



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 314 190**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/593 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03714261 .9**

(96) Fecha de presentación : **20.03.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1496914**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2005**

(54) Título: **(20S)-1 α -hidroxi-2 α -metil y 2 β -metil-19-nor-vitamina D₃ y sus usos.**

(30) Prioridad: **22.04.2002 US 127180**

(73) Titular/es:
WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
614 North Walnut Street
Madison, Wisconsin 53705, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

(72) Inventor/es: **Deluca, Hector, F.;**
Sicinski, Rafal, R. y
Grzywacz, Pawel K.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 314 190 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)-1 α -hidroxi-2 α -metil y 2 β -metil-19-nor-vitamina D₃ y sus usos.

5 La invención se refiere a compuestos de vitamina D, y más particularmente a los profármacos (20S)-1 α -hidroxi-2 α -metil y 2 β -metil-19-nor-vitamina D₃, y a sus usos farmacéuticos.

10 La hormona natural 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃ y su análogo en la serie del ergosterol, es decir la 1 α ,25-dihidroxivitamina D₂, son conocidas como reguladores muy potentes de la homeostasis del calcio en animales y en seres humanos, y también se ha demostrado su actividad en la diferenciación celular (Ostrem y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2610 (1987)). Se han preparado y ensayado muchos análogos estructurales de estos metabolitos, entre ellos la 1 α -hidroxivitamina D₃, 1 α -hidroxi-vitamina D₂, diversas vitaminas de cadena homóloga, y análogos fluorados. Algunos de estos compuestos presentan una interesante separación de actividades en la diferenciación celular y la regulación del calcio. Esta diferencia en actividad puede ser útil en el tratamiento de diversas enfermedades tales como la osteodistrofia renal, raquitismo resistente a vitamina D, osteoporosis, psoriasis, y algunas neoplasias malignas.

15 Recientemente se ha descubierto una nueva clase de análogos de vitamina D, los denominados compuestos de 19-nor-vitamina D, que se caracterizan porque el grupo metíleno exocíclico del anillo A (carbono 19), típico del sistema de vitamina D, ha sido reemplazado por dos átomos de hidrógeno. Los ensayos biológicos de tales 19-nor-análogos (por ejemplo la 1 α ,25-dihidroxi-19-nor-vitamina D₃) han revelado un perfil selectivo de actividad, con gran potencia para inducir la diferenciación celular, y muy poca actividad de movilización del calcio. Por tanto, estos compuestos son potencialmente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de neoplasias malignas, o para el tratamiento de diversos trastornos cutáneos. Se han descrito dos métodos diferentes de síntesis de dichos análogos de 19-nor-vitamina D (Perlman y otros, Tetrahedron Lett. 31, 1823 (1990); Perlman y otros, Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991), y DeLuca y otros, patente de EE.UU. número 5,086,191).

20 En la patente de EE.UU. número 4,666,634, se han descrito análogos 2 β -hidroxi y alcoxi (por ejemplo ED-71) de 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃, y han sido examinados por el grupo Chugai como fármacos potenciales para la osteoporosis y como agentes antitumorales (véase también Okano y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 1444 (1989)). También se han preparado y ensayado otros análogos con el anillo A sustituido en posición 2 (con hidroxialquilo, por ejemplo ED-120, y grupos fluoroalquilo) de 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃ (Miyamoto y otros, Chem. Pharm. Bull. 41, 1111 (1993); Nishii y otros, Osteoporosis Int. Suppl. 1, 190 (1993); Posner y otros, J. Org. Chem. 59, 7855 (1994), y J. Org. Chem. 60, 4617 (1995)).

25 Recientemente se han sintetizado también análogos de 1 α ,25-dihidroxi-19-nor-vitamina D₃ sustituidos en posición 2, es decir compuestos sustituidos en posición 2 con grupos hidroxi o alcoxi (DeLuca y otros, patente de EE.UU. número 5,536,713), con grupos 2-alquilo (DeLuca y otros, patente de EE.UU. número 5,945,410), y con grupos 2-alquilideno (DeLuca y otros, patente de EE.UU. número 5,843,928), que presentan perfiles de actividad interesantes y selectivos. Todos estos estudios indican que los sitios de fijación en receptores de vitamina D pueden acomodar diferentes sustituyentes en C-2 dentro de los análogos de vitamina D sintetizados.

30 En un continuo esfuerzo de exploración de la clase 19-nor de compuestos de vitamina D farmacológicamente importantes, también se han sintetizado y ensayado dos análogos que se caracterizan por la presencia de un sustituyente metilo en el carbono 2 (C-2) y la ausencia de un grupo hidroxilo en el carbono 25 (C-25) de la cadena lateral. Estos dos análogos se caracterizan por un grupo hidroxilo en el carbono 1 y una cadena lateral de vitamina D₃ con el grupo metilo unido al carbono 20 en la orientación no natural o epi, es decir, (20S)-1 α -hidroxi-2 α -metil y 2 β -metil-19-nor-vitamina D₃. Estos análogos de vitamina D han parecido dianas interesantes porque el relativamente pequeño grupo metilo en C-2 no debe interferir con el receptor de vitamina D. Además, los estudios de mecánica molecular parecen indicar que esta modificación molecular altera sustancialmente la conformación del anillo de ciclohexanodiol A, desplazando su equilibrio conformacional hacia la forma de silla con el sustituyente metilo de C-2 orientado ecuatorialmente.

35 **55 Sumario de la invención**

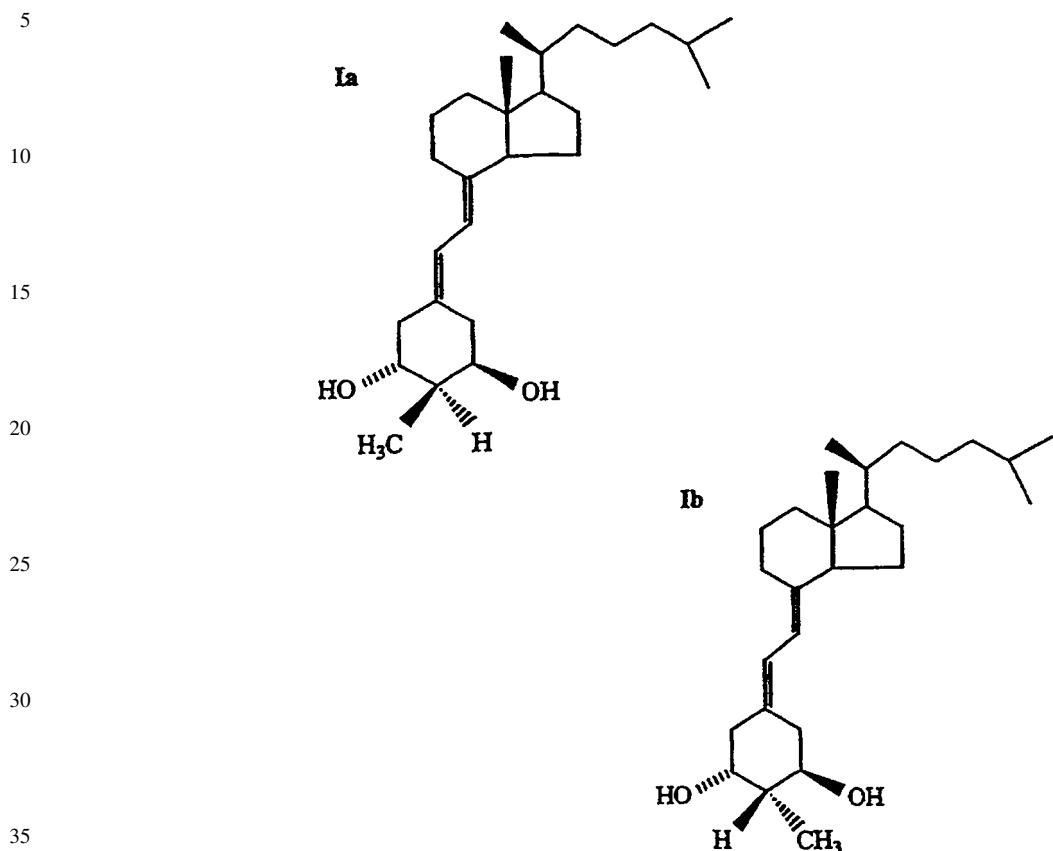
La presente invención se refiere a los profármacos (20S)-1 α -hidroxi-2 α -metil-19-nor-vitamina D₃ (fórmula Ia más abajo) y (20S)-1 α -hidroxi-2 β -metil-19-nor-vitamina D₃ (fórmula Ib más abajo), a su actividad biológica, y a diversos usos farmacéuticos para estos compuestos.

40

45

ES 2314 190 T3

Estructuralmente, estos 2α -methyl- y 2β -methyl-19-nor-análogos están respectivamente caracterizados por las fórmulas Ia y Ib, que se muestran a continuación:



Los dos compuestos precedentes presentan un perfil de actividad biológica deseado, sumamente ventajoso. Estos compuestos no se unen, o lo hacen muy escasamente, al receptor de vitamina D. Sin embargo, el compuesto de 2α -metilo tiene una actividad de transporte intestinal de calcio superior, en comparación con la $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D₃, y posee una mayor capacidad para movilizar el calcio desde el hueso, en comparación con la $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D₃. El compuesto de 2β -metilo tiene aproximadamente la misma actividad de transporte intestinal de calcio y de movilización del calcio óseo que la $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D₃. Por tanto, se pueden caracterizar estos compuestos como poseedores de una actividad calcémica muy potente, y por ser muy específicos en su actividad calcémica. Su actividad de movilización del calcio desde el hueso y su actividad de transporte intestinal de calcio elevada o normal permiten la administración *in vivo* de estos compuestos para el tratamiento de enfermedades óseas metabólicas en las cuales es una preocupación fundamental la pérdida de hueso. Gracias a su actividad sobre el hueso, estos compuestos serán agentes terapéuticos preferidos para el tratamiento de enfermedades en las cuales se desee la formación de hueso, tales como la osteoporosis, en especial la osteoporosis con bajo recambio óseo, la osteoporosis inducida por esteroides, la osteoporosis senil o la osteoporosis posmenopáusica, así como la osteomalacia.

También se ha descubierto que los compuestos de la invención son especialmente adecuados para el tratamiento y profilaxis de trastornos en seres humanos que estén caracterizados por un desequilibrio en el sistema inmunitario, por ejemplo las enfermedades autoinmunitarias, entre ellas la esclerosis múltiple, lupus, diabetes sacaria, reacción de huésped contra injerto, y rechazo de trasplantes de órganos; y además para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como la artritis reumatoide, asma, y enfermedades inflamatorias del intestino tales como la enfermedad celíaca y la enfermedad de Crohn. El acné, la alopecia y la hipertensión son otros trastornos que pueden ser tratados con los compuestos de la invención.

60 Los anteriores compuestos se caracterizan también por una elevada o significativa actividad de diferenciación celular. Por tanto, estos compuestos proporcionan también un agente terapéutico para el tratamiento de la psoriasis, o como un agente anticanceroso, especialmente contra la leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata. Además, gracias a su actividad de diferenciación celular relativamente alta, estos compuestos proporcionan un agente terapéutico para el tratamiento de diversas afecciones cutáneas que incluyen las arrugas, falta de adecuada hidratación dérmica, es decir piel seca, falta de adecuada firmeza de la piel, es decir piel flácida, e insuficiente secreción de sebo. Por tanto, el uso de estos compuestos no sólo da como resultado la hidratación de la piel, sino que mejora también la función de barrera de la piel.

ES 2 314 190 T3

Los compuestos pueden estar presentes en una composición para tratar las enfermedades y trastornos antes mencionados en una cantidad desde aproximadamente 0,01 $\mu\text{g/g}$ hasta aproximadamente 100 $\mu\text{g/g}$ de la composición, y se pueden administrar por vía tópica, transdérmica, oral o parenteral, en pautas desde aproximadamente 0,01 $\mu\text{g/día}$ hasta aproximadamente 100 $\mu\text{g/día}$.

5

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica que ilustra la actividad relativa de (20S)-1 α -hidroxi-2 α -metil-19-nor-vitamina D₃, (20S)-1 α -hidroxi-2 β -metil-19-nor-vitamina D₃, y 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃, en la competición por la fijación de [³H]-1,25-(OH)₂-D₃ al receptor nuclear intestinal de cerdo; y

la Figura 2 es una gráfica que ilustra el porcentaje de diferenciación de células HL-60 en función de la concentración de (20S)-1 α -hidroxi-2 α -metil-19-nor-vitamina D₃, de (20S)-1 α -hidroxi-2 β -metil-19-nor-vitamina D₃, y de 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃.

15

La invención proporciona compuestos de fórmula Ia y Ib para uso en el tratamiento de psoriasis, una enfermedad seleccionada de leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata, una enfermedad autoinmunitaria seleccionada de esclerosis múltiple, lupus, diabetes sacarina, rechazo de huésped contra injerto y rechazo de trasplantes de órganos, una enfermedad inflamatoria seleccionada de artritis reumatoide, asma y enfermedades inflamatorias del intestino, una afección cutánea seleccionada de arrugas, falta de adecuada firmeza de la piel, falta de adecuada hidratación dérmica, e insuficiente secreción de sebo, y un enfermedad ósea metabólica donde se desea mantener o incrementar la masa ósea.

La invención provee además el uso de una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula Ia o Ib para ser empleado en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata.

La invención provee también el uso de una cantidad eficaz de un compuesto según la fórmula Ia o la fórmula Ib en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada de esclerosis múltiple, lupus, diabetes sacarina, rechazo de huésped contra injerto, y rechazo de trasplantes de órganos.

La invención provee también el uso de una cantidad eficaz de un compuesto según la fórmula Ia o la fórmula Ib en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria seleccionada de artritis reumatoide, asma y enfermedades inflamatorias del intestino.

35

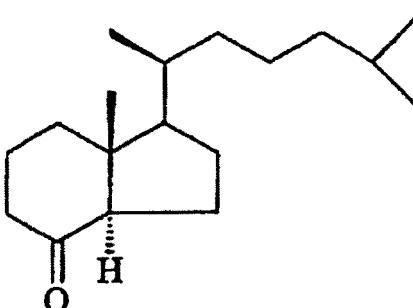
La invención provee también el uso de una cantidad eficaz de un compuesto según la fórmula Ia o la fórmula Ib en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección cutánea seleccionada de arrugas, falta de adecuada firmeza de la piel, falta de adecuada hidratación dérmica e insuficiente secreción de sebo.

40 La invención provee también el uso de una cantidad eficaz de un compuesto según la fórmula Ia o la fórmula Ib en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad ósea metabólica donde se desea mantener o incrementar la masa ósea.

45

La invención proporciona además un compuesto de fórmula

50



55

Descripción detallada de la invención

60

Se han sintetizado y ensayado (20S)-1 α -hidroxi-2 α -metil-19-nor-vitamina D₃ y (20S)-1 α -hidroxi-2 β -metil-19-nor-vitamina D₃. Estructuralmente, estos 19-nor-análogos están respectivamente caracterizados por las fórmulas Ia y Ib, ilustradas más arriba en este documento.

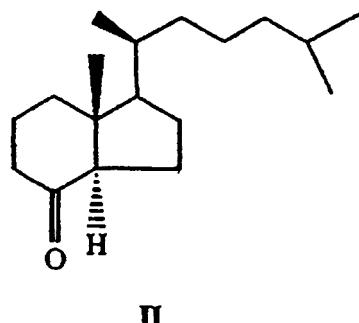
65

La preparación de (20S)-1 α -hidroxi-2 α -metil- y (20S)-1 α -hidroxi-2 β -metil-19-nor-vitamina D₃, que tienen las estructuras Ia y Ib, se puede conseguir mediante un método general común, es decir, la condensación de una cetona bicíclica II de tipo Windaus-Grundman con el óxido de fosfina alísica III para dar el correspondiente análogo de 2-

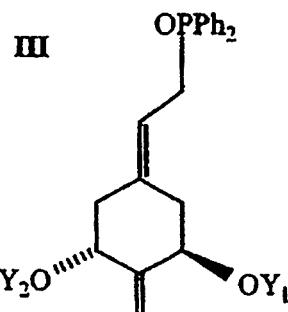
ES 2 314 190 T3

metilen-19-nor-vitamina D IV, seguida de desprotección de hidroxilos en C-1 y C-3 en este último compuesto; y seguida después por una reducción selectiva del grupo exometíleno en C-2 del compuesto V para proporcionar el isómero 2α -metilo (Ia) y el isómero 2β -metilo (Ib):

5

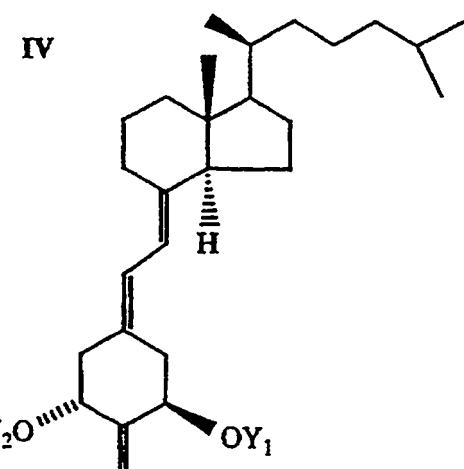


10



15

20



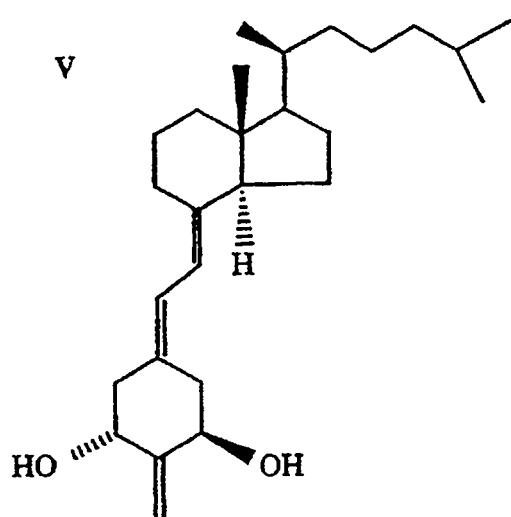
25

30

35

40

45



50

55

60

65

En las estructuras III y IV los grupos Y_1 e Y_2 son grupos protectores de hidroxi, preferiblemente grupos $tBuMe_2Si$, entendiéndose también que cualesquiera funcionalidades que pudieran ser sensibles o que interfieran con la reacción de condensación, deben ser adecuadamente protegidas como es bien conocido en la técnica. El proceso mostrado en lo que antecede representa una aplicación del concepto de síntesis convergente, que ha sido aplicado eficazmente para

ES 2 314 190 T3

la preparación de compuestos de vitamina D [por ejemplo Lythgoe y otros, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 590 (1978); Lythgoe, Chem. Soc. Rev. 9, 449 (1983); Toh y otros, J. Org. Chem. 48, 1414 (1983); Baggolini y otros, J. Org. Chem. 51, 3098 (1986); Sardina y otros, J. Org. Chem. 51, 1264 (1986); J. Org. Chem. 51, 1269 (1986); DeLuca y otros, patente de EE.UU. número 5,086,191; DeLuca y otros, patente de EE.UU. número 5,536,713].

Una hidrindanona de la estructura II es un compuesto nuevo que se puede preparar a partir de vitamina D₂ comercial mediante modificación por métodos conocidos. Así, el alcohol 1 de partida se preparó a partir de vitamina D₂ comercial en 3 pasos (Esquema 1). El alcohol C-22 1 resultante se oxidó al aldehído 2, que después se equilibró en C-20. Se redujo la mezcla de aldehídos (20R) y (20S), y se aisló por cromatografía el (20R)-alcohol 3. Este, a su vez, fue tosilado, y el tosilato 4 se copuló con el reactivo de Grignard 5 en presencia de tetraclorocuprato de dilitio. El hidrindanol 6 obtenido se oxidó para dar el análogo de (20S)-cetona de Grundmann II.

Para preparar los óxidos de fosfina requeridos de estructura general III, se ha desarrollado una nueva ruta sintética partiendo de un derivado de quinato de metilo que se obtiene fácilmente a partir de ácido (1R,3R,4S,5R)-(-)-quínico tal como han descrito Perlman y otros, Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991) y DeLuca y otros, patente de EE.UU. número 5,086,191.

El paso final del proceso es la hidrogenación catalítica homogénea selectiva de la unidad de exometileno en el carbono 2 de la vitamina V llevada a cabo eficientemente en presencia de cloruro de tris(trifenilfosfina)rodio(I) [catalizador de Wilkinson, (Ph₃P)₃RhCl]. Estas condiciones de reducción permiten reducir sólo la unidad C(2)=CH₂, sin afectar al resto de butadieno C(5)-C(8). El material aislado es una mezcla epimera (aproximadamente 1:1) de las 2-metil-19-nor-vitaminas Ia y Ib, que se diferencian en la configuración en C-2. La mezcla se puede emplear sin separarla, o bien, si se desea, se pueden separar los isómeros 2 α y 2 β por medio de un sistema HPLC eficaz.

El proceso global de la síntesis de compuestos Ia y Ib está ilustrado y descrito con más detalle en la patente de EE.UU. número 5,945,410 titulada “2-Alkyl-19-Nor-Vitamin D Compounds”.

Específicamente, la preparación de la hidrindanona II se describe a continuación y se ilustra en el Esquema 1. Los pasos finales de la síntesis convergente, es decir, la copulación de este compuesto con el óxido de fosfina 7 seguida de desprotección de hidroxilo en el compuesto de vitamina D 8 y reducción/hidrogenación de la unidad de exometileno en el compuesto de 2-metilen-19-nor-vitamina D V también se describen a continuación y se ilustran en el Esquema 2.

Preparación de (20S)-de-A,B-8 β -benzoiloxi-20-(hidroximetil)pregnano (1)

El alcohol 1 de partida se preparó a partir de vitamina D₂ comercial con un rendimiento de 70%, según el procedimiento publicado por J.C. Hanekamp, R.B. Rookhuizen, H.J.T. Bos, L. Brandsma *Tetrahedron*, 1992, 48, 9283-9294.

Se hizo pasar ozono a través de una disolución de vitamina D₂ (3 g, 7,6 mmol) en metanol (250 ml) y piridina (2,44 g, 2,5 ml, 31 mmol) durante 50 minutos a -78°C. Después se barrió la mezcla de reacción con oxígeno durante 15 minutos para eliminar el ozono residual, y se trató con NaBH₄ (0,75 g, 20 mmol) la disolución. Transcurridos 20 minutos se añadió una segunda porción de NaBH₄ (0,75 g, 20 mmol), y se dejó que la mezcla se calentase hasta la temperatura ambiente. Después se añadió la tercera porción de NaBH₄ (0,75 g, 20 mmol), y se agitó la mezcla de reacción durante 18 horas. Se desactivó la reacción con agua (40 ml) y se concentró la disolución bajo presión reducida. Se extrajo el residuo con acetato de etilo (3 x 80 ml) y se lavaron las fases orgánicas combinadas con HCl acuoso 1M y con NaHCO₃ acuoso saturado, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se cromatógrafió sobre gel de sílice con hexano/acetato de etilo (75:25) para proporcionar (20S)-de-A,B-20-(hidroximetil)pregnan-8 β -ol (1,21 g, rendimiento 75%) como cristales blancos.

Se añadió cloruro de benzoílo (2,4 g, 2, mL, 17 mmol) a una disolución del 8 β ,20-diol (1,2 g, 5,7 mmol) y DMAP (30 mg, 0,2 mmol) en piridina anhidra (20 mL) a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción a 4°C durante 24 horas, se diluyó con cloruro de metileno (100 mL), se lavó con HCl acuoso al 5%, con agua, y con NaHCO₃ acuoso saturado, se secó (Na₂SO₄) y se concentró bajo presión reducida. El residuo (3,39 g) se trató con disolución de KOH (1 g, 15,5 mmol) en etanol anhidro (30 ml) a temperatura ambiente. Tras agitar la mezcla de reacción durante 3 horas, se añadieron hielo y HCl acuoso al 5%, hasta pH = 6. Se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml) la disolución, y las fases orgánicas combinadas se lavaron con NaHCO₃ acuoso saturado, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se cromatógrafió sobre gel de sílice con hexano/acetato de etilo (75:25) para proporcionar el alcohol 1 (1,67 g, rendimiento 93%) en forma de un aceite incoloro: $[\alpha]_D^{20} +56,0$ (*c* 0,48, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + TMS) δ 8,08-8,02 (2H, m, *o*-H_{Bz}), 7,59-7,53 (1H, m, *p*-H_{Bz}), 7,50-7,40 (2H, m, *m*-H_{Bz}), 5,42 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, 8 α -H), 3,65 (1H, dd, *J* = 10,5, 3,2 Hz, 22-H), 3,39 (1H, dd, *J* = 10,5, 6,8 Hz, 22-H), 1,08 (3H, d, *J* = 5,3 Hz, 21-H₃), 1,07 (3H, s, 18-H₃); ¹³C NMR (125 MHz) δ 166,70 (s, C=O), 132,93 (d, *p*-C_{Bz}), 131,04 (s, *i*-C_{Bz}), 129,75 (d, *o*-C_{Bz}), 128,57 (d, *m*-C_{Bz}), 72,27 (d, C-8), 67,95 (t, C-22), 52,96 (d), 51,60 (d), 42,15 (s, C-13), 39,98 (t), 38,61 (d), 30,73 (t), 26,81 (t), 22,91 (t), 18,20 (t), 16,87 (q, C-21), 13,81 (q, C-18); MS (EI) *m/z* 316 (5, M⁺), 301 (3, M⁺ - Me), 299 (1, M⁺ - OH), 298 (2, M⁺ - H₂O), 285 (10, M⁺ - CH₂OH), 257 (6), 230 (9), 194 (80), 135 (84), 105 (100), masa exacta calculada para C₂₀H₂₈O₃ 316,2038, hallada 316,2019.

ES 2 314 190 T3

Preparación de (20S)-de-A,B-8β-benzoiloxi-20-formilpregnano (2)

Se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas una mezcla de alcohol 1 (1,63 g, 5,2 mmol), dicromato de piridinio (6,05 g, 16,1 mmol) y *p*-toluenosulfonato de piridinio (100 mg, 0,4 mmol) en cloruro de metileno anhidro.

- 5 Se filtró la suspensión resultante a través de una corta capa de Celite. Se lavó con éter el adsorbente, se eliminaron los disolventes bajo presión reducida, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice con hexano/acetato de etilo (90:10) para proporcionar el aldehído 2 (1,36 g, rendimiento 83%) en forma de un aceite: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + TMS) δ 9,60 (1H, d, J = 3,1 Hz, CHO), 8,05 (2H, m, *o*-H_{Bz}), 7,57 (1H, m, *p*-H_{Bz}), 7,45 (2H, m, *m*-H_{Bz}), 5,44 (1H, s, 8α-H), 2,39 (1H, m, 20-H), 2,03 (2H, dm, J = 11,5 Hz), 1,15 (3H, d, J = 6,9 Hz, 21-H₃), 1,10 (3H, s, 18-H₃); MS (EI) *m/z* 314 (1, M⁺), 299 (0,5, M⁺ - Me), 286 (1, M⁺ - CO), 285 (5, M⁺ - CHO), 257 (1, M⁺ - C₃H₅O), 209 (10, M⁺ - PhCO), 192 (38), 134 (60), 105 (100), 77 (50); masa exacta calculada para C₂₀H₂₆O₃ 314,1882, hallada 314,1887.
- 10

Preparación de (20R)-de-A,B-8β-benzoiloxi-20-(hidroximetil)pregnano (3)

- 15 Se disolvió el aldehído 2 (1,35 g, 4,3 mmol) en CH₂Cl₂ (15 ml) y se añadió una disolución acuosa de n-Bu₄NOH al 40% (5,6 mL, 5,57 g, 8,6 mmol). Se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas la mezcla resultante, se diluyó con cloruro de metileno (30 mL), se lavó con agua, se secó (Na₂SO₄) y se concentró bajo presión reducida. El residuo se cromatógrafió sobre gel de sílice con hexano/acetato de etilo (95:5) para proporcionar una mezcla del aldehído 2 y su 20-epímero (730 mg, rendimiento 53%) en una proporción aproximadamente 1:1,7 (por ¹H NMR).

- 20 Se disolvió esta mezcla de aldehídos (730 mg, 2,3 mmol) en THF (5 mL) y se añadió NaBH₄ (175 mg, 4,6 mmol), seguido de la adición gota a gota de etanol (5 mL). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se desactivó con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl. Se extrajo con éter (3 x 30 mL) la mezcla, y las fases acuosas combinadas se lavaron con agua, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se cromatógrafió sobre gel de sílice con hexano/acetato de etilo (95:5 → 80:20) para proporcionar el alcohol (20R) 3 deseado, puro (366 mg, rendimiento 52%) en forma de un aceite, y una mezcla de 3 y su 20-epímero 1 (325 mg, rendimiento 45%) en una proporción aproximadamente 1:4 (por ¹H NMR).

- 25 30: [α]_D +43,0 (*c* 0,54, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃ + TMS) δ 8,10-8,00 (2H, m, *o*-H_{Bz}), 7,60-7,53 (1H, m, *p*-H_{Bz}), 7,48-7,41 (2H, m, *m*-H_{Bz}), 5,42 (1H, s ancho, 8α-H), 3,75 (1H, dd, J = 10,6, 3,5 Hz, 22-H), 3,48 (1H, dd, J = 10,6, 7,0 Hz, 22-H), 1,069 (3H, s, 18-H₃), 0,973 (3H, d, J = 6,7 Hz, 21-H₃); ¹³C NMR (125 MHz) δ 166,70 (s, C=O), 123,94 (d, *p*-C_{Bz}), 131,05 (s, *i*-C_{Bz}), 129,76 (d, *o*-C_{Bz}), 128,59 (d, *m*-C_{Bz}), 72,28 (d, C-8), 66,95 (t, C-22), 52,94 (d), 51,77 (d), 41,96 (s, C-13), 39,56 (t), 37,78 (d), 30,75 (t), 26,67 (t), 22,71 (t), 18,25 (t), 16,76 (q, C-21), 14,14 (q, C-18); 35 MS (EI) *m/z* 316 (16, M⁺), 301 (5, M⁺ - Me), 299 (2, M⁺ - OH), 298 (3, M⁺ - H₂O), 285 (9, M⁺ - CH₂OH), 257 (5), 242 (11), 230 (8), 194 (60), 147 (71), 105 (100); masa exacta calculada para C₂₀H₂₈O₃ 316,2038, hallada 316,2050.

Preparación de (20R)-de-A,B-8-benzoiloxi-20-[(*p*-toluenosulfonil)oximetil]pregnano (4)

- 40 40: A una disolución agitada del alcohol 3 (393 mg, 1,24 mmol), DMAP (10 mg, 0,08 mmol) y Et₃N (0,7 mL, 0,51 g, 5,04 mmol) en cloruro de metileno anhidro (10 mL) se añadió cloruro de *p*-toluenosulfonilo (320 mg, 1,68 mmol) a 0°C. Se dejó que la mezcla de reacción se calentase hasta la temperatura ambiente (4 horas) y se continuó agitando durante 22 horas más. Se añadió cloruro de metileno (60 mL), y se lavó la mezcla con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃, se secó (Na₂SO₄) y se concentró bajo presión reducida. El residuo se cromatógrafió sobre gel de sílice con hexano/acetato de etilo (95:5) para proporcionar el tosilato 4 (533 mg, rendimiento 91%) en forma de un aceite incoloro: [α]_D +15,0 (*c* 0,54, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃ + TMS) δ 8,02 (2H, m, *o*-H_{Bz}), 7,80 (2H, d, J = 8,2 Hz, *o*-H_{Ts}), 7,55 (1H, m, *p*-H_{Bz}), 7,44 (2H, m, *m*-H_{Bz}), 7,35 (2H, d, J = 8,2 Hz, *m*-H_{Ts}), 5,39 (1H, s ancho, 8α-H), 4,15 (1H, dd, J = 9,4, 3,4 Hz, 22-H), 3,83 (1H, dd, J = 9,4, 7,1 Hz, 22-H), 2,457 (3H, s, Me_{Ts}), 1,98 (1H, m), 0,978 (3H, s, 18-H₃), 0,898 (3H, d, J = 6,6 Hz, 21-H₃); ¹³C NMR (125 MHz) δ 166,60 (s, C=O), 144,87 (s, *p*-C_{Ts}), 133,35 (s, *i*-C_{Ts}), 132,98 (d, *p*-C_{Bz}), 130,94 (s, *i*-C_{Bz}), 129,97 (d, *m*-C_{Ts}), 129,72 (d, *o*-C_{Bz}), 128,58 (d, *m*-C_{Bz}), 128,13 (d, *o*-C_{Ts}), 74,21 (t, C-22), 72,03 (d, C-8), 52,44 (d), 51,52 (d), 41,82 (s, C-13), 39,30 (t), 35,00 (d), 30,57 (t), 26,56 (t), 22,54 (t), 21,85 (q, Me_{Ts}), 18,12 (t), 16,85 (q, C-21), 14,09 (q, C-18); MS (EI) *m/z* 470 (1, M⁺), 365 (33, M⁺ - PhCO), 348 (64, M⁺ - PhCOOH), 193 (52), 176 (71), 134 (72), 105 (100); masa exacta calculada para C₂₇H₃₄O₅S 470,2127, hallada 470,2091.

- 55 55: Preparación de (20S)-de-A,B-colestan-8β-ol (6)

- 60 Se refluieron virutas de magnesio (1,32 g, 55 mmol), 1-cloro-3-metilbutano (3,3 mL, 2,9 g, 27,2 mmol) y yodo (2 cristales) en THF anhidro (18 mL) durante 10 horas. La disolución del reactivo de Grignard 5 formado se enfrió a -78°C y se añadió gota a gota, a través de una cánula, a una disolución del tosilato 4 (348 mg, 0,74 mmol) en THF anhidro (5 mL) a -78°C. Despues se añadieron gota a gota a la mezcla de reacción a -78°C, a través de una cánula, 6 mL de una disolución de Li₂CuCl₄ [preparada disolviendo LiCl seco (232 mg, 5,46 mmol) y CuCl₂ seco (368 mg, 2,75 mmol) en THF anhidro (27 mL)]. Se retiró el baño refrigerante, se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 20 horas, y después se vertió sobre disolución acuosa 1M de H₂SO₄ (25 mL) que contenía hielo (aproximadamente 100 g). Se extrajo la mezcla con cloruro de metileno (3 x 50 mL), y las fases orgánicas combinadas se lavaron con NH₄Cl acuoso saturado, con NaHCO₃ acuoso saturado, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se cromatógrafió sobre gel de sílice con cloroformo para proporcionar el alcohol 6 (149 mg, rendimiento 76%) en forma de un aceite incoloro: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + TMS) δ 4,07 (1H, d, J = 2,2 Hz, 8α-H), 1,98 (1H,

ES 2 314 190 T3

dm, J = 13,1 Hz), 0,93 (3H, s, 18-H₃), 0,86 (6H, d, J = 6,6 Hz, 26 y 27-H₃), 0,81 (3H, d, J = 6,6 Hz, 21-H₃); ¹³C NMR (125 MHz) δ 69,41 (d, C-8), 56,27 (d), 52,62 (d), 41,84 (s, C-13), 40,28 (t), 39,38 (t), 35,40 (t), 34,83 (d), 33,51 (t), 28,03 (d), 27,10 (t), 23,93 (t), 22,72 (q, C-26/27), 22,63 (q, C-26/27), 22,40 (t), 18,53 (q, C-21), 17,47 (t), 13,73 (q, C-18); MS (EI) m/z 266 (7, M⁺), 251 (6, M⁺ - Me), 248 (2, M⁺ - H₂O), 233 (4, M⁺ - Me - H₂O), 163 (6), 152 (11), 135 (38), 111 (100); masa exacta calculada para C₁₈H₃₄O 266,2610, hallada 266,2601.

Preparación de (20S)-de-A,B-colestan-8-ona (II)

Se añadió dicromato de piridinio (90 mg, 239 μmol) a una disolución del alcohol 6 (15 mg, 56 μmol) y p-toluenosulfonato de piridinio (2 mg, 8 μmol) en cloruro de metileno anhidro (6 mL). Se agitó la suspensión resultante a temperatura ambiente durante 3,5 horas. Se filtró la mezcla de reacción a través de un cartucho de sílice Waters Sep-Pak (2 g), que después se lavó con CHCl₃. Despues de eliminar los disolventes se obtuvo la cetona II (13 mg, rendimiento 88%) en forma de un aceite incoloro: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + TMS) δ 2,46 (1H, dd, J = 11,5, 7,6 Hz), 0,89 (6H, d, J = 6,6 Hz, 26 y 27-H₃), 0,87 (3H, d, J = 6,1 Hz, 21-H₃), 0,65 (3H, s, 18-H₃); MS (EI) m/z 264 (41, M⁺), 249 (37, M⁺ - Me), 246 (3, M⁺ - H₂O), 231 (3, M⁺ - Me - H₂O), 221 (50, M⁺ - C₃H₇), 152 (34), 125 (100), 111 (69); masa exacta calculada para C₁₈H₃₂O 264,2453, hallada 264,2454.

Preparación de (20S)-1α-hidroxi-2-metilen-19-norvitamina D₃ (V)

A una disolución de óxido de fosfina 7 (34 mg, 58 μmol) en THF anhidro (450 μL) a -20°C se añadió lentamente PhLi (1,7 M en ciclohexano-éter, 75 μL, 128 μmol) bajo argón, con agitación. La disolución tomó un color anaranjado oscuro. Transcurridos 30 minutos se enfrió la mezcla hasta -78°C y se añadió lentamente una disolución preenfriada (a -78°C) de cetona II (12 mg, 45 μmol) en THF anhidro (200 + 100 μL). Se agitó la mezcla, bajo argón, a -78°C durante 3 horas y a 0°C durante 18 horas. Se añadió acetato de etilo, y se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó (Na₂SO₄), y se evaporó. Se disolvió el residuo en hexano, y se aplicó a un cartucho de sílice Waters Sep-Pak (2 g). Se lavó el cartucho con hexano y hexano/acetato de etilo (99,5:0,5) para proporcionar del derivado de 19-norvitamina 8 (12 mg). Despues se lavó el Sep-Pak con hexano/acetato de etilo (96:4) para recuperar la cetona II inalterada en el anillo C,D (7 mg), y con acetato de etilo para recuperar el óxido de difenilfosfina 7 (19 mg). La vitamina protegida 8 se purificó adicionalmente mediante HPLC (columna Zorbax-Silica de 10 x 250 mm, 4 mL/min) utilizando el sistema de disolventes hexano/2-propanol (99,9:0,1). El compuesto 8 puro (10 mg, rendimiento 36%) eluyó a R_v = 15 mL en forma de un aceite incoloro: UV (en hexano) λ_{max} 262,5, 252,5, 243,5 nm; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6,21 y 5,82 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,1 Hz, 6- y 7-H), 4,95 y 4,90 (1H y 1H, cada uno s, =CH₂), 4,41 (2H, m, 1β- y 3α-H), 2,80 (1H, dd, J = 11,9, 3,5 Hz, 9β-H), 2,49 (1H, dd, J = 13,2, 6,0 Hz, 10α-H), 2,44 (1H, dd, J = 12,7, 4,6 Hz, 4α-H), 2,32 (1H, dd, J = 13,2, 3,1 Hz, 10β-H), 2,16 (1H, dd, J = 12,7, 8,2 Hz, 4β-H), 1,98 (2H, m), 1,84 (1H, m), 0,876 (9H, s, Si-*t*-Bu), 0,851 (6H, d, J = 6,0 Hz, 26 y 27-H₃), 0,845 (9H, s, Si-*t*-Bu), 0,820 (3H, d, J = 6,5 Hz, 21-H₃), 0,521 (3H, s, 18-H₃), 0,060, 0,046, 0,029 y 0,006 (cada uno 3H, cada uno s, 4 x Si-CH₃); MS (EI) m/z 628 (3, M⁺), 613 (1, M⁺ - Me), 571 (3, M⁺ - *t*-Bu), 496 (63, M⁺ - *t*-BuMe₂SiOH), 383 (4, M⁺ - *t*-BuMe₂SiOH-C₈H₁₇), 366 (21), 234 (20), 129 (41), 75 (100); masa exacta calculada para C₃₉H₇₂O₂Si₂ 628,5071, hallada 628,5068.

La vitamina protegida 8 (10 mg, 16 μmol) se disolvió en THF anhidro (3 mL) y se añadió una disolución de fluoruro de tetrabutilamonio (1M en THF, 160 μL, 160 μmol), seguida por tamices moleculares 4A recién activados (300 mg). Se agitó la mezcla bajo argón a temperatura ambiente durante 2 horas, despues se diluyó con 2 mL de hexano/acetato de etilo (6:4) y se aplicó a un cartucho de sílice Waters Sep-Pak (2 g). La elución con el mismo sistema de disolventes proporcionó el producto V bruto, que se purificó adicionalmente mediante HPLC (columna Zorbax-Silica de 10 x 250 mm, 4 mL/min) utilizando el sistema de disolventes hexano/2-propanol (9:1). La 2-metilen-19-norvitamina V analíticamente pura (3,3 mg, rendimiento 52%) se recogió a R_v = 32 mL en forma de un aceite incoloro: UV (en EtOH) λ_{max} 261,5, 251,5, 243,5 nm; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃ + TMS) δ 6,36 y 5,88 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,3 Hz, 6- y 7-H), 5,11 y 5,09 (cada uno 1H, cada uno s, =CH₂), 4,47 (2H, m, 1β- y 3α-H), 2,85 (1H, dd, J = 13,4, 4,6 Hz, 10β-H), 2,81 (1H, d ancho, J = 13,9 Hz, 9β-H), 2,58 (1H, dd, J = 13,2, 3,7 Hz, 4α-H), 2,33 (1H, dd, J = 13,2, 6,1 Hz, 4β-H), 2,29 (1H, dd, J = 13,4, 8,4 Hz, 10α-H), 1,99 (2H, m), 1,86 (1H, m), 0,867 (6H, d, J = 6,6 Hz, 26 y 27-H₃), 0,839 (3H, d, J = 6,5 Hz, 21-H₃), 0,547 (3H, s, 18-H₃); MS (EI) m/z 400 (100, M⁺), 385 (5, M⁺ - Me), 382 (16, M⁺ - H₂O), 367 (6, M⁺ - Me - H₂O), 349 (3, M⁺ - Me - 2H₂O), 315 (46), 287 (56, M⁺ - C₈H₁₇), 269 (52), 247 (42); masa exacta calculada para C₂₇H₄₄O₂ 400,3341, hallada 400,3346.

Preparación de (20S)-1α-hidroxi-2α-metil-19-norvitamina D₃ (Ia) y (20S)-1α-hidroxi-2β-metil-19-norvitamina D₃ (Ib)

Se añadió cloruro de tris(trifenilfosfina)rodio(I) (3,5 mg, 3,9 μmol) a benceno seco (2,5 mL), previamente saturado con hidrógeno. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente hasta que se formó una disolución homogénea (unos 45 minutos). Despues se añadió una disolución de vitamina V (1,8 mg, 4,5 μmol) en benceno seco (400 + 400 μL) y se dejó que la reacción continuase bajo una continua corriente de nitrógeno durante 3 horas. Se eliminó el benceno a vacío, se redisolvió el residuo en hexano/acetato de etilo (1:1) y se aplicó a un cartucho de sílice Waters Sep-Pak (2 g). Con el mismo sistema de disolventes se eluyó una mezcla de 2-metil-vitaminas. Los compuestos se purificaron ulteriormente mediante HPLC (columna Zorbax-Silica de 10 x 250 mm, 4 mL/min) utilizando el sistema de disolventes hexano/2-propanol (9:1). La mezcla de 2-metil-19-norvitaminas Ia y Ib proporcionó un pico único a R_v = 34 mL. La separación de ambos epímeros se consiguió mediante HPLC en fase invertida (columna Chromegabond C18 de 10 x 250 mm, 3 mL/min) utilizando el sistema de disolventes metanol/agua (9:1). La 2β-metil-vitamina Ib (280 μg, rendimiento 15%) se recogió a R_v = 47 mL, y su epímero 2α Ia (382 μg, rendimiento 21%) a R_v = 51mL.

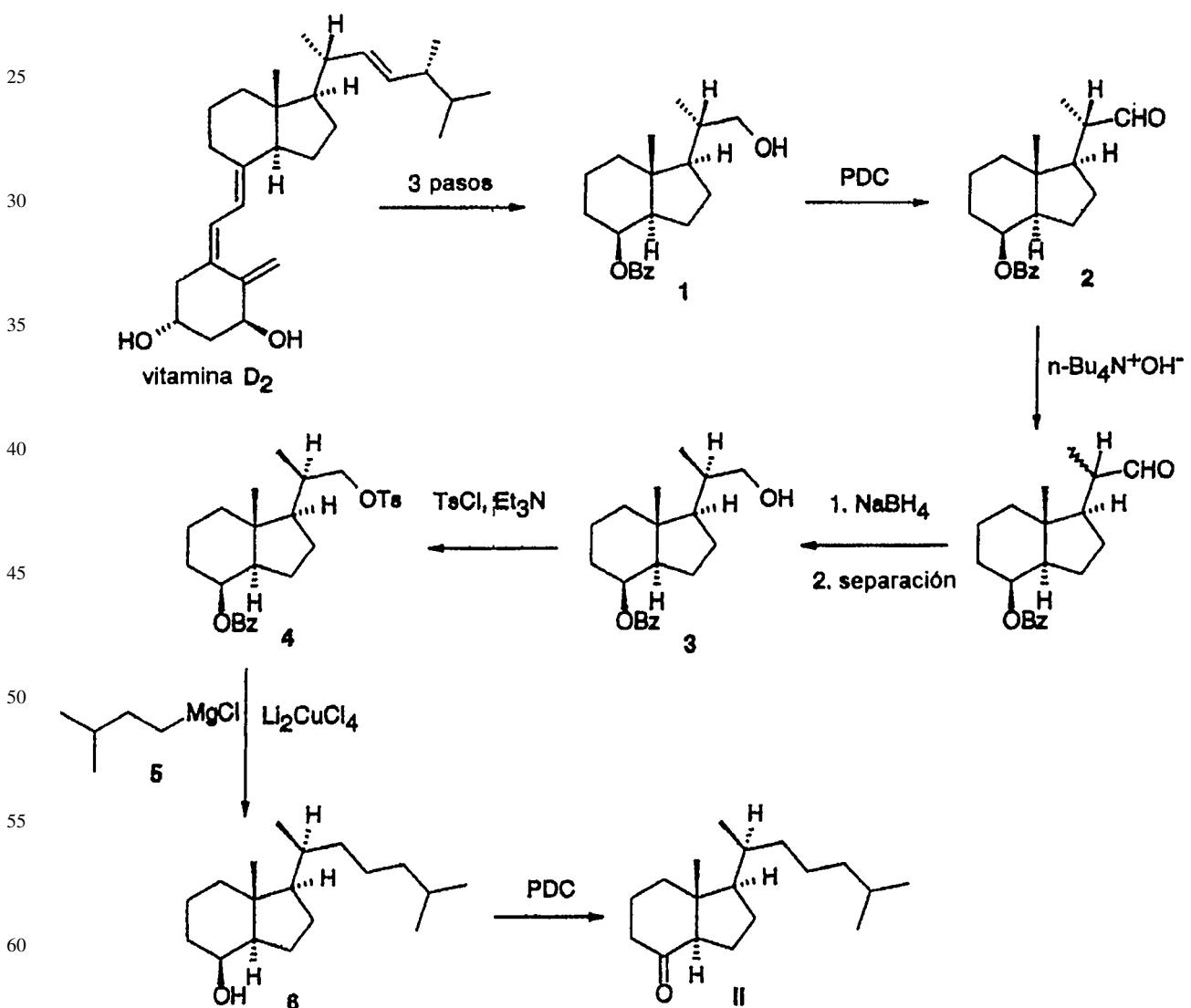
ES 2 314 190 T3

Ia: UV (en EtOH) λ_{max} 260,5, 250,5, 242,5 nm; ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{TMS}$) δ 6,37 y 5,82 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,1 Hz, 6- y 7-H), 3,96 (1H, m, w/2 = 14 Hz, 1 β -H), 3,61 (1H, m, w/2 = 20 Hz, 3 α -H), 2,80 (2H, m ancho, 9 β - y 10 α -H), 2,60 (1H, dd, J = 13,0, 4,5 Hz, 4 α -H), 2,22 (1H, d ancho, J = 12,8 Hz, 10 β -H), 2,13 (1H, t, J = 13,0 Hz, 4 β -H), 1,133 (3H, d, J = 6,8 Hz, 2 α -CH₃), 0,866 (6H, d, J = 6,6 Hz, 26- y 27-H₃), 0,833 (3H, d, J = 6,4 Hz, 21-H₃), 0,530 (3H, s, 18-H₃); MS (EI) m/z 402 (100, M⁺), 387 (4, M⁺ - Me), 384 (7, M⁺ - H₂O), 369 (3, M⁺ - Me - H₂O), 317 (24), 289 (60, M⁺ - C₈H₁₇), 271 (33), 259 (40), 247 (63); masa exacta calculada para C₂₇H₄₆O₂ 402,3498, hallada 402,3496.

Ib: UV (en EtOH) λ_{max} 260,5, 250,0, 242,0 nm; ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{TMS}$) δ 6,26 y 5,87 (1H y 1H, cada uno d, J = 11,3 Hz, 6-H y 7-H), 3,90 (1H, m, w/2 = 14 Hz, 3 α -H), 3,50 (1H, m, w/2 = 26 Hz, 1 β -H); 3,08 (1H, dd, J = 12,6, 4,3 Hz, 10 β -H), 2,80 (1H, dd, J = 12,5, 3,8 Hz, 9 β -H), 2,43 (1H, d ancho, J = approx. 14 Hz, 4 α -H), 2,34 (1H, dd, J = 13,9, 3,0 Hz, 4 β -H), 1,143 (3H, d, J = 6,8 Hz, 2 β -CH₃), 0,867 (6H, d, J = 6,6 Hz, 26- y 27-H₃), 0,839 (3H, d, J = 6,5 Hz, 21-H₃), 0,543 (3H, s, 18-H₃); MS (EI) m/z 402 (100, M⁺), 387 (8, M⁺ - Me), 384 (8, M⁺ - H₂O), 369 (5, M⁺ - Me - H₂O), 317 (42), 289 (88, M⁺ - C₈H₁₇), 271 (52), 259 (55), 247 (66); masa exacta calculada para C₂₇H₄₆O₂ 402,3498, hallada 402,3486.

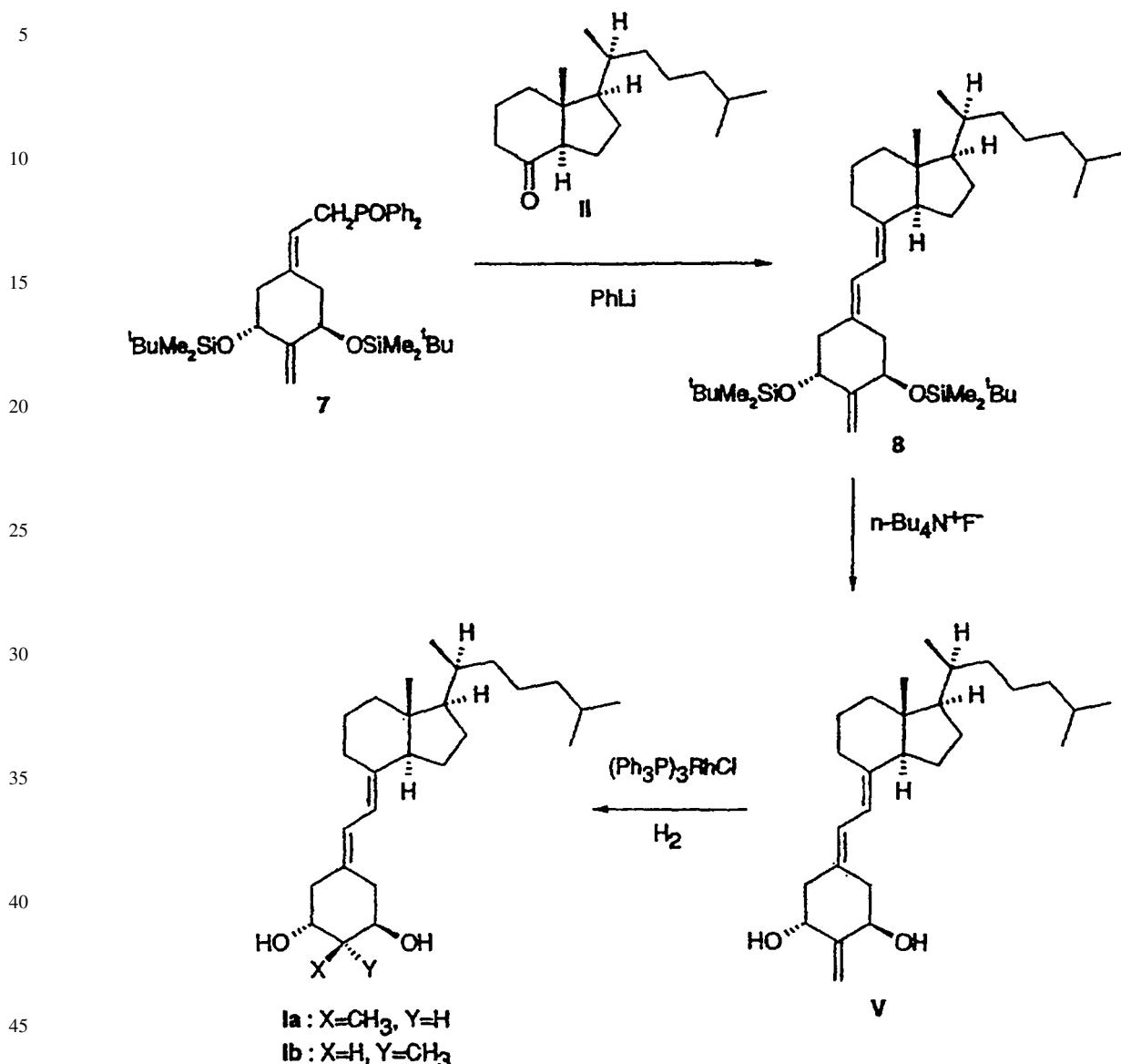
Esquema 1

20



65

Esquema 2



Actividad biológica de (20S)-1 α -hidroxi-2 α -metil y 2 β -metil-19-nor-vitamina D₃

La 2 β -metil-(20S)-1 α -hidroxivitamina D₃ no se fija al receptor de vitamina D, mientras que la 2 α -metil-(20S)-1 α -hidroxivitamina D₃ se fija al receptor, pero con una afinidad 100 veces inferior que la de 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25-(OH)₂D₃) (Figura 1). De esta actividad disminuida es responsable en gran medida la ausencia de un grupo 25-hidroxilo en estos compuestos (véase Eisman, J.A. y H.F. DeLuca, *Steroids* 30, 245-257, 1977). Es importante señalar que el derivado 2 α -metil es superior al análogo 2 β -metil en la fijación al receptor.

Sorprendentemente, la Figura 2 ilustra que la (20S)-1 α -hidroxi-2 α -metil-19-nor-vitamina D₃ es casi tan potente como 1,25-(OH)₂D₃ en la diferenciación de HL-60, lo que la hace un excelente candidato para el tratamiento de psoriasis y cáncer, especialmente contra leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata. Además, gracias a su actividad de diferenciación celular relativamente alta, este compuesto proporciona un agente terapéutico para el tratamiento de diversas afecciones cutáneas tales como arrugas, falta de adecuada hidratación dérmica, es decir piel seca, falta de adecuada firmeza de la piel, es decir piel flácida, e insuficiente secreción de sebo. Por tanto, el uso de estos compuestos no sólo da como resultado la hidratación de la piel, sino que mejora también la función de barrera de la piel. El derivado 2 β es 100 veces menos activo que 1,25-(OH)₂D₃, lo que le hace menos eficaz en estas áreas.

ES 2 314 190 T3

Los datos de la Tabla 1 muestran que la (20S)- 1α -hidroxi- 2α -metil-19-nor-vitamina D₃ tiene una elevada actividad en comparación con la de la 1,25-(OH)₂D₃, la hormona natural, en la estimulación del transporte intestinal de calcio. Además, la (20S)- 1α -hidroxi- 2β -metil-19-nor-vitamina D₃ tiene una actividad significativa en la estimulación del transporte intestinal de calcio, y su actividad es casi la misma que la de 1,25-(OH)₂D₃.

5 Los datos de la Tabla 1 demuestran también que la (20S)- 1α -hidroxi- 2α -metil-19-nor-vitamina D₃ tiene una actividad de movilización del calcio óseo superior, en comparación con la de 1,25-(OH)₂D₃. Además, la (20S)- 1α -hidroxi- 2β -metil-19-nor-vitamina D₃ tiene una actividad de movilización del calcio óseo significativa, y su actividad es casi la misma que 1,25-(OH)₂D₃.

10 Una característica muy importante de estos análogos es que se fijan escasamente o nada en absoluto al receptor de vitamina D, aunque tienen una actividad biológica superior o igual que la de 1,25-(OH)₂D₃. Esto sugiere que tales análogos son profármacos. Es decir, que probablemente son activados *in vivo* al ser hidroxilados en posición 25. Una vez hidroxilados en posición 25, son capaces de fijarse al receptor de vitamina D y proporcionar actividad. Estos 15 resultados sugieren que dichos compuestos podrían ser preferibles al fármaco final ya que son activados lentamente dentro del organismo, proporcionando una actividad más controlada y prolongada.

20 Así, los datos de la Tabla 1 ilustran que la (20S)- 1α -hidroxi- 2α -metil-19-nor-vitamina D₃ puede ser caracterizada por poseer una actividad calcémica significativa y muy potente, que es superior a la de 1,25-(OH)₂D₃, y que la (20S)- 1α -hidroxi- 2β -metil-19-nor-vitamina D₃ tiene también una actividad calcémica significativa y muy potente, que es aproximadamente la misma que la de 1,25-(OH)₂D₃.

25 La fijación competitiva de los análogos al receptor intestinal porcino se llevó a cabo por el método descrito por Dame y otros (*Biochemistry* 25, 4523-4534, 1986).

25 La diferenciación de promielocitos HL-60 a monocitos se determinó de la manera descrita por Ostrem y otros (*J. Biol. Chem.* 262, 14164-14171, 1987).

30 El transporte intestinal de calcio se determinó de la manera descrita por Perlman y otros (*Biochemistry* 29, 190-196, 1990).

Interpretación de los datos

35 Los ensayos *in vivo* para determinar el calcio sérico de ratas con una dieta baja en calcio proporcionan una estimación de la actividad osteoblástica u ósea de (20S)- 1α -hidroxi- 2α -metil-19-nor-vitamina D₃ y de (20S)- 1α -hidroxi- 2β -metil-19-nor-vitamina D₃. Los datos de la Tabla 1 muestran que la (20S)- 1α -hidroxi- 2α -metil-19-nor-vitamina D₃ es significativamente más potente que 1,25-(OH)₂D₃ para incrementar los niveles de calcio en el plasma a través de la estimulación de los osteoblastos. Al mismo tiempo, la actividad de la (20S)- 1α -hidroxi- 2α -metil-19-nor-vitamina D₃ sobre el transporte intestinal de calcio es también significativamente superior a la de 1,25-(OH)₂D₃ (Tabla 1). Por tanto, estos datos muestran que la (20S)- 1α -hidroxi- 2α -metil-19-nor-vitamina D₃ tiene una actividad significativa y muy potente sobre el hueso, que es superior a la de 1,25-(OH)₂D₃.

40 Los datos de la Tabla 1 también muestran que la (20S)- 1α -hidroxi- 2β -metil-19-nor-vitamina D₃ es sólo ligeramente menos potente que 1,25-(OH)₂D₃ en el incremento del calcio en el plasma a través de la estimulación de los osteoblastos. Al mismo tiempo, la actividad de la (20S)- 1α -hidroxi- 2β -metil-19-nor-vitamina D₃ sobre el transporte intestinal de calcio es aproximadamente la misma que la de 1,25-(OH)₂D₃ (Tabla 1). Por tanto, estos datos muestran que la (20S)- 1α -hidroxi- 2β -metil-19-nor-vitamina D₃ tiene una actividad significativa y muy potente sobre el hueso, aproximadamente igual a la de 1,25-(OH)₂D₃.

45 Los compuestos Ia y Ib presentan un perfil de actividad de actividad biológica deseado, y sumamente ventajoso. Estos compuestos se caracterizan por una actividad de transporte intestinal de calcio relativamente elevada, en comparación con la $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D₃, al tiempo que presentan también una actividad relativamente elevada, en comparación con la $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D₃, en su capacidad para movilizar el calcio desde el hueso. Por tanto, estos compuestos son altamente específicos en su actividad calcémica. Su actividad de movilización del calcio óseo y su actividad elevada o normal de transporte intestinal de calcio permite la administración *in vivo* de estos compuestos para el tratamiento de enfermedades óseas metabólicas en las cuales es una preocupación fundamental la pérdida de hueso. Gracias a su actividad calcémica sobre el hueso, estos compuestos serán agentes terapéuticos preferidos para el tratamiento de enfermedades en las cuales se desea la formación de hueso, tales como la osteoporosis, en especial la osteoporosis con bajo recambio óseo, la osteoporosis inducida por esteroides, la osteoporosis senil o la osteoporosis posmenopáusica, así como la osteomalacia.

50 La (20S)- 1α -hidroxi- 2α -metil-19-nor-vitamina D₃ y la (20S)- 1α -hidroxi- 2β -metil-19-nor-vitamina D₃ son mucho menos activas que 1,25-(OH)₂D₃ en su fijación al receptor de vitamina D (Figura 1), y ambas son sólo ligeramente menos activas que 1,25-(OH)₂D₃ en provocar la diferenciación del promielocito HL-60 para dar el monocito (Figura 65 2). Este resultado sugiere que tanto la (20S)- 1α -hidroxi- 2α -metil-19-nor-vitamina D₃ como la (20S)- 1α -hidroxi- 2β -metil-19-nor-vitamina D₃ serán muy eficaces en la psoriasis, ya que tienen una actividad celular directa para provocar la diferenciación celular y en la supresión del crecimiento celular. Ello indica también que ambas tendrán una actividad significativa como agentes anticancerosos, en especial contra leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de

ES 2 314 190 T3

próstata, así como contra afecciones cutáneas tales como piel seca (falta de hidratación dérmica), flacidez indebida de la piel (insuficiente firmeza de la piel), insuficiente secreción de sebo y arrugas. Estos resultados revelan también que tanto la (20S)- 1α -hidroxi- 2α -metil-19-nor-vitamina D₃ como la (20S)- 1α -hidroxi- 2β -metil-19-nor-vitamina D₃ serán excelentes candidatas para numerosas terapias en seres humanos, y que serán útiles en numerosas circunstancias 5 además el cáncer y la psoriasis, por ejemplo en enfermedades autoinmunitarias.

Se mantuvo a ratas Spague-Dawley machos, destetadas, con Diet 11 (0,47% de Ca) + AEK durante 11 días, seguida por Diet 11 (0,02% de Ca) + AEK durante 31 días. La administración (por vía intraperitoneal (i.p.) se inició 7 días antes del sacrificio). Las dosis se administraron sobre una base diaria, a intervalos de 24 horas. Se extirparon los primeros 10 cm del intestino, para los estudios del transporte intestinal, y se recogió el suero para los análisis de movilización de Ca óseo. En la Tabla 1 se indican los resultados.

TABLA 1

15 *Respuesta de actividad de transporte intestinal de calcio y de calcio sérico (movilización de calcio óseo) a dosis crónicas de 1,25-(OH)₂D₃ y de (20S)-1 α -hidroxi- 2α -metil-19-nor-vitamina D₃ y (20S)-1 α -hidroxi- 2β -metil-19-nor-vitamina D₃*

Compuesto	Cantidad (pmol/día)	Transporte de Ca S/M (media ± SEM)	Ca en suero (media ± SEM)
ninguno (testigo)	0	4,5 ± 0,40	4,4 ± 0,07
1 α ,25-(OH) ₂ D ₃	130	5,3 ± 0,42	5,0 ± 0,05
	260	6,5 ± 0,84	5,5 ± 0,16
(20S)-1 α -(OH)- 2α -metil-19-nor-D ₃	130	8,6 ± 0,90	10,0 ± 0,20
	260	6,7 ± 0,68	12,7 ± 0,15
(20S)-1 α -(OH)- 2β -metil-19-nor-D ₃	130	6,8 ± 0,73	4,8 ± 0,04
	260	5,7 ± 0,45	5,1 ± 0,04

*Los datos precedentes son la media y el error medio (SE) de 5 animales

40

Para los fines terapéuticos, los compuestos de esta invención definidos por las fórmulas Ia y Ib pueden formularse para aplicaciones farmacéuticas en forma de disolución en disolventes inocuos, o en forma de emulsión, suspensión o dispersión en disolventes o vehículos apropiados, o en forma de píldoras, comprimidos o cápsulas, junto con vehículos sólidos, de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica. Cualquiera de estas formulaciones puede contener también otros excipientes farmacéuticamente aceptables y no tóxicos tales como estabilizantes, antioxidantes, aglutinantes, agentes colorantes o agentes emulsionantes o modificadores del sabor.

50 Los compuestos se pueden administrar por vía oral, tópica, parenteral o transdérmica. Los compuestos se administran ventajosamente por inyección o por infusión intravenosa de disoluciones estériles adecuadas, o en forma de dosis líquidas o sólidas a través del tubo digestivo, o en forma de cremas, pomadas, parches, o vehículos similares adecuados para aplicaciones transdérmicas. Las dosis de 0,01 μ g a 100 μ g de los compuestos por día son apropiadas para fines terapéuticos, y dichas dosis se ajustan a la enfermedad que se está tratando, a su gravedad y a la respuesta del paciente, como es bien conocido en la técnica. Como los compuestos presentan especificidad de acción, cada uno 55 de ellos puede ser administrado, de manera conveniente, solo o junto con dosis adecuadas de otro compuesto activo de vitamina D, por ejemplo 1 α -hidroxivitamina D₂ ó D₃, en situaciones en donde resulten ventajosos distintos grados de movilización mineral del calcio y de estimulación del transporte del calcio.

60 Las composiciones para uso en los tratamientos antes mencionados comprenden una cantidad eficaz de (20S)-1 α -hidroxi- 2α -metil-19-nor-vitamina D₃ o de (20S)-1 α -hidroxi- 2β -metil-19-nor-vitamina D₃ tales como se definen por las fórmulas Ia y Ib precedentes, como ingrediente activo, y un vehículo adecuado. Una cantidad eficaz de dichos compuestos para uso de acuerdo con la presente invención se sitúa en el intervalo de aproximadamente 0,01 μ g a aproximadamente 100 μ g por gramo de composición, y se puede administrar por vía tópica, transdérmica, oral o parenteral, en dosis desde aproximadamente 0,01 μ g/día hasta aproximadamente 100 μ g/día.

65

Los compuestos se puede formular en cremas, lociones, pomadas, parches tópicos, píldoras, cápsulas o comprimidos, o en formas líquidas tales como soluciones, emulsiones, dispersiones, o suspensiones en disolventes o aceites

ES 2 314 190 T3

farmacéuticamente inocuos y aceptables, y dichas preparaciones pueden contener, además, otros componentes farmacéuticamente inocuos o beneficiosos, tales como estabilizantes, antioxidantes, emulsionantes, agentes colorantes, aglutinantes o agentes modificadores del sabor.

- 5 Los compuestos se administran ventajosamente en cantidades suficientes para provocar la diferenciación de promielocitos para dar macrófagos normales. Las dosis tales como las descritas con anterioridad son adecuadas, entendiendo que las cantidades administradas deben ajustarse a la gravedad de la enfermedad, el estado y la respuesta del paciente, como es bien conocido en la técnica.
- 10 Las formulaciones de la presente invención 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 demás ingredientes de las formulaciones y no perjudiciales para el receptor de las mismas.
- 15 Las formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración por vía oral pueden estar en forma de unidades discretas tales como cápsulas, sellos, comprimidos o pastillas, que contienen cada una cantidad predeterminada de ingrediente activo; en forma de polvos o gránulos; en forma de una disolución o suspensión en un líquido acuoso o en un líquido no acuoso; o en forma de una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite.
- 20 Las formulaciones para la administración por vía rectal pueden encontrarse en forma de un supositorio que contiene el ingrediente activo y un vehículo tal como manteca de cacao, o bien en forma de un enema.
- Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente una preparación oleosa o acuosa estéril del ingrediente activo, que preferiblemente es isotónica con la sangre de quien la recibe.
- 25 Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas tales como linimentos, lociones, aplicaciones, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite tales como cremas, pomadas o pastas; o bien soluciones o suspensiones tales como gotas; o bien nebulizaciones.
- 30 Para el tratamiento del asma o la inhalación de un polvo, se pueden emplear formulaciones autopropelentes o en nebulización, dispensadas con un envase a presión para nebulizaciones, un nebulizador o un atomizador. Cuando se han dispersado, las formulaciones tienen preferiblemente un tamaño de partícula dentro del intervalo de 10 a 100 μm .
- 35 Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria, y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Con la expresión "forma de dosificación unitaria" se quiere significar una dosis unitaria, es decir, única, que se puede administrar a un paciente en forma de una dosis unitaria física y químicamente estable que comprende el ingrediente activo, como tal o en forma de una mezcla del mismo con diluyentes o vehículos farmacéuticos sólidos o líquidos.

40

45

50

55

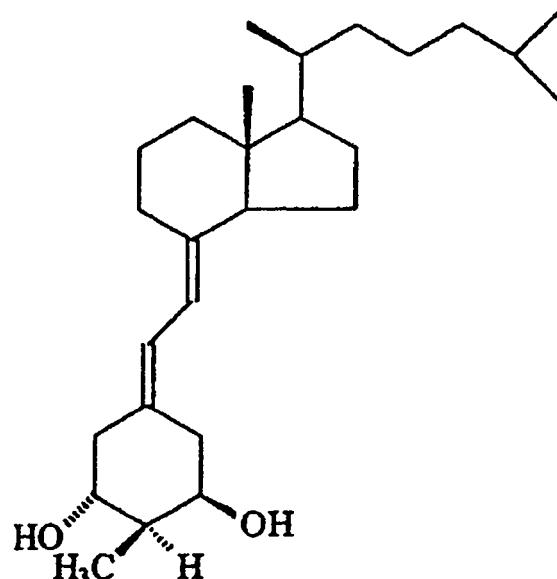
60

65

REIVINDICACIONES

1. (20S)-1 α -Hidroxi-2 α -metil-19-nor-vitamina D₃ que tiene la fórmula:

5



10

15

20

25

30

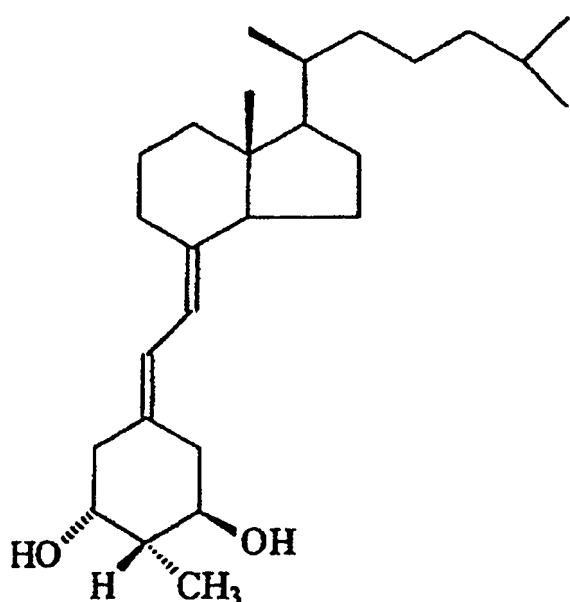
2. (20S)-1 α -Hidroxi-2 β -metil-19-nor-vitamina D₃ que tiene la fórmula:

35

40

45

50



55

3. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, para uso en el tratamiento de psoriasis.

4. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata.

60

5. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de esclerosis múltiple, lupus, diabetes sacarina, rechazo de huésped contra injerto, y rechazo de trasplantes de órganos.

65

6. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria seleccionada de artritis reumatoide, asma y enfermedades inflamatorias del intestino.

7. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, para uso en el tratamiento de una afección cutánea seleccionada de arrugas, falta de adecuada firmeza de la piel, falta de adecuada hidratación dérmica, e insuficiente secreción de sebo.

ES 2 314 190 T3

8. Un compuesto según la reivindicación 1 ó 2, para uso en el tratamiento de una enfermedad ósea metabólica donde se desea mantener o incrementar la masa ósea.

5 9. Uso de una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de psoriasis.

10 10. Uso de una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata.

11. Uso de una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada de esclerosis múltiple, lupus, diabetes sacarina, rechazo de huésped contra injerto, y rechazo de trasplantes de órganos.

15 12. Uso de una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria seleccionada de artritis reumatoide, asma y enfermedades inflamatorias del intestino.

20 13. Uso de una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección cutánea seleccionada de arrugas, falta de adecuada firmeza de la piel, falta de adecuada hidratación dérmica, e insuficiente secreción de sebo.

25 14. Uso de una cantidad eficaz de un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad ósea metabólica donde se desea mantener o incrementar la masa ósea.

15. El uso según la reivindicación 9 ó 13, en donde el medicamento es adecuado para la administración por vía oral, parenteral, transdérmica o tópica.

30 16. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 ó 14, en donde el medicamento es adecuado para la administración por vía oral, parenteral o transdérmica.

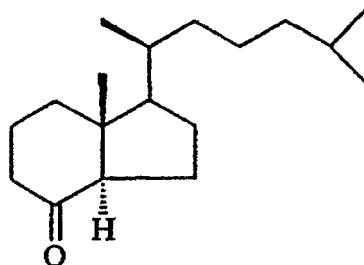
17. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, adecuado para la administración en una pauta de 0,01 $\mu\text{g}/\text{día}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{día}$.

35 18. El uso según la reivindicación 14, en donde la enfermedad es osteoporosis senil, osteoporosis posmenopáusica, osteoporosis inducida por esteroides, osteoporosis con bajo recambio óseo, u osteomalacia.

19. Un compuesto que tiene la fórmula:

40

45



50

55

60

65

Fijación competitiva - PINÉ

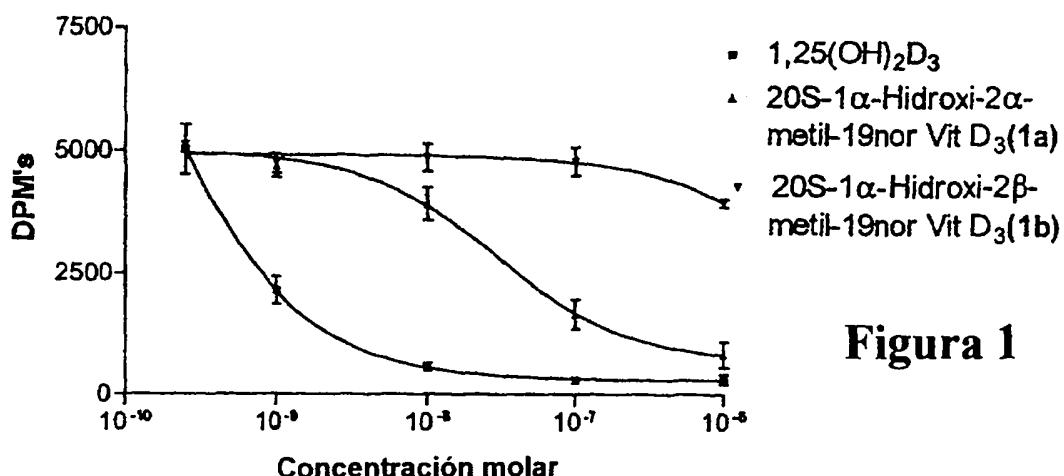


Figura 1

Diferenciación de células HL-60

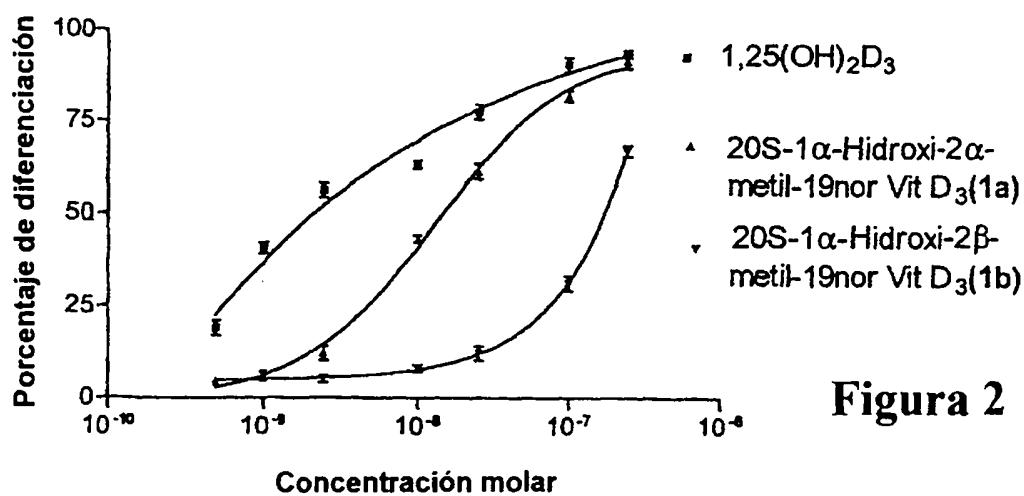


Figura 2