

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

153
150

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 00051318 02202024

Folios: 17

Fecha (AMD): 2005-08-11 17:17:14

Tramite: 002 PATENTES 0 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

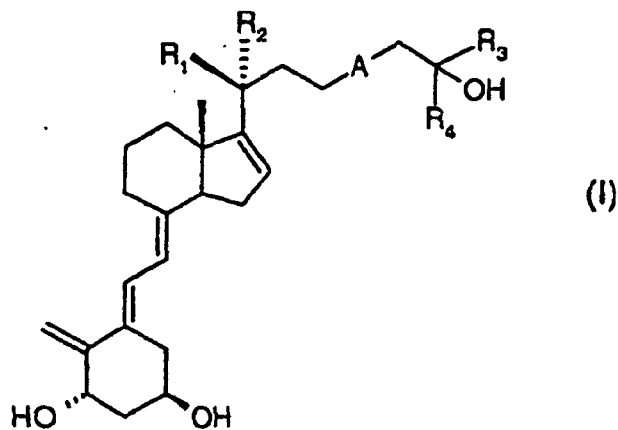
E. _____ S. _____ D. _____

Re: P1.-F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.-Solicitud de Patente de Invención
para "ANALOGOS DE VITAMINA D₃".-Clase A.61.-Expediente
número 00-051.318.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 19 de Mayo de 2005 y al memorial radicado el 7 de Septiembre de 2004 ante esa Oficina, en el cual se acredita mi calidad de Representante Legal respecto de la sociedad **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**

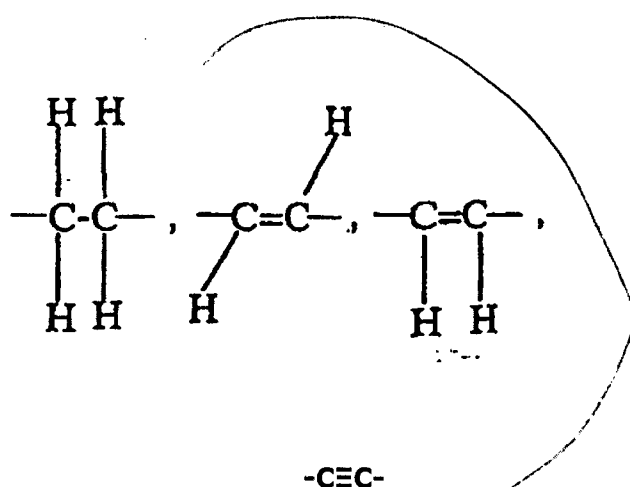
2. **OBJETO DE LA PRESENTE INVENCION**

Antes de entrar a discutir los argumentos que demuestran la novedad y el nivel inventivo de la presente invención, vale la pena llamar la atención de ese despacho al hecho de que el objetivo principal de la presente solicitud es el de proporcionar nuevos compuestos de la fórmula general



en donde A es

154
151

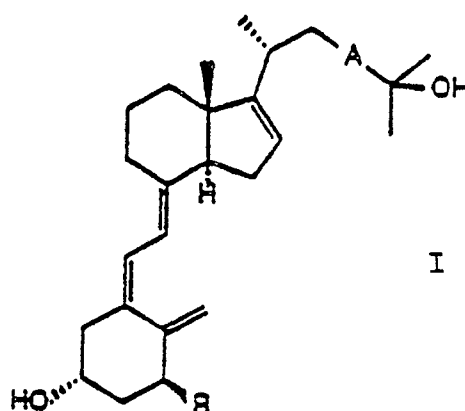


6

y R_1 , R_2 , R_3 y R_4 , son tal como se define en la descripción, o consisten en las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos de la presente invención se caracterizan por su sorprendente **actividad anti-androgénica**.

3. DOCUMENTO CITADO EN EL CONCEPTO TECNICO No. 689

El señor Examinador cita el documento **EP 0325279 (D1)** para objetar la novedad y el nivel inventivo de los compuestos de la presente invención. Dicho documento enseña compuestos de fórmula general (I)



los cuales son útiles como agentes para el tratamiento de enfermedades **hiperproliferativas**, como la psoriasis, y de enfermedades **neoplásicas** como la leucemia.

En conexión con lo anterior, atentamente me permito manifestar a esa Oficina que nada en el documento citado en el Concepto Técnico No. **689** resulta

155.
152

relevante para desvirtuar la novedad y el nivel inventivo de la materia objeto de la presente invención. Lo anterior se debe a que ninguno de los apartes del documento citado establecen en forma idéntica las características fundamentales que distinguen la materia objeto de la presente invención, y mucho menos le enseñan a una persona versada en la materia en forma obvia o evidente la sorprendente e inesperada actividad anti-androgénica de los compuestos particulares de la presente solicitud, tal y como me permito demostrarlo a continuación.

4. **ARGUMENTOS QUE REALZAN LA NOVEDAD DE LOS COMPUESTOS DE LA PRESENTE SOLICITUD**

El señor Examinador objeta la novedad de los compuestos de la presente invención, con base en las enseñanzas del documento D1, para lo cual afirma en su concepto técnico No. **689**, lo siguiente: "*La solicitud en estudio reclama compuestos derivados de vitamina D₃ sustituidos de la fórmula:*

[...]

- *La anterioridad D1 enseña los compuestos de fórmula:*

[...]

Igual que en la solicitud en estudio son derivados o análogos de la vitamina D₃, que cuando se hacen los reemplazos de los significados para cada uno sustituyentes, vemos compuestos reclamados en la solicitud en estudio no son nuevos porque la solicitud anterioridad los contiene, a lo largo de toda la descripción, también como sus métodos de obtención, por lo tanto los compuestos de la solicitud en estudio no tienen novedad."

Sobre este particular, atentamente me permito manifestar a ese Despacho que si bien los compuestos revelados en D1. resultan similares a los compuestos de la presente invención, estos últimos se diferencian de aquellos revelados en D1 en el hecho que poseen un grupo CH₂, unido mediante un doble enlace al anillo de cinco miembros en una posición diferente a la de los compuestos enseñados en D1, además de que tienen una cadena lateral corta diferente a la de los compuestos revelados en D1.

Tabla I. Diferencias entre las cadenas laterales los compuestos de D1 y los de la presente invención.

156
153

	EP 0325279	Presente Invención
Cadena Lateral	-CH₂-A-C(CH₃)₂OH, en donde A es -C≡C-, -C=CH- (configuración E), o -CH ₂ -CH ₂ -	-CH₂-CH₂-A-CH₂-C(R₃R₄)OH en donde A es -CH ₂ -CH ₂ -, -CH=CH- (en posición cis ó trans), ó -C≡C-

En efecto, si el señor Examinador dirige su atención a la cadena lateral de los compuestos revelados en D1, tal como se presenta en la tabla I, podrá notar que dicha cadena lateral corresponde a un grupo **-CH₂-A-C(CH₃)₂OH**, en donde A se selecciona de -C≡C-, -C=CH- (configuración E), o -CH₂-CH₂-. En vista de lo anterior, es claro que la cadena lateral de los compuestos del documento D1 contiene un esqueleto carbonado **de solo cuatro (4) átomos de carbono**.

Por el contrario, si se observa la cadena lateral de los compuestos de la presente solicitud (ver tabla I), dicha cadena corresponde a un grupo **-CH₂-CH₂-A-CH₂-C(R₃R₄)OH**, en donde A se selecciona de un grupo -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (en posición cis ó trans), ó -C≡C-, por lo que la cadena lateral de los compuestos de la presente solicitud corresponde a una cadena **con un esqueleto carbonado de seis (6) átomos de carbono, diferente a la cadena de solo 4 átomos de carbono revelada en D1**, por lo que no resultan iguales los compuestos de la presente solicitud a aquellos revelados en el arte anterior, representado por el documento D1. Por ende, la anterior afirmación del señor Examinador en el Concepto Técnico citado resulta del todo equivocada, toda vez que no ha considerado tanto la cadena lateral de los

157
154

compuestos en cuestión, como las diferencias en cuanto a la actividad de los compuestos reivindicados en la presente invención, y los revelados en D1.

En consecuencia, resulta evidente que **los compuestos que son objeto de la presente solicitud se diferencian claramente de los compuestos revelados en D1 por la posición del CH₂ sobre el anillo de cinco miembros y por la longitud de la cadena lateral, excluyendo por completo** cualquier posibilidad de que los compuestos reivindicados en la presente solicitud **lleguen a ser iguales al menos a uno de los compuestos enseñados en el documento D1**. Por lo tanto, resulta completamente evidente que los compuestos de la presente invención tienen **características estructurales completamente NOVEDOSAS, las cuales no habían sido enseñadas por ninguno de los compuestos revelados en el estado del arte representado por D1** y por tanto, es innegable que **la presente solicitud cumple efectivamente con el requisito de novedad exigido por la legislación Andina**, para poder gozar del privilegio de patente solicitado. En relación con lo anterior, los compuestos que hacen parte del estado del arte, no abarcan ninguno de los compuestos reivindicados en la presente invención.

5. **ARGUMENTOS QUE REALZAN EL NIVEL INVENTIVO DE LOS COMPUESTOS DE LA PRESENTE SOLICITUD.**

Con relación al análisis de nivel inventivo realizado por el señor Examinador, atentamente me permito manifestar a esa Oficina que el documento **D1** no resulta relevante para desvirtuar la altura inventiva de la presente solicitud. En efecto, el señor Examinador no tiene en cuenta para hacer su análisis del nivel inventivo, el hecho de que existen diferencias estructurales entre los compuestos en cuestión y los del estado del arte (D1). Las anteriores diferencias resultan relevantes, y no podrían resultar obvias o evidentes para una persona medianamente versada en la materia, toda vez que dicha persona no encontraría ninguna indicación o sugerencia en las enseñanzas del documento D1 que le permitiera poder llegar a pensar en realizar las modificaciones que se deben llevar a cabo tanto sobre la cadena lateral, como sobre la posición del grupo CH₂ del anillo de cinco miembros encontrados en los compuestos revelado en D1, para poder llegar a obtener compuestos idénticos a los reivindicados en la presente invención.

158
155

Aún más, resulta imposible que el documento D1 enseñe o indique el remplazo de una cadena lateral de 4 átomos de carbono, por una de 6 átomos de carbono junto con el cambio en la posición del grupo CH₂ sobre el anillo de cinco miembros, toda vez que el sustituyente A siempre corresponderá a un grupo con máximo 2 átomos de carbono. De esta manera, la cadena lateral de los compuestos de D1 siempre tendrá como máximo una longitud de 4 átomos de carbono, lo que indica que no puede ser igual a una cadena lateral con un esqueleto de 6 átomos de carbono, dos de los cuales corresponden al sustituyente A, el cual se enseña en los compuestos de la presente invención. En vista de lo anterior, resulta claro que la persona que decidiera emplear dicho documento no encontraría motivación alguna para llevar a cabo el reemplazo necesario en la cadena lateral, toda vez que D1 tan solo enseña una cadena lateral de 4 átomos de carbono, tal y como ya se ha mostrado.

En vista de las claras diferencias estructurales existentes, y del hecho que ninguna de dichas diferencias puede ser derivada de las enseñanzas del documento D1, es claro que cuando el señor Examinador afirma que "(...) *los compuestos reclamados solo se diferencian de los compuestos de vitamina D activos en el doble enlace sobre el anillo de cinco miembros, lo cual para una persona versada en la materia no implica un avance tecnológico. Por lo tanto se observa que no tiene nivel inventivo*", está llevando a cabo un análisis de patentabilidad equivocado, toda vez que no solo está desconociendo las diferencias estructurales existentes en la cadena lateral entre los compuestos que enseña D1, y los que reivindica la presente solicitud, sino que además desconoce las ventajas técnicas de los compuestos reivindicados al afirmar, en forma errada, que los compuestos ahora reivindicados no implican un avance tecnológico.

Por el contrario, como bien lo puede notar el señor Examinador, los compuestos de la presente invención muestran una sorprendente actividad anti-androgénica, la cual los hace útiles para el tratamiento del cáncer, en particular del cáncer de próstata (ver página 2, línea 26 a página 3, línea 2 de la descripción), tal y como se puede apreciar en la tabla 1, página 14 de la descripción, en donde se muestra claramente que al emplear el compuesto 1,25(OH)₂-16-en-5,6-trans-D₃ en una cantidad de 0,1 µg, se inhibe en un 77% tanto el crecimiento de la

159
156

próstata, como en un 48% el de la vesícula seminal en un estudio realizado en Hamsters.

Los resultados obtenidos con los compuestos de la presente invención, demuestran en forma contundente que la misma constituye efectivamente un avance tecnológico al proporcionar una alternativa efectiva para el tratamiento del cáncer de próstata, lo cual no es indicado o siquiera sugerido por las enseñanzas del documento citado como el estado del arte más cercano (D1). Por lo tanto, no hay dentro de las enseñanzas del documento D1, ninguna indicación o sugerencia que motivara a la persona medianamente versada en la materia a emplear sus enseñanzas para realizar las modificaciones estructurales necesarias y de esta manera poder llegar a obtener los compuestos de la presente invención, con la sorprendente actividad anti-androgénica resultante la cual no es enseñada en ninguno de los apartes del documento citado (D1). Por ende, no es posible que la presente invención sea considerada como una derivación evidente de la materia allí enseñada.

En consecuencia, se puede decir que **D1 enseña compuestos químicos diferentes en su estructura a los compuestos enseñados en la presente invención, de tal forma que los compuestos que se encuentran dentro del alcance de la presente solicitud no resultan derivables de las enseñanzas de D1.** Aún más, el documento D1 no presenta ningún indicio que pudiera dirigir a la persona medianamente versada en la técnica a modificar los compuestos allí revelados, para llegar a obtener los nuevos e inventivos compuestos de la presente solicitud. De igual manera, mucho menos puede dicha referencia llegar a sugerir o anticipar la sorprendente actividad anti-androgénica que presentan los compuestos de la presente solicitud. Por lo tanto, los compuestos revelados en la presente invención son **INVENTIVOS** frente a aquellos revelados en D1.

6. CONSIDERACIONES DEL MANUAL ANDINO DE PATENTES

Adicionalmente, con respecto a las objeciones realizadas sobre la novedad y la altura inventiva de la presente solicitud, me permito llamar la atención de esa Oficina a lo que sobre el tema establece el **Manual Andino de Patentes**, en aras de obtener una correcta evaluación de la patentabilidad de una solicitud.

7

160
157

De igual manera, es necesario llamar la atención de ese Despacho al hecho de que dicho Manual Andino de Patentes es un documento que ha sido editado por la misma **Secretaría General de la Comunidad Andina, con la colaboración de la OMPI, la EPO y las oficinas de Propiedad Industrial de los países miembros de la CAN.**

En este sentido, es claro que dicho Manual Andino de Patentes **debe servir de guía para la evaluación de las solicitudes de patente en los países miembros de la CAN, y que no se deben dejar de lado estos lineamientos al momento de estudiar una solicitud de patente.**

Por lo tanto, para un correcto análisis del requisito de novedad frente a las enseñanzas del documento D1, el Manual Andino de Patentes enseña en su numeral **"9.4 Análisis de Novedad"**, lo siguiente: *"Para determinar la novedad de la invención, se debe comprobar si existen anticipaciones del estado de la técnica que contengan explícitamente todas las características técnicas esenciales de la invención."*¹ (resaltado fuera de texto).

en la
técnica

En conexión con lo anterior, y en vista de las diferencias estructurales existentes entre los compuestos de D1 y los de la presente solicitud, es claro que de acuerdo con las enseñanzas del citado Manual Andino, se ha demostrado en el presente escrito que los compuestos de D1 no enseñan en forma idéntica todas y cada una de las características fundamentales de los compuestos de la presente solicitud, en virtud de lo cual las enseñanzas de la citada referencia no pueden afectar la novedad de los compuestos de la presente solicitud, como en forma equivocada pretende hacerlo entender el señor Examinador en su Concepto Técnico anteriormente citado.

del cit. s.
técnica

Lo anterior se ve reafirmado por el mismo Manual Andino de Patentes, el cual en otro de sus apartes enseña que: *"Sí una característica aunque sea banal, no se encuentra contenida en el antecedente, la reivindicación es nueva."*². Por lo tanto, como el documento citado por el señor Examinador **no enseña ninguna de las diferencias estructurales que existen entre los compuestos de la presente solicitud y los del estado del arte**, se aplican las enseñanzas del Manual Andino

¹ COMUNIDAD ANDINA, Secretaría General, "Manual Andino de Patentes", 2ª ED. 2004, Lima, Perú. página 65.

² Ibid, página 66.

161
158

de Patentes en el presente caso, resultando novedosa la materia objeto de la presente invención, debido a que D1 no contiene las enseñanzas de anticipar el cambio de la posición del grupo CH₂ sobre el anillo de cinco miembros y la mayor longitud de la cadena lateral, como ocurre en la presente solicitud.

De otra parte, el citado Manual Andino, enseña que para una correcta evaluación del nivel inventivo frente a las enseñanzas del documento D1, su acápite "**10.1 Requisitos del Artículo 18**", establece lo siguiente: *"Para juzgar si la invención definida por las reivindicaciones realmente se deriva de manera evidente del estado de la técnica, **hay que determinar si carece de nivel inventivo cuando se consideran las diferencias entre esta y el estado de la técnica más cercano.**"*³ (resaltado fuera de texto).

De acuerdo con lo que establece el citado Manual Andino de Patentes, es claro que en este caso lo realmente importante para poder determinar el nivel inventivo de los compuestos reivindicados en la presente invención, radica en el hecho de que **existen claras y notorias diferencias estructurales entre los compuestos del estado de la técnica más cercana (D1), y los enseñados en la presente solicitud.** Adicionalmente, dichas diferencias de ninguna manera hubieran podido ser derivadas en forma evidente a partir de las enseñanzas del mismo documento D1, junto con los conocimientos de una persona medianamente versada en la materia.

Además, el mismo Manual Andino establece que *"...el examinador debe realizar el esfuerzo intelectual de colocarse en la situación que ha tenido que afrontar el técnico con conocimientos medios en la materia en un momento en que la invención no era conocida, es decir antes de la invención."*⁴. De no ser así, cualquier modificación o reemplazo en la estructura de los compuestos de D1 para llegar a obtener aquellos reivindicados en la presente invención, una vez estos ya han sido conocidos, resultaría evidente. Por el contrario, si el señor Examinador se traslada al momento en el que el solicitante intenta llegar a obtener los compuestos ahora reivindicados, podrá determinar que a pesar de la existencia de las enseñanzas de D1, no encontraría ninguna indicación que lo llevara a intentar realizar las modificaciones estructurales necesarias sobre los compuestos de la

³ Ibid. páginas 76-77.

⁴ Ibid, página 78.

162
159

citada referencia, que lo llevarían a obtener los compuestos de la presente invención.

En este orden de ideas, el Manual Andino de Patentes confirma la existencia de la novedad y el nivel inventivo de los compuestos de la presente solicitud, toda vez que de acuerdo con sus enseñanzas, la materia objeto del documento **EP 0325279 (D1)** citado por el señor Examinador, no resulta relevante para objetar la patentabilidad de la presente invención, toda vez que no contiene ninguna enseñanza o sugerencia que anticipe las modificaciones estructurales y la sorprendente actividad anti-androgénica que presentan los compuestos reclamados en la presente invención.

7. Como un hecho adicional que permite corroborar los argumentos expuestos anteriormente tendientes a realzar la novedad y el nivel inventivo de los análogos de vitamina D₃ que son objeto de la presente invención, atentamente me permito manifestar a ese Despacho que la patentabilidad del objeto de la presente solicitud ha sido reconocida y aceptada por parte de la **Oficina de Europa de Patentes**, como Patente número **EP 1200399 B1**, y por parte de la **Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos**, como Patente número **US 6331642 B1**, en donde se han suscitado objeciones similares. Sin embargo, el hecho de que la referencia citada en ninguno de sus apartes enseña los compuestos de la presente invención y mucho menos su sorprendente actividad anti-androgénica ha sido suficiente para que se reconozca la patentabilidad de la presente solicitud. En particular, resulta relevante para el estudio que adelanta actualmente ese Despacho sobre la presente solicitud, el hecho de que haya sido concedida la misma materia objeto de la presente invención por parte de una oficina como la Europea, con la cual guarda cierta similitud la legislación Andina en materia de Patentes.

es concedido compuestos de la técnica ergocaliferol y calciferol
#

En conexión con lo anterior, el solicitante reconoce que cada país es independiente de conceder o negar una solicitud de patente, luego de la realización del estudio de fondo. Sin embargo, el hecho de que los expertos de una oficina como la Europea hayan considerado que los compuestos análogos de la vitamina D₃ reivindicados, poseen la novedad, el nivel inventivo y la aplicación industrial requeridas para gozar del privilegio de patente solicitado. Adicionalmente, resulta adecuado recordar que los estándares de conocimiento

163
160

de las personas que laboran en un área particular de tecnología está siendo cada vez más uniforme y, por consiguiente, el hecho de que la novedad y la altura inventiva de una invención hayan sido reconocidas por parte de las oficinas mencionadas anteriormente, es **un indicio que resulta mas que razonable a la hora de evaluar si la** invención cumple con los requerimientos exigidos de Novedad, Nivel Inventivo y Aplicación Industrial, de acuerdo con la Legislación Andina.

Por lo tanto, se debe tener en cuenta que el hecho de que haya sido concedida la misma materia objeto de la presente invención en otros países, no constituye una intromisión en la soberanía de un país, sino que es una herramienta más para ser empleada en la evaluación de la patentabilidad de una solicitud que se encuentra bajo estudio. En consecuencia, atentamente solicito a ese Despacho considerar estos hechos como relevantes para conceder el privilegio solicitado.

8. **CONCLUSION**

En conclusión, los argumentos aquí presentados con respecto a las enseñanzas del documento D1 citado por el señor Examinador, demuestran de forma irrefutable la existencia de diferencias técnicas entre los compuestos de la presente invención y los del estado del arte más cercano. Por tanto, dicho documento no se puede considerar relevante para desvirtuar ni la novedad, ni el nivel inventivo de la presente solicitud, toda vez que no revela en forma idéntica la materia objeto reclamada, quedando de esta manera demostrada la **NOVEDAD** de la presente solicitud.

Adicionalmente, las diferencias existentes entre las estructuras y la actividad resultante de los compuestos de la presente solicitud frente a los revelados en el documento D1, no pueden resultar obvias o evidentes para una persona versada en la materia que tuviera a su disposición las enseñanzas de dicho documento, tal y como ya se ha discutido en el presente escrito, por lo cual los compuestos ahora reivindicados resultan completamente **INVENTIVOS** sobre las enseñanzas de la referencia citada, toda vez que ninguno de los apartes de dicho documento enseñan o siquiera sugieren las modificaciones estructurales que sería necesario realizar sobre los compuestos de D1 para poder llegar a obtener la sorprendente actividad anti-androgénica de los compuestos reivindicados en la presente

?

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

164
161

solicitud, lo cual los hace útiles para el tratamiento del cáncer de próstata, hecho que no es indicado de ninguna manera en el documento citado.

9. Anexo me permito presentar copia de la carátula y las reivindicaciones de las correspondientes patentes concedidas por parte de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos, y de la Oficina Europea, bajo los números **US 6,331,642 B1** y **EP 1200399 B1**, como se expuso anteriormente.

10. En vista de todo lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las argumentaciones presentadas, y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,


GUSTAVO TAMAYO

T.P. 37.172

N. Courde
conferir el novedad
usando solo la 165
162



US006331642B1

(12) **United States Patent**
Batcho et al.

(10) **Patent No.: US 6,331,642 B1**
(45) **Date of Patent: Dec. 18, 2001**

(54) **VITAMIN D₃ ANALOGS**

(75) **Inventors:** Andrew David Batcho, North Caldwell; Bernard Michael Hennessy, Nutley; Milan Radoje Uskokovic, Upper Montclair, all of NJ (US)

(73) **Assignee:** Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, NJ (US)

(*) **Notice:** Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) **Appl. No.: 09/578,324**

(22) **Filed: May 24, 2000**

Related U.S. Application Data

(60) Provisional application No. 60/143,413, filed on Jul. 12, 1999.

(51) **Int. Cl.⁷** C07C 401/00; A61K 31/59

(52) **U.S. Cl.** 552/653; 514/167

(58) **Field of Search** 552/653; 514/167

(56) **References Cited**

U.S. PATENT DOCUMENTS

4,749,710	6/1988	Truitt et al.	514/167	
5,087,619	*	2/1992	Baggiolini et al.	514/167
5,401,733	*	3/1995	Mclane et al.	514/167
5,428,029	*	6/1995	Doran et al.	514/167
5,451,574	*	9/1995	Baggiolini et al.	514/167
6,040,300	*	3/2000	Brasitus et al.	514/167

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

0 796 843 9/1997 (EP).

OTHER PUBLICATIONS

Hisatake et al. (Cancer Res. 59(16), pp. 4023-4029, (Aug. 15, 1999).*

Baggiolini et al. (CA 112:36267, abstract of EP 325,279), 1989.*

Zhang et al. (CA 122:72583, abstract of Cell Proliferation (1994), 27(11), 643-54).*

Schwartz et al. (CA 121:292155, abstract of Anticancer Res. (1994), 14(3A), 1077-81).*

Lamire et al. (CA 122:24528, abstract of Endocrinology (1994), 135(6), 2818-21).*

Jung et al. (CA 122:159343, abstract of Han'guk Yongyang Siklyong Hakhoechi (1994), 23(3), 443-52).*

Bishop et al. (CA 122:76909, abstract of J. Bone Miner. Res. (1994), 9(8), 1277-88, 1989.*

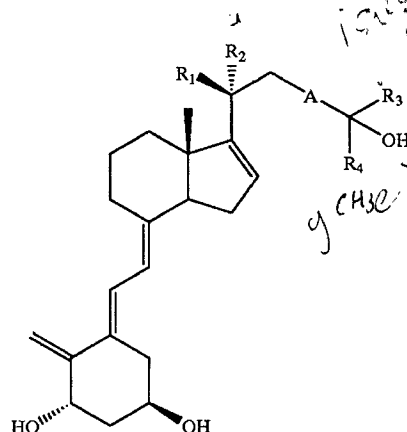
* cited by examiner

Primary Examiner—Sabiha Qazi

(74) **Attorney, Agent, or Firm**—George W. Johnston; Patricia S. Rocha-Tramalon; Robert A. Silverman

(57) **ABSTRACT**

Compounds of the formula

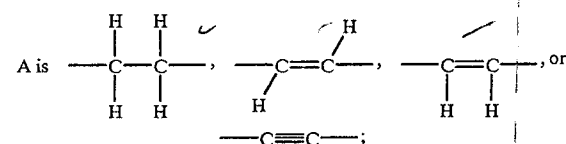


wherein

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.

7 Claims, No Drawings

1) en condiciones
de ergocalciferol y de calciferol.
= a la agui presentada.

166
163

-continued

<223> OTHER INFORMATION: Description of Artificial Sequence: primer for GAPDH (antisense)

<400> SEQUENCE: 4

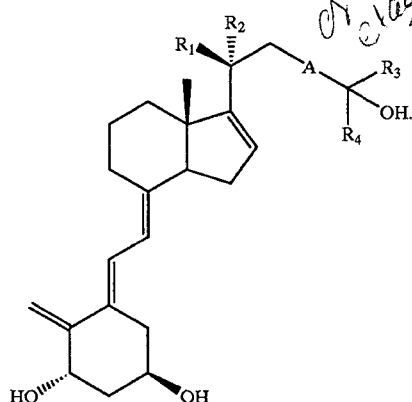
caaagttgtc atggatgacc

20

What is claimed is:

1. A compound of the formula

-continued
—CH₂—CH₂—;



10

15

20

25

30

35

R₃ is alkyl, hydroxy-alkyl or fluoroalkyl; and
R₄ is a alkyl, hydroxyalkyl or fluoroalkyl.

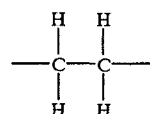
2. A compound in accordance with claim 1 wherein R₁ is hydrogen and R₂ is alkyl or R₁ is alkyl and R₂ is hydrogen.

3. A compound in accordance with claim 2 wherein R₁ is hydrogen and R₂ is methyl or R₁ is methyl and R₂ is hydrogen.

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

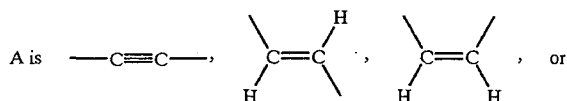


wherein

R₁ is hydrogen or an alkyl group;

R₂ is hydrogen or an alkyl group; or

R₁, R₂ and C₂₀ together are cyclopropyl;



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

* * * * *

167
167

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11) EP 1 200 399 B1

(12)

EUROPEAN PATENT SPECIFICATION

- (45) Date of publication and mention of the grant of the patent:
24.03.2004 Bulletin 2004/13

(51) Int Cl.7: C07C 401/00, A61K 31/59
- (21) Application number: 00954438.8

(86) International application number:
PCT/EP2000/006393
- (22) Date of filing: 06.07.2000

(87) International publication number:
WO 2001/004089 (18.01.2001 Gazette 2001/03)

(54) VITAMIN D3 ANALOGS

VITAMIN D3 ANALOGA

ANALOGUES DE VITAMINE D3

(84) Designated Contracting States: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE Designated Extension States: LT LV RO SI (30) Priority: 12.07.1999 US 143413 P (43) Date of publication of application: 02.05.2002 Bulletin 2002/18 (73) Proprietor: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG 4070 Basel (CH)	(72) Inventors: - BATCHO, Andrew, David North Caldwell, NJ 07006 (US) - HENNESSY, Bernard, Michael Nutley, NJ 07110 (US) - USKOKOVIC, Milan, Radoje Upper Montclair, NJ 07043 (US) (74) Representative: Witte, Hubert, Dr. et al 124 Grenzacherstrasse 4070 Basel (CH) (56) References cited: EP-A- 0 325 279 EP-A- 0 796 843
---	---

EP 1 200 399 B1

Note: Within nine months from the publication of the mention of the grant of the European patent, any person may give notice to the European Patent Office of opposition to the European patent granted. Notice of opposition shall be filed in a written reasoned statement. It shall not be deemed to have been filed until the opposition fee has been paid. (Art. 99(1) European Patent Convention).

168
165

EP 1 200 399 B1

(continued)

Soft Gelatin Capsule Formulation I		
Item	Ingredients	mg/Capsule
2	Butylated Hydroxytoluene (BHT)	0.016
3	Butylated Hydroxyanisole (BHA)	0.016
4	Miglyol 812 qs.	160.0

Manufacturing Procedure:

[0088]

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.
4. Fill the solution from Step 3 in soft gelatin capsules.

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

Example 11

[0089]

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:

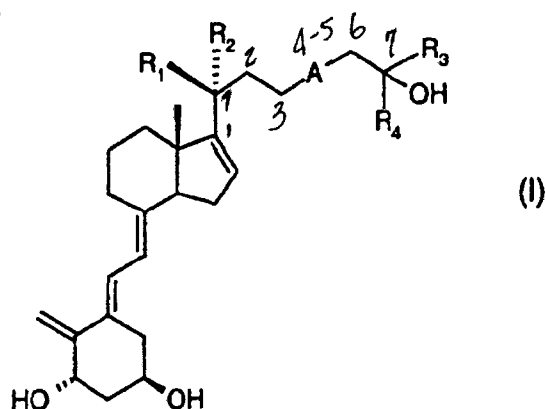
[0090]

1. Suspend di-α-Tocopherol 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.
4. Fill the solution from Step 3 in soft gelatin capsules.

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

Claims

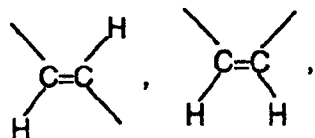
1. A compound of the formula



wherein

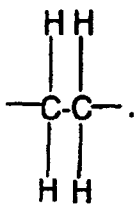
20

R_1 is hydrogen or a C_1 - C_4 -alkyl group;
 R_2 is hydrogen or a C_1 - C_4 -alkyl group; or
 R_1 , R_2 and C_{20} together are cyclopropyl;
 A is $—C\equiv C—$,



or $—CH_2-CH_2—$;
 R_3 is C_1 - C_4 -alkyl, hydroxy- C_1 - C_4 -alkyl or fluoro- C_1 - C_4 -alkyl; and
 R_4 is C_1 - C_4 -alkyl, hydroxy- C_1 - C_4 -alkyl or fluoro- C_1 - C_4 -alkyl.

- 35
2. A compound in accordance with claim 1 wherein R_1 is hydrogen and R_2 is C_1 - C_4 -alkyl or R_1 is C_1 - C_4 -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.
- 40
4. A compound in accordance with claim 3 wherein R_3 and R_4 are, independently, C_1 - C_4 -alkyl, hydroxy- C_1 - C_4 -alkyl or trifluoro- C_1 - C_4 -alkyl.
5. A compound in accordance with claim 4 wherein R_3 and R_4 are, independently, methyl, hydroxy-methyl or trifluoro-methyl.
- 45
6. A compound in accordance with claim 5 wherein A is



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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

170
167

375.
2005/09/22

2020/
Bogotá, D.C.,

Doctora
Alicia Lloreda Ricaurte
Apoderado
F. HOFFMANN – LA ROCHE

Oficio N° 8578

REFERENCIA	Radicación	00 51318
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Folios	013

Como resultado del examen de patentabilidad de la solicitud de patente de invención N° 00 51318, realizado según el artículo 45 de la decisión 486 de la comisión de la Comunidad Andina, se notifica:

1. DOCUMENTOS ESTUDIADOS:

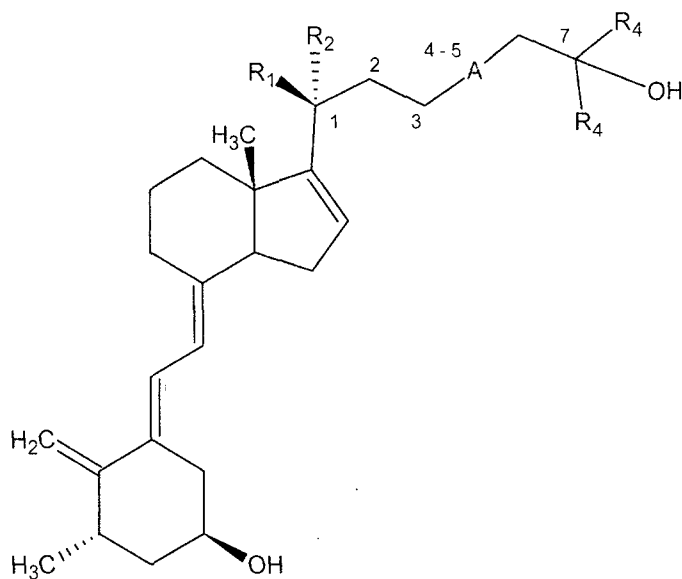
- El resumen y el capítulo descriptivo de la solicitud de los folios 5 y 6 a 25 respectivamente.
- Los ejemplos que ilustran la solicitud en los folios 26 a 38.
- Las cláusulas 1 a 7 relacionadas en el capítulo reivindicatorio de la solicitud y que se encuentran en los folios 40 y 41.
- Copia de la solicitud original mediante la cual se reivindica prioridad de Estados Unidos US60/143,413 de 12/07/1999 en los folios 51 a 86, junto con su traducción correspondiente en los folios 48 a 50.
- Primer examen de forma de la solicitud correspondiente a los folios 119 a 122.
- Segundo examen de forma de la solicitud y que se encuentra en el folio 124.
- Solicitud de examen de patentabilidad que se encuentra en los folios 127 a 129.
- Examen de fondo No. 689 realizado por esta Dependencia en virtud del artículo 45 de la Decisión 486, que se encuentra en los folios 137 a 152.
- El memorial de respuesta allegado a esta Superintendencia en la fecha 11/08/2005, producto de las recomendaciones formuladas en el examen de fondo No. 689 y que se encuentra en los folios 153 a 169.

2. OBJETO DE LA INVENCION

La solicitud hace referencia a "**Análogos de vitamina D3**".

• Reivindicaciones 1 a 7:

Se reivindica un compuesto de fórmula:

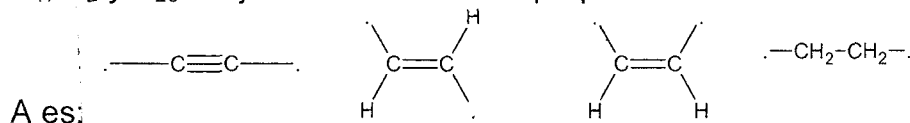


En donde

R₁ es H o alquilo

R₂ es H o alquilo

R₁, R₂ y C₂₀ conjuntamente son ciclopropilo



R₃ es alquilo, hidroxi-alquilo o fluoro-alquilo y

R₄ es alquilo, hidroxi-alquilo o fluoro-alquilo

Una vez catalogada la invención ésta se clasificó en la sección: **A 61 K³¹/59** de la **Clasificación Internacional de Patentes**

3. DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA:

Consultadas las fuentes de información con que cuenta este Despacho, se encontraron los siguientes documentos, anteriores a la fecha de presentación de la solicitud en estudio - 12.07.1999-, relacionados con la materia técnica reivindicada:

Nº	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	EP0325279	"Dehydrocholecalciferolderivative"	26/07/1989
D2	Artículo 1	"Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines"	1993
D3	Artículo 2	"Actions of vitamin D3 analogs on human prostate cancer cell lines: comparison with 1,25-dihydroxyvitamin D3"	1995 Received 29/07/1994

Artículo 1: R.J. SKOWRONSKI, D.M. PEEHL, D. FELDMAN. Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines. Department of Medicine, Stanford University School of Medicine. Endocrinology, Vol 132, 1952-1960.

Artículo 2: Roman J. SKOWRONSKI, Donna M. PEEHL, David FELDMAN. Actions of vitamin D3 analogs on human prostate cancer cell lines: comparison with 1,25-dihydroxyvitamin D3. Department of medicine and urology. Stanford University School of Medicine. Endocrinology. Vol 136, No. 1. 1995.

4. EVALUACIÓN DE LOS REQUISITOS DE PATENTABILIDAD:

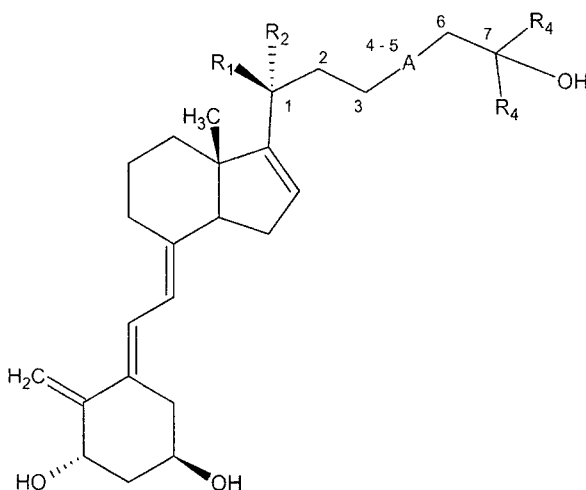
El artículo 14 de la decisión 486 de la comisión de la comunidad andina establece que: *"Los países miembros otorgarán patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial"*

En cumplimiento del artículo 14 de la decisión 486 de la comisión de la comunidad andina, se procedió a evaluar los requisitos de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial con el fin de establecer la patentabilidad de la invención reivindicada en la solicitud en estudio.

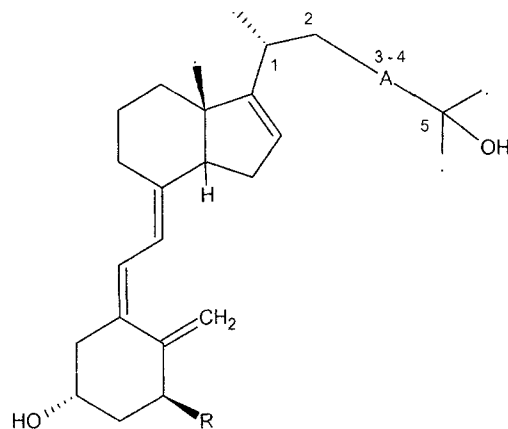
4.1 Evaluación de NIVEL INVENTIVO

El artículo 18 de la decisión 486 dispone *"Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la Materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica."*

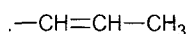
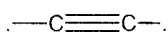
La solicitud en estudio reclama compuestos derivados de vitamina D3 sustituidos de fórmula:



La anterioridad **D1** enseña los compuestos de fórmula:

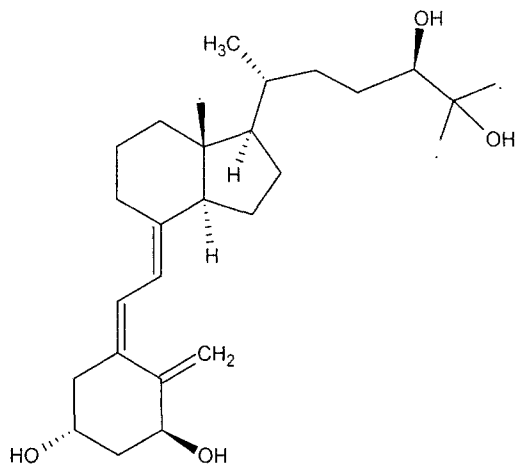


Donde A es:



con configuración E

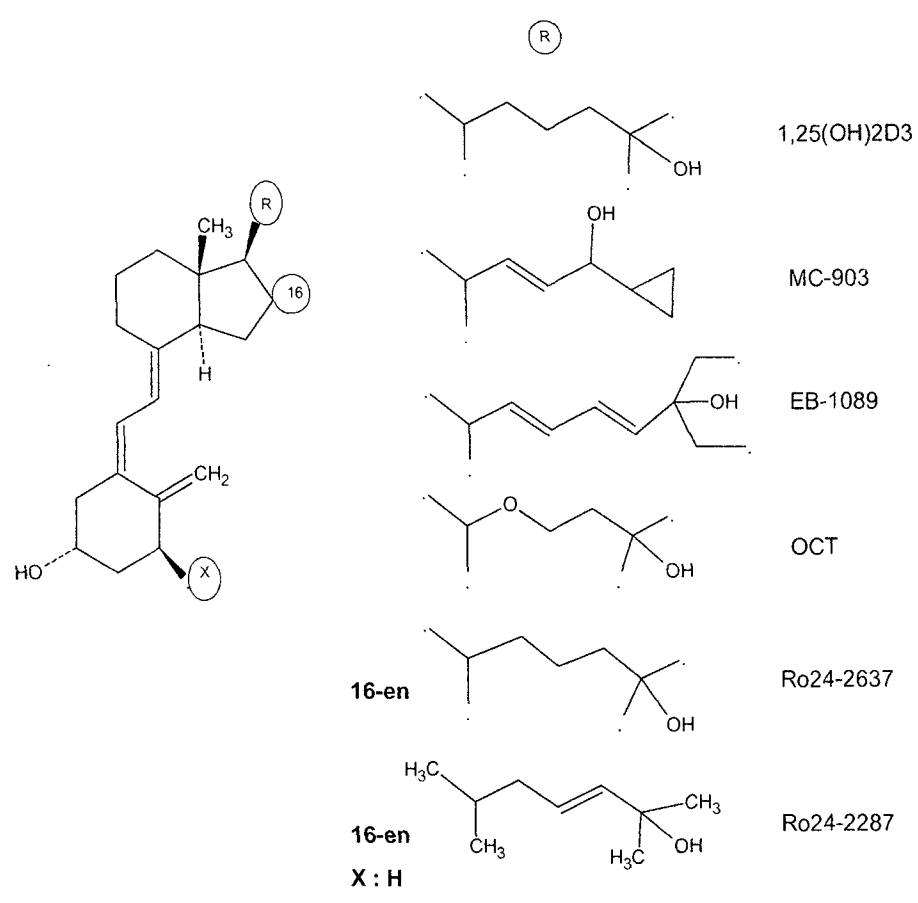
La anterioridad **D2** presenta un estudio sobre tres líneas celulares de carcinoma prostático: LNCaP, DU-145 y PC-3 a las cuales se les estudió la presencia de receptores específicos para la molécula 1,25-dihidroxi-vitamina D3 (VDRs) por métodos de inmunocitoquímica, a fin de evaluar a profundidad el efecto de la hormona sobre la proliferación y diferenciación celular. Para la medición del efecto se determinaron los niveles fisiológicos de 1,25(OH)₂D₃, encontrándose que efectivamente la presencia y alta afinidad del compuesto por los receptores VDR inhibieron dramáticamente la proliferación celular en las líneas LNCaP y PC-3. En el caso de la línea celular DU-145, no obstante la alta afinidad por los receptores VDR, la proliferación no fue inhibida por las dosis del compuesto 1,25(OH)₂D₃ suministradas.



En general y de acuerdo con el estudio se presenta una estimulación dosis dependiente en la producción de las secreciones antigénicas prostáticas y específicas de la línea celular LNCaP cuando se administra el compuesto 1,25(OH)₂D₃, hecho que demuestra la presencia de los receptores VDR en las tres líneas celulares de carcinoma prostático humano y la actividad terapéutica antiproliferativa del compuesto 1,25(OH)₂D₃, lo cual pone de manifiesto la hipótesis acerca del efecto benéfico de la vitamina D en los casos de riesgo de carcinoma prostático.

La anterioridad **D3** presenta un estudio comparativo relacionado con la actividad de análogos de vitamina D3 como el compuesto 1,25-dihidroxi-vitamina D3 cuando se suministra en líneas celulares de carcinoma prostático. Dentro de los análogos de

vitamina D3 que fueron evaluados a través del presente estudio se encuentran los siguientes compuestos:



Estructura Química de análogos de vitamina D3 X=OH excepto en el compuesto Ro24-2287 donde X =H

De acuerdo con los resultados reportados los compuestos citados presentan alta afinidad por los receptores VDRs, hecho que permite inferir a una persona de nivel medio versada en la materia técnica que compuestos sustituidos en la posición 16 por cadenas carbonadas de más de 5 átomos –caso particular de la solicitud objeto del presente estudio – presentan resultados análogos en cuanto a la actividad terapéutica.

Este hecho se corrobora cuando en el aparte descriptivo de la solicitud se mencionan los ensayos clínicos que comprueban la actividad antiproliferativa, de los compuestos de la invención, sobre líneas celulares de carcinoma prostático como LNCaP; actividad medida a través del análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo y la determinación de la actividad de la telomerasa.

En este sentido es claro que se deriva del estado de la técnica el diseño de compuestos con actividad anticancerígena y con estructura análoga a la vitamina D3, si se conoce con antelación que las células de carcinoma prostático expresan en su membrana celular receptores de tipo VDRs con carácter específico para el metabolito activo de la vitamina D y sus análogos. Lo anterior aunado al hecho de que existen estudios clínicos como el que presenta la anterioridad **D2**, que revelan la actividad farmacológica del análogo de vitamina D3 1,25(OH)₂D₃, altamente afín a los receptores VDRs y se estudia la anterioridad **D3** que presenta ensayos clínicos con análogos sintéticos de vitamina D3, como los citados en el aparte anterior, con actividad anticancerígena, se corrobora el hecho de que los compuestos análogos presentados por la solicitud en estudio, que difieren en el número de átomos de carbono presentes en el sustituyente de la posición 16 y que más exactamente presentan dos átomos más en la cadena carbonada, son derivados del estado de la

172
175
técnica y su diseño es producto de la combinación de enseñanzas como las reveladas por los documentos **D2** y **D3**, que en consecuencia afectan claramente su nivel inventivo.

Si bien es cierto que el documento **D1** presenta compuestos que difieren en la cola carbonada de la posición 16, el mismo revela indicios y principios para el diseño de moléculas análogas que presenten actividad anticancerígena por derivarse de la estructura del dehidrocolecalfiferol – análogo de la vitamina D -.

Lo anterior hace que los documentos citados puedan afectar el nivel inventivo de la presente solicitud cuando se combinan las enseñanzas de la anterioridad **D2** y **D3** o se estudia de forma separada la anterioridad **D1**.

En consecuencia los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

Nº	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	EP0325279	1 a 7	Nivel Inventivo
D2	Artículo 1	1 a 7	Nivel Inventivo
D3	Artículo 2	1 a 7	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de la notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo 5 del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001

Álix Carmenza Céspedes de Vergel
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 22 SET. 2005

CONCEPTO TÉCNICO Número 01412	EXAMINADOR TÉCNICO Código 202044
----------------------------------	-------------------------------------

Endocrinology, Vol 132, 1952-1960, Copyright © 1993 by Endocrine Society

ARTICLES

Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines

RJ Skowronski, DM Peehl and D Feldman

Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, California 94305.

It has been suggested that vitamin D deficiency may promote prostate cancer, although the mechanism is not understood. In this study three human prostate carcinoma cell lines, LNCaP, DU-145, and PC-3, were examined both for the presence of specific 1,25 dihydroxyvitamin D3 [1,25 (OH)2D3] receptors (VDRs) and also employed to study the effects of hormone on cell proliferation and differentiation. Ligand binding experiments demonstrated classical VDR in all three cell lines examined with an apparent dissociation constant of 7.5, 5.4, and 6.3 x 10⁻¹¹ M for LNCaP, DU-145, and PC-3 cells, respectively. Corresponding binding capacity for the three prostate carcinoma cell lines were 27, 31, and 78 fmol/mg protein, respectively. The presence of VDR in the three cell lines was also confirmed by immunocytochemistry. In addition, one major 4.6-kilobase messenger RNA transcript hybridizing with a specific human VDR complementary DNA, probe was identified in all three cell lines. Interestingly, both DU-145 and PC-3 but not LNCaP cell lines exhibited 1,25(OH)2D3-stimulated induction of 24-hydroxylase messenger RNA employed as a marker of 1,25(OH)2D3 action. Physiological levels of 1,25(OH)2D3 dramatically inhibited proliferation of the LNCaP and PC-3 cell lines. However, in spite of the presence of high affinity VDR, proliferation of DU-145 cells was not inhibited by 1,25 (OH)2D3 at the doses tested. Treatment with 1,25(OH)2D3 caused a dose-dependent stimulation of prostate-specific antigen secretion by LNCaP cells. In conclusion, these results demonstrate that these three human prostate carcinoma cell lines all possess specific VDR and that 1,25(OH)2D3 treatment can elicit both an antiproliferative and a differentiating action on these cancer cells. The findings lend support to the hypothesis that vitamin D might exert beneficial actions on prostate cancer risk.

Full Text (PDF)

Alert me when this article is cited

Alert me if a correction is posted

Citation Map

Email this article to a friend

Similar articles in this journal

Similar articles in PubMed

Alert me to new issues of the journal

Download to citation manager

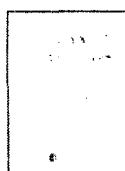
Cited by other online articles

Request Copyright Permission

PubMed Citation

Articles by Skowronski, R. J.

Articles by Feldman, D.

This article has been cited by other articles:**ENDOCRINE REVIEWS**

S. Nagpal, S. Na, and R. Rathnachalam

Noncalcemic Actions of Vitamin D Receptor Ligands

Endocr. Rev., August 1, 2005; 26(5): 662 - 687.

[Abstract] [Full Text] [PDF]

HOME

R. S. Savkur, K. S. Bramlett, K. R. Stayrook, S. Nagpal, and T. P. Burris

HOME

Actions Of Vitamin D₃ Analogs on Human Prostate Cancer Cell Lines: Comparison with 1,25-Dihydroxyvitamin D₃*

ROMAN J. SKOWRONSKI, DONNA M. PEEHL, AND DAVID FELDMAN

Departments of Medicine and Urology (D.M.P.), Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305

ABSTRACT

Data from epidemiological studies has suggested that vitamin D deficiency may promote prostate cancer, although the mechanism is not understood. We have previously demonstrated the presence of vitamin D receptors (VDR) in three human prostate carcinoma cell lines (LNCaP, PC-3, and DU-145) as well as in primary cultures of stromal and epithelial cells derived from normal and malignant prostate tissues. We have also shown that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃] can elicit an antiproliferative action in these cells. In the present study we compared the biological actions of 1,25-(OH)₂D₃ to those of a series of natural vitamin D₃ metabolites and several synthetic analogs of vitamin D₃ known to exhibit less hypercalcemic activity *in vivo*. In ligand binding competition experiments, we demonstrated the following order of potency in displacing [³H]1,25-(OH)₂D₃ from VDR: EB-1089 > 1,25-(OH)₂D₃ > MC-903 > 1,24,25-(OH)₂D₃ > 22-oxacalcitriol (OCT) > 1 α ,25-dihydroxy-16-ene-cholecalciferol (Ro24-2637) > 25-hydroxyvitamin D₃, with EB-1089 being ~2-fold more potent than the native hormone. No competitive activity was found for 25-hydroxy-16,23-diene-cholecalciferol. When compared for ability to inhibit proliferation of LNCaP cells, MC-903, EB-1089, OCT, and Ro24-2637 exhibited 4-, 3-, 3-, and 2-fold greater

inhibitory activity than 1,25-(OH)₂D₃. Interestingly, although OCT and Ro24-2637 exhibit, respectively, 10 and 14 times lower affinity for VDR than 1,25-(OH)₂D₃, both compounds inhibited the proliferation of LNCaP cells with a potency greater than that of the native hormone. The relative potency of vitamin D₃ metabolites and analogs to inhibit cell proliferation correlated well with the ability of these compounds to stimulate prostate-specific antigen secretion by LNCaP cells as well as with their potency to induce the 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase messenger RNA transcript in PC-3 cells.

In conclusion, these results demonstrate that synthetic analogs of vitamin D₃, known to exhibit reduced calcemic activity, can elicit antiproliferative effects and other biological actions in LNCaP and PC-3 cell lines. It is noteworthy that although binding to VDR is critical for 1,25-(OH)₂D₃ action, the analog data indicate that additional factors significantly contribute to the magnitude of the biological response. Finally, the strong antiproliferative effects of several synthetic analogs known to exhibit less calcemic activity than 1,25-(OH)₂D₃ suggest that these compounds potentially may be useful as an additional therapeutic option for the treatment of prostate cancer. (*Endocrinology* 136: 20-26, 1995)

THE ACTIVE hormonal form of vitamin D, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃], exerts its actions via specific intracellular vitamin D receptors (VDR) to modulate gene expression in a fashion analogous to the classical steroid hormones (1). In addition to being the major regulator of calcium homeostasis in the body (2, 3), current findings indicate that 1,25-(OH)₂D₃ is an important modulator of cellular proliferation and differentiation in a number of normal and malignant cells (4, 5). We have recently reported the presence of VDR in three established prostate cancer cell lines, LNCaP, DU-145, and PC-3, as well as in primary cultures derived from normal, benign prostatic hyperplasia, and prostate cancer tissues (6, 7). 1,25-(OH)₂D₃ mediates important biological functions in these cells, including antiproliferative and differentiating actions (6, 7). Such activity has the potential to be useful therapeutically. Recently, a number of vitamin D synthetic analogs have been developed that retain potentially useful properties of 1,25-(OH)₂D₃, but exhibit less

calcemic activity *in vivo* (8-16). In the present study, we compared the potency of a series of synthetic analogs of 1,25-(OH)₂D₃ to that of 1,25-(OH)₂D₃ and its naturally occurring metabolites. We examined the following properties: 1) binding affinity for VDR, 2) inhibition of cell proliferation, 3) stimulation of prostate-specific antigen (PSA) secretion by LNCaP cells (employed as a marker of cellular differentiation), and 4) induction of 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase (24-hydroxylase) messenger RNA (mRNA) by PC-3 cells (as a measure of a vitamin D-specific biological response). As will be described in this paper, the analogs include molecules with higher binding affinity and potency than 1,25-(OH)₂D₃ itself, raising the possibility of achieving therapeutically useful activity *in vivo* with less risk of hypercalcemia.

Materials and Methods

Materials

1 α ,25-(OH)₂-[³H]D₃ (SA, 102 Ci/mmol) was obtained from Amersham Chemical Co. (Arlington Heights, IL). Nonradioactive 1 α ,25-(OH)₂D₃, 24,25-(OH)₂D₃, 1,24,25-(OH)₃D₃, 25OHD, 1 α ,25-dihydroxy-16-ene-cholecalciferol (Ro24-2637), and 25-hydroxy-16,23-diene-cholecalciferol (Ro24-2287) were the generous gifts of Dr. M. Uskokovic (Hoffman LaRoche Co., Nutley, NJ). 1 α ,24,5-Dihydroxy-22-25,26,27-cyclopropylvitamin D₃ (Calcipotriol, MC 903) and 1 α ,25-dihydroxy-22,24-

Received July 29, 1994.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. David Feldman, Division of Endocrinology, Stanford University School of Medicine, Room 5-005, Stanford, California 94305-5103.

* This work was supported by grants from the NIH (DK-42482 and DK-47551), the American Institute for Cancer Research, and the Lucas Foundation.

El juez examinará la pretensión y deberá rechazarla si quien la promueve no es víctima o está acreditado el pago efectivo de los perjuicios y este fuere la única pretensión formulada. La decisión negativa al reconocimiento de la condición de víctima será objeto de recurso de impugnación en los términos de este código.

Admitida la pretensión el juez la pondrá en conocimiento del declarado penalmente responsable y acto seguido ofrecerá la posibilidad de una conciliación que de prosperar dará término al incidente y lo allí acordado se incorporará a la sentencia. En caso contrario el juez fijará fecha para una nueva audiencia dentro de los ocho (8) días siguientes para intentar nuevamente la conciliación y de no lograrse el declarado penalmente responsable deberá ofrecer sus propios medios de prueba.

Artículo 104. Audiencia de pruebas y alegaciones. El día y hora señalados el juez realizará la audiencia, la cual iniciará con una invitación a los intervinientes a conciliar. De lograrse el acuerdo su contenido se incorporará a la decisión. En caso contrario, se procederá a la práctica de la prueba ofrecida por cada parte y se oirá el fundamento de sus pretensiones.

Parágrafo. La ausencia injustificada del solicitante a las audiencias de este trámite implicará el desistimiento de la pretensión, el archivo de la solicitud, y la condenatoria en costas.

Si injustificadamente no compareciere el declarado penalmente responsable se recibirá la prueba ofrecida por los presentes y, con base en ella, se resolverá. Quien no comparezca, habiendo sido citado en forma debida, quedará vinculado a los resultados de la decisión del incidente.

Artículo 105. Decisión de reparación integral. En la misma audiencia el juez adoptará la decisión que ponga fin al incidente, la cual se incorporará a la sentencia de responsabilidad penal.

Artículo 106. Caducidad. La solicitud para la reparación integral por medio de este procedimiento especial caduca treinta (30) días después de haberse anunciado el fallo de responsabilidad penal.

Artículo 107. Tercero civilmente responsable. Es la persona que según la ley civil deba responder por el daño causado por la conducta del condenado.

El tercero civilmente responsable podrá ser citado o acudir al incidente de reparación a solicitud de la víctima del condenado o su defensor. Esta citación deberá realizarse en la audiencia que abra el trámite del incidente.

Artículo 108. Citación del asegurador. Exclusivamente para efectos de la conciliación de que trata el artículo 103, la víctima, el condenado, su defensor o el tercero civilmente responsable podrán pedir la citación del asegurador de la responsabilidad civil amparada en virtud del contrato de seguro válidamente celebrado, quien tendrá la facultad de participar en dicha conciliación.

diene-24,26,27-trihomovitamin D₃ (EB-1089) were kindly donated by Dr. Lise Binderup (Leo Pharmaceutical Products, Ballerup, Denmark). 22-Oxa-1 α ,25-(OH)₂D₃ (22-oxacalcitriol, also known as OCT) was generously contributed by Chugai Pharmaceutical (Tokyo, Japan). The chemical structures of the vitamin D analogs are shown in Fig. 1. Aprotinin, pepstatin, soybean trypsin inhibitor, and the random primed DNA labeling kit were purchased from Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianapolis, IN). Tissue culture media were purchased from Gibco (Grand Island, NY). All other reagents, except where indicated, were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Cell cultures

Human prostate carcinoma LNCaP and PC-3 cells, obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD) were routinely cultured in T-75 flasks in RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) at 37 C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

VDR binding analysis

For binding experiments, cell monolayers grown to near confluence in T-75 flasks were rinsed twice with ice-cold PBS and harvested by scraping with a rubber policeman without prior trypsinization. After an initial wash in PBS, cell pellets were resuspended in KTEDM buffer [300 mM KCl, 10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 1.5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and 10 mM sodium molybdate] containing a protease inhibitor cocktail (10 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 1 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml pepstatin, and 1 μ g/ml aprotinin). Cells were disrupted by sonication while cooling on ice. The sonicate was centrifuged at 207,000 $\times$ g for 35 min at 4 C to obtain a soluble extract used for binding studies. In a typical binding experiment, 200 μ l soluble extract (1–2 mg protein/ml) were incubated with a 1-nM concentration of [³H]1,25-(OH)₂D₃ and increasing concentrations of metabolites and/or analogs (0.01–100 nM) for 16–20 h at 4 C. Bound and free hormones were separated by the hydroxylapatite method (17). The protein concentration was measured by the method of Bradford (18). Specific binding was calculated by subtracting nonspecific binding obtained in the presence of a 250-fold excess of radioinert 1,25-(OH)₂D₃ from the total binding measured in the absence of radioinert steroid.

Assay of cell proliferation

Cell proliferation was assessed by measurement of attained cell mass using an assay of DNA content, as described previously (6). LNCaP cells are seeded in six-well tissue culture plates (Becton Dickinson Co., Lincoln Park, NJ) at a density of about 50,000 cells/well in 3 ml RPMI-

1640 containing 5% FBS. After incubation for 48–72 h, the medium was replaced, and cells were treated with vehicle (ethanol; final concentration, 0.1%), 1,25-(OH)₂D₃, vitamin D₃ metabolites, or analogs in the concentration range of 0.01–100 nM. The medium containing vehicle or test compounds was subsequently changed every 3 days during the course of the experiment. At the appropriate time points, cell monolayers were washed with PBS and precipitated with ice-cold 5% trichloroacetic acid. After a final wash with 100% ice-cold ethanol, the cell pellet was solubilized using 0.2 N sodium hydroxide, and the DNA content was determined using the diphenylamine assay of Burton (19).

Cellular differentiation

The LNCaP cell line is known to express PSA, which was assayed as a marker of cellular differentiation (6). To determine the effect of 1,25-(OH)₂D₃ metabolites and analogs on PSA production, cells were seeded in six-well tissue culture plates at a density of ~50,000 cells/well, as described above. After incubation for 48–72 h, the medium was replaced, and cells were treated with vehicle or the indicated compounds. At the appropriate time points, the media from cultures were removed and stored at –20 C for PSA analysis. Remaining cell monolayers were solubilized as described above for determination of DNA content. PSA was measured in the conditioned medium by an automated assay using a Chemiluminescence System (ACS 180, Ciba-Corning, Medfield, MA) (20), with a lower limit of detection of approximately 1 ng/ml. Results are expressed as nanograms of PSA per μ g DNA.

24-Hydroxylase mRNA induction

PC-3 cells grown to near confluence in T-75 flasks in RPMI-1640–5% FBS were treated with vehicle (ethanol; final concentration, 0.1%) or the indicated compounds (0.1–100 nM). After 6 h of treatment, total cellular RNA was isolated by the guanidinium thiocyanate precipitation method (21), and 10 μ g were subsequently fractionated by electrophoresis on 1% agarose-0.66 M formaldehyde-containing gels. A RNA ladder [0.24–9.5 kilobases (kb); BRL, Gaithersburg, MD] was used to determine the size of the RNA. Fractionated RNA was transferred to nylon (Hybond-N, Amersham Chemical Co., Arlington Heights, IL) by capillary action in 10 $\times$ SSC (1 $\times$ SSC = 150 mM sodium chloride and 15 mM sodium citrate, pH 7) at room temperature. After transfer and baking, the nylon blots were hybridized at 55 C with a random primed ³²P-labeled 1.3-kb *AccI*-*KpnI* fragment of the rat 24-hydroxylase complementary DNA probe (22). To control for RNA sample loading and transfer, Northern blots were also hybridized at 55 C with a ³²P-labeled 0.9-kb *EcoRI* fragment of the human complementary DNA for the ribosomal protein gene L7. In several systems, L7 mRNA levels have been shown not to change with the cell cycle, serum stimulation, or physiological state (23, 24). Blots were exposed to Kodak XAR film (Eastman Kodak, Rochester, NY) at –80 C and developed. The pixel intensity of each 24-hydroxylase or L7 band was determined by scanning with a computing densitometer (model 300, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA), and the data were integrated using the scanner software. 24-Hydroxylase mRNA levels were then indexed to the corresponding levels of L7 mRNA.

Results

Ability of 1,25-(OH)₂D₃ and analogs to compete with [³H]1,25-(OH)₂D₃ for VDR-binding sites in LNCaP cells

The ability of a series of natural metabolites and synthetic analogs of 1,25-(OH)₂D₃ to bind to the VDR of LNCaP cells was assessed in competition experiments with [³H]1,25-(OH)₂D₃. As shown in Fig. 2A, 1,25-(OH)₂D₃ has the highest affinity of the natural metabolites, competing for 50% of the sites at a concentration of approximately 2 nM under the conditions of this experiment. 1,24,25-(OH)₃D₃ and 25OHD were approximately 3- and 63-fold less potent than the native hormone, respectively, whereas 24,25-(OH)₂D₃ reached only

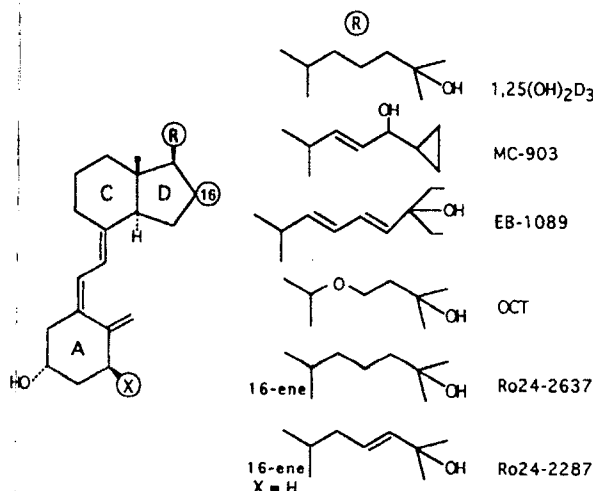


FIG. 1. Chemical structure of vitamin D₃ analogs. X = OH except Ro24-2287 where X = H.

imputación hasta antes de iniciarse el juicio oral, con base en los motivos existentes al tiempo de su formulación. El juez que conozca del asunto resolverá de plano.

Artículo 98. Autorizaciones especiales. El juez podrá autorizar que se realicen operaciones mercantiles sobre los bienes descritos en el artículo anterior, cuando aquellas sean necesarias para el pago de los perjuicios. Igual autorización procederá para los bienes entregados en forma provisional. El negocio jurídico deberá ser autorizado por el funcionario, y el importe deberá consignarse directamente a órdenes del despacho judicial.

Cuando la venta sea necesaria en desarrollo del giro ordinario de los negocios del sindicado o esté acreditada la existencia de bienes suficientes para atender una eventual indemnización, se podrá autorizar aquella.

Artículo 99. Medidas patrimoniales a favor de las víctimas. El fiscal, a solicitud del interesado, podrá:

1. Ordenar la restitución inmediata a la víctima de los bienes objeto del delito que hubieren sido recuperados.
2. Autorizar a la víctima el uso y disfrute provisional de bienes que, habiendo sido adquiridos de buena fe, hubieran sido objeto de delito.
3. Reconocer las ayudas provisionales con cargo al fondo de compensación para las víctimas.

Artículo 100 . Afectación de bienes en delitos culposos. En los delitos culposos, los vehículos automotores, naves o aeronaves o cualquier unidad montada sobre ruedas y los demás objetos que tengan libre comercio, una vez cumplidas dentro de los diez (10) días siguientes las previsiones de este código para la cadena de custodia, se entregarán provisionalmente al propietario, poseedor o tenedor legítimo, salvo que se haya solicitado y decretado su embargo y secuestro.

Tratándose de vehículos de servicio público colectivo, podrán ser entregados a título de depósito provisional al representante legal de la empresa a la cual se encuentre afiliado con la obligación de rendir cuentas sobre lo producido en el término que el funcionario judicial determine y la devolución cuando así lo disponga. En tal caso, no procederá la entrega hasta tanto no se tome decisión definitiva respecto de ellos.

La entrega será definitiva cuando se garantice el pago de los perjuicios, o se hayan embargado bienes del imputado o acusado en cuantía suficiente para proteger el derecho a la indemnización de los perjuicios causados con el delito.

CAPITULO IV

Del ejercicio del incidente de reparación integral

Artículo 101. Suspensión y cancelación de registros obtenidos fraudulentamente. En cualquier momento y antes de presentarse la acusación, a petición de la Fiscalía, el juez de control de garantías dispondrá la suspensión del poder dispositivo de los bienes sujetos a registro cuando existan motivos fundados para inferir que el título de propiedad fue obtenido fraudulentamente.

En la sentencia condenatoria se ordenará la cancelación de los títulos y registros respectivos cuando exista convencimiento más allá de toda duda razonable sobre las circunstancias que originaron la anterior medida.

Lo dispuesto en este artículo también se aplicará respecto de los títulos valores sujetos a esta formalidad y obtenidos fraudulentamente.

Si estuviere acreditado que con base en las calidades jurídicas derivadas de los títulos cancelados se están adelantando procesos ante otras autoridades, se pondrá en conocimiento la decisión de cancelación para que se tomen las medidas correspondientes.

Artículo 102. Procedencia y ejercicio del incidente de reparación integral. Emitido el sentido del fallo que declara la responsabilidad penal del acusado y, previa solicitud expresa de la víctima, o del fiscal o del Ministerio Público a instancia de ella, el juez fallador abrirá inmediatamente el incidente de reparación integral de los daños causados con la conducta criminal, y convocará a audiencia pública dentro de los ocho (8) días siguientes.

Cuando la pretensión sea exclusivamente económica, solo podrá ser formulada por la víctima directa, sus herederos, sucesores o causahabientes.

Artículo 103. Trámite del incidente de reparación integral. Iniciada la audiencia el incidentante formulará oralmente su pretensión en contra del declarado penalmente responsable, con expresión concreta de la forma de reparación integral a la que aspira e indicación de las pruebas que hará valer.

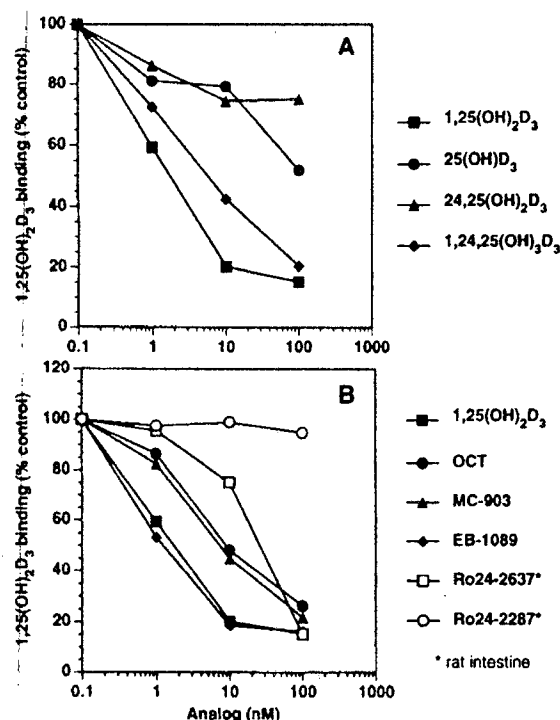


FIG. 2. Competition binding analysis of VDR by specific [³H]1,25-(OH)₂D₃ binding in the LNCaP human prostate carcinoma cell line. Cells were grown in RPMI-1640–5% FBS to near confluence, as described in *Materials and Methods*. Soluble extracts were prepared in KTEDM buffer at 4 °C and incubated for 16–20 h in the presence of 1 nM [³H]1,25-(OH)₂D₃ with or without a 250-fold excess of radioinert hormone. Specific binding was measured by the hydroxylapatite method. A, Competition for VDR by naturally occurring metabolites of 1,25-(OH)₂D₃. B, Competition for VDR by synthetic analogs of 1,25-(OH)₂D₃. Values shown are means from four to six experiments performed in duplicate.

about 20% competition for VDR at a concentration of 100 nM. As shown in Fig. 2B, EB-1089 was approximately 2-fold more potent than 1,25-(OH)₂D₃ as a competitor for VDR. In contrast, MC-903, OCT, and Ro24-2637 exhibited 2.5-, 10-, and 100-fold lower binding affinities for the VDR than 1,25-(OH)₂D₃, respectively (Fig. 2B). In addition, Ro24-2287 was relatively inactive in this binding assay. The binding potencies of the natural and synthetic analogs relative to that of 1,25-(OH)₂D₃ are summarized in Table 1.

It is important to note that we were unable to determine the competition profile for two analogs, Ro24-2287 and Ro24-2637, when using cytosol from LNCaP cells. Under all conditions studied, both compounds caused an artificially high nonspecific binding of [³H]1,25-(OH)₂D₃, which could not be displaced by using a 10,000-fold excess of radioinert hormone. The same phenomenon was also observed when cytosol from MCF-7 human breast cancer cells was used for competition studies. Interestingly, such a phenomenon was not observed when rat intestine (binding capacity, 200–400 fmol/mg protein) was used as a source of VDR. The explanation for this is not known. In attributing the binding potency for these two analogs, we used their relative affinities for intestinal VDR as an estimate. The relative binding affinities of the various other metabolites and analogs were similar in LNCaP cells and intestine (data not shown).

TABLE 1. Effect of vitamin D₃ metabolites and synthetic analogs on receptor binding, cell proliferation, stimulation of PSA production, and induction of 24-hydroxylase

Analog	ED ₅₀ (nM)			
	VDR	Proliferation	PSA	24-Hydroxylase
1,25-(OH) ₂ D ₃	1.6	2.0	1.1	4.2
25(OH)D ₃	100	NR	NR	NR
24,25-(OH) ₂ D ₃	NR	NR	NR	NR
1,24,25-(OH) ₃ D ₃	5.0	10.5	8.0	5.4
MC-903	4.0	0.5	0.2	1.1
EB-1089	0.8	0.7	0.3	7.0
OCT	16	0.7	0.4	7.0
Ro24-2637	22 ^a	0.9	0.7	3.0
Ro24-2287	NR ^a	NR	NR	NR

VDR binding analysis, cell proliferation and PSA production were estimated using LNCaP cells, and induction of 24-hydroxylase mRNA using PC-3 cells, as described in *Materials and Methods*. ED₅₀, Effective dose achieving 50% of the maximal response; NR, ED₅₀ not reached at 100 nM.

^a Estimated using rat intestine.

Ability of 1,25-(OH)₂D₃ and analogs to inhibit proliferation of LNCaP cells

The ability of a series of natural metabolites and synthetic analogs of 1,25-(OH)₂D₃ to inhibit the growth of LNCaP cells was assessed in cell proliferation experiments. As shown in Fig. 3A, 1,25-(OH)₂D₃ had the greatest potency of the natural metabolites, inhibiting 50% growth at approximately 1 nM.

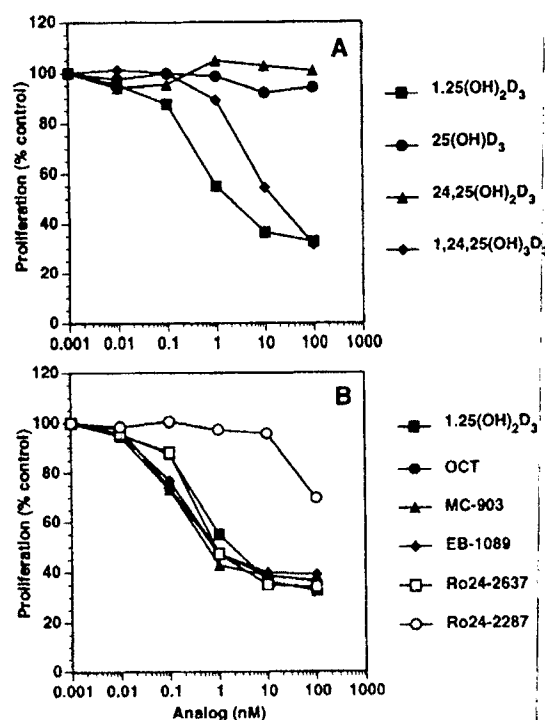


FIG. 3. Dose-response effect of 1,25-(OH)₂D₃ metabolites (A) and synthetic analogs (B) on the proliferation rate of LNCaP cells. Cells were seeded in six-well tissue culture flasks at a density of ~50,000 cells/well in RPMI-1640–5% FBS. After the 72-h incubation allowed for stabilization and cell attachment, the media were replaced, and cells were treated for 6 days with either vehicle alone or the indicated concentrations of the indicated compounds. The proliferation rate was assessed by determination of DNA content, as described in *Materials and Methods*. Values shown are means from two to four experiments performed in duplicate.

CAPITULO III

Medidas cautelares

Artículo 92. Medidas cautelares sobre bienes. El juez de control de garantías, en la audiencia de formulación de la imputación o con posterioridad a ella, a petición del fiscal o de las víctimas directas podrá decretar sobre bienes del imputado o del acusado las medidas cautelares necesarias para proteger el derecho a la indemnización de los perjuicios causados con el delito.

La víctima directa acreditará sumariamente su condición de tal, la naturaleza del daño recibido y la cuantía de su pretensión.

El embargo y secuestro de los bienes se ordenará en cuantía suficiente para garantizar el pago de los perjuicios que se hubieren ocasionado, previa caución que se debe prestar de acuerdo al régimen establecido en el Código de Procedimiento Civil, salvo que la solicitud sea formulada por el fiscal o que exista motivo fundado para eximir de ella al peticionante. El juez, una vez decretado el embargo y secuestro, designará secuestre y adelantará el trámite posterior conforme a las normas que regulan la materia en el Código de Procedimiento Civil.

Cuando las medidas afecten un bien inmueble que esté ocupado o habitado por el imputado o acusado, se dejará en su poder a título de depósito gratuito, con el compromiso de entregarlo a un secuestro o a quien el funcionario indique si se profiere sentencia condenatoria en su contra.

Parágrafo. En los procesos en los que sean víctimas los menores de edad o los incapaces, el Ministerio Público podrá solicitar el embargo y secuestro de los bienes del imputado en las mismas condiciones señaladas en este artículo, salvo la obligación de prestar caución.

Artículo 93. Criterios para decretar medidas cautelares. El juez al decretar embargos y secuestros los limitará a lo necesario, de acuerdo con las reglas establecidas en el Código de Procedimiento Civil.

El juez a solicitud del imputado, acusado o condenado, deberá examinar la necesidad de las medidas cautelares y, si lo considera pertinente, sustituirlas por otras menos gravosas o reducirlas cuando sean excesivas.

Artículo 94. Proporcionalidad. No se podrán ordenar medidas cautelares sobre bienes del imputado o acusado cuando aparezcan desproporcionadas en relación con la gravedad del daño y la probable sentencia sobre la pretensión de reparación integral o tasación de perjuicios.

Artículo 95. Cumplimiento de las medidas. Las medidas cautelares se cumplirán en forma inmediata después de haber sido decretadas, y se notificarán a la parte a quien afectan, una vez cumplidas.

Artículo 96. Desembargo. Podrá decretarse el desembargo de bienes, cuando el imputado preste caución en dinero efectivo o mediante póliza de compañía de seguros o garantía bancaria, por el monto que el juez señale para garantizar el pago de los daños y perjuicios que llegaren a establecerse, como de las demás obligaciones de contenido económico a que hubiere lugar.

La caución en dinero efectivo se considerará embargada para todos los efectos legales.

Señalado el monto de la caución, el interesado deberá prestarla dentro de un término no mayor de veinte (20) días contados a partir de la fecha en que se impuso.

Cuando se profiera preclusión o sentencia absolutoria se condenará al peticionario temerario al pago de los perjuicios que con la práctica de las medidas cautelares se hubieren ocasionado al imputado.

Artículo 97. Prohibición de enajenar. El imputado dentro del proceso penal no podrá enajenar bienes sujetos a registro durante los seis (6) meses siguientes a la formulación de la imputación, a no ser que antes se garantice la indemnización de perjuicios o haya pronunciamiento de fondo sobre su inocencia.

Esta obligación deberá ser impuesta expresamente en la audiencia correspondiente. Cualquier negociación que se haga sobre los bienes sin autorización del juez será nula y así se deberá decretar.

Para los efectos del presente artículo el juez comunicará la prohibición a la oficina de registro correspondiente.

Lo anterior sin perjuicio de los negocios jurídicos realizados con anterioridad y que deban perfeccionarse en el transcurso del proceso y de los derechos de los terceros de buena fe, quienes podrán hacerlos valer, personalmente o por intermedio de abogado dentro de una audiencia preliminar que deberá proponerse, para ese único fin, desde la formulación de la

The growth inhibition exhibited by the other natural metabolites was roughly proportional to their ability to compete for the VDR. As shown in Fig. 3B, the synthetic analogs were all potent inhibitors of proliferation, except for Ro24-2287, which had minimal binding affinity for the VDR. Compared to 1,25-(OH)₂D₃, MC-903, EB-1089, OCT, and Ro24-2637 exhibited 4-, 3-, 3-, and approximately 2-fold greater antiproliferative activity than the native hormone (Table 1).

Ability of 1,25-(OH)₂D₃ and analogs to stimulate PSA secretion by LNCaP cells

We next examined the ability of natural metabolites and synthetic analogs to stimulate PSA production by LNCaP cells. PSA fulfills the classic definition of a differentiation marker because it is made specifically by the specialized secretory luminal cells of normal prostatic epithelium. As shown in Fig. 4A, treatment of LNCaP cells with 1,25-(OH)₂D₃ resulted in a dose-dependent stimulation of PSA secretion, as expressed per μ g DNA. 1,24,25-(OH)₃D₃ exhibited ~7-fold lower potency than 1,25-(OH)₂D₃, whereas 25OHD and 24,25-(OH)₂D₃ were relatively inactive. As shown in Fig. 4B, with the exception of Ro24-2287, which had the lowest binding affinity and did not inhibit the proliferation of LNCaP cells, all other synthetic analogs employed in the present study stimulated the production of PSA

by LNCaP cells with potency proportional to their ability to inhibit proliferation of LNCaP cells (Table 1).

Ability of 1,25-(OH)₂D₃ and analogs to stimulate 24-hydroxylase mRNA induction in PC-3 cells

To examine another marker of 1,25-(OH)₂D₃ action, we chose to assess the induction of 24-hydroxylase mRNA. As this response to 1,25-(OH)₂D₃ is not exhibited by LNCaP cells (6), we performed these experiments with PC-3 cells, another human prostate cancer cell line that has VDR and is growth inhibited by 1,25-(OH)₂D₃ (6). As shown in Fig. 5A, of the natural metabolites, only 1,25-(OH)₂D₃ and 1,24,25-(OH)₃D₃ were able to induce 24-hydroxylase mRNA transcript in a dose-dependent manner. When autoradiography data were analyzed by laser densitometry, 1,25-(OH)₂D₃ and 1,24,25-(OH)₃D₃ were almost equipotent in 24-hydroxylase mRNA induction (Table 1). As in the previous experiments, 25OHD and 24,25-(OH)₂D₃ were inactive up to a concentration of 100 nM (Fig. 5A and Table 1). As shown in Fig. 5B, the synthetic analogs, MC-903, OCT, Ro24-2637, and EB-1089, were potent inducers of 24-hydroxylase mRNA. When quantitated by laser densitometry, MC-903 exhibited about 3-fold greater potency than 1,25-(OH)₂D₃, whereas OCT, Ro24-2637, and EB-1089 had approximately equal potency to the native hormone (Table 1). Once again, Ro24-2287, which previously failed to bind to VDR, inhibit proliferation, or stimulate PSA secretion by LNCaP cells, was unable to exhibit agonist potency in 24-hydroxylase induction when tested up to a concentration 100 nM (Fig. 5B and Table 1).

Discussion

Previous studies have shown that some synthetic analogs of vitamin D, although exhibiting less calcemic activity, may be equal or even more potent than 1,25-(OH)₂D₃ as inhibitors of the proliferation and differentiation of various malignant and nonmalignant cells, both *in vitro* and *in vivo* (9, 10, 13, 25-31). In this paper, we compared the biological activity of 1,25-(OH)₂D₃ with that of a series of naturally occurring vitamin D metabolites and several synthetic analogs on LNCaP and PC-3 human prostate carcinoma cells *in vitro*. MC-903 (introduction of a double bond at C₂₂, a hydroxyl group at C₂₄, and cyclopropyl modification of the side-chain), EB-1089 (introduction of two double bonds at C_{22,24} and three additional hydroxyl groups), and OCT (substitution of an oxygen atom for the methylene group at C₂₂) were the three analogs with modification of the side-chain, whereas Ro24-2637 and Ro24-2287 both had modifications of the D-ring (double bond at C₁₆), and there was a deletion of the 1 α -hydroxyl group in the former and introduction of the double bond at C₂₃ in the latter. The biological potencies were compared in VDR ligand binding assays as well as three tests of functional responsiveness: inhibition of cell proliferation, stimulation of PSA secretion, and induction of 24-hydroxylase mRNA.

As summarized in Table 1, ligand competition experiments demonstrated the following order of potency of naturally occurring metabolites of vitamin D₃ in displacing [³H]1,25-(OH)₂D₃ from VDR: 1,25-(OH)₂D₃ > 1,24,25-

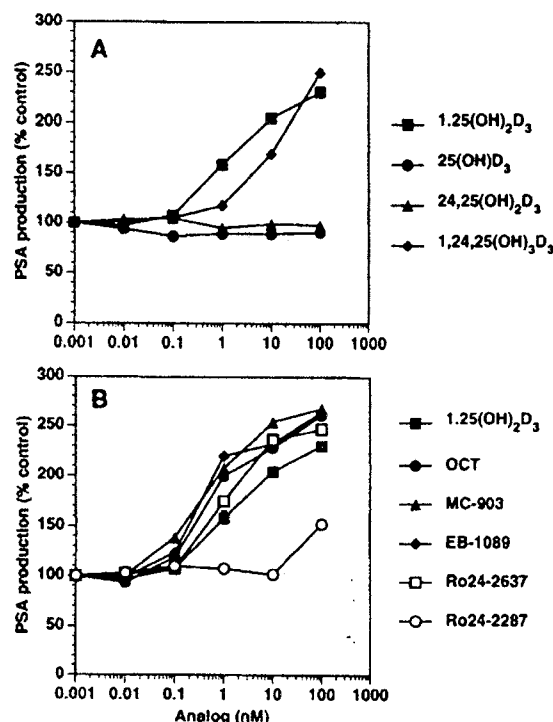
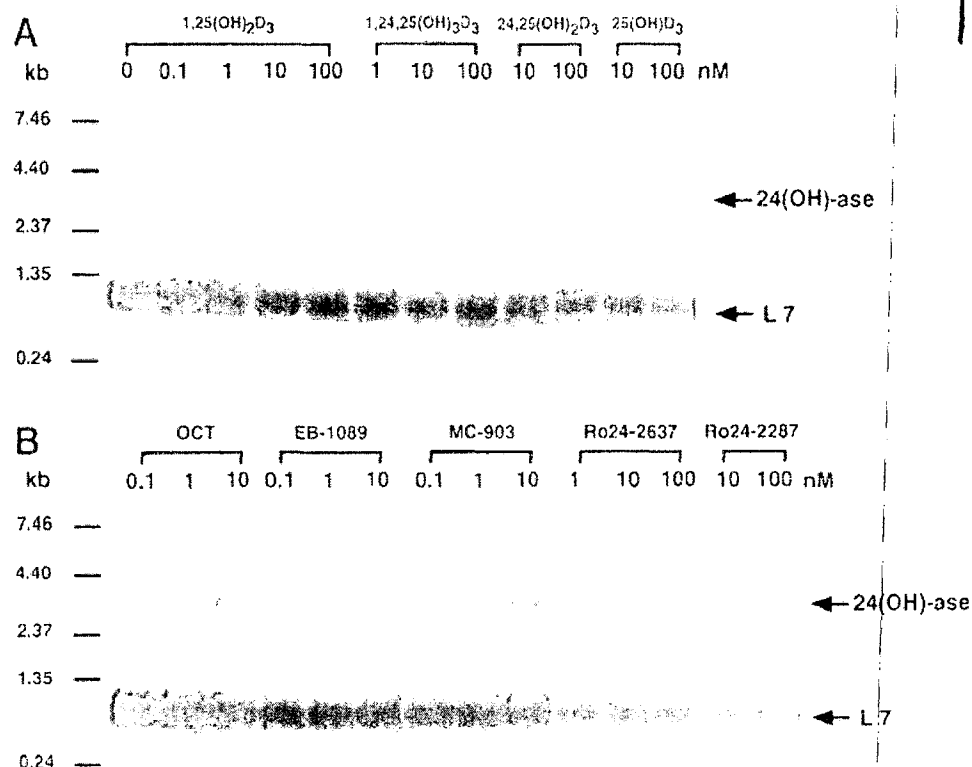


FIG. 4. Dose-response effect of 1,25-(OH)₂D₃ metabolites (A) and synthetic analogs (B) on PSA secretion by LNCaP cells. After the 72-h incubation allowed for stabilization and cell attachment, the medium was replaced, and cells were treated for 6 days with either vehicle alone or the indicated concentrations of the indicated compounds. Then, the medium was removed, and PSA and DNA content was measured as described in *Materials and Methods*. The results are expressed as nanograms of PSA per μ g DNA and are presented as a percentage of control cells treated with vehicle alone. The values shown represent the mean $\pm$ SD from two experiments performed in duplicate.

Fig. 15. Dose response effect of 1,25-(OH)₂D₃ metabolites (A) and synthetic analogs (B) on 25 hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase expression in the human prostate carcinoma PC-3 cell line. Cells grown in T-75 flasks to about 80–90% confluency were treated with vehicle or with indicated concentrations of 1,25-(OH)₂D₃, natural metabolites or synthetic analogs. After 6 h of treatment, total RNA was extracted and subjected to Northern blot analysis, as described in *Materials and Methods*. A and B. Two sections of the same gel; the blot was simultaneously probed for expression of the L7 ribosomal protein gene as a control for RNA loading and transfer. The pixel intensity of each 24-hydroxylase or L7 band was scanned by computing densitometer (model 300, Molecular Dynamics), and the data were integrated by scanner software and indexed to the corresponding levels of L7 mRNA.



(OH)₂D₃ = 25OHD > 24,25-(OH)₂D₃. A similar pattern of biological responsiveness was observed when natural metabolites were used to inhibit proliferation and stimulate PSA secretion by LNCaP cells as well as to induce 24-hydroxylase mRNA transcript by PC-3 cells. As a general rule, one might expect that the VDR binding potency would predict the magnitude of the functional response. In general, this was the case for natural metabolites. However, although binding to VDR correlated with biological responses in some cases, a number of exceptions were found when synthetic analogs were tested. As expected, Ro24-2287, which was a very weak binder to the VDR, had a low potency in all functional assays employed. EB-1089 was about 2-fold more potent than 1,25-(OH)₂D₃ in binding and was proportionally more potent than the native hormone in the three functional responses tested. As in the case of the naturally occurring metabolites, binding potency predicted functional response. In contrast, MC-903, OCT, and Ro24-2637, which exhibited approximately 2.5-, 10-, and 14-fold lower affinity for VDR than 1,25-(OH)₂D₃, all inhibited the proliferation of LNCaP cells with a potency 2- to 4-fold greater than the native hormone, respectively. In the experiments in which stimulation of PSA was measured, these compounds exhibited 2- to 5-fold greater activity than 1,25-(OH)₂D₃.

Interestingly, of the naturally occurring metabolites of vitamin D that we evaluated, only 1,25-(OH)₂D₃ and 1,24,25-(OH)₃D₃ were able to induce 24-hydroxylase mRNA with almost equal potency. As in the proliferation and PSA stimulation experiments, 25OHD and 24,25-(OH)₂D₃ were inactive up to a concentration of 100 nM. When synthetic analogs were compared for their ability to induce 24-hydroxylase mRNA, MC-903 exhibited about 3-fold greater potency, whereas OCT, Ro24-2637, and EB-1089 had potencies approximately equal to that of the native hormone.

The lack of direct correlation between the binding affinity for VDR and the biological potency of the compounds indicates that supplementary factors in addition to affinity for VDR influence the biological activity of the vitamin D analogs and are important in determining the magnitude of the biological response. These additional factors might include: 1) binding affinity for the vitamin D-binding protein (DBP) present in serum, 2) rate of metabolism and/or degradation to inactive metabolites, 3) relative ability to penetrate into target cells, 4) role of the membrane or other sites of activity, and 5) ability to dimerize and convert to a competent trans-activator.

To interpret our findings, the importance of the different affinities of the analogs for both cellular VDR and serum DBP must be taken into account. It is important to emphasize that the binding assay was performed in cytosolic extracts, whereas the functional response assays were performed with intact cells grown in the presence of 5% fetal bovine serum. MC-903, EB1089, OCT, and Ro24-2637 had an affinity for VDR within 1.4 order of magnitude of the affinity of 1,25-(OH)₂D₃. However, these compounds were much less tightly bound to DBP (15, 26, 28, 31, 32). Recent reports have shown approximately 30–50 times lower binding affinity of MC-903 (32, 33) and approximately 300 times lower binding affinity of OCT for serum DBP (33). Essentially no displacement of [³H]25OHD from serum binding proteins was obtained with EB-1089 over the wide concentration range tested in a separate study (29). Therefore, much of the apparent increase in the potency of the analogs relative to that of 1,25-(OH)₂D₃ in inhibiting proliferation and stimulating differentiation *in vitro* may be due to their higher free fraction in medium containing serum. Thus, despite their lower receptor binding affinity, a higher proportion of the free active form of the noncalcemic analog in the medium may partially explain

182
25
179

their higher biological activity. The opposite phenomenon, the higher binding affinity for DBP and potential sequestration of free active hormone in the medium (34, 35), can partially explain the somewhat reduced functional responses of 25OHD and 24,25-(OH)₂D₃ compared to their affinity for VDR.

Different rates of metabolism of 1,25-(OH)₂D₃ and analogs would be expected to play an important role in determining functional responses (16, 36). Under our experimental conditions, no change in antiproliferative activity was observed when 1,25-(OH)₂D₃ or analogs were incubated together with ketoconazole for LNCaP, PC-3, as well as DU-145 cells (data not shown). Ketoconazole has been shown to inhibit a number of cytochrome P-450-enzymes (37), including 24-hydroxylase, which is involved in 1,25-(OH)₂D₃ metabolism (38, 39). Although these results suggest that differences in 24-hydroxylase activity do not explain the pattern of responses to analogs, these experiments do not rule out differential metabolism by other pathways. Variations in rates of metabolism and dissimilar pharmacokinetics become even more likely to cause disparities in potency under *in vivo* conditions. Also, the side-effects of systemic administration will be of critical importance in determining which analog has the potential to be used as a therapeutic agent.

Differences in the entry of 1,25-(OH)₂D₃ or analogs into target cells is another possible site to explain the discordance between binding affinity and the magnitude of biological responsiveness. This area has not been well studied and is not usually thought to be rate limiting in experiments carried out over several days duration. Differences in nongenomic intracellular signaling (40–44) might be another mechanism, besides the classical genomic actions of 1,25-(OH)₂D₃, involved in the selectivity of the analogs for different target tissues. Finally, distinctions in the ability of the ligand-VDR complex to dimerize and transactivate the promoter of target genes may play a role in the inconsistencies found.

In addition to the factors mentioned above, the complexity of the experimental conditions, *i.e.* types of cells used, medium composition, presence or absence of serum, methods of cell growth assessment, *etc.*, may all contribute to the different potencies reported for various synthetic analogs by numerous *in vitro* studies (9, 10, 29–31, 45, 46). As yet, it is not clear which of these variables may be dominant in terms of defining the relative biological effectiveness of analogs. This implies that *in vivo* experiments will be necessary to estimate the biological potencies of analogs as possible antitumor agents. Such experiments using human prostate carcinoma heterotransplants into nude mice are currently underway in our laboratory.

In summary, these results demonstrate that 1,25-(OH)₂D₃ and synthetic analogs can elicit various functional responses in human prostate carcinoma cells, including antiproliferative and differentiating actions. Noteworthy, although binding to VDR is critical for 1,25-(OH)₂D₃ action, the analog data indicate that additional factors significantly contribute to the magnitude of the biological response. Finally, the strong antiproliferative effects of several synthetic analogs known to exhibit less calcemic activity than 1,25-(OH)₂D₃ may indicate their potential use as an additional therapeutic option for the treatment of prostate cancer.

Acknowledgments

We thank Dr. M. Uskokovic, Hoffman LaRoche Co. (Nutley, NJ), for kindly providing us with the Ro24–2637, Ro24–2287, and nonradioactive vitamin D metabolites; Dr. L. Binderup, Leo Pharmaceutical Products (Ballerup, Denmark), for MC-903 and EB-1089; and Dr. Y. Nishii, Chugai Pharmaceutical (Tokyo, Japan), for oxacalcitriol.

References

1. Evans RM 1988 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889–895
2. Norman AW, Roth J, Orci L 1982 The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins). *Endocr Rev* 3:331–366
3. Holick MF 1989 Vitamin D: Biosynthesis, Metabolism, and Mode of Action. Grune and Stratton, New York, pp 902–926
4. Suda T, Miyaura C, Abe E, Kuroki T 1986 Modulation of cell differentiation, immune response and tumor promotion by vitamin D compounds. In: Peck W (ed) *Bone and Mineral Research*. Elsevier, Amsterdam, vol 4:1–49
5. Pols HAP, Birkenhager JC, Foekens JA, Van Leeuwen JPTM 1990 Vitamin D: a modulator of cell proliferation and differentiation. *J Steroid Biochem* 37:873–876
6. Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D 1993 Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D₃ receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinology* 132:1952–1960
7. Peehl DM, Skowronski RJ, Leung GK, Wong ST, Stamey TA, Feldman D 1994 Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on primary cultures of human prostatic cells. *Cancer Res* 54:805–810
8. Abe J, Morikawa M, Miyamoto K, Kaiho S-I, Fukushima M, Miyaura C, Age E, Suda T, Nishii Y 1987 Synthetic analogues of vitamin D compounds with an oxygen atom in the side chain. *FEBS Lett* 226:58–62
9. Binderup L, Bramm E 1988 Effects of a novel vitamin D analogue MC 903 on cell proliferation and differentiation *in vitro* and on calcium metabolism *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 37:889–895
10. Binderup L, Latini S, Kissmeyer A-M 1991 New vitamin D₃ analogues with potent effects on cell growth regulation and immune responses: structure-activity studies. In: Norman AW, Bouillon R, Thomasset M (eds) *Vitamin D: Gene Regulation, Structure-Function Analysis and Clinical Application: Proceedings of the Eighth Workshop on Vitamin D*. de Gruyter, Berlin, pp 478–485
11. Brown AJ, Finch JL, Lopez-Hilker S, Dusso A, Ritter C, Pernalet N, Slatopolsky E 1990 New active analogues of vitamin D with low calcemic activity. *Kidney Int* 38:S22–S27
12. Colston KW, Mackay AG, Chandler S, Binderup L, Coombes R C 1991 Novel vitamin D analogues suppress tumor growth *in vivo*. In: Norman AW, Bouillon R, Thomasset M (eds) *Vitamin D: Gene Regulation, Structure-Function Analysis and Clinical Application: Proceedings of the Eighth Workshop on Vitamin D*. de Gruyter, Berlin, pp 465–466
13. Kissmeyer A-M, Binderup L 1991 Calcipotriol (MC 903): pharmacokinetics in rats and biological activities of metabolites. *Biochem Pharmacol* 41:1601–1606
14. Bikle DD 1992 Clinical counterpoint: vitamin D: new actions, new analogs, new therapeutic potential. *Endocr Rev* 13:765–784
15. Anzano MA, Smith JM, Uskokovic MR, Peer CW, Mullen LT, Letterio JJ, Welsh MC, Shrader MW, Logsdon DI, Driver CL, Brown CC, Roberts AR, Sporn MB 1994 1 α ,25-Dihydroxy-16-ene-23yne-26,27-hexafluorocholecalciferol (Ro24–5531) a new deltanoid (vitamin D analogue) for prevention of breast cancer in the rat. *Cancer Res* 54:1653–1656
16. Dilworth FJ, Calverley MJ, Makin HL, Jones G 1994 Increased biological activity of 20-epi-1,25-dihydroxyvitamin D₃ is due to reduced catabolism and altered protein binding. *Biochem Pharmacol* 47:987–993
17. Malloy PJ, Hochberg Z, Pike JW, Feldman D 1989 Abnormal binding of vitamin D receptors to Deoxyribonucleic acid in a kindred with vitamin D-dependent rickets, type II. *J Clin Endocrinol Metab* 68:263–269

