

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

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

187
184

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 00051318 0000000/

Fecha (AMD): 2006-01-26 16:44:18

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 REMESA

Dependencia: 2428 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 20

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 22 de Septiembre de 2005 y a mi memorial de solicitud de plazo de 15 de Diciembre y al memorial de corrección al plazo de 27 de Diciembre del mismo año.

2. NIVEL INVENTIVO

De acuerdo con el Concepto Técnico No. 01412, el señor Examinador cita los documentos EP 0325279 (D1), Artículo 1 "Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors and actions in human prostate cancer cell lines" (D2) y Artículo 2 "Actions of vitamin D3 analogs on human prostate cancer cell lines: comparison with 1,25-dihydroxyvitamin D3" (D3), como referencias del estado de la técnica capaces de desvirtuar el nivel inventivo de la presente solicitud.

En efecto, de acuerdo con los argumentos presentados por el señor Examinador, los compuestos revelados en la solicitud bajo estudio resultarían evidentes para una persona medianamente versada en la materia, combinando su conocimiento medio y las enseñanzas de los documentos D1 a D3, toda vez que el diseño de sustancias de estructura análoga a la vitamina D₃ y que presentaran actividad anticancerígena, como las actualmente reivindicadas, se derivaría fácilmente a partir de las enseñanzas consignadas en tales referencias.

Las razones sobre las cuales el señor Examinador fundamenta su posición son:

- (a) el hecho de que los documentos citados ya enseñan análogos de vitamina D₃ y
- (b) que en estos documentos se menciona la actividad farmacológica anticancerígena de tales compuestos.

De manera especial, es importante resaltar la importancia que el señor Examinador ha dado a la sustitución que se presenta sobre la posición 16 del esqueleto carbonado de la estructura de los análogos de vitamina D₃, toda vez que en su opinión, la única diferencia estructural entre los compuestos de la presente invención y los de las referencias citadas radica en "la cola carbonada de la posición 16", específicamente en el número de átomos de carbono de los

188
185

sustituyentes que conforman dicha "cola", y por ende, que este hecho "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" (resaltado fuera de texto).

Esto también
se afirma en
memorial del
11/08/2005
folio 156

Finalmente, como conclusión para su argumentación, el señor Examinador manifiesta que "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 del tipo VDRs con carácter específico para el metabolito activo de la vitamina D y sus análogos. Lo anterior teniendo en cuenta el 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 corroborará 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 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 dehidrocolecalciferol** - análogo de la vitamina D-" (resaltado fuera de texto).

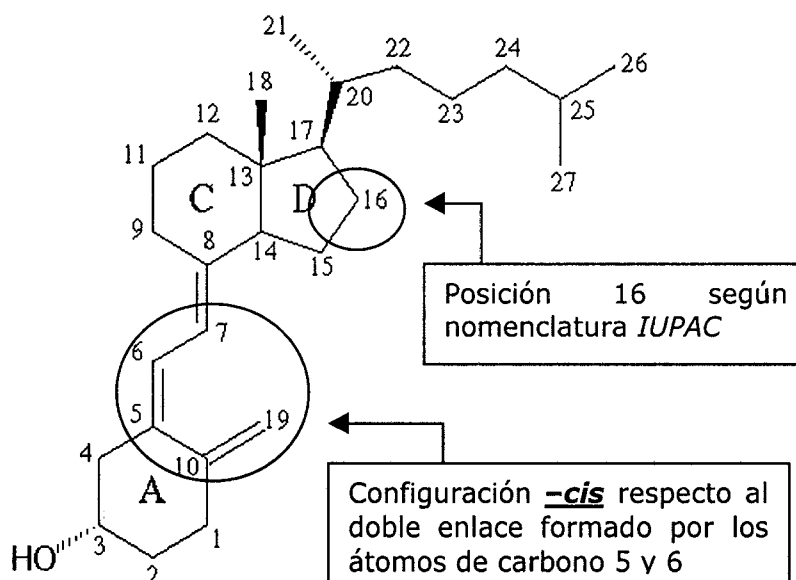
Tal como puede apreciarse a partir de los anteriores argumentos, el señor Examinador ratifica que **no resulta sorprendente la actividad farmacológica** de los compuestos de la presente solicitud con base en las revelaciones de los documentos citados, toda vez que lo que el solicitante ha hecho es simplemente **"agregar dos átomos más en la cadena carbonada"** del sustituyente de la posición 16.

189
186

Sobre este particular, me permito dirigir nuevamente la atención del señor Examinador al hecho de que los compuestos de la presente invención **no solo presentan una sorprendente y significativa actividad antiandrogénica, sino que además, y de manera inesperada, no estimulan ni potencian la hipercalcemia, el cual es un efecto tóxico importante reconocido para los compuestos análogos de vitamina D₃ conocidos en el estado de la técnica,** siendo este un efecto que resulta impredecible a partir de los documentos citados, toda vez que esta deseable y ventajosa característica ni siquiera es sugerida en ninguna de tales referencias, por lo que difícilmente este resultado podría ser considerado obvio o evidente para la persona versada en la materia que tomara como base las enseñanzas de los documentos **D1 a D3**.

De la misma manera, me permito manifestar al señor Examinador que, contrario a lo expuesto en su Concepto Técnico No. **01412**, las diferencias estructurales entre los compuestos de la presente invención y aquellos revelados en las referencias citadas no se restringen únicamente a la longitud y naturaleza de los sustituyentes sobre **la posición 17** (no la posición 16) y a la presencia de un doble enlace entre los carbonos de las posiciones 16 y 17, sino además **a la novedosa mitad 5,6-trans, que solamente presentan los análogos descritos en la solicitud bajo estudio, y que representa todo un trabajo de diseño y síntesis química que no resultaría para nada evidente a partir de las enseñanzas del estado de la técnica, que se limita a enseñar la configuración 5,6-cis, tal como se puede apreciar en cualquiera de los documentos D1, D2 y D3.**

Con el fin de facilitar y hacer más ilustrativa la discusión de los argumentos técnicos que demuestran el nivel inventivo de los análogos de vitamina D₃ de la presente solicitud, me permito dirigir la atención del señor Examinador a la siguiente figura, **mediante la cual se representa la nomenclatura IUPAC para el esqueleto carbonado de la molécula de vitamina D₃, tal como se enseña en el sitio en internet: www.icgeb.org/~p450srv/ligand/D3_x.html** (copia anexa).

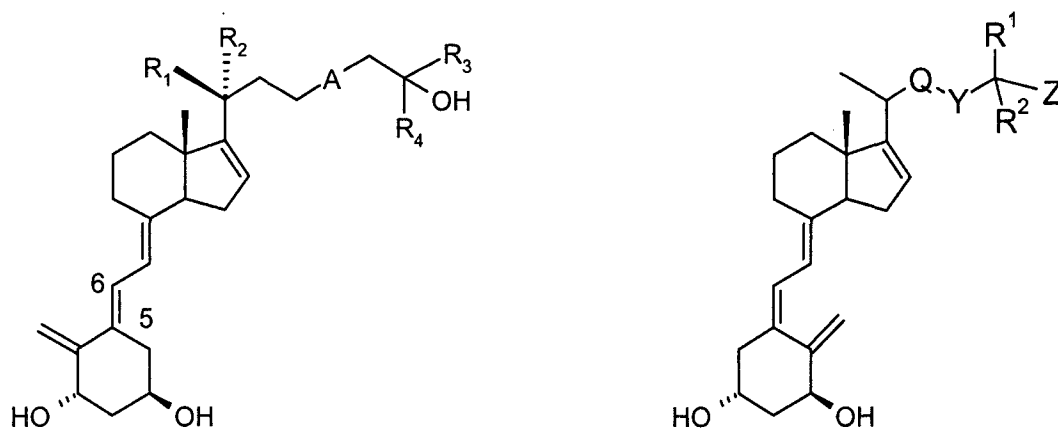
170
187Figura 1. Nomenclatura IUPAC para la Vitamina D₃.

De acuerdo con la figura anterior, es claro que las sustituciones a las cuales hace referencia el señor Examinador en la posición 16 realmente corresponden a la cadena carbonada unida directamente al carbono 17 de la estructura de la vitamina D₃. De hecho, la misma referencia **D3** enseña que el sustituyente R va enlazado directamente al carbono adyacente a la posición 16 libre. Adicionalmente, la posición 16, resaltada en la Figura 1, ilustra el lugar en el cual se ubica el doble enlace 16-eno que pueden presentar o no los compuestos análogos de la vitamina D₃, como es el caso de todos los compuestos enseñados en el documento **D2** y de la gran mayoría de los enseñados en **D3**, en donde los análogos descritos, a diferencia de los de la presente invención, **no presentan este doble enlace**.

Sin embargo, el hecho de mayor importancia que es resaltado mediante la Figura 1, radica en que **todos los documentos citados enseñan análogos de vitamina D₃ 5,6-cis**, tal como se ilustra en el círculo inferior de la figura en mención, mientras que los compuestos de la presente invención **revelan una configuración 5,6-trans, que representa una ruta de síntesis completamente diferente a la empleada para los compuestos del estado de la técnica**, hecho que ratifica que la actividad anticancerígena y la carencia de inducción a hipercalcemia *in vivo* demostrada por los compuestos revelados **resultarían absolutamente sorprendentes e inesperados para una persona versada en la materia**, máxime cuando esta persona tiene a su disposición documentos que, como los citados, sólo enseñan estructuras con configuración cis.

19A
188

Figura 2a. Diferencia estructural entre la configuración 5,6-*trans* de acuerdo con la presente invención y la configuración 5,6-*cis* enseñada por el estado de la técnica.

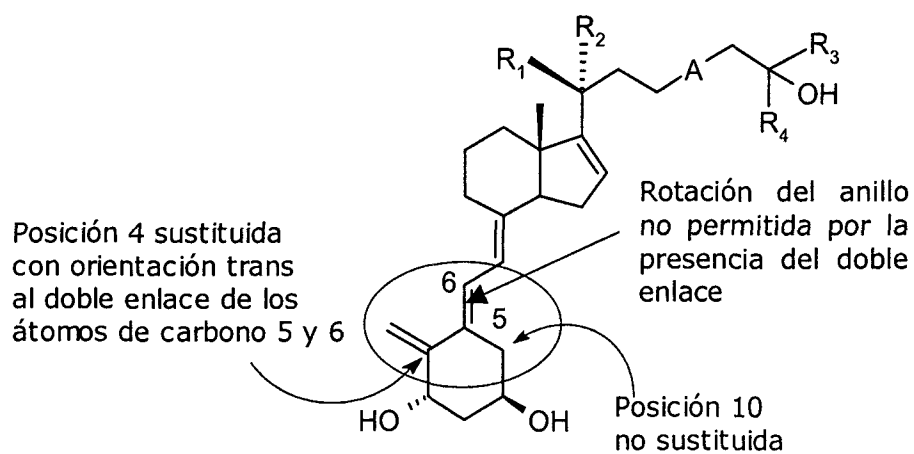


Compuestos 5,6-*trans* (presente invención)

Compuestos 5,6-*cis* (estado de la técnica)

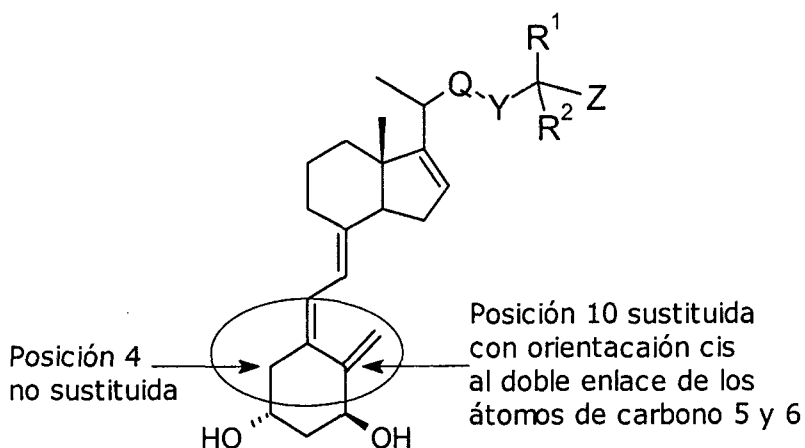
Figura 2b. Diferencia estructural entre la configuración 5,6-*trans* de acuerdo con la presente invención y la configuración 5,6-*cis* enseñada por el estado de la técnica.

Compuestos de la presente invención



192
189

Compuestos del estado de la técnica



Tal como puede apreciarse a partir de las anteriores representaciones, es completamente claro que la principal diferencia estructural entre los compuestos enseñados en el estado de la técnica y los descritos en la presente solicitud, se encuentra en el hecho de que en el caso de la configuración 5,6-*trans* el átomo de carbono 19 está unido a la posición 4, y no a la posición 10 del anillo A (ver Figura 1- Nomenclatura vitamina D₃).

Sobre este particular, me permito manifestar al señor Examinador que resulta de la mayor importancia notar que la diferencia anteriormente señalada no puede ser alcanzada por medio de la simple rotación del anillo A, toda vez que el anillo A está unido a través de un enlace doble entre los carbonos 5 y 6 al resto de la estructura. Como es bien sabido por una persona medianamente versada en química, un enlace doble no puede rotar, y por lo tanto **es claro que los compuestos 5,6-*trans* necesitan de una ruta de síntesis diferente y novedosa comparada con la conocida para los compuestos 5,6-*cis* revelados en el estado de la técnica.**

es una solitud de pda o de priedi

Adicionalmente, es también de la mayor importancia resaltar al señor Examinador que resulta sorprendente que una diferencia estructural relativamente pequeña, como la anteriormente señalada entre los compuestos de la presente solicitud y los revelados en los documentos citados, tenga los inesperados efectos revelados en la solicitud estudiada, esto es, **que los compuestos reivindicados además de tener la capacidad para inhibir significativamente la proliferación de líneas celulares cancerosas en diferentes tejidos, no inducen la hipercalcemia *in vivo*, tal como lo hacen los análogos convencionales de vitamina D₃.**

Efecto sorprendente!

Por lo tanto, se ha demostrado en forma contundente que la afirmación del señor Examinador según la cual "los compuestos análogos presentados por la

193
190

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 técnica **y su diseño es producto de la combinación de enseñanzas como las reveladas**" no es correcta, toda vez que existen otras diferencias estructurales, además de la longitud de la cadena del sustituyente sobre la posición 17, **que de ninguna forma podrían derivarse de las enseñanzas de los documentos citados, y que indudablemente contribuyen al sorprendente resultado de que los novedosos análogos revelados en la presente invención muestren sorprendentes efectos anticancerígenos, al tiempo que no padecen de la toxicidad por inducción de hipercalcemia que presentan los análogos convencionales de vitamina D₃.**

En conexión con lo anterior, me permito manifestar al señor Examinador que ninguna de la enseñanzas descritas en los documentos citados en el Concepto Técnico No. **01412** podría resultar relevante para desvirtuar el nivel inventivo de la materia objeto de la presente invención. Lo anterior se debe a que ninguno de los apartes de tales documentos establece en forma idéntica las características fundamentales y los claros efectos técnicos 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 y la no inducción de hipercalcemia de los compuestos particulares de la presente solicitud, tal y como me permito demostrar a continuación.

En efecto, me permito dirigir la atención del señor Examinador nuevamente al hecho de que el documento **D1**, el cual ya ha sido discutido previamente en mi respuesta de 11 de Agosto de 2005, revela compuestos **que son estructuralmente diferentes** de los compuestos reivindicados en la presente solicitud. De manera particular, **D1 revela únicamente análogos 5,6-cis de vitamina D₃**. Por el contrario, es completamente claro a partir de la Fórmula (I) revelada en la presente solicitud que **los compuestos de la invención en estudio son derivados 5,6-trans**.

Adicionalmente, me permito resaltar una vez más que nada en **D1** podría enseñar o sugerir **una actividad anti-androgénica** para los compuestos revelados por el solicitante, que adicionalmente **no presentara el efecto de toxicidad por hipercalcemia comúnmente presentado por este tipo de análogos**. 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

194
191

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 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 **D1**. Por lo tanto, no hay dentro de las enseñanzas de dicho documento, 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, sin efecto hipercalcémico asociado**. Por ende, no es posible que la presente invención sea considerada como una derivación evidente de la materia allí enseñada.

Por otra parte, si bien los documentos **D2** y **D3**, en particular **D3**, sugieren que los análogos de vitamina D₃ son útiles en el tratamiento del cáncer de próstata, las enseñanzas de estas referencias revelan que todos los compuestos ejemplificados se derivan de la vitamina D₃ y por lo tanto también enseñan la configuración 5,6-*cis*.

Sobre este particular, me permito resaltar nuevamente que **la característica esencial de la invención reivindicada es la novedosa mitad 5,6-*trans***, toda vez que es precisamente esta modificación la que proporciona a los compuestos reivindicados la capacidad para inhibir la proliferación en las líneas celulares de los cánceres de próstata, seno y leucemia mieloide sin la inducción de hipercalcemia *in vivo*, siendo estos resultados totalmente impredecibles para la persona versada en la materia que tomara como base los documentos citados, máxime al considerar que de acuerdo con esos documentos, **no existe motivación alguna para considerar una modificación estructural como la presentada, y mucho menos, que la misma podría dar solución al problema de la inducción de hipercalcemia *in vivo*** que normalmente presentan los análogos de vitamina D₃.

En este sentido, me permito dirigir la atención del señor Examinador al hecho de que en la descripción de la solicitud en estudio se enseña tanto el problema del efecto hipercalcémico, como la demostración experimental de que

195
192

los compuestos de la presente invención no elevan los niveles de calcio en suero *in vivo*. En efecto, tal como se manifiesta en la página 10, líneas 18 a 20, de la presente solicitud como fue originalmente presentada, **"la hipercalcemia representa una toxicidad importante de los compuestos de vitamina D₃".** No obstante lo anterior, y tal como es señalado por medio de los datos presentados en la página 10, líneas 20 a 28 de la solicitud como se presentó originalmente, **los compuestos 5,6-trans de la invención** mostraron sorprendentemente **"el mismo nivel de calcio que los ratones control"** con dosis de 0.1-2.0 µg/ratón de los compuestos revelados por el solicitante. Por el contrario, **los ratones tratados únicamente con 0.1 µg de 1,25(OH)₂D₃, un compuesto 5,6-cis ampliamente mencionado en las referencias citadas, fueron todos hipercalcémicos** (página 10, líneas 22-24).

Consecuentemente, es claro que los compuestos de acuerdo con la presente invención **mostraron una actividad anti-androgénica mejorada en niveles de dosis en los que los compuestos 5,6-cis son tóxicos**, o tal como se expone en la página 13, líneas 8 y 9, que el compuesto **"1,25(OH)₂D₃ fue inactivo a dosis no tóxicas"**. Adicionalmente, y con respecto al estado de la técnica citado, es de la mayor relevancia resaltar que **la toxicidad no fue investigada de ninguna forma ni en D₂ ni en D₃**, lo que claramente corrobora los resultados reportados en la presente solicitud no podrían derivarse de ninguna forma, y mucho menos de manera evidente, a partir de las referencias citadas.

Con el fin de proporcionar un sustento adicional a estos hallazgos y afirmaciones, me permito presentar al señor Examinador la publicación **"5,6-trans-16-ene-Vitamin D₃: A New Class of Potent Inhibitors of Proliferation of Prostate, Breast, and Myeloid Leukemic Cells"** (Cancer Research 59, 4023-4029, Agosto 15, 1999, copia anexa), en donde los efectos de la significativa actividad anticancerígena y la sorprendente baja actividad calcémica de los compuestos de la presente solicitud son descritos.

De manera particular, me permito dirigir la atención del señor Examinador al **"Abstract"** de dicha publicación, en donde se presentan en forma condensada las ventajas de los compuestos con la mitad 5,6-trans frente a los análogos convencionales de vitamina D₃, siendo de especial relevancia el hecho de que la actividad antiproliferativa de los compuestos con la configuración 5,6-trans es 10 a 100 veces mayor que la de compuestos con estructura 5,6-cis cuando se midió el crecimiento clonal de líneas celulares de cáncer de seno (MCF-7) y de próstata (LNCaP), así como también la línea celular de leucemia mieloide (HL-60).

196

193

Adicionalmente, los efectos calcémicos comparados de compuestos de acuerdo con la presente invención frente a compuestos con la configuración 5,6-*cis* también son reseñados en esta publicación y se ilustran de manera específica en la Figura 3 de la página 4026 de esta publicación. Tal como se manifestó anteriormente, los ratones a los que fueron administrados compuestos de la presente invención **mostraron niveles de calcio en suero comparables** con los niveles que presentaban los ratones de control a los que no había sido administrada dosis alguna de ningún compuesto, mientras que todos los ratones que recibieron dosis de compuestos con la configuración *cis* demostraron ser hipercalcémicos.

En consecuencia, y de acuerdo con los argumentos anteriormente presentados, es claro que ninguno de los documentos citados **D1-D3**, ya sean tomados solos o en combinación, sugieren la invención reivindicada por el solicitante, toda vez que **enseñan compuestos significativamente diferentes en términos estructurales a los compuestos enseñados en la presente invención, especialmente porque todas las referencias enseñan análogos 5,6-*cis*, razón por la cual los compuestos de la presente solicitud no pueden resultar evidentes a partir de tales enseñanzas.** De igual manera, es claro que ninguno de estos documentos puede llegar a sugerir o anticipar la sorprendente actividad anti-androgénica y, en particular, que no es para nada deducible a partir de cualquiera de las referencias citadas, la toxicidad mejorada anteriormente descrita que exhiben los compuestos de la presente invención gracias a la configuración 5,6-*trans*. Por lo tanto, los compuestos revelados en la presente invención sí son **INVENTIVOS** frente a las enseñanzas reveladas en los documentos **D1, D2 y D3**.

Finalmente, me permito dirigir nuevamente la atención del señor Examinador a lo establecido en el **Manual Andino de Patentes**, relevante publicación elaborada por la Secretaría General de la Comunidad Andina, el cual establece en su acápite "Nivel inventivo en áreas específicas de la tecnología" con relación a altura inventiva de compuestos o composiciones químicas, lo siguiente:

"10.8.1 Química

- a) ¿Cuándo un compuesto químico o composición química tienen nivel inventivo?
- el compuesto tiene una estructura inesperada (caso poco frecuente);
o,
 - presenta efecto inesperado, (es el caso más frecuente sobre todo si el compuesto es similar a otros del estado de la técnica. **El efecto inesperado puede ser completamente diferente de los**

197
194

descritos para los compuestos similares conocidos, o puede ser igual pero con una mejora en los resultados)...

b.2 Efecto o uso no esperado

Uso?

b.2.2 Tipos de efecto sorprendente: (i) **completamente diferente de los usos o efectos conocidos de compuestos descritos en el estado de la técnica**; y (ii) **una mejora sustancial de un efecto de la misma índole que exhiba un compuesto conocido del estado de la técnica más próximo**** (resaltado fuera de texto)

En conexión con lo anterior, es completamente claro que los compuestos de la presente invención cumplen con las condiciones arriba resaltadas, toda vez que, tal como ya ha sido ampliamente demostrado, no solamente presentan **una mejora sustancial de la actividad antiproliferativa frente a la que presentan los análogos de vitamina D₃ convencionales con configuración 5,6-*cis* (10 a 100 veces mayor)**, sino que además enseñan un **efecto completamente diferente al de los compuestos descritos en el estado de la técnica citado, como lo es la baja actividad calcémica que permite solucionar el problema de toxicidad asociado con la hipercalcemia que los análogos convencionales de vitamina D₃ suelen presentar**.

Por lo tanto, dado que las referencias citadas como estado de la técnica más cercano no revelan, enseñan o al menos sugieren la configuración 5,6-*trans*, junto con las demás diferencias estructurales, de los compuestos análogos de vitamina D₃ de la reivindicación 1, y mucho menos podrían señalar las propiedades superiores demostradas, **es completamente claro que la presente invención sí posee el nivel inventivo requerido frente a tales documentos**.

3. CONCLUSIÓN

En conclusión, los argumentos técnicos aquí presentados con respecto a las enseñanzas de los documentos **D1** a **D3** citados por el señor Examinador, demuestran de forma irrefutable que las diferencias existentes entre las estructuras y la actividad resultante de los compuestos de la presente solicitud frente a los revelados en tales referencias, no pueden resultar obvias o evidentes para una persona versada en la materia que tuviera a su disposición las enseñanzas de dichos documentos, tal y como ya se ha discutido en el presente escrito, por lo cual los compuestos ahora reivindicados resultan completamente

* COMUNIDAD ANDINA, Secretaría General, "Manual Andino de Patentes", Junio de 2004, Lima, Perú, páginas 82 y 83.

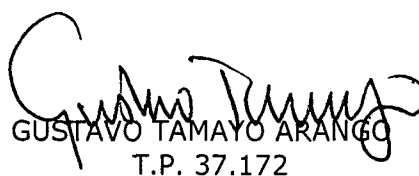
198
195

INVENTIVOS sobre las enseñanzas de las referencias citadas, toda vez que en ninguna de ellas se enseñan o siquiera sugieren las modificaciones estructurales que sería necesario realizar sobre los compuestos allí descritos para poder llegar a obtener no solo los análogos tal como han sido revelados en la presente invención, sino además la sorprendente actividad anti-androgénica y la inesperada baja actividad calcémica de los compuestos reivindicados en la presente solicitud, lo cual los convierte en una solución novedosa e inventiva para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, con claras ventajas sobre los compuestos conocidos convencionalmente, representando así un verdadero aporte al estado de la técnica y señalando una nueva regla técnica con respecto a la configuración 5,6-*trans* y su efecto para este tipo de compuestos.

4. Anexo me permito presentar copia de la nomenclatura IUPAC para el esqueleto carbonado de la molécula de vitamina D₃, tal como se enseña en el sitio en internet www.icgeb.org/~p450srv/ligand/D3_x.html y copia de la publicación "5,6-*trans*-16-ene-Vitamin D₃: A New Class of Potent Inhibitors of Proliferation of Prostate, Breast, and Myeloid Leukemic Cells" (Cancer Research 59, 4023-4029, Agosto 15, 1999), tal como se expuso anteriormente.

5. 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.

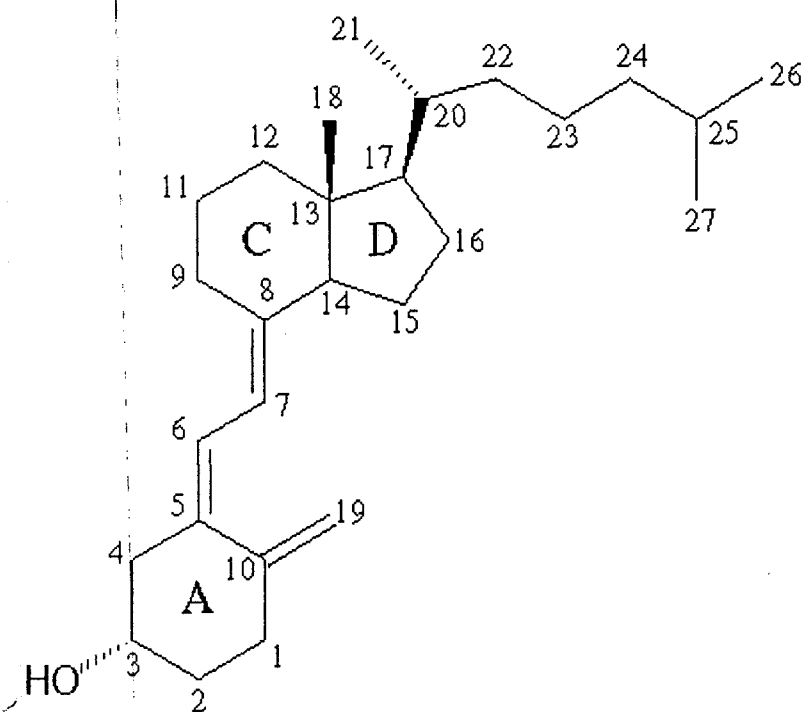
Señor Superintendente,


GUSTAVO TAMAYO ARANGO
T.P. 37.172

Vitamin D₃ carbon nomenclature

Last modified: Thu Jun 3 18:24:20 BST 2004

199
196



Reference

- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) (1989) The nomenclature of steroids. Recommendations 1989. *Eur. J. Biochem.* **186**, 429-458.

Back to the [Directory of P450-containing Systems home page](#):

 [Trieste site](#)

 [Gödöllő site](#)

200
197

5,6-*trans*-16-ene-Vitamin D₃: A New Class of Potent Inhibitors of Proliferation of Prostate, Breast, and Myeloid Leukemic Cells¹

Jun-ichi Hisatake,² Tetsuya Kubota, Yasuko Hisatake, Milan Uskokovic, Shigeru Tomoyasu, and H. Phillip Koeffler

Division of Hematology/Oncology, Cedars-Sinai Research Institute, UCLA School of Medicine, Los Angeles, California 90048 [J.-i. H., T. K., Y. H., H. P. K.]; Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, New Jersey 07110 [M. U.]; and Department of Hematology, Showa University School of Medicine, Tokyo, Japan [S. T.]

ABSTRACT

The 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃] is the physiologically active form of vitamin D₃ that inhibits proliferation and induces differentiation of a variety of malignant cells. We evaluated a newly synthesized vitamin D₃ analogue [1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ (Ro 25-4020)] that has a novel 5,6-*trans* motif. Dose-response studies showed that 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ had 10–100-fold greater antiproliferative activities than 1,25(OH)₂D₃ when measuring clonal growth of breast (MCF-7) and prostate (LNCaP) cancer cell lines as well as a myeloid leukemia cell line (HL-60). Because the chief toxicity of vitamin D₃ is hypercalcemia, we examined the calcemic activity of 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ in mice. Remarkably, 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ was at least 40-fold less calcemic as compared with 1,25(OH)₂D₃ and 1,25(OH)₂-16-ene-D₃ (Ro 24-2637). To explore the mechanism by which the 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ analogue mediated its antiproliferative activity, several studies were performed. Pulse-exposure studies showed that a 4-day pulse exposure to 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ (10⁻⁷ M) in liquid culture was adequate to achieve a 40% inhibition of MCF-7 clonal growth in the absence of the analogue, suggesting that the growth inhibition mediated by 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ was at least in part irreversible. Cell cycle studies showed that 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ increased the proportion of MCF-7 cells in the G₀-G₁ phase and decreased those in the S phase. Furthermore, 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ induced an elevated expression of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21^{waf1} and p27^{kip1}. In addition, 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ almost completely inhibited telomerase activity, as measured by telomeric repeat amplification protocol assay and human telomerase reverse transcriptase mRNA. For each of the growth-related parameters that were examined, the vitamin D₃ analogue was more active than 1,25(OH)₂D₃. In contrast, 1,25(OH)₂D₃ was more calcemic than 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃. In summary, 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃, having a novel 5,6-*trans* motif, strongly inhibited clonal proliferation and reduced telomerase activity with low calcemic activity, suggesting further testing in *in vivo* cancer models. This analogue may gain a therapeutic niche for selected malignancies.

INTRODUCTION

In the United States, breast and prostate cancers are two of the most prevalent, nonskin malignancies. Improvement in hormonal and cytotoxic therapies has not led to either a major lengthening of remissions or increase in cures in advanced breast cancer. In prostate cancer, blockade of androgen stimulation often leads to a remission; however, a subsequent relapse almost invariably occurs within a few years, resulting in a poorly differentiated, androgen-independent cancer. The present chemotherapy of cancer uses agents that are toxic to normal cells. On the other hand, induction of cellular differentiation may be useful for several forms of neoplasia, like the successful use

of all-*trans*-retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia.

1,25(OH)₂D₃³ is a member of the seco-steroid hormone family, which controls calcium homeostasis. The effects of 1,25(OH)₂D₃ are mediated mainly via interaction with a specific nuclear vitamin D₃ receptor, which heterodimerizes with the retinoic acid receptor (retinoid X receptor; Ref. 1). 1,25(OH)₂D₃ can inhibit the growth and induce differentiation of a variety of types of malignant cells, including breast (2–6), prostate (7–10), blood (11–14), colon (15, 16), skin (17), and brain (18). However, the calcemic side effects of 1,25(OH)₂D₃ have prevented its application as a therapeutic agent (19). Synthesis of analogues of 1,25(OH)₂D₃ with potent antiproliferative and differentiation activity against cancer cells with decreased risk of inducing hypercalcemia have been reported (20–25).

In the present study, we analyzed 1,25(OH)₂D₃ analogues that have a novel 5,6-*trans* motif. The results indicated that 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ (Ro 25-4020) was more potent than 1,25(OH)₂D₃ in its ability to inhibit the clonal cell growth of breast (MCF-7) and prostate (LNCaP) cancer cells and myeloid leukemia cells (HL-60) *in vitro*. Further studies showed that 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ arrested MCF-7 cells in G₀-G₁, which was associated with the rapid and prominent accumulation of the p21^{waf1} and p27^{kip1} CDKIs. In addition, we showed that 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ markedly inhibited telomerase activity as measured by TRAP assay and *hTERT* mRNA expression in HL-60 cells.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines. The breast cancer (MCF-7), prostate cancer (LNCaP), and myeloid leukemia (HL-60) cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD). MCF-7 cells were maintained in DMEM with 10% FCS. LNCaP and HL-60 were cultured in RPMI 1640 with 10% FCS. All three cell lines were maintained in a 37°C incubator containing 5% CO₂.

Vitamin D₃ Compounds. In this study, 10 vitamin D₃ analogues were used: [1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃; 1,25(OH)₂-5,6-*trans*-D₃; 1,25(OH)₂-16-ene-D₃; 1,25(OH)₂D₃; 1,25(OH)₂-16,23Z-diene-5,6-*trans*-D₃; 1,25(OH)₂-16-ene-23-yne-26,27-F₈-5,6-*trans*-D₃; 1,25(OH)₂-16,23E-diene-26,27-F₈-20-epi-5,6-*trans*-D₃; 1,25R(OH)₂-16,23E-diene-26-F₃-5,6-*trans*-D₃; 1,25R,5-(OH)₂-16-ene-23-yne-26-F₃-5,6-*trans*-D₃; and 25(OH)-16-ene-23-yne-5,6-*trans*-D₃]. All analogues were synthesized by Hoffmann-La Roche, Inc. The analogues studied in greatest detail are shown in the Fig. 1. The vitamin D₃ compounds were dissolved in absolute ethanol at 10⁻³ M as stock solution, which were stored at -20°C and protected from light. For *in vitro* use, analogues were diluted in DMEM or RPMI 1640. For *in vivo* use, analogues were diluted with PBS. An aliquot was used only once.

Soft Agar Colony Assay. Cells were cultured in a two-layer soft agar system for either 14 days (MCF-7 and LNCaP) or 10 days (HL-60) as described previously (26). MCF-7 and LNCaP cells were trypsinized. Washed single-cell suspensions of cells were enumerated and plated into 24-well, flat-bottomed plates with a total of 1 × 10³ cells/well in a volume of 400 μl/well. The feeder layer was prepared with agar that had been equilibrated at

Received 1/6/99; accepted 6/14/99.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by United States Defense and NIH grants and by the Lymphoma Foundation, Parker Hughes Trust, CaP Cure, Aaron Eschman Trust, and the C. and H. Koeffler Fund.

² To whom requests for reprints should be addressed, at Division of Hematology/Oncology, Cedars-Sinai Medical Center, UCLA School of Medicine, B-215, 8700 Beverly Boulevard, Los Angeles, CA 90048. Phone: (310) 855-4609; Fax: (310) 659-9741.

³ The abbreviations used are: 1,25(OH)₂D₃, 1,25-dihydroxyvitamin D₃; Ro 25-4020, 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃; CDK1, cyclin-dependent kinase inhibitor; TRAP, telomeric repeat amplification protocol; *hTERT*, human telomerase reverse transcriptase; RT-PCR, reverse transcription-PCR; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

201
198

ANTICANCER EFFECT OF 5,6-TRANS-16-ENE-VITAMIN D₃

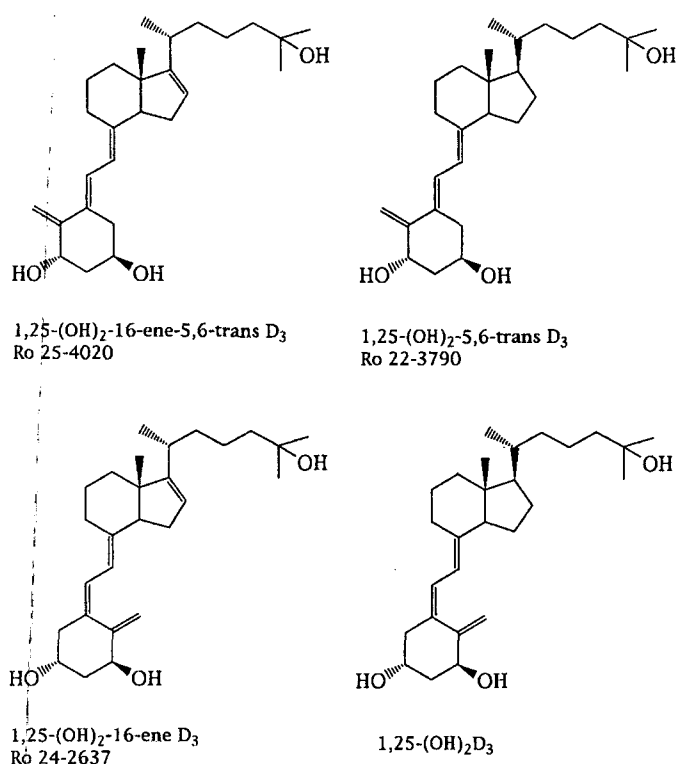


Fig. 1. Chemical structures of vitamin D₃ compounds used in this study.

42°C. Prior to this step, compounds were pipetted into wells. After incubation, the colonies were counted. All experiments were done at least three times using triplicate plates per experimental point.

Serum Calcium Levels *in Vivo*. Forty male BALB/c mice at 8–9 weeks of age were purchased from Harlan Sprague Dawley, Inc. (Indianapolis, IN) and maintained in pathogen-free conditions and fed a standard laboratory diet. Four mice per group were injected i.p. every other day (except Saturday and Sunday) with either a vitamin D₃ analogue or diluent (100 µl/mouse) for either 3 or 5 weeks. Doses of 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ were 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, and 6.0 µg/mouse. Doses of 1,25(OH)₂D₃, 1,25(OH)₂-16-ene-D₃, and 1,25(OH)₂-5,6-trans-D₃ were 0.1 µg/mouse based on prior experiments (22, 23). Control mice were injected with 100 µl of PBS. Serum calcium values were measured every week by the quantitative, colorimetric detection assay using the Sigma 587 kit.

Pulse-Exposure Experiments. The MCF-7 cells were incubated in liquid culture with 10⁻⁷ M of either 1,25(OH)₂D₃ or 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ for various durations. After incubation, these cells were carefully washed twice with PBS, and viable cells were counted and plated into 24-well plates for soft agar colony assay, as described previously (27).

Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry. Cell cycle analysis was performed on MCF-7 cells incubated for 4 days with either 1,25(OH)₂D₃ or 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ at 10⁻⁷ M. The cells were fixed in chilled methanol overnight before staining with 50 µg/ml propidium iodide, 1 mg/ml RNase (100 units/ml; Sigma Chemical Co.), and 0.1% NP40 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Analysis was performed immediately after staining using a FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) and CELLFit program (Becton Dickinson). All experiments were done at least three times independently. All data were statistically analyzed by Student's *t* test.

Western Blot Analysis. Cells were washed twice in PBS, suspended in lysis buffer [50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP40, 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin, and 10 µg/ml leupeptin], and placed on ice for 30 min. After centrifugation at 15,000 × *g* for 20 min at 4°C, the supernatant was collected. Protein concentrations were quantitated using the Bio-Rad assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Whole lysates (15 µg) were resolved by 15% SDS polyacrylamide gel, transferred to an Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Millipore Corp., Bedford, MA), and probed with anti-p27^{kip1} rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa

Cruz, CA), anti-p21^{waf1} murine monoclonal antibody (Oncogene Science, Uniondale, NY), and antiactin murine monoclonal antibody (Oncogene). The blots were developed by using the ECL kit (Amersham Corp., Arlington Heights, IL).

Telomerase Activity. To detect the relative telomerase activity, TRAP assays were performed using TRAP-eze telomerase detection kit (Oncor, Gaithersburg, MD) according to the manufacturer's instruction. For *hTERT*, total RNAs were isolated from HL-60 cells that were treated with either 1,25(OH)₂D₃ or 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ (10⁻⁹, 10⁻⁸, and 10⁻⁷ M) for 4 days with Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY). RT-PCR was performed with 1 µg of total RNA and random hexamer primers using the Superscript Preamplification System (Life Technologies). cDNA was amplified using primers specific for either the *hTERT* gene or the *GAPDH* gene, the latter of which was used as a control. The primers used for *hTERT* were 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3' (sense) and 5'-GGATGAAGCG-GAGTCTGGA-3' (antisense). The thermal cycles were 94°C for 90 s, followed by 33 cycles of 95°C for 20 s, 68°C for 40 s, and 72°C for 30 s. These primers and the PCR conditions were as described previously (28). Primers for the *GAPDH* gene were 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3' (sense) and 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3' (antisense). Conditions for *GAPDH* amplifications were: 94°C for 2 min, 26 cycles of 94°C for 30 s, 62°C for 40 s, and 72°C for 60 s, followed by 72°C for 4 min. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gel and stained with ethidium bromide.

RESULTS

Effect of Vitamin D₃ Analogues on Clonogenic Growth of Prostate, Breast, and Myeloid Leukemic Cells. The LNCaP, MCF-7, and HL-60 cells were cloned in soft agar in the presence of various concentrations of vitamin D₃ analogues at 10⁻¹¹ to 10⁻⁷ M. Dose-response curves were drawn, and the effective dose that inhibited 50% colony formation (ED₅₀) was determined. Initially, 10 analogues were examined (see "Materials and Methods"). The most effective was 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ (Ro 25-4020; data not shown). Thus, additional experiments focused on this analogue. For comparison, 1,25(OH)₂-5,6-trans-D₃, 1,25(OH)₂-16-ene-D₃, and 1,25(OH)₂D₃ were also studied in the additional experiments (Fig. 1). Each of the four vitamin D₃ compounds was effective in inhibition of clonal proliferation of the three cell lines in a dose-dependent manner (Fig. 2). The 1,25(OH)₂-16-ene-D₃ was the most potent. The ED₅₀ of 1,25(OH)₂-16-ene-D₃ was 5.0 × 10⁻¹¹ M, 2.4 × 10⁻¹¹ M, and 1.9 × 10⁻¹² M for LNCaP, MCF-7, and HL-60 cells, respectively (Table 1). The ED₅₀s of 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ was 1.4 × 10⁻⁹ M for LNCaP cells, 4.3 × 10⁻⁹ M for MCF-7 cells, and 3.0 × 10⁻¹¹ M for HL-60 cells, which were about 10–100-fold more potent than 1,25(OH)₂D₃. The potency of 1,25(OH)₂-5,6-trans-D₃ was nearly equivalent to 1,25(OH)₂D₃.

Serum Calcium Levels *in Vivo*. Because hypercalcemia is a major toxicity of vitamin D₃ compounds, we compared their calcemic effects (Fig. 3). The mice that received 0.1 µg of either 1,25(OH)₂D₃ or 1,25(OH)₂-16-ene-D₃ (three times per week) were hypercalcemic, with mean serum calcium levels of approximately 11.6 ± 0.1 and 13.8 ± 0.5 mg/dl (normal, 8.5–10.5 mg/dl) at week 3, respectively. In contrast, mice that received 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ (0.1–2.0 µg/mouse) had almost the same calcium level (7.9–10.4 mg/dl) as the control mice (8.4–9.7 mg/dl). When 6.0 µg/mouse 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ were administered, serum calcium levels increased to a mean 12.9 ± 0.7 and 11.4 ± 0.3 mg/dl at weeks 3 and 5, respectively. When 4.0 µg/mouse were administered, serum calcium levels increased to a mean 11.7 ± 0.8 mg/dl at week 3; but at weeks 4 and 5, levels returned to the normal range.

Pulse-Exposure Experiments. To investigate whether the inhibition of clonogenic proliferation by 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ was reversible, we performed pulse-exposure experiments. The MCF-7 cells were exposed to either 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃

202
199

ANTICANCER EFFECT OF 5,6-TRANS-16-ENE-VITAMIN D₃

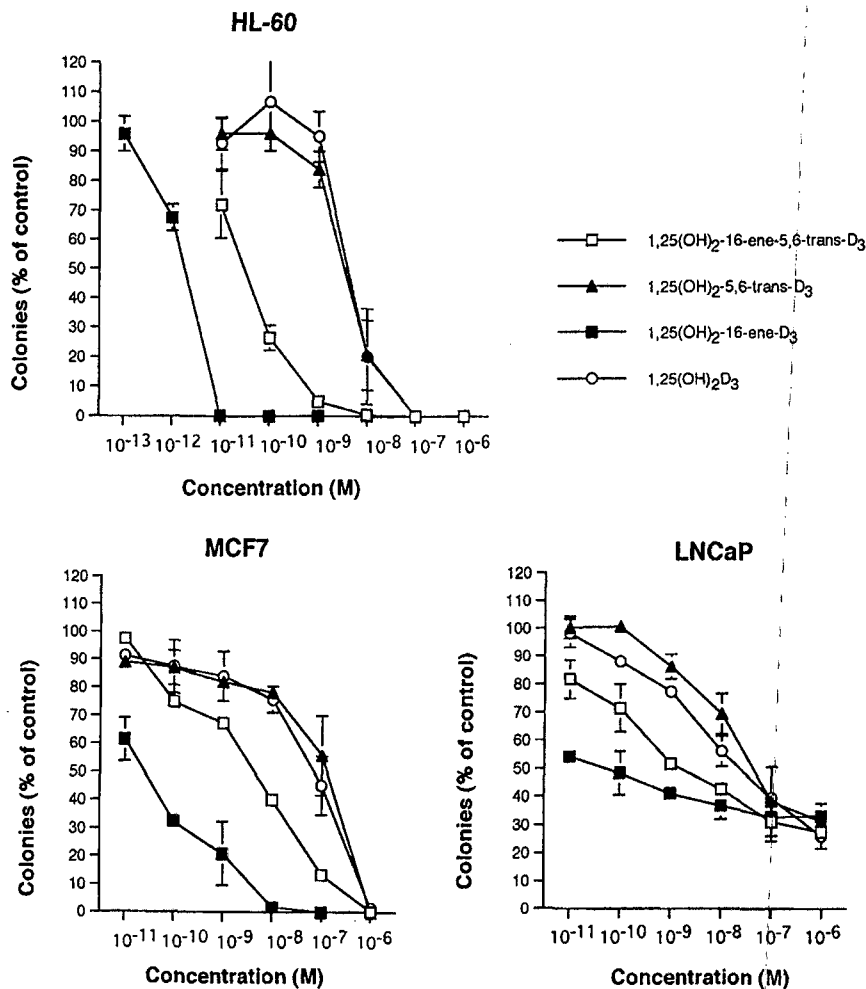


Fig. 2. Dose-response effects of vitamin D₃ compounds on clonal proliferation of HL-60, LNCaP, and MCF-7 cells. Results are expressed as a mean percentage of control plates containing no vitamin D₃ analogues. Each point represents a mean of three independent experiments with triplicate dishes. Bars, SD.

Table 1 Inhibition of clonal proliferation of tumor cells by vitamin D₃ analogues
Data were plotted on semilogarithm graphs (Fig. 2), and the curves were used to calculate the concentration of the analogues achieving a 50% inhibition of clonal growth (ED₅₀).

Analogue	Inhibition of clonal proliferation ED ₅₀ (M) Tumor cell lines		
	HL-60	MCF-7	LNCaP
1,25(OH) ₂ D ₃	4.0 × 10 ⁻⁹	7.3 × 10 ⁻⁸	2.3 × 10 ⁻⁸
1,25(OH) ₂ -5,6-trans-D ₃ (Ro 22-3790)	3.5 × 10 ⁻⁹	1.3 × 10 ⁻⁷	4.3 × 10 ⁻⁸
1,25(OH) ₂ -16-ene-5,6-trans-D ₃ (Ro 25-4020)	3.0 × 10 ⁻¹¹	4.3 × 10 ⁻⁹	1.4 × 10 ⁻⁹
1,25(OH) ₂ -16-ene-D ₃ (Ro 24-2637)	1.9 × 10 ⁻¹²	2.4 × 10 ⁻¹¹	5.0 × 10 ⁻¹¹

or 1,25(OH)₂D₃ for various durations, washed thoroughly, and plated in soft agar; clonal growth was determined on day 14 of culture (Fig. 4). Approximately 40 and 30% of the clonogenic cells were inhibited by 4 days of exposure to 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ and 1,25(OH)₂D₃, respectively, suggesting that these vitamin D₃ compounds were capable of mediating a partial, irreversible inhibition of growth of MCF-7 cells.

Analysis of the Cell Cycle and Expression of p21^{waf1} and p27^{kip1}. To understand better the mechanism by which the vitamin D₃ analogue prevented cell growth, its effect on the cell cycle of the MCF-7 cells was determined. A significant accumulation (*P* < 0.05) of the number of cells in the G₀-G₁ phase of the cell cycle occurred with a concomitant decrease in the proportion of cells in S phase after culture with either 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ or 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M; 4 days; Fig. 5).

The CDKIs known as p21^{waf1} and p27^{kip1} are able to inhibit the activity of cyclin kinase and thus slow the progression of the cells through the cell cycle. The control MCF-7 cells constitutively had a moderate level of expression of p21^{waf1} and p27^{kip1}, as determined by Western blot analysis (Fig. 6A). Exposure for 1 day to 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ (10⁻⁷ M) increased levels of p21^{waf1} and p27^{kip1} by about 3.2–3.5-fold, whereas culture with 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M; 1 day) increased expression of p21^{waf1} and p27^{kip1} about 1.6–1.8-fold. By 3 days, 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ (10⁻⁷ M) increased expression of p21^{waf1} and p27^{kip1} about 2.8- and 3.4-fold, respectively; and 1,25(OH)₂D₃ increased expression of p21^{waf1} and p27^{kip1} by 4.8- and 3.3-fold, respectively. The 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ and 1,25(OH)₂D₃ also up-regulated expression of p27^{kip1} in HL-60 cells in a dose-dependent manner (Fig. 6B).

Telomerase Activity. Maintenance of telomeres is important for cellular well-being, and progressive telomere shortening limits the replicative capacity of cells (29–33). Telomerase activity is inhibited by diverse agents including 1,25(OH)₂D₃ during terminal differentiation of leukemia cell lines (34–36). Therefore, we evaluated the effect 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ and 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁹ to 10⁻⁷ M; 4 days) on telomerase activity using the TRAP assay. Telomerase activity markedly decreased in HL-60 cells cultured with either 10⁻⁹ M 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ or 10⁻⁷ M 1,25(OH)₂D₃ (Fig. 7).

Recent investigations have revealed that hTERT is the catalytic human telomerase subunit, and it plays an important role in the activation of telomerase (37–40). The effects of vitamin D₃ analogues on hTERT expression in HL-60 cells were evaluated using RT-PCR

203
200

ANTICANCER EFFECT OF 5,6-TRANS-16-ENE-VITAMIN D₃

Fig. 3. The effect of vitamin D₃ analogues on serum calcium in mice. □, control; △, 1,25(OH)₂D₃ (0.1 µg); ○, 1,25(OH)₂-5,6-trans-D₃ (0.1 µg); ●, 1,25(OH)₂-16-ene-D₃ (0.1 µg); ▲, 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ (6.0 µg); ■, (4.0 µg); ×, (2.0 µg); ▼, (1.0 µg); ▽, (0.5 µg); ◇, (0.1 µg). Each data point represents the mean; bars, SD. If the SD was <0.2 mg/dl, it does not appear on the graph. The compounds were delivered i.p. on Monday, Wednesday, and Friday.

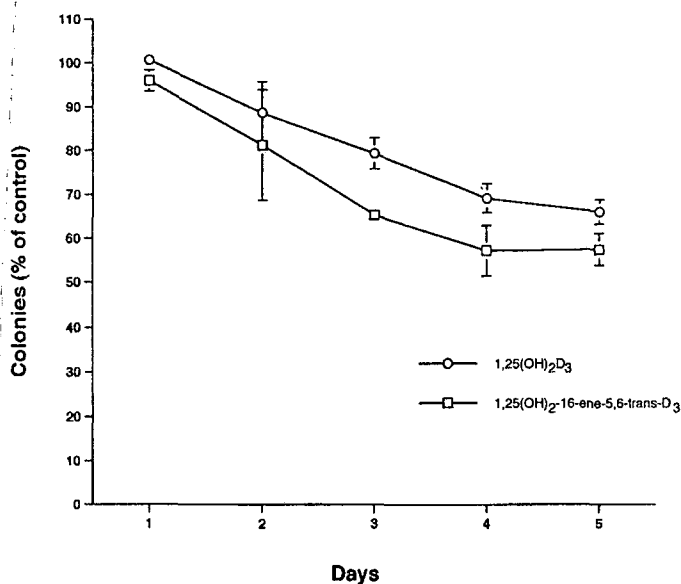
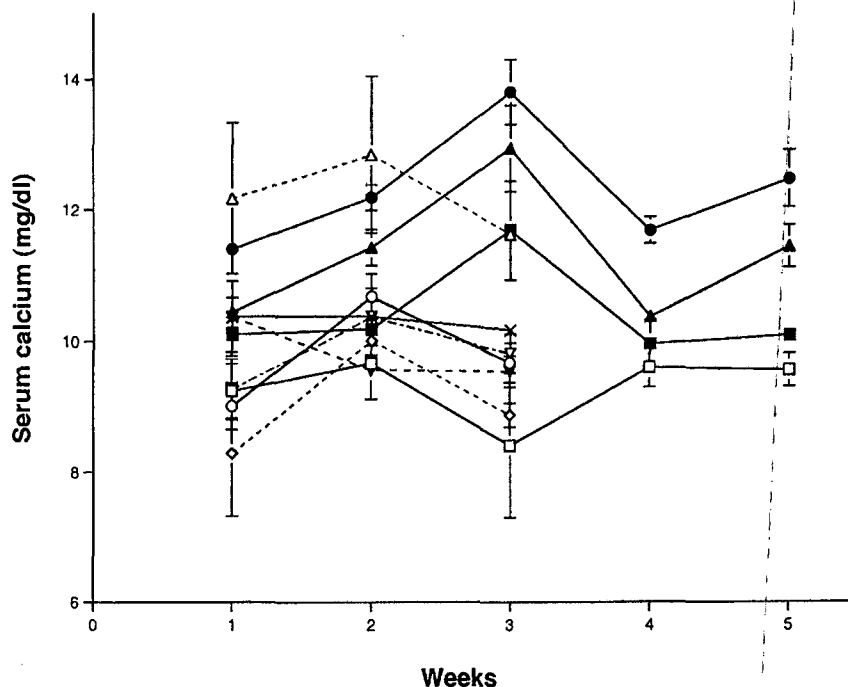


Fig. 4. Effect of pulse-exposure of vitamin D₃ compounds on the clonal growth of MCF-7 cells. MCF-7 cells were exposed to 10⁻⁷ M of either 1,25(OH)₂D₃ or 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ for the indicated duration, washed thoroughly, and plated in the absence of vitamin D₃ compound in soft agar; colonies were enumerated after 14 days of culture. The results are expressed as a mean percentage of colonies in control plates containing cells not exposed to vitamin D₃ analogues. Bars, SD.

(Fig. 8). Both 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ and 1,25(OH)₂D₃ inhibited the expression of *hTERT* mRNA in a dose-dependent manner with almost complete inhibition of expression occurring at 10⁻⁸ M 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ and at 10⁻⁷ M 1,25(OH)₂D₃.

DISCUSSION

Previously, we showed that the vitamin D₃ analogue having the C-16-ene motif [1,25(OH)₂-16-ene-D₃] was more potent than 1,25(OH)₂D₃ in inhibiting the proliferation of HL-60 cells, but the calcemic activity of this analogue was nearly identical to 1,25(OH)₂D₃ (22). The desaturation of the side chain with the addition of a C-23-triple bond [1,25(OH)₂-16-ene-23-yne-D₃] also was

potent in its ability to induce cell differentiation and inhibit leukemic clonal proliferation with low calcemic activity (13, 14, 22). This latter analogue, however, did not have a broad range of activity against breast and prostate cancer cells (27, 41). The addition of six fluorines to the end of the side chain (C-26,27-F₆) markedly enhanced the range and potency of the analogues (24–27, 41, 42). In particular, 1,25(OH)₂-16-ene-23-yne-19-nor-26,27-F₆D₃ is one of the most potent vitamin D₃ analogues in its ability to inhibit clonal proliferation of breast and prostate cancer cells as well as leukemic cells. But a major toxicity with these fluorine-substituted analogues was their potent induction of hypercalcemia in experimental animals (23, 24). In this study, we evaluated in detail a compound from the newly synthesized family of analogues having a C-5,6-trans motif. The 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ strongly inhibited clonal proliferation of each of the cell lines (ED₅₀: HL-60, 3.0 × 10⁻¹¹ M; MCF-7, 4.3 × 10⁻⁹ M; LNCaP, 1.4 × 10⁻⁹ M). It was approximately 10–

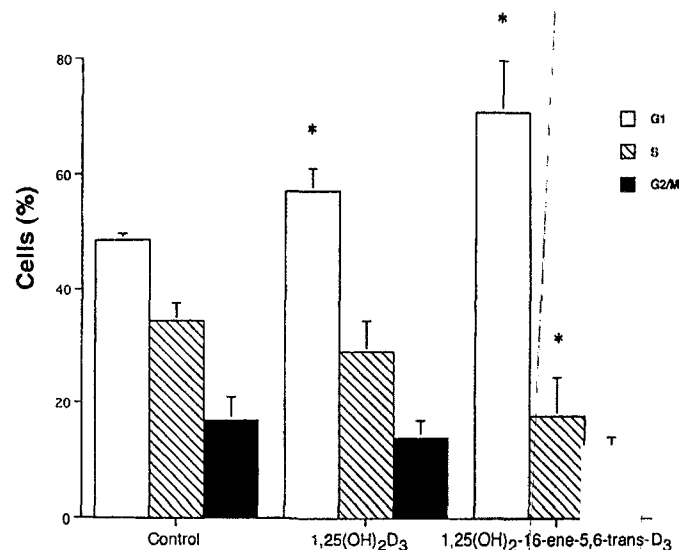
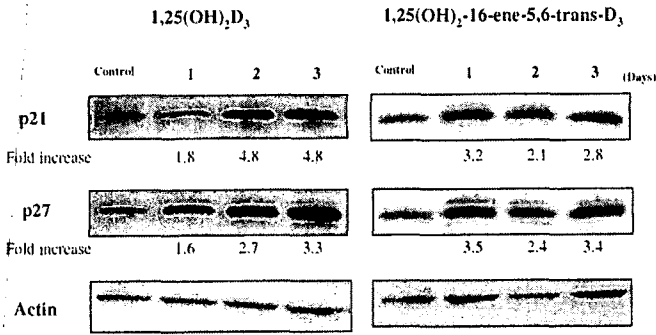


Fig. 5. Cell cycle analysis of MCF-7 cells. Columns, means of three independent experiments; bars, SD. *, *P* < 0.05 as determined by Student's *t* test for difference compared with the control group.

204
201

ANTICANCER EFFECT OF 5,6-TRANS-16-ENE-VITAMIN D₃

A: MCF-7 cells



B: HL-60 cells

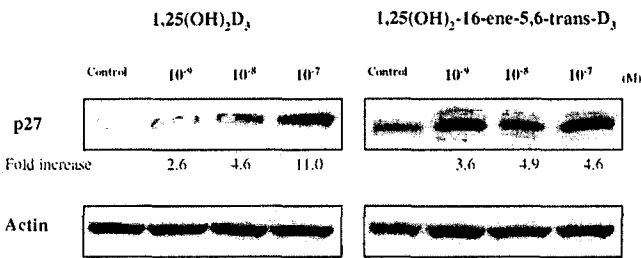


Fig. 6. Western blot analysis of CDKs in cell lines cultured with either 1,25(OH)₂D₃ or 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃. A, time course study of p27^{kip1} and p21^{waf1} expression in MCF-7 breast cancer cells. Cells were either untreated (Control) or cultured with either 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁷ M) or 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ (10⁻⁷ M) for 1, 2, and 3 days. Actin was analyzed as a loading control. B, dose-dependent study of p27^{kip1} expression in HL-60 myeloid leukemic cells. Cells were either untreated (Control) or cultured with 10⁻⁹, 10⁻⁸, and 10⁻⁷ M of either 1,25(OH)₂D₃ or 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ for 4 days. Actin was analyzed as a loading control. Results are expressed as fold increase in expression as compared with untreated cells. The band intensity was measured using a densitometer.

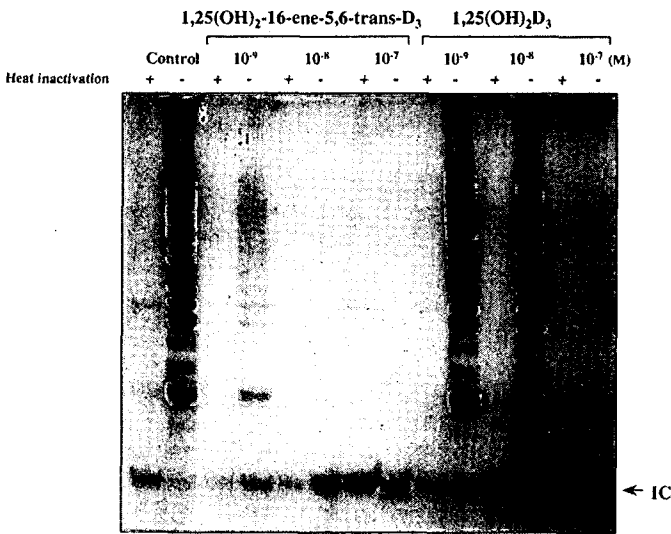


Fig. 7. Telomerase activity was reduced in HL-60 cells cultured with vitamin D₃ compounds. Cells were cultured with 10⁻⁹, 10⁻⁸, and 10⁻⁷ M of either 1,25(OH)₂D₃ or 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ for 4 days. Results were compared with cells not cultured with vitamin D₃ compound (Control, left two lanes). Cell extracts (0.5 µg of protein) were used for TRAP assay either with (+) or without (-) heat inactivation; heat inactivation provides a control. IC, internal control PCR product.

100-fold more active than 1,25(OH)₂D₃. In contrast, the 1,25(OH)₂-5,6-trans-D₃ inhibited cell growth almost to the same degree as 1,25(OH)₂D₃. The 1,25(OH)₂-16-ene-D₃, which has a 16-ene motif, was almost 1000-fold more potent than 1,25(OH)₂D₃ in HL-60 cells as described previously (22). It was ~1000-fold more potent than 1,25(OH)₂D₃ against breast (MCF-7) and prostate (LNCaP) cancer

cell lines. These findings show the importance of the 16-ene motif for antiproliferative activity toward cancer cells.

The dose-limiting toxicity of vitamin D₃ compounds is hypercalcemia. The calcium studies in mice highlighted the importance of the 5,6-trans motif. The 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ had very weak calcemic effects, causing no hypercalcemia at week 5 of administration of 4.0 µg, which was given i.p. three times per week. When the dose of the analogue was increased to 6.0 µg, serum calcium levels became elevated at approximately 11 mg/dl on week 5. In contrast, 1,25(OH)₂D₃ and 1,25(OH)₂-16-ene-D₃ at a 40-fold lower dose (0.1 µg/mouse) induced hypercalcemia. Thus, the addition of the 5,6-trans motif to the 16-ene-containing analogue plays an important role in reducing the calcemic activity of the vitamin D₃ analogues.

Although the addition of the 5,6-trans motif decreased the calcemic potential of the 16-ene-analogue, it also decreased its antiproliferative potency against the target cancer cell lines. To compare the ability of the compounds to inhibit clonal growth and to cause hypercalcemia, we calculated the relative therapeutic potency of the compounds (Table 2). When the results were standardized for their potential to cause hypercalcemia, 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ showed a 2.5- and 1.4-fold greater therapeutic index than 1,25(OH)₂-16-ene-D₃ for growth inhibition of leukemic cells (HL-60) and prostate cancer cells (LNCaP), respectively. For the breast cancer cells (MCF-7), however, 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ had a 4.5-fold lower therapeutic potency than 1,25(OH)₂-16-ene-D₃.

We explored the mechanism by which the vitamin D₃ analogues decreased the clonal growth of cancer cells. The vitamin D₃ compounds, including 1,25(OH)₂D₃, increased the number of MCF-7 cells in G₁ and decreased those in S phase. Recently, studies reported that the CDKs, p21^{waf1} and p27^{kip1}, mediated the G₁ arrest induced by 1,25(OH)₂D₃ in HL-60 cells (43, 44). We have shown previously that vitamin D₃ compounds induced increased expression of p27^{kip1} and p21^{waf1} in several cancer cell lines (26, 27). In this study, 1,25(OH)₂-

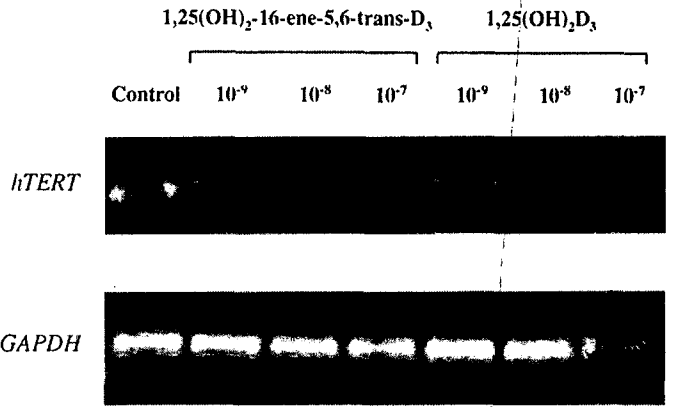


Fig. 8. hTERT expression in HL-60 cells treated with either 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-trans-D₃ or 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ M; 4 days). Control shows untreated cells. Upper panel, hTERT mRNA expression measured by RT-PCR. Lower panel, GAPDH mRNA was measured as a control.

Table 2 Relative therapeutic potency

Analogue	Cell lines ^a		
	HL-60	MCF-7	LNCaP
1,25(OH) ₂ -16-ene-5,6-trans-D ₃ (Ro 25-4020)	5333	679	657
1,25(OH) ₂ -16-ene-D ₃ (Ro 24-2637)	2105	3042	460

^a Calculated by: [concentration of analogue to elevate serum Ca²⁺/concentration of 1,25(OH)₂D₃ to elevate serum Ca²⁺] × [ED₅₀ of 1,25(OH)₂D₃ to inhibit clonal growth/ED₅₀ of analogue to inhibit clonal growth]. The higher number represents an analogue with better therapeutic index.

205
202

16-ene-5,6-*trans*-D₃ markedly enhanced expression of p27^{kip1} and p21^{waf1} in MCF-7 cells and p27^{kip1} expression in HL-60 cells. These results were consistent with the hypothesis that the p27^{kip1} and p21^{waf1} mediated at least in part the antiproliferative effects of the vitamin D₃ compounds by producing a G₁-S phase block of the cell lines.

Furthermore, pulse-exposure of MCF-7 breast cancer cells to 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ (10⁻⁷ M; 4 days), followed by extensive washing, plating in soft agar, and enumerating colony formation at 14 days resulted in a 40% inhibition of colony formation. These results showed that 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ inhibited growth of these cancer cells by a mechanism other than one that was merely cytostatic, and only a relatively brief exposure (4 days) was required to cause this growth suppression. This suggests that brief pulse exposures *in vivo* might suffice for a cancer-suppressive effect.

Telomere length correlates closely with cellular senescence. Cellular senescence appears to be impaired in telomerase-deficient mice (45). Studies have observed that several reagents reduced the telomerase activity during the induction of terminal differentiation of leukemia cell lines (34–36). In this study, the TRAP assay showed that 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ (10⁻⁸ M; 4 days) almost completely inhibited telomerase activity in HL-60 cells; and within the limits of the TRAP assay, 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ was more potent than 1,25(OH)₂D₃. hTERT is probably the human telomerase catalytic subunit (37–40), the expression of which significantly correlates with telomerase activity in malignant cell lines and cancer tissue (46, 47). hTERT expression in tumor cells was down-regulated by several inducers of differentiation [retinoic acid (39) or phorbol diester (48)]. We have found that vitamin D₃ compounds caused the down-regulation of hTERT mRNA expression, and this correlated with down-regulation of telomerase activity. These observations suggest that vitamin D₃ compounds inhibit telomerase activity by reducing hTERT mRNA expression. We do not know if this marked decrease in telomerase activity is the cause or the result of CDKI-induced inhibition of growth and terminal differentiation of HL-60 cells.

Taken together, the new vitamin D₃ compound 1,25(OH)₂-16-ene-5,6-*trans*-D₃ strongly inhibited cell proliferation, caused a G₁-G₀ block in the cell cycle associated with an elevation of expression of several CDKIs, and markedly decreased telomerase activity; and yet, it had extremely low calcemic activity. This analogue should be studied *in vivo* with several cancer models as a prelude to possible future clinical trials.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Chloe Koeffler and Seth Robinson for enthusiastic help. We also thank Patricia Lin (Flow Cytometry Core Facility, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA) for generous technical assistance and Kim Burgin for excellent secretarial help.

REFERENCES

- Minghetti, P. P., and Norman, A. W. 1,25(OH)₂-vitamin D₃ receptors: gene regulation and genetic circuitry. *FASEB J.*, 2: 3043–3053, 1988.
- Eisman, J. A., Martin, T. J., MacIntyre, I., and Moseley, J. M. 1,25-Dihydroxyvitamin D receptor in breast cancer cells. *Lancet*, 2: 1335–1336, 1979.
- Frampton, R. J., Omond, S. A., and Eisman, J. A. Inhibition of human cancer cell growth by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ metabolites. *Cancer Res.*, 43: 4443–4447, 1983.
- Colston, K. W., Chander, S. K., Mackay, A. G., and Coombes, R. C. Effects of synthetic vitamin D analogues on breast cancer cell proliferation *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, 44: 693–702, 1992.
- Bower, M., Colston, K. W., Stein, R. C., Hedley, A., Gazet, J. C., Ford, H. T., and Coombes, R. C. Topical calcipotriol treatment in advanced breast cancer. *Lancet*, 337: 701–702, 1991.
- Frappart, L., Falette, N., Lefebvre, M. F., Bremond, A., Vauzelle, J. L., and Saez, S. *In vitro* study of effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the morphology of human breast cancer cell line BT.20. *Differentiation*, 40: 63–69, 1989.
- Peehl, D. M., Skowronski, R. J., Leung, G. K., Wong, S. T., Stamey, T. A., and Feldman, D. Antiproliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on primary cultures of human prostatic cells. *Cancer Res.*, 54: 805–810, 1994.
- Skowronski, R. J., Peehl, D. M., and Feldman, D. Actions of vitamin D₃ analogs on human prostate cancer cell lines: comparison with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*, 136: 20–26, 1995.
- Danielpour, D., Kadomatsu, K., Anzano, M. A., Smith, J. M., and Sporn, M. B. Development and characterization of nontumorigenic and tumorigenic epithelial cell lines from rat dorsal-lateral prostate. *Cancer Res.*, 54: 3413–3421, 1994.
- Campbell, M. J., Reddy, G. S., and Koeffler, H. P. Vitamin D₃ analogs and their 24-oxo metabolites equally inhibit clonal proliferation of a variety of cancer cells but have differing molecular effects. *J. Cell Biochem.*, 66: 413–425, 1997.
- Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshiki, S., and Suda, T. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 4990–4994, 1981.
- Honma, Y., Hozumi, M., Abe, E., Konno, K., Fukushima, M., Hata, S., Nishii, Y., DeLuca, H. F., and Suda, T. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 1 α -hydroxyvitamin D₃ prolong survival time of mice inoculated with myeloid leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 201–204, 1983.
- Zhou, J. Y., Norman, A. W., Chen, D. L., Sun, G. W., Uskokovic, M., and Koeffler, H. P. 1,25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-vitamin D₃ prolongs survival time of leukemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3929–3932, 1990.
- Norman, A. W., Zhou, J. Y., Henry, H. L., Uskokovic, M. R., and Koeffler, H. P. Structure-function studies on analogues of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃: differential effects on leukemic cell growth, differentiation, and intestinal calcium absorption. *Cancer Res.*, 50: 6857–6864, 1990.
- Wali, R. K., Bissonnette, M., Khare, S., Hart, J., Sitrin, M. D., and Brasitus, T. A. 1 α ,25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-26,27-hexafluorocholecalciferol, a noncalcemic analogue of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, inhibits azoxymethane-induced colonic tumorigenesis. *Cancer Res.*, 55: 3050–3054, 1995.
- Shabahang, M., Buras, R. R., Davoodi, F., Schumaker, L. M., Nauta, R. J., Uskokovic, M. R., Brenner, R. V., and Evans, S. R. Growth inhibition of HT-29 human colon cancer cells by analogues of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Res.*, 54: 4057–4064, 1994.
- Yu, J., Papavasiliou, V., Rhim, J., Goltzman, D., and Kremer, R. Vitamin D analogs: new therapeutic agents for the treatment of squamous cancer and its associated hypercalcemia. *Anticancer Drugs*, 6: 101–108, 1995.
- Naveilhan, P., Berger, F., Haddad, K., Barbot, N., Benabid, A. L., Brachet, P., and Wion, D. Induction of glioma cell death by 1,25(OH)₂ vitamin D₃: towards an endocrine therapy of brain tumors? *J. Neurosci. Res.*, 37: 271–277, 1994.
- Koeffler, H. P., Hirji, K., and Itri, L. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃: *in vivo* and *in vitro* effects on human preleukemic and leukemic cells. *Cancer Treat. Rep.*, 69: 1399–1407, 1985.
- Abe, J., Nakano, T., Nishii, Y., Matsumoto, T., Ogata, E., and Ikeda, K. A novel vitamin D₃ analog, 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D₃, inhibits the growth of human breast cancer *in vitro* and *in vivo* without causing hypercalcemia. *Endocrinology*, 129: 832–837, 1991.
- Zhou, J. Y., Norman, A. W., Akashi, M., Chen, D. L., Uskokovic, M. R., Aureco-echea, J. M., Dauben, W. G., Okamura, W. H., and Koeffler, H. P. Development of a novel 1,25(OH)₂-vitamin D₃ analog with potent ability to induce HL-60 cell differentiation without modulating calcium metabolism. *Blood*, 78: 75–82, 1991.
- Jung, S. J., Lee, Y. Y., Pakkala, S., Vos, S. D., Elstner, E., Norman, A. W., Green, J., Uskokovic, M., and Koeffler, H. P. 1,25(OH)₂-16-ene-vitamin D₃ is potent antileukemic agent with low potential to cause hypercalcemia. *Leuk. Res.*, 18: 453–463, 1994.
- Pakkala, S., Vos, S. D., Elstner, E., Rude, R. K., Uskokovic, M., Binderup, L., and Koeffler, H. P. Vitamin D₃ analogs: effect on leukemic clonal growth and differentiation on serum calcium levels. *Leuk. Res.*, 19: 65–72, 1995.
- Kubota, T., Koshizuka, K., Koike, M., Uskokovic, M., Miyoshi, J., and Koeffler, H. P. 19-nor-26,27-bishomo-Vitamin D₃ analogs: a unique class of potent inhibitors of proliferation of prostate, breast, and hematopoietic cancer cells. *Cancer Res.*, 58: 3370–3375, 1998.
- Anzano, M. A., Smith, J. M., Uskokovic, M. R., Peer, C. W., Mullen, L. T., Letterio, J. J., Welsh, M. C., Shrader, M. W., Logsdon, D. L., Driver, C. L., Brown, C. C., Roberts, A. B., and Sporn, M. B. 1 α ,25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-26,27-hexafluorocholecalciferol (Ro24-5531), a new deltanoid (vitamin D analogue) for prevention of breast cancer in the rat. *Cancer Res.*, 54: 1653–1656, 1994.
- Munker, R., Kobayashi, T., Elstner, E., Norman, A. W., Uskokovic, M., Zhang, W., Andreff, M., and Koeffler, H. P. A new series of vitamin D analogs is highly active for clonal inhibition, differentiation, and induction of WAF1 in myeloid leukemia. *Blood*, 88: 2201–2209, 1996.
- Campbell, M. J., Elstner, E., Holden, S., Uskokovic, M., and Koeffler, H. P. Inhibition of proliferation of prostate cancer cells by a 19-nor-hexafluoride vitamin D₃ analogue involves the induction of p21^{waf1}, p27^{kip1} and E-cadherin. *J. Mol. Endocrinol.*, 19: 15–27, 1997.
- Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H., Giudice, L. C., and Hoffman, A. R. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res.*, 58: 4168–4172, 1998.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature (Lond.)*, 345: 458–460, 1990.
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W., and Harley, C. B. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10114–10118, 1992.
- Wright, W. E., and Shay, J. W. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp. Gerontol.*, 27: 383–389, 1992.

206
203

ANTICANCER EFFECT OF 5,6-TRANS-16-ENE-VITAMIN D₃

32. Counter, C. M. The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat. Res.*, 366: 45-63, 1996.
33. de Lange, T. Telomeres and senescence: ending the debate. *Science (Washington DC)*, 279: 334-335, 1998.
34. Sharma, H. W., Sokoloski, J. A., Perez, J. R., Maltese, J. Y., Sartorelli, A. C., Stein, C. A., Nichols, G., Khaled, Z., Telang, N. T., and Narayanan, R. Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 12343-12346, 1995.
35. Bestilny, L. J., Brown, C. B., Miura, Y., Robertson, L. D., and Riabowol, K. T. Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines. *Cancer Res.*, 56: 3796-3802, 1996.
36. Seol, J. G., Kim, E. S., Park, W. H., Jung, C. W., Kim, B. K., and Lee, Y. Y. Telomerase activity in acute myelogenous leukaemia: clinical and biological implications. *Br. J. Haematol.*, 100: 156-165, 1998.
37. Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Ide, T., and Ishikawa, F. Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.*, 18: 65-68, 1998.
38. Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., and Cech, T. R. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science (Washington DC)*, 277: 955-959, 1997.
39. Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., Bacchetti, S., Haber, D. A., and Weinberg, R. A. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, 90: 785-795, 1997.
40. Kilian, A., Bowtell, D. D., Abud, H. E., Hime, G. R., Venter, D. J., Keese, P. K., Duncan, E. L., Reddel, R. R., and Jefferson, R. A. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum. Mol. Genet.*, 6: 2011-2019, 1997.
41. Koike, M., Elstner, E., Campbell, M. J., Asou, H., Uskokovic, M., Tsuruoka, N., and Koeffler, H. P. 19-nor-Hexafluoride analogue of vitamin D₃: a novel class of potent inhibitors of proliferation of human breast cell lines. *Cancer Res.*, 57: 4545-4550, 1997.
42. Asou, H., Koike, M., Elstner, E., Cambell, M., Le, J., Uskokovic, M. R., Kamada, N., and Koeffler, H. P. 19-nor-Vitamin D analogs: a new class of potent inhibitors of proliferation and inducers of differentiation of human myeloid leukemia cell lines. *Blood*, 92: 2441-2449, 1998.
43. Jiang, H., Lin, J., Su, Z. Z., Collart, F. R., Huberman, E., and Fisher, P. B. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene*, 9: 3397-3406, 1994.
44. Wang, Q. M., Jones, J. B., and Studzinski, G. P. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G₁-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in HL60 cells. *Cancer Res.*, 56: 264-267, 1996.
45. Rudolph, K. L., Chang, S., Lee, H. W., Blasco, M., Gottlieb, G. J., Greider, C., and DePinho, R. A. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell*, 96: 701-712, 1999.
46. Takakura, M., Kyo, S., Kanaya, T., Tanaka, M., and Inoue, M. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res.*, 58: 1558-1561, 1998.
47. Snijders, P. J., van Duin, M., Walboomers, J. M., Steenbergen, R. D., Risse, E. K., Helmerhorst, T. J., Verheijen, R. H., and Meijer, C. J. Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. *Cancer Res.*, 58: 3812-3818, 1998.
48. Ramakrishnan, S., Eppenberger, U., Mueller, H., Shinkai, Y., and Narayanan, R. Expression profile of the putative catalytic subunit of the telomerase gene. *Cancer Res.*, 58: 622-625, 1998.

207
204
375
2006/02/08

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

**Expediente No. 00 - 51318
IPC A61K31/59
Concepto Técnico: 164**

Realizado el estudio de fondo definitivo de la solicitud de patente de invención No. 00 - 51318 con fundamento en el artículo 48 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se notifica el siguiente Concepto Técnico:

1.DOCUMENTOS ESTUDIADOS

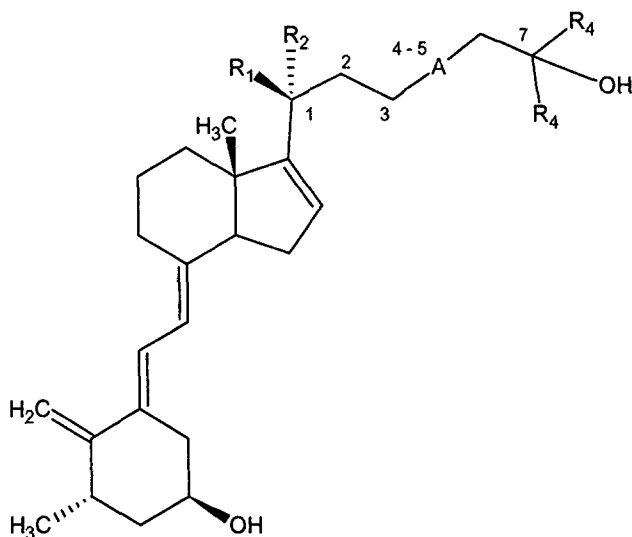
- El resumen y el capítulo descriptivo de la solicitud de los folios 5 y 6 a 25 respectivamente.
- Los ejemplos que ilustran la solicitud en los folios 26 a 38.
- Las cláusulas 1 a 7 relacionadas en el capítulo reivindicatorio de la solicitud y que se encuentran en los folios 40 y 41.
- Copia de la solicitud 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.
- El primer 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.
- El segundo examen técnico de fondo, realizado en virtud del artículo 45 de la Decisión 486, No. 1412 que se encuentra en los folios 170 a 182.
- La respuesta allegada a esta Dependencia con motivo del examen de fondo No. 1412, que se encuentra en los folios 187 a 206.

2.OBJETO DE LA INVENCION

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

- **Reivindicaciones 1 a 7:**

Se reivindica un compuesto de fórmula:

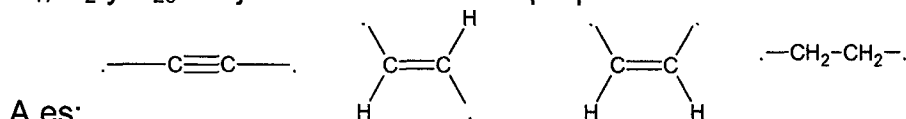


En donde:

R₁ es H o alquilo

R₂ es H o alquilo

R₁, R₂ y C₂₀ conjuntamente son ciclopropilo



R₃ es alquilo, hidroxialquilo o fluoroalquilo y

R₄ es alquilo, hidroxialquilo o fluoroalquilo

En particular el compuesto de fórmula: 1,25-dihidroxi-16-eno-5,6-trans-colecalciferol.

La clasificación según la IPC correspondiente al objeto de la solicitud es A61K31/59.

3. CLARIDAD DE LA SOLICITUD

La descripción divulga la invención de manera clara y completa tal como lo establece el artículo 28 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina cuando dice: "La descripción deberá divulgar la invención de manera suficientemente clara y completa para su comprensión y para que una persona capacitada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla. La descripción de la invención indicará el nombre de la invención e incluirá la siguiente información:

- a) el sector tecnológico al que se refiere o al cual se aplica la invención;
- b) la tecnología anterior conocida por el solicitante que fuese útil para la comprensión y el examen de la invención, y las referencias a los documentos y publicaciones anteriores relativas a dicha tecnología;
- c) una descripción de la invención en términos que permitan la comprensión del problema técnico y de la solución aportada por la invención, exponiendo las diferencias y eventuales ventajas con respecto a la tecnología anterior;
- d) una reseña sobre los dibujos, cuando los hubiera;
- e) una descripción de la mejor manera conocida por el solicitante para ejecutar o llevar a la práctica la invención, utilizando ejemplos y referencias a los dibujos, de ser éstos pertinentes; y,

f) una indicación de la manera en que la invención satisface la condición de ser susceptible de aplicación industrial, si ello no fuese evidente de la descripción o de la naturaleza de la invención."

Las reivindicaciones están acordes con el artículo 30 de la Decisión de la Comunidad Andina: ".- Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción.

Las reivindicaciones podrán ser independientes o dependientes. Una reivindicación será independiente cuando defina la materia que se desea proteger sin referencia a otra reivindicación anterior. Una reivindicación será dependiente cuando defina la materia que se desea proteger refiriéndose a una reivindicación anterior. Una reivindicación que se refiera a dos o más reivindicaciones anteriores se considerará una reivindicación dependiente múltiple."

4.EVALUACIÓN DE UNIDAD DE INVENCION

La presente solicitud comprende una invención o grupo de invenciones relacionadas entre sí, de manera que no se integra un único concepto inventivo conforme al artículo 25 de la Decisión de la Comunidad Andina: "La solicitud de patente sólo podrá comprender una invención o un grupo de invenciones relacionadas entre sí, de manera que conformen un único concepto inventivo."

5.ES UNA INVENCION

El objeto de la presente solicitud no se encuentra comprendido dentro del alcance del artículo 15 de la Comisión de la Comunidad Andina que establece: "No se considerarán invenciones:

- a) los descubrimientos, las teorías científicas y los métodos matemáticos;
- b) el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, los procesos biológicos naturales, el material biológico existente en la naturaleza o aquel que pueda ser aislado, inclusive genoma o germoplasma de cualquier ser vivo natural;
- c) las obras literarias y artísticas o cualquier otra protegida por el derecho de autor;
- d) los planes, reglas y métodos para el ejercicio de actividades intelectuales, juegos o actividades económico-comerciales;
- e) los programas de ordenadores o el soporte lógico, como tales; y,
- f) las formas de presentar información."

6.PATENTABILIDAD DE LAS INVENCIONES

La presente solicitud no se encuentra bajo el alcance del artículo 20 de la Decisión de la Comisión de la Comunidad Andina: "No serán patentables:

- a) las invenciones cuya explotación comercial en el territorio del País Miembro respectivo deba impedirse necesariamente para proteger el orden público o la moral. A estos efectos la explotación comercial de una invención no se considerará contraria al orden público o a la moral solo debido a la existencia de una disposición legal o administrativa que prohíba o que regule dicha explotación;
- b) las invenciones cuya explotación comercial en el País Miembro respectivo deba impedirse necesariamente para proteger la salud o la vida de las personas o de los animales, o para preservar los vegetales o el medio ambiente. A estos efectos la explotación comercial de una invención no se considerará contraria a la salud o la vida de las personas, de los animales, o

para la preservación de los vegetales o del medio ambiente sólo por razón de existir una disposición legal o administrativa que prohíba o que regule dicha explotación;

c) las plantas, los animales y los procedimientos esencialmente biológicos para la producción de plantas o animales que no sean procedimientos no biológicos o microbiológicos;

d) los métodos terapéuticos o quirúrgicos para el tratamiento humano o animal, así como los métodos de diagnóstico aplicados a los seres humanos o a animales."

7.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, 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.

7.1 Evaluación de la NOVEDAD

La Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece en su art. 16.- *"Una invención se considerará nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica."*

El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente o, en su caso, de la prioridad reconocida."

Sólo para el efecto de la determinación de la novedad, también se considerará dentro del estado de la técnica, el contenido de una solicitud de patente en trámite ante la oficina nacional competente, cuya fecha de presentación o de prioridad fuese anterior a la fecha de presentación o de prioridad de la solicitud de patente que se estuviese examinando, siempre que dicho contenido esté incluido en la solicitud de fecha anterior cuando ella se publique o hubiese transcurrido el plazo previsto en el artículo 40."

Después de realizada la búsqueda de anterioridades en los archivos con que cuenta la Oficina, y no habiéndose encontrado alguna anterioridad que se anticipara a un compuesto análogo de vitamina D3 en configuración trans en las posiciones 5 y 6 y con una cadena carbonada principal de 8 átomos de carbono en la posición 17, con actividad antineoplásica y antihipercalcémica se considera que la materia correspondiente a estas reivindicaciones es nueva.

7.2 Evaluación del NIVEL INVENTIVO

De acuerdo al art. 18.- *"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."*, se conceptúa:

Los compuestos reivindicados cuentan con nivel inventivo puesto que se trata de los isómeros trans de la posición 5-6 de análogos de vitamina D3, que presentan una configuración tal que no incrementan los niveles intracelulares de calcio, por tanto se reduce el índice de mortalidad por hipercalcemia de acuerdo con los ensayos preclínicos realizados sobre reactivo biológico; motivo por el cual una persona medianamente versada en la materia técnica correspondiente no puede derivar del arte que un cambio en la configuración estructural de la molécula generaría variaciones relacionadas con la actividad de los compuestos análogos de vitamina D3, en particular en el mecanismo de liberación de los iones calcio. Por lo anterior se considera que los compuestos no son obvios y no se derivan de manera evidente del estado de la técnica, por lo tanto tienen nivel inventivo.

7.3Evaluación de la APLICACIÓN INDUSTRIAL

De acuerdo al art. 19.- *“Se considerará que una invención es susceptible de aplicación industrial, cuando su objeto pueda ser producido o utilizado en cualquier tipo de industria, entendiéndose por industria la referida a cualquier actividad productiva, incluido los servicios.”*, se conceptúa:

Se considera que los compuestos objeto de la solicitud poseen aplicación industrial ya que pueden emplearse en la industria farmacéutica por su actividad antineoplásica e hipocalcémica.

Teniendo en cuenta lo anterior y en razón del cumplimiento del Art.14 de la Comisión de la Comunidad Andina, se recomienda conceder el privilegio solicitado para las reivindicaciones 1 a 7, folios 40 y 41.

EXAMINADOR TÉCNICO CÓDIGO 202044	JEFE DIVISIÓN NUEVAS CREACIONES	FECHA 2006-02-08
-------------------------------------	---------------------------------	---------------------



209

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 3165

Por la cual se otorga una patente de invención

CERTIFICADO 28461

Rad. N° 00-51318

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
en ejercicio de sus facultades legales, en especial de las que se confirieron en el artículo 4, numeral 5 del decreto 2153 de 1992, y

CONSIDERANDO:

PRIMERO: Que mediante escrito radicado en esta Superintendencia con el número 00051318 del día 10 de julio del 2000, se solicitó conceder patente para la invención contenida en el expediente de la referencia.

SEGUNDO: Que efectuado el examen de forma y cumplidas las exigencias legales, se ordenó publicar el extracto sin que se hubieran presentado observaciones.

TERCERO: Que realizado el examen de fondo se requirió al solicitante en los términos del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, para que presentara respuesta a las observaciones de carácter técnico visibles a folios 170 a 182 del cuaderno administrativo, relacionadas con la patentabilidad o cumplimiento de los requisitos establecidos por esta Decisión, para la concesión de la patente.

CUARTO: Que el solicitante, mediante escrito radicado bajo el número 00051318 00000006 del 27 de diciembre del 2005, atendió oportunamente el requerimiento formulado, presentando las aclaraciones respectivas en relación con las observaciones efectuadas en el examen de fondo.

QUINTO: Que en virtud de lo dispuesto en el artículo 14 de la Decisión 486 expedida por la Comisión de La Comunidad Andina se 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".

SEXTO: Que en el presente caso cumplen los requisitos indicados en el numeral anterior las reivindicaciones 1 a 7 contenidas en los folios 40 y 41, razón por la cual este Despacho encuentra procedente conceder para las mismas el privilegio solicitado.

RESUELVE:

ARTICULO PRIMERO: Otorgar privilegio de patente de invención a la creación denominada:

" ANALOGOS DE VITAMINA D₃ "

3165



210

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION 3165

Por la cual se otorga una patente de invención

CERTIFICADO 28461

Rad. N° 00-51318

Clasificación IPC: A 61 K 31/59.

Reivindicación(es): 1 a 7 **Folio(s):** 40 y 41.

Titular(es): F. HOFFMANN – LA ROCHE A.G.

Domicilio(s): Basilea, Suiza.

Inventor(es): Andrew David Batcho, Bernard Michael Hennessy y Milan Radoje Uskokovic.

Prioridad N° 60/143,413 **Fecha:** 12 de julio de 1999 **País:** US.

Vigente desde: 10 de julio del 2000 **Hasta:** 10 de julio del 2020

ARTICULO SEGUNDO: El titular tendrá los derechos y las obligaciones establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y su privilegio caducará en las condiciones prescritas por las disposiciones legales vigentes sobre propiedad industrial.

ARTICULO TERCERO: Entregar al titular copia auténtica de esta resolución y el certificado de patente, previas las anotaciones en los libros de registro.

ARTICULO CUARTO: Notificar el contenido de la presente resolución al doctor Gustavo Tamayo Arango, o a quien haga sus veces, en su calidad de apoderado de F.Hoffmann – La Roche A.G., entregándole copia de la misma, advirtiéndole que contra ella procede el recurso de reposición ante el Superintendente de Industria y Comercio, del cual podrá hacer uso al momento de la notificación o dentro de los cinco 5 días hábiles siguientes a ella.

NOTIFÍQUESE Y CUMPLASE

Dada en Bogotá, D.C., a los

15 FEB. 2006

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO,

JAIRO RUBIO ESCOBAR

Doctor
GUSTAVO TAMAYO ARANGO
Calle 72 N° 5 – 83 Piso 5.
Bogotá, D.C.

202021

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Sede CAN: Tl. 40A No. 38-50 Conmutador: 3820840
Fax: 382 26 95. Línea 9800-910 165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia