

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 905**

21 Número de solicitud: 201831298

51 Int. Cl.:

C07J 9/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

28.12.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

29.06.2020

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

25.09.2020

Fecha de concesión:

01.12.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

10.12.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (50.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
UNIVERSITY OF WROCLAW (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARCINKOWSKA, Ewa;
BERKOWSKA, Klaudia;
MOURIÑO MOSQUERA, Antonio;
SIGÜEIRO PONTE, Rita y
GAIKWAD, Sunil**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASÁNCHEZ, Susana

54 Título: **COMPUESTOS DE INTERÉS FARMACÉUTICO**

57 Resumen:

Compuestos de interés farmacéutico. Los compuestos de la presente invención pueden definirse como derivados de ácido litocólico y de sus metabolitos. Por este motivo los compuestos de la invención se nombran empleando el sistema de numeración de esteroides. Más en particular, se dirige a compuestos derivados del ácido litocólico, a los procedimientos de obtención de los mismos, a compuestos intermedios de su síntesis, y a sus aplicaciones.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 769 905 B2

DESCRIPCIÓN**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Compuestos de interés farmacéutico

Sector de la técnica

La presente invención se dirige a compuestos de interés farmacéutico. Más en particular, se
5 dirige a compuestos derivados del ácido litocólico, a los procedimientos de obtención de los
mismos, a compuestos intermedios de su síntesis, y a sus aplicaciones.

Antecedentes

La 1,25 α -dihidroxitamina D₃ (1,25D) es el metabolito más activo de la vitamina D. Ejerce
sus acciones biológicas uniéndose de forma específica a su receptor nuclear, el receptor de
10 la vitamina D (VDR). El sistema endocrino de la vitamina D juega un papel fundamental en
la regulación del metabolismo fosforo-cálcico, estimulando la absorción intestinal de estos
minerales esenciales y su movilización en el tejido óseo. Aunque las acciones sobre el
metabolismo del fosfato y del calcio son las más conocidas, estudios epidemiológicos,
bioquímicos, celulares, o de genética molecular han demostrado su implicación en otros
15 procesos fisiológicos, al inhibir la proliferación e inducir la diferenciación celular, y
patológicos, como psoriasis, diabetes, osteoporosis, enfermedades autoinmunes,
degenerativas, endocrinológicas, cardiovasculares, infecciosas, o tumorales.

El VDR también funciona como un receptor para el ácido litocólico (LCA), un ácido biliar
secundario hepatotóxico y potencialmente carcinógeno (Masuno, et al., Journal of Lipid
20 Research, 2013, volumen 54, 2206-2213; Deluca, et al., PNAS, 2007, volumen 104, 10006-
10009; Belorusova, et al., Journal of Medicinal Chemistry, 2014, 57, 4710-4719). El VDR
es un orden de magnitud más sensible al LCA y sus metabolitos, que otros receptores
nucleares. La activación de VDR por el LCA o la 1,25D induce la expresión *in vivo* de la
enzima citocromo P450 CYP3A, que desintoxica el LCA en el hígado y en el intestino. Estos
25 estudios ofrecen un mecanismo que pueden explicar los efectos protectores de la vitamina
D y su receptor contra el cáncer de colon (*Science*, **2002**, 296, 1313-1316).

Un factor que contribuye a los efectos dañinos de una dieta rica en grasas es un incremento
asociado a la excreción de ácidos biliares fecales, el más tóxico de los cuales es el LCA, un
ácido biliar secundario. A diferencia de los ácidos biliares primarios, el ácido

quenodesoxicólico (CDCA) y el ácido cólico (CA), el LCA se reabsorbe mal en la circulación enterohepática y pasa al colon. A altas concentraciones, el LCA produce roturas en las cadenas de ADN, formando aductos con el ADN e inhibiendo a las enzimas encargadas de la reparación del ADN. El LCA puede también promover cáncer de colon en animales, y su concentración es mayor que otros ácidos biliares secundarios en pacientes con cáncer colorectal.

En contraste con la correlación directa entre las dietas ricas en grasas, el LCA y el cáncer de colon, la ingesta de vitamina D y calcio reduce la incidencia del cáncer colorrectal. Además, la administración de vitamina D inhibe la carcinogénesis del colon inducida por dietas ricas en grasas o por acción de la acumulación del LCA intrarrectal. Una vía para la eliminación del LCA es a través de su catabolismo por acción del citocromo enterohepático P450, CYP3A, un gen diana de la vitamina D.

Así, el desarrollo de nuevos análogos de vitamina D con las mismas propiedades de la hormona natural, pero además efectivo en la inducción de la diferenciación celular y en la expresión del gen diana del VDR, es un objetivo a alcanzar para su utilización en la práctica clínica.

Descripción breve de la invención

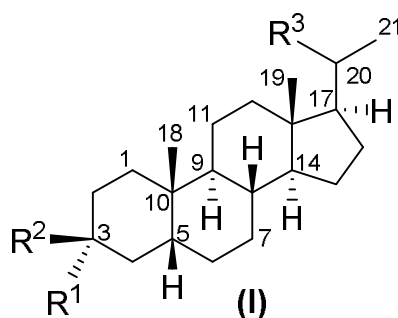
Los autores de la presente invención han diseñado y obtenido compuestos derivados del ácido litocólico que presentan afinidad por el receptor de la vitamina D y además presentan actividad en la diferenciación celular. Esto permitiría su empleo para el tratamiento de ciertas enfermedades en particular el cáncer y más específicamente el cáncer de mama, colon y próstata.

Una ventaja adicional de la invención es que, aunque los compuestos de la invención están altamente funcionalizados, el procedimiento para su preparación consta de pocas etapas de síntesis.

Otra ventaja adicional es que los intermedios obtenidos en esa ruta sintética presentan una elevada versatilidad en cuanto a la naturaleza de los sustituyentes. Más en concreto, la funcionalidad en C-3 y C-20 permite preparar fácilmente derivados del ácido litocólico con

una amplia variedad de sustituyentes. En particular, los compuestos de la invención presentan sustituyentes en la posición C-3 y C-20, tan versátiles que pueden ser diseñados a medida de las necesidades de su aplicación y así pueden además presentar configuración *R* o *S* en dichas posiciones según se requiera. La funcionalidad en C-3 y C-20 permite además

Así, en un aspecto la invención se dirige a un compuesto de fórmula (I), sus diastereoisómeros o sus enantiómeros



donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 , se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo, alquilacilo, arilacilo, alcoxilo, ariloxi, alquilcarboxi, arilcarboxi, heterociclo, $-\text{OSiR}^a\text{R}^b\text{R}^c$, donde cada uno de R^a , R^b y R^c se seleccionan de entre alquilo, arilo, arilalquilo y heterociclo, y R^1 y R^2 pueden formar conjuntamente un grupo metileno sustituido por un grupo seleccionado de entre hidroxialquilo, hidroxialquenilo y alquilcarboxi.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I).

Otro aspecto de la invención se refiere al compuesto de fórmula (I) para su uso en medicina.

En una realización particular, la invención se dirige a los compuestos de fórmula (I) para su uso en el tratamiento de trastornos del metabolismo del calcio y del fósforo, osteoporosis, osteodistrofia renal, osteomalacia, enfermedades cutáneas hiperproliferativas, eczema, dermatitis, miopatía, leucemia, osteosarcomas, carcinomas escamosos, melanomas, desórdenes inmunológicos y en el rechazo a transplantes. En otra realización particular, la invención se dirige a compuestos de fórmula (I) para su uso para el tratamiento del cáncer.

Más particularmente, cáncer de mama, colon y próstata.

En una realización particular, la invención se dirige a compuestos de fórmula (I) para su uso para el tratamiento de enfermedades del sistema inmune. En un aspecto más particular, para su uso para el tratamiento de psoriasis.

Descripción de las figuras

5 **Figura 1.** Muestra las curvas dosis-respuesta de la afinidad de los análogos al VDR. Diluciones seriadas de los compuestos fueron preparadas en placas de 384 pocillos. El complejo VDR/Fluormone™ VDR Red fue entonces añadido a cada pocillo de muestra y los componentes a ensayar fueron incubados durante 4 horas a temperatura ambiente para alcanzar el equilibrio. La polarización de fluorescencia de cada pocillo fue determinada. Las
10 curvas de concentración-respuesta fueron representados usando GraphPad Prism 7.

Figura 2. Muestra la localización nuclear de la proteína VDR en HL60 expuestos a 1,25D o a los compuestos de la invención testados. Las células HL60 fueron expuestas durante 24 horas a 100nM 1,25D o los compuestos de la invención testados. Extractos nucleares fueron separados por SDS-PAGE y electrodepositados en una membrana de PVDF. La membrana
15 fue ensayada contra VDR y HDAC2.

Figura 3. Muestra las curvas dosis-respuesta de la expresión de CD14 (Figura 3A) y de CD11b (Figura 3B) inducida por 1,25D o por los compuestos de la invención testados. Las células HL60 fueron expuestas a 1,25D o a los compuestos de la invención testados en un amplio rango de concentraciones durante 96h. Entonces la expresión de los marcadores de
20 superficie celular CD14 (A) y CD11b (B) fueron determinados por citometría de flujo. Se ha representado los valores promedio ($\pm$ SEM) de los porcentajes de células positivas al antígenos.

Figura 4. Muestra la expresión de *CYP24A1* en células HL60 inducidas por 1,25D o por los compuestos de la invención testados. Las células HL60 fueron expuestas a 1,25D o los
25 compuestos de la invención testados a concentraciones de 1nM (figura 4A), 10nM (figura 4B) or 100nM (C) y después de 96 h la expresión del mRNA de *CYP24A1* fue determinada por PCR en tiempo real. Las barras en las representaciones muestran los valores promedio ($\pm$ SEM) de los órdenes de magnitud en los niveles de mRNA relativos a los niveles del mRNA de *GAPDH*. Los valores que son significativamente más altos para aquellos
30 obtenidos por las respectivas células control están marcados con asteriscos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Figura 5. Muestra la expresión de *CD14* en células HL60 inducidas por 1,25D o por compuestos testados de la invención. Las células HL60 fueron expuestas a 1,25D o a compuestos de la invención a concentraciones de 1nM (figura 5A), 10nM (figura 5B) or 100nM (figura 5C) y después de 96 h la expresión del mRNA de *CD14* fue determinada por PCR en tiempo real. Las barras en las representaciones muestran los valores promedio ($\pm$ SEM) de los órdenes de magnitud en los niveles de mRNA relativos a los niveles del mRNA de *GAPDH*. Los valores que son significativamente más altos para aquellos obtenidos por las respectivas células control están marcados con asteriscos (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Las expresiones que fueron significativamente mayores en células expuestas a 1,25D están marcadas con una almohadilla ($^{##}p < 0.01$).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

“Alquilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, cíclica o acíclica formada por átomos de carbono e hidrógeno, sin insaturaciones, de 1 a 12, preferiblemente dos a cuatro átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, que opcionalmente puede estar marcado isotópicamente de modo que uno o más hidrógenos se sustituyen por deuterio (^2H) o tritio (^3H) y/o uno o más carbonos se sustituyen por carbono-11 (^{11}C), carbono-13 (^{13}C) o carbono-14 (^{14}C), opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo tioalcoxi, un grupo heteroalquilo, un grupo heterocíclico o CF_3 , por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo, ciclopropilo, etc.

“Alquenilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, cíclica o acíclica formada por átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos una insaturación, conjugada o no, de 2 a 12, preferiblemente de dos a ocho, más preferiblemente de dos a cuatro átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo y que opcionalmente puede estar marcado isotópicamente de modo que uno o más hidrógenos se sustituyen por ^2H o ^3H y/o uno o más carbonos se sustituyen por ^{11}C , ^{13}C o ^{14}C . Los radicales alquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un átomo de halógeno, en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo,

un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo tioalcoxi, un grupo heteroalquilo, un grupo heterocíclico o CF_3 , por ejemplo, vinil, alil, butenil (por ejemplo, 1-butenil, 2-butenil, 3-butenil), o pentenil (por ejemplo, 1-pentenil, 2-pentenil, 3-pentenil, 4-pentenil).

- 5 "Alquinilo" se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, cíclica o acíclica formada por átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono, conjugado o no, de dos a doce, preferiblemente de dos a ocho, más preferiblemente de dos a cuatro átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, tal como $-\text{CCH}$, $-\text{CH}_2\text{CCH}$, $-\text{CCCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CCCH}_3$, y que opcionalmente puede
- 10 estar marcado isotópicamente de modo que uno o más hidrógenos se sustituyen por ^2H o ^3H y/o uno o más carbonos se sustituyen por ^{11}C , ^{13}C o ^{14}C . Los radicales alquinilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un átomo de halógeno, un grupo hidroxil, un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo tioalcoxi, un grupo heterocíclico o CF_3 .
- 15 "Ariilo" se refiere a un hidrocarburo aromático de 6 a 10 átomos de carbono, tal como fenilo o naftilo, y que opcionalmente puede estar marcado isotópicamente de modo que uno o más hidrógenos se sustituyen por ^2H o ^3H y/o uno o más carbonos se sustituyen por ^{11}C , ^{13}C o ^{14}C . Los radicales ariilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxil, un
- 20 grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo tioalcoxi, un grupo alquilo o CF_3 .

"Ariilalquilo" se refiere a uno o varios grupos ariilo unidos al resto de la molécula mediante un radical alquilo, por ejemplo, bencil, 3-(fenil)-propil, etc.

- "Heterociclo" se refiere a un anillo estable de 3 a 15 miembros formado por átomos de
- 25 carbono y entre 1 a 5 heteroátomos escogidos entre nitrógeno, oxígeno y azufre, preferiblemente un anillo de 4 a 8 miembros formado por uno o más heteroátomos, y más preferiblemente un anillo de 5 a 6 miembros con uno o más heteroátomos. Para los propósitos de esta invención, los grupos heterocíclicos pueden ser sistemas monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos, que pueden incluir anillos fusionados; y el átomo de nitrógeno o de
- 30 azufre en el anillo heterocíclico puede estar opcionalmente oxidado; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternarizado; y el radical heterocíclico puede estar parcial o

totalmente saturado. Los radicales heterocíclicos pueden ser aromáticos (por ejemplo, pueden tener uno o más anillos aromáticos) en cuyo caso se consideran como "heteroarilos" para los propósitos de la presente invención. El anillo heterocíclico puede estar sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de

5 halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo alquilo, un grupo tioalcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro o CF_3 . Ejemplos de tales heterociclos incluyen, por ejemplo, furano, tiofeno, pirrol, imidazol, triazol, isotiazol, benzotiofeno, benzofurano, indol, benzoimidazol, tetrahidrofurano.

"Alcoxi" se refiere a un radical de fórmula $-\text{O}-\text{alquilo}$, por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi,

10 etc.

"Ariloxi" se refiere a un radical de fórmula $-\text{O}-\text{arilo}$, por ejemplo fenoxi, benciloxi, etc.

"Alquilcarboxi" se refiere a un grupo alquilo que se une al resto de la molécula mediante un grupo carboxi ($-\text{CO}_2-$), como por ejemplo $\text{EtOC}(\text{O})$.

"Ariacarboxi" se refiere a un grupo arilo que se une al resto de la molécula mediante un grupo

15 carboxi ($-\text{CO}_2-$).

"Alquilacilo" se refiere a un grupo alquilo que se une al resto de la molécula mediante un grupo carbonilo ($-\text{CO}-$).

"Ariacilo" se refiere a un grupo arilo que se une al resto de la molécula mediante un grupo carbonilo ($-\text{CO}-$).

20 "Carboxialquilo" se refiere a un grupo carboxi ($-\text{CO}_2-$) que se une al resto de la molécula mediante un grupo alquilo. El grupo carboxi puede ser por ejemplo un grupo ácido carboxílico o un éster alquílico como por ejemplo etilcarboxialquilo.

"Heteroalquilo" se refiere a un grupo alquilo en el que uno o más carbonos están sustituidos por heteroátomos, preferentemente de 1 a 5, donde el heteroátomo se puede seleccionar de

25 entre oxígeno, azufre, selenio, telurio, nitrógeno, fósforo, arsénico.

"Heteroalquenilo" se refiere a un grupo alquenilo en el que uno o más carbonos están sustituidos por heteroátomos, preferentemente de 1 a 5, donde el heteroátomo se puede seleccionar de entre oxígeno, azufre, selenio, telurio, nitrógeno, fósforo, arsénico.

“Heteroalquinilo” se refiere a un grupo alquinilo en el que uno o más carbonos están sustituidos por heteroátomos, preferentemente de 1 a 5, donde el heteroátomo se puede seleccionar de entre oxígeno, azufre, selenio, telurio, nitrógeno, fósforo, arsénico.

5 “Hidroxialquilo” se refiere a un grupo hidroxilo (-OH) que se une al resto de la molécula mediante una cadena alquílica, la cadena alquílica puede estar ramificada o no ramificada.

“Hidroxialquenilo” se refiere a un grupo hidroxilo (-OH) que se une al resto de la molécula mediante una cadena alquenílica, la cadena alquenílica puede estar ramificada o no ramificada.

“Metileno” se refiere a un grupo ($\text{CH}_2=$).

10 Los compuestos de la presente invención pueden incluir diastereoisómeros y/o enantiómeros y sus mezclas racémicas, en cuanto a la presencia de centros quirales, e isómeros dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo *Z*, *E*). Dichos isómeros, diastereómeros, enantiómeros y sus mezclas están dentro del alcance de la presente invención.

15 Los compuestos de la presente invención pueden definirse como derivados de ácido litocólico y de sus metabolitos. Por este motivo los compuestos de la invención se nombran empleando el sistema de numeración de esteroides.

En una realización particular, la invención se dirige a compuestos de fórmula (I) en los que R_1 , R_2 y R_3 se seleccionan de entre hidrógeno, hidroxialquilo, hidroxialquenilo, 20 carboxialquilo y carboxialquenilo, o R_1 y R_2 pueden formar conjuntamente un grupo metileno sustituido por un grupo seleccionado de entre hidroxialquilo, hidroxialquenilo y alquilcarboxi.

En una realización preferida, la invención se dirige a compuestos de fórmula (I) en los que R_2 es hidrógeno y R_1 se selecciona de entre hidroxialquilo, heteroalquilo, arilalquilo, 25 alquilacilo, arilacilo, carboxialquilo, carboxialquenilo, heteroalquenilo y hidroxialquenilo.

En una realización particular, la invención se dirige a compuestos de fórmula (I) en los que R_2 es hidrógeno y R_1 se selecciona de entre hidroximetilo, hidroxietilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo, hidroxi(terc-butilo), carboximetilo, carboxietilo y carboxipropilo. En una

realización preferida la invención se dirige a compuestos de fórmula (I) en los que R2 es hidrógeno y R1 es hidroxi(terc-butilo).

En una realización particular, la invención se dirige a compuestos de fórmula (I) en los que R1 es hidrógeno y R2 se selecciona de entre hidroxialquilo, heteroalquilo, arilalquilo, alquilacilo, arilacilo, carboxialquilo, carboxialquenilo, heteroalquenilo y hidroxialquenilo.

En una realización particular, la invención se dirige a compuestos de fórmula (I) en los que R1 es hidrógeno y R2 se selecciona de entre hidroximetilo, hidroxietilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo, hidroxi(terc-butilo), carboximetilo, carboxietilo y carboxipropilo. En una realización particular la invención se dirige a compuestos de fórmula (I) en los que R1 es hidrógeno y R2 es hidroxi(terc-butilo).

En una realización particular, la invención se dirige a compuestos de fórmula (I) en los que R1 y R2 conjuntamente forman un grupo metileno sustituido por un grupo seleccionado de entre hidroxialquilo, hidroxialquenilo y alquilcarboxi. En una realización más particular, la invención se dirige a compuestos de fórmula (I) en los que R1 y R2 conjuntamente forman un grupo metileno sustituido por un grupo alquilcarboxi.

En una realización particular, la invención también se dirige a cualquiera de los compuestos descritos anteriormente en los que R3 se selecciona de entre alquilo, alquenilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo, hidroxialquilo y carboxialquilo.

En una realización particular la invención se dirige a cualquiera de los compuestos siguientes:

Ácido (*R*)-4-{(5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*,*Z*)-3-(2-Etoxi-2-oxoetiliden)-10,13-dimetilhexa decahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il}-pentanoico,

Ácido (*R*)-4-{(5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*,*E*)-3-(2-Etoxi-2-oxoetiliden)-10,13-dimetilhexa decahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il}-pentanoico,

Ácido (*R*)-4-[(3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-3-(2-Etoxi-2-oxoetil)-10,13-dimetilhexadeca-hidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il]-pentanoico,

Ácido (*R*)-4-[(3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-3-(2-hidroxi-2-metilpropil)-10,13-dimetilhexadeca-hidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il]pentanoico,

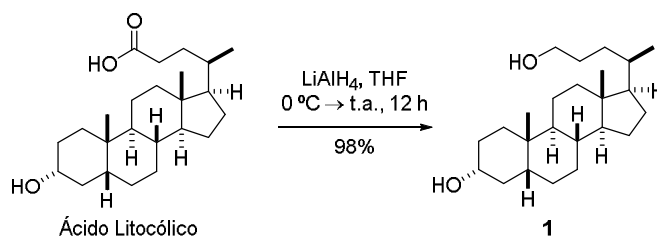
Ácido (*R*)-4-[(3*S*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-3-(2-etoxi-2-oxoetil)-10,13-dimetilhexadeca hidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il]-pentanoico, y

Ácido (*R*)-4-[(3*S*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-3-(2-Hidroxi-2-metilpropil)-10,13-dimetilhexadeca hidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il]-pentanoico.

5

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben de ser interpretados como limitativos de la misma:

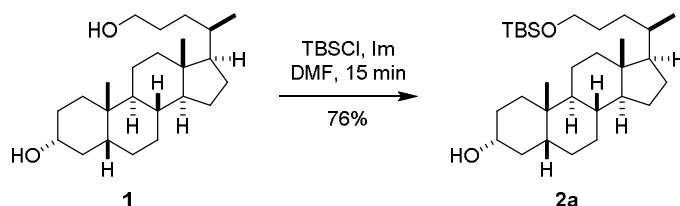
Ejemplo 1. Preparación de 3*S*,5*R*,8*R*,9*R*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-[(*R*)-5-Hidroxipentan-2-il]-10,13-dimetilhexadecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*] fenantren-3-ol (1**)**



LiAlH₄ (2.02 g) se añadió en porciones sobre una disolución de ácido Litocólico (4 g) en THF (100 mL) enfriada a 0 °C. Después 15 min, la mezcla de reacción se retiró del baño y se agito a temperatura ambiente durante 12 h. Sobre la mezcla enfriada a 0 °C se añadió lentamente ácido clorhídrico (30 mL, 10%) y se agitó durante 30 min hasta que la disolución se vuelve transparente. La mezcla se extrajo con AcOEt (3x25 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cristalización. Al residuo se añadieron 20 mL de una mezcla 1:1 de EtOAc/Hexanes. La suspensión resultante se calentó a 50 °C hasta que se vuelve transparente. La mezcla se dejó venir a temperatura ambiente y luego se enfrió a 0 °C, observándose la formación de un sólido blanco. El sólido se filtro a vacío para dar el alcohol **1** (3.79 g, 98%).

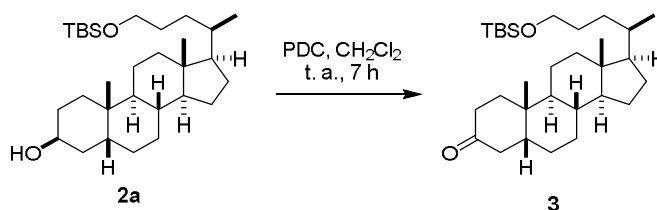
Ref.: Arto Valkonen, Elina Sievänen, Satu Ikonen, Nikolai V. Lukashev, Pavel A. Donez, Alexej D. Averin, Manu Lahtinen, Erkki Kolehmainen. Novel lithocholaphanes: syntheses, NMR, MS and molecular modeling studies. *J. Mol. Struc.* **2007**, 846, 65-73.

Ejemplo 2. Preparación de (3*S*,5*R*,8*R*,9*R*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-[(*R*)-5-(*tert*-Butildimetilsililoxi)pentan-2-il]-10,13-dimetilhexadecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3-ol (2a)



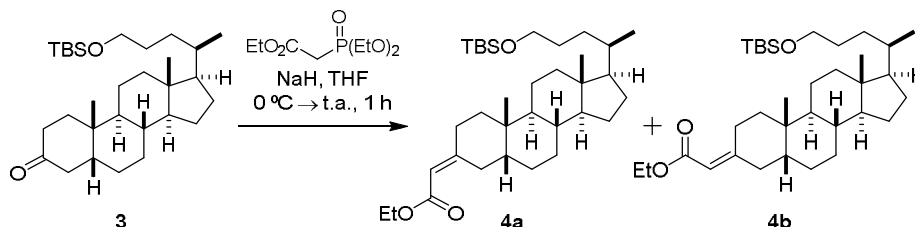
- 5 Una suspensión del diol **1** (2 g) en DMF (50 mL) se calentó hasta su disolución. Después de 5 min, la disolución se dejó venir a temperatura ambiente. Sobre la disolución anterior se añadió sucesivamente imidazol (0.375 g) y cloruro de *tert*-butildimetilsilil éter (0.83 g). Tras agitar 15 min, la reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa saturada de NaCl (30 mL). La mezcla se extrajo con hexanos (3x20 mL). La fase orgánica combinada se secó,
- 10 filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (10% EtOAc/hexanes) para dar el alcohol monoprotegido **2a** (1.51 g, 57%, espuma blanca) y el diol dioprotegido **2b** (0.287 g, 9% (16% BSMR), aceite incoloro), recuperándose sustancia de partida **1** (0.61 g, 1.68 mmol, 30%).

Ejemplo 3. Preparación de (5*R*,8*R*,9*R*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-[(*R*)-5-(*tert*-Butildimetilsililoxi)-pentan-2-il]-10,13-dimetilhexadecahidro-3*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3-ona (3)



- Dicromato de piridinio (PDC, 2.60 g) se añadió sobre una disolución del alcohol **2a** (1.10 g) en CH₂Cl₂ (45 mL). La mezcla se agitó protegida de la luz y a temperatura ambiente durante
- 20 7 h. La mezcla se diluyó con MTBE (50 mL), se agitó 15 min y se filtró a vacío sobre un lecho de celita, lavando los sólidos con MTBE (3x20 mL). Los filtrados se concentraron a vacío y el residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (2% EtOAc/Hexanos) para dar la cetona **3** (1.02 g 93%, sólido blanco).

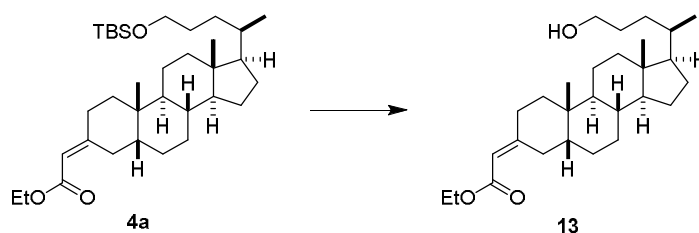
Ejemplo 4. Preparación de (Z)-2-[(5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-17-[(R)-5-(*tert*-Butildimetilsililo)pentan-2-il]-10,13-dimetilhexa decahidro-3H-ciclopenta[a]fenantren-3-iliden}-acetato de etilo (4a) y (E)-2-[(5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-17-[(R)-5-(*tert*-Butildimetilsililo)pentan-2-il]-10,13-dimetilhexa decahidro-3H-ciclopenta[a]fenantren-3-iliden}-acetato de etilo (4b)



Trietilfosfonoacetato (3.2 mL) se goteó sobre una suspensión de NaH (0.640 g, 60% p/p) en THF

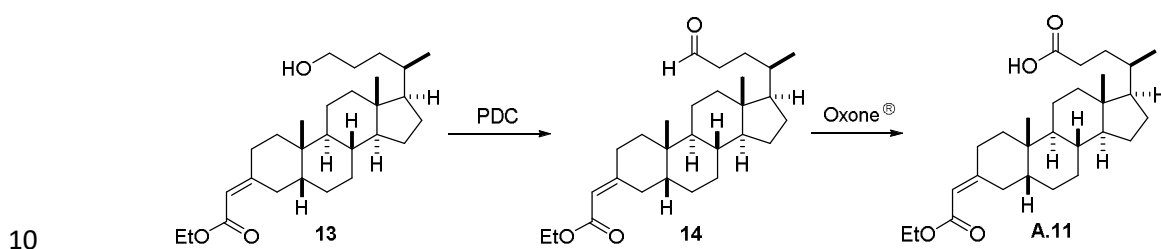
(15 mL) enfriada a 0 °C. Después de 30 min, se añadió vía cánula una disolución de la cetona **3** (1.5 g) en THF (15 mL). Tras 5 min, la mezcla de reacción se retiró del baño y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción se detuvo por adición lenta de H₂O (20 mL). La mezcla resultante se extrajo con EtOAc (3x25 mL). La fase orgánica combinada se seco, filtro y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (5% EtOAc/Hexanes) para dar la mezcla de alquenos **4** (1.68 g, 98%). Los ester **4** se sometieron a HPLC preparativo (Phenomenex Luna Silica 5 μ , 250x210 mm, 100 Å; 0.5% EtOAc/Hexanes) obteniéndose **4a** (0.746 g, 43%, aceite incoloro) y **4b** (0.802 g, 47%, aceite incoloro).

Ejemplo 5. Preparación de (E)-2-[(5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-17-[(R)-5-hidroxipentan-2-il]-10,13-dimetil hexadecahidro-3H-ciclopenta[a]fenantren-3-iliden}-acetato de etilo (13).



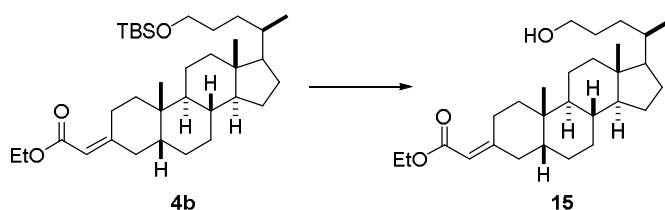
Una disolución de TBAF en THF (1.1 mL, 1M) se añadió a una disolución del éster **4a** (0.40 g) in THF (10 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa saturada de NaCl (15 mL). La mezcla resultante se extrajo con AcOEt (3x10 mL). La fase orgánica combinada se seco, filtro y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (10% AcOEt/hexanos) para dar el alcohol **13** (0.301 g, 95%, sólido blanco).

Ejemplo 6. Preparación de Ácido (R)-4-[(5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R,Z)-3-(2-Etoxi-2-oxoetiliden)-10,13-dimetilhexa decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]-pentanoico (A.11 o SUNIL5)



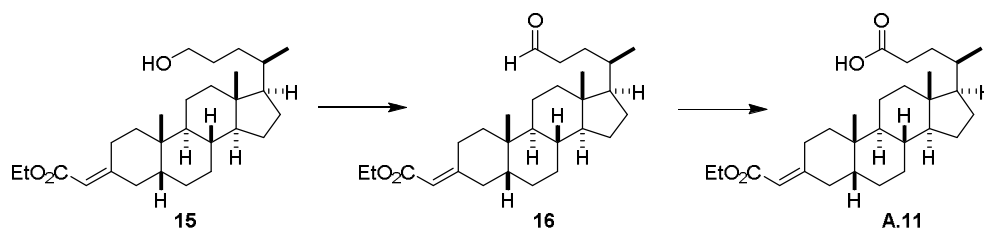
Dicromato de piridinio (0.525 g) se añadió sobre una disolución del alcohol **13** (0.200 g) en CH₂Cl₂ (15 mL). La mezcla se agitó protegido de la luz y a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla se diluyó con MTBE (10 mL), se filtró a vacío sobre una capa de celita y los sólidos se lavaron con MTBE (3x20 mL). Los filtrados se concentraron a vacío. El residuo (**14**) se disolvió en DMF (5 mL) y sobre esta disolución se añadió Oxone® (0.106 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa de HCl (10 mL, 10%). La mezcla se extrajo con AcOEt (3x10 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (15% AcOEt/hexanos) para dar **A.11** (158 mg, 77%, aceite incoloro).

Ejemplo 7. Preparación de (E)-2-[(5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-17-[(R)-5-hidroxipentan-2-il]-10,13-dimetilhexadeca hidro-3H-ciclopenta[a]fenantren-3-iliden}-acetato de etilo (15**).**



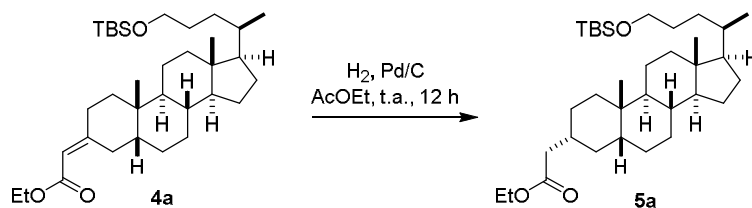
Una disolución de TBAF en THF (0.55 mL, 1M) se añadió sobre una disolución del ester **4b** (0.200 g) en THF (10 mL). Después de 12 h, la reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa de NaCl (15 mL). La mezcla se extrajo con AcOEt (3x10 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (10% AcOEt/hexanos) para dar el alcohol **15** (0.147 g, 93%, sólido blanco).

Ejemplo 8. Preparación de Ácido (R)-4-[(5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R,E)-3-(2-Etoxi-2-oxoetiliden)-10,13-dimetilhexa decahidro-1H-ciclopenta[a]fenentran-17-il]-pentanoico (A.11 o SUNIL6)



Dicromato de piridinio (0.525 g) se añadió a una disolución del alcohol **15** (0.20 g) en CH₂Cl₂ (15 mL). La mezcla se agito protegida de la luz y a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla se diluyo con MTBE (10 mL), se filtró a vacío sobre un lecho de celita y los sólidos se lavaron con MTBE (3x20 mL). Los filtrados se concentraron a vacío y el residuo (**16**, 0.180 g) resultante se disolvió DMF. Sobre la disolución anterior se añadió Oxone® (0.085 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa de HCl (10 mL, 10%) y la mezcla se extrajo con AcOEt (3x10 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (20% AcOEt/hexanos) para dar **A.11** (137 mg, 66%, sólido espumoso).

Ejemplo 9. Preparación de 2-[(3R,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-17-[(R)-5-(terc-Butildimetilsililo)pentan-2-il]-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il]acetato de Etilo (5a).

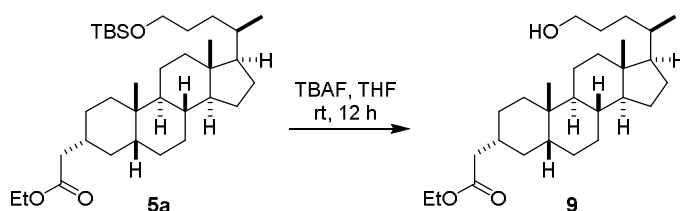


Pd/C (135 mg, 10% p/p) se añadió sobre una disolución de **4a** (0.690 g) en AcOEt (20 mL). El sistema se purgo 3 veces vacío/hidrógeno. La mezcla se agitó bajo atmósfera de hidrógeno (globo de H₂) durante 12 h. La mezcla se filtró a vacío sobre una capa de celita lavando

5 AcOEt (20 mL). Los filtrados se concentraron a vacío y el residuo resultante se purificó por cromatografía rápida en columna (10% AcOEt/hexanos) para dar el éster **5a** (570 mg, 82%, aceite incoloro).

Ejemplo 10. Preparación de 2-[(3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-[(*R*)-5-hidroxipentan-2-il]-10,13-dimetilhexadecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3-il]acetato de etilo (9)

10

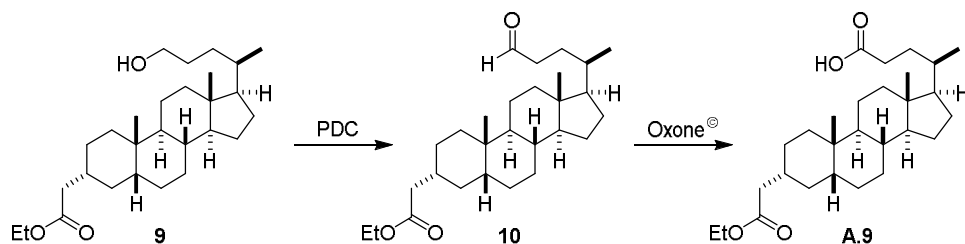


Una disolución de TBAF en THF (1.1 mL, 1M) se añadió sobre una disolución de **5a** (0.390 g) en THF (10 mL). Después de 12 h, la reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa saturada de NaCl. La mezcla se extrajo con AcOEt (3x10 mL). La fase orgánica

15 combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (10% AcOEt/Hexanos) para dar el alcohol **9** (0.300 g, 0.699 mmol, 97%, sólido blanco).

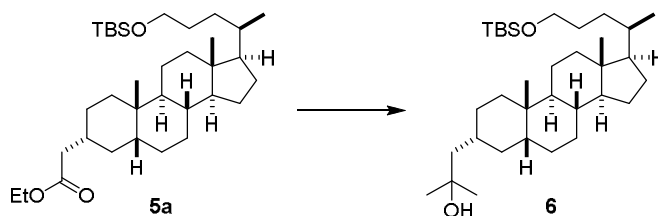
Ejemplo 11. Preparación de Ácido (*R*)-4-[(3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-3-(2-Etoxi-2-oxoetil)-10,13-dimetilhexadeca-hidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il]-pentanoico (A.9 o SUNIL3)

20



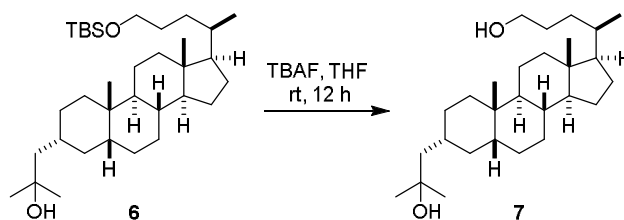
Dicromato de piridinio (0.430 g) se añadió sobre una disolución del alcohol **9** (0.165 g) en CH₂Cl₂ (25 mL). La mezcla se agitó protegida de la luz y a temperatura ambiente durante 12 h. La mezcla se diluyó en MTBE (10 mL) y se agitó durante 15 min. La mezcla se filtró a vacío sobre un lecho de celita, lavando los sólidos con MTBE (3x20 mL) y los filtrados se concentraron. El residuo (**10**, 0.160 g) se disolvió en DMF (10 mL) y sobre esta disolución se añadió Oxone® (60 mg). Después de 3 h, la reacción se detuvo por adición de una disolución de HCl (10 mL, 10%). La mezcla se extrajo con AcOEt (3x10 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (20% AcOEt/hexanos) para dar el ácido **A.9** (120 mg, 70%, sólido blanco).

Ejemplo 12. Preparación de 1-[(3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-[(*R*)-5-(*tert*-Butildimetilsililo)pentan-2-il]-10,13-dimetilhexadecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3-il]-2-metilpropan-2-ol (6**)**



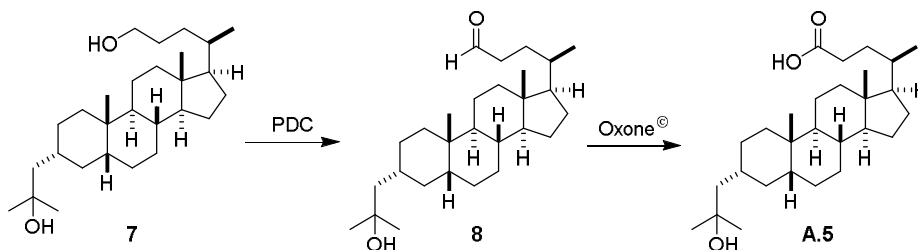
Una disolución de bromuro de metilmagnesio en THF (MeMgBr, 1.5 mL, 3 M) se añadió sobre una disolución del éster **5a** (0.50 g) en THF (10 mL), enfriada a 0 °C. Después de 5 min, la mezcla se retiró del baño y se calentó a reflujo (65 °C) durante 3 h. La reacción se dejó venir a temperatura ambiente y se detuvo por adición de una disolución acuosa de HCl (15 mL, 10%). La mezcla se extrajo con AcOEt (3x15 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (5% AcOEt/hexanos) para dar el alcohol **6** (0.479 g, 98%, aceite incoloro).

Ejemplo 13. Preparación de (*R*)-4-[(3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-3-(2-Hidroxi-2-metilpropil)-10,13-dimetilhexa decahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il]pentan-1-ol (7)



- 5 Una disolución de TBAF en THF (0.6 mL, 1M) se añadió sobre una disolución del éter de silicio **6** (0.226 g) en THF (1 mL). La mezcla se agito a temperatura ambiente durante 12 h. La reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa saturada de NaCl (5 mL). La mezcla se extrajo con AcOEt (3x10 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida (15% AcOEt/hexanos) para dar
- 10 el alcohol **7** (0.167 g, 94%, solido blanco).

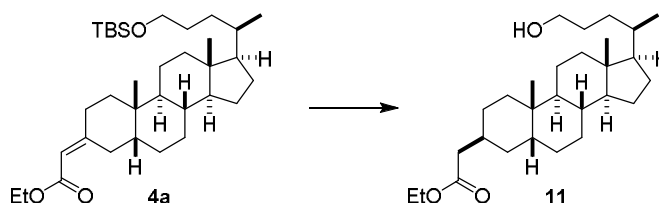
Ejemplo 14. Preparación de Ácido (*R*)-4-[(3*R*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-3-(2-hidroxi-2-metilpropil)-10,13-dimetilhexadeca-hidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il]pentanoico (A.5 o SUNIL1)



- 15 Dicromato de piridinio (0.620 g) se añadió sobre una disolución del alcohol **7** (0.230 g) en CH₂Cl₂ (15 mL). La mezcla se agito protegida de la luz y a temperatura ambiente durante 7 h. La mezcla resultante se diluyo con MTBE (20 mL) y se agitó 15 min. A continuación, la mezcla se filtró a vacio sobre una lecho de celita, lavando los sólidos con MTBE (3x20 mL). Los
- 20 filtrados se concentraron a vacio y el residuo (**8**, 0.229 g) se disolvió en DMF (10 ml). Sobre la disolución anterior se añadió oxone® (0.125 g) y la mezcla se agito a temperatura ambiente 3 h. La reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa saturada de NaCl (10 mL) y la mezcla se extrajo con AcOEt (3x10 mL). La fase orgánica combinada se secó,

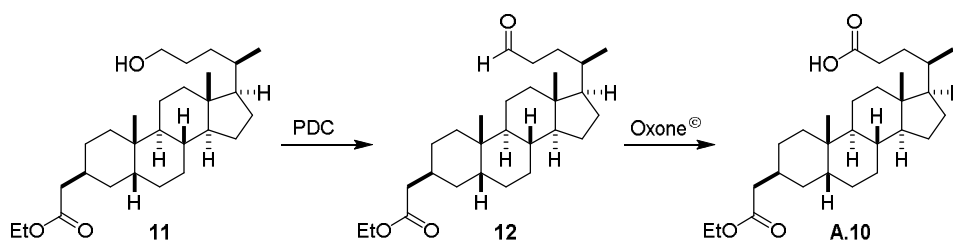
filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (15% AcOEt/hexanos) para dar el ácido **6** (0.180 g, 0.416 mmol, 76%, sólido blanco).

Ejemplo 15. Preparación de 2-[(3*S*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-[(*R*)-5-hidroxipentan-2-il]-10,13-dimetilhexadecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenentren-3-yl]-acetato de etilo (11**)**



Poli(metilhidroxisiloxano) (PMHS, 0.53 mL) y una disolución de *tert*-butóxido de potasio en THF (KO^tBu, 0.41 mL) se añadieron sucesivamente sobre una suspensión de CuCl (38 mg) y (*S*)-tol-BINAP (45 mg) en hexanos (8 mL). La mezcla se sónico durante 2h y luego se enfrió a -20 °C. A continuación, sobre la suspensión anterior se añadió vía canula una disolución del éster **4a** (0.300 g) en *i*PrOH (0.170 mL) y hexanos (2 mL). Después de 3.5 h, la mezcla de reacción se retiró del baño y se dejó venir a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa de HCl (15 mL, 10 %). La mezcla se extrajo con AcOEt (3x20 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo (**5b** y restos de PMHS) se disolvió en THF (10 mL) y sobre esta disolución se añadió HF (0.5 mL, 48%). Transcurridas 12 h, la mezcla se vertió sobre una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (50 mL). La mezcla se extrajo con AcOEt (3x25 mL). La fase orgánica combinada, se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl (20 mL), se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (10% AcOEt/Hexanos) para dar el alcohol **11** (0.220 g, 0.508 mmol, 92%, sólido blanco).

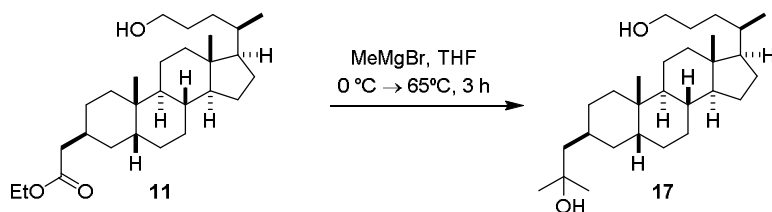
Ejemplo 16. Preparación de Ácido (*R*)-4-[(3*S*,5*R*,8*R*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,17*R*)-3-(2-etoxi-2-oxoetil)-10,13-dimetilhexadecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-17-il]-pentanoico (A.10 o SUNIL4)



Dicromato de piridinio (0.430 g) se añadió sobre una disolución del alcohol **11** (0.165 g) en CH₂Cl₂

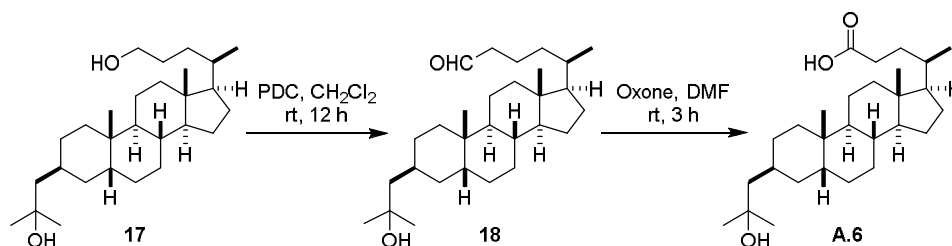
(10 mL). La mezcla se agito protegida de la luz y a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla de reacción se diluyo con MTBE (10 mL), se agitó durante 15 min y se filtró a través de un lecho de celita, lavando los sólidos con MTBE (3x20 mL). Los filtrados se concentraron y el residuo resultante (12, 0.160 g) se disolvió en DMF (5 mL). A continuación, se añadió Oxone® (0.060 g) y la mezcla se agito a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa de HCl (10 mL, 10%). La mezcla se extrajo con AcOEt (3x10 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentro. El residuo se purifico por cromatografía rápida en columna (15% AcOEt/hexanos) para dar **A.10** (120 mg, 70%, sólido blanco).

Ejemplo 17. Preparación de (R)-4-[(3S,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-(2-Hidroxi-2-metilpropil)-10,13-dimetilhexa decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]pentan-1-ol



Una disolución de bromuro de metilmagnesio en THF (1 mL) se añadió sobre una disolución, enfriada a 0 °C, del éster **11** (0.300 g) en THF (10 mL). Al cabo de 5 min, la mezcla de reacción se retiró del baño y se calentó a reflujo durante 3 h. Entonces, la reacción se dejó venir a temperatura ambiente y se detuvo por adición de una disolución acuosa de HCl (15 mL, 5%). La mezcla se extrajo con AcOEt (3x15 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (15% AcOEt/hexanos) para dar el alcohol **17** (0.276 g, 0.659 mmol, 95%, sólido blanco).

Ejemplo 18. Preparación de Ácido (R)-4-[(3S,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-(2-Hidroxí-2-metilpropil)-10,13-dimetilhexadeca hidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]-pentanoico (A.6 o SUNIL2)



Dicromato de piridinio (PDC, 0.270 g) se añadió sobre una disolución del alcohol **17** (0.150 g) en CH_2Cl_2 (15 mL). La mezcla de reacción se agitó protegida de la luz y a temperatura ambiente durante 7 h. A continuación, la mezcla se diluyó con MTBE (50 mL), se agitó 15 min y se filtró a vacío sobre un lecho de celita, lavando los sólidos con MTBE (3x20 mL). Los filtrados se concentraron a vacío y el residuo resultante (**18**, 0.149 g) se disolvió en DMF (10 mL). Sobre la disolución anterior se añadió Oxone (0.054 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa saturada de NaCl (10 mL). La mezcla se extrajo con AcOEt (3x10 mL). La fase orgánica combinada se secó, filtró y concentró. El residuo se purificó por cromatografía rápida en columna (15% AcOEt/hexanos) para dar el ácido **6** (120 mg, 0.277 mmol, 77%, sólido blanco).

Ejemplo 19. Pruebas in vitro

19.1. Métodos

19.1.1. Compuestos

1,25-Dihidroxitamina D3 (1,25D) se adquirió en Cayman Europe (Tallinn, Estonia) y fue disuelta en etanol absoluto hasta una concentración de 1 mM.

Compuestos de la invención a testar: El compuesto A.9, preparado en el ejemplo 11, fue disuelto en etanol absoluto a una concentración de 20 mM, y los restantes compuestos testados (A.5 preparado en el ejemplo 14; A.6 preparado en el ejemplo 18; A.10 preparado en el ejemplo 16; A.11-(Z) preparado en el ejemplo 6; A.11-(E) preparado en el ejemplo 8) fueron disueltos en etanol absoluto a una concentración de 50 mM.

19.1.2. Células

Las células HL60 se obtuvieron de un banco de células local en el Instituto de Inmunología y Terapia Experimental en Wrocław, Polonia. Las células fueron cultivadas en un medio

RPMI 1640 complementado con un 10% de suero fetal de ternera (FCS), penicilina 100 unidades/mL y streptomycin 100 µg/mL (Sigma, St. Louis, MO). Las células fueron cultivadas en atmósfera humedecida con un 95% de aire y un 5% de CO₂ a 37°C. El número y la viabilidad celular fueron determinados mediante conteos en un hematocitómetro y por exclusión de azul tripano. Las células fueron sembradas con una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/mL en un medio de cultivo conteniendo 1,25D, un compuesto de la presente invención citado en el apartado 19.1.1. o el volumen equivalente de etanol como vehículo control.

19.1.3. Ensayo de afinidad por el VDR

La afinidad por el VDR fue determinada mediante un kit de ensayo competitivo del receptor de la vitamina D PolarScreen™ siguiendo las condiciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). La 1,25D y los compuestos ensayados fueron evaluados en el rango de concentraciones de 10^{-12} – 10^{-5} M. Los componentes del ensayo fueron incubados durante 4h a temperatura ambiente para permitir alcanzar el equilibrio. La fluorescencia polarizada de cada bandeja fue determinada por triplicado usando el lector multipocillo Envision (PerkinElmer, Waltham, MA) y el promedio de la polarización de fluorescencia fue calculada a partir de estas medidas. El ensayo completo se repitió tres veces. Los valores IC₅₀ fueron calculados con el programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego CA) utilizando el promedio de los valores obtenidos.

19.1.4. Western blotting

Para obtener los extractos citosólicos y nucleares, 6×10^6 células/muestra fueron lavadas y disgregadas usando los reactivos de extracción nuclear y citoplasmática NE-PER (Thermo Fisher Scientific Inc., Worcester, MA) siguiendo las condiciones del fabricante. Los lisados celulares fueron desnaturalizados mediante la adición del tampón de muestra cinco veces (con un volumen máximo correspondiente a 1/4 del volumen del lisado) y se llevó a ebullición durante 5 min. 20 µL de cada lisado fue separado mediante SDS-PAGE y electrodepositado sobre una membrana de PVDF. Las membranas se secaron y fueron incubadas secuencialmente con anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios de peroxidasa conjugada peroxidasa de horradura. Las bandas de proteína fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia. Entonces las membranas fueron recortadas, secadas otra vez y ensayadas con anticuerpos subsecuentes.

19.1.5. Diferenciación celular y citometría de flujo

Las células fueron sembradas con una densidad de 15×10^4 células/mL en un medio de cultivo conteniendo 1,25D, un compuesto de la invención a testar según se indican en 19.1.1. o el volumen equivalente de etanol como vehículo control. Después de 96 h de incubación, las células fueron lavadas con PBS/0.1%BSA, y entonces incubadas durante 1 h, en baño de hielo, con 1 μ L de CD14-PE y 2 μ L CD11b-APC (ImmunoTools, Friesoythe, Germany). Las células fueron lavadas y suspendidas en 350 μ L de PBS/0.1%BSA antes de su análisis en un citómetro de flujo Becton Dickinson Accuri C6 (San Jose, CA). El análisis de datos fue realizado utilizando programas del Becton Dickinson Accuri C6. El ensayo se repitió de 3 a 5 veces. Los porcentajes de células positivas fueron impresos en los gráficos y los valores EC50 fueron calculados usando el software GraphPad Prism.

19.1.6. Síntesis de cDNA y PCR en tiempo real

ARN total fue aislado utilizando el reactivo EXTRAzol (BLIRT S.A., Gdańsk, Polonia) siguiendo las condiciones del fabricante. La cantidad de ARN fue determinada usando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc. Worcester, MA) y la calidad del ARN fue verificada por electroforesis de gel. EL ARN fue transcrito en ADN utilizando un kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR en tiempo real fue realizada utilizando el kit SensiFAST™ SYBR Hi-ROX (Bioline) en un sistema de detección "CFX Connect Real-Time PCR" (Bio-Rad Laboratories, Inc.). La secuencia de los primers de *CYP24A1* fueron (fp): 5'-CTCATGCTAAATACCCAGGTG-3', (rp): 5'-TCGCTGGCAAAACGCGATGGG-3' [1], los primers de *CD14* fueron (fp): 5'-GTTTCGGAAGACTTATCGACCATGGAGC-3', (rp): 5'-CAGACGCAGCGGAAATCTTCATC-3' [2], mientras que las secuencias de GAPDH fueron las siguientes: (fp): 5'-CAT GAG AAG TAT GAC AAC AGC CT-3', (rp): 5'-AGT CCT TCC ACG ATA CCA AAG T-3' [3]. Los cambios de magnitud en los niveles de mARN en los genes de *CYP24A1* o *CD14* relacionados con el gen de GAPDH fueron calculados por análisis cuantitativo relativo.

19.1.7. Análisis de resultados

Los programas Microsoft Excel and Graphpad Prism 7 (San Diego, CA, USA) fueron usados para analizar los resultados. El análisis estadístico de t de Student de las diferencias entre

muestras tratadas y no tratadas fue utilizado para determinar muestras independientes. Para verificar si las muestras tratadas con los compuestos de la invención a testar según se indican en 19.1.1., eran significativamente diferentes de las muestras tratadas con 1,25D, fueron empleados un análisis ANOVA unidireccional seguido de un análisis Dunnett adaptado.

5

19.2. Resultados

19.2.1. Afinidad de los compuestos por el VDR

La afinidad de los compuestos de la invención a testar según se indican en 19.1.1. por el receptor VDR fue determinada mediante un ensayo competitivo que utiliza polarización de fluorescencia. En este ensayo VDR humano recombinante se añade a un ligando fluorescente del VDR para formar un complejo, dando lugar a un gran valor de la polarización de fluorescencia. Entonces los compuestos a ensayar fueron añadidos al complejo en una bandeja de 386 pocillos. Los compuestos ensayados desplazan al ligando fluorescente del complejo, resultando un valor menor de polarización. La afinidad de los compuestos por el VDR fue ensayada con amplio rango de concentraciones y fue comparada con la 1,25D. Se debe mencionar que la afinidad por el VDR no pudo ser determinada para aquellos compuestos de la invención aplicados a concentraciones superiores a 10^{-5} M. Cuando los compuestos fueron ensayados en elevadas concentraciones, la curva concentración-respuesta es de forma de U en vez de ser sigmoideal. La causa probable se debe a la formación de asociación coloidal de los compuestos ensayados. La curva concentración-respuesta fue representada (presentada en la Figura 1), y los valores IC₅₀ fueron calculados usando GraphPad Prism 7.

La afinidad por el VDR se compara con la 1,25D, para la cual la afinidad relativa de enlace (RBA) está normalizada a 100, y ha sido presentada en la Tabla 1.

Tabla 1. Afinidades de los compuestos al VDR recombinante.

	1,25D	A.5	A.6	A.9	A.10	A.11 (Z)	A.11 (E)
IC₅₀ (nM)	2.92	46.53	188.5	ND	ND	424	ND
RBA^a	100	6.27	1.55	-	-	0.69	-

La afinidad por el VDR se expresa como IC₅₀ y actividad porcentual. ^a La potencia de la 1,25D está normalizada a 100. RBA: afinidad relativa de enlace. ND: no detectada.

19.2.2. Translocación nuclear y acumulación de VDR en respuesta a los compuestos de la invención a testar según se indican en 19.1.1.

- 5 Dado que la acumulación nuclear del VDR y la actividad pro-diferenciadora estaban correlacionadas para análogos anteriormente ensayados, se estudió como los compuestos de la invención a testar según se indican en 19.1.1. influyen en los niveles de proteína VDR en células HL60 expuestas durante 24h a concentraciones 100 nM de análogos. Se analizaron los niveles de VDR en fracciones nucleares de las células. La proteína nuclear HDAC2 fue
10 usada como control, como proteína que no cambia durante la diferenciación celular de HL60. La cantidad de VDR en el núcleo celular se había incrementado para 1,25D y para los compuestos A.5, A.6 y A.11-(Z) (Fig. 2).

19.2.3. Diferenciación de células HL60

- Las células HL60 fueron utilizadas para determinar la actividad pro-diferenciadora de los
15 compuestos de la invención a testar según se indican en 19.1.1.. Después del barrido inicial, los rangos de concentración fueron establecidos para cada compuesto. La 1,25D se ensayó en concentraciones entre 0.032 nM – 100 nM, A.5, A.6 y A.11-(Z) se ensayaron en concentraciones 0.032 nM – 500 nM, mientras que A.9, A.10 y A.11-(E) fueron aplicados en concentraciones 4 µM – 50 µM. Las células fueron expuestas a los compuestos durante
20 96 h y entonces la expresión del marcador de diferenciación monocito/macrófago CD14 y del marcador de diferenciación monocito/granulocito CD11b fueron estudiados mediante citometría de flujo. Los porcentajes de células positivas a CD14- y CD11b fueron registrados usando el software del Becton Dickinson Accuri C6. Los resultados son presentados en las Figuras 3A y 3B. Los valores EC₅₀ fueron estimados de las curvas dosis-respuesta
25 utilizando el software GraphPad Prism 7. Las relaciones molares efectivas (EMR) para cada análogo en comparación con la 1,25D para el antígeno para CD14 se representan en la Tabla 2 y para el antígeno para CD11b en la Tabla 3.

Tabla 2. Inducción de la expresión de CD14 por 1,25D y compuestos de Sunil.

	1,25D	A.5	A.6	A.9	A.10	A.11 (Z)	A.11 (E)

EC₅₀ (nM)	0.731	0.859	42.79	31 279	ND	54.04	10 363
EMR^a	1	0.85	0.017	0.000023	--	0.014	0.00007

^aLos valores de EC₅₀ fueron estimados de la curva dosis-respuesta utilizando el programa GraphPad Prism 7. Los valores de EC₅₀ fueron usados para calcular la relación molar efectiva (EMR). EMR=EC₅₀ 1,25D/EC₅₀ compuesto. ND – no se pudo calcular (actividad no detectada).

5

Tabla 3. Inducción de la expresión de CD11b por 1,25D y compuestos de Sunil.

	1,25D	A.5	A.6	A.9	A.10	A.11 (Z)	A.11 (E)
EC₅₀ (nM)	8.903	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EMR^a	1	--	--	--	--	--	--

^aLos valores de EC₅₀ fueron estimados de la curva dosis-respuesta utilizando el programa GraphPad Prism 7. Los valores de EC₅₀ fueron usados para calcular la relación molar efectiva (EMR). EMR=EC₅₀ 1,25D/EC₅₀ compuesto. ND – no se pudo calcular (actividad no detectada).

10

19.2.4. Expresión de *CYP24A1* en células HL60 en respuesta a 1,25D y compuestos de la invención a testar según se indican en 19.1.1.

Las células HL60 fueron expuestas a 1,25D o a los compuestos de la invención a testar según se indican en 19.1.1. a concentraciones 1 nM, 10 nM and 100 nM durante 96h. Células control fueron tratadas con un volumen equivalente de etanol (disolvente para todos los compuestos). Entonces el mRNA fue aislado de las células, transcrito en cADN y la expresión de *CYP24A1*, el gen diana de VDR más fuertemente regulado, fue determinada en una PCR en tiempo real con relación al gen *GAPDH*. Los efectos de la exposición a 1 nM de los compuestos está representada en la Figura 4A, a 10 nM en la Figura 4B, y a 100 nM en la Figura 4C. Las expresiones, las cuales fueron significativamente superiores a las de las células control, están marcadas con asteriscos. Las expresiones, las cuales fueron significativamente superiores a las de las células expuestas a 1,25D, están marcadas con una almohadilla.

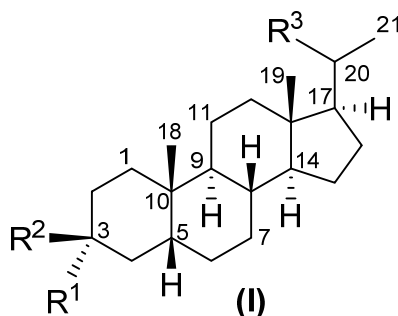
19.2.5. Expresión de *CD14* en células HL60 en respuesta a 1,25D y compuestos de la invención.

Las células HL60 fueron expuestas a 1,25D o a los compuestos de la invención según se indica en 19.1.1. a concentraciones 1 nM, 10 nM and 100 nM durante 96h. Células control fueron tratadas con un volumen equivalente de etanol (disolvente para todos los compuestos). Entonces el mRNA fue aislado de las células, transcrito en cADN y la expresión de *CD14* fue determinada en una PCR en tiempo real con relación al gen *GAPDH*. El gen *CD14* codifica una proteína de superficie celular presente en macrófagos, que es un co-receptor para LPS bacteriano. Los efectos de la exposición a 1 nM de los compuestos está representada en la Figura 5A, a 10 nM en la Figure 5B, y a 100 nM en la Figura 5C. Las expresiones, las cuales fueron significativamente superiores a las de las células control, están marcadas con asteriscos.

A la vista de los resultados in vitro obtenidos podemos concluir que el compuesto A.5 o SUNIL1 es el más activo del grupo de derivados del ácido litocólico estudiados. Este compuesto es especialmente efectivo en la inducción de la diferenciación celular y en la expresión del gen diana del VDR a una concentración 10 nM.

REIVINDICACIONES

1.- Compuesto de fórmula (I), sus diastereoisómeros o sus enantiómeros



donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 , se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, heteroalquinilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo, alquilacilo, arilacilo, alcoxilo, ariloxi, alquilcarboxi, arilcarboxi, heterociclo, $-\text{OSiR}^a\text{R}^b\text{R}^c$, donde cada uno de R^a , R^b y R^c se seleccionan de entre alquilo, arilo, arilalquilo y heterociclo, o R^1 y R^2 pueden formar conjuntamente un grupo metileno sustituido por un grupo seleccionado de entre hidroxialquilo, hidroxialquenilo y alquilcarboxi.

2.- Compuestos de fórmula (I), según la reivindicación 1, donde R^1 , R^2 y R^3 se seleccionan de entre hidrógeno, hidroxialquilo, hidroxialquenilo, carboxialquilo y carboxialquenilo, o R^1 y R^2 pueden formar conjuntamente un grupo metileno sustituido por un grupo seleccionado de entre hidroxialquilo, hidroxialquenilo y alquilcarboxi.

3.- Compuestos de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R^2 es hidrógeno y R^1 se selecciona de entre hidroxialquilo, heteroalquilo, arilalquilo, alquilacilo, arilacilo, carboxialquilo, carboxialquenilo, heteroalquenilo y hidroxialquenilo.

4.- Compuestos de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R^2 es hidrógeno y R^1 se selecciona de entre hidroximetilo, hidroxietilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo, hidroxiterc-butilo, carboximetilo, carboxietilo y carboxipropilo.

5.- Compuestos de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R^2 es hidrógeno y R^1 es hidroxiterc-butilo.

6.- Compuestos de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R1 es hidrógeno y R2 se selecciona de entre hidroxialquilo, heteroalquilo, arilalquilo, alquilacilo, arilacilo, carboxialquilo, carboxialquenilo, heteroalquenilo y hidroxialquenilo.

7.- Compuestos de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde
5 R1 es hidrógeno y R2 se selecciona de entre hidroximetilo, hidroxietilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo, hidroxi(terc-butilo), carboximetilo, carboxietilo y carboxipropilo.

8.- Compuestos de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R1 es hidrógeno y R2 es hidroxi(terc-butilo).

9.- Compuestos de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde
10 R1 y R2 conjuntamente forman un grupo metileno sustituido por un grupo seleccionado de entre hidroxialquilo, hidroxialquenilo y alquilcarboxi.

10.- Compuestos de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R1 y R2 conjuntamente forman un grupo metileno sustituido por un grupo alquilcarboxi.

11.- Compuestos de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde
15 R3 se selecciona de entre alquilo, alquenilo, heteroalquilo, heteroalquenilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo, hidroxialquilo y carboxialquilo.

12.- Compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones anteriores seleccionado de entre:

20 Ácido (R)-4-{(5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R,Z)-3-(2-Etoxi-2-oxoetiliden)-10,13-dimetilhexa decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il}-pentanoico,

Ácido (R)-4-{(5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R,E)-3-(2-Etoxi-2-oxoetiliden)-10,13-dimetilhexa decahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il}-pentanoico,

Ácido (R)-4-[(3R,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-(2-Etoxi-2-oxoetil)-10,13-dimetilhexadeca-hidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]-pentanoico,

25 Ácido (R)-4-[(3R,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-(2-hidroxi-2-metilpropil)-10,13-dimetilhexadeca-hidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanoico,

Ácido (R)-4-[(3S,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-(2-etoxi-2-oxoetil)-10,13-dimetilhexadeca hidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]-pentanoico, y

Ácido (R)-4-[(3S,5R,8R,9S,10S,13R,14S,17R)-3-(2-Hidroxi-2-metilpropil)-10,13-dimetilhexadeca hidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il]-pentanoico.

- 5 13.- Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 14.- Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en medicina.
- 15.- Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso
10 en el tratamiento de trastornos del metabolismo del calcio y del fósforo, osteoporosis, osteodistrofia renal, osteomalacia, enfermedades cutáneas hiperproliferativas, eczema, dermatitis, miopatía, leucemia, osteosarcomas, carcinomas escamosos, melanomas, desórdenes inmunológicos y en el rechazo a trasplantes.
- 16.- Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso
15 en el tratamiento del cáncer.
- 17.- Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en el tratamiento de cáncer de mama, colon y próstata.
- 18.- Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en el tratamiento de enfermedades del sistema inmune.
- 20 19.- Compuesto de fórmula (I), según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en el tratamiento de psoriasis.

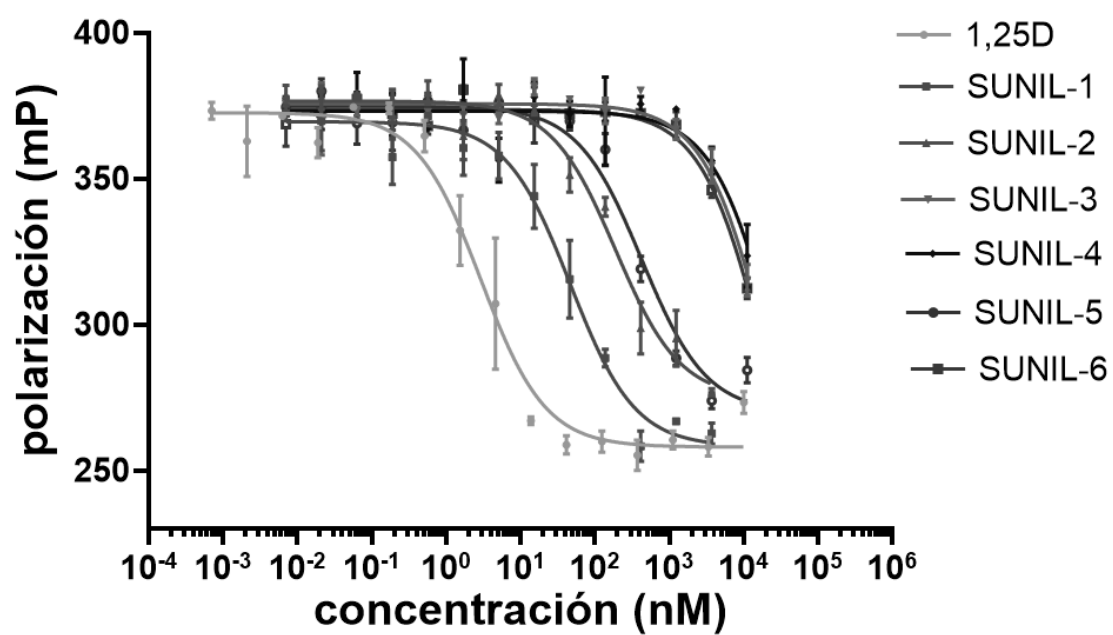


Figura 1

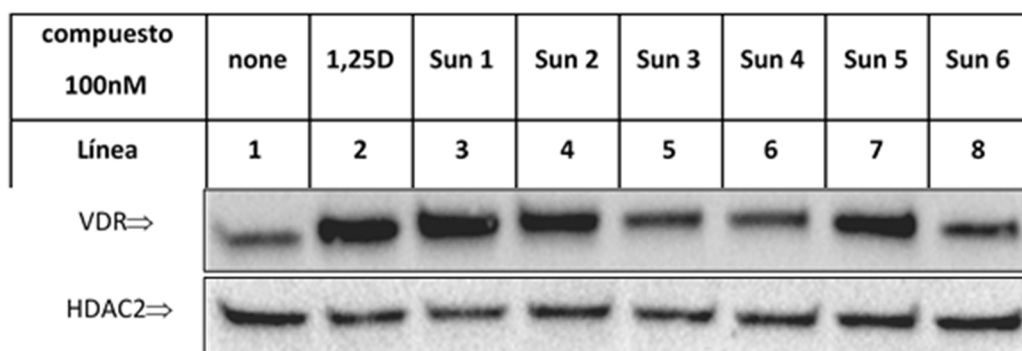


Figura 2

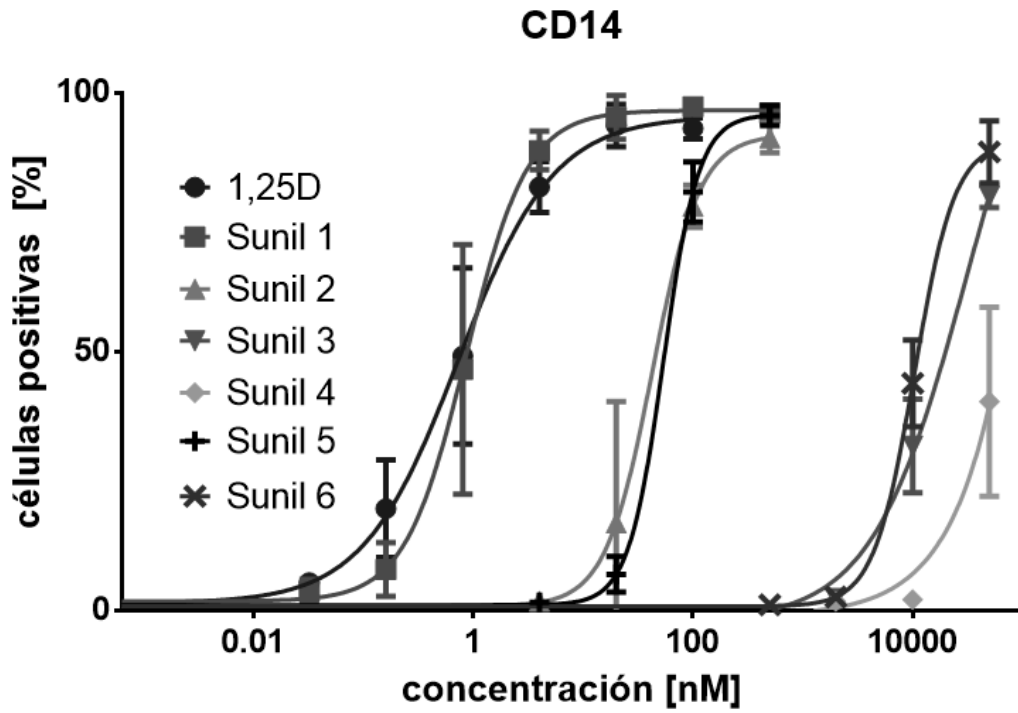


Figura 3 A

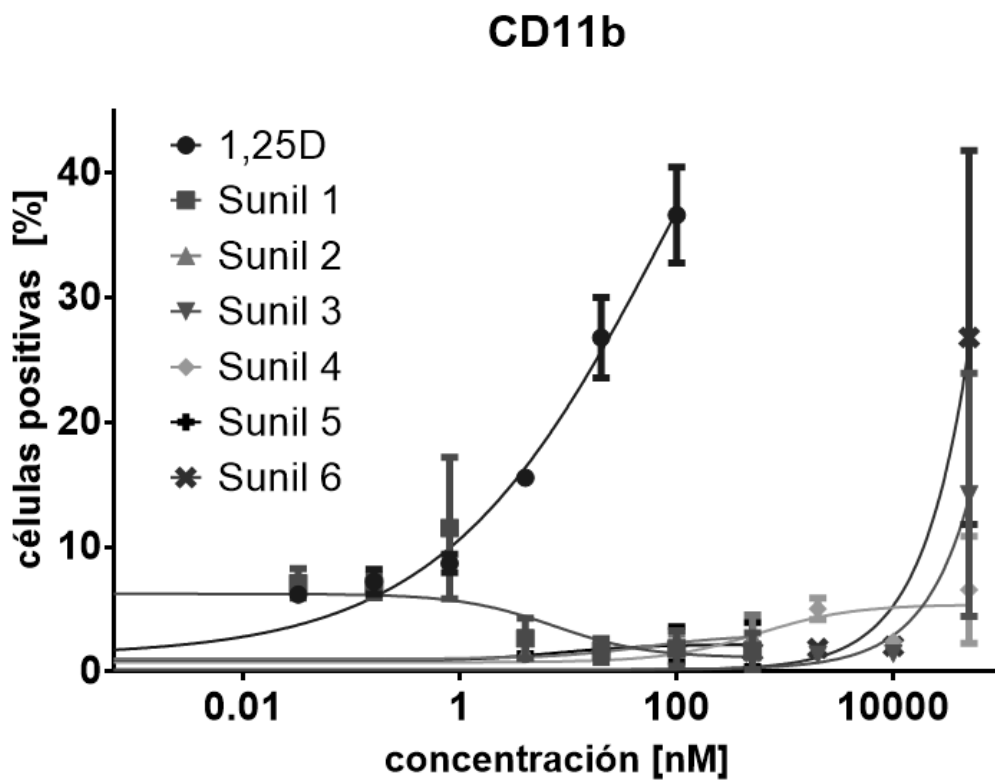


Figura 3 B

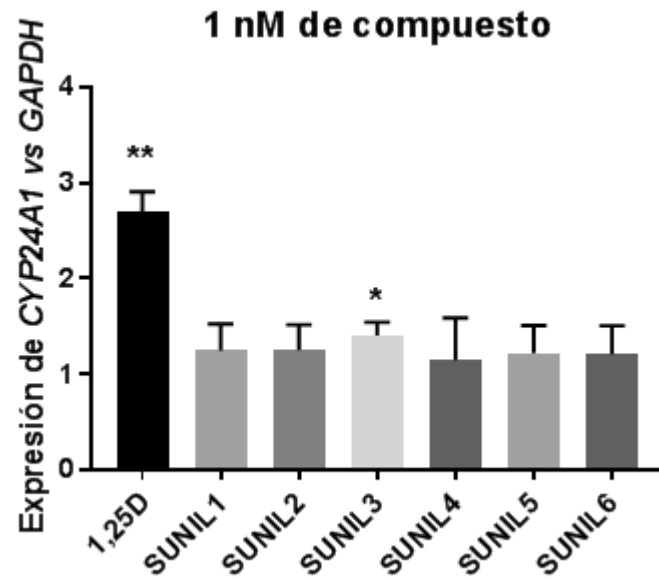


Figura 4 A

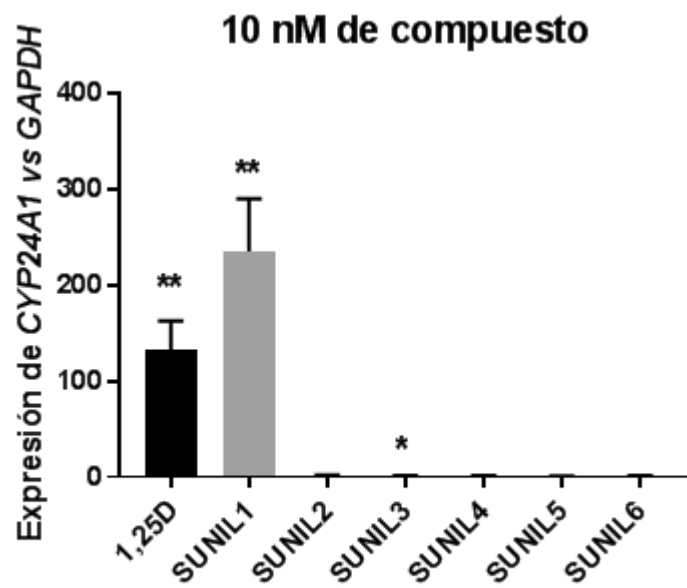


Figura 4 B

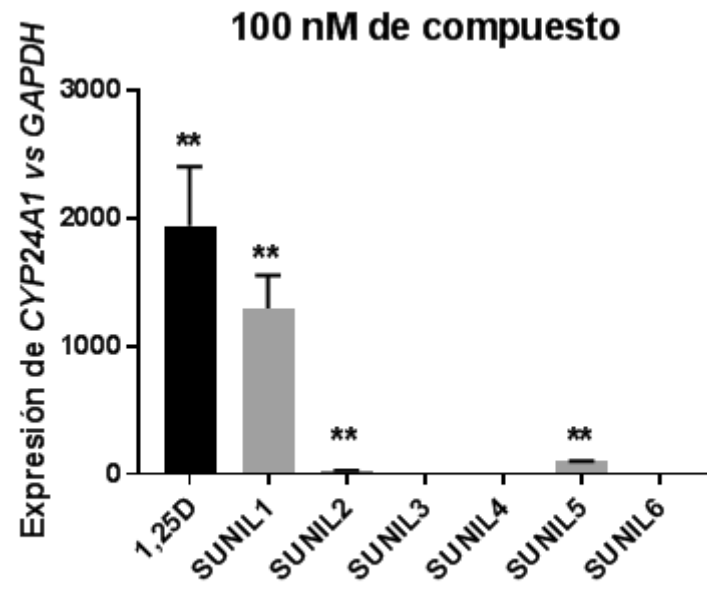


Figura 4 C

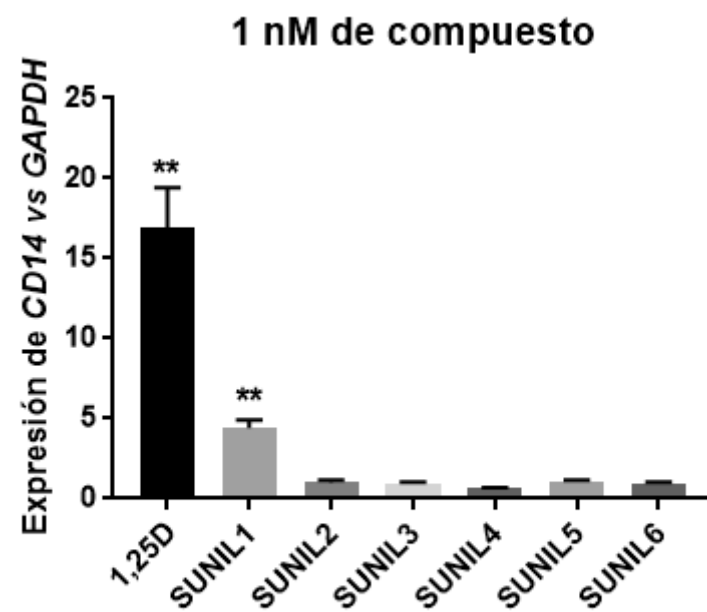


Figura 5 A

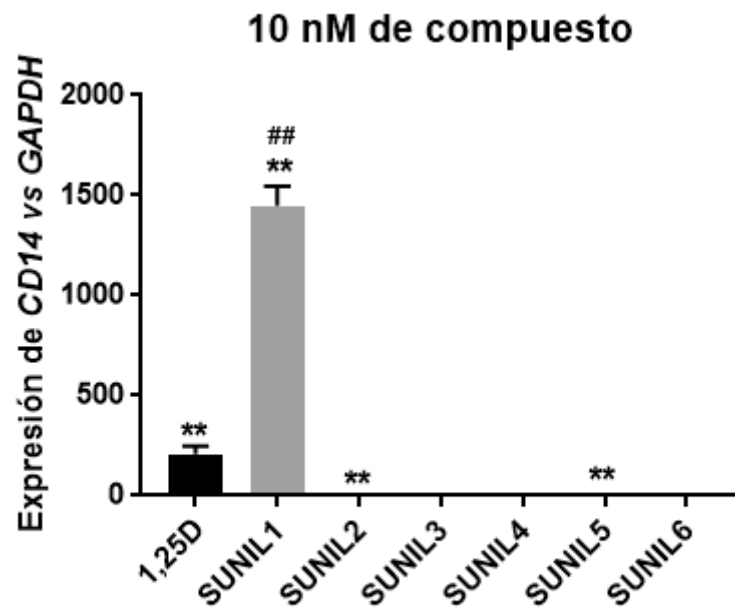


Figura 5 B

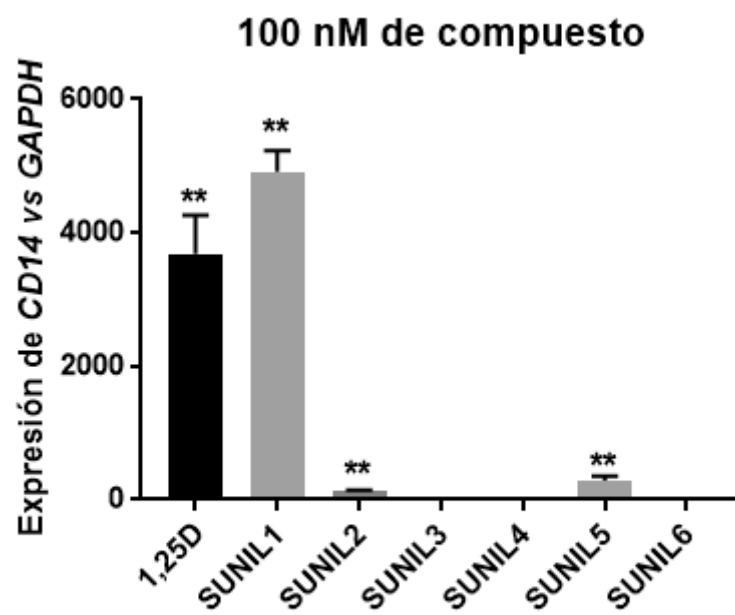


Figura 5 C