



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 277 293**

51 Int. Cl.:

A61K 31/59 (2006.01)

C07C 401/00 (2006.01)

A61P 3/14 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04777595 .2**

86 Fecha de presentación : **06.07.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1641466**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54

Título: **2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil-1 α -hidroxicalciferol y sus usos.**

30

Prioridad: **03.07.2003 US 613201**
08.09.2003 US 657533

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

73

Titular/es:
WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION
614 Walnut Street, Floor 13
Madison, Wisconsin 53705, US

72

Inventor/es: **Deluca, Hector, F. y**
Grzywacz, Pawel, K.

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 277 293 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

2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil-1 α -hidroxicalciferol y sus usos.

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a los derivados de vitamina D sustituidos en la posición del carbono 2, y más particularmente a 2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil-1 α -hidroxicalciferol y a sus usos farmacéuticos.

10 Se sabe que la hormona natural, 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ y su análogo de la serie de ergosterol, es decir, 1 α ,25-dihidroxitamina D₂, son reguladores sumamente potentes de la homeostasis del calcio en animales y humanos, y también se ha establecido su actividad en la diferenciación celular, Ostrem *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2610 (1987). Se han preparado y ensayado muchos análogos estructurales de estos metabolitos, que incluyen 1 α -hidroxivitamina D₃, 1 α -hidroxivitamina D₂, diversas vitaminas homologadas de cadena lateral y análogos fluorados.

15 Algunos de estos compuestos exhiben una separación interesante de actividades en la diferenciación celular y en la regulación del calcio. Esta diferencia de actividad puede ser útil en el tratamiento de una diversidad de enfermedades, tales como osteodistrofia renal, raquitismo resistente a vitamina D, osteoporosis, psoriasis y ciertos tumores malignos.

Recientemente se ha descubierto una clase nueva de análogos de vitamina D, es decir, los compuestos denominados 20 19-nor-vitamina D, que se caracterizan por la sustitución del grupo metileno exocíclico del anillo A (carbono 19), típico del sistema de la vitamina D, por dos átomos de hidrógeno.

La experimentación biológica de tales 19-nor-análogos (p.ej., 1 α ,25-dihidroxi-19-nor-vitamina D₃) reveló un perfil de actividad selectiva con elevada potencia en la inducción de la diferenciación celular, y muy baja actividad de 25 movilización del calcio. Así, estos compuestos son potencialmente útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de tumores malignos, o para el tratamiento de diversos trastornos cutáneos. Se han descrito dos métodos diferentes de síntesis de tales análogos de 19-nor-vitamina D (Perlman *et al.*, Tetrahedron Lett. 31, 1823 (1990); Perlman *et al.*, Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991), y DeLuca *et al.*, pat. de EE.UU. n° 5.086.191).

En la pat. de EE.UU. n° 4.666.634, el grupo de Chugai ha descrito y examinado los análogos 2 β -hidroxilo y alcoxilo (p.ej., ED-71) de 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ como fármacos potenciales para la osteoporosis y como agentes 30 antitumorales. Véase también Okano *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 163, 1444 (1989). Se han preparado y ensayado otros análogos del anillo A sustituidos en la posición 2 (con grupos hidroxialquilo, p.ej. ED-120, y fluoroalquilo) de 1 α ,25-dihidroxitamina D₃ (Miyamoto *et al.*, Chem. Pharm. Bull. 41, 1111 (1993); Nishii *et al.*, Osteoporosis Int. Suppl. 1, 190 (1993); Posner *et al.*, J. Org. Chem. 59, 7855 (1994), y J. Org. Chem. 60, 4617 (1995)).

Recientemente, también se han sintetizado análogos sustituidos en la posición 2 de 1 α ,25-dihidroxi-19-norvitamina D₃, es decir, compuestos sustituidos en la posición 2 con grupos hidroxilo o alcoxilo (DeLuca *et al.*, pat. de EE.UU. n° 5.536.713), los cuales exhiben perfiles de actividad interesantes y selectivos. Todos estos estudios indican que los 40 sitios de unión en los receptores de vitamina D pueden acomodar diferentes sustituyentes en C-2 en los análogos sintetizados de vitamina D.

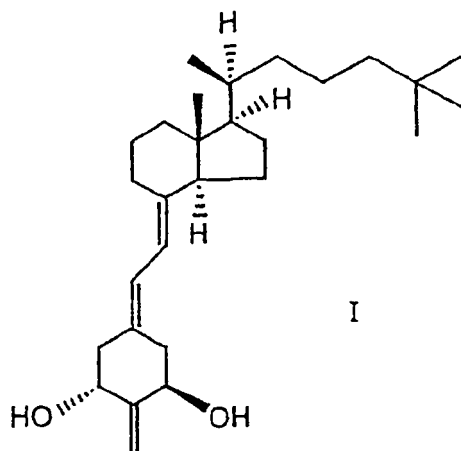
En un esfuerzo continuado por explorar la clase 19-nor de compuestos de vitamina D farmacológicamente importantes, se han sintetizado y ensayado sus análogos que se caracterizan por la presencia de un sustituyente alquilideno 45 (en particular metileno) en el carbono 2 (C-2), es decir, compuestos de 2-alquilideno-19-nor-vitamina D. Son de interés particular los análogos que se caracterizan por la transposición del grupo metileno exocíclico del anillo A, presente en el esqueleto de la vitamina D normal, desde el carbono 10 (C-10) al carbono 2 (C-2), es decir, compuestos de 2-metilen-19-nor-vitamina D. Tales análogos de vitamina D parecían objetivos interesantes, porque el grupo alquilideno relativamente pequeño (en particular metileno) en C-2 no debería interferir con la unión al receptor de vitamina D. Además, los estudios de mecánica molecular realizados sobre el modelo de 1 α -hidroxi-2-metilen-19-nor-vitaminas 50 indican que tal modificación molecular no cambia de forma sustancial la conformación del anillo A de ciclohexanodiol. Sin embargo, la introducción del grupo 2-metileno en el esqueleto de carbono de 19-nor-vitamina D cambia el carácter de los 1 α - y 3 β -hidroxilos del anillo A. Así, éstos están ambos en las posiciones alílicas, de forma similar al grupo 1 α -hidroxilo (crucial para la actividad biológica) en la molécula de la hormona natural, 1 α ,25-(OH)₂D₃.

55 Resumen de la invención

La presente invención se dirige a 2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil-1 α -hidroxicalciferol, a su actividad biológica y a los diversos usos farmacéuticos de este compuesto (en adelante denominado "TMM"). A diferencia de 2-metilen- 60 19-nor-(20S)-1 α ,25-dihidroxicolecalciferol, TMM no tiene un 25-hidroxilo, y a diferencia de 2-metilen-19-nor-(20S)-1 α -hidroxicolecalciferol, TMM no se puede 25-hidroxilar *in vivo* debido a la presencia de un grupo 25-metilo.

65

Estructuralmente, este análogo 19-nor se caracteriza por la fórmula general I mostrada a continuación:



El compuesto nuevo anterior exhibe un patrón deseado y sumamente ventajoso de actividad biológica. Este compuesto se caracteriza por una actividad relativamente elevada de transporte intestinal de calcio, comparado con la de $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 , mientras también exhibe una actividad relativamente baja comparado con $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 en su capacidad para movilizar calcio del hueso. Por lo tanto, este compuesto es sumamente específico en su actividad calcémica. Su actividad preferente de transporte intestinal de calcio permite la administración *in vivo* de este compuesto para el tratamiento de enfermedades óseas metabólicas en las que la disminución de masa ósea es una preocupación importante. Debido a su actividad calcémica intestinal, este compuesto sería un agente terapéutico preferido para el tratamiento de enfermedades en las que se desea la formación de hueso, tales como osteoporosis, especialmente osteoporosis con baja remodelación ósea, osteoporosis inducida por esteroides, osteoporosis senil u osteoporosis posmenopáusica, así como osteomalacia y osteodistrofia renal. El tratamiento puede ser transdérmico, oral o parenteral. Los compuestos pueden estar presentes en una composición en una cantidad de 0,01 a 100 μg por g de la composición, preferiblemente de 0,1 a 50 μg por g de la composición, y se pueden administrar en dosis de 0,01 $\mu\text{g}/\text{día}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{día}$, preferiblemente de 0,1 $\mu\text{g}/\text{día}$ a 50 $\mu\text{g}/\text{día}$.

El compuesto de la invención también es especialmente adecuado para el tratamiento y la profilaxis de trastornos humanos que se caracterizan por un desequilibrio en el sistema inmunitario, p.ej. en enfermedades autoinmunes, que incluyen esclerosis múltiple, *diabetes mellitus*, reacción de hospedador contra injerto y rechazo de trasplantes; y además para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide, asma y enfermedades inflamatorias intestinales, tales como enfermedad celíaca y enfermedad de Crohn, así como para la mejora de la consolidación de fracturas óseas y para la mejora de injertos óseos. Otras enfermedades que se pueden tratar con el compuesto de la invención son acné, alopecia, enfermedades cutáneas tales como sequedad cutánea (carencia de hidratación cutánea), laxitud cutánea excesiva (firmeza cutánea insuficiente), secreción sebácea insuficiente y arrugas, e hipertensión.

El anterior compuesto también se caracteriza por una actividad elevada sobre la diferenciación celular. Así, este compuesto también proporciona un agente terapéutico para el tratamiento de la psoriasis, o como agente antineoplásico, especialmente contra leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de próstata. El compuesto puede estar presente en una composición para tratar la psoriasis y/o el cáncer en una cantidad de 0,01 a 100 μg por g de la composición, y se puede administrar de forma tópica, transdérmica, oral o parenteral en dosis de 0,01 $\mu\text{g}/\text{día}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{día}$.

Esta invención también proporciona una síntesis nueva para la producción del producto final de estructura I, así como un intermedio nuevo de cetona formado durante la síntesis.

Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que ilustra la actividad relativa de 2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil- 1α -hidroxicalciferol o $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 al competir con la unión de $[3\text{H}]-1,25-(\text{OH})_2-D_3$ al receptor de vitamina D nuclear intestinal de cerdo;

La Figura 2 es un gráfico que ilustra el porcentaje de diferenciación de células HL-60 como función de la concentración de 2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil- 1α -hidroxicalciferol o $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 ; y

La Figura 3 es un gráfico que ilustra el calcio sérico respecto del tiempo en ratones a los que se les inyecta vehículo más alendronato, $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 más alendronato, o 2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil- 1α -hidroxicalci-

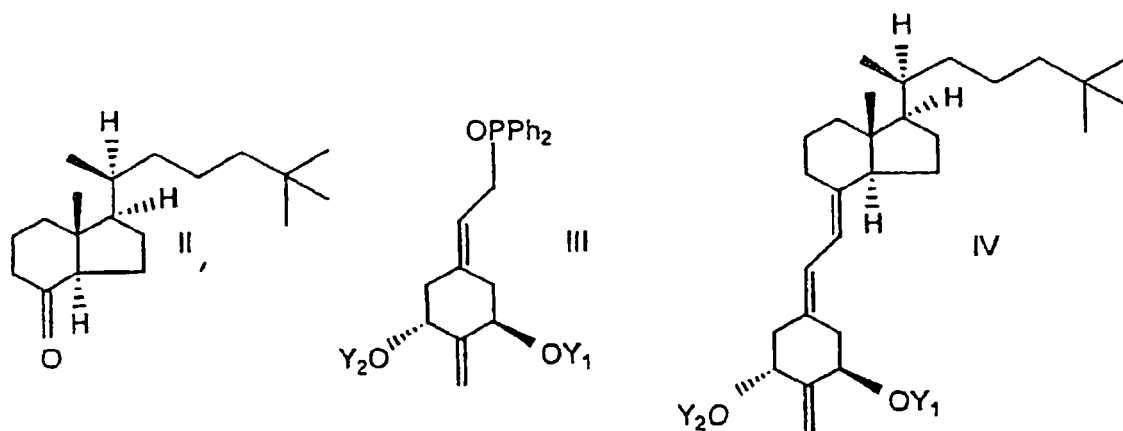
ferol (TMM) más alendronato. Ya que alendronato bloquea la resorción ósea, la elevación del calcio sérico refleja solamente la absorción intestinal.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en la descripción y en las reivindicaciones, la expresión "grupo protector de hidroxilo" significa cualquier grupo usado habitualmente para la protección temporal de las funciones hidroxilo, tal como, por ejemplo, grupos alcóxicarbonilo, acilo, alquilsililo o alquilarilsililo (en adelante denominados simplemente grupos "sililo"), y grupos alcóxialquilo. Los grupos protectores alcóxicarbonilo son grupos alquil-O-CO- tales como metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, propoxycarbonilo, isopropoxycarbonilo, butoxycarbonilo, isobutoxycarbonilo, tert-butoxycarbonilo, benciloxycarbonilo o aliloxycarbonilo. El término "acilo" significa un grupo alcanoilo de 1 a 6 carbonos, en todas sus formas isoméricas, o un grupo carboxialcanoilo de 1 a 6 carbonos, tal como un grupo oxalilo, malonilo, succinilo, glutarilo, o un grupo acilo aromático tal como benzoilo, o un grupo benzoilo sustituido con halógeno, nitro o alquilo. La palabra "alquilo", como se usa en la descripción o en las reivindicaciones, denota un radical alquilo de cadena lineal o ramificada de 1 a 10 carbonos, en todas las formas isoméricas. Los grupos protectores alcóxialquilo son grupos tales como metoximetilo, etoximetilo, metoxietoximetilo o tetrahidrofuranilo y tetrahidropirranilo. Los grupos protectores sililo preferidos son trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, dibutildimetilsililo, difenildimetilsililo, fenildimetilsililo, difenil-t-butilsililo y radicales sililo alquilados análogos. El término "arilo" especifica un grupo fenilo sustituido con fenilo, o con alquilo, nitro o halógeno.

Un grupo "hidroxilo protegido" es un grupo hidroxilo derivatizado o protegido mediante cualquiera de los grupos anteriores usados habitualmente para la protección temporal o permanente de las funciones hidroxilo, p.ej. los grupos sililo, alcóxialquilo, acilo o alcóxicarbonilo, como se definieron previamente. Los términos "hidroxialquilo", "deuterioalquilo" y "fluoroalquilo" se refieren a un radical alquilo sustituido mediante uno o más grupos hidroxilo, deuterio o flúor, respectivamente.

La preparación de 2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil-1 α -hidroxicalciferol, que tiene la estructura básica I, se puede realizar mediante un método general habitual, es decir, la condensación de una cetona bicíclica II de tipo Windaus-Grundmann con el óxido de fosfina III alílico hasta el análogo IV de 2-metilen-19-nor-vitamina D correspondiente, seguido de la desprotección en C-1 y C-3 en el último compuesto:



En las estructuras III y IV, los grupos Y_1 e Y_2 preferiblemente son grupos protectores de hidroxilo, y se entiende también que cualquier grupo funcional que podría ser sensible, o que interfiere con la reacción de condensación, se protege de forma adecuada como se conoce en la técnica. El proceso mostrado anteriormente representa una aplicación del concepto de síntesis convergente, que se ha aplicado de forma eficaz para la preparación de compuestos de vitamina D [p.ej. Lythgoe *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 590 (1978); Lythgoe, *Chem. Soc. Rev.* 9, 449 (1983); Toh *et al.*, *J. Org. Chem.* 48, 1414 (1983); Baggiolini *et al.*, *J. Org. Chem.* 51, 3098 (1986); Sardina *et al.*, *J. Org. Chem.* 51, 1264 (1986); *J. Org. Chem.* 51, 1269 (1986); DeLuca *et al.*, pat. de EE.UU. n.º 5.086.191; DeLuca *et al.*, pat. de EE.UU. n.º 5.536.713].

Se pueden preparar hidrindanonas de la estructura general II mediante métodos conocidos. Un método específico comienza con la ozonación de la vitamina D_2 , y se describe y se ilustra aquí con referencia a los Esquemas 1 y 2.

Para la preparación de los óxidos de fosfina necesarios de estructura general III, se ha desarrollado una ruta sintética nueva que comienza a partir del derivado de quinicato de metilo, obtenido fácilmente a partir de ácido (1R,3R,4S,5R)-(-)-quinico comercial como describieron Perlman *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 32, 7663 (1991) y DeLuca *et al.*, pat. de EE.UU. n.º 5.086.191. El proceso total de transformación del éster de metilo de partida en los sintones del anillo A deseados se resume con detalle en estas dos referencias. La etapa final de la síntesis será típicamente la hidrólisis de los grupos protectores de hidroxilo para proporcionar 2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil-1 α -hidroxicalciferol (TMM).

ES 2 277 293 T3

Esta invención se describe mediante los siguientes ejemplos ilustrativos. En estos ejemplos, los productos específicos identificados mediante numeración arábiga (p.ej. 1, 2, 3, etc.) se refieren a las estructuras específicas así identificadas en la descripción precedente y en el Esquema 1, Esquema 2 y Esquema 3. Se debería hacer referencia a los Esquemas 1 y 2 para el Ejemplo 1, y al Esquema 3 para el Ejemplo 2.

5

Ejemplo 1

Preparación de (20S)-des-A,B-8β-(*tert*-butildimetilsilil)oxi-20-(hidroximetil)pregnano (2)

10 Se hizo pasar ozono a través de una disolución de vitamina D₂ (3 g, 7,6 mmoles) en metanol (250 mL) y piridina (2,44 g, 2,5 mL, 31 mmoles) durante 50 min a -78°C. Después se hizo burbujear oxígeno en la mezcla de reacción durante 15 min para eliminar el ozono residual, y la disolución se trató con NaBH₄ (0,75 g, 20 mmoles). Después de 20 min se añadió la segunda porción de NaBH₄ (0,75 g, 20 mmoles) y se dejó que la mezcla se calentase a temperatura ambiente. Después se añadió la tercera porción de NaBH₄ (0,75 g, 20 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 18 h. La reacción se paró con agua (40 mL) y la disolución se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con acetato de etilo (3 x 80 mL) y la fase orgánica combinada se lavó con HCl ac. 1M, NaHCO₃ ac. saturado, se secó (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice con hexano/acetato de etilo (75:25) para proporcionar (20S)-des-A,B-20-(hidroximetil)pregnan-8β-ol 1 (1,21 g, 75% de rendimiento) en forma de cristales blancos.

20

Se añadió trifluorometanosulfonato de *tert*-butildimetilsililo (3,24 mL, 3,72 g, 14,1 mmoles) a una disolución del 8β,20-diol 1 (1 g, 4,7 mmoles) y 2,6-lutidina (1,64 mL, 1,51 g, 14,1 mmoles) en DMF anhidro (15 mL) a 0°C. La mezcla se agitó en atmósfera de argón a 0°C durante 1 h y después a temperatura ambiente durante 18 h. La reacción se paró con agua (50 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en THF anhidro (8 mL), se añadió trietilamina (3 mL, 2,17 g, 21,5 mmoles) y una disolución de fluoruro de tetrabutilamonio (1 M en THF, 6,5 mL, 6,5 mmoles), seguido de tamices moleculares 4A recién activados (3 g). La mezcla de reacción se agitó en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 4 h, después se filtró a través de una capa fina de celita y se evaporó. El residuo se disolvió en acetato de etilo (30 mL), se lavó con salmuera, agua, se secó (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida. 30 El alcohol puro 2 (1,42 g, 93% de rendimiento) se aisló mediante cromatografía en gel de sílice con hexano/acetato de etilo (97,5:2,5 → 95:5) en forma de un aceite incoloro: ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 4,00 (1H, d, J = 2,4 Hz, 8α-H), 3,63 (1H, dd, J = 10,5, 3,2 Hz, 22-H), 3,39 (1H, dd, J = 10,5, 6,8 Hz, 22-H), 1,94 (1H, br.d, J = 12,5 Hz), 1,02 (3H, d, J = 6,6 Hz, 21-H₃), 0,924 (3H, s, 18-H₃), 0,882 (9H, s, Si-*t*-Bu), 0,005 y -0,010 (cada 3H, cada s, cada Si-Me); ¹³C RMN (125 MHz) δ 69,29 (d, C-8), 67,94 (t, C-22), 53,06 (d), 52,80 (d), 42,12 (s, C-13), 40,54 (t), 38,27 (d), 34,39 (t), 35 26,79 (t), 25,79 (q, SiCMe₃), 23,08 (t), 18,00 (s, SiCMe₃), 17,61 (t), 16,65 (q, C-21), 13,75 (q, C-18), -4,81 y -5,18 (cada q, cada SiMe).

Preparación de (20S)-des-A,B-8β-(*tert*-butildimetilsilil)oxi-20-formilpregnano (3)

40 Se añadió complejo trióxido de azufre-piridina (1,32 g, 8,28 mmoles) a una disolución del alcohol 2 (451 mg, 1,38 mmoles), trietilamina (960 μL, 697 mg, 6,9 mmoles) en cloruro de metileno anhidro (20 mL) y DMSO anhidro (5 mL) a 0°C. La mezcla de reacción se agitó en atmósfera de argón a 0°C durante 20 min y después se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice con hexano/acetato de etilo (95:5) para proporcionar el aldehído 3 (364 mg, 81% de rendimiento) en forma de un aceite: ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 9,55 (1H, d, J = 3,1 Hz, CHO), 4,00 (1H, s, 8α-H), 2,33 (1H, m, 20-H), 1,89 (1H, dm, J = 12,4 Hz), 1,07 (3H, d, J = 6,8 Hz, 21-H₃), 0,939 (3H, s, 18-H₃), 0,862 (9H, s, Si-*t*-Bu), -0,009 y -0,026 (cada 3H, cada s, cada SiMe); ¹³C RMN (125 MHz) δ 205,37 (d, CHO), 68,99 (d, C-8), 52,28 (d), 51,58 (d), 49,15 (d), 42,58 (s, C-13), 40,35 (t), 34,29 (t), 26,16 (t), 25,74 (q, SiCMe₃), 23,27 (t), 17,96 (s, SiCMe₃), 17,52 (t), 14,04 (q, C-21), 13,28 (q, C-18), -4,85 y -5,23 (cada q, cada SiMe).

50 Preparación de (20R)-des-A,B-8β-(*tert*-butildimetilsilil)oxi-20-(hidroximetil)pregnano (4)

El aldehído 3 (364 mg, 1,12 mmoles) se disolvió en cloruro de metileno (15 mL) y se añadió una disolución de n-Bu₄NOH ac. del 40% (1,47 mL, 1,45 g, 2,24 mmoles). La mezcla resultante se agitó en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 16 h, se diluyó con cloruro de metileno (20 mL), se lavó con agua, se secó (Na₂SO₄) 55 y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice con hexano/acetato de etilo (95:5) para proporcionar una mezcla de aldehído 3 y su epímero en la posición 20 (292 mg, 80% de rendimiento) en una proporción aprox. 1:2 (mediante ¹H RMN).

Esta mezcla de aldehídos (292 mg, 0,9 mmoles) se disolvió en THF (5 mL) y se añadió NaBH₄ (64 mg, 1,7 mmoles), seguido de la adición gota a gota de etanol (5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min y se paró con una disolución saturada de NH₄Cl ac. La mezcla se extrajo con éter (3 x 20 mL), y la fase orgánica combinada se lavó con agua, se secó (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice con hexano/acetato de etilo (96:4 → 80:20) para proporcionar el (20R)-alcohol 4 deseado puro (160 mg, 55% de rendimiento) en forma de un aceite y una mezcla de 4 y de su epímero 2 en la posición 65 20 (126 mg, 43% de rendimiento) en una proporción aprox. 1:3 (mediante ¹H RMN).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 4,00 (1H, d, J = 1,9 Hz, 8α-H), 3,70 (1H, dd, J = 10,6, 3,2 Hz, 22-H), 3,43 (1H, dd, J = 10,6, 7,0 Hz, 22-H), 0,94 (3H, d, J = 6,7 Hz, 21-H₃), 0,927 (3H, s, 18-H₃), 0,884 (9H, s, Si-*t*-Bu), 0,007 y -0,006

ES 2 277 293 T3

(cada 3H, cada s, SiMe); ^{13}C RMN (125 MHz) δ 69,30 (d, C-8), 66,83 (t, C-22), 53,02 (d), 52,96 (d), 41,91 (s, C-13), 40,12 (t), 37,48 (d), 34,38 (t), 26,71 (t), 25,79 (q, SiCMe₃), 22,85 (t), 18,01 (s, SiCMe₃), 17,64 (t), 16,58 (q, C-21), 14,07 (q, C-18), -4,81 y -5,18 (cada q, cada SiMe).

5 Preparación de (20R)-des-A,B-8 β -(*tert*-butildimetilsilil)oxi-20-[(*p*-toluensul-fonil)oximetil]pregnano (5)

A una disolución agitada del alcohol 4 (134 mg, 0,41 mmoles), 4-dimetilaminopiridina (10 mg, 0,08 mmoles) y trietilamina (258 μL , 187 mg, 1,85 mmoles) en cloruro de metileno anhidro (6 mL) se le añadió cloruro de *p*-toluensulfonylo (118 mg, 0,62 mmoles) a 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente (4 h) y se continuó con la agitación durante 22 h adicionales. Se añadió cloruro de metileno (20 mL) y la mezcla se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ ac., se secó (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice con hexano/acetato de etilo (95:5) para proporcionar el tosilato 5 (192 mg, 98% de rendimiento) en forma de un aceite incoloro: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +15,7^{\circ}$ (c 1,0, CHCl₃); ^1H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,78 (2H, d, J = 8,2 Hz, *o*-H_{Ts}), 7,33 (2H, d, J = 8,2 Hz, *m*-H_{Ts}), 4,11 (1H, dd, J = 9,3, 3,4 Hz, 22-H), 3,96 (1H, d, J = 2,1 Hz, 8 α -H), 3,77 (1H, dd, J = 9,3, 7,4 Hz, 22-H), 2,443 (3H, s, Me_{Ts}), 0,87 (3H, d, J = 6,5 Hz, 21-H₃), 0,864 (9H, s, Si-*t*-Bu), 0,810 (3H, s, 18-H₃), -0,009 y -0,027 (cada 3H, cada s, cada SiMe); ^{13}C RMN (125 MHz) δ 144,55 (s, *p*-C_{Ts}), 133,06 (s, *i*-C_{Ts}), 129,70 (d, *m*-C_{Ts}), 127,91 (d, *o*-C_{Ts}), 74,26 (t, C-22), 69,09 (d, C-8), 52,65 (d), 52,51 (d), 41,72 (s, C-13), 39,83 (t), 34,65 (d), 34,16 (t), 26,60 (t), 25,74 (q, SiCMe₃), 22,65 (t), 21,61 (q, Me_{Ts}), 17,86 (s, SiCMe₃), 17,48 (t), 16,65 (q, C-21), 13,99 (q, C-18), -4,86 y -5,23 (cada q, cada SiMe); MS (EI) *m/z* no M⁺, 437 (2, M⁺ - C₃H₇), 423 (1, M⁺ - C₄H₉), 348 (2, M⁺ - *t*-BuMe₂SiOH), 309 (2, M⁺ - OSO₂C₆H₄CH₃), 229 (76), 177 (100, M⁺ - *t*-BuMe₂SiOH - OSO₂C₆H₄CH₃), 135 (33), 121 (38), 107 (27), 95 (41); masa exacta calculada para C₂₂H₃₅O₄SSi (M⁺ - C₄H₉) 423,2025, hallada 423,2036.

25 Preparación de (20S)-des-A,B-8 β -(*tert*-butildimetilsilil)oxi-25-metilcolestano (8)

Se sometió a reflujo limaduras de magnesio (0,53 g, 22 mmoles), 1-cloro-3,3-dimetilbutano 6 (1,32 g, 11 mmoles) y yodo (2 cristales) en THF anhidro (15 mL) durante 6 h. La disolución del reactivo de Grignard 7 formado se enfrió a -78°C y se añadió gota a gota por medio de una cánula a una disolución del tosilato 5 (183 mg, 0,38 mmoles) en THF anhidro (3 mL) a -78°C. Después, se añadieron 6 mL de disolución de Li₂CuCl₄ (preparada mediante la disolución de LiCl seco (232 mg, 5,46 mmoles) y CuCl₂ seco (368 mg, 2,75 mmoles) en THF anhidro (27 mL)) gota a gota por medio de una cánula a la mezcla de reacción a -78 °C. Se quitó el baño de refrigeración y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h, y después se vertió en una disolución de H₂SO₄ ac. 1 M (25 mL) que contenía hielo (aprox. 100 g). La mezcla se extrajo con cloruro de metileno (3 x 50 mL) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con NH₄Cl ac. saturado, NaHCO₃ ac. saturado, se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron a presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía en gel de sílice con hexano para proporcionar el producto 8 (130 mg, 87% de rendimiento) en forma de un aceite incoloro: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +19,9^{\circ}$ (c 2,2, CHCl₃); ^1H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 4,00 (1H, d, J = 1,5 Hz, 8 α -H), 1,94 (1H, dm, J = 12,5 Hz), 0,915 (3H, s, 18-H₃), 0,891 (9H, s, Si-*t*-Bu), 0,866 (9H, s, 25-Me₃), 0,81 (3H, d, J = 6,5 Hz, 21-H₃), 0,010 y -0,002 (cada 3H, cada s, cada SiMe); ^{13}C RMN (125 MHz) δ 69,52 (d, C-8), 56,46 (d), 53,17 (d), 44,57 (t), 42,20 (s, C-13), 40,68 (t), 36,17 (t), 34,82 (d), 34,51 (t), 30,36 (s, C-25), 29,47 (q, 25-Me₃), 27,27 (t), 25,82 (q, SiCMe₃), 23,01 (t), 20,99 (t), 18,60 (q, C-21), 18,03 (s, SiCMe₃), 17,76 (t), 14,00 (q, C-18), -4,78 y -5,15 (cada q, cada SiMe); MS (EI) *m/z* no M⁺, 379 (11, M⁺ - CH₃), 351 (3, M⁺ -), 337 (72), 319 (2), 292 (10), 261 (66), 247 (10), 159 (17), 135 (27), 75 (100); masa exacta calculada para C₂₄H₄₇OSi (M⁺ - CH₃) 379,3396, hallada 379,3398.

45 Preparación de (20S)-des-A,B-25-metilcolestano-8 β -ol (9)

El alcohol protegido 8 (100 mg, 254 μmoles) se disolvió en metanol anhidro (5 mL) y se añadió fluoruro de hidrógeno-piridina (2,5 mL). La mezcla se agitó en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 3 días, y después se añadió acetato de etilo (20 mL). La fase orgánica se lavó con salmuera y agua, se secó (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con hexano y se sometió a cromatografía en gel de sílice con hexano para recuperar el sustrato 8 (16 mg). La elución con hexano/acetato de etilo (8:2) proporcionó el alcohol puro 9 (58 mg, 82% de rendimiento) en forma de un aceite incoloro: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +8,2^{\circ}$ (c 1,15, CHCl₃); ^1H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 4,07 (1H, s, 8 α -H), 1,98 (1H, dm, J = 12,2 Hz), 0,928 (3H, s, 18-H₃), 0,861 (9H, s, 25-Me₃), 0,82 (3H, d, J = 6,5 Hz, 21-H₃); ^{13}C RMN (125 MHz) δ 69,46 (d, C-8), 56,32 (d), 52,68 (d), 44,56 (t), 41,89 (s, C-13), 40,31 (t), 36,09 (t), 34,82 (d), 33,59 (t), 30,35 (s, C-25), 29,45 (q, 25-Me₃), 27,12 (t), 22,43 (t), 20,96 (t), 18,54 (q, C-21), 17,50 (t), 13,74 (q, C-18); MS (EI) *m/z* 280 (34, M⁺), 265 (15, M⁺ - Me), 247 (18), 237 (1), 166 (28), 135 (30), 111 (100), 97 (37), 81 (23); masa exacta calculada para C₁₉H₃₆O (M⁺) 280,2766, hallada 280,2753.

60 Preparación de (20S)-des-A,B-25-metilcolestano-8-ona (II)

Se añadió dicromato de piridinio (102 mg, 271 μmoles) a una disolución del alcohol 9 (19 mg, 68 μmoles) y *p*-toluensulfonato de piridinio (2 mg, 8 μmoles) en cloruro de metileno anhidro (6 mL). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se filtró a través de un cartucho Sep-Pak de sílice Waters (2 g) que se lavó adicionalmente con hexano/acetato de etilo (8:2). Después de la eliminación de los disolventes se obtuvo la cetona II (16 mg, 85% de rendimiento) en forma de un aceite incoloro: ^1H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 2,45 (1H, dd, J = 11,5, 7,7 Hz), 0,875 (9H, s, 25-Me₃), 0,86 (3H, d, J = 5,9 Hz, 21-H₃), 0,638 (3H, s, 18-H₃); ^{13}C RMN (125 MHz) δ 212,18 (C-8), 62,06, 56,25, 49,95 (C-13), 44,52, 40,96, 38,85, 36,30, 34,90, 30,35 (C-25), 29,42 (25-Me₃), 27,21, 24,06, 20,89, 18,95 (C-21), 18,49, 12,68 (C-18); MS (EI) *m/z* 278 (66, M⁺), 263 (79, M⁺ - Me), 245

ES 2 277 293 T3

(10, M⁺ - Me - H₂O), 235 (84, M⁺ - Me - CO), 179 (12, M⁺ - C₇H₁₅), 166 (25), 152 (49, M⁺ - C₉H₁₈), 124 (100, M⁺ - CO - C₉H₁₈), 111 (96), 96 (42), 81 (30); masa exacta calculada para C₁₉H₃₄O 278,2610, hallada 278,2606.

Ejemplo 2

5

Preparación de (20S)-2-metilen-19-nor-25-metil-1 α -hidroxicalciferol (I)

A una disolución de óxido de fosfina 10 (45 mg, 77 μ moles) en THF anhidro (500 μ L) a -20°C se le añadió lentamente PhLi (1,56 M en ciclohexano-éter, 100 μ L, 156 μ moles) en atmósfera de argón con agitación. La disolución se volvió de color naranja intenso. Después de 30 min la mezcla se enfrió a -78°C, y se añadió lentamente una disolución preenfriada (-78°C) de cetona II (17 mg, 61 μ moles) en THF anhidro (200 + 100 μ L). La mezcla se agitó en atmósfera de argón a -78 °C durante 3 h y a 0 °C durante 18 h. Se añadió acetato de etilo, la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (Na₂SO₄) y se evaporó. El residuo se disolvió en hexano y se aplicó a un cartucho Sep-Pak de sílice Waters (2 g). El cartucho se lavó con hexano y hexano/acetato de etilo (99,5:0,5) para proporcionar el derivado de 19-norvitamina 11 (24 mg). El Sep-Pak se lavó después con hexano/acetato de etilo (96:4) para recuperar la cetona II de anillos C,D inalterada (4 mg), y con acetato de etilo para recuperar el óxido de difenilfosfina 10 (21 mg). La vitamina protegida 11 se purificó adicionalmente mediante HPLC (columna de 10 x 250 mm Zorbax-Silica, 4 mL/min) mediante el uso del sistema de disolventes hexano/2-propanol (99,9:0,1). Se eluyó el compuesto 11 puro (19,9 mg, 51% de rendimiento) a un R_v = 15 mL en forma de un aceite incoloro: UV (en hexano) λ_{\max} 262,2, 252,2, 243,3 nm; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 6,22 y 5,83 (1H y 1H, cada d, J = 11,2 Hz, 6- y 7-H), 4,97 y 4,92 (1H y 1H, cada s, =CH₂), 4,41 (2H, m, 1 β - y 3 α -H), 2,82 (1H, br. d, J = 12,3 Hz, 9 β -H), 2,53 (1H, dd, J = 13,2, 5,8 Hz, 10 α -H), 2,46 (1H, dd, J = 12,7, 4,6 Hz, 4 α -H), 2,31 (1H, dd, J = 13,2, 2,9 Hz, 10 β -H), 2,17 (1H, dd, J = 12,7, 8,3 Hz, 4 β -H), 2,30 - 1,93 (2H, m), 1,90 - 1,80 (1H, m), 0,891 (9H, s, Si-*t*-Bu), 0,862 (9H, s, 25-Me₃), 0,856 (9H, s, Si-*t*-Bu), 0,84 (3H, d, J = 6,4 Hz, 21-H₃), 0,535 (3H, s, 18-H₃), 0,076, 0,061, 0,046 y 0,019 (cada 3H, cada s, 4 x Si-CH₃); ¹³C RMN (125 MHz) δ 152,93 (s, C-2), 141,32 (s, C-8), 132,68 (s, C-5), 122,42 (d, C-6), 116,04 (d, C-7), 106,27 (t, =CH₂), 72,52 y 71,59 (cada d, C-1 y C-3), 56,34 (d), 56,17 (d), 47,59 (t), 45,70 (s, C-13), 44,57 (t), 40,47 (t), 38,51 (t), 36,34 (t), 35,61 (d), 30,39 (s, C-25), 29,48 (q, 25-Me₃), 28,76 (t), 27,56 (t), 25,85 (q, SiCMe₃), 25,79 (q, SiCMe₃), 23,48 (t), 22,12 (t), 20,93 (t), 18,65 (q, C-21), 18,28 (s, SiCMe₃), 18,18 (s, SiCMe₃), 12,31 (q, C-18), -4,81, -4,87, -5,05 y -5,14 (cada q, cada SiMe); MS (EI) *m/z* 642 (8, M⁺), 627 (3, M⁺ - Me), 585 (6, M⁺ - C₄H₉), 510 (100, M⁺ - *t*-BuMe₂SiOH), 495 (5, M⁺ - *t*-BuMe₂SiOH - Me), 453 (3), 366 (24), 257 (7), 234 (9), 197 (7), 147 (10), 73 (46); masa exacta calculada para C₄₀H₇₄O₂Si₂ (M⁺) 642,5227, hallada 642,5206.

La vitamina protegida 11 (1,7 mg, 2,6 μ moles) se disolvió en THF anhidro (3 mL) y se añadió una disolución de fluoruro de tetrabutilamonio (1 M en THF, 50 μ L, 50 μ moles), seguido de tamices moleculares 4A recién activados (300 mg). La mezcla se agitó en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 18 h, después se diluyó con 2 mL de hexano/acetato de etilo (6:4) y se aplicó en un cartucho Sep-Pak de sílice Waters (2 g). La elución con el mismo sistema de disolventes proporcionó el producto I bruto, que se purificó adicionalmente mediante HPLC (columna de 10 x 250 mm Zorbax-Silica, 4 mL/min) mediante el uso del sistema de disolventes hexano/2-propanol (9:1). Se recogió 2-metilen-19-norvitamina I analíticamente pura (768 μ g, 71% de rendimiento) a un R_v = 26 mL en forma de un aceite incoloro: UV (en EtOH) λ_{\max} 261,2, 251,3, 243,1 nm; ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 6,36 y 5,89 (1H y 1H, cada d, J = 11,3 Hz, 6- y 7-H), 5,11 y 5,09 (cada 1H, cada s, =CH₂), 4,48 (2H, m, 1 β - y 3 α -H), 2,85 (1H, dd, J = 13,3, 4,7 Hz, 10 β -H), 2,82 (1H, br d, J = 13,0 Hz, 9 β -H), 2,57 (1H, dd, J = 13,3, 3,8 Hz, 4 α -H), 2,33 (1H, dd, J = 13,3, 6,2 Hz, 4 β -H), 2,29 (1H, dd, J = 13,3, 8,3 Hz, 10 α -H), 2,05 - 1,95 (2H, m), 1,90 - 1,82 (1H, m), 0,866 (9H, s, 25-Me₃), 0,84 (3H, d, J = 6,5 Hz, 21-H₃), 0,548 (3H, s, 18-H₃); MS (EI) *m/z* 414 (100, M⁺), 399 (8, M⁺ - Me), 396 (5, M⁺ - H₂O), 381 (8, M⁺ - Me - H₂O), 363 (2, M⁺ - Me - 2H₂O), 329 (28, M⁺ - C₆H₁₃), 287 (36, M⁺ - C₉H₁₉), 261 (24), 192 (14), 161 (19), 147 (37), 135 (51), 107 (42); masa exacta calculada para C₂₈H₄₆O₂ 414,3498, hallada 414,3515.

Actividad biológica de 2-metilen-19-nor-20(s)-25-metil-1 α -hidroxicalciferol

Se llevó a cabo la unión competitiva del análogo al receptor intestinal porcino mediante el método descrito por Dame *et al* (Biochemistry 25, 4523-4534, 1986).

La diferenciación de promielocitos HL-60 a monocitos se determinó como describió Ostrem *et al* (J. Biol. Chem. 262, 14164-14171, 1987).

55

La unión competitiva de 1 α ,25-(OH)₂D₃ y del análogo de vitamina D sintetizado al receptor de vitamina D intestinal porcino se llevó a cabo por triplicado en dos ocasiones diferentes. Los valores de DE₅₀ se pueden obtener de las curvas dosis-respuesta (Fig. 1), y representan la concentración de análogo necesaria para un desplazamiento del 50% de 1 α ,25-(OH)₂D₃ radiomarcado de la proteína receptora. La proporción de unión se puede determinar mediante la proporción de la DE₅₀ media del análogo respecto de la DE₅₀ para 1 α ,25-(OH)₂D₃.

60

Se determinó la inducción de la diferenciación de promielocitos HL-60 a monocitos mediante 1 α ,25-(OH)₂D₃ y mediante el análogo de vitamina D sintetizado midiendo el porcentaje de células que reducían azul de nitrotetrazolio (NBT). El experimento se repitió tres veces. Los valores de DE₅₀ se pueden obtener de las curvas dosis-respuesta (Fig. 2), y representan la concentración de análogo capaz de inducir una maduración del 50%. La proporción de actividad de diferenciación se puede determinar después a partir de la proporción de la DE₅₀ media del análogo respecto de la DE₅₀ para 1 α ,25-(OH)₂D₃.

65

ES 2 277 293 T3

Ejemplo 3

Objetivo: Determinar si TMM tiene actividad de movilización de calcio óseo o no, y cómo es en comparación con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y 2-metilen-19-nor-20(S)- $1\alpha,25$ -(OH) $_2\text{D}_3$ (en adelante denominado 2MD).

Animales

Los ratones CD-1 de 5-6 semanas de edad se colocaron en el cuarto de ratones +D y se alimentaron con una dieta normal. Se dejó que se aclimatasen durante 5 días antes de cambiarlos a la dieta purificada descrita por Yang *et al* (Arch. Biochem. Biophys. 303, 98, 1993) que contenía un 0,02% de calcio y un 0,3% de P. Dos días después del cambio de dieta comenzó la administración de la dosis.

Diseño experimental

Todos los animales se pesaron antes de la administración de la dosis. Los animales se dividieron en grupos que contenían 5 animales/grupo. El fármaco se administró a todos los animales mediante sonda oral una vez. La dosis se administró en 100 μl de aceite Neobee/ratón de 25 g. Se extrajo sangre (alrededor de 80 μl) del seno retroorbital antes de la dosis y 24 h, 48 h y 72 h tras la dosis, y se midió el calcio sérico total mediante el uso de espectrometría de absorción atómica.

Grupo 1: Aceite Neobee

Grupo 2: 50 μg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{kg}$ de pc

Grupo 3: 450 μg de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{kg}$ de pc

Grupo 4: 0,5 μg de 2MD/kg de pc

Grupo 5: 1,5 μg de 2MD/kg de pc

Grupo 6: 4,5 μg de 2MD/kg de pc

Grupo 7: 13,5 μg de 2MD/kg de pc

Grupo 8: 0,5 μg de TMM/kg de pc

Grupo 9: 1,5 μg de TMM/kg de pc

Grupo 10: 4,5 μg de TMM/kg de pc

Grupo 11: 13,5 μg de TMM/kg de pc.

Resultados

La Tabla 1 muestra la elevación del calcio sérico de los ratones alimentados con la dieta del 0,02% de calcio y a los que se administró vehículo, vehículo más $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, vehículo más 2MD, o vehículo más TMM. La elevación del calcio sérico proviene solamente de la movilización ósea, ya que no hay disponible calcio procedente del intestino.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 277 293 T3

TABLA 1

Actividad de movilización del calcio óseo

Compuesto	Nivel de dosis	Movilización de calcio óseo (mg/dL)			
		0 h	24 h	48 h	72 h
Vehículo		8,4±0,3	8,9±0,1	9,3±0,1	9,1±0,1
1 α ,25(OH) ₂ D ₃	50 μ g/kg	8,8±0,2	10,9±0,1	9,6±0,3	9,1±0,2
	450 μ g/kg	8,8±0,2	11,6±0,3	11,4±0,7	9,4±0,4
2-metilen-19-nor-1 α ,25(OH) ₂ D ₃	0,5 μ g/kg	8,8±0,3	9,4±0,2	9,2±0,2	8,9±0,2
	1,5 μ g/kg	8,8±0,2	10,1±0,1	10,5±0,2	10,1±0,2
(2MD)	4,5 μ g/kg	8,8±0,0	10,9±0,2	12,6±0,5	12,0±0,4
	13,5 μ g/kg	8,6±0,1	11,5±0,4	10,8±0,5	13,4±0,6
2-metilen-19-nor-25-metil-1 α ,25(OH) ₂ D ₃	0,5 μ g/kg	8,7±0,2	8,8±0,1	8,7±0,1	8,7±0,1
	1,5 μ g/kg	8,7±0,2	8,7±0,2	8,6±0,1	8,9±0,2
(TMM)	4,5 μ g/kg	8,5±0,3	9,0±0,1	8,9±0,1	8,8±0,2
	13,5 μ g/kg	8,8±0,1	9,7±0,2	9,9±0,3	9,5±0,3

Los ratones alimentados con una dieta de un 0,02% de calcio pueden elevar sus concentraciones de calcio sérico solamente mediante resorción ósea, ya que no hay calcio disponible por medio de la absorción intestinal. Los datos de la Tabla 1 demuestran que TMM solamente provocó resorción ósea *in vivo* a la dosis más elevada. A dosis menores, no hubo una elevación significativa del calcio sérico. Por contraste, se descubrió que 1 α ,25-(OH)₂D₃ es eficaz a 50 μ g/kg de pc y 450 μ g/kg de pc. Así, TMM es aproximadamente equivalente a 1 α ,25(OH)₂D₃ para elevar el calcio sérico, pero solamente tiene una décima parte de la actividad de 2MD a este respecto. Así, se ilustra la importancia del hidroxilo en la posición 25 para la movilización del calcio óseo.

La Fig. 3 demuestra que TMM es más activo que 1 α ,25-(OH)₂D₃ en cuanto a actividad de absorción de calcio intestinal en un factor de alrededor de 10. En esta medida se usa alendronato para bloquear la resorción ósea, de forma que la elevación del calcio sérico se debe a la absorción de calcio incrementada en el intestino.

Ejemplo 4

Objetivo: Determinar si TMM tiene actividad de transporte de calcio intestinal o no, y cómo es en comparación con 1,25(OH)₂D₃.

Animales

Los ratones CD-1 de 5-6 semanas de edad se colocaron en el cuarto de ratones +D y se alimentaron con una dieta normal. Se dejó que se aclimasen durante 7 días antes de cambiarlos a una dieta que contenía un 0,47% de calcio.

Diseño experimental

Todos los animales se pesaron antes de la administración de las dosis y se dividieron en grupos que contenían 5 animales/grupo de tratamiento. Se colocaron dos-tres animales/jaula. Se administró el análogo de vitamina D a todos los animales mediante sonda oral una vez, y alendronato mediante inyección intraperitoneal una vez. Las dosis se administraron en 100 μ l de aceite Neobee/ratón de 25 g (análogos de vitamina D) y en 100 μ l de PBS/ratón (alendronato). Se administró alendronato un día antes que los análogos de vitamina D para permitir que actuase en el

ES 2 277 293 T3

hueso antes de la administración de los compuestos con actividad ósea. Se extrajo sangre (alrededor de 80 μ l) del seno retroorbital antes de la dosis, y 24 h, 48 h y 144 h tras la dosis. Una vez que se recogieron todas las extracciones, el suero se diluyó 1:50 en cloruro de lantano del 0,1% y se analizó mediante espectrometría de absorción atómica para la determinación de las concentraciones de calcio sérico total.

5

Grupo 1: Aceite Neobee + Alendronato (1,75 mg/kg de pc)

Grupo 2: 40,5 μ g de 1,25(OH)₂D₃/kg de pc + Alendronato (1,75 mg/kg de pc)

10 Grupo 3: 4,5 μ g de TMM/kg de pc + Alendronato (1,75 mg/kg de pc)

Grupo 4: 13,5 μ g de TMM/kg de pc + Alendronato (1,75 mg/kg de pc)

Grupo 5: 40,5 μ g de TMM/kg de pc + Alendronato (1,75 mg/kg de pc)

15

Resultados

La Fig. 3 ilustra que, en contraste con la actividad de movilización de calcio óseo, TMM tiene más actividad de transporte de calcio intestinal que 1,25(OH)₂D₃.

20

Los datos biológicos de las Figs. 1-3 y de la Tabla 1 se pueden resumir como sigue:

La unión del derivado 25-metilo TMM al receptor recombinante de vitamina D de rata ilustra que TMM se une con una décima parte de la afinidad por el receptor de vitamina D de la hormona nativa, 1,25-(OH)₂D₃. Esto es sorprendente porque TMM carece del grupo 25-hidroxilo. Sin embargo, TMM, cuando se ensayó en la diferenciación de HL-60, reveló una actividad esencialmente igual a la de 1,25-(OH)₂D₃. Así, TMM es muy potente incluso sin grupo 25-hidroxilo. Son de gran interés los datos *in vivo* obtenidos en ratones CD-1. Los datos de los animales tras una dosis única del compuesto a las concentraciones indicadas demostraron que TMM tuvo muy poca actividad de movilización del calcio óseo. La movilización del calcio óseo (concentración de calcio sérico) fue mínima incluso hasta con 13,5 microgramos de TMM/kg de peso corporal. Así, su actividad no solamente se colocó muy por debajo de la de 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-(OH)₂D₃ o 2MD, sino también por debajo de la de la hormona nativa, 1,25-(OH)₂D₃. Es de considerable interés, sin embargo, que TMM tuvo un efecto muy potente sobre la absorción intestinal de calcio. La actividad de TMM sobre la absorción intestinal de calcio es 10 veces la de 1,25-(OH)₂D₃, que en un trabajo previo se demostró que tenía aproximadamente la misma actividad que 2-metilen-19-nor-20(S)-1 α ,25-(OH)₂D₃. Así, TMM muestra selectividad por la actividad sobre el intestino, donde la utilización del calcio del medio es sumamente deseable sin estar asociada a la movilización del calcio óseo. Se podría usar como un compuesto de vitamina D de mantenimiento en pacientes en los que no se desea la disminución de masa ósea debida a la movilización ósea. Tal circunstancia podría ser cualquier forma de osteoporosis. La actividad de TMM para provocar la diferenciación celular y la supresión del crecimiento de células HL-60 es también consistente con su uso en el tratamiento de tumores malignos o en el tratamiento de psoriasis, una enfermedad cutánea por hiperproliferación de queratinocitos.

40

Para el tratamiento, el compuesto nuevo de esta invención, definido por la fórmula I, se puede formular para las aplicaciones farmacéuticas en forma de una disolución en disolventes inocuos, o en forma de una emulsión, suspensión o dispersión en disolventes o vehículos adecuados, o en forma de píldoras, comprimidos o cápsulas junto con vehículos sólidos, según los métodos convencionales conocidos en la técnica. Cualquiera de tales formulaciones puede contener también otros excipientes farmacéuticamente aceptables y atóxicos, tales como estabilizantes, antioxidantes, aglutinantes, agentes colorantes o emulsificantes o agentes modificadores del sabor.

45

El compuesto se puede administrar de forma oral, tópica, parenteral o transdérmica. El compuesto se administra de forma ventajosa mediante inyección o mediante infusión intravenosa o mediante 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 las aplicaciones transdérmicas. Las dosis de 0,01 μ g a 100 μ g por día del compuesto son apropiadas para el tratamiento, y tales dosis se ajustan según la enfermedad a tratar, su gravedad y la respuesta del sujeto, tal como se entiende en la técnica. Ya que el compuesto nuevo exhibe especificidad de acción, se puede administrar de forma adecuada por sí solo, o junto con dosis graduadas de otro compuesto activo de vitamina D, p.ej. 1 α -hidroxivitamina D₂ o D₃, o 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃, en situaciones en las que se considera que es ventajoso obtener diferentes grados de movilización de mineral óseo y de estimulación del transporte de calcio.

55

Las composiciones para el uso en el tratamiento anteriormente mencionado de la psoriasis y de tumores malignos comprenden una cantidad eficaz del compuesto de 2-metilen-19-nor-vitamina D como se definió mediante la fórmula I anterior como ingrediente activo, y un vehículo adecuado. Una cantidad eficaz de tal compuesto para el uso de acuerdo con esta invención es de 0,01 a 100 μ g por g de composición, y se puede administrar de forma tópica, transdérmica, oral o parenteral en dosis de 0,01 μ g/día a 100 μ g/día.

60

El compuesto se puede formular en forma de cremas, lociones, pomadas, parches tópicos, píldoras, cápsulas o comprimidos, o en forma líquida como disoluciones, emulsiones, dispersiones o suspensiones en disolventes o aceites farmacéuticamente inocuos y aceptables, y tales preparaciones pueden contener además otros componentes far-

ES 2 277 293 T3

macéuticamente inocuos o beneficiosos, tales como estabilizantes, antioxidantes, emulsificantes, agentes colorantes, aglutinantes o agentes modificadores del sabor.

5 El compuesto se administra de forma ventajosa en cantidades suficientes para lograr la diferenciación de promielocitos a macrófagos normales. Las dosis como las descritas anteriormente son adecuadas, y se entiende que las cantidades dadas se deben ajustar de acuerdo con la gravedad de la enfermedad y el estado y la respuesta del sujeto, tal como se entiende en la técnica.

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

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

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

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

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

30 Para el tratamiento del asma, se puede usar la inhalación de formulaciones en polvo, autopropelentes o en aerosol, administradas con un envase de aerosol, un nebulizador o un atomizador. Las formulaciones, cuando se administran, tienen preferiblemente un tamaño de partícula en el intervalo de 10 a 100 μm .

35 Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de unidad de dosis, y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica farmacéutica. La expresión "unidad de dosis" significa 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 una mezcla de éste con diluyentes o vehículos farmacéuticos sólidos o líquidos.

40

(Esquema pasa a página siguiente)

45

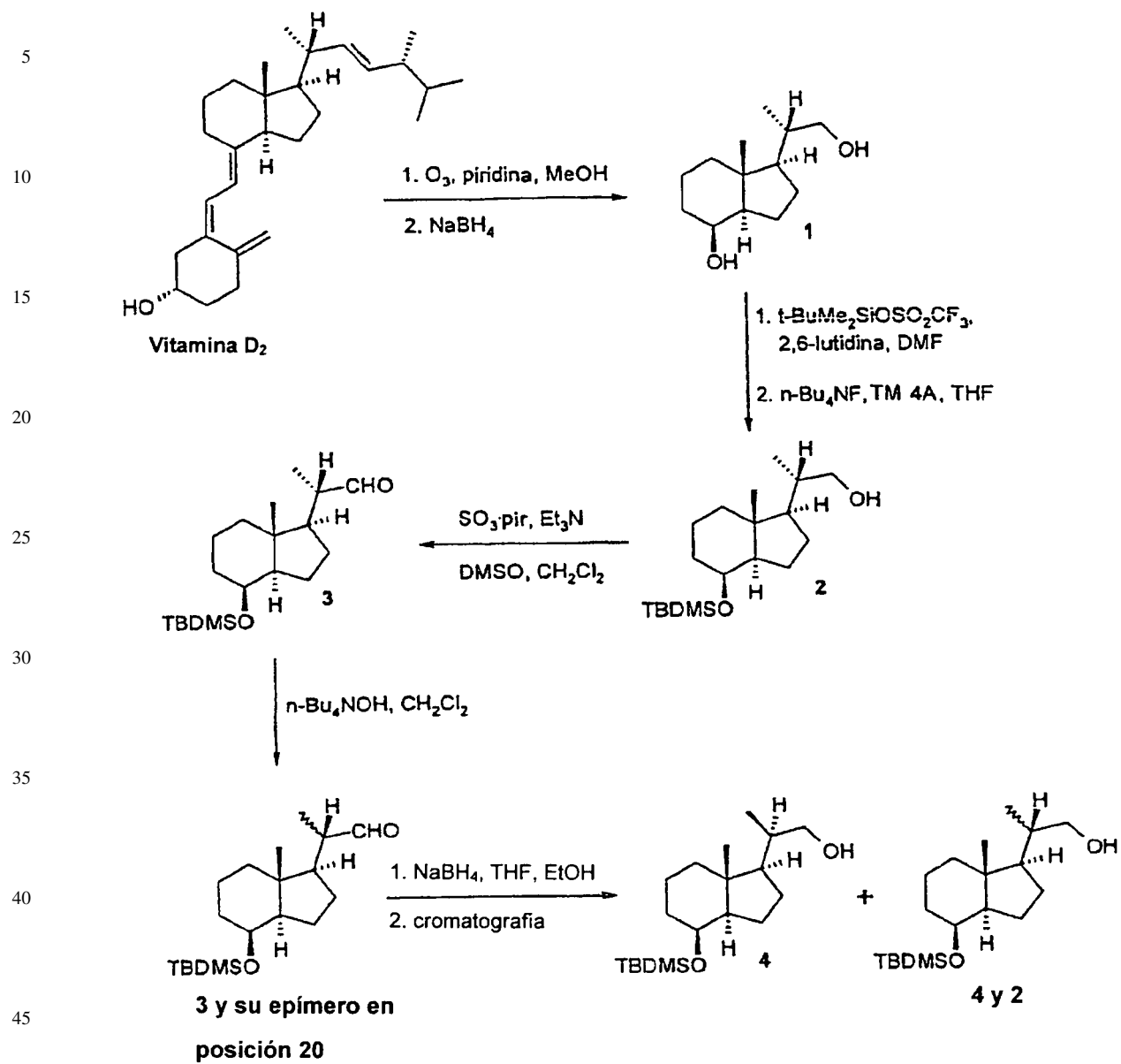
50

55

60

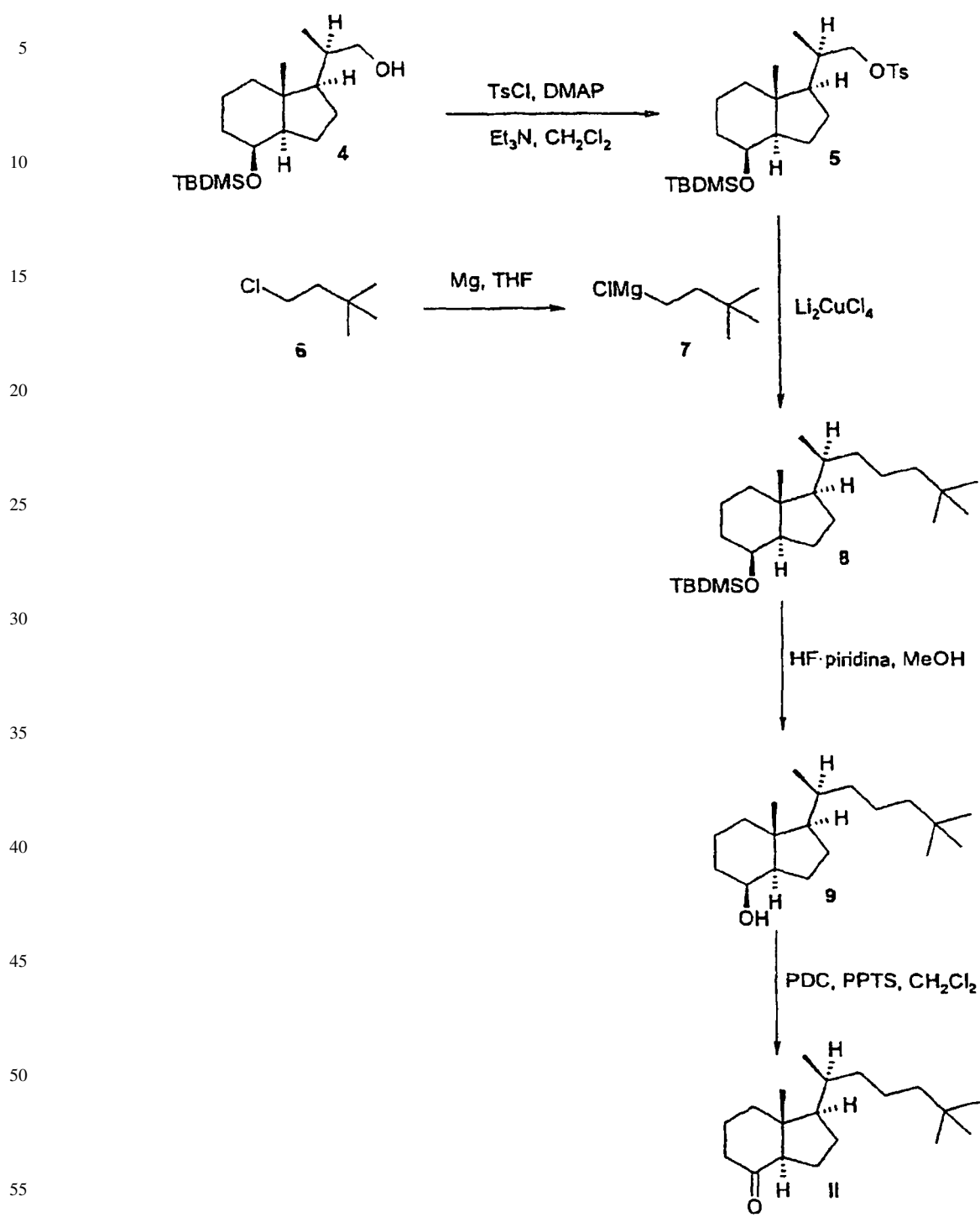
65

Esquema 1

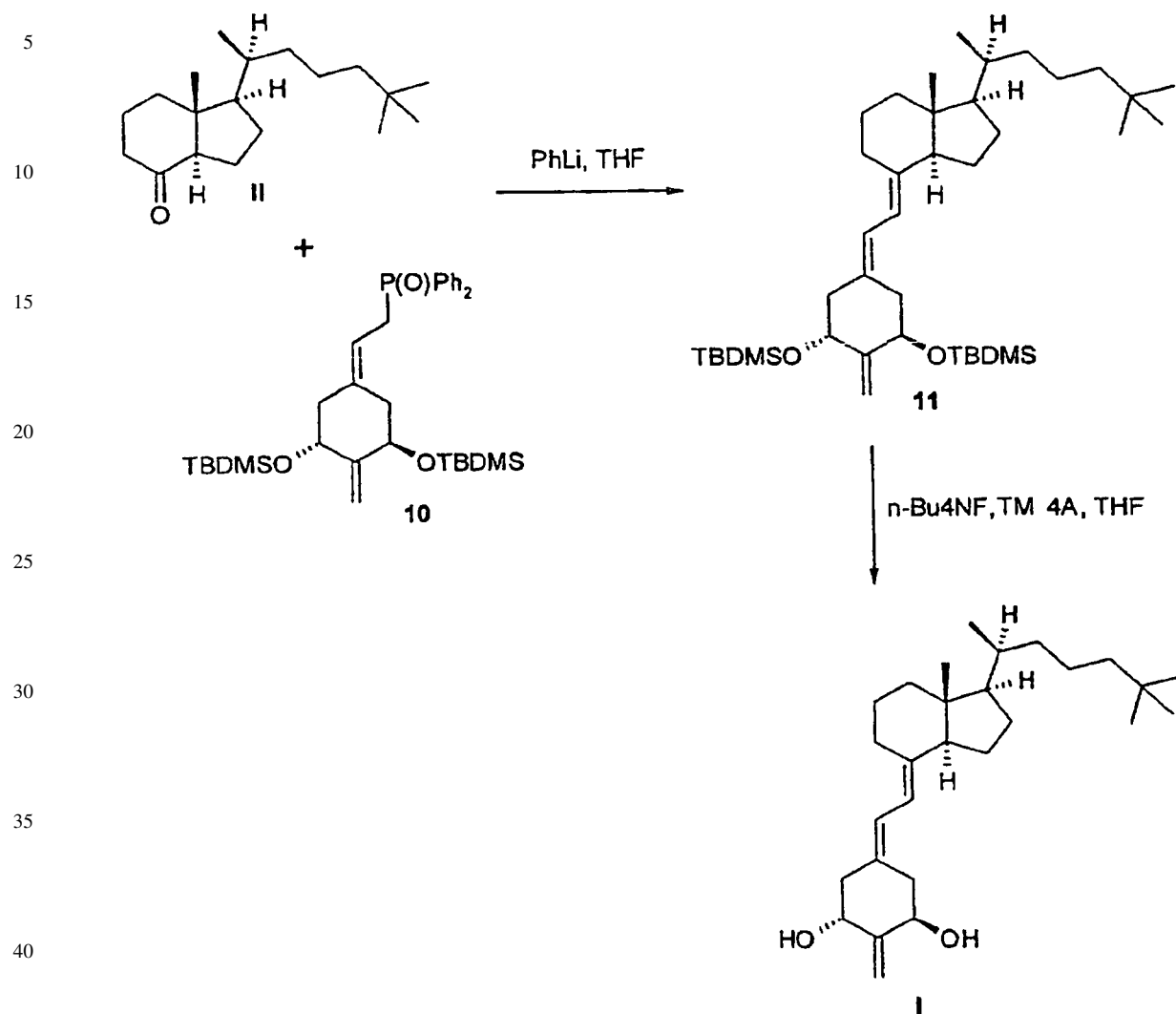


ES 2 277 293 T3

Esquema 2

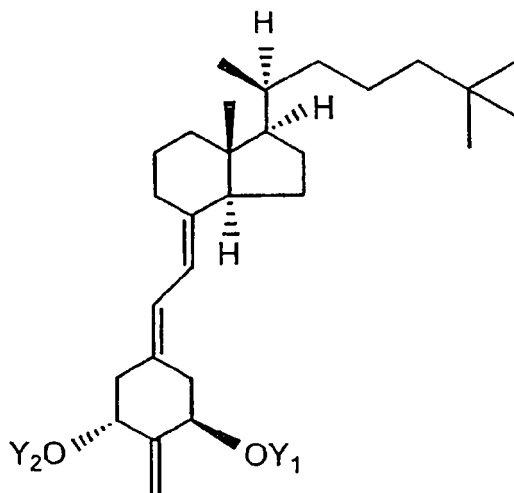


Esquema 3



REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



en la que Y_1 e Y_2 , que pueden ser iguales o diferentes, se seleccionan cada uno de hidrógeno y un grupo protector de hidroxilo.

2. 2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil-1 α -hidroxicalciferol.

3. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según la reivindicación 1, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3, que comprende 2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil-1 α -hidroxicalciferol en una cantidad de 0,01 μ g a 100 μ g por g de composición.

5. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3, que comprende 2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil-1 α -hidroxicalciferol en una cantidad de 0,1 μ g a 50 μ g por g de composición.

6. El uso de un compuesto según la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad ósea metabólica en la que se desea mantener o incrementar la masa ósea.

7. El uso según la reivindicación 6, en el que la enfermedad es osteoporosis senil, osteoporosis posmenopáusica, osteoporosis inducida por esteroides, osteoporosis con baja remodelación ósea, osteomalacia u osteodistrofia renal.

8. El uso según la reivindicación 6, en el que el compuesto es para administrarse de forma oral, parenteral o transdérmica.

9. El uso según la reivindicación 6, en el que el compuesto es para administrarse en una dosis de 0,01 μ g a 100 μ g por día.

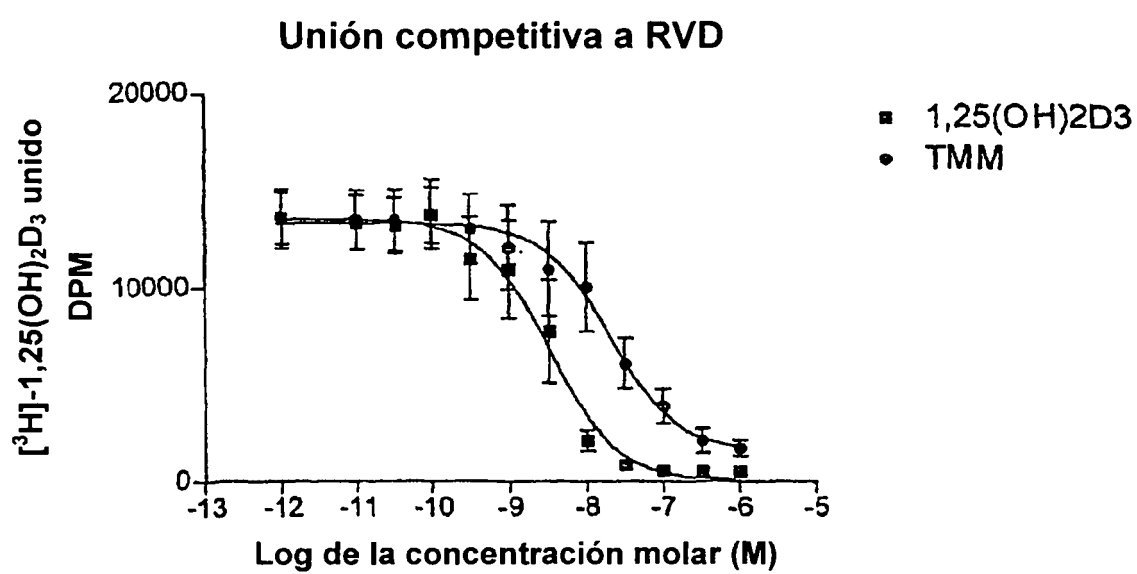
10. El uso según la reivindicación 6, en el que el compuesto es 2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil-1 α -hidroxicalciferol.

11. El uso de un compuesto según la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la psoriasis.

12. El uso según la reivindicación 11, en el que el compuesto es 2-metilen-19-nor-20(S)-25-metil-1 α -hidroxicalciferol.

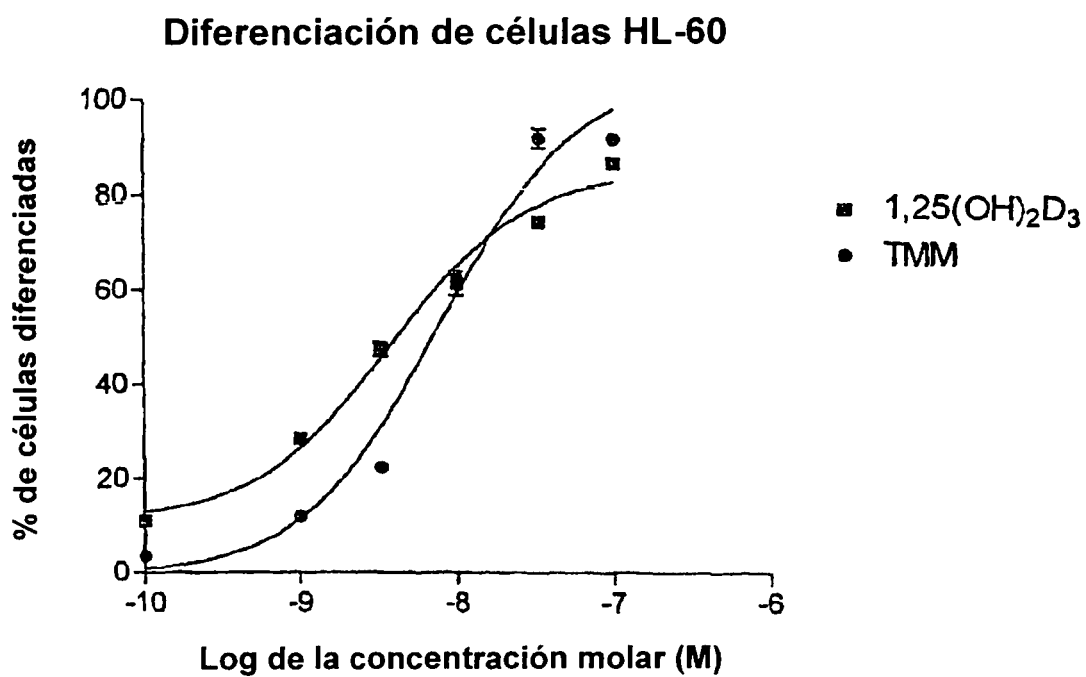
13. El uso según la reivindicación 11, en el que el compuesto es para administrarse en una dosis de 0,01 μ g/día a 100 μ g/día.

14. El uso de un compuesto según la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad cancerosa.



	1,25(OH) ₂ D ₃	TMM
K _d	4.7290e-10	2.9980e-09

FIGURA 1



	1,25(OH) ₂ D ₃	TMM
CE50	3.8410e-09	7.8140e-09

FIGURA 2

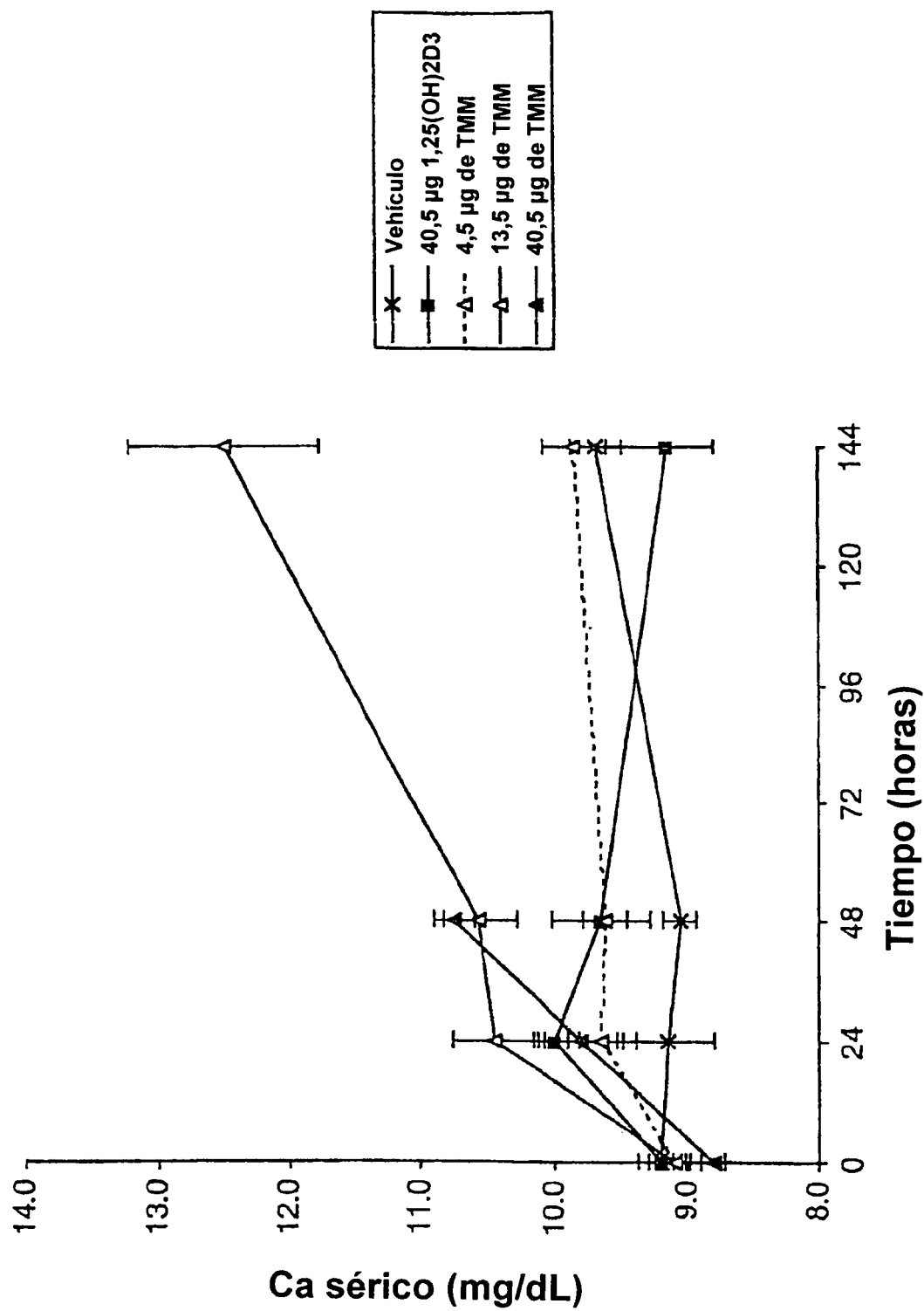


FIGURA 3