



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 11 596 T2 2004.07.01**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 080 055 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 11 596.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/12084

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 953 332.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/061398

(86) PCT-Anmeldetag: 28.05.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 02.12.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 07.03.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 24.09.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 01.07.2004

(51) Int Cl.⁷: **C07C 1/00**

A61K 31/592, C07C 401/00, A61P 3/02,
A61P 5/20, A61P 17/06, A61P 35/00,
A61P 37/00, A61P 37/06

(30) Unionspriorität:

86969 29.05.1998 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, IE, IT, LI, LU,
NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Bone Care International Inc., Madison, Wis., US

(72) Erfinder:

BISHOP, W., Charles, Madison, US; KNUTSON, C.,
Joyce, Madison, US; STRUGNELL, Stephen,
Madison, US

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(54) Bezeichnung: 24-HYDROXY VITAMIN D, DEREN ANALOGEN UND VERWENDUNGEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

[0001] Diese Erfindung betrifft im Allgemeinen 24-Hydroxyvitamin-D-Verbindungen und ihre Verwendung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und Prävention von Hyperparathyreoidismus und hyperproliferativen Erkrankungen und bei der Modulierung der Immunreaktion sowie der Behandlung von Knochenschwunderkrankungen.

[0002] Seit langem ist bekannt, dass Vitamin D eine bedeutende biologische Rolle im Knochen- und Mineralstoffwechsel spielt. Vitamin D spielt beispielsweise eine entscheidende Rolle bei der Stimulierung der Kalziumabsorption und der Regulierung des Kalziumstoffwechsels. Die Entdeckung aktiver Formen von Vitamin D (M. F. Holick et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 803–804 (1971); G. Jones et al., Biochemistry 14, 1250–1256 (1975)) und aktiver Vitamin-D-Analoga (M. F. Holick et al., Science 180, 190–191 (1973); H. Y. Lam et al., Science 186, 1038–1040 (1974)) löste große Aufregung und Spekulationen über die Nützlichkeit dieser Vitamin-D-Verbindungen in der Behandlung von Knochenschwunderkrankungen aus.

[0003] Tierstudien, in denen die Wirkungen dieser aktiven Vitamin-D-Verbindungen untersucht wurden, lassen vermuten, dass solche Wirkstoffe zur Wiederherstellung des Kalziumgleichgewichts eingesetzt werden können. Eine frühe klinische Studie ergab, dass die Verabreichung von 0,5 µg/Tag 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃, der hormonell aktiven Form von Vitamin D₃, an eine Gruppe postmenopausaler Frauen die intestinale Kalziumabsorption sowie das Kalziumgleichgewicht der Frauen verbesserte. Davon ausgehend beschrieb und beanspruchte das US-Patent 4.225.596 ("596-Patent") die Verwendung von 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ und Analoga davon zur Erhöhung der Kalziumabsorption und -retention.

[0004] Der beste Indikator für die Wirksamkeit von Vitamin-D-Verbindungen bei der Prävention oder Behandlung von Knochenschwunderkrankungen ist jedoch der Knochen selbst, und nicht die Kalziumabsorption oder das Kalziumgleichgewicht. Neuere klinische Daten zeigen auf, dass bei Dosisbereichen, die im Patent '596 angeführt wurden, das 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ nur bescheidene Wirkung in der Prävention oder Wiederherstellung verlorener Knochenmasse oder verlorenen Knochenmineralgehalts aufweist (S. M. Ott und C. H. Chesnut, Ann. Int. Med. 110, 267–274 (1989); J. C. Gallagher et al., Ann. Int. Med. 113, 649–655 (1990); J. Aloia et al., Amer. J. Med. 84, 401–408 (1988)).

[0005] Diese klinischen Studien mit 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ und eine weitere Studie mit 1α-Hydroxyvitamin D₃ (M. Shiraki et al., Endocrinol. Japan 32, 305–315 (1985)) zeigen, dass die Fähigkeit dieser beiden Vitamin-D-Verbindungen, verlorene Knochenmasse oder verlorenen Knochenmineralgehalt wiederherzustellen, von der Dosis abhängt. Diese Studien zeigen aber auch, dass bei einer Dosis, die erforderlich ist, damit diese Verbindungen wirksam sind, Toxizität in Form von Hyperkalzämie und Hyperkalzurie zu einem bedeutenden Problem werden. Vor allem Versuche, die Menge von 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ über 0,5 µg/Tag zu erhöhen, haben häufig zu Toxizität geführt. Bei Dosen unter 0,5 µg/Tag wurde keinerlei Wirkung auf die Knochenmasse oder den Mineralgehalt beobachtet. (Siehe G. F. Jensen et al., Clin. Endocrinol. 16, 515–524 (1982); C. Christiansen et al., Eur. J. Clin. Invest. 11, 305–309 (1981)).

[0006] Daten über klinische Studien in Japan, einer Bevölkerungsgruppe, die eine sehr geringe Kalziumaufnahme aufweist, zeigen, dass schon 1 µg/Tag 1α-Hydroxyvitamin D₃ Wirkung hat (M. Shiraki et al., Endocrinol. Japan. 32, 305–315 (1985); H. Orimo et al., Bone and Mineral 3, 47–52 (1987)). Zwei µg/Tag 1α-Hydroxyvitamin D₃ erhöhten die Knochenmasse bei Patienten mit Altersosteoporose (O. H. Sorensen et al., Clin. Endocrinol. 7, 169S–175S (1977)). Bei 2 µg/Tag 1α-Hydroxyvitamin D₃ trat jedoch bei etwa 67 Prozent der Patienten Toxizität auf, und bei 1 µg/Tag lag dieser Prozentsatz bei etwa 20 Prozent. Somit können diese 1α-hydroxylierten Vitamin-D₃-Verbindungen aufgrund ihrer inhärenten kalzämischen Aktivität zu gefährlich erhöhten Blutkalziumwerten führen.

[0007] Aufgrund dieser Toxizität können 1-hydroxylierte Vitamin-D₃-Verbindungen nur in Dosen verabreicht werden, die bestenfalls mäßige Wirkung in der Behandlung oder Prävention von Knochenschwund oder des Rückgangs des Knochenmineralgehalts aufweist. Tatsächlich empfiehlt Aloia, alternative Verabreichungswege zu suchen, durch welche die Toxizitätsprobleme vermieden werden und höhere Dosen erreicht werden können (J. Aloia et al., Amer. J. Med. 84, 401–408 (1988)). Trotz bekannter Berichte über die Toxizität von 1α-Hydroxyvitamin D₃ und 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ werden diese Medikamente in der Behandlung vieler Knochenschwunderkrankungen immer noch eingesetzt.

[0008] Diese zwei Medikamente sind auch die einzigen zugelassenen Formen des 1α-hydroxylierten Vitamins D zur Behandlung oder Prävention von Hyperparathyreoidismus, der sekundär nach dem Endstadium eines Nierenleidens auftritt, obwohl die beiden Medikamente derzeit nicht auf allen wichtigen pharmazeutischen Märkten zugelassen sind. Hyperparathyreoidismus ist eine generalisierte Störung, die aus übermäßiger Sekretion des Parathormons (PTH) durch eine oder mehrere Nebenschilddrüsen resultiert. Somit ist sie durch erhöhte Blutwerte des Parathormons gekennzeichnet.

[0009] Typischerweise weisen eine oder mehrere Nebenschilddrüsen eine deutliche Vergrößerung auf. Im

Fall von primärem Hyperparathyreoidismus ist die Vergrößerung normalerweise auf ein Neoplasma oder einen Tumor zurückzuführen. Im Fall von sekundärem Hyperparathyreoidismus kommt es aufgrund der Resistenz gegenüber den metabolischen Wirkungen des Hormons typischerweise zu Nebenschilddrüsenhyperplasie.

[0010] Sekundärer Hyperparathyreoidismus kommt bei Patienten mit beispielsweise Nierenversagen, Osteomalazie und intestinalem Malabsorptionssyndrom vor. Sowohl bei primärem als auch bei sekundärem Hyperparathyreoidismus treten häufig Knochenanomalien, wie beispielsweise Verlust von Knochenmasse oder verringelter Mineralgehalt, auf, und auch eine Schädigung der Niere ist möglich. Hyperparathyreoidismus ist somit durch Kalzium-, Phosphor- und Knochenstoffwechselanomalien gekennzeichnet.

[0011] Vor kurzem wurden andere Aufgaben von Vitamin D aufgedeckt. So wurden in Zellen von verschiedenen Organen, die nicht an der Kalziumhomöostase beteiligt sind, spezifische Kernrezeptoren für 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ gefunden. Miller et al., Cancer Res. 52, 515–520 (1992) haben beispielsweise in der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP biologisch aktive, spezifische Rezeptoren für 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ nachgewiesen.

[0012] Berichte zeigen, dass bestimmte Vitamin-D-Verbindungen und -Analoga potente Inhibitoren maligner Zellproliferation und Induktoren/Stimulanzien von Zelldifferenzierung sind. Das US-Patent 4.391.802 von Suda et al. offenbart beispielsweise, dass 1 α -Hydroxyvitamin-D-Verbindungen, insbesondere 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ und 1 α -Hydroxyvitamin D₃, starke antileukämische Wirkung aufweisen, da sie die Differenzierung von malignen Zellen (vor allem Leukämiezellen) an nicht-maligne Makrophagen (Monozyten) induzieren, und zur Behandlung von Leukämie eingesetzt werden können. In einem weiteren Beispiel berichteten Skowronski et al., Endocrinology 136, 20–26 (1995) über antiproliferative und differenzierende Wirkungen von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ und anderen Vitamin-D₃-Analoga auf Prostatakrebszelllinien.

[0013] Frühere Proliferationsstudien, wie beispielsweise die oben genannten, konzentrierten sich ausschließlich auf Vitamin-D₃-Verbindungen. Obwohl solche Verbindungen tatsächlich große Wirkung in der Differenzierung maligner Zellen in einer Kultur aufweisen können, ist ihr praktischer Nutzen als Mittel zu Behandlung von Krebs in der Differenzierungstherapie stark begrenzt, weil sie ebenso große Wirkung auf den Kalziumstoffwechsel haben. Bei den in vivo zur wirksamen Verwendung als antileukämische Wirkstoffe erforderlichen Dosen können dieselben Verbindungen aufgrund ihrer inhärenten kalzämischen Aktivität stark erhöhte und möglicherweise gefährliche Blutkalziumwerte verursachen. Mit anderen Worten ist die klinische Verwendung von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ und anderen Vitamin-D₃-Analoga als Krebsbehandlungsmittel durch das Risiko von Hyperkalzämie ausgeschlossen oder stark beschränkt.

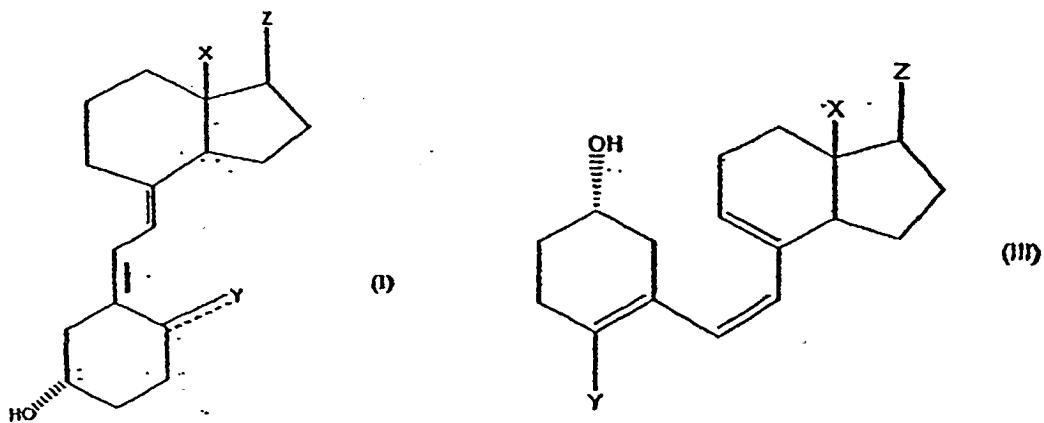
[0014] Weitere Aspekte des Stoffwechsels, bei denen angenommen wird, dass Vitamin D eine Rolle spielt, sind Immunreaktionen (siehe beispielsweise das US-Patent 4.749.710 von Truitt et al.; das US-Patent 5.559.107 von Gates et al.; und die US-Patente 5.540.919., 5.518.725 und 5.562.910 von Daynes et al.) und Entzündungsreaktionen (siehe beispielsweise das US-Patent 5.589.471 von Hansen et al.).

[0015] Die US 5.098.899 offenbart die Verwendung von Vitamin-D-Verbindungen in der Behandlung von Psoriasis-Arthritis. Die Verbindungen dieses Patents können an verschiedenen Positionen Hydroxygruppen aufweisen, aber die bevorzugtesten Verbindungen weisen Hydroxygruppen an der 1- und/oder 25-Position des Vitamins D auf.

[0016] In Anbetracht der unterschiedlichen biologischen Wirkungen von Vitamin D und seiner Einsatzmöglichkeit als therapeutischer Wirkstoff, sollten Verbindungen mit höherer spezifischer Aktivität und Wirkungsselektivität entwickelt werden, beispielsweise Vitamin-D-Verbindungen mit antiproliferativen und differenzierenden Wirkungen, die jedoch geringere kalzämische Aktivität aufweisen als therapeutische Mengen der bekannten Verbindungen oder Analoga von Vitamin D₃.

KURZE ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0017] In einem ersten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein 24-Hydroxyvitamin D der Formel (I) oder 24-Hydroxyprovitamin D der Formel (III) zur Steigerung oder Beibehaltung der Knochenmasse oder des Knochenmineralgehalts; und/oder zur Senkung oder Beibehaltung eines verringerten Parathormon-Spiegels; und/oder zum Hemmen von Hyperproliferation; und/oder zur Induktion oder Förderung von Zelldifferenzierung; und/ oder zur Modulation einer Immun- und/oder Entzündungsreaktion bereit:

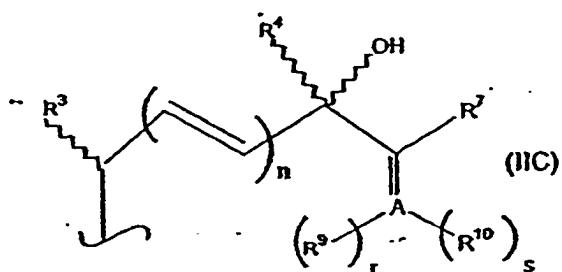
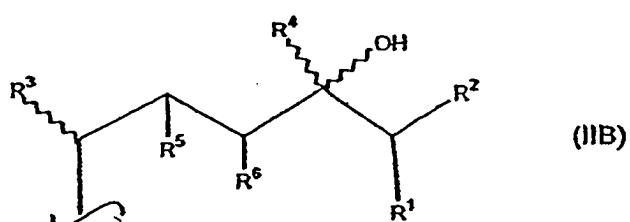
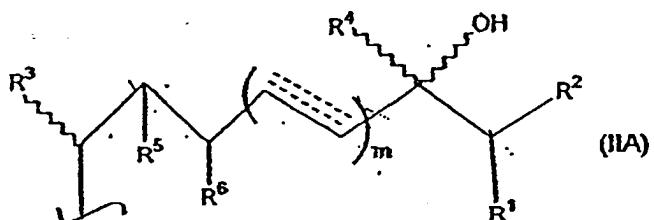


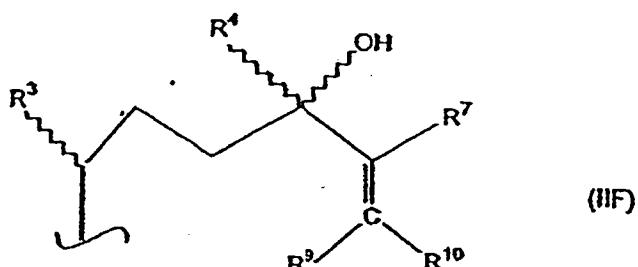
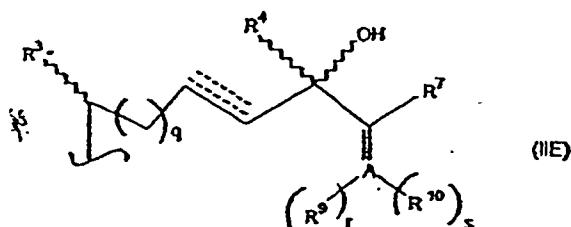
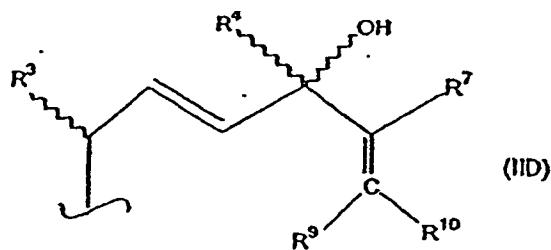
worin:

X Wasserstoff, Niederalkyl oder Niederfluoralkyl ist;

Y eine Methylengruppe, wenn Y über eine Doppelbindung an den A-Ring gebunden ist, oder eine Methylgruppe oder Wasserstoff ist, wenn Y über eine Einfachbindung an den A-Ring gebunden ist; und

Z eine Seitenkette der Formel (IIA), (IIB), (IIC), (IID), (IIE) oder (IIF) ist;





worin:

R¹ und R² jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl, Niederfluoralkenyl, Niedercycloalkyl sind oder gemeinsam mit dem Kohlenstoff, an den sie gebunden sind, einen zyklischen C₃-C₈-Kohlenwasserstoff-Ring bilden;

R³ Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist;

R⁴ Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist;

R⁵ und R⁶ jeweils Wasserstoff sind oder gemeinsam eine Doppelbindung bilden;

R⁷ Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist;

R⁹ und R¹⁰ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederalkenyl, Niederfluoralkyl oder Niederfluoralkenyl sind;

A Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff ist;

m = 0 oder 1 ist;

n eine ganze Zahl von 1 oder 2 ist;

q = 0 oder eine ganze Zahl von 1 oder 2 ist;

r = 1 ist und s = 0 ist, wenn A Stickstoff ist;

r und s = 1 sind, wenn A Kohlenstoff ist;

r und s = 0 sind, wenn A Schwefel oder Sauerstoff ist; und

eine strichlierte Linie entlang der Seitenkette eine optionale zusätzliche C-C-Bindung darstellt;

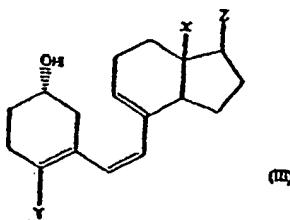
und worin der oben als Modifikator für Alkyl-, Alkenyl-, Fluoralkyl-, Fluoralkenyl- oder Cycloalkylgruppe verwendete Begriff "Nieder-" eine unverzweigte oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen bezeichnet.

[0018] In einem zweiten Aspekt stellt die Erfindung die Verwendung eines 24-Hydroxyvitamins D der Formel (I) oder eines 24-Hydroxyprovitamins D der Formel (III), wie sie oben bei der Herstellung eines Medikaments zur Steigerung oder Beibehaltung der Knochenmasse oder des Knochenmineralgehalts definiert wurden; und/oder zur Senkung oder Beibehaltung eines verringerten Parathormon-Spiegels; und/oder zum Hemmen von Hyperproliferation; und/oder zur Förderung von Zelldifferenzierung; und/oder zur Modulation einer Immun- und/oder Entzündungsreaktion bereit.

[0019] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit, die eine wirksame Menge eines 24-Hydroxyvitamins D der Formel (I) oder eines 24-Hydroxyprovitamins D der Formel (III), wie sie oben definiert wurden, und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, ein pharmazeutisch annehmbares Adjutans oder ein pharmazeutisch annehmbares Vehikel umfasst.

[0020] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein 24-Hydroxyprovitamin D bereit, das eine Verbindung

der Formel (III):



ist, worin Z für eine gesättigte oder ungesättigte, substituierte oder unsubstituierte, unverzweigte, verzweigte oder zyklische C₄-C₁₈-Kohlenwasserstoffgruppe steht, in der C-24 hydroxyliert ist; Y eine Methylgruppe oder Wasserstoff ist; und X Wasserstoff, Niederalkyl oder Niederfluoralkyl ist, und worin der oben als Modifikator für Alkyl-, Alkenyl-, Fluoralkyl-, Fluoralkenyl- oder Cycloalkylgruppe verwendete Begriff "Nieder-" eine unverzweigte oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen bezeichnet. Diese Verbindung kann zur Steigerung oder Beibehaltung der Knochenmasse oder des Knochenmineralgehalts; und/oder zur Senkung oder Beibehaltung eines verringerten Parathormon-Spiegels; und/oder zum Hemmen von Hyperproliferation; und/oder zur Induktion oder Förderung von Zelldifferenzierung; und/oder zur Modulation einer Immun- und/oder Entzündungsreaktion eingesetzt werden.

[0021] In anderen Aspekten stellt die Erfindung chemische Verbindungen bereit, wie sie in den beiliegenden Ansprüchen 23, 24, 25 und 26 definiert sind.

[0022] Die Verbindung der Formel (I) ist eine 24-Hydroxyvitamin-D-Verbindung, die im Vergleich zu aktiven Formen von Vitamin D₃ starke biologische Aktivität aber geringe kalzämische Aktivität aufweist. Vorzugsweise sind solche Verbindungen 24-hydroxylierte Pro-Pharmaka, die in vivo an der C-1-Position hydroxyliert sind, um 1,24-dihydroxylierte aktive Vitamin-D-Verbindungen zu bilden.

[0023] Der Begriff "Vitamin-D-Verbindung" bezeichnet hierin Verbindungen, welche die generische Struktur der Formel (II) aufweisen, und solch eine Verbindung oder ihr Metabolit weist Vitamin-D-hormonale Bioaktivität auf. Außerdem ist anzumerken, dass für die D-Verbindungen oft Kurzbezeichnungen verwendet werden, wie beispielsweise 1 α -OH-D₂ für 1 α -Hydroxyvitamin D₂.

[0024] In einem weiteren Aspekt umfasst die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, in der die Verbindung der Formel (I) den aktiven Bestandteil darstellt. Solch eine Zusammensetzung wird geeigneterweise in einer Dosierungseinheit verabreicht, die eine wirksame Menge einer Vitamin-D-Verbindung der Formel (I) und einen pharmazeutisch annehmbaren Exzipienten aufweist.

[0025] Die Behandlungsmethoden der vorliegenden Erfindung stellen Alternativen zu herkömmlichen Therapien mit dem 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ oder 1 α -Hydroxyvitamin D₃ dar. Die Methoden sind dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel (I) mit gleicher Bioaktivität aber viel geringerer Toxizität bereitgestellt ist als bei diesen herkömmlichen Therapien.

[0026] Weitere Vorteile und eine genauere Einschätzung der spezifischen Merkmale dieser Erfindung sind in den folgenden Abbildungen, der detaillierten Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen und den beiliegenden Ansprüchen zu entnehmen. Es ist offensichtlich, dass die Abbildungen nur zur Veranschaulichung und Beschreibung dienen und nicht als Definition der Grenzen der Erfindung zu verstehen sind.

KURZBESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0027] Im Folgenden wird die als Beispiel angeführte bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung unter Bezugnahme auf die beiliegenden Abbildungen beschrieben, worin ähnliche Bezeichnungen sich auf ähnliche Elemente beziehen und wobei:

[0028] **Fig. 1** ein Beispiel eines Reaktionsschemas zur Herstellung eines 24-Hydroxyvitamins D₂ ist;

[0029] **Fig. 2** ein Beispiel eines Reaktionsschemas zur Herstellung eines 24-Hydroxy-25-en-Vitamins D₂ ist;

[0030] **Fig. 3** ein IR-Spektrum eines 24(S)-Hydroxyvitamins D₂ ist; und

[0031] **Fig. 4** ein NMR-Spektrum der Verbindung von **Fig. 3** ist.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0032] Die vorliegende Erfindung betrifft 24-Hydroxyvitamin-D-Verbindungen. Die Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung sind zur Verwendung in der Behandlung und Prophylaxe von bestimmten Krankheiten und Leiden angepasst, wie beispielsweise von Hyperproliferations- und Entzündungsleiden und bestimmten Immunreaktionszuständen. Solche Hyperproliferationsleiden umfassen Haut-, Brust-, Darm- und Prostatakrebs und Psoriasis. Entzündungsleiden umfassen Arthritis und Asthma. Hyperparathyreoidismusleiden umfassen sowohl primären als auch sekundären Hyperparathyreoidismus. Immunreaktionszustände umfassen Autoimmundiabetes, Multiple Sklerose und Abstoßung von Transplantaten. Demgemäß wird die vorliegende Erfin-

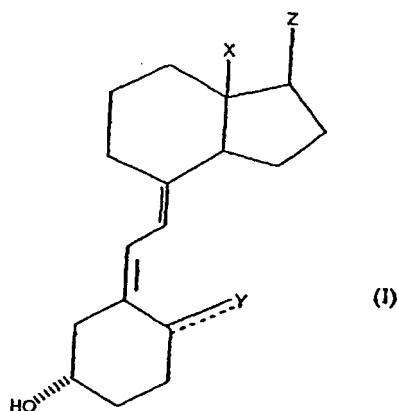
dung nun unter Bezugnahme auf solche Bemühungen genauer beschrieben; Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung wird jedoch klar sein, dass solch eine Beschreibung der Erfindung nur als Beispiel dient und nicht als Einschränkung ihres Schutzmangangs zu betrachten ist.

[0033] Die vorliegende Erfindung stellt 24-Hydroxyvitamin-D-Verbindungen bereit, die als pharmazeutische Wirkstoffe Verwendung finden. Diese Verbindungen sind geeignete Pro-Pharmaka für eine 1 α ,24-dihydroxylierte Vitamin-D-Verbindung, da sie in vivo an der 1 α -Position hydroxyliert werden, um aktive Formen von Vitamin D zu bilden. Als Pro-Pharmaka umgehen diese Verbindungen das Problem in Zusammenhang mit intestinaler Vitamin-D-Rezeptorbindung, die intestinale Kalziumabsorption vermittelt, was im Vergleich zu bekannten Dosen bekannter aktiver Vitamin-D-Verbindungen, wie beispielsweise 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ und 1 α -Hydroxyvitamin D₃, in verringriger oder keiner Hyperkalzämie resultiert.

[0034] In der folgenden Beschreibung des Verfahrens gemäß vorliegender Erfindung werden die Prozessschritte bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck durchgeführt, sofern nicht anders angegeben.

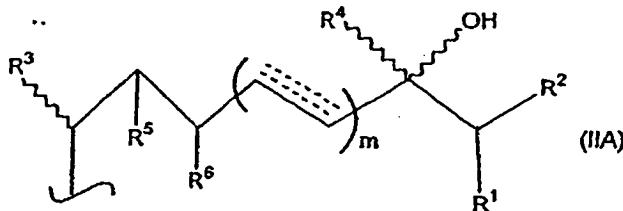
[0035] Die Begriffe "im Wesentlichen rein" oder "im Wesentlichen frei" beziehen sich hierin auf eine Reinheit von zumindest 90%. Der Begriff "im Wesentlichen weniger" bezieht sich auf zumindest 25% weniger als die Vergleichssubstanz. Darüber hinaus bezeichnet der Begriff "Nieder-" als Modifikator für Alkyl, Alkenyl, Fluoralkyl, Fluoralkenyl oder Cycloalkyl eine unverzweigte oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen. Spezifische Beispiele für solche Kohlenwasserstoffgruppen sind Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, tert.-Butyl, Ethenyl, Propenyl, Butenyl, Isobut enyl, Isopropenyl, Formyl, Acetyl, Propionyl, Butyryl oder Cyclopropyl. Der Begriff "Kohlenwasserstoffgruppierung" bezeichnet hierin ein Niederalkyl, ein Niederalkenyl, eine Niederacylgruppe oder ein Niedercycloalkyl, d. h. eine unverzweigte, verzweigte oder zyklische, gesättigte oder ungesättigte C₁-C₄-Kohlenwasserstoffgruppe. Außerdem bezieht sich der Begriff "äquivalente Position", wie beispielsweise in C-24- oder einer äquivalenten Position, auf einen bestimmten Kohlenstoff in der C-17-Seitenkette einer Vitamin-D-Verbindung, worin dieser Kohlenstoff außer für die Homologierung der Seitenkette der C-24-Kohlenstoff wäre.

[0036] In einem Aspekt sind die Vitamin-D-Verbindungen, die in der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können, durch die Formel (I) dargestellt:



worin Z eine Seitenkette der Formel (IIA), (IIB), (IIC), (IID), (IIE) oder (IIF) ist; Y eine Methylengruppe ist, wenn Y über eine Doppelbindung an den A-Ring gebunden ist, oder eine Methylgruppe oder Wasserstoff ist, wenn Y über eine Einfachbindung an den A-Ring gebunden ist; d. h. wenn Y Wasserstoff ist, ist die Verbindung der Formel (I) eine 19-nor-Verbindung; und X Wasserstoff, Niederalkyl oder Niederfluoralkyl ist. Wenn X Wasserstoff ist, ist die Verbindung der Formel (I) eine 18-nor-Verbindung.

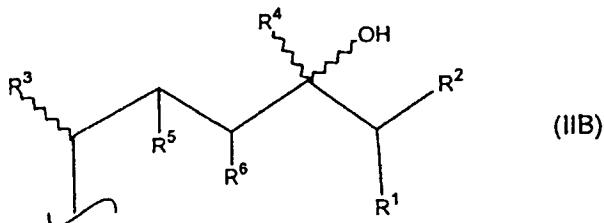
[0037] Z kann eine Seitenkette der folgenden Formel (IIA) sein:



worin m = 0 oder 1 ist und eine strichlierte Linie entlang der Seitenkette eine optionale zusätzliche C-C-Bindung darstellt; R¹ und R² unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl, Niederfluoralkenyl, Niedercycloalkyl sind oder gemeinsam mit dem Kohlenstoff, an den sie gebunden sind (z. B. C-25, wenn m = 0 ist), einen zyklischen C₃-C₈-Kohlenwasserstoff-Ring bilden; R³ Wasserstoff, Niederalkyl, Nieder-

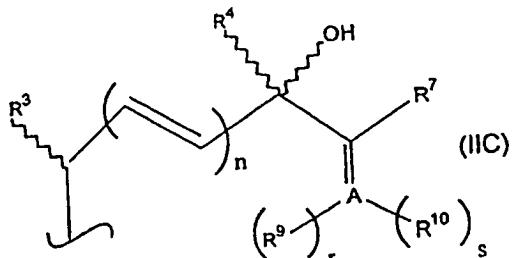
fluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist; R⁴ Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist; R⁵ und R⁶ jeweils Wasserstoff sind oder gemeinsam eine Doppelbindung zwischen C-22 und C-23 bilden. In Bezug auf die Bindung, auf die sich m bezieht, kann diese Bindung eine Einfach-, Doppel- oder Dreifachbindung, mit anderen Worten -CH₂-CH₂-, -CH=CH- oder -C≡C-, sein.

[0038] Z umfasst beispielsweise eine Seitenkette der folgenden Formel (IIB):



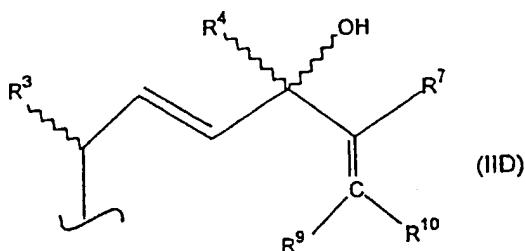
worin R⁵ und R⁶ jeweils Wasserstoff sind oder gemeinsam eine Doppelbindung zwischen C-22 und C-23 bilden; R³ Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist; R⁴ Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist; und R¹ und R² unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl, Niederfluoralkenyl, Niedercycloalkyl sind oder gemeinsam mit dem Kohlenstoff, an den sie gebunden sind (d. h. C-25), einen zyklischen C₃-C₈-Kohlenwasserstoff-Ring bilden.

[0039] Z umfasst auch eine Seitenkette der folgenden Formel (IIC):



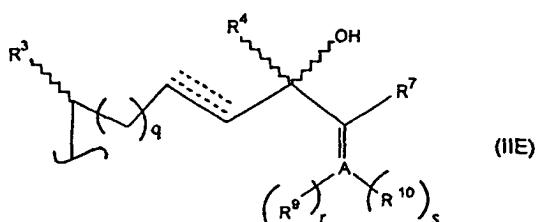
worin n eine ganze Zahl von 1 oder 2 ist; R³ Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist; R⁴ und R⁷ unabhängig voneinander Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl sind; A Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff ist; r = 1 ist und s = 0 ist, wenn A Stickstoff ist; r und s = 1 sind, wenn A Kohlenstoff ist; r und s = 0 sind, wenn A Schwefel oder Sauerstoff ist; und R⁹ und R¹⁰ unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederalkenyl, Niederfluoralkyl oder Niederfluoralkenyl sind. In Bezug auf die Bindung, auf die sich m bezieht, ist diese Bindung -CH₂-CH₂- oder -CH=CH-.

[0040] Z umfasst beispielsweise eine Seitenkette, worin n = 1 ist, A Kohlenstoff ist und r und s = 1 sind, die durch die folgende Formel (IID) dargestellt ist:



worin R³, R⁹ und R¹⁰ unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl sind, und R⁴ und R¹ unabhängig voneinander Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl sind.

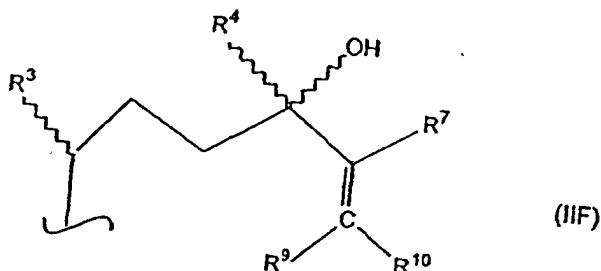
[0041] Außerdem umfasst Z eine Seitenkette der folgenden Formel (IIE):



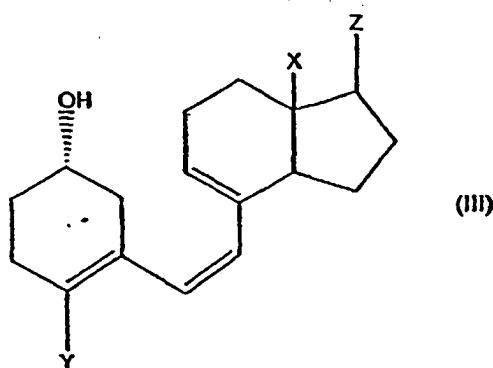
worin eine strichlierte Linie entlang der Seitenkette eine optionale zusätzliche C-C-Bindung darstellt; q = 0 oder eine ganze Zahl von 1 oder 2 ist; R³ Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluor-

ralkenyl ist; R⁴ und R¹ unabhängig voneinander Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl sind; A Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff ist; r = 1 ist und s = 0 ist, wenn A Stickstoff ist; r und s = 1 sind, wenn A Kohlenstoff ist; r und s = 0 sind, wenn A Schwefel oder Sauerstoff ist; R⁹ und R¹⁰ unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederalkenyl, Niederfluoralkyl oder Niederfluoralkenyl sind. In Bezug auf die zusätzlichen Bindungen, wenn beispielsweise q = 0 ist, kann eine Einfach-, Doppel- oder Dreifachbindung zwischen C-22 und C-23 vorhanden sein. In Bezug auf die Gruppe, auf die sich q bezieht, ist diese Gruppe -CH₂-.

[0042] Z umfasst beispielsweise eine Seitenkette, worin z = 0 ist, A Kohlenstoff ist, r und s = 1 sind; R³, R⁹ und R¹⁰ Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl sind; R⁴ und R¹ unabhängig voneinander Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl sind; und die durch die folgende Formel (IIF) dargestellt ist:



[0043] Außerdem sind als Vitamin-D-Verbindungen innerhalb des Schutzmfangs der vorliegenden Erfindung 24-Hydroxyprovitamin-D-Verbindungen eingeschlossen, die geeigneterweise dieselbe Z-Seitenkette wie oben beschrieben enthalten, einschließlich jener der Formeln (IIA), (IIB), (IIC), (IID), (IIE) und (IIF), die an der C-24- oder einer äquivalenten Position hydroxysubstituiert sind. Provitamin-D-Verbindungen sind die thermischen Isomere der entsprechenden Vitamin-D-Verbindungen, z. B. ist 24-Hydroxyprovitamin D₂ das thermische Isomer von 24-Hydroxyvitamin D₂ und kommt im thermischen Gleichgewicht mit ihm vor. 24-Hydroxyprovitamin-D-Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung sind geeigneterweise durch die folgende Formel (III) dargestellt:



worin X und Y wie oben beschrieben sind und Z eine gesättigte oder ungesättigte, substituierte oder unsubstituierte, unverzweigte, verzweigte oder zyklische C₄-C₁₈-Kohlenwasserstoffgruppe darstellt, worin das C-24 hydroxyliert ist; Y eine Methylgruppe oder Wasserstoff ist; und X Wasserstoff, Niederalkyl oder Niederfluoralkyl ist, und worin der oben als Modifikator für Alkyl-, Alkenyl-, Fluoralkyl-, Fluoralkenyl- oder Cycloalkylgruppe verwendete Begriff "Nieder-" eine unverzweigte oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen bezeichnet.

[0044] Bevorzugt von den Verbindungen der Formel (I) sind die 24-Hydroxyverbindungen, die Pro-Pharmaka für ein 1 α ,24-dihydroxyliertes Vitamin D sind. Beispiele für die Verbindungen der Formel (I) sind:

24-Hydroxyvitamin D₂ [24-(OH)-D₂];

24-Hydroxy-25-fluorvitamin D₂ [24-(OH)-25-F-D₂];

24-Nydroxy-25-en-Vitamin D₂ [24-ON-25-en-D₂];

24-Hydroxy-25-oxovitamin D₂ [24-OH-25-oxo-D₂];

24-Hydroxyvitamin D₄ [24-(OH)-D₄];

24-Hydroxy-25-fluorvitamin D₄ [24-(OH)-25-F-D₄];

24-Hydroxy-25-en-Vitamin D₄ [24-ON-25-en-D₄]; und

24-Hydroxy-25-oxovitamin D₄ [24-OH-25-oxo-D₄].

[0045] Bevorzugt von den Verbindungen der Formel (III) sind 24-Hydroxyprovitamin-D-Verbindungen, die

Pro-Pharmaka oder Isomere für ein 1 α ,24-dihydroxyliertes Vitamin D sind. Beispiele für die Verbindung der Formel (III) sind:

24-Hydroxyprovitamin D₂ [24-(OH)-proD₂];
 24-Hydroxy-25-fluorprovitamin D₂ [24-(OH)-25-F-proD₂];
 24-Hydroxy-25-enprovitamin D₂ [24-OH-25-en-proD₂];
 24-Hydroxy-25-oxoprovitamin D₂ [24-OH-25-oxo-proD₂];
 24-Hydroxyprovitamin D₄ [24-(OH)-proD₄];
 24-Hydroxy-25-fluorprovitamin D₄ [24-(OH)-25-F-proD₄];
 24-Hydroxy-25-en-provitamin D₄ [24-OH-25-en-proD₄]; und
 24-Hydroxy-25-oxo-provitamin D₄ [24-OH-25-oxo-proD₄].

[0046] Es versteht sich, dass von diesen Verbindungen der vorliegenden Erfindung, die ein Chiralitätszentrum in der Seitenkette aufweisen, wie beispielsweise bei C-20 oder C-24, beide Diastereomere (z. B. R und S) und deren Gemisch im Schutzmfang der vorliegenden Erfindung liegen.

[0047] Die Verbindungen der Formel (I) können im Allgemeinen durch den als Beispiel angeführten und in **Fig. 1** dargestellten Reaktionsprozess hergestellt werden. **Fig. 1** zeigt ein Verfahren zur Herstellung eines 24-Hydroxyvitamins D₂ unter Verwendung von Ergosterol als Ausgangsmaterial; worin das 24-Hydroxyvitamin D₂ gebildet und dann aufgetrennt wird, um das 24(S)-Hydroxyvitamin-D₂-Diastereomer und 24(R)-Hydroxyvitamin-D₂-Diastereomer zu erhalten, wenn stereochemische Reinheit gewünscht ist. Wenn hierin im Folgenden auf eine 24-Hydroxy-Verbindung Bezug genommen wird, handelt es sich – sofern nicht anders angegeben – um ein Diastereomer-Gemisch der R- und S-Form.

[0048] Genauer gesagt wird Ergosterol durch ein sechs Stufen umfassendes Verfahren in 24-Hydroxyergosterol (5,7,22-Ergostatrien-3 β ,24-dio) (7) übergeführt. Das 24-Hydroxyergosterol wird dann mithilfe auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Verfahren bestrahlt und thermisch umgesetzt, um ein 24-Hydroxyvitamin D₂ zu erhalten, dessen Diastereomere getrennt werden.

[0049] Wie in **Fig. 1** dargestellt wird Ergosterol acetyliert, um das 3 β -Acetat (2) zu bilden. Ein Addukt (3) wird dann mit dem B-Ring der Ergosterolstruktur gebildet, indem das 3 β -Acetat mit einem Triazolindion umgesetzt wird. Das Addukt (3) wird dann ozonisiert, um die Seitenkette zu verkürzen und ein C-21-Aldehyd (4) zu bilden. Die Seitenkette wird dann durch Umsetzung des resultierenden Aldehyds mit der geeigneten Keto-Verbindung wiederhergestellt, um das 24-Enon (5) zu erhalten. Das Enon wird in das 24-Methyl-3 β ,24-Dihydroxyaddukt (6) übergeführt. Dieses Addukt wird dann mit Lithiumaluminiumhydrid umgesetzt, um die Schutzgruppen des Addukts zu entfernen und 24-Hydroxyergosterol (7) zu erhalten. Das 24-Hydroxyergosterol wird dann bestrahlt und thermisch behandelt, um 24-Hydroxyvitamin D₂ (8) zu bilden. Das 24-Hydroxyvitamin D₂ wird RP-HPLC unterzogen, um die beiden Diastereomere zu trennen und die diastereomeren Formen gemäß der Erfindung, 24(S)-Hydroxyvitamin D₂ (9) und 24(R)-Hydroxyvitamin D₂ (10), zu erhalten.

[0050] Die Verbindungen der Formel (I), worin die Seitenkette durch die Formel (IIC) oder (IIE) dargestellt ist, kann im Allgemeinen durch das als Beispiel angeführte und in **Fig. 2** dargestellte Reaktionsverfahren hergestellt werden. **Fig. 2** zeigt ein Verfahren zur Herstellung eines 24-Hydroxy-25-en-Vitamins D₂, das die Verwendung von Vitamin D₂ als Ausgangsmaterial und die Bildung von 25-en-Vitamin D₂ durch Inkubieren kultivierter Zellen, die von humanen Hepatomzellen, z. B. HEP3B oder HEPG2, stammen, mit dem 25-en-Vitamin D₂ umfasst, um den Metaboliten 24-Hydroxy-25-en-Vitamin D₂ zu erhalten, der dann isoliert und durch HPLC gereinigt wird.

[0051] Wie in **Fig. 2** zu sehen ist, wird Vitamin D₂ (11) mit SO₂ umgesetzt, und die Hydroxyfunktionalität an C-3 wird mit tert-Butyldimethylsilylchlorid geschützt, um das Zwischenprodukt (12) zu erhalten. Ozonolyse und Reduktion ergeben den Alkohol (13). SO₂-Extrusion, Isomerisierung und darauf folgende Oxidation unter Einsatz der bekannten Swern-Oxidation ergibt den Aldehyd (14). Die Seitenkette wird durch Umsetzung des Aldehyds (14) mit einem Wittig-Reagens oder einem geeigneten Phenylsulfon eingeführt, um die 25-en-Vitamin-D₂-Verbindung (15) zu erhalten. Die 25-en-Verbindung (15) wird dann mit einer Zelllinie inkubiert, die von menschlichen Hepatomzellen stammt, und das 24-Hydroxy-25-en-Vitamin D₂ (16) wird extrahiert und gereinigt. Verfahren zur Herstellung von 24-Hydroxy-25-en-Vitamin D sind auch in der gleichzeitig anhängigen Patentanmeldung derselben Anmelderin mit dem Titel "Verfahren zur Herstellung von Hydroxy-25-en-Vitamin-D-Verbindungen" beschrieben, die durch Verweis hierin aufgenommen ist.

[0052] Die Verbindungen der Formel (III) können im Allgemeinen durch die Verfahren aus **Fig. 1** und **Fig. 2** hergestellt werden, worin die Provitamin-Ausgangsmaterialien durch die in beispielsweise dem US-Patent 5.252.191 von Pauli et al.; dem US-Patent 5.035.783 von Goethals et al.; und dem US-Patent 4.388.243, die durch Verweis hierin aufgenommen sind, als Beispiele angeführten Reaktionsverfahren hergestellt werden können. Die 19-nor-Verbindungen der Formel (1) können im Allgemeinen durch die hierin als Beispiele angeführten Reaktionsverfahren hergestellt werden, worin die 19-nor-Ausgangsmaterialien durch die in beispielsweise dem US-Patent 5.710.294, das durch Verweis hierin aufgenommen ist, als Beispiel angeführten Umsetzungsverfahren hergestellt werden, wobei das geeignete Vitamin-D-Ausgangsmaterial verwendet wird.

[0053] Die Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung können, im Vergleich zu den bekannten Analogen von aktiven Formen von Vitamin D₃, mit verringerten Nebenwirkungen und geringer Toxizität als aktive Verbin-

dungen in pharmazeutischen Zusammensetzungen verwendet werden. Die Verbindungen sind vor allem für lokale, einschließlich topische, und systemische Behandlung und Prophylaxe von Leiden bei Mensch und Tier geeignet, die durch (i) anormale Zellproliferation und/oder Zelldifferenzierung, wie beispielsweise Krebsarten, z. B. Haut-, Brust-, Darm- und Prostatakrebs, und dermatologische Leiden, z. B. Psoriasis; (ii) Ungleichgewicht des Immunsystems, wie beispielsweise Autoimmunerkrankungen, z. B. Multiple Sklerose und Diabetes, und Abstoßung von Transplantaten; (iii) abnormale Interleukin-1-Produktion, wie beispielsweise Entzündungsreaktionserkrankungen, z. B. primärchronische Polyarthritiden und Asthma; (iv) abnormale Parathormonproduktion, wie beispielsweise primärer und sekundärer Hyperparathyreoidismus; und (v) Verlust von Knochenmasse oder verringertem Knochenmineralgehalt, wie beispielsweise Osteoporose, gekennzeichnet sind.

[0054] Die 24-Hydroxyvitamin-D-Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung neigen weniger dazu und sind sogar unfähig, die unerwünschten Nebenwirkungen von Hyperkalzämie und/oder Hyperkalzurie zu verursachen. Mit anderen Worten können die Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung in Dosen verabreicht werden, in denen sie beispielsweise als antiproliferative Wirkstoffe und Zelldifferenzierungswirkstoffe agieren können, wenn sie malignen oder anderen hyperproliferativen Zellen ausgesetzt werden, ohne den Kalziumstoffwechsel wesentlich zu verändern. Durch diese Selektivität und Spezifität der Wirksamkeit sind die 24-Hydroxyvitamin-D-Verbindungen der vorliegenden Erfindung nützliche und bevorzugte Wirkstoffe, um beispielsweise Hyperproliferation sicher zu hemmen und die Differenzierung von malignen oder hyperplastischen Zellen zu fördern. Die 24-Hydroxyvitamin-D-Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung heben somit Mängel der bekannten, oben beschriebenen aktiven Vitamin-D₃-Verbindungen auf und können als bevorzugte Wirkstoffe zur Überwachung und Behandlung von malignen Erkrankungen, wie beispielsweise Prostatakrebs, oder benigner Prostatahyperplasie, Hauterkrankungen, wie beispielsweise Hautkrebs und Psoriasis, Brustkrebs und Darmkrebs, Immun- und Entzündungsreaktionserkrankungen und Hyperparathyreoidismus oder Knochenschwundkrankungen eingesetzt werden.

[0055] Die pharmakologisch aktiven Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung werden nach herkömmlichen pharmazeutischen Verfahren verarbeitet, um medizinische Zusammensetzung zur Verabreichung an Patienten, beispielsweise Säugetiere einschließlich Menschen, herzustellen, beispielsweise in Gemischen mit herkömmlichen Arzneimittelträgern, wie z. B. pharmazeutisch annehmbare organische oder anorganische Trägersubstanzen, die keine schädliche Reaktion mit den aktiven Verbindungen aufweisen, und gegebenenfalls anderen therapeutischen Bestandteilen. Jeder geeignete Verabreichungsweg kann verwendet werden, um eine wirksame Dosis der Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung bereitzustellen. So kann das Medikament beispielsweise oral, rektal, topisch, parenteral, intravenös, intramuskulär, subkutan, Okular, nasal, bukkal oder auf ähnliche Weise verabreicht werden.

[0056] Therapeutische und prophylaktische Zusammensetzungen sind solche, die für die verschiedenen hierin beschriebenen Verabreichungswege geeignet sind, obwohl der geeignete Weg in jedem Fall von der Art und Schwere des zu behandelnden Leidens und von der Art des aktiven Bestandteils abhängt. Die Zusammensetzungen werden am besten in Dosierungseinheiten bereitgestellt.

[0057] Geeignete pharmazeutisch annehmbare Träger zur Verwendung mit der Zusammensetzung und im Verfahren gemäß vorliegender Erfindung umfassen Wasser, Salzlösungen (z. B. Pufferlösungen), Alkohole, einschließlich Benzylalkoholen, Gummi arabicum, mineralische und pflanzliche Öle (z. B. Maisöl, Baumwollöl, Erdnussöl, Olivenöl, Kokosnussöl), Fischleberöle, Ölester, wie z. B. Polysorbat 80, Polyethylen- und Propylenglykole, Gelatine, Kohlenhydrate (z. B. Lactose, Amylose oder Stärke), Magnesiumstearat, Talk, Kieselsäure, viskoses Paraffin, Fettsäuremonoglyceride und -diglyceride, Pentaerythritolfettsäureester, Hydroxymethylcellulose, Polyvinylpyrrolidon usw., sind jedoch nicht darauf beschränkt.

[0058] Die pharmazeutischen Präparate können sterilisiert und, falls gewünscht, mit Hilfsstoffen, wie beispielsweise Schmierstoffen, Konservierungsmitteln, Stabilisatoren, Benetzungsmitteln, Emulgatoren, Salzen zur Beeinflussung des osmotischen Drucks, Puffern, Farbstoffen und Geschmacksstoffen, vermischt werden. Wird ein fester Träger verwendet, können die Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung in Tabletten, Kapseln, Pulvern, Zäpfchen oder Pastillen dosiert werden. Wird ein flüssiger Träger verwendet, sind Weichgelatinekapseln, transdermale Pflaster, Aerosol-Sprays, topische Cremes, Sirupe oder flüssige Suspensionen, Emulsionen oder Lösungen als Dosierungsform geeignet.

[0059] 24-Hydroxyprovitamin D wird jedoch am besten mit Trägern, wie beispielsweise Stärke, Lactose oder Amylose, dosiert, die keine schädlichen Reaktionen mit den aktiven Verbindungen aufweisen. Die Zubereitungen können in Tabletten-, Kapsel-, Pulver- und Pastillenform hergestellt werden. Egal welches Zubereitungsverfahren eingesetzt wird, wichtig ist, dass die Zubereitung keinen Lösungsmitteln und keiner Hitze ausgesetzt wird, da 24-Hydroxyprovitamin D unter solchen Bedingungen häufig in 24-Hydroxyvitamin D übergeführt wird, d. h. die Verbindungen der Formel (III) werden vorzugsweise in lösungsmittelfreier, kristalliner, hitzebeständiger Form hergestellt. Da Hitze und Lösungsmittel vermieden werden müssen, ist das bevorzugte Verfahren zur Herstellung von Tabletten Trockengranulierung.

[0060] Zur parenteralen Verabreichung sind vor allem injizierbare, sterile Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, sowie Suspensionen, Emulsionen oder Implantate, einschließlich Zäpfchen, geeignet.

Auch Ampullen eignen sich bequem zur Dosierung. Die Dosis der Analogen gemäß vorliegender Erfindung bei parenteraler Verabreichung beträgt im Allgemeinen etwa 1 bis 30 µg 1 bis 3 Mal wöchentlich.

[0061] Wie oben erwähnt, sind zur enteralen Verabreichung vor allem Tabletten, Dragees, Flüssigkeiten, Tropfen, Zäpfchen oder Kapseln geeignet. Ein Sirupelixier oder dergleichen, in dem ein gesüßtes Vehikel enthalten ist, kann auch verwendet werden.

[0062] Zur rektalen Verabreichung werden Verbindungen zu einer pharmazeutischen Zusammensetzung mit einer Zäpfchenbasis, wie beispielsweise Kakaoöl oder andere Triglyceride, verarbeitet. Um die Lagerfähigkeit zu verlängern, umfasst die Zusammensetzung vorzugsweise ein Antioxidans, wie beispielsweise Ascorbinsäure, butyliertes Hydroxyanisol oder Hydrochinon.

[0063] Zur topischen Verabreichung werden auch nicht spraybare Formen, viskose bis halbfeste oder feste Formen verwendet, die einen mit topischer Anwendung verträglichen Träger umfassen und vorzugsweise eine größere dynamische Viskosität als Wasser aufweisen. Geeignete topische Zubereitungen umfassen transdermale Vorrichtungen, Lösungen, Suspensionen, Emulsionen, Aerosole, Cremes, Wundsalben, Linimente, Salben, Lotionen, Diapasma und dergleichen, die, falls gewünscht, sterilisiert oder mit Hilfsstoffen, wie beispielsweise Konservierungsmitteln usw., vermischt werden können.

[0064] Die Größe einer prophylaktischen oder therapeutischen Dosis der Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung variiert je nach Art oder Schwere des zu behandelnden Leidens und je nach Zusammensetzung und Verabreichungsweg. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß vorliegender Erfindung werden vorzugsweise oral verabreicht.

[0065] Im Allgemeinen beträgt die tägliche Dosis der Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung etwa 0,025 bis etwa 7,5 nmol/kg Körpergewicht des Patienten, vorzugsweise etwa 0,025 bis etwa 1 nmol/kg. Die Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung werden geeigneterweise in Dosierungseinheiten in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger bereitgestellt, beispielsweise eine Dosierungseinheit von etwa 0,25 bis etwa 50,0 µg in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger. Die Dosierung der Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung beträgt im Allgemeinen etwa 3,5 µg bis etwa 1.000 µg/Woche, vorzugsweise etwa 10 µg bis etwa 500 µg/Woche.

[0066] Zur Behandlung von hyperproliferativen Leiden, wie beispielsweise Krebs und Psoriasis, beträgt die enterale Dosis der Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung etwa 1 nmol bis etwa 100 nmol pro Dosierungseinheit; für Hyperparathyreoidismus etwa 0,5 nmol bis 50 nmol pro Dosierungseinheit; zur Behandlung von Entzündungserkrankungen etwa 1 nmol bis 150 nmol pro Dosierungseinheit; zur Modulation einer Immunreaktion etwa 1 nmol bis 150 nmol pro Dosierungseinheit; und für Knochenschwunderkrankungen etwa 1 nmol bis 150 nmol pro Dosierungseinheit. In Mikrogramm beträgt die wirksame tägliche Dosis in Bezug auf das Körpergewicht des Patienten in Kilogramm etwa 0,01 µg/kg/Tag bis etwa 3,0 µg/kg/Tag.

[0067] Fachleute auf dem Gebiet der Erfindung werden außerdem erkennen, dass solche Dosierungen in Form von Depotpräparaten zur Langzeit-, verzögerten oder gesteuerten Abgabe, wie beispielsweise in Form eines Liposomabgabesystems, in Form von Polysacchariden mit einem langsamen Abgabemechanismus, in Form von salistischen oder anderen Polymerimplantaten oder Mikrokügelchen, sowie in Form von Zubereitungen, in denen der aktive Bestandteil beispielsweise durch Mikroinkapselung, eine darmlösliche Beschichtung, Mehrfachbeschichtung usw. mit einer oder mehreren unterschiedlich abbaubaren Überzügen geschützt ist, wobei solche Mittel eine kontinuierliche Dosierung von darin enthaltenen Zusammensetzung ermöglichen, vorliegen können. Eine darmlösliche Beschichtung ist beispielsweise resistent gegenüber Magensaften. Außerdem ist es möglich, den aktiven Bestandteil gefrierzutrocknen und das erhaltene gefriergetrocknete Produkt beispielsweise zur Herstellung von Injektionen zu verwenden.

[0068] Natürlich variieren die jeweils in einem bestimmten Fall bevorzugten Mengen eines aktiven Analogs je nach der verwendeten Verbindung, der formulierten Zusammensetzungen, der Verabreichungsart und den zu behandelnden Stellen. Die Dosierungen können nach herkömmlichen Überlegungen bestimmt werden, beispielsweise durch einen üblichen Vergleich zwischen den unterschiedlichen Aktivitäten der jeweiligen Verbindungen und eines bekannten Wirkstoffs, z. B. mithilfe eines geeigneten herkömmlichen pharmakologischen Protokolls.

[0069] Die für einen bestimmten Patienten geeigneten Dosen hängen von einer Reihe von Faktoren ab, beispielsweise von der Wirksamkeit der jeweiligen Verbindung, vom Alter, vom Körpergewicht, vom allgemeinen Gesundheitszustand, vom Geschlecht, von der Ernährung, von der Verabreichungszeit und -art, von der Ausscheidungsgeschwindigkeit und von anderen, in Kombination eingesetzten Medikamenten und der Schwere des jeweiligen Leidens, gegen das sich die Therapie richtet.

[0070] Wie hierin weiter oben beschrieben wurde, werden die Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung vorzugsweise in einer oralen Dosisformulierung an einen Menschen oder ein Tier verabreicht. Wenn eine Verbindung gemäß vorliegender Erfindung vor der oralen Dosisformulierung abgegeben wird, geht diese vom Darm in das Blut über. Die Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung unterlaufen dann eine Hydroxylierung an der 1 α -Position des A-Rings der Vitamin-D-Ringstruktur, wodurch eine aktive Form der Vitamin-D-Verbindung bereitgestellt wird, die 1 α ,24-dihydroxyliert ist. In Bezug auf die Verbindungen der Formel (I) ist wenig

oder keine First-Pass-Wechselwirkung mit den intestinalen Vitamin-D-Rezeptoren zu erwarten, wodurch wenig oder keine Stimulierung von intestinaler Kalziumabsorption ausgelöst wird. Im Fall der 24-Hydroxyprovitamin-D-Verbindungen der Formel (III) werden diese, da diese Verbindungen durch die Kerntemperatur des Menschen oder Tiers erwärmt werden, in das entsprechende 24-Hydroxyvitamin D übergeführt, das dann 1 α -hydroxyliert wird, um die 1,24-Dihydroxyverbindungen zu bilden. Außerdem ist anzumerken, dass die 24-Hydroxyprovitamin-D-Verbindungen nicht mit den intestinalen Vitamin-D-Rezeptoren interagieren und somit keine intestinale First-Pass-Kalziumabsorption auslösen.

[0071] Die Dosierungsformen der Zusammensetzungen gemäß vorliegender Erfindung können auch Adjuvantien sowie andere therapeutisch wertvolle Substanzen enthalten oder mehr als eine der hierin angeführten Verbindungen als Gemisch umfassen. Somit betrifft ein weiterer Aspekt innerhalb des Schutzmangfs der vorliegenden Erfindung die Verabreichung wirksamer Dosen der Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung zusammen mit der Verabreichung anderer Hormone oder Wirkstoffe, die sich bei der Behandlung und Vorbeugung von hierin beschriebenen Erkrankungen und Leiden als wirksam herausgestellt haben. Es ist zu erwarten, dass solch eine gleichzeitige Verabreichung oder Kombination bedeutend verbesserte therapeutische Wirkungen, beispielsweise eine Synergiewirkung, erzielen kann.

[0072] Bei der Behandlung von Knochenschwunderkrankungen werden Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung beispielsweise geeigneterweise zusammen mit Wirkstoffen verabreicht, die bekannterweise Knochenerkrankungen oder -leiden lindern. Solche Knochenwirkstoffe umfassen konjugierte Östrogene oder ihre Äquivalente, Antiöstrogene, Calcitonin, Bisphosphonate, Kalziumergänzungen, Kalziumrezeptoragonisten, Cobalamin, Pertussis-Toxin, Bor, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und andere Knochenwachstumsfaktoren, wie beispielsweise den Transformierenden Wachstumsfaktor Beta, Activin oder ein morphogenetisches Knochenprotein. Mögliche Dosen für bestimmte diese gemeinsam verabreichten Wirkstoffe sind in Tabelle 1 angeführt.

TABELLE 1

Mögliche orale Dosen für verschiedene Wirkstoffe, die gemeinsam mit 1 α -Hydroxyvitamin D₂ verabreicht werden

Wirkstoff	Dosisbereiche		
	allgemein	bevorzugt	ideal
Konjugierte Östrogene oder Äquivalente (mg/Tag)	0,3 - 5,0	0,4 - 2,4	0,6 - 1,2
Natriumfluorid (mg/Tag)	5 - 150	30 - 75	40 - 60
Calcitonin (IE/Tag)	5 - 800	25 - 500	50 - 200
Bisphosphonate (μ g/Tag)	50 - 20.000	100 - 15.000	250 - 10.000
Kalziumergänzungen (μ g/Tag)	250 - 2.500	500 - 1.500	750 - 1.000
Kalziumrezeptoragonisten (mg/Tag)	4 - 1.000	20 - 800	50 - 60
Cobalamin (μ g/Tag)	5 - 200	20 - 100	30 - 50
Pertussis-Toxin (mg/Tag)	0,1 - 2.000	10 - 1.500	100 - 1.000
Bor (mg/Tag)	0,10 - 3.000	1 - 250	2 - 100

[0073] Antiöstrogene, wie beispielsweise Tamofixen™, sind ebenfalls bekannte Knochenwirkstoffe und anti-proliferative Wirkstoffe und können zusammen mit den 24-Hydroxyvitamin-D- und 24-Hydroxyprovitamin-D-Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung eingesetzt werden.

[0074] Obwohl sich die oben genannten Beispiele auf orale Verabreichung beziehen, versteht sich, dass die Kombinationen von Wirkstoffen auch auf andere Weise verabreicht werden können, beispielsweise intranasal, transdermal, intrarektal, intravaginal, subkutan, intravenös und intramuskulär.

[0075] Außerdem stellt die vorliegende Erfindung die gemeinsame Verabreichung der Verbindungen gemäß

vorliegender Erfindung mit bekannten zytotoxischen Wirkstoffen bereit.

[0076] Solche Wirkstoffe umfassen Estramustinphosphat, Prednimustin, Cisplatin, 5-Fluoruracil, Melphalan, Hydroxyharnstoff, Mitomycin, Idarubicin, Methotrexat, Adriamycin und Daunomycin. Es ist zu erwarten, dass ein Vitamin D der Formel (I) oder (III), das in Kombination mit verschiedenen Krebsbehandlungsmitteln verwendet wird, eine bedeutend erhöhte zytotoxische Wirkung auf Krebszellen aufweist, wodurch eine verbesserte therapeutische Wirkung erzielt wird. Vor allem weil mit den oben genannten Kombinationen mit Vergleich zu Behandlungsformen, bei denen die Medikamente alleine eingesetzt werden, bei geringerer Konzentration des Krebsbehandlungsmittels stärkere wachstumshemmende Wirkung erzielt wird, besteht die Möglichkeit, eine Therapie bereitzustellen, bei der unerwünschte Nebenwirkungen in Zusammenhang mit dem Krebsbehandlungsmittel im Vergleich zu normalen Behandlungen mit dem Krebsbehandlungsmittel, das alleine und in größeren Dosen eingesetzt wird, bedeutend verringert werden können. Mögliche Dosisbereiche dieser gemeinsam verabreichten zweiten Krebsbehandlungsmittel betragen etwa 0,1 bis 1 µg/kg/Tag.

[0077] Die Verbindungen gemäß vorliegender Erfindung sind auch zur gemeinsamen Verabreichung mit bekannten entzündungshemmenden Wirkstoffen geeignet. Solche Wirkstoffe umfassen sowohl steroidale (z. B. Corticosteroide) als auch nichtsteroidale entzündungshemmende Wirkstoffe (z. B. Salicylate, Naproxen). Es ist zu erwarten, dass eine Verbindung gemäß vorliegender Erfindung in Kombination mit diesen verschiedenen entzündungshemmenden Medikamenten zu bedeutend erhöhter entzündungshemmender Aktivität führen kann, wodurch stärkere therapeutische Wirkung bereitgestellt werden kann und entzündungshemmende Wirkstoffe bedeutend geringer dosiert werden können.

[0078] Der Schutzmfang der vorliegenden Erfindung umfasst auch die gemeinsame Verabreichung von Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung mit bekannten Wirkstoffen zur Erhöhung der Immunreaktion. Solche Wirkstoffe umfassen die Cyclosporine, DHEA und DHEA-Derivate, wie beispielsweise DHEA-Sulfat, 16α-Brom-DHEA, 7-Oxo-DHEA, 16α-Brom-DHEA-sulfat und 7-Oxo-DHEA-sulfat. Außerdem ist zu erwarten, dass eine Verbindung gemäß vorliegender Erfindung in Kombination mit diesen verschiedenen Immunreaktionen modulierenden Medikamenten zu bedeutend erhöhter Immunmodulationsaktivität führen kann, wodurch stärkere therapeutische Wirkung bereitgestellt wird.

[0079] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung anhand einiger Beispiele genauer erläutert.

Beispiel 1: Synthese von 24-Hydroxyvitamin D₂ [24-OH-D₂]

(22E)-5,7,22-Ergostatrien-3β-ylacetat (2)

[0080] Zu einer Lösung von 50 mg (0,13 mol) Ergosterol (1) in 300 ml wasserfreiem Pyridin wurden 33,3 ml (0,35 mol) Essigsäureanhydrid zugesetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, und dann wurden 600 ml Wasser zugesetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und drei Mal mit 200 ml Acetonitril gewaschen und dann luftgetrocknet, um 42,0 g von (2) zu erhalten (74%).

22-Oxo-5α,8α-(4-phenyl-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1,2-diyl)-23,24-dinor-6-cholin-3β-ylacetat (4)

[0081] Zu einer Lösung von 33,0 g (0,075 mol) Ergosterolacetat (2) in 1.000 ml Chloroform wurden 13,2 g (0,075 mol) 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion zugesetzt. Die so hergestellte Lösung (3) wurde 30 min lang bei Raumtemperatur gerührt, und dann wurden 5 ml Pyridin zugesetzt. Die Lösung wurde auf -78°C abgekühlt, bei -78°C 2 Stunden lang mit einem Ozon-Sauerstoff-Gemisch behandelt und dann gut mit Stickstoff gespült. Danach wurden 50 ml Dimethylsulfoxid zugesetzt, und das Gemisch wurde zuerst mit 300 ml Wasser, dann zwei Mal mit 200 ml 2 N HCl und schließlich mit 300 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde unter Verwendung von 30% Ethylacetat in Hexan auf einer Kieselgelsäule gereinigt, um 16,0 g (39 %) der Verbindung als schaumartigen Feststoff zu erhalten.

¹H NMR: (400 MHz; CDCl₃): δ ppm 0,85 (3H, s, 18-CH₃), 1,10 (3H, s, 19-CH₃), 1,15 (3H, d, 21-CH₃), 1,99 (3H, s, 3β-CH₃CO), 5,45 (1H, m, 3α-H), 6,26 (1H, d, 7-H), 6,40 (1H, d, 6-H), 7,42 (5H, m, Ph), 9,58 (1H, d, HCO).

(22E)-5α,8α-(4-phenyl-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1,2-diyl)cholesta-6,22-dien-24-on-3β-ylacetat (5)

[0082] Butyllithium (8,94 ml 1,6-M-Lösung (0,014 mol) in Hexan) wurde unter Stickstoff zu einer gerührten, gekühlten (0°C) Lösung von Diisopropylamin (1,45 g, 0,014 mol) in trockenem Tetrahydrofuran (20 ml) zugesetzt. 3-Methylbutan-2-on (1,23 g, 0,014 mol) in trockenem Tetrahydrofuran (6 ml) wurde bei 0°C über einen Zeitraum von 15 min zugetropft. Die Lösung wurde eine weitere Stunde bei 0°C gerührt, dann auf -70°C abgekühlt, und eine Lösung des Aldehyds (4) (6,0 g, 0,011 mol) in trockenem Tetrahydrofuran (60 ml) wurde zugesetzt. Die Temperatur wurde auf -20°C erhöht und 3 Stunden lang bei dieser Temperatur gehalten. Dann wurde Eisessig (20 ml) bei -20°C zugesetzt, und die Lösung wurde auf Raumtemperatur gebracht. Ether (800

ml) und Wasser (400 ml) wurden zugesetzt, und die organische Phase wurde abgetrennt und mit 10% Salzsäure (2 × 300 ml), einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung (2 × 300 ml) und Wasser (2 × 300 ml) gewaschen. Einengung ergab das Rohprodukt (7,5 g), das in 1,5 N Salzsäure (12 ml) enthaltendem Tetrahydrofuran (100 ml) gelöst wurde. Nach 1,5 Stunden Rückflusserhitzen wurde das Gemisch mit Ether (600 ml) verdünnt, mit einer 5 Natriumcarbonatlösung (2 × 200 ml) und Wasser (2 × 200 ml) gewaschen und getrocknet (wasserfreies $MgSO_4$). Eine Einengung unter reduziertem Druck ergab das Rohprodukt (7,0 g). Eine Chromatographie über Kieselgel (50% Ethylacetat in Hexan) ergab 4,0 g des Enons (5) (59%).

1H NMR: (400 MHz): δ ppm 0,83 (3H, s, 18- CH_3), 0,99 (3H, s, 19- CH_3), 1,09 (6H, dd, 26 und 27- CH_3), 1,12 (3H, d, 21- CH_3), 2,0 (3H, s, 3 β - CH_3CO), 2,84 (1H, m, 25-H), 5,45 (1H, m, 3 α -H), 6,06 (1H, d, 23H), 6,24 (1H, d, 7-H), 6,39 (1H, d, 6-H), 6,71 (1H, dd, 22-H), 7,42 (5H, m, Ph).

(22E)-5 α ,8 α -(4-phenyl-3,5-dioxo-1,2,4-triazolidin-1,2-diy)-6,22-ergostadien-3 β ,24-diol (6)

[0083] Das Enon (5) (3,5 g, 5,7 mmol) in trockenem Ether (100 ml) wurde auf 0°C abgekühlt, und Methylmagnesiumbromid (6,8 ml 3,0-M-Lösung (0,02 mol) in Ether) wurde zugetropft. Nach 1 Stunde bei 0°C wurde gesättigtes Ammoniumchlorid (100 ml) zugesetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mit Ether (2 × 200 ml) extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingeengt, um 3,0 des Rohprodukts (6) zu erhalten (90%).

(22E)-5,7,22-Ergostatrien-3 β ,24-diol (7)

[0084] Zu einer Lösung von 3,0 g (5,1 mmol) von (6) in trockenem Tetrahydrofuran (250 ml) wurden 3,6 g (0,09 mol) Lithiumaluminiumhydrid zugesetzt. Das Gemisch wurde 3 Stunden lang rückflusserhitzt, mit einem Eisswasserbad abgekühlt, und das Reaktionsgemisch wurde durch vorsichtiges Zutropfen von Eisswasser (5 ml) zersetzt. Das Gemisch wurde filtriert, und das Filtrat wurde im Vakuum eingeengt, um den Großteil des Tetrahydrofurans zu entfernen. Der Rückstand wurde in 200 ml Ethylacetat gelöst und zwei Mal mit einer gesättigten NaCl-Lösung (2 × 200 ml) gewaschen, über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde unter Verwendung von 30% Ethylacetat in Hexan auf einer Kieselgelsäule gereinigt, um 1,5 g von (7) zu erhalten (71%).

1H NMR: (400 MHz, $CHCl_3$): δ ppm 0,64 (3H, s, 18-H), 0,88 (6H, dd, 26 und 27- CH_3), 0,93 (3H, s, 19- CH_3), 1,06 (3H, d, 21- CH_3), 1,19 (3H, s, 28- CH_3), 3,55 (1H, m, 3 α -H), 5,36 (1H, d, 7-H), 5,42 (2H, m, 22 und 23-H), 5,52 (1H, d, 6-H). UV (Ethanol) λ_{max} : 282 nm.

24-Hydroxyvitamin D₂ (8)

[0085] 1 g (2,4 mmol) von (7) wurde in 250 ml Ether und Benzol (4 : 1) gelöst und unter Rühren unter Stickstoff in einem wassergekühlten Quarz-Tauchbehälter unter Verwendung einer Hanovia-Mitteldruck-UV-Lampe 2 Stunden lang bestrahlt. Die Lösung wurde im Vakuum eingeengt, in 100 ml Ethanol gelöst und über Nacht rückflusserhitzt. Die Lösung wurde im Vakuum bis zur Trockene eingeengt, und der Rückstand wurde unter Verwendung von 30% Ethylacetat in Hexan auf einer Kieselgelsäule gereinigt, um 0,55 g von (8) zu erhalten (55%).

1H NMR: (400 MHz, $CDCl_3$): δ ppm 0,57 (3H, s, 18- CH_3), 0,92 (6H, dd, 26 und 27- CH_3), 1,06 (3H, d, 21- CH_3), 1,20 (3H, s, 28- CH_3), 3,93 (1H, m, 3-H), 4,79 (1H, m (scharf) 19-H), 5,01 (1H, m (scharf), 19-H), 5,43 (2H, m, 22 und 23-H), 6,02 (1H, d, 7-H), 6,22 (1H, d, 6-H). UV (Ethanol) λ_{max} : 265 nm.

Beispiel 2: Synthese von 24(S)-Hydroxyvitamin D₂ (9) [24(S)-OH-D₂]

[0086] Das Produkt (8) wird Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) auf einer mit Hexan/Isopropanol/Methanol (91 : 7 : 2) entwickelten Zorbax-SIL oder unter Verwendung einer Umkehrphasen-Säule Supelco C-8 (25 cm × 21,2 mm; Teilchengröße 12 μ m) mit dem Lösungsmittelsystem Acetonitril : Wasser 60 : 40, 10 ml/min, unterzogen. Die Diastereomere (9) und (10) werden eluiert und dabei getrennt.

[0087] 24(S)-Hydroxyvitamin D₂ war wie folgt gekennzeichnet: optische Drehung: $[\alpha]_D^{24,0^\circ} = +120,4$ (c = 1,0, Ethanol); Fp.: 123–126°C; DC: R_f = 0,10 (4 : 1, Hexan, Ethylacetat, Silica; Whitman Nr. 4500-101), Elementaranalyse: ber. C = 81,50, H = 10,75; gef. C = 81,62, H = 10,66. Ein Infrarotspektrum (IR) (KBr) ist in **Fig. 3** dargestellt und ein Magnetisches Kernresonanzspektrum (NMR) (300 MHz, 1H in $CDCl_3$) in **Fig. 4**.

Beispiel 3: In-vivo-Bildung von 1 α ,24(S)-Dihydroxyvitamin D₂ [1 α ,24(S)-(OH)₂-D₂] aus 24(S)-OH-D₂

[0088] 24-OH-D₂ wurde (entweder oral oder als intraperitoneale Ergänzung) an Ratten mit Vitamin-D-Mangel verabreicht. Lipidextrakte des Plasmas wurden hergestellt und die Metabolite durch das weiter unten beschrie-

bene Verfahren nach Horst et al. (Horst, R. L., Koszewski, N. J. und Reinhardt, R. A., Biochem. 29, 578–82 (1990), durch Verweise hierin aufgenommen) gereinigt, um herkömmliches biologisches 1 α ,24-(OH)₂D₂ herzustellen.

[0089] Herkömmliches biologisches 1 α ,24-(OH)₂D₂ wurde in vitro aus 24-OH-D₂ synthetisiert, indem 10 μ g 24-OH-D₂ in einem Kolben, der 5 ml aus Hühnern mit Vitamin-D-Mangel hergestellte 20% Nierenhomogenate enthielt, inkubiert wurden. Das Produkt dieser Umsetzung wurde durch HPLC isoliert und durch Massenspektrometrie identifiziert. In den Lipidextrakten des Plasmas von den Ratten mit Vitamin-D-Mangel, denen D₂ oder 24-OH-D₂ verabreicht wurde, wanderte ein isolierter Metabolit auf einer HPLC gemeinsam mit dem herkömmlichen 1 α ,24-(OH)₂D₂, was darauf hinweist, dass 1 α ,24-(OH)₂D₂ ein natürlicher Metabolit von Vitamin D₂ ist. Im Gegensatz dazu wiesen vergleichbare Ratten, denen Vitamin D₃ verabreicht wurde, kein detektierbares 24-OH-D₃ auf.

Beispiel 4: In-vivo-Bildung von 1 α ,24(S)-(OH)₂-D₂ aus 24(S)-Hydroxyprovitamin D₂ [24(S)-ON-Provitamin D₂]

[0090] Männliche Wanderratten wurden auf Vitamin-D-arme Diät mit normalem Kalziumgehalt (0,47%) gesetzt. Nach vier Wochen wurden die Ratten in zwei Gruppen geteilt und erhielten entweder 24-OH-Provitamin D₂ (0,25 μ g/kg) in einem Vehikel, wie beispielsweise Lactose, oder das Vehikel alleine (Kontrolle). Vier Stunden nach der Verabreichung wurden die Ratten getötet, und ihr Gehalt an 1 α ,24-(OH)₂-D₂ im Blut wurde unter Verwendung eines herkömmlichen Verfahrens gemessen.

[0091] Dieses Verfahren zeigte, dass der Gehalt an 1 α ,24-(OH)₂-D₂ im Blut bedeutend höher ist als bei den Kontrolltieren.

Beispiel 5: Bildung von 1 α ,24(S)-Dihydroxy-25-en-Vitamin D₂ [1 α ,24(S)-(OH)₂-25-en-D₂] bei an Osteoporose leidenden Frauen, denen 24-(OH)-25-en-D₂ verabreicht wurde

[0092] Frauen, die an Osteoporose litten, wurden eine Woche lang täglich Dosen von 25 μ g/Tag 24-OH-25-en-D₂ verabreicht. Dann wurde ihnen Blut abgenommen, das auf den Metaboliten 1 α ,24(S)-(OH)₂-25-en-D₂ analysiert wurde. Ein Lipid wurde aus dem Blut extrahiert, und der Metabolit wurde durch HPLC-Standardverfahren gereinigt und mithilfe des Radiorezeptor-Assays von Incstar (Stillwater, Minnesota, USA) quantifiziert. Einen Tag nach der letzten 25 μ g-Dosis zeigten die Ergebnisse, dass ein bedeutender Gehalt an 1 α ,24(S)-(OH)₂-25-en-D₂ im Blut vorhanden war.

Beispiel 6: Behandlung von Osteoporose mit 24(S)-OH-ProD₂

[0093] Eine klinische Studie an ambulanten postmenopausalen Osteoporosepatientinnen im Alter zwischen 55 und 75 Jahren wurde durchgeführt. Die Studie umfasste bis zu 120 Patientinnen, die willkürlich in drei Behandlungsgruppen geteilt wurden, und dauerte 24 Monate. Zwei der Behandlungsgruppen erhielten konstante, oral verabreichte Dosen von 24-OH-ProD₂ (u. i. d.; zwei unterschiedliche Dosen über 5,0 μ g/Tag), und die andere Gruppe erhielt ein entsprechendes Placebo. Alle Patientinnen behielten normale Kalziumaufnahme durch die Ernährung bei (500 bis 800 mg/Tag) und verwendeten keine Kalziumergänzungen. Die Wirksamkeit wurde durch Vergleiche (a) der Knochenmineralgehalte im gesamten Körper, in der Speiche, im Oberschenkelknochen und/oder in der Wirbelsäule der Patienten, bestimmt durch Röntgenabsorptiometrie (DEXA), (b) durch Knochenbiopsien des Beckenkamms und (c) die Bestimmung von Serumosteocalcin vor und nach der Behandlung bewertet. Die Sicherheit wurde durch Vergleiche der Hydroxypyrolinexkretion durch Urin, Serum- und Urinkalziumwerte, Creatininausscheidung, Blutharnstoffstickstoff und andere Routinebestimmungen bewertet.

[0094] Diese Untersuchung zeigte, dass Patientinnen, denen oral 24-OH-ProD₂ verabreicht worden war, im gesamten Körper, in der Speiche, im Oberschenkelknochen und/oder in der Wirbelsäule bedeutend höhere Knochendichte aufweisen als Patientinnen, die das Placebo erhielten. Die behandelten Patientinnen wiesen auch einen bedeutenden Anstieg an Serumosteocalcin auf. Knochenbiopsien von den behandelten Patientinnen zeigten, dass 24-OH-ProD₂ die normale Knochenbildung stimuliert. Die überwachten Sicherheitsparameter bestätigten einen unbedeutenden Anstieg von Hyperkalzämie oder Hyperkalzurie oder anderen Stoffwechselstörungen durch 24-OH-ProD₂.

Beispiel 7: Präventive Behandlung von Knochenmasseverlust bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose unter Verwendung von 24(S)-OH-25-en-D₂

[0095] Eine klinische Studie an ambulanten postmenopausalen Osteoporosepatientinnen im Alter zwischen 55 und 75 Jahren wurde durchgeführt. Die Studie umfasste bis zu 120 Patientinnen, die willkürlich in drei Behandlungsgruppen geteilt wurden, und dauerte 24 bis 36 Monate. Zwei der Behandlungsgruppen erhielten

konstante Dosen von 24(S)-OH-25-en-D₂ (u. i. d.; zwei unterschiedliche Dosen von oder über 5,0 µg/Tag), und die andere Gruppe erhielt ein entsprechendes Placebo. Alle Patientinnen behielten normale Kalziumaufnahme durch die Ernährung bei (500 bis 800 mg/Tag) und verwendeten keine Kalziumergänzungen. Die Wirksamkeit wurde durch Vergleiche (a) der Kalziumretention im gesamten Körper und (b) der Knochenmineraldichte in der Speiche und in der Wirbelsäule, bestimmt durch Doppel-Photon-Absorptiometrie (DPA) oder Doppel-Energie-Röntgenabsorptiometrie (DEXA), vor und nach der Behandlung bewertet. Die Sicherheit wurde durch Vergleiche der Hydroxypyrolinexkretion durch Urin, Serum- und Urinkalziumwerte, Creatininausscheidung, Blutharnstoffstickstoff und andere Routinebestimmungen bewertet.

[0096] Die Ergebnisse zeigten, dass Patientinnen, die mit 24(S)-OH-25-en-D₂ behandelt worden waren, bedeutend höhere Kalziumwerte im gesamten Körper und bedeutend höhere Knochendichte in der Speiche und in der Wirbelsäule aufweisen als Patientinnen, die mit dem Placebo behandelt worden waren. Die überwachten Sicherheitsparameter bestätigten einen unbedeutenden Vorfall von Hyperkalzämie oder Hyperkalzurie oder anderen Stoffwechselstörungen durch die 24(S)-OH-25-en-D₂-Therapie.

Beispiel 8: Behandlung von Psoriasis mit 24-OH-D₂

[0097] Eine 24-OH-D₂ enthaltende, orale Dosiszubereitung wird in einer Doppelblindstudie auf ihre therapeutische Wirksamkeit bei der Behandlung von (Kontakt- und ektopischer) Dermatitis bewertet. Die bewertete Zubereitung enthielt 10,0 bis 20,0 µg 24-OH-D₂. Die Kontrollzubereitung war identisch, mit der Ausnahme, dass sie das 24-OH-D₂ nicht enthielt. Die Patienten wurden in einem Ambulatorium behandelt und in eine Versuchs- und Kontrollpopulation geteilt. Die Patienten sollten das Medikamente ein Mal täglich, vor dem Frühstück, einnehmen.

[0098] Bei jedem Patienten (Versuchs- und Kontrollgruppe) wurde eine Hautstelle mit einer Läsion ausgewählt, die normalerweise durch Kleidung bedeckt ist, und die Patienten sollten diese zur Untersuchung ausgewählten Hautstellen keiner Sonne aussetzen. Die Läsionsstelle wurde bewertet und registriert, und die Läsion wurde fotografiert. Relevante Details des Fotografieverfahrens wurden ebenfalls registriert, so dass sie reproduziert werden konnten, als die Läsionen das nächste Mal fotografiert wurde (Distanz, Blendenöffnung, Winkel, Hintergrund usw.)

[0099] Erytheme, Abschuppungen und Dicke wurden wöchentlich von einem Arzt bewertet. Die Endbewertung wird üblicherweise am Ende einer vier- bis sechswöchigen Behandlung durchgeführt. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass eine tägliche orale Verabreichung von 24-OH-D₂ Erytheme, Abschuppungen und die Dicke im Vergleich zu den Kontrollpatienten bedeutend reduzierte.

Beispiel 9: Behandlung von Psoriasis mit 24(S)-OH-ProD₂

[0100] Eine 24(S)-OH-ProD₂ enthaltende, orale Dosiszubereitung wird in einer Blindstudie auf ihre therapeutische Wirksamkeit bei der Behandlung von (Kontakt- und ektopischer) Dermatitis bewertet. Die bewertete Zubereitung enthielt 10,0 bis 20,0 µg 24(S)-OH-ProD₂. Die Kontrollzubereitung war identisch, mit der Ausnahme, dass sie das 24(S)-OH-ProD₂ nicht enthielt. Die Patienten wurden in einem Ambulatorium behandelt und in eine Versuchs- und Kontrollpopulation geteilt. Die Patienten sollten das Medikamente ein Mal täglich, vor dem Frühstück, einnehmen.

[0101] Bei jedem Patienten (Versuchs- und Kontrollgruppe) wurde eine Hautstelle mit einer Läsion ausgewählt, die normalerweise durch Kleidung bedeckt ist, und die Patienten sollten diese zur Untersuchung ausgewählten Hautstellen keiner Sonne aussetzen. Die Läsionsstelle wurde bewertet und registriert, und die Läsionen) wurde(n) fotografiert. Relevante Details des Fotografieverfahrens wurden ebenfalls registriert, so dass sie reproduziert werden konnten, als die Läsionen das nächste Mal fotografiert wurde (Distanz, Blendenöffnung, Winkel, Hintergrund usw.)

[0102] Erytheme, Abschuppungen und Dicke wurden wöchentlich von einem Arzt bewertet. Die Endbewertung wird üblicherweise am Ende einer vier- bis sechswöchigen Behandlung durchgeführt. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass eine tägliche orale Verabreichung von 24(S)-OH-ProD₂ Erytheme, Abschuppungen und die Dicke im Vergleich zu den Kontrollpatienten bedeutend reduzierte.

Beispiel 10: Behandlung von Prostatakrebs mit 24-(OH)-D₂

[0103] Patienten mit fortgeschrittenem, Androgen-unabhängigem Prostatakrebs nahmen an einer offenen Studie mit 24-(OH)-D₂ teil. Geeignete Patienten waren zumindest 40 Jahre alt, wiesen histologische Beweise von Adenocarcinomen an der Prostata auf und litten an einer progressiven Erkrankung, die vorher auf (eine) hormonelle Behandlungen) angesprochen hatte. Die Studie begann mit einer 26-wöchigen oralen Therapie mit 24-(OH)-D₂, wobei jeglicher Einsatz von vorher verwendeten Kalziumergänzungen, Vitamin-D-Ergänzungen und Vitamin-D-Substitutionstherapien unterbrochen wurde. Während der Behandlung wurden die Patienten in

regelmäßigen Intervallen auf (1) Hyperkalzämie, Hyperphosphatämie, Hyperkalzurie, Hyperphosphaturie und andere Toxizitäten, (2) Beweise für Veränderungen im Fortschreiten der metastatischen Erkrankung; und (3) Einhaltung der vorgeschriebenen Medikamentendosis untersucht.

[0104] Die Studie wurde in zwei Phasen durchgeführt. Während der ersten Phase wurde die maximal verträgliche, orale tägliche Dosis von 24-(OH)D₂ durch Verabreichung immer höherer Dosen an aufeinanderfolgende Patientengruppen bestimmt. Alle Dosen wurden am Morgen vor dem Frühstück verabreicht. Die erste Patientengruppe wurde mit 25,0 µg 24-(OH)D₂ behandelt. Darauffolgende Patientengruppen wurden mit 50,0, 75,0 und 100,0 µg/Tag behandelt. Die Verabreichung wurde während des gesamten Verlaufs der Studie ohne Unterbrechung fortgesetzt, es sei denn der Serumkalziumwert stieg über 11,6 mg/dl oder eine andere Toxizität 3. oder 4. Grades trat auf, denn in diesem Fall wurde die Verabreichung zurückgestellt, bis die toxische(n) Wirkungen verschwunden waren(en), und dann mit 10,0 µg weniger wieder aufgenommen.

[0105] Ergebnisse der ersten Phase der Studie zeigten, dass die maximal verträgliche Dosis für 24-(OH)D₂ über 25,0 µg/Tag liegt, d. h. 10 bis 50 Mal höher als mit 1α,25-(OH)₂D₃ erreicht werden kann. Analysen von Blutproben, die den teilnehmenden Patienten in regelmäßigen Abständen abgenommen wurden, zeigten, dass der Gehalt an zirkulierendem 24-(OH)D₂ proportional mit der verabreichten Dosis ansteigt und bei den höchsten Dosen auf Maximalwerte ansteigt, die weit über 100 pg/ml liegen, und dass der Gehalt an zirkulierendem 1α,25-(OH)₂D₃ zurückgeht, häufig auf nicht mehr detektierbare Werte. Der Serum- und Urinkalziumwert stiegen in Abhängigkeit von der Dosis. Patienten, die zumindest sechs Monate lang mit der maximal verträglichen Dosis 24-(OH)D₂ behandelt worden waren, berichteten, dass Knochenschmerzen in Zusammenhang mit der metastatischen Erkrankung bedeutend zurückgegangen waren.

[0106] Während der zweiten Phase wurden Patienten 24 Monate lang mit 0,5 und 1,0 Mal der maximal verträglichen Dosis 24-(OH)D₂ behandelt. Nach ein und zwei Jahren Behandlung zeigten CAT-Scans, Röntgenuntersuchungen und Knochenscans, die zu Bewertung des Fortschreitens der metastatischen Erkrankung durchgeführt wurden, bei vielen Patienten, die mit geringeren Dosen behandelt worden waren, eine Stabilisierung oder eine teilweise Remission der Erkrankung und bei vielen Patienten, die mit höheren Dosen behandelt worden waren, eine Stabilisierung oder eine teilweise oder komplett Remission der Erkrankung auf.

Beispiel 11: Behandlung von Prostatakrebs mit 24-OH-ProD₂

[0107] Die Studie von Beispiel 10 wurde mit der Vitamin-D-Verbindung 24-OH-ProD₂ wiederholt. Die Ergebnisse der Phase 1 zeigten, dass Patienten, die zumindest sechs Monate lang mit der maximal verträglichen Dosis 24-OH-ProD₂ behandelt worden waren, berichteten, dass Knochenschmerzen in Zusammenhang mit der metastatischen Erkrankung bedeutend zurückgegangen waren. Die Ergebnisse der Phase 2 zeigten, dass, nach zwei Jahren, CAT-Scans, Röntgenuntersuchungen und Knochenscans, die zu Bewertung des Fortschreitens der metastatischen Erkrankung durchgeführt wurden, bei vielen Patienten, die mit geringeren Dosen behandelt worden waren, eine Stabilisierung oder eine teilweise Remission der Erkrankung und bei vielen Patienten, die mit höheren Dosen behandelt worden waren, eine Stabilisierung oder eine teilweise oder komplett Remission der Erkrankung zeigten.

Beispiel 12: Behandlung von älteren Personen mit erhöhten Blut-PTH-Werten aufgrund von sekundärem Hyperparathyreoidismus mit 24-OH-D₄

[0108] Eine zwölfmonatige, klinische, Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie wurde mit vierzig Personen mit sekundärem Hyperparathyreoidismus durchgeführt. Die ausgewählten Patienten waren zwischen 60 und 100 Jahren alt und wiesen eine Vorgeschichte von sekundärem Hyperparathyreoidismus auf. Die Patienten litten auch an Schenkelhalsosteopenie (Knochenmineraldichte des Schenkelhalses $\leq 0,70$ g/cm²).

[0109] Alle Patienten durchliefen einen sechswöchigen Kontrollzeitraum, nach dem sie willkürlich in zwei Behandlungsgruppen geteilt wurden: eine Gruppe erhielt eine konstante Dosis von 15 µg/Tag 24-(OH)-D₄, und die andere Gruppe erhielt ein entsprechendes Placebo. Beide Gruppen behielten normale Kalziumaufnahme durch die Ernährung bei und verwendeten keine Kalziumergänzungen. Die Wirksamkeit wurde durch Vergleiche der beiden Patientengruppen in Bezug auf (a) intakte PTH (iPTH); (b) Knochenmineraldichte in der Speiche, im Oberschenkelknochen und in der Wirbelsäule; und (c) knochenspezifische Urinmarker (z. B. Pyridinium-Crosslinks) vor und nach der Behandlung bewertet. Die Sicherheit wurde durch (a) Serumkalzium- und -phosphorwerte und (b) Urinkalzium- und -phosphorwerte bewertet.

[0110] Analysen der klinischen Daten zeigten, dass 24-(OH)-D₄ iPTH und knochenspezifischen Urinmarker bedeutend reduziert. Patienten, die mit dieser Verbindung behandelt worden waren, wiesen im Vergleich zu Standardwerten normale Serumkalziumwerte und stabile Knochendichten in der Speiche und in der Wirbelsäule auf. Im Gegensatz dazu zeigten Patienten, die mit Placebo behandelt worden waren, keine Reduzierung von iPTH und knochenspezifischen Urinmarkern auf. In der Behandlungsgruppe trat ein unbedeutender Vorfall von Hyperkalzämie auf.

Beispiel 13: Behandlung von älteren Personen mit erhöhten Blut-PTH-Werten aufgrund von sekundärem Hyperparathyreoidismus mit 24-OH-ProD₂

[0111] Eine zwölfmonatige, klinische, Placebo-kontrollierte Doppelblindstudie wurde mit vierzig Personen mit sekundärem Hyperparathyreoidismus durchgeführt. Die ausgewählten Patienten waren zwischen 60 und 100 Jahren alt und wiesen eine Vorgeschichte von sekundärem Hyperparathyreoidismus auf. Die Patienten litten auch an Schenkelhalsosteopenie (Knochenmineraldichte des Schenkelhalses $\leq 0,70 \text{ g/cm}^2$).

[0112] Alle Patienten durchliefen einen sechswöchigen Kontrollzeitraum, nach dem sie willkürlich in zwei Behandlungsgruppen geteilt wurden: eine Gruppe erhielt eine konstante Dosis von 15 µg/Tag 24-(OH)-ProD₂, und die andere Gruppe erhielt ein entsprechendes Placebo. Beide Gruppen behielten normale Kalziumaufnahme durch die Ernährung bei und verwendeten keine Kalziumergänzungen. Die Wirksamkeit wurde durch Vergleiche der beiden Patientengruppen in Bezug auf (a) intakte PTH (iPTH); (b) Knochenmineraldichte in der Speiche, im Oberschenkelknochen und in der Wirbelsäule; und (c) knochenspezifische Urinmarker (z. B. Pyridinium-Crosslinks) bewertet. Die Sicherheit wurde durch (a) Serumkalzium- und -phosphorwerte und (b) Urinkalzium- und -phosphorwerte bewertet.

[0113] Analysen der klinischen Daten zeigten, dass 24-(OH)-ProD₂ iPTH und knochenspezifischen Urinmarker bedeutend reduziert. Patienten, die mit dieser Verbindung behandelt worden waren, wiesen im Vergleich zu Standardwerten normale Serumkalziumwerte und stabile Knochendichten in der Speiche und in der Wirbelsäule auf. Im Gegensatz dazu zeigten Patienten, die mit Placebo behandelt worden waren, keine Reduzierung von iPTH und knochenspezifischen Urinmarkern auf. In der Behandlungsgruppe trat ein unbedeutender Vorfall von Hyperkalzämie auf.

Beispiel 14: Behandlung von Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus im Endstadium einer Nierenkrankung mit 24-OH-D₂

[0114] Dreißig Nierenpatienten wurden in eine klinische Studie aufgenommen, um sekundären Hyperparathyreoidismus zu untersuchen. Die Patienten wiesen iPTH-Standardwerte über 1.000 pg/ml auf. Eine Anfangsdosis 24-OH-D₂ (50 µg 3 Mal pro Woche) wurde, je nach Bedarf, erhöht (Maximum: 100 µg 3 Mal pro Woche) oder verringert, um den iPTH-Wert in den Bereich von 150 bis 300 pg/ml zu bringen und dort zu halten. Nach 11 bis 12 Wochen Behandlung sanken die iPTH-Werte der Patienten auf unter 1.000 pg/ml, und in vielen Fällen sogar unter 500 pg/ml. Einige wenige Fälle von Hyperkalzämie traten in der Studie auf.

Beispiel 15: Behandlung von primärem Hyperparathyreoidismus mit 24-OH-ProD₂

[0115] Zwanzig Nierenpatienten wurden in eine klinische Studie aufgenommen, um primären Hyperparathyreoidismus zu untersuchen. Die Patienten wiesen iPTH-Standardwerte über 200 pg/ml auf. Eine Anfangsdosis 24-OH-ProD₂ (2 bis 4 µg/Tag) wurde, je nach Bedarf, erhöht (Maximum: 10 µg/Tag) oder verringert, um den iPTH-Wert in den Normalbereich zu bringen und dort zu halten. Nach 11 bis 12 Wochen Behandlung sanken die iPTH-Werte der Patienten auf unter 100 pg/ml, und in vielen Fällen sogar unter 60 pg/ml. Einige wenige Fälle von Hyperkalzämie traten in der Studie auf.

Beispiel 16: Immunologietest mit 24-OH-D₂

[0116] Hierzu wurden 9 bis 12 Wochen alte, weibliche C57BL/6-Mäuse verwendet. Den Mäusen wurde nach Belieben Futter und Wasser gegeben, und sie wurden in einem 12-Stunden-Licht-12-Stunden-Dunkelheit-Zyklus gehalten.

[0117] Eine bekannte ausgeglichene Salzlösung (BSS) wurde hergestellt und auf 0,01 mol mit HEPES-Puffer ergänzt.

[0118] Die Testverbindung 24-OH-D₂ wurde in Dimethylsulfoxid gelöst, um eine Endkonzentration von 0,2 oder 0,4 mg/ml zu erhalten. Beim Arbeiten mit Vitamin-D-Verbindungen wurde wenig Licht verwendet.

[0119] Die Mäuse wurden in 4 Gruppen geteilt und intraperitoneal mit 3×10^6 allogenischen P815-Tumorzellen inkuliert, und die resultierende zytotoxische, vom Thymus ausgehende Lymphozyten- (CTL-) Aktivität wurde 10 Tage später bewertet. Die Mäuse wurden über den intraperitonealen Weg mit 25 µl der Testverbindung, die in Dimethylsulfoxid gelöst war, oder nur mit Dimethylsulfoxid (Vehikelkontrolle) behandelt. In Test 1 wurden Mäuse täglich mit 5 µg 24-OH-D₂ behandelt, beginnend einen Tag vor der Immunisierung und bis zum Tag vor dem Assay dauernd. In Test 2 wurden Mäuse nur zwei Mal mit 10 µg 24-OH-D₂ behandelt: am Tag vor der Immunisierung und am Tag der Immunisierung.

[0120] Zehn Tage nach der Immunisierung der Mäuse mit P815-Zellen, wurden einzelne Milzzellsuspensionen hergestellt, indem Milzen durch ein Stahlsieb in BSS gepresst und dann zwei Mal mit BSS gewaschen wurden. Weitere Bearbeitungsschritte von Milzzellen, die Markierung von P815-Zielzellen mit Cr, die Abläufe

des Assays und die Berechnung der Ergebnisse aus dem CTL-Assay sind bekannt und wurden im US-Patent 4.749.710, das durch Verweis hierin aufgenommen ist, beschrieben. Die zytotoxische T-Lymphozytenaktivität wurde individuell auf Milzzellen von jedem Tier jeder Gruppe bestimmt, und die Ergebnisse wurden als mittlere CTL-Aktivität (als prozentbezogene spezifische Cr-Abgabe) jeder Gruppe \pm Standardabweichung ausgedrückt.

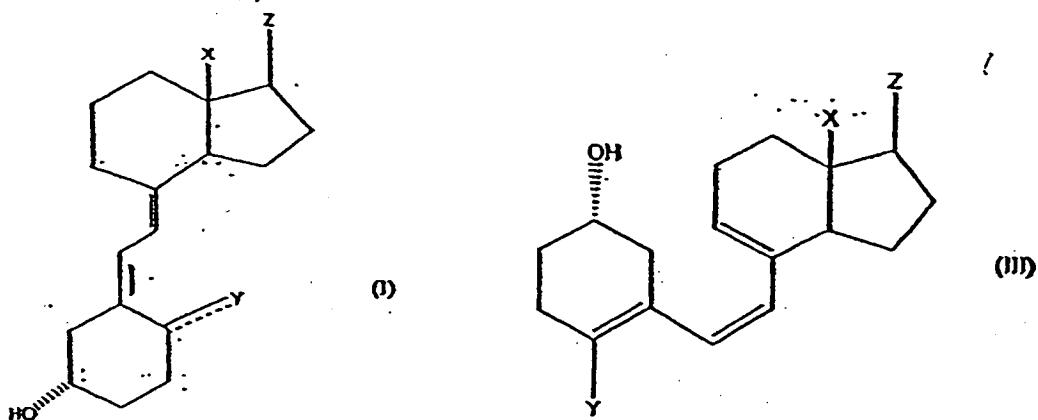
[0121] Die Ergebnisse zeigten, dass Mäuse, die mit P815-Zellen immunisiert waren, in der Vehikelkontrollgruppe innerhalb von 10 Tagen bedeutende CTL-Aktivität entwickelten. Eine statistisch signifikante Reduktion der CTL-Aktivität wurde in beiden Untersuchungen jener Gruppe beobachtet, die mit 24-OH-D₂ behandelt wurden, was die immunsuppressive Aktivität der Verbindung belegt, wenn sie an Tiere verabreicht wird.

[0122] Es versteht sich, dass, obwohl in den oben genannten Beispielen spezifische Verwendungen von 24-OH-D- und 24-OH-ProD-Verbindungen erläutert wurden, auch andere Verbindungen innerhalb des Schutzzumfangs der Ansprüche mit im Wesentlichen gleichen Ergebnissen in Behandlungsmethoden gemäß vorliegender Erfindung eingesetzt werden können.

[0123] Zusammengefasst stellt die vorliegende Erfindung 24-Hydroxyvitamin-D-Pro-Pharmakon-Verbindungen bereit, die 24-Hydroxyprovitamin-D-Verbindungen umfassen, die in vivo zu 1,24-Hydroxyvitamin-D-Verbindungen 1 α -hydroxyliert werden. Die Verbindungen sind insbesondere dazu ausgerichtet, bedeutend geringere Hyperkalzämie zu verursachen als Dosen ähnlicher Mengen von Vitamin-D₃-Verbindungen, wie beispielsweise 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. Die Verbindungen sind zur Behandlung und Prävention von Hyperparathyreoidismus, hyperproliferativen Leiden sowie Knochenschwunderkrankungen und zur Regulierung von Immun- und Entzündungsreaktionen geeignet.

Patentansprüche

1. 24-Hydroxyvitamin D der Formel (I) oder 24-Hydroxyprävitamin D der Formel (III) zur Steigerung oder Beibehaltung der Knochenmasse oder des Knochenmineralgehalts; und/oder zur Senkung oder Beibehaltung eines verringerten Nebenschilddrüsen-Hormon-Spiegels; und/oder zum Hemmen von Hyperproliferation; und/oder zur Induktion oder Förderung von Zelldifferenzierung; und/oder zur Modulation einer Immun- und/oder Entzündungsreaktion:

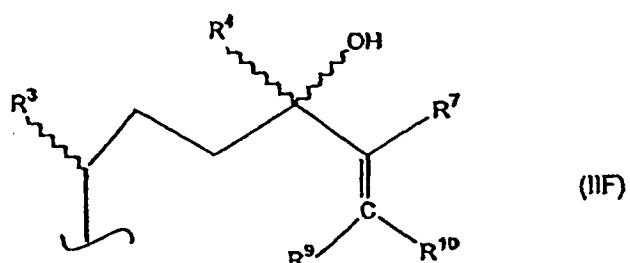
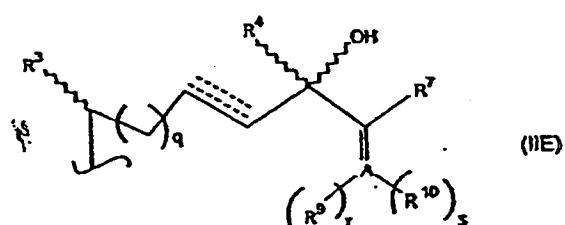
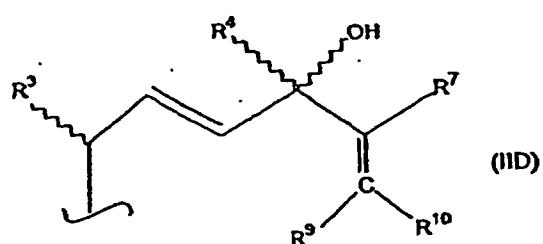
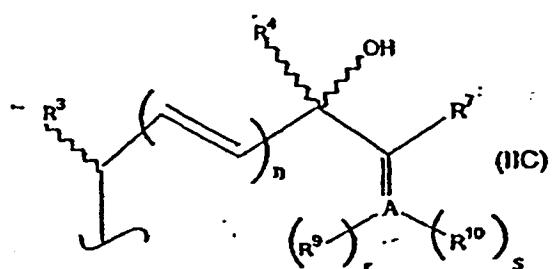
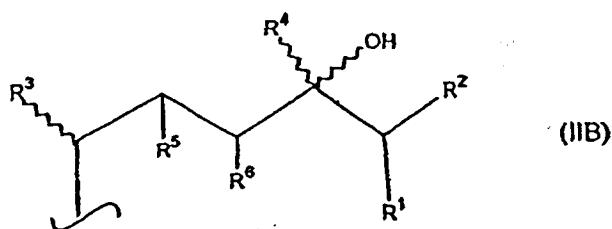
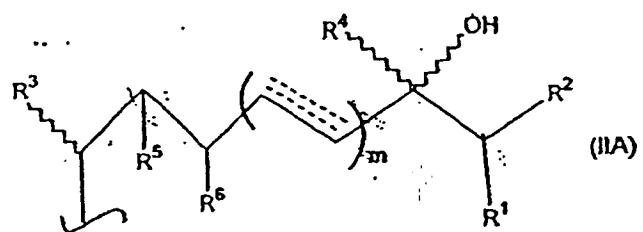


worin:

X Wasserstoff, Niederalkyl oder Niederfluoralkyl ist:

Y eine Methylengruppe, wenn Y über eine Doppelbindung an den A-Ring gebunden ist, oder eine Methylgruppe oder Wasserstoff ist, wenn Y über eine Einfachbindung an den A-Ring gebunden ist; und

Z eine Seitenkette der Formel (IIA), (IIB), (IIC), (IID), (IIE) oder (IIF) ist:



worin:

R^1 und R^2 jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl, Niederfluoralkenyl, Niedercycloalkyl sind oder gemeinsam mit dem Kohlenstoff, an den sie gebunden sind, einen zyklischen C_3 - C_8 -Kohlenwasserstoff-Ring bilden;

R^3 Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist;

R^4 Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist;
 R^5 und R^6 jeweils Wasserstoff sind oder gemeinsam eine Doppelbindung bilden;
 R^7 Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist;
 R^9 und R^{10} jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederalkenyl, Niederfluoralkyl oder Niederfluoralkenyl sind;
A Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff ist;
 $m = 0$ oder 1 ist;
 n eine ganze Zahl von 1 oder 2 ist;
 $g = 0$ oder eine ganze Zahl von 1 oder 2 ist;
 $r = 1$ ist und $s = 0$ ist, wenn A Stickstoff ist;
 r und $s = 1$ sind, wenn A Kohlenstoff ist;
 r und $s = 0$ sind, wenn A Schwefel oder Sauerstoff ist; und
eine strichlierte Linie entlang der Seitenkette eine optionale zusätzliche C-C-Bindung darstellt;
und worin der oben als Modifikator für Alkyl-, Alkenyl-, Fluoralkyl-, Fluoralkenyl- oder Cycloalkylgruppe verwendete Begriff "Nieder-" eine unverzweigte oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen bezeichnet.

2. 24-Hydroxyvitamin D nach Anspruch 1, das die in Anspruch 1 dargelegte Formel (I) aufweist.
3. 24-Hydroxyprävitamin D nach Anspruch 1 der in Anspruch 1 dargelegten Formel (III).
4. 24-Hydroxyvitamin D nach Anspruch 1 der Formel (I) oder 24-Hydroxyprävitamin D nach Anspruch 1 der Formel (III), worin Z eine Seitenkette der Formel (IIA) ist.
5. 24-Hydroxyvitamin D nach Anspruch 1 der Formel (I) oder 24-Hydroxyprävitamin D nach Anspruch 1 der Formel (III), worin Z eine Seitenkette der Formel (IIB) ist.
6. 24-Hydroxyvitamin D nach Anspruch 5, worin das 24-Hydroxyvitamin D 24-Hydroxyvitamin D_2 ; 24(S)-Hydroxyvitamin- D_2 ; 24-Hydroxyvitamin D_4 ; 24(R)-Hydroxyvitamin D_4 ist.
7. 24-Hydroxyprävitamin D nach Anspruch 5, das aus 24-Hydroxyprävitamin D_2 oder 24-Hydroxyprävitamin D_4 ausgewählt ist.
8. 24-Hydroxyvitamin D der Formel (I) oder 24-Hydroxyprävitamin D der Formel (III) nach Anspruch 1, worin Z eine Seitenkette der Formel (IIC) ist.
9. 24-Hydroxyvitamin D der Formel (I) oder 24-Hydroxyprävitamin D der Formel (III) nach Anspruch 1, worin Z eine Seitenkette der Formel (IID) ist.
10. 24-Hydroxyvitamin D der Formel (I) oder 24-Hydroxyprävitamin D der Formel (III) nach Anspruch 1, worin Z eine Seitenkette der Formel (IIE) ist.
11. 24-Hydroxyvitamin D nach Anspruch 10, worin die 24-Hydroxyvitamin D-Verbindung 24-OH-25-en- D_2 oder 24-OH-25-OXO- D_2 ist.
12. 24-Hydroxyprävitamin D nach Anspruch 10, das aus 24-OH-25-en-prä D_2 und/ oder 24-OH-25-OXO-prä D_2 ausgewählt ist.
13. Verwendung eines 24-Hydroxyvitamin D der Formel (I) oder eines 24-Hydroxyprävitamin D der Formel (III) nach einem der vorangegangenen Ansprüche bei der Herstellung eines Medikaments zur Steigerung oder Beibehaltung der Knochenmasse oder des Knochenmineralgehalts; und/oder zur Senkung oder Beibehaltung eines verringerten Nebenschilddrüsen-Hormon-Spiegels; und/oder zum Hemmen von Hyperproliferation; und/oder zur Förderung von Zelldifferenzierung; und/oder zur Modulation einer Immun- und/oder Entzündungsreaktion.
14. Verwendung nach Anspruch 13, worin das Medikament zur Behandlung von Osteoporose und/oder Hyperparathyreoidismus und/oder Psoriasis und/oder Hautkrebs und/oder Brustkrebs und/oder Dickdarmkrebs und/oder Prostatakrebs und/oder Prostatahyperplasie und/oder Immunreaktionsungleichgewicht und/oder Entzündungsreaktionsungleichgewicht dient.

15. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14, worin die 24-Hydroxyvitamin D-Verbindung der Formel (I) oder die 24-Hydroxyprävitamin D-Verbindung der Formel (III) zur Verabreichung in einer Dosis von 3,5 µg/Woche bis 1.000 µg/Woche vorgesehen ist.

16. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, worin das Medikament weiters ein Knochenmittel, ein zytotoxisches Mittel, ein Immunreaktion regulierendes Mittel, ein entzündungshemmendes Mittel oder Kombinationen davon enthält.

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 13 bis 15, worin das Medikament zur Verwendung in Kombination mit einem Knochenmittel, einem zytotoxischen Mittel, einem Immunreaktion regulierenden Mittel, einem entzündungshemmenden Mittel oder Kombinationen davon bestimmt ist.

18. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17, worin das Medikament ein Knochenmittel enthält oder zur Verwendung in Kombination damit bestimmt ist, das aus anderen Vitamin D-Verbindungen, konjugierten Östrogenen, Natriumfluoriden, Biphosphonaten, Cobalamin, Kalziumrezeptoragonisten, Pertussintoxin, Bor und DHEA ausgewählt ist.

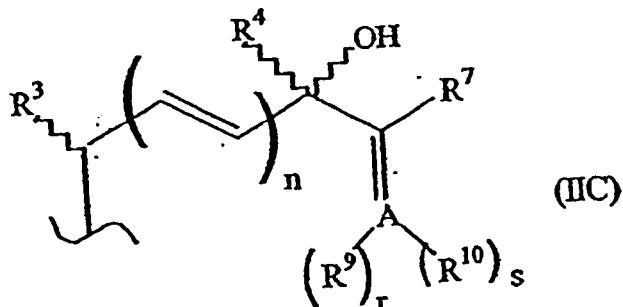
19. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine wirksame Menge eines 24-Hydroxyvitamin D der Formel (I) oder eines 24-Hydroxyprävitamin D der Formel (III) nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, ein pharmazeutisch annehmbares Adjuvans oder ein pharmazeutisch annehmbares Vehikel umfasst.

20. Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin die Zusammensetzung oral verabrechbar ist.

21. Zusammensetzung nach Anspruch 19 oder 20, worin die Zusammensetzung auch ein Knochenmittel, ein zytotoxisches Mittel, ein Immunreaktion regulierendes Mittel, ein entzündungshemmendes Mittel oder Kombinationen davon umfasst.

22. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 19 bis 21 in Form einer Tablette.

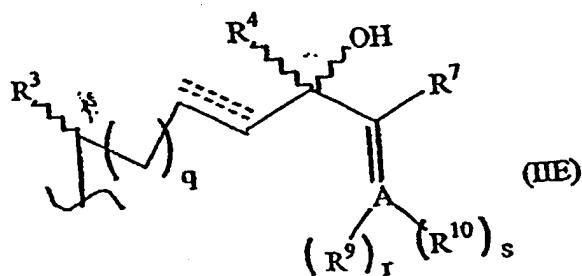
23. 24-Hydroxyvitamin D, dessen chemische Formel die in Formel (I) in Anspruch 1 dargelegte ist, worin Z eine Seitenkette der Formel (IIC):



ist, worin n eine ganze Zahl von 1 oder 2 ist; R³ Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist; R⁴ und R⁷ jeweils unabhängig voneinander Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl sind; A Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff ist; r = 1 ist und s = 0 ist, wenn A Stickstoff ist; r und s = 1 sind, wenn A Kohlenstoff ist; r und s = 0 sind, wenn A Schwefel oder Sauerstoff ist; und R⁹ und R¹⁰ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederalkenyl, Niederfluoralkyl oder Niederfluoralkenyl sind;

und worin der oben als Modifikator für Alkyl-, Alkenyl-, Fluoralkyl-, Fluoralkenyl- oder Cycloalkylgruppe verwendete Begriff "Nieder-" eine unverzweigte oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen bezeichnet.

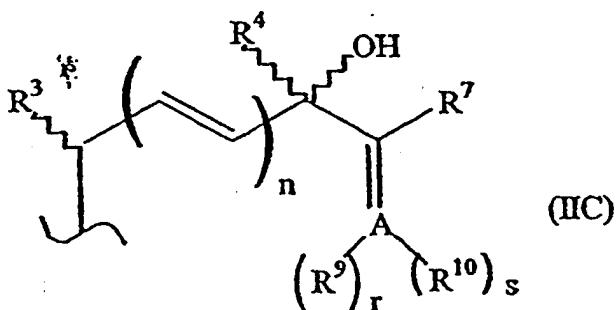
24. 24-Hydroxyvitamin D, dessen chemische Formel die in Formel (I) in Anspruch 1 dargelegte ist, worin Z eine Seitenkette der Formel (IIE):



ist, worin eine strichlierte Linie entlang der Seitenkette eine optionale zusätzliche C-C-Bindung darstellt, $q = 0$ oder eine ganze Zahl ist, die 1 oder 2 ist; R^3 Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist; R^4 und R^7 jeweils unabhängig voneinander Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl sind; A Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff ist; $r = 1$ ist und $s = 0$ ist, wenn A Stickstoff ist; r und $s = 1$ sind, wenn A Kohlenstoff ist; r und $s = 0$ sind, wenn A Schwefel oder Sauerstoff ist; und R^9 und R^{10} jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederalkenyl, Niederfluoralkyl oder Niederfluoralkenyl sind;

und worin der oben als Modifikator für Alkyl-, Alkenyl-, Fluoralkyl-, Fluoralkenyl- oder Cycloalkylgruppe verwendete Begriff "Nieder-" eine unverzweigte oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen bezeichnet.

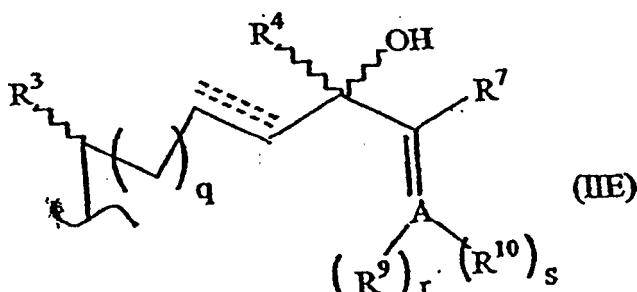
25. 24-Hydroxyprävitamin D, dessen chemische Formel die in Formel (III) in Anspruch 1 dargelegte ist, worin Z eine Seitenkette der Formel (IIC):



ist, worin n eine ganze Zahl von 1 oder 2 ist; R^3 Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist; R^4 und R^7 jeweils unabhängig voneinander Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl sind; A Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff ist; $r = 1$ ist und $s = 0$ ist, wenn A Stickstoff ist; r und $s = 1$ sind, wenn A Kohlenstoff ist; r und $s = 0$ sind, wenn A Schwefel oder Sauerstoff ist; und R^9 und R^{10} jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederalkenyl, Niederfluoralkyl oder Niederfluoralkenyl sind;

und worin der oben als Modifikator für Alkyl-, Alkenyl-, Fluoralkyl-, Fluoralkenyl- oder Cycloalkylgruppe verwendete Begriff "Nieder-" eine unverzweigte oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen bezeichnet.

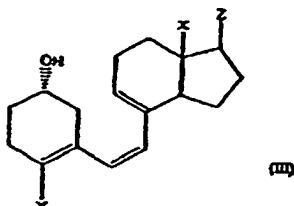
26. 24-Hydroxyprävitamin D, dessen chemische Formel die in Formel (III) in Anspruch 1 dargelegte ist; worin Z eine Seitenkette der Formel (IIIE):



ist, worin eine strichlierte Linie entlang der Seitenkette eine optionale zusätzliche C-C-Bindung darstellt, $q = 0$ oder eine ganze Zahl ist, die 1 oder 2 ist; R^3 Wasserstoff, Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl ist; R^4 und R^7 jeweils unabhängig voneinander Niederalkyl, Niederfluoralkyl, Niederalkenyl oder Niederfluoralkenyl sind; A Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel oder Stickstoff ist; $r = 1$ ist und $s = 0$ ist, wenn A

Stickstoff ist; r und s = 1 sind, wenn A Kohlenstoff ist; r und s = 0 sind, wenn A Schwefel oder Sauerstoff ist; und R⁹ und R¹⁰ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Niederalkenyl, Niederfluoralkyl oder Niederfluoralkenyl sind; und worin der oben als Modifikator für Alkyl-, Alkenyl-, Fluoralkyl-, Fluoralkenyl- oder Cycloalkylgruppe verwendete Begriff "Nieder-" eine unverzweigte oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen bezeichnet.

27. 24-Hydroxyprävitamin D, das eine Verbindung der Formel (III):



ist, worin Z für eine gesättigte oder ungesättigte, substituierte oder unsubstituierte, unverzweigte, verzweigte oder zyklische C₄-C₁₈-Kohlenwasserstoffgruppe steht, in der C-24 hydroxyliert ist, Y eine Methylgruppe oder Wasserstoff ist; und X Wasserstoff, Niederalkyl oder Niederfluoralkyl ist, und worin der oben als Modifikator für Alkyl-, Alkenyl-, Fluoralkyl-, Fluoralkenyl- oder Cycloalkylgruppe verwendete Begriff "Nieder-" eine unverzweigte oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 4 Kohlenstoffatomen bezeichnet.

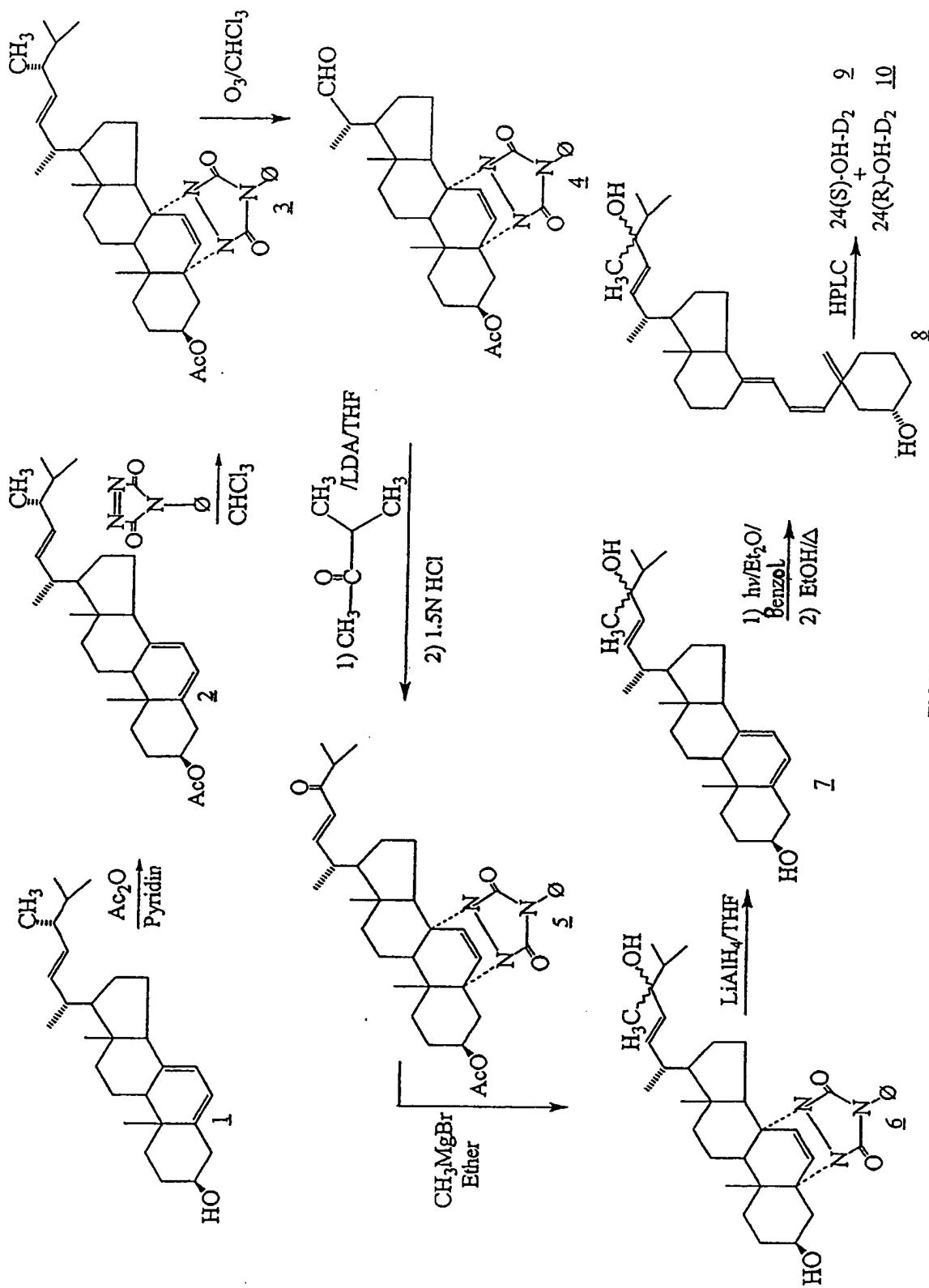
28. 24-Hydroxyprävitamin D nach Anspruch 27 zur Verwendung zur Steigerung oder Beibehaltung der Knochenmasse oder des Knochenmineralgehalts; und/oder zur Senkung oder Beibehaltung eines verringerten Nebenschilddrüsen-Hormon-Spiegels; und/ oder zum Hemmen von Hyperproliferation; und/oder zur Induktion oder Förderung von Zelldifferenzierung; und/oder zur Modulation einer Immun- und/oder Entzündungsreaktion.

29. Pharmazeutische Zusammensetzung, die ein 24-Hydroxyprävitamin D nach Anspruch 27 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, ein pharmazeutisch annehmbares Adjuvans oder ein pharmazeutisch annehmbares Vehikel umfasst.

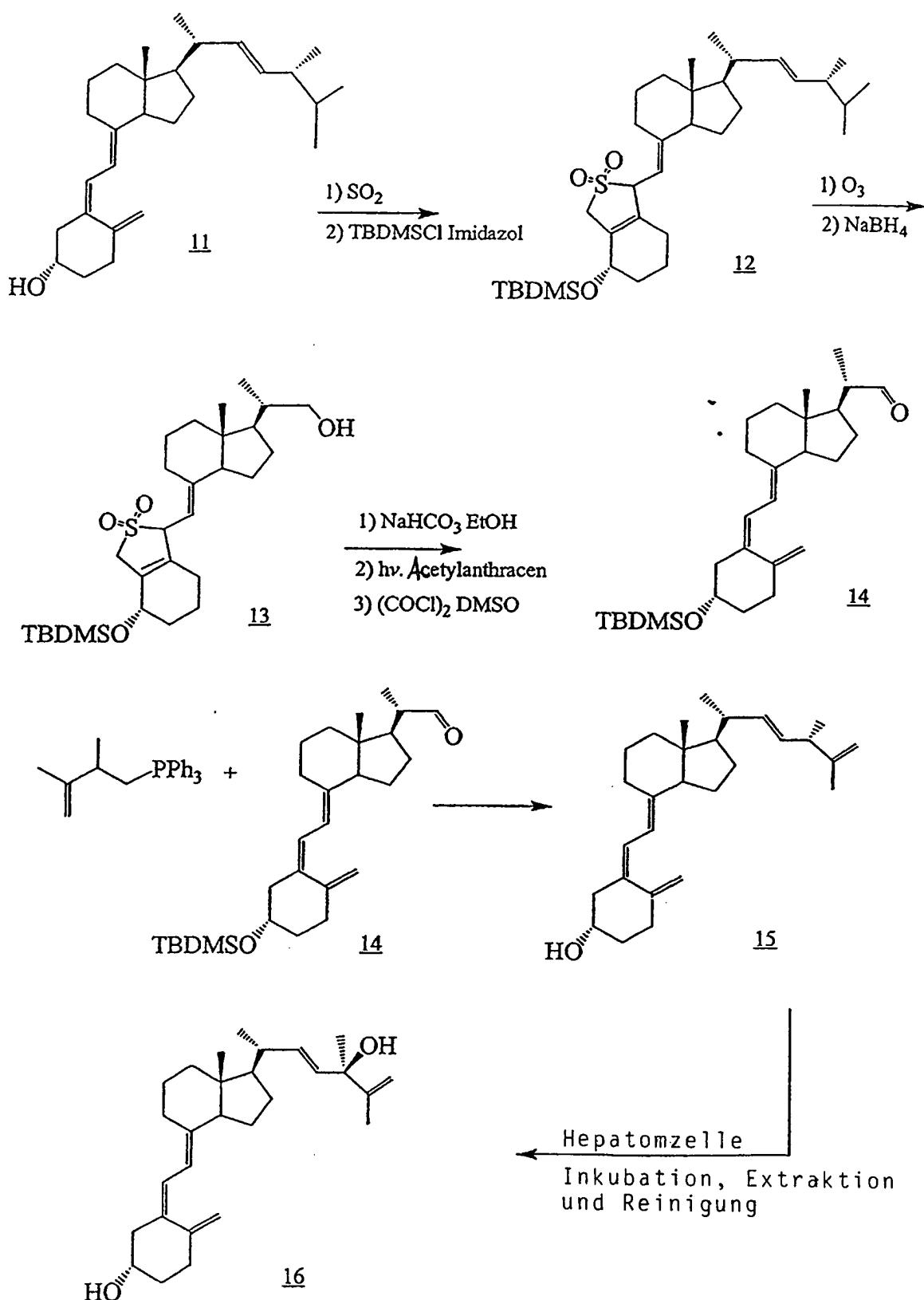
30. Verwendung eines 24-Hydroxyprävitamin D nach Anspruch 27 bei der Herstellung eines Medikaments zur Steigerung oder Beibehaltung der Knochenmasse oder des Knochenmineralgehalts und/oder zur Senkung oder Beibehaltung eines verringerten Nebenschilddrüsen-Hormon-Spiegels; und/oder zum Hemmen von Hyperproliferation; und/oder zur Induktion oder Förderung von Zelldifferenzierung; und/oder zur Modulation einer Immun- und/oder Entzündungsreaktion.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



FIGUR 1



FIGUR 2

FIG. 3

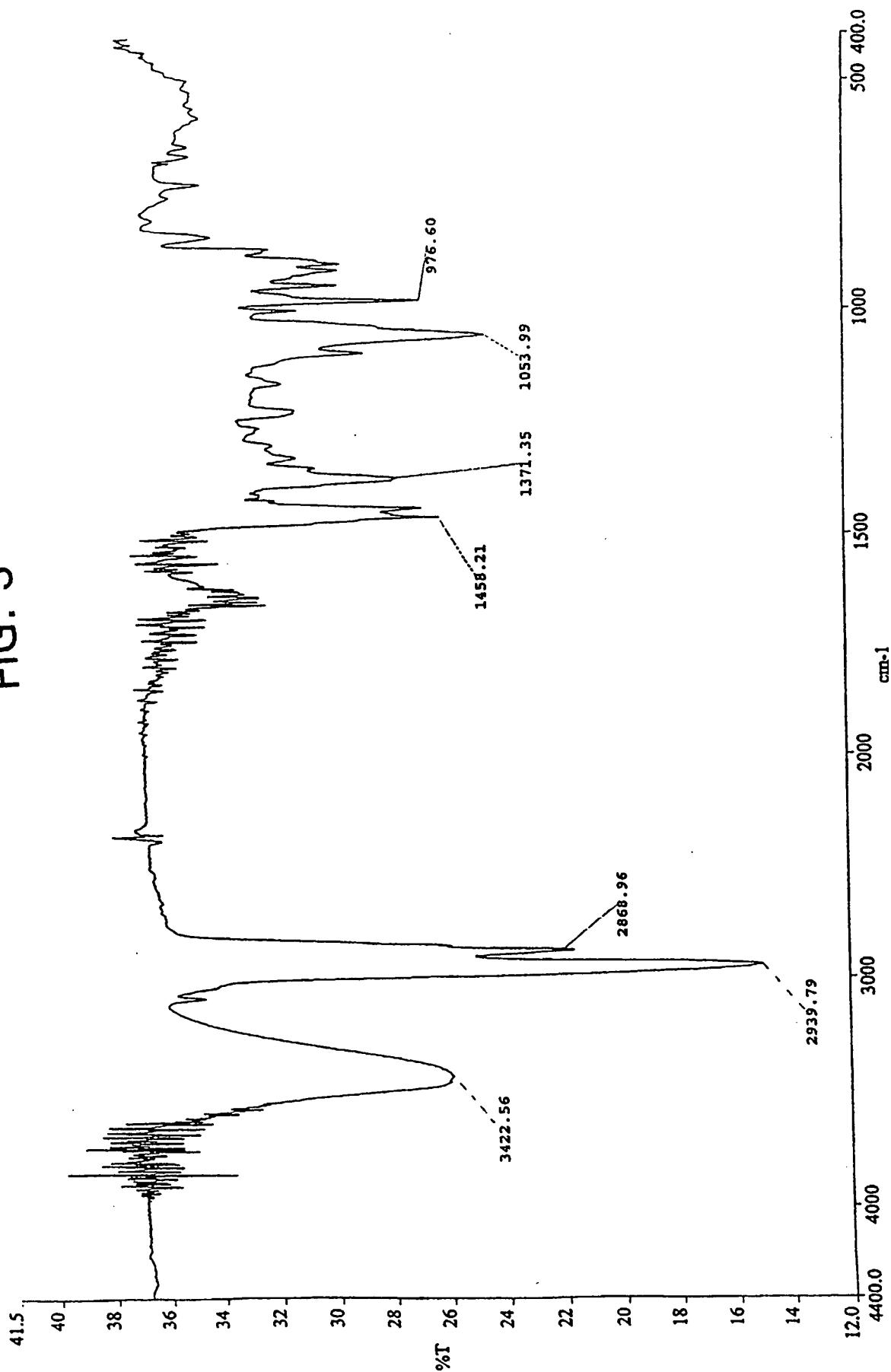


FIG. 4

