

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03811968.4

[51] Int. Cl.

A61K 31/59 (2006.01)

A61K 31/593 (2006.01)

A61P 3/14 (2006.01)

A61P 3/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 100531739C

[22] 申请日 2003.3.12 [21] 申请号 03811968.4

[30] 优先权

[32] 2002. 3.25 [33] US [31] 10/105,826

[86] 国际申请 PCT/US2003/007443 2003.3.12

[87] 国际公布 WO2003/082300 英 2003.10.9

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.25

[73] 专利权人 威斯康星校友研究基金会

地址 美国威斯康星州

[72] 发明人 赫克托·F·德鲁卡

J·韦斯利·派克

尼茹帕玛·K·舍弗德

[56] 参考文献

WO9841500A1 1998.9.24

WO0205823A2 2002.1.24

WO0174766A1 2001.10.11

WO9841501A1 1998.9.24

WO0205824A1 2002.1.24

WO9711053A1 1997.3.27

New 1 α ,25 - Dihydroxy - 19 - norvitamin D₃
Compounds of High Biological Activity: Synthesis
and Biological Evaluation of 2 - Hydroxymethyl, 2
- Methyl, and 2 - Methylene Analogs. Sicinski,
Rafal R., Prahl, Jean M., Smith, Connie M. J.
Med. Chem, Vol. 41 No. 23. 1998

审查员 王 荧

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

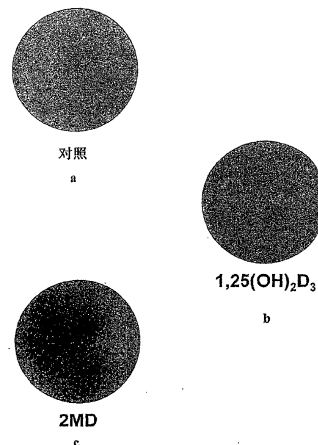
权利要求书 4 页 说明书 29 页 附图 2 页

[54] 发明名称

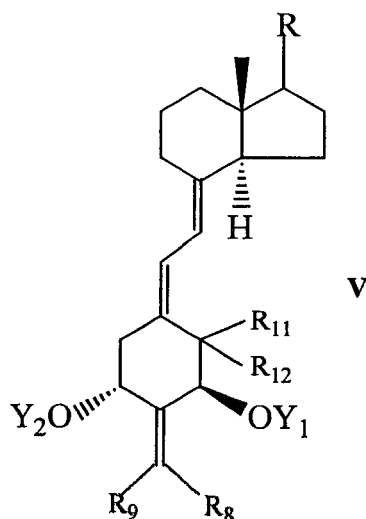
碳 2 位修饰的 19 - 去甲 - 维生素 D 类似物在
制备诱导新骨生成药物中的应用

[57] 摘要

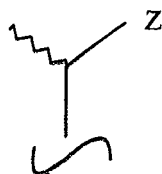
本发明发现 1 α , 25 - 二羟基维生素 D₃ 的 2 位
碳修饰的衍生物可以特异性地促进成骨细胞形成
新骨。2 位碳修饰的维生素 D 类似物促进新骨形成
的能力表明此类化合物可用于需要新骨合成的场
合。因此, 此类化合物可以全身或局部应用以促进
骨骼移植的生长, 提高骨折治愈的速率并因此减少
骨折治愈所需的、置换手术所需的刺激骨骼生长所
需的、以及骨骼生长到维持骨骼或牙齿在适当的位
置所需的植入物或其他设备所需的时间。



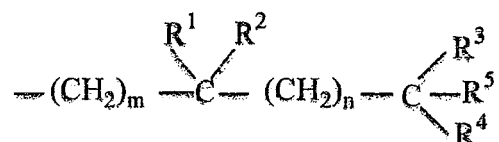
1. 如下式的化合物在制备用于通过刺激哺乳动物中新骨生长从而促进所述哺乳动物中牙科植入物的骨整合、牙周骨骼的生长或牵引成骨法后骨骼质量的改善的药物中的应用:



其中 Y_1 和 Y_2 相同或不同, 各自选自自由氢和羟基保护基组成的组中, R_{11} 和 R_{12} 各自是氢或共同构成亚甲基, 其中 R_8 和 R_9 相同或不同, 各自选自自由氢、烷基、羟基烷基、氟烷基、羟基和烷氧基组成的组中, 或 R_8 和 R_9 共同构成 $-(CH_2)_X-$, 其中 X 为 2 至 5 的整数, 而且基团 R 是



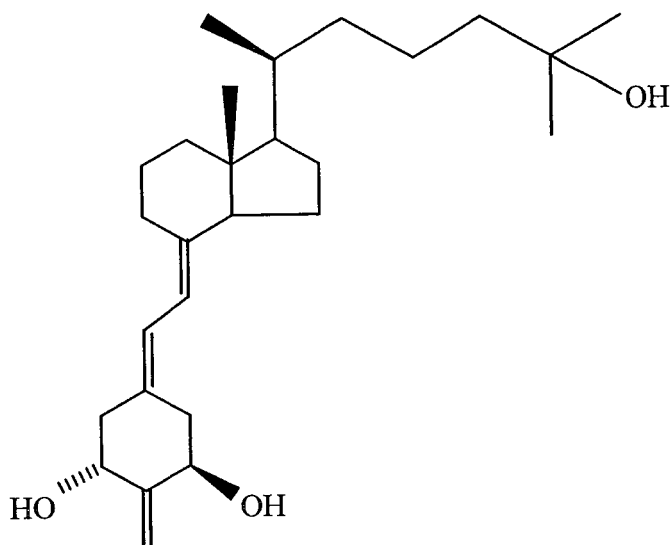
其中相当于甾体编号中的 C-20 的立体化学中心是 R 或 S 构型, Z 选自 Y 、 $-OY$ 、 $-CH_2OY$ 、 $-C\equiv CY$ 和 $-CH=CHY$, 双键是顺式或反式几何构型, 以及 Y 选自氢、甲基、 $-COR^5$ 和如下结构的基团:



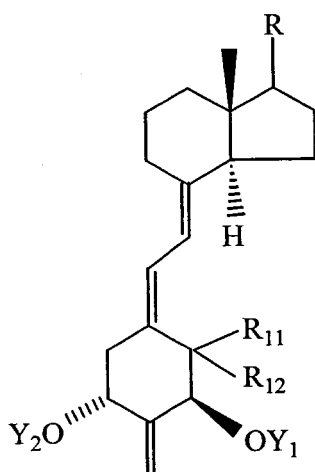
其中 m 和 n 彼此独立地是 0 至 5 的整数, 其中 R^1 选自氢、氘、羟基、被

保护的羟基、氟、三氟甲基和直链或支链且任选地具有羟基或被保护的羟基取代基的 C_{1-5} 烷基，以及其中 R^2 、 R^3 和 R^4 彼此独立地选自氘、氘代烷基、氢、氟、三氟甲基和直链或支链且任选地具有羟基或被保护的羟基取代基的 C_{1-5} 烷基，以及其中 R^1 和 R^2 共同构成氧代基，或亚烷基、 $=CR^2R^3$ 或 $-(CH_2)_p$ -基团，其中 p 是 2 至 5 的整数，以及其中 R^3 和 R^4 共同构成氧代基或 $-(CH_2)_q$ -基，其中 q 是 2 至 5 的整数，以及其中 R^5 是氢、羟基、被保护的羟基或 C_{1-5} 烷基。

2. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述药物配制为口服给药剂型。
3. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述药物配制为非胃肠道给药剂型。
4. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述药物配制为透皮给药剂型。
5. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述药物配制为局部给药剂型。
6. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述哺乳动物为人。
7. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述化合物是如下式的 2-亚甲基-19-去甲-20(S)-1 α ,25-二羟基维生素 D_3 ：



8. 如权利要求 1 所述的应用, 其中所述化合物是如下式的酰化衍生物:



其中 Y_1 和 Y_2 各自独立地是氢或酰基, 条件是 R^5 是 $-OY_3$ 并且 Y_3 选自自由酰基或烃基氧羰基组成的组中。

9. 如权利要求 8 所述的应用, 其中所述化合物是三乙酸酯, 从而 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 均是 CH_3CO- 。

10. 如权利要求 8 所述的应用, 其中所述化合物是三己酸酯, 从而 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 均是 $CH_3(CH_2)_4CO-$ 。

11. 如权利要求 8 所述的应用, 其中所述化合物是三壬酸酯, 从而 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 均是 $CH_3(CH_2)_7CO-$ 。

12. 如权利要求 8 所述的应用, 其中所述化合物是 25-乙酸酯, 从而 Y_1 和 Y_2 均是氢而 Y_3 是 CH_3CO- 。

13. 如权利要求 8 所述的应用, 其中所述化合物是 2-亚甲基-19-去甲-1 α ,25-(OH) $_2$ -D $_3$ -1,3,25-三乙酸酯。

14. 如权利要求 8 所述的应用, 其中所述化合物是 2-亚甲基-19-去甲-1 α ,25-(OH) $_2$ -D $_3$ -1,3,25-三己酸酯。

15. 如权利要求 8 所述的应用, 其中所述化合物是 2-亚甲基-19-去甲-1 α ,25-(OH) $_2$ -D $_3$ -1,3,25-三壬酸酯。

16. 如权利要求 8 所述的应用, 其中所述化合物是 2-亚甲基-19-去甲-1 α ,25-(OH) $_2$ -D $_3$ -25-乙酸酯。

碳 2 位修饰的 19-去甲-维生素 D 类似物在制备 诱导新骨生成药物中的应用

技术领域

本发明涉及维生素 D 化合物，特别是在碳 2 位被取代的 19-去甲维生素 D 化合物，其对新骨的形成有促进作用。

背景技术

维生素 D 引起正常骨形成的能力被公知已有超过 75 年之久。例如，维生素 D 能够治疗佝偻病和骨软化症。在上述两种疾病中，据设想骨的成骨细胞即使在维生素 D 缺乏的情况下也可以合成骨骼的有机基质，而该维生素 D 是无机物在新生成的基质中沉积所必需的。该能力中，通常认为维生素 D 通过将血浆中的钙、磷提高至矿化过程得以进行所需的水平而治疗佝偻病和骨软化症 (DeLuca¹, 1981)。例如，早期的研究 (Shipley, Kramer, and Howland^{2,3}, 1925; 1926) 表明取自正常大鼠的血清可以用来治疗培养物中的佝偻病损害，而取自佝偻病大鼠的血清不能带来同样的治疗作用。后来发现这是因为维生素 D 依靠其提高钙和磷在小肠中吸收的功效，可提高血浆中钙和磷的浓度至骨骼矿化所需的过饱和水平。此外，据设想维生素 D 也可以促进钙从骨中动员而提高血钙浓度 (DeLuca¹, 1981) 或者促进肾对钙在成尿中的重吸收 (Yamamoto et al⁴, 1984) 而增加矿化作用所需的血浆钙和磷产物。最终的证据表明，正因如此，当向维生素 D 缺乏的大鼠血流中输注钙和磷时导致骨骼有机基质的正常矿化，而维生素 D 的作用即使比该作用大也只大很少。(Underwood and DeLuca⁵, 1984)。

在 Shipley、Kramer 和 Howland^{2,3} (1925; 1925) 的研究与 Underwood

和 DeLuca⁵ 的研究 (1984) 其间, 得到大量关于维生素 D 如何发挥其作用的信息。现在已经充分明白维生素 D 在发挥作用之前必须首先在肝脏中发生 25-羟基化反应, 再在肾脏中发生 1α -羟基化反应 (DeLuca⁶, 1974)。这两步反应生成维生素 D 最终的活性形式, 即 $1,25-(OH)_2D_3$ (DeLuca & Schnoes⁷, 1983)。继而, 该化合物促进小肠对钙的吸收、肾对钙的重吸收、小肠对磷的吸收, 以及促进骨在收到甲状旁腺水平高的信号时对钙的动员。这些作用提高血浆中钙和磷的水平, 使如佝偻病和骨软化症的骨损伤康复并可预防低血钙性抽搐的神经错乱。

因此, $1,25-(OH)_2D_3$ 已经用于治疗各类骨骼疾病, 其包括肾性骨营养不良症、骨质疏松症、骨软化症以及各种类型佝偻病的治疗 (Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, eds.⁸, 1997)。此外, 其还被用于治疗甲状旁腺功能减退患者的低血钙症 (Kooh 等⁹, 1975)。对于治疗肾性骨营养不良症的继发性甲状旁腺功能亢进症, 已公知此激素和位于甲状旁腺的维生素 D 受体 (VDR) 结合, 从而抑制甲状旁腺细胞的生长和增殖以及前甲状旁腺基因的表达 (Demay 等¹⁰, 1992; Darwish & DeLuca¹¹, 1999)。然而从未设想过 $1,25-(OH)_2D_3$ 在促进新骨生长中的应用, 实际上, 对绝经后的妇女的治疗可以降低骨折的几率, 而不会明显提高骨量 (bone mass) (Aloia¹², 1990; Tilyard 等¹³, 1992)。因此, $1,25-(OH)_2D_3$ 对骨的合成代谢作用为未知, 实际上, 证据与此相反。

骨转换是正常的關鍵过程, 其本质为体内稳态的, 且为正常衰老和创伤导致的有缺陷骨进行更新所必需的。该过程是维持成年人骨骼完整性所必需的, 并且其通过两种重要的细胞类型的作用得以实施, 即重吸收骨骼的破骨细胞和形成骨骼的成骨细胞。类固醇激素如维生素 D 在调节成骨细胞的形成和功能中起着重要的调节作用。

现在, 使用抗骨重吸收物质治疗骨质丢失疾病。例如, 雌激素能够阻滞雌激素缺乏导致的骨重吸收, 因此被用于治疗绝经后骨质疏松症。

包括 Fosamax®的二磷酸盐通过阻滞骨重吸收起效，从而使骨量得以增加。因此，在需要新骨生长的情况下不能考虑使用抗重吸收试剂，这一点是十分明确的。

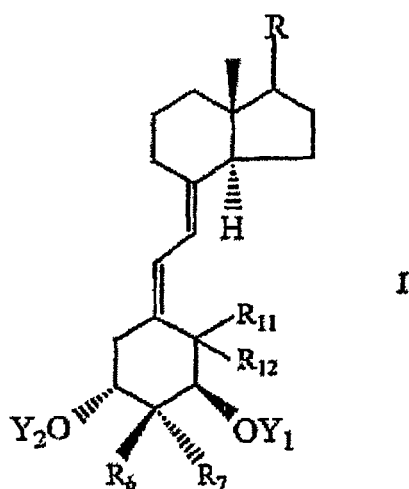
在研究 1,25-(OH)₂D₃ 类似物的过程中，发现维生素 D 激素 2 位碳上的修饰对其生物活性有显著的影响 (Sicinski 等¹⁴, 1998)。例如，在第 4,666,634 号美国专利中叙述并测定了作为潜在的治疗骨质疏松症药物以及作为抗癌药物的 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 的 2 β -羟基和烷氧基 (例如 ED-71) 类似物。还可参见 Okano 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 1444 (1989)。1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 的其他的 2 位取代 (被羟烷基, 例如 ED-71, 和氟烷基) A 环类似物也已制备并加以测定 (Miyamoto 等, *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 1111 (1993); Nishii 等, *Osteoporosis Int. Suppl.* **1**, 190 (1993); Posner 等, *J. Org. Chem.* **59**, 7855 (1994), 及 *J. Org. Chem.* **60**, 4617 (1995))。尤其是 19-去甲类似物, 据发现这些化合物可以提高切除卵巢大鼠的骨强度和骨量 (参考 DeLuca 第 6,306,844 号美国专利), 特别是 2 α -甲基-19-去甲-20S-1,25-(OH)₂D₃ 和 2-亚甲基-19-去甲-20S-1,25-(OH)₂D₃。这些化合物如何提高骨量和骨强度还不清楚。实际上, 它们可能是作为抗重吸收物质发挥作用的, 因为它们可以通过抑制甲状旁腺而减少甲状旁腺激素水平, 从而减少骨的重吸收。其他 1 α ,25-二羟基-19-去甲维生素 D₃ 的 2 位取代的类似物也已合成, 即在 2 位用羟基或烷氧基取代的化合物 (DeLuca 等, 第 5,536,713 号美国专利), 其显示出引人注意的选择性活性功能 (activity profiles)。此外, 文献中有教导主张维生素 D 化合物不是新骨形成所必需的, 也不能增加新骨的形成。

发明内容

现在已经发现, 向成骨细胞及其前体的原代培养物中加入碳 2 位修饰的维生素 D 化合物时, 能够显著地促进新骨的形成。此活性是选择性

的，因为天然激素，即 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 不能产生此作用。这些结果表明，该特点是 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 碳 2 位修饰的类似物的特有性质，更具体而言这些化合物可以用来促进新骨的生长，及用于促进成骨细胞介导的骨骼生长。结论就是，上述化合物能够用于显著地提高骨骼修复率如骨折的修复率、移植的骨整合（osseointegration）以及移植物的固化，以及用于应用牵引成骨法后骨骼质量的加速和改善。这些化合物也可用于改善应用各种矫形装置和牙科植入物的外科手术的效果。因此，本发明旨在研究维生素 D 化合物的 2 位碳修饰的类似物的各种药物学应用，包括用于新骨的形成。

维生素 D 化合物的 2 位碳修饰的类似物的结构特征如下通式 I 所示：



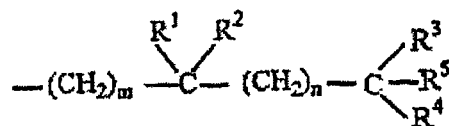
其中 Y_1 和 Y_2 可以相同或不同，各自选自由氢和羟基保护基组成的组中，其中 R_{11} 和 R_{12} 各自是氢或共同构成亚甲基，其中 R_6 和 R_7 可以相同或不同，各自选自由氢、烷基、羟基烷基、氟烷基、羟基和烷氧基组成的组中，但是 R_6 和 R_7 不能全是氢，或者 R_6 和 R_7 共同构成 $-(\text{CH}_2)_x$ -基团，其中 x 为 2 至 5 的整数，或者 R_6 和 R_7 共同构成 $=\text{CR}_8\text{R}_9$ 基团，其中 R_8 和 R_9 可以相同或不同，各自选自由氢、烷基、羟基烷基、氟烷基、羟基

和烷氧基组成的组中, 或 R_8 和 R_9 共同构成 $-(CH_2)_x-$, 其中 x 为 2 至 5 的整数, 其中基团 R 是维生素 D 型化合物中任何已知的典型侧链。

具体地, R 可以是饱和或不饱和的 1 至 35 个碳的烃基, 其可以是直链、支链或环状, 且可包括一个或更多个其他取代基如羟基或被保护的羟基、氟、羰基、酯、环氧基、氨基或其他杂环基团。该类型优选的侧链如下列结构所示:



其中立体化学中心 (相当于甾体编号中的 C-20) 可以是 R 或 S 构型, (即碳 20 的天然构型或 20-表构型), Z 选自 Y 、 $-OY$ 、 $-CH_2OY$ 、 $-C\equiv CY$ 和 $-CH=CHY$, 其中双键可以是顺式或反式几何构型, 而且 Y 选自氢、甲基、 $-COR^5$ 和如下结构的基团:

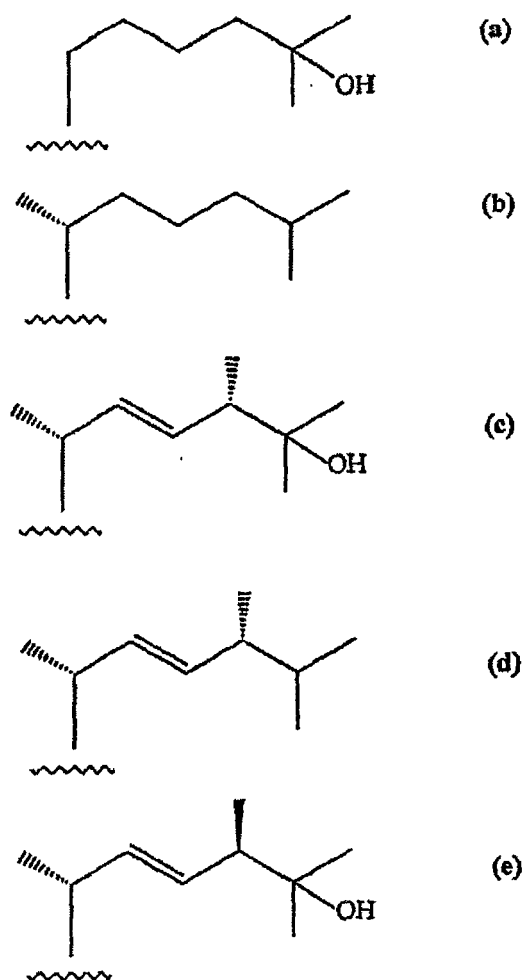


其中 m 和 n 彼此独立地是 0 至 5 的整数, 其中 R^1 选自氢、氘、羟基、被保护的羟基、氟、三氟甲基和可以是直链或支链且任选地具有羟基或被保护的羟基取代基的 C_{1-5} 烷基, 以及 R^2 、 R^3 和 R^4 彼此独立地选自氘、氘代烷基、氢、氟、三氟甲基和可以是直链或支链且任选地具有羟基或被保护的羟基取代基的 C_{1-5} 烷基, 而且 R^1 和 R^2 可以共同构成氧代基、或亚烷基、 $=CR^2R^3$ 或 $-(CH_2)_p$ -基团, 其中 p 是 2 至 5 的整数, R^3 和 R^4 共同构成氧代基或 $-(CH_2)_q$ -基, 其中 q 是 2 至 5 的整数, R^5 是氢、羟基、被保护的羟基或 C_{1-5} 烷基, 在侧链 20、22 或 23 位上的任何 CH 基团均可以

被氮原子代替,或在 20、22 和 23 位上的任何-CH(CH₃)-、-(CH₂)_m-、-CR₁R₂-或-(CH₂)_n-可以分别被氧原子或硫原子代替。

C-20 位甲基取代基的波浪线表示碳 20 可以是 R 或 S 构型。

具有天然 20R 构型的侧链的具体的重要实例为如下式 (a)、(b)、(c)、(d) 和 (e) 所示结构,即处于 25-羟基维生素 D₃ (a); 维生素 D₃ (b); 25-羟基维生素 D₂ (c); 维生素 D₂ (d); 以及 25-羟基维生素 D₂ 的 C-24 差向异构体 (e) 中的侧链:



优选的化合物是 19-去甲-1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 的 2 位碳修饰的类似物,特别是化合物 2-亚甲基-19-去甲-20(S)-1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 和

2 α -甲基-19-去甲-20(S)-1 α ,25-二羟基维生素 D₃。这些化合物的缓慢释放形式也是需要的,即在 1、3 和/或 25 位具有酰基的化合物,尤其是 25-乙酸基结构。

上述化合物显示出希望的且十分有益的生物活性模式。这些化合物的特点是其促进新骨生长的能力,并因此可用于促进成骨细胞调节的骨骼的生长。其促进新骨生长的作用允许其作为优选的治疗剂体内给药用于治疗骨折、骨移植、骨内移植物的固化、牙科植入物的骨整合、以及促进牙周骨骼的生长。该治疗可以是局部的、透皮的、口服的或非胃肠道的。该化合物可以约 0.01 μ g/gm 至约 50 μ g/gm 的用量用于组合物中,也可以约 0.01 μ g/天至 50 μ g/天的剂量给药。

附图说明

图 1a、1b 和 1c 是温育 14 天后成骨细胞培养物的照片,其显示对照(图 1a)、以及 10⁻⁸ 摩尔浓度的 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ (图 1b)、以及 10⁻⁸ 摩尔浓度的 2-亚甲基-19-去甲-20(S)-1 α ,25-羟基维生素 D₃ (图 1c) 对成骨细胞的作用; 以及

图 2a、2b、2c、2d 和 2e 是经过 Von Kossa 染色的显示深色结形钙化骨骼的成骨细胞培养物的照片,其为以对照(图 2a)、10⁻⁸ 摩尔浓度的 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ (图 2b)、10⁻¹⁰ 摩尔浓度的 1 α ,25-二羟基维生素 D₃ (图 2c)、10⁻¹⁰ 摩尔浓度的 2-亚甲基-19-去甲-20(S)-1 α ,25-二羟基维生素 D₃ (图 2d) 以及 10⁻¹² 摩尔浓度的 2-亚甲基-19-去甲-20(S)-1 α ,25-二羟基维生素 D₃ (图 2e) 治疗的结果。

具体实施方式

在说明书和权利要求书中使用的术语“羟基保护基”是指任何通常用来起暂时保护羟基作用的基团,例如烷氧基羰基、酰基、烷基甲硅烷

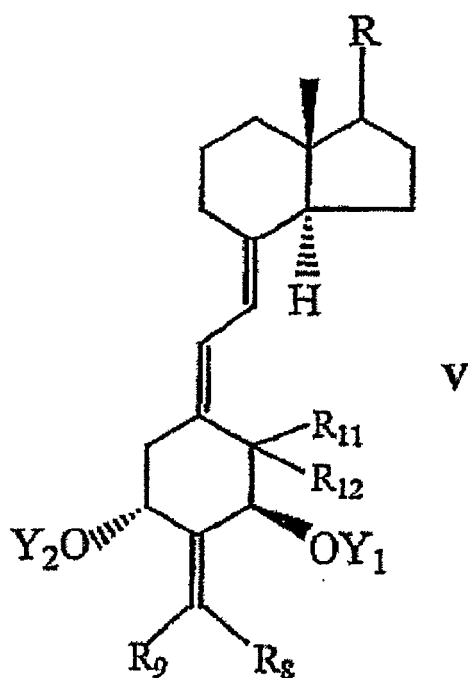
基或烷基芳基甲硅烷基（下文简称为甲硅烷基）、以及烷氧基烷基。烷氧基羰基保护基是烷基-O-CO-基团如甲氧基羰基、乙氧基羰基、丙氧基羰基、异丙氧基羰基、丁氧基羰基、异丁氧基羰基、叔丁氧基羰基、苄氧基羰基或烯丙氧基羰基。术语“酰基”是指所有的同分异构形式的1至6个碳的烷酰基，或1至6个碳的羧基烷酰基如乙二酰基、丙二酰基、丁二酰基、戊二酰基或芳香酰基如苯甲酰基或被卤素、硝基或烷基取代的苯甲酰基。在说明书或权利要求书中使用的术语“烷基”是指含有1至10个碳的所有同分异构形式的直链或支链烷基。烷氧基烷基保护基是如甲氧基甲基、乙氧基甲基、甲氧基乙氧基甲基、或四氢呋喃基和四氢吡喃基的基团。优选的甲硅烷基保护基是三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、二丁基甲基甲硅烷基、二苯基甲基甲硅烷基、苯基二甲基甲硅烷基、二苯基叔丁基甲硅烷基和类似的烷基化的甲硅烷基。术语“芳基”特指苯基-或烷基-、硝基-或卤素取代的苯基，术语“烷氧基”特指-O-烷基基团。

“被保护的羟基”基团是由前文所定义的通常用于暂时或永久性保护羟基作用的上述基团例如甲硅烷基、烷氧基烷基、酰基或烷氧基羰基所衍生化或保护的羟基。术语“羟基烷基”、“氘代烷基”和“氟烷基”是指由一个或多个羟基、氘或氟基团分别取代的烷基。

本说明书中必须注意的是术语“24-高”是指在侧链24位碳上附加一个亚甲基，术语“24-双高”指在侧链24位碳上附加两个亚甲基。同样地，术语“三高”是指附加三个亚甲基。术语“26,27-二甲基”是指在26位碳和27位碳上附加甲基，使得例如 R^3 和 R^4 是乙基。同样地，术语“26,27-二乙基”是指在26位碳和27位碳上附加乙基，使得 R^3 和 R^4 是丙基。当 R_{11} 和 R_{12} 均是氢时，该化合物在本文称作19-去甲化合物。

2-亚烷基化合物

2-亚烷基类似物的结构特点如下通式 V 所示：



其中 Y_1 和 Y_2 可相同或不同，各自选自由氢和羟基保护基组成的组中， R_{11} 和 R_{12} 均是氢或共同构成亚甲基， R_8 和 R_9 可相同或不同，各自选自由氢、烷基、羟基烷基和氟烷基组成的组中，或共同构成 $-(CH_2)_x-$ ，其中 x 为 2 至 5 的整数，基团 R 是如本文前述的维生素 D 型化合物中任何已知的典型侧链。

下文所列的化合物中，连接于碳 2 位的特定亚烷基取代基应当被添加入命名中。例如，如果亚甲基是该亚烷基取代基，那么术语“2-亚甲基”必须在每个所命名的化合物之前。如果亚乙基是该亚烷基取代基，那么术语“2-亚乙基”必须在每个所命名的化合物之前，依此类推。此外，如果连在 20 位碳上的甲基为表型或非天然构型，术语“20 (S)”或

“20-表”必须包括在每个之后所命名的化合物之中。同样，如果在侧链20、22或23位包含氧原子取代，那么术语“20-氧杂”、“22-氧杂”或“23-氧杂”必须分别加入所命名的化合物中。若需要，该所命名化合物也可作为维生素D₂类型。

当侧链不饱和并且R₁₁和R₁₂均是氢时，通式V所示的2-亚烷基化合物的具体的和优选的实例为：

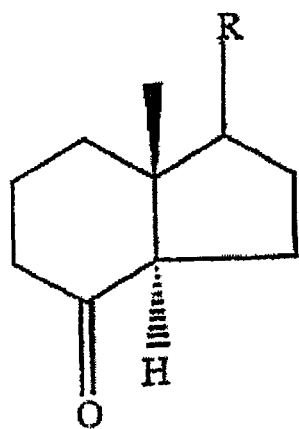
19-去甲-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃；
19-去甲-24-高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃；
19-去甲-24-二高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃；
19-去甲-24-三高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃；
19-去甲-26,27-二甲基-24-高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃；
19-去甲-26,27-二甲基-24-二高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃；
19-去甲-26,27-二甲基-24-三高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃；
19-去甲-26,27-二乙基-24-高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃；
19-去甲-26,27-二乙基-24-二高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃；
19-去甲-26,27-二乙基-24-三高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃；
19-去甲-26,27-二丙基-24-高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃；
19-去甲-26,27-二丙基-24-二高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃；以及
19-去甲-26,27-二丙基-24-三高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素D₃。

当侧链饱和并且R₁₁和R₁₂均是氢时，通式V所示的2-亚烷基化合物的具体的和优选的实例为：

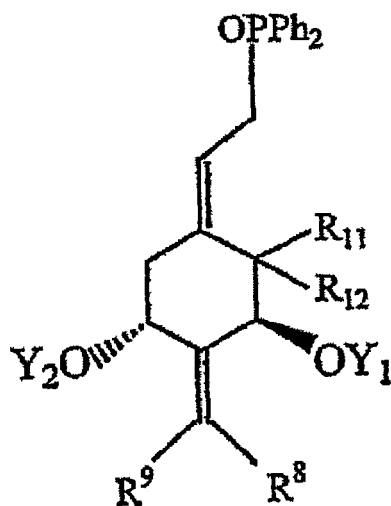
19-去甲-1,25-二羟基维生素D₃；
19-去甲-24-高-1,25-二羟基维生素D₃；
19-去甲-24-二高-1,25-二羟基维生素D₃；

19-去甲-24-三高-1,25-二羟基维生素 D₃;
 19-去甲-26,27-二甲基-24-高-1,25-二羟基维生素 D₃;
 19-去甲-26,27-二甲基-24-二高-1,25-二羟基维生素 D₃;
 19-去甲-26,27-二甲基-24-三高-1,25-二羟基维生素 D₃;
 19-去甲-26,27-二乙基-24-高-1,25-二羟基维生素 D₃;
 19-去甲-26,27-二乙基-24-二高-1,25-二羟基维生素 D₃;
 19-去甲-26,27-二乙基-24-三高-1,25-二羟基维生素 D₃;
 19-去甲-26,27-二丙基-24-高-1,25-二羟基维生素 D₃;
 19-去甲-26,27-二丙基-24-二高-1,25-二羟基维生素 D₃; 以及
 19-去甲-26,27-二丙基-24-三高-1,25-二羟基维生素 D₃。

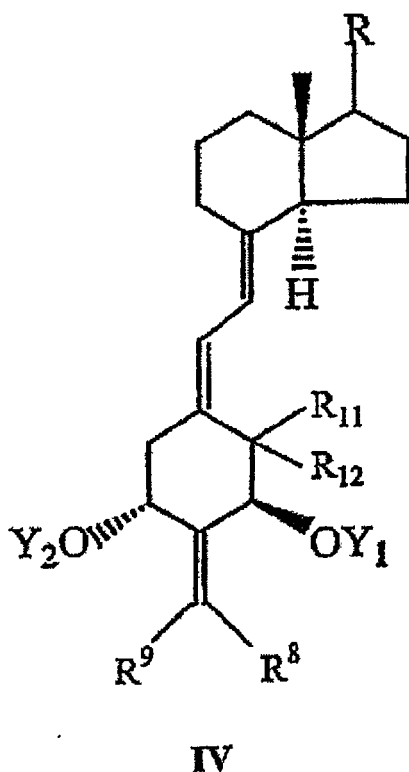
具有基本结构 V 的 2-亚烷基维生素 D 化合物, 尤其是 2-亚甲基-19-去甲维生素 D 化合物的制备可使用普通的常规方法实施, 即双环 Windaus-Grundmann 型酮 II 和烯丙基氧化膦 III 缩合生成相应的 2-亚烷基维生素 D 类似物 IV, 后者再经过 C-1 和 C-3 去保护:



II



III



在结构 II、III 和 IV 中，基团 Y_1 、 Y_2 、 R_{11} 、 R_{12} 以及 R 如上文通式 I 中所定义； Y_1 和 Y_2 优选为羟基保护基，还应当了解， R 基团中的任何可能敏感的或干扰缩合反应的官能度都如本领域所公知得以适当的保护。上述过程为汇集合成概念的一个应用，其已有效地用于制备维生素 D 化合物[例如，Lythgoe 等，*J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 590(1978)；Lythgoe, *Chem. Soc. Rev.* 2, 449 (1983)；Toh 等，*J. Org. Chem.* 48, 1414 (1983)；Baggiolini 等，*J. Org. Chem.* 51, 3098 (1986)；Sardina 等，*J. Org. Chem.* 51, 1264 (1986)；*J. Org. Chem.* 51, 1269 (1986)；DeLuca 等，美国专利 No.5,086,191；DeLuca 等，美国专利 No. 5,536,713；DeLuca 等，美国专利 No.5,843,928 及 DeLuca 等，美国专利 No.5,936,133]。

通式 II 所示的茛烷酮(Hydrindanones)是已知的，或可以用已知的方法制备。

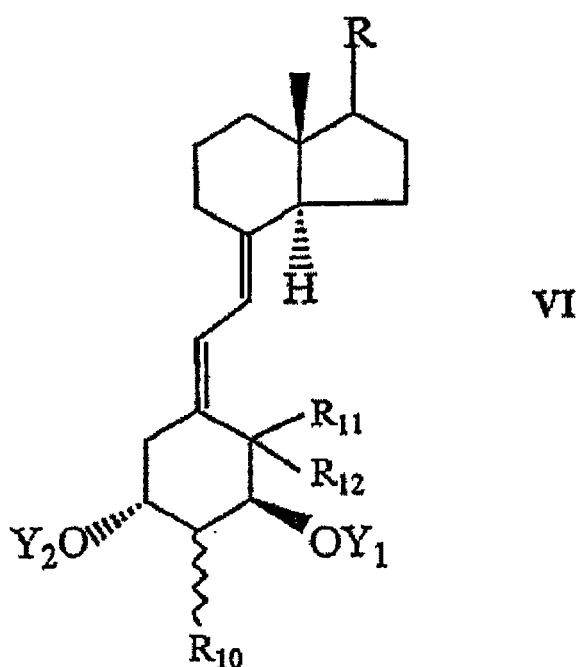
所需的通式 III 的氧化磷的合成由奎宁酸甲酯 (methyl quinate) 衍

生物开始制备, 如 Perlman 等在 Tetrahedron Lett. 32, 7663 (1991) 以及 DeLuca 等在美国专利 No.5,086,191 中所述, 其容易从商品 (1R,3R,4S,5R)-(-)-奎宁酸得到。

C-20 差向异构化可如下实施, 氧化磷III和 (20S) Grundmann 酮发生类似偶合反应, 然后水解掉羟基保护基即可得到(20S)-2-亚烷基-维生素 D 化合物。如上所述, 其他的 2-亚烷基-维生素 D 类似物也可由本文所述方法合成, 特别是例如可得到其中 R_{11} 和 R_{12} 可均为氢的 2-亚甲基-19-去甲-20(S)-1 α ,25-二羟基维生素 D₃。

2-烷基化合物

该 2-烷基类似物的结构特点如下列通式VI所示:



其中 Y_1 和 Y_2 可相同或不同, 各自选自由氢和羟基保护基组成的组中, R_{11} 和 R_{12} 可均为氢或共同构成亚甲基, R_{10} 选自由烷基、羟基烷基和氟烷基组成的组中, 且基团 R 是如本文前述的维生素 D 型化合物中任何已知

的典型侧链。

下文所列的化合物中，连接于碳 2 位的特定取代基应当被添加入命名中。例如，如果甲基是该烷基取代基，那么术语“2-甲基”必须在每个所命名的化合物之前。如果乙基是该烷基取代基，那么术语“2-乙基”必须在每个所命名的化合物之前，依此类推。此外，如果连在 20 位碳上的甲基为表型或非天然构型，术语“20 (S)”或“20-表”必须包括在每个之后所命名的化合物之中。同样，如果在侧链 20、22 或 23 位包含氧原子取代，那么术语“20-氧杂”、“22-氧杂”或“23-氧杂”必须分别加入所命名的化合物中。若需要，该所命名化合物也可为维生素 D₂ 类型。

当侧链不饱和并且 R₁₁ 和 R₁₂ 均是氢时，通式 VI 所示的 2-烷基化合物的具体的和优选的实例为：

19-去甲-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃；

19-去甲-24-高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃；

19-去甲-24-二高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃；

19-去甲-24-三高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃；

19-去甲-26,27-二甲基-24-高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃；

19-去甲-26,27-二甲基-24-二高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃；

19-去甲-26,27-二甲基-24-三高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃；

19-去甲-26,27-二乙基-24-高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃；

19-去甲-26,27-二乙基-24-二高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃；

19-去甲-26,27-二乙基-24-三高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃；

19-去甲-26,27-二丙基-24-高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃；

19-去甲-26,27-二丙基-24-二高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃；以及

19-去甲-26,27-二丙基-24-三高-1,25-二羟基-22-脱氢维生素 D₃。

相对于上述不饱和化合物（2-亚烷基和 2-烷基化合物），应注意在侧链 22 和 23 位碳原子之间的双键可为（E）或（Z）构型。因此，基于此

构型，术语“22,23 (E)”或“22,23 (Z)”应包含于每个上述所命名的化合物中。同样地，通常指定在 22 和 23 碳原子之间的双键用符号“ Δ^{22} ”表示。因此，例如上述第二个所命名的化合物还可记做 19-去甲-24-高-22,23(E)- Δ^{22} -1,25-(OH)₂D₃，其中双键为 (E) 构型。类似地，如果连在碳 20 的甲基是非天然构型，那么此化合物可以记做 19-去甲-20(S)-24-高-22,23(E)- Δ^{22} -1,25-(OH)₂D₃。

当侧链饱和并且 R₁₁R₁₂ 均是氢时，通式 VI 所示的 2-烷基化合物的具体的和优选的实例为：

19-去甲-1,25-二羟基维生素 D₃；
19-去甲-24-高-1,25-二羟基维生素 D₃；
19-去甲-24-二高-1,25-二羟基维生素 D₃；
19-去甲-24-三高-1,25-二羟基维生素 D₃；
19-去甲-26,27-二甲基-24-高-1,25-二羟基维生素 D₃；
19-去甲-26,27-二甲基-24-二高-1,25-二羟基维生素 D₃；
19-去甲-26,27-二甲基-24-三高-1,25-二羟基维生素 D₃；
19-去甲-26,27-二乙基-24-高-1,25-二羟基维生素 D₃；
19-去甲-26,27-二乙基-24-二高-1,25-二羟基维生素 D₃；
19-去甲-26,27-二乙基-24-三高-1,25-二羟基维生素 D₃；
19-去甲-26,27-二丙基-24-高-1,25-二羟基维生素 D₃；
19-去甲-26,27-二丙基-24-二高-1,25-二羟基维生素 D₃；以及
19-去甲-26,27-二丙基-24-三高-1,25-二羟基维生素 D₃。

具有基本结构 VI 的 2-烷基-维生素 D 化合物，尤其是 2 α -甲基-维生素 D 化合物的制备可使用普通的常规方法实施，即双环 Windaus-Grundmann 型酮 II 和烯丙基氧化膦 III 缩合生成相应的 2-亚烷基-维生素 D 类似物 IV，后者的化合物的碳 2 位外亚甲基的选择性还原得到 2-烷基化合物。

该方法（如上所述）为汇集合成概念的应用，其已有效地应用于维生素 D 化合物的制备。除本文前述所引用的参考文献外，同样可以参考 DeLuca 等，美国专利 5,945,410；DeLuca 等，美国专利 6,127,559；以及 DeLuca 等，美国专利 6,277,837。

该方法的最后一步是在三（三苯基膦）铑（I）氯化物[威尔金森氏催化剂， $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}$]的存在下有效实施的维生素 IV 中碳 2 位外亚甲基单元的选择性均匀催化加氢。此还原反应的条件仅仅还原 C（2）位的亚甲基单元，对 C（5）—C（8）的丁二基部分没有作用。该所分离的物质是 2-烷基-19-去甲-维生素的 C-2 位构型不同的差向异构体混合物（大约 1:1）。此混合物可未经分离而使用或，如果需要，可以使用高效的 HPLC 系统分离得到独立的 2α -和 2β -异构体。

C-20 差向异构化可以如下实施：用氧化膦 III 和（20S）Grundmann 酮发生类似偶合反应，然后水解掉羟基保护基，即可得到（20S）-2-烷基-维生素 D 化合物。

如上所述，其他 2-烷基-维生素 D 类似物的可通过本文揭示的方法合成，特别是例如 2α -甲基-19-去甲-20(S)- 1α ,25-二羟基维生素 D_3 ，其中 R_{11} 和 R_{12} 均是氢。

许多维生素 D_3 的氧杂类似物及其合成已为人所知。例如，N. Kubodera 等，Chem. Pharm. Bull., 34, 2286(1986)和 Abe 等，FEBS Lett. 222, 53, 1987 中记载了 20-氧杂类似物。在 E. Murayama 等，Chem. Pharm. Bull., 34, 4410(1986)，Abe 等，FEBS Lett. 226, 58, (1987)，PCT 国际申请 WO 90/09991 以及公开号为 184112 的欧洲专利申请中记载了几种 22-氧杂类似物，以及公开号为 78704 的欧洲专利申请和美国专利 4772433 中记载了一种 23-氧杂类似物。

2-取代的缓释化合物

具有所希望的及非常有益的体内生物活性模式（pattern of biological

activity), 即起效更缓慢且作用延续时间更长的经修饰的维生素 D 化合物也可在此处应用。

在结构上, 经修饰的具有所需生物学特征的维生素 D 化合物的关键特点是它们是 2-取代的-维生素 D 类似物的衍生物, 其中可水解基团连在碳 25 的羟基上, 且可任选地连在该分子中的任一其他羟基上。依据不同的结构因子——例如所连基团的类型、大小、结构的复杂性——这些衍生物在体内以不同的速度水解生成活性 2-取代的-维生素 D 类似物, 从而在体内得到生物学活性维生素 D 化合物的“缓释”效果。

当然, 该化合物体内活性功能的“缓释”可通过应用衍生物混合物或含有一种或多种维生素 D 衍生物及未衍生化的维生素 D 化合物的混合物加以进一步调节。

强调如上所定义的维生素衍生物的关键结构特点是十分重要的, 该特点为在分子的碳 25 的羟基上连有可水解的基团。在此位上可水解基团的存在揭示所得到的衍生物具有上述所需的“缓释”生物学活性功能。在此分子中的其他羟基官能团(例如, 在碳 1 或 3 上的羟基官能团)可作为自由羟基存在, 或其中的一个或多个羟基也可用可水解基团加以衍生化。

上述衍生物中存在的“可水解基团”优选为酰基, 即 Q^1CO -型的基团, 其中 Q^1 是氢或 1 至 18 个碳的烃基, 此烃基可以是直链、环状、支链、饱和或不饱和的。因此, 例如该烃基可以是直链或支链的烷基, 或是具有一个或多个双键的直链或支链的烯基, 或其可以是任选地被取代的环烷基或环烯基, 或是芳香基如取代或未取代的苯基、苄基或萘基。特别优选的酰基为烷酰基或烯酰基, 其中一些典型的实例为甲酰基、乙酰基、丙酰基、己酰基、异丁酰基、2-丁烯酰基、棕榈酰基或油酰基。另一种适宜种类的可水解基团为羟基羧基, 即 Q^2-O-CO -类型的基团, 其中 Q^2 是如上所述的 C_1 至 C_{18} 的烃基。该烃基的实例为甲基、乙基、丙

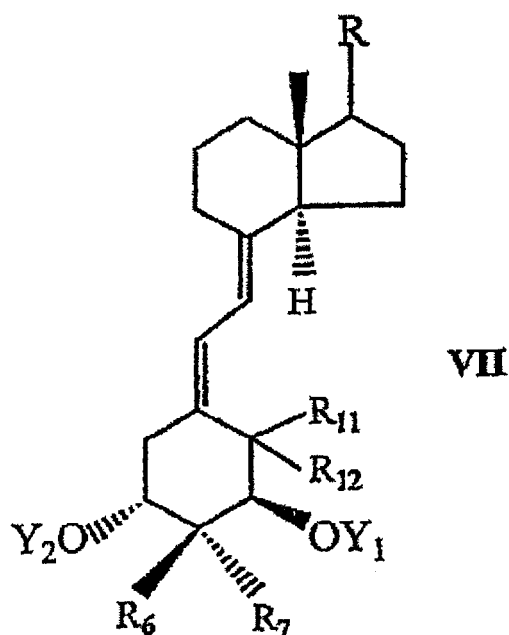
基，以及更高级的直链或支链的烷基和烯基，以及如苯基和苯甲酰基的芳烃基。

这些经过修饰的维生素 D 化合物在服用一段时间之后在体内水解成活性类似物，因此调节活性类似物的体内利用度，从而也调节其在体内的活性功能。术语“活性功能”(activity profile)指维生素 D 化合物随时时间的生物反应。单个经修饰的化合物或这种化合物的混合物都可给药用于“微调(fine tune)”反应所希望的时程。

在这里用到的术语“经修饰的维生素 D 化合物”包括任何该化合物中的一个或多个羟基官能团被可水解的基团衍生化修饰的维生素 D 化合物。“可水解的基团”指羟基修饰基，其可在体内水解从而重新生成游离羟基官能团。

在本公开的上下文中，术语可水解的基团优选为包括酰基和烷基氧羰基，即各自为 Q^1CO- 和 $Q^2-O-CO-$ 类型的基团，其中 Q^1 和 Q^2 分别如上述定义。

所包括的经修饰的维生素 D 化合物的结构如下通式 VII 所示：



其中 Y_1 、 Y_2 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_6 和 R_7 同上述通式 I 中的定义，例外的是在侧

链上的 R_5 是 $-OY_3$ 且 Y_3 是如上所定义的酰基或烃基氧羰基。

这种经修饰的维生素 D 化合物的具体实例包括 2-取代的衍生物如：

2-亚甲基-19-去甲- $1\alpha,25-(OH)_2-D_3-1,3,25$ -三乙酸酯，其中 $Y_1=Y_2=Y_3$ 为 CH_3CO ；其中 R_6 和 R_7 共同构成 $=CH_2$ ；且 R_{11} 和 R_{12} 均是氢；

2-亚甲基-19-去甲- $1\alpha,25-(OH)_2-D_3-1,3,25$ -三己酸酯，其中 $Y_1=Y_2=Y_3$ 为 $CH_3(CH_2)_4CO$ ； R_6 和 R_7 共同构成 $=CH_2$ ； R_{11} 和 R_{12} 均是氢；

2-亚甲基-19-去甲- $1\alpha,25-(OH)_2-D_3-1,3,25$ -三壬酸酯，其中 $Y_1=Y_2=Y_3$ 为 $CH_3(CH_2)_7CO$ ； R_6 和 R_7 共同构成 $=CH_2$ ； R_{11} 和 R_{12} 均是氢；

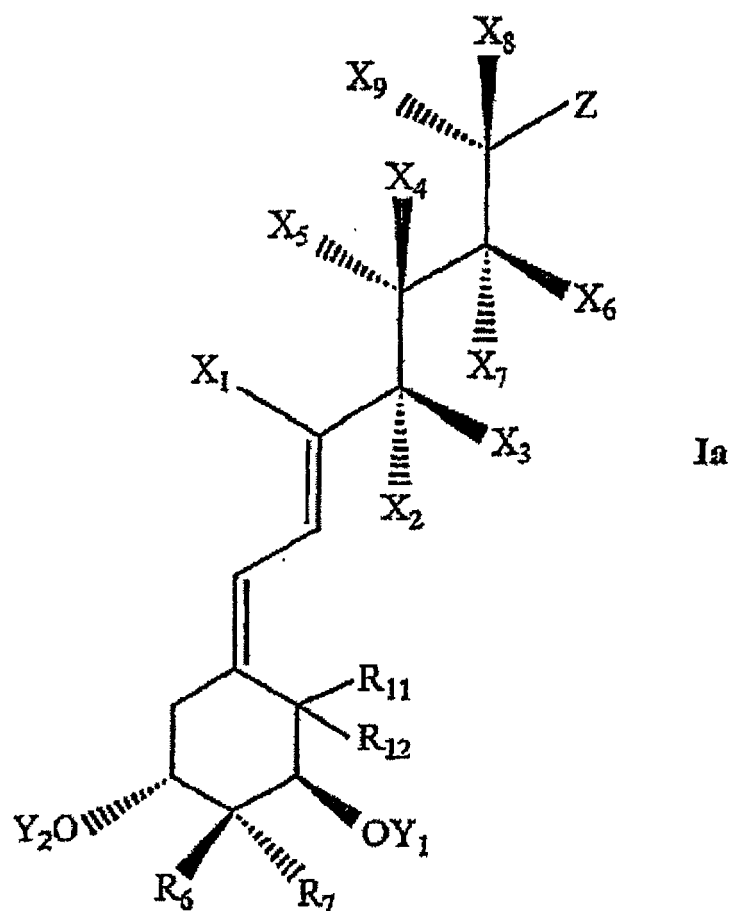
2-亚甲基-19-去甲- $1\alpha,25-(OH)_2-D_3-25$ -乙酸酯，其中 $Y_1=Y_2$ 为 H 且 Y_3 为 CH_3CO ； R_6 和 R_7 共同构成 $=CH_2$ ； R_{11} 和 R_{12} 均是氢。

上述化合物可以用已知的方法制备。例如参考公开于 1999 年 3 月 27 日的 WO 97/11053。

其他 2-取代的化合物

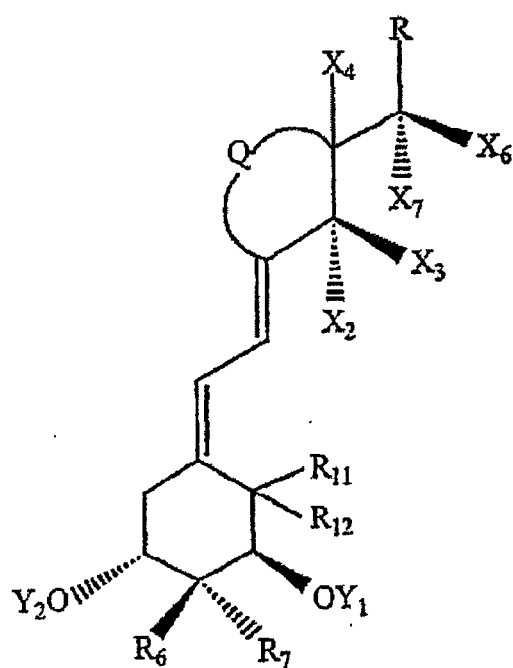
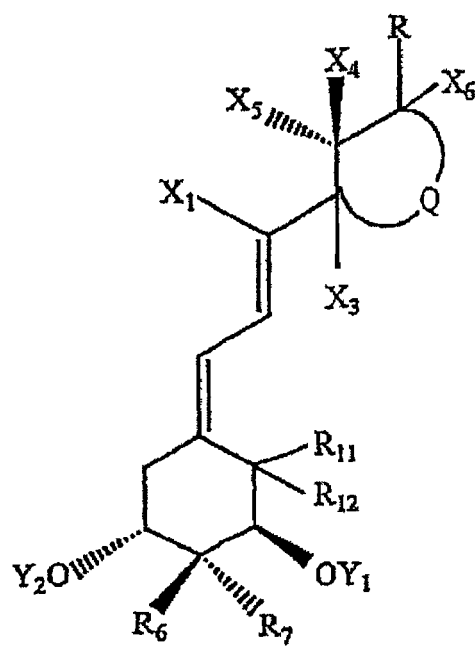
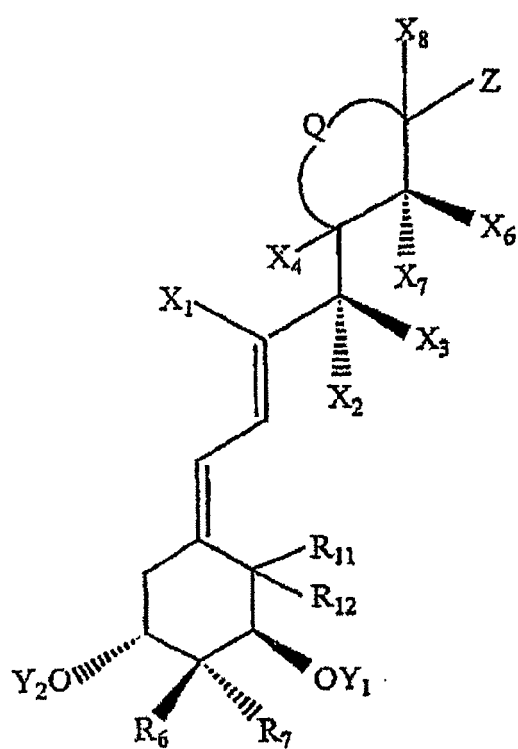
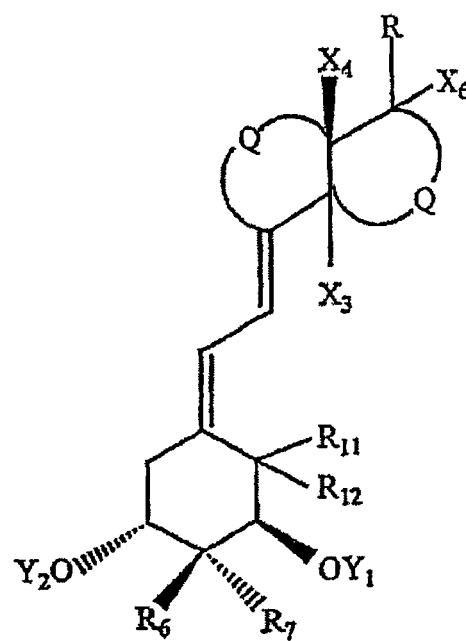
在最广泛的应用中，本发明涉及所有含有维生素 D 环的 2-取代的维生素 D 类似物。维生素 D 环指中心部分包含对应于维生素 D 的 8、14、13、17 和 20 位的 5 个碳原子的取代链，且其末端在 20 位与为任何已知的维生素 D 类型化合物的典型侧链（如本文前文所定义的 R）的结构部分相连，在 8 位 5,7-二烯部分与活性 1α -羟基维生素 D 类似物（如本文通式 I 所示）的 A 环相连。因此，维生素 D 化合物中通常存在的对 6 元 C 环和 5 元 D 环的各种已知的修饰，如缺少其中一个或另一个或全部，也包括在本发明中。

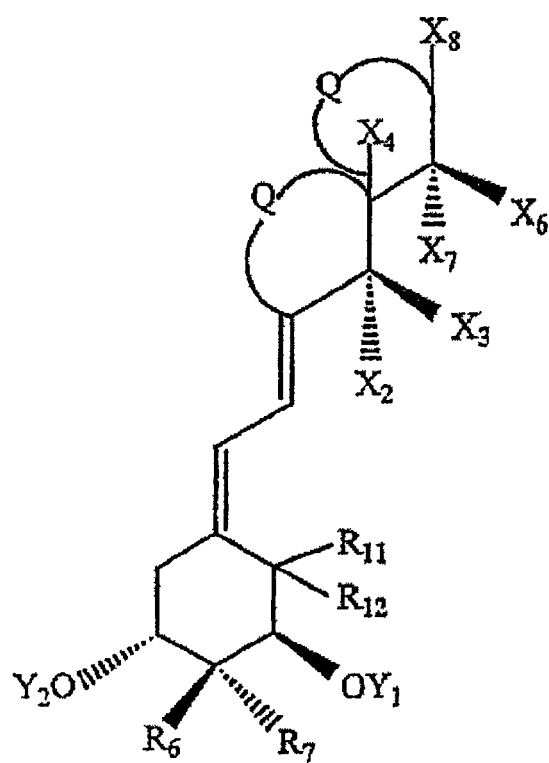
因此，如下通式 I a 所示的化合物，连同通式 I 所示的化合物一起，同样包含在本发明中：



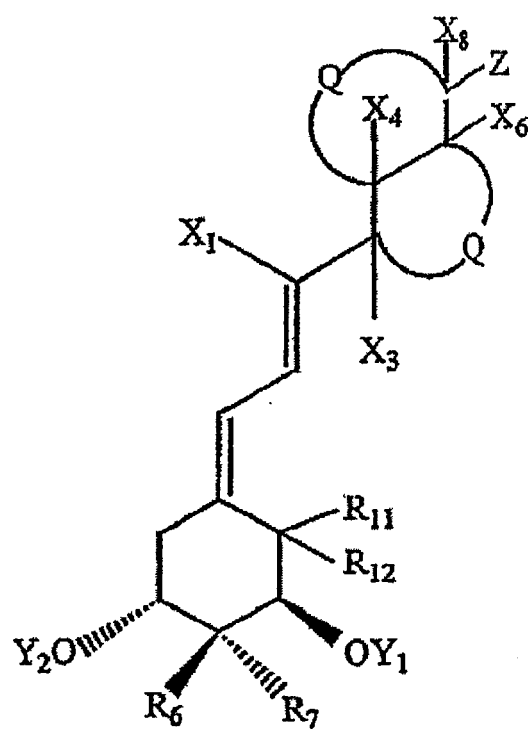
在上面通式 Ia 中， Y_1 、 Y_2 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_6 、 R_7 和 Z 的定义如上述通式 I 中所述。取代基 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 、 X_8 和 X_9 可以相同或不同，且选自氢或低级烷基即 C_{1-5} 的烷基，如甲基、乙基或 n -丙基。此外，成对的取代基 X_1 和 X_4 或 X_5 、 X_2 或 X_3 和 X_6 或 X_7 、 X_4 或 X_5 和 X_8 或 X_9 可与分别对应于 8、14、13 或 14、13、17 或 13、17、20 位的化合物中心部分的三个相邻碳原子共同构成相同或不同、饱和或不饱和、取代或未取代的 3、4、5、6 或 7 元碳环。

本发明中优选的化合物可以如下式之一所示：

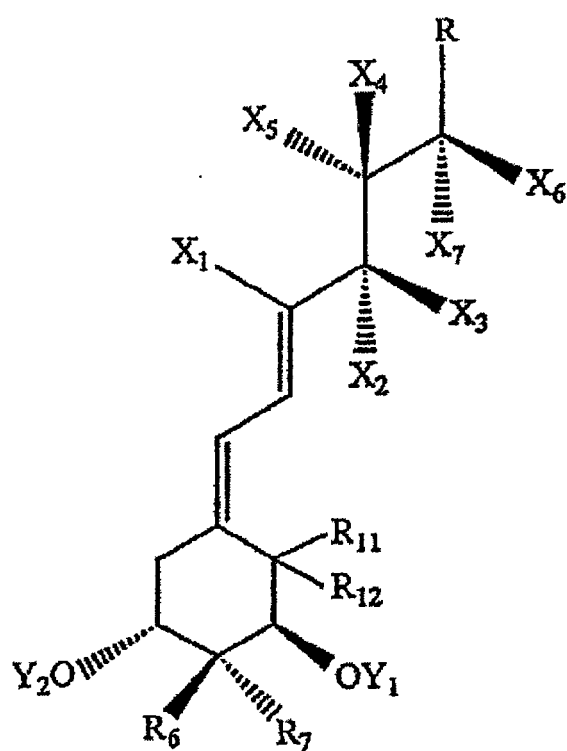
**Ib****Ic****Id****Ie**



If



Ig



Ih

在上面式 I b、I c、I d、I e、I f、I g 和 I h 中， Y_1 、 Y_2 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_6 、 R_7 、 R 、 Z 、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 、 X_7 和 X_8 的定义均如前文所述。取代基 Q 是饱和或不饱和的、取代或未取代的含 0、1、2、3 或 4 个碳原子的烃链，但优选为 $-(CH_2)_k$ -基团，其中 k 是 2 或 3 的整数。

制备式 I a 至 I h 化合物的方法是已知的。具体而言，可参考于 1994 年 7 月 7 日提交的国际申请 PCT/EP94/02294，其公开于 1995 年 1 月 19 日，公开号为 WO95/01960。

为了治疗目的，本文分子式所定义的化合物可以依照本领域公知的常规方法在无毒溶剂中配制成溶液剂或乳剂、混悬剂或在适宜溶剂或载体中的分散剂，或与固体载体制成丸剂、片剂或胶囊用于药物学应用。任何上述剂型还可包括其他的药物学可接受且无毒的赋形剂，如稳定剂、抗氧化剂、粘合剂、着色剂或乳化剂或矫味剂。该剂型可口服、全身或局部给药。如果局部应用，此化合物可如本领域公知的以固定形式 (immobilized form) 给药，或使用 Alzet 微型泵 (minipump)。

该化合物可口服、局部、非胃肠道或透皮给药。该化合物适宜通过注射或通过静脉输注或合适的无菌溶液给药，或以液体或固体剂量形式通过消化道给药，或以霜剂、软膏、贴剂形式或以适于透皮应用的类似的载体给药。剂量为每天 $0.01 \mu g$ 至 $50 \mu g$ 的该化合物适用于治疗目的，如本领域所公知，该剂量可根据所需治疗的疾病、其严重程度以及患者的反应加以调节。由于该新化合物显示出作用的特异性，因此各自适于单独给药或在发现需要改善不同程度的骨盐动员和钙转运刺激作用的情况下与分级剂量的另一种活性维生素 D 化合物共同给药，例如 1α -羟基维生素 D_2 或 D_3 ，或 $1\alpha, 25$ -二羟基维生素 D_3 。

上述化合物可以制成霜剂、洗剂、软膏、局部贴剂、丸剂、胶囊剂或片剂，或以液体的形式如在药物学无毒且可接受的溶剂或油中的溶液剂、乳剂、分散剂或混悬剂，这些制剂还可包含其他药用无毒或有益的

成分，如稳定剂、抗氧化剂、乳化剂、着色剂、粘合剂或矫味剂。

对于特定的疾病与给药途径，该化合物优先以足以产生所希望的治疗结果的量给药，即“治疗有效量”。上述剂量是适宜的，如本领域所公知的那样，已知所给定的量需依据疾病的严重程度、病情以及患者的反应进行调节。

本发明的剂型包括活性成分和药物学可接受的载体以及任选的其他治疗成分。该载体就与剂型中其他成分的相容性来说必须是“可接受的”，且对其接受者无害。

适宜口服给药的本发明的剂型可为分散单元形式，如各自含有预定量有效成分的胶囊、小药囊(sachets)、片剂或锭剂；为散剂或颗粒剂形式；为水溶液或非水溶液中的溶液剂或混悬剂形式；或为水包油型乳剂或油包水型乳剂的形式。

用于直肠给药的剂型可以为并入活性成分和载体如可可脂的栓剂形式，或为灌肠剂形式。

适于非胃肠道给药的剂型宜包括活性成分的无菌油性或水性制剂，其与接受者的血液完全等渗。

适宜用作局部给药的制剂包括液体或半液体制剂，如搽剂、洗剂、敷剂(applicants)、水包油或油包水型乳剂如霜剂、软膏或糊剂；或者是溶液剂或混悬剂如滴剂；或者是喷雾剂。

对于哮喘病的治疗，可以使用分散于喷雾器(spray can, nebulizer 或 atomizer)中的粉末吸入剂、自推进或喷雾剂型。给药时该剂型的粒径优选的范围是 10 至 100 μ 。

上述剂型可便利地制备成剂量单位形式，并且可以用药剂学上公知的方法制备。术语“剂量单位”是指单位，即可作为物理和化学稳定的单位剂量给药的单一剂量，其包含该活性成分或其与固体或液体药物学稀释剂或载体构成的混合物。

实施例

在遵守被批准的 IRB 协议（协议#2001-055）的情况下收集在髌/膝置换手术的手术过程后丢弃的人体骨骼样品，并使用下述方法处理。若非如此，这些骨骼碎片在外科手术时通常被当作废物丢弃。

将这些骨骼碎片在无菌条件下用磷酸缓冲盐（PBS）彻底清洗。然后将这些碎片切成更小的碎片（1-2mm³），并如下所述用酶切消化法分离成骨细胞。

利用胶原酶消化从骨骼碎片得到成骨细胞。简言之，用 PBS 清洗骨骼样品两次，并切成 1mm³ 大小的碎片，然后在胰蛋白酶（1mg/mL）中消化 10 分钟，然后在分散酶（2mg/mL）中消化 20 分钟，并用细菌胶原酶[胶原酶 A]（3mg/mL）在 37℃ 水浴中的 PBS 中消化两次，30 分钟。洗涤胶原酶消化释放的细胞，计数并使其于 25cm² 的细胞培养瓶中在含有 1:1 的 Ham's F12/Dulbecco 改良 Eagle 培养基（DMEM）并补充 10% 胎牛血清的培养基中生长至亚合生。细胞培养在 37℃ 含有 5%CO₂ 和 95% 空气的潮湿环境中。每 2 至 3 天更换一次培养基，直到细胞有 80% 合生。然后将细胞胰蛋白酶化，从早期传代中清洗并冷冻，用于利用如下所述的方法进行评价。

为了评价成骨细胞在体外形成骨小节（bone nodules）的能力，将细胞培养在 6 孔板中，每孔 1—3 × 10⁵ 个细胞。细胞在不同剂量的 1,25-(OH)₂D₃ 或维生素 D 类似物存在的条件下培养 7 天。在细胞培养的 7 天中，彻底更换培养基两次，并且在每次更换培养基时，向培养基补充加入新鲜的化合物（1,25-(OH)₂D₃ 或 2-亚甲基-19-去甲-(20S)-1 α ,25-二羟基维生素 D₃——2MD）。在第 10 天和第 13 天，完全更换培养基，并用抗坏血酸（50 μ g/ml）和 β -磷酸甘油（10mM）处理以替代上述化合物。如果需要，可以在第 15 天向培养基中加入第三剂量的抗坏血酸和

β -磷酸甘油。培养期过后,用 Von Kossa 技术对细胞进行染色。简言之,在暗处用 5%硝酸银盐对细胞染色 30 分钟,用蒸馏水冲洗,用碳酸钠/甲醛溶液还原 2 分钟,然后用自来水冲洗 10 分钟。用亚甲绿派洛宁将细胞染色 20 分钟,用水冲洗然后再用无水乙醇清洗两次。通过上述方法,在培养基小结区域的染色为由暗棕色到黑色的磷酸钙(钙化基质)证明骨骼小结在体外的形成(Marie^{15,16}, 1994; 1995; Shevde 等¹⁷, 2001)。可用各种公开的方法定量评价骨骼小结在体外的形成。

结果及讨论

图 1 表示温育 14 天后成骨细胞培养物的照片,其生动地显示 10^{-8} 摩尔 $1,25-(OH)_2D_3$ 仅产生很微小的变化。因此,天然维生素 D 激素对成骨细胞形成矿化的骨骼的作用是很微弱的。图 2 表示经 Von Kossa 染色的使用不同浓度的 $1,25-(OH)_2D_3$ 或 2MD 的一系列培养物。结论明确证明,正如 Von Kossa 染色法所显示,2MD 对促进成骨细胞培养物形成矿化骨骼具有独特和强烈的作用。即使在 10^{-12} 摩尔的浓度,2MD 也可使新骨生成达到饱和程度。在不同场合用不同的人成骨细胞培养物重复这些结果,得到相同的结果和结论。此外,从初生小鼠颅骨成骨细胞培养物可得出相似的结论。显然 2MD 可特定地、显著地诱导破骨细胞介导的骨骼的形成。上述结果表明此化合物及其相关的类似物可用于促进成骨细胞介导的骨骼生长。其可由此化合物对切除卵巢的动物具有显著地促进骨量积聚的能力加以证实(DeLuca 美国专利 6306844)。然而,上述结果证明骨量的积聚是由于其对新骨形成的显著的促进作用。因此,可以预想,2MD 及其类似物非常有益于促进骨痂的形成和骨折的治疗。因此,任何部分骨骼发生骨折的患者都可以口服、全身或直接使用 2MD 治疗以促进骨折的痊愈。可预想在骨折的部位使用缓释形式的 2MD;从而可提供如 2MD 25-醋酸酯的缓释形式或使用微型渗透泵(osmotic minipump)用于每小

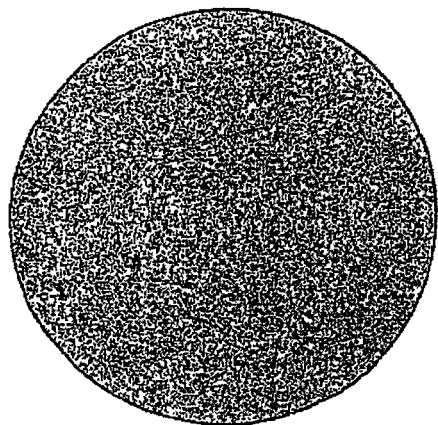
时释放少量该化合物，或以固定的形式植入，或以固定的形式注射入骨折区域。此外，上述结果表明此化合物可以全身应用，也可以放置在能显著促进例如牵引成骨术中骨移植生长和愈合的区域。还可预想，此化合物对植入用于治愈或维持骨骼在适当位置的植入物或装置的患者十分有益。

参考文献

1. DeLuca, HF. The transformation of a vitamin into a hormone: The vitamin D story. The Harvey Lectures, Series 75, pp. 333-379. Academic Press, New York(1981).
2. Shipley PG, Kramer B, Howland J. Calcification of rachitic bones in vitro. Am. J. Dis. Child. 30:37-39,1925.
3. Shipley PG, Kramer B, Howland J. Studies upon Calcification in vitro. Biochem. J. 20:379-387, 1926.
4. Yamamoto M, Kawanobe Y, Takahashi H, Shimazawa E, Kimura S, Ogata E. Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. J. Clin. Invest. 74,507-513,1984.
5. Underwood JL, DeLuca HF. Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. Am. J. Physiol. 246, E493-E498,1984.
6. DeLuca HF. Vitamin D: The vitamin and the hormone. Fed. Proc. 33,2211-2219, 1974.
7. DeLuca HF, Schnoes HK. Vitamin D: Recent advances. Ann. Rev. Biochem. 52,411-439,1983.
8. Feldman D, Glorieux FH, Pike JW, eds. Vitamin D. Academic Press, San Diego, CA. 1285pp., 1997.
9. Kooh SW, Fraser D, DeLuca HF, Holick MF, Belsey RE, Clark MB,

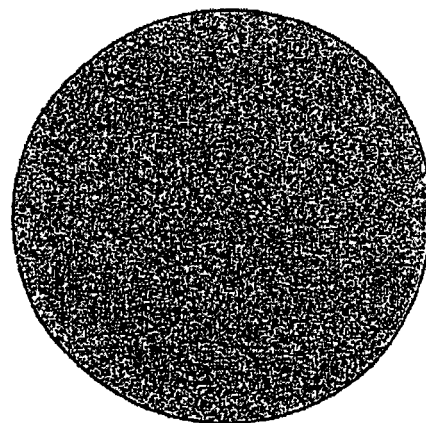
- Murray TM. Treatment of hypoparathyroidism and pseudohypoparathyroidism with metabolites of vitamin D: Evidence for impaired conversion of 25-hydroxyvitamin D to $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D. *New Engl. J. Med.* 293,840-844, 1975.
10. Demay MB, Kiernan MS, DeLuca HF, Kronenberg HM. Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the $1,25$ -dihydroxyvitamin D₃ receptor and mediate transcriptional repression in response to $1,25$ -dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89,8097-8101,1992.
 11. Darwish HM, DeLuca HF. Identification of a transcription factor that binds to the promoter region of the human parathyroid hormone gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 365,123-130, 1999.
 12. Aloia JF. Role of calcitriol in the treatment of post-menopausal osteoporosis *Metabolism* 39,35-38, 1990.
 13. Tilyard MW, Sprars GFS, Thomson J, Dovey S. Treatment of postmenopausal osteoporosis with calcitriol or calcium. *New Engl. J. Med.* 326,357-362, 1992.
 14. Sicinski RR, Prah JM, Smith CM, DeLuca HF. New $1\alpha,25$ -dihydroxy-19-norvitamin D₃ compounds of high biological activity: Synthesis and biological evaluation of 2-hydroxymethyl, 2-methyl, and 2-methylene analogues. *J. Med. Chem.* 41,4662-4674, 1998.
 15. Marie PJ. Human osteoblastic cells: A potential tool to assess the etiology of pathologic bone formation. *J Bone Miner Res.* 9(12):1847-1850, 1994.
 16. Marie PJ. Human osteoblastic cells: Relationship with bone formation. *Calcif. Tissue Int.* 56S:13-16, 1995.

-
17. Shevde NK, Bendixen AC, Maruyama M, Li BL and Billmire DA. Enhanced activity of Osteoblast Differentiation Factor (PEBP2 α A2/CBFA1) in Affected Sutural Osteoblasts from Patients with Nonsyndromic Craniosynostosis. Cleft Palate-Craniofacial Journal 38(6):606-614, 2001.



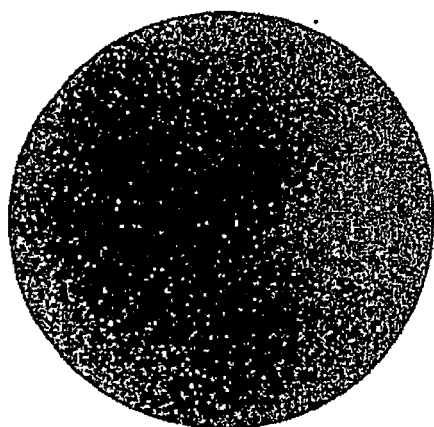
对照

图 1a



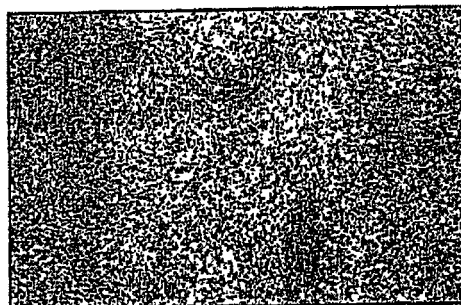
1,25(OH)₂D₃

图 1b



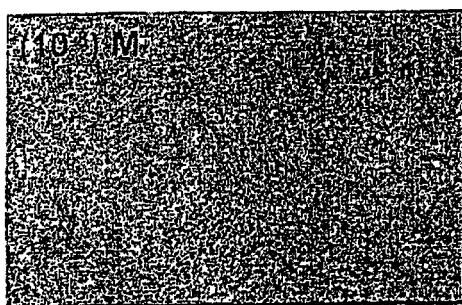
2MD

图 1c



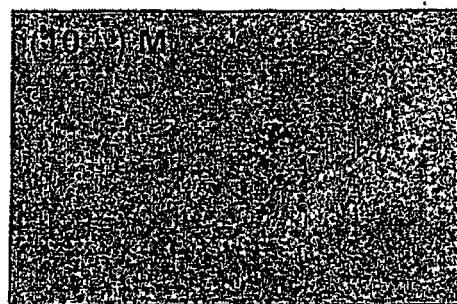
对照

图 2a



$1,25(OH)_2D_3$

图 2b



$1,25(OH)_2D_3$

图 2c



2MD

图 2d



2MD

图 2e