

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 99.998

REQUERENTE: LUNAR CORPORATION, norte-americana, industrial, com sede em 313 West Beltine Highway Madison, Wisconsin 53713, Estados Unidos da América do Norte

EPÍGRAFE: "MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO E UTILIZAÇÃO DA 1 α , 24-DI-HIDROXI-VITAMINA D₂"

INVENTORES: CHARLES W. BISHOP, JOYCE C. KNUTSON; ROBERT M. MORIARTY e RAJU PENMASTA

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

8 de Janeiro de 1991 No.07/637,867, nos Estados Unidos da América do Norte

99.998



"MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO E UTILIZAÇÃO DA 1 α ,24-DI-HIDROXI-VITAMINA D₂"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito à 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D₂ e à sua utilização para a preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de doenças induzidas pela deficiência em vitamina D, da osteodistrofia renal, de perturbações da pele, e de perturbações depletivas dos ossos.

O presente invento refere ainda as composições farmacêuticas profiláticas ou terapêuticas contendo este composto, o método de tratamento que os utiliza, bem como o processo para a preparação do referido composto a partir do ergosterol, através de uma série de reacções sucessivas. É ainda objecto do invento um alimento para mamíferos que utiliza o referido composto.

CAMPO TÉCNICO

Este invento diz respeito a compostos de vitamina D_2 biologicamente activos. Mais especificamente, este invento diz respeito ao metabolito natural, hormonalmente activo, $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 , e aos métodos para a preparação deste metabolito. Este invento diz também respeito a uma composição farmacêutica, a qual inclui uma quantidade farmacêuticamente eficaz de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 , e a um método para controlar o metabolismo anormal do cálcio por meio da administração de uma quantidade farmacêuticamente eficaz do composto.

ANTECEDENTES DO INVENTO

A vitamina D e os seus metabolitos activos são conhecidos como sendo importantes na regulação do metabolismo do cálcio em animais e humanos. A forma de vitamina D que ocorre naturalmente em animais e humanos é a vitamina D_3 . Tem sido mostrado que em animais, incluindo humanos, a vitamina D_3 é activada através do facto de ser hidroxilada na posição C_{25} no fígado, seguido pela hidroxilação em 1α no rim de modo a produzir a hormona $1\alpha,25$ -di-hidroxi-vitamina D_3 [$1,25-(OH)_2D_3$]. Ver patente dos E.U.A. No. 3 880 894. A via fisiológica principal para o catabolismo dos metabolitos da vitamina D_3 , 25-hidroxi-vitamina D_3 e $1,25-(OH)_2D_3$ é iniciada pela oxidação em C_{24} . Ver Holick, M.F., Kleiner-Bossalier, A., Schnoes, H.K., Karsten, P.M., Boyle, I.T., e DeLuca., H.F., J. Biol. Chem., 248, 6691-6696 (1973).

A vitamina D_2 é a forma principal, que ocorre naturalmente, da vitamina D encontrada em plantas. A vitamina D_2 difere estruturalmente da vitamina D^3 no facto da vitamina D_2 ter um grupo metilo em C_{24} e ter uma dupla ligação entre C_{22} e C_{23} .

Pouco depois da sua descoberta, pareceu evidente que a vitamina D_3 e a vitamina d_2 possuíam actividade biológica semelhante, se não equivalente. Tem-se também vulgarmente acreditado que o metabolismo (i.e., a activação e catabolismo) da vitamina D_2 era o mesmo da vitamina D_3 . Ver Harrison's Principles of Internal Medicine: Parte sete, "Disorders of Bone and Mineral Metabolism: Capítulo 35", em E. Braunwald, K.J. Isselbacher, R.G. Petersdorf, J.D. Wilson., J.B. Martin e H.S. Fauci (eds.), Calcium, Phosphorus and Bone Metabolism: Calcium Regulating Hormones, McGraw-hill, New York, pág. 1860-1865. Relativamente a isto, acredita-se que a forma activa da vitamina D_2 seja $1\alpha,25$ -di-hidroxi-vitamina D_2 [$"1,25-(OH)_2D_2"$]. Para além disso são conhecidos derivados 24-hidroxi de 25-hidroxi-vitamina D_2 e de $1,25-(OH)_2D_2$, isto é, 24,25-di-hidroxi-vitamina D_2 e $1\alpha,24,25$ -tri-hidroxi-vitamina D_2 , sugerindo que o catabolismo da vitamina D_2 , semelhantemente ao da vitamina D_3 , se processa através do mesmo passo de oxidação em C_{24} . Ver Jones, G., Rosenthal, D., Segev, D., Mazur, Y., Frolow, F., Halfon, Y., Robinavich, D. e Shakked, Z., Biochemistry, 18:1094-1101 (1979).

Foi recentemente descoberto, contudo, que um análogo activo de vitamina D_2 , 1α -hidroxi-vitamina D_2 [$"1\alpha-(OH)D_2"$] possui propriedades farmacológicas distintamente diferentes das exibidas pelo seu análogo correspondente de vitamina D_3 , 1α -hidroxi-vitamina D_3 [$"1\alpha-(OH)D_3"$]. O pedido de Patente dos E.U.A. No. 07/569 412, cedido em comum com o presente pedido de patente, revela que a $1\alpha-(OH)D_2$ pode inverter a perda de massa óssea em pacientes humanos osteoporóticos quando administrada em dosagens de $2,0 \mu\text{g}/\text{dia}$ ou superiores. Devido à toxicidade, níveis de dosagem de $2 \mu\text{g}/\text{dia}$ ou maiores não são obtidos, com segurança, com a $1\alpha-(OH)D_3$.

Essas propriedades farmacológicas distintas podem ser explicadas pela presente descoberta dos inventores que dosagens farmacológicas de 1α -(OH) D_2 administradas a humanos são metabolizadas em parte em $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 [$1\alpha,24$ -(OH) $_2D_2$] biologicamente activa. Como explicado com mais pormenor a seguir, a hidroxilação na posição 24 do carbono da molécula de vitamina D_2 1-hidroxilada, representa uma via de activação peculiar para a molécula de vitamina D_2 .

Embora a $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_3 [$1\alpha,24$ -(OH) $_2D_3$] tenha sido sintetizada quimicamente (Patente dos E.U.A. No. 4 022 891), não demonstrou ser um composto natural em sistemas biológicos. Para além disso, os inventores presentes descobriram que a $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_2$ possui actividade biológica distintamente diferente da exibida pela $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_3$. Por exemplo, Ishizuka et al., descobriram que a $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_3$ se liga ao local receptor de $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$ mais firmemente do que a própria $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$. Ver Ishizuka, S., Bannai, K., Naruchi, T. e Hashimoto, Y., Steroids, 37:1,33-42 (1981); Ishizuka S., Banai, K., Naruchi, T. e Hashimoto, Y., Steroids, 39:1,53-62 (1982). Utilizando um ensaio semelhante, os presentes inventors descobriram que a $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_2$ é duas vezes menos competitiva na ligação ao local receptor da $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_3$ do que a $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_3$. Os presentes inventores descobriram também que a $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_2$ mostra uma afinidade de ligação relativamente fraca para a proteína do sangue de ligação ao soro da vitamina D, o que é uma evidência de um semi-vida bastante curta indicativa de toxicidade baixa.

Os presentes inventores demonstraram a presença de $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_2$ circulante em humanos a quem foi administrada 1α -(OH) D_2 . Isto indica que em animais e no homem, a vitamina D_2 é metabolizada naturalmente em ambas as $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_2$ e $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_2$. A proporção relativa das duas hormonas vitamina D_2

parece variar de acordo com o precursor e com a quantidade de precursor apresentado à via C_{24} . Deste modo, parece que à medida que as dosagens de $1\alpha-(OH)D_2$ aumentam, a proporção de $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ para $1\alpha,25-(OH)_2D_2$ aumenta.

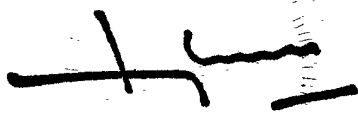
Estes resultados, que são apresentados com mais pormenor mais adiante, indicam que a $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ possui a característica desejável de actividade biológica elevada com toxicidade baixa. O facto da $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ ser um metabolito significativo quando são administrados níveis farmacológicos de $1\alpha-(OH)D_2$ indica que a $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ pode ser a causa dos efeitos farmacológicos desejáveis da $1\alpha-(OH)D_2$ e ser uma droga terapêutica útil para o tratamento de vários tipos de perturbações que envolvem o metabolismo do cálcio.

SUMÁRIO DO INVENTO

O invento proporciona a $1\alpha,24-(OH)_2D_2$, a qual é uma forma bioactiva de vitamina D_2 . A hormona pode ser também referida como $1\alpha,24$ -di-hidroxi-ergocalciferol e é representada pela estrutura apresentada, mais adiante, nesta Memória Descritiva. O composto possui uma actividade biológica potente e uma remoção sistémica rápida, o que indica toxicidade baixa.

O invento abrange também um novo método para a produção de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 , o qual implica a utilização de ergosterol como material de partida, a formação de 24-hidroxi-vitamina D_2 e, em seguida, a hidroxilação em 1α do composto 24-hidroxi. No decurso desta síntese, são também produzidos novos intermediários.

O composto deste invento é útil no tratamento de várias doenças caracterizadas pela deficiência em vitamina D e várias



perturbações depletivas dos ossos, em particular no tratamento sem a incidência concomitante de hipercalcemia ou hipercalúria. Os compostos do invento são vantajosamente utilizados como compostos activos de composições farmacêuticas para doenças provocadas por deficiência em vitamina D, para inverter ou prevenir a perda de massa óssea ou do conteúdo mineral dos ossos em pessoas predispostas a desenvolver tal perda, e para estabilizar a densidade óssea em pessoas que sofrem de osteodistrofia renal.

O composto do invento é também útil como agente tópico para o tratamento de certas perturbações da pele. O composto do invento é vantajosamente utilizado como ingrediente activo para composições tópicas, as quais podem também incluir outros agentes capazes de melhorar as perturbações da pele.

Outras vantagens e uma apreciação mais completa das adaptações específicas, variações composicionais, e atributos físicos e químicos do presente invento, serão visualizados após um exame da descrição detalhada que se segue do invento, tomada em conjunto com os desenhos que a acompanham.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

O presente invento irá ser descrito, mais adiante, nesta Memória Descritiva, em conjunção com os desenhos apensos, em que, em toda a parte, designações semelhantes se referem a elementos semelhantes e nos quais:

A Figura 1 ilustra os passos preparativos para a síntese da 24-hidroxi-vitamina D₂; e

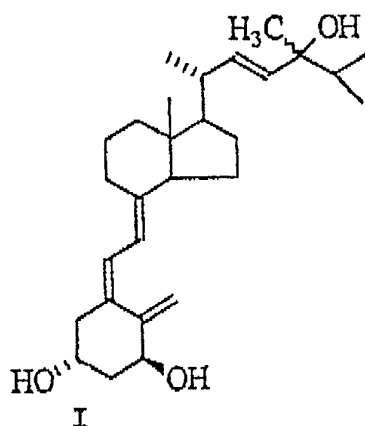
A Figura 2 ilustra os passos preparativos para a síntese da 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D₂ a partir da 24-hidroxi-vitamina D₂.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA

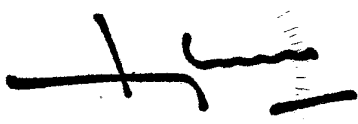
O presente invento proporciona a 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D₂ [1 α ,24-(OH)₂D₂] sintética.

Tal como utilizados nesta Memória Descritiva, os termos "actividade biológica", "bioactivo" ou "biopotente", têm por finalidade referir-se a propriedades bioquímicas de compostos tais como as que afectam o metabolismo, por exemplo as que afectam a concentração de cálcio no soro, ou a ligação a uma proteína receptora apropriada, por exemplo a ligação à proteína receptora de vitamina D.

Num dos seus aspectos, o invento abrange o composto biologicamente activo de fórmula geral (I):



Noutro aspecto, o invento envolve a preparação do composto de fórmula (I). A síntese da 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina

 D_2 é levda a cabo de acordo com o esquema apresentado nas Figuras 1 e 2. Como se vê na Figura 1, a síntese utiliza ergosterol como material de partida. O ergosterol é convertido em 24-hidroxi-ergosterol (5,7,22-ergostatrieno-3 β ,24-diol (7)) por meio de um processo em seis passos. O 24-hidroxi-ergosterol é em seguida irradiado e convetido termicamente através de métodos bem conhecidos nesta técnica de modo a obter-se a 24-hidroxi-vitamina D_2 . Como se vê na Figura 2, a 24-hidroxi-vitamina D_2 é em seguida hidroxilada num processo em seis passos de modo a obter-se a 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D_2 , utilizando um procedimento semelhante ao descrito por Paaren, et al., J. Org. Chem., vol 45, p. 3253 (1980).

Especificamente, o ergosterol é acetilado de modo a formar o 3 β -acetato (2). É em seguida formado um aducto (3) com o anel B da estrutura ergosterol por meio de reacção do 3 β -acetato com uma triazolidinodiona. O aducto (3) é em seguida ozonado a fim de truncar a cadeia lateral de modo a formar um aldeído em C-21 (4). A cadeia lateral 'e restabelecida por meio de reacção do aldeído resultante com o composto ceto apropriado de modo a obter-se a 24-enona (5). A enona é em seguida convertida no aducto 24-metilo, 3 β ,24-di-hidroxi (6). Este aducto é em seguida feito reagir com um hidreto de alumínio e lítio de modo a desproteger o aducto e a produzir o 24-hidroxi-ergosterol (7). O 24-hidroxi-ergosterol é em seguida irradiado e tratado termicamente de modo a formar a 24-hidroxi-vitamina D_2 . A 24-hidroxi-vitamina D_2 é em seguida tosilada de modo a obter-se o 3 β -tosilato da 24-hidroxi-vitamina D_2 . O tosilato é deslocado por solvólise de modo a obter-se a 6-metoxi-24-hidroxi-3,5-ciclovitamina D_2 . A ciclovitamina D_2 é sujeita a oxidação alílica de modo a formar o derivado 1 α ,24-di-hidroxi-ciclovitamina. O derivado 1 α ,24-di-hidroxi-ciclovitamina é sequencialmente solvolisado e sujeito a uma reacção do tipo Diels-Alder, a qual remove

o grupo 6-metoxi e separa a $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 (5,6-cis) da 5,6-trans- $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 .

O composto do invento em vários campos clínicos e veterinários, e é particularmente útil para o tratamento do metabolismo anormal do cálcio e do fósforo. Especificamente, o composto de fórmula (I) é destinado a ser utilizado, por exemplo, para estimular a actividade osteoblástica, como medido pelos níveis de osteocalcina no soro. A osteocalcina é uma das principais proteínas na matriz dos ossos. O composto de fórmula (I) liga-se à proteína de ligação ao soro da vitamina D de modo mais fraco do que se liga a $1,25-(OH)_2D_3$, indicativo de uma remoção rápida e de baixa toxicidade, o que melhora as suas propriedades farmacêuticas.

Num outro aspecto, o invento inclui um método para controlar o metabolismo do cálcio, tal como para o tratamento do metabolismo anormal do cálcio causado, por exemplo, por insuficiência hepática, insuficiência renal, insuficiência gastrointestinal, etc. Os compostos de fórmula (I) podem ser utilizados para tratar profilactica ou terapeuticamente doenças causadas por deficiência em vitamina D e doenças relacionadas, por exemplo, osteodistrofia renal, esteatorreia, osteomalacia, raquitismo resistente à vitamina D hipofosfatémico, osteoporose, incluindo osteoporose pós-menopausa, osteoporose senil, osteoporose induzida por esteroides, e outros estados de doença característicos da perda de massa óssea, raquitismo (dependente da vitamina D) de pseudodeficiência, raquitismo nutricional e de má absorção, osteomalacia e osteopenias secundárias ao hipoparatiroidismo, hipoparatiroidismo pós-cirúrgico, hipotiroidismo idiopático, pseudoparatiroidismo, e alcoolismo.

A 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D₂ é também valiosa para o tratamento de perturbações hiperproliferativas da pele tais como psoríase, eczema, falta de firmeza adequada da pele, hidratação da pele e secreção de sebo.

O composto de fórmula (I) é útil como composto activo em composições farmacêuticas possuindo efeitos secundários reduzidos e baixa toxicidade quando comparadas com os análogos conhecidos de formas activas de vitamina D₃, quando aplicadas, por exemplo, a doenças induzidas pelo metabolismo anormal do cálcio. Estas composições farmacêuticas constituem outro aspecto do invento.

O composto farmacologicamente activo deste invento pode ser processado de acordo com métodos convencionais em farmácia de modo a produzirem-se agentes medicinais para administração a pacientes, por exemplo, a mamíferos incluindo humanos. Por exemplo, o composto de fórmula (I) pode ser empregado em mistura com excipientes convencionais, por exemplo, substâncias veículo farmaceticamente aceitáveis para aplicação entérica (por exemplo, oral), parentérica, ou tópica, que não reajam de modo prejudicial com o composto activo.

Veículos aceitáveis farmaceticamente adequados incluem, mas não estão limitados a, água, soluções salinas, álcoois, goma arábica, óleos vegetais (por exemplo, óleo de amêndoas, óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de amendoim, azeite, óleo de coco), óleo mineral, óleos de fígados de peixes, ésteres oleosos tal como Polysorbate 80, polietileno-glicóis, gelatina, hidratos de carbono (por exemplo, lactose, amilose e amido), estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, monoglicerídeos e diglicerídeos de ácidos gordos, ésteres de

ácidos gordos de pentaeritritol, hidroximetil-celulose, polivinil-pirrolidona, etc.

As preparações farmacêuticas podem ser esterilizadas e, se for desejado, ser misturadas com agentes auxiliares, por exemplo, lubrificantes, conservantes, estabilizadores, agentes molhantes, emulsionantes, sais para influenciar a pressão osmótica, tampões, corantes, aromatizantes e/ou um ou mais outros compostos activos, por exemplo, vitamina D₃ e seus metabolitos 1 α -hidroxilados, estrogénios conjugados ou seus equivalentes, anti-estrogénios, calcitonina, bifosfonatos, suplementos de cálcio, cobalamina, toxina da tosse convulsa e boro.

Para aplicação parentérica, são particularmente adequadas soluções injectáveis, estéreis, de preferência soluções oleosas ou aquosas, bem como suspensões, emulsões, ou implantes, incluindo supositórios. A administração parentérica inclui adequadamente a injeção subcutânea, intramuscular, ou intravenosa, a absorção nasofaríngea ou mucósica, ou absorção transdérmica. As ampolas são unidades de dosagem convenientes.

Para aplicação entérica, são particularmente adequados os comprimidos, drageias, líquidos, gotas, supositórios, pastilhas, pós, ou cápsulas. Pode ser utilizado um xarope, elixir ou análopes se for desejado um veículo edulcorado.

Para aplicação tópica, podem ser empregadas formas não pulverizáveis viscosas, semi-sólidas ou sólidas, as quais incluem um veículo compatível com a administração tópica e tendo uma viscosidade dinâmica de preferência superior à da água, por exemplo, óleo mineral, óleo de amêndoas, cera de abelhas auto-emulsionável, óleo vegetal, parafina mole branca, e propileno-glicol. As formulações adequadas incluem, mas não estão

limitadas a, cremes, pomadas, loções, soluções, suspensões, emulsões, pós, linimentos, unguentos, aerossóis, emplastos transdérmicos, etc., os quais são, se desejado, esterilizados ou misturados com agentes auxiliares, por exemplo, conservantes, estabilizadores, desemulsionantes, agentes molhantes, etc. Uma preparação de creme de acordo com o presente invento inclui, adequadamente, por exemplo, mistura de água, óleo de amêndoas, óleo mineral e cera de abelhas auto-emulsionável; uma preparação de pomada inclui, adequadamente, por exemplo, óleo de amêndoas e parafina mole branca; e uma preparação de loção inclui, adequadamente, por exemplo, propileno-glicol seco.

As preparações tópicas do composto de acordo com presente invento úteis para o tratamento de perturbações da pele podem também incluir agentes indutores de epitelialização tais como retinoides (por exemplo, vitamina A), cromanois tais como vitamina E, β -agonistas tais como isoproterenol, ou monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), agentes anti-inflamatórios tais como corticosteroides (por exemplo, hidrocortisona ou o seu acetato, ou dexametasona) e agentes ceratoplásticos tais como alcatrão mineral ou antralina. As quantidades eficazes de tais agentes são, por exemplo, cerca de 0,003 a cerca de 0,3% de vitamina A, em peso da composição; cerca de 0,1 a cerca de 10% de vitamina E; cerca de 0,1 a cerca de 2% de isoproterenol; cerca de 0,1 a cerca de 1% de cAMP; cerca de 0,25 a cerca de 5% de hidrocortisona; cerca de 0,1 a cerca de 20% de alcatrão mineral; e cerca de 0,05 a cerca de 2% de antralina.

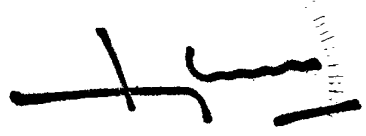
Para administração rectal, o composto é formado numa composição farmacêutica contendo uma base para supositórios, tal como óleo de cacau e outros triglicerídeos. Para prolongar a vida em armazenamento, a composição inclui, vantajosamente, um

anti-oxidante tal como ácido ascórbico, hidroxianisole butiladoi ou hidroquinona.

Para o tratamento das perturbações metabólicas do cálcio, é preferida a administração oral das composições farmacêuticas do presente invento. Geralmente, o composto deste invento é distribuído por meio de uma forma de dosagem unitária, que compreende cerca 0,5 μg a cerca de 25 μg num veícul farmacêuticamente aceitável por dosagem unitária. A dosagem do composto de acordo com este invento, situa-se geralmente entre cerca de 0,01 e cerca de 1,0 $\mu\text{g/kg/dia}$, de preferência entre cerca de 0,04 e cerca de 0,3 $\mu\text{g/kg/dia}$.

Para tratamento tópico de perturbações da pele, a dosagem do composto do presente invento, numa composição tópica, situa-se geralmente entre cerca de 0,01 μg e cerca de 10 μg por grama de composição.

É de ter em consideração que a quantidades preferidas reais de composto activo num caso específico variarãode acordo com o composto específico utilizado, as composições específicas formuladas, o modo de aplicação, e o local e organismo particulares a serem tratados. Por exemplo, a dose específica para um paciente particular depende da idade, peso do corpo, estado geral de saúde e sexo, da dieta, da altura e modo de administração, da taxa de excreção, e dos medicamentos utilizados em combinação e da gravidade da perturbação particular à qual a terapia é aplicada. As dosagens para um determinado hospedeiro podem ser determinadas utilizando considerações convencionais, por exmplo, por comparação usual das actividades diferenciais dos compostos sujeitos a apreciação e de um composto conhecido, tal como por meio de um protocolo farmacológico convencional apropriado.



Ainda num outro aspecto, o composto do presente invento pode também ser vantajosamente utilizado em composições veterinárias, por exemplo, composições alimentares para animais domésticos para tratar ou prevenir a hipocalcemia. Geralmente, o composto do presente invento é distribuído no alimento para a animais, de tal modo que o consumo normal de tal alimento proporcione ao animal cerca de 0,01 a cerca de 1,0 $\mu\text{g/kg/dia}$.

Os exemplos que se seguem destinam-se a uma finalidade meramente ilustrativa, e não limitativa da parte restante da descoberta seja de que maneira for. Nos exemplos que se seguem, os espectros de ressonância magnética nuclear de prótons (^1H RMN) foram registados com um Brucker AM-400 (400 MHz) com expressão de Computador 3000 em soluções de CDCl_3 como padrão interno. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm. Os espectros de ultravioletas são registados com um Espectrofotômetro Hitachi U-2000 e são referidos a soluções de etanol.

Geração, purificação e identificação da $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ em células de fígado humano incubadas com $1\alpha-(OH)D_2$

Exemplo 1

A $1\alpha-(OH)D_2$ substancialmente pura foi obtida a partir de Bone Care International, Inc. of Madison, Wisconsin. A $1\alpha-(OH)D_2$ foi cultivada com células Hep 3B, derivadas de um hematoma humano utilizando métodos conhecidos nesta técnica.

O extractos lípidos foram gerados por meio de métodos conhecidos e foram sujeitos a cromatografia líquida de de pressão elevada (HPLC) sobre Zorbax SIL desenvolvida com hexano/isopropanol/metanol (91:7:2)). O metabolito putativo $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ elui entre a $1\alpha-(OH)D_2$ progenitora e a $1,25-(OH)_2D_2$ padrão (também obtida a partir de Bone Care International, Inc. of Madison, Wisconsin). A $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ foi posteriormente purificada por meio deste sistema de HPLC antes da identificação do metabolito ter sido levada a cabo utilizando análise de espectrometria de massa.

O metabolito purificado era mais polar do que o material de partida, $1\alpha-(OH)D_2$, e deste modo concluiu-se experimentalmente que era um metabolito di-hidroxi-vitamina D_2 . Este metabolito possuía também o cromóforo da vitamina D, o que indicava a retenção do sistema cis-trieno da vitamina D. Visto que o metabolito era derivado da $1\alpha-(OH)D_2$, a sua estura era, por conseguinte, $1\alpha,X-(OH)_2D_2$.

O derivado trimetilsililo da $1\alpha,X-(OH)_2D_2$ foi preparado de acordo com métodos conhecidos nesta técnica e a espectrometria de massa foi levada a cabo sobre o derivado TMS e o composto nativo. O derivado TMS foi analisado por meio de CG-EM, e a

identificação foi principalmente derivada da interpretação do padrão de fragmentação do piro-metabolito. O íon molecular possuía a m/z de 644, o que indicava a di-hidroxi-vitamina D_2 com adição de três grupos TMS correspondendo a 216 unidades de massa adicional. Visto que a $1\alpha-(OH)D_2$ tem grupos 3β e 1α e o metabolito putativo tinha um hidroxilo adicional, todos os três hidroxilos eram, deste modo, derivatizados. Foram encontrados fragmentos distintivos a m/z 601, 511, 421, 331 representando uma perda de 43 unidades de massa do fragmento sozinho ou em adição a um, dois ou três grupos TMS de 90 unidades cada. Este padrão foi era muito provavelmente explicado pela clivagem da ligação entre C-24 e C-25, correspondendo a perda de C_3H_7 a 43 unidades de massa. Isto representa a perda do fragmento $C_{26}-C_{25}-C_{27}$. Para além disso, faltava ao espectro de massa o fragmento de m/z 131 característico de todos os compostos de vitamina D 25-hidroxilados.

O espectro de massa mostrou o fragmento de m/z 513 indicando 1 indicando perda de 131 unidades de massa devido à clivagem do anel A com perda de $C_2-C_3-C_4$ também característico dos composto de vitamina D. O espectro de massa continha também m/z 143 o qual era provavelmente derivado da clivagem da ligação entre C-24 e C-23 e a uma perda de um grupo metilo. A perda anormal de 43 unidades indicando fragilidade da ligação $C_{24}-C_{25}$ em associação com a perda de um fragmento devido à clivagem da ligação $C_{23}-C_{24}$ indicou que o hidroxilo extra na $1\alpha,X-(OH)_2D_2$ era no carbono 24. Por conseguinte, a estrutura foi identificada como $1\alpha,24-(OH)_2D_2$.

O metabolito nativo foi analisado por espectrometria de massa de sondagem directa. Esta análise foi consistente com um hidroxilo na posição 24, e foi também consistente com a análise CG.EM do derivado TMS anteriormente descrita. O metabolito nativo mostrou o íon molecular esperado a m/z 428 e um fragmento

distintivo a m/z 367, indicando perda de uma molécula de água e do fragmento $C_{25}-C_{26}-C_{27}$ de 43 unidades de massa.

Síntese da 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D₂

Exemplo 2

Acetato de (22E)-5,7,22-ergostatrieno-3 β -ilo (2)

A uma solução de 50 g (0,13 mol) de ergosterol (1) em 300 ml de piridina anidra foram adicionados 33,3 ml (0,35 mol) de anidrido acético. A mistura foi agitada à temperatura ambiente de um dia para o outro e, em seguida, foram adicionados 600 ml de água. O precipitado foi filtrado e lavado três vezes com porções de 200 ml de acetonitrilo e, em seguida, seco ao ar de modo a obterem-se 42,0 g (74%) de (2).

Acetato de 22-oxo-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-23,24-dinor-6-choleno-3 β -ilo (4)

A uma solução de 33,0 g (0,075 mol) de acetato de ergosterol (2) em 1000 ml de clorofórmio foram adicionados 13,2 g (0,075 mol) de 4-fenil-1,2,4-triazolino-3,5-diona. A solução deste modo formada (3) foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos e, em seguida, foram adicionados 5 ml de piridina. A solução foi arrefecida até -78°C e tratada a -78°C com uma mistura de ozono-oxigênio durante 2 horas e, em seguida, completamente purgada com azoto. Em seguida, foram adicionados 50 ml de sulfureto de dimetilo e a mistura foi lavada com 300 ml de água, em seguida duas vezes com 200 ml de HCl 2N e finalmente 300 ml de água. A camada orgânica foi separada, seca sobre MgSO₄ anidro e concentrada até à secura in vacuo. O resíduo foi purificado sobre uma coluna de gel de sílica utilizando acetato de etilo a 30% em

hexano de modo a produzirem-se 16,0 g (39%) do composto em epígrafe sob a forma de um sólido semelhante a espuma.

^1H RMN: (400 MHz; CDCl_3): δ ppm 0,85 (3H, s, 18- CH_3), 1,10 (3H, s, 19- CH_3), 1,15 (3H, d, 21- CH_3), 1,99 (3H, s, 3 β - CH_3CO), 5,45 (1H, m, 3 α -H), 6,26 (1H, d, 7-H), 6,40 (1H, d, 6-H), 7,42 (5H, m, Ph), 9,58 (1H, d, HCO).

Acetato de (22E) 5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)colest-6,22-dieno-24-ona-3 β -ilo (5)

Foi adicionado butil-lítio (8,94 ml de solução 1,6M em hexano, 0,014 mol) a uma solução agitada, arrefecida (0°C), de di-isopropilamina (1,45 g, 0,014 mol) de tetra-hidrofurano seco (20 ml) sob azoto. Foi adicionada 3-metilbutan-2-ona (1,23 g, 0,014 mol) em tetra-hidrofurano seco (6 ml), gota a gota, a 0°C, durante 15 min. A solução foi agitada a 0°C durante mais 1 h, em seguida arrefecida até -70°C e foi adicionada uma solução do aldeído (4) (6,0 g, 0,011 mol) em tetra-hidrofurano seco (60 ml). A temperatura foi aumentada até -20°C e a solução foi levada até à temperatura ambiente. Foram adicionados éter (800 ml) e água (400 ml) e a camada orgânica foi separada e lavada com ácido clorídrico a 10% (2 x 300 ml), e água (2 x 300 ml). A concentração deu origem ao produto bruto (7,5 g) o qual foi dissolvido em tetra-hidrofurano (100 ml) contendo ácido clorídrico 1,5 N (12 ml). Depois de refluxo durante 1,5 h, a mistura foi diluída com éter (600 ml), lavada com solução de carbonato de sódio a 5% (2 x 200 ml) e água (2 x 200 ml), e seca (MgSO_4 anidro). A concentração sob pressão reduzida deu origem ao produto bruto (7,0 g). A cromatografia sobre gel de sílica (acetato de etilo a 50% em hexano) deu origem a 4,0 g (59%) da enona (5).

¹H RMN: (400 MHz): δppm 0,83 (3H, s, 18-CH₃), 0,99 (3H, s, 19-CH₃), 1,09 (6H, dd, 26 e 27-CH₃), 1,12 (3H, d, 21-CH₃), 2,0 (3H, s, 3β-CH₃CO), 2,84 (1H, m, 25-H), 5,45 (1H, m, 3α-H), 6,06 (1H, d, 23-H), 6,24 (1H, d, 7-H), 6,39 (1H, d, 6-H), 6,71 (1H, dd, 22-H), 7,42 (5H, m, Ph).

**(22E)-5α,8α-(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-
-6,22-ergostadieno-3β,24-diol (6)**

A enona (5) (3,5 g, 5,7 mmol) em éter seco (100 ml) foi arrefecida até 0°C e foi adicionado, gota a gota, brometo de metilmagnésio (6,8 ml de solução 3,0 M em éter, 0,02 mol). DEpois de 1 h a 0°C, foi adicionado cloreto de amônio saturado (100 ml). A camada orgânica foi separada. A camada aquosa foi extraída com éter (2 x 200 ml). As fases etéreas combinadas foram secas sobre MgSO₄ anidro e concentradas até à secura in vacuo de modo a obterem-se 3,0 g (90%) de produto bruto de (6).

(22E)-5,7,22-ergostadieno-3β,24-diol (7)

A uma solução de 3,0 g (5,1 mmol) de (6) em tetra-hidrofurano seco (250 ml) foram adicionados 3,6 g (0,09 mol) de alumino-hidreto de lítio. A mistura foi aquecida sob refluxo durante 3 h, arrefecida com banho de gelo-água e a mistura reaccional foi decomposta por meio da adição cuidadosa, gota a gota, de gelo-água (5 ml). A mistura foi filtrada e o filtrado foi concentrado in vacuo de modo a remover a maior parte do tetra-hidrofurano. O resíduo foi dissolvido em 200 ml de acetato de etilo e lavado duas vezes com solução saturada de NaCl (2 x 200 ml), seco sobre MgSO₄ anidro e concentrado in vacuo. O resíduo foi purificado sobre uma coluna de gel de sílica utilizando acetato de etilo a 30% em hexano de modo a obterem-se 1,5 g (71%) de (7).

^1H RMN: (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 0,64 (3H, s, 18-H), 0,88 (6H, dd, 26 e 27- CH_3), 0,93 (3H, s, 19- CH_3), 1,06 (3H, d, 21- CH_3), 1,19 (3H, s, 28- CH_3), 3,55 (1H, m, 3 α -H), 5,36 (1H, d, 7-H), 5,42 (2H, m, 22 e 23-H), 5,52 (1H, d, 6-H).

UV (etanol) λ_{max} : 282 nm.

24-hidroxi-vitamina D_2 (8)

Um grama (2,4 mmol) de (7) foi dissolvido em 250 ml de éter e benzeno (4:1) e irradiado, com agitação sob azoto, num recipiente de imersão de quartzo arrefecido com água, utilizando uma lâmpada de UV de média pressão Hanovia, durante 2 h. A solução foi concentrada in vacuo, redissolvida em 100 ml de etanol, e aquecida sob refluxo de um dia para o outro. A solução foi concentrada até à secura in vacuo e o resíduo foi purificado sobre uma coluna de gel de sílica utilizando acetato de etilo a 30% em hexano de modo a obterem-se 0,55 g (55%) de (8).

^1H RMN: (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 0,57 (3H, s, 18- CH_3), 0,92 (6H, dd, 26 e 27- CH_3), 1,06 (3H, d, 21- CH_3), 1,20 (3H, s, 28- CH_3), 3,93 (1H, m, 3-H), 4,79 (1H, m, (agudo), 19-H), 5,01 (1H, m, (agudo), 19-H), 5,43 (2H, m, 22 e 23-H), 6,02 (1H, d, 7-H), 6,22 (1H, d, 6-H).

UV (etanol) λ_{max} : 265 nm.

tosilato de 24-hidroxi-vitamina D_2 (9)

A uma solução de 0,55 g (1,3 mmol) de (8) dissolvidos em 5 ml de piridina anidra foram adicionados 0,6 g (3,2 mmol) de cloreto de tosilo. A mistura foi agitada sob azoto a 5°C durante 20 h. A mistura reaccional foi vertida dentro de 100 ml de solução saturada fria de NaHCO_3 e extraída com éter (3 x 100 ml). Os extractos orgânicos combinados foram lavados com solução de

HCl a 5% (2 x 200 ml), solução saturada de bicarbonato de sódio (2 x 200 ml) e solução saturada de NaCl (2 x 200 ml), secos sobre MgSO₄ anidro e concentrados in vacuo de modo a obterem-se 0,62 g (84%) de (9).

¹H RMN: (400 MHz, CDCl₃): δppm 0,57 (3H, s, 18-CH₃), 0,92 (6H, dd, 26 e 27-CH₃), 1,08 (3H, d, 21-CH₃), 1,24 (3H, s, 28-CH₃), 2,43 (3H, s, CH₃, (tosilato)), 4,69 (1H, m, 3-H), 4,77 (1H, m, (agudo), 19-H), 5,0 (1H, m, (agudo), 19-H), 5,42 (2H, m, 22 e 23-H), 6,03 (1-H, d, 7-H), 6,25 (1-H, d, 6-H), 7,31 e 7,83 (4H, d, aromático).

24-hidroxi-3,5-ciclovitamina D₂ (10)

A uma solução de 0,6 g (1,06 mmol) de (9) dissolvidos em 50 ml de metanol anidro foram adicionados 4,0 g de bicarbonato de sódio (0,047 mol). A mistura foi aquecida ao refluxo durante 6 h. A mistura reaccional foi concentrada in vacuo. Foi adicionada água (100 ml), seguido pela extracção com éter (2 x 200 ml). Os extractos etéreos combinados foram secos sobre MgSO₄ e concentrados até à secura in vacuo de modo a obterem-se 450 mg (100%) de (10) sob a forma de um óleo.

1α,24-di-hidroxi-3,5-ciclovitamina D₂ (11)

Foi adicionado hidroperóxido de terc-butilo (870 μl (2,61 mmol); 3M em tolueno) a uma suspensão de 73 mg (0,66 mmol) de dióxido de selênio em 50 ml de diclorometano anidro sob azoto. A mistura foi agitada à temperatura ambiente sob azoto durante 3 h. Em seguida, foram adicionados 0,1 ml de piridina anidra, seguida por uma solução de 450 mg de (10), dissolvidos em 15 ml de diclorometano anidro. A mistura foi agitada sob azoto à temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida foram

adicionados 25 ml de solução de NaOH a 10% e a mistura foi extraída com éter (3 x 100 ml). Os extractos etéreos combinados foram lavados com solução de NaOH a 10% (2 x 100 ml), água (2 x 100 ml), solução saturada de cloreto de sódio (2 x 100 ml), seca sobre MgSO_4 anidro e concentrada até à secura in vacuo. O resíduo foi purificado sobre uma coluna de gel de sílica utilizando uma mistura de acetato de etilo a 30% em hexano de modo a obterem-se 110 mg (24%) de (11).

^1H RMN: (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 0,55 (3H, s, 18- CH_3), 0,90 (6H, dd, 26 e 27- CH_3), 1,03 (3H, d, 21- CH_3), 1,19 (3H, s, 28- CH_3), 3,25 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4,19 (1H, d, 6-H), 4,19 (1H, m, 1-H), 4,92 (2H, d, 7-H), 5,15 (1H, m, (agudo), 19-H), 5,2 (1H, m, (agudo), 19-H), 5,42 (2H, m, 22 e 23-H)).

5,6-cis e 5,6-trans-1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D_2 (12, 13)

110 mg (0,25 mmol) de 1 α ,24-di-hidroxi-3,5-ciclovitamina D_2 (11) foram dissolvidos em 2,0 ml de dimetil-sulfóxido e 1,5 ml de ácido acético e aqueceu-se a 50°C, sob azoto, durante 1 h. A solução foi vertida sobre gelo e 50 ml de solução saturada de NaHCO_3 . A mistura foi extraída com éter (3 x 100 ml), água (2 x 100 ml), solução saturada de cloreto de sódio (2 x 200 ml), seca sobre MgSO_4 anidro e concentrada in vacuo de modo a obterem-se 100 mg (93%) do produto bruto de (12) e (13).

5,6-cis-1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D_2 (12)

A uma solução de (12) e (13) em 5 ml de acetato de etilo foram adicionados 20 mg (0,2 mmol) de anidrido maleico e a mistura foi agitada a 35°C durante 24 h sob azoto. A solução foi

concentrada até à secura in vacuo. O resíduo foi purificado sobre uma coluna de gel de sílica utilizando acetato de etilo a 50% em hexano de modo a obterem-se 20 mg (22%) de (12).

^1H RMN: (400 MHz, CDCl_3): δ ppm 0,57 (3H, s, 18- CH_3), 0,89 (6H, dd, 26 e 27- CH_3), 1,04 (3H, d, 21- CH_3), 1,21 (3H, s, 28- CH_3), 4,23 (1H, m, 3-H), 4,40 (1H, m, 1-H), 5,0 (1H, m, (agudo), 19-H), 5,33 (1H, m, (agudo), 19-H), 5,44 (2H, m, 22 e 23-H), 6,01 (1H, d, 7-H), 6,37 (1H, d, 6-H).

UV (etanol) λ_{max} : 265 nm.

Produção preferencial de $1\alpha,24\text{-(OH)}_2\text{D}_2$ com concentrações crescentes de substrato in vitro

Exemplo 3

Células hep 3B foram incubadas com $1\alpha\text{-OH-D}_2$, conforme descrito anteriormente, em concentrações finais de 1, 10 ou 100 nM (Experiência 1), e 1 ou 10 μM (Experiência 2) e a $1\alpha,24\text{-(OH)}_2\text{D}_2$ foi extraída e purificada. Os metabolitos $1\alpha,24\text{-(OH)}_2\text{D}_2$ e $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$ foram quantificados por meio de marca radioactiva recuperada (Experiência 1) ou por meio de espectrofotometria de disposição de fotodíodo (Experiência 2). Conforme mostrado na Tabela 1, a quantidade de $1\alpha,24\text{-(OH)}_2\text{D}_2$ aumentou relativamente à quantidade de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_2$, à medida que a concentração de substrato era aumentada. Isto indica que neste sistema a $1\alpha,24\text{-(OH)}_2\text{D}_2$ era o metabolito natural activo predominante da $1\alpha\text{-OH-D}_2$ para concentrações de substrato mais elevadas.

TABELA 1

EXPERIÊNCIA	CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO	PRODUTO FORMADO	
1	nM	Proporção de $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ para $1,25-(OH)_2D_2$	
	1	1:4	
	10	1:1	
	100	1,5:1	
2	μM	Velocidade de Produção, pmol por 10^6 células/dia	
		$1\alpha,24-(OH)_2D_2$	$1,25-(OH)_2D_2$
	1	4,9	N.D.*
	10	59	7,4

* N.D. significa não detectável

Produção de $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ em mulheres osteoporóticas administradas com $1\alpha-OH-D_2$

Exemplo 4

Um aumento na produção de $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ relativamente a $1,25-(OH)_2D_2$ foi também observado pelos presentes inventores em fêmeas humanasque receberam $1\alpha-OH-D_2$ como parte de uma investigação acerca daquela droga para o tratamento de osteoporose. A seguir quer a uma dose única de 2 μg de $1\alpha-OH-D_2$ quer a doses diárias de 8 μg /dia durante uma semana, o sangue foi recolhido e analisado relativamente aos metabolitos $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ e $1,25-(OH)_2D_2$. Os lípidos foram extraídos do sangue, e os metabolitos foram purificados por meio de HPLC utilizando métodos padrão, e

quantificados com o ensaio de radio-receptore produzido por Incstar (Stillwater, Minnesota). Um dia depois de uma dose única de 2 μ g, o nível de $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ não era detectável, sendo o nível de $1,25-(OH)_2D_2$ de aproximadamente 11 pg/ml. Pelo contrário, um dia a seguir à última dose de 8 μ g, o nível de $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ tinha um valor de 9 pg/ml, tendo o nível de $1,25-(OH)_2D_2$ um valor de 30 pg/ml

Afinidade da $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ para o receptor de vitamina D

Exemplo 5

A afinidade da $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ para o receptor de vitamina D (VDR) mamífero foi avaliada utilizando um equipamento ("kit") comercialmente disponível de VDR de timo bovino e soluções padrão de $1,25-(OH)_2D_3$ a partir de Incstar (Stillwater, Minnesota). A $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ purificada foi quantificada por meio de espectrofotometria de disposição de fotodíodo e ensaiada no ensaio de radio-receptor. A ligação semi-máxima de $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ foi aproximadamente 150 pg/ml enquanto que a da $1\alpha,25-(OH)_2D_2$ foi de 80 pg/ml. Deste modo, o VDR de timo bovino tinha uma afinidade duas vezes mais baixa para a $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ do que para a $1\alpha,25-(OH)_2D_3$, o que indicava que a $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ tinha uma actividade biológica potente.

Afinidade da $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ para a proteína de ligação ao soro da vitamina D

Exemplo 6

A afinidade da $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ para a proteína de ligação ao soro de vitamina D (DBP) foi avaliada utilizando soro de ratazana deficiente em vitamina D, de acordo com métodos

conhecidos nesta técnica. Os dados indicaram que a ligação a DBP da $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ era pelo menos 1 000 vezes mais fraca do que para a $25-OH-D_3$. Em virtude da ligação forte da $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ para o VDR e da ligação fraca para a DBP, este composto pode ser destinado a ser tomado pelas células alvo, possuindo deste modo uma potente actividade biológica. Para além disso, a ligação fraca pela DBP foi indicativa de uma remoção mais rápida, o que conduz a uma baixa toxicidade.

Deste modo, os ensaios anteriores demonstraram que a nova $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ exibia um espectro de actividades distinto e único, nomeadamente, potência biológica elevada e baixa toxicidade, o que distinguia, claramente, o composto dos da técnica anterior.

Ensaio Biológicos

Exemplo 7

Vinte mulheres osteoporóticas pós-menopausa são inscritas num estudo de marcação aberta. Os pacientes seleccionados possuem idades entre 55 e 75 anos, e exibem densidade mineral dos ossos vertebrais L2-L3 entre 0,7 e 1,05 g/cm², conforme determinado por meio de medidas com um Densitómetro de Ossos LUNAR (Lunar Corporation, Madison, Wisconsin).

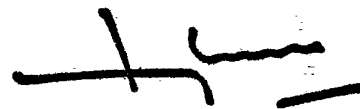
Quando da admissão ao estudo, todos os pacientes receberam a instrução de seleccionarem uma dieta diária contendo 400 a 600 mg de cálcio. A concordância com esta dieta é verificada em intervalos semanais por meio de registos alimentares de 24 horas e por meio de entrevistas com cada paciente.

Todos os pacientes completam um período base de uma semana, um período de tratamento de cinco semanas, e um período de observação pós-tratamento de uma semana. Durante o período de tratamento, os pacientes auto-administraram oralmente $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 numa dose inicial de $0,5 \mu\text{g}/\text{dia}$ relativamente à primeira semana, e em doses sucessivamente mais elevadas de $1,0$, $2,0$, $4,0$ e $8,0 \mu\text{g}/\text{dia}$ em cada uma das quatro semanas seguintes. Todas as doses são administradas antes do pequeno almoço.

As químicas do sangue e da urina são verificadas numa base semanal ao longo de todo o estudo. As químicas principais do sangue incluem os níveis no soro, em jejum, de cálcio, fósforo, osteocalcina, creatinina, e de azoto de ureia no sangue. As químicas principais da urina incluem a excreção em 24 horas de cálcio, fósforo, e creatinina.

Os dados do sangue e da urina obtidos a partir deste estudo clínico indicam que este composto não afecta de modo adverso a função renal, conforme determinado por remoção de creatinina e níveis no sangue de azoto da ureia; nem faz aumentar a excreção urinária de hidroxiprolina, o que indica a ausência de qualquer efeito estimulante sobre a reabsorção óssea. O composto não tem efeito sobre quaisquer parâmetros do soro verificados rotineiramente, o que indica a ausência de efeitos metabólicos adversos.

Um efeito positivo da $1\alpha,24$ -di-hidroxivitamina D_2 sobre a homeostase do cálcio é evidente a partir aumentos modestos nos níveis de cálcio urinários em 24 horas, o que confirma que o composto aumenta a absorção de cálcio intestinal, e a partir de aumentos nos níveis de osteocalcina no soro, o que indica que o composto estimula os osteoblastos.



Exemplo 8

É conduzido um estudo clínico com pacientes externos osteoporóticos pós-menopausa, possuindo idades entre 55 e 75 anos. O estudo envolve até 120 pacientes aleatoriamente divididos em três grupos de tratamento e continua durante 24 a 36 meses. Dois dos grupos de tratamento recebem dosagens constantes de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 (u.i.d.; dois níveis de dose diferentes a, ou superiores a, $1,0 \mu\text{g}/\text{dia}$) e o outro grupo recebe um placebo equivalente. Todos os pacientes mantêm uma tomada normal de cálcio dietético e abstêm-se da utilização de suplementos de cálcio. A eficácia é avaliada por meio de comparações pré- e pós-tratamento dos grupos de pacientes retivamente a (a) retenção total de cálcio no corpo, e (b) densidade mineral óssea radial e espinal, conforme determinada por absorciometria de duplo fotão (DPA) ou absorciometria de raios X de dupla energia (DEXA). A segurança é avaliada por meio de comparações da excreção urinária de hidroxiprolina, níveis de cálcio na urina e no soro, remoção de creatinina, azoto de ureia no sangue, e outras determinações de rotina.

Os resultados mostram que os pacientes tratados com $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 apresentam cálcio total no corpo, e densidades ósseas radiais e espinais, significativamente mais elevados relativamente a pacientes tratados com placebo. Os parâmetros de segurança verificados confirmam uma incidência insignificante de hipercalcemia ou hipercalciúria, ou de qualquer outro distúrbio metabólico, com a terapia por $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 .

Exemplo 9

É conduzido um estudo clínico com mulheres pós-menopausa saudáveis, possuindo idades entre 55 e 60 anos. O estudo envolve até 80 pacientes aleatoriamente divididos em dois grupos de tratamento e continua durante 24 a 36 meses. Um dos grupos de tratamento recebe uma dosagem constante de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 (u.i.d.; um nível de dose a, ou superior a, $1,0 \mu\text{g}/\text{dia}$) e o outro grupo recebe um placebo equivalente. O estudo é conduzido conforme indicado no Exemplo 2 anterior.

Os resultados mostram que os pacientes tratados com $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 apresentam perdas reduzidas de cálcio total no corpo, e das densidades ósseas radiais e espinais, relativamente aos valores da linha de base. Em contraste, os pacientes tratados com placebo mostram perdas significativas nestes parâmetros relativamente aos valores da linha de base. Os parâmetros de segurança verificados confirmam a segurança da administração a longo prazo de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 neste nível de dose.

Exemplo 10

É conduzido um ensaio clínico de doze meses, controlado com placebo, duplamente cego, com trinta homens e mulheres com doença renal, os quais estão sendo submetidos a hemodiálise crónica. Todos os pacientes entram num período de controlo de 8 semanas, tempo durante o qual recebem uma dose de manutenção de Vitamina D_3 ($400 \text{ UI}/\text{dia}$). Depois deste período de controlo, os pacientes são divididos aleatoriamente em dois grupos de tratamento: um dos grupos de tratamento recebe uma dosagem constante de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 (u.i.d.; uma dosagem superior a $3,0 \mu\text{g}/\text{dia}$) e o outro grupo recebe um placebo equivalente. Ambos

os grupos de tratamento recebem recebem uma dosagem de manutenção de Vitamina D_3 , mantêm uma tomada normal de cálcio dietético e abstêm-se da utilização de suplementos de cálcio. A eficácia é avaliada por meio de comparações pré- e pós-tratamento dos dois grupos de pacientes relativamente a (a) medidas directas da absorção intestinal de cálcio (b) retenção total de cálcio no corpo, (c) densidade mineral óssea radial e espinal, e (d) determinações de cálcio no soro. A segurança é avaliada por meio de verificação dregular do cálcio no soro.

A análise dos dados clínicos mostra a $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 aumenta significativamente a absorção do cálcio, conforme determinado por meio de medidas directas utilizando uma técnica de duplo isótopo. Os pacientes tratados com este composto níveis normalizados de cálcio no soro, valores estáveis de cálcio total no corpo, e densidades ósseas radiais e espinais estáveis, relativamente aos valores da linha de base. Em contraste, os pacientes tratados com placebo mostram hipocalcemia frequente, redução significativa do cálcio total do corpo e da densidade óssea radial e espinal. É observada uma incidência insignificante de hipocalcemia no grupo tratado.

Preparações de Medicamentos

Exemplo 11

É preparado um creme tópico através da dissolução de 1,0 mg de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 em 1 g de óleo de amêndoas. A esta solução são adicionados 40 g de óleo mineral e 20 g de cera de abelhas auto-emulsionável. A mistura é aquecida até à liquefacção. Depois da adição de 40 ml de água quente, a mistura é bem misturada. O creme resultante contém aproximadamente 10 μ g de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 por grama de creme.



Exemplo 12

É preparada uma pomada através da dissolução de 1,0 mg de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 em 30 g de óleo de amêndoas. A esta solução são adicionados 70 g de parafina mole branca, a qual tinha sido aquecida o estritamente necessário para a liquefacção. A pomada é bem misturada e deixada arrefecer. Esta pomada contém aproximadamente 10 μ g de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 por grama de pomada.

Exemplo 13

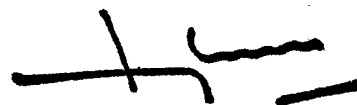
À pomada do Exemplo 12 são adicionados, com mistura cuidadosa, 0,5 g de adenosina e 2,0 g de base papaverina, ambas dissolvidas numa quantidade mínima de dimetil-sulfóxido. Os ingredientes adicionais estão presentes numa quantidade de cerca de 0,5% em peso (adenosina) e 2% em peso (base papaverina).

Exemplo 14

À pomada do Exemplo 12 são adicionados, com mistura cuidadosa, 10 000 U de Vitamina A, dissolvida numa quantidade mínima de óleo vegetal. A pomada resultante contém cerca de 100 U de Vitamina A por grama de pomada.

Exemplo 15

É preparada uma loção dermatológica através da dissolução de 1,0 mg de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 em 100 g de propileno-glicol seco. A loção é armazenada num frigorífico numa garrafa castanha e contém cerca de 10 μ g de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 por grama de loção.



Exemplo 16

Em 1 g de óleo de amêndoas são dissolvidos 0,2 mg de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 . À solução são adicionados 40 g de óleo mineral e 20 g de cera de abelhas auto-emulsionável, seguido pela adição de 40 ml de água quente. A mistura é bem misturada de modo a produzir um creme cosmético que contém aproximadamente 2 μ g de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 por grama de creme.

Exemplo 17

Ao creme cosmético preparado de acordo com o Exemplo 14 são adicionados 10 mg de adenosina. O creme é bem misturado e contém cerca de 0,1% em peso de adenosina.

Exemplo 18

É preparada uma pomada através da dissolução de 100 μ g de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 em 30 g de óleo de amêndoas. À solução assim produzida são adicionados 70 g de parafina mole branca, a qual tinha sido aquecida o estritamente necessário para a liquefacção. A pomada é bem misturada e deixada arrefecer. Esta pomada contém aproximadamente 1,0 μ g de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 por grama de pomada.

Exemplo 19

À pomada cosmética do Exemplo 12 são adicionados, com mistura cuidadosa, 200 U de Vitamina A, dissolvida numa quantidade mínima de óleo vegetal.

Exemplo 20

É preparada uma loção cosmética através da dissolução de 300 μg de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 em 100 g de propileno-glicol seco. A loção é armazenada num frigorífico numa garrafa castanha e contém cerca de 3,0 μg de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 por grama de loção.

Teste Dermatológico

Exemplo 21

São avaliadas composições contendo $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 quanto à eficácia terapêutica da composição no tratamento tópico da dermatite (de contacto e ectópica). A composição avaliada é uma pomada que contém 10 μg de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 por grama de pomada numa base petrolato-óleo de amêndoas. A composição de controlo é idêntica excepto que não contém o agente activo $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 . Os pacientes são tratados numa clínica para pacientes externos. Eles são instruídos para utilizarem a preparação duas vezes por dia.

A pomada é, tanto quanto possível, aplicada a uma única lesão, ou a uma área da doença. A pomada e o seu contentor são pesados antes do tratamento se iniciar e são voltados a pesar, com qualquer conteúdo não utilizado, no fim do tratamento.

A área da lesão tratada é estimada e registada, e a lesão é fotografada se requerido, juntamente com lesões de "controlo" adequadas. Estas últimas são, de preferência, lesões de dimensões semelhantes e na mesma fase de desenvolvimento, quer na vizinhança da lesão tratada, quer simetricamente contralateral. Os pormenores relevantes do procedimento fotográfico são

registados de modo a serem reproduzidos quando as lesões são a seguir fotografadas (distância, abertura, ângulo, fundo, etc.). A pomada é aplicada duas vezes por dia e de preferência deixada descoberta. As lesões de "control" são deixadas por tratar, mas se isso não for possível, o tratamento nelas utilizado é registrado.

São conduzidas avaliações do eritrema, formação de escamas e espessura, com intervalos semanais, por um médico, sendo a gravidade da lesão classificada de 0 a 3. A avaliação final é habitualmente levada a cabo ao fim de quatro a seis semanas de tratamento. Essas lesões tratadas com $1\alpha,24-(OH)_2D_2$ têm valores mais baixos do que as lesões de controle. É também observada uma incidência insignificante de hipercalcemia.

Diferenciação das Células Epidérmicas e Ensaio de Proliferação

Exemplo 22

São cultivados ceratinócitos humanos de acordo com modificações conhecidas do sistema originalmente descrito por Rheiwald e Green (Cell, 6; 331 (1975)). A $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 , dissolvida em etanol, é adicionada às células de modo a produzir-se uma variedade de concentrações entre 0,05 e 5 $\mu g/ml$, em que a concentração de etanol não excede 0,5% v/v. As culturas de controle são suplementadas com etanol numa concentração de 0,5% v/v.

A diferenciação e proliferação das células epidérmicas em cultura é examinada por meio de:

1. Quantificação dos invólucros endurecidos.

2. Quantificação da densidade de células ligadas aos discos;
3. Verificação da actividade da transglutaminase; ou
4. Verificação da síntese de DNA pela incorporação de ^3H -timidina.

As culturas incubadas com $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 têm mais invólucros endurecidos, menos células ligadas, actividade de transglutaminase mais elevada, e síntese de DNA mais baixa do que as culturas de controlo.

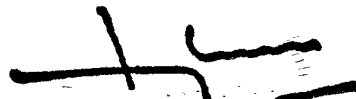
Embora o presente invento tenha agora sido descrito e exemplificado com alguma especificidade, os peritos nesta técnica terão em consideração as várias modificações, incluindo variações, adições e omissões, que podem ser feitas em tudo o que foi descrito. Por conseguinte, é nossa intenção que estas modificações possam também ser englobadas pelo presente invento, e que o âmbito do presente invento seja unicamente limitado pela interpretação mais ampla que legalmente possa estar de acordo com as reivindicações apensas.

Lisboa, 8 de Janeiro de 1992



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10 - A 3.º
1200 LISBOA

99998



REIVINDICAÇÕES

1ª. - Utilização da $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 , caracterizada por o referido composto ser empregado para a preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de doenças induzidas pela deficiência em vitamina D.

2ª. - Utilização da $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 , caracterizada por o referido composto ser empregado para a preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento da osteodistrofia renal.

3ª. - Utilização da $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 , caracterizada por referido composto ser empregado para a preparação de um medicamento tópico para o tratamento de perturbações da pele.

4ª. - Utilização da $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 , caracterizada por o referido composto ser empregado para a preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de perturbações depletivas dos ossos.

5ª. - Composição farmacêutica profilática ou terapêutica para doenças provocadas por deficiência em vitamina D, caracterizada por compreender um veículo fisiologicamente aceitável e uma quantidade eficaz de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 .

6ª. - Composição farmacêutica, caracterizada por compreender uma quantidade eficaz para prevenir ou tratar a perda de massa óssea ou do conteúdo mineral dos ossos, num ser humano

que sofre de ou que é predisposto a uma perturbação depletiva dos ossos, de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 em combinação com um excipiente fisiologicamente aceitável.

7ª. - Composição farmacêutica, caracterizada por compreender uma quantidade eficaz para estabilizar a densidade óssea espinal e radial, num ser humano que sofre de osteodistrofia renal, de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 em combinação com um excipiente fisiologicamente aceitável.

8ª. - Método para prevenir ou tratar a perda de massa óssea ou do conteúdo mineral dos ossos, num ser humano que sofre de ou que é predisposto a uma perturbação a perda de massa óssea ou do conteúdo mineral dos ossos, caracterizado por compreender a administração ao referido ser humano de uma quantidade de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 suficiente para prevenir a perda de massa óssea ou do conteúdo mineral dos ossos, sem causar hipercalcemia ou hipercalciúria.

9ª. - Método para estabilizar ou aumentar a massa óssea, num ser humano que sofre de osteodistrofia renal, caracterizado por compreender a administração ao referido ser humano de uma quantidade de $1\alpha,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 suficiente para estabilizar ou aumentar a massa óssea, sem causar hipercalcemia ou hipercalciúria.

10ª. - Composição para utilização no tratamento de perturbações da pele, caracterizada por compreender um suporte para aplicação tópica e $1,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 .

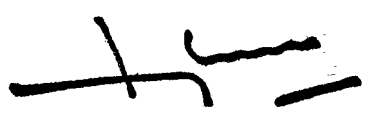
11ª. - Composição de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por a quantidade de $1,24$ -di-hidroxi-vitamina D_2 se situar entre $0,01 \mu g$ e $10 \mu g$.



12ª. - Composição de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por compreender ainda um agente de entre o grupo constituído por agentes indutores de epitelialização, cromanois, β -agonistas, agentes anti-inflamatórios e agentes ceratoplásticos.

13ª. - Método para a preparação da 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D₂, caracterizado por compreender:

- (a) a acetilação do ergosterol para formar o seu 3 β -acetato;
- (b) a reacção com uma triazolinodiona e a ozonação para formar o acetato de 22-oxo-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-23,24-dinor-6-coleno-3 β -ilo;
- (c) a adição de 3-metilbutan-2-ona ao acetato de 22-oxo-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-23,24-dinor-6-coleno-3 β -ilo para formar o acetato de (22E)-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-colest-6,22-dieno-24-ona-3 β -ilo;
- (d) a adição de brometo de metilmagnésio ao acetato de (22E)-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-colest-6,22-dieno-24-ona-3 β -ilo para formar o (22E)-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-6,22-ergostadieno-3 β ,24-diol;
- (e) a redução do (22E)-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-6,22-ergostadieno-3 β ,24-diol para formar o 24-hidroxi-ergosterol;

- 
- (g) a irradiação do 24-hidroxi-ergosterol para formar a 24-hidroxi-vitamina D_2 ;
 - (h) a tosilação da 24-hidroxi-vitamina D_2 na presença de piridina seca para formar o 3 β -tosilato de 24-hidroxi-vitamina D_2 ;
 - (i) a solvólise do tosilato de 24-hidroxi-vitamina D_2 para formar a 24-hidroxi-3,5-ciclovitamina D_2 ;
 - (j) a oxidação alílica da 24-hidroxi-3,5-ciclovitamina D_2 com dióxido de selênio para formar a 1 α ,24-di-hidroxi-ciclovitamina D_2 ; e
 - (k) a hidrólise da 1 α ,24-di-hidroxi-3,5-ciclovitamina D_2 com uma mistura de dimetilsulfóxido e um ácido orgânico para formar uma mistura de 5,6-cis-1 α -hidroxi e 5,6-trans-1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D_2 e a formação de um produto de adição de Diels-Alder da 5,6-trans-1 α -hidroxi-vitamina D_2 para permitir a purificação de modo a obter-se a 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D_2 .

14^a. - Método para a preparação de 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D_2 , caracterizado por compreender:

- (a) a tosilação da 24-hidroxi-vitamina D_2 para formar o tosilato de 24-hidroxi-vitamina D_2 ;
- (b) a metanólise do tosilato de 24-hidroxi-vitamina D_2 para formar a 24-hidroxi-3,5-ciclovitamina D_2 ;
- (c) a oxidação da 24-hidroxi-3,5-ciclovitamina D_2 para formar a 1 α ,24-di-hidroxi-3,5-ciclovitamina D_2 ; e

- (d) a hidrólise sequencial e a sujeição a uma reacção de Diels-Alder da 1 α ,24-di-hidroxi-3,5-ciclovitamina D₂ para formar a 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D₂.

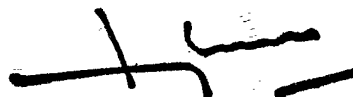
15^a. - Método para a preparação de acetato de 22-oxo-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-23,24-dinor-6-coleno-3 β -ilo, caracterizado por compreender a reacção do acetato de 22-oxo-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-23,24-dinor-6-coleno-3 β -ilo com 3-metilbutan-2-ona na presença de butil-lítio e tetra-hidrofurano seco.

16^a. - Método para a preparação de (22E)-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-6,22-ergostadieno-3 β ,24-diol, caracterizado por compreender a reacção do acetato de 22-oxo-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-23,24-dinor-6-coleno-3 β -ilo com um reagente de Grignard.

17^a. - Método para a preparação de 24-hidroxi-ergosterol, caracterizado por compreender a reacção do (22E)-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-6,22-ergostadieno-3 β ,24-diol, com hidreto de alumínio e lítio na presença de tetra-hidrofurano seco.

18^a. - Método para a preparação de tosilato de 24-hidroxi-vitamina D₂, caracterizado por compreender a reacção do 24-hidroxi-ergosterol, com cloreto de tolueno-sulfonilo na presença de piridina seca.

19^a. - Método para a preparação de 6-metoxi-24-hidroxi-3,5-ciclovitamina D₂, caracterizado por compreender a solvólise do tosilato de 24-hidroxi-vitamina D₂, em metanol.



20ª. - Método para a preparação de 6-metoxi-1 α ,24-di-hidroxi-3,5-ciclovitamina D₂, caracterizado por compreender a oxidação alílica da 6-metoxi-24-hidroxi-3,5-ciclovitamina D₂, com dióxido de selênio.

21ª. - Método para o tratamento de doenças depletivas dos ossos induzidas pela deficiência em vitamina D, caracterizado por compreender:

- (a) a redução do ergosterol, sob condições tais e numa quantidade suficiente para produzir o 24-hidroxi-ergosterol;
- (b) a irradiação do 24-hidroxi-ergosterol para produzir a 24-hidroxi-vitamina D₂;
- (c) a hidroxilação da vitamina D₂, sob condições tais e numa quantidade suficiente para produzir a 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D₂;
- (d) a purificação da 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D₂;
- (e) a administração a um ser humano que sofre de uma doença depletiva dos ossos, de uma quantidade eficaz para prevenir ou inverter a perda de massa óssea ou do conteúdo mineral dos ossos de 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D₂, em mistura com um veículo farmacêuticamente aceitável.

22ª. - Composto, caracterizado por ser o acetato de (22E)-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-col-esta-6,22-dieno-24-ona-3 β -ilo.

23^a. - Composto, caracterizado por ser o (22E)-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-6,22-ergostadieno-3 β ,24-diol.

24^a. - Composto, caracterizado por ser o (22E)-5,7,22-ergostatrieno-3 β ,24-diol.

25^a. - Composto, caracterizado por ser o 24-hidroxi-ergosterol.

26^a. - Composto, caracterizado por ser o tosilato de 24-hidroxi-vitamina D₂.

27^a. - Composto, caracterizado por ser o 6-metoxi-24-hidroxi-3,5-ciclovitamina D₂.

28^a. - Método para a preparação da 24-hidroxi-vitamina D₂, caracterizado por compreender:

- (a) a acetilação do ergosterol para formar o seu 3 β -acetato;
- (b) a reacção com uma triazolinodiona e a ozonação para formar o acetato de 22-oxo-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-23,24-dinor-6-coleno-3 β -ilo;
- (c) a adição de 3-metilbutan-2-ona ao acetato de 22-oxo-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-23,24-dinor-6-coleno-3 β -ilo para formar o acetato de (22E)-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-colest-6,22-dieno-24-ona-3 β -ilo;

- (d) a adição de brometo de metilmagnésio ao acetato de (22E)-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-colest-6,22-dieno-24-ona-3 β -ilo para formar o (22E)-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-6,22-ergostadieno-3 β ,24-diol;
- (e) a redução do (22E)-5 α ,8 α -(4-fenil-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidino-1,2-di-il)-6,22-ergostadieno-3 β ,24-diol para formar o 24-hidroxi-ergosterol; e
- (g) a irradiação do 24-hidroxi-ergosterol para formar a 24-hidroxi-vitamina D₂.

29ª. - Alimento para mamíferos, caracterizado por compreender 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D₂, em que o consumo normal pelos mamíferos proporciona cerca de 0,01 a cerca de 1,0 μ g/kg/dia de 1 α ,24-di-hidroxi-vitamina D₂.

Lisboa, 8 de Janeiro de 1992



J. PEREIRA DA CRUZ

Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10 - A 3.ª
1200 LISBOA

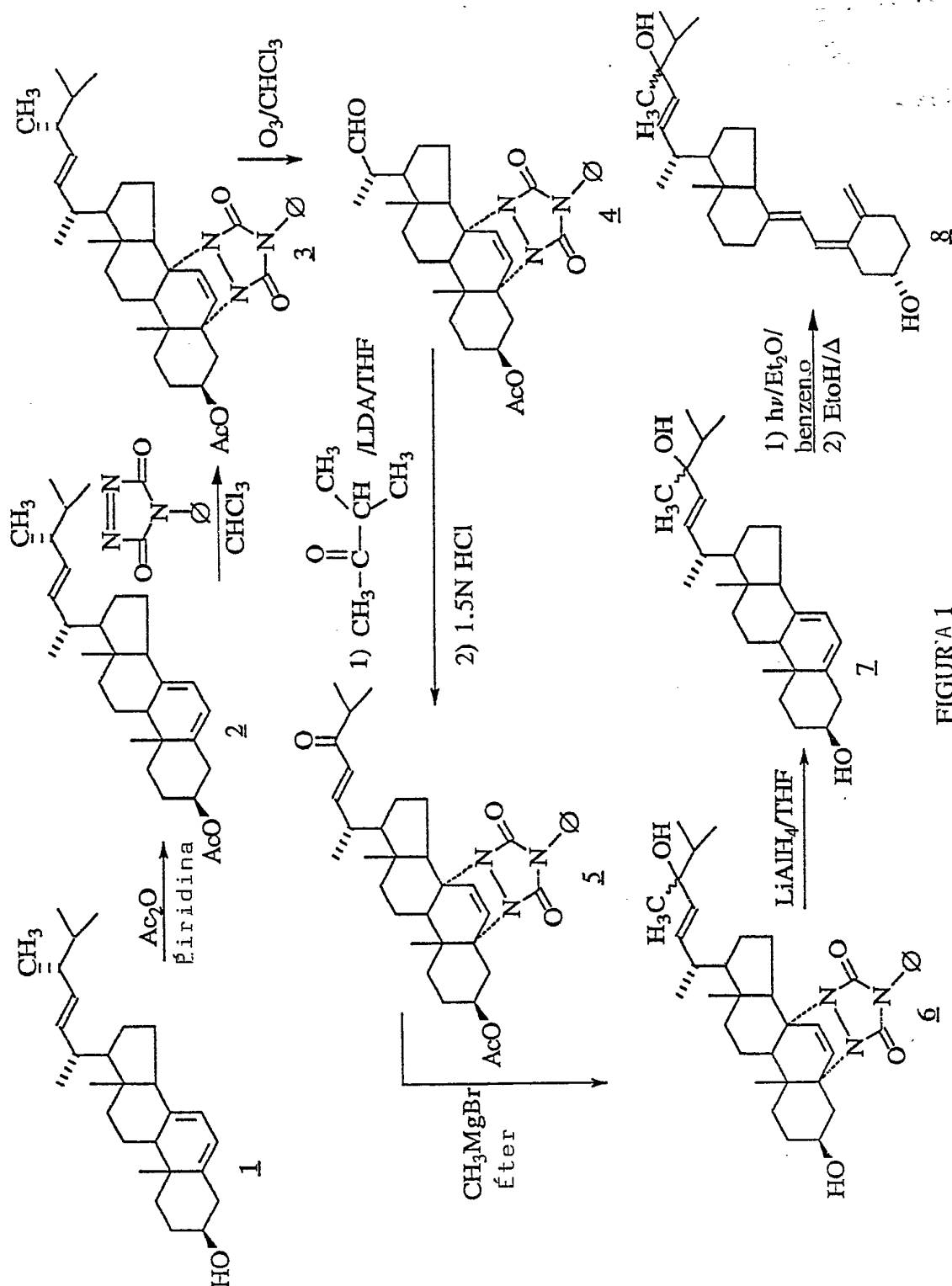


FIGURA 1

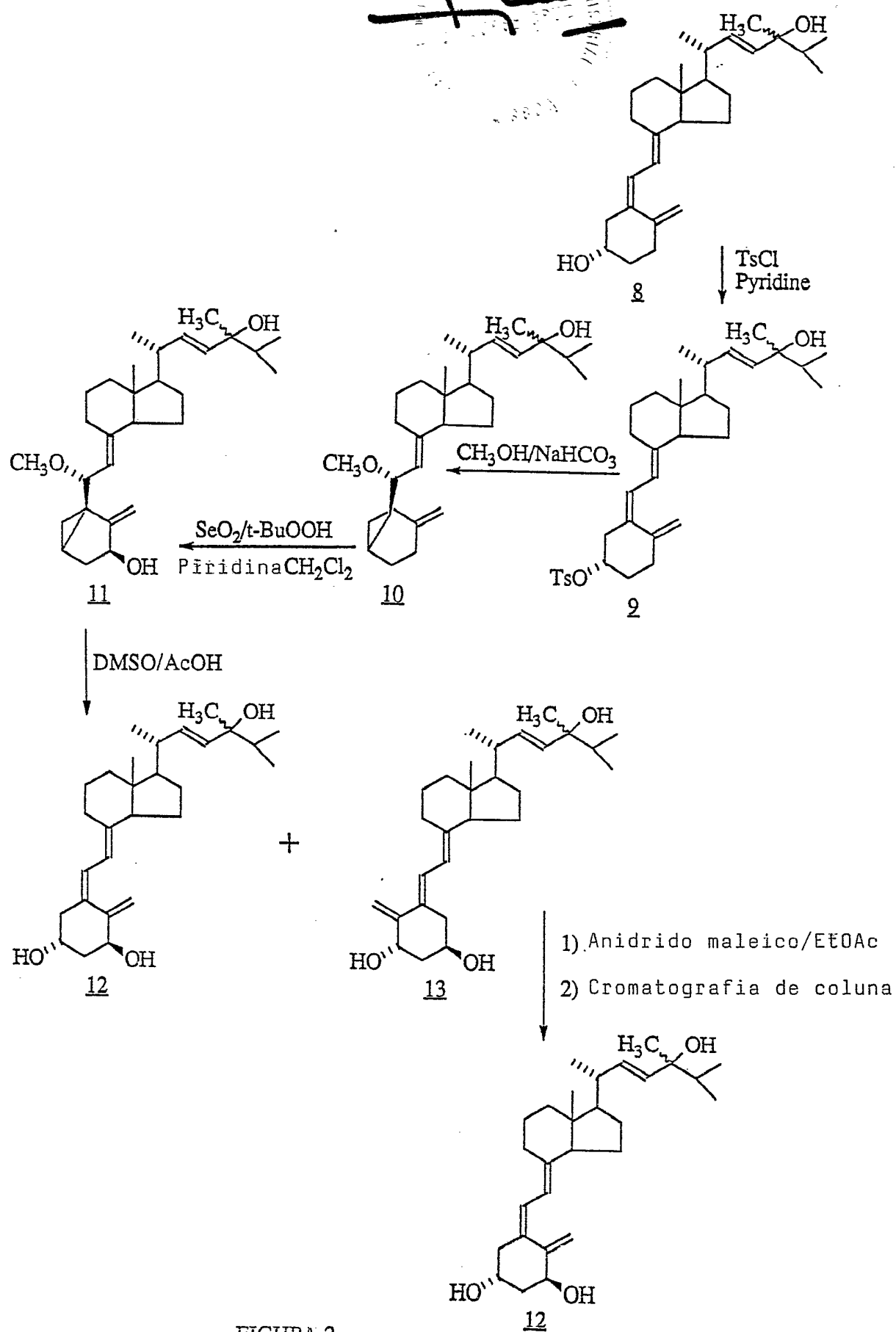


FIGURA 2