

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA Organización CSA Ltda

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE No.

00-51318

54 TITULO

"ANALOGOS DE VITAMINA D3"

53 CLASIFICACION INTERNACIONAL

A 61K 31/59

71 SOLICITANTE

F. HOFFMANN-LA ROCHE A.G.

DOMICILIO

BASILEA, SUIZA

74 APODERADO

JOSE ANTONIO LLOREDA

T.P. 10.784

Código 231

22 SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

10 JUL. 2000



SOLICITUD
DE PATENTE DE INVENCIÓN

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 00051318 00000000

Folios: 116

Fecha (AMD): 2000-07-10 14:59:06

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social F. HOFFMANN-LA ROCHE A.G. sociedad existente y organizada de conformidad con las leyes de Suiza

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica) JOSE ANTONIO LLOREDA

País de Domicilio Suiza

Departamento o Estado

Dirección 124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle, Suiza

Ciudad Basle Teléfono 41 61 6881111

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre JOSE ANTONIO LLOREDA

Dirección y Domicilio Calle 72 No. 5-83 Piso 6, Santafé de Bogotá, Colombia

Ciudad Santafé de Bogotá, D.C. Teléfono 57 1 3264270

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor(es) Andrew David Batcho, Bernard Michael Hennessy y Milan Radoje Uskokovic

Identificación

Dirección 19 White Oak Drive, North Caldwell, New Jersey 07006; 111 Passaic Avenue, Nutley, New Jersey 07110 y 253 Highland Avenue, Upper Montclair, New Jersey 07043, Estados Unidos de América

Ciudad North Caldwell, Nutley y Upper Montclair Teléfono 41 61 6881111

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención "ANALOGOS DE VITAMINA D3"

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒ NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☒

(33) País US

(32) Fecha 12-07-99

(31) No. Solicitud 60/143,413

Para Publicar a los

☒ 6 meses

☐ 12 meses

☐ 18 meses

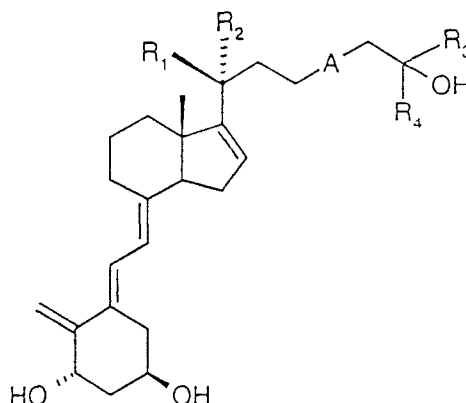
a partir de la fecha de la presente Solicitud

12 FOLIOS 2001
(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

A 61 K 31/59

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Compuestos de la fórmula



en donde

R₁ es hidrógeno o un grupo alquilo;

R₂ es hidrógeno o un grupo alquilo; ó

R₁, R₂ y C₂₀ conjuntamente son ciclopropilo;

Certifica

Los pod

Recibo d

Recibo d

Si se reiv

Copia de la primera solicitud

Traducción oficial

Si se reivindica prioridad Unionista: SI

Copia certificada de la primera solicitud: US 60/143,413 de fecha 12-07-99

Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior

Traducción Simple No. LLC-061-2000 de fecha 27-06-00 de Gabriel Rueda Chadid

Capítulo descriptivo

Dibujos, planos necesarios

Capítulo reivindicatorio

Tarjeta archivo propietarios según formato

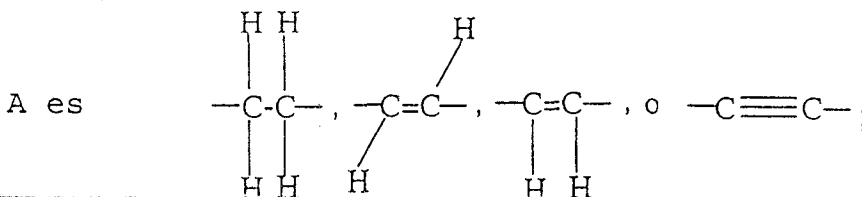
Tarjeta archivo temático según formato

Extracto para publicación según formato

Arte final 12 x 12 cms. Y 6x6 cms

Otros Documentos Traspaso de inventores y traspaso de sociedades

Nota: Anexo información sobre la fuente normativa de reciprocidad y petición Reconocimiento Personería



SOLICITO LA CONCESIÓN DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE JOSÉ ANTONIO LLOREDA

C.C. 17.159.681 de Bogotá TP No. 10.784



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00051318 00000000

Folios: 116

Fecha (AMD): 2000-07-10 14:59:06

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

VIT. 00000000

COPIA OFICIAL DE DATA : 44,070

JULIO 7 DE 2000

AL SEÑOR DON DOMINGO

PRESENTE

TIPO PASO

BRANCO

CONCEPTO

CUENTA

Nº 0000

VALOR

AL SEÑOR DON DOMINGO

CONSIGNACION

BRANCO PORQUE

CONCEPTO

CUENTA

Nº 0000

VALOR

AL SEÑOR DON DOMINGO

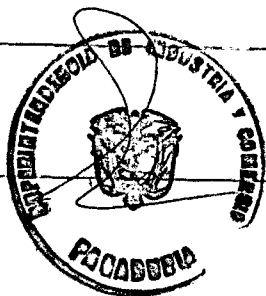
COPIA OFICIAL DE DATA

CONCEPTO

COPIA OFICIAL DE DATA

COPIA OFICIAL DE DATA

RECIBO



Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10

Conmutador: 334 12 21

Fax: 281 31 25

Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

ANEXO

Atentamente manifiesto a usted que la fuente normativa de la reciprocidad de la cual se deriva el derecho del solicitante para reivindicar prioridad en el presente caso, se encuentra:

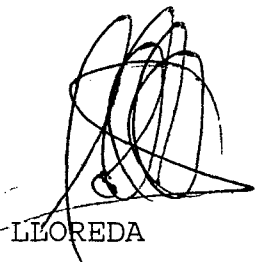
- a) En el Artículo 2 del Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el cual se establece la "Organización Mundial de Comercio (OMC)" suscrito en Marruecos el 15 de abril de 1994. Este acuerdo fue aprobado por el Congreso de Colombia mediante Ley 170 de 1994 y por la Corte Constitucional Colombiana mediante Sentencia C-137-95 de 28 de marzo de 1995, y entró en vigencia en nuestro país el 30 de abril de 1995, 30 días después de su ratificación.

Dicho Artículo establece que en lo que respecta a las partes II, III y IV del Acuerdo (referidas a la existencia, alcance y ejercicio de los derechos de propiedad intelectual, entre otros) los Miembros cumplirán los artículos 1 a 12 y el Artículo 19 del Convenio de París —el Artículo que establece la prioridad de las patentes de invención es el Artículo 4--

- b) En el Artículo 4 del mencionado Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el cual se establece la Organización Mundial de Comercio (OMC), el cual consagra el "Trato de la nación más favorecida" para los países Miembros del mismo.
- c) En el Artículo 4 del Convenio de París, del cual ya era parte Colombia en el momento en que se presentó la solicitud cuya prioridad ahora reivindico, con lo cual se cumple la reciprocidad exigida en el Artículo 12 de la Decisión 344 del Acuerdo de Cartagena para con solicitudes provenientes de los Países Miembros del Acuerdo de Cartagena.

ANEXO

El documento que acredita la calidad REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores JOSE LLOREDA CAMACHO y/o ALFONSO LLOREDA CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLOREDA para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se encuentra protocolizado ante esa División bajo el No. 15.256. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



JOSE ANTONIO LLOREDA

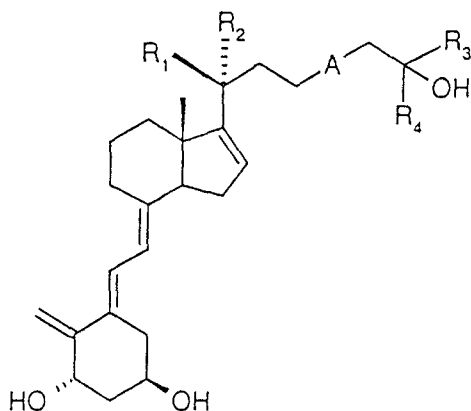
T.P. No. 10.784

CODIGO 231

RESUMEN OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Compuestos de la fórmula

5



10

en donde

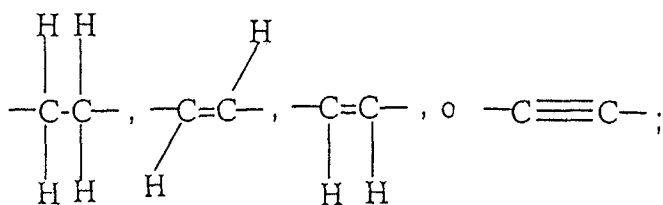
R₁ es hidrógeno o un grupo alquilo;

R₂ es hidrógeno o un grupo alquilo; ó

R₁, R₂ y C₂₀ conjuntamente son ciclopropilo;

15

A es



20

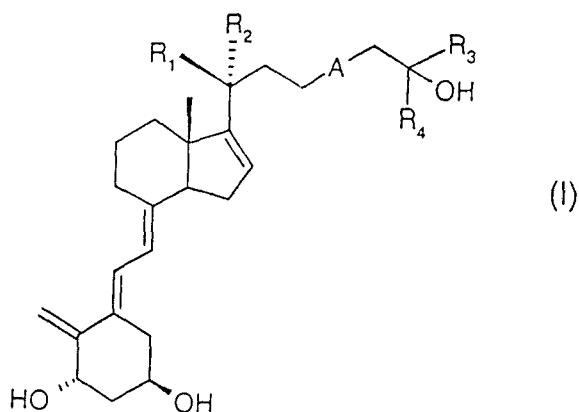
R₃ es alquilo, hidroxí-alquilo o fluoroalquilo; y

R₄ es alquilo, hidroxí-alquilo o fluoroalquilo

los cuales son útiles en el tratamiento de cáncer de mama, cáncer de próstata, leucemia mieloide, crecimiento benigno de la próstata, calvicie y osteoporosis.

25

La invención se refiere a un compuesto de la fórmula

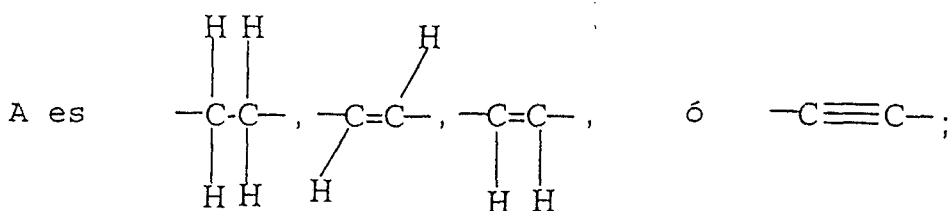


en donde

10 R_1 es hidrógeno o un grupo alquilo;

R_2 es hidrógeno o un grupo alquilo; ó

R_1 , R_2 y C_{20} conjuntamente son ciclopropilo;



R_3 es alquilo, hidroxialquilo o fluoroalquilo; y

R_4 es alquilo, hidroxialquilo o fluoroalquilo.

20 Se ha descubierto que los compuestos de la fórmula I inducen la inhibición de la proliferación en las líneas celulares de leucemia mieloide, cáncer de próstata y de mama. Según esto, los compuestos de la fórmula I son útiles como agentes para el tratamiento del cáncer de próstata, cáncer de mama y para el tratamiento de la leucemia.

25

También se ha descubierto que los compuestos de la fórmula I tienen actividad antiandrogénica. Según esto, los compuestos de la fórmula I son útiles para el tratamiento

154d

del crecimiento benigno de la próstata, calvicie y cáncer de próstata.

También se ha descubierto que los compuestos de la fórmula I presentan una actividad que los hace útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con las glándulas sebáceas tales como el acné o la dermatitis seborréica.

También se ha descubierto que los compuestos de la fórmula I presentan una actividad que hace a los compuestos útiles para el tratamiento de la osteoporosis.

10 Descripción detallada de la invención

Tal como se emplea aquí, el término "grupo alquilo" denota un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada que presenta entre 1-4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo y similares.

15 El término "hidroxi-alquilo" denota un grupo alquilo que presenta un sustituyente hidroxilo en cualquiera de los átomos de carbono del grupo alquilo. El término "fluoro-alquilo" denota un grupo alquilo que presenta uno, dos o tres átomos de fluro substituidos en cualquiera de los

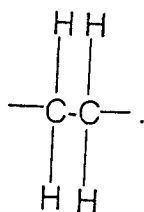
20 átomos de carbono del grupo alquilo.

En las fórmulas presentadas aquí, varios substituyentes se ilustran unidos al núcleo por uno de las siguientes notaciones: una línea continua con forma de cuña(◄) indicando un substituyente que se encuentra por encima del plano de la molécula; y una línea discontinua con forma de cuña (≡) indicando un substituyente que se encuentra por debajo del plano de la molécula.

Preferiblemente R_1 es hidrógeno y R_2 es alquilo, o R_1 es alquilo y R_2 es hidrógeno. Más preferiblemente, R_1 es hidrógeno y R_2 es metilo o R_1 es metilo y R_2 es hidrógeno.

Preferiblemente R_3 y R_4 son, independientemente, alquilo, hidroxialquilo o trifluoroalquilo. Más preferiblemente, R_3 y R_4 son independientemente, metilo, hidroximetilo o trifluorometilo.

Preferiblemente, A es

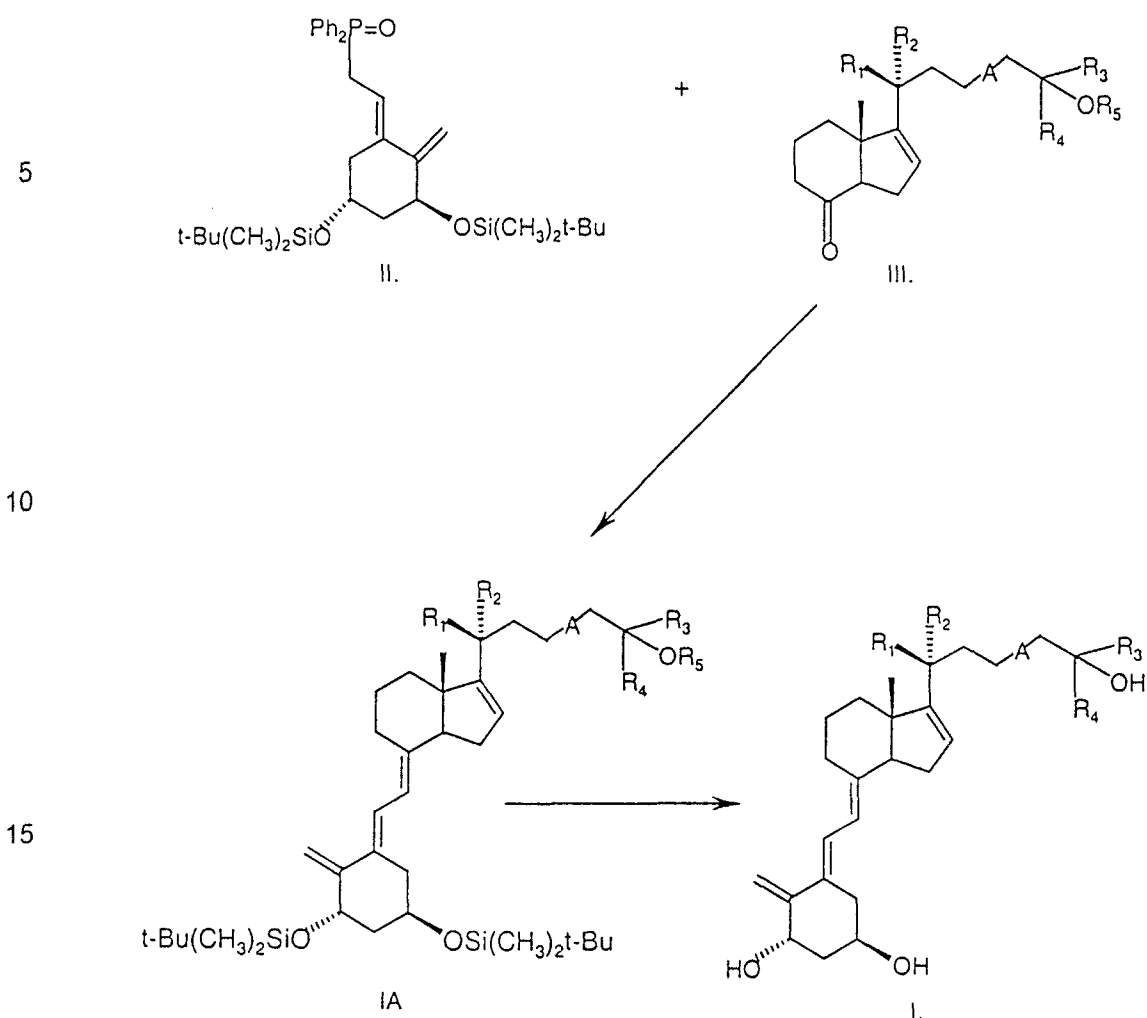


El compuesto más preferido de la fórmula I es 1,25-dihidroxi-16-en-5,6-trans-colecalciferol.

Los compuestos de la fórmula I se preparan como se describe a continuación, haciendo mención especial al Es-

quema de Fórmula siguiente.

Esquema de fórmula



R_5 es hidrógeno o trimetilsililo.

En el anterior Esquema de Fórmula, en donde Ph es fenilo, el compuesto de fórmula II, el cual es el compuesto óxido de [3S-(1E,3 β ,5 α)-2-[3,5-bis(dimetiletil)dimetilsilil]oxi]-2-metilen-ciclohexiliden]etil]difenilfosfina, se convierte en un compuesto de fórmula IA mediante la reacción con un compuesto de la fórmula III.

La reacción se lleva a cabo entre -60 °C y -90 °C, en un solvente orgánico, aprótico polar, tal como éter seco o

más preferiblemente tetrahidrofurano seco, en presencia de una base fuerte tal como un alquil litio como butil litio.

Los grupos protectores de los compuestos de fórmula IA se eliminan mediante la reacción con una sal de fluoruro, tal como fluoruro de tetrabutyl-amonio en un solvente polar orgánico tal como éter, o más preferiblemente tetrahidrofurano, para dar lugar al correspondiente compuesto de fórmula I.

El compuesto de fórmula II se prepara como se describe a continuación en los Ejemplos 1-6, o de forma alternativa, como se describe en los Ejemplos 7-8.

Los compuestos de la fórmula III son conocidos (por ejemplo en la Patente U.S No 5.087.619) o se puede preparar siguiendo métodos conocidos.

La actividad útil de los compuestos de la fórmula I como agentes para el tratamiento de cáncer de próstata, cáncer de mama y para el tratamiento de leucemia, se puede demostrar por los siguientes ensayos que son conocidos en el campo.

Los materiales que se seleccionaron para utilizarlos aquí y los procedimientos empleados fueron los siguientes:

Líneas celulares. La línea celular de cáncer de mama (MCF-7), la línea celular de cáncer de próstata (LNCaP) y la línea celular de leucemia mieloide (HL-60) se mantuvieron del modo siguiente: las células MCF-7 se mantuvieron en Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) con suero fetal de ternera (FCS) al 10%; LNCaP y HL-60 se hicieron crecer en RPMI1640 con FCS al 10%. Las tres líneas celulares se man-

tuvieron en un incubador a 37 °C conteniendo CO₂ al 5%.

Compuestos de vitamina D₃. Los compuestos de vitamina D₃ se disolvieron en etanol absoluto a 10⁻³ M como solución madre, la cual se conservó a -20 °C y se protegió de la luz. Para su uso *in vitro*, los compuestos se diluyeron en medio DMEM o RPMI. Para su uso *in vivo*, los compuestos se diluyeron con una solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se utilizó una alícuota sólo una vez y las células LNCaP fueron tripsinizadas. Las suspensiones de células con células únicas lavadas se enumeraron y se plaquearon en placas de fondo plano de 24 pocillos con un total de 1x 10⁻³ células/ pocillo en un volumen de 400 µl/pocillo. La capa de nutrientes se preparó con agar que se equilibró a 42 °C. De forma previa a este paso, los compuestos se dispusieron en los pocillos. Tras la incubación, se contaron las colonias. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces utilizando placas por triplicado para un punto experimental.

Niveles de calcio en suero *in vivo*. Veintiocho ratones macho Balb/c de 8 a 9 semanas de edad se mantuvieron en condiciones sin patógenos y se alimentaron con una dieta de laboratorio estándar. Cuatro ratones por grupo fueron inyectados intraperitonealmente cada día (excepto el sábado y el domingo) con un compuesto de vitamina D₃ o bien con un diluyente (100 µl/ratón) durante 3 semanas. Las dosis de 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ fueron: 0,1, 0,5, 1,0 y 2,0 µg. Las dosis de 1,25(OH)₂D₃ fueron 0,1 µg/ratón. Los ratones control fueron inyectados con 100 ml de PBS. Los valo-

res de calcio en suero se midieron cada semana mediante un ensayo de detección colorimétrico y cuantitativo.

Experimentos de exposición a pulsos. Las células MCF-7 se incubaron en cultivo líquido con 10^{-7} de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ó $1,25(\text{OH})_2$ -16-en-5,6-trans- D_3 durante diferentes períodos. Tras la incubación, estas células se lavaron con cuidado dos veces con PBS y las células viables se contaron y plaquearon en placas de 24 pocillos para llevar a cabo el ensayo de colonia en agar blando, tal como se ha descrito previamente.

Análisis del ciclo celular mediante Citometría de Flujo. El análisis del ciclo celular se llevó a cabo en células MCF-7 incubadas durante 4 días con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ó bien con $1,25(\text{OH})_2$ -16-en-5,6-trans- D_3 a 10^{-7} M. Las células se fijaron en metanol frío durante toda la noche antes de la tinción con 50 $\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio, Rnasa 1 mg/ml (100 unidades/ ml) y NP40 al 0,1%. El análisis se realizó de forma inmediata tras la tinción. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces de forma independiente. Todos los datos se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Student.

Análisis por Western Blot. Las células se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en tampón de lisis (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, deoxicolato sódico 0,5%, NP40 1%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 $\mu\text{g/ml}$, aprotinina 2 $\mu\text{g/ml}$, pepstatina 1 $\mu\text{g/ml}$ y leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$), y se dejaron en hielo durante 30 minutos. Tras la centrifugación a 15.000 g durante 20 minutos a 4°C, se re-

cogió el sobrenadante. Las concentraciones de proteína se cuantificaron. Los lisados completos (15 µg) se analizaron por gel de poliacrilamida dodecil sulfato sódico al 15%, se transfirieron a una membrana inmobilon poliviniliden difu-
 5 ruro y se analizaron mediante anticuerpo policlonal de co-
 nejo anti-p27^{kip1} y anticuerpo monoclonal anti-Actina murina. Las membranas se revelaron.

Actividad Telomerasa. Para detectar la actividad telomerasa relativa, se realizaron ensayos de protocolo de am-
 10 plificación de repetición telomérica (TRAP). Para la trans-
 criptasa reversa telomerasa humana (hTERT), se aislaron los
 RNAs totales de las células HL que se trataron con
 1,25(OH)₂D₃ ó 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃ (10⁻⁹, 10⁻⁸, y 10⁻⁷
 M) durante 4 días con una solución monofásica de fenol e
 15 isotiocianato de guanidinio. El RT-PCR se realizó con 1 µg
 de RNA total y cebadores hexámeros al azar. El cDNA se am-
 plificó utilizando cebadores específicos para el gen hTERT
 o el gen GAPDH, que se usó como control. Los cebadores uti-
 lizados para hTERT fueron: 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3' (sen-
 20 tido) (SEQ ID NO:1), y 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3' (antisen-
 tido) (SEQ ID NO:2). Los ciclos térmicos fueron 94 °C du-
 rante 90 segundos, seguido por 33 ciclos de 95 °C durante
 20 segundos, 68 °C durante 40 segundos y 72 °C durante 30
 segundos. Los cebadores para el gen GAPDH fueron: 5'-
 25 CCATGGAGAAGGCTGGGG-3' (sentido) (SEQ ID NO:3), y 5'-
 CAAAGTTGTCATGGATGACC-3' (antisentido) (SEQ ID NO:4). Las
 condiciones para las amplificaciones GAPDH fueron: 94 °C
 durante 2 minutos, 26 ciclos de 94 °C durante 30 segundos,

62 °C durante 40 segundos, 72 °C durante 60 segundos, seguido por 72 °C durante 4 minutos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%, el cual se tiñió con bromuro de etidio.

5 **Efecto de análogos de Vitamina D₃ en el Ensayo clonogénico.** Las células LNCaP, las células MCF-7 y las células HL-60 se sometieron a clonaje en agar blando en presencia de análogos de vitamina D₃ a concentraciones de entre 10⁻¹¹ y 10⁻⁷ M. Se representaron las curvas dosis-respuesta y se determinó la dosis efectiva que inhibía el 50% de la formación de colonias (ED₅₀). El 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃ fue eficaz en cuanto a la inhibición de la proliferación clonal de las tres líneas celulares de una forma dependiente de dosis. La ED₅₀ de 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃ fue 1,4 x 10⁻⁹ M para las células LNCaP, 4,3 x 10⁻⁹ M para las células MCF-7 y 3,0 x 10⁻¹¹ M para las células HL-60, que fue alrededor de 10-100 veces más potente que 1,25(OH)₂D₃.

20 **Niveles de calcio en suero *in vivo*.** Debido a que la hipercalcemia representa una toxicidad importante de los compuestos de vitamina D₃, se compararon los efectos calcémicos de 1,25(OH)₂D₃ con 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃. Todos los ratones sobrevivieron a las 3 semanas de estudio. Los ratones que recibieron 0,1 µg de 1,25(OH)₂D₃, todos fueron hipercalcémicos con niveles de calcio en suero de aproximadamente 12 mg/dl (valor normal 8,5-10,5 mg/dl). En contraste, los ratones que recibieron 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃ (0,1-2,0 µg/ratón) presentaron casi el mismo nivel de calcio (8-10 mg/dl) que los ratones control (8-9 mg/dl).

Experimentos de exposición a pulsos. Para investigar si la inhibición de la proliferación clonogénica por los análogos de vitamina D₃ era reversible, se llevaron a cabo experimentos de exposición a pulsos. Las células MCF-7 se expusieron a 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃ ó 1,25(OH)₂D₃ durante diferentes períodos, se lavaron y plaqueron en agar blando y el número de colonias se contó el día 14 de cultivo. Aproximadamente el 40 y el 30 por ciento de las células clonogénicas fueron inhibidas a los 4 días de exposición a 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃ y 1,25(OH)₂D₃, respectivamente.

Análisis del ciclo celular. Se determinó el efecto de 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃ y 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷, 4 días) en el ciclo celular de las células MCF-7. Se observó un incremento significativo ($P \leq 0,05$) en el número de células en fase G₀-G₁ del ciclo celular, conjuntamente con una disminución concomitante en la proporción de células en fase S.

Análisis por Western Blot. Los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina conocidos como p21^{waf1} y p27^{kip1} son capaces de inhibir la actividad de la ciclina quinasa y así disminuir la progresión de las células a través del ciclo celular. Las células MCF-7 control presentaban constitutivamente un nivel moderado de expresión de p21^{waf1} y p27^{kip1}, tal como se determinó por análisis por Western blot. La exposición durante un día a 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃ (10⁻⁷ M) aumentó la expresión de p21^{waf1} y p27^{kip1} entre 3,2-3,5 veces, mientras que el cultivo con 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) aumentó la expresión de p21^{waf1} y p27^{kip1} entre 1,6-1,8 veces. La exposición de las células MCF-7 a 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-

D_3 (10^{-7} M) durante 3 días resultó en un aumento de 2,8 veces y 3,4 veces en la expresión de $p21^{waf1}$ y $p27^{kip1}$, respectivamente. $1,25(OH)_2D_3$ (10^{-7} M, 3 días) aumentó la expresión de $p21^{waf1}$ y $p27^{kip1}$ en 4,8 veces y 3,3 veces, respectivamente.

5 Se estudió el efecto dependiente de la dosis de los compuestos de vitamina D_3 en la expresión de $p27^{kip1}$ en células HL-60. Tanto $1,25(OH)_2D_3$ como $1,25(OH)_2-16-en-5,6-trans-D_3$ estimulan la expresión de $p27^{kip1}$ y estos niveles aumentan de forma significativa tras la incubación con $1,25(OH)_2-16-en-5,6-trans-D_3$ (4 días, 10^{-9} M). Los niveles de $p27^{kip1}$ au-
10 mentan de forma notable cuando las células HL-60 se cultivan con $1,25(OH)_2D_3$ 10^{-8} - 10^{-9} M.

Actividad Telomerasa. El efecto de $1,25(OH)_2-16-en-5,6-trans-D_3$ y de $1,25(OH)_2D_3$ (10^{-9} - 10^{-7} M, 4 días) en la activi-
15 dad telomerasa se evaluó mediante el ensayo TRAP. La actividad telomerasa disminuyó de forma notable en células HL-60 incubadas con $1,25(OH)_2-16-en-5,6-trans-D_3$ 10^{-9} M ó $1,25(OH)_2D_3$ 10^{-7} M.

Los efectos de los análogos de la vitamina D_3 en la ex-
20 presión de hTERT en células HL-60 se evaluó mediante RT-PCR. Tanto $1,25(OH)_2-16-en-5,6-trans-D_3$ como $1,25(OH)_2D_3$ inhibieron la expresión del mRNA de hTERT de forma dependiente de la dosis, consiguiendo casi la total inhibición de la expresión con 10^{-8} M de $1,25(OH)_2-16-en-5,6-trans-D_3$ y
25 con 10^{-7} M de $1,25(OH)_2D_3$.

La actividad beneficiosa de los compuestos de fórmula I como agentes para el tratamiento del crecimiento benigno de próstata se puede demostrar mediante los siguientes en-

sayos que son conocidos en el campo.

Se evaluó $1,25(\text{OH})_2-16\text{-en-}5,6\text{-trans-}\text{D}_3$ en cuanto a actividad antiandrogénica en hámsters Syrian machos, castrados y estimulados con testosterona. Los estudios demostraron que $1,25(\text{OH})_2-16\text{-en-}5,6\text{-trans-}\text{D}_3$ suprimió substancialmente la hipertrofia inducida por andrógenos de las vesículas seminales y de la glándula de la próstata ventral en estos animales, mientras que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fue inactivo a dosis no tóxicas ($1\text{ }\mu\text{g}$).

Los hámsters Syrian machos castrados fueron inyectados diariamente, s.c. con $20\text{ }\mu\text{g}$ de testosterona propionato y $1\text{ }\mu\text{g}$ de $1,25(\text{OH})_2-16\text{-en-}5,6\text{-trans-}\text{D}_3$ durante 14 días consecutivos. Ambos compuestos se administraron en un vehículo de $0,2\text{ ml}$ de aceite de sésamo cada uno. La necropsia se llevó a cabo en el día 15. La próstata y las vesículas seminales se retiraron, se secaron y se pesaron. Los datos se analizaron para determinar su significación estadística mediante la prueba t de Student y se expresaron como porcentaje de inhibición de la respuesta estimulada.

Tabla I

Inhibición del crecimiento de la próstata y de la vesícula seminal en hámsters castrados estimulados con testosterona

<u>Grupo</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Próstata Ven-</u>		<u>Vesículas Semina-</u>	
		<u>tral</u>		<u>les</u>	
		<u>mg</u>	<u>Inhib.</u>	<u>mg ± MES</u>	<u>Inhib.</u>
1	Vehículo	12±1	---	36±3	---
2	Testosterona	43±5	---	105±6	---
3	Testosterona + 1,25(OH) ₂ -16-en- 5,6-trans-D ₃ 0,1µg	19±2	77%	71±1	48%

***p<0,001

- 5 La actividad beneficiosa de los compuestos de la fórmula I como agentes para el tratamiento de la osteoporosis se puede demostrar mediante los ensayos siguientes, los cuales son conocidos en el campo.

Materiales y Métodos

10 Animales y tratamiento:

Se utilizaron ratas hembras adultas de tres meses de edad. Tras una semana de aclimatación, los animales se agruparon por peso y se trataron mediante alimentación forzada de 1 ml/kg/día con diversas concentraciones de 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃. En el día 7 de dosificación, los animales se sangraron y se determinaron los niveles de calcio en suero.

Preparación del compuesto:

20 El compuesto se disolvió en etanol de graduación 200 para obtener una concentración de 100 µg/ml. Se prepararon

el vehículo de aceite de sésamo y la solución del compuesto en etanol para la concentración de la mayor dosificación y entonces se evaporaron de forma rotatoria a 37 °C para eliminar el etanol. El volumen de la dosis se calculó mediante el grupo de dosificación por peso corporal medio. Se realizaron diluciones seriadas del compuesto disuelto en el vehículo para obtener las concentraciones de dosis apropiadas.

Recogida y determinación del suero:

Se recogió la sangre (1,5 ml) de cada animal mediante punción orbital bajo anestesia por éter el día 7 de dosificación. La sangre se recogió en tubos separadores de suero, se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos y entonces el suero se alicuoteó para realizar las determinaciones de calcio. El calcio en suero se determinó mediante ensayo colorimétrico.

Resultados

Niveles de calcio en suero:

Grupo #	Tratamiento	Dosis µg/kg/día	Media de Calcio en Suero (mg/dL)	DE
1	Vehículo	0	9,65	0,25
6	Compuesto	0,5	10,64	0,51
7	Compuesto	1	10,06	0,47
8	Compuesto	1,5	9,92	0,39
9	Compuesto	2	9,77	0,46

Los niveles de calcio en suero para los grupos de dosificación de hasta 2 µg/kg/día de tratamiento con 1,25(OH)₂-16-

en-5,6-trans-D₃ se encontraron dentro del rango normal.

Materiales y métodos

Animales y tratamiento:

5 Ratas hembra adultas de tres meses de edad fueron sometidas a una ovariectomía bilateral o cirugía de control. Tras una semana de aclimatación, los animales se agruparon por peso y se trataron mediante alimentación forzada de 1 mg/kg de la concentración especificada. El volumen de la dosis se calculó semanalmente mediante el grupo de peso corporal medio. La dosis se inicio 17 días después de la 10 cirugía y se continuó durante 19 días. En el día 20, los animales se sacrificaron mediante inhalación de dióxido de carbono y se les escindió los fémures izquierdos.

Calcio óseo femoral total:

15 En la necropsia se escindieron los fémures izquierdos de todos los grupos y se eliminó el tejido blando. Los huesos se midieron y se cortaron por la mitad por la diáfisis; entonces la porción distal se cortó longitudinalmente por la mitad tras eliminar la epífisis. La médula ósea se limpió y el calcio se extrajo mediante inmersión en TCA al 5%. 20 El contenido de calcio de los extractos de TXA se determinó mediante una determinación colorimétrica y cuantitativa de calcio. Los datos se expresaron como media del calcio en hueso total en mg/mitad distal del fémur (DHF) $\pm$ suero.

25 Recogida y determinación del suero:

Se recogió la sangre (1,5 ml) de cada animal mediante punción orbital bajo anestesia por éter el día 7 y día 18 tras la dosificación. La sangre se recogió en tubos separa-

dores de suero, se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos y entonces el suero se alicuoteó para realizar las determinaciones de calcio. El calcio en suero se determinó mediante ensayo colorimétrico.

5 Estadísticas:

Para obtener una verificación del efecto de la ovariectomía en el calcio óseo, se compararon los grupos falso y vehículo ovx mediante la prueba de la t de Student. Los grupos ovx se compararon mediante el análisis de la varian-
10 za de 1 variable (ANOVA), seguido por Fischer's LSD para comparar cada grupo de tratamiento con el vehículo cuando el efecto global era estadísticamente significativo.

Resultados

Efecto en el calcio del fémur ajustado en relación al peso
15 corporal

20

Tratamiento	Dosis µg/kg	Femur CA/ 100g BW		MES	Valor p vs Ovx
Falso/Veh.	0.000	14.44	±	0.31	0.0001
Ovx/Veh.	0.000	10.58	±	0.33	---
1,25(OH) ₂ D ₃	0.500	11.91	±	0.32	0.0026
1,25(OH) ₂ -16- en -5,6-trans D ₃	2.000	11.49	±	0.26	0.0368

Efecto en los niveles de calcio en suero

Tratamiento	Dosis µg/kg	Calcio en Suero mg/dl		MES	valor p vs Ovx
Falso/Veh.	0.000	10.48	±	0.12	NS
Ovx/Veh.	0.000	10.41	±	0.15	---
1,25(OH) ₂ D ₃	0.500	11.74	±	0.19	0.0001
1,25(OH) ₂ -16- en -5,6-trans D ₃	2.000	9.98	±	0.09	NS

En primer lugar identificamos la actividad beneficiosa de los compuestos de la fórmula I como agentes para el tratamiento de enfermedades relacionadas con las glándulas sebáceas, tal como se ha demostrado con los siguientes ensayos que son conocidos en el campo.

Doscientos µl de 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃ se disolvieron en propilenglicol, se administraron diariamente (5 días por semana) mediante alimentación forzada para obtener Golden Syrian hamsters. Los animales se sacrificaron a las 4 semanas y las orejas se procesaron para su evaluación histológica. El área de las glándulas sebáceas se midió en secciones transversales de la oreja preparadas histológicamente mediante análisis por imagen.

Resultados

Dosis($\mu\text{g/day}$)	% Cambio respecto del control
10	-50
1	-50
0.1	-23
0.01	-5

5

También se examinó la fracción lipídica total de una de las orejas (extracción por solvente orgánico seguida por peso del material lipídico remanente).

Resultados

Dosis ($\mu\text{g/day}$)	% Cambio respecto del control
10	-56
1	-37
0.1	-25
0.01	-26

15

Los compuestos de la fórmula I se pueden administrar oralmente para el tratamiento de cáncer de mama, cáncer de próstata o leucemia a humanos que necesiten dicho tratamiento. Más específicamente, los compuestos de la fórmula I se pueden administrar oralmente a un humano adulto con una dosis que se encuentra dentro del rango de entre 1 y 20 μg por día de dicho tratamiento.

25

Los compuestos de la fórmula I se pueden administrar oralmente, para el tratamiento del crecimiento benigno de

la próstata y de la calvicie a humanos que necesiten dicho tratamiento. Más específicamente, los compuestos de la fórmula I se pueden administrar oralmente a un humano adulto con unas dosis que se encuentran en el rango de entre 1 y 5 20 µg por día de dicho tratamiento.

Los compuestos de la fórmula I se pueden administrar oralmente para el tratamiento de la osteoporosis a humanos, con una dosis de alrededor de 1 a 20 µg por día.

Los compuestos de la fórmula I se pueden administrar 10 tópicamente para el tratamiento de la calvicie en humanos que necesiten dicho tratamiento. Más específicamente, los compuestos de la fórmula I se pueden administrar tópicamente con dosis que se encuentran en el rango de alrededor de 5 a alrededor de 50 µg por gramo de formulación tópica por 15 día, para dicho tratamiento.

Los compuestos de la fórmula I se pueden administrar oralmente, para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con las glándulas sebáceas en humanos, con una dosis de alrededor de 1 a 20 µg por día.

20 Las formas con dosificación oral que comprenden compuestos de la fórmula I de la invención se pueden incorporar en cápsulas, comprimidos y similares con materiales de vehículos farmacéuticamente aceptables.

De forma ilustrativa, los materiales de vehículos farmacéuticamente 25 aceptables que se pueden incorporar en cápsulas y similares son los siguientes: un agente de unión tal como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; un excipiente tal como fosfato dicálcico; un agente

desintegrador tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algénico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio, un agente edulcorante tal como la sacarosa, lactosa o sacarina; un agente aromatizante tal como la menta, aceite de gualteria o cereza. Otros materiales pueden estar presentes en forma de cubierta o para modificar de otra manera la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos pueden estar recubiertos con laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propil paraben como conservantes, un colorante y un aromatizante tal como aroma de cereza o de naranja.

Las formas de dosificación tópicas que comprenden compuestos de la fórmula I de la invención incluyen: pomadas y cremas que comprenden las formulaciones con bases del tipo emulsión, solubles en agua, absorbibles y oleaginosas tales como petrolado, lanolina, polietilen glicoles y similares.

Las lociones son preparaciones líquidas, que varían desde soluciones simples a preparaciones acuosas o hidroalcohólicas que contienen sustancias finamente divididas. Las lociones pueden contener agentes en suspensión o en dispersión, por ejemplo, derivados de celulosa tales como etil celulosa, metil celulosa y similares; gelatina o gomas, que incorporan el ingrediente activo en un vehículo formado por agua, alcohol, glicerina y similares.

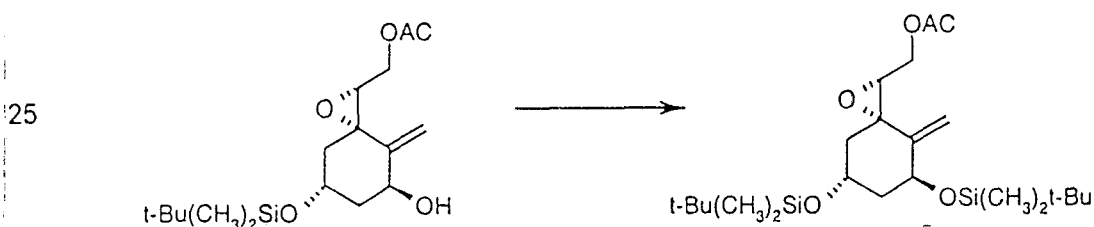
Los geles y las preparaciones semi-sólidas se preparan mediante la gelificación de una solución o suspensión del ingrediente activo en un vehículo transportador. Los vehí-

culos, que pueden estar hidratados o deshidratados, se gelifican mediante un agente gelificante, tal como carboxi polimetileno y se neutralizan para obtener una consistencia característica del gel mediante el uso de álcalis tales como hidróxido de sodio y aminas, tales como polietilencocamina.

Como se emplea aquí, el término "tópico" denota el uso del ingrediente activo, incorporado en un vehículo farmacéuticamente adecuado y aplicado en la zona de inflamación para que se produzca la acción local. Según esto, las composiciones tópicas incluyen aquellas formas farmacéuticas en las que el compuesto se aplica externamente mediante el contacto directo con la piel. Las formas de dosificación comprenden geles, cremas, lociones, pomadas, polvos, aerosoles y otras formas convencionales de aplicación de la medicación sobre la piel, obtenidas por la mezcla de los compuestos de fórmula I con materiales de transporte tópico farmacéuticamente conocidos.

Los siguientes Ejemplos se proporcionan para describir la invención y no pretenden limitarla de ninguna forma.

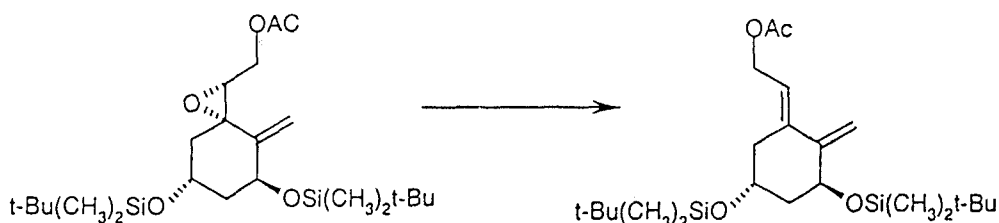
Ejemplo 1



(2R,3S,5S,7S)-2-[5,7-Bis[(1,1-dimetiletil)dimetilsilil]oxi]-4-metilen-1-oxaspiro[2,5]octano-2-metanol acetato

A una solución agitada magnéticamente de 18,5 g (0,0523 moles) de (2R,3R,5S,7S)-5-hidroxi-4-metilen-7[(1,1,-dimetiletil)dimetilsililoxi]-1-oxaspiro[2,5]octano-2-metanol acetato (Y.Kiegiel, P.M. Wovkulich and M.R. Uskovic, Tetrahedron Letters, 32, pgs. 6057-6060 (1991)) y 6,8 g (0,099 moles) de imidazol en 50 ml de dimetilformamida bajo una atmósfera de argón, se añadieron 9,8 g (0,065 moles) de cloruro de t-butildimetilsililo. La mezcla de reacción se agitó durante 5 horas, se particionó con 5 ml de agua, se agitó durante 30 minutos y se depositó en 400 ml de agua. Entonces se extrajo con 2 x 500 ml de hexano y 2 x 500 ml de éter. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con 300 ml de agua, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron. La cromatografía en una columna de gel de sílice dio 22,31 g (92 %) del compuesto del título en forma de aceite incoloro.

Ejemplo 2

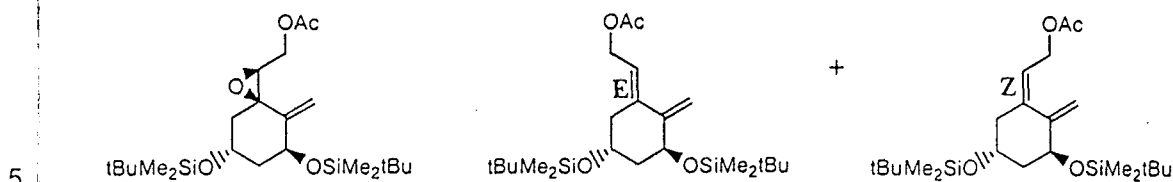


Acetato de [3S-(1E,3β,5α)]-2-[3,5-Bis[(1,1-dimetiletil)dimetilsilil]oxi]-2-metilenciclohexiliden]etanol

Un recipiente de 3 litros con 3 aperturas provisto de válvula de argón, agitador mecánico y termómetro se rellenó

con 500 ml de tetrahidrofurano y se enfrió a -60°C en un baño de acetona en hielo seco. La adición con respecto a las porciones de 43,23 g (0,108 moles) de hexacloruro de tungsteno anhidro se llevó a cabo mientras se mantenía la temperatura a -60°C , y entonces la rápida adición gota a gota de 200 ml de n-butil-litio 1,6 M en hexano mantuvo la temperatura por debajo de -45°C (aproximadamente 5 minutos). El baño de acetona en hielo seco se sustituyó por un baño de agua-hielo, permitiendo alcanzar una temperatura de 5°C . Se produjeron cambios de color del azul al caqui y al negro rojizo. Tras 30 minutos a 5°C , se añadió rápidamente gota a gota una solución de 22,31 g (0,04884 moles) de acetato de (2R,3S,5S,7S)-2-[5,7-bis[(1,1-dimetil-etil)dimetilsilil]oxil]-4-metilen-1-oxaspiro[2,5]octano-2-metanol en 50 ml de hexano durante 3 minutos. Tras 4 horas, la mezcla de reacción se diluyó con 2 litros de hexano, se filtró a través de un depósito de gel de sílice, el cual se lavó con 3 x 500 ml de hexano-etilacetato 9:1 y se evaporó. El residuo se sometió a cromatografía mediante una columna de gel de sílice de 75 g para dar 22,56 g de producto crudo. La cromatografía mediante una columna de gel de sílice de presión media y la elución con una mezcla de diclorometano-acetato de etilo 100:1 proporcionó 17,42 g (80,1%) del compuesto del título y una pequeña cantidad del correspondiente epímero 1Z.

Ejemplo 3



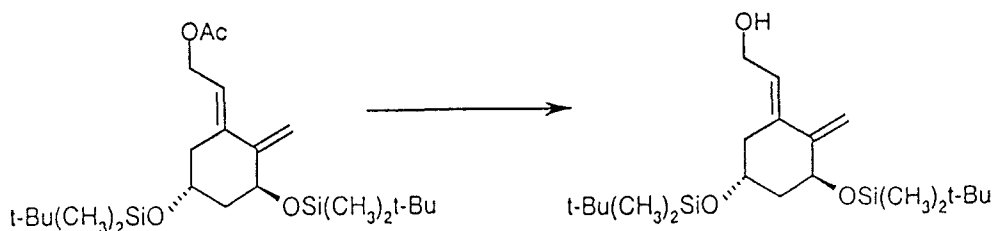
Acetato de [3S-(1E,3β,5α)]-2-[3,5-Bis[[(1,1-dimetiletil)di-
metilsilil]oxi]-2-metilenciclohexiliden]etanol (E-dieno) y
Acetato de [3S-(1Z,3β,5α)]-2-[3,5-Bis[[(1,1-dimetiletil)di-
10 metilsilil]oxi]-2-metilenciclohexiliden]etanol (Z-dieno)

A 465 ml de THF anhidro a -78°C se añadió, bajo agita-
ción, 64,3 g (160 mmoles) de WCl₆ (solución azul), seguido
por la adición de 337,5 ml de n-BuLi 1,43 M en hexano (a
tal velocidad que la temperatura interna no subió por enci-
15 ma de los -20 °C). Entonces la mezcla se dejó calentando a
temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una solución de
24,5 g (53,6 mmoles) de (2R,3S,5S,7S)-2-[5,7-bis[(1,1-
dimetil-etil)dime-tilsilil]oxi]-4-metilen-1-oxaspiro[2,5]-
octano-2-metanol en 65 ml de THF y la mezcla se agitó du-
20 rante 4 h. La mezcla se diluyó con 600 ml de pentano y se
filtró a través de un lecho de 4 cm de gel de sílice, se
lavó con hexano/EtOAc (19:1) para dar, tras la evaporación
de los agentes volátiles bajo presión reducida, 27 g de
mezcla de dieno crudo. Otra purificación mediante cromato-
25 grafía eluída con hexano/EtOAc (25:1) dio 21,6 g (91%) de
una mezcla de dienos Z/E 2:3 (compuestos del título), los
cuales se pueden separar mediante cromatografía en gel de
sílice (hexano/EtOAc 40:1).

Z-dieno ^1H RMN δ 0,052 (s, 6H), 0,06 (s, 6H), 0,87 (s, 9H), 0,89 (s, 9H), 1,74-1,90 (m, 2H), 2,04 (s, 3H), 2,20 (dd, $J=6,0, 12,8$ Hz, 1H), 2,41 (d, $J= 11,1$ Hz, 1H), 4,19 (m, 1H), 4,42 (m, 1H), 4,61 (dd, $J= 7,3, 12,1$ Hz, 1H), 4,68 (dd, $J= 7,3, 12,1$ Hz, 1H), 4,80 (s, 1H), 5,20 (s, 1H), 5,47 (t, $J= 7,2$ Hz, 1H). $[\alpha]_D^{25} = +1,2^\circ$ ($c= 0,4$, EtOH). Anal. Calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{Si}_2$: C, 62,27; H, 10,01; Hallado: C, 62,55, H, 10,33.

E-dieno ^1H RMN δ 0,046 (s, 3H), 0,057 (s, 3H), 0,065 (s, 6H), 0,88 (s, 9H), 0,89 (s, 9H), 1,77 (ddd, $J= 3,1, 9,4, 11,9$ Hz, 1H), 1,89 (m, 1H), 2,09 (s, 3H), 2,31 (dd, $J= 2,0, 15,2$ Hz, 1H), 4,21 (br s, 1H), 4,50 (m, 1H), 4,58 (dd, $J= 7,2, 12,9$ Hz, 1H), 4,65 (dd, $J= 7,2, 12,9$ Hz, 1H), 4,95 (s, 1H), 4,99 (s, 1H), 5,69 (t, $J=7,2$ Hz, 1H). $[\alpha]_D^{25} = +8,0^\circ$ ($c= 0,5$, EtOH). Anal. Calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{Si}_2$: C, 62,27; H, 10,06; Hallado: C, 62,42, H, 10,01.

Ejemplo 4



Acetato de [3S-(1E,3 β ,5 α)]-2-[3,5-Bis[[1,1-dimetiletil)dimetilsilil]oxi]-2-metilenciclohexiliden]etanol

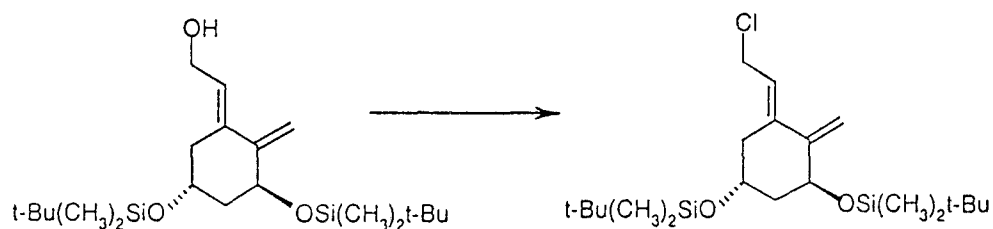
A una solución agitada magnéticamente de 10,84 g (0,0246 moles) de acetato de [3S-(1E,3 β ,5 α)]-2-[3,5-bis[[1,1-dimetiletil)dimetilsilil]oxi]-2-metilenciclohe-

xiliden]etanol en 100 ml de metanol bajo una atmósfera de argón, se añadió 3,5 g de perlas de hidróxido sódico y la mezcla de reacción se agitó bajo argón durante 3 horas. Entonces se evaporó bajo presión reducida hasta obtener un volumen de 50 ml, se diluyó con 500 ml de agua, se extrajo con 2 x 500 ml de hexano:éter. La capa orgánica (100%) del compuesto del título se lavó con agua, se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó. Resultaron 9,80 g (100%) del compuesto del título en forma de sólido de color blanco.

10

Ejemplo 5

15



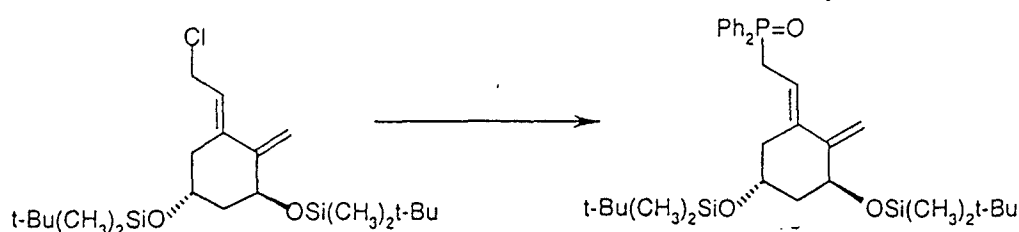
1R-(1 α , 3 β , 5E)-[[(-2-Chloroetiliden)-4-metilen-1,3-ciclo-hexanediil]bis(oxi)]bis(1,1-dimetiletil)dimetilsilano

A una solución agitada de 6,67 g (0,050 moles) de N-clorosuccinimida en 150 ml de diclorometano bajo una atmósfera de argón enfriada a 2 °C en un baño de hielo-acetona, se le añadió gota a gota durante 2 minutos 4 ml (0,055 moles) de dimetilsulfuro. Se formó un precipitado de color blanco. Tras 30 minutos a 0°C, el baño se sustituyó por un baño de acetona en hielo seco y la temperatura de la mezcla de reacción se ajustó a -20 °C. Se añadió una solución de 9,8 g (0,0246 moles) de [3S-(1E,3 β ,5 α)]-2-[3,5-bis[[[(1,1-dimetiletil)dimetilsilil]oxi]-2-metilen-ciclohexiliden]-

etanol en 60 ml de diclorometano. Tras 15 minutos, el baño enfriado se retiró y la mezcla de reacción se agitó durante 50 minutos y entonces se transfirió a un dispositivo separador que contenía 500 ml de agua. Se extrajo con 2 x 350 ml de hexano. La capa orgánica se lavó con 500 ml de agua, se secó sobre sulfato sódico y se evaporó para dar 10,49 g de producto crudo en forma de líquido de color amarillo. La purificación mediante cromatografía Flash dió el compuesto del título puro en forma de aceite incoloro. RMN (CDCl₃): δ

0,03 (s, 3H), 0,05 (s, 3H), 0,07 (s, 6H), 0,87 (s, 9H), 0,89 (s, 9H), 1,70 - 1,94 (m, 2H), 2,34 (m, 2H), 4,13 (m, 2H), 4,28 (m, 1H), 4,53 (m, 1H), 5,00 (m, 1H), 5,03 (m, 1H), 5,78 (tm, J= 8Hz, 1H).

Ejemplo 6



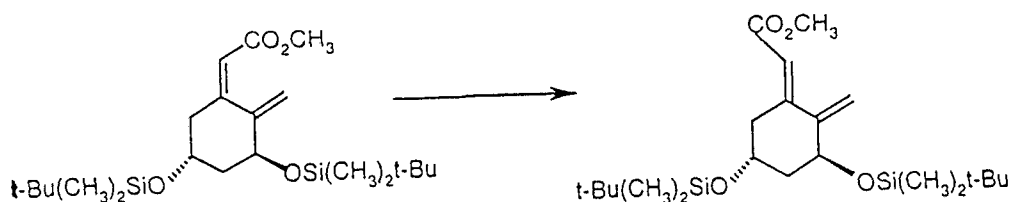
Óxido de [3S-(1E,3β,5α)]-2-[3,5-Bis[[(dimetiletil)dimetilsilil]oxi]-2-metilen-ciclohexiliden]-etil]difenilfosfina

Un recipiente de 1 litro con 3 aperturas provisto de válvula de argón, termómetro y agitador mecánico se relleno con una solución de 10,26 g (0,0246 moles) de 1R-(1α, 3β, 5E)-[[(-2-cloroetiliden)-4-metilen-1,3-ciclohexanediil]bis-(oxi)]bis(1,1-dimetiletil)dimetilsilano en 100 ml de tetra-

hidrofurano anhidro recién destilado y se enfrió en un baño

de acetona en hielo seco a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se necesitó la adición de 60 ml de difenilfosfuro potásico en tetrahidrofurano durante 30 minutos para que persistiera un color rojo. Tras la agitación durante 1 hora a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$, se añadió 10 ml de agua y se retiró el baño enfriado. La reacción perdió su color. Entonces se añadieron rápidamente 200 ml de diclorometano seguido por 200 ml de una solución acuosa que contenía 10 ml de peróxido de hidrógeno al 30%. Tras 1 hora, se añadieron 13,5 g de sulfito de sodio, 100 ml de salmuera y 200 ml de diclorometano. Tras su agitación cuidadosa, las fases se separaron y la fase acuosa se lavó con 200 ml de diclorometano. Las fases orgánicas se lavaron con 200 ml de salmuera. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron para dar 16,33 g de producto crudo. Este producto crudo se purificó mediante cromatografía (gel de sílice G-60) de presión media para dar 12,54 g (87%) del compuesto del título en forma de cristales de color blanco. RMN (CDCl_3): δ 0,02 (s, 3H), 0,07 (s, 6H), 0,08 (s, 3H), 0,84 (s, 18H), 1,76 (m, 2H), 2,98 - 3,15 (m, 2H), 4,06 (m, 1H), 4,37 (m, 1H), 4,53 (m, 1H), 4,72 (m, 1H), 4,79 (m, 1H), 7,45 (m, 6H), 7,72 (m, 4H).

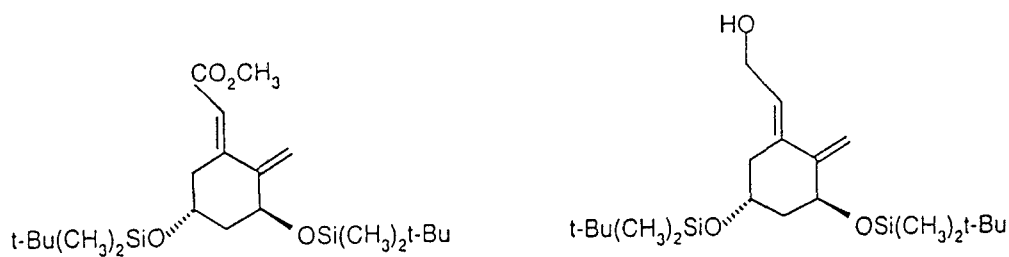
Ejemplo 7



Éster metílico del ácido E-(3S,5R)-[3,5-Bis-(terc-butil-dimetil-silani-loxi)-2-metilenciclohexiliden] acético (Ro 65-8821)

Una solución de 4,45 g (0,01043 moles) de éster metílico del ácido Z-(3S,5R)-[3,5-Bis-(terc-butil-dimetil-silani-loxi)-2-metilen-ciclohexiliden] acético (X) (A. Mowrino, et al., Tetrahedron Letters, 38, pgs. 4713-4716 (1997)) en 10 ml de hexano se irradió con una fuente de UV durante 3 horas. La evaporación dió 4,25 g (95,5%) del compuesto del título en forma de aceite incoloro. RMN (CDCl₃): δ 0,06 (s, 3H), 0,07 (s, 9H), 0,85 (s, 9H), 0,89 (s, 9H), 1,76 (m, 1H), 1,84 (m, 1H), 2,70 (m, 1H), 3,36 (m, 1H), 3,70 (s, 3H), 4,26 (m, 1H), 4,58 (m, 1H), 5,07 (m, 2H), 5,91 (brs, 1H).

Ejemplo 8



[3S-(1E,3β,5α)]-2-[3,5-Bis[[1,1-dimetiletil)di-metilsilil]oxi]-2-metilenciclohexiliden]etanol

A una solución de 4,25 g (0,00996 moles) de éster metílico del ácido E-(3S,5R)-[3,5-bis-(terc-butil-dimetil-silani-loxi)-2-metilenciclohexiliden] acético en 100 ml de tolueno a -78 °C, se añadió gota a gota, 25 ml de hidruro de diisobutilaluminio 1,2M (0,03 moles) y la mezcla de reacción se

agitó durante una hora. Tras la adición de 5 ml de metanol, la mezcla de reacción se dejó atemperando a temperatura ambiente. Entonces se diluyó con 150 ml de tartrato sodio-potasio acuoso 2M y se agitó vigorosamente. La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se evaporó hasta sequedad. El producto crudo se purificó por cromatografía Flash con hexano-acetato de etilo 8:2, dando 2,8 g (70%) del compuesto del título en forma de sólido ceroso incoloro. RMN (CDCl_3): δ 0,05 (s, 3H), 0,07 (s, 9H), 0,88 (s, 9H), 0,91 (s, 9H), 1,74 (m, 1H), 2,06 (m, 1H), 2,26 (dm, $J = 13,6$ Hz, 1H), 2,40 (dd, $J = 13,6, 5,2$, 1H), 4,30-4,11 (m, 3H), 4,53 (m, 1H), 4,98 (m, 1H), 5,00 (m, 1H), 5,80 (tm, $J = 7$ Hz, 1H).

Ejemplo 9

1,25-Dihidroxi-16-en-5,6-trans-colecalciferol

Una solución agitada de 796 mg (0,00137 moles) de óxido de [3S-(1E,3 β ,5 α)]-2-[3,5-bis[(1,1-dimetiletil)dimetilsilil]oxi]-2-metilenciclohexiliden]-etil]difenilfosfina en 10 ml de tetrahidrofurano anhidro a -78°C se trató con 0,83 ml (0,00133 moles) de n-butil litio 1,6 M en hexano, gota a gota, bajo una atmósfera de argón. Para obtener una solución de color rojo se añadió una solución de 280 mg (0,000803 moles) de [3aR-[1(R*),3a α , 7a β]]-1-[1,5-dimetil-5-[(trimetilsilil)oxi]hexil]-3,3a,5,6,7,7a-hexahidro-7a-metil-4H-inden-4-ona en 5 ml de tetrahidrofurano, gota a gota durante un período de 10 minutos bajo una atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a -78°C durante 90 minutos, entonces se particionó por adición de 40 ml de una

sal Rochelle 2N y KHCO_3 , 2N 1:1 y se dejó calentando a temperatura ambiente. Se extrajo con 3 x 100 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas se lavaron 3 x agua/salmuera, se secaron sobre sulfato sódico y se evaporaron hasta sequedad. Este producto crudo se purificó mediante cromatografía Flash en una columna de gel de sílice de 40 mm x 6'' con hexano-acetato de etilo 40:1, dando 278 mg del compuesto del título trisililado y 140 mg de la cetona de partida.

Una solución de 278 mg (0,000389 moles) de este intermediario trisililado en 8 ml de tetrahidrofurano anhidro, se trató con 1,9 (1,9 mmoles) de fluoruro de tetrabutylamonio 1M en tetrahidrofurano bajo una atmósfera de argón durante 17 horas. Se particionó con 6 ml de agua y se agitó durante 30 minutos. Tras la evaporación del tetrahidrofurano al vacío, la solución residual se extrajo con 3 x 100 ml de acetato de etilo. Las capas orgánicas se lavaron 4 x agua/ salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron hasta sequedad. El producto crudo, 192 mg, se purificó mediante cromatografía Flash en una columna de gel de sílice, la cual fue previamente lavada con una solución al 1% de trietilamina: acetato de etilo (300 ml); la elución se llevó a cabo con acetato de etilo. Ésta dió 152 mg del compuesto del título cristalizado. La muestra recristalizada de tetrahidrofurano:metilformato (0,3:7) tenía un p.f. 95-100 °C. $[\alpha]_D^{25} + 160,5^\circ$ (EtOH, $c = 0,20$). λ_{max} 272/3 nm (ϵ 20600).

Ejemplo 10

Cápsula de gelatina blanda

Formulación I

Item	Ingredientes	mg/Cápsula
1	1,25(OH) ₂ -16-en-5,6-trans-D ₃	0,001-0,02
2	Hidroxitolueno butilado (BHT)	0,016
3	Hidroxianisol butilado (BHA)	0,016
4	Migliol 812 c.s.	160,0

Procedimiento de elaboración:

1. Resuspender BHT y BHA en Migliol 812. Calentar a alrededor de 50 °C y agitar hasta conseguir su disolución.
2. Disolver 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃ en la solución del paso 1 a 50 °C.
3. Enfriar la solución del Paso 2 a temperatura ambiente.
4. Rellenar cápsulas de gelatina blanda con la solución del Paso 3.

Nota: Realizar todos los pasos de elaboración bajo una atmósfera de nitrógeno y protección de la luz.

Ejemplo 11

Cápsula de gelatina blanda

Formulación II

Item	Ingredientes	mg/Cápsula
1	1,25(OH) ₂ -16-en-5,6-trans-D ₃	0,001-0,02
2	di-α-Tocoferol	0,016
3	Migliol 812 c.s.	160,0

Procedimiento de elaboración:

1. Resuspender di-α-Tocoferol en Migliol 812. Calentar a alrededor de 50 °C y agitar hasta conseguir su disolución.

2. Disolver 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃ en la solución del paso 1 a 50 °C.

3. Enfriar la solución del Paso 2 a temperatura ambiente.

4. Rellenar cápsulas de gelatina blanda con la solución del

5 Paso 3.

Nota: Realizar todos los pasos de elaboración bajo una atmósfera de nitrógeno y protección de la luz.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

10 <120> Análogos de la Vitamina D3

<130> 20472

<140>

<141>

<150> U.S 60/143413

15 <150> 1999-07-12

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<210> 20

20 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador para hTERT (antisentido)

25 <400> 1

cggaagagtg tctggagcaa

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador para
5 hTERT (antisentido)

<400> 2

ggatgaagcg gagtctgga

<210> 3

<211> 18

10 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador para
GAPDH (sentido)

15 <400> 3

ccatggagaa ggctgggg

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

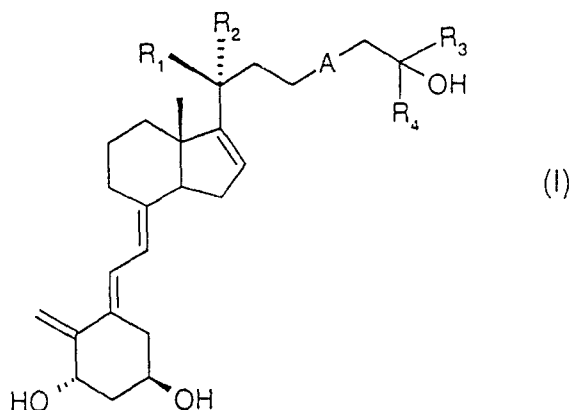
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador para
GAPDH (antisentido)

<400> 4

25 caaagttgtc atggatgacc

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula

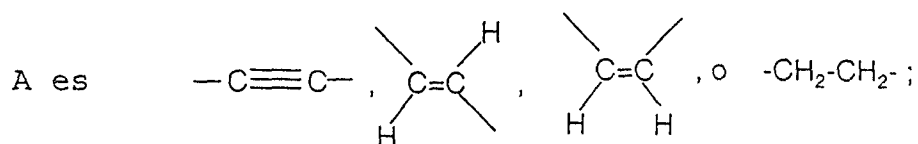


en donde

R_1 es hidrógeno o un grupo alquilo;

R_2 es hidrógeno o un grupo alquilo; ó

R_1 , R_2 y C_{20} conjuntamente son ciclopropilo;



R_3 es alquilo, hidroxí-alquilo o fluoroalquilo; y

R_4 es alquilo, hidroxí-alquilo o fluoroalquilo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde R_1 es hidrógeno y R_2 es alquilo o R_1 es alquilo y R_2 es hidrógeno.

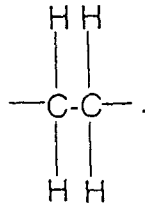
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en donde R_1 es hidrógeno y R_2 es metilo o R_1 es metilo y R_2 es hidrógeno.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en donde R_3 y R_4 son, independientemente, alquilo, hidroxí-alquilo

o trifluoro-alquilo.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, en donde R_3 y R_4 son, independientemente, metilo, hidroximetilo o trifluorometilo.

5 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en donde A es



10 7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, 1,25 dihidroxi-16-en-5,6-trans-colecalciferol.

diferencia isomería cis

EL SUSCRITO JEFE DEL AREA DE
LEGALIZACIONES DE MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES.

HACE CONSTAR

que el señor Gabriel Rueda, se encuentra debidamente
autorizado ante este Ministerio, como traductor e
intérprete oficial para los idiomas INGLES -ESPAÑOL,
ESPAÑOL - INGLES.

Para efectos de esta certificación el interesado presenta
copia autenticada de la certificación del Ministerio de
Justicia acerca de la vigencia de la resolución 932.

Dada en Santafé de Bogotá, D.C., a los diez y nueve días
(19) del mes de diciembre de 1994.

Neibon Sánchez Torres
Jefe Área de Legalizaciones

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTÉNTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.

SANTAFÉ DE BOGOTÁ, 03 SEI. 1998

PABLO MENDEZ DAPILA

COMO NOTARIO SEXTO DE
SANTAFÉ DE BOGOTÁ
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTÉNTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.

SANTAFÉ DE BOGOTÁ, 20 ABR. 1999

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

COMO NOTARIO SEXTO DE
SANTAFÉ DE BOGOTÁ
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTÉNTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.

SANTAFÉ DE BOGOTÁ, 08 MAR. 1999

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTÉNTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.

SANTAFÉ DE BOGOTÁ, 21 AGO. 1998

COMO NOTARIO SEXTO DE
SANTAFÉ DE BOGOTÁ
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTÉNTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.

SANTAFÉ DE BOGOTÁ, 05 ENE. 1999

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DEL CÍRCULO
DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR
QUE ESTA COPIA FOTOSTÁTICA COINCIDE CON LA ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA.

01 JUL 1998

COMO NOTARIO SEXTO DE
SANTAFÉ DE BOGOTÁ
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTÉNTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.

SANTAFÉ DE BOGOTÁ, 23 NOV. 1998

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

República de Colombia



Ministerio de Justicia y del Derecho

EL SECRETARIO GENERAL DEL MINISTERIO DE
JUSTICIA Y DEL DERECHO

CERTIFICA:

Por Resolución 5996 del 29 de noviembre de 1982, le fue expedida
licencia para ejercer funciones de Traductor e Intérprete Oficial en los
Idiomas INGLÉS-ESPAÑOL, ESPAÑOL-INGLÉS a GABRIEL RUEDA
CHADID, identificado con la cédula de ciudadanía No. 17.124.145
expedida en Bogotá. Que dicha resolución se encuentra vigente en la
fecha.

A solicitud del interesado, en Santafé de Bogotá D.C., a los 17 días
mes de noviembre de 1994.

JORGE LOIS SARRACAL SARRACAL

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
SANTAFE DE BOGOTA

PAOLO MENUEZ BARAJAS

COMO NOTARIO SEXTO DE
SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
SANTAFE DE BOGOTA

20 ABR. 1999

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

COMO NOTARIO SEXTO DE
SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
SANTAFE DE BOGOTA

08 MAR. 1999

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR

QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
SANTAFE DE BOGOTA

17 AGO. 1998

COMO NOTARIO SEXTO DE
SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR

QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
SANTAFE DE BOGOTA

23 NOV. 1998

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR

QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
SANTAFE DE BOGOTA

06 ENE. 1999

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

PAOLO MENUEZ BARAJAS
NOTARIO

13 SET. 1998

47
44

TRIBUNAL SUPERIOR DEL DISTRITO JUDICIAL DE SANTAFE DE BOGOTA
SECRETARIA GENERAL

COMO NOTARIO SEXTO DE
SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.
SANTAFE DE BOGOTA
20 ABR 1999
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

LA SUSCRITA SECRETARIA DEL H. TRIBUNAL SUPERIOR DEL DISTRITO JUDICIAL
DE SANTAFE DE BOGOTA,

CERTIFICA:

COMO NOTARIO SEXTO DE
SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.
SANTAFE DE BOGOTA
08 MAR 1999
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

que el Acuerdo No. 183 de diciembre 3 de 1982 emanado de esta Corporación, por medio del cual dió posesión al señor GABRIEL RUEDA CHADID, identificado con Cédula de Ciudadanía número 17.124.145 de Bogotá, como TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL de los idiomas INGLES-ESPAÑOL, ESPAÑOL-INGLES, en virtud de la Resolución No. 5996, se acuerda VIGENTE.

21 AGO. 1998

Se expide en Santafé de Bogotá D.C., a dieciseis (16) de noviembre de mil novecientos noventa y cuatro (1994).

MARIA INES RODRIGUEZ TORRES
SECRETARIA

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.
SANTAFE DE BOGOTA
08 SEP 1998
PABLO MENDEZ BARRAN

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.
SANTAFE DE BOGOTA
06 ENY 1999

01 JUL 1998

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO
DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR
QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON LA FOTOCOPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.
SANTAFE DE BOGOTA

23 NOV. 1998
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

F. Hoffmann La Roche AG. C-20.472

REF: LLC-061-2000. La presente es Traducción Oficial de un documento presentado originalmente en inglés. Esta traducción es elaborada por Gabriel Rueda Chadid (Traductor Oficial).

PA 234428

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

A TODOS LOS QUE TUVIEREN LA OPORTUNIDAD DE LEER EL CONTENIDO
DEL PRESENTE DOCUMENTO:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos

Abril 13 del 2000

Se certifica que anexo se encuentra fiel copia de los Registros de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos correspondientes a los documentos de la patente solicitada y cuya identificación aparece más adelante, la cual cumplió con los requerimientos exigidos para que se otorgue una fecha de presentación de acuerdo con los dispuesto en la Sección 35 USC 111.

Número de Solicitud: 60/143.413
Fecha de presentación: Julio 12 de 1999

Por autorización del

COMISIONADO DE MARCAS REGISTRADAS Y PATENTES

P. SWAIN

Funcionario Encargado de Certificaciones

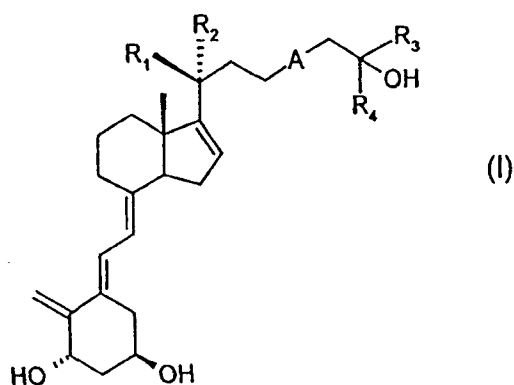
(Hay firma y sello)

GR
GABRIEL RUEDA CHADID
TRADUCTOR OFICIAL
Resolución 5996 de Nov. 29/82
Ministerio de Justicia

40
46

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la formula

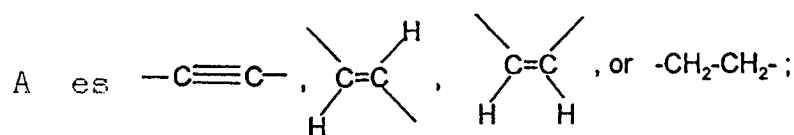


donde

R₁ es hidrógeno o un grupo alquilo;

R₂ es hidrógeno o un grupo alquilo; o

R₁, R₂ y C₂₀ conjuntamente son ciclopropilo;



R₃ es alquilo, hidroxialquilo o fluoroalquilo; y

R₄ es un alquilo, hidroxialquilo o fluoroalquilo.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 donde R₁ es hidrógeno y R₂ es alquilo, o R₁ es alquilo y R₂ es hidrógeno.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 donde R₁ es hidrógeno y R₂ es metilo, o R₁ es metilo y R₂ es hidrógeno.

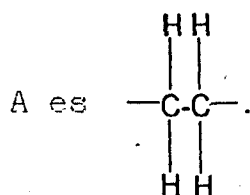
50
47

3

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3 donde R₃ y R₄ son independientemente alquilo, hidroxí alquilo o trifluoro-alquilo.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4 donde R₃ y R₄ son independientemente metilo, hidroxí-metilo o trifluoro-metilo.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 donde



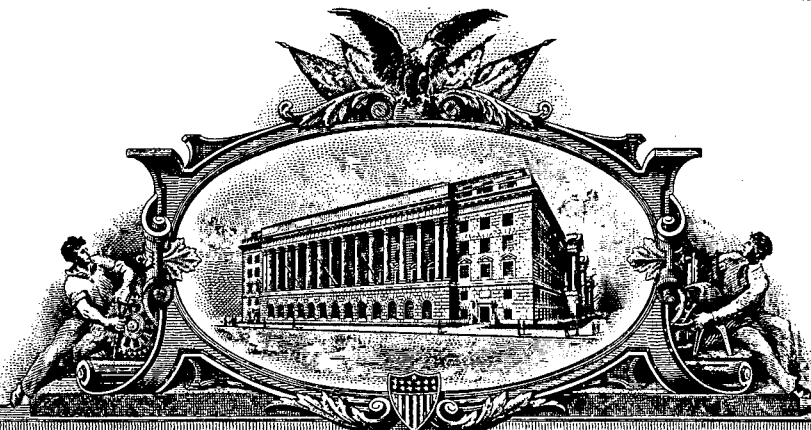
7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6, 1,25-dihidroxí-16-eno-5,6-trans colecalciferol.

La anterior es Traducción Oficial de un documento presentado originalmente en inglés. Esta traducción fue realizada por GABRIEL RUEDA CHADID (Traductor Oficial). Resolución 5996 del Minjusticia, por lo cual estampo mi Sello y Firmo.

Santafé de Bogotá D.C., Junio 27 del 2000.

[Firma]
GABRIEL RUEDA CHADID
TRADUCTOR OFICIAL
Resolución 5996 de Nov. 29/82
Ministerio de Justicia

PA 234428

**THE UNITED STATES OF AMERICA****TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:****UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE****United States Patent and Trademark Office****April 13, 2000**

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

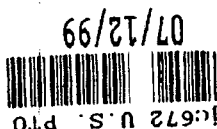
APPLICATION NUMBER: 60/143,413

FILING DATE: July 12, 1999



**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**

**P. SWAIN
Certifying Officer**

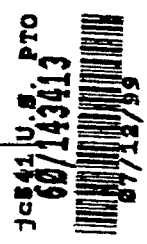


CERTIFICATION UNDER 37 CFR 1.10

52
A/PROV + Box Seq 49

I hereby certify that this New Application Transmittal and the documents referred to as enclosed therein are being deposited with the United States Postal Service on this date July 12, 1999 in an envelope as "Express Mail Post Office to Addressee" Mailing Label Number EL275412080US addressed to the: Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Michelle Williams
(Print Name)
Michelle Williams
(Signature)



PROVISIONAL APPLICATION COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION under 37 CFR 1.53(b)(2).

Docket No. 1092P

INVENTOR(s)/APPLICANT(s)

Name: Batcho, Andrew, David
Residence: Essex County, North Caldwell, New Jersey
Citizenship: U.S.A.
Post Office Address: 19 White Oak Drive, North Caldwell, New Jersey 07006

Name: Hennessy, Bernard, Michael
Residence: Essex County, Nutley, New Jersey
Citizenship: U.S.A.
Post Office Address: 111 Passaic Avenue, Nutley, New Jersey 07110

Name: Uskokovic, Milan, Radoje
Residence: Essex County, Upper Montclair, New Jersey
Citizenship: U.S.A.
Post Office Address: 253 Highland Avenue, Upper Montclair, New Jersey 07043

TITLE OF THE INVENTION

VITAMIN D₃ ANALOGS

CORRESPONDENCE ADDRESS

George W. Johnston
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110

ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)

- | | | | |
|--|------------------------|---|--------------------------------|
| ☒ Specification | No. of Pages <u>27</u> | ☒ Declaration | No. of Pages <u>3</u> |
| ☒ Claims | No. of Claims <u>7</u> | ☐ Drawings | Sheets of Drawings <u> </u> |
| ☒ Sequence Listing | No. of Pages <u>2</u> | ☐ Other | <u> </u> |

DEPOSIT ACCOUNT
NO. 08-2525
OUR ORDER NO. 2630

53
50

METHOD OF PAYMENT

☒ The Commissioner is hereby authorized to charge any fees or credit any overpayment to Deposit Account Number: 08-2525

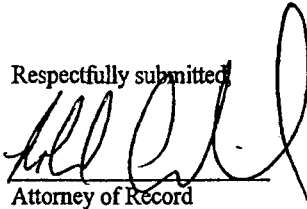
Provisional
Filing Fee
Amount \$150.00

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

☒ No

☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____

Respectfully submitted


Attorney of Record

Robert A. Silverman

(Reg. No. 35682)

Telephone: (973) 235-2863

Telefax: (973) 235-2363

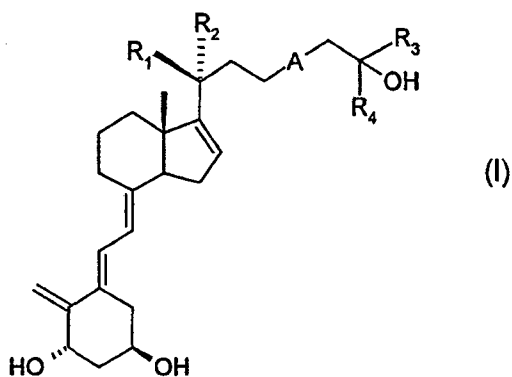
July 12, 1999

84622

VITAMIN D₃ ANALOGS

Summary of the Invention

The invention relates to a compound of the formula

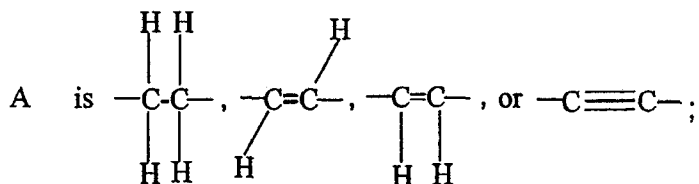


wherein

R₁ is hydrogen or an alkyl group;

R₂ is hydrogen or an alkyl group; or

R₁, R₂ and C₂₀ together are cyclopropyl;



R₃ is alkyl, hydroxy-alkyl or fluoroalkyl; and

R₄ is alkyl, hydroxy-alkyl or fluoroalkyl.

It has been found that the compounds of formula I induce inhibition of proliferation in prostate, breast and myeloid leukemic cancer cell lines. Accordingly, the

5 compounds of formula I are useful as agents for the treatment of prostate cancer, breast cancer, and for the treatment of leukemia.

It has also been found that the compounds of formula I have antiandrogenic activity. Accordingly, the compounds of formula I are useful for treating benign
10 prostate growth, baldness and cancer of the prostate.

It has also been found that the compounds of formula I have activity making them useful for the treatment of sebaceous gland diseases such as acne or seborreic dermatitis.

15 It has also been found that the compounds of formula I have activity making the compounds useful for treating osteoporosis.

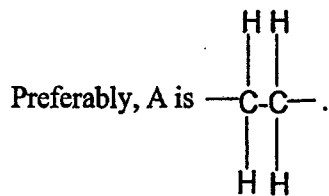
Detailed Description of the Invention

20 As used herein, the term "alkyl group" denotes a straight or branched chain alkyl group having from 1-4 carbon atoms, for example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, t-butyl and the like. The term "hydroxy-alkyl" denotes an alkyl group having a hydroxy substituent on any of the carbon atoms of the alkyl group. The term "fluoro-alkyl" denotes an alkyl group having one, two or three fluorine atoms substituted on any of the
25 carbon atoms of the alkyl group.

In the formulas presented herein, the various substituents are illustrated as joined to the nucleus by one of the following notations: a wedged solid line (—) indicating a substituent which is above the plane of the molecule; and a wedged dotted line
30 (·····) indicating a substituent which is below the plane of the molecule.

Preferably, R_1 is hydrogen and R_2 is alkyl, or R_1 is alkyl and R_2 is hydrogen. More preferably, R_1 is hydrogen and R_2 is methyl or R_1 is methyl and R_2 is hydrogen.

- 5 Preferably, R₃ and R₄ are, independently, alkyl, hydroxy-alkyl or trifluoro-alkyl.
More preferably, R₃ and R₄ are, independently, methyl, hydroxy-methyl or trifluoro-methyl.

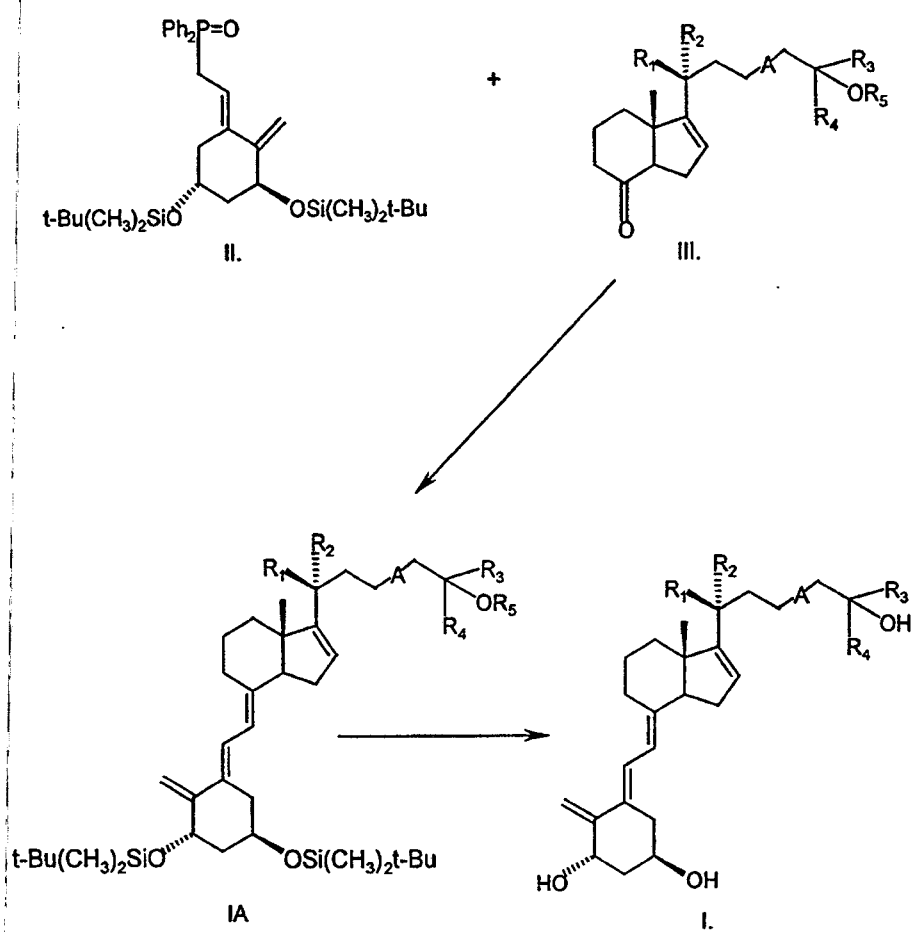


- 10 The most preferred compound of formula I is 1,25-dihydroxy-16-ene-5,6-trans-cholecalciferol.

- 15 The compounds of formula I are prepared as hereafter described, with particular reference to the Formula Scheme below.

57
54

Formula Scheme



R_5 is hydrogen or trimethylsilyl.

5

10

5

In the above Formula Scheme, wherein Ph is phenyl, the compound of formula II, which is the compound [3S-(1E,3 β ,5 α)-2-[3,5-bis(dimethylethyl)dimethylsilyl]oxy]-2-methylene-cyclohexylidene]ethyl] diphenylphosphine oxide, is converted to a compound of formula IA by reaction with a compound of formula III.

10

The reaction is carried out at -60°C to -90°C, in a polar aprotic, organic solvent, such as dry ether or more preferably dry tetrahydrofuran, in the presence of a strong base such as an alkyl lithium like butyl lithium.

15

The protecting groups of compounds of formula IA are removed by reaction with a fluoride salt, such as tetrabutyl-ammonium fluoride in a polar, organic solvent such as ether, or more preferably tetrahydrofuran, to yield the corresponding compound of formula I.

20

The compound of formula II is prepared as hereinafter described in Examples 1-6, or alternatively, as described in Examples 7-8.

Compounds of formula III are known (for example, in U.S. Patent No. 5,087,619) or can be prepared according to known methods.

25

The useful activity of compounds of formula I as agents for the treatment of prostate cancer, breast cancer, and for the treatment of leukemia can be demonstrated by the following test processes which are known in the art.

30

Materials selected for use herein and procedures employed were as follows:

Cell lines. The breast cancer cell line (MCF-7), prostate cancer cell line (LNCaP) and myeloid leukemia cell line (HL-60) were maintained as follows: MCF-7 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) with 10% fetal calf serum

59
56

5 (FCS); LNCaP and HL-60 were cultured in RPMI1640 with 10% FCS; All three cell lines were maintained in a 37°C incubator containing 5% CO₂.

Vitamin D₃ Compounds. The vitamin D₃ compounds were dissolved in absolute ethanol at 10⁻³ M as stock solution, which were stored at -20°C and protected from light.
10 For *in vitro* use, compounds were diluted in DMEM or RPMI medium. For *in vivo* use, compounds were diluted with phosphate buffered saline (PBS). An aliquot was used only once and LNCaP cells were trypsinized. Washed single-cell suspensions of cells were enumerated and plated into 24-well flat-bottomed plates with a total of 1 X 10⁻³ cells/well in a volume of 400 µl/well. The feeder layer was prepared with agar that had been
15 equilibrated at 42°C. Prior to this step, compounds were pipetted into wells. After incubation, the colonies were counted. All experiments were done at least three times using triplicate plates per experimental point.

Serum Calcium Levels *in vivo*. Twenty-eight male Balb/c mice at 8 to 9 weeks
20 of age were maintained in pathogen-free conditions and fed a standard laboratory diet. Four mice per group were injected intraperitoneally every other day (except Saturday and Sunday) with either vitamin D₃ compound or diluant (100 µl/mouse) for 3 weeks. Doses of 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ were: 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 µg. Doses of 1,25(OH)₂D₃ were 0.1 µg/mouse. Control mice were injected with 100 µl of PBS. Serum calcium
25 values were measured every week by the quantitative, colorimetric detection assay.

Pulse-Exposure Experiments. The MCF-7 cells were incubated in liquid culture with 10⁻⁷ of 1,25(OH)₂D₃ or 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ for various durations. After incubation, these cells were carefully washed twice with PBS and viable cells were
30 counted and plated into 24-well plates for soft agar colony assay, as previously described.

Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. Cell cycle analysis was performed on MCF-7 cells incubated for 4 days with either 1,25(OH)₂D₃ or 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ at 10⁻⁷ M. The cells were fixed in chilled methanol overnight before staining
35 with 50 µg/ml propidium iodide, 1 mg/ml Rnase (100 units/ml) and 0.1% NP40. Analysis

5 was performed immediately after staining. All experiments were done at least three times independently. All data were statistically analyzed by Student's test.

Western Blot Analysis. Cells were washed twice with PBS, suspended in Lysis buffer (50 mM Tris Ph 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP40, 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin and 10 µg/ml leupeptin), and placed on ice for 30 minutes. After centrifugation at 15,000 g for 20 minutes at 4°C, the supernatant was collected. Protein concentrations were quantitated. Whole lysates (15 µg) were resolved by 15% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel, were transferred to an immobilon polyvinylidene difuride membrane and were probed with anti-p27^{kip1} rabbit polyclonal antibody and anti-Actin murine monoclonal antibody. Blots were developed.

Telomerase Activity. To detect the relative telomerase activity, telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assays were performed. For human telomerase reverse transcriptase (hTERT), total RNAs were isolated from HL-cells which were treated with either 1,25(OH)₂D₃ or 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ (10⁻⁹ 10⁻⁸, and 10⁻⁷ M) for 4 days with a monophasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate. RT-PCR was performed with 1 µg of total RNA and random hexamer primers. cDNA was amplified using primers specific for the hTERT gene or the GAPDH gene, which was used as a control. The primers used for hTERT were: 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3' (sense) (SEQ ID NO: 1), and 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3' (antisense) (SEQ ID NO: 2). The thermal cycles were 94°C for 90 seconds, followed by 33 cycles of 95°C for 20 seconds, 68°C for 40 seconds, and 72°C for 30 seconds. Primers for the GAPDH gene were: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3' (sense) (SEQ ID NO: 3), and 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3' (antisense) (SEQ ID NO: 4). Conditions for GAPDH amplifications were: 94°C for 2 minutes, 26 cycles of 94°C for 30 seconds, 62°C for 40 seconds, 72°C for 60 seconds, followed by 72°C for 4 minutes. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gel and stained with ethidium bromide.

61
58

5 **Effect of Vitamin D₃ analogs on Clonogenic Assay.** LNCaP cells, MCF-7 cells and HL-60 cells were cloned in soft agar in the presence of vitamin D₃ analogs at 10⁻¹¹ to 10⁻⁷ M. Dose-response curves were drawn and the effective dose that inhibited 50% colony formation (ED₅₀) was determined. 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans D₃ was effective in inhibition of clonal proliferation of the three cell lines in a dose-dependent manner.

10 The ED₅₀ of 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ was 1.4 X 10⁻⁹ M for LNCaP cells, 4.3 X 10⁻⁹ M for MCF-7 cells, and 3.0 X 10⁻¹¹ M for HL-60 cells, which was about 10-100 fold more potent than 1,25(OH)₂D₃.

15 **Serum Calcium Levels *in vivo*.** Because hypercalcemia is a major toxicity of vitamin D₃ compounds, the calcemic effects of 1,25(OH)₂D₃ were compared with 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃. All mice survived at 3 weeks of study. The mice that received 0.1 µg of 1,25(OH)₂D₃ were all hypercalcemic with serum calcium levels of approximately 12 mg/dl (normal 8.5-10.5 mg/dl). In contrast, mice that received 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ (0.1 – 2.0 µg/mouse) had almost the same calcium level
20 (8-10 mg/dl) as the control mice (8-9 mg/dl).

25 **Pulse-Exposure Experiments.** To investigate whether the inhibition of clonogenic proliferation by vitamin D₃ analogs was reversible, pulse-exposure experiments were performed. The MCF-7 cells were exposed to either 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ or 1,25(OH)₂D₃ for various durations, washed thoroughly, plated in soft agar, and colony numbers were enumerated on day 14 of culture. Approximately forty and thirty percent of the clonogenic cells were inhibited by 4 days of exposure to 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ and 1,25(OH)₂D₃, respectively.

30 **Cell cycle Analysis.** Effect of 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ and 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷, 4 days) on the cell cycle of the MCF-7 cells was determined. A significant increase ($P \leq 0.05$) in the number of cells in the G₀-G₁ phase of the cell cycle occurred with a concomitant decrease in the proportion of cells in S phase.

Western Blot Analysis. The cyclin dependent kinase inhibitors known as p21^{waf1} and p27^{kip1} are able to inhibit the activity of cyclin kinase and thus slow the progression for the cells through the cell cycle. The control MCF-7 cells constitutively had a moderate level of expression of p21^{waf1} and p27^{kip1}, as determined by Western blot analysis. Exposure for one day to 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ (10⁻⁷ M) increased expression of p21^{waf1} and p27^{kip1} by about 3.2-3.5 fold, whereas culture with 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) increased expression of p21^{waf1} and p27^{kip1} about 1.6-1.8 fold. Exposure of MCF-7 cells to 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ (10⁻⁷ M) for 3 days resulted in a 2.8-fold and 3.4-fold increase in expression of p21^{waf1} and p27^{kip1}, respectively. 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M, 3 days) increased expression of p21^{waf1} and p27^{kip1} by 4.8 fold and 3.3 fold, respectively.

The dose-dependent effect of the vitamin D₃ compounds on expression of p27^{kip1} HL-60 cells was examined. Both 1,25(OH)₂D₃ and 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ up-regulated expression of p27^{kip1} expression, and these levels markedly increased after incubation with 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ (4 days, 10⁻⁹ M). Levels of p27^{kip1} increased prominently when the HL-60 cells were cultured with 10⁻⁸ – 10⁻⁷ M of 1,25(OH)₂D₃.

Telomerase Activity. The effect of 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ and 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁹ – 10⁻⁷ M, 4 days) on telomerase activity was evaluated using the TRAP assay. Telomerase activity markedly decreased in HL-60 cells cultured with either 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ 10⁻⁹ M or 10⁻⁷ M, 1,25(OH)₂D₃.

The effects of vitamin D₃ analogs on hTERT expression in HL-60 cells was evaluated using RT-PCR. Both 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ and 1,25(OH)₂D₃ inhibited the expression of hTERT mRNA in a dose-dependent manner with almost complete inhibition of expression occurring at 10⁻⁸ M of 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ and at 10⁻⁷ M of 1,25(OH)₂D₃.

5 The useful activity of the compounds of formula I as agents for the treatment of
benign prostate growth can be demonstrated by the following test processes which are
known in the art.

1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans D₃ was evaluated for antiandrogenic activity in
10 castrated, testosterone stimulated male Syrian hamsters. Studies demonstrated that
1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans D₃ substantially suppressed the androgen-induced
hypertrophy of the seminal vesicles and the ventral prostate gland in these animals,
whereas 1,25(OH)₂D₃ was inactive at non-toxic doses (1 µg).

15 Castrated male Syrian hamsters were injected daily, s.c. with 20 µg testosterone
propionate and 1 µg 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans D₃ for 14 consecutive days. Both
compounds were administered in a vehicle of 0.2 ml sesame oil each. Necropsy was
performed on day 15. The prostate and seminal vesicles were removed, blotted and
weighed. Data were analyzed for statistical significance using the Student's t-test and are
20 expressed as percent inhibition of stimulated response.

Table I
Inhibition of Prostate And Seminal Vesicle Growth In Castrated Testosterone
Stimulated Hamsters

<u>Grp.</u>	<u>Treatment</u>	<u>Ventral Prostate</u>		<u>Seminal Vesicles</u>	
		<u>mg</u>	<u>Inhib.</u>	<u>mg ± SEM</u>	<u>Inhib.</u>
1.	Vehicle	12 ± 1	---	36 ± 3	---
2.	Testosterone	43 ± 5	---	105 ± 6	---
3.	Testosterone + 1,25(OH) ₂ -16-ene-5,6-trans D ₃ 0.1 µg	19 ± 2	77%	71 ± 1	48%

***p<0.001

611

5 The useful activity of the compounds of formula I as agents for the treatment of osteoporosis can be demonstrated by the following test processes which are known in the art.

Materials and Methods

10 **Animals and treatment:**

Three month old adult female rats were used. After a week of acclimatization the animals were weight grouped and treated by oral gavage at 1 ml/kg/day with several concentrations of 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans D₃. On day 7 of dosing, animals were bled
15 and serum calcium levels were determined.

Compound Preparation:

Compound was dissolved in 200 proof ethanol to produce a concentration of 100 µg/ml.
20 Sesame oil vehicle and ethanol compound solution were prepared for the highest dosage concentration, then rotary evaporated at 37° to remove ethanol. Dose volume was calculated using the dosing group average body weight. Serial dilutions of vehicle dissolved compound were done to appropriate dosage concentrations.

25 **Serum Collection and Determination:**

Blood (1.5 ml) was collected from each animal by orbital puncture under ether anesthesia on Day 7 of dosing. Blood was collected into serum separator tubes, centrifuged at 2000 rpm for 15 minutes and then serum aliquoted for calcium determinations. Serum calcium
30 was determined by colorimetric assay.

Results

Serum Calcium Levels:

Group #	Treatment	Dose µg/kg/day	Serum Calcium Mean (mg/dL)	SD
1	Vehicle	0	9.65	0.25
6	Compound	0.5	10.64	0.51
7	Compound	1	10.06	0.47
8	Compound	1.5	9.92	0.39
9	Compound	2	9.77	0.46

5

Serum calcium levels were within the normal range for dosage groups up to 2 µg/kg/day of treatment with 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans D₃.

10

Materials and Methods
Animals and treatment:

15

Three month old adult female rats were subjected to bilateral ovariectomy or sham surgery. After a week of acclimatization the animals were weight grouped and treated by oral gavage at 1 mg/kg of specified concentration. Dose volume was calculated weekly using the group average body weight. Dosing started 17 days post surgery and continued for 19 days. On the 20th day animals were euthanized by carbon dioxide inhalation and left femurs excised.

20

Total Femoral Bone Calcium:

25

At necropsy the left femurs from all groups were excised and soft tissue removed. The bones were measured and cut in half at mid-diaphysis; then the distal portion was cut in half longitudinally after removal of the epiphysis. The bone marrow was flushed out and the calcium was extracted by immersion in 5% TCA. The calcium content of TCA extracts was determined by using quantitative, colorimetric determination of calcium. The data were expressed as mean total bone calcium in mg/distal half femur (DHF) ± serum.

30

Serum Collection and Determination:

Blood (1.5 ml) was collected from each animal by orbital puncture under ether anesthesia on day 7 and day 18 of dosing. Blood was collected into serum separator tubes, centrifuged at 2000 rpm for 15 min. and then serum aliquoted for calcium determinations. Serum calcium was determined by colorimetric assay.

35

Statistics:

For a verification of the effect of ovariectomy on bone calcium, the sham and ovx vehicle groups were compared using student's t-test. The ovx groups were compared by one-way

- 5 analysis of variance (ANOVA), followed by Fisher's LSD to compare each treatment group to vehicle when the overall effect was statistically significant.

Results

Effect on Femur Calcium Adjusted for Body Weight

10

<u>Treatment</u>	<u>Dose μg/kg</u>	<u>Femur CA/ 100g BW</u>		<u>SEM</u>	<u>p-value vs Ovx</u>
Sham/Veh.	0.000	14.44	±	0.31	0.0001
Ovx/Veh.	0.000	10.58	±	0.33	---
1,25(OH) ₂ D ₃	0.500	11.91	±	0.32	0.0026
1,25(OH) ₂ -16-ene-5,6-trans D ₃	2.000	11.49	±	0.26	0.0368

Effect on Serum Calcium Levels

<u>Treatment</u>	<u>Dose μg/kg</u>	<u>Serum Calcium mg/dl</u>		<u>SEM</u>	<u>p-value vs Ovx</u>
Sham/Veh.	0.000	10.48	±	0.12	NS
Ovx/Veh.	0.000	10.41	±	0.15	---
1,25(OH) ₂ D ₃	0.500	11.74	±	0.19	0.0001
1,25(OH) ₂ -16-ene-5,6-trans D ₃	2.000	9.98	±	0.09	NS

- 15 We first identified the useful activity of the compounds of formula I as agents for the treatment of sebaceous gland diseases, as demonstrated by the following test procedures which are known in the art.

- 20 Two hundred μl of (1,25)OH₂-16-ene-5,6-trans D₃ was dissolved in propylene glycol, administered daily (5 days per week) by gavage to make Golden Syrian hamsters. The animals were sacrificed at 4 weeks and the ears were processed for histological

67
64

5 evaluation. The area of the sebaceous glands was measured on histologically prepared cross sections of the ear by image analysis.

Results

<u>Dose (µg/day)</u>	<u>% Change from Control</u>
10	-50
1	-50
0.1	-23
0.01	-5

10 Also examined was the total lipid fraction from one of the ears (extraction by organic solvent followed by weighing the remaining lipid material).

Results

<u>Dose (µg/day)</u>	<u>% Change from Control</u>
10	-56
1	-37
0.1	-25
0.01	-26

15 The compounds of formula I can be administered orally, for the treatment of breast cancer, prostate cancer or leukemia, to humans which need such treatment. More specifically, the compounds of formula I can be administered orally to an adult human in dosages that are in the range of about 1 to 20 µg per day for such treatment.

20 The compounds of formula I can be administered orally, for the treatment of benign prostate growth and baldness to humans which need such treatment. More specifically, the compounds of formula I can be administered orally to an adult human in dosages that are in the range of about 1 to 20 µg per day for such treatment.

68
65

5 The compounds of formula I can be administered orally for the treatment of osteoporosis, in humans at a dosage of about 1 to 20 μg per day.

 The compounds of formula I can be administered topically, for the treatment of baldness to humans which need such treatment. More specifically, the compounds of
10 formula I can be administered topically in dosages that are in the range of about 5 to about 50 μg per gram of topical formulation per day, for such treatment.

 The compounds of formula I can be administered orally, for the treatment of sebaceous gland diseases in humans at a dosage of about 1 to 20 μg per day.

15 Oral dosage forms comprising compounds of formula I of the invention may be incorporated in capsules, tablets and the like with pharmaceutically acceptable carrier materials.

20 Illustrative of the pharmaceutically acceptable carrier materials which may be incorporated into capsules, and the like are the following: a binder such as gum tragacanth, acacia, corn starch, or gelatin; an excipient such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent such as corn starch, potato starch, algenic acid, and the like; a lubricant such as magnesium stearate, a sweetening agent such as sucrose, lactose, or
25 saccharin; a flavoring agent such as peppermint, oil of wintergreen or cherry. Various other materials may be present as coating or to otherwise modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets may be coated with shellac, sugar, or both. A syrup or elixir may contain the active compound, sucrose as a sweetening agent, methyl and propyl parabens as preservatives, a dye, and a flavoring such as cherry or orange flavor.

30 Topical dosage forms comprising compounds of formula I of the invention include: ointments and creams encompassing formulations having oleaginous, absorbable, water-soluble and emulsion-type bases such as petrolatum, lanolin, polyethylene glycols and the like.

35

69
66

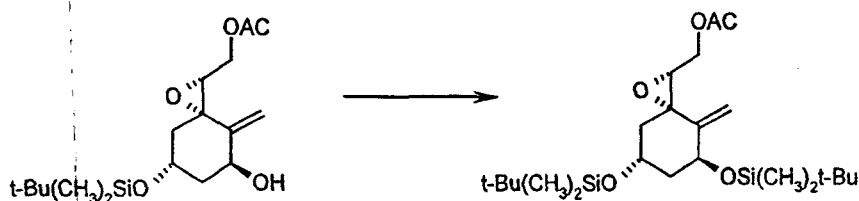
5 Lotions are liquid preparations and vary from simple solutions to aqueous or hydroalcoholic preparations containing finely divided substances. Lotions can contain suspending or dispersing agents, for example, cellulose derivatives such as ethyl cellulose, methyl cellulose, and the like; gelatin or gums, which incorporate the active ingredient in a vehicle made up of water, alcohol, glycerin and the like.

10 Gels are semi-solid preparations made by gelling a solution or suspension of the active ingredient in a carrier vehicle. The vehicles, which can be hydrous or anhydrous, are gelled using a gelling agent, such as, carboxy polymethylene, and neutralized to a proper gel consistency with the use of alkalies, such as, sodium hydroxide and amines, such as, polyethylenecocoamine.

15 As used herein, the term "topical" denotes the use of the active ingredient, incorporated in a suitable pharmaceutical carrier, and applied at the site of the inflammation for the exertion of local action. Accordingly, the topical compositions include those pharmaceutical forms in which the compound is applied externally by direct contact with the skin. The topical dosage forms comprise gels, creams, lotions, ointments, powders, aerosols and other conventional forms for applying medication to the skin obtained by admixing the compounds of formula I with known pharmaceutical topical carrier materials.

25 The following Examples are provided to further describe the invention and are not intended to limit it in any way.

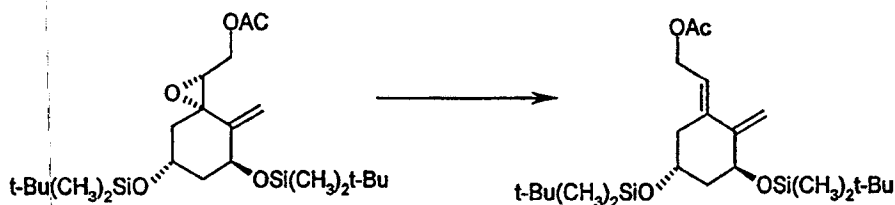
Example 1



5 (2R,3S,5S,7S)-2-[5,7-Bis[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]oxy]-4-methylene-1-oxaspiro[2,5]octane-2-methanol acetate

To a magnetically stirred solution of 18.5 g (0.0523 mole) of (2R,3S,5S,7S)-5-hydroxy-4-methylene-7-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyloxy]-1-oxaspiro[2,5]octane-2-methanol acetate (Y. Kiegiel, P.M. Wovkulich and M. R. Uskokovic, Tetrahedron Letters, 32, pgs. 6057-6060 (1991)) and 6.8 g (0.099 mole) of imidazole in 50 ml of dimethylformamide under an argon atmosphere was added 9.8 g (0.065 mole) of t-butyldimethylsilyl chloride. The reaction mixture was stirred for 5 hours, quenched with 5 ml water, stirred for 30 min and poured in 400 ml water. It was then extracted with 2 x 500 ml hexane and 2 x 500 ml ether. The organic layers were combined, washed with 300 ml water, dried over Na₂SO₄ and evaporated. Chromatography on a silica-gel column gave 22.31 g (92 %) of the title compound as a colorless oil.

20 Example 2



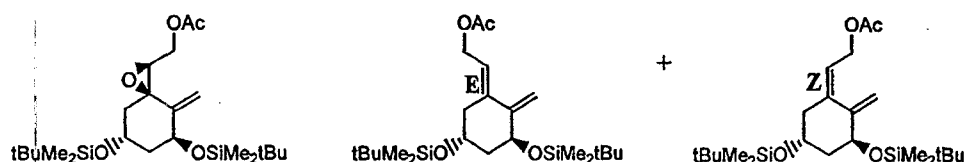
25 [3S-(1E,3β,5α)]-2-[3,5-Bis-[[[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]oxy]-2-methylenecyclohexylidene]ethanol acetate

A 3 liter 3-neck flask fitted with argon inlet, mechanical stirrer, and thermometer was charged with 500 ml of tetrahydrofuran and cooled to -60° C in a dry ice acetone bath. Portionwise addition of 43.23 g (0.108 mole) of anhydrous tungsten hexachloride was carried out while maintaining temperature of -60° C, and then rapid dropwise addition of 200 ml of 1.6 M n-butyllithium in hexane keeping the temperature below -45° C (ca 5 min). The dry ice-acetone bath was replaced with ice-water bath allowing temperature to reach 5° C. Color changes from blue to khaki to reddish black occurred. After 30 minutes at 5° C a solution of 22.31 g (0.04884 mole) of (2R,3S,5S,7S)-2-[5,7-bis[(1,1-

71
68

5 dimethyl-ethyl)dimethylsilyl]oxy]-4-methylene-1-oxaspiro[2,5]octane-2-methanol
acetate in 50 ml hexane was added rapidly dropwise over 3 minutes. After 4 hours, the
reaction mixture was diluted with 2 liter of hexane, filtered through silica gel cake, which
was washed with 3 x 500 ml of hexane-ethylacetate 9:1, and evaporated. The residue
was chromatographed on a 75 g silica gel column to give 22.56 g of the crude product.
10 Chromatography by a medium pressure silica gel column and elution with 100:1
dichloromethane-ethyl acetate mixture afforded 17.42 g (80.1%) of the title compound
and small amount of the corresponding 1Z epimer.

Example 3



[3S-(1E,3 β ,5 α)]-2-[3,5-Bis-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]oxy]-2-methylenecyclohexylidene]ethanolacetate (E-diene)

and

[3S-(1Z,3 β ,5 α)]-2-[3,5-Bis-[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]oxy]-2-methylenecyclohexylidene]ethanol acetate (Z-diene)

To 465 ml of anhydrous THF at -78 °C was added, with stirring, 64.3 g (160 mmol) of
25 WC1₆ (blue solution), followed by the addition of 337.5 ml of 1.43 M n-BuLi in hexane
(at a rate such that the internal temperature did not rise above -20 °C). The mixture was
then allowed to warm to room temperature. A solution of 24.5 g (53.6 mmol) of
(2S,3R,5S,7S)-2-[5,7-bis[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]oxy]-4-methylene-1-oxaspiro
[2,5]octane-2-methanol acetate in 65 ml of THF was added dropwise, and the mixture
30 was stirred for 4 h. The mixture was diluted with 600 ml of pentane and filtered through
a 4 cm bed of silica gel, washing with hexane/EtOAc (19:1), to give, after evaporation of
the volatiles under reduced pressure, 27 g of crude diene mixture. Further purification by
chromatography eluting with hexane/EtOAc (25:1) gave 21.6 g (91%) of a 2:3 Z/E dienes
mixture (title compounds) which were separable by silica gel chromatography
35 (hexane/EtOAc 40:1).

5

Z-diene ^1H NMR δ 0.052 (s, 6H), 0.06 (s, 6H), 0.87 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 1.74-1.90 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 2.20 (dd, $J = 6.0, 12.8$ Hz, 1H), 2.41 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 4.19 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.61 (dd, $J = 7.3, 12.1$ Hz, 1H), 4.68 (dd, $J = 7.3, 12.1$ Hz, 1H), 4.80 (s, 1H), 5.20 (s, 1H), 5.47 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +1.2^\circ$ ($c = 0.4$, EtOH). Anal. Calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{Si}_2$: C, 62.27; H, 10.01; Found: C, 62.55, H, 10.33.

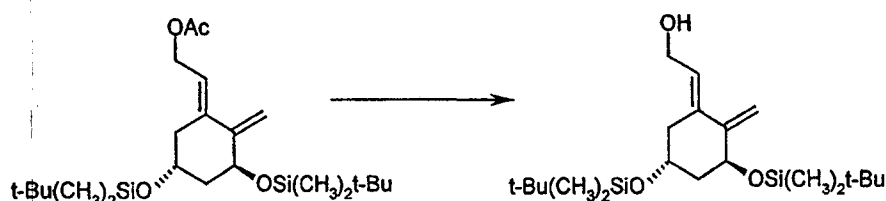
10

E-diene ^1H NMR δ 0.046 (s, 3H), 0.057 (s, 3H), 0.065 (s, 6H), 0.88 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 1.77 (ddd, $J = 3.1, 9.4, 11.9$ Hz, 1H), 1.89 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.31 (dd, $J = 2.0, 15.2$ Hz, 1H), 2.39 (dd, $J = 6.3, 15.2$ Hz, 1H), 4.21 (br s, 1H), 4.50 (m, 1H), 4.58 (dd, $J = 7.2, 12.9$ Hz, 1H), 4.65 (dd, $J = 7.2, 12.9$ Hz, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.99 (s, 1H), 5.69 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +8.0^\circ$ ($c = 0.5$, EtOH). Anal. Calcd. For $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{Si}_2$: C, 62.67; H, 10.06; Found: C, 62.42, H, 10.01.

15

Example 4

20



[3S-(1E,3 β ,5 α)]-2-[3,5-Bis[[1,1-dimethylethyl]dimethylsilyl]oxy]-2-methylenecyclohexylidene]ethanol

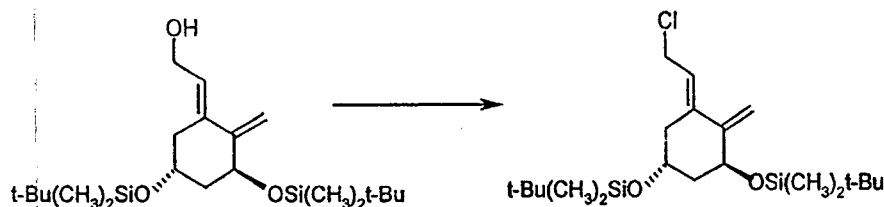
25

To a magnetically stirred solution of 10.84 g (0.0246 mole) of [3S-(1E,3 β ,5 α)]-2-[3,5-bis[[1,1-dimethylethyl]dimethylsilyl]oxy]-2-methylenecyclohexylidene]ethanol acetate in 100 ml methanol under an argon atmosphere was added 3.5 g of sodium hydroxide pellets, and the reaction mixture was stirred under argon for 3 hours. It was then evaporated under reduced pressure to a 50 ml volume, diluted with 500 ml water, extracted with 2 x 500 ml hexane-ether 1:1. The organic layer was washed with water, dried over Na_2SO_4 and evaporated. It gave 9.80 g (100%) of the title compound as white solid.

30

5

Example 5



10

1R-(1 α ,3 β ,5E)-[[-2-Chloroethylidene)-4-methylene-1,3-cyclohexanediyl]bis(oxy)]bis(1,1-dimethylethyl)dimethylsilane

15

To a stirred solution of 6.67 g (0.050 mole) of N-chlorosuccinimide in 150 ml dichloromethane under argon atmosphere cooled to 2° C in an ice-acetone bath was added dropwise over 2 minutes 4 ml (0.055 mole) of dimethylsulfide. A white precipitate

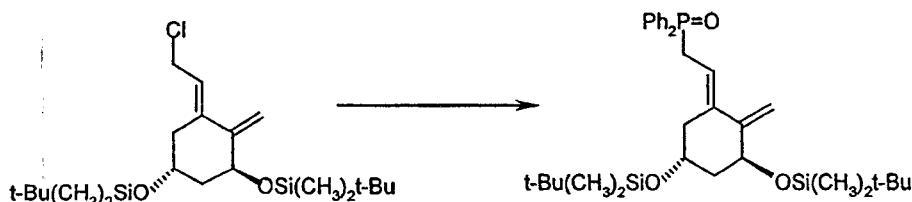
20

formed. After 30 minutes at 0° C, the bath was replaced with dry-ice acetone bath and the temperature of the reaction mixture was adjusted to -20° C. A solution of 9.8 g (0.0246 mole) of [3S-(1E,3 β ,5 α)]-2-[3,5-bis[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]oxy]-2-methylene-cyclohexylidene]ethanol in 60 ml dichloromethane was added. After 15 minutes, the cooling bath was removed, and the reaction mixture was stirred for 50

25

minutes, and then transferred to a separatory funnel containing 500 ml water. It was extracted with 2 x 350 ml hexane. The organic layer was washed with 500 ml water, dried over sodium sulfate and evaporated to give 10.49 g of crude product as yellow liquid. Purification by flash chromatography gave the pure title compound as colorless oil. NMR (CDCl₃): δ 0.03 (s, 3H), 0.05 (s, 3H), 0.07 (s, 6H), 0.87 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 1.70 – 1.94 (m, 2H), 2.34 (m, 2H), 4.13 (m, 2H), 4.28 (m, 1H), 4.53 (m, 1H), 5.00 (m, 1H), 5.03 (m, 1H), 5.78 (tm, J = 8 Hz, 1H).

Example 6



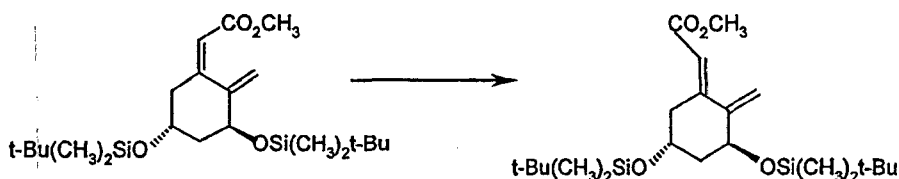
30

[3S-(1E,3 β ,5 α)]-2-[3,5-Bis[[dimethylethyl]dimethylsilyl]oxy]-2-methylenecyclohexylidene]ethyl]diphenylphosphine oxide

74
71

5 A 1 liter 3-neck flask fitted with argon inlet, thermometer, and mechanical stirrer was charged with a solution of 10.26 g (0.0246 mole) of 1R-(1 α ,3 β ,5E)-[[-(2-chloroethylidene)-4-methylene-1,3-cyclohexanediyl]bis(oxy)]bis(1,1-dimethylethyl)dimethyl silane in 100 ml of freshly distilled anhydrous tetrahydrofuran and cooled in a dry-ice acetone bath to -65° C. Addition of 0.5 M potassium diphenylphosphide in tetrahydrofuran during 30 minutes until a red color persisted required 60 ml. After stirring for 10 1 hour at -65° C, 10 ml water was added and the cooling bath removed. The reaction decolorized. Then 200 ml of dichloromethane was added rapidly followed 200 ml watery solution containing 10 ml of 30% hydrogen peroxide. After 1 hour, 13.5 g of sodium sulfite, 100 ml of brine and 200 ml dichloromethane were added. After shaking 15 thoroughly, phases were separated and aqueous phase was washed with 200 ml of dichloromethane. The organic phases were washed with 200 ml of brine. The combined organic layers were dried over sodium sulfate, filtered and evaporated, to give 16.33 g of crude product. This crude product was purified by medium pressure (silica gel G-60) chromatography to give 12.54 g (87%) of the title compound as white crystals. NMR (CDCl₃): δ 0.02 (s, 3H), 0.07 (s, 6H), 0.08 (s, 3H), 0.84 (s, 18H), 1.76 (m, 2H), 2.98-3.15 (m, 2H), 4.06 (m, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.53 (m, 1H), 4.72 (m, 1H), 4.79 (m, 1H), 7.45 (m, 6H), 7.72 (m, 4H).

Example 7



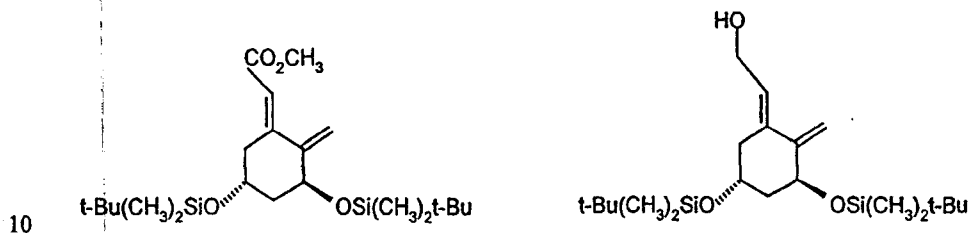
E-(3S,5R)-[3,5-Bis-(tert-butyl-dimethyl-silanyloxy)-2-methylenecyclohexylidene] acetic acid methyl ester (Ro 65-8821)

30 A solution of 4.45 g (0.01043 mole) of Z-(3S,5R)-[3,5-bis-(tert-butyl-dimethyl-silanyloxy)-2-methylene-cyclohexylidene]-acetic acid methyl ester (X) (A. Mowrino, et al., Tetrahedron Letters, 38, pgs. 4713-4716 (1997)) in 100 ml hexane was irradiated with a UV-lamp for 3 hours. Evaporation gave 4.25 g (95.5%) of the title compound as 35 colorless oil. NMR (CDCl₃): δ 0.06 (s, 3H), 0.07 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 1.76

72

5 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 2.70 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 4.26 (m, 1H), 4.58 (m, 1H), 5.07 (m, 2H), 5.91 (brs, 1H).

Example 8



[3S-(1E,3β,5α)]-2-[3,5-Bis-[[[(1,1-dimethylethyl)dimethyl-silyl]oxy]-2-methylenecyclohexylidene]ethanol

15 To a solution of 4.25 g (0.00996 mole) of E-(3S,5R)-[3,5-bis-(tert-butyl-dimethyl-silyloxy)-2-methylenecyclohexylidene]-acetic acid methyl ester in 100 ml toluene at -78° C was added dropwise 25 ml of a 1.2 M diisobutylaluminum hydride (0.03 mole) and the reaction mixture was stirred for one hour. After addition of 5 ml methanol, the reaction mixture was allowed to warm up to room temperature. It was then diluted with 150 ml of

20 2M aqueous potassium-sodium tartrate and stirred vigorously. The organic phase was separated, dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. The crude product was purified by Flash-chromatography with hexane-ethyl acetate 8:2 to yield 2.8 g (70%) of the title compound as colorless waxy solid. NMR (CDCl₃): δ 0.05 (s, 3H), 0.07 (s, 9H), 0.88 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 1.74 (m, 1H), 2.06 (m, 1H), 2.26 (dm, J = 13.6 Hz, 1H), 2.40

25 (dd, J = 13.6, 5.2, 1H), 4.30 - 4.11 (m, 3H), 4.53 (m, 1H), 4.98 (m, 1H), 5.00 (m, 1H), 5.80 (tm, J = 7 Hz, 1H).

Example 9

30 **1,25-Dihydroxy-16-ene-5,6-trans-cholecalciferol**

A stirred solution of 796 mg (0.00137 mole)[3S-(1E,3β,5α)]-2-[3,5-bis[[[(1,1-dimethylethyl)dimethyl-silyl]oxy]-2-methylenecyclohexylidene]ethyl]diphenylphosphine oxide in 10 ml of anhydrous tetrahydrofuran at -78° C was treated with 0.83 ml (0.00133

35 mole) of a 1.6M n-butyl lithium in hexane, dropwise under argon. To thus obtained red colored solution was added a solution of 280 mg (0.000803 mole) of [3aR-

76
73

5 [1(R*),3 α ,7 β]-1-[1,5-dimethyl-5-[(trimethylsilyl)oxy]hexyl]-3,3a,5,6,7,7a-hexahydro-
7a-methyl-4H-inden-4-one in 5 ml of tetrahydrofuran, dropwise over a 10 minute period
under argon. The reaction mixture was stirred at -78° C for 90 minutes, then quenched
by addition of 40 ml of a 1:1 of 2N Rochelle salt and 2N KHCO₃, and allowed to warm
up to room temperature. It was extracted with 3 x 100 ml ethyl acetate. The organic
10 layers were washed 3 x water/brine, dried over sodium sulfate and evaporated to dryness.
This crude product was purified by flash chromatography on a 40 mm x 6" column of
silica gel with hexane-ethyl acetate 40:1, to give 278 mg of trisilylated title compound
and 140 mg of starting ketone.

15 A solution of 278 mg (0.000389 mole) of this trisilylated intermediate in 8 ml of
anhydrous tetrahydrofuran was treated with 1.9 (1.9 mmole) of a 1M tetrabutyl-
ammonium fluoride in tetrahydrofuran under argon for 17 hours. It was quenched with 6
ml water and stirred for 30 minutes. After evaporation of tetrahydrofuran in vacuo, the
residual solution was extracted with 3 x 100 ml ethyl acetate. The organic layers were
20 washed 4x water/brine, dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. The crude
product, 192 mg, was purified by flash chromatography on a silica gel column, which
was prewashed with a 1% triethylamine:ethyl acetate solution (300 ml); elution was
performed with ethyl acetate. This gave 152 mg of crystalline title compound. Sample
recrystallized from tetrahydrofuran: methylformate (0.3:7) had a mp 95-100 °C. [α]_D²⁵ +
25 160.5° (EtOH, c = 0.20). λ_{max} 272/3nm (ϵ 20600).

Example 10

**Soft Gelatin Capsule
Formulation I**

Item	Ingredients	mg/Capsule
1	1,25(OH) ₂ -16-ene-5,6-trans D ₃	0.001-0.02
2	Butylated Hydroxytoluene (BHT)	0.016
3	Butylated Hydroxyanisole (BHA)	0.016
4	Miglyol 812 qs.	160.0

77
74

5 **Manufacturing Procedure:**

1. Suspend BHT and BHA in Miglyol 812. Warm to about 50°C, and stir until dissolved.
2. Dissolve 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans D₃ in the solution from step 1 at 50°C.
3. Cool the solution from Step 2 at room temperature.
- 10 4. Fill the solution from Step 3 in soft gelatin capsules.

Note: Perform all manufacturing steps under a nitrogen atmosphere and protect from light.

15 **Example 11**

**Soft Gelatin Capsule
Formulation II**

Item	Ingredients	mg/Capsule
1	1,25(OH) ₂ -16-ene-5,6-trans D ₃	0.001-0.02
2	di-α-Tocopherol	0.016
3	Miglyol 812 qs.	160.0

Manufacturing Procedure:

1. Suspend di-α-Tocopherol in Miglyol 812. Warm to about 50°C, and stir until dissolved.
- 20 2. Dissolve 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans D₃ in the solution from step 1 at 50°C.
3. Cool the solution from Step 2 at room temperature.
4. Fill the solution from Step 3 in soft gelatin capsules.

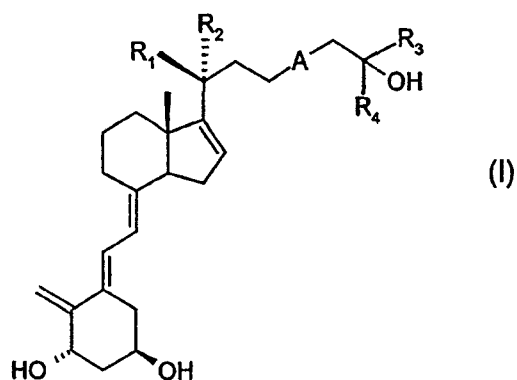
Note: Perform all manufacturing steps under a nitrogen atmosphere and protect from light.

78
75

5

CLAIMS

1. A compound of the formula



10

wherein

R_1 is hydrogen or an alkyl group;

R_2 is hydrogen or an alkyl group; or

R_1 , R_2 and C_{20} together are cyclopropyl;

A is $-C\equiv C-$, $\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ C=C \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$, $\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ C=C \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$, or $-CH_2-CH_2-$;

15

R_3 is alkyl, hydroxy-alkyl or fluoroalkyl; and

R_4 is a alkyl, hydroxyalkyl or fluoroalkyl.

20

2. A compound in accordance with claim 1 wherein R_1 is hydrogen and R_2 is alkyl or R_1 is alkyl and R_2 is hydrogen.

3. A compound in accordance with claim 2 wherein R_1 is hydrogen and R_2 is methyl or R_1 is methyl and R_2 is hydrogen.

25

79
76

5

10

15

20

25

30

- 4. A compound in accordance with claim 3 wherein R₃ and R₄ are, independently, alkyl, hydroxy alkyl or trifluoro-alkyl.
- 5. A compound in accordance with claim 4 wherein R₃ and R₄ are, independently, methyl, hydroxy-methyl or trifluoro-methyl.

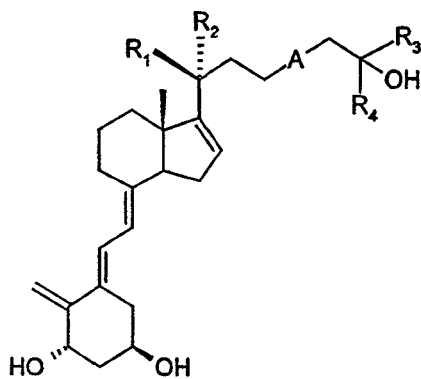
- 6. A compound in accordance with claim 5 wherein A is $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ | \quad | \\ -\text{C}-\text{C}- \\ | \quad | \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$.

- 7. A compound in accordance with claim 6, 1,25-dihydroxy-16-ene-5,6-trans cholecalciferol.

80
97

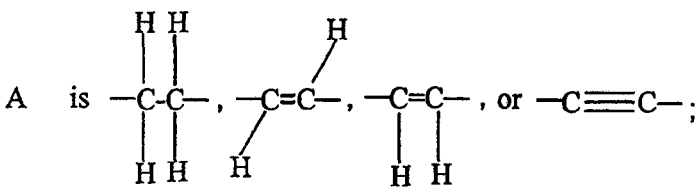
ABSTRACT

Compounds of the formula



wherein

- R₁ is hydrogen or an alkyl group;
- R₂ is hydrogen or an alkyl group; or
- R₁, R₂ and C₂₀ together are cyclopropyl;



- R₃ is alkyl, hydroxy-alkyl or fluoroalkyl; and
- R₄ is alkyl, hydroxy-alkyl or fluoroalkyl

which are useful in the treatment of breast cancer, prostate cancer, myeloid leukemia benign prostate growth, baldness and osteoporosis.

80006

81
78

Declaration and Power of Attorney for Patent Application

As a below named inventor, I hereby declare that:

My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name,

I believe I am the original, first and sole inventor (if only one name is listed below) or an original, first and joint inventor (if plural names are listed below) of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled

VITAMIN D₃ ANALOGS

the specification of which

(check one)

[X] is attached hereto.

[] was filed on _____ as

Application Serial No. _____

and was amended on _____
(if applicable)

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above identified specification, including the claims, as amended by any amendment referred to above.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in 37 CFR § 1.56.

I hereby claim foreign priority benefits under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) or § 365(b) of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate, or § 365(a) of any PCT International application which designated at least one country other than the United States, listed below and have also identified below, by checking the box, any foreign application for patent or inventor's certificate, or PCT International application having a filing date before that of the application on which priority is claimed.

Prior Foreign Application(s)

Priority Claimed

(Number)	(Country)	(Day/Month/Year Filed)	☐ Yes	☐ No
(Number)	(Country)	(Day/Month/Year Filed)	☐ Yes	☐ No
(Number)	(Country)	(Day/Month/Year Filed)	☐ Yes	☐ No

I hereby claim the benefit under 35 U.S.C. § 119(e) of any United States provisional application(s) listed below.

(Application No.)	(Filing Date)	(Application No.)	(Filing Date)
-------------------	---------------	-------------------	---------------

82
79

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code, § 120 of any United States application(s), or § 365(c) of any PCT International application designating the United States, listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States application in the manner provided by the first paragraph of Title 35, United States Code, § 112, I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in 37 CFR § 1.56 which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of this application:

(Application Serial No.)

(Filing Date)

(Status) (patented, pending, abandoned)

(Application Serial No.)

(Filing Date)

(Status) (patented, pending, abandoned)

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

POWER OF ATTORNEY: As a named inventor, I hereby appoint the following attorney(s) and/or agent(s) to prosecute this application and transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith. (list name and registration number)

George W. Johnston (Reg. No. 28090)
William H. Epstein (Reg. No. 20008)

Dennis P. Tramaloni (Reg. No. 28542)
Patricia S. Rocha-Tramaloni (Reg. No. 31054)
Robert A. Silverman (Reg. No. 35682)

Send Correspondence to:

George W. Johnston, Esq., Hoffmann-La Roche Inc., 340 Kingsland Street, Nutley, New Jersey 07110-1199

Direct Telephone Calls to: (name and telephone number)

Robert A. Silverman (973) 235-2863

Andrew David Batcho

Full name of sole or first inventor

Andrew David Batcho

7/9/99

Inventor's signature

Date

Essex County, North Caldwell, New Jersey

Residence

U.S.A.

Citizenship

19 White Oak Drive, North Caldwell, New Jersey 07006

Post Office Address

83
10

Bernard Michael Hennessy

Full name of second joint inventor, if any

Bernard Michael Hennessy

7-9-99

Second Inventor's signature

Date

Essex County, Nutley, New Jersey

Residence

U.S.A.

Citizenship

111 Passaic Avenue, Nutley, New Jersey 07110

Post Office Address

Milan Radoje Uskokovic

Full name of third joint inventor, if any

Milan Radoje Uskokovic

7.9.99

Third Inventor's signature

Date

Essex County, Upper Montclair, New Jersey

Residence

U.S.A.

Citizenship

233 Highland Avenue, Upper Montclair, New Jersey 07043

Post Office Address

Title 37, Code of Federal Regulations, §1.56, duty to disclose information material to patentability provides, in part, that each individual associated with the filing and prosecution of a patent application has a duty of candor and good faith in dealing with the Office, which includes a duty to disclose to the Office all information known to that individual to be material to patentability as defined in this section. The duty to disclose information exists with respect to each pending claim until the claim is cancelled or withdrawn from consideration, or the application becomes abandoned.

Under this section, information is material to patentability when it is not cumulative to information already of record or being made of record in the application, and

- (1) It establishes, by itself or in combination with other information, a prima facie case of unpatentability of a claim; or
- (2) It refutes, or is inconsistent with, a position the applicant takes in:
 - (i) Opposing an argument of unpatentability relied on by the Office, or
 - (ii) Asserting an argument of patentability.

84
81

SEQUENCE LISTING

<110> Batcho, Andrew
Hennessey, Bernard
Uskokovic, Milan

<120> 5,6-trans-16-ene-vitamin D3

<130> uskokovic d3 analogs 1092P

<140>
<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Primer for
hTERT (sense)

<400> 1
cggaagagtg tctggagcaa 20

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for
hTERT (antisense)

<400> 2
ggatgaagcg gagtctgga 19

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer for
GAPDH (sense)

<400> 3
ccatggagaa ggctgggg 18

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

~~85~~
82

<400> 4

20

87
83

TRADUCCION OFICIAL No. 168

**TRADUCCION DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES. TRASPASO
Y LEGALIZACION DE INVENCION ANALOGOS DE LA VITAMINA D3 A
HOFFMANN-LA-ROCHE.**

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

DEPARTAMENTO DE ESTADO

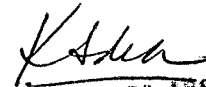
A TODOS A QUIENES LLEGUE EL PRESENTE, Saludo:

Certifico que el documento anexo al presente está sellado con el Sello de la Oficina de Patentes y Marcas, Departamento de Comercio, Estados Unidos de América, y que dicho Sello merece plena fe y crédito.*

En testimonio de lo cual, Yo, Madeleine K. Albright, Secretario de Estado, he ordenado que se estampe el sello del Departamento de Estado y que el Funcionario Asistente de Autenticaciones de dicho Departamento suscriba mi nombre en el presente documento, en la ciudad de Washington, en el Distrito de Columbia, el día 26 de abril, 2000.

Firmado: **Madeleine K. Albright**
Secretario de Estado

Por: (Firma ilegible)


JANIS SALAMANCA DE ABERN
TRADUCTORA OFICIAL
RES. MINISTRO 3248

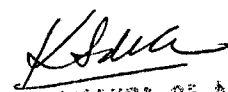
88
54

Funcionario Asistente de Autenticaciones
Departamento de Estado

Sello en relieve: Departamento de Estado, Estados Unidos de América – con el escudo de los Estados Unidos en el centro.

* El Departamento no asume ninguna responsabilidad por el contenido del documento adjunto.

Este certificado no es válido si se altera o modifica en cualquier forma.


MARIA SALAZAR DE ARRED
TRADUCTORA DEL
RES. MINISTRO DE JUSTICIA

89
85

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

A TODOS A QUIENES LLEGUE EL PRESENTE:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Abril 20, 2000

**EL PRESENTE CERTIFICA QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES COPIA
AUTENTICA TOMADA DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN
DOCUMENTO REGISTRADO EN JULIO 30, 1999.**

Por la Autoridad del
COMISIONADO DE PATENTES Y MARCAS

Firmado: **H. PHILLIPS**
Funcionario que certifica

Sello en papel dorado de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos
de América.


ANITA SALAMANCA DE AGRED
TRADUCTORA OFICIAL
RES. MIN. JUSTICIA 3218

90
86

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Patentes y Marcas

Caso No. 1092P

SOLAMENTE PATENTES

08-03-99

101108485

El Honorable Comisionado de Patentes y Marcas: Favor registrar los documentos originales o copia de los mismos.

1. Nombre de la(s) parte(s) que realizan el traspaso:

1) ANDREW DAVID BATCHO

2) BERNARD MICHAEL HENNESSY

3) MILAN RADOJE USKOKOVIC

¿Se anexan nombres adicionales de partes que realizan el traspaso? No

2. Nombre y dirección de la parte que recibe :

Nombre: HOFFMANN-LA ROCHE INC.

Dirección interna:

Calle: 340 Kingsland Street

Ciudad: Nutley

Estado: NJ

Código postal: 07110

Nombre(s) adicional(es) y direcciones adjuntas: No



LILIA SALAMANCA DE ABEDUTO

TRADUCTORA OFICIAL

RES. MINISTERIO 0210

94
87

3. Naturaleza del traspaso:

Traspaso

Fecha de ejecución: Julio 09, 1999

4. Número(s) de solicitud o número(s) de patente:

Si este documento se registra junto con una nueva solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es:

A. Solicitud de patente No.(s)

B. Patente No. (s)

Solicitud de Patente Provisional US: 60/143,413 Reg: julio 12, 1999

¿Números adicionales anexados? No

5. Nombre y dirección de la parte a la cual debe enviarse la correspondencia concerniente al documento:

Nombre: GEORGE W. JOHNSTON

Dirección interna:

HOFFMANN-LA ROCHE INC.
PATENT LAW DEPARTMENT

Calle: 340 Kingsland Street

Ciudad: Nutley

Estado: NJ

Código postal: 07110


ANITA SALAMANCA DE ABED
TRADUCTORA OFICIAL
SES. MINISTROS 3210

92
88

6. Número total de solicitudes y patentes implicadas: UNO

7. Total derechos (37 CFR 3.41) \$ 40.00

- ☒ Autorizado para ser cargado a cuenta de depósito
☒ Autorizado cualquier deficiencia cargar a cuenta de depósito

8. Número de cuenta de depósito: 08-2525

9. Declaración y firma.

A mi leal saber y entender, la anterior información es verdadera y correcta y cualquier copia anexa es copia fiel y verdadera del documento original.

Firmado: **ROBERT. S. SILVERMANN**

Firma: (ilegible)

Fecha: Julio 28, 1999

Contacto: **Lou Ann Donatoni**

Teléfono: (973) 235-4389

Fax: (973) 235-2363

Número total de páginas incluyendo cubierta, anexos y documento: 4


MARIA SALAZAR DE AGUEDA
TRADUCTORA OFICIAL
RES. MINJUSTICIA 3288

INVENCION

Caso No. 1092P

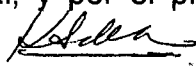
TRASPASO

POR CUANTO, NOSOTROS, Andrew David Batcho, Bernard Michael Hennessy, Milan Radoje Uskokovic (Cedentes) hemos inventado ciertas mejoras nuevas y útiles que se describen y reivindican en solicitud de la Patente de los Estados Unidos y se identifican como Caso No. 1092P, titulado

ANALOGOS DE LA VITAMINA D3

POR CUANTO, HOFFMANN-LA ROCHE INC., una corporación organizada y existente bajo y en virtud de las leyes del Estado de Nueva Jersey, y con oficinas principales en Nutley, New Jersey, desea adquirir todos los intereses en y para dicho invento, dicha solicitud y la Patente por obtener para las mismas;

POR CONSIGUIENTE, por y en consideración de Un Dólar (\$1.00) y otras consideraciones valederas que nos han sido pagadas, cuyo recibo y suficiencia por medio del presente reconocemos, hemos vendido, traspasado, y transferido y por el presente vendemos, cedemos y transferimos a HOFFMANN-LA ROCHE INC. (Cesionario), y a los representantes legales, sucesores de dicho cesionario todos los derechos, títulos e intereses, para todo el mundo, en y para dicha invención y dicha solicitud, así como para cualquier solicitud subsiguiente que reclame prioridad con base en la fecha de registro de dicha solicitud identificada como Caso No. 1092P y las patentes, tanto nacionales como extranjeras, que puedan resultar de las mismas incluyendo el derecho a reclamar respecto de cualquier patente y solicitud de patente subsiguiente, extranjera y de los Estados Unidos, la fecha de prioridad de dicha solicitud de acuerdo con cualquier estatuto de los Estados Unidos y convención o tratado internacional; y por el presente


ANITA SALAMANCA DE ABREU
TRADUCTORA OFICIAL
REC. MINISTRO DE JUSTICIA 3211

94
90

autorizamos y solicitamos la expedición de dichas patentes, nacionales y extranjeras, de conformidad con los términos del presente Acuerdo.

EN CONSIDERACION DE LO ANTERIOR, por medio del presente convenimos y acordamos con dicho Cesionario que no firmaremos ningún documento ni realizaremos ningún acto cualesquiera que sea que contradiga el presente documento, y que en cualquier momento por solicitud, sin ninguna otra consideración, sino a expensas de dicho Cesionario, firmaremos traspasos adicionales y otros documentos y realizaremos los actos que dicho Cesionario pueda juzgar necesarios o deseables para perfeccionar el uso de esta concesión por parte del Cesionario, y prestaremos toda la asistencia necesaria para solicitar y obtener la patente provisional, original, continuada, parcialmente continuada, fraccionaria, re-emitida, re-examinada o prorrogada de los Estados Unidos o de cualquier país extranjero sobre dicha invención, y para hacer valer cualquier derecho o derechos de acción adquiridos como resultado de dichas solicitudes o patentes, incluyendo pero sin limitación a, dar testimonio en cualquier proceso o transacción que implique tales solicitudes o patentes, y ejecutar declaraciones preliminares y otras declaraciones juradas, dando por entendido que el anterior acuerdo será obligatorio y entrará en vigencia en beneficio de los cesionarios y representantes legales de todas las partes del mismo.


ANITA SALAMANCA DE AGREU
TRADUCTORA OFICIAL
BES. MINJUSTICIA 2200

95
91

EN FE DE LO CUAL, hemos firmado de nuestro puño y letra y estampado nuestros sellos, este 9 de julio, 1999.

Nutley, Nueva Jersey, U.S.A.

Firmado: **Andrew David Batcho**

Firmado: **Bernard Michael Hennessy**

Firmado: **Milan Radoje Uskokovic**

RECONOCIMIENTO

Estados Unidos de América

Estado de New Jersey

Condado de Essex

El día julio 9, 1999, comparecieron ante mí personalmente

Andrew David Batcho, Bernard Michael Hennessy, Milan Radoje Uskokovic

a quienes conozco como las personas descritas en el anterior Traspaso, quienes reconocieron que firmaron el anterior Traspaso por su propia voluntad para los fines expuestos en dicho documento.

Firmado: **LOU ANN DONATONI**


LATA SALAMANCA DE ASHEU
TRADUCTORA OFICIAL
REG. MINISTERO 3714

96
92

Notario Público de New Jersey

Mi comisión expira el 26 de marzo, 2003



KATIA SALAMANCA DE ABBEU
TRADUCTORA OFICIAL
REG. MINJUSTICIA 3288

97
93

CONSULADO DE COLOMBIA EN WASHINGTON, D.C.

NO. 1058

CERTIFICA la autenticidad de la firma y cargo de PATRICK O. HATCHETT, que aparece en el documento en cuestión, expedida en Washington D.C., el 26 de abril del 2000.

Firmado: JAQUELINE ESPITIA ARIAS

Vicecónsul

Sello del Consulado de Colombia en Washington.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

SANTA FE DE BOGOTA

N° 189230

CERTIFICA la firma y el cargo del funcionario consular JAQUELINE ESPITIA, el día junio 27, 2000.

(Firma) Ilegible

JEFE DE LEGALIZACIONES

Santafé de Bogotá, D.C.

K. Saldaña
LITIA SALDANHA DE ABREU
TRADUCTORA OFICIAL
REG. MINJUSTICIA 3211

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
N° 189230
Jaqueline Espitia
JEFE DE LEGALIZACIONES
CONSULADO DE COLOMBIA EN WASHINGTON, D.C.

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TERCERO
2000 JUL - 6
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTA FE DE BOGOTA
[Firma]



CONSULADO DE COLOMBIA

WASHINGTON, D.C.



No. 1058

EL CONSULADO DE COLOMBIA

CERTIFICA:

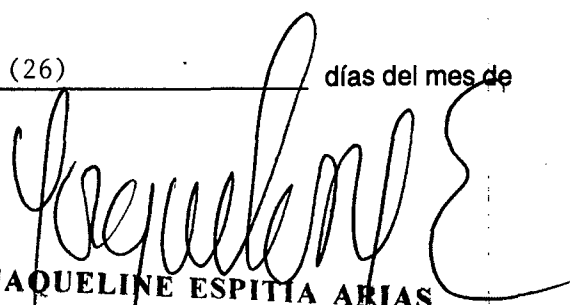
Que es auténtica la firma de PATRICK O. HATCHETT.
quien el día 26 DE ABRIL DEL 2000
desempeñaba las funciones de OFICIAL DE AUTENTICACIONES DEPARTAMENTO DE ESTADO.
la cual aparece al pie de los documentos anexos relacionados con REGISTRO DE MARCA.

Dado en Washington, D.C. a los VEINTISEIS (26) días del mes de
ABRIL. del año dos mil (2000)

Pagado Impuesto de Timbre 7=

Pagado Derecho Consular 15=

Total 22=


JAQUELINE ESPITIA ARIAS
Vicecónsul

(El Consulado no asume ninguna
responsabilidad por el contenido de los
documentos anexos)

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Signature

22/30

Signature

COTA FIJA LA APARECE EN EL
ACUERDO DE 1994 A
LOS SEÑORES FISCALAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2000 JUN 21 A 10:56

SE DE REGALIZACION
SANTAFE DE BOGOTA D.

Signature

United States of America



DEPARTMENT OF STATE



To all to whom these presents shall come, Greetings:



I Certify That the document hereunto annexed is under the Seal of the Patent and Trademark Office, Department of Commerce, United States of America, and that such Seal is entitled to full faith and credit.*

In testimony whereof, I, Madeleine K. Albright, Secretary of State, have hereunto caused the seal of the Department of State to be affixed and my name subscribed by the Assistant Authentication Officer, of the said Department, at the city of Washington, in the District of Columbia, this twenty-sixth day of April, 2000.

Madeleine K. Albright

Secretary of State

By

Paul O. Hanna

Assistant Authentication Officer,
Department of State

Issued pursuant to CHXIV, State of
Sept. 15, 1789, 1 Stat. 68-69; 22
USC 2657; 22 USC 2651a; 5 USC
301; 28 USE 1733 et. seq.; 8 USC
1443(f); RULE 44 Federal Rules of
Civil Procedure.

**For the contents of the annexed document, the Department assumes no responsibility*

This certificate is not valid if it is removed or altered in any way whatsoever

A 235131

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

April 20, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
JULY 30, 1999.



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

H. Phillips
H. PHILLIPS
Certifying Officer

COLOMBIA



101
97

08-03-1999

md 7-30-99

Form PTO-1595
Page 1 of 2



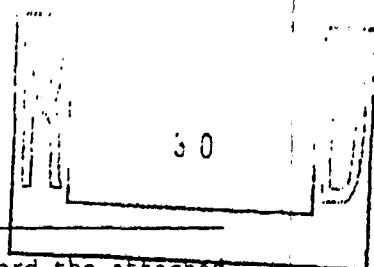
U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office

101108485

RECORDATION FORM COVER SHEET

PATENTS ONLY

Case Docket No. 1092P



To the Honorable Commissioner of Patents and Trademarks: Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):

- 1) ANDREW DAVID BATCHO
- 2) BERNARD MICHAEL HENNESSY
- 3) MILAN RADOJE USKOKOVIC

2. Name and address of receiving party(ies):

Name: HOFFMANN-LA ROCHE INC.

Internal Address: _____

Additional name(s) of conveying

party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

☒ Assignment

☐ Merger

Street Address: 340 KINGSLAND STREET

☐ Security Agreement

☐ Change of Name

☐ Other _____

City: NUTLEY State: NJ Zip: 07110

Execution Date: July 09, 1999

Additional name(s) & address(es) attached:

☐ Yes ☒ No

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No.(s)

B. Patent No.(s)

US Provisional Patent Appln.: 60/143,413 FILED: JULY 12, 1999

Additional numbers attached? ☐ Yes ☒ No

08/02/1999 DMUYEN 00000167 082525 60143413

01 FC:581

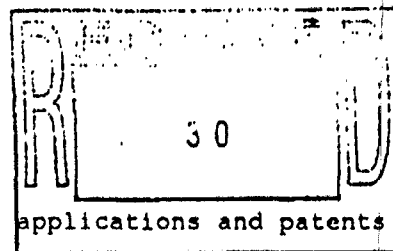
40.00 CH

PATENT
REEL: 010130 FRAME: 0070



102
98

Page 2 of 2



5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Name: GEORGE W. JOHNSTON

Internal Address:

HOFFMANN-LA ROCHE INC.

PATENT LAW DEPARTMENT

Street address: 340 KINGSLAND STREET

City: NUTLEY State: NJ Zip: 07110

6. Total number of applications and patents involved: ONE

7. Total fee (37 CFR 3.41).....\$ 40.00

☒ Authorized to be charged to deposit account

☒ Authorized any deficiencies to be charged to deposit account

8. Deposit account number:

08-2525

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

ROBERT S. SILVERMAN

Name of Person Signing

Signature

JULY 28, 1999

Date

CONTACT: Lou Ann Donatoni
TELEPHONE: (973) 235-4389
FAX: (973) 235-2363

Total number of pages including cover sheet, attachments and document: 4



103
99

JOINT INVENTION

Case Docket No. 1092P

ASSIGNMENT

WHEREAS, WE, Andrew David Batcho, Bernard Michael Hennessy, Milan Radoje Uskokovic (Assignors) have invented certain new and useful improvements which are described and claimed in application for United States Patent and identified as Case Docket No. 1092P, entitled

VITAMIN D₃ ANALOGS

WHEREAS, HOFFMANN-LA ROCHE INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of New Jersey, and having its principal place of business at Nutley, New Jersey, is desirous of acquiring the entire interest in and to said invention, said application and the Patent to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, for and in consideration of One Dollar (\$1.00) and other good and valuable consideration to us in hand paid, the receipt and sufficiency whereof are hereby acknowledged, we have sold, assigned, and set over, and by these presents do hereby sell, assign, and set over unto the said HOFFMANN-LA ROCHE INC. (Assignee), and said Assignee's legal representatives, successors, the entire right, title and interest, for the whole work, in and to said invention and said application, as well as any subsequent application which claims priority based upon the filing date of said application identified as Case Docket No. 1092P and the patents, both domestic and foreign, that may or shall result therefrom including the right to claim in respect of any subsequent United States and foreign patent applications and patents, the priority date of said application under any United States statute and international convention or treaty; and we do hereby authorize and request the issuance of said patents, domestic and foreign, conformably to the terms of this Agreement.

UPON SAID CONSIDERATION, we do hereby covenant and agree with the said Assignee that we will not execute any writing or do any act whatsoever conflicting with these presents, and that we will at any time upon request, without further or additional consideration, but at the expense of the said Assignee, execute such additional assignments and other writings and do such additional acts as said Assignee may deem necessary or desirable to perfect the Assignee's enjoyment of this grant, and render all necessary assistance in making application for and obtaining provisional, original, continuation, continuation-in-part, divisional, reissued, re-examined or extended Patent of the United States or of any and all foreign countries on said invention, and in enforcing any rights or choses in action accruing as a result of such applications or patents, including but not limited to, giving testimony in any proceedings or transactions involving such applications or patents, and executing preliminary statements and other affidavits, it being understood that the foregoing covenant and agreement shall bind and inure to the benefit of the assigns and legal representatives of all parties hereto.

104
100

104514
P.00000

IN WITNESS WHEREOF, we have hereunto set our hands and affixed our seals this 9th day of July, 1999.

Nutley, New Jersey, U.S.A.

Andrew David Batcho
Andrew David Batcho

Bernard Michael Hennessy
Bernard Michael Hennessy

Milan Radoje Uskokovic
Milan Radoje Uskokovic

ACKNOWLEDGMENT

United States of America)
State of New Jersey)
County of Essex)

On July 9, 1999, before me personally appeared Andrew David Batcho, Bernard Michael Hennessy, Milan Radoje Uskokovic to me known to be the persons described in the foregoing Assignment, who acknowledged that they executed the foregoing Assignment of their own free will for the purposes therein set forth.

Lou Ann Donatoni

LOU ANN DONATONI
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires March 26, 2003

845.1

105
101

TRADUCCION OFICIAL No. 166

**TRADUCCION DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES. TRASPASO
INVENCION ANALOGOS DE LA VITAMINA D3 A HOFFMANN-LA-ROCHE.**

TRASPASO

Colombia

Caso 20472

Caso No. 1029P

HOFFMANN-LA ROCHE INC. (Cedente), una corporación del Estado de Nueva Jersey, Estados Unidos de América, con oficinas principales en Nutley, Nueva Jersey, Estados Unidos de América, por el presente traspasa a

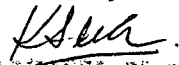
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (Cesionario)

124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basilea, Suiza

todos sus derechos, títulos e intereses para todos los países del mundo excepto los Estados Unidos de América y sus territorios y posesiones, en y para la invención descrito y reivindicado en la solicitud de Patente de los Estados Unidos, Caso No. 1092P, registrado en julio 12, 1999, titulada

ANALOGOS DE LA VITAMINA D3

realizada por David Batcho, Bernard Michael Hennessy y Milan Radoje Uskokovic


ANITA SALAMANCA DE ARRED
TRADUCTORA OFICIAL
RES. MINJUSTICIA 3700

406
102

así como en cualquier solicitud(es) subsiguiente(s) en todos los países del mundo, excepto en los Estados Unidos de América y sus territorios y posesiones, solicitud que reclama esta solicitud, Caso No. 1029P, como prioridad; y respecto de tal invención y todas las solicitudes de patente, nacionales y extranjeras, sobre dicha invención, un traspaso de todos los derechos, títulos e intereses en la misma, para todo el mundo, a favor del Cesionario fue firmado el 9 de julio, 1999 por David Batcho, Bernard Michael Hennessy y Milan Radoje Uskokovic

El presente traspaso es para, pero sin limitación a, los siguientes países y por razones valederas, cuyo recibo y suficiencia se reconocen por el presente:

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazakhsan, Corea, Luxemburgo, Méjico, Mónaco, Holanda, Nueva Zelanda, Noruega, Paquistán, República Popular China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Sudáfrica, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Reino Unido o Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, Venezuela.

El Cedente traspasa expresamente al Cesionario el derecho a presentar las correspondientes solicitudes de patente en todos los países del mundo excepto los Estados Unidos de América y a exigir la fecha de prioridad de conformidad con cualquier tratado o convención internacional de cualquiera de las solicitudes de patente de los Estados Unidos arriba mencionadas traspasadas por el Cedente en el presente Traspaso. El Cedente acuerda firmar cualquier otro traspaso o documento así como a realizar cualquier acto adicional necesario para que el Cesionario pueda disfrutar de los derechos plenos del presente Traspaso.

Nutley, Nueva Jersey, U.S.A.

HOFFMANN-LA ROCHE INC.


AUTORIZACION DE ABOGADO
TRADUCTORA OFICIAL
CES. MIN/JUSTICIA 3216

Fecha: Julio 28, 1999

Por: (firma ilegible)

William H. Epstein

Subsecretario

Kelley
AREA SALAMANCA DE MEXICO
INTERPRETE OFICIAL
RES. MINISTERIO 3211

108
104

RECONOCIMIENTO

Estados Unidos de América

Estado de Nueva Jersey

Condado de Essex

El 28 de julio, 1999, compareció ante mí personalmente William H. Epstein a quien conozco como la persona descrita en el anterior Traspaso, quien reconoció que él(ella) firmó el anterior Traspaso en nombre de **Hoffmann-La Roche Inc.**, y que él(ella) está facultado para firmar el anterior Traspaso y para transferir los derechos mediante él otorgados.

Firmado: **LOU ANN DONATONI**

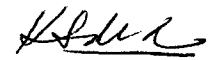
Notario Público de Nueva Jersey

Mi comisión expira marzo 26, 2003

Hay sello en altorrelieve del Notario Público de New Jersey, LOU ANN DONATONI.

DECLARACION

El anterior Cedente declara que a través de los apoderados del Cedente, la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos me ha informado que dicha Oficina ha asignado el Número de Serie 60/143,413 y la fecha de registro julio 12, 1999 a la solicitud de patente de los Estados Unidos referida como Caso No. 1092P en el anterior traspaso.


ANNA SALAMANCA DE ACHEU
TRADUCTORA OFICIAL
REC. MINJUSTICIA 1288

109
105

El Cedente declara además que en julio 28, 1999, su representante firmó el anterior traspaso y que en esa fecha el Cedente traspasó a F. Hoffmann-La Roche AG el derecho a exigir la fecha de prioridad de la solicitud de patente de los Estados Unidos arriba mencionada respecto de cualquier solicitud y patente extranjera subsiguiente correspondiente.

Firmado: **HOFFMANN-LA ROCHE INC.**

Por: (firma ilegible)

William H. Epstein

Subsecretario

Nutley, Nueva Jersey, U.S.A.

Fecha: Julio 28, 1999

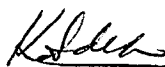
RECONOCIMIENTO

Estados Unidos de América

Estado de Nueva Jersey

Condado de Essex

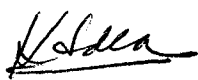
El 28 de julio, 1999, compareció ante mí personalmente William H. Epstein a quien conozco como la persona descrita en el anterior Traspaso, quien reconoció que él(ella) firmó el anterior Traspaso en nombre de **Hoffmann-La Roche Inc.**, y que él(ella) está facultado para firmar el anterior Traspaso y para transferir los derechos mediante él otorgados.


MARIA SALAZAR DE ALBEO
TRADUCTORA OFICIAL
BIS MINJUSTICIA 3218

106

Firmado: **LOU ANN DONATONI**
Notario Público de Nueva Jersey
Mi comisión expira marzo 26, 2003

Hay sello en altorrelieve del Notario Público de New Jersey, LOU ANN DONATONI.


ARLA CALABRANCA DE ADHEU
TRADUCTORA OFICIAL
RES. MINJUSTICIA 2218

174
107

YO, EL TESORERO DEL ESTADO DE NUEVA JERSEY, POR EL PRESENTE
CERTIFICO QUE

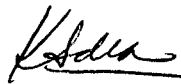
LOU ANN DONATONI

EL FUNCIONARIO CUYA FIRMA APARECE EN EL CERTIFICADO DE
RECONOCIMIENTO, PRUEBA O DECLARACION JURADA ADJUNTA AL
PRESENTE DOCUMENTO, ERA EN EL MOMENTO DE HACER DICHO
RECONOCIMIENTO, PRUEBA O DECLARACION JURADA NOTARIO PUBLICO,
EN Y PARA EL ESTADO DE NUEVA JERSEY, DEBIDAMENTE COMISIONADO
Y JURAMENTADO Y ERA, COMO TAL, UN FUNCIONARIO DE DICHO ESTADO,
DEBIDAMENTE AUTORIZADO POR LAS LEYES DEL MISMO PARA HACER Y
CERTIFICAR LA MISMA, ASI COMO PARA HACER Y CERTIFICAR LA PRUEBA
Y RECONOCIMIENTO DE ESCRITURAS Y OTROS INSTRUMENTOS
ESCRITOS QUE DEBAN REGISTRARSE EN DICHO ESTADO, Y QUE DEBE
DARSE TOTAL FE Y CREDITO A SUS ACTOS OFICIALES.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, HE COLOCADO MI FIRMA Y SELLO OFICIAL
EN TRENTON, ESTE 9 DE MAYO, 2000.

Firmado: **Roland M. Machold**
TESORERO

Sello en papel dorado.


KATHY MALABANCA OF ALBEDO
TRANSLATIONS, INC.
RES. 2000000000 0244

442
108

CERTIFICACION EN ESPAÑOL DEL CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
EN NUEVA YORK.

Firmado: **Federico Mejía Mejía**

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

SANTA FE DE BOGOTA

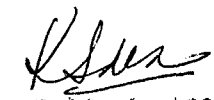
N° 189232

CERTIFICA la firma y el cargo del funcionario consular FEDERICO MEJIA, el día
junio 27, 2000.

(Firma) Ilegible

JEFE DE LEGALIZACIONES

Santafé de Bogotá, D.C.


ANITA SALAMANCA DE ARRED
INTERPRETORA OFICIAL
RES. MINISTERIO 7211

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
FELIX
155054
COPIA PARA ARCHIVO EN EL
CONSEJO DE SEGURIDAD
DEL GOBIERNO NACIONAL
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2000 JUL -6 11:23
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTA FE DE BOGOTA D.C.



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

10 EAST 46TH STREET, NUEVA YORK, NY 10017

TEL. (212) 370-0004 FAX (212) 972-1725

EL SUSCRITO CONSUL DE COLOMBIA

VISTOS LOS DOCUMENTOS PRESENTADOS POR LOS INTERESADOS

CERTIFICA

Que el Señor (a), **ROLAND M MACHOLDS** Tesorero del Estado de New Jersey verificó la firma de (el) (la) señor(a) **LOU ANN DONATONI** como Notario publico para el estado de New Jersey y que la firma y sello que aparecen en el documento adjunto son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.

Que la Notario(a) arriba mencionado(a) verificó las firma del señor(a) **WILLIAM H. EPSTEIN** quien firma el documento adjunto en su calidad de Secretaria Asistente de **HOFFMAN-LA ROCHE INC.** corporación organizada, legalmente existente de conformidad con las leyes de Los Estados Unidos de Norte América..

Que ha tenido a la vista los documentos probatorios de los hechos citados y constatados por el Tesorero del Estado de New Jersey, y la notario pública del mismo estado, los cuales forman parte integral del precedente documento.

Se expide la presente certificación en cumplimiento de los artículos 259 del Código de Procedimiento Civil y 480 del Código de Comercio y a solicitud del interesado a los 27 dias del mes de Abril de 2000.

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD POR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO ADJUNTO.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES

VALOR CINCUENTA Y SIETE DOLARES US\$57.00 RECIBO No. 238680



Federico Mejía Mejía
Cónsul de Colombia

APR 27 2000

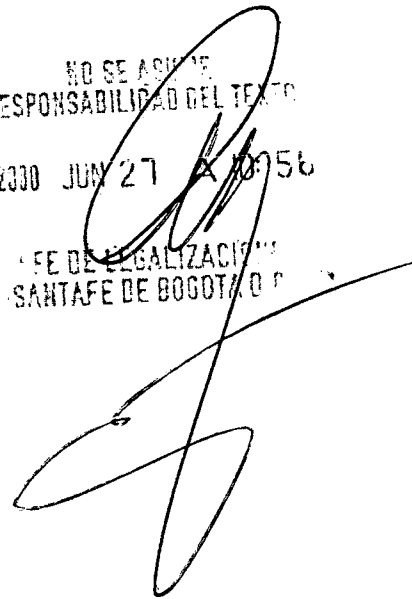
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Extorio
128232
Tejeda
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2000 JUN 27 A 10:56

FE DE LEGALIZACION
SANTAFE DE BOGOTA D.C.





ASSIGNMENT

HOFFMANN-LA ROCHE INC. (Assignor), a corporation of the State of New Jersey, United States of America, having its principal place of business at Nutley, New Jersey, United States of America, hereby assigns to

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG (Assignee)
124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle, Switzerland

all of its right, title and interest for all countries of the world except the United States of America and its territories and possessions, in and to the invention described and claimed in an application for United States Patent, Case Docket No. 1092P, filed on July 12, 1999, entitled

VITAMIN D3 ANALOGS

by Andrew David Batcho, Bernard Michael Hennessy and Milan Radoje Uskokovic

as well as in any subsequent application(s) in all countries of the world, except the United States of America and its territories and possessions, which subsequent application(s) claims this application, Case Docket No. 1092P, as priority; and in respect of which invention and all such patent applications, domestic and foreign, on said invention, an assignment of all right, title and interest therein, for the whole world, in favor of Assignor was executed on July 09, 1999 by Andrew David Batcho, Bernard Michael Hennessy and Milan Radoje Uskokovic

The present assignment is for, but is not limited to, the following countries and is for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, Venezuela.

Assignor expressly assigns to Assignee the right to file corresponding patent applications in all countries of the world except the United States of America and to claim the priority date under any international treaty or convention of any of the above U.S. patent application(s) assigned by Assignor in this present Assignment. Assignor agrees to execute any additional assignments and writings as well as to perform any additional acts necessary to enable Assignee to enjoy the full rights of the present Assignment.

Nutley, New Jersey, U.S.A.
Date: July 28, 1999

HOFFMANN-LA ROCHE INC.

By: 
William H. Epstein
Assistant Secretary

ACKNOWLEDGMENT

United States of America)
State of New Jersey)
County of Essex)

On July 28, 1999, before me personally appeared William H. Epstein to me known to be the person described in the foregoing Assignment, who acknowledged that (s)he executed the foregoing Assignment on behalf of **Hoffmann-La Roche Inc.**, and that (s)he is empowered to execute the foregoing Assignment and to convey the rights granted thereunder.

Lou Ann Donatoni

LOU ANN DONATONI
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires March 26, 2003

STATEMENT

The aforementioned Assignor states that through Assignor's attorneys, the U.S. Patent and Trademark Office has informed me that that Office has given Serial Number 60/143,413 and filing date of July 12, 1999 to the United States patent application referred to as Case Docket No. 1092P in the foregoing Assignment.

Assignor further states that on July 28, 1999, its representative executed the foregoing Assignment and on that date Assignor did assign to F.Hoffmann-La Roche AG the right to claim the priority date of the above-mentioned U.S. patent application in respect of any subsequent corresponding foreign application and patents.

HOFFMANN-LA ROCHE INC.

By:

William H. Epstein

William H. Epstein
Assistant Secretary

Nutley, New Jersey, U.S.A.
Date: July 28, 1999

ACKNOWLEDGMENT

United States of America)
State of New Jersey)
County of Essex)

On July 28, 1999, before me personally appeared William H. Epstein, to me known to be the person described in the foregoing Assignment, who acknowledged that (s)he executed the foregoing Assignment on behalf of **Hoffmann-La Roche Inc.**, and that (s)he is empowered to execute the foregoing Assignment and to convey the rights granted thereunder.

Lou Ann Donatoni

LOU ANN DONATONI
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires March 26, 2003

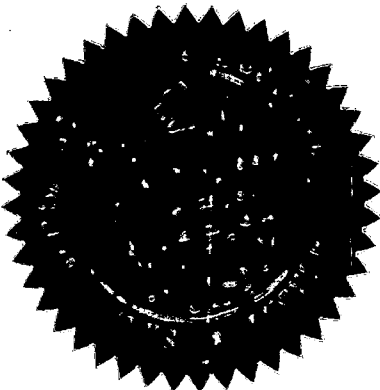


112-46

I, THE TREASURER OF THE STATE OF NEW JERSEY, DO HEREBY
CERTIFY THAT

LOU ANN DONATONI

THE OFFICER WHOSE NAME IS SUBSCRIBED TO THE CERTIFICATE
OF ACKNOWLEDGEMENT, PROOF OR AFFIDAVIT ATTACHED TO THE
ANNEXED INSTRUMENT, WAS AT THE TIME OF TAKING SAID
ACKNOWLEDGEMENT, PROOF OR AFFIDAVIT A NOTARY PUBLIC,
IN AND FOR THE STATE OF NEW JERSEY, DULY COMMISSIONED
AND SWORN AND WAS, AS SUCH, AN OFFICER OF SAID STATE,
DULY AUTHORIZED BY THE LAWS THEREOF TO TAKE AND
CERTIFY THE SAME, AS WELL AS TO TAKE AND CERTIFY THE
PROOF AND ACKNOWLEDGEMENT OF DEEDS AND OTHER INSTRUMENTS
IN WRITING TO BE RECORDED IN SAID STATE, AND THAT FULL
FAITH AND CREDIT ARE AND OUGHT TO BE GIVEN TO HIS OFFICIAL
ACTS.



IN TESTIMONY WHEREOF, I HAVE
HEREUNTO SET MY HAND AND AFFIXED
MY OFFICIAL SEAL AT TRENTON, THIS
24TH DAY OF APRIL
A.D. 2000.

Roland M Machold

Roland M Machold
TREASURER



REQUISITOS MINIMOS PARA ADI

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00051318 00000000

Folios: 116

Fecha (AMD): 2000-07-10 14:59:06

Tracite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION [✓]

MODELO DE UTILIDAD []

- Nombre e identificación del Solicitante (1)
- Nombre e identificación del Inventor (1)
- Título o nombre de la Invención (1)
- Descripción (6)
- Reivindicaciones (40)
- Resumen (5)
- Comprobante de Pago (2)

- [✓]
- [✓]
- [✓]
- [✓]
- [✓]
- [✓]
- [✓]

COMPLETA [✓]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario
- Nombre e identificación del inventor o diseñador
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse
- Representación gráfica
- Comprobante de pago

- []
- []
- []
- []
- []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha: _____

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 00-51318

Fecha: 11 de Julio del 2000.

Se certifica que:

Desde fecha 22 de junio de 1994
del folio 76.618 al folio 76.623 del
libro de Protocolo NO 259, obra el poder
NO 15.256 conferido por F. HOFFMANN LA
ROCHE A.G.

domiciliado(a) en Basilea - Suiza

al doctor JOSE LLOREDA CAMACHO y/o ALFONSO
LLOREDA CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLOREDA

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los
mismos

Facultad para desistir SI

Revisado

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

430.
2000) 07/11

EXPEDIENTE 00-51318

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- | | | |
|----------|--------|--|
| SI [x] | NO [] | NO APLICABLE [] Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a). |
| SI [x] | NO [] | NO APLICABLE [] Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94). |
| SI [x] | NO [] | NO APLICABLE [] Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de Enero del 2000) |
| SI [x] | NO [] | EXTEMPORANEAMENTE [] Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris. |
| SI [X] | NO [] | NO APLICABLE [] Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional. |
| SI [X] | NO [] | NO APLICABLE [] Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.). |
| SI [X] | NO [] | CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS |

OBSERVACIONES

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI [X] NO [] Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI [X] NO [] Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 11 de Julio del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.

202022

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

430.
2000/08/11

CONCEPTO TECNICO
EXPEDIENTE
IPC

1302
00 051.318
A 61 K 31/59

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto o finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c).
- SI ☒ NO ☐ Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980).
- SI ☒ NO ☐ Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el extracto y cumple con los requisitos para publicación (Art.14-c junto con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☐ NO ☒ Contiene el arte final del dibujo característico y cumple con los requisitos (Art.14-c junto con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).

SI ☒ NO ☐ CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C.,

EXAMINADOR TECNICO

Agosto 11 del 2000

202007

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TECNICO 1302
EXPEDIENTE 00 051.318
IPC A 61 K 31/59

Realizado el primer examen de forma de esta solicitud se hace la siguiente observación:

1. Debe adjuntarse el arte final de la fórmula química característica en papel fotográfico o papel mantequilla, tamaño 12 X 12 cm, por duplicado. Y otro, tamaño 6 X 6 cm, para la tarjeta del archivo temático.

EXAMINADOR TECNICO DE PATENTES 202007	JEFE DIVISIÓN NUEVAS CREACIONES	Santa Fe de Bogotá, D.C. Agosto 11 del 2000
--	------------------------------------	--

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

118

430.
2000/08/17

EXPEDIENTE 00-51318

AUTO 2427

LA JEFE DE DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE:

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor JOSE ANTONIO LLOREDA, como apoderado de la Sociedad solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido.

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérsele al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

15 AGO. 2000

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los _____

LA JEFE DE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., _____ notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

17 AGO 2000

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI _____ NO _____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA