

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07C401/00

A61K 31/59



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00810222.8

[45] 授权公告日 2004 年 11 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 1174964C

[22] 申请日 2000.7.6 [21] 申请号 00810222.8

[30] 优先权

[32] 1999.7.12 [33] US [31] 60/143,413

[86] 国际申请 PCT/EP2000/006393 2000.7.6

[87] 国际公布 WO2001/004089 英 2001.1.18

[85] 进入国家阶段日期 2002.1.11

[71] 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 安德鲁·戴维·巴超

伯纳德·迈克尔·亨尼西

米兰·拉多耶·乌斯科科维奇

审查员 刘广南

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公

司

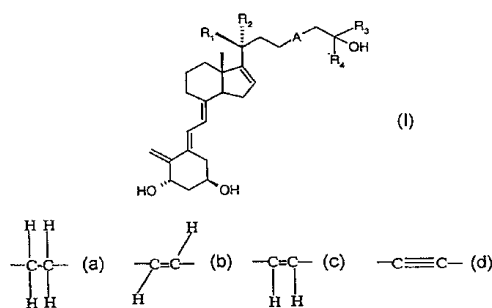
代理人 李悦

权利要求书 2 页 说明书 21 页

[54] 发明名称 维生素 D<sub>3</sub> 类似物

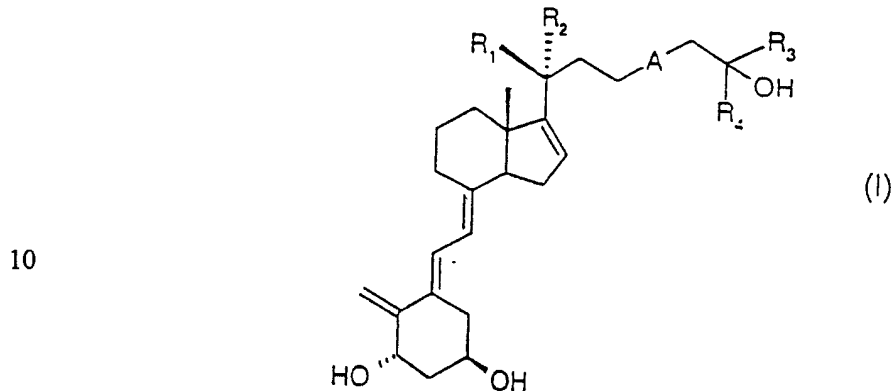
[57] 摘要

本发明公开了式(I)的化合物, 其中 R<sub>1</sub> 是氢或烷基; R<sub>2</sub> 是氢或烷基; 或者 R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 与 C<sub>20</sub> 一起是环丙基; A 是 a, b, c 或 d; R<sub>3</sub> 是烷基, 羟基烷基或氟代烷基; 和 R<sub>4</sub> 是烷基, 羟基烷基或氟代烷基, 其用于治疗乳腺癌, 前列腺癌, 髓细胞白血病, 良性前列腺增生, 秃发和骨质疏松症。



ISSN 1008-4274

5 1. 下式的化合物:



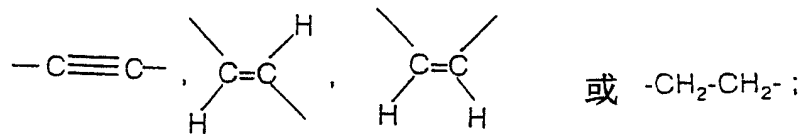
其中

$R_1$  是氢或烷基;

15  $R_2$  是氢或烷基; 或者

$R_1, R_2$  与  $C_{20}$  一起是环丙基;

A 是



$R_3$  是烷基, 羟基-烷基或氟代烷基;

和  $R_4$  是烷基, 羟基烷基或氟代烷基,

其中“烷基”指具有 1-4 个碳原子的直链或支链烷基。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中  $R_1$  是氢和  $R_2$  是烷基, 或者  $R_1$   
25 是烷基和  $R_2$  是氢, 其中“烷基”如权利要求 1 所定义。

3. 根据权利要求 2 的化合物, 其中  $R_1$  是氢和  $R_2$  是甲基, 或者  $R_1$   
是甲基和  $R_2$  是氢。

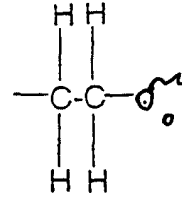
4. 根据权利要求 3 的化合物, 其中  $R_3$  和  $R_4$  独立地是烷基, 羟基烷  
基或三氟烷基, 其中“烷基”如权利要求 1 所定义。

30 5. 根据权利要求 4 的化合物, 其中  $R_3$  和  $R_4$  独立地是甲基, 羟基甲

基或三氟甲基。

6.根据权利要求5的化合物，其中A是

5

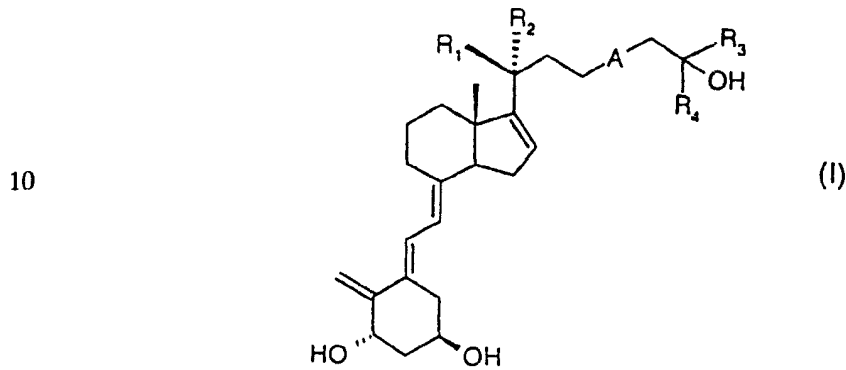


7.根据权利要求6的化合物，其是1,25-二羟基-16-烯-5,6-反-维生素D<sub>3</sub>。

维生素 D<sub>3</sub> 类似物

5

本发明涉及一种下式的化合物



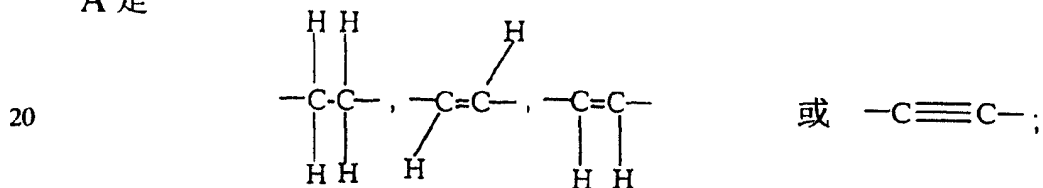
其中

15 R<sub>1</sub> 是氢或烷基;

R<sub>2</sub> 是氢或烷基; 或者

R<sub>1</sub> 和 R<sub>2</sub> 与 C<sub>20</sub> 一起是环丙基;

A 是



R<sub>3</sub> 是烷基, 羟基烷基或氟代烷基;

和 R<sub>4</sub> 是烷基, 羟基烷基或氟代烷基。

25 已经发现式 I 的化合物诱导对前列腺, 乳腺和髓细胞白血病癌症细胞系增生的抑制。因此, 式 I 的化合物用作治疗前列腺癌, 乳腺癌, 和用于治疗白血病的药物。

还已经发现式 I 的化合物具有抗雄激素活性。因此, 式 I 的化合物用于治疗良性前列腺增生, 秃发和前列腺癌。

30 还发现式 I 的化合物具有使它们用于治疗皮脂腺疾病例如粉刺或皮

脂溢性皮炎的活性。

还发现式 I 的化合物具有使该化合物用于治疗骨质疏松症的活性。

### 发明的详细描述

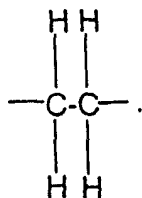
- 5 如这里使用的, 术语“烷基”指具有 1-4 个碳原子的直链或支链烷基, 例如甲基, 乙基, 丙基, 异丙基, 丁基, 叔丁基等等。术语“羟基烷基”指在烷基的任何碳原子上具有羟基取代基的烷基。术语“氟代烷基”指在烷基的任何碳原子上被一个, 两个或三个氟原子取代的烷基。

- 在这里给出的结构式中, 各取代基通过下面的标志之一与核心连接:  
10 楔形实线(—)指取代基位于分子平面之上; 楔形虚线(……)指取代基位于分子平面之下。

优选地,  $R_1$  是氢和  $R_2$  是烷基, 或者  $R_1$  是烷基和  $R_2$  是氢。更优选地,  $R_1$  是氢和  $R_2$  是甲基, 或者  $R_1$  是甲基和  $R_2$  是氢。

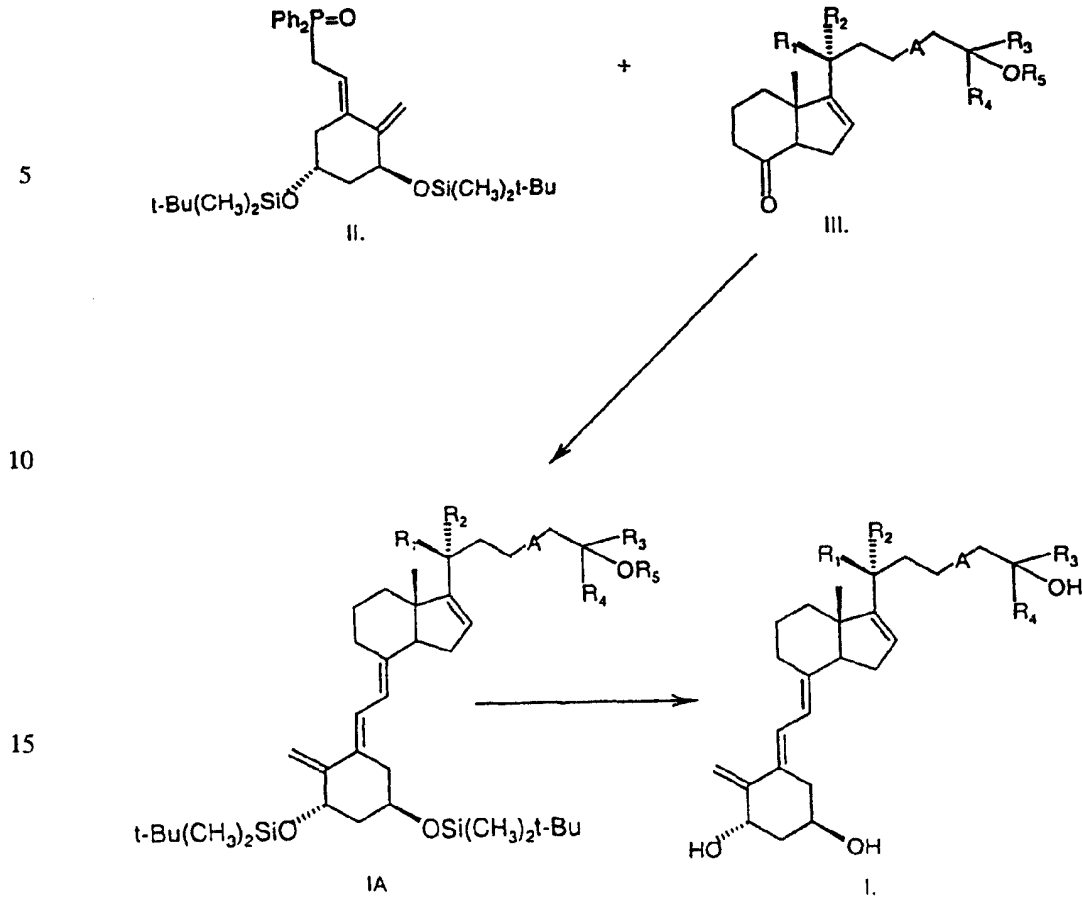
- 15 优选地,  $R_3$  和  $R_4$  独立地是烷基, 羟基烷基或三氟烷基。更优选地,  $R_3$  和  $R_4$  独立地是甲基, 羟基甲基或三氟甲基。

优选地, A 是



- 20 最优选的式 I 的化合物是 1, 25-二羟基-16 烯-5, 6-反-维生素  $D_3$ 。  
如下文所述制备式 I 的化合物, 特别参照下面的结构式反应示意图。

## 结构式反应示意图



$R_5$  是氢或三甲基甲硅烷基。

20 在上面的结构式反应示意图中，其中 Ph 是苯基，式 II 的化合物是 [3S-(1E, 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-2-[3, 5-二(二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]-2-亚甲基-环己基亚基]乙基]二苯基磷氧化物，其通过与式 III 的化合物反应而被转化为式 IA 的化合物。

25 该反应在强碱例如烷基锂(例如丁基锂)的存在下、在极性的对质子惰性的有机溶剂(例如无水乙醚或更优选地四氢呋喃)中在-60 $^{\circ}$ C至-90 $^{\circ}$ C下进行。

通过在极性有机溶剂(例如乙醚或更优选地四氢呋喃)中与氟化物盐(例如四丁基氟化铵)反应，去除式 IA 的化合物的保护基，得到相应的式 I 的化合物。

30 如下文实施例 1-6 所述，或者如实施例 7-8 所述，制备式 II 的化合物。

式 III 的化合物是已知的(例如在美国专利 No.5087619)或者可以根据已知方法制备。

通过下面的本领域公知的试验方法能证明式 I 的化合物作为用于治疗前列腺癌, 乳腺癌和用于治疗白血病的药物的有用活性。

5 下面是选择使用的材料和应用的方法:

细胞系.如下保持乳腺癌细胞系(MCF-7), 前列腺癌细胞系(LNCaP)和髓细胞白血病细胞系(HL-60):在含有 10%胎牛血清(FCS)的 Dulbecco's Modified Eagle Media(DEME)中保持 MCF-7 细胞;在含有 10%FCS 的 RPMI1640 中培养 LNCaP 和 HL-60;所有三种细胞系在含有 5%CO<sub>2</sub> 的 37  
10 °C 培养箱中保持。

维生素 D<sub>3</sub> 化合物.以 10<sup>-3</sup>M 将维生素 D<sub>3</sub> 化合物溶解于无水乙醇中作为储液,其在-20°C下避光储存。对于体外应用,在 DMEM 或 RPMI 培养基中稀释化合物。对于体内应用,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中稀释化合物。一份样品只使用一次并且将 LNCaP 细胞胰酶消化。将细胞的洗涤过的单  
15 细胞悬浮液计数并且以 400 微升/孔的体积 1X10<sup>3</sup> 细胞/孔的总量制成 24 孔平底板。用在 40°C 平衡过的琼脂制备饲养层。在该步骤之前,将化合物移入孔中。孵育后计数菌落。所有的实验对于每个实验点使用三份平行平板进行至少三次。

体内血清钙水平.将 28 只 8-9 周龄雄性 Balb/c 小鼠豢养在没有病原体条件下并且喂以标准实验饮食。隔天(除了周六和周日)用维生素 D<sub>3</sub> 化合物或稀释剂(100 微升/小鼠)对每组四只小鼠腹膜内注射 3 星期。  
20 1,25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 的剂量是:0.1, 0.5, 1.0 和 2.0 微克。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 的剂量是 0.1 微克/小鼠。对照小鼠注射 100 微升 PBS。通过定量比色检测测定每周测定血清钙值。

25 脉冲暴露实验.MCF-7 细胞在液体培养基中与 10<sup>-7</sup> 的 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 或 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 孵育不同时间。孵育之后,这些细胞用 PBS 小心冲洗两次并且计数活细胞并且制成 24-孔板用于软琼脂菌落测定,如先前所述。

30 通过流式细胞计数仪分析细胞周期.对与 10<sup>-7</sup>M 的 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 或 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 孵育 4 天的 MCF-7 细胞进行细胞周期分析。在

用 50 微克/毫升碘化丙锭, 1 毫克/毫升 RNA 酶(100 单位/毫升)和 0.1%NP40 染色之前将细胞在冷却的甲醇中固定过夜。染色之后立即进行分析。所有的实验至少独立地进行三次。所有的数据通过斯氏检验实验进行统计学分析。

- 5 蛋白质印迹分析.细胞用 PBS 冲洗两次, 悬浮于溶胞缓冲液(50mM Tris pH8.0, 150mMNaCl, 0.1%SDS, 0.5%脱氧胆酸钠, 1%NP40, 100 微克/毫升苯基甲基磺酰氟, 2 微克/毫升抑酶肽, 1 微克/毫升胃酶抑制剂和 10 微克/毫升亮抑酶肽)中, 并且置于冰上 30 分钟。4°C 下以 15000 克离心 20 分钟之后收集上清液。定量测定蛋白质浓度。通过 15%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶分离所有的溶胞产物, 转移到转移膜聚二氟乙烯膜上, 并且用抗-p27<sup>kip1</sup> 兔多克隆抗体和抗-肌动蛋白鼠单克隆抗体探测。产生印迹。

- 端粒酶活性.为了测定相对端粒酶活性, 进行端粒重复扩增方案 (TRAP)测定。对于人端粒酶逆转录酶(hTERT), 用苯酚和异硫代氰酸胍的单相溶液从用 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 或 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub>(10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>和 10<sup>-7</sup>M) 处理 4 天的 HL-细胞分离总 RNA。用 1 微克总 RNA 和随机的六碱基引物进行 RT-PCR。使用对 hTERT 基因或 GAPDH 基因特异性的引物扩增 cDNA, 后者用作对照物。用于 hTERT 的引物是 :5'-CGGAAGAGTGCTGGAGCAA-3'(有义) (SEQ ID NO:1), 和 5'-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3'(反义)(SEQ ID NO:2)。热循环是 94°C 90 秒, 接着 95°C 20 秒, 68°C 40 秒, 和 72°C 30 秒 33 个循环。用于 GAPDH 的引物是: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'(有义) (SEQ ID NO:3), 和 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'(反义) (SEQ ID NO:4)。用于 GAPDH 扩增的条件是: 95°C 2 分钟; 94°C 30 秒, 62°C 40 秒, 和 72°C 60 秒 26 个循环, 接着 72°C 4 分钟。PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳并且用溴化乙锭染色。

- 25 维生素 D<sub>3</sub> 类似物对克隆测试的作用.在 10<sup>-11</sup> 至 10<sup>-7</sup>M 维生素 D<sub>3</sub> 类似物存在下在软琼脂中克隆 MCF-7 细胞, LNCaP 细胞和 HL-60 细胞。测定剂量反应曲线和抑制 50%菌落生成的有效剂量(ED<sub>50</sub>)。1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5,6-反-D<sub>3</sub> 以剂量依赖方式有效抑制三种细胞系的克隆增殖。1,25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5,6-反-D<sub>3</sub> 对于 LNCaP 细胞的 ED<sub>50</sub> 是 1.4X10<sup>-9</sup>M, 对于 MCF-7 细胞是 4.3X10<sup>-9</sup>M, 对于 HL-60 细胞是 3.0X10<sup>-11</sup>M, 比 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 更有效大约

10-100 倍。

体内血清钙水平.因为高血钙是维生素 D<sub>3</sub> 化合物的主要毒性, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 的血钙效果可与 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 相比。所有的小鼠在研究的 3 星期时是存活的。接受 0.1 微克的 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 小鼠都是高血钙, 血清钙水平大约 12 毫克/dl(正常 8.5-10.5 毫克/dl)。相反, 接受 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub>(0.1-2.0 微克/小鼠)的小鼠和对照小鼠(8-9 毫克/dl)几乎具有相同的钙水平(8-10 毫克/dl)。

脉冲-照射实验.为了研究维生素 D<sub>3</sub> 类似物对克隆增殖的抑制作用是不是可逆的, 进行脉冲暴露实验。MCF-7 细胞接触 1,25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5,6-反-D<sub>3</sub> 或 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 不同时间, 充分冲洗, 制成软琼脂板, 在培养的第 14 天计数菌落数。分别接触 1,25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5,6-反-D<sub>3</sub> 和 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 4 天抑制克隆细胞的大约 40-30%。

细胞周期分析.测定 1,25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5,6-反-D<sub>3</sub> 和 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(10<sup>-7</sup>, 4 天)对 MCF-7 细胞的细胞周期的影响。细胞周期的 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期细胞数目显著增加(P≤0.05), S 期细胞比例伴随降低。

蛋白质印迹分析.已知为 p21<sup>waf1</sup> 和 p27<sup>kip1</sup> 的依赖细胞周期蛋白的激酶抑制剂能抑制细胞周期蛋白激酶的活性, 因此减缓细胞通过细胞周期的进程。如蛋白质印迹分析测定的, 对照 MCF-7 细胞组成型地具有中等水平的 p21<sup>waf1</sup> 和 p27<sup>kip1</sup> 的表达。接触 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub>(10<sup>-7</sup>M)一天将 p21<sup>waf1</sup> 和 p27<sup>kip1</sup> 的表达提高大约 3.2-3.5 倍, 而用 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(10<sup>-7</sup>M)培养则将 p21<sup>waf1</sup> 和 p27<sup>kip1</sup> 的表达提高大约 1.6-1.8 倍。MCF-7 细胞接触 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub>(10<sup>-7</sup>M)三天导致 p21<sup>waf1</sup> 和 p27<sup>kip1</sup> 的表达分别提高 2.8 倍和 3.4 倍, 而 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(10<sup>-7</sup>M, 3 天)则将 p21<sup>waf1</sup> 和 p27<sup>kip1</sup> 的表达分别提高 4.8 倍和 3.3 倍。

检测维生素 D<sub>3</sub> 化合物对 HL-60 细胞 p27<sup>kip1</sup> 表达的剂量依赖性影响。1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 和 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 两者都正调节 p27<sup>kip1</sup> 表达, 与 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub>(10<sup>-9</sup>M, 4 天)孵育之后, 表达水平大大提高。当 HL-60 细胞与 10<sup>-8</sup>-10<sup>-7</sup>M 的 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 培养时, p27<sup>kip1</sup> 的水平显著提高。

端粒酶活性.使用 TRAP 测定评价 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 和 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(10<sup>-9</sup>-10<sup>-7</sup>M 4 天)对端粒酶活性的影响。HL-60 细胞与 1,

25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub>10<sup>-9</sup>M 或 10<sup>-7</sup>M 的 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 培养, 端粒酶活性显著降低。

使用 RT-PCR 评价维生素 D<sub>3</sub> 化合物对 HL-60 细胞 hHERT 表达的影响。1,25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5,6-反-D<sub>3</sub> 和 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 以剂量依赖方式抑制 hHERT mRNA 的表达, 在 10<sup>-8</sup>M 的 1,25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 和 10<sup>-7</sup>M 的 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 时几乎完全抑制表达。

通过下面本领域公知的实验方法能证明式 I 的化合物作为治疗良性前列腺增生的药物的有用活性。

对阉割的睾丸素刺激的雄性 Syrian 仓鼠评价 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 抗雄性激素活性。研究证明 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 基本上抑制了这些动物的精囊腺和腹前列腺的雄性激素诱导的过度生长, 而 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 在无毒剂量(1 微克)时是没有活性的。

用 20 微克丙酸睾丸素和 1 微克 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 每天对阉割的雄性 Syrian 仓鼠皮下注射, 连续 14 天。这两种化合物分别在 0.2 毫升芝麻油载体中施用。在第 15 天进行尸体剖检。取出前列腺和精囊腺, 印迹并且称重。使用斯氏 t-检验对数据进行统计学意义分析并且表示为刺激反应抑制百分率。

表 I

20 阉割的睾丸素刺激的仓鼠的前列腺和精囊腺生长的抑制

组号	处理	腹前列腺 毫克 抑制	精囊腺 毫克±SEM 抑制
1	载体	12±1 ...	36±3 ...
2	睾丸素	43±5 ...	105±6 ...
3	睾丸素+ 1,25(OH) <sub>2</sub> -16-烯-5, 6-反-D <sub>3</sub> 0.1 微克	19±2 72%	71±1 48%

\*\*\*p<0.001

通过下面本领域公知的实验方法能证明式 I 的化合物作为用于治疗

骨质疏松症的药物的有用活性。

### 材料和方法

#### 动物和处理

使用三月龄成年雌性大鼠。对环境适应 1 周之后，对动物分组称重并且用几种浓度的 1,25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5,6-反-D<sub>3</sub> 以 1 毫升/千克/天管饲法口服处理。给药第 7 天，对动物采血并且测定血清钙水平。

#### 化合物制剂

将化合物溶解于 200 标准乙醇中产生 100 微克/毫升的浓度。对于最高剂量浓度制备芝麻油载体和乙醇化合物溶液，然后 37°C 下旋转蒸发去除乙醇。利用剂量分组平均体重计算剂量体积。将溶解于载体中的化合物系列稀释得到合适的剂量浓度。

#### 血清收集和检测

给药第 7 天，在乙醚麻醉下通过眼眶穿刺从每一只动物采取血液(1.5 毫升)。将血液收集到血清分离机试管中，以 2000rpm 离心 15 分钟，然后将血清分为等份用于钙测定。通过比色分析测定血清钙。

### 结果

#### 血清钙水平:

组号#	处理	剂量 微克/千克/天	血清钙 平均值(毫克/dL)	血清钙 SD
1	载体	0	9.65	0.25
6	化合物	0.5	10.64	0.51
7	化合物	1	10.06	0.47
8	化合物	1.5	9.92	0.39
9	化合物	2	9.77	0.46

血清钙水平在给药组正常范围内，用 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 处理至多 2 微克/千克/天。

### 材料和方法

#### 动物和处理

对三月龄成年雌性大鼠实施两侧卵巢切除术或假手术。对环境适应 1

周之后,对动物分组称重并且以 1 毫升/千克具体浓度管饲法口服处理。利用分组平均体重每周计算剂量体积。手术后 17 天开始给药并且持续 19 天。在第 20 天,通过吸入二氧化碳对动物实施安死术并且切除左股骨。

#### 总股骨骨钙:

- 5 尸体剖检时从所有组的动物切除左股骨并且剔除软组织。对骨进行测量并且在中骨干处切成两半;然后在去除骨髓之后将远侧部分纵向切为两半。将骨髓冲洗出来并且通过在 5%TCA 中浸泡提取钙。通过钙比色分析定量测定 TCA 提取液的钙含量。以毫克/远侧半股骨(DHF)±血清平均总骨钙表示数据。

#### 10 血清收集和测定

给药第 7 天和第 18 天,在乙醚麻醉下通过眼眶穿刺从每一只动物采取血液(1.5 毫升)。将血液收集到血清分离机试管中,以 2000rpm 离心 15 分钟,然后将血清分为等份用于钙测定。通过比色分析测定血清钙。

#### 统计学分析

- 15 为了证实卵巢切除术对骨钙的影响,使用斯氏检验比较假手术和 ovx 载体组。通过一次方差分析(ANOVA)比较 ovx 载体组,接着当总的效果统计学意义明显时通过 Fisher's LSD 比较各处理组和载体组。

### 结果

#### 调节股骨钙对体重的影响

处理	剂量 微克/千克	股骨 CA/100 克 BW		SEM	p-值对 Ovx
假手术/载体	0.000	14.44	±	0.31	0.0001
Ovx/载体	0.000	10.58	±	0.33	...
1, 25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	0.500	11.91	±	0.32	0.0026
1, 25(OH) <sub>2</sub> -16-烯-5, 6-反-D <sub>3</sub>	2.000	11.49	±	0.26	0.0368

## 对血清钙水平的影响

处理	剂量 微克/千克	血清钙 毫克/dl		SEM	p-值对 Ovx
假手术/载体	0.000	10.48	±	0.12	NS
Ovx/载体	0.000	10.41	±	0.15	...
1, 25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	0.500	11.74	±	0.19	0.0001
1, 25(OH) <sub>2</sub> -16-烯-5, 6-反-D <sub>3</sub>	2.000	9.98	±	0.09	NS

我们首先证明式 I 的化合物作为治疗皮脂腺疾病的药物的有用活性, 如本领域公知的下面的试验方法证明的。

- 5 将 200 微升 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 溶解于丙二醇, 管饲法对 Golden Syrian 仓鼠每天给药(每周 5 天)。在第 4 周杀死动物, 并且对耳朵进行处理, 用于组织学评价。通过成像分析在组织学制备的耳朵的横切片上测定皮脂腺面积。

## 结果

剂量(微克/天)	与对照变化百分比%
10	-50
1	-50
0.1	-23
0.01	-5

10

并且所有检测的都是来自一只耳朵的总脂质级分(通过有机溶剂提取后称重残留的脂质材料)。

## 结果

剂量(微克/天)	与对照变化百分比%
10	-56
1	-37
0.1	-25
0.01	-26

式 I 的化合物可以对需要这样治疗的人口服给药, 用于治疗乳腺癌, 前列腺癌或白血病。更具体地说, 式 I 的化合物可以以大约 1-20 微克/天的范围的剂量对成年人口服给药用于这样的治疗。

式 I 的化合物可以对需要这样治疗的人口服给药, 用于治疗良性前列腺增生和秃发。更具体地说, 式 I 的化合物可以以大约 1-20 微克/天的范围的剂量对成人口服给药用于这样的治疗。

可以以大约 1-20 微克/天的剂量对人口服施用式 I 的化合物用于治疗骨质疏松症。

式 I 的化合物可以对需要这样治疗的人局部给药, 用于治疗秃发。更具体地说, 式 I 的化合物可以以大约 5 至大约 50 微克/克局部用制剂/天范围内的剂量局部给药用于这样的治疗。

可以以大约 1-20 微克/天的剂量对人口服施用式 I 的化合物用于治疗皮脂腺疾病。

含有本发明式 I 的化合物的口服剂量形式可以和药学可接受的载体材料一起掺入在胶囊, 片剂等中。

下面详细说明可以掺入到胶囊等中的药学可接受的载体材料: 粘合剂, 例如黄耆胶, 金合欢, 玉米淀粉, 或明胶; 赋形剂, 例如磷酸二钙; 崩解剂, 例如玉米淀粉, 马铃薯淀粉, 藻酸(alginate)等等; 润滑剂, 例如硬脂酸镁, 甜味剂, 例如蔗糖, 乳糖或糖精; 矫味剂, 例如薄荷, 冬青树油或樱桃木油。可以有各种其它材料作为包衣或者另外改变单位剂量的物理形态。例如, 可以用紫胶, 糖, 或者两者对片剂包衣。糖浆或酏剂可以含有活性化合物, 作为甜味剂的蔗糖, 作为保鲜剂的对羟基苯甲酸甲酯和丙酯, 染料, 和矫味剂, 例如樱桃味或橘子味。

含有本发明的式 I 的化合物的局部给药剂量形式包括: 具有油脂性, 可吸收的, 水溶性和乳状液基质的软膏剂和乳膏剂, 例如凡士林, 含水羊毛脂, 聚乙二醇等等。

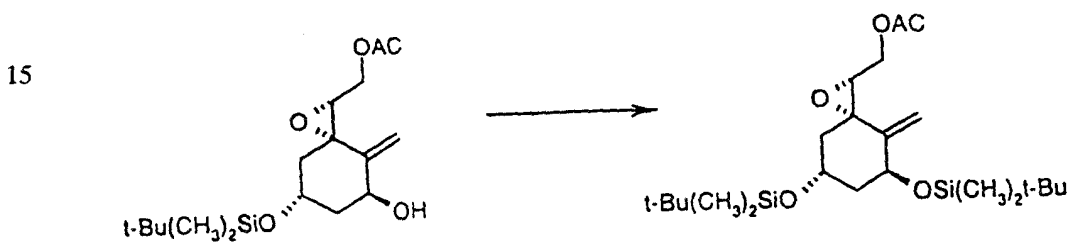
洗剂是液体制剂并且有含有研细的物质的单一溶液或含水制剂或水醇(hydroalcoholic)制剂不同形式。洗剂可以含有悬浮剂或分散剂, 例如纤维素衍生物, 例如乙基纤维素, 甲基纤维素等等; 明胶或树胶, 其在水, 醇, 甘油等等载体中掺入活性成分。

凝胶是通过将活性成分的溶液或悬浮液在载体载体中制成凝胶而制备的半固体制剂。使用凝胶剂，例如羧基聚亚甲基将可以是含水或无水的载体凝胶化，并且使用碱，例如氢氧化钠和胺，例如聚乙烯可可胺 (polyethylenecocoamine)中和至适当的凝胶稠度。

5 这里使用的术语“局部”指使用掺入到合适的药物载体中的活性成分，并且在炎症部位施用以发挥局部作用。因此，局部用组合物包括其中通过直接接触皮肤外部施用化合物的那些药物形式。局部剂量形式包括凝胶剂，乳膏剂，洗剂，软膏剂，粉末剂，气雾剂和通过将式 I 的化合物与已知的药物局部载体材料混合获得的其它常规的对皮肤施药的形式。

10 提供下面的实施例进一步描述本发明，但是不管在哪方面都不是对本发明的限制。

### 实施例 1



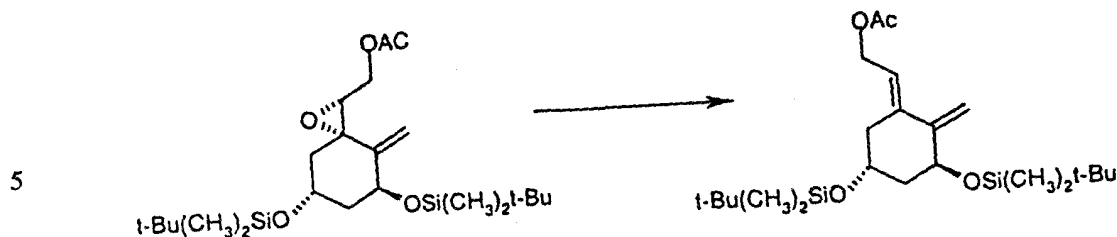
20 (2R, 3S, 5S, 7S)-2-[5, 7-二[1, 1-二甲基乙基]二甲基甲硅烷基]氧基]-4-亚甲基-1-氧杂螺[2, 5]辛烷-2-甲醇乙酸酯

氩气下向磁子搅拌的 50 毫升二甲基甲酰胺中的 18.5 克(0.0523 摩尔)的(2R, 3S, 5S, 7S)-5-羟基-4-亚甲基-7-[(1, 1-二甲基乙基)二甲基甲硅烷基氧基]-1-氧杂螺[2, 5]辛烷-2-甲醇乙酸酯(Y.Kiegiel, P.M.Wovkulich 和 M.R.Uskokovic, 四面体快报(Tetrahedron Letters)32, p.6057-6060(1991))和

25 6.8 克(0.099 摩尔)的咪唑的溶液加入 9.8 克(0.065 摩尔)的叔丁基二甲基甲硅烷基氯。将该反应混合物搅拌 5 小时，用 5 毫升水中止反应，搅拌 30 分钟并且倒入 400 毫升水中。然后用 2 X 500 毫升己烷和 2 X 500 毫升乙醚萃取。合并有机层，用 300 毫升水洗涤，用硫酸钠干燥并蒸发。在硅胶柱上层析分离，得到 22.31 克(92%)的标题化合物，为无色油状物。

30

### 实施例 2

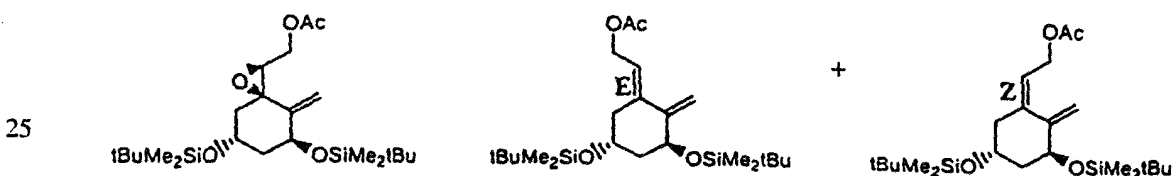


[3S-(1E, 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-2-[3, 5-二(二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]-2-亚甲基-环己基亚基]乙醇乙酸酯

向安装有氩气导管, 机械搅拌器和温度计的 3 升 3 颈瓶中加入 500 毫升四氢呋喃并且在干冰丙酮浴中冷却到 $-60^{\circ}\text{C}$ 。在保持温度低于 $-60^{\circ}\text{C}$ 的同时分批加入 43.23 克(0.108 摩尔)无水六氯化钨, 然后保持温度低于 $-45^{\circ}\text{C}$ 下快速滴加己烷中的 1.6M 正丁基锂 200 毫升(大约 5 分钟)。用冰水浴代替干冰丙酮浴使温度达到  $5^{\circ}\text{C}$ 。颜色从蓝色变为土黄色至亮红黑色。 $5^{\circ}\text{C}$ 下 30 分钟之后, 经 30 分钟快速滴加 50 毫升己烷中 22.31 克(0.04884 摩尔)(2R, 3S, 5S, 7S)-2-[5, 7-二[(1, 1-二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]-4-亚甲基-1-氧杂螺[2, 5]辛烷-2-甲醇乙酸酯。4 小时之后, 用 2 升己烷稀释反应混合物, 通过硅胶滤饼过滤, 用 3 X 500 毫升己烷-乙酸乙酯 9:1 洗涤, 并蒸发。残余物在 75 克硅胶柱上层析分离, 得到 22.56 克粗产物。通过中压硅胶柱进行层析, 用 100:1 二氯甲烷-乙酸乙酯混合物洗脱, 得到 17.42(80.1%)标题化合物和少量的相应的 1Z 差向异构体。

20

### 实施例 3



[3S-(1E, 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-2-[3, 5-二(二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]-2-亚甲基-环己基亚基]乙醇乙酸酯(E-差向异构体) 和

[3S-(1E, 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-2-[3, 5-二(二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]-2-亚甲基-环己基亚基]乙醇乙酸酯(Z-差向异构体)

30

-78°C 搅拌下向 465 毫升无水 THF 中加入 64.3 克(160 毫摩尔)  $\text{WCl}_6$ (蓝色溶液), 接着加入 337.5 毫升 1.43M 正丁基锂己烷溶液(以内部温度不超过-20°C 的速度)。使混合物温热至室温。滴加 65 毫升 THF 中 24.5 克(53.6 毫摩尔) (2S, 3R, 5S, 7S)-2-[5, 7-二[(1, 1-二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]-4-亚甲基-1-氧杂螺[2, 5]辛烷-2-甲醇乙酸酯溶液, 并且将混合物搅拌 4 小时。用 600 毫升戊烷稀释混合物, 并且通过 4 厘米硅胶床过滤, 用己烷/EtOAc(19:1)洗涤, 减压下蒸发挥发物之后得到 27 克粗二烯混合物。通过层析进一步纯化, 用己烷/EtOAc(25:1)洗脱, 得到 21.6 克(91%) 2:3 Z/E 二烯混合物(标题化合物), 通过硅胶层析将其分离(己烷/EtOAc40:1)。

10

Z- 二烯  $^1\text{H NMR } \delta$  0.052 (s, 6H), 0.06 (s, 6H) 0.87 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 1.74-1.90 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 2.20 (dd, J = 6.0, 12.8 Hz, 1H), 2.41 (d, J = 11.1 Hz, 1H) 4.19 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.61 (dd, J = 7.3, 12.1 Hz, 1H), 4.68 (dd, J = 7.3, 12.1 Hz, 1H), 4.80 (s, 1H), 5.20 (s, 1H), 5.47 (t, J = 7.2 Hz, 1H).  $[\alpha]_D^{25} = +1.2^\circ$  (c = 0.4, EtOH). 分析计算值:  $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{Si}_2$ : C, 62.27; H, 10.01; 实测值: C, 62.55, H, 10.33.

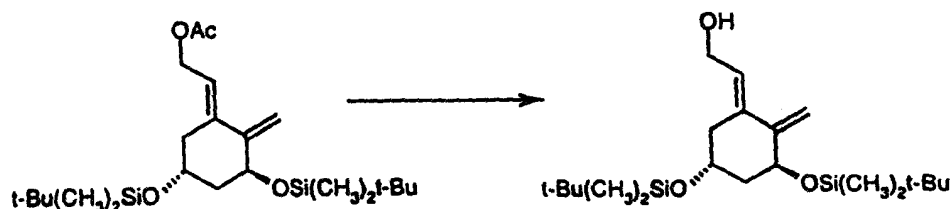
15

E- 二烯  $^1\text{H NMR } \delta$  0.046 (s, 3H), 0.057 (s, 3H), 0.065 (s, 6H), 0.88 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 1.77 (ddd, J = 3.1, 9.4, 11.9 Hz, 1H), 1.89 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.31 (dd, J = 2.0, 15.2 Hz, 1H), 2.39 (dd, J = 6.3, 15.2 Hz, 1H), 4.21 (br s, 1H), 4.50 (m, 1H), 4.58 (dd, J = 7.2, 12.9 Hz, 1H), 4.65 (dd, J = 7.2, 12.9 Hz, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.99 (s, 1H), 5.69 (t, J = 7.2 Hz, 1H).  $[\alpha]_D^{25} = +8.0^\circ$  (c = 0.5, EtOH). 分析计算值:  $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{Si}_2$ : C, 62.67; H, 10.06; 实测值: C, 62.42, H, 10.01.

20

#### 实施例 4

25

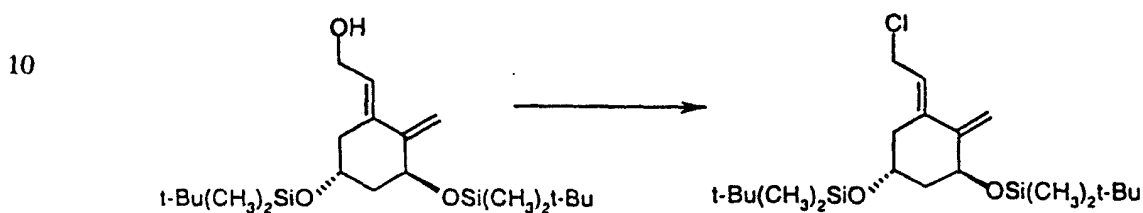


30

[3S-(1E, 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-2-[3, 5-二(二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]-2-亚甲基-环己基亚基]乙醇

氩气下向磁子搅拌的 100 毫升甲醇中的 10.84 克(0.0246 摩尔)的[3S-(1E, 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-2-[3, 5-二(二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]-2-亚甲基-环己基亚基]乙醇乙酯的溶液加入 3.5 克氢氧化钠颗粒, 并且将该反应混合物在氩气下搅拌 3 小时。减压蒸发得到 50 毫升体积, 用 500 毫升水稀释, 用  
5 2X500 毫升己烷-乙醚 1:1 萃取。有机层用水洗涤, 用硫酸钠干燥并蒸发。得到 9.80 克(100%)的标题化合物, 为白色固体。

### 实施例 5

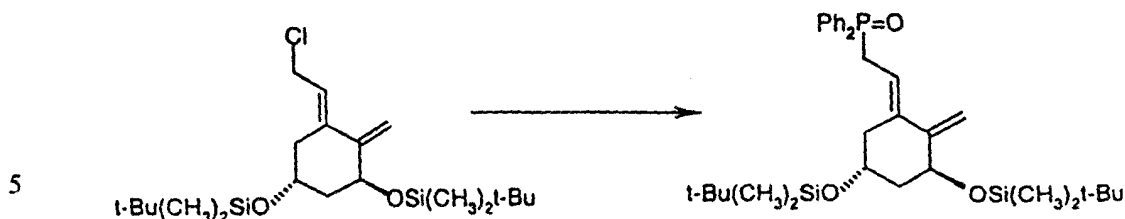


15 1R-(1 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 5E)-[[-2-氯代亚乙基)-4-亚甲基-1, 3-环己烷二基]二(氧)二(1, 1-二甲基乙基)二甲基硅烷

氩气下, 经 2 分钟向在冰-丙酮浴中冷却至 2°C 的搅拌的 150 毫升二氯甲烷中 6.67 克(0.050 摩尔)的 N-氯代琥珀酰亚胺溶液滴加 4 毫升(0.055 摩尔)的二甲硫。形成白色沉淀。0°C 下 30 分钟之后, 用干冰-丙酮浴代替冰-丙酮浴, 并且将反应混合物温度调节到 -20°C。加入 60 毫升二氯甲烷  
20 中 9.8 克(0.0246 摩尔)的[3S-(1E, 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-2-[3, 5-二[[[(1, 1-二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]-2-亚甲基-环己基亚基]乙醇溶液。15 分钟之后, 移去冷却浴, 将反应混合物搅拌 50 分钟, 然后转移到含有 500 毫升水的分液漏斗中。用 2 X 350 毫升己烷萃取。有机层用 500 毫升水洗涤, 用硫酸钠干燥并且蒸发, 得到 10.49 克粗产物, 为黄色液体。通过急骤层析法纯化,  
25 得到纯的标题化合物, 为无色油状物。

NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.03 (s, 3H), 0.05 (s, 3H), 0.07 (s, 6H), 0.87 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 1.70 – 1.94 (m, 2H), 2.34 (m, 2H), 4.13 (m, 2H), 4.28 (m, 1H), 4.53 (m, 1H), 5.00 (m, 1H), 5.03 (m, 1H), 5.78 (tm,  $J = 8$  Hz, 1H).

### 实施例 6



[3S-(1E, 3β, 5α)-2-[3, 5-二[[二甲基乙基]二甲基甲硅烷基]氧基]-2-亚甲基-环己基亚基]乙基]二苯基磷氧化物

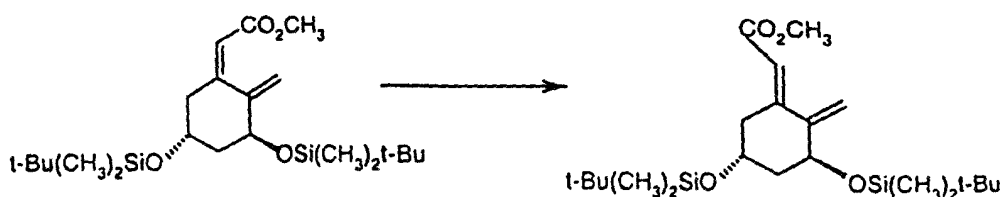
向安装有氩气导管, 温度计和机械搅拌器的 1 升 3 口烧瓶中加入 100  
 10 毫升新蒸馏的无水四氢呋喃中 10.26 克(0.0246 摩尔)的 1R-(1α, 3β, 5E)-[[2-氯代亚乙基]-4-亚甲基-1, 3-环己烷二基]二(氧)二(1, 1-二甲基乙基)二甲基硅烷溶液, 并且在干冰-丙酮浴中冷却至-65℃。在 30 分钟内加入 0.5M 二苯基磷化钾的四氢呋喃溶液, 直到保持红色需要 60 毫升。-65℃ 下搅拌 1 小时之后, 加入 10 毫升水并且移去冷却浴。将反应脱色。然后  
 15 快速加入 200 毫升二氯甲烷, 接着加入 200 毫升含有 10 毫升 30%过氧化氢的水溶液。1 小时之后, 加入 13.5 克亚硫酸钠, 100 毫升溴和 200 毫升二氯甲烷。充分振荡之后, 分离各相, 水相用 200 毫升二氯甲烷洗涤。有机相用 200 毫升溴洗涤。合并的有机层用硫酸钠干燥, 过滤并蒸发, 得到  
 20 16.33 克粗产物。该粗产物通过中压(硅胶 G-60)层析纯化, 得到 12.54 克 (87%)的标题化合物, 为白色结晶。

NMR

(CDCl<sub>3</sub>): δ 0.02 (s, 3H), 0.07 (s, 6H), 0.08 (s, 3H), 0.84 (s, 18H), 1.76 (m, 2H), 2.98-3.15 (m, 2H), 4.06 (m, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.53 (m, 1H), 4.72 (m, 1H), 4.79 (m, 1H), 7.45 (m, 6H), 7.72 (m, 4H).

25

### 实施例 7



30

E-(3S, 5R)-[3, 5-二-(叔丁基-二甲基-甲硅烷基氧基)-2-亚甲基环己基亚基]乙酸甲酯(Ro 65-8821)

用 UV 灯照射 100 毫升己烷中 4.45 克(0.01043 摩尔)的 Z-(3S, 5R)-[3, 5-二-(叔丁基-二甲基-甲硅烷基氧基)-2-亚甲基环己基亚基]乙酸甲酯(X)

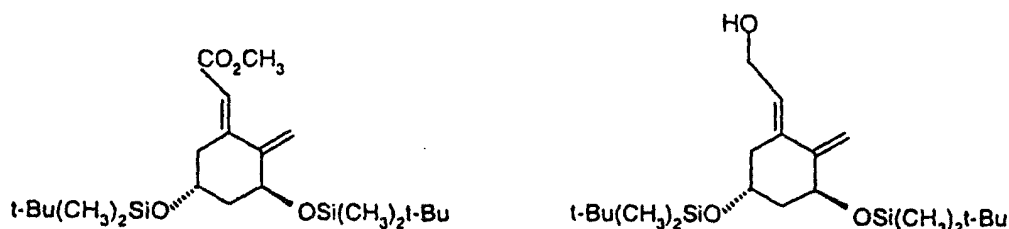
5 (A.Mowrino 等, 四面体快报) (Tetrahedron Letters) 38, p. 4713 - 4716 (1997) 的溶液 3 小时。蒸发, 得到 4.25 克 (95.5%) 标题化合物, 为无色油状物。

NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.06 (s, 3H), 0.07 (s, 9H), 0.85 (s, 9H), 0.89 (s, 9H), 1.76

(m, 1H), 1.84 (m, 1H), 2.70 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 4.26 (m, 1H), 4.58 (m, 1H), 5.07 (m, 2H), 5.91 (brs, 1H).

10

### 实施例 8



15

[3S-(1E, 3β, 5α)-2-[3, 5-二-[(1, 1-二甲基乙基)二甲基-甲硅烷基]氧基]-2-亚甲基-环己基亚基]乙醇

-78°C 下, 向 100 毫升甲苯中 4.25 克(0.00996 摩尔)的 E-(3S, 5R)-[3, 5-二-(叔丁基-二甲基-甲硅烷基氧基)-2-亚甲基环己基亚基]乙酸甲酯的溶液

20 滴加 25 毫升 1.2M 二异丁基铝氢化物(0.03 摩尔)并且将反应混合物搅拌 1 小时。加入 5 毫升甲醇之后, 使反应混合物温热至室温。然后用 150 毫升 2M 钾-钠酒石酸盐水溶液稀释并且剧烈搅拌。分离有机相, 用硫酸钠干燥并且蒸发至干。通过急骤层析法纯化粗产物, 用己烷-乙酸乙酯 8:2 洗脱, 得到 2.8 克(70%)标题化合物, 为无色蜡状固体。NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.05 (s,

25 3H), 0.07 (s, 9H), 0.88 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 1.74 (m, 1H), 2.06 (m, 1H), 2.26 (dm, J = 13.6 Hz, 1H), 2.40(dd, J = 13.6, 5.2, 1H), 4.30 - 4.11 (m, 3H), 4.53 (m, 1H), 4.98 (m, 1H), 5.00 (m, 1H), 5.80 (tm, J=7Hz, 1H).

30 1, 25-二羟基-16 烯-5, 6-反-维生素 D<sub>3</sub>

### 实施例 9

-78°C下, 氩气下滴加 1.6M 正丁基锂己烷溶液 0.83 毫升(0.00133 摩尔)处理 10 毫升无水四氢呋喃中的 796 毫克(0.00137 摩尔) [3S-(1E, 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-2-[3, 5-二[[[(1, 1-二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]-2-亚甲基-环己基亚基]乙基]二苯基膦氧化物。氩气下经 10 分钟向这样获得的红色溶液滴加 5 毫升四氢呋喃中 280 毫克(0.000803 摩尔)[3aR-[1(R'), 3a $\alpha$ , 7a $\beta$ ]]-1-[1, 5-二甲基-5-[(三甲基甲硅烷基)氧基]己基]-3, 3a, 5, 6, 7, 7a-六氢-7a-甲基-4H-二氢茛-4-酮溶液。该反应混合物在 78°C下搅拌 90 分钟, 然后通过加入 40 毫升 1: 1 的 2N Rochelle 盐和 2N KHCO<sub>3</sub> 中止反应, 使温热至室温。用 3X100 毫升乙酸乙酯萃取。用 3X 水/盐水洗涤有机层, 硫酸钠干燥并且蒸发至干。通过在 40 毫米 X6" 硅胶柱上急骤层析法纯化粗产物, 用己烷-乙酸乙酯 40: 1 洗脱, 得到 278 毫克三甲硅烷基化标题化合物和 140 毫克起始酮。

氩气下用 1.9 克(1.9 毫摩尔)1M 四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液处理 8 毫升无水四氢呋喃中 278 毫克(0.000389 摩尔)的该三甲硅烷基化中间体的溶液 17 小时。用 6 毫升水中止反应并且搅拌 30 分钟。真空蒸发四氢呋喃之后, 用 3X100 毫升乙酸乙酯萃取残余溶液。有机层用 4X 水/盐水洗涤层, 硫酸钠干燥并且蒸发至干。通过在硅胶柱上急骤层析法纯化, 用 1% 三乙胺:乙酸乙酯溶液(300 毫升)预洗涤; 用乙酸乙酯进行洗脱。得到 152 毫克结晶标题化合物。从四氢呋喃:甲酸甲酯(0.3:7)中重结晶的样品具有 95 °C-100°C 的熔点。[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>+160.5 度(EtOH, c=0.20)。 $\lambda$ <sub>最大</sub> 272/3nm(  $\epsilon$  20600)。

### 实施例 10

#### 软明胶胶囊制剂 I

编号	成分	毫克/胶囊
1	1, 25(OH) <sub>2</sub> -16-烯-5, 6-反-D <sub>3</sub>	0.001-0.02
2	丁基化羟基甲苯(BHT)	0.016
3	丁基化羟基茴香醚(BHA)	0.016
4	Miglyol 812 加至	160.0

制备方法:

1. 将 BHT 和 BHA 悬浮于 Miglyol 812。温热至大约 50°C，并且搅拌直到溶解。
  2. 50°C 下将 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 溶解于步骤 1 的溶液中。
  - 5 3. 将步骤 2 的溶液冷却到室温。
  4. 将步骤 3 的溶液装入软明胶胶囊。
- 注意：所有的制备步骤在氮气下避光进行。

实施例 11

## 软明胶胶囊制剂 I

10

编号	成分	毫克/胶囊
1	1, 25(OH) <sub>2</sub> -16-烯-5, 6-反-D <sub>3</sub>	0.001-0.02
2	二-α-维生素 E	0.016
3	Miglyol812 加至	160.0

制备方法:

1. 将二-α-维生素 E 悬浮于 Miglyol 812 中。温热至大约 50°C，并且搅拌直到溶解。
  2. 50°C 下将 1, 25(OH)<sub>2</sub>-16-烯-5, 6-反-D<sub>3</sub> 溶解于步骤 1 的溶液中。
  - 15 3. 将步骤 2 的溶液冷却到室温。
  4. 将步骤 3 的溶液装入软明胶胶囊。
- 注意：所有的制备步骤在氮气下避光进行。

## 序列表

<110> 霍夫曼-拉罗奇有限公司

<120> 维生素D3类似物

<130> 20472

<140>

<141>

<150> U.S 60/143413

<151> 1999-07-12

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列的描述: hTERT的引物(反义)

<400> 1

cggaagagtg tctggagcaa

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列的描述: hTERT的引物(反义)

<400> 2

ggatgaagcg gagtctgga

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列的描述: GAPDH的引物(有义)

<400> 3

ccatggagaa ggctgggg

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列的描述: GAPDH的引物(反义)

<400> 4

caaagttgtc atggatgacc