

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/351 (2006.01)

C07D 309/04 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580040165.0

[43] 公开日 2008 年 1 月 16 日

[11] 公开号 CN 101106985A

[22] 申请日 2005.9.23

[21] 申请号 200580040165.0

[30] 优先权

[32] 2004.9.24 [33] US [31] 60/612,732

[86] 国际申请 PCT/US2005/034213 2005.9.23

[87] 国际公布 WO2006/036813 英 2006.4.6

[85] 进入国家阶段日期 2007.5.23

[71] 申请人 拜奥艾克塞尔股份公司

地址 意大利米兰

[72] 发明人 M·R·乌斯科科维克

L·阿多里尼 G·彭纳 E·科利

S·马查克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜 黄可峻

权利要求书 17 页 说明书 91 页 附图 4 页

[54] 发明名称

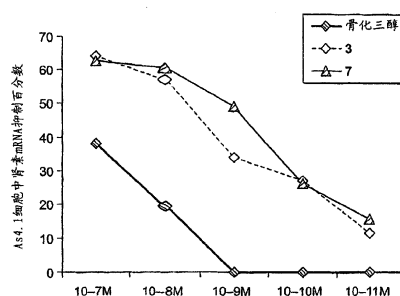
20—环烷基, 26,27—烷基/卤代烷基维生素
D₃化合物及其使用方法

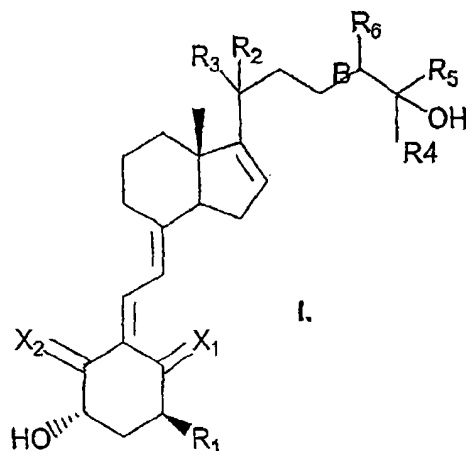
[57] 摘要

本发明提供了碳-20 被环烷基, 例如环丙基, 取代的胆骨化醇的维生素 D₃类似物, 其中碳-16 是双键, 并且碳-23 是单键、双键或三键。各种烷基或卤代烷基取代基结合在碳-25 上。本发明提供了药学可接受的酯类、盐类及其前体药物。还公开了使用该化合物以治疗维生素 D₃相关疾病的方法, 以及含有该化合物的药物组合物。

骨化三醇	10-7M	10-8M	10-9M	10-10M	10-11M	
3	38	19	0	0	0	
7	64	57	34	27	11	
	63	61	49	26	16	

剂量响应抑制曲线



1. 式 I 的维生素 D₃ 化合物:

其中:

B 是单键、双键或三键;

X₁ 和 X₂ 各自独立地是 H₂ 或 CH₂, 假定 X₁ 和 X₂ 不都是 CH₂;

R₁ 是羟基或卤素;

R₂ 和 R₃ 与 C₂₀ 一起形成 C₃-C₆ 环烷基;

R₄ 和 R₅ 各自独立地是烷基或卤代烷基;

R₆ 是氢、C₁-C₄ 烷基、羟基烷基或卤代烷基, 条件是当 B 是三键时 R₆ 不存在; 和

药学可接受的酯类、盐类及其前体药物。

2. 权利要求 1 所述的化合物, 其中 R₁ 是羟基。

3. 权利要求 1 所述的化合物, 其中 R₁ 是卤素。

4. 权利要求 3 所述的化合物, 其中 R₁ 是 F。

5. 权利要求 1-4 任意一项所述的化合物, 其中 B 是单键。

6. 权利要求 1-4 任意一项所述的化合物, 其中 B 是双键。

7. 权利要求 1-4 任意一项所述的化合物, 其中 B 是三键。

8. 上述权利要求任意一项所述的化合物, 其中 X₁ 是 CH₂ 并且 X₂ 是 H₂。

9. 上述权利要求任意一项所述的化合物, 其中 X₁ 和 X₂ 各自是 H₂。

10. 上述权利要求任意一项所述的化合物, 其中 R₄ 和 R₅ 各自独立地是烷基或卤代烷基。

11. 上述权利要求任意一项所述的化合物, 其中 R_4 和 R_5 各自独立地是烷基或三卤代烷基。

12. 上述权利要求任意一项所述的化合物, 其中 R_4 和 R_5 各自独立地是 甲基或三氟甲基。

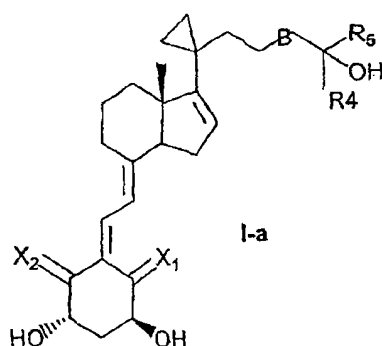
13. 上述权利要求任意一项所述的化合物, 其中 R_4 和 R_5 是甲基。

14. 权利要求 1-12 任意一项所述的化合物, 其中 R_4 和 R_5 是三氟甲基。

15. 上述权利要求任意一项所述的化合物, 其中 R_6 是氢。

16. 上述权利要求任意一项所述的化合物, 其中 R_2 和 R_3 与 C_{20} 一起形成环丙基。

17. 权利要求 1 所述的化合物, 其具有式 I-a

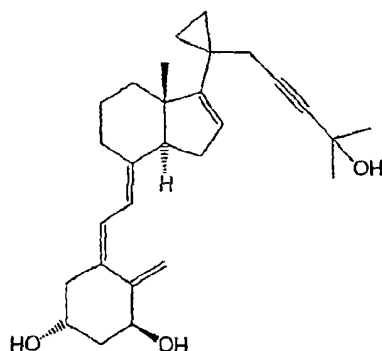


其中:

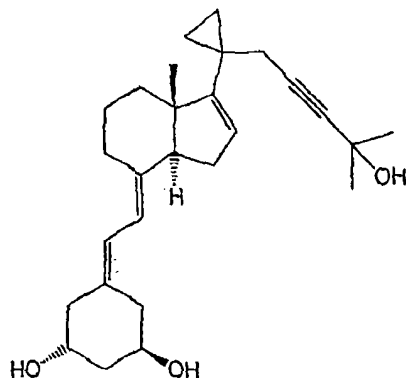
B 是单键、双键或三键;

X_1 和 X_2 各自独立地是 H_2 或 CH_2 , 假定 X_1 和 X_2 不都是 CH_2 ; 和 R_4 和 R_5 各自独立地是烷基或卤代烷基。

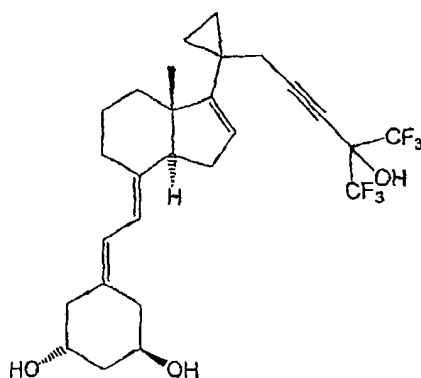
18. 权利要求 17 所述的化合物, 其中所述的化合物是 1,25-二羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-胆骨化醇:



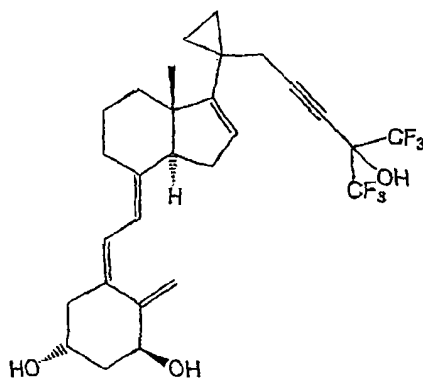
19. 权利要求 17 所述的化合物, 其中所述的化合物是 1,25-二羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇:



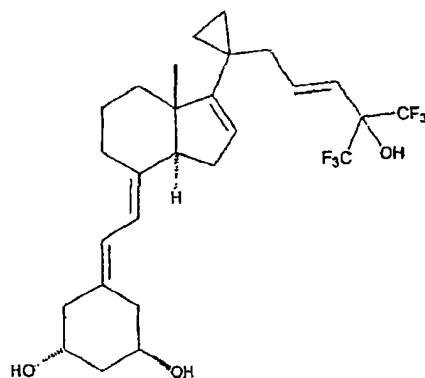
20. 权利要求 17 所述的化合物, 其中所述的化合物是 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23-炔-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇:



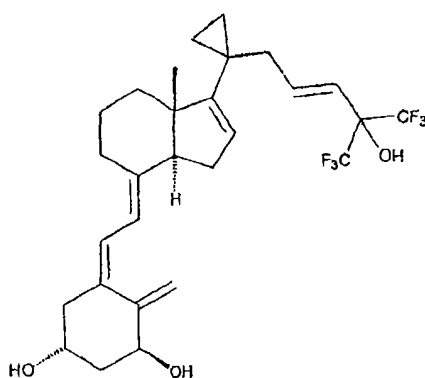
21. 权利要求 17 所述的化合物, 其中所述的化合物是 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23-炔-26,27-六氟-胆骨化醇:



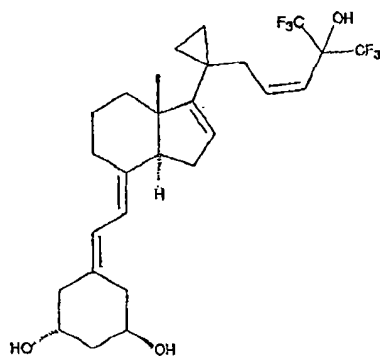
22. 权利要求 17 所述的化合物, 其中所述的化合物是 1,25-二羟基-16,23E-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇:



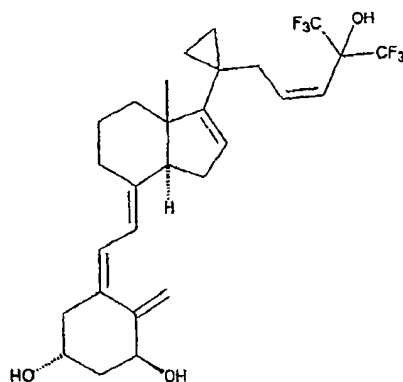
23. 权利要求 17 所述的化合物, 其中所述的化合物是 1,25-二羟基-16,23E-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇:



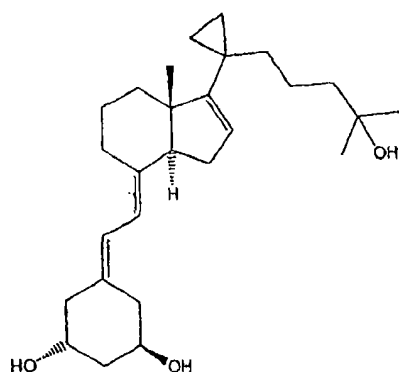
24. 权利要求 17 所述的化合物, 其中所述的化合物是 1,25-二羟基-16,23Z-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇:



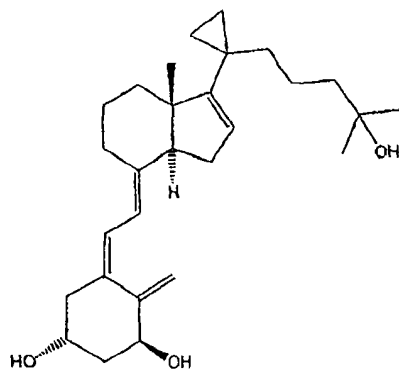
25. 权利要求 17 所述的化合物, 其中所述的化合物是 1,25-二羟基-16,23Z-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇:

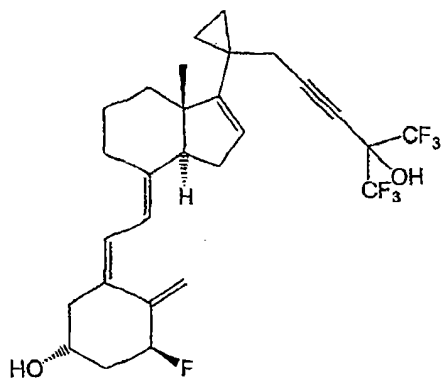


26. 权利要求 17 所述的化合物, 其中所述的化合物是 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇:

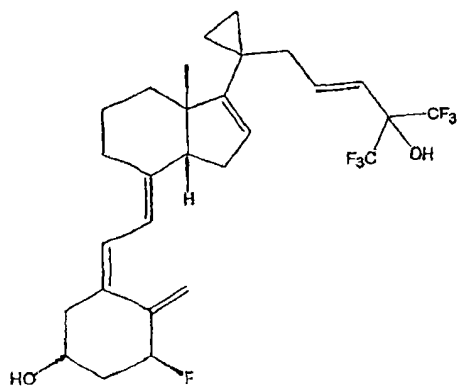


27. 权利要求 17 所述的化合物, 其中所述的化合物是 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇:

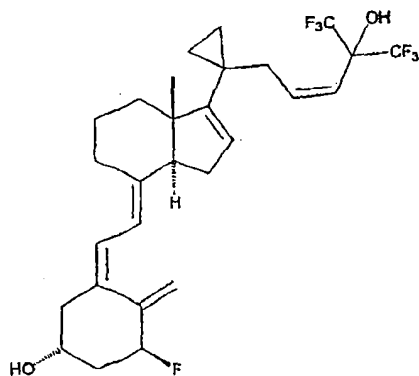




31. 权利要求 28 所述的化合物，其中所述的化合物是 1 α -氟-25-羟基-16,23E-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇：



32. 权利要求 28 所述的化合物，其中所述的化合物是 1 α -氟-25-羟基-16,23Z-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇：



33. 治疗个体的维生素 D₃ 相关疾病的方法，包括向所述的需要的个体施用有效量的权利要求 1-32 任意一项的维生素 D₃ 化合物，这样所述的个体治疗了所述的维生素 D₃ 相关疾病。

34. 根据权利要求 33 所述的方法, 进一步包括获得所述维生素 D 化合物的所述步骤。

35. 权利要求 33 所述的方法, 进一步包括鉴别需要治疗维生素 D₃ 相关疾病的个体。

36. 权利要求 33 所述的方法, 其中所述的维生素 D₃ 相关疾病是 ILT3-相关障碍。

37. 权利要求 36 所述的方法, 其中所述的 ILT3-相关障碍是免疫障碍。

38. 权利要求 37 所述的方法, 其中所述的免疫障碍是自身免疫性障碍。

39. 权利要求 38 所述的方法, 其中所述的自身免疫性障碍选自 1 型胰岛素依赖型糖尿病、成人呼吸窘迫综合征、炎症肠病、皮炎、脑膜炎、血栓性血小板减少性紫癜、斯耶格伦氏综合征、脑炎、眼色素层炎、眼色素层视网膜炎、白细胞粘附缺陷、类风湿性关节炎、风湿热、莱特尔氏综合征、牛皮癣关节炎、进行性全身性硬化症、原发性胆汁性肝硬变、天疱疮、类天疱疮、坏死性脉管炎、重症肌无力、多发性硬化症、红斑狼疮、多发性肌炎、结节病、肉芽肿病、血管炎、恶性贫血、CNS 炎性障碍、抗原-抗体复合介导的疾病、自身免疫性溶血性贫血症、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、习惯性自然流产、雷诺氏综合征、肾小球肾炎、皮肌炎、慢性活动性肝炎、腹部疾病、AIDS 的自身免疫性并发症、萎缩性胃炎、强直性脊柱炎和阿狄森氏病。

40. 权利要求 37 所述的方法, 其中所述的免疫障碍是移植排斥。

41. 权利要求 38 所述的方法, 其中所述的自身免疫性障碍是 I 型胰岛素依赖型糖尿病。

42. 权利要求 33 所述的方法, 其中所述的维生素 D₃ 相关疾病是一种以维生素 D₃-应答细胞的异常活性为特征的障碍。

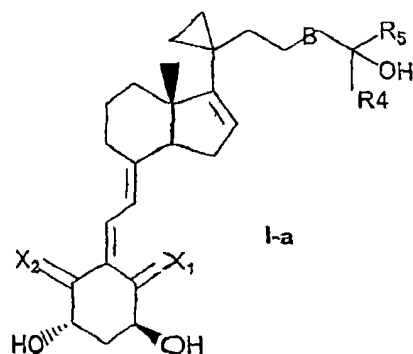
43. 权利要求 42 所述的方法, 其中所述的障碍包括过度增殖皮肤细胞的异常活性。

44. 权利要求 43 所述的方法, 其中所述的障碍选自牛皮癣、基底细胞癌和角化病。

45. 权利要求 44 所述的方法, 其中所述的障碍是牛皮癣。

46. 权利要求 45 所述的方法, 其中所述的维生素 D₃ 化合物具有所

述的式 I-a

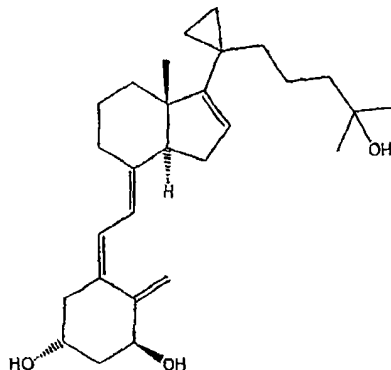


其中:

B 是单键、双键或三键;

X₁ 和 X₂ 各自独立地是 H₂ 或 CH₂, 假定 X₁ 和 X₂ 不都是 CH₂; 和 R₄ 和 R₅ 各自独立地是烷基或卤代烷基。

47. 权利要求 46 所述的方法, 其中所述的维生素 D₃ 化合物是 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇:



48. 权利要求 42 所述的方法, 其中所述的障碍包括内分泌细胞的异常活性。

49. 权利要求 48 所述的方法, 其中所述的内分泌细胞是甲状旁腺细胞, 并且所述的异常活性是甲状旁腺激素的处理和/或分泌。

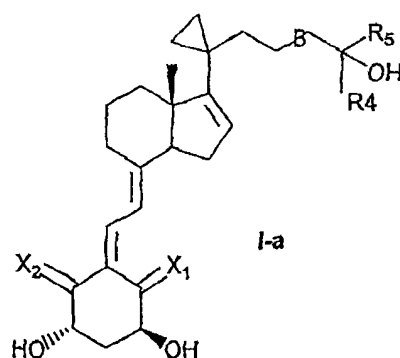
50. 权利要求 49 所述的方法, 其中所述的障碍是继发性甲状旁腺功能亢进症。

51. 权利要求 42 所述的方法, 其中所述的障碍包括骨细胞的异常活性。

52. 权利要求 51 所述的方法, 其中所述的障碍选自骨质疏松症、骨营养不良、老年性骨质疏松症、骨软化症、佝偻病、囊性纤维性骨炎和肾性骨营养不良。

53. 权利要求 52 所述的方法, 其中所述的障碍是骨质疏松症。

54. 权利要求 53 所述的方法, 其中所述的维生素 D₃ 化合物具有所述的式 I-a



其中:

B 是单键、双键或三键;

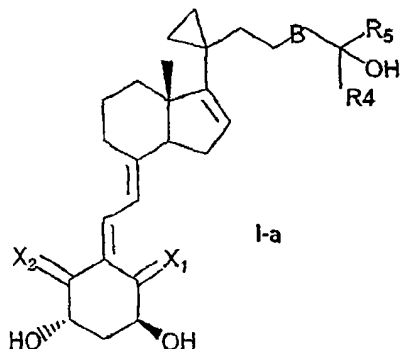
X₁ 和 X₂ 各自独立地是 H₂ 或 CH₂, 假定 X₁ 和 X₂ 不都是 CH₂; 和 R₄ 和 R₅ 各自独立地是烷基或卤代烷基。

55. 权利要求 42 所述的方法, 其中所述的障碍是肝硬化或慢性肾脏病。

56. 权利要求 42 所述的方法, 其中所述的障碍是高血压。

57. 权利要求 56 所述的方法, 其中所述的化合物抑制肾素的表达, 从而治疗所述的个体的高血压。

58. 权利要求 57 所述的方法, 其中所述的维生素 D₃ 化合物具有所述的式 I-a

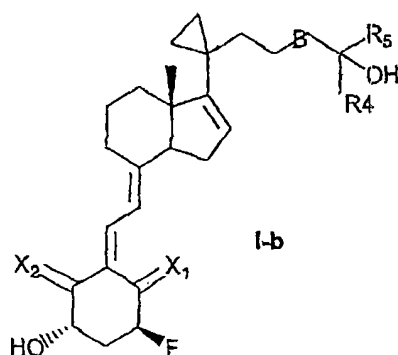


其中:

B 是单键、双键或三键;

X_1 和 X_2 各自独立地是 H_2 或 CH_2 , 假定 X_1 和 X_2 不都是 CH_2 ; 和 R_4 和 R_5 各自独立地是烷基或卤代烷基。

59. 权利要求 57 所述的方法, 其中所述的维生素 D_3 化合物具有所述的式 I-b

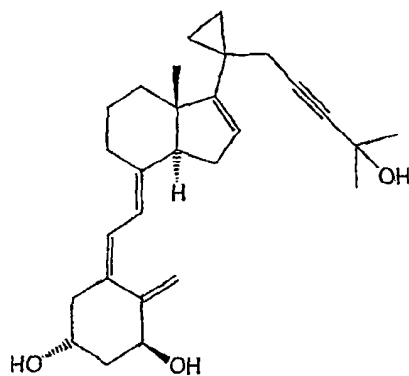


其中:

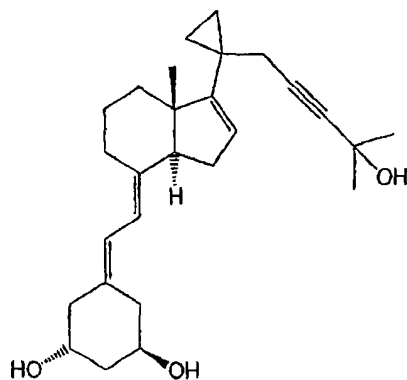
B 是单键、双键或三键;

X_1 和 X_2 各自独立地是 H_2 或 CH_2 , 假定 X_1 和 X_2 不都是 CH_2 ; 和 R_4 和 R_5 各自独立地是烷基或卤代烷基。

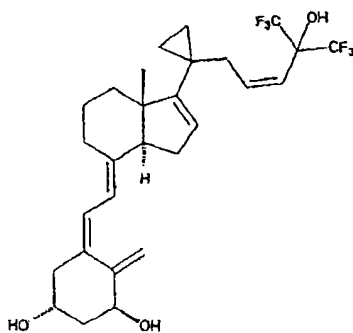
60. 权利要求 58 所述的方法, 其中所述的维生素 D_3 化合物是 1,25-二羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-胆骨化醇:



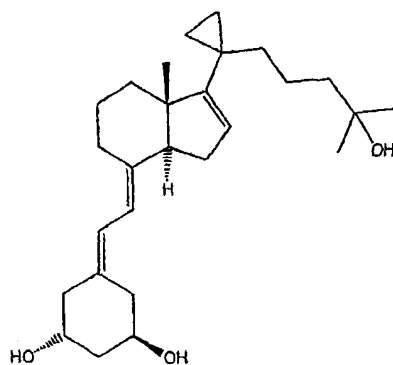
61. 权利要求 58 所述的方法, 其中所述的维生素 D_3 化合物是 1,25-二羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇:



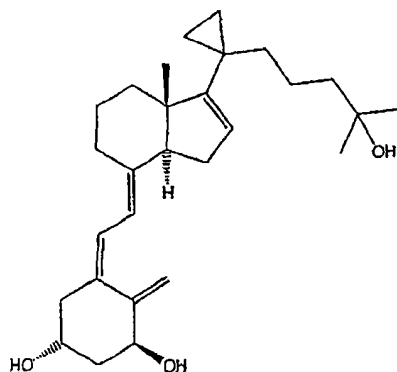
62. 权利要求 58 所述的方法, 其中所述的维生素 D₃ 化合物是 1,25-二羟基-16,23Z-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇:



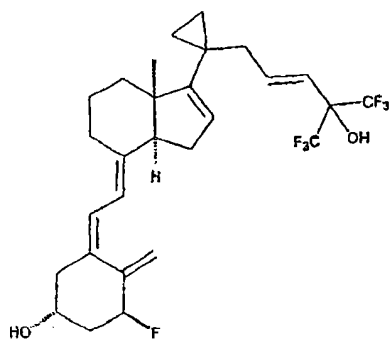
63. 权利要求 58 所述的方法, 其中所述的维生素 D₃ 化合物是 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇:



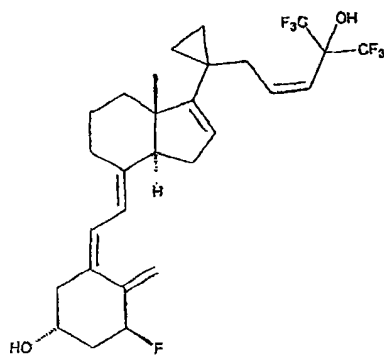
64. 权利要求 58 所述的方法, 其中所述的维生素 D₃ 化合物是 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇:



65. 权利要求 59 所述的方法, 其中所述的维生素 D₃ 化合物是 1 α -氟-25-羟基-16,23E-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇:



66. 权利要求 59 所述的方法, 其中所述的维生素 D₃ 化合物是 1 α -氟-25-羟基-16,23Z-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇:



67. 权利要求 42 所述的方法, 其中所述的障碍是良性的前列腺肥大。

68. 权利要求 42 所述的方法, 其中所述的障碍是肿瘤疾病。

69. 权利要求 68 所述的方法, 其中所述的肿瘤疾病选自白血病, 淋巴瘤, 黑素瘤, 骨肉瘤, 结肠癌, 直肠癌, 前列腺癌, 膀胱癌和肺

脏、乳腺、胃肠道和生殖泌尿道的恶性肿瘤。

70. 权利要求 69 所述的方法，其中所述的肿瘤疾病是膀胱癌。

71. 权利要求 42 所述的方法，其中所述的障碍是神经元缺失。

72. 权利要求 71 所述的方法，其中所述的障碍是选自阿耳茨海默氏病、皮克氏病、帕金森氏病、血管疾病、亨廷顿氏病和年龄相关记忆缺陷。

73. 权利要求 42 所述的方法，其中所述的障碍是眼色素层炎。

74. 权利要求 45 所述的方法，其中所述的障碍是间质性膀胱炎。

75. 权利要求 42 所述的方法，其中所述的障碍是以维生素 D₃-应答的平滑肌细胞的异常活性为特征。

76. 权利要求 75 所述的方法，其中所述的障碍是子宫肌瘤。

77. 权利要求 75 所述的方法，其中所述的障碍是过度增殖性血管疾病，其选自高血压诱导的血管重构、血管再狭窄和动脉粥样硬化。

78. 权利要求 75 所述的方法，其中所述的障碍是动脉性高血压。

79. 改善钙磷代谢脱调节的方法，包括向个体施用治疗有效量的权利要求 1-32 任意一项的化合物，以便改善钙磷代谢脱调节。

80. 权利要求 79 所述的方法，其中所述的钙磷代谢脱调节导致骨质疏松症。

81. 调节免疫球蛋白样转录物 3(ILT3)表面分子在细胞中表达的方法，包括将所述细胞与有效量的权利要求 1-32 任意一项的化合物接触以调节免疫球蛋白样转录物 3(ILT3)表面分子在所述细胞中的表达。

82. 权利要求 81 所述的方法，其中所述的细胞是在个体内。

83. 在个体中治疗 ILT3-相关障碍的方法，包括向所述的个体施用有效量的权利要求 1-32 任意一项的化合物以调节所述的 ILT3 表面分子的表达，从而在所述的个体中治疗所述的 ILT3-相关障碍。

84. 权利要求 83 所述的方法，其中所述的 ILT3-相关障碍是免疫障碍。

85. 权利要求 84 所述的方法，其中所述的免疫障碍是自身免疫性障碍。

86. 权利要求 85 所述的方法，其中所述的自身免疫性障碍是胰岛素依赖型糖尿病。

87. 在个体中诱导免疫耐受的方法，包括向所述的个体施用有效

量的权利要求 1-32 任意一项的化合物以调节所述的 ILT3 表面分子的表达，从而在所述的个体中诱导免疫耐受性。

88. 权利要求 87 所述的方法，其中所述的免疫耐受性是在抗原呈递细胞中被诱导的。

89. 权利要求 88 所述的方法，其中所述的抗原呈递细胞选自树突状细胞、单核细胞和巨噬细胞。

90. 在个体中抑制移植排斥的方法，包括向所述的个体施用有效量的权利要求 1-32 任意一项的化合物以调节所述的 ILT3 表面分子的表达，从而在所述的个体中抑制移植排斥。

91. 权利要求 90 所述的方法，其中所述的移植是实体器官移植。

92. 权利要求 90 所述的方法，其中所述的移植是胰岛移植。

93. 权利要求 90 所述的方法，其中所述的移植是骨髓移植。

94. 通过抗原呈递细胞调节免疫抑制活性的方法，包括将抗原呈递细胞与有效量的权利要求 1-32 任意一项的化合物接触以调节 ILT3 表面分子表达，从而通过所述的抗原呈递细胞调节所述的免疫抑制活性。

95. 权利要求 81 或 94 所述的方法，其中所述的细胞是抗原呈递细胞。

96. 权利要求 95 所述的方法，其中所述的抗原呈递细胞选自树突状细胞、单核细胞和巨噬细胞。

97. 在需要的个体中预防或治疗膀胱功能障碍的方法，其通过施用有效量的权利要求 1-32 任意一项的化合物，从而在所述的个体中预防或治疗膀胱功能障碍。

98. 权利要求 97 所述的方法，其中所述的膀胱功能障碍的特征为存在膀胱肥大。

99. 权利要求 97 所述的方法，其中所述的膀胱功能障碍是活动过度性膀胱。

100. 权利要求 97-99 任意一项所述的方法，其中所述的个体雄性动物。

101. 权利要求 97-99 任意一项所述的方法，其中所述的雄性动物同时罹患 BPH。

102. 权利要求 97-99 任意一项所述的方法，其中所述的个体雌性

动物。

103. 权利要求 33 所述的方法，其中所述的维生素 D₃ 化合物是与药学可接受的载体组合施用。

104. 权利要求 70、81、83、7 或 90 任意一项所述的方法，其中所述的维生素 D₃ 化合物是使用药学可接受的配方向所述的个体施用。

105. 权利要求 104 所述的方法，其中在该药学可接受的配方向所述的个体施用后，所述的药学可接受的配方向个体提供了所述维生素 D₃ 化合物持续释放达至少 4 周。

106. 权利要求 81、83、87 或 90 任意一项所述的方法，其中所述免疫球蛋白样转录物 3(ILT3)表面分子的该表达是增量调节。

107. 权利要求 97 所述的方法，其中所述的化合物是与药学可接受的稀释剂或载体一起配制于药物组合物中。

108. 权利要求 98 所述的方法，其中所述的化合物是维生素 D 受体激动剂。

109. 权利要求 33-108 任意一项所述的方法，其中所述的个体是哺乳动物。

110. 权利要求 109 所述的方法，其中所述的个体是人。

111. 权利要求 33、79、81、83、87 或 90 任意一项所述的方法，其中所述的化合物是经口施用。

112. 权利要求 33、79、81、83、87 或 90 任意一项所述的方法，其中所述的化合物是静脉内施用。

113. 权利要求 33、79、81、83、87 或 90 任意一项所述的方法，其中所述的化合物是局部施用。

114. 权利要求 33、79、81、83、87 或 90 任意一项所述的方法，其中化合物是胃肠外施用。

115. 权利要求 33、79、81、83、87 或 90 任意一项所述的方法，其中所述的化合物是以 0.001 μ g-100 μ g/kg 体重的浓度施用。

116. 药物组合物，包括有效量的权利要求 1-32 任意一项的化合物和药学可接受的稀释剂或载体。

117. 权利要求 116 所述的药物组合物，其中所述的有效量治疗维生素 D₃ 相关疾病是有效的。

118. 权利要求 117 所述的药物组合物, 其中所述的维生素 D₃ 相关疾病是 ILT3-相关障碍。

119. 权利要求 117 所述的药物组合物, 其中所述的维生素 D₃ 相关疾病是一种以维生素 D₃-应答细胞的异常活性为特征的障碍。

120. 权利要求 117 所述的药物组合物, 其中所述的维生素 D₃ 相关疾病是膀胱功能障碍。

121. 权利要求 117 所述的药物组合物, 其中所述的障碍是高血压。

122. 用于治疗维生素 D₃ 相关状态的包装化配方, 包括含有权利要求 1-32 任意一项的化合物的药物组合物和指令说明, 以用于治疗维生素 D₃ 相关疾病。

123. 权利要求 122 所述的包装化配方, 其中所述的维生素 D₃ 相关疾病是 ILT3-相关障碍。

124. 权利要求 122 所述的包装化配方, 其中所述的维生素 D₃ 相关疾病是一种以维生素 D₃-应答细胞的异常活性为特征的障碍。

125. 权利要求 122 所述的包装化配方, 其中所述的维生素 D₃ 相关疾病是膀胱功能障碍。

20-环烷基, 26,27-烷基/卤代烷基维生素 D₃ 化合物及其使用方法

相关申请

本申请要求 2004 年 9 月 24 日提交的美国临时专利申请序列号 60/612, 732 的优先权, 其公开以其整体通过引用并入本文。

发明背景

自从 Mellanby 于 1920 年(Mellanby, E. (1921) Spec. Rep. Ser. Med. Res. Council (GB) SRS 61: 4)发现维生素 D(胆骨化醇)以来, 它在高等动物的生物系统中的重要性就是公认的。在 1920-1930 年间, 维生素 D 正式分类为"维生素", 它是骨骼正常发育以及维持钙磷平衡所必需的。

涉及维生素 D₃ 代谢的研究始于血浆代谢物 25-羟基维生素 D₃[25(OH)D₃] (Blunt, J.W.等人(1968) Biochemistry 6: 3317-3322)和激素活性型 1 α ,25(OH)₂D₃ (Myrtle, J.F.等人(1970) J. Biol. Chem. 245: 1190-1196; Norman, A. W.等人(1971) Science 173: 51-54; Lawson, D.E.M.等人(1971) Nature 230: 228-230; Holick, M.F. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 803-804)的发现和化学表征。维生素 D 内分泌系统概念的形成既依赖于肾脏在以谨慎地调节方式而产生 1 α ,25(OH)₂D₃ 的关键作用中的正确评价(Fraser, D.R.和 Kodicek, E (1970) Nature 288: 764-766; Wong, R.G.等人(1972) J. Clin. Invest. 51: 1287-1291), 还依赖于肠内 1 α ,25(OH)₂D₃(VD₃R)的核心受体的发现(Haussler, M.R.等人(1969) Exp. Cell Res. 58: 234-242; Tsai, H.C.和 Norman, A.W. (1972) J. Biol. Chem. 248: 5967-5975)。

维生素 D 内分泌系统的运行依赖于以下方面: 首先, 肝脏(Bergman, T. 和 Postlind, H. (1991) Biochem. J. 276: 427-432; Ohyama, Y.和 Okuda, K. (1991) J. Biol. Chem. 266: 8690-8695)和肾脏(Henry, H.L.和 Norman, A.W. (1974) J. Biol. Chem. 249: 7529-7535; Gray, R. W.和 Ghazarian, IG. (1989) Biochem. J. 259: 561-568)以及多种其它组织中存在的细胞色素 P450 酶影响维生素 D₃ 转化成生物活性代谢物例如 1 α ,25(OH)₂D₃ 和 24R,25(OH)₂D₃; 其次, 血浆维生素 D

结合蛋白(DBP)的存在对这些疏水性分子选择性转运和递送至维生素 D 内分泌系统的各种组织部位的影响(Van Baelen, H.等人(1988) *Ann NY Acad. Sci* 538: 60-68; Cooke, N.E.和 Haddad, J.G. (1989) *Endocr. Rev.* 10: 294-307; Bikle, D.D.等人(1986) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63: 954-959); 以及第三, 广泛存在于各种靶组织的立体选择性受体与激动剂 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 相互作用产生对该开环甾类激素所必需的特异性生物反应(Pike, J.W. (1991) *Annu. Rev. Nutr.* 11: 189-216)。迄今为止, 有证据表明, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3(\text{VD}_3\text{R})$ 的核心受体存在于 30 种以上组织和癌细胞系中(Reichel, H.和 Norman, A.W. (1989) *Annu. Rev. Med.* 40: 71-78)。

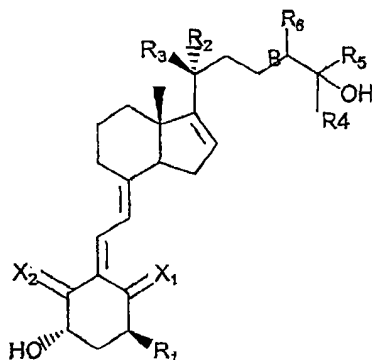
维生素 D_3 及其激素活性型是公知的钙磷平衡的调节剂。已经知道, 这些化合物刺激以下中的至少一种: 小肠钙磷吸收、骨矿物质流动和肾脏中钙的贮留。此外, 发现特异性维生素 D 受体存在于 30 种以上组织中, 这验证了维生素 D_3 是一种除了它对钙/骨平衡的经典作用之外的多向性调节剂。能够将维生素 D_3 氧化成其活性型的酶例如 25-OHD- 1α -羟化酶与在若干组织例如骨、角质化细胞、胎盘及免疫细胞中的特异性受体的组合存在, 提出了 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的旁分泌作用。此外, 已经发现, 维生素 D_3 激素和活性代谢物能够调节正常细胞和恶性细胞的细胞增殖和分化(Reichel, H.等人(1989) *Ann. Rev. Med.* 40: 71-78)。

已知维生素 D_3 及其代谢物的活性, 更多的注意力集中到这些化合物的合成类似物的开发。这些类似物大部分包括在 A 环、B 环、C/D 环以及主要的在侧链上的结构修饰(Bouillon, R.等人, *Endocrine Reviews* 16(2): 201-204)。尽管迄今为止开发的大多数维生素 D_3 类似物包括在侧链上的结构修饰, 少数研究已报道了 A 环非对映异构体的生物学模式(Norman, A.W.等人 *J. Biol. Chem.* 268 (27): 20022-20030)。此外, 已经研究了甾族化合物的生物酯化作用(Hochberg, R.B., (1998) *Endocr Rev.* 19(3): 331-348), 而且维生素 D_3 的酯类是已知的(WO 97/11053)。

此外, 尽管在开发合成类似物方面付出了巨大的努力, 维生素 D 及其结构类似物的临床应用, 受到由这些化合物施用于已知维生素 D 化合物的适应症和应用的个体后所产生的不期望的副作用的限制。

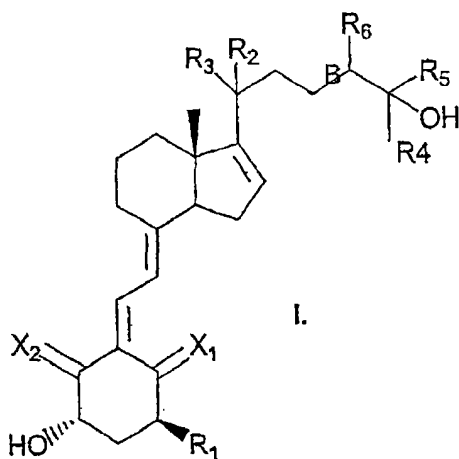
发明概述

本发明涉及下式的维生素 D₃ 化合物:



其中: B 是单键、双键或三键; X₁ 和 X₂ 各自独立地是 H₂ 或 CH₂, 假定 X₁ 和 X₂ 不都是 CH₂; R₁ 是羟基或卤素; R₂、R₃ 和 R₆ 各自独立地是氢、C₁-C₄ 烷基、羟基烷基或卤代烷基, 条件是当 B 是三键或者 R₂ 和 R₃ 与 C₂₀ 一起形成 C₃-C₆ 环烷基时, R₆ 不存在; R₄ 和 R₅ 各自独立地是烷基或卤代烷基; 及其药学可接受的酯、盐和前体药物。

因此, 一方面, 本发明提供了式 I 的维生素 D₃ 化合物:



其中:

B 是单键、双键或三键; X₁ 和 X₂ 各自独立地是 H₂ 或 CH₂, 假定 X₁ 和 X₂ 不都是 CH₂;

R₁ 是羟基或卤素;

R₂ 和 R₃ 与 C₂₀ 一起形成 C₃-C₆ 环烷基;

R₄ 和 R₅ 各自独立地是烷基或卤代烷基;

R_6 是氢、 C_1 - C_4 烷基、羟基烷基或卤代烷基，条件是当 B 是三键时 R_6 不存在；和

其药学可接受的酯、盐和前体药物。

另一方面，所述的方法提供了改善钙磷代谢脱调节的方法。该方法包括向个体施用治疗有效量的式 I 的维生素 D_3 化合物，以便改善钙磷代谢脱调节。

另一方面，本发明提供了调节免疫球蛋白样转录物 3(ILT3) 表面分子在细胞中表达的方法。所述的方法包括将所述的细胞与一定量的式 I 的维生素 D_3 化合物接触，以有效地调节免疫球蛋白样转录物 3(ILT3) 表面分子在细胞中的表达。

再另一方面，本发明提供了在个体中治疗 ILT3-相关障碍的方法。所述的方法包括向个体施用一定量的式 I 的维生素 D_3 化合物，以有效地调节免疫球蛋白样转录物 3(ILT3) 表面分子的表达，从而在个体中治疗 ILT3-相关障碍。

更另一方面，本发明提供了在个体中诱导免疫耐受的方法。所述的方法包括向个体施用一定量的式 I 的维生素 D_3 化合物，以有效地调节 ILT3 表面分子的表达，从而在个体中诱导免疫耐受。

再一方面，本发明提供了在个体中抑制移植排斥的方法。所述的方法包括向个体施用一定量的式 I 的维生素 D_3 化合物，以有效地调节 ILT3 表面分子的表达，从而在个体中抑制移植排斥。

在再另一种实施方案中，本发明提供了在需要的个体中预防或治疗膀胱功能障碍的方法，其通过施用有效量的式 I 的维生素 D_3 化合物，从而在所述的个体中预防或治疗膀胱功能障碍。

再另一方面，本发明提供了用于治疗维生素 D_3 相关疾病的包装化配方。所述的包装化配方包括药物组合物，其包括式 I 的维生素 D_3 化合物和药学可接受的载体，包装了用于治疗维生素 D_3 相关疾病的说明书。

另一方面，本发明提供了用于治 ILT-3 相关障碍的包装化配方。所述的包装化配方包括药物组合物，其包括式 I 的维生素 D_3 化合物和药学可接受的载体，包装了用于治疗 ILT3-相关障碍的说明书。

再一方面，本发明提供了通过抗原呈递细胞调节免疫抑制活性的方法。所述的方法包括将抗原呈递细胞与一定量的式 I 的维生素 D_3 化

合物接触,以有效地调节 ILT3 表面分子表达,从而通过所述的抗原呈递细胞调节免疫抑制活性。

再另一方面,本发明提供了药物组合物。所述的组合物包括有效量的式 I 的维生素 D₃ 化合物和药学可接受的载体。

附图简要说明

参考以下非限制性实施例,并参考以下附图,对本发明进一步描述如下,其中:

图 1 显示在膀胱状细胞中存在维生素 D 受体(VDRs);

图 2 显示骨化三醇(维生素 D₃ 的活性型)有效地抑制膀胱状细胞的基础生长;

图 3 显示在 As4.1 细胞中的肾素抑制作用; 和

图 4 显示在 As4.1 细胞中的肾素抑制作用的剂量响应。

发明详述

1、定义

在进一步描述本发明之前,并且为了使本发明更容易地理解,为方便起见,首先对一些术语在此定义并收集于此。

所述的术语"施用(administration)"或"施用(administering)"包括将所述的维生素 D₃ 化合物(类)导至个体的途径以执行它们的预期功能,可以使用的施用途径的实例包括注射(皮下的、静脉内的、胃肠外的、腹膜内的、鞘内的)、经口、吸入、经直肠和经皮。当然,该药物制剂是以适合于各种施用途径的形式给予。例如,这些制剂是以片剂或胶囊剂的形式、注射剂、吸入剂、洗眼剂、软膏剂、栓剂等施用,通过注射、输注或吸入施用;洗液或软膏剂局部施用;以及栓剂经直肠施用。经口施用是优选的。注射剂可以推注或连续输注。根据施用途径,所述的维生素 D₃ 化合物可以用所选择的材料包衣或包陷于其中,以保护它避开自然条件,该自然条件可以不利地影响它实现预期功能的能力。所述的维生素 D₃ 化合物可以单独施用,或者与上述任一种另一药物结合、或与药学可接受的载体结合、或与两者结合而施用。维生素 D₃ 化合物可以在施用所述的其它药物之前、与所述的药物同时或施用所述的药物之后施用。此外,该维生素 D₃ 化合物还可以以前体

形式施用，该前体形式在体内转化成其活性代谢物或更有效的代谢物。

所述的术语"烷基"是指饱和脂肪族基团的基，包括直链烷基、支链烷基、环烷(脂环族的)基、烷基取代的环烷基和环烷基取代的烷基。所述的术语烷基进一步包括烷基，其可进一步包括取代一个或多个碳氢化合物主链的碳的氧、氮、硫或磷原子，例如氧、氮、硫或磷原子。在优选的实施方案中，直链或支链烷基在其主链中具有30个或更少的碳原子(例如， C_1 - C_{30} 的直链、 C_3 - C_{30} 的支链)，优选26个或更少，更优选20个或更少，再更优选4个或更少。同样，优选的环烷基在其环结构中具有3-10个碳原子，并且更优选在其环结构中具有3、4、5、6或7个碳。

此外，整个说明书和权利要求书中的所述术语烷基意欲包括"未取代的烷基"和"取代的烷基"，其中的后者是指烷基部分，其具有在碳氢化合物主链的一个或多个碳上取代氢的取代基。该取代基可以包括，例如，卤素、羟基、烷基羰氧基、芳基羰氧基、烷氧基羰氧基、芳氧基羰氧基、羧化物、烷基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基硫代羰基、烷氧基、磷酸盐/酯、膦酸基(phosphonato)、次膦酸基(phosphinato)、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基和脒基)、脒基、亚胺基、硫氢基、烷基硫代基、芳基硫代基、硫代羧化物、硫酸化物、磺酸化物、氨磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基或者芳香族或杂芳香族的部分。本领域技术人员可理解，如果合适，在碳氢化合物链上取代的该部分其本身可被取代。环烷基可以进一步被取代，例如被上述取代基取代。"烷基芳基"部分是一个被芳基(例如，苯甲基(苄基))取代的烷基。所述的术语"烷基"还包括在长度和可能的取代基方面类似于上述烷基的不饱和脂肪族基团，但其分别含有至少一个双键或三键。

除非碳数另有说明，如在此使用的"低级烷基"表示如以上定义的烷基，但在其主链结构中具有1至10个碳，更优选1至6个，最优选1至4个碳原子。低级烷基的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、叔丁基、己基、庚基、辛基等。在优选的实施方案中，所述的术语"低级烷基"包括在其主链上具有4个或较少碳原子的直链烷基，例如，

C₁-C₄烷基。

所述的术语"烷氧基烷基"、"多氨基烷基"和"硫代烷氧基烷基"是指如上述的烷基，其进一步包括取代碳氢化合物主链的 1 个或多个碳的氧、氮或硫原子，例如，氧、氮或硫原子。

所述的术语"烯基"和"炔基"是指在长度和可能的取代基方面类似于上述烷基的不饱和脂肪族基团，但其分别含有至少一个双键或三键。例如，本发明着重于氰基和炔丙基。

所述的术语"抗原"包括引起免疫应答的物质。本发明耐受性被诱导的抗原，其外源性产生可与或不与宿主相关。例如，本发明的方法可用于对"自身抗原"诱发耐受性。自身抗原是身体的一种正常成分，其与自身抗体反应。本发明还包括对"异型抗原"诱发耐受性。异型抗原是指一种仅发现于物种的一些成员中的抗原，例如血型物质。同种异体移植物是给予遗传学上相同物种不同成员的移植物。同种异体移植物因 T 淋巴细胞对组织相容性抗原的免疫应答而被排斥。本发明的方法还提供了对"异种抗原"诱发耐受性。异种抗原是因不同物种间的差异引起的免疫反应的物质。为此，异种移植物是从一种物种的成员移植至不同物种的成员的移植物。异种移植物通常在少数几天内由抗体和细胞毒 T 淋巴细胞对组织相容性抗原而被排斥。

所述的术语"抗原呈递细胞"或"APC"包括一种能够向例如 T 辅助细胞呈递抗原的细胞。抗原呈递细胞包括 B 淋巴细胞、辅佐细胞或非淋巴细胞，例如树突状细胞、表皮黑素细胞和单核吞噬细胞，其有助于通过向辅助 T 淋巴细胞呈递抗原而诱发免疫应答。本发明的抗原呈递细胞优选是来自骨髓的，并且包括，但不限于树突状细胞、巨噬细胞、单核细胞。本发明的 APC 可从骨髓、血液、胸腺、表皮、肝脏、胎儿肝脏或脾脏中分离。

所述的术语"抗肿瘤药"和"抗增殖药"在此可替换使用，并且包括具有抑制维生素 D₃-应答细胞增殖的功能特征的药物，例如，抑制具有该特征的赘生物的发展或进展，特别是造血赘生物。

如此处使用的所述的术语"芳基"，是指芳基的基，包括 5-和 6-元单环芳香族基团，其可以包括 0~4 个杂原子，例如苯、吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、苯并 唑、苯并噻唑、三唑、四唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶等。芳基还包括多环稠合的芳香族基团，例如萘基、喹啉

基、吡啶基等。这些在环结构上具有杂原子的芳基还可以指"芳基杂环基"、"杂芳基"或"杂芳族化合物"。芳族环可以在一个或多个环位置被如上述的取代基取代,该取代基例如卤素、羟基、烷氧基、烷基羰氧基、芳基羰氧基、烷氧基羰氧基、芳氧基羰氧基、羧化物、烷基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基硫代羰基、磷酸盐/酯、膦酸基、次膦酸基、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基和脲基)、脒基、亚胺基、硫氢基、烷基硫代基、芳基硫代基、硫代羧化物、硫酸化物、磺酸化物、氨磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基或者芳香族或杂芳香族的部分。芳基还可以与不是芳香族的脂环族或杂环的环稠合或桥接,从而形成多环(例如,四氢萘)。

所述的术语"自身免疫性疾病"或"自身免疫性障碍"是指免疫系统侵袭宿主的自身组织的疾病。在自身免疫性疾病中,患者的免疫耐受系统不能识别自身的抗原,并且这种耐受性丧失的结果是,造成免疫系统对表达抗原的组织产生影响。免疫耐受障碍包括,但不限于,1型胰岛素依赖型糖尿病、成人呼吸窘迫综合征、炎症肠病、皮炎、脑膜炎、血栓性血小板减少性紫癜、斯耶格伦氏综合征(Sjogren's syndrome)、脑炎、眼色素层炎、眼色素层视网膜炎(uveoretinitis)、白细胞粘附缺陷、类风湿性关节炎、风湿热、莱特尔氏综合征(Reiter's syndrome)、牛皮癣关节炎、进行性全身性硬化症、原发性胆汁性肝硬化、天疱疮、类天疱疮、坏死性脉管炎、重症肌无力、多发性硬化症、红斑狼疮、多发性肌炎、结节病、肉芽肿病、血管炎、恶性贫血、CNS炎性障碍、抗原-抗体复合介导的疾病、自身免疫性溶血性贫血症、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、格雷夫斯病(Graves disease)、习惯性自然流产、雷诺氏综合征(Reynard's syndrome)、肾小球肾炎、皮炎(dermatomyositis)、慢性活动性肝炎、腹部疾病、AIDS的自身免疫性并发症、萎缩性胃炎、强直性脊柱炎和阿狄森氏病(Addison's disease)。

术语维生素 D₃ 的"生物活性"包括在应答细胞中由维生素 D₃ 化合物引起的所有活性。它包括由这些化合物引起的基因性或非基因性活性(Gniadecki R.和 Cabverley MJ. (1998) Pharmacology & Toxicology

82: 173-176; Bouillon, R.等人(1995) *Endocrinology Reviews* 16(2): 206-207; Norman A.W.等人(1992) *J. 甾族化合物 Biochem Mol Biol* 41: 231-240; Baran D.T.等人(1991) *J. Bone Miner Res.* 6: 1269-1275; Caffrey J.M.和 Farach-Carson M.C. (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 20265-20274; Nemere I.等人(1984) *Endocrinology* 115: 1476-1483)。

"膀胱功能障碍"意思是与逼尿肌过度活动伴发的膀胱疾病, 例如, 临床性 BPH 或膀胱活动过度。在本发明的上下文中, "膀胱功能障碍"不包括膀胱癌。

所述的术语"骨代谢"包括对骨结构的形成和退化的直接或间接作用, 例如骨形成、骨吸收等, 其可以最终地影响血清中钙磷浓度。该术语还意欲包括本发明化合物对骨细胞的作用, 例如破骨细胞和成骨细胞, 其可依次导致骨形成和退化。

所述的术语"钙磷平衡"是指细胞内和细胞外的钙磷浓度的细微平衡, 其由细胞、组织、器官或系统中的钙磷浓度的波动而触发的。起因于对本发明化合物的直接或间接应答的钙水平的波动也意欲包含于这些术语中。

所述的术语"癌"是本领域公认的, 并且是指上皮或内分泌组织的恶性肿瘤, 包括呼吸系统癌、胃肠系统癌、生殖泌尿系统癌、睾丸癌、乳腺癌、前列腺癌、内分泌系统癌和黑素瘤。示例性的癌包括由子宫颈、肺、前列腺、膀胱、乳腺、头和颈、结肠和卵巢组织形成的那些。所述的术语还包括癌肉瘤, 例如, 其包括癌性和肉瘤性组织的恶性肿瘤。"腺癌"是指产生于腺组织的癌或者其中该肿瘤细胞形成可辨别的腺结构。

所述的术语"手性"是指具有镜像体无重叠能力(non-superimposability)的特征的分子, 而所述的术语"非手性"是指在其镜像体上能重叠的分子。

所述的术语"非对映体"是指具有 2 个或更多个不对称中心的立体异构体, 并且它们的分子相互间不为镜像。

所述的术语"有效量"包括一种量, 其以必要的剂量和时间阶段有效地达到期望的结果, 例如充分治疗维生素 D₃ 相关状态, 或者调节 ILT3 在细胞中的表达。维生素 D₃ 化合物的有效量可以根据例如疾病状态、年龄和个体体重的因素而改变, 维生素 D₃ 化合物在个体中引起期

望的应答的能力。给药方案可以调节以提供最佳的治疗应答。有效量还是这样的剂量，其中维生素 D₃ 化合物的任何毒性和有害作用(例如，副作用)不及治疗有益作用有价值的。

治疗有效量的维生素 D₃ 化合物(即，有效剂量)可以为约 0.001 ~ 30 µg/kg 体重，优选约 0.01 ~ 25 µg/kg 体重，更优选约 0.1 ~ 20 µg/kg 体重，再更优选约 1 ~ 10 µg/kg、2 ~ 9 µg/kg、3 ~ 8 µg/kg、4 ~ 7 µg/kg 或 5 ~ 6 µg/kg 体重。本领域技术人员可以理解，某些因素可影响需要有效地治疗个体的剂量，包括但不限于疾病或障碍的严重性、在先的治疗、一般健康和/或个体年龄，以及其它疾病的存在。此外，用治疗有效量的维生素 D₃ 化合物的个体治疗可以包括单次治疗，优选的，可以包括一连串的治疗。在一个实施例中，用约 0.1 ~ 20 µg/kg 体重的维生素 D₃ 化合物治疗个体，每周一次，历经约 1 ~ 10 周，优选 2 ~ 8 周，更优选约 3 ~ 7 周，再更优选历经约 4、5 或 6 周。还可以理解，用于治疗维生素 D₃ 化合物的该有效剂量可以在特定治疗过程中增加或减少。

所述的术语"对映体"是指化合物的 2 个立体异构体，其为相互间不能重叠的镜像。2 个对映体的等摩尔混合物称为"外消旋混合物"或"外消旋化合物"。

所述的术语维生素 D₃ 的"基因性"活性或作用意欲包括由 1 α ,25(OH)₂D₃(VD₃R)的核心受体介导的那些活性，例如，靶基因的转录激活。

所述的术语"卤代烷基"意欲包括如以上定义的烷基，其被卤素单、二或多取代，例如，氟甲基和三氟甲基。

所述的术语"卤素"指-F、-Cl、-Br 或-I。

所述的术语"羟基"表示-OH。

如在此使用的，所述的术语"杂原子"表示除碳或氢以外的任何元素。优选的杂原子是氮、氧、硫和磷。

所述的术语"平衡"是本领域公认的，表示在内环境中的静态或恒定状况的维持。

所述的术语"激素分泌"是本领域公认的，并且包括控制对给定激素分泌的转录和处理的维生素 D₃ 化合物的活性，该激素例如维生素 D₃ 应答细胞的甲状旁腺素(PTH) (Bouillon, R.等人(1995) *Endocrine Reviews* 16(2): 235-237)。

所述的术语"高钙血症"或"血钙过高活动"意欲具有其公认的临床意义,即,钙血清水平增加,其在个体中呈现以下副作用:中枢和周围神经系统抑制、肌肉无力、便秘、腹痛、食欲缺乏以及心脏舒张期的低下性松弛。高钙血症的症状表现为至少一种以下活动刺激而触发:肠钙运输、骨钙代谢和成骨素(osteocalcin)合成(由 Boullion, R.等人(1995) *Endocrinology Reviews* 16(2): 200-257 综述)。

所述的术语"过度增殖"和"肿瘤"可互换使用,并且包括那些具有自发生长能力的细胞,即,以细胞生长迅速增殖为特征的异常的状态或疾病。过度增殖和肿瘤的疾病状态可分类为病理的,即,表征或构成疾病状态,或者可分类为非病理的,即,偏离于正常但未伴发疾病状态。该术语是指包括所有类型的癌性生长或致癌过程,转移性组织或恶性变异性细胞、组织或器官,而不考虑组织病理学类型和侵袭阶段。"病理性过度增殖"细胞出现于以恶性肿瘤生长为特征的疾病状态中。非病理性过度增殖细胞的实例包括与伤口修复相关的细胞增殖。

所述的术语"免疫球蛋白样转录物 3"或"ILT3"是指免疫球蛋白超家族的细胞表面分子,其由抗原呈递细胞(APC)例如单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞表达。ILT3 是免疫球蛋白样转录物(ILT)家庭的成员,并呈现出长的胞质尾区,其含有假想的免疫受体酪氨酸基抑制性基序(ITIM)。当与刺激性受体交联时,ILT3 显示出抑制性受体行为。介导信号通路的 ILT3 的细胞质成分是含有 SH2 的磷酸酶 SHP-1,其与交联的 ILT3 相关。ILT3 还被内在化(internalized),并且 ILT3 配体有效地呈递出特异性 T 细胞(见,例如, Cella, M.等人(1997) *J. Exp. Med.* 185: 1743)。该候选维生素 D₃化合物是否调节 ILT3 表面分子的表达的测定,其例如可以通过与对照组比较 ILT3 表面分子表达,通过测定 mRNA 表达或者通过测定蛋白表达而完成测定。

"ILT3-相关障碍"包括与 ILT3 分子有相关的疾病、障碍或疾病。ILT3 相关障碍包括这种障碍,即其中的 ILT3 活性异常或者可从 ILT3 活性调节获益的非 ILT3 活性异常。在一种实施方案中,该 ILT3-相关障碍是一种免疫性障碍,例如,一种自身免疫性障碍,如 1 型胰岛素依赖型糖尿病、成人呼吸窘迫综合征、炎性肠病、皮炎、脑膜炎、血栓性血小板减少性紫癜、斯耶格伦氏综合征、脑炎、眼色素层炎、眼色素层视网膜炎、白细胞粘附缺陷、类风湿性关节炎、风湿热、莱特

尔氏综合征、牛皮癣关节炎、进行性全身性硬化症、原发性胆汁性肝硬化、天疱疮、类天疱疮、坏死性脉管炎、重症肌无力、多发性硬化症、红斑狼疮、多发性肌炎、结节病、肉芽肿病、血管炎、恶性贫血、CNS 炎性障碍、抗原-抗体复合介导的疾病、自身免疫性溶血性贫血症、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、习惯性自然流产、雷诺氏综合征、肾小球肾炎、皮炎、慢性活动性肝炎、腹部疾病、AIDS 的自身免疫性并发症、萎缩性胃炎、强直性脊柱炎和阿狄森氏病；或者移植排斥，如 GVHD。在本发明的某些实施方案中，ILT3 相关障碍是一种免疫性障碍，如移植排斥、移植物抗宿主病和自身免疫性障碍。

所述的术语"免疫应答"包括 T 和/或 B 细胞应答，例如，细胞的和/或体液的免疫应答。本发明要求的方法可用于原发性和继发性免疫应答。个体的该免疫应答可以通过例如测定抗体产生、免疫细胞增殖、细胞因子释放、细胞表面标记的表达、细胞毒性等而测定。

所述的术语"免疫耐受性(immunological tolerance)"或"耐受抗原"或"免疫耐受性"包括对抗原无应答，不诱导延长的全身性免疫缺陷。因而，根据本发明，能耐受的宿主除耐受抗原外还能够对抗原发生反应。耐受性表示在个体应答中的诱导抑制，该个体未经过诱导耐受性过程，能够对抗原发生免疫应答。在本发明的一种实施方案中，免疫耐受性在抗原呈递细胞中被诱导，例如，产生于骨髓样或淋巴样家族的抗原呈递细胞、树突状细胞、单核细胞和巨噬细胞。

所述的术语"免疫抑制活性"是指抑制正常免疫应答的过程。当淋巴细胞 T 和/或 B 克隆量减少或者其反应性被抑制时，该应答中包含扩张或分化。免疫抑制活性可以是抑制或阻断已经进行中的免疫应答的形式，或者可以包括防止诱导免疫应答。激活的 T 细胞的功能可以被抑制免疫细胞应答或者被诱导特异性耐受性而抑制，或者被二者抑制。T 细胞应答的免疫抑制通常是有效的、非抗原特异性的过程，其需要连续地将 T 细胞暴露于抑制剂。包括在 T 细胞中诱导非应答性或无反应性的耐受性，其与免疫抑制的区别在于，它通常是抗原特异性的，并且在终止暴露于耐受剂(tolerizing agent)后仍然持续。操作上，耐受性可以通过在无耐受剂时，T 细胞对再暴露于特异性抗原的应答缺乏而证实。

所述的术语"改善的生物学性质"是指本发明化合物的任何内在活

性，其在体内增强了它的有效性。在优选的实施方案中，该术语是指任何定性或定量的改善维生素 D₃ 化合物的治疗性质，例如毒性减少，如血钙过高活动减少。

所述的术语赘生物的"抑制生长"包括延缓、中断、阻止或终止其生长和转移，并且不必要表明肿瘤生长完全消失。

所述的短语"免疫应答的抑制"意欲包括减少 T 细胞增殖和活性，例如，减少 IL₂、干扰素- γ 、GM-CSF 合成和分泌(Lemire, J. M. (1992) J. Cell Biochemistry 49: 26-31; Lemire, J. M.等人(1994) Endocrinology 135 (6): 2813-2821; Bouillon, R.等人(1995) Endocrine Review 16 (2): 231-32)。

所述的术语"异构体"或"立体异构体"是指具有相同化学结构，但原子和基团在空间上的排列不同的化合物。

所述的术语"白血病(leukemia)"具有其临床含义，即，一种肿瘤性疾病，其中在细胞发育的初始阶段白细胞成熟被阻止。该疾病的特征在于骨髓中白血病母细胞的数目增加，以及正常造血细胞生成的不同程度的衰竭。疾病可以是急性或慢性的。进一步地，白血病典型地分类为淋巴细胞性白血病，即其特征在于其细胞与正常淋巴细胞具有相同的特征，或者髓细胞性(或骨髓内生成性)白血病，即其特征在于其细胞具有正常粒细胞的某些特征。急性淋巴细胞性白血病("ALL")出现于淋巴组织，并且通常首先表现为出现于骨髓。急性髓细胞性白血病("AML")产生于骨髓造血干细胞或它们的后代。术语急性髓细胞性白血病包括数种白血病亚型：原粒细胞白血病、早幼粒细胞白血病和骨髓单核细胞白血病。另外，具有红细胞性或巨核细胞特征的白血病也称为骨髓性白血病。

所述的术语"白血病癌"是指所有的造血或免疫系统的癌症或肿瘤(血液或淋巴系统)。急性和慢性白血病，连同其它类型的血液、骨髓细胞(骨髓瘤)和淋巴组织(淋巴瘤)的肿瘤，是造成全部癌症死亡约 10% 的原因，还是造成儿童和 30 岁以下成人全部癌症死亡约 50% 的原因。慢性骨髓性白血病(CML)还称为慢性粒细胞性白血病(CGL)，其为一种造血干细胞的肿瘤障碍。所述的术语"白血病"是本领域公认的，并且是指一种造血器官的进行性、恶性疾病，其标志在于在血液和骨髓中的粒细胞及其前体的畸形的增殖和发育。

所述的术语"调节"是指对暴露于本发明化合物应答的细胞活性增加或减少,例如,动物中至少一个细胞亚群的抑制增殖和/或诱导分化从而达到期望的最终结果,例如治疗结果。在优选的实施方案中,该短语意欲包括导致病理性障碍的活动过度性疾病。

普通医学意义上的所述的术语"肿瘤形成"是指"新细胞生长",其导致对正常生长控制的应答性丧失,例如指肿瘤细胞生长。"增生"是指细胞历经异常高速的生长。然而,如此处使用的,术语肿瘤形成和增生可以互换使用,如上下文所论述的,通常是指细胞经历异常的细胞生长速度。肿瘤形成和增生包括"肿瘤",其可以是良性的、恶化前的或恶性的。

所述的术语"非基因性"维生素 D₃活性包括在应答细胞中的由维生素 D₃ 化合物引起的细胞活性(例如,穿过组织的钙转动)和亚细胞活性(例如,电压门控钙通道的开启的膜钙转运,细胞内第二信使的改变)。检测这些活性的电生理和生物化学技术是本领域已知的。特别充分地研究的非基因性活性的实例是肠内钙转运的快速激素性刺激,称为"转钙作用(transcaltachia)"(Nemere I.等人(1984) *Endocrinology* 115: 1476-1483; Lieberherr M.等人(1989) *J. Biol. Chem.* 264: 20403-20406; Wali R.K.等人(1992) *Endocrinology* 131: 1125-1133; Wali R.K.等人(1992) *Am. J. Physiol.* 262: G945-G953; Wali R.K.等人(1990) *J. Clin. Invest.* 85: 1296-1303; Bolt M.J.G. 等人(1993) *Biochem. J.* 292: 271-276)。试验性转钙作用的详细描述提供于 Norman, A.W. (1993) *Endocrinology* 268(27): 20022-20030; Yoshimoto, Y.和 Norman, A.W. (1986) *Endocrinology* 118: 2300-2304 中。钙活动变化和第二信使系统是本领域公知的,并且充分地综述于 Bouillion, R.等人(1995) *Endocrinology Review* 16(2): 200-257 中,其说明书通过引用并入本文。

如此处使用的,所述的术语"获得"包括购买、合成、分离或其它方面获得一种或多种用于实施本发明的维生素 D 化合物。

如在此使用的,所述的短语"胃肠外施用"和"施用于胃肠外"表示除了肠内和局部施用以外的施用方式。通常通过注射,并且非限制性地包括,静脉内的、肌内的、动脉内的、鞘内的、囊内的、眶内的、心内的、皮内的、腹膜内的、经气管的、皮下的、表皮下的、关节内的(intraarticulare)、囊下的、蛛网膜下的、脊柱内的和胸骨内的注射

和输注。

所述的术语"多环基"或"多环的基"是指 2 个或多个环状的环的基(例如, 环烷基、环烯基、环炔基、芳基和/或杂环基), 其中 2 个或多个碳为两个邻接的环共有, 例如, 该环为"稠合环"。通过非邻近原子结合的环称为"桥接"环。多环的各个环可以被如上述的取代基取代, 例如, 卤素、羟基、烷基羰氧基、芳基羰氧基、烷氧基羰氧基、芳氧基羰氧基、羧化物、烷基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基硫代羰基、烷氧基、磷酸盐/酯、膦酸基、次膦酸基、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、和烷基芳基氨基)、酰氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基和脲基)、脒基、亚胺基、硫氢基、烷基硫代基、芳基硫代基、硫代羧化物、硫酸化物、磺酸化物、氨磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氨基、杂环基、烷基、烷基芳基或者芳香族或杂芳香族的部分。

所述的术语"前体药物"包括具有能在体内被代谢的部分的化合物。通常, 该前体药物在体内通过酯酶或通过其它机制被代谢成活性药物。前体药物的实例及其用途是本领域公知的(见, 例如, Berge 等人(1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci 66: 1-19)。前体药物可以在化合物的最终分离或纯化时原位制备, 或者分别通过将纯化的化合物以其游离酸型或羟基与适合的酯化剂反应。羟基可以通过用羧酸处理而转化成酯类。前体药物部分的实例包括取代的和未取代的、分支或未分支的低级烷基酯部分, (例如, 丙酸(propionic acid)酯类)、低级烯基酯类、二低级烷基氨基低级烷基酯类(例如, 二甲基氨基乙基酯)、酰氨基低级烷基酯类(例如, 乙酰氧基甲基酯)、酰氧基低级烷基酯类(例如, 特戊酰氧基甲基酯)、芳基酯类(苯基酯)、芳基-低级烷基酯类(例如, 苄基酯)、取代的(例如, 用甲基、卤素或甲氧基取代基)芳基和芳基-低级烷基酯类、酰胺类、低级-烷基酰胺类、二低级烷基芳基酰胺类和羟基酰胺类。优选的前体药物部分是丙酸酯类和酰基酯类。还包括在体内通过其它机制转化成活性形式的前体药物。

化合物的所述的术语"预防有效的抗肿瘤量", 其是指式(I)或在此另外描述的维生素 D₃ 化合物的量, 其以单或多剂量施用于患者是有效的, 以预防或延缓肿瘤疾病状态发病的发生。

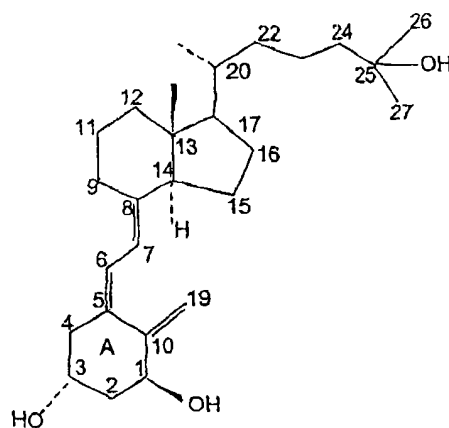
所述的术语"牛皮癣"具有其医学含义, 即一种疾病, 其主要地使

皮肤痛苦, 并产生隆起、增厚、脱皮(scaling)、非斑痕化损伤。该损伤常常是边界清楚(sharply demarcated)的红斑性丘疹, 其被重叠的有光泽的鳞屑覆盖。该鳞屑典型地为银色或微乳色。累及指甲而经常导致剥蚀(pitting)、指甲分离、增厚和变色发生。牛皮癣有时与关节炎有关, 并且其可以致死。

所述的术语"毒性减小"意欲包括减小由体内施用维生素 D₃ 化合物时引起的不希望的副作用。例如, 减小血钙过高活动。

所述的术语"肉瘤"是本领域公认的, 并且是指恶性的间充质细胞诱导的肿瘤。

所述的术语"开环甾族化合物"是本领域公认的, 并且包括甾族化合物环结构的一个全氢环戊烷-菲环是断开的化合物。1 α ,25(OH)₂D₃ 及其类似物是激素活性的开环甾族化合物。至于维生素 D₃, B 环的 9-10 碳-碳键是断开的, 产生断-B-甾族化合物。维生素 D₃ 的正式的 IUPAC 名称是 9,10-断胆甾-5,7,10(19)-三烯-3B-醇。为方便起见, 在此说明 1 α ,25(OH)₂D₃ 的 6-s-反式构象异构体, 其使用标准甾族化合物标记法, 具有全部碳原子编号。



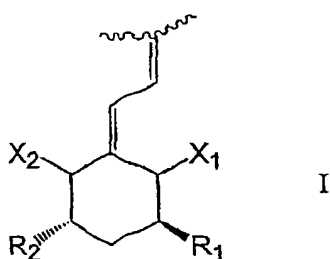
在此出现的式中, 在环 A 上的不同取代基通过以下符号说明与甾族化合物核结合: 虚线(---)或(·····)表示 β -取向(即, 在环平面以上)的取代基, 楔形实线(◀)表示 α -取向(即, 在分子平面以下)的取代基, 或者波浪线(~~~~)表示可以在环平面以上或以下的取代基。关于环 A, 应当理解, 在维生素 D 领域中的立体化学规定是与普通化学领域相反的, 在普通化学领域中, 虚线表示在环 A 上的 α -取向(即, 在分子平面以下)的取代基, 并且楔形实线表示在环 A 上的 β -取向(即, 在环平面

以上)的取代基。如所示的, 激素 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的 A 环在碳 1 和 3 上含有 2 个不对称中心, 各含一个适当特征构型的羟基, 即 1α -和 3β -羟基。换句话说, A 环的碳 1 和 3 称为"手性碳"或"碳中心"。

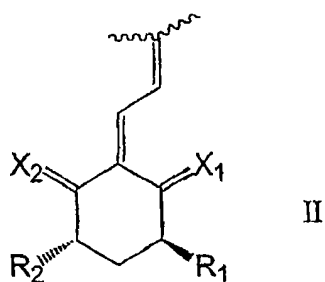
此外, 立体化学交叉表示的碳-碳双键也与普通化学领域相反, 在普通化学领域, "Z"是指其通常所指的"顺式"(同侧)构象, 而"E"是指其通常所指的"反式"(对侧)构象。如所示的, 激素 $1-\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的 A 环在碳 1 和 3 上含有 2 个不对称中心, 各含一个适当特征构型的羟基, 即 $1-\alpha$ -和 $3-\beta$ -羟基。换句话说, A 环的碳 1 和 3 称为"手性碳"或"碳中心"。两种构型, 不论顺式/反式和/或 Z/E, 均为用于本发明化合物所考虑的。

关于手性中心的命名法, 所述的术语"d"和"l"构型由 IUPAC 推荐所确定。如所用的所述术语, 非对映体、外消旋化合物、差向异构体和对映体, 这些术语将用于其正常的上下文中以描述制品的立体化学。

而且, 在整个专利文献中, 维生素 D 化合物的 A 环常以如以下结构的任一通式描述:



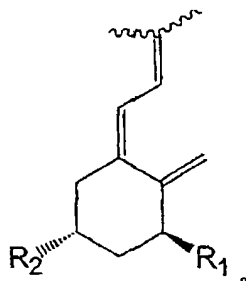
其中 X_1 和 X_2 定义为 H 或 $=\text{CH}_2$; 或者



其中 X_1 和 X_2 定义为 H_2 或 CH_2 。

尽管未出现任何组合约定, 本领域普通技术人员可清楚地理解,

式 I 或 II 均可表示 A 环, 其中例如, X_1 是 $=CH_2$ 并且 X_2 定义为 H_2 , 如下:



为了本发明的目的, 式 II 将用于所有的通用结构。

所述的术语"硫氢基(sulfhydryl)"或"硫羧(thiol)"表示-SH。

所述的术语"个体"包括能够罹患维生素 D_3 相关状态的有机体, 或者其可以在其它方面从施用本发明维生素 D_3 化合物中受益, 该个体例如人类或非人类动物。优选人类动物, 包括罹患难或易于罹患如此处所述的维生素 D_3 相关状态的人类患者。本发明所述的术语"非人类动物"包括所有的脊椎动物, 例如, 哺乳动物, 例如, 啮齿类, 例如, 小鼠, 以及非哺乳动物例如非人类的灵长类、羊、犬、牛、鸡、两栖动物、爬行类动物等。

如在此使用的, 所述的短语"全身施用"、"施用于全身"、"周围施用"和"施用于周围"表示维生素 D_3 化合物(类)、药物或其它材料的施用, 以致其进入患者的全身, 并且因此其历经代谢和其它类似过程, 例如, 皮下施用。

本发明的维生素 D_3 化合物的所述术语"治疗有效的抗肿瘤量"是指一种化合物的量, 在抑制肿瘤维生素 D_3 -应答细胞的生长, 或在延长患有该瘤细胞的患者生存能力中, 该量在单次或多次施用于患者时是有效的, 以超过无该治疗时所期待的效果。

所述的术语"移植排斥"是指直接抑制从其他的人类供体(同种异体移植类)或者从其他物种例如羊、猪或非人类的灵长类(异种移植物类)所移植的器官的免疫反应。因此, 本发明的该方法可用于预防对从其他的人类供体(同种异体移植类)或者从其他物种(异种移植物类)所移植的器官的免疫反应。用于移植的该组织包括, 但不限于, 心脏、肝脏、肾脏、肺脏、胰脏、胰岛、骨髓、脑组织、角质层、骨、肠、皮肤、

和造血细胞。在该定义中还包括的是"移植物抗宿主病(GVHD)", 其是一种疾病, 其中该移植物细胞侵入抑制宿主的免疫应答。因此, 在移植骨髓或淋巴组织以治疗例如急性白血病、再生障碍性贫血和酶或免疫缺陷时失配情况下, 本发明的方法可用于抑制移植物抗宿主病。所述的术语"移植排斥" 还包括以器官功能丧失为特征的疾病症状。例如, 肾排斥反应的特征是血中肌酸水平升高。心脏排斥反应的特征是心内膜心肌活检(endomyocardial biopsy), 而胰脏排斥反应的特征是血糖水平升高。肝脏排斥反应的特征是血中肝源性转氨酶水平和胆红素水平。肠排斥反应是通过活组织检查测定的, 而肺排斥反应是通过血氧合测定法测定的。

所述的术语维生素 D 受体("VDR")意欲包括受体的 II 型类别的甾族化合物/甲状腺超家族的成员(Stunnenberg, H.G. (1993) *Bio Essays* 15(5): 309-15), 在配体缺乏时其能够通过维生素 D 应答单元(VDRE)结合并反向激活(transactivate)(Damm 等人(1989) *Nature* 339: 593-97; Sap 等人, *Nature* 343: 177-180)。

所述的术语"VDRE"是指以正向重复半位排列组成的 DNA 序列。本领域已知, II 型受体不结合它们的各自结合位点为同型二聚体, 但需要辅助因子 RXR(例如 $RXR\alpha$ 、 $RXR\beta$ 、 $RXR\gamma$)以高亲和力结合(Yu 等人(1991) *Cell* 67: 1251-1266; Bugge 等人(1992) *EMBO J.* 11: 1409-1418; Kliewer 等人(1992) *Nature* 355: 446-449; Leid 等人(1992) *EMBO J.* 11: 1419-1435; Zhang 等人(1992) *Nature* 355: 441-446)。

所述的术语"维生素 D₃相关状态"是一种通过施用一种或多种本发明化合物而预防、治疗或另外改善的状态。维生素 D₃ 相关状态包括 ILT3-相关障碍、以维生素 D₃-应答细胞的异常活性为特征的障碍、以钙磷代谢的脱调节为特征的障碍和其它在此描述的障碍或状态。

所述的术语"维生素 D₃-应答细胞"包括能够对具有式 I 或其它在此描述的维生素 D₃ 化合物产生应答的任何细胞, 或者是与包括过度增殖的皮肤细胞、甲状旁腺细胞、瘤细胞、免疫细胞和骨细胞的异常活性的障碍相关的细胞。这些细胞能对维生素 D₃ 活化产生应答, 其通过触发基因性和/或非基因性应答, 该应答最后导致细胞增殖的调节, 分化残余物和/或其它细胞活性例如激素分泌。在优选的实施方案中, 细胞的最终应答是细胞增殖的抑制和/或特定基因的诱导分化。示例性的维

生素 D₃ 应答细胞包括免疫细胞、骨细胞、神经元细胞、内分泌细胞、瘤细胞、表皮细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等。

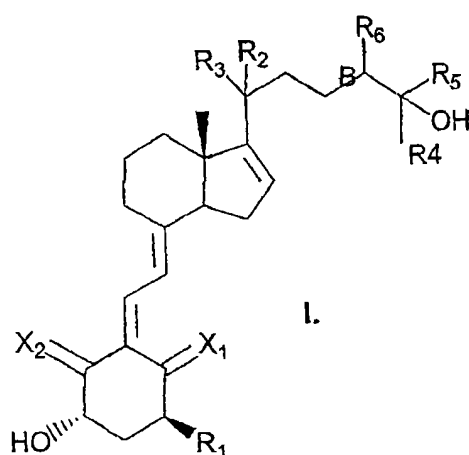
关于手性中心的命名法,术语"d"和"l"构型是由 IUPAC 推荐定义的。至于应用的所述的术语,非对映体、外消旋化合物、差向异构体和对映体将在其正规的上下文中使用以描述制品的立体化学。

2、本发明的维生素 D₃ 化合物

本发明的维生素 D₃ 化合物的突出特征包括 1,3-二羟基取代于 A 环、20-环丙基在侧链以及 16-烯双键在 B 环。Manchand 等人的美国专利 6,492,353B1 描述了 1,3-二羟基,20-环丙基维生素 D₃ 化合物。然而,任何特别地描述于美国专利 6,492,353B1 中的该化合物被排除在所附权利要求之外。

以上式 I 的维生素 D₃ 化合物产生完整的 1,25(OH)₂D₃ 生物活性谱,例如与特异性核受体 VDR 结合、抑制在 5,6-肾切除大鼠中甲状旁腺激素水平的增加、抑制 MLR 细胞中 INF-γ 的释放、刺激 HL-60 白血病细胞分化以及抑制实体瘤细胞增殖。公知的是,体内和细胞培养 1,25-(OH)₂D₃ 历经由 24R-羟化酶影响而引起的代谢修饰的级联。首先形成 24R-羟基代谢产物,其被氧化成 24-酮中间体,然后 23S-羟基化并断裂产生完全无活性的维生素 D₃-23 羧酸(calcitroic acid)。

为此,一方面,本发明提供了式 I 的维生素 D₃ 化合物:



其中:

B 是单键、双键或三键;

X₁ 和 X₂ 各自独立地是 H₂ 或 CH₂, 假定 X₁ 和 X₂ 不都是 CH₂;

R_1 是羟基或卤素;

R_2 和 R_3 与 C_{20} 一起形成 C_3 - C_6 环烷基;

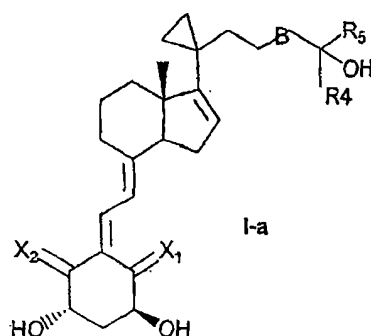
R_4 和 R_5 各自独立地是烷基或卤代烷基;

R_6 是氢、 C_1 - C_4 烷基、羟基烷基或卤代烷基, 条件是当 B 是三键时 R_6 不存在; 和

药学可接受的酯类、盐类及其前体药物。

在一种实施方案中, R_1 是羟基。在另一种实施方案中, B 是单键、双键或三键。在另一种实施方案中, X_1 是 CH_2 并且 X_2 是 H_2 , 或者均为 H_2 。在进一步的实施方案中, R_4 和 R_5 各自独立地是烷基或卤代烷基, 优选烷基或三卤代烷基, 优选甲基或三氟甲基。在另一种实施方案中, R_2 和 R_3 与 C_{20} 一起形成 C_3 - C_6 环烷基, 优选环丙基。

在另一种实施方案中, 本发明提供了式 I-a 的维生素 D_3 化合物



其中:

B 是单键、双键或三键;

X_1 和 X_2 各自独立地是 H_2 或 CH_2 , 假定 X_1 和 X_2 不都是 CH_2 ; 和 R_4 和 R_5 各自独立地是烷基或卤代烷基。

在进一步的实施方案中, X_1 是 CH_2 并且 X_2 是 H_2 。在优选的实施方案中, B 是三键, 并且 R_4 和 R_5 是烷基或卤代烷基。优选的, R_4 和 R_5 优选为烷基或三卤代烷基, 优选甲基或三氟甲基。在另一种实施方案中, B 是双键并且 R_4 和 R_5 为卤代烷基, 优选三卤代烷基, 优选三氟甲基。在再一优选的实施方案中, B 是单键并且 R_4 和 R_5 是烷基, 优选甲基。

在另一种实施方案中, X_1 和 X_2 各自是 H_2 。在优选的实施方案中, B 是三键并且 R_4 和 R_5 是烷基或卤代烷基。优选的, R_4 和 R_5 是烷基或

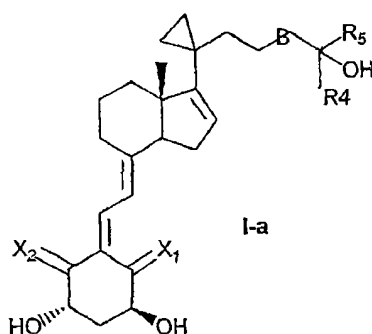
三卤代烷基, 优选甲基或三氟甲基。在另一优选的实施方案, B 是双键并且 R_4 和 R_5 是卤代烷基, 优选三卤代烷基, 优选三氟甲基。在再一种实施方案中, B 是单键并且 R_4 和 R_5 是烷基, 优选甲基。

本发明的其它优选的化合物包括如下: 1,25-二羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-胆骨化醇(1)、1,25-二羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇(2)、1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23-炔-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(3)、1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(4)、1,25-二羟基-16,23E-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(5)、1,25-二羟基-16,23E-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇(6)、1,25-二羟基-16,23Z-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(7)、1,25-二羟基-16,23Z-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇(8)、1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇(9)和 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇(10)。

本发明另外优选的化合物包括如下: 1α -氟-25-羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-胆骨化醇(11)、 1α -氟-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(12)、 1α -氟-25-羟基-16,23E-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇(13)和 1α -氟-25-羟基-16,23Z-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇(14)。

本发明优选的化合物概述于表 1 中。

表 1

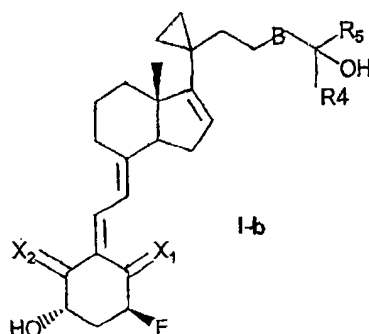


化合物 ^a	X ₁	B	R ₄	R ₅
(1)	CH ₂	≡	CH ₃	CH ₃
(2)	H ₂	≡	CH ₃	CH ₃
(3)	H ₂	≡	CF ₃	CF ₃
(4)	CH ₂	≡	CF ₃	CF ₃
(5)	H ₂	=	CF ₃	CF ₃
(6)	CH ₂	=	CF ₃	CF ₃
(7) ^b	H ₂	=	CF ₃	CF ₃
(8) ^b	CH ₂	=	CF ₃	CF ₃
(9)	H ₂	—	CH ₃	CH ₃
(10)	CH ₂	—	CH ₃	CH ₃

^aX₂ 是 H₂。 ^b 顺式烯烃。

本发明另外优选的化合物概述于表 2 中。

表 2



化合物 ^a	X ₁	B	R ₄	R ₅
(11)	CH ₂	≡	CH ₃	CH ₃
(12)	CH ₂	≡	CF ₃	CF ₃
(13)	CH ₂	=	CF ₃	CF ₃
(14) ^b	CH ₂	=	CF ₃	CF ₃

^aX₂ 是 H₂。 ^b 顺式烯烃。

本发明某些化合物的结构包括不对称碳原子。相应地，产生于该不对称的异构体(例如，所有的对映体和非对映体)包括在本发明的范围内，除非另有说明。该异构体可以通过经典的分离技术和/或通过立体

化学控制合成而获得基本上纯净的形式。

天然产生的或合成的异构体可以以本领域已知的多种方式分离。分离两个对映体的外消旋混合物的方法包括使用手性固定相的色谱法(见,例如, "Chiral Liquid Chromatography," WJ. Lough, Ed. Chapman and Hall, New York (1989))。对映体还可以通过经典的分离技术分离。例如, 形成非对映体的盐以及分步结晶可用于分离对映体。对于羧酸类的对映体的分离, 该非对映体的盐类可通过添加对映体纯的手性碱类例如番木鳖碱、奎宁、麻黄碱、马钱子碱等而形成。另外, 非对映体的酯类可以用对映体纯的手性醇例如甲醇而形成, 接着分离该非对映体的酯类并水解, 产生游离的、对映体富集的羧酸。对于氨基化合物的光学异构体的分离, 添加手性的羧酸或磺酸类, 例如樟脑磺酸、酒石酸、扁桃酸或乳酸可以导致非对映体的盐类的形成。

3、本发明的维生素 D₃化合物的用途

一方面, 本发明提供了治疗个体的维生素 D₃相关状态的方法, 包括向所述需要的个体施用有效量的本发明式 I 的维生素 D₃化合物, 该式 I 化合物包括式 Ia 和 Ib 的化合物类, 并且优选其中的上述化合物, 这样所述的个体治疗了所述的维生素 D₃相关状态。

在一种实施方案中, 该方法进一步包括获得该维生素 D₃化合物的步骤。在另一种实施方案中, 该方法进一步包括鉴别需要治疗维生素 D₃相关状态的个体。

在进一步的实施方案中, 该维生素 D₃相关状态是 ILT3-相关障碍。在另一种实施方案中, 该 ILT3-相关障碍是免疫障碍。在另一种实施方案中, 该免疫障碍是自身免疫性障碍。

在另一种实施方案中, 该自身免疫性障碍选自 1 型胰岛素依赖型糖尿病、成人呼吸窘迫综合征、炎性肠病、皮炎、脑膜炎、血栓性血小板减少性紫癜、斯耶格伦氏综合征、脑炎、眼色素层炎、眼色素层视网膜炎、白细胞粘附缺陷、类风湿性关节炎、风湿热、莱特尔氏综合征、牛皮癣关节炎、进行性全身性硬化症、原发性胆汁性肝硬化、天疱疮、类天疱疮、坏死性脉管炎、重症肌无力、多发性硬化症、红斑狼疮、多发性肌炎、结节病、肉芽肿病、血管炎、恶性贫血、CNS 炎性障碍、抗原-抗体复合介导的疾病、自身免疫性溶血性贫血症、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、习惯性自然流产、雷诺氏综合征、肾小

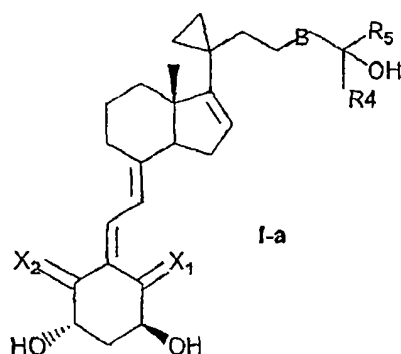
球肾炎、皮肤炎、慢性活动性肝炎、腹部疾病、AIDS 的自身免疫性并发症、萎缩性胃炎、强直性脊柱炎和阿狄森氏病。

在另一种实施方案中，该免疫障碍是移植排斥。

在另一种实施方案中，该自身免疫性障碍是 I 型胰岛素依赖型糖尿病。

在再一种实施方案中，该维生素 D₃ 相关状态是一种以维生素 D₃-应答细胞的异常活性为特征的障碍。在另一种实施方案中，该障碍包括过度增殖皮肤细胞的异常活性。在再一种实施方案中，所述的障碍选自牛皮癣、基底细胞癌和角化病。

在另一种实施方案中，该障碍是牛皮癣。在另一种实施方案中，用于治疗牛皮癣的该维生素 D₃ 化合物具有式 I-a

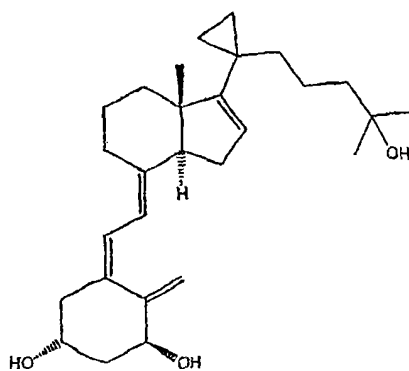


其中：

B 是单键、双键或三键；

X₁ 和 X₂ 各自独立地是 H₂ 或 CH₂，假定 X₁ 和 X₂ 不都是 CH₂；和 R₄ 和 R₅ 各自独立地是烷基或卤代烷基。

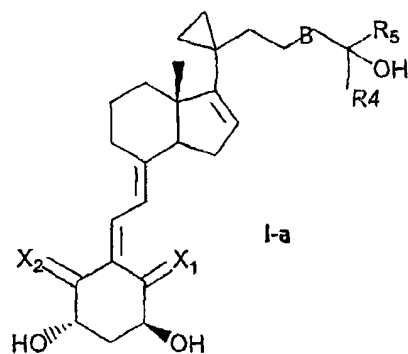
在另一种实施方案中，维生素 D₃ 化合物是 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇：



在另一种实施方案中，该障碍包括内分泌细胞的异常活性。在另一种实施方案中，该内分泌细胞是甲状旁腺细胞，并且该异常活性是甲状旁腺激素的处理和/或分泌。

在再一种实施方案中，该障碍是继发性甲状旁腺功能亢进症。

在再另一种实施方案中，该障碍包括骨细胞的异常活性。在进一步的实施方案中，障碍选自骨质疏松症、骨营养不良、老年性骨质疏松症、骨软化症、佝偻病、囊性纤维性骨炎和肾性骨营养不良。在一种实施方案中，该障碍是骨质疏松症。在另一种实施方案中，用于治疗骨质疏松症的该维生素 D₃ 化合物具有式 I-a

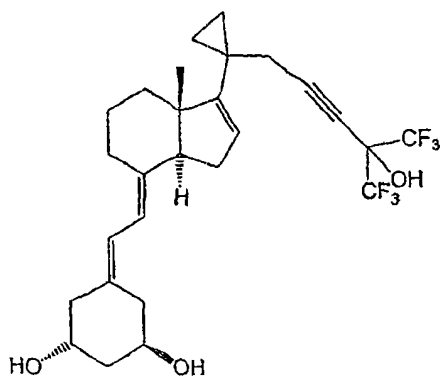


其中：

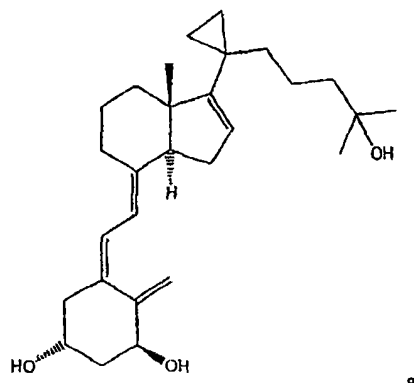
B 是单键、双键或三键；

X₁ 和 X₂ 各自独立地是 H₂ 或 CH₂，假定 X₁ 和 X₂ 不都是 CH₂；和 R₄ 和 R₅ 各自独立地是烷基或卤代烷基。

在进一步的实施方案中，用于治疗骨质疏松症的该维生素 D₃ 化合物是 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23-炔-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇：



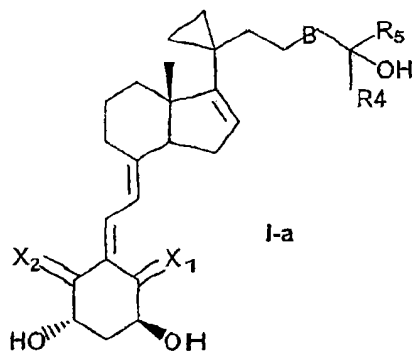
在进一步的实施方案中，用于治疗骨质疏松症的该维生素 D₃ 化合物是 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇：



在另一种实施方案中，该障碍是肝硬化或慢性肾脏病。

在另一种实施方案中，该障碍是高血压。

在另一种实施方案中，该本发明化合物抑制肾素的表达，从而治疗个体的高血压。在另一种实施方案中，该用于抑制凝乳酶(rennin)表达的维生素 D₃ 化合物具有式 I-a

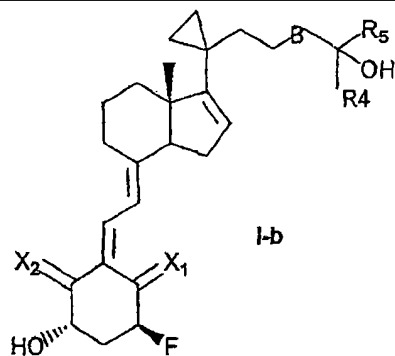


其中：

B 是单键、双键或三键；

X₁ 和 X₂ 各自独立地是 H₂ 或 CH₂，假定 X₁ 和 X₂ 不都是 CH₂；和 R₄ 和 R₅ 各自独立地是烷基或卤代烷基。

在另一种实施方案中，该用于抑制凝乳酶表达的维生素 D₃ 化合物具有式 I-b

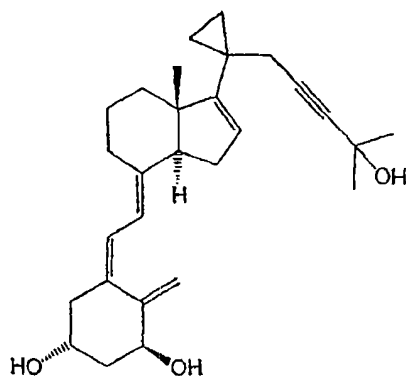


其中:

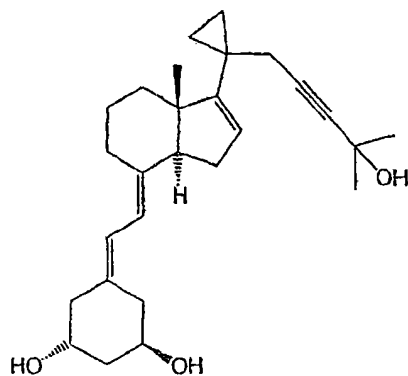
B 是单键、双键或三键;

X_1 和 X_2 各自独立地是 H_2 或 CH_2 , 假定 X_1 和 X_2 不都是 CH_2 ; 和 R_4 和 R_5 各自独立地是烷基或卤代烷基。

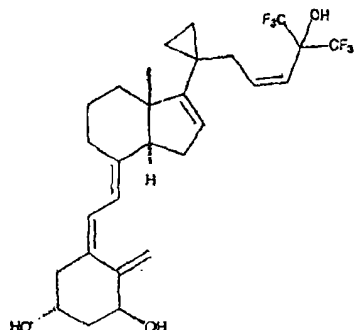
在进一步的实施方案中, 该用于抑制凝乳酶表达的维生素 D_3 化合物是 1,25-二羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-胆骨化醇:



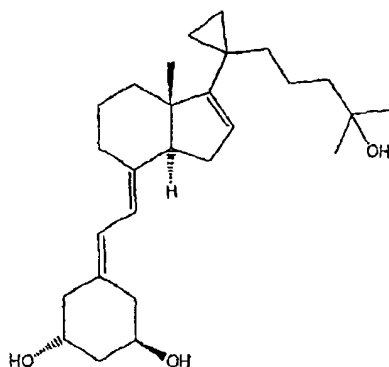
在进一步的实施方案中, 该用于抑制凝乳酶表达的维生素 D_3 化合物是 1,25-二羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇:



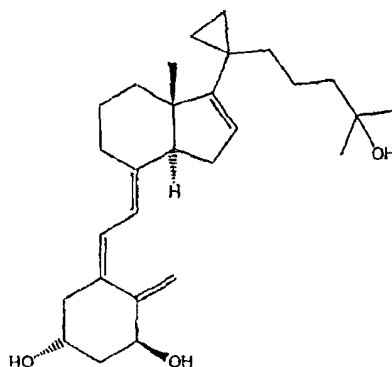
在进一步的实施方案中，该用于抑制凝乳酶表达的维生素 D₃ 化合物是 1,25-二羟基-16,23Z-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇：



在进一步的实施方案中，该用于抑制凝乳酶表达的维生素 D₃ 化合物是 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇：

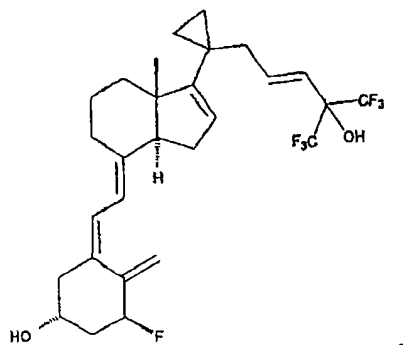


在进一步的实施方案中，该用于抑制凝乳酶表达的维生素 D₃ 化合物是 1,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇：

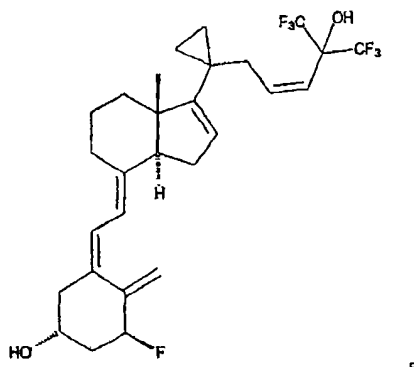


在进一步的实施方案中，该用于抑制凝乳酶表达的维生素 D₃ 化合物

物是 1 α -氟-25-羟基-16,23E-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇:



在进一步的实施方案中, 该用于抑制凝乳酶表达的维生素 D₃ 化合物是 1 α -氟-25-羟基-16,23Z-双烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇:



在另一种实施方案中, 该障碍是良性的前列腺肥大。

在另一种实施方案中, 该障碍是肿瘤疾病。在进一步的实施方案中, 该肿瘤疾病选自白血病, 淋巴瘤, 黑素瘤, 骨肉瘤, 结肠癌, 直肠癌, 前列腺癌, 膀胱癌和肺脏、乳腺、胃肠道和生殖泌尿道的恶性肿瘤。在另一种实施方案中, 该肿瘤疾病是膀胱癌。

在另一种实施方案中, 该障碍是神经元缺失。在进一步的实施方案中, 该障碍是选自阿耳茨海默氏病、皮克氏病、帕金森氏病、血管疾病、亨廷顿氏病和年龄相关记忆缺陷。

在另一种实施方案中, 该障碍是眼色素层炎。

在另一种实施方案中, 该障碍是间质性膀胱炎。

在另一种实施方案中, 该障碍是以维生素 D₃-应答的平滑肌细胞的异常活性为特征。在一种实施方案中, 该障碍是子宫肌瘤。在另一种实施方案中, 该障碍是过度增殖性血管疾病, 其选自高血压诱导的血

管重构、血管再狭窄和动脉粥样硬化。在再另一进一步的实施方案中，该障碍是动脉性高血压。

在一种实施方案中，本发明提供了改善钙磷代谢脱调节的方法，包括向个体施用治疗有效量的本发明化合物，以便改善钙磷代谢脱调节。在进一步的实施方案中，该钙磷代谢脱调节导致骨质疏松症。

在再一种实施方案中，本发明提供了调节免疫球蛋白样转录物 3(ILT3)表面分子在细胞中的表达的方法，包括将所述细胞与有效量的本发明化合物接触以调节免疫球蛋白样转录物 3(ILT3)表面分子在所述细胞中的表达。在另一种实施方案中，该细胞是在个体内。

在再另一种实施方案中，本发明提供了在个体中治疗 ILT3-相关障碍的方法，包括向个体施用有效量的本发明化合物以调节该 ILT3 表面分子的表达，从而在所述的个体中治疗所述的 ILT3-相关障碍。在一种实施方案中，该 ILT3-相关障碍是免疫障碍。在另一种实施方案中，该免疫障碍是自身免疫性障碍。在另一种实施方案中，该自身免疫性障碍是胰岛素依赖型糖尿病。

在一种实施方案中，本发明提供了在个体中诱导免疫耐受的方法，包括向个体施用有效量的本发明化合物以调节该 ILT3 表面分子的表达，从而在所述的个体中诱导免疫耐受性。在一种实施方案中，该免疫耐受性是在抗原呈递细胞中被诱导的。在一种实施方案中，该抗原呈递细胞选自树突状细胞、单核细胞和巨噬细胞。

在另一种实施方案中，本发明提供了在个体中抑制移植排斥的方法，包括向个体施用有效量的本发明化合物以调节该 ILT3 表面分子的表达，从而在所述的个体中抑制移植排斥。在一种实施方案中，该移植是实体器官移植。在一种实施方案中，该移植是胰岛移植。在一种实施方案中，该移植是骨髓移植。

在另一种实施方案中，本发明提供了通过抗原呈递细胞调节免疫抑制活性的方法，包括将抗原呈递细胞与有效量的本发明化合物接触以调节 ILT3 表面分子表达，从而通过所述抗原呈递细胞调节所述免疫抑制活性。

在进一步的实施方案中，该细胞是抗原呈递细胞。在另一种实施方案中，抗原呈递细胞选自树突状细胞、单核细胞和巨噬细胞。

在再一种实施方案中，本发明提供了在需要的个体中预防或治疗

膀胱功能障碍的方法，其通过施用有效量的本发明化合物，从而在所述的个体中预防或治疗膀胱功能障碍。

在一种实施方案中，该膀胱功能障碍的特征在于存在膀胱肥大。在另一种实施方案中，该膀胱功能障碍是活动过度性膀胱。在另一种实施方案中，该个体是雄性动物。在另一种实施方案中，该雄性动物同时罹患 BPH。在一种实施方案中，该个体是雌性动物。

在进一步的实施方案中，本发明提供了一种方法，其中该维生素 D₃ 化合物与药学可接受的载体组合施用。

在再一种实施方案中，本发明提供了一种方法，其中所述的维生素 D₃ 化合物使用药学可接受的配方向该个体施用。

在再另一种实施方案中，本发明提供了一种方法，其中在该药学可接受的配方向该个体施用后，所述的药学可接受的配方向个体提供了所述维生素 D₃ 化合物持续释放达至少 4 周。

在一种实施方案中，本发明提供了一种方法，其中所述免疫球蛋白样转录物 3(ILT3)表面分子的表达是增量调节。

在另一种实施方案中，本发明提供了一种方法，其中该化合物是与药学可接受的稀释剂或载体一起配制于药物组合物中。在另一种实施方案中，本发明提供了一种方法，其中所述的化合物是维生素 D 受体激动剂。

在另一种实施方案中，本发明提供了一种方法，其中该个体哺乳动物，优选人。

在进一步的实施方案中，该化合物是经口施用。在另一种实施方案中，该化合物是静脉内施用。在另一种实施方案中，该化合物是局部施用。在另一种实施方案中，该化合物是胃肠外施用。

在再一种实施方案中，该化合物是以 0.001 μ g-100 μ g/kg 体重的浓度施用。

另一方面，本发明提供了药物组合物，包括有效量的本发明化合物和药学可接受的稀释剂或载体。在一种实施方案中，该有效量治疗维生素 D₃ 相关状态是有效的。在另一种实施方案中，本发明提供了一种药物组合物，其中所述的维生素 D₃ 相关状态是 ILT3-相关障碍。在另一种实施方案中，本发明提供了一种药物组合物，其中所述的维生素 D₃ 相关状态是一种具有维生素 D₃-应答细胞异常活性的特征的障

碍。在另一种实施方案中，本发明提供了一种药物组合物，其中所述的维生素 D₃ 相关状态是膀胱功能障碍。在另一种实施方案中，本发明提供了一种药物组合物，其中所述的障碍是高血压。

一方面，本发明提供了包装化配方以用于治疗维生素 D₃ 相关状态，该包装化配方包括含有本发明化合物的药物组合物和指令说明，以用于治疗维生素 D₃ 相关状态。在一种实施方案中，本发明提供了一种包装化配方，其中所述的维生素 D₃ 相关状态是 ILT3-相关障碍。在另一种实施方案中，本发明提供了包装化配方，其中所述的维生素 D₃ 相关状态是一种具有维生素 D₃-应答细胞异常活性的特征的障碍。在另一种实施方案中，本发明提供了包装化配方，其中所述的维生素 D₃ 相关状态是膀胱功能障碍。

在某些实施方案中，本发明所述的方法包括向个体施用与另一种药学活性化合物组合的治疗有效量的维生素 D₃ 化合物。药学活性化合物的实例包括已知治疗自身免疫性障碍的化合物，例如，免疫抑制剂如环孢菌素 A、雷帕霉素、desoxyspergualine、FK506、甾族化合物、硫唑嘌呤、抗-T 细胞抗体和 T 细胞亚群的单克隆抗体。其它可以使用的药学活性化合物可以在 Harrison's Principles of Internal Medicine, Thirteenth Edition, Eds. T.R. Harrison 等人 McGraw-Hill N.Y., NY 和 Physicians Desk Reference 50th Edition 1997, Oradell New Jersey, Medical Economics Co.中找到，其全部内容通过引用明确地并入本文。该维生素 D₃ 化合物和该药学活性化合物可以在同一药物组合物中或在不同的药物组合物中(同一时间或不同时间)施用于该个体。

A、过度增殖性疾病

另一方面，本发明提供了一种治疗个体的以维生素 D₃-应答细胞异常活性为特征的障碍的方法。该方法包括向该个体施用有效量的式 I 的或其它在此描述的维生素 D₃ 化合物的药物组合物，从而调节了该细胞活性。

在某些实施方案中，该治疗的细胞是过度增殖的细胞。如下面更详细地描述的，本发明维生素 D₃ 化合物可用于抑制多种增生性和瘤性组织的增殖。根据本发明，本发明的维生素 D₃ 化合物可用于治疗病理性和非病理性的、以不需要维生素 D₃-应答细胞生长为特征的增殖性疾病，例如，过度增殖的皮肤细胞、免疫细胞和具有变异细胞的组织，

例如，癌、肉瘤和白血病。在其它实施方案中，该治疗的细胞是异常分泌细胞，例如，甲状旁腺细胞、免疫细胞。

由于它们的血钙过高作用，维生素 D 化合物在治疗过度增殖疾病中的用途受到限制。为此，本发明的维生素 D₃ 化合物可提供一种较低毒性的、当前治疗方法所另选的方法。

在一种实施方案中，本发明描述了一种抑制增殖和/或诱导过度增殖皮肤细胞分化的方法，该过度增殖皮肤细胞例如表皮或上皮细胞，例如角质化细胞，该方法通过将该细胞与本发明的维生素 D₃ 化合物接触。通常，所述的方法包括将病理性或非病理性过度增殖细胞与有效量的该维生素 D₃ 化合物接触的步骤，以促进过度增殖细胞的分化。本方法可以在培养的细胞中执行，例如，体外或离体，或者可在存在于动物个体中的细胞中执行，例如，作为体内治疗方案的一部分。该治疗方案可以在人或任何其它动物个体上实现。

本发明的维生素 D₃ 化合物 of 可用于治疗过度增殖皮肤障碍。示例性的障碍包括，但不限于，牛皮癣、基底细胞癌、角质化障碍和角化病。这些障碍的其它实例包括湿疹；狼疮相关性皮肤损伤；牛皮癣关节炎；包含衬于关节囊的上皮相关细胞的过度增殖和炎症的类风湿性关节炎；皮炎例如脂溢性皮炎和日光性皮炎；角化病例如脂溢性角化病、老年性角化病、光化性角化病、光诱导的角化病和毛囊角化病；寻常痤疮；瘢痕疙瘩和抗瘢痕疙瘩形成的预防；痣；疣，其包括赘肉、湿疣或尖锐湿疣和人乳头状瘤病毒(HPV)感染例如性病疣；粘膜白斑病；扁平苔癣；和角膜炎。

在说明性实施例中，本发明的维生素 D₃ 化合物在治疗例如牛皮癣的疾病中，通过向需要治疗的个体施用有效量的这些化合物，可用于抑制角质化细胞的过度增殖。所述的术语"牛皮癣"具有其医学含义，即一种疾病，其主要地使皮肤痛苦，并产生隆起、增厚、脱皮(scaling)、非斑痕化损伤。该损伤常常是边界清楚(sharply demarcated)的红斑性丘疹，其被重叠的有光泽的鳞屑覆盖。该鳞屑典型地为银色或微乳色。发生经常累及指甲而导致剥蚀(pitting)、指甲分离、增厚和变色。牛皮癣有时与关节炎有关，并且其可以致残。角质化细胞过度增殖是牛皮癣表皮增生以及表皮炎症和角质化细胞分化减少的主要特征。已援引多种机理来解释该以牛皮癣为特征的角质化细胞过度增殖。在牛皮癣

的发病机理中还涉及患病的细胞免疫。

B、瘤形成

本发明还描述了抑制增殖和/或逆转维生素 D₃-应答过度增殖细胞的转变的表型的方法,该方法通过将该细胞与式 I 或其它在此描述的维生素 D₃化合物接触。通常,所述的方法包括将病理性或非病理性过度增殖细胞与有效量的本发明的维生素 D₃化合物接触的步骤,以促进过度增殖细胞的分化。本方法可以在培养的细胞中执行,例如,体外或离体,或者可以在存在于动物个体中的细胞中执行,例如,作为体内治疗方案的部分。该治疗方案可以在人或其它个体上实现。

式 I 或其它在此描述的维生素 D₃化合物可以最初在体外测定其对瘤细胞增殖的抑制作用。可使用的细胞系的实例是变异细胞,例如,人早幼粒细胞(promyeloid)白血病细胞系 HL-60 和人骨髓性白血病 U-937 细胞系(Abe E.等人(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4990-4994; Song L.N.和 Cheng T. (1992) Biochem Pharmacol 43: 2292-2295; Zhou J.Y.等人(1989) Blood 74: 82-93; 美国专利 5,401,733; U.S. 5,087,619)。或者,本发明的维生素 D₃化合物的抗肿瘤作用可以在体内测定,其使用本领域已知的和在 Bouillon, R.等人(1995) Endocrine Reviews 16(2): 233(表 E)中概述的各种动物模型,其通过引用并入本文。例如,在本领域中测定维生素 D 化合物,SL 小鼠常规地作为模型用于 M1 骨髓性白血病(Honma 等人(1983) Cell Biol. 80: 201-204; Kasukabe T.等人(1987) Cancer Res. 47: 567-572); 乳腺癌研究可以在例如用于人 MX1 (ER) 的裸鼠模型中进行(Abe J.等人(1991) Endocrinology 129: 832-837); 其它癌症,例如,结肠癌、黑素瘤骨肉瘤可以特征性地用例如裸鼠模型,其如在(Eisman J. A.等人(1987) Cancer Res. 47: 21-25; Kawaura A.等人(1990) Cancer Lett 55: 149-152; Belleli A. (1992) Carcinogenesis 13: 2293-2298; Tsuchiya H.等人(1993) J. Orthopaed Res. 11: 122-130)中描述的。

该主题方法还可用于抑制造血源(hematopoietic origin)的增生性/瘤性细胞的增殖,例如,起源于骨髓、淋巴或红细胞系,或者其前体细胞。例如,本发明打算治疗的各种骨髓障碍包括,但不限于,急性早幼粒细胞白血病 (APML)、急性骨髓性白血病(AML)和慢性骨髓性白血病(CML)(在 Vaickus, L. (1991) Crit Rev. in Oncol./Hematol. 11:

267-97 中综述)。可通过主题方法治疗的淋巴恶性肿瘤包括,但不限于包括 B-谱系 ALL 和 T-谱系 ALL 的急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、幼淋巴细胞白血病(PLL)、毛样细胞白血病(HLL)和瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia, WM)。打算通过本发明方法治疗的其它形式的恶性淋巴瘤包括,但不限于非何杰金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)及其变体、周围 T 细胞淋巴瘤、成人 T 细胞白血病/淋巴瘤(ATL)、表皮 T-细胞淋巴瘤(CTCL)、巨粒性淋巴细胞性白血病(large granular lymphocytic leukemia, LGL)和何杰金氏病。

在某些实施方案中,本发明的维生素 D₃ 化合物可以用于与常规癌症化学疗法组合治疗。白血病和其它肿瘤的常规治疗方案包括辐射、药物或二者的组合。除了辐射,以下通常相互组合的药物常常用于治疗急性白血病:长春新碱、泼尼松、甲氨蝶呤、巯嘌呤、环磷酰胺和阿糖胞苷。在慢性白血病中,例如,白消安、美法仑和苯丁酸氮芥可组合使用。所有的常规抗癌药物毒性高,而且在进行治疗的同时容易使患者在一定程度上患病。有力的治疗是基于这样的前提,即除非所有的白血病细胞均被破坏,剩余的细胞会繁殖并引起复发。

主题方法还可用于治疗各种器官系统的恶性肿瘤,例如侵袭肺脏、乳腺、淋巴、胃肠和生殖泌尿道以及腺癌,其包括恶性肿瘤例如大多数结肠癌、肾脏细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、肺脏的非小细胞癌、小肠癌、食道癌和膀胱癌。

根据一般涉及变异细胞分化的维生素 D₃ 的示例,可以根据本发明方法治疗的示例性实体瘤包括肉瘤和癌的维生素 D₃-应答表型,例如,但不限于:纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、膀胱癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯氏肿瘤(Wilms' tumor)、子宫颈癌、睾丸肿瘤、肺脏癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、

听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤和视网膜成神经细胞瘤。

本发明维生素 D₃化合物的治疗有效的抗肿瘤量或预防有效的抗肿瘤量的确定,其可以容易地通过本领域熟练的医生或兽医("主治临床医生"),通过应用已知技术并通过在类似条件下观察获得的结果而实现。该剂量可以根据主治临床医生判断的患者需要量、治疗疾病的严重性和所使用的特定化合物而改变。在确定治疗有效的抗肿瘤量或剂量和预防有效的抗肿瘤量或剂量过程中,主治临床医生考虑了多种因素,包括,但不限于:所涉及的增生性/瘤性细胞;特定化合物的药效学性质及其施用的方法和途径;需要的治疗时间过程;哺乳动物的物种;其大小、年龄和一般健康;所涉及的特定疾病;疾病的程度或者所涉及的疾病严重性;个体患者的应答;施用的特定化合物;施用方法;施用的制品的生物利用度性质;选择的给药方案;合并治疗的种类(即,本发明的维生素 D₃化合物与其它共同施用的治疗剂的相互作用);以及其它相关情况。例如,美国专利 5,427,916 描述了在个体患者中预测抗肿瘤治疗的效果的方法,并说明了与本发明的治疗方案结合的某些可以使用的方法。

可以以低于该化合物的最佳量的较小剂量开始治疗。其后,该剂量可以通过小的增量增加,直至在所述条件下达到最佳效果。如果需要,为方便起见,总日剂量可以分开并在该日内分成数部分施用。本发明维生素 D₃化合物的治疗有效的抗肿瘤量和预防有效的抗肿瘤量是期望在约 0.1 毫克每公斤体重每天(mg/kg/day)至约 100mg/kg/日内改变的。

确定可有效地预防或治疗动物例如犬类、啮齿类肿瘤的化合物还可用于人肿瘤的治疗。根据动物研究获得的数据,治疗人肿瘤的本领域技术人员将知道该化合物向人施用的剂量和途径。通常,人施用的剂量和途径是希望类似于动物所施用的。

需要预防治疗增生性/瘤性疾病状态的那些患者的辨认,是很好地在在本领域技术人员的能力和知识之内的。对于有发生可通过本主题方法治疗的肿瘤疾病状态的风险的患者,辨认该患者的一些方法是医学领域所理解的,例如特定疾病状态的发展的家族史和与个体患者疾病状态发展相关的风险因素的存在。本领域熟练的临床医生通过应用例

如临床试验、身体检查和医学/家族史而可以容易地辨认该候选患者。

C、免疫活性

健康个体使用多种不同机理保护其本身以防异物侵入，包括物理障碍、血和组织中的吞噬细胞、称为淋巴细胞的免疫细胞组和生血分子。所有这些机理都参与了为个体防御潜在的有害环境。存在于先前与传染性微生物或其它外源性大分子接触的个体中的、称为自然或先天性免疫的一些防御机理，其不会通过该接触而增强，并且不会在从多数外来物质之间进行区分。通过外源物质接触诱导或刺激的、称为后天性或特异性免疫的其它防御机理，其对不同大分子具有精确地特异性，并增加与各种特定大分子相继接触的强度和防御能力。诱导特异性免疫应答的物质称为抗原(见，例如，Abbas, A.等人, *Cellular and Molecular Immunology*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1991; Silverstein, A.M. *A history of Immunology*, San Diego, Academic Press, 1989; Unanue A.等人, *Textbook of Immunology*, 2nded. Williams and Wilkens, Baltimore, 1984)。

免疫系统的最显著特征之一是其区分外源性抗原和自身抗原的能力。因此在各个体中的淋巴细胞能够识别并应答多种外源性抗原，但通常对存在于个体中的潜在的抗原性物质无应答。这种免疫无反应性指称为免疫耐受性(见，例如，Burt RK 等人(2002) *Blood* 99: 768; Coutinho, A.等人(2001) *Immunol. Rev.* 182: 89; Schwartz, RH (1990) *Science* 248: 1349; Miller, J.F.等人(1989) *Immunology Today* 10: 53)。

自身耐受性是一种后天性的已知经由各个体淋巴细胞过程。其部分地因淋巴细胞通过一个它们发育的阶段而发生，此时，当与由抗原呈递细胞(APC)呈递的抗原相遇时，导致其在称为正或负选择性的过程中死亡或失活(见，例如，Debatin KM (2001) *Ann. Hematol.* 80 Suppl 3: B29; Abbas, A. (1991), 前述)。为此，在这一功能成熟不良的阶段，潜在的自身识别淋巴细胞与自身抗原接触，并防止发展为能够对自身抗原产生应答的阶段。当自身耐受性的诱导和维持异常出现时，产生自身免疫，其导致对特定抗原(类)的耐受性的丧失和随后的宿主免疫系统对表达抗原(类)的宿主组织的攻击(见，例如，Boyton RJ 等人(2002) *Clin. Exp. Immunol.* 127: 4; Hagiwara E. (2001) *Ryumachi* 41: 888; Burt RK 等人(2002) *Blood* 99: 768)。

免疫系统识别自身和外源性抗原的能力还在组织移植中充当了关键性作用。移植的成功取决于防止宿主受体的免疫系统将该移植识别为外源性的,以及在某些情况下,防止该移植物将该宿主组织识别为外源性的。例如,当宿主接受骨髓移植时,该移植的骨髓可识别该新宿主为外源性的,引起移植物抗宿主病(GVHD)。因而,该宿主的生存取决于防止供体骨髓的排异反应以及宿主通过该移植物免疫反应的排异反应(见,例如, Waldmann H 等人(2001) *Int. Arch. Allergy Immunol.* 126: 11)。

当前,引起自身免疫性疾病和移植排斥的有害的免疫反应通过使用药物例如甾族化合物、硫唑嘌呤、抗-T细胞抗体以及最近的对T细胞亚群的单克隆抗体而被防止或治疗。免疫抑制药例如环孢菌素A(CsA)、雷帕霉素、desoxyspergualine 和 FK-506 也广泛地应用。

非特异性免疫抑制剂,例如甾族化合物和对淋巴细胞的抗体,使该宿主机会性感染和肿瘤发展的风险增加。此外,许多免疫抑制药在宿主中引起骨脱矿质(见,例如, Chhajed PN 等人(2002) *Indian J. Chest Dis. Allied* 44: 31; Wijdicks EF (2001) *Liver Transpl.* 7: 937; Karamchic J 等人(2001) *Med. Arh.* 55: 243; 颁发给 Beschorner WE 的美国专利 5,597,563 和颁发给 DeLuca HF 等人的美国专利 6,071,897)。由于与存在免疫抑制形式相关的主要缺点,需要一种新的治疗免疫障碍的方法,例如,在宿主中诱导免疫耐受性。

为此,另一方面,本发明提供了调节免疫细胞活性的方法,其通过将该细胞与式 I 的或其它在此描述的维生素 D₃ 化合物接触。

在一种实施方案中,本发明提供了一种在免疫细胞中抑制免疫活性的方法,其通过将病理性或非病理性免疫细胞与有效量的本发明维生素 D₃ 化合物接触,从而抑制与缺乏该治疗相关的细胞的免疫应答。本方法可以在培养细胞中完成,例如,体外或离体,或者可以在存在于动物个体中的细胞中完成,例如,作为体内治疗方案的部分。体内治疗可以在人或其它动物个体上进行。

本发明的维生素 D₃ 化合物可以最初在体外测定其对T细胞增殖和分泌活动的抑制作用,如在 Reichel, H.等人, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84: 3385-3389; Lemire, J. M.等人(1985) *J. Immunol* 34: 2032-2035 中描述的。或者,该免疫抑制作用可以使用本领域已知以及

Bouillon, R.等人(1995) *Endocrine Reviews* 16(2) 232 (表 6 和 7)概述的各种动物模型在体内测定。例如, 自身免疫性障碍的动物模型, 例如狼疮、甲状腺炎、脑炎、糖尿病和肾炎已在(Lemire J.M. (1992) *J. Cell Biochem.* 49: 26-31; Koizumi T.等人(1985) *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 77: 396-404; Abe J.等人(1990) *Calcium Regulation and Bone Metabolism* 146-151 ; Fournier C. 等人 (1990) *Clin. Immunol Immunopathol.* 54: 53-63; Lemire J.M.和 Archer D. C. (1991) *J. Clin. Invest.* 87: 1103-1107; Lemire, J. M.等人, (1994) *Endocrinology* 135 (6): 2818-2821; Inaba M.等人(1992) *Metabolism* 41: 631-635; Mathieu C. 等人 (1992) *Diabetes* 41: 1491-1495 ; Mathieu C. 等人 (1994) *Diabetologia* 37: 552-558; Lillevang S.T. 等人(1992) *Clin. Exp. Immunol.* 88: 301-306, 等)中描述。在器官移植中表现为免疫抑制活性的模型, 例如皮肤移植、心脏移植、岛移植已在 Jordan S.C.等人(1988) v Herrath D (eds) *Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology* 346-347; Veyron P.等人(1993) *Transplant Immunol.* 1: 72-76; Jordan S.C. (1988) v Herrath D (eds) *Molecular, Cellular and Clinical Endocrinology* 334-335; Lemire J.M.等人(1992) *Transplantation* 54: 762-763; Mathieu C. 等人(1994) *Transplant Proc.* 26: 3128-3129 中描述。

在体外确定某些试验化合物为有效的免疫应答的抑制剂后, 这些化合物可作为治疗方案的部分用于体内。因此, 本发明另一方面提供了抑制免疫应答的方法, 包括向个体施用本发明维生素 D₃化合物的药物制剂, 以便抑制免疫反应例如移植排斥、自身免疫障碍和炎症。

在一种实施方案中, 本发明提供了治疗个体的维生素 D₃相关状态的方法, 其中该维生素 D₃相关状态是 ILT3-相关障碍, 该方法通过向个体施用有效量的本发明维生素 D₃化合物。在一种实施方案中, 该 ILT3-相关状态是免疫障碍。在某些实施方案中, 该免疫障碍是自身免疫性障碍。在特定的实施方案中, 该免疫障碍是 1 型糖尿病。在其它实施方案中, 该免疫障碍是移植排斥。

例如, 本发明的该主题维生素 D₃化合物可在临床状况中用于抑制应答, 该临床状况希望减量调节 T 细胞应答。例如, 在移植物抗宿主病中, 移植的病例、自身免疫性疾病(包括, 例如, 糖尿病、关节炎(包括类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣关节

炎)、多发性硬化症、脑脊髓炎、糖尿病、重症肌无力、全身性红斑狼疮、自身免疫性甲状腺炎、皮炎(包括特应性皮炎和湿疹性皮炎)、牛皮癣、斯耶格伦氏综合征其包括干燥性角结膜炎继发的斯耶格伦氏综合征、斑秃、因节肢动物叮咬反应的过敏性应答、克罗恩病(Crohn's disease)、口疮性溃疡、虹膜炎、结膜炎、角膜结膜炎、溃疡性结肠炎、哮喘、过敏性哮喘、表皮性红斑狼疮、硬皮病、阴道炎、直肠炎、药疹、麻风病逆转反应、麻风结节性红斑、自身免疫性眼色素层炎、过敏性脑脊髓炎、急性坏死性出血性脑病、原发性双侧进行性感觉神经性耳聋、再生障碍性贫血、单纯红细胞性贫血,原发性血小板减少症、多软骨炎、韦格纳氏肉芽肿病(wegener's granulomatosis)、慢性活动性肝炎、史-约综合征(Stevens-Johnson syndrome)、原发性口炎性腹泻、扁平苔藓、克罗恩病、格雷夫斯眼病(Grave's ophthalmopathy)、结节病、原发性胆汁性肝硬变、后眼色素层炎和间质性肺纤维化)。在变态反应例如特应性变态反应情况下,免疫活性的减量调节也是需要的。

本发明另一方面的提供了一种在细胞中调节免疫球蛋白样转录物3(ILT3)表面分子表达的方法。所述的方法包括将该细胞与有效量的式I化合物接触以在该细胞调节免疫球蛋白样转录物3(ILT3)表面分子表达。在一种实施方案中,细胞是在个体中。在另一实施方案中,该调节是表达的增量调节。在其它实施方案中,该调节是表达的减量调节。

本发明相关方面提供了一种在个体中治疗ILT3-相关障碍的方法。该方法包括向个体施用有效量的式I化合物以调节该ILT3表面分子的表达,从而在个体中治疗该ILT3-相关障碍。

在某些实施方案中,本发明提供了方法和组合物以治疗免疫障碍,例如,自身免疫障碍和移植排斥,例如移植物抗宿主病(GVHD)。本发明的这些实施方案是基于这样的发现,即本发明维生素D₃化合物能够调节细胞中免疫球蛋白样转录物3(ILT3)的表达,该细胞例如抗原呈递细胞。

因此,本发明另一方面提供了在个体中抑制移植排斥的方法。所述的方法包括向个体施用有效量的式I化合物以调节该ILT3表面分子的表达,从而在该个体中抑制移植排斥。在一种实施方案中,该移植器官移植。在另一种实施方案中,该移植是胰岛移植。在再一种实施方案中,该移植是骨髓移植。

如前面描述的, 治疗有效的免疫抑制量的确定, 其可以容易地通过作为本领域技术人员的主治临床医生, 通过应用已知技术并通过在类似条件下观察获得的结果而实现。在动物例如犬类、啮齿类中确定有效的化合物可以通过本领域技术人员相应地推定到人。用于动物的起始剂量/用法可以根据先前的研究进行估计。例如, 在啮齿类中治疗自身免疫障碍的本发明维生素 D₃ 化合物的剂量, 其经口或注射施用可以最初估计为 0.1g/kg/日 ~ 1g/kg/日。

本领域技术人员根据动物研究获得的数据会知道, 人施用的剂量和途径是希望类似于动物所施用的。用于人的示范性的剂量范围是每名成人 0.25 ~ 10μg/日, 优选 0.5 ~ 5μg/日(美国专利 4,341,774)。

D、钙磷平衡

本发明还涉及治疗个体以钙代谢脱调节为特征的障碍的方法, 该方法包括将病理性或非病理性维生素 D₃ 应答细胞与有效量的本发明维生素 D₃ 化合物接触, 从而直接或间接地调节钙磷平衡。体内或体外检测钙波动的技术是本领域已知的。

示范性的 Ca⁺⁺ 平衡相关测定包括针对肠的测定, 其中肠的 ⁴⁵Ca²⁺ 吸收是 1) 体内 (Hibberd K.A. 和 Norman A.W. (1969) *Biochem. Pharmacol.* 18: 2347-2355; Hurwitz S. 等人 (1967) *J. Nutr.* 91: 319-323; Bickle D.D. 等人 (1984) *Endocrinology* 114: 260-267), 或 2) 以外翻十二指肠囊的体外 (Schachter D. 等人 (1961) *Am. J. Physiol* 200: 1263-1271), 或 3) 在小鸡钙结合蛋白-D_{28k} 或大鼠钙结合蛋白-D_{9k} 的基因诱导作用上 (Thomasset M. 等人 (1981) *FEBS Lett.* 127: 13-16; Brehier A. 和 Thomasset M. (1990) *Endocrinology* 127: 580-587) 测定。骨定向测定包括: 1) 通过测定 Ca²⁺ 从体内 (饲养零钙饮食的动物) 骨中的释放 (Hibberd K. A. 和 Norman A.W. (1969) *Biochem. Pharmacol.* 18: 2347-2355; Hurwitz S. 等人 (1967) *J. Nutr.* 91: 319-323), 或者从体外骨移出物中的释放 (Bouillon R. 等人 (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 3044-3051), 2) 血清成骨素水平的测定 [成骨素是一种成骨细胞特异性蛋白, 其在合成后大量地掺合到骨基质中, 但部分地释放到循环 (或组织培养基) 中, 并且因此代表了骨形成或循环的良性需求] (Bouillon R. 等人 (1992) *Clin. Chem.* 38: 2055-2060), 或 3) 骨灰分含量 (Norman A.W. 和 Wong R.G. (1972) *J. Nutr.* 102: 1709-1718)。仅完成了一项肾定向测定。在该测定中, 测定

了尿 Ca^{2+} 排泄(Hartenbower DX.等人(1977) Walter de Gruyter, Berlin pp 587-589); 该分析是依靠血清 Ca^{2+} 水平升高, 并可以反映骨 Ca^{2+} 运动活性大于肾脏作用。最后, 有一项"软组织钙化"测定, 其可用于检测施用本发明化合物的结果。在该测定中, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 腹膜内给药施用于大鼠, 接着 7 天经每日施用相对较高剂量的本发明化合物; 在严重高钙血症发生的情况下, 可以通过测定 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 水平而评价软组织钙化。在所有的这些测定中, 本发明维生素 D_3 化合物以单次剂量或长期(依赖于测定方案), 在测定终点定量之前以合适的时间间隔向维生素 D-充足或缺乏的动物施用。

在某些实施方案中, 本发明的维生素 D_3 化合物可用于调节骨代谢。所术语"骨代谢"意欲包括对骨结构的形成和退化的直接或间接作用, 例如骨形成、骨吸收等, 其可以最终地影响血清中钙磷的浓度。该术语还意欲包括维生素 D_3 化合物对骨细胞的作用, 例如破骨细胞和成骨细胞, 它们可依次导致骨形成和退化。例如, 本领域已知, 成骨细胞通过基因性和非基因性途径, 维生素 D_3 化合物对骨形成细胞产生作用(Walters M.R.等人(1982) J. Biol. Chem. 257: 7481-7484; Jurutka P.W.等人(1993) Biochemistry 32: 8184-8192; Mellon W.S.和 DeLuca H.F. (1980) J. Biol. Chem. 255: 4081-4086)。同样, 本领域已知, 维生素 D_3 化合物支持骨再吸收破骨细胞的不同活动, 例如刺激单核细胞和单核吞噬细胞分化成破骨细胞(Abe E.等人(1988) J. Bone Miner Res. 3: 635-645; Takahashi N. 等人(1988) Endocrinology 123: 1504-1510; Udagawa N.等人(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7260-7264)。相应地, 本发明的调节骨细胞生成的维生素 D_3 化合物可影响骨形成和退化。

本发明提供了一种调节骨细胞代谢的方法, 其通过将病理性或非病理性骨细胞与有效量的本发明维生素 D_3 化合物接触, 从而调节骨形成和退化。本方法可在培养的细胞中完成, 例如, 体外或离体, 或者可在存在于动物个体中的细胞中完成, 例如, 体内细胞。可使用的典型的培养系统包括成骨细胞系, 例如, ROS17/2.8 细胞系、单核细胞、骨髓培养系统(Suda T.等人(1990) Med. Res. Rev. 7: 333-366; Suda T.等人(1992) J. Cell Biochem. 49: 53-58)等。所选化合物可进一步在体内试验, 例如, 在骨硬化症的动物模型和在人类疾病中(Shapira F. (1993)

Clin. Orthop. 294: 34-44).

在优选的实施方案中, 提供了治疗骨质疏松症的方法, 包括向个体施用本发明维生素 D₃ 化合物的药物制剂, 从而改善未治疗个体有关的状况。

本发明的维生素 D₃ 化合物可在卵巢切除动物中试验, 例如犬类、啮齿类, 以评价正常动物和雌激素缺乏动物的骨量和骨形成率的变化。临床试验可以通过主治临床医生在人身上进行, 以确定本发明维生素 D₃ 化合物的预防和治疗骨质疏松症的治疗有效量。

在其它实施方案中, 本发明维生素 D₃ 化合物治疗应用包括治疗其它以代谢性钙磷缺乏为特征的疾病。该疾病的实例如下: 骨质疏松症、骨营养不良、骨软化症、佝偻病、囊性纤维性骨炎、肾性骨营养不良、骨硬化、抗惊厥药治疗、骨量减少、不完全性骨纤维生成、继发性甲状旁腺功能亢进症、甲状旁腺功能减退症、甲状旁腺功能亢进症、肝硬化、阻塞性黄疸、药物造成的代谢、骨髓癌、慢性肾脏病、血磷酸盐过少性 VDRR、维生素 D-依赖性佝偻病、结节病、糖皮质激素拮抗、吸收不良综合征、脂肪泻、热带口炎性腹泻、原发性高钙血症和生乳热(milk fever)。

E、激素分泌

再另一方面, 本发明提供了一种调节维生素 D₃-应答细胞例如内分泌细胞的激素分泌的方法。激素分泌包括本发明维生素 D₃ 化合物的基因性和非基因性活性, 其在维生素 D₃ 应答细胞中控制给定激素分泌的转录和加工, 例如甲状旁腺激素(PTH)、降钙素、胰岛素、催乳素(PRL)和 TRH(Bouillon, R.等人(1995) Endocrine Reviews 16(2): 235-237)。

本方法可在培养的细胞中完成, 例如, 体外或离体, 或者可存在于动物个体中的细胞中完成, 例如, 体内。本发明的维生素 D₃ 化合物可以先在体外使用原代培养的甲状旁腺细胞试验。可以使用的其它系统包括大鼠垂体瘤细胞中催乳素分泌试验, 例如, GH4C1 细胞系(Wark J.D.和 Tashjian Jr. A.H. (1982) Endocrinology 111: 1755-1757; Wark J. D.和 Tashjian Jr. A.H. (1983) J. Biol. Chem. 258: 2118-2121; Wark J.D.和 Gurtler V. (1986) Biochem. J. 233: 513-518), 以及 GH4C1 细胞中 TRH 分泌试验。另外, 本发明维生素 D₃ 化合物的作用可以使用体内动物模型定性, 该动物模型如在以下公开的: Nko M.等人(1982)

Miner Electrolyte Metab. 5: 67-75; Oberg F.等人(1993) J. Immunol. 150: 3487-3495; Bar-Shavit Z.等人(1986) Endocrinology 118: 679-686; Testa U.等人(1993) J. Immunol. 150: 2418-2430; Nakamaki T.等人(1992) Anticancer Res. 12: 1331-1337; Weinberg J.B.和 Larrick J.W. (1987) Blood 70: 994-1002; Chambaut-Guerin A.M.和 Thomopoulos P. (1991) Eur. Cytokine New. 2: 355; Yoshida M.等人(1992) Anticancer Res. 12: 1947-1952; Momparler R.L.等人(1993) Leukemia 7: 17-20; Eisman J.A. (1994) Kanis JA (eds) Bone and Mineral Research 2: 45-76; Veyron P.等人(1993) Transplant Immunol. 1: 72-76; Gross M.等人(1986) J Bone Miner Res. 1: 457-467; Costa E.M.等人(1985) Endocrinology 117: 2203-2210; Koga M.等人(1988) Cancer Res. 48: 2734-2739; Franceschi R.T.等人(1994) J. Cell Physiol. 123: 401-409; Cross H.S.等人(1993) Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 347: 105-110; Zhao X.和 Feldman D. (1993) Endocrinology 132: 1808-1814; Skowronski R.J.等人(1993) Endocrinology 132: 1952-1960; Henry HX.和 Norman A.W. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 62: 781-788; Weeksler W.R.等人(1980) Arch. Biochem. Biophys. 201: 95-103; Brumbaugh P.F.等人(1915) Am. J. Physiol. 238: 384-388; Oldham S.B.等人(1979) Endocrinology 104: 248-254; Chertow B.S.等人(1975) J. Clin Invest. 56: 668-678; Canterbury J.M.等人(1978) J. Clin. Invest. 61: 1375-1383; Quesad J.M.等人(1992) J. Clin. Endocrinol Metab. 75: 494-501.

在某些实施方案中，本发明的维生素 D₃ 化合物作为治疗方案的一部分可用于抑制甲状旁腺激素(PTH)加工，例如，转录的、翻译的加工，和/或甲状旁腺细胞的分泌。使用这些化合物的治疗方法可以容易地用于所有疾病，包括 PTH 活动的直接或间接作用，例如，原发性和继发性应答。

相应地，本发明维生素 D₃ 化合物的治疗应用包括治疗疾病，例如慢性肾衰竭的继发性甲状旁腺功能亢进症(Slatopolsky E.等人(1990) Kidney Int. 38: S41-S47; Brown A.J.等人(1989) J. Clin. Invest. 84: 728-732)。治疗有效量和给药方案的确定可以通过熟练技术人员使用本领域公开的数据而完成。

F、防止神经元缺失

再另一方面, 本发明提供了一种防止神经元缺失的方法, 其通过将维生素 D₃ 应答细胞例如神经元细胞与本发明的维生素 D₃ 化合物接触, 以预防或延缓神经元缺失。所述的术语"防止"意欲包括预防、延缓和/或终止神经元的退化、损伤或死亡。

正常功能受损的神经元的任何疾病均可导致神经元缺失。损害神经元功能的、容易导致神经元缺失的任何疾病均可导致神经元退化。神经元功能可因例如神经元的生化学、生理学或解剖学改变而受损。神经元退化可包括膜、树枝状或突触变化, 该变化对正常神经元功能有害。神经元退化、损伤、和/或死亡的原因可能不清楚。或者, 可能是年龄和/或疾病相关变化的原因, 该变化发生于个体的神经系统中。

当神经元缺失在此描述为"年龄相关"时, 其意欲包括起因于已知或未知的与老化相关的个体的身体变化的神经元缺失。当神经元缺失在此描述为"疾病相关"时, 其意欲包括起因于已知或未知的与疾病相关的个体的身体变化的神经元缺失。然而, 应当理解, 这些术语并非相互排斥, 事实上, 许多导致神经元缺失的疾病是与年龄和疾病相关的。

示例性的与神经元缺失和神经元形态学变化相关的年龄相关疾病包括, 例如, 阿耳茨海默氏病、皮克氏病、帕金森氏病、血管疾病、亨廷顿氏病和年龄相关记忆缺陷。在阿耳茨海默氏病患者中, 在海马, 额部的、颞叶的和前颞叶的皮层, 扁桃体和嗅系统中, 神经元缺失最明显。海马的最明显的侵袭区域包括 CA1 区、下脚和内嗅皮质。记忆丧失被认为是最早并最具代表性的认知改变, 因为公知的是, 海马在记忆中发挥着决定性的作用。皮克氏病的特征在于在额部和前颞叶的新皮质中严重的神经元退化, 其有时伴随纹状体内神经元的死亡。帕金森氏病可通过黑质和蓝斑中的神经元缺失识别。亨廷顿氏病的特征为纹状体内和皮质的胆碱能神经元和 GABA-能神经元的退化。帕金森氏和亨廷顿氏病通常与运动障碍相关, 但常常也表现为认知损伤(记忆丧失)。

年龄相关的记忆缺陷(AAMI)是另一种年龄相关障碍, 其特征为健康的、上了年纪的个体在生命的后数十年记忆丧失。Crook, T.等人(1986) *Devel. Neuropsych.* 2(4): 261-276。目前, AAMI 的神经基础还没有准确地确定。然而, 已报道伴随老化的神经元死亡出现在许多物种的涉及记忆的脑区域, 包括皮层、海马、扁桃体、基底神经节、胆碱能基

底前脑、蓝斑、脊髓和小脑。Crook, T.等人(1986) *Devel. Neuropsych.* 2(4): 261-276。

本发明的维生素 D₃ 化合物可通过基因性或非基因性机理防止神经元缺失。已知核心维生素 D₃ 受体存在于外周, 但还发现于脑中, 特别是海马和新皮质中。非基因性机理也可通过调节内神经元和/或外周钙磷水平而预防或延缓神经元缺失。此外, 本发明的维生素 D₃ 化合物可以通过间接作用而防止神经元缺失, 例如, 通过调节血清 PTH 水平。例如, 已经证明在阿耳茨海默氏病中, 血清 PTH 水平与认知降低呈正相关。

本方法可在培养的细胞中完成, 例如, 体外或离体, 或者可在存在于动物个体中的细胞中完成, 例如, 体内。本发明的维生素 D₃ 化合物可以先在体外使用来自胚胎性啮齿动物小狗(例如见美国专利 5,179,109—胚胎大鼠组织培养物)、或其它哺乳动物(例如见美国专利 5,089,517—胚胎小鼠组织培养物)或非哺乳动物模型的神经元试验。在局部缺血、中风、伤、神经压伤、阿耳茨海默氏病、皮克氏病和帕金森氏病等的动物或组织培养模型中, 这些培养物系统已用于表征的外周和中枢神经系统神经元保护作用。

研究预防新皮质神经元破坏的体外系统实例包括使用胚胎小鼠神经元的体外培养物, 并将神经胶质细胞预先暴露于不同的谷氨酸激动剂, 例如钾盐镁矾(kainite)、NMDA 和 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异唑丙酸酯(isoxazoleprionate)(AMPA)。美国专利 5,089,517。另见美国专利 5,170,109 (用神经保护化合物处理之前用谷氨酸盐处理大鼠皮质/海马神经元培养物); 美国专利 5,163,196 和 5,196,421(在大鼠中神经保护性兴奋性氨基酸受体拮抗剂抑制甘氨酸、钾盐镁矾、AMPA 受体结合)。

或者, 本发明维生素 D₃ 化合物的作用可以使用动物模型在体内表征。在这些模型系统中的神经元退化常常通过实验性创伤或介入而诱导(例如应用毒素、神经压伤、中断氧供应)。

G、平滑肌细胞

再另一方面, 本发明提供了一种调节血管平滑肌细胞活性的方法, 其通过将维生素 D₃-应答的平滑肌细胞与本发明的维生素 D₃ 化合物接触以刺激或, 优选的, 抑制该细胞的活动。所述的术语"平滑肌细胞的活性"意欲包括平滑肌细胞的任何活性, 例如增殖、迁移、粘连和

/或代谢。

在某些实施方案中，本发明的维生素 D₃ 化合物可用于治疗与维生素 D₃-应答的平滑肌细胞的异常活性相关的疾病和疾病。例如，本发明可用于治疗过度增殖性血管疾病，例如高血压诱导的血管重构、血管再狭窄和动脉粥样硬化。在其它实施方案中，本发明的化合物或用于治疗以维生素 D₃-应答的平滑肌细胞的异常代谢为特征的障碍，例如，动脉性高血压。

本方法可在培养的细胞中完成，例如，体外或离体，或者可在存在于动物个体中的细胞中完成，例如，体内。本发明的维生素 D₃ 化合物可以先在体外如 Catellot 等人(1982), J. Biol. Chem. 257(19): 11256 所述试验。

4、肾素表达的抑制

本发明的化合物通过抑制凝乳酶表达而控制血压，并可用作抗高血压剂。肾素-血管紧张素调节剂级联在血压、电解质和容量自体平衡的调节中发挥重要作用(Y.C. Li, 摘要, DeLuca Symposium on Vitamin D₃, Tauc, New Mexico, June 15-June 19, 2002, p. 18)。为此，本发明提供了治疗个体维生素 D₃ 相关状态的方法，其中该维生素 D₃ 相关状态是以表达肾素的细胞的异常活性为特征的障碍。该方法包括向个体施用有效量的式 I 化合物，从而由该细胞的肾素表达被抑制，从而为该个体治疗了高血压。

5、膀胱功能障碍

包括膀胱壁进行性去神经和肥大的形态学的膀胱变化，这在具有不同的膀胱障碍患者中是组织学检查经常可见的，该膀胱障碍导致活动过度性膀胱与例如临床良性的前列腺增生(BPH)和脊髓损伤相关的膀胱障碍。

在这些疾病中观测到，膀胱张力和/或紧张的增加显示与细胞和分子改变例如细胞支架蛋白和收缩性蛋白、线粒体功能和平滑肌细胞的各种酶活性相关。膀胱壁肥大还包括改变它的细胞外基质和非平滑肌部位。

在膀胱中的这些变化与存贮(刺激)症状相关，特别是尿频、尿急、欲望性尿失禁和夜尿症。这些症状影响到患者的社交、心理、家庭、职业、身体和性生活，对患者的生活质量造成深刻的负面影响。

目前,尚未发现这些症状的理想治疗方法。可用的每种治疗选项(例如抗毒蕈碱剂或 α -阻滞剂)与和其作用机理有关的缺点相关,其仅仅是基于症状的治疗,而不是基于疾病的病因治疗。事实上,一些可用药物的临床效果受限于其弱的效能,以及由于一些显著的副作用而不为一般患者接受。

因此,需要有一种新的提供改善临床效果的治疗方法,该方法针对潜在的致病因素、异常生长以及因此而发生的膀胱平滑肌细胞的功能障碍。

如此处所述的,令人惊讶地发现,维生素 D 类似物可以治疗或预防与膀胱肥大相关的膀胱功能障碍,例如膀胱过度活动和临床 BPH。活动过度性膀胱,还称为逼尿肌过度活动或逼尿肌功能失调,包括无意识性膀胱痉挛。活动过度的逼尿肌可引起活动过度性膀胱。尽管活动过度性膀胱的潜在原因可能是神经性疾病(例如,多发性硬化症、帕金森氏病、中风、脊髓损伤),由腹部创伤、骨盆创伤或手术造成的神经损害,中风,多发性硬化症,感染,膀胱癌,药物副作用或前列腺增大(BPH),在多数情况下该原因是自发性的,即未知原因。

另外,该维生素 D 相关化合物已用于治疗与 BPH 相关的刺激性排泄症状。BPH 不但与导致膀胱出口阻塞(BOO)的腺增大及其继发症状相关,还与包括膀胱壁肥大和进行性去神经的膀胱形态变化相关。这些变化导致功能需求增加和膀胱平滑肌细胞内协调中断。

6、眼色素层炎

眼色素层炎,一种包括包含虹膜、睫状体和脉络膜的眼的炎症的疾病,事实上包括一大群不同的疾病,其不但影响眼色素层,还影响视网膜、视神经和玻璃体。根据国际眼色素层炎研究小组(International Uveitis Study Group),有多种眼色素层炎分类:前、中、后和全眼色素层炎(全部的)。炎症可能是由创伤或毒素或传染剂诱导的,但在多数情况下,该机理在性质上似乎是自身免疫。症状可能是急性的、亚急性的、慢性的(持续时间大于3个月)和复发的。大多数情况下,内源性眼色素层炎的病因是未知的。眼色素层炎是视力严重损伤的主要原因。尽管由眼色素层炎致盲的患者数量不清楚,估计在美国眼色素层炎占全部全盲病例的10-15%。

可描述为后眼色素层炎的多种疾病:病灶性、多病灶性或弥漫性

脉络膜炎，脉络膜视网膜炎，视网膜脉络膜炎，眼色素层视网膜炎或神经性眼色素层炎。该疾病通常是无痛的，但其特征是存在悬浮物、视觉损伤(突然的或逐渐的)例如目昏等和视力丧失。后眼色素层炎可能有多种病因，而且其本身症候复杂，有时误认为临床疾病。在试验模型和临床上，越来越多的证据表明内源性后眼色素层视网膜炎常常具有过大的免疫应答的特征，该过大的免疫应答会引起组织破坏。当未发现明显的感染或瘤病原时，治疗可以直接针对抑制炎症级联产生，并且有望减少组织损伤。在一种实施方案中，本发明提供了治疗眼色素层炎的方法。

7、间质性膀胱炎

间质性膀胱炎，在此是指"IC"，是一种慢性炎症性膀胱疾病，还称为慢性骨盆疼痛综合征(CPPS)或疼痛性膀胱综合征(PBS)，其特征为骨盆疼痛、尿急和尿频。该疾病主要影响雌性动物，尽管雄性动物也有诊断为IC的。与其它膀胱功能障碍疾病不同，IC的特征为由于症状学的膀胱壁慢性炎症；换言之，引起异常膀胱收缩性和慢性骨盆疼痛的原因是慢性炎症，因此，治疗应以这种病原部位为目标。事实上，传统的以平滑肌弛缓剂治疗膀胱功能障碍，如活动过度性膀胱，这在IC患者中是无效的。在一种实施方案中，本发明提供了治疗间质性膀胱炎的方法。

8、子宫肌瘤

子宫肌瘤(还称为子宫的平滑肌瘤/平滑肌瘤、纤维瘤、肌瘤/肌瘤、纤维肌瘤、肌纤维瘤、纤维平滑肌瘤)是来自子宫的子宫肌膜的良性的平滑肌细胞肿瘤。它们包括粘膜下的、浆膜下的和壁内的肌瘤。在一种实施方案中，本发明提供了治疗子宫肌瘤的方法。

9、药物组合物

本发明还提供了一种药物组合物，包括有效量的式I或其它在此描述的维生素D₃化合物和药学可接受的载体。在进一步的实施方案中，该有效量治疗如前述的维生素D₃相关状态是有效的。在一种实施方案中，该维生素D₃化合物使用药学可接受的配方施用于该个体，例如，药学可接受的配方施用于该个体后，药学可接受的配方给个体提供了持续递送至少12小时、24小时、36小时、48小时、1周、2周、3周或4周的维生素D₃化合物。

在某些实施方案中，这些药物组合物适合于局部或经口施用于个体。在如以下详细描述的有关实施方案中，本发明的该药物组合物可以特别地配制用于以固体或液体形式施用，包括如下适用的：(1)经口施用，例如，灌服剂(水性或非水性溶液或混悬液)、片剂、大丸剂(boluses)、散剂、颗粒剂、糊剂；(2)胃肠外施用，例如，通过皮下的、肌内的或静脉内的注射剂，例如，灭菌溶液混悬液；(3)局部应用，例如，乳膏剂、软膏剂用于皮肤的喷雾剂；(4)阴道内或直肠内，例如，阴道栓剂、乳膏剂或泡沫剂；或者(5)气雾剂，例如，水性气雾剂、脂质体制剂或含有该化合物的固体微粒。

所述的短语“药学可接受的”是指本发明维生素 D₃ 化合物、含有该化合物的组合物和/或剂型，它们在可靠的医学判断范围内，适用于与人类和动物的组织接触而没有过高的毒性、刺激、过敏性应答或其它问题或并发症，具有适当合理的利益/风险比。

所述的短语“药学可接受的载体”包括药学可接受的材料、组分或载体，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包胶材料，参与将该主题化学药品从一个器官或身体的部分运载或运输另一器官或身体的部分。在与配方其它成分相容性和对患者无害的意义上说，各载体应当是“可接受的”。一些可用于药学可接受的载体的材料的实例包括：(1)糖类，例如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2)淀粉类，例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3)纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；(4)西黄蓍胶粉；(5)麦芽；(6)明胶；(7)滑石粉；(8)赋形剂，例如可可脂和栓剂蜡类；(9)油类，例如花生油、棉子油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10)乙二醇类，例如丙二醇；(11)多元醇类，例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇；(12)酯类，例如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13)琼脂；(14)缓冲剂，例如氢氧化镁和氢氧化铝；(15)海藻酸；(16)无热原水；(17)等渗盐水；(18)林格氏溶液；(19)乙醇；(20)磷酸盐缓冲溶液；和(21)其它非毒性可配伍的用于药物配方的物质。

润湿剂、乳化剂和润滑剂，例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁，以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂，防腐剂和抗氧化剂也可以出现于该组合物中。

药学可接受的抗氧化剂的实例包括：(1)水溶性抗氧化剂，例如抗坏血

酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、亚硫酸钠、偏重亚硫酸钠、亚硫酸钠等；(2)油溶性抗氧化剂，例如抗坏血酸棕榈酸酯、叔丁基对羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、丁羟基茴香醚、 α -生育酚等；和(3)和金属螯合剂，例如枸橼酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

含有维生素 D₃ 化合物(类)的组合物包括适合于经口、经鼻、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道、气雾剂和/或胃肠外施用的那些。该组合物可方便地以单位剂型呈现，并且可以通过任何药学领域已知的方法制备。可以与载体材料组合以生产单一剂型的活性成分的量会根据被治疗的宿主、特定的施用方法而改变。可以与载体材料组合以生产单一剂型的活性成分的量通常是产生疗效的化合物的量。通常，以 100% 计，该量为约 1% ~ 约 99% 的活性成分，优选约 5% ~ 约 70%，最优选约 10% ~ 约 30%。

制备这些组合物的方法包括将维生素 D₃ 化合物(类)与该载体并且任选一种或多种助剂结合的步骤。通常，该配方通过均匀地且紧密地将维生素 D₃ 化合物与液体载体、或细微分开的固体载体、或二者结合，然后如果需要，使该产品成形而制备。

适合于经口施用的本发明组合物可以是胶囊剂、扁胶囊剂、丸剂、片剂、锭剂(使用香味基质，通常为蔗糖和阿拉伯胶或西黄蓍胶)、散剂、颗粒剂，或为在水或非水性液体中的溶液剂或混悬剂，或为水包油或油包水液体乳剂，或为酏剂或糖浆剂，或为软锭剂(使用惰性基质，例如明胶和甘油，或蔗糖和阿拉伯胶)和/或为口腔洗剂等，各自含有预定量的维生素 D₃ 化合物(类)作为活性成分。化合物还可以以大丸剂、药糖剂(electuary)或糊剂施用。

在本发明供经口施用的固体剂型(胶囊剂、片剂、丸剂、糖锭剂、散剂、颗粒剂等)中，该活性成分与一种或多种药学可接受的载体混合，该载体例如枸橼酸钠或磷酸二钙，和/或如下任意的：(1)充填剂或增充剂，例如淀粉类、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸；(2)粘合剂，例如，羧甲基纤维素、藻酸盐类、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶；(3)保湿剂，例如甘油；(4)崩解剂，例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐类和碳酸钠；(5)溶解阻滞剂，例如石蜡；(6)吸收促进剂，例如季胺类化合物；(7)润湿剂，例如，乙

酰醇(acetyl alcohol)和单硬脂酸甘油酯; (8)吸收剂, 例如高岭土和膨润土; (9)润滑剂, 例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇类、十二烷基硫酸钠及其混合物; 和(10)着色剂。对于胶囊剂、片剂和丸剂, 该药物组合物还可以包括缓冲剂。使用赋形剂使用乳糖或乳糖(milk sugars)以及高分子量聚乙二醇类等, 相似类型的固体组分还可以作为充填剂用于软和硬填充的明胶胶囊剂。

片剂可以任选地与一种或多种助剂通过压制或模制而制备。压制片剂可以使用粘合剂(例如, 明胶或羟丙基甲基纤维素)、滑润剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如, 淀粉羟乙酸钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性或分散剂而制备。模制片剂可以通过在适当的机器上将粉末化的用惰性液体稀释剂润湿的活性成分的混合物制模而得。

本发明药物组合物的片剂和其它固体剂型, 例如糖锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂可以任选地压痕, 或者以衣层或壳而制备, 例如药物配制领域公知的肠溶衣或其它衣层。它们还可以配制成提供延缓或控制释放的活性成分, 其中使用例如, 以不同比例提供期望的释放模式的羟丙基甲基纤维素, 其它聚合物基质、脂质体和/或微球。它们通过例如经细菌截流过滤器过滤, 或通过将灭菌剂掺入无菌固体组合物中而除菌, 该无菌固体组合物可以在使用前溶于无菌水或一些其它无菌可注射的介质中。这些组合物还任选地含有遮光剂并且可以是仅仅、或优选在胃肠道的某些部位, 任选地以延缓的方式释放活性成分(类)的组合物。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡类。如果合适, 该活性成分还可以是与一种或多种上述赋形剂的微胶囊形式。

维生素 D₃ 化合物(类)经口施用的液体剂型包括药学可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酏剂。除该活性成分外, 液体剂型可以含有通常用于本领域的惰性稀释剂, 例如, 水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂, 例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苧醇、苯甲酸苧酯、丙二醇、1,3-丁烯乙二醇、油类(特别地, 棉籽、花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻和芝麻油)、甘油、四氢呋喃甲醇、聚乙二醇类和脱水山梨醇脂肪酸酯类及其混合物。

除了惰性稀释剂外, 经口服的组合物可以包括辅助剂例如润湿剂、乳化剂和混悬剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。

除了活性维生素 D₃ 化合物(类)外, 混悬剂可以含有混悬剂, 例如,

乙氧基化异硬脂醇类、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯类、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和西黄蓍胶及其混合物。

本发明供直肠或阴道施用的药物组合物可以是栓剂，其可以通过将一种或多种维生素 D₃ 化合物(类)与一种或多种适合的非刺激性的包括例如可可脂、聚乙二醇类、栓剂蜡或水杨酸酯的赋形剂或载体混合而制备，并且该栓剂在室温下为固体，但在体温下为液体，并且因此在此在直肠或阴道黏膜腔中会熔化并释放活性剂。

本发明适合阴道施用的组合物还包括阴道栓剂、棉塞剂、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或含有如本领域已知的适合的载体的喷雾配方。

维生素 D₃ 化合物(类)的局部或经皮施用的剂型包括散剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、乳膏剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。该活性维生素 D₃ 化合物(类)可以在无菌条件下与药学可接受的载体和任何防腐剂、缓冲剂或可能需要的抛射剂混合。

除了本发明的维生素 D₃ 化合物(类)外，软膏剂、糊剂、乳膏剂和凝胶剂可以含有赋形剂，例如动物和植物脂肪类、油类、蜡类、石蜡类、淀粉、西黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇类、硅酮类、膨润土、硅酸、滑石粉和氧化锌或其混合物。

除了维生素 D₃ 化合物(类)外，散剂和喷雾剂可以含有赋形剂例如乳糖、滑石粉、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙类和聚酰胺粉，或这些物质的混合物。喷雾剂还可以含有常用的抛射剂，例如氯氟碳氢化合物和挥发性未取代的碳氢化合物，例如丁烷和丙烷。

维生素 D₃ 化合物(类)可以另选地通过气雾剂施用。这是通过制备含有该化合物的水性气雾剂、脂质制品或固体颗粒而实现。可以使用非水性(例如碳氟化合物抛射剂)混悬剂。声波雾化器是优选的，因为它们使该化合物暴露于剪切力减至最小，该剪切力可引起化合物降解。

通常，水性气雾剂是通过将该化合物的水性溶液或混悬液与常规的药学可接受的载体和稳定剂配制而制备。该载体和稳定剂因特定化合物的需要量而改变，但是典型地包括非离子型表面活性剂(吐温类、普流罗尼克类或聚乙二醇类)、无毒蛋白类如血清白蛋白、脱水山梨酯类、油酸、卵磷脂、氨基酸例如甘氨酸、缓冲剂、盐类、糖类或糖醇类。气雾剂通常由等渗溶液制备。

透皮贴剂具有向身体提供控制释放维生素 D₃ 化合物(类)的额外优

点。该剂型可以通过将该化合物溶解或分散至适当的介质中而制备。还可使用吸收促进剂以增加该活性成分穿过皮肤的流量。该流量的速率可以通过提供速率控制膜或者将活性成分分散至聚合物基质或凝胶中而得到控制。

眼科配方、眼膏剂、散剂、溶液剂等也在本发明的范围内。

本发明适合胃肠外施用的药物组合物包含一种或多种维生素 D₃ 化合物(类)与一种或多种药学可接受的无菌等渗水性或非水性溶液剂、分散剂、混悬剂或乳剂，或者临用前可以复溶于无菌可注射溶液剂或分散剂中的无菌粉末，该药物组合物可以含有抗氧剂、缓冲剂、抑菌剂、使该配方与意欲接受者的血液等渗的溶质或者混悬或增稠剂。

可以用于本发明药物组合物的适合的水性或非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇类(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇类等)及其适合的混合物、植物油类如橄榄油和可注射的有机酯类例如油酸乙酯。可以保持适合的流动性，例如，通过使用包衣材料例如卵磷脂、在分散剂时通过维持需要的粒子径和通过使用表面活性剂。

这些组合物还可以含有辅助剂例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂可以确保防止微生物的作用。该抗细菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等。还可以需要等渗剂例如糖类、氯化钠等包含于组合物中。另外，通过包含延缓吸收例如单硬脂酸铝和明胶的成分，可以使可注射药物剂型延长吸收。

在某些情况下，为了延长药物的作用，需要减缓从皮下或肌肉注射的药物的吸收。这可以通过使用具有弱水溶性的结晶或无定形材料的液体混悬剂而实现。药物的吸收速率依赖于其溶解速率，该溶解又依赖于晶体粒度和晶型。或者，胃肠外施用的药物剂型的延缓吸收是通过将该药物溶解或混悬于油性载体中而实现的。

可注射的贮库形式是通过在生物可降解聚合物例如聚交酯-聚乙醇酸交酯中将维生素 D₃ 化合物(类)形成微胶囊基质而制备的。依据药物与聚合物的比，以及所用特定聚合物的性质，可以控制药物的释放速率。其它生物可降解聚合物的实例包括聚(原酸酯类)和聚(酞类)。贮库型可注射配方还可通过将药物包陷在与身体组织相容的脂质体或微乳剂中而制备。

当维生素 D₃ 化合物(类)作为药物施用于人或动物时, 它们可以以其本身给予, 或者以含有例如 0.1 ~ 99.5%(更优选 0.5 ~ 90%)的活性成分与药学可接受的载体组合的药物组合物给予。

不论所选择的施用途径, 本发明的可以以适当水合的形式使用的维生素 D₃ 化合物(类)和/或药物组合物, 它们是通过本领域技术人员已知的常规方法而配制成药学可接受的剂型。

在本发明药物组合物中的活性成分, 其实际的剂量水平和施用的时程可以改变以便获得一种活性成分的量, 该量对于特定的患者、组合物和施用方法而言可有效地获得期望的治疗应答而对患者无毒性。示例性的剂量范围内为每日 0.1 ~ 10mg。

本发明维生素 D₃ 化合物的优选剂量是患者可耐受的最大的并且不发生严重高钙血症的量。优选地, 本发明的维生素 D₃ 化合物以约 0.001 μ g ~ 约 100 μ g/kg 体重, 约 0.001 ~ 约 10 μ g/kg 体重或约 0.001 μ g ~ 约 100 μ g/kg 体重的浓度施用。上述值的中间范围也是本发明的一部分。

本发明的实例

本发明通过以下实施例进一步说明, 这些实施例不应解释为进一步的限定。

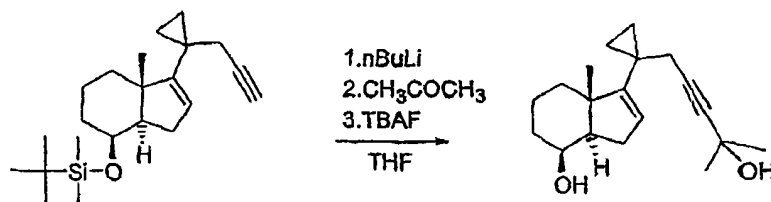
本发明化合物的合成

试验

涉及维生素 D₃ 类似物的全部操作均在氮气氛下、在琥珀色玻璃器皿中进行。四氢呋喃是在临用前从二苯酮羰自由基钠(sodium-benzophenone ketyl)中蒸馏而来, 并且溶质的溶液以硫酸钠干燥。熔点是在 Thomas-Hoover 毛细管仪上测定并且未经校正。旋光度是在 25℃ 下测定。除非另有说明, ¹H NMR 光谱是在 CDCl₃ 中、在 400MHz 处记录的。TLC 是在硅胶板(Merck PF-254)上进行, 在短波长 UV 光下显影或通过以 10% 磷钼酸甲醇喷板接着加热显影。快速色谱法是在 40-65 μ m 筛目硅胶上进行。制备型 HPLC 是在 5×50cm 柱及 15-30 μ m 筛目硅胶上、以 100ml/min 流速而完成。化合物 1-14 的结果概述于表 1 和 2 中。

实施例 1

(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-羟基-4-甲基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-醇的合成



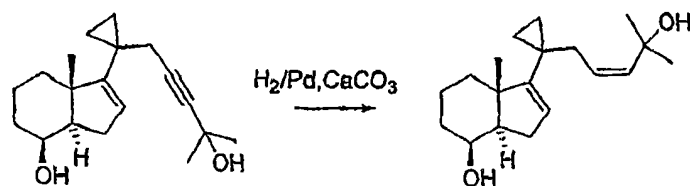
在-78℃下，向(3aR,4S,7aR)-1-[1-[4-(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-7a-甲基-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-1-基]-环丙基]-乙炔基(1.0g, 2.90mmol)在四氢呋喃(15mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(2.72mL, 4.35mmol, 1.6M 在己烷中)。在-78℃下搅拌 1h 后加入丙酮(2.5mL, 34.6mmol)，连续搅拌 2.5h。加入 NH₄Cl 水溶液(15mL)，并在室温下将该混合物搅拌 15min，然后用 AcOEt(2×50mL)萃取。将合并的萃取液用盐水(50mL)洗涤，再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(2.4g)通过 FC(50g, 10%AcOEt 在己烷中)纯化，得到(3aR,4S,7aR)-5-[1-[4-(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-7a-甲基-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-1-基]-环丙基]-2-甲基-戊-3-炔-2-醇(1.05g, 2.61mmol)，将其用氟化四丁基铵(6mL, 6mmol, 1.0M 在 THF 中)处理，并在 65-75℃下搅拌 48h。将该混合物用 AcOEt(25mL)稀释，再用水(5×25mL)、盐水(25mL)洗涤。将合并的水洗涤物用 AcOEt(25mL)萃取，再将合并的有机萃取物通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(1.1g)通过 FC(50g, 20%AcOEt 在己烷中)纯化，得到标题化合物(0.75g, 2.59mmol, 90%)。

$[\alpha]_D^{30} = +2.7 \pm 0.75$, CHCl₃. ¹H NMR (CDCl₃): 5.50 (1H, m), 4.18 (1H, m), 2.40 (2H, s), 2.35-1.16 (11H, m), 1.48 (6H, s), 1.20 (3H, s), 0.76-0.50 (4H, m); ¹³C NMR (CDCl₃): 156.39, 125.26, 86.39, 80.19, 69.21, 65.16, 55.14, 46.94, 35.79, 33.60, 31.67, 29.91, 27.22, 19.32, 19.19, 17.73, 10.94, 10.37;

MS HREI 计算值 C₂₂H₂₈O₂ M+ 288.2089, 测定值 M+ 288.2091.

实施例 2

(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-羟基-4-甲基-戊-2Z-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-醇的合成



在室温下将(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-羟基-4-甲基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-醇(0.72g, 2.50mmol)、乙酸乙酯(10mL)、己烷(24mL)、无水乙醇(0.9mL)、喹啉(47 μ L)和林德拉(Lindlar)催化剂(156mg, 5%Pd 披 CaCO_3)的混合物氢化 2h。将该反应混合物通过硅藻土垫板(celite pad)过滤, 并将该垫板用 AcOEt 洗涤。合并过滤液和洗涤液, 再用 1M HCl、 NaHCO_3 和盐水洗涤。通过 Na_2SO_4 干燥后蒸发溶剂, 残余物(0.79g)通过 FC(45g, 20%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到标题化合物(640mg, 2.2mmol, 88%)。

实施例 3

(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-羟基-4-甲基-戊基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-醇的合成



使用 Paar 仪, 在室温和 50p.s.i.压力下, 将(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-羟基-4-甲基-戊-2Z-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-醇(100mg, 0.34mmol)、1,4-双(二苯基-膦基)丁烷 1,5 环辛二烯铑四氟硼酸盐(25mg, 0.034mmol)、二氯甲烷(5mL)和 1 滴汞的混合物氢化 3h。将该反应混合物通过硅藻土垫板过滤, 然后将其用乙酸乙酯洗涤。将混合的过滤液和洗涤液蒸发至干(110mg), 再通过 FC(10g, 20%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到标题化合物(75mg, 0.26mmol, 75%)。

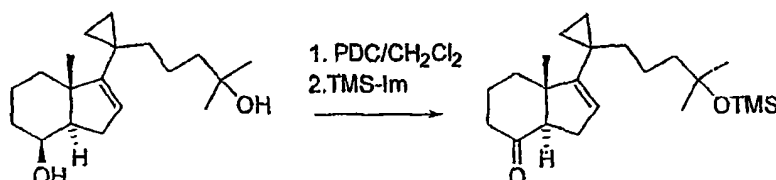
$[\alpha]_D^{30} = -8.5 \pm 0.65$, CHCl_3 , $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 5.37 (1H, m), 4.14 (1H, m), 2.37-1.16

(17H, m), 1.19 (6H, s), 1.18 (3H, s), 0.66-0.24 (4H, m);

MS HREI 计算值 $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_2$ M+H 292.2402。测定值 M+H 292.2404。

实施例 4

(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-甲基-4-三甲基硅烷基氧基-戊基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮的合成



在室温下向搅拌的(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-羟基-4-甲基-戊烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-醇(440mg, 1.50mmol)和硅藻土(2.0g)在二氯甲烷(10mL)中的混悬液中加入重铬酸吡啶 (1.13g, 3.0mmol)。将产生的混合物搅拌 5h, 通过硅胶(10g)过滤, 然后将硅胶垫板用 20%AcOEt 在己烷中的溶液洗涤。将合并的过滤液和洗涤液蒸发, 得到粗制的(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-羟基-4-甲基-戊烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(426mg, 1.47mmol, 98%)。在室温下向(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-羟基-4-甲基-戊烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(424mg, 1.47mmol)在二氯甲烷(10mL)中的搅拌的溶液中加入三甲代甲硅烷基-咪唑(0.44mL, 3.0mmol)。将产生的混合物搅拌 1.0h, 通过硅胶(10g)过滤, 再将硅胶垫板用 10%AcOEt 在己烷中的溶液洗涤。将合并液过滤, 并将洗涤液蒸发, 得到标题化合物(460mg, 1.27mmol, 86%)。

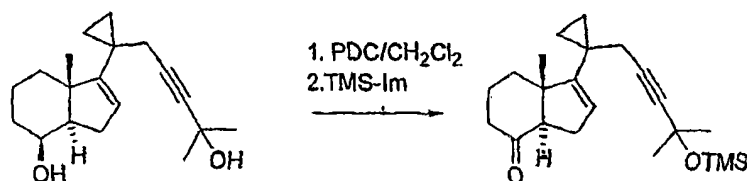
$[\alpha]_D^{29} = -9.9 \pm 0.55$, CHCl_3 , $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3):

5.33 (1H, dd, $J=3.2, 1.5$ Hz), 2.81 (1H, dd, $J=10.7, 6.2$ Hz), 2.44 (1H, ddd, $J=15.6, 10.7, 1.5$ Hz), 2.30-1.15 (13H, m) 重叠峰 2.03 (ddd, $J=15.8, 6.4, 3.2$ Hz), 1.18 (6H, s), 0.92 (3H, s), 0.66-0.28 (4H, m), 0.08 (9H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): 211.08 (0), 155.32(0), 124.77(1), 73.98(0), 64.32(1), 53.91(0), 44.70(2), 40.45(2), 38.12(2), 34.70(2), 29.86(3), 29.80(3), 26.80(2), 24.07(2), 22.28(2), 21.24(0), 18.35(3), 12.60(2), 10.64(2), 2.63 (3);

MS HRES 计算值 $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_2\text{Si}$ M^+ 362.2641。测定值 M^+ 362.2648。

实施例 5

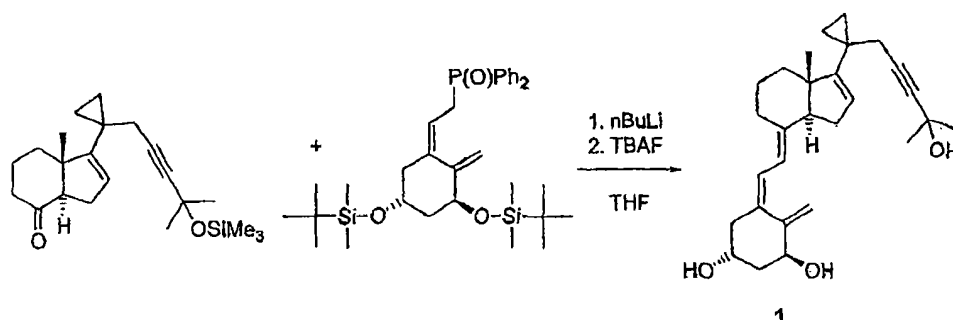
(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-甲基-4-三甲基硅烷基氧基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮的合成



在室温下向(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-羟基-4-甲基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-醇(381mg, 1.32mmol)和硅藻土(2.0g)在二氯甲烷(10mL)中的搅拌的混悬液中加入重铬酸吡啶 (1.0g, 2.65mmol)。产生的混合物搅拌 1.5h, 通过硅胶(10g)过滤, 然后将硅胶垫板用 20%AcOEt 在己烷中的溶液洗涤。将合并的过滤液和洗涤液蒸发, 得到粗制的(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-羟基-4-甲基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(360mg, 1.26mmol, 95%)。在室温下(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-羟基-4-甲基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(360mg, 1.26mmol)在二氯甲烷(10mL)中的搅拌的溶液中加入三甲代甲硅烷基-咪唑(0.25mL, 1.7mmol)。产生的混合物搅拌 0.5h, 通过硅胶(10g)过滤, 再将硅胶垫板用 5%AcOEt 在己烷中的溶液洗涤。将合并液过滤, 并将洗涤液蒸发, 得到标题化合物(382mg, 1.07mmol, 81%)。

实施例 6

1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-胆骨化醇(1)的合成



在-78℃下向(1S,5R)-1,5-双-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-3-[2-(二苯基膦基)-乙-(Z)-亚基]-2-亚甲基-环己烷(513mg, 0.88mmol)在四氢呋喃(6mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(0.55mL, 0.88mmol)。将产生的混合物搅拌 15min, 并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-甲基-4-三甲硅烷基氧基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(179mg,

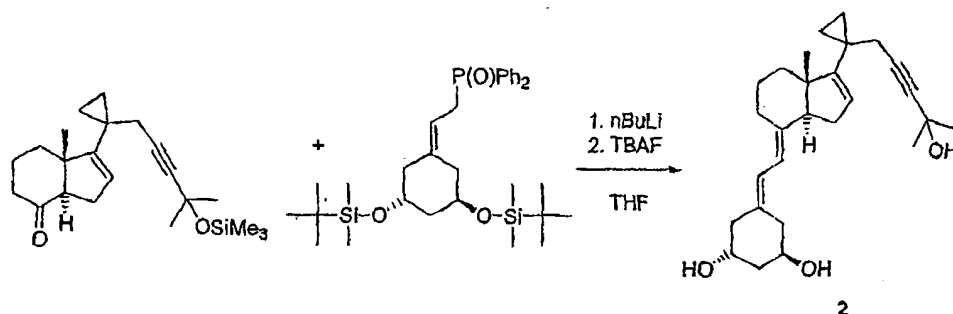
0.50mmol)在四氢呋喃(2mL)中的溶液。在-72℃下将该反应混合物搅拌3.5h,用己烷(25mL)稀释,盐水(30mL)洗涤,再通过Na₂SO₄干燥。将蒸发溶剂后的残余物(716mg)通过FC(15g, 5%AcOEt在己烷中)纯化,得到1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-胆骨化醇(324mg, 0.45mmol)。在室温下向1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-胆骨化醇(322mg, 0.45mmol)中加入氟化四丁基铵(4mL, 4mmol, 1M溶液在THF中)。将混合物搅拌18h,用AcOEt(25mL)稀释,再用水(5×20mL)、盐水(20mL)洗涤,再通过Na₂SO₄干燥。将蒸发溶剂后的残余物(280mg)通过FC(10g, 50%AcOEt在己烷和AcOEt中)纯化,得到标题化合物(1)(172mg, 0.41mmol, 82%)。

$$[\alpha]_D^{31} = +32.4^{\circ}$$

0.50, MeOH. UV $\lambda_{\max}$ (EtOH): 261 nm (ϵ 11930); ¹H NMR (CDCl₃): 6.36 (1H, d, J=11.3 Hz), 6.09 (1H, d, J=11.3 Hz), 5.45 (1H, m), 5.33 (1H, m), 5.01 (1H, s), 4.45 (1H, m), 4.22 (1H, m), 2.80 (1H, m), 2.60 (1H, m), 2.50-1.10 (16H, m), 1.45 (6H, s), 0.81 (3H, s), 0.72-0.50 (4H, m); MS HRES 计算值 C₂₈H₃₈O₃ M⁺ 422.2821。测定值 M⁺ 422.2854。

实施例 7

1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-19-去甲-胆骨化醇(2)的合成



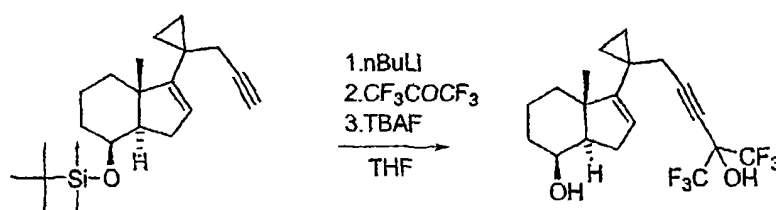
在-78℃下向(1R,3R)-1,3-双-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-5-[2-(二苯基磷基)亚乙基]-环己烷(674mg, 1.18mmol)在四氢呋喃(8mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(0.74mL, 1.18mmol)。将产生的混合物搅拌15min,并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-甲基-4-三甲基硅烷基氧基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(235mg, 0.66mmol)在四

氢呋喃(3mL)中的溶液。在-72℃下将该反应混合物搅拌 3.5h, 用己烷(25mL)稀释, 盐水(30mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(850mg)通过 FC(15g, 5%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-19-去甲-胆骨化醇(330mg, 0.46mmol)。在室温下, 向 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-19-去甲-胆骨化醇(328mg, 0.46mmol)中加入氟化四丁基铵(5mL, 5mmol, 在 THF 中的 1M 溶液)。将混合物搅拌 62h, 用 AcOEt(25mL)稀释, 再用水(5 × 20mL)、盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(410mg)通过 FC(10g, 50%AcOEt 在己烷和 AcOEt 中)纯化, 得到标题化合物(2)(183mg, 0.45mmol, 68%)。

$[\alpha]_D^{29} = +72.1$ c 0.58, MeOH. UV λ_{max} (EtOH): 242nm (ϵ 29286), 251 nm (ϵ 34518), 260 nm (ϵ 23875); ¹H NMR (CDCl₃): 6.30 (1H, d, J=11.3 Hz), 5.94 (1H, d, J=11.3 Hz), 5.48 (1H, m), 4.14 (1H, m), 4.07 (1H, m), 2.78 (2H, m), 2.52-1.10 (18H, m), 1.49 (6H, s), 0.81 (3H, s), 0.72-0.50 (4H, m); MS HRES 计算值 C₂₇H₃₈O₃ M⁺ 410.2821。测定值 M⁺ 410.2823。

实施例 8

(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-羟基-4-三氟甲基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-醇的合成



在-78℃下向(3aR,4S,7aR)-1-[1-[4-(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-7a-甲基-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-1-基]]-环丙基}-乙炔基(1.95g, 5.66mmol)在四氢呋喃(35mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(4.3mL, 6.88mmol, 1.6M 在己烷中)。在-78℃下搅拌 1h 后, 加入六氟丙酮(从冷却棒中加入 6 滴), 并连续搅拌 1h。加入 NH₄Cl 水溶液(10mL), 并使该混合物温热至室温。将反应混合物用盐水(100mL)稀释, 并用己烷(2×125mL)萃取。将合并的萃取物通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的

残余物(8.2g)通过 FC(150g, 10%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到 (3aR,4S,7aR)-5-{1-[4-(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-7a-甲基-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-1-基]-环丙基}-1,1,1-三氟-2-三氟甲基-戊-3-炔-2-醇(2.73g, 5.35mmol), 将其用氟化四丁基铵(20mL, 20mmol, 1.0M 在 THF 中)处理, 并在 65-75℃下搅拌 30h. 将该混合物用 AcOEt(150mL)稀释, 再用水(5×150mL)、盐水(150mL)洗涤。将合并的水洗涤物用 AcOEt(150mL)萃取, 再将合并的有机萃取物通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(3.2g)通过 FC(150g, 20%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到标题化合物(2.05g, 5.17mmol, 97%)。

$$[\alpha]_{\text{D}}^{28} = +6.0 \pm 0.47,$$

CHCl₃, ¹H NMR (CDCl₃): 5.50 (1H, br. s), 4.16 (1H, br. s), 3.91 (1H, s), 2.48 (1H,

AB四重峰的A部分, J=17.5 Hz), 2.43 (1H, AB四重峰的B部分, J=17.5Hz), 2.27

(1H, m), 2.00-1.40 (9H, m), 1.18 (3H, s), 0.8-0.5 (4H, m); ¹³C NMR (CDCl₃): 155.26(0),

126.68(1), 121.32(0, q, J=284 Hz), 90.24 (0), 71.44(0, sep. J=34Hz), 70.54 (0), 69.57(1),

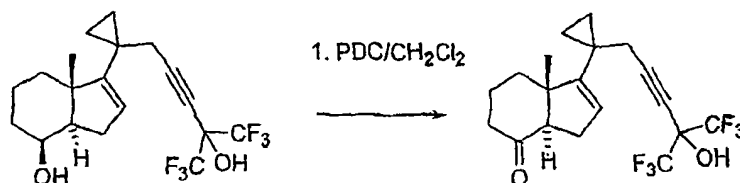
55.17(1), 47.17(0), 36.05(2), 33.63(2), 30.10(2), 27.94(2), 19.50(3), 19.27(0), 17.90(2),

11.56(2), 11.21(2); MS HREI 计算值 C₁₉H₂₂O₂F₆ M+ 396.1524。测定值 M+

396.1513.

实施例 9

(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-三氟甲基-4-羟基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮的合成



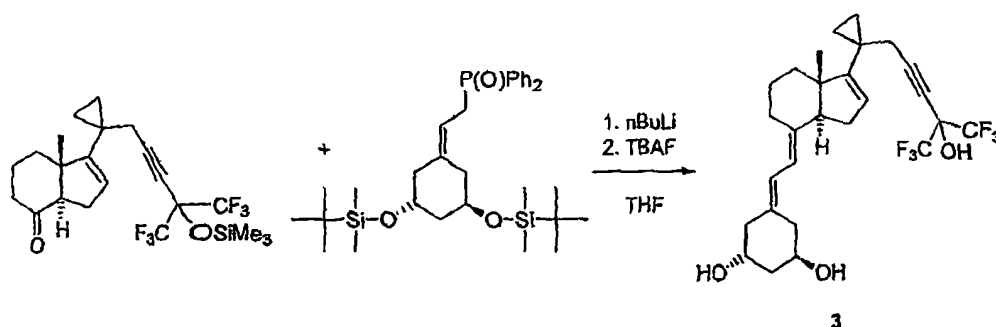
在室温下向(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-羟基-4-三氟甲基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-醇(504mg, 1.27mmol)和硅藻土(1.5g)在二氯甲烷(12mL)中的搅拌的混悬液中加入重铬酸吡啶 (0.98g, 2.6mmol)。将产生的混合物搅拌 2.5h, 通过硅胶(5g)过滤, 然后将硅胶垫板用 20%AcOEt 在己烷中的溶液洗涤。将合并液过滤, 并将洗涤液蒸发, 得到标题化合物(424mg, 1.08mmol, 85%)。

$$[\alpha]_D^{28} = +3.1 \text{ c } 0.55, \text{CHCl}_3.$$

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 5.46 (1H, br. s), 3.537 (1H, s), 2.81 (1H, dd, $J=10.7, 6.5$ Hz), 2.49-1.76 (10H, m), 0.90 (3H, s), 0.77-0.53 (4H, m); MS HREI 计算值 $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{F}_6$ $\text{M}+\text{H}$ 395.1440。测定值 $\text{M}+\text{H}$ 395.1443。

实施例 10

1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(3)的合成



在-78℃下向(1R,3R)-1,3-双-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-5-[2-(二苯基磷基)亚乙基]-环己烷(900mg, 1.58mmol)在四氢呋喃(8mL)中的搅拌的溶液中加入 $n\text{-BuLi}$ (1.0mL, 1.6mmol)。产生的混合物搅拌 15min, 并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-三氟甲基-羟基-戊-2-炔基)-环丙基 3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-酮(200mg, 0.51mmol)在四氢呋喃(3mL)中的溶液。在-72℃下将该反应混合物搅拌 3.5h, 用己烷(25mL)稀释, 盐水(30mL)洗涤, 再通过 Na_2SO_4 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(850mg)通过 FC(20g, 10%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(327mg, 0.44mmol, 86%)。在室温下向 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(327mg, 0.44mmol)中加入氟化四丁基铵(4mL, 4mmol, 在 THF 中的 1M 溶液)。将混合物搅拌 24h, 用 AcOEt(25mL)稀释, 再用水(5×20mL)、盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na_2SO_4 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(250mg)通过 FC(10g, 50%AcOEt 在己烷和 AcOEt 中)纯化, 得到标题化合物(3)(183mg, 0.45mmol, 68%)。

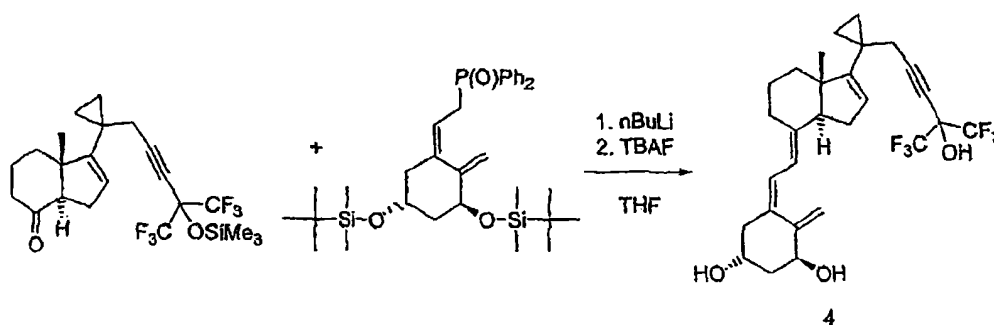
$[\alpha]_D^{30} = +73.3$ c 0.51, EtOH. UV

$\lambda_{\max}$ (EtOH): 243 nm (ϵ 29384), 251 nm (ϵ 34973), 260 nm (ϵ 23924); ^1H NMR (CDCl_3): 6.29 (1H, d, $J=11.1$ Hz), 5.93 (1H, d, $J=11.1$ Hz), 5.50 (1H, m), 4.12 (1H, m), 4.05 (1H, m), 2.76 (2H, m), 2.55-1.52 (18H, m), 0.80 (3H, s), 0.80-0.49 (4H, m); ^{13}C NMR (CDCl_3): 155.24(0), 141.78(0), 131.28(0), 126.23(1), 123.65(1), 121.09(0, q, $J=285\text{Hz}$), 115.67(1), 89.63(0), 70.42(0), 67.48(1), 67.29(1), 59.19(1), 49.87(0), 44.49(2), 41.98(2), 37.14(2), 35.76(2), 29.22(2), 28.47(2), 27.57(2), 23.46(2), 19.32(0), 17.97(3), 11.89(2), 10.18(2);

MS HRES 计算值 $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{F}_6$ $\text{M}+\text{H}$ 519.2329。测定值 $\text{M}+\text{H}$ 519.2325.

实施例 11

1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(4)的合成



在下向(1S,5R)-1,5-双-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-3-[2-(二苯基磷基)-乙-(Z)-亚基]-2-亚甲基-环己烷(921mg, 1.58mmol)在四氢呋喃(8mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(1.0mL, 1.6mmol)。将产生的混合物搅拌 15min, 并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-三氟甲基-4-羟基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(197mg, 0.50mmol)在四氢呋喃(2mL)中的溶液。在-72℃下将该反应混合物搅拌 3.5h, 用己烷(25mL)稀释, 盐水(30mL)洗涤, 再通过 Na_2SO_4 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(876mg)通过 FC(20g, 105%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(356mg, 0.47mmol)。

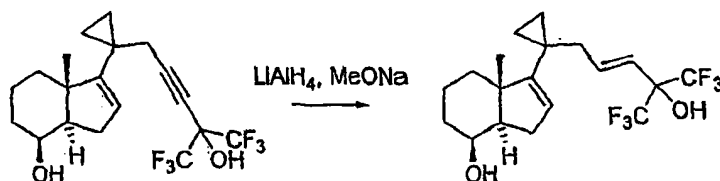
在室温下向 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(356mg, 0.47mmol)中加入氟化四丁基铵(5mL, 5mmol, 在 THF 中的 1M 溶液)。将混合物搅拌 15h,

用 AcOEt(25mL)稀释, 再用水(5 × 20mL)、盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(270mg)通过 FC(20g, 50%AcOEt 在己烷和 AcOEt 中)纯化, 得到标题化合物(4)(216mg, 0.41mmol, 87%)。

$[\alpha]_D^{30} = +40.0 \pm 0.53$, EtOH. UV $\lambda_{\max}$ (EtOH): 262 nm (ϵ 12919); ¹H NMR (CDCl₃): 6.38 (1H, d, J=11.5 Hz), 6.10 (1H, d, J=11.1 Hz), 5.49 (1H, m), 5.35 (1H, s), 5.02 (1H, s), 4.45 (1H, m), 4.25 (1H, m), 3.57 (1H, s), 2.83-1.45 (18H, m), 0.82 (3H, s), 0.80-0.51 (4H, m); MS HRES 计算值 C₂₈H₃₂O₃F₆ M+H 531.2329。测定值 M+H 531.2337。

实施例 12

(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[2-(5,5,5-三氟-4-羟基-4-三氟甲基-戊-2E-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-醇的合成



在 5°C 下向氢化铝锂(4.5mL, 4.5mmol, 1.0M 在 THF 中)中首先加入固体甲醇钠(245mg, 4.6mmol), 然后滴加 (3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-羟基-4-三氟甲基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-醇(360mg, 0.91mmol)在四氢呋喃(5mL)中的溶液。添加完毕后, 在回流下将该混合物搅拌 2.5h。然后在冰浴中将其冷却, 并用水(2.0mL)和氢氧化钠(2.0mL, 2.0M 水溶液)猝灭; 用醚(50mL)稀释, 搅拌 30min, 然后加入 MgSO₄(5g), 再连续搅拌 30min。将过滤液蒸发后的残余物(0.42g)通过 FC(20g, 20%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到标题化合物(315mg, 0.79mmol, 87%)。

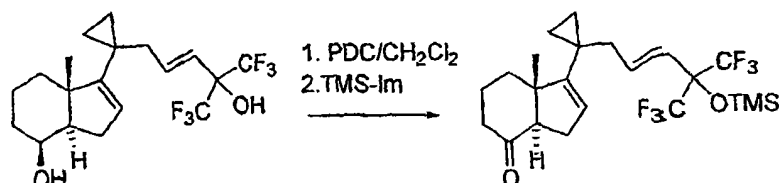
$[\alpha]_D^{28} = +2.0 \pm 0.41$,

CHCl₃. ¹H NMR (CDCl₃): 6.24 (1H, dt, J=15.7, 6.7 Hz), 5.60 (1H, d, J=15.7 Hz), 5.38 (1H, br. s), 4.13 (1H, br. s), 3.27 (1H, s), 2.32-1.34 (12H, m), 1.15 (3H, s), 0.80-0.45 (4H, m); ¹³C NMR (CDCl₃): 155.89(0), 138.10(1), 126.21(1), 122.50(0, q, J=287 Hz), 119.15(1), 76.09(0, sep. J=31Hz), 69.57(1), 55.33(1), 47.30(0), 40.31(2), 36.05(2), 33.71(2), 30.10(2), 20.36(0), 19.46(3), 17.94(2), 1.96(2), 11.46(2); MS HREI

计算值 C₁₉H₂₄O₂F₆ M+ 398.1680。测定值 M+ 398.1675。

实施例 13

(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-三氟甲基-4-三甲基硅烷基氧基-戊-2E-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮的合成



在室温下向(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-羟基-4-三氟甲基-戊-2E-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-醇(600mg, 1.51mmol)和硅藻土(2.0g)在二氯甲烷(10mL)中搅拌的混悬液的中加入重铬酸吡啶 (1.13g, 3.0mmol)。产生的混合物搅拌 3.5h, 通过硅胶(10g)过滤, 然后将硅胶垫板用 25%AcOEt 在己烷中的溶液洗涤。将合并的过滤滤和洗涤液蒸发, 得到粗制的(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-羟基-4-三氟甲基-戊-2E-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(550mg, 1.39mmol, 92%)。在室温下向(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-羟基-4-三氟甲基-戊-2E-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(550mg, 1.39mmol)在二氯甲烷(15mL)中的搅拌的溶液中加入三甲代甲硅烷基-咪唑(1.76mL, 12.0mmol)。将产生的混合物搅拌 1.0h, 通过硅胶(10g)过滤, 并将硅胶垫板用 10%AcOEt 在己烷中的溶液洗涤。将合并的过滤滤和洗涤液蒸发, 得到标题化合物(623mg, 1.33mmol, 88%)。

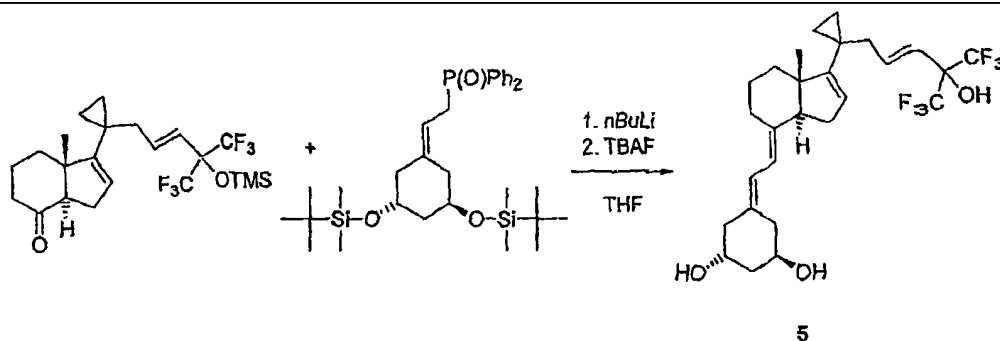
$[\alpha]_D^{28} = -1.6 \pm 0.51$, CHCl_3 . $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3):

6.14 (1H, dt, $J=15.5, 6.7$ Hz), 5.55 (1H, d, $J=15.5$ Hz), 5.35 (1H, m), 2.80 (1H, dd, $J=10.7, 6.4$ Hz), 2.47-1.74 (10H, m), 0.90 (3H, s), 0.76-0.40 (4H, m), 0.2 (9H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): 210.99 (0), 154.28(0), 137.41(1), 126.26(1), 122.59(0, q, $J=289$ Hz), 120.89 (1), 64.31(1), 53.96(0), 40.60(2), 40.13(2), 35.00(2), 27.03(2), 24.21(2), 20.57(0), 18.53(3), 12.41(2), 10.79(2), 1.65 (3);

MS HRES 计算值 $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{F}_6\text{Si}$ $\text{M}+\text{H}$ 469.1992。测定值 $\text{M}+\text{H}$ 469.1995。

实施例 14

1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(5)的合成

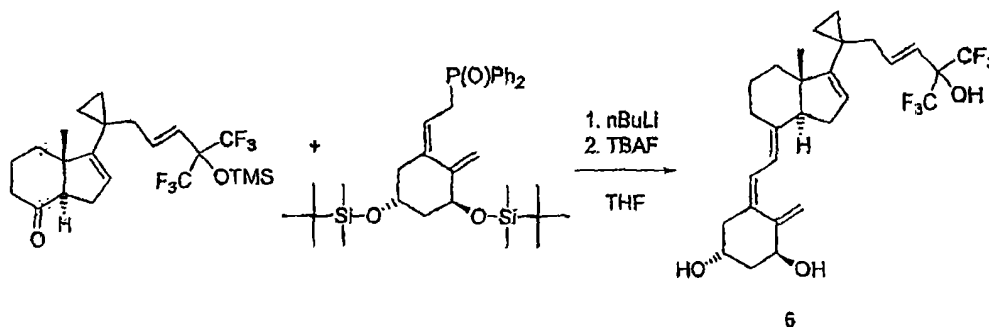


在-78℃下向(1R,3R)-1,3-双-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-5-[2-(二苯基磷基)亚乙基]-环己烷(514mg, 0.90mmol)在四氢呋喃(6mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(0.57mL, 0.91mmol)。将产生的混合物搅拌15min,并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-三氟甲基-4-三甲基硅烷基氧基-戊-2E-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-酮(200mg, 0.43mmol)在四氢呋喃(2mL)中的溶液。在-72℃下将该反应混合物搅拌3.5h,用己烷(35mL)稀释,盐水(30mL)洗涤,再通过Na₂SO₄干燥。将蒸发溶剂后的残余物(750mg)通过FC(15g, 5%AcOEt在己烷中)纯化,得到1α,3β-二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇和1α,3β-二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇的混合物(250mg)。在室温下向1α,3β-二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇和1α,3β-二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇的混合物(250mg)中加入氟化四丁基铵(4mL, 4mmol,在THF中的1M溶液)。将混合物搅拌24h,用AcOEt(25mL)稀释,再用水(5×20mL)、盐水(20mL)洗涤,再通过Na₂SO₄干燥。将蒸发溶剂后的残余物(270mg)通过FC(10g, 50%AcOEt在己烷和AcOEt中)纯化,得到标题化合物(5)(157mg, 0.30mmol, 70%)。

$[\alpha]_D^{25} = +63.3$ c 0.45, EtOH. UV λ_{max} (EtOH): 243nm (ϵ 3082) 251 nm (ϵ 36064), 260 nm (ϵ 24678); ¹H NMR (CDCl₃): 6.29 (1H, d, J=11.3 Hz), 6.24 (1H, dt, J=15.9, 6.4Hz), 5.92 (1H, d, J=11.1 Hz), 5.61 (1H, d, J=15.7Hz), 5.38 (1H, m), 4.13 (1H, m), 4.05 (1H, m), 2.88 (1H, s), 2.82-1.34 (19H, m), 0.770 (3H, s), 0.80-0.36 (4H, m); MS HRES 计算值 C₂₇H₃₄O₃F₆ M+H 521.2485。测定值 M+H 521.2489。

实施例 15

1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇(6)的合成

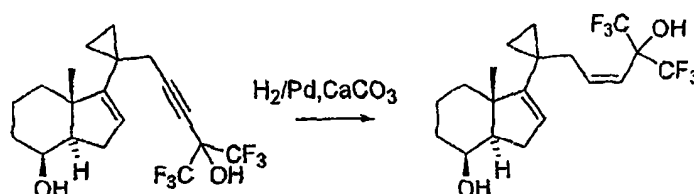


在-78℃下向(1S,5R)-1,5-双-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-3-[2-(二苯基膦基)-乙-(Z)-亚基]-2-亚甲基-环己烷(525mg, 0.90mmol)在四氢呋喃(6mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(0.57mL, 0.91mmol)。将产生的混合物搅拌 15min, 并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-三氟甲基-4-三甲基硅烷基氧基-戊-2E-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-酮(200mg, 0.43mmol)在四氢呋喃(2mL)中的溶液。在-72℃下将该反应混合物搅拌 2.5h, 用己烷(35mL)稀释, 盐水(30mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(760mg)通过 FC(15g, 10%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇和 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇的混合物(274mg)。在室温下向 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇和 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇的混合物(274mg)中加入氟化四丁基铵(4mL, 4mmol, 在 THF 中的 1M 溶液)。将混合物搅拌 15h, 用 AcOEt(25mL)稀释, 再用水(5×20mL)、盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(280mg)通过 FC(15g, 50%AcOEt 在己烷和 AcOEt 中)纯化, 得到标题化合物(6)(167mg, 0.31mmol, 73%)。

$[\alpha]_D^{25} = +18.3$ c 0.41, EtOH. UV $\lambda_{\max}$ (EtOH): 207 nm (ϵ 17778), 264 nm (ϵ 15767); ^1H NMR (CDCl_3): 6.36 (1H, d, $J=11.1$ Hz), 6.24 (1H, dt, $J=15.7, 6.7$ Hz), 6.07 (1H, d, $J=11.3$ Hz), 5.60 (1H, d, $J=15.5$ Hz), 5.35 (1H, m), 5.33 (1H, s), 5.00 (1H, s), 4.44 (1H, m), 4.23 (1H, m), 3.14 (1H, s), 2.80 (1H, m), 2.60 (1H, m), 2.40-1.40 (15H, m), 0.77 (3H, s), 0.80-0.36 (4H, m); MS HRES 计算值 $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{F}_6$ M+H 533.2485. 测定值 M+H 533.2483.

实施例 16

(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-羟基-4-三氟甲基-戊-2Z-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-醇的合成



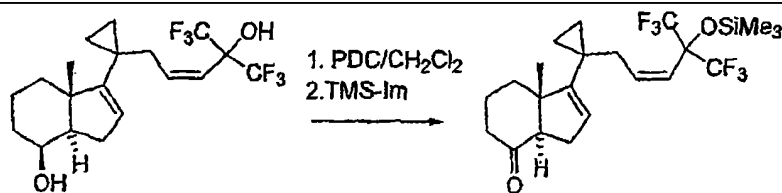
在室温下将(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-羟基-4-三氟甲基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-醇(300mg, 0.76mmol)、乙酸乙酯(5mL)、己烷(12mL)、无水乙醇(0.5mL)、喹啉(30 μ L)和林德拉催化剂(75mg, 5%Pd 披 CaCO_3)的混合物氢化 2h。将该反应混合物通过硅藻土垫板过滤, 并将该垫板用 AcOEt 洗涤。蒸发溶剂, 得到标题化合物(257mg, 0.65mmol, 87%)。

$[\alpha]_D^{28} = +1.8$ c 0.61, CHCl_3

^1H NMR (CDCl_3): 6.08 (1H, dt, $J=12.3, 6.7$ Hz), 5.47 (1H, m), 5.39 (1H, d, $J=12.1$ Hz), 4.15 (1H, br. s), 3.28 (1H, s), 2.52-1.34 (12H, m), 1.16 (3H, s), 0.78-0.36 (4H, m); ^{13}C NMR (CDCl_3): 156.66(0), 141.77(1), 126.51(1), 122.79(0, q, $J=285$ Hz), 115.77 (1), 69.59(1), 55.41(1), 47.28(0), 36.44(2), 35.90 (2), 33.75(2), 30.22(2), 20.89(0), 19.41(3), 17.94(2), 12.05(2), 11.11(2); MS HRES 计算值 $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{F}_6$ M+H 399.1753. 测定值 M+H 399.1757.

实施例 17

(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-三氟甲基-4-三甲基硅烷基氧基-戊-2Z-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-酮的合成



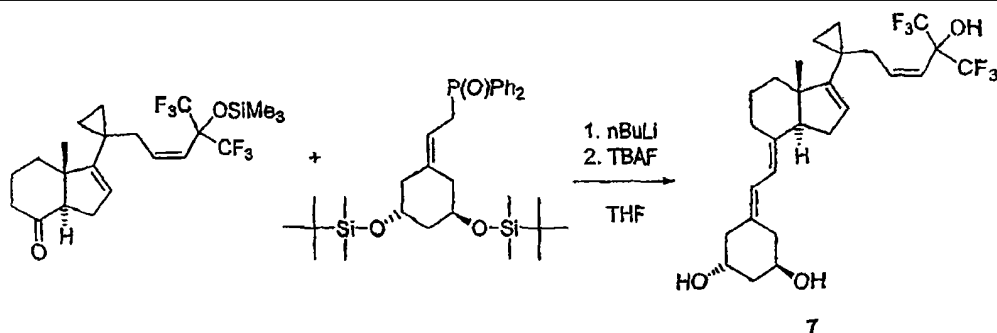
在室温下向(3aR,4S,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-羟基-4-三氟甲基-戊-2Z-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-醇(617mg, 1.55mmol)和硅藻土(2.0g)在二氯甲烷(10mL)中的搅拌的混悬液中加入重铬酸吡啶 (1.17g, 3.1mmol)。将产生的混合物搅拌 2.5h, 通过硅胶(5g)过滤, 然后将硅胶垫板用 20%AcOEt 己烷洗涤。将合并的过液滤和洗涤液蒸发, 得到粗制的(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-羟基-4-三氟甲基-戊烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(600mg, 1.51mmol, 98%)。在室温下向(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-羟基-4-三氟甲基-戊-2Z-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(600mg, 1.51mmol)在二氯甲烷(15mL)中的搅拌的溶液中加入三甲代甲硅烷基-咪唑(1.76mL, 12.0mmol)。将产生的混合物搅拌 1.0h, 通过硅胶(10g)过滤, 并将硅胶垫板用 10%AcOEt 的己烷洗涤。将合并的过液滤和洗涤液蒸发, 得到标题化合物(640mg, 1.37mmol, 88%)。

$[\alpha]_D^{25} = -0.2$ c 0.55, CHCl_3 , $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 5.97 (1H, dt, $J=12.2, 6.2$ Hz), 5.40 (1H, m), 5.38 (1H, d, $J=12.2$ Hz), 2.82 (1H, dd, $J=10.7, 6.6$ Hz), 2.60-1.74 (10H, m), 0.89 (3H, s), 0.75-0.36 (4H, m), 0.21 (9H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): 210.56 (0), 154.30(0), 139.28(1), 125.81(1), 122.52(0, q, $J=289$ Hz), 118.17 (1), 64.11(1), 53.69(0), 40.43(2), 35.51(2), 34.85(2), 26.94(2), 24.07(2), 20.89(0), 18.39(3), 12.26(2), 10.61(2), 1.43 (3);

MS HRES 计算值 $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{F}_6\text{Si}$ $\text{M}+\text{H}$ 469.1992。测定值 $\text{M}+\text{H}$ 469.1992。

实施例 18

1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(7)的合成



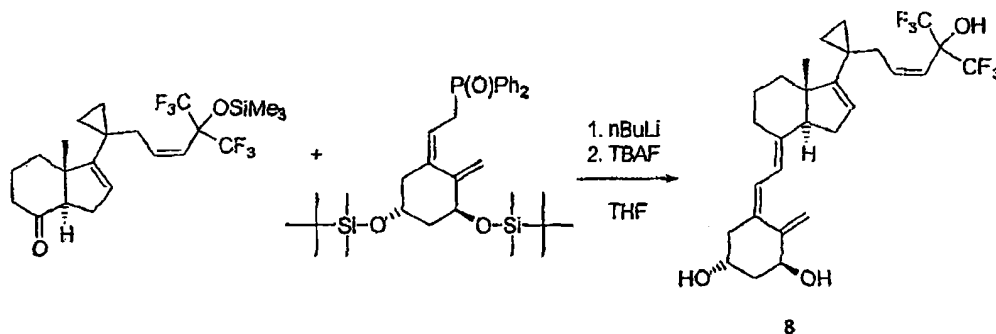
在-78℃下向(1R,3R)-1,3-双-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-5-[2-(二苯基膦基)亚乙基]-环己烷(514mg, 0.90mmol)在四氢呋喃(6mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(0.57mL, 0.91mmol)。将产生的混合物搅拌15min, 并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-三氟甲基-4-三甲基硅烷基氧-戊-2Z-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(194mg, 0.41mmol)在四氢呋喃(2mL)中的溶液。在-72℃下将该反应混合物搅拌3.0h, 用己烷(35mL)稀释, 盐水(30mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(750mg)通过 FC(15g, 10%AcOEt 己烷)纯化, 得到 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇和 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇的混合物(230mg)。在室温下向 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇和 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇的混合物(230mg)中加入氟化四丁基铵(4mL, 4mmol, 在 THF 中的 1M 溶液)。将混合物搅拌 40h, 用 AcOEt(25mL)稀释, 再用水(5×20mL)、盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(260mg)通过 FC(10g, 50%AcOEt 在己烷和 AcOEt 中)纯化, 得到标题化合物(7)(1327mg, 0.25mmol, 62%)。

$$[\alpha]_D^{28} = +53.6 \text{ c } 0.33, \text{ EtOH. UV } \lambda_{\text{max}} (\text{EtOH}): 243\text{nm}$$

(ϵ 26982), 251 nm (ϵ 32081), 260 nm (ϵ 21689); ¹H NMR (CDCl₃): 6.29 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.08 (1H, dt, J=12.5, 6.7Hz), 5.93 (1H, d, J=11.1 Hz), 5.46 (1H, m), 5.40 (1H, d, J=12.7 Hz), 4.12 (1H, m), 4.05 (1H, m), 3.14 (1H, s), 2.80-1.40 (19H, m), 0.77 (3H, s), 0.80-0.36 (4H, m); MS HRES 计算值 C₂₇H₃₄O₃F₆ M+H 521.2485。测定值 M+H 521.2487。

实施例 19

1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇(8)的合成

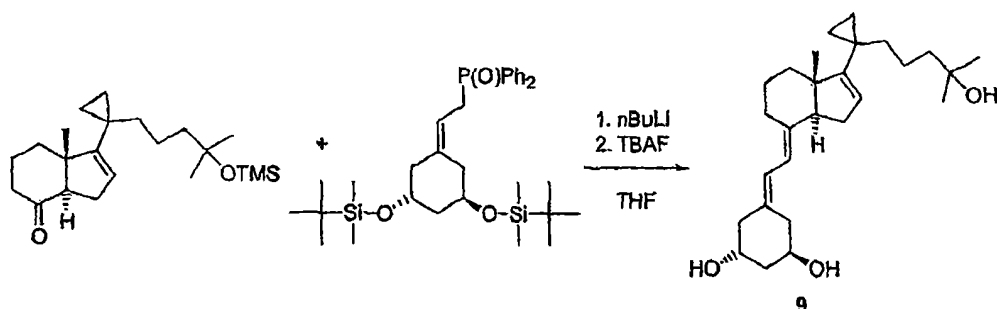


在-78℃下向(1S,5R)-1,5-双-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-3-[2-(二苯基膦基)-乙-(Z)-亚基]-2-亚甲基-环己烷(525mg, 0.90mmol)在四氢呋喃(6mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(0.57mL, 0.91mmol)。将产生的混合物搅拌 15min, 并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-三氟甲基-4-三甲基硅烷基氧基-戊-2Z-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-酮(200mg, 0.43mmol)在四氢呋喃(2mL)中的溶液。在-72℃下将该反应混合物搅拌 2.5h, 用己烷(35mL)稀释, 盐水(30mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(680mg)通过 FC(15g, 10%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇和 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇的混合物(310mg)。在室温下向 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇和 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇的混合物(310mg)中加入氟化四丁基铵(4mL, 4mmol, 在 THF 中的 1M 溶液)。将混合物搅拌 15h, 用 AcOEt(25mL)稀释, 再用水(5 × 20mL)、盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(370mg)通过 FC(10g, 50%AcOEt 在己烷和 AcOEt 中)纯化, 得到标题化合物(8)(195mg, 0.37mmol, 85%)。

$[\alpha]_D^{30} = +9.4$ c 0.49, EtOH. UV $\lambda_{\max}$ (EtOH): 262 nm (ϵ 11846); ^1H NMR (CDCl_3): 6.36 (1H, d, $J=11.1$ Hz), 6.08 (2H, m), 5.44 (1H, m), 5.40 (1H, d, $J=12.3$ Hz), 5.32 (1H, s), 5.00 (1H, s), 4.43 (1H, m), 4.23 (1H, m), 3.08 (1H, s), 2.80 (1H, m), 2.60 (1H, m), 2.55-1.40 (15H, m), 0.77 (3H, s), 0.80-0.34 (4H, m); MS HRES 计算值 $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_3\text{F}_6$ M+H 533.2485。测定值 M+H 533.2502。

实施例 20

1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇(9)的合成



在 -78°C 下向(1R,3R)-1,3-双-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-5-[2-(二苯基膦基)亚乙基]-环己烷(697mg, 1.22mmol)在四氢呋喃(9mL)中的搅拌的溶液中加入 $n\text{-BuLi}$ (0.77mL, 1.23mmol)。将产生的混合物搅拌 15min, 并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-甲基-4-三甲基硅烷基氧基-戊基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-酮(220mg, 0.61mmol)在四氢呋喃(2mL)中的溶液。在 -72°C 下将该反应混合物搅拌 3.5h, 用己烷(35mL)稀释, 盐水(30mL)洗涤, 再通过 Na_2SO_4 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(900mg)通过 FC(15g, 10%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇(421mg, 0.59mmol)。在室温下向 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇(421mg, 0.59mmol)中加入氟化四丁基铵(4mL, 4mmol, 在 THF 中的 1M 溶液)。将混合物搅拌 40h, 用 AcOEt(25mL)稀释, 再用水($5 \times 20\text{mL}$)、盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na_2SO_4 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(450mg)通过 FC(15g, 50%AcOEt 在己烷和 AcOEt 中)纯化, 得到标题化合物(9)(225mg, 0.54mmol, 89%)。

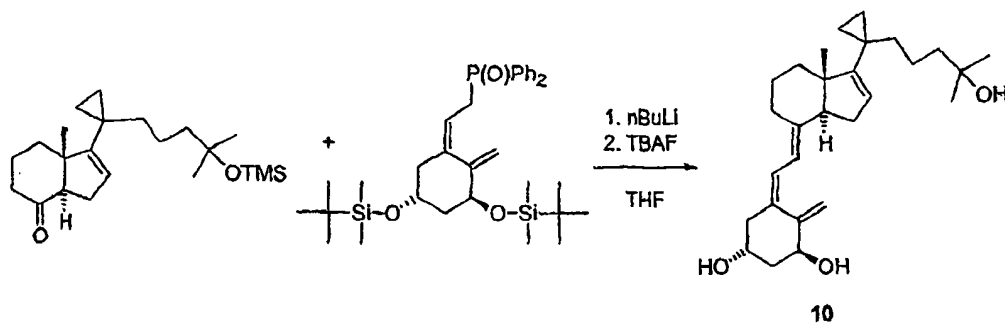
$$[\alpha]_D^{29} = +69.5^\circ$$

0.37, EtOH. UV $\lambda_{\max}$ (EtOH): 243nm (ϵ 27946251 nm (ϵ 33039), 261 nm (ϵ 22701);

^1H NMR (CDCl_3): 6.30 (1H, d, $J=11.3$ Hz), 5.93 (1H, d, $J=11.3$ Hz), 5.36 (1H, m), 4.12 (1H, m), 4.04 (1H, m), 2.75 (2H, m), 2.52-1.04 (22H, m), 1.18 (6H, s), 0.79 (3H, s), 0.65-0.26 (4H, m); ^{13}C NMR (CDCl_3): 157.16(0), 142.33(0), 131.25(0), 124.73(1), 123.76(1), 115.50(1), 71.10(0), 67.39(1), 67.19(1), 59.47(1), 50.12(0), 44.60(2), 43.84(2), 42.15(2), 38.12(2), 37.18(2), 35.57(2), 29.26(3), 29.11(2), 29.08(3), 28.48(2), 23.46(2), 22.26(2), 21.27(0), 17.94(3), 12.70(2), 10.27(2); MS HRES 计算值 $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$ $\text{M}+\text{H}$ 415.3207。测定值 $\text{M}+\text{H}$ 415.3207。

实施例 21

1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇(10)的合成



在 -78°C 下向(1S,5R)-1,5-双-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-3-[2-(二苯基膦基)-乙-(Z)-亚基]-2-亚甲基-环己烷(675mg, 1.16mmol)在四氢呋喃(8mL)中的搅拌的溶液中加入 $n\text{-BuLi}$ (0.73mL, 1.17mmol)。将产生的混合物搅拌 15min, 并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-甲基-4-三甲基硅烷基氧基-戊基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-酮(210mg, 0.58mmol)在四氢呋喃(2mL)中的溶液。在 -72°C 下将该反应混合物搅拌 3.5h, 用己烷(35mL)稀释, 盐水(30mL)洗涤, 再通过 Na_2SO_4 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(850mg)通过 FC(15g, 10%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇(382mg, 0.53mmol)。在室温下向 1 α ,3 β -二(叔丁基-二甲基-硅烷基氧基)-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇(382mg, 0.53mmol)中加入氟化四丁基铵(4mL, 4mmol, 在 THF 中的 1M 溶液)。将混合物搅拌 15h, 用 AcOEt(25mL)稀释, 再用水($5 \times 20\text{mL}$)、盐水(20mL)洗涤, 并通过 Na_2SO_4 干燥。将蒸发溶剂后的残

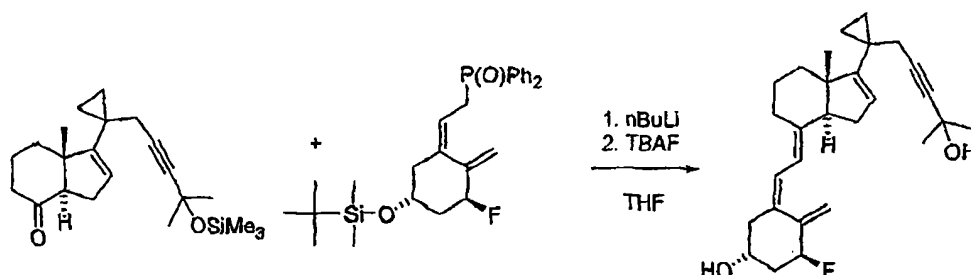
余物(380mg)通过 FC(15g, 50%AcOEt 在己烷和 AcOEt 中)纯化, 得到标题化合物(10)(204mg, 0.48mmol, 83%)。

$[\alpha]_D^{29} = +16.1$ c 0.36, EtOH UV $\lambda_{\max}$ (EtOH):

208 nm (ϵ 17024), 264 nm (ϵ 16028); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 6.37 (1H, d, $J=11.3$ Hz), 6.09 (1H, d, $J=11.1$ Hz), 5.33 (2H, m), 5.01 (1H, s), 4.44 (1H, m), 4.23 (1H, m), 2.80 (1H, m), 2.60 (1H, m), 2.38-1.08 (2OH, m), 1.19 (6H, s), 0.79 (3H, s), 0.66-0.24 (4H, m); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): 157.07(0), 147.62(0), 142.49(0), 133.00(0), 124.90(1), 124.73(1), 117.19(1), 111.64(2), 71.10(1), 70.70(0), 66.88(1), 59.53(1), 50.28(0), 45.19(2), 43.85(2), 42.86(2), 38.13(2), 35.59(2), 29.27(2), 29.14(3), 28.65(2), 23.57(2), 22.62(2), 21.29(0), 17.84(3), 12.74(2), 10.30(2); MS HRES 计算值 $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}_3$ M+Na 449.3026。测定值 M+Na 449.3023。

实施例 22

1 α -氟-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-胆骨化醇(11)的合成



在-78℃下向(1S,5R)-1-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-3-[2-(二苯基膦基)-乙-(Z)-亚基]-5-氟-2-亚甲基-环己烷(320mg, 0.68mmol)在四氢呋喃(6mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(0.43mL, 0.68mmol)。将产生的混合物搅拌 15min, 并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(4-甲基-4-三甲基硅烷基氧基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-酮(122mg, 0.34mmol)在四氢呋喃(2mL)中的溶液。在-72℃下将该反应混合物搅拌 3.5h, 用己烷(25mL)稀释, 盐水(30mL)洗涤, 再通过 Na_2SO_4 干燥。将蒸发溶剂后的残余物通过 FC(15g, 5%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到 1 α -氟-3 β -叔丁基-二甲基-硅烷基氧-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-胆骨化醇(162mg, 0.27mmol)。

在室温下向 1 α -氟-3 β -叔丁基-二甲基-硅烷基氧-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-胆骨化醇(162mg, 0.27mmol)中加入氟化四丁基铵(4mL, 4mmol, 在 THF 中的 1M 溶液)。将混合物搅拌 18h,

用 AcOEt(25mL)稀释, 再用水(5 × 20mL)、盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(160mg)通过 FC(10g, 30%AcOEt 在己烷和 AcOEt 中)纯化, 得到标题化合物(106mg, 0.25mmol, 74%)。

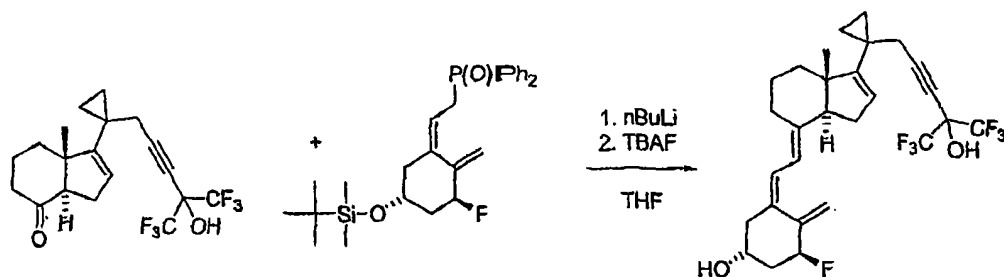
$[\alpha]_D^{31} = +60.6$ c 0.51, MeOH; UV λ_{max}

(MeOH): 242 nm (ϵ 12265), 269 nm (ϵ 12618); ¹H NMR (CDCl₃): 6.40 (1H, d, J=11.1 Hz), 6.10 (1H, d, J=11.1 Hz), 5.45 (1H, m), 5.40 (1H, s), 5.15 (1H, dm, J=50Hz), 5.12 (1H, s), 4.23 (1H, m), 2.85-1.50 (17H, m), 1.47 (6H, s), 0.81 (3H, s), 0.72-0.50 (4H, m).

MS HRES	计算值	C ₂₈ H ₃₇ FO ₂	M+	424.2778
	测定值		M+	424.2745.

实施例 23

1 α -氟-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(12)的合成



在-78℃下向(1S,5R)-1-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-3-[2-(二苯基膦基)-乙-(Z)-亚基]-5-氟-2-亚甲基-环己烷(565mg, 1.2mmol)在四氢呋喃(6mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(0.75mL, 1.2mmol)。将产生的混合物搅拌 15min, 并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-三氟甲基-4-羟基-戊-2-炔基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-酮(156mg, 0.40mmol)在四氢呋喃(2.5mL)中的溶液。在-72℃下将该反应混合物搅拌 3.5h, 用己烷(25mL)稀释, 盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(610mg)通过 FC(20g, 10%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到 1 α -氟-3 β -叔丁基-二甲基-硅烷基氧-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(206mg)。在室温下向 1 α -氟-3 β -叔丁基-二甲基-硅烷基氧-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(206mg, 0.32mmol)中加入氟化四丁基铵(4mL, 4mmol, 在 THF 中的 1M 溶液)。将混合物搅拌 15h, 用 AcOEt(50mL)稀释, 再用水(4 ×

520mL)、盐水(50mL)洗涤,再通过 Na₂SO₄干燥。将蒸发溶剂后的残余物(410mg)通过 FC(20g, 30%AcOEt 在己烷中)纯化,得到标题化合物(163mg, 0.31mmol,

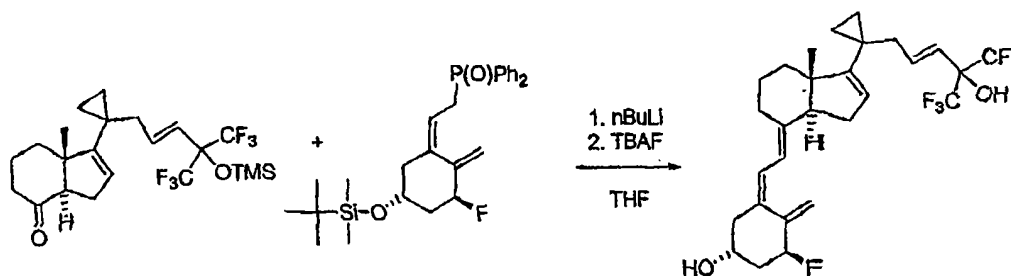
$[\alpha]_D^{20} = +39.8$ c 0.48, EtOH. UV $\lambda_{\max}$ (EtOH): 244 nm (ϵ 9521); ¹H NMR

(CDCl₃): 6.39 (1H, d, J=11.3 Hz), 6.10 (1H, d, J=11.1 Hz), 5.48 (1H, m), 5.40 (1H, s), 5.15 (1H, dm, J=52Hz), 5.11 (1H, s), 4.23 (1H, m), 3.56 (1H, s), 2.82-1.52 (16H, m), 0.80 (3H, s), 0.80-0.50 (4H, m).

MS HRES	计算值	C ₂₈ H ₃₁ O ₂ F ₇	M+H	533.2285
	测定值		M+H	533.2300.

实施例 24

1 α -氟-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇(13)的合成



在-78℃下向(1S,5R)-1-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-3-[2-(二苯基膦基)-乙-(Z)-亚基]-5-氟-2-亚甲基-环己烷(424mg, 0.90mmol)在四氢呋喃(6mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(0.57mL, 0.91mmol)。将产生的混合物搅拌 15min, 并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟-4-三氟甲基-4-三甲基硅烷基氧-戊-2E-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茚-4-酮(200mg, 0.43mmol)在四氢呋喃(2mL)中的溶液。在-72℃下将该反应混合物搅拌 2.5h, 用己烷(25mL)稀释, 盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄干燥。将蒸发溶剂后的残余物(660mg)通过 FC(15g, 10%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到 1 α -氟-3 β -叔丁基-二甲基-硅烷基氧-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇和 1 α -氟-3 β -叔丁基-二甲基-硅烷基氧-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇的混合物(197mg)。

在室温下向 1 α -氟-3 β -叔丁基-二甲基-硅烷基氧-25-三甲基硅烷基

氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇和 1 α -氟-3 β -叔丁基-二甲基-硅烷基氧-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇的混合物(197mg)中加入氟化四丁基铵(4mL, 4mmol, 在 THF 中的 1M 溶液)。将该混合物搅拌 15h, 用 AcOEt(25mL)稀释, 再用水(5 $\times$ 20mL)、盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(190mg)通过 FC(10g, 30%, 50%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到标题化合物(143mg, 0.27mmol, 62%)。

$[\alpha]_D^{30} = +47.4$ c 0.38, EtOH. UV λ_{max} (EtOH): 243nm (ϵ 9699),

265 nm (ϵ 9315); ¹H NMR (CDCl₃): 6.39 (1H, d, J=11.3 Hz), 6.25 1H, dt, J=15.8,

6.6Hz), 6.09 (1H, d, J=11.3 Hz), 5.61 (1H, d, J=15.6Hz), 5.40 (1H, s), 5.36 (1H, m),

5.15 (1H, dm, J=52Hz), 5.11 (1H, s), 4.23 (1H, m), 3.18 (1H, s), 2.80 (1H, m), 2.63 (1H,

m), 2.40-1.46 (14H, m), 0.78 (3H, s), 0.76-0.36 (4H, m).

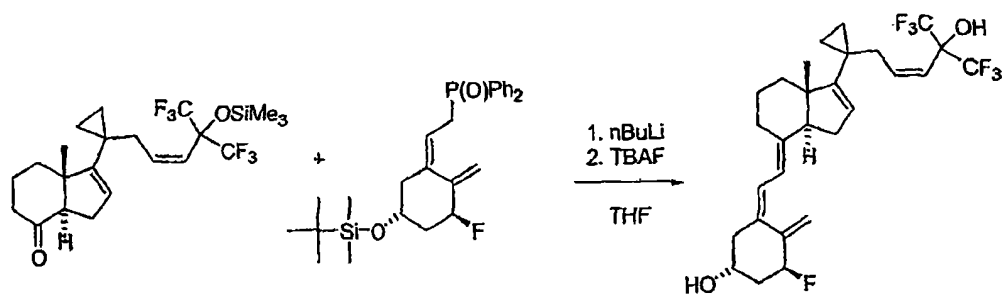
MS HRES 计算值 C₂₈H₃₃O₂F₇ M+H 535.2442

测定值

M+H 535.2450

实施例 25

1 α -氟-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇
(14)的合成



在-78℃下向(1S,5R)-1-((叔丁基二甲基)硅烷基氧基)-3-[2-(二苯基磷基)-乙-(Z)-亚基]-5-氟-2-亚甲基-环己烷(424mg, 0.90mmol)在四氢呋喃(6mL)中的搅拌的溶液中加入 n-BuLi(0.57mL, 0.91mmol)。将产生的混合物搅拌 15min, 并滴加(3aR,7aR)-7a-甲基-1-[1-(5,5,5-三氟 4-三氟甲基-4-三甲基硅烷基氧基-戊-2Z-烯基)-环丙基]-3a,4,5,6,7,7a-六氢-3H-茛-4-酮(100mg, 0.25mmol)在四氢呋喃(2mL)中的溶液。在-72℃下将该反应混合物搅拌 4.5h, 用己烷(25mL)稀释, 盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(590mg)通过 FC(15g, 10%AcOEt

在己烷中)纯化, 得到 1 α -氟-3 β -叔丁基-二甲基-硅烷基氧-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇和 1 α -氟-3 β -叔丁基-二甲基-硅烷基氧-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇的混合物(85mg)。在室温下向 1 α -氟-3 β -叔丁基-二甲基-硅烷基氧-25-三甲基硅烷基氧基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇和 1 α -氟-3 β -叔丁基-二甲基-硅烷基氧-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇的混合物(85mg)中加入氟化四丁基铵(2mL, 2mmol, 在 THF 中的 1M 溶液)。将混合物搅拌 15h, 用 AcOEt(25mL)稀释, 再用水(5 $\times$ 20mL)、盐水(20mL)洗涤, 再通过 Na₂SO₄ 干燥。将蒸发溶剂后的残余物(110mg)通过 FC(10g, 30%, 50%AcOEt 在己烷中)纯化, 得到标题化合物(62mg, 0.12mmol, 46%)。

$[\alpha]^{30}_D = +26.5$ c 0.37, EtOH. UV λ_{max} (EtOH): 243nm (ϵ 10706), 266 nm (ϵ

10098);

¹H NMR (CDCl₃): 6.39 (1H, d, J=11.3 Hz), 6.09(1H, d, J=11.8Hz), 6.08 1H, dt, J=12.1, 6.9Hz), 5.44 (1H, m), 5.40 (1H, d, J=12.1Hz), 5.39 (1H, s), 5.14 (1H, dm, J=50Hz), 5.10 (1H, s), 4.23 (1H, m), 3.08 (1H, s), 2.79 (1H, m), 2.62 (1H, m), 2.60-1.50 (14H, m), 0.77 (3H, s), 0.80-0.34 (4H, m).

MS HRES	计算值	C ₂₈ H ₃₃ O ₂ F ₇	M+H	535.2442
	测定值		M+H	535.2453.

生物学实施例

实施例 26

最大耐受剂量(MTD)的测定

本发明维生素 D₃ 化合物的最大耐受剂量是以 8 周龄雌性 C57BL/6 小鼠(3 小鼠/组), 以不同浓度的维生素 D₃ 类似物, 每日经口给药(0.1ml/小鼠)达 4 日。将类似物配制在米格列醇(miglyol)中, 使每日以 0.1ml/小鼠 p.o.给予时达到 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30、100 和 300 μ g/kg 的终浓度。在研究最后一日的第 5 日通过尾部放血抽取用于血清钙测定的血。使用比色测定法(Sigma Diagnostics, 操作编号 597)测定血清钙水平。取耐受而不诱导高钙血症(血清钙>10.7mg/dl)的类似物的最高剂量作为最大耐受剂量(MTD)。表 3 显示了化合物(1)-(14)的相对 MTD。

实施例 27

化合物(1)-(14)的免疫测定

未成熟树突状细胞(DC)如 Romani, N. 等人(Romani N. 等人(1996) J. Immunol. Meth. 196: 137)所述制备。在混合白细胞应答(MLR)中激活同种异体 T 细胞的 IFN- γ 产量是如 Penna, G., 等人, J Immunol, 164: 2405-2411 (2000)所述测定。

简而言之, 外周血单核细胞(PBMC)是通过聚蔗糖(Ficoll)梯度从血沉棕黄层分离而得, 并将相同数目(3×10^5)的来自 2 种不同供体的同种异体 PBMC 在 96 孔平底板中共同培养。将维生素 D₃ 化合物加至各培养物中。5 日后, MLR 测定中的 IFN- γ 产量通过 ELISA 测定, 结果以需要诱导 50% 抑制 IFN- γ 产量(IC₅₀)的测试化合物的量(nM)表示。结果概述于表 3 中。

表 3

化合物	MTD (小鼠) μg/kg	IFN-γ IC ₅₀ pM
1,25-(OH) ₂ D ₃	0.3	49.6
1α,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-胆骨化醇(1)	10	33.6
1α,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-19-去甲-胆骨化醇(2)	10	25.4
1α,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(3)	0.3	14.0
1α,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(4)	0.3	45.0
1α,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(5)	0.01	12.0
1α,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇(6)	0.3	40
1α,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(7)	0.3	55
1α,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇(8)	1	33.0
1α,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇(9)	1	31.0
1α,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇(10)	1	<0.01
1α-氟-25-羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-胆骨化醇(11)	100	16.4
1α-氟-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(12)	0.3	585.0
1α-氟-25-羟基-16,23E-二烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇(13)	3	65.0
1α-氟-25-羟基-16,23Z-二烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇(14)	1	81.0

实施例 28

使用膀胱癌细胞系的增殖测定

膀胱癌细胞系(T24、RT112、HT1376 和 RT4 为人膀胱癌细胞系；NHEK 为正常人角质化细胞)从 European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK)获得。在平底 96 孔板中在 100 μ l 的 DMEM 介质内将细胞以 3×10^3 /孔铺板, 该 DMEM 培养基含有: 5%胎克隆 I(Fetal Clone I)、50 μ g/l 庆大霉素、1mM 丙酮酸钠和 1%非必需氨基酸。在 37 $^{\circ}$ C 下 5%CO₂ 中培养 24h 后, 使细胞附着在板上, 加入在 100 μ l 上述完全培养基中的浓度 100 μ M ~ 0.3 μ M 的 VDR 配体(化合物(1)-(14))。进一步培养 72h 后, 使用荧光基础增殖测定盒测定细胞增殖(CyQuant 细胞增殖测定盒, 分子探针, Eugene, OR, USA)。由滴定数据的回归曲线计算 IC₅₀。结果见表 4。

表 4

化合物	T24 (μM)	RT112 (μM)	HT1376 (μM)	RT4 (μM)	NHEK (μM)
1,25-(OH) ₂ D ₃	54.6	19/28.7	50	45/26	4.5
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-胆骨化醇(1)	-	>30	-	10.6	-
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-19-去甲-胆骨化醇(2)	-	>30	-	6.3	-
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(3)	-	22.7	-	5.2	1.0
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(4)	-	13.8	-	1.7	2.0
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(5)	-	14.5	-	4.6	4.9
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇(6)	-	10.6	-	2.3	5.8
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(7)	-	9.6	-	2.2	4.4
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇(8)	-	15.5	-	3.3	3.6
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇(9)	-	>30	-	9.9	6.1
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇(10)	-		-	2	5.2
1 α -氟-25-羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-胆骨化醇(11)	-	>30	-	16.7	
1 α -氟-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(12)	-		-	3.6	1.0
1 α -氟-25-羟基-16,23E-二烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇(13)	-		-	3.6	5.1
1 α -氟-25-羟基-16,23Z-二烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇(14)	-		-	3.1	4.0

实施例 29

骨化三醇和维生素 D₃ 类似物对膀胱状细胞的生长和功能的活性

本发明人发现, 骨化三醇和维生素 D₃ 类似物对膀胱状细胞的生长和功能有影响, 这已在体外模型中通过培养人间质膀胱状细胞得到证实。本发明人证实了文献已报道的维生素 D 受体(VDR)存在于这些细胞中(见以下图 1)。

在这些模型中, 骨化三醇(维生素 D₃ 的活性型)和其它维生素 D₃ 类似物(化合物(4)、(6)、(8)和(10))显示有效地抑制膀胱状细胞的基础(图 2)生长。在以前尚未报道的该活性是剂量依赖型的, 骨化三醇(1,25-二羟基维生素 D₃)(对基底细胞)的 IC₅₀ 为 $9.8 \pm 7 \times 10^{-15}$ 。

已经完成了一些其它维生素 D 化合物的类似研究, 结果(以 -Log IC₅₀ 表示)见下表。表中数据是指化合物对基底人膀胱细胞生长的抑制作用, 该细胞未用睾酮刺激或(在一种情况下)受刺激。还列出了各化合物的大鼠最大耐受剂量(MTD)(表 5)。

表 5

化合物	-LogIC ₅₀	MTD(μg/kg)
(4)	2.45±2.47	0.3
(6)	10.8±0.34	0.3
(8)	7.1±0.68	1
(10)	7.77±0.44	1

实施例 30

在鼠类/肾小球旁细胞系 As4.1 中肾素 mRNA 的抑制作用

在完全培养基中用本发明化合物以 10⁸、10⁹、和 10¹⁰M 将 As4.1 细胞(80%亚融合)处理 24h。将总 RNA 用 RNeasy Mini 试剂盒(Qiagen)提取; 用 DNase I(Qiagen)处理, 根据制造商的指示以随机试验将逆转录试剂(Applied Biosystems)用于逆转录作用。使用商业获得的β-肌动蛋白 VIC 结合探针(目录号 4352341E, Applied Biosystems)和用户设计的 mRENIN FAM-结合探针(图样分析, Applied Biosystems; 正向:

AGGCCTTCCTTGACCAATCTTAC ; 反 向 :
GCTGAACCCGTGTCAAAGATG ; 探 针 : **FAM-ACCAACTA**
CCTGAATACCGAGT-MGB), 以多通路完成实时 PCR 分析。反应在
25 μ L 体积中完成, 该 25 μ L 体积中含有 12.5 μ l 2 $\times$ Master Mix(Applied
Biosystems)、10ng/反应/孔 cDNA 和 2.5 μ M 各种基因特异性引物。将
ABI PRISM 7700 分析仪(Applied Biosystems)在 50 $^{\circ}$ C 下使用 2 分钟, 在
95 $^{\circ}$ C 下使用 10 分钟, 接着在 95 $^{\circ}$ C 下 15 秒和 60 $^{\circ}$ C 下 1 分钟经 40 循环。
将循环阈(Ct)值输出到 Excel 工作表中进行分析。将试验 cDNA 结果对
鼠 β -肌动蛋白持家(housekeeping)基因正交。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法来表示扣除
对未扣除群间基因表达的叠差(表 6)。

表 6

化合物	肾素 mRNA 抑制 As4.1/wt, IC50pM
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-胆骨化醇(1)	9423.4
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-19-去甲-胆骨化醇(2)	97,197.6
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(3)	730.3
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(4)	2985.8
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(5)	4401.8
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-E-烯-26,27-六氟-胆骨化醇(6)	547.1
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-19-去甲-胆骨化醇(7)	2580.9
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-23,24-Z-烯-26,27-六氟-胆骨化醇(8)	1605.0
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-19-去甲-胆骨化醇(9)	8781.6
1 α ,25-二羟基-16-烯-20-环丙基-胆骨化醇(10)	26,239.1
1 α -氟-25-羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-胆骨化醇(11)	303361.9
1 α -氟-25-羟基-16-烯-20-环丙基-23-炔-26,27-六氟-胆骨化醇(12)	9725.5
1 α -氟-25-羟基-16,23E-二烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇(13)	9499.1
1 α -氟-25-羟基-16,23Z-二烯-20-环丙基-26,27-六氟-胆骨化醇(14)	5997.0

实施例 31

硅(Silico)模型

根据二维结构,计算多种与药用性能(druggability)相关的物理化学和结构性质来评价化合物。使用 ACD/labs 软件(v.7.0, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada)。计算的物理化学性质包括: 辛醇/水分配系数的对数尺(ACDlogP)、pH7.4 时辛醇/水分配系数的对数尺(logD7.4)和 pH7.4 时摩尔溶解度对数转换(logS7.4)计算的结构性质包括: 分子量(MW)、摩尔体积(表示为 cm^3)、摩尔折射系数(表示为 cm^3)、氢键供体和受体(即 H 供体和 H 受体)的数目、自由旋转键(FRB)的数目、违反 Lipinski 规则的数目和极化表面积(PSA 表示为 $\text{\AA}^2$)。结果见表 7。

为评价所选化合物肠吸收的可能性,还使用了修改的原始方程计算小鼠、大鼠和人的肠的最大可吸收剂量(MAD) (Johnson 1996, Hilgers 2003): $\text{MAD}(\text{mg}) = \text{S} \cdot \text{Pe} \cdot (\text{A}/\text{ILV}) \cdot \text{SIV} \cdot \text{SITT}$ (方程 1), 其中 S 是在 pH7.4 时测定的溶解度(mg/ml), Pe 是在人工膜(PAMPA)上或在 Caco-2 细胞尖端至底外侧方向上测定的渗透性(cm/sec), A 是肠表面积(cm^2), ILV 是肠内腔容积(cm^3), SIV 是小肠容积, SITT 是通过小肠时间(sec)。结果见表 8。

表 7、计算的化合物的物理化学和结构性质(ACD/labs 7.0 软件)

化合物	摩尔折射系数 (cm^3)	摩尔体积 (cm^3)	ACDLogP	RuleOf5	H供体	H受体	FRB	PSA	LogD_7.40	LOGS_7.40
3	125.13	382.59	8.35	2	3	3	7	60.69	8.13	-8.85
7	127.18	372.90	7.73	2	3	3	8	60.69	7.72	-8.32
8	127.32	406.02	8.05	2	3	3	8	60.69	8.04	-8.42
9	126.21	346.50	5.34	1	3	3	9	60.69	5.34	-5.26

表 8、使用 PAMPA 或 Caco-2 渗透性数据计算化合物在小鼠、大鼠和人中的理论 MAD(还报告了 pH7.4 的溶解度和渗透性数据)。

化合物	PAMPA Papp (10 ⁻⁶ cm ² /秒)	Caco2 Papp_AB (10 ⁻⁶ cm ² /秒)	Caco2 Papp_BA (10 ⁻⁶ cm ² /秒)	溶解度 (mg/ml)	MAD (ug) 人 (PAMPA)	MAD (ug) 小鼠 (PAMPA)	MAD (ug) 大鼠 (PAMPA)
3		3.00	6.00	0.000674	54.43 (Caco2-AB)	0.16 (Caco2- AB)	0.78 (Caco2- AB)
7	47.83	0.00	0.00	0.002166	2788.31	8.20	39.99
8	50.00			0.000533	716.81	2.11	10.28
9	36.05	4.82	6.46	0.008268	8023.11	23.61	115.08

实施例 32

体外模型

以下体外试验用于表征化合物:

pH7 的溶解度。使用 96-孔板模块测定。将化合物贮备溶液在 pH 值 7 的水缓冲溶液中稀释成 10 μ M 的浓度。溶液经 0.22 μ m 过滤, 过滤液中的化合物浓度以 1 和 10 μ M 标准作对照, 使用 LC-MS/MS 测定。测量结果以 mM 表示。

代谢稳定性(hCYP3A4)。底物的相对稳定性是通过与表达 CYP3A4 微粒体制品(Gentest, 6 pmol)的人 cDNA 孵育, 与含有活性的细胞色素 P450 的对照微粒体孵育对比, 测量底物剩余量而测定其稳定性。该测定是在 96 孔板模块中完成。每一化合物以 2 μ M 浓度在 37°C 下孵 60min。使用 LC-MS/MS 测定孵育后剩余的化合物。结果表示为 % 剩余。

被动扩散的渗透性(JPAMPA)。试验在 96 孔接受板(acceptor)和供应板(donor)上、使用 15%大豆卵磷脂、以正十二烷人工膜而完成。接受板(96 孔疏水性滤板(MAIP N45, Millipore))是通过 4 μ L 人工膜材料加至过滤器上端而制备, 并将该板用 200 μ L 的 HEPES 缓冲的 HBSS(pH7.4)过滤。供应板(锯齿状 96 孔板来自于 p-ION, MA)用含有 10 μ M 试验化合物的 200 μ L 的 HEPES 缓冲的 HBSS(pH7.4)过滤。将接受板置于供应板上, 形成"三明治", 并在 37°C 下孵育 4 小时。孵育期过后, 接受板、供应板和初始供应板溶液(参比)经 LC-MS/MS 分析。将数据报告为以 cm $\times$ 10⁻⁶/秒表示的双向 Peff(bilateral Peff)和膜中 % 残留量。

Caco-2 细胞上的表观渗透性。人结肠腺癌(Caco-2)细胞从 American Type Culture Collection (Rockville, MD)获得。渗透性研究是使用 24 孔模块在 Caco-2 单层上,以 2 个转运方向,即顶端(apical)至底外侧(basolateral)(A→B)和基底外侧至顶端(B→A)而完成。将含有 10 μ M 试验化合物的新鲜供体溶液加至顶端或底外侧,同是将无药物的培养基加至相对侧。在 37°C 下将 24 横孔板置于板振荡器上。2h 后,收集来自接收和供体室的缓冲溶液,并将等分经 LC-MS/MS 分析。报告的数据为渗透性 cm $\cdot$ 10⁻⁶/秒和流出率。结果见表 9。

表 9、使用体外模型获得的生物药剂学性质

化合物	PAMPA Papp (x10-6 cm/秒)	PAMPA % 膜	溶解度 2 h	溶解度 24 h	CYP3A4 稳定性	Papp_A>B	Mass_Bal_A>B	Papp_B>A	Mass_Bal_B>A
3	NA	NA	1.3	7.1	45.5	3.0	8.8	6.0	50.5
7	NA	58.1	4.2	4.1	58.3	0.0	13.1	0.0	83.3
8	NA	57.6	<1	1.6	52.7	NA	NA	NA	NA
9	36.0	97.1	19.9	21.6	33.3	4.8	36.7	6.5	89.1

NA: 未得到

<1: 低于测定限

实施例 33

软明胶胶囊配方 I

项目	成分	mg/胶囊
1	化合物(1)	10.001-0.02
2	二丁基羟基甲苯(BHT)	0.016
3	叔丁基对羟基茴香醚(BHA)	0.016
4	米格列醇 812, 适量	160.0

制备过程:

1、将 BHT 和 BHA 混悬于米格列醇 812 中,并在搅拌下混热至约 50°C,直至溶解。

2、在 50°C 下将 1,25-二羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-胆骨化醇溶于

步骤 1 的溶液中。

3、在室温下将步骤 2 的溶液冷却。

4、将步骤 3 的溶液填充至软明胶胶囊中。

注：所有制备步骤均在在氮气氛下完成并避光。

实施例 34

软明胶胶囊配方 II

项目	成分	mg/胶囊
1	化合物(1)	10.001-0.02
2	二- α -生育酚(Di- α -Tocopherol)	0.016
3	米格列醇 812, 适量	160.0

制备过程:

1、将二- α -生育酚混悬于米格列醇 812 中,并在搅拌下混热至约 50℃,直至溶解。

2、在 50℃下将 1,25-二羟基-16-烯-23-炔-20-环丙基-胆骨化醇溶于步骤 1 的溶液中。

3、在室温下将步骤 2 的溶液冷却。

4、将步骤 3 的溶液填充至软明胶胶囊中。

合并引用

据此,本申请的全部引用内容(包括文献、授权专利、公开专利申请和共同待决专利申请)以其整体通过引用清楚地并入本文。

等同物

本领域技术人员清楚,或者只使用常规试验即能够确定本发明在此描述特定的实施方案的许多等同物。该等同物包含于以下权利要求中。

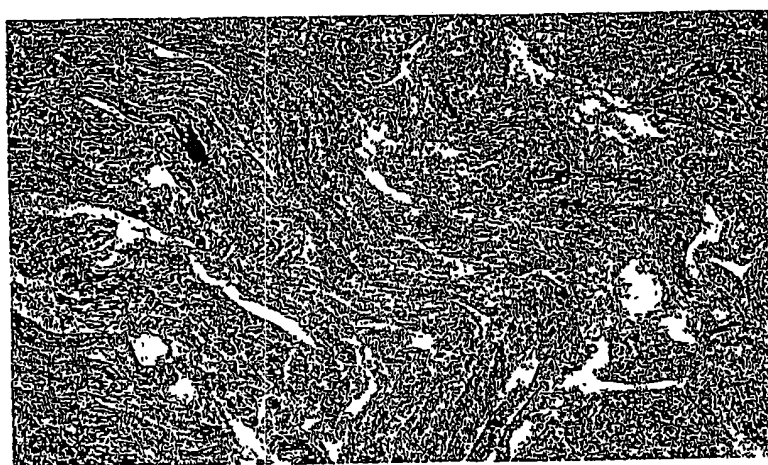


图 1

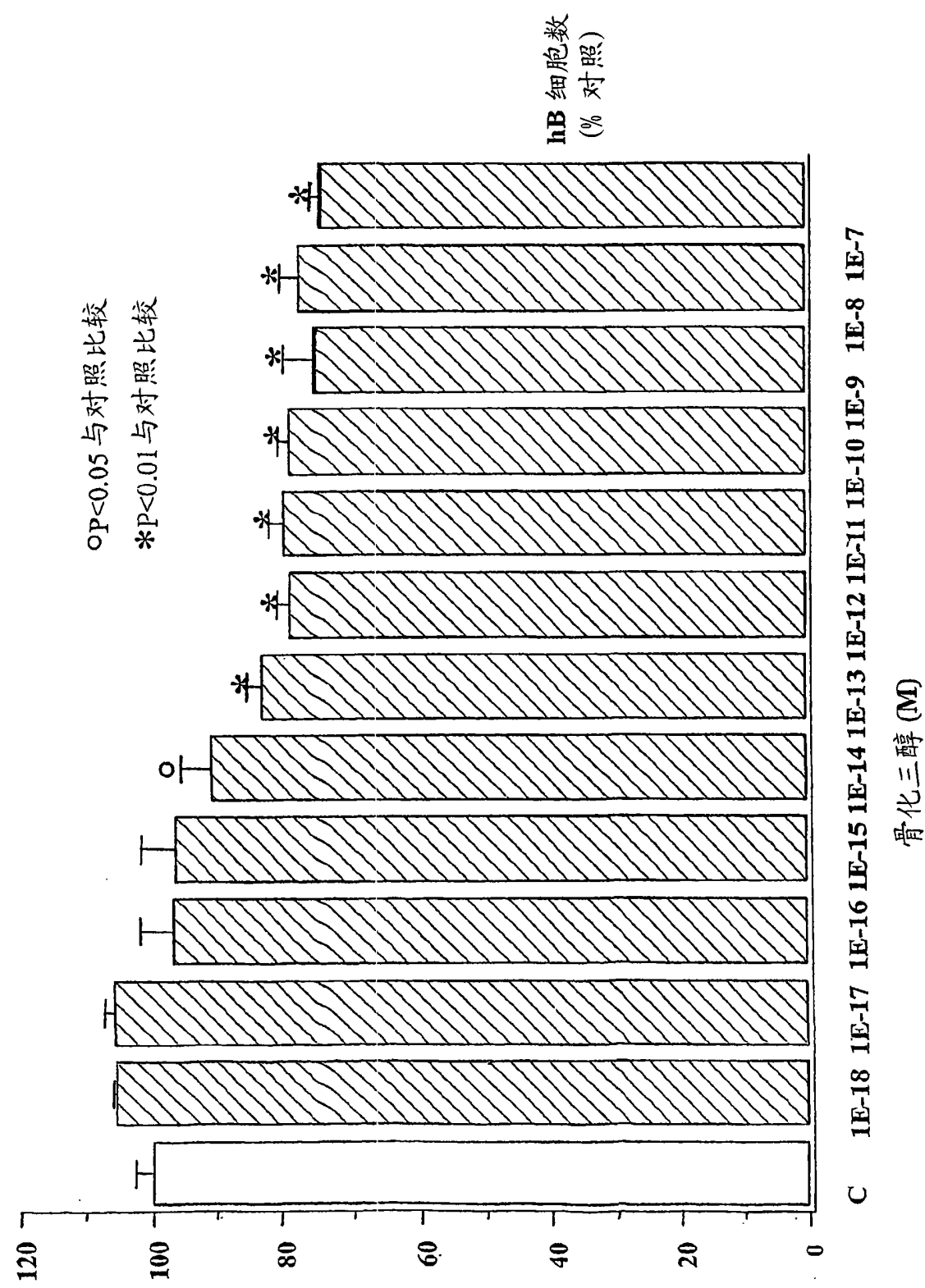


图 2

骨化三醇	10 nM	1 nM	0,1 nM
	39	18	1
3	77	53	36
4	67	40	19
5	60	40	1
6	76	74	16
7	74	38	1
8	71	45	30
9	50	33	19
10	43	30	1

肾素抑制

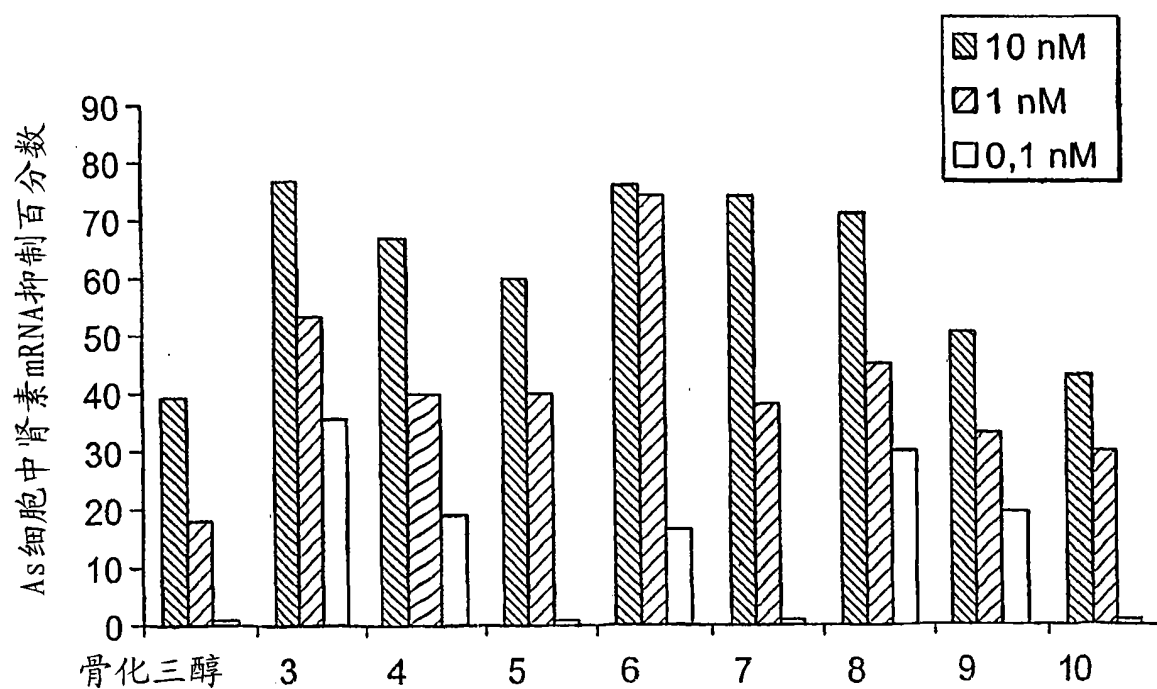


图 3

	10-7M	10-8M	10-9M	10-10M	10-11M
骨化三醇		38	19	0	0
3	64	57	34	27	11
7	63	61	49	26	16

剂量响应抑制曲线

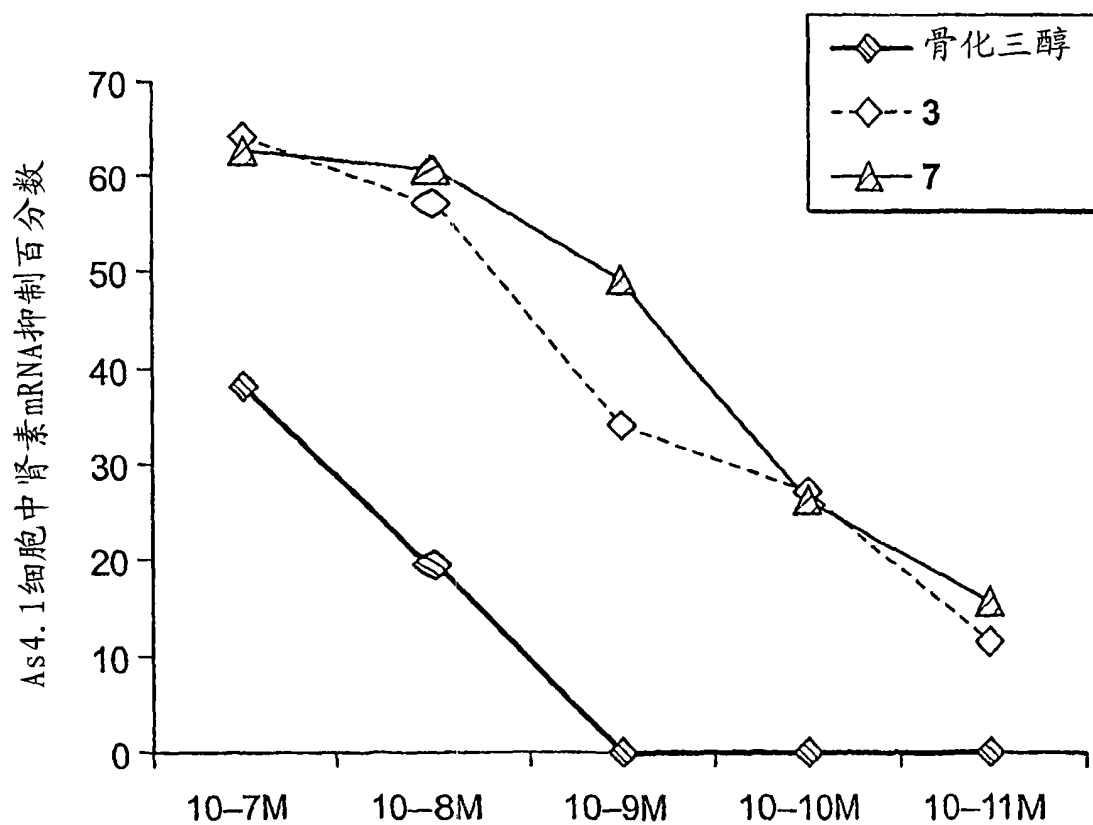


图 4