

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/59 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 02812881.8

[45] 授权公告日 2006 年 1 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1234366C

[22] 申请日 2002.6.26 [21] 申请号 02812881.8

[30] 优先权

[32] 2001.6.26 [33] US [31] 09/891,814

[86] 国际申请 PCT/US2002/020475 2002.6.26

[87] 国际公布 WO2003/000023 英 2003.1.3

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.26

[71] 专利权人 骨疗国际公司

地址 美国威斯康星

[72] 发明人 查尔斯·W·毕晓普

理查德·B·梅兹斯

审查员 黄 强

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 7 页 说明书 24 页

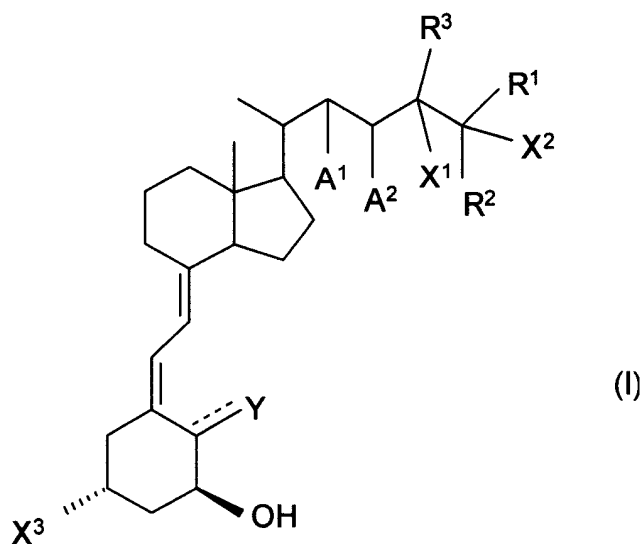
[54] 发明名称

活性维生素 D 类似物在制备用于治疗过度增殖性疾病的药物中的应用

[57] 摘要

本发明涉及使用活性维生素 D 类似物治疗恶性或肿瘤细胞的过度增殖作用但不产生血钙过多的方法。

1、C24 位具有烃基团的低钙血性羟基维生素 D 化合物在制备用于抑制患者中表达维生素 D 受体的恶性或肿瘤细胞过度增殖的药物中的应用，该药物用于治疗乳腺癌、结肠癌、肺癌、颈和头部的癌症、胰腺癌、子宫内膜癌、膀胱癌、子宫颈癌、睾丸癌、卵巢癌、鳞状细胞癌、髓性和淋巴细胞性白血病、淋巴瘤、髓性甲状腺癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤、成视网膜细胞瘤、或者软组织和骨的肉瘤，其中所述低钙血性维生素 D 是以下通式 (I) 的化合物：



其中：A¹ 和 A² 分别是氢或在 C-22 和 C-23 之间形成双键的碳-碳键；R¹ 和 R² 可相同或不同并且是氢、羟基、低级烷基、低级氟代烷基、O-低级烷基、低级烯基、低级氟代烯基、O-低级烯基、O-低级酰基、O-芳香酰基、低级环烷基，其条件是 R¹ 和 R² 不能都是烯基，或者与它们所连接的碳一起形成 C₃-C₈ 环碳环；R³ 是低级烷基、低级烯基、低级氟代烷基、低级氟代烯基、O-低级烷基、O-低级烯基、O-低级酰基、O-芳香酰基或低级环烷基；X¹ 是氢或羟基，或者当 R³ 是烯基时，与

R^3 一起构成一个键； X^2 是氢或羟基，或者与 R^1 或 R^2 构成双键； X^3 是氢或羟基，其条件是 X^1 、 X^2 或 X^3 中至少一个是羟基；而且如果与 Y 连接的键是双键，则 Y 是亚甲基，或者如果与 Y 连接的键是单键，则是甲基或氢。

2、如权利要求 1 所述的应用，其中 X^3 是羟基。

3、如权利要求 1 所述的应用，其中 X^3 是羟基，与 Y 连接的键是双键且 Y 是亚甲基。

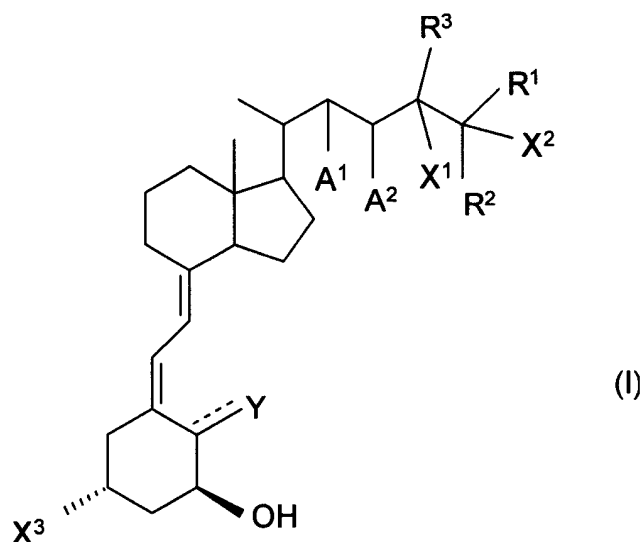
4、如权利要求 1 所述的应用，其中所述低钙血性维生素 D 化合物的量为 10—100 μg 。

5、如权利要求 1 所述的应用，其中所述低钙血性维生素 D 化合物与选自 5-氟尿嘧啶、氨甲蝶呤、氟达拉滨、长春新碱、长春碱、紫杉醇、多西他塞、环磷酰胺、美法仑、二氯乙基硝基脲、羟基脲、顺铂、卡铂、奥沙利铂、JM-216、CI-973、多柔比星、柔红霉素、丝裂霉素、伊达比星、阿霉素、道诺霉素、依托泊苷、喜树碱、磷酸雌莫司汀和泼尼莫司汀的细胞毒性剂共同给药。

6、如权利要求 1 所述的应用，其中所述化合物是 1α ，24-二羟基维生素 D_2 、 1α ，24-二羟基维生素 D_4 、 1α ，25-二羟基维生素 D_4 、 1α ，25-二羟基维生素 D_2 、 1α -羟基维生素 D_2 或 1α -羟基维生素 D_4 。

7、低钙血性羟基维生素 D 化合物在制备药物中的应用，其中所述药物用于向人给药以缓解乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、睾丸癌、胰腺癌、

子宫内膜癌、肺部的小细胞及包括鳞状、腺癌和大细胞类型的非小细胞癌、头和颈部的鳞状细胞、膀胱、卵巢和子宫颈癌、髓性和淋巴细胞性白血病、淋巴瘤、肝肿瘤、髓性甲状腺癌、多发性骨髓瘤、黑素瘤、成视网膜细胞瘤、或者软组织和骨的肉瘤之病理作用，其中所述低钙血性维生素 D 是以下通式 (I) 的化合物：



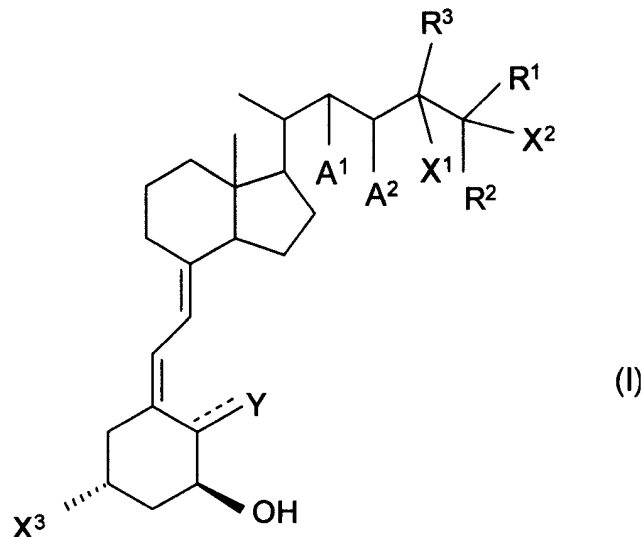
其中： A^1 和 A^2 分别是氢或在C-22和C-23之间形成双键的碳-碳键； R^1 和 R^2 可相同或不同并且是氢、羟基、低级烷基、低级氟代烷基、O-低级烷基、低级烯基、低级氟代烯基、O-低级烯基、O-低级酰基、O-芳香酰基、低级环烷基，其条件是 R^1 和 R^2 不能都是烯基，或者与它们所连接的碳一起形成 C_3-C_8 环碳环； R^3 是低级烷基、低级烯基、低级氟代烷基、低级氟代烯基、O-低级烷基、O-低级烯基、O-低级酰基、O-芳香酰基或低级环烷基； X^1 是氢或羟基，或者当 R^3 是烯基时，与 R^3 一起构成一个键； X^2 是氢或羟基，或者与 R^1 或 R^2 构成双键； X^3 是氢或羟基，其条件是 X^1 、 X^2 或 X^3 中至少一个是羟基；而且如果与Y连接的键是双键，则Y是亚甲基，或者如果与Y连接的键是单键，则是甲基或氢。

8、如权利要求 7 所述的应用，其中 X^3 是羟基，与 Y 连接的键是双键且 Y 是亚甲基。

9、如权利要求 8 所述的应用，其中所述药物的量是 $0.01-2.0 \mu g/kg$ 。

10、如权利要求 8 所述的应用，其中所述化合物是 1α ，24-二羟基维生素 D_2 、 1α ，24-二羟基维生素 D_4 、 1α ，25-二羟基维生素 D_4 、 1α ，25-二羟基维生素 D_2 、 1α -羟基维生素 D_2 或 1α -羟基维生素 D_4 。

11、低钙血性维生素 D 化合物在制备药物中的应用，其中所述药物用于与细胞毒性剂共同向罹患需要细胞毒性剂治疗的疾病的患者给药，其中所述低钙血性维生素 D 是以下通式 (I) 的化合物：



其中： A^1 和 A^2 分别是氢或在 C-22 和 C-23 之间形成双键的碳-碳键； R^1 和 R^2 可相同或不同并且是氢、羟基、低级烷基、低级氟代烷基、O-低级烷基、低级烯基、低级氟代烯基、O-低级烯基、O-低级酰基、O-芳香酰基、低级环烷基，其条件是 R^1 和 R^2 不能都是烯基，或者与它

们所连接的碳一起形成 C_3-C_8 环碳环； R^3 是低级烷基、低级烯基、低级氟代烷基、低级氟代烯基、O—低级烷基、O—低级烯基、O—低级酰基、O—芳香酰基或低级环烷基； X^1 是氢或羟基，或者当 R^3 是烯基时，与 R^3 一起构成一个键； X^2 是氢或羟基，或者与 R^1 或 R^2 构成双键； X^3 是氢或羟基，其条件是 X^1 、 X^2 或 X^3 中至少一个是羟基；而且如果与 Y 连接的键是双键，则 Y 是亚甲基，或者如果与 Y 连接的键是单键，则是甲基或氢；以及

所述细胞毒性剂选自 5-氟尿嘧啶、氨甲蝶呤、氟达拉滨、长春新碱、长春碱、紫杉醇、多西他塞、环磷酰胺、美法仑、二氯乙基硝基脲、羟基脲、顺铂、卡铂、奥沙利铂、JM-216、CI-973、多柔比星、柔红霉素、丝裂霉素、伊达比星、阿霉素、道诺霉素、依托泊苷、喜树碱、磷酸雌莫司汀和泼尼莫司汀。

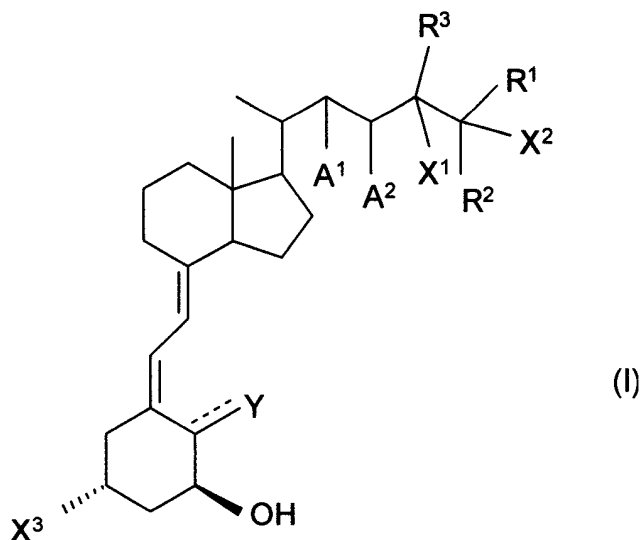
12、如权利要求 11 所述的应用，其中 X^3 是羟基，与 Y 连接的键是双键且 Y 是亚甲基。

13、如权利要求 12 所述的应用，其中所述维生素 D 化合物的量是 $0.01-2.0 \mu g/kg$ 。

14、如权利要求 12 所述的应用，其中所述化合物是 $1\alpha, 24$ -二羟基维生素 D_2 、 $1\alpha, 24$ -二羟基维生素 D_4 、 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_4 、 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_2 、 1α -羟基维生素 D_2 和 1α -羟基维生素 D_4 。

15、低钙血性维生素 D 化合物在制备用于诱导恶性或肿瘤细胞中的分化作用的药物中的应用，其中所述低钙血性维生素 D 是以下通式 (I)

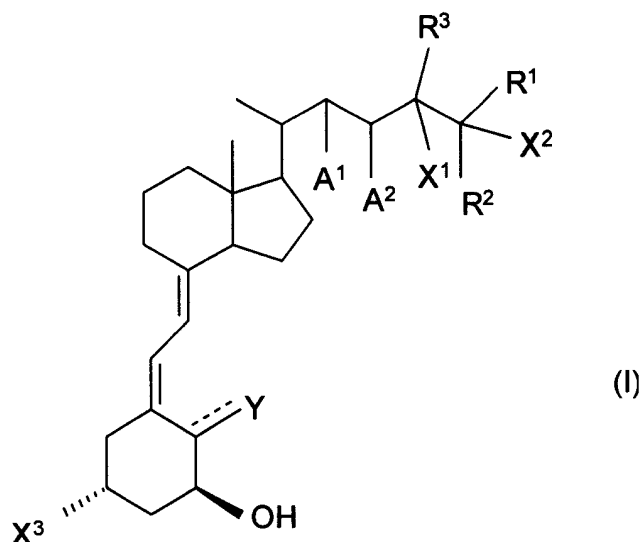
的化合物:



其中: A^1 和 A^2 分别是氢或在 C-22 和 C-23 之间形成双键的碳-碳键;
 R^1 和 R^2 可相同或不同并且是氢、羟基、低级烷基、低级氟代烷基、O-
 低级烷基、低级烯基、低级氟代烯基、O-低级烯基、O-低级酰基、O-
 芳香酰基、低级环烷基, 其条件是 R^1 和 R^2 不能都是烯基, 或者与它
 们所连接的碳一起形成 C_3-C_8 环碳环; R^3 是低级烷基、低级烯基、低级
 氟代烷基、低级氟代烯基、O-低级烷基、O-低级烯基、O-低级酰基、
 O-芳香酰基或低级环烷基; X^1 是氢或羟基, 或者当 R^3 是烯基时, 与
 R^3 一起构成一个键; X^2 是氢或羟基, 或者与 R^1 或 R^2 构成双键; X^3 是氢
 或羟基, 其条件是 X^1 、 X^2 或 X^3 中至少一个是羟基; 而且如果与 Y 连接
 的键是双键, 则 Y 是亚甲基, 或者如果与 Y 连接的键是单键, 则是甲基
 或氢。

16、低钙血性维生素 D 化合物在制备用于治疗患者表达维生素 D 受
 体的肿瘤或赘生物的药物中的应用, 其中所述药物用于向患者给药足够
 量的低钙血性维生素 D 化合物以在足够长的期间内提高血液维生素 D 的
 水平至足以抑制肿瘤或赘生物生长而不导致患者血钙过高的超生理水

平，其中所述低钙血性维生素 D 是以下通式 (I) 的化合物：



其中：A¹ 和 A² 分别是氢或在 C-22 和 C-23 之间形成双键的碳-碳键；R¹ 和 R² 可相同或不同并且是氢、羟基、低级烷基、低级氟代烷基、O-低级烷基、低级烯基、低级氟代烯基、O-低级烯基、O-低级酰基、O-芳香酰基、低级环烷基，其条件是 R¹ 和 R² 不能都是烯基，或者与它们所连接的碳一起形成 C₃-C₈ 环碳环；R³ 是低级烷基、低级烯基、低级氟代烷基、低级氟代烯基、O-低级烷基、O-低级烯基、O-低级酰基、O-芳香酰基或低级环烷基；X¹ 是氢或羟基，或者当 R³ 是烯基时，与 R³ 一起构成一个键；X² 是氢或羟基，或者与 R¹ 或 R² 构成双键；X³ 是氢或羟基，其条件是 X¹、X² 或 X³ 中至少一个是羟基；而且如果与 Y 连接的键是双键，则 Y 是亚甲基，或者如果与 Y 连接的键是单键，则是甲基或氢。

活性维生素 D 类似物在制备用于治疗 过度增殖性疾病的药物中的应用

相关申请的交叉参考

本申请是于 1998 年 2 月 23 日递交的第 09/596,149 号美国专利申请的部分继续,后者则是于 1996 年 12 月 30 日递交的第 08/781,910 号美国专利申请的分案,该美国专利申请现已是第 5,763,429 号美国专利。这些文献的内容在此并入作为参考。

有关联邦政府资助的研究或开发的声明

不适用

技术领域

本发明概括地涉及一种用于治疗过度增殖性疾病的方法,更具体地是涉及使用低钙血性维生素 D 的活性形式抑制所述疾病的过度增殖性细胞活性以及促进细胞的分化。

背景技术

在过去二十年间进行的深入研究已经确认了维生素 D 除其在骨和矿物质代谢中的传统作用外的重要生物作用。 $1\alpha, 25\text{-二羟基维生素 D}_3$ (维生素 D 的激素活性形式) 的特异性核受体, 存在于并不参与钙体内平衡的各种器官的细胞中。例如, 在人前列腺癌细胞系——LNCaP 中已证实了特异性的、生物活性的维生素 D 受体 (Miller 等人, 52 Cancer Res. (1992) 515-520); 在许多其他肿瘤如乳腺癌和结肠癌的细胞中也存在维生素 D 受体。

已有报道称，某些维生素 D 化合物及类似物是恶性细胞增殖的强效抑制剂，而且是细胞分化的诱导剂/刺激剂。例如，Suda 等人的美国专利 4,391,802 公开了 1α -羟基维生素 D 化合物，特别是 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_3 以及 1α -羟基维生素 D_3 ，由于可以诱发恶性细胞（特别是白血病细胞）分化为非恶性的巨噬细胞（单细胞），具有强效的抗白血病活性，而且可用于治疗白血病。 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_3 以及其他维生素 D_3 类似物的抗增殖及分化作用已在癌细胞系中予以报道。最近，已报道了在维生素 D 受体基因多形性与癌症风险之间的关系，提示出维生素 D 受体有可能在癌症的发展以及癌症的治疗中扮演重要的角色。

这些以前的研究仅集中于维生素 D_3 化合物。虽然这些化合物在培养基中有可能的确能够非常有效地促进恶性细胞的分化，但是由于它们同样是非常有效的影响钙代谢的药物，这些化合物作为抗癌剂在分化治疗中的实际应用受到严重的限制。在例如有效作为抗白血病药物所需要的体内浓度下，这些相同的化合物由于固有的钙血症活性可诱发血钙浓度显著升高，并达到潜在危险的水平。也就是说，由于血钙过多的风险，阻止了 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_3 以及其他维生素 D_3 类似物作为抗癌剂在临床上的使用，或者该应用受到了严重的限制。这表明仍需要具有更高特异性活性以及选择性的化合物，即、具有抗增殖作用和分化作用但是血钙症活性低的维生素 D 化合物。

发明内容

本发明提供一种用于治疗过度增殖性疾病的方法，例如那些以过度增殖性细胞生长和/或异常细胞分化为特征的病症。该方法包括使用活性维生素 D 化合物抑制异常细胞生长并促进细胞分化。

本发明的上述以及其他优点是在其一个方面中实现的，在该方面中提供一种用于抑制肿瘤或增生细胞的过度增殖活性的方法，其包括用有

效量的低钙血性维生素 D 化合物治疗所述细胞。治疗步骤包括抑制此等细胞中的增殖作用以及诱导并增强该细胞中的分化作用。

本发明的低钙血性维生素 D 化合物包括在分子的侧链上于 C-24 位处具有取代的羟基以及在 C₁、C₂₄ 或 C₂₅ 中的至少一个位置处具有羟基取代基的维生素 D 化合物。

根据本发明的维生素 D 化合物是活性维生素 D，而且可以用以下式 (I) 表示。合适的式 (I) 化合物是 1 α ，24-二羟基维生素 D₂、1 α ，24-二羟基维生素 D₄、1 α ，25-二羟基维生素 D₄、1 α ，25-二羟基维生素 D₂、1 α -羟基维生素 D₂ 和 1 α -羟基维生素 D₄。

低钙血性维生素 D 化合物适用于治疗乳腺和结肠癌以及其他肿瘤如胰腺癌、子宫内膜癌、肺部的小细胞及非小细胞癌（包括鳞状、腺癌和大细胞类型）、脑和颈部的鳞状细胞、膀胱、卵巢和子宫颈癌、髓性和淋巴细胞性白血病、淋巴瘤、肝肿瘤、髓性甲状腺癌、多发性骨髓瘤、黑素瘤、成视网膜细胞瘤、以及软组织和骨的肉瘤。

根据本发明，当向罹患癌症或者肿瘤的患者给药有效量的低钙血性维生素 D 化合物时，抑制、降低、或者稳定了异常肿瘤细胞的增殖活性，并且诱发、促进或者增强细胞分化作用，同时可观察到显著降低的血钙过多及尿钙过多，其作用明显高于按照已知制剂给药的相同量的活化维生素 D₃（如 1 α -OH D₃、1 α ，25-(OH)₂ D₃）。因此，根据本发明的化合物相对于活性形式的维生素 D₃ 类似物具有更高的治疗指数。

因此，本发明的另一个方面是治疗人癌症的方法，其包括向罹患癌症的患者给药有效量的低钙血性维生素 D 化合物，该化合物通过体内代谢具有或者可以达到基本上与 1 α ，25-二羟基维生素 D₃ 相同的维生素 D 受体（VDR）结合亲和性，而且其血钙过多的风险大大低于 1 α ，25-二羟基维生素 D₃，以抑制、降低或者稳定癌症中的细胞异常增殖活性。

为根据本发明治疗恶性病症，所述低钙血性维生素 D 适合于在药物

组合物中单独作为活性成分进行给药，或者与其他抗癌剂共同给药。

另外，在本发明的范围内还包括给药式(I)的维生素D化合物以及细胞毒性或抗癌剂。该细胞毒性或抗癌剂适当地包括抗代谢药（如5-氟尿嘧啶、氨甲蝶呤、氟达拉滨）、抗微管剂（antimicrotubule agent）（例如长春新碱、长春碱、紫杉烷类药物如紫杉醇、多西他赛）、烷基化剂（如环磷酰胺、美法仑、二氯乙基硝基脲、羟基脲）、铂药物（如顺铂、卡铂、奥沙利铂、JM-216、CI-973）、蒽环霉素（多柔比星、柔红霉素）、antibiotics（例如丝裂霉素、伊达比星、多柔比星、柔红霉素）、拓扑异构酶抑制剂（例如依托泊苷、喜树碱）或者任何其他抗肿瘤剂（磷酸雌莫司汀、泼尼莫司汀）。

复合使用低钙血性维生素D化合物和各种抗癌药物，可期望对癌细胞产生显著增强的细胞毒性作用，并由此增加治疗效果。具体而言，与单独使用各抗癌药物的治疗相比，使用更低浓度的抗癌药物的上述组合即可明显增加生长抑制作用，而且与单独或大剂量地使用抗癌药物相比，可显著降低与这些抗癌药物有关的副作用。这些共同给药的抗癌剂的可能剂量范围是0.1—20 mg/kg/天。

共同给药有效剂量的式(I)类似物以及其它已知可缓解骨疾病的激素或药物如雌激素，也包括在本发明的范围内。例如，前列腺癌经常转移至骨上，导致骨丢失和相关的疼痛。此等骨治疗剂可包括结合雌激素或其等价物、降钙素、二磷酸酯、钙添加剂、钴胺素、百日咳毒素和硼。

在另一个方面中，本发明提供药物组合物，其包括是活性维生素D化合物的抗癌剂；选自于以下组中的药剂：(i) 抗癌剂、(ii) 骨治疗剂、和它们的组合；以及生理上可接受的载体。

在阅读以下优选实施方案的详细描述后可更容易理解本发明方法、组合物以及物理性质的其他优点和改进。

附图说明

没有

具体实施方式

本发明提供治疗肿瘤和过度增殖性疾病的有效方法。具体而言，本发明涉及用于抑制、降低或稳定患病细胞的过度增殖性细胞活性、以及诱导、增强或者促进患病细胞中的细胞分化的方法。本发明用低钙血性羟基维生素 D 类似物为罹患过度增殖性疾病如前列腺癌或前列腺增生的患者提供了一种新的治疗方法。该维生素 D 类似物合适地是 1α -羟基维生素 D 或 24 -羟基维生素 D 化合物。用以下式 (I) 表示的低钙血性羟基维生素 D 类似物在给药于患者时，其不会产生剂量限制性的血钙过多和尿钙过多，即、分别是非生理性地高而且损害性的血钙浓度和尿钙浓度。这些特性是通过所述低钙血性维生素 D 化合物的特异性化学性质实现的。

根据本发明，当向罹患癌症或增生的患者给药有效量的低钙血性活性维生素 D 化合物时，抑制、缓解或者稳定了异常细胞的增殖活性，而且诱导、促进或者增强了细胞分化，其中血钙过多或尿钙过多都显著低于按照已知制剂给药相同量的活化维生素 D_3 时所观察到的。因此，本发明的低钙血性维生素 D 化合物相对于活性形式的维生素 D_3 类似物具有更高的治疗指数。

已知的是，在活化前，即、产生生物应答前，维生素 D_3 必须在 C-1 和 C-25 位被羟基化。活化其它形式的维生素 D，如维生素 D_2 和维生素 D_4 ，也似乎需要类似的代谢过程。因此，在此所用术语“活化维生素 D”或“活性维生素 D”是指已至少在分子的 C-1、C-24 或 C-25 位被羟基化而且该化合物本身或者作为前体药物（如 1α -羟基维生素 D_2 ）时其代谢物结合维生素 D 受体（VDR）的维生素 D 化合物或类似物。仅

在 C-1 位被羟基化的维生素 D 化合物在此称为“前体药物”。此等化合物在体内经历进一步的羟基化，而且它们的代谢物结合 VDR。

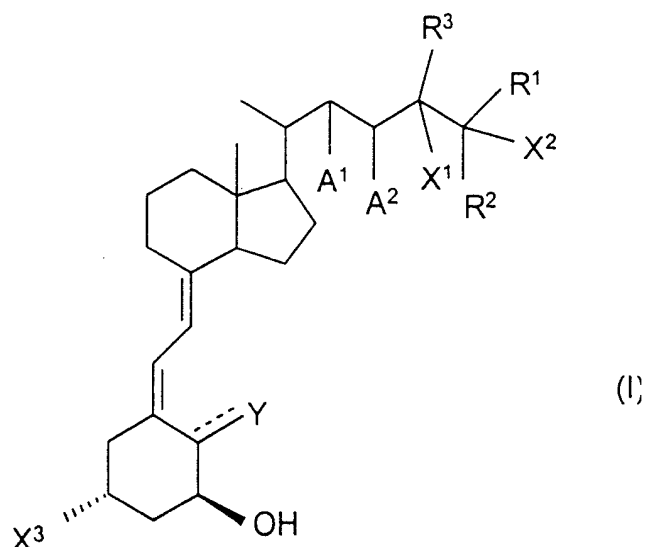
术语“低钙血性维生素 D 化合物”是指具有低钙血活性的活性维生素 D 类似物，即、与 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_3 相比具有低的血钙活性，其包括 24 -羟基维生素 D 化合物、 25 -羟基维生素化合物和 1α -羟基维生素化合物。这些化合物的血钙活性为 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_3 的 0.001 – 0.5 倍。

同样，对于烷基、烯基、酰基或环烷基而言，在此所用术语“低级”是指具有 1 – 4 个碳原子的直链或支链、饱和或不饱和的烃基。此等烃基的具体例子是：甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、乙烯基、丙烯基、丁烯基、异丁烯基、异丙烯基、甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基或环丙基。术语“芳香酰基”是指未被取代或经取代的苯甲酰基。

在此所用术语“烃基团”是指低级烷基、低级烯基、低级酰基或低级环烷基，即、直链或支链、饱和或不饱和的 C_1 – C_4 烃基。

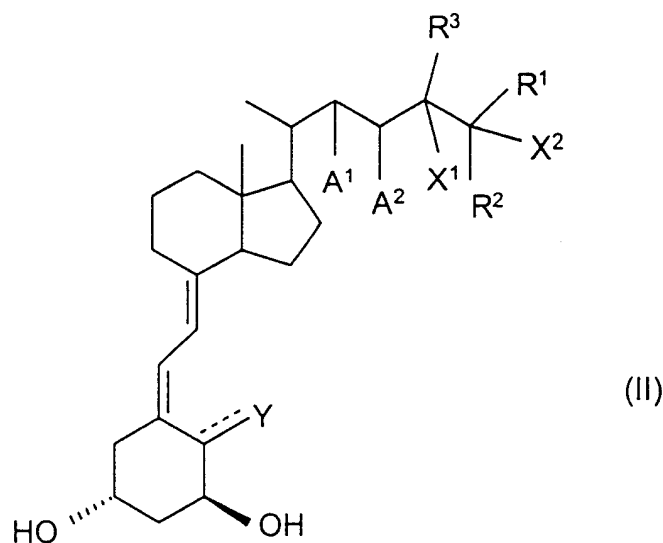
根据本发明的化合物是低钙血性的活性维生素 D 化合物。另外，根据本发明的活性维生素 D 可具有不饱和的侧链，即、在 C-22 和 C-23、C-25 和 C-26 或者 C-26 和 C-27 之间适当地具有双键。

本发明的低钙血性羟基维生素 D 优选具有以下通式 (I)：



其中： A^1 和 A^2 分别是氢或在 C-22 和 C-23 之间形成双键的碳-碳键； R^1 和 R^2 可相同或不同并且是氢、羟基、低级烷基、低级氟代烷基、O-低级烷基、低级烯基、低级氟代烯基、O-低级烯基、O-低级酰基、O-芳香酰基、低级环烷基，其条件是 R^1 和 R^2 不能都是烯基，或者与它们所连接的碳一起形成 C_3-C_8 环碳环； R^3 是低级烷基、低级烯基、低级氟代烷基、低级氟代烯基、O-低级烷基、O-低级烯基、O-低级酰基、O-芳香酰基或低级环烷基； X^1 是氢或羟基； X^2 是氢或羟基，或者与 R^1 或 R^2 构成双键； X^3 是氢或羟基，其条件是 X^1 、 X^2 或 X^3 中至少一个是羟基；而且如果与 Y 连接的键是双键，则 Y 是亚甲基，或者如果与 Y 连接的键是单键，则是甲基或氢。

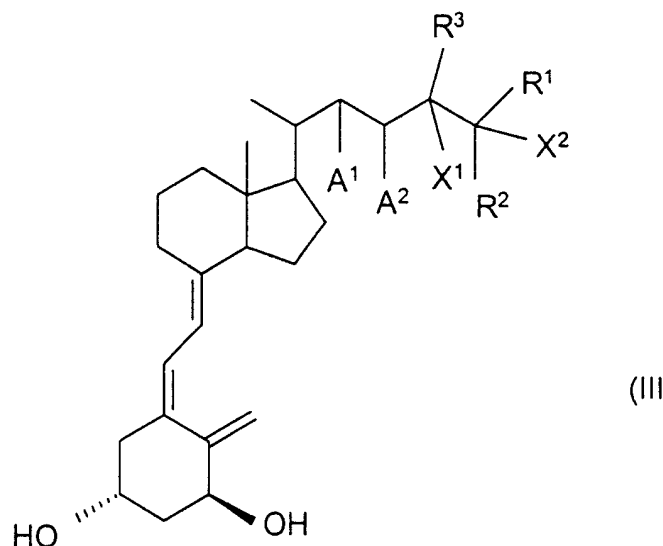
式 (I) 的 1 α -羟基维生素 D 化合物可用通式 (II) 表示：



其中： A^1 和 A^2 分别是氢或在 C-22 和 C-23 之间形成双键的碳-碳键； R^1 和 R^2 可相同或不同并且是氢、羟基、低级烷基、低级氟代烷基、O-低级烷基、低级烯基、低级氟代烯基、O-低级烯基、O-低级酰基、O-芳香酰基、低级环烷基，其条件是 R^1 和 R^2 不能都是烯基，或者与它们所连接的碳一起形成 C_3-C_8 环碳环； R^3 是低级烷基、低级烯基、低级氟代烷基、低级氟代烯基、O-低级烷基、O-低级烯基、O-低级酰基、

O—芳香酰基或低级环烷基； X^1 是氢或羟基； X^2 是氢或羟基，或者与 R^1 或 R^2 构成双键；而且如果与 Y 连接的键是双键，则 Y 是亚甲基，或者如果与 Y 连接的键是单键，则是甲基或氢。

具体而言，根据本发明的 1α —羟基维生素 D 化合物可用以下通式 (III) 表示：



其中： A^1 和 A^2 分别是氢或在 C—22 和 C—23 之间形成双键的碳—碳键； R^1 和 R^2 可相同或不同并且是氢、羟基、低级烷基、低级氟代烷基、O—低级烷基、低级烯基、低级氟代烯基、O—低级烯基、O—低级酰基、O—芳香酰基、低级环烷基，其条件是 R^1 和 R^2 不能都是烯基，或者与它们所连接的碳一起形成 C_3 — C_8 环碳环； R^3 是低级烷基、低级烯基、低级氟代烷基、低级氟代烯基、O—低级烷基、O—低级烯基、O—低级酰基、O—芳香酰基或低级环烷基； X^1 是氢或羟基；而 X^2 是氢或羟基，或者与 R^1 或 R^2 构成双键。

本发明的低钙血性羟基维生素 D 化合物是那些具有有效的抗增殖活性和细胞分化活性（即、反转恶性转化），但产生血钙过多和/或尿钙过多之副作用的能力低或者无此能力者，即、与 $1\alpha, 25$ —二羟基维生素 D_3 相比具有更低血钙症活性的低钙血性化合物。换言之，本发明的化合物在与恶性或其它过度增殖细胞接触时可起到抗增殖剂和细胞分化剂的

作用，但不明显改变钙代谢。该作用的选择性和特异性可使低钙血性维生素 D 化合物优选用作抗血钙过多的药剂，以及用于安全地抑制过度增殖作用并促进恶性或增殖细胞的分化。因此，本发明的化合物克服了上述已知活性维生素 D₃ 化合物的缺陷，并可作为用于控制和治疗恶性疾病的优选药剂，所述疾病例如是乳腺、前列腺、睾丸和结肠癌以及其他肿瘤如胰腺癌、子宫内膜癌、肺部的小细胞及非小细胞癌（包括鳞状、腺癌和大细胞类型）、脑和颈部的鳞状细胞、膀胱、卵巢和子宫颈癌、髓性和淋巴细胞性白血病、淋巴瘤、肝肿瘤、髓性甲状腺癌、多发性骨髓瘤、黑素瘤、成视网膜细胞瘤、以及软组织和骨的肉瘤，即表达维生素 D 受体的肿瘤。

因此，本发明提供用有效量的低钙血性维生素 D 化合物治疗恶性细胞以及其他过度增殖性细胞（例如抑制它们的过度增殖活性和/或诱发并增强它们的分化作用）的方法。所述有效剂量为约 0.01—2.0 μ g/kg 患者体重/天。根据本发明的化合物可每日或者阶段性地给药，例如每 2—6 天给药 1 次或者 1 周给药 1 次。每天的给药剂量可以作为单个剂量或者分为 2—4 个亚剂量给药，所述亚剂量可例如每 1 小时给药 1 次直至给完所有的剂量。根据本发明的化合物可按照将血清维生素 D 的浓度升高至超生理水平的量给药足够长的时间，以诱发肿瘤或赘生物的分化或退化，但不导致血钙过多。本发明化合物的低钙血性性质允许此等超生理水平。

式 (I) 的化合物对于治疗患者中的癌症和肿瘤是有价值的。具体而言，本发明提供用于治疗罹患癌症和其他肿瘤之过度增殖性细胞作用的患者的方法，其包括向所述患者给药治疗有效量的式 (I) 化合物，该化合物适当地是：1 α ，24-二羟基维生素 D₂、1 α ，24-二羟基维生素 D₄、1 α ，25-二羟基维生素 D₂、1 α ，25-二羟基维生素 D₄、1 α -羟基维生素 D₂、和 1 α -羟基维生素 D₄。应理解的是，在那些侧链（如 C—24）中具有手性中心的式 (I) 化合物中，差向异构体（如 S 和 R）和

外消旋化合物也在本发明的范围内。

式(I)化合物可根据 Knutson 等人的第 5,448,120 号、DeLuca 等人的第 4,670,190 和 4,554,106 号美国专利、DeLuca 等人的第 5,486,66 号美国专利、以及 Strugnelli 等人 (310 Biochem. J. (1995), 第 233—241 页) 的方法来制备。上述文献的内容在此并入作为参考。

已研究了式(I)化合物的生物效用,并与 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_3 的生物效用进行了比较,后者为维生素 D 的活性激素形式,并且是所用维生素 D 化合物和类似物的测量标准。例如,现已发现,式(I)化合物或其活性代谢物的维生素 D 受体(VDR)结合亲和性基本上等于(即、等于或弱 3 倍) $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_3 的亲和性。此等受体结合亲和性是有效生物活性的指示。

同时,已发现式(I)化合物的毒性明显低于它们相应的维生素 D_3 类似物。例如,在第 08/265,438 号共同未决的母案申请(该文献的内容在此并入作为参考)中, 1α -羟基维生素 D_4 的 LD_{50} 在男性中是 1.0 mg/kg,在女性中为 3.0 mg/kg,也就是说大大低于 1α -羟基维生素 D_3 的毒性(LD_{50} 约为 0.2 mg/kg)。另外,在第 5,403,831 号母案美国专利、及其第 5,104,864 号母案的母案美国专利(这两个文献的内容在此并入作为参考)中,已表明 1α -羟基维生素 D_2 的生物效用与 1α -羟基维生素 D_3 和 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_3 的相同,但毒性却更低。即使对患有绝经后骨质疏松症的妇女给药至 $10\mu\text{g}/\text{天}$ 的 1α -羟基维生素 D_2 ,也仅诱发中等程度的尿钙过多(尿 $\text{Ca} > 300\text{ mg}/24\text{ 小时}$),而且仅由于 1α -羟基维生素 D_2 也不会产生明显的血钙过多(血清 $\text{Ca} > 11.0\text{ mg/dl}$)。另外,根据肌酐清除和 BUN 测定,该化合物对肾功能没有副作用;也没有增加羟基脯氨酸的尿排泄,这表明对骨重吸收没有产生任何刺激作用。以最大至 $8\mu\text{g}/\text{天}$ 的剂量向成年男性给药 1α -羟基维生素 D_2 没有表现出明显的临床血钙过多症或其它副作用。

式(I)的化合物可在药物组合物中作为活性成分使用,降低副作用的产生,而且与维生素D₃已知的活性形式类似物相比,毒性更低。

本发明的药理活性化合物可根据药学常规方法进行处理,以制成用于给药于患者如包括人的哺乳动物的药剂。例如,低钙血性维生素D化合物可以与常规赋形剂的混合物形式使用,所述赋形剂例如是适用于肠道(如口服)或非胃肠道给药而且不损坏性地与活性化合物反应的药物学上可接受的载体物质。

合适的药物学上可接受的载体包括但不限于:水、盐溶液、醇、阿拉伯胶、植物油(如杏仁油、玉米油、棉籽油、花生油、橄榄油、椰子油)、矿物油、鱼肝油、油酯如 Polysorbate 80、聚乙二醇、明胶、碳水化合物(如乳糖、直链淀粉或淀粉)、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、脂肪酸单甘油酯和二甘油酯、季戊四醇脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、等等。

药物制剂可以是无菌的,而且如果需要的话,可与辅助试剂混合,所述辅助试剂例如是润滑剂、防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、调节渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或一种或多种其它活性成分,例如维生素D₃及其1 α -羟基化代谢物、结合雌激素或其等价物、抗雌激素、降钙素、二磷酸酯、钙添加剂、钴胺素、百日咳毒素和硼。

对于非胃肠道给药,无菌注射液是特别合适的,优选为油性或含水溶液、以及混悬液、乳液、或者植入剂包括栓剂。非胃肠道给药适当地包括皮下、肌肉或静脉注射、鼻咽或粘膜吸收、或者透皮吸收。如上所述,式(I)的化合物可直接注射入肿瘤如甲状旁腺腺癌中,或者通过区域转运例如动脉内转运或者通过门静脉转运进行给药。区域转运对于治疗肝癌是特别合适的。安瓿是常规的单元剂量。

对于肠内给药,特别合适的是片剂、糖衣片剂、液体、滴剂、锭剂、粉末或胶囊剂。如果需要甜味载体,糖浆、甘香酒剂等也可使用。

对于局部给药, 可使用合适的非喷雾性粘稠、半固体或者固体剂型, 其包括适合于局部给药的载体并且具有优选大于水的动态粘度, 例如矿物油、杏仁油、自乳化蜂蜡、植物油、白色软石蜡、以及丙二醇。合适的剂型包括但不限于乳膏剂、软膏剂、洗剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、粉末剂、擦剂、药膏、气雾剂、透皮药贴等, 如果需要, 这些剂型可进行消毒或者与辅剂混合, 所述辅剂例如是防腐剂、稳定剂、乳化剂、湿润剂等。根据本发明的乳膏剂可适当地包括例如水、杏仁油、矿物油以及自乳化蜂蜡的混合物, 软膏剂可适当地包括例如杏仁油和白色软石蜡的混合物, 而洗剂可适当地包括例如无水丙二醇。

在治疗皮肤疾病时, 根据本发明的化合物的局部制剂还可包括诱导表皮生长的药物如类视色素(如维生素 A)、苯并二氢吡喃醇(chromanols)如维生素 E、 β -激动剂如异丙肾上腺素或环腺苷单磷酸酯(cAMP)、抗炎药如皮质甾类(例如氢化可的松或其乙酸酯、或地塞米松)、以及角质促成剂如煤焦油或地蒽酚。这些药物的有效量, 例如维生素 A 约为组合物重量的 0.003—0.3%, 维生素 E 约为 0.1—10%, 异丙肾上腺素约为 0.1—2%, cAMP 约为 0.1—1%, 氢化可的松约为 0.25—5%, 煤焦油约为 0.1—20%, 而地蒽酚约为 0.05—2%。

对于直肠给药, 化合物可形成为包含栓剂基质如可可油或其他三甘油酯的药物组合物。为延长储存时间, 所述组合物可有利地包括抗氧化剂, 如抗坏血酸、丁基化羟基茴香醚或氢醌。

在治疗钙代谢疾病时, 口服给药本发明的药物组合物是优选的。通常情况下, 本发明的化合物通常是以单元剂量剂型分配在药物学上可接受的载体中, 每个单元剂量剂型包含约 0.5—25 μg 的本发明化合物。本发明化合物的剂量通常约为 0.01—1.0 $\mu\text{g/kg/天}$, 优选为约 0.04—0.3 $\mu\text{g/kg/天}$ 。在治疗癌症、肿瘤以及其他过度增殖性疾病时, 口服剂量通常为约 10—200 $\mu\text{g/天}$ 。

在局部使用治疗皮肤疾病时，本发明化合物在局部用组合物中的剂量通常为约 0.01—50 μg 每克组合物。在治疗皮肤癌时，低钙血性维生素 D 化合物在局部使用的组合物中的剂量通常约为 0.01—100 μg 每克组合物。

优选口服给药本发明的药物组合物。在治疗癌症或肿瘤时，本发明化合物的剂量通常为约 0.01—2.0 $\mu\text{g/kg/天}$ ，优选为约 0.01—1.0 $\mu\text{g/kg/天}$ 。如上所述，根据本发明之低钙血性维生素的化合物的给药也可阶段性地进行，在此情况下，如果每 2—7 天给药 1 次，则通常可使用约 20—200 μg 的更高剂量。通常情况下，本发明的化合物以单元剂量剂型分配在药物学上可接受的载体中。

根据良好的医疗实践以及个体患者的临床情况，本领域技术人员可容易地对有效剂量和共同给药方案进行优化。无论何种给药方式，应认识到，在具体情况下活性化合物的实际优选用量可根据所用具体化合物的功效、配制的具体组分、给药形式以及所治疗的具体部位和生物而变化。例如，对于具体患者的具体剂量取决于患者年龄、性别、体重、健康状况、饮食、给药的时间和方式、排泄速率、复合用药、以及所治疗疾病的严重性。用于某一宿主的剂量可根据常规方法来确定，例如通过合适的常规药理学方法比较所用化合物与已知药剂的不同活性。

另外，共同给药低钙血性维生素 D 化合物和抗癌剂或抗肿瘤剂也包括在本发明的范围中。所述抗癌剂可合适地包括：抗代谢药（如 5-氟尿嘧啶、氨甲蝶呤、氟达拉滨）、抗微管剂（例如长春新碱、长春碱、紫杉烷类药物如紫杉醇、多西他赛）、烷基化剂（如环磷酰胺、美法仑、二氯乙基硝基脲、羟基脲）、铂药物（如顺铂、卡铂、奥沙利铂、JM-216、CI-973）、蒽环霉素（多柔比星、柔红霉素）、antibiotics（例如丝裂霉素、伊达比星、多柔比星、柔红霉素）、拓扑异构酶抑制剂（例如依托泊苷、喜树碱）或者任何其他抗肿瘤剂（磷酸雌莫司汀、泼尼莫司汀）。复合

使用低钙血性维生素 D 化合物和各种抗癌剂，可期望对癌细胞产生显著增强的细胞毒性作用，并由此增加治疗效果。具体而言，与单独使用各抗癌剂相比，使用低浓度的抗癌药物的上述组合即可明显增加生长抑制作用，而且与单独或大剂量地使用抗癌剂相比，可显著降低与这些抗癌药物有关的副作用。这些共同给药的抗癌剂的可能剂量范围是 0.1—20 mg/kg/天。

在此所用术语“共同给药”是指其中两种或者更多种药物给药于患者或者宿主的任何给药途径。例如，所述药物一起或者先后进行给药。药物可按照不同的途径进行给药，例如一种药物通过静脉给药，而第二种药物通过肌肉内、静脉内或者口服途径给药。这些药物可同时或者顺序地给药，只要它们的给药方式能够使药物在体内达到有效的浓度。这些药物也可以混合物的形式给药，例如在同一个片剂中。在顺序给药时，一种药物可直接在给药另一种药物后进行给药，或者这些药物可阶段性地给药，例如一种药物在一个时间给药，而另一种药物在以后的时间给药，通常在一周之内。合适的共同给药的方案是，在给药细胞毒性剂之前 0.5—7 天给药低钙血性维生素 D 化合物。

共同给药有效剂量的式 (I) 类似物和其它已知可缓解骨疾病的激素或药物如雌激素，也包括在本发明的范围内。如上应注意的是，前列腺癌经常转移至骨上，导致骨丢失和相关的疼痛。此等骨治疗剂可包括结合雌激素或其等价物、降钙素、二磷酸酯、钙添加剂、钴胺素、百日咳毒素和硼。这些共同给药的治疗剂的可能剂量范围见表 1。

表 1：与式 (I) 之 1α -羟基维生素 D 共同给药的各种药剂的可能口服剂量范围

药剂	剂量范围		
	宽的	优选的	最优选的
结合雌激素或等价物 (mg/天)	0.3-5.0	0.4-2.4	0.6-1.2
氟化钠 (mg/天)	5-150	30-75	40-60
降钙素 (IU/天)	5-800	25-500	50-200
二磷酸酯 (mg/天)	0.5-20	1-15	5-10
钙添加剂 (mg/天)	250-2500	500-1500	750-1000
钴胺素 (μ g/天)	5-200	20-100	30-50
百日咳毒素 (mg/天)	0.1-2000	10-1500	100-1000
硼 (mg/天)	0.10-3000	1-250	2-100

如 TamoxifenTM 的抗雌激素物质也是已知的骨治疗剂，并且可适当地与本发明的低钙血性维生素 D 化合物复合使用。

以下将根据实施例进一步阐明本发明的实施方案，这些实施例不应被理解为是对本发明范围的限制，其仅是用于说明本发明。

VDR 结合分析

实施例 1： 1α ，24-二羟基维生素 D₂ [1α ，24-(OH)₂D₂]

使用从 Incstar (Stillwater, Minnesota) 购得的牛胸腺 VDR 试剂盒及标准 1α ，25-(OH)₂D₃ 溶液，测定 1α ，24-(OH)₂D₂ 对哺乳动物维生素 D 受体 (VDR) 的结合亲和性。化学合成的 1α ，24-(OH)₂D₂ 的半最大结合是约 150 pg/ml，而 1α ，25-(OH)₂D₃ 的半最大结合为 80 pg/ml。因此， 1α ，25-(OH)₂D₂ 对牛胸腺 VDR 的亲和性类似于 1α ，25-

(OH)₂D₃，这表明具有强的生物活性。

实施例 2：1 α ，24-二羟基维生素 D₄ [1 α ，24-(OH)₂D₄]

研究 1 α ，24-(OH)₂D₄ 的 VDR 亲和结合作用。将 1 α ，24-(OH)₂D₄ 与维生素 D 受体和放射性标记的痕量 1 α ，25-(OH)₂D₃ 一起培养。培养后，测量结合于受体的放射活性量，并与共同培养后未标记及标记的 1 α ，25-(OH)₂D₃ 的结合量进行比较。发现 50 pg/试管的 1 α ，24-(OH)₂D₄ 等于约 20 pg 的 1 α ，25-(OH)₂D₃。

这些结果表明，1 α ，24-(OH)₂D₄ 与维生素 D 受体的结合略低于 1 α ，25-(OH)₂D₃。该数据意味着，1 α ，24-(OH)₂D₄ 对 VDR 具有高亲和性及显著的生物活性，类似于 1 α ，25-(OH)₂D₃。这些数据与用 1 α ，24-(OH)₂D₄ 进行的基因表达研究（以下将描述）是一致的，后者表明 1 α ，24-(OH)₂D₄ 的活性略低于 1 α ，25-(OH)₂D₃。

与现有技术相比，这些结果是令人惊奇的，同时也是出乎意料的。它们与维生素 D 领域中以前认为维生素 D₄ 化合物的生理活性低的观点正相反。

实施例 3：1 α ，24-二羟基维生素 D₂ [1 α ，24-(OH)₂D₂]

用 Skowronski 等人的方法（136 *Endocrinology* (1995) 20-26，该文献的内容在此并入作为参考）证实维生素 D 化合物在前列腺细胞中与 VDR 的结合。将前列腺衍生的细胞系培养至接近融合，然后洗涤并刮集。离心洗涤细胞，然后将细胞沉淀物重新悬浮在经缓冲的盐溶液中，该溶液包含蛋白酶抑制剂。用超声破碎细胞，并同时在冰上冷却。在 4℃、207000 × g 下离心经破碎的细胞 35 分钟，分析由此得到的上清液以检测结合情况。200 μ l 可溶性提取物（1-2 mg 蛋白/ml 上清液）与 1 nM 的 ³H-1 α ，25-(OH)₂D₃ 培养，并在 4℃ 下于 16-20 小时中增加 1 α ，24-(OH)₂D₂

的浓度 (0.01–100 nM)。用羟基磷灰石通过标准方法分离结合及游离的激素。从测定的总结合中减去在 250 倍过量的非放射性 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在时得到的非特异性结合, 由此计算特异性结合。结果表明, $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_2$ 对前列腺 VDR 具有强的亲和性, 这说明 $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_2$ 对前列腺细胞具有强的生物活性。

实施例 4: $1\alpha, 24$ -二羟基维生素 D_4 [$1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_4$]

使用活性维生素 D 类似物 $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 重复实施例 3 的方法, 并测定特异性结合。结果表明, $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 对前列腺 VDR 具有强的亲和性, 这说明 $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 对前列腺细胞具有强的生物活性。

实施例 5: $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_4 [$1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_4$]

使用活性维生素 D 类似物 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 重复实施例 3 的方法, 并测定特异性结合。结果表明, $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 对前列腺 VDR 具有强的亲和性, 这说明 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 对前列腺细胞具有强的生物活性。

基因表达

实施例 6: $1\alpha, 24$ -二羟基维生素 D_4 [$1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_4$]

使用质粒 p(CT4)⁴TKGH (其是维生素 D 受体(VDR)表达质粒)和 pSG5-hVDR1/3 (其是包含生长激素(GH)基因的质粒), 在维生素 D 应答元素 (VDRE) 的对照下进行实验, 以发现 $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 与 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 相比诱导维生素 D 依赖性生长激素的能力, 该激素的作用是作为报道基因。用上述两种质粒转染在培养基中的细胞。在维生素 D 应答元素 (VDRE) 的对照下, 一种质粒包含表达生长激素 (GH) 的基因, 另一种质粒包含表达维生素 D 受体 (VDR) 的结构基因。这些经转染的培养基与 $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 或 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 一起培养, 然后

测量生长激素的产生。下表 2 示出了该实验的结果。

表 2: 维生素 D 化合物对生长激素的诱导

化合物	使用浓度 (M)	生长激素的诱导作用 (ng/ml)
1 α , 25-(OH) ₂ D ₃	1×10^{-10}	39
1 α , 25-(OH) ₂ D ₃	5×10^{-10}	248
1 α , 24-(OH) ₂ D ₄	5×10^{-10}	165
1 α , 24-(OH) ₂ D ₄	1×10^{-9}	625
1 α , 24-(OH) ₂ D ₄	5×10^{-9}	1098

这些数据表明, 1 α , 24-(OH)₂D₄ 刺激维生素 D 依赖性的生长激素的能力接近等于 1 α , 25-(OH)₂D₃。该结果是非常令人惊奇的, 而且是所有现有技术都没有公开的。

实施例 7: 1 α , 24 (S) -二羟基维生素 D₂ 和 1 α , 24 (R) -二羟基维生素 D₂ [1 α , 24(S)-(OH)₂D₂ 和 1 α , 24(R)-(OH)₂D₂]

进行实施例 6 所述的基因表达研究, 以比较化学合成的 1 α , 24(S)-(OH)₂D₂ 和 1 α , 24(R)-(OH)₂D₂ 与 1 α , 25-(OH)₂D₃ 和 25-OH-D₃ 的体外生物活性。使用维生素 D 依赖性的转录活化模型系统, 其中将质粒 pSG5-hVDR1/3 和 p(CT4)⁴TKGH 共同转染在绿猴肾 COS-1 细胞中。

经转染的细胞与维生素 D 代谢物一起培养, 然后测定生长激素的产生。如表 3 所示, 在该系统中, 1 α , 24(S)-(OH)₂D₂ 及其差向异构体——1 α , 24(R)-(OH)₂D₂ 都具有比 25-OH-D₃ 明显更高的活性, 而 1 α , 24(R)-(OH)₂D₂ 的活性几乎与 1 α , 25-(OH)₂D₃ 的相同。

表 3: 在经转染的 COS-1 细胞中维生素 D 诱导的生长激素产生

诱导剂	摩尔浓度	维生素 D 诱导的生长激素产生	
		总 GH 产生* (ng/ml)	净维生素 D 诱导的 GH 产生(ng/ml)
乙醇		44	0
25-OH-D ₃	1 × 10 ⁻⁷	245	201
	1 × 10 ⁻⁶	1100	1056
	1 × 10 ⁻⁵	775	731
1 α, 25-(OH) ₂ D ₃	1 × 10 ⁻¹⁰	74	30
	1 × 10 ⁻⁹	925	881
	1 × 10 ⁻⁸	1475	1441
1 α, 24(S)-(OH) ₂ D ₂	1 × 10 ⁻¹⁰	425	381
	1 × 10 ⁻⁹	1350	1306
	1 × 10 ⁻⁸	1182	1138
1 α, 24(R)-(OH) ₂ D ₂	1 × 10 ⁻⁹	80	36
	1 × 10 ⁻⁸	1100	1056
	1 × 10 ⁻⁷	1300	1256

*两次测量的平均值

对细胞增殖的抑制作用

实施例 8: 1 α, 24-二羟基维生素 D₂ [1 α, 24-(OH)₂D₂]

使用 Skowronski 等人的方法 (132 *Endocrinology* (1993) 1952-1960, 以及 136 *Endocrinology* (1995) 20-26, 这两个文献的内容在此并入作为参考) 证实对细胞增殖的抑制作用。将得自于人前列腺之腺癌之细胞系——LnCaP 和 PC-3 接种在六孔组织培养板上, 它们的密度为约 50000 个细胞/板。在连接细胞并稳定后, 约为 2-3 天, 用包含载体或浓度为 10⁻¹¹

10^{-7} M 的活性维生素 D 类似物—— $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_2$ 的培养基补充前述培养基。包含测试类似物或载体的培养基每 3 天更换一次。6—7 天后，除去培养基，并冲洗细胞，用冷却的 5% 三氯乙酸沉淀，然后用冷乙醇洗涤。将细胞溶解在 0.2 N 氢氧化钠中，然后通过标准方法测定 DNA 的量。结果表明，根据本发明用 $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_2$ 培养的培养基与对照培养基相比具有显著更少的细胞。

实施例 9: $1\alpha, 24$ -二羟基维生素 D_4 [$1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_4$]

使用活性维生素 D 类似物 $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 重复实施例 8 的方法，并测定细胞数量。用 $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 培养的培养基与对照培养基相比具有显著更少的细胞。

实施例 10: $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_4 [$1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_4$]

使用活性维生素 D 类似物 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 重复实施例 8 的方法，并测定细胞数量。用 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 培养的培养基与对照培养基相比具有显著更少的细胞。

对细胞分化的刺激作用

实施例 11: $1\alpha, 24$ -二羟基维生素 D_2 [$1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_2$]

使用 Skowronski 等人的方法 (132 *Endocrinology* (1993) 1952-1960, 以及 136 *Endocrinology* (1995) 20-26, 这两个文献的内容在此并入作为参考), 将得自于人前列腺之转移腺癌之细胞系——LnCaP 的细胞接种在六孔组织培养板上, 其密度为约 50000 个细胞/板, 而且已知该细胞可表达 PSA。在连接细胞并稳定后, 约为 2—3 天, 用包含载体或浓度为 10^{-11} — 10^{-7} M 的活性维生素 D 类似物—— $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_2$ 的培养基补充前述培养基。6—7 天后, 除去培养基, 并在 -20°C 下储存, 用于前列腺特

异性抗原（PSA）的分析。

冲洗平行培养基中的细胞，然后通过标准方法测定 DNA 的量。用标准的已知方法测定 PSA。以 PSA 量/细胞计，用 1α ， $24-(\text{OH})_2\text{D}_2$ 培养的培养基与对照培养基相比具有显著更多的 PSA。

实施例 12: 1α ， 24 -二羟基维生素 D_4 [1α ， $24-(\text{OH})_2\text{D}_4$]

使用活性维生素 D 类似物 1α ， $24-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 重复实施例 12 的方法，并测定 PSA。以 PSA 量/细胞计，用 1α ， $24-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 培养的培养基与对照培养基相比具有显著更多的 PSA。

实施例 13: 1α ， 25 -二羟基维生素 D_4 [1α ， $25-(\text{OH})_2\text{D}_4$]

使用活性维生素 D 类似物 1α ， $25-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 重复实施例 12 的方法，并测定 PSA。以 PSA 量/细胞计，用 1α ， $25-(\text{OH})_2\text{D}_4$ 培养的培养基与对照培养基相比具有显著更多的 PSA。

临床研究

实施例 14: 癌症的总治疗方法

罹患已知的维生素 D 受体阳性肿瘤（例如前列腺、乳腺、肺、结肠或胰腺的腺癌，或者膀胱的过渡性细胞癌，或者黑素瘤）的患者参与根据本发明之低钙血性维生素 D 化合物的开标研究。在治疗前，患者摄入低钙饮食，以有助于使肠吸收最小化，并且允许更高剂量的低钙血性维生素 D。该低钙饮食可在治疗期间持续下去，并且可在最后给药 1α ， $24(\text{S})$ -二羟基维生素 D_2 后持续 1 周。所述饮食理想的情况是将每日钙摄入量被限制在约 400—500 mg。患者也可停止使用任何维生素 D 添加剂或者维生素 D 替代治疗。每位患者还被要求比通常饮水多饮入 4—6 杯的水，以确保足够的口腔水合作用。

每位受试者在规定的间隔检测以下指标：（1）血钙过多、血磷过多、尿钙过多、尿磷过多以及其他毒性；（2）转移性疾病发展变化的证据；以及（3）与处方测试药物剂量的顺应性。

给药方案通常是每日剂量基础为约 $10\ \mu\text{g}$ 或 $20\ \mu\text{g}$ 每日一约 $100\ \mu\text{g}$ 每日，共进行 10 周。或者可使用非每日给药方案，即、每隔一天给药 $40\ \mu\text{g}$ ，每周一次 $100\ \mu\text{g}$ 。给药途径可为口服、静脉直至区域性转运（例如动脉输注、通过门静脉）。当然，口服给药是最容易的而且也是最有效的途径。区域性转运可允许高的给药剂量，并且通常可避免产生血钙过多。但在根据本发明的化合物时，所述化合物基本上是低钙血性的。

在治疗期后，用于评估转移性疾病发展的 CAT、扫描、X 射线以及骨扫描显示在更低的剂量水平下疾病保持稳定或者在许多患者中有部分减轻，而且在更高的剂量时在许多患者中疾病保持稳定以及部分或者完全减轻。

实施例 15：用 1α ，24-二羟基维生素 D_2 [1α ，24-($\text{OH})_2\text{D}_2$] 治疗前列腺癌

患有晚期非雄激素依赖性前列腺癌的患者参加 1α ，24-($\text{OH})_2\text{D}_2$ 的开标研究。合格的患者至少为 40 岁，有前列腺之腺癌的组织学证据，而且患有以前对激素治疗有反应的进行性疾病。在允许参加研究后，患者开始持续 26 周口服 1α ，24-($\text{OH})_2\text{D}_2$ 的治疗过程，但中止使用以前的钙添加剂、维生素 D 添加剂、以及维生素 D 激素替代治疗。在治疗过程中，在规定的的时间间隔处检测患者以下项目：（1）血钙过多、血磷过多、尿钙过多、尿磷过多以及其他毒性；（2）转移性疾病发展变化的证据；以及（3）与处方测试药物剂量的顺应性。

分两个阶段进行该研究。在第一阶段中，对一系列组的患者给药逐渐增高剂量的 1α ，24-($\text{OH})_2\text{D}_2$ ，由此测定其每日口服的最大耐受剂量

(MTD)。所有给药都是在早饭之前进行。第一组患者用 $25.0 \mu\text{g}$ 的 $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_2$ 进行治疗。随后的组用 50.0 、 75.0 和 $100.0 \mu\text{g}$ /天的剂量治疗。在研究阶段不间断地连续给药，除非血清钙超过 11.6 mg/dl 或者观察到 3 或 4 级的其它毒性，在这些情况下，暂时停止给药，直至没有观察到毒性作用，并在浓度已下降 $10.0 \mu\text{g}$ 时重新开始。

该研究第一阶段的结果表明， $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_2$ 的 MTD 为 $20.0 \mu\text{g}$ /天以上，该水平高于 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的 10–40 倍。从参加患者身上定时收集的血样分析揭示， $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_2$ 的循环浓度与给药剂量成比例地增加，在最高剂量时升高至 100 pg/ml 以上的最大浓度，而且 $1\alpha, 25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的循环浓度被抑制，通常至检测不到的水平。血清和尿钙剂量依赖性地升高。对于用 $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_2$ 之 MTD 治疗的患者，至少在 6 个月的时间中称与转移性疾病有关的骨疼痛显著减少。

在第二阶段中，用 0.5–1.0 倍于 MTD 的 $1\alpha, 24-(\text{OH})_2\text{D}_2$ 治疗患者 24 个月。治疗 1 和 2 年后，用于评估转移性疾病进展的 CAT 扫描、X-射线和骨扫描都表明，许多患者在较低剂量时疾病稳定或者部分减轻，而且在更高剂量时疾病稳定并有部分或完全的减轻。

实施例 16：用 1α -羟基维生素 D_2 [1α -OH- D_2] 治疗前列腺癌

用活性维生素 D 化合物—— 1α -OH- D_2 重复实施例 14 的研究。阶段一研究的结果表明，用 1α -OH- D_2 之 MTD 治疗至少 6 个月的患者中与转移性疾病有关的骨疼痛显著降低。阶段二研究的结果表明，2 年后，用于评估转移性疾病进展的 CAT 扫描、X-射线和骨扫描都表明，许多患者在较低剂量时疾病稳定或者部分减轻，而且在更高剂量时疾病稳定并有部分或完全的减轻。

实施例 17：治疗黑素瘤

使用实施例 14 的方法治疗例如颞部罹患转移性恶性黑素瘤的患者。在 18 个月的治疗期后，转移性疾病的发展表明该疾病稳定或者部分减轻。

实施例 18：治疗成视网膜细胞瘤

使用实施例 14 的方法治疗罹患转移性成视网膜细胞瘤的患者。在 18 个月的治疗期后，转移性疾病的发展表明该疾病稳定或者部分减轻。

实施例 19：治疗肝癌

使用实施例 14 的方法治疗罹患转移性肝细胞瘤的患者。例如通过动脉输注对本发明的化合物进行区域转运。在 18 个月的治疗期后，转移性疾病的发展表明该疾病稳定或者部分减轻。

虽然已具体地描述了本发明，但本领域技术人员应认识到，还可在本发明的范围内进行各种改进，其包括改变、添加和省略。因此，这些改进也应在本发明的范围之内，而且本发明的范围仅应局限在所附权利要求书的法律解释范围内。