

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT



(11) 157007 B

(21) Patentansøgning nr.: 4431/86

(51) Int.Cl.⁴ C 07 C 172/00

(22) Indleveringsdag: 16 sep 1986

(24) Løbedag: 15 jan 1986

(41) Alm. tilgængelig: 16 sep 1986

(44) Fremlagt: 30 okt 1989

(86) International ansøgning nr.: PCT/US86/00093

(86) International indleveringsdag: 15 jan 1986

(85) Videreførelsesdag: 16 sep 1986

(30) Prioritet: 17 jan 1985 US 692151 30 maj 1985 US 739332

(71) Ansøger: *WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION; 614 North Walnut Street; Madison; WI 53705, US

(72) Opfinder: Hector F. *Deluca; US, Nobuo *Ikekawa; JP, Yoko *Tanaka; US, Heinrich K. *Schnoes; US, Voula *Ostrem; US

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Vitamin D3 derivater, farmaceutiske præparater indeholdende disse forbindelser, samt anvendelse af disse forbindelser til fremstilling af farmaceutiske præparater til behandling af neoplastiske sygdomme eller til induktion af differentiering i maligne celler

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

4431-86

26-homo-vitamin D forbindelser og fremgangsmåde til fremstilling heraf og hidtil ukendte mellemprodukter beskrives. Forbindelserne udviser vitamin D lignende virkning af samme art som 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, den anerkendte cirkulerende hormonale form af vitamin D, eller forskellige af dets derivater. Forbindelserne kan anvendes ved behandling af sygelige tilstande i forbindelse med calcium-phosphor-ubalance. Derudover udviser forbindelserne et højt antineoplastisk/calcemisk aktivitetsforhold og kan derfor anvendes ved behandlingen af neoplastiske sygdomme.

DK 157007 B

Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte vitamin D derivater, som er ejendommelige ved, at de har den i krav 1's kendetegnende del angivne formel.

5 Desuden angår opfindelsen farmaceutiske præparater, som er ejendommelige ved det i krav 4's og 7's kendetegnende dele angivne, og endelig angår opfindelsen anvendelse af de i krav 1 omhandlede derivater til fremstilling af farmaceutiske præparater til behandling af neoplastiske
10 sygdomme eller til induktion af differentiering i maligne celler.

Det er velkendt, at vitamin D regulerer calcium og phosphormetabolisme hos dyr og mennesker, og det er nu helt
15 klart bevist, at den biologiske effektivitet af vitamin D afhænger af vitaminets stofskiftemæssige omsætning in vivo til hydroxylerede derivater. Således hydroxyleres vitamin D₃ in vivo til 25-hydroxyvitamin D₃ i leveren, der for sit vedkommende omdannes til 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ i nyrerne. Det er sidstnævnte forbindelse, der
20 nu anerkendes som værende den cirkulerende hormonale form af vitamin D.

På grund af deres biologiske evne til at fremme calcium- og phosphortransport i tarmen og til at mobilisere og mineralisere knogler er disse former af vitamin D vigtige farmaceutiske forbindelser, der er særdeles velegnede til anvendelse ved behandlingen af forskellige knoglesygdomme.

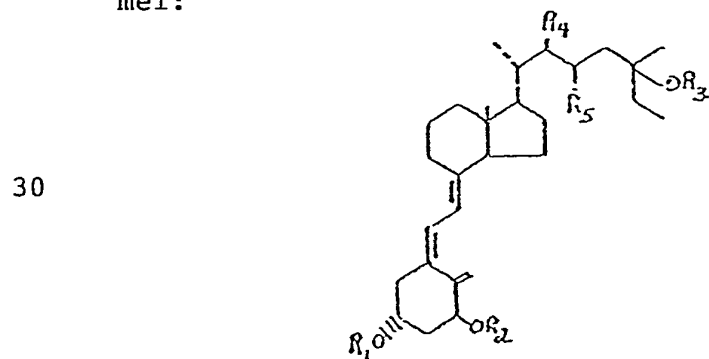
30 Vitamin D derivater og deres fremstilling og anvendelse er omtalt i en hel række patentskrifter og inden for den videnskabelige litteratur. F. eks. omhandler USA patentskrift nr. 3 565 924 25-hydroxycholecalciferol; USA patentskrift nr. 3 697 559 omhandler 1,25-dihydroxycholecalciferol; USA patentskrift nr. 3 741 996 omhandler 1 α -

hydroxycholecalciferol; USA patentskrift nr. 3 786 062
 omhandler 22-dehydro-25-hydroxycholecalciferol; USA pa-
 tentskrift nr. 3 880 894 omhandler 1,25-dihydroxyergo-
 calciferol; USA patentskrift nr. 4 201 881 omhandler
 5 24,24-difluor-1 α ,25-dihydroxycholecalciferol og USA pa-
 tentskrift nr. 4 196 133 omhandler 24,24-difluor-1 α ,25-
 dihydroxycholecalciferol.

De omhandlede vitamin D forbindelser har nu vist sig at
 10 udvise glimrende vitamin D lignende virkning, og af den
 grund kan de let anvendes som en erstatning for vitamin
 D såvel som dettes derivater til velkendte anvendelser
 som f. eks. behandling af forskellige sygelige tilstan-
 de, der viser sig i forbindelse med calcium og phosphor
 15 ubalance som hypoparathyroidisme, osteodystrophi, osteo-
 malacia og osteoporose.

Disse derivater er 26-homovitaminer og eksempler på
 disse er 1 α ,25-dihydroxy-22E-dehydro-26-homovitamin D₃
 20 og 1 α ,25-dihydroxy-26-homovitamin D₃. Derivaterne er i
 besiddelse af den overraskende fordel i forhold til
 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃, at de uventet udviser højere
 anti-leukæmisk til calcemisk virkende forhold end dette.

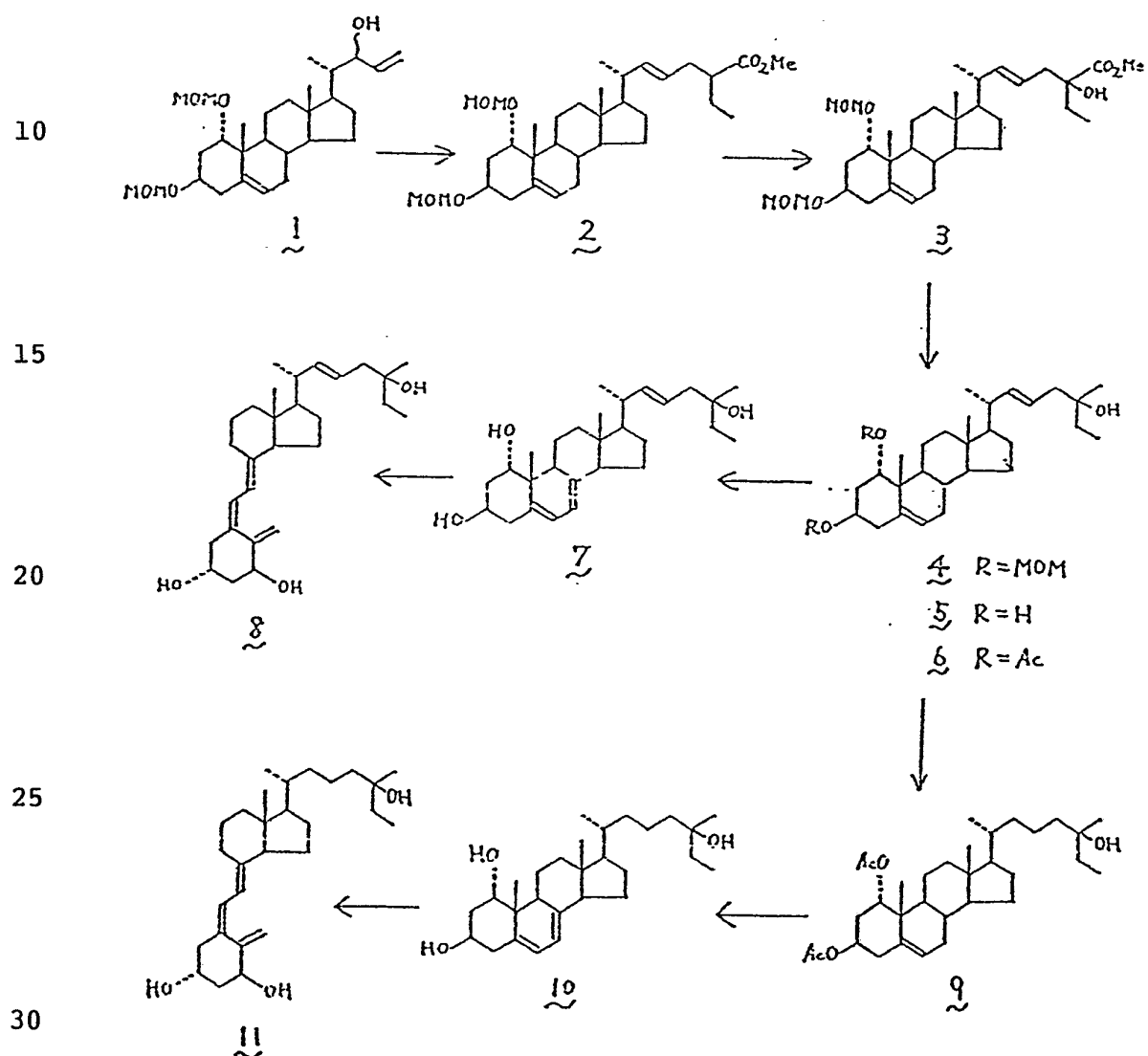
25 De omhandlede forbindelser afbildes med den almene for-
 mel:



35 hvori R₁-R₅ har de i krav 1 anførte betydninger.

I den skematiske og detaljerede beskrivelse af fremstillingen af de omhandlede forbindelser betyder samme numre samme forbindelser.

5

REAKTIONSSKEMA

Fremgangsmåden til fremstilling af omhandlede derivater beskrives nærmere nedenfor:

1α,3β-dimethoxymethoxy-23,24-dinorchol-5-en-22-al omsat-
tes med vinylmagnesiumbromid til fremstilling af allyl-
alkoholen 1. Denne alkohol underkastedes Claisen omlej-
ring ved at omsætte den med trimethylortho-n-butylat og
en katalytisk mængde propionsyre til opnåelse af esteren
2 i godt udbytte (97%). Forbindelsen 2 omdannedes til
dennes enolat form ved behandling med n-butyllithium og
THF, der herefter behandledes med oxygen og dernæst re-
duceredes med triethylphosphit til indførsel af en hy-
droxylgruppe ved C-25-stillingen i molekylet. Herefter
omdannedes 27-esteren 3 til alkoholen 4 ved behandling
først med lithiumaluminiumhydrid til opnåelse af den
tilsvarende diol efterfulgt af behandling med methansul-
fonylchlorid og pyridin til opnåelse af mesylatet, der
for sit vedkommende behandledes med lithiumaluminiumhy-
drid.

Fjernelse af MOM-gruppen ved behandling med syre gav
(22E, 25ξ)-1α,3β,25-trihydroxy-26-homo-cholesta-5,22-
dien 5, der acetyleredes til opnåelse af diacetatet 6.
Allylbromering af 6 med N-bromsuccinimid og herefter med
tetra-n-butylammoniumfluorid gav 5,7,22-trienen 7, der
bestråledes og isomeriseredes ved opvarmning til opnåel-
se af 1α,25-dihydroxy-(22E)-dehydro-26-homovitamin D₃ 8.

(25ξ)-1α,25-dihydroxy-26-homovitamin D₃ 11 fremstilledes
ved selektiv hydrogenering af 5,22-dienen 6 til opnåelse
af 5-enen 9, der omdannedes til 5,7-dienen 10 og heref-
ter til 26-homo-vitamin 11 som beskrevet ovenfor.

I den efterfølgende detaljerede beskrivelse af frem-
gangsmåden bestemtes smeltepunkterne med varmt-trins
mikroskop og er angivet ukorrigeret. ¹H-NMR-spektrene

blev optaget med et Hitachi R-24A (60 MHz) i CDCl_3 med Me_4Si som en indre standard, med mindre andet er angivet. Massespektre blev opnået med Shimadzu QP-1000 massespektrometer ved 70 eV. UV spektre blev optaget i ethanol-opløsning med et Shimadzu UV 2000 dobbeltstrålespektrofotometer. Søjlechromatografi udførtes under anvendelse af silicagel (E. Merck, Kieselgel 60, 70-230 mesh). Præparativ tyndtlagschromatografi udførtes på præcoatede plader af silicagel (E. Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,25 mm tyk). Sædvanlig oparbejdning er fortynding med vand, ekstraktion med et organisk opløsningsmiddel, der er angivet i parentes, vask af ekstrakten indtil neutral reaktion, tørring over vandfrit magnesiumsulfat, filtrering og fjernelse af opløsningsmidlet under reduceret tryk. Følgende forkortelser anvendtes: THP-tetrahydropyranyl; THF-tetrahydrofuran; ether-diethylether, MeOH-methanol, MOM-methoxymethyl, LDA-lithiumdiisopropylamid. Temperaturer er angivet i °C.

20 (22E)-1 α ,3 β -dimethoxymethyloxy-26-homocholesta-5,22-dien-27-syremethyl ester (2)

En opløsning af allylalkoholen 1 (390 mg, 0,844 mmol), trimethylortho-n-butylat (0,7 ml) og propionsyre (3 dråber) i toluen (6 ml) opvarmedes 2 timer med tilbagesvaling under argon. Fjernelse af opløsningsmidlet under reduceret tryk gav den urensede forbindelse, der hældtes på en søjle af silicagel (20 g). Eluering med hexan-ethylacetat (5:1) gav esteren 2 (446 mg 97%) som en olie. $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,68 (3H, s, 18-H₃), 0,88 (3H, t, J = 7 Hz, -CH₂CH₃), 0,98 (3H, d, J = 6 Hz, 21-H₃) 3,03 (3H, s, 19-H₃), 3,38 (3H, s, -OCH₃), 3,43 (3H, s, -OCH₃), 3,68 (3H, s, -CO₂CH₃), 3,76 (1H, m, 1 β -H), 4,68 (2H, s, 3 β -O-CH₂-O-), 4,69 (2H, ABq, J = 7 Hz, AB = 11 Hz, 1 α -O-CH₂-O), 5,27 (2H, m, 22-H og 23-H), og 5,56 (1H, m, 6-H).

(22E,25Ξ)-1α,3β-dimethoxymethyloxy-25-hydroxy-26-homocholesta-5,22-dien-27-syre methylester (3)

Til en opløsning af LDA (fremstillet med diisopropylamin) (0,13 ml, 0,929 mmol), 1,56 mmol n-butyllithium (0,59 ml) og THF (2 ml) sættes esteren 2 (437 mg, 0,800 mmol) i THF (5 ml), og blandingen omrørtes under argon ved -78 °C i 30 minutter. Oxygen bobledes gennem opløsningen, og herefter tilsattes triethylphosphit (0,14 ml, 0,817 mmol). Sædvanlig oparbejdning (ether til ekstraktion) gav en urenset forbindelse, der påførtes en søjle af silicagel (25 g). Eluering med hexan-ethylacetat (5:1) gav hydroxyesteren 3 (303 mg, 67%) som en olie. ¹H-NMR δ: 0,68 (3H, s, 18-H₃), 0,85 (3H, t, J = 7 Hz, -CH₂CH₃), 0,98 (3H, d, J = 6 Hz, 21-H₃), 1,02 (3H, s, 19-H₃), 3,08 (1H, bs, W_{1/2} = 3 Hz, -OH), 3,38 (3H, s, -OCH₃), 3,42 (3H, s, -OCH₃), 3,76 (3H, s, -CO₂CH₃) 4,68 (2H, s, 3β-O-CH₂-O-), 4,68 (2H, ABq, J = 7 Hz, AB = 11 Hz, 1α-O-CH₂-O-), 5,32 (2H, m, 22-H og 23-H), 5,55 (1H, m, 6-H).

20 (22E,25Ξ)-1α,3β-dimethoxymethyloxy-25-hydroxy-26-homocholesta-5,22-dien (4)

Til en opløsning af hydroxyesteren 3 (294 mg, 0,539 mmol) i THF sættes lithiumaluminiumhydrid (20 mg, 0,526 mmol), og blandingen omrørtes ved stuetemperatur i 30 minutter. Opbejdning som sædvanlig (ether til ekstraktion) gav en urenset diol. Denne behandledes med methansulfonylchlorid (0,04 ml, 0,517 mmol) og pyridin (1,5 ml) ved stuetemperatur i 30 minutter. Sædvanlig opbejdning (ether til ekstraktion) gav et urenset mesylat. Til en opløsning af det urensede mesylat i THF (5 ml) sættes lithiumaluminiumhydrid (20 mg, 0,526 mmol), og blandingen opvarmedes 30 minutter med tilbagesvaling. Sædvanlig opbejdning (ether til ekstraktion) gav en

urenset forbindelse, der påførtes en søjle af silicagel (20 g). Eluering med hexan-ethylacetat (5:1) gav alkoholen-4 (190 mg, 70%) som en olie. $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,71 (3H, s, 18-H₃), 0,90 (3H, t, J = 7 Hz, -CH₂CH₃), 1,03 (3H, d, J = 6 Hz, 21-H₃), 1,03 (3H, s, 19-H₃), 1,12 (3H, s, 27-H₃), 3,36 (3H, s, -OCH₃), 3,40 (3H, s, -OCH₃), 3,74 (1H, m, 1 β -H), 4,66 (2H, s, 3 β -O-CH₂-O-), 4,67 (2H, ABq, J = 7 Hz, AB = 11 Hz, 1 α -O-CH₂-O-), 5,35 (2H, m, 22-H og 23-H) og 5,54 (1H, m, 6-H).

10 (22E,25 ξ)-1 α ,3 β ,25-trihydroxy-26-homocholesta-5,22-dien (5)

En opløsning af dimethoxymethyletheren 1 mg, 0,349 mmol) i THF (5 ml) behandledes med 6N HCl (1 ml) i 1 1/2 time ved 50 °C. Sædvanlig oparbejdning (ethylacetat til ekstraktion) gav et urenset produkt, der påførtes en søjle af silicagel (15 g). Eluering med hexan-ethylacetat (1:2) gav triolen 5 (147 mg, 98%) med smeltepunkt 85-87 °C (hexan-dichlormethan). $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,69 (3H, s, 18-H₃), 0,89 (3H, t, J = 7 Hz, -CH₂CH₃), 1,02 (3H, s, 19-H₃), 1,13 (3H, s, 27-H₃), 3,85 (1H, m, 1 β -H), 3,98 (1H, m, 3 α -H), 5,40 (2H, m, 22-H og 23-H) og 5,60 (1H, m, 6-H).

25 (22E,25 ξ)-1 α ,3 β -diacetox-25-hydroxy-26-homocholesta-5,22-dien (6)

En opløsning af triolen 5 (100 mg, 0,233 mmol) i pyridin (1 ml) behandledes med eddikesyreanhydrid (1 ml) ved stuetemperatur i 15 timer. Sædvanlig oparbejdning (ethylacetat til ekstraktion) gav en urenset forbindelse, der påførtes en søjle af silicagel (10 g). Eluering med hexan-ethylacetat (5:1) gav diacetatet 6 (101 mg, 85%) som et amorft fast stof. $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,68 (3H, s, 18-H₃), 0,88 (3H, t, J = 7 Hz, -CH₂CH₃), 0,98 (3H, d, J = 6 Hz,

21-H₃), 1,08 (3H, s, 19-H₃), 1,12 (3H, s, 27-H₃), 2,03 (3H, s, acetyl), 2,06 (3H, s, acetyl), 4,98 (1H, m, 3 α -H), 5,06 (1H, m, 1 β -H), 5,37 (2H, m, 22-H og 23-H) og 5,53 (1H, m, 6-H).

5 (22E,25 ξ)-1 α ,3 β ,25-trihydroxy-26-homocholesta-5,7,22-
trien (7)

En opløsning af 5,22-dienen 6 (38 mg, 0,0739 mmol) og N-bromsuccinimid (19 mg, 0,107 mmol) i carbontetrachlorid (3 ml) opvarmedes 20 minutter under argon med tilbage-
10 sving. Efter afkøling til 0 °C frafiltreredes det fremkomne bundfald. Filtratet koncentreredes under 40 °C til opnåelse af en remanens. En opløsning af denne remanens i 5 ml THF behandledes med en katalytisk mængde tetra-n-butylammoniumbromid ved stuetemperatur i 50 minutter.
15 Herefter behandledes blandingen med en opløsning af tetra-n-butylammoniumfluorid i THF (0,3 ml, 0,3 mmol) ved stuetemperatur i 30 minutter. Sædvanlig oparbejdning (ethylacetat til ekstraktion) gav en urenset trien. Denne trien i THF (5 ml) behandledes med 5% KOH-MeOH (4 ml)
20 ved stuetemperatur i 14 timer. Sædvanlig oparbejdning (ethylacetat til ekstraktion) gav en urenset forbindelse, der underkastedes præperativ tyndtlags chromatografi (benzen-ethylacetat, 1:1, fremkaldt 6 gange). Båndet med R_f-værdien 0,45 blev skrabet af og elueret med ethyl-
25 acetat. Fjernelse af opløsningsmidlet gav 5,7,22-trienen 7 (8,7 mg, 40%). UV λ_{EtOH} : 293, 282, 271 nm.
max

30 (22E,25 ξ)-1 α ,25-dihydroxy-22-dehydro-26-homovitamin D₃
(8)

En opløsning af trienen 7 (4,4 mg, 0,0103 mmol) i benzen (90 ml) og ethanol (40 ml) bestråledes med en medium tryk kviksølvlampe gennem et Vycor-filter ved 0 °C i 2
35

1/2 minut under argon. Reaktionsblandingen opvarmedes 1 time med tilbagesvaling under argon. Fjernelse af opløsningsmidlet under reduceret tryk gav en urenset forbindelse, der underkastedes præparativ tyndtlags-chromatografi (benzen-ethylacetat, 1:1, fremkaldt 6 gange). Båndet med Rf-værdien 0,49 blev skrabet af og elueret med ethylacetat. Fjernelse af opløsningsmidlet gav den vitamin D₃ analoge 8 (0,91 mg, 21%). UV $\lambda_{\text{EtOH}}^{\text{max}}$: 265 nm,

10 $\lambda_{\text{EtOH}}^{\text{min}}$: 282 nm. MS m/z: 428 (M^+), 410, 392, 374, 338, 320, 287, 269, 251, 141, 134, 123, 73. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) δ : 0,56 (3H, s, 18-H₃), 0,91 (3H, t, J = 7,6 Hz, -CH₂CH₃), 1,04 (3H, d, J = 6,8 Hz, 21-H₃), 1,13 (3H, s, 27-H₃), 4,23 (1H, m, $W_{1/2}$ = 18,4 Hz, 3 α -H), 4,43 (1H, m, $W_{1/2}$ = 16,9 Hz, 1 β -H), 5,00 (1H, bs, $W_{1/2}$ = 3,2 Hz, 19-H), 5,32 (1H, bs, $W_{1/2}$ = 3,2 Hz, 19-H), 5,37 (2H, m, 22-H og 23-H), 6,02 (1H, d, J = 11,5 Hz, 7-H) og 6,38 (1H, d, J = 11,5 Hz, 6-H).

20

(25 ξ)-1 α ,3 β -diacetoxy-25-hydroxy-26-homocholest-5-en (9)

En blanding af 5,22-dienen 6 (35 mg, 0,0681 mmol) og 10% Pd-C (4 mg) i ethylacetat (4 ml) omrørtes under hydrogen 3 timer ved stuetemperatur. Palladium-katalysatoren frafiltreredes, og filtratet koncentreredes til opnåelse af en remanens, der underkastedes præparativ tyndtlagschromatografi (hexan-ethylacetat, 2:1, fremkaldt én gang). Båndet med Rf-værdi 0,46 blev skrabet af. Eluering med ethylacetat gav 5-enen 9 (30 mg, 85%) som et amorft fast stof. $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,66 (3H, s, 18-H₃), 0,88 (3H, t, J = 7 Hz, -CH₂CH₃), 1,08 (3H, s, 19-H₃), 1,12 (3H, s, 27-H₃), 2,02 (3H, s, acetyl), 2,04 (3H, s, acetyl), 4,97 (1H, m, 3 α -H), 5,04 (1H, m, 1 β -H) og 5,51 (1H, m, 6-H).

35

(25 ξ)-1 α ,3 β ,25-trihydroxy-26-homocholesta-5,7-dien (10)

5-enen (22 mg, 0,0426 mmol) omdannedes som beskrevet for forbindelsen 6 til 5,7-dienen 10 (6,7 mg, 37%).

5 UV λ ^{EtOH} : 293, 282, 271 nm.
max

(25 ξ)-1 α ,25-dihydroxy-26-homovitamin D₃ 11

10 Dienen 10 (4,8 mg, 0,0112 mmol) omdannedes som beskrevet for forbindelsen 7 til den vitamin D₃ analoge 11 (1,3 mg, 27%). UV λ EtOH : 265 nm, λ EtOH : 228 nm. MS m/z :

max	min
430 (M ⁺), 412, 394, 379, 376, 287, 269, 251, 152, 134,	
116, 73, 55.	

15

Eventuelt kan de omhandlede forbindelser let fås i krystallinsk form ved omkrystallisation med passende opløsningsmidler som hexan, ethere, alkoholer eller blandinger heraf, sådan som det vil være klart for fagmanden.

20

Biologisk aktivitet

25 Knoglecalcium mobiliserende virkning af 1 α ,25-(OH)₂-26-homo-D₃ forbindelser.

Han-fravænnede rotter blev indkøbt fra Holtzman Co., Madison, Wis. og fodret ad libitum med en lav-calcium, vitamin D fattig diæt som beskrevet af Suda et al (J. Nutrition 100:1049, 1970) og vand i 3 uger. Herefter opdeltes rotterne i 4 grupper med 6 i hver, og der blev indgivet intrajugulært henholdsvis 650 pmol af enten 1 α ,25-(OH)₂-26-homo-D₃, 1 α ,25-(OH)₂-(22E) Δ ²²-26-homo-D₃ eller 1 α ,25-(OH)₂D₃ opløst i 0,05 ml 95% ethanol 7 timer inden aflivning. Rotterne i kontrolgruppen fik 0,05 ml 95% ethanol 7 timer inden aflivning. Rotterne i

30

35

kontrolgruppen fik 0,05 ml ethanol bærestof på samme måde. De blev aflivet ved at hugge hovedet af, blodet opsamledes og centrifugeredes til opnåelse af serum. Serum calcium koncentrationen bestemtes med et atom-absorptions spektrofotometer (Perkin-Elmer model 214) i nærværelse af 0,1 % lanthanumchlorid. Resultaterne er angivet i tabel 1 nedenfor:

TABEL 1

10

Administrerede forbindelser	Serum calciumkoncentration (mg/100 ml)
ethanol	3,4 ± 0,3 * a)
15 1α,25-(OH) ₂ -26-homo-D ₃	4,6 ± 0,2 b)
1α,25-(OH) ₂ -(22E) Δ ²² -26-homo D ₃	4,6 ± 0,3 b)
1α,25-(OH) ₂ D ₃	4,5 ± 0,2 b)

* standard afvigelse fra gennemsnit

20

b) er signifikant forskellig fra a) P< 0,001

Af ovenstående resultater kan det konkluderes, at i det vitamin D responderende system hos vitamin D manglende dyr udviser de omhandlede forbindelser samme aktivitet som 1α,25-dihydroxy vitamin D₃, den cirkulerende hormonale form af vitaminet.

De omhandlede forbindelser kan let administreres for at udnytte deres calcemiske virkning som sterile parenterale opløsninger ved injektion eller intravenøst eller per os i form af perorale doser eller ved suppositorier eller transcutant. Doser på fra ca. 0,1 µg til ca. 2,5 µg per dag er i stand til at opnå det fysiologiske calciumbalancerespons, der er karakteristisk for vitamin D-liggende virkning med vedligeholdelsesdosis på fra ca. 0,1 µg til ca. 0,5 µg.

Det har for nylig vist sig, at $1\alpha,25$ -dihydroxy vitamin D_3 ($1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$) og dens strukturelt analoge forbindelse 1α -hydroxy vitamin D_3 (1α -OH- D_3) ud over deres veletablerede calcemiske virkning omtalt ovenfor også udviser kraftig anti-cancer virkning. Specielt har det vist sig, at ovennævnte forbindelser var i stand til at

5 bevirke differentiering af maligne humane celler som leukæmi-celler i kultur til ikke-maligne makrofager, og anti-cancer virkningen på celler in vitro kunne korreleres med helbredende virkninger in vivo ved at vise, at administreringen af disse forbindelser forlængede levetiden hos leukæmiske mus (i forhold til kontroller) og kraftigt forbedrede tilstanden hos leukæmi patienter.

10 Baseret på disse observationer er 1α -hydroxylerede vitamin D forbindelser blevet foreslået som terapeutiske lægemidler ved behandlingen af leukæmoide sygdomme (Suda et al, USA patentskrift nr. 4 391 802).

15

Skønt disse kendte 1α -hydroxy vitamin D forbindelser afprøvet af Suda et al (supra) nemlig 1α -hydroxy vitamin D_3 (1α -OH- D_3) og $1\alpha,25$ -dihydroxy vitamin D_3 ($1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$) faktisk er kraftig virkende med hensyn til at forårsage differentiering af leukæmiske celler, er der en alvorlig ulempe ved deres anvendelse som anti-leukæmiske midler, som følge af den uundgåelig høje calcemiske virkning af disse forbindelser. Således er $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$, den kraftigste vitamin-afledte anti-leukæmiske hidtil kendte forbindelse, også det kraftigste calcemiske middel, og den anti-leukæmiske virkning af 1α -OH- D_3 er på samme måde korreleret med høj calcemisk virkning.

20 Administrering af disse forbindelser i dosis-mængder, hvor de er effektive som anti-leukæmiske lægemidler (f. eks. 1 μ g /dag som angivet i eksemplerne i nævnte Suda et al patentskrift) vil uundgåeligt frembringe forhøjede, potentielt for store, calcium-niveauer med medfølgende alvorlige medicinske komplikationer, specielt hos

25

30

35

patienter, der allerede lider af en yderst alvorlig sygdom. På grund af den høje intrinsiske virkning af de kendte 1α -hydroxy vitamin D forbindelser til at hæve calcium niveauerne, er deres anvendelse som anti-leukæmiske midler udelukket.

En foretrukken metode til behandling af maligne sygdomme ville klart være administreringen af forbindelser, der er karakteriseret ved et højt anti-leukæmisk til calcemisk virkende forhold dvs. forbindelser, der udviser en forøget effektivitet til at udvirke differentiering af leukæmiske celler i forhold til deres evne til at hæve serumcalcium-niveauer.

De omhandlede forbindelser er også i stand til at inducere differentiering af maligne celler til ikke-maligne celler dvs. de udviser antineoplastisk virkning målt ved leukæmicelledifferentiering, og disse forbindelsers antineoplastiske virkning er stærkere end virkningen af $1\alpha,25-(OH)_2D_3$, mens de ikke er mere aktive end $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 med hensyn til deres virkning på calciummetabolismen. På grund af denne enestående og uventede kombination af egenskaber, repræsenterer de omhandlede sidekæde homovitamin D forbindelser foretrukne lægemidler til behandling af leukæmisygdomme og andre neoplastiske sygdomme.

Når de omhandlede sidekæde-homovitamin D forbindelser administreres til humane promyelocytiske leukæmiceller (HL-60 celler) dyrket i kultur frembringer de differentiering af disse celler til makrophager (monocyttter). I adskillige standardforsøg til måling af differentieringsvirkningen viste forbindelserne sig at være mere effektive end $1\alpha,25(OH)_2D_3$, det hidtil mest aktive kendte vitamin D derivat. Forsøg udførtes på følgende måde:

Forsøg over homovitamin D forbindelsernes differen-
tierende virkning

- Den humane promyelocytiske leukæmicellelinie (HL-60)
- 5 blev vedligeholdet i suspensionskultur i RPML 1640 sub-
strat (Gibco, Grand Island, NY) tilsat 10 rumfang/rum-
fang-% varmeinaktiveret føtalt kalveserum 100 mg/ml pe-
nicillin, 100 µg/ml streptomycin og 0,25 µg/ml fungizo-
ne. Cellerne dyrkedes i en befugt atmosfære med 5%
- 10 CO₂. Cellelevedygtigheden blev undersøgt ved standard-
forsøg f. eks. tryphanblå eksklusion. Morphologisk be-
dømmelse blev gjort på Wright-farvede objektglaspræpa-
rater.
- 15 Cellerne blev udsået i $1,5 - 2 \times 10^5$ celler/ml i 10 ml
substrat i vævsdyrkningsskåle. Efter 20 timers forløb
behandledes doublet plader herefter med hver af forsøgs-
forbindelserne i forskellige koncentrationer som angivet
i tabellerne nedenfor. Forsøgsforbindelserne blev tilsat
- 20 som opløsninger i 100% ethanol, således at den totale
ethanolkoncentration i hver dyrkningsskål ikke oversteg
0,2%. Kontrolkulturerne behandledes med samme koncentra-
tion ethanol. Efter 4 dages (96 timers) inkubation med
forsøgsforbindelserne høstede cellerne fra dyrknings-
- 25 skålene og celletal og levedygtighed blev bestemt. Gra-
den af differentiering opnået med de undersøgte vitamin
D derivater blev udtrykt som procent celler, der udviser
funktionale og enzymatiske markører, der er karakteritis-
ke for monocytter. De to anvendte markører var a) cel-
- 30 lernes evne til at phagocytisere død gær og b) cellernes
evne til at frembringe superoxid (reducere nitrotetrazo-
liumblåt), når de stimuleres med phorbolestere.

a) Phagocytoseundersøgelse for differentierende
virkning:

De indhøstede celler opslæmmedes i RPML substrat inde-
5 holdende 20% AB serum og 20% føtalt kalveserum til op-
nåelse af et præparat indeholdende 2×10^6 celler/ml.
Til 0,5 ml (10^6 celler) af ovennævnte celleduspension
sattes herefter 0,5 ml af en suspension (i phosphatpuf-
ret saltvand) af varmeinaktiverede saccharomyces cere-
10 visiae celler (1×10^8 celler), der var farvet med try-
phanblåt. Efter inkubering af denne blanding i 1 time
ved 37°C blev antallet af phagocytiske celler talt (be-
stemt ved tryphanblåfarvet gær, der forekommer intracel-
lulært) og udtrykt som en procent af de totalt tilste-
15 deværende levende celler. Denne "% phagocytiske celler"
angiver differentieringsprocenten induceret af forsøgs-
forbindelserne. Resultaterne er angivet i tabel 2 neden-
for.

20

25

30

35

Tabel 2

Procent phagocytiske (differentierede) celler frembragt i HL-60 cellekulturer behandlet med vitamin D forbindelserne i forskellige koncentrationer.

Administreret forbindelse	0 (a,b)	Koncentration (mol/liter)				
		3×10^{-10}	5×10^{-10}	1×10^{-9} (b)	1×10^{-8} (b)	3×10^{-7}
$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	$10 \pm 1,5$	17	23	28 ± 4	47 ± 1	67 ± 6
homo-forb. I*	$10 \pm 1,5$	28	38	44 ± 5	72 ± 2	76 ± 3
homo-forb. II**	$10 \pm 1,5$	22	42	48 ± 6	70 ± 0	78 ± 4

^aKontrolniveau; cellekulturer blev kun behandlet med opløsningsmidlet ethanol.

^bResultaterne angivet i disse kolonner betegner gennemsnittet $\pm$ SEM af tre forskellige forsøg, der hver blev foretaget 2 gange.

* $1\alpha, 25$ dihydroxy-26-homovitamin D₃

** $1\alpha, 25$ -dihydroxy-22E-dehydro-26-homovitamin D₃

Resultaterne i tabel 2 viser, at homoforbindelserne er signifikant stærkere virkende end $1\alpha,25-(OH)_2 D_3$. Ved alle koncentrationer bevirker homoforbindelserne en større differentieringsgrad af leukæmicellerne end $1\alpha,25-(OH)_2 D_3$, den hidtil mest aktive kendte forbindelse. F. eks. giver en koncentration på 10^{-8} mol af homoforbindelserne en differentiering på 70%, medens $1\alpha,25-(OH)_2 D_3$ i samme koncentration kun giver ca. 47% differentierede celler. For at opnå 50% differentiering kræves en koncentration på 1×10^{-9} M af homoforbindelserne, men ca. 1×10^{-8} M af $1\alpha,25-(OH)_2 D_3$ dvs. en forskel i aktivitet på ca. 10 gange.

b) NBT-reduktionsforsøg for differentiering:

Dette forsøg udnytter evnen hos monocytllignende leukæmiske celler til at reducere nitroblåt tetrazolium (NBT) reagens til et blåsort bundfald (formazan), dersom de stimuleres med phorbolestere. Forsøget blev udført som beskrevet generelt af Yen et al (J. Cellular Physiol. 118, 277 (1984)). Cellerne blev høstet som nævnt ovenfor og herefter opslået i RPMI substrat; til 0,2 ml af denne suspension (indeholdende ca. $1,4 \times 10^6$ celler/ml) sættes 0,2 ml nitroblåt tetrazolium (NBT) reagens. (NBT reagentet blev fremstillet ved at blande en opløsning indeholdende 50 mg nitroblåt tetrazolium i 50 ml fosfatpufret saltvand med 10 μ l af en acetone/vand (1:1) opløsning indeholdende 0,5 mg/ml 4β -phorbol-12-myristat-13-acetat). Efter henstand i vandbad i 30 minutter taltes de differentierede celler (dvs. celler, der udviste formazanblå aflejringer som indikation på NBT reduktion) med et hæmocytometer og blev udtrykt som procent af totale tilstedeværende levende celler. Resultaterne af forsøget er angivet i tabel 3.

Tabel 3

Procent celler i HL-60 cellekulturer, der udviser nitroblåt tetrazolium(NBT) reduktionsevne efter behandling med vitamin D forbindelser i forskellige koncentrationer.

Administret forbindelse	0 (a,b)	Koncentration (mol/liter)				
		3x10 ⁻¹⁰	5x10 ⁻¹⁰	1x10 ⁻⁹ (b)	1x10 ⁻⁸ (b)	1x10 ⁻⁷ (b) 3x10 ⁻⁷
1α,25-(OH) ₂ D ₃	10±1,5	15	27	31±4	45±4	69±7 65
homo-forb. I*	10±1,5	27	41	47±7	72±5	79±2 78
homo-forb. II**	10±1,5	22	44	49±4	70±2	79±5 80

^aKontrolniveau; cellekulturer blev kun behandlet med opløsningsmidlet ethanol.

^bResultaterne repræsenterer gennemsnittet ± SEM af tre adskilte forsøg, idet hvert forsøg blev gentaget 2 gange.

* 1α,25 dihydroxy-26-homovitamin D₃

** 1α,25-dihydroxy-22E-dehydro-26-homovitamin D₃

Resultaterne i tabel 3 viser igen, at de undersøgte homoforbindelser er mere aktive end $1\alpha,25-(OH)_2 D_3$ til at inducere en differentiering af humane myeloide leukæmiceller til normale celler in vitro. For at opnå en 60% differentiering af leukæmiske celler målt ved denne NBT reduktionsmetode kræves en koncentration på 2×10^{-9} M af homoforbindelserne; for at opnå samme grad af differentiering med $1\alpha,25-(OH)_2 D_3$ kræves en koncentration på $3,5 \times 10^{-8}$ M, en 17 fold forskel i aktivitet.

Således bekræfter begge ovennævnte forsøg den kraftige aktivitet af de omhandlede homovitamin D forbindelser til at inducere differentiering af leukæmiske celler. Herudover viser ovennævnte resultater, at med hensyn til denne differentieringsvirkning er homovitamin D forbindelserne betydeligt mere virksomme end $1\alpha,25-(OH)_2 D_3$.

Da differentieringsvirkningen er udtrykt i humane leukæmiske celler (HL-60), er det klart, at de omhandlede homovitamin D forbindelser kan anvendes effektivt mod leukæmi hos mennesker. På samme tid udviser disse forbindelser ikke forøget calcemisk virkning, men er omtrent lige så aktive som $1\alpha,25-(OH)_2 D_3$. Homovitamin D forbindelserne er således karakteriseret ved et højt forhold mellem antineoplastisk og calcemisk virkning. På grund af denne hidtil ukendte og ønskede biologiske egenskab, vil sidekæde homoforbindelserne virke som glimrende terapeutiske midler til behandling af maligne sygdomme.

Til behandling af human leukæmi administreres de omhandlede homovitamin D forbindelser til patienter i doser, der er tilstrækkelige til at inducere differentiering af leukæmiske celler til makrophager. Passende doser er fra 0,2 μ g til ca. 5 μ g pr. dag, idet dosis naturligvis skal justeres afhængigt af sygdommens svær-

hedsgrad eller af patientens respons eller tilstand, hvilket er klart for fagmanden.

Til behandling kan de omhandlede forbindelser fremstilles i dosisformer ved at forene dem med et ikke toxisk farmaceutisk acceptabelt bærerstof, som er velkendt inden for fagområdet. Sådanne bærerstoffer kan være enten 5 faste eller flydende som f. eks. majsstivelse, lactose, saccharose, jordnøddeolie, olivenolie, sesamolie og vand. Dersom et fast bærerstof anvendes kan dosisformer af de omhandlede forbindelser være tabletter, kapsler, 10 pulvere, drageer eller sugetabletter. Dersom et flydende bærerstof anvendes kan dosisform være bløde gelatinekapsler eller sirup- eller væskesuspensioner, emulsioner eller opløsninger. Doseringsformerne kan også indeholde hjælpestoffer som konserveringsmidler, befugtningsmidler 15 eller emulgatorer og opløsningsfremmere. De kan også indeholde andre terapeutisk virksomme forbindelser.

Den administrerede dosis til patienten afhænger naturligvis af det specielle tilfælde, der skal behandles, af 20 det ønskede slutresultat i det specielle tilfælde, af patientens fysiske tilstand og af andre faktorer, der er velkendte for fagmanden.

Forbindelserne kan med fordel administreres ved injektion eller ved intravenøs infusion af passende sterile opløsninger eller i form af perorale doser gennem fordøjelsessystemet. 25

30

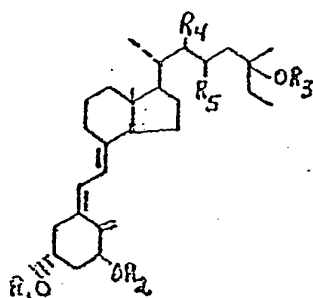
35

P a t e n t k r a v:

1. D-vitaminderivater k e n d e t e g n e t ved, at de har den almene formel

5

10



hvor R_1 , R_2 og R_3 er valgt blandt hydrogen, en acylgruppe med fra 1 til 4 carbonatomer og benzoyl, og R_4 og R_5 hver især betegner hydrogenatomer eller sammen danner en carbon-carbonbinding.

15

2. Derivat ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at R_1 , R_2 og R_3 betegner hydrogen, og R_4 og R_5 betegner hydrogenatomer.

20

3. Derivat ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at det er i krystallinsk form.

25

4. Farmaceutisk præparat, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder derivatet ifølge krav 2 og et farmaceutisk acceptabelt hjælpestof.

5. Derivat ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at R_1 , R_2 og R_3 betegner hydrogen, og R_4 og R_5 sammen betegner en carbon-carbonbinding.

30

6. Derivat ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at det er i krystallinsk form.

35

7. Farmaceutisk præparat, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder derivatet ifølge krav 5 og et farmaceutisk acceptabelt hjælpestof.

8. Derivat ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at Δ^{22} bindingen er i E-konfigurationen.

5

9. Anvendelse af D-vitamin derivater ifølge krav 1 til fremstilling af et farmaceutisk præparat til behandling af neoplastiske sygdomme.

10 10. Anvendelse af D-vitamin derivater ifølge krav 1 til fremstilling af et farmaceutisk præparat til induktion af differentiering i maligne celler.

15

20

25

30

35