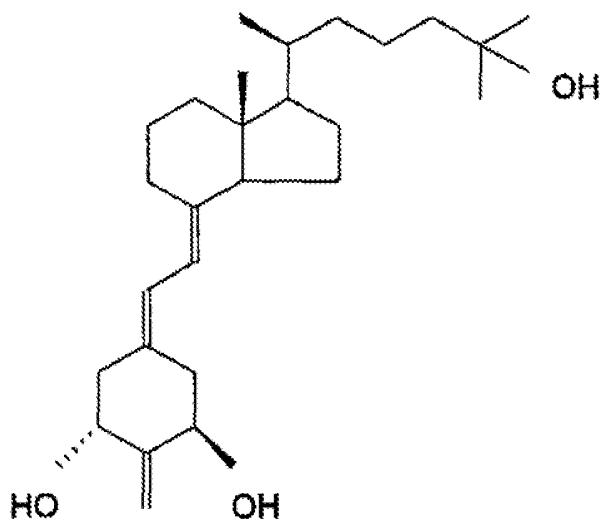
**4.** Uso de acordo com a reivindicação 1 ou um composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é administrado numa forma estabilizada no local onde é desejado o crescimento de osso novo.

**5.** Uso de acordo com a reivindicação 1 ou um composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é administrado numa forma de liberação lenta num local onde seja desejado o crescimento de osso novo.

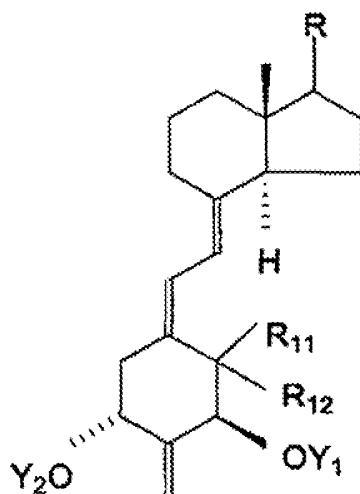
**6.** Uso de acordo com a reivindicação 1 ou um composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é administrado numa dosagem de 0,01 µg até 50 µg por dia.

**7.** Uso de acordo com a reivindicação 1 ou um composto de acordo com a reivindicação 2, onde o mamífero é um ser humano.

**8.** Uso de acordo com a reivindicação 1 ou um composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é 2-metileno-19-nor-20(S)-1 $\alpha$ ,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub>, com a fórmula:



**9.** Uso de acordo com a reivindicação 1 ou um composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é um derivado acilado com a fórmula:



onde  $Y^1$  e  $Y^2$  representam independentemente hidrogénio e um grupo acilo, e com a condição de  $R^5$  ser  $-OY_3$  e  $Y_3$  ser escolhido entre acilo e hidrocarbiloxicarbonilo.

**10.** Uso de um composto de acordo com a reivindicação 9, onde o composto é um triacetato tal que  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_3$  são cada um  $CH_3CO^-$ .

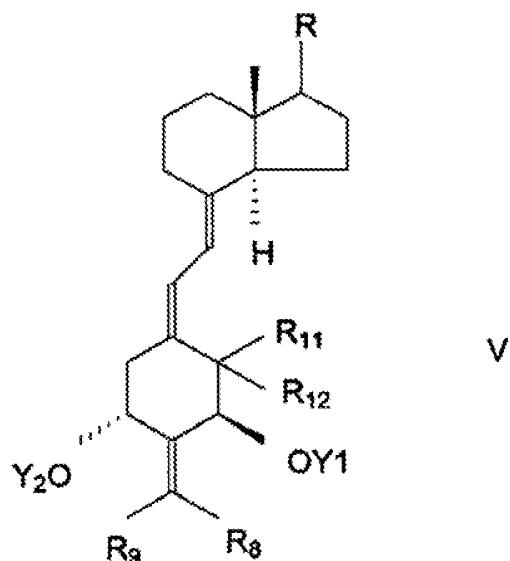
**11.** Uso de um composto de acordo com a reivindicação 9, onde o composto é um tri-hexanoato tal que  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_3$  são cada um  $CH_3(CH_2)_4CO^-$ .

**12.** Uso de um composto de acordo com a reivindicação 9, onde o composto é um trinonanoato tal que  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $Y_3$  são cada um  $CH_3(CH_2)_7CO^-$ .

**13.** Uso de um composto de acordo com a reivindicação 9, onde o composto é um 25-acetato tal que  $Y_1$  e  $Y_2$  são ambos hidrogénio e  $Y_3$  é  $CH_3CO^-$ .

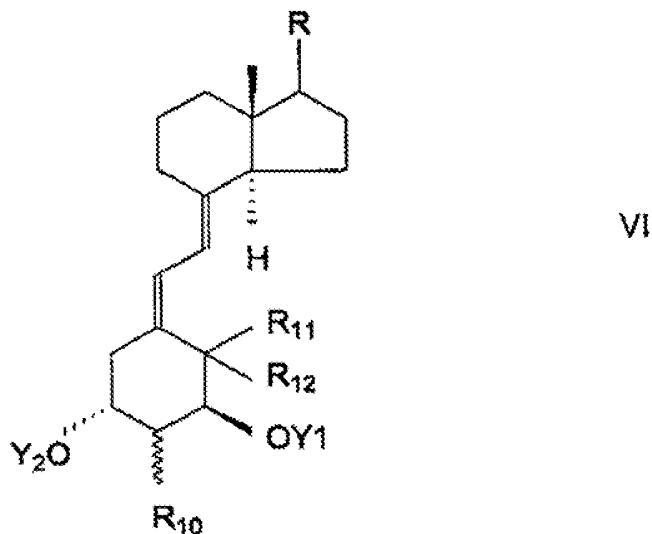
**14.** Uso de um composto de acordo com a reivindicação 9, onde o composto é escolhido entre 2-metileno-19-nor-1 $\alpha$ ,25-( $OH$ )<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>-1,3,25-triacetato, 2-metileno-19-nor-1 $\alpha$ ,25( $OH$ )<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>-1,3,25-tri-hexanoato, 2-metileno-19-nor-1 $\alpha$ ,25( $OH$ )<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>-1,3,25-trinonanoato e 2-metileno-19-nor-1 $\alpha$ ,25( $OH$ )<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>-25-acetato.

**15.** Uso de acordo com a reivindicação 1 ou composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é escolhido a partir de



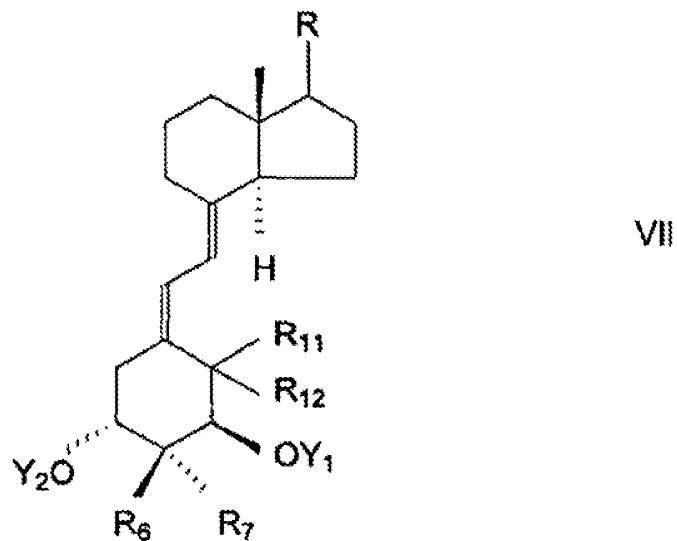
onde  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{12}$  e  $R$  são como definidos na reivindicação 1, e  $R_8$  e  $R_9$  que podem ser iguais ou diferentes, são escolhidos cada um entre hidrogénio, alquilo, hidroxialquilo e fluoroalquilo ou, quando tomados em conjunto, representam o grupo  $-(CH_2)_x-$  onde  $x$  é um número inteiro de 2 a 5.

**16.** Uso de acordo com a reivindicação 1 ou composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto é escolhido entre



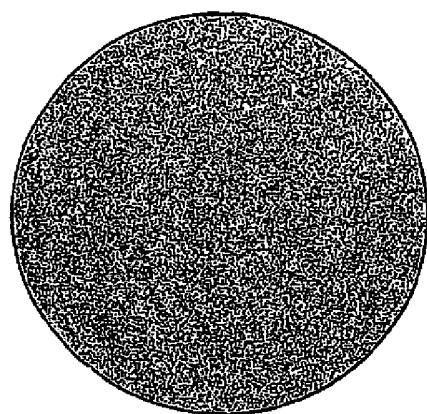
onde  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $R_{11}$  e  $R_{12}$  são definidos como na reivindicação 1 e  $R_{10}$  é escolhido entre alquilo, hidroxialquilo e fluoroalquilo.

**17.** Uso de acordo com a reivindicação 1 ou composto de acordo com a reivindicação 2, onde o composto administrado é escolhido entre



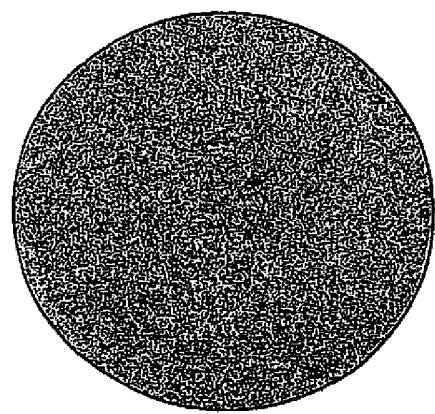
onde  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{12}$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  e  $R$  são definidos como na reivindicação 1, com a condição de  $R^5$  ser  $-OY_3$  e  $Y_3$  ser escolhido entre um acilo e um hidrocárbiloxicarbonilo.

Lisboa, 2008-10-09



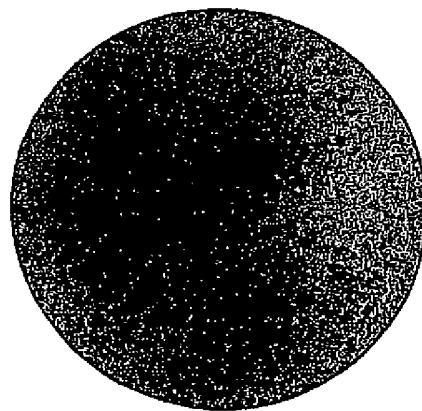
Controlo

Figura 1a



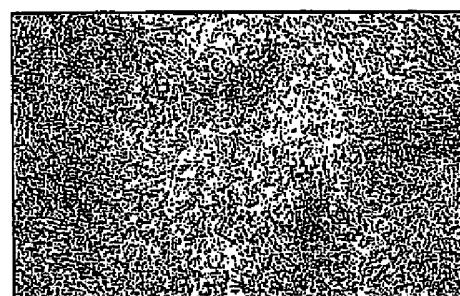
**1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>**

Figura 1b



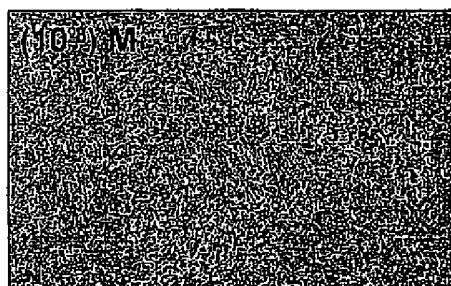
**2MD**

Figura 1c



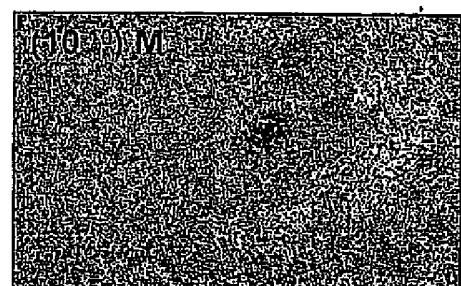
Controlo

Figura 2a



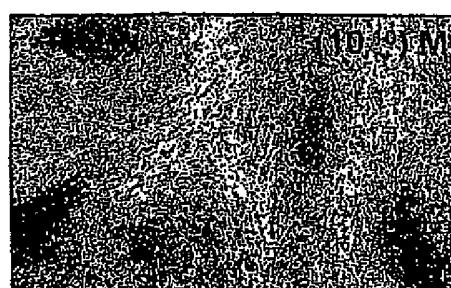
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Figura 2b



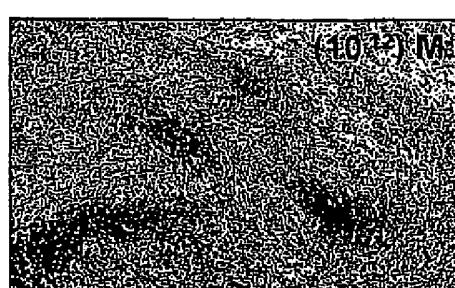
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Figura 2c



2MD

Figura 2d



2MD

Figura 2e