



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 31 478 T2** 2004.11.25

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 831 838 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 31 478.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/09222**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 921 322.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/40154**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.06.1996**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **19.12.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.04.1998**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **04.02.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.11.2004**

(51) Int Cl.7: **A61K 31/59**
A61P 35/00

(30) Unionspriorität:
484342 **07.06.1995** **US**

(73) Patentinhaber:
Bone Care International Inc., Madison, Wis., US

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**KNUTSON, C., Joyce, Madison, US; BISHOP, W.,
Charles, Madison, US**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON VITAMIN D4-DERIVATEN ZUR BEHANDLUNG VON HAUTERKRANKUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von 1α -Hydroxyvitamin- D_4 -Verbindungen bei der Herstellung von Medikamenten für die Behandlung von gewissen Hauterkrankungen, einschließlich Hautkrebs beim Menschen.

[0002] Vitamin D ist bekannterweise wichtig für die Regulierung des Calciummetabolismus bei Tieren und Menschen (siehe E. Braunwald et al., Hrsg., Harrison's Principals of Internal Medicine: Part Eleven, „Disorders of Bone and Mineral Metabolism, Chapter 335“, 1860–1865, McGraw-Hill, New York (1987)). Die zweit bekanntesten nützlichen Formen von Vitamin D sind Vitamin D_3 und Vitamin D_2 . Vitamin D_3 wird in der Haut von Tieren und Menschen endogen synthetisiert, während Vitamin D_2 die von Pflanzen bereitgestellte Form von Vitamin D ist. Vitamin D_2 unterscheidet sich von Vitamin D_3 darin, dass es eine Doppelbindung zwischen C22 und C23 aufweist und zudem eine C24-Methylgruppe enthält. Bei Menschen und Ratten besitzen Vitamin D_3 und Vitamin D_2 dieselbe Biopotenz.

[0003] Vitamin D_4 , auch bekannt als bestrahltes 22,23-Dihydroergosterol oder 22,23-Dihydrovitamin D_2 oder 22,23-Dihydroergocalciferol, unterscheidet sich von Vitamin D_3 darin, dass es eine C24-Methylgruppe enthält. Vitamin D_4 wurde 1936 zum ersten Mal beschrieben (siehe W. Grab, Z. Physiol. Chem. 243, 63 (1936); F. G. McDonald, J. Biol. Chem. 114, IVX (1936); siehe auch A. Windaus und G. Trautmann, Z. Physiol. Chem. 247, 185–188 (1937)). Diese Literaturhinweise berichten eine gewisse Uneinigkeit hinsichtlich des Ausmaßes an biologischer Aktivität des Vitamins, wobei nahe gelegt wird, dass Vitamin D_4 bei Ratten 1/3- bis 3/4-mal so aktiv ist wie Vitamin D_3 und bei Hühnern entweder 1/10- oder 1/5-mal so aktiv ist wie Vitamin D_3 .

[0004] Eine genauere Untersuchung der biologischen Aktivität von Vitamin D_4 wurde von DeLuca et al. 1968 durchgeführt (DeLuca et al., Arch. Biochem. Biophys. 124, 122–128 (1968)). Die Autoren bestätigten, dass Vitamin D_4 weniger aktiv war als Vitamin D_3 . DeLuca et al. berichten, dass Vitamin D_4 bei ihren Versuchen 2/3 der Aktivität von Vitamin D_3 oder Vitamin D_2 bei Ratten und 1/5 der Aktivität von Vitamin D_3 bei Hühnern aufwies.

[0005] Da DeLuca et al. die aktive Form von Vitamin D_3 , 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 (US-A-3.697.559), und deren synthetische Vorstufe, 1α -Hydroxyvitamin D_3 (US-A-3.741.996), entdeckten, hat sich das Interesse größtenteils auf die Entwicklung therapeutischer Anwendungen dieser aktiven Vitamin- D_3 -Metaboliten konzentriert. Obwohl die Vitamin- D_3 -Metaboliten als therapeutische Wirkstoffe Großes versprochen, konnten sie diese Erwartungen aufgrund ihrer enormen Toxizität unglücklicherweise niemals vollständig erfüllen. Die Toxizität schränkt beispielsweise die Wirksamkeit von Vitamin D_3 , dessen aktiver Formen und Analoga ein, um Knochenverlust zu verhindern oder verlorene Knochenmasse wiederherzustellen. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass bei Dosen, die notwendig sind, damit diese Wirkstoffe bei der Verhinderung oder Wiederherstellung von Knochenverlust wirksam sind, die Probleme der Hyperkalzämie und Hyperkalziurie auftreten. Es wurde berichtet, dass 1α -Hydroxyvitamin D_3 in einer täglichen Dosis von 2 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ (was sich in einigen Studien als wirksam bei der Verhinderung von Knochenverlust erwiesen hat) bei etwa 67% der Patienten zu Toxizität führt. Benötigt wird ein biopotenter Vitamin-D-Metabolit von geringer Toxizität, so dass das Medikament als therapeutischer Wirkstoff verwendet werden kann.

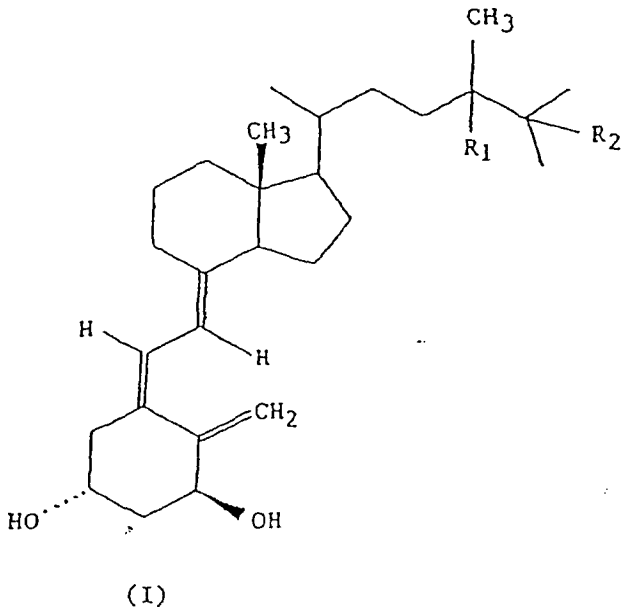
[0006] 1α -Hydroxyvitamin D_4 , 1,25-Dihydroxyvitamin D_4 und 1,24-Dihydroxyvitamin D_4 sind bioaktive Formen von Vitamin D. Die Erfinder haben entdeckt, dass diese aktiven Formen von Vitamin D_4 eine wesentlich größere Biopotenz aufweisen als auf Basis der vorhergehend erwähnten Bioassays von Vitamin D_4 vorhergesagt worden ist. Die Erfinder haben zudem herausgefunden, dass die bioaktiven neuartigen Verbindungen weniger toxisch sind als auf Basis ihrer Biopotenz vorhergesagt wurde. Diese Kombination aus hoher Aktivität und geringer Toxizität macht die Verbindungen der Erfindung als therapeutische Wirkstoffe bei der Behandlung von Störungen des Calciumstoffwechsels nützlich.

[0007] 1α -Hydroxyvitamin D_4 kann synthetisch hergestellt werden. 1,25-Dihydroxyvitamin D_4 und 1,24-Dihydroxyvitamin D_4 sind als biologische Produkte des Stoffwechsels von 1α -Hydroxyvitamin D_4 isoliert.

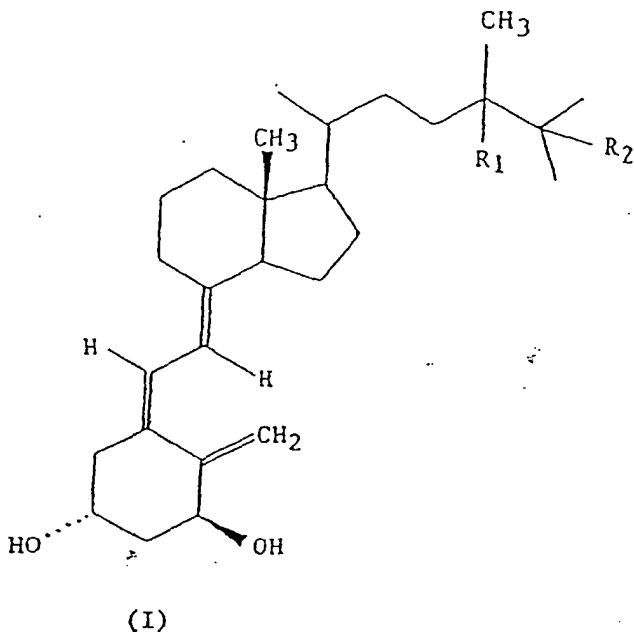
[0008] Die WO 92105130 offenbart Verfahren für die Synthese von 1α -Hydroxyvitamin- D_4 -Verbindungen und legt nahe, dass deren Verbindungen für die Behandlung von hyperproliferativen Hauterkrankungen wie Psoriasis nützlich sein könnten.

[0009] Die EP-A-0562497 beschreibt die Synthese von 1α -Hydroxyvitamin D_4 und legt nahe, dass dieses bei der Behandlung von Osteoporose und Psoriasis verwendet werden könnte.

[0010] Gemäß einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung einer Verbindung der Formel (I) bereitgestellt:



worin R_1 entweder H oder OH ist und R_2 entweder H oder OH ist, oder eines Salzes, eines Hydrats oder eines Solvats davon, bei der Herstellung eines Medikaments zum Hemmen der hyperproliferativen Aktivität von menschlichen Hautkrebszellen. In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird die Verwendung einer Verbindung der Formel (I) bereitgestellt:



worin R_1 entweder H oder OH ist und R_2 entweder H oder OH ist, oder eines Salzes, eines Hydrats oder eines Solvats davon, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Menschen, um die Zellvermehrungswirkungen von Hautkrebs, Ekzemen, Hautnässen oder Talgausscheidung beim Menschen zu vermindern.

[0011] Die vorliegende Erfindung wird im Nachstehenden in Verbindung mit den begleitenden Abbildungen beschrieben, worin gleiche Beschriftungen auf übereinstimmende Elemente verweisen und worin:

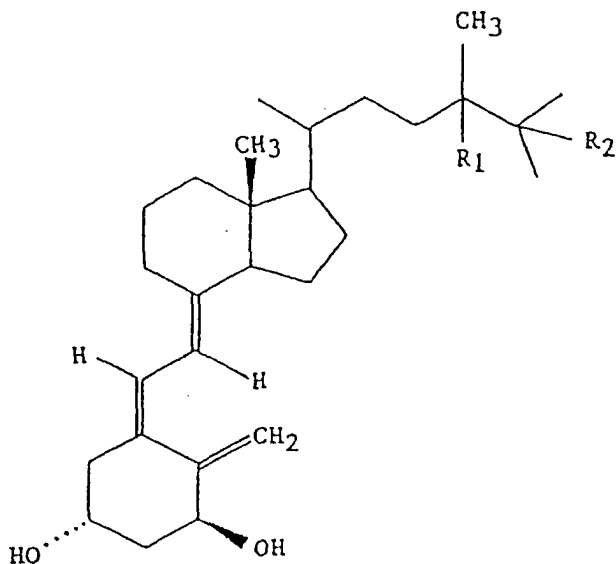
[0012] Fig. 1 präparative Schritte für die Synthese von Vitamin D_4 veranschaulicht; und

[0013] Fig. 2 präparative Schritte für die Synthese von 1α -Hydroxyvitamin D_4 beginnend mit Vitamin D_4 ver-

anschaulicht.

[0014] Die hierin verwendeten Begriffe „biologische Aktivität“ oder „biologisch aktiv“ beziehen sich auf biochemische Eigenschaften von Verbindungen wie das Beeinflussen des Stoffwechsels, z. B. der Serum-Calcium-Konzentration, oder das Binden an ein geeignetes Rezeptorprotein, z. B. an Vitamin-D-Rezeptorprotein.

[0015] Verbindungen, die im ersten und im zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung verwendet werden, weisen folgende allgemeine Formel (I) auf:



(I)

worin R₁ entweder H oder OH ist und R₂ entweder H oder OH ist, oder Salze, Hydrate oder Solvate davon. Bevorzugte Verbindungen unter denen der Formel (I) sind die, bei denen R₁ und R₂ H; R₁ = OH und R₂ = H; und R₁ = H und R₂ = OH ist.

[0016] Die Synthese von 1 α -Hydroxyvitamin D₄, d. h. Verbindungen der Formel (I), worin R₁ und R₂ H sind, wird gemäß dem in den Fig. 1 und 2 dargestellten Schema erreicht. Wie in Fig. 1 ersichtlich ist, wird bei der Synthese Ergosterol als Ausgangsmaterial verwendet. Ergosterol wird einer Seitenkettensättigung durch ein sechsstufiges Verfahren unterzogen, um unter Verwendung eines Verfahrens ähnlich dem von Barton et al. (in JCS Perkin 1, 821–826 (1976)) 22,23-Dihydroergosterol (VIII) zu erhalten. Das 22,23-Dihydroergosterol wird dann wie bei Windau et al. (in Z. Physiol. Chem. 147, 185 (1937)) beschrieben bestrahlt, um Vitamin D₄ [22,23-Dihydroergocalciferol] (IX) zu erhalten. Wie in Fig. 2 ersichtlich ist, wird Vitamin D₄ anschließend in einem vierstufigen Verfahren hydroxyliert, um unter Verwendung eines ähnlichen Verfahrens wie von Paaren et al. (in J. Org. Chem. 45, 3253 (1980)) beschrieben 1 α -Hydroxyvitamin D₄ zu erhalten.

[0017] Im Speziellen wird Ergosterol acetyliert, um 3 β -Acetat zu bilden. Dieses Ergosterolacetat wird an der 5,6-Doppelbindung einer Hydroxyhalogenierung unterzogen, um ein 6 α -Chlor-5 α -hydroxyderivat zu bilden. Diese Chlorhydrin wird reduziert und zu einem 5 α -Hydroxy- (d. h. 5 α -ol-) Derivat reacetyliert. Das 5 α -ol wird einer Hydrierung unterzogen, um die Seitenkette zu sättigen. Das resultierende 3 β -Acetoxyergost-7-en-5 α -ol wird zu 22,23-Dehydroergosterolacetat reduziert, um 22,23-Dehydroergosterol zu erhalten. Das 22,23-Dehydroergosterol wird dann bestrahlt, um Vitamin D₄ zu bilden. Vitamin D₄ wird dann tosyliert, um 3 β -Tosylvitamin D₄ zu erhalten. Das Tosylat wird durch Solvolyse verdrängt, um das 6-Methoxy-3,5-cyclovitamin D₄ zu erhalten. Das Cyclovitamin D₄ wird einer Allyl-Oxidation unterzogen, um das 1 α -Hydroxycyclovitamin-Derivat zu bilden. Das 1 α -Hydroxycyclovitamin-Derivat wird folgerichtig solvolysiert und einer Diels-Alder-Reaktion unterzogen, die die 5-Methoxy-Gruppe entfernt und das 1 α -Hydroxyvitamin D₄ (5,6-cis) vom 5,6-trans-1 α -Hydroxyvitamin D₄ zu trennen.

[0018] Das 1,24-Dihydroxyvitamin-D₄- und 1,25-Dihydroxyvitamin-D₄-Metaboliten von 1 α -Hydroxyvitamin D₄ werden durch Inkubation der 1 α -Hydroxy-Derivate mit menschlichen Leberzellen, Kultivieren dieser Zellen und Gewinnen des 1,24-Dihydroxyvitamins D₄ oder des 1,25-Dihydroxyvitamins D₄ synthetisiert. Durch Verwendung von Vitamin-D-Rezeptorprotein-Bindungstests werden diese Metaboliten als biologisch aktiv bestimmt.

[0019] Es hat sich erwiesen, dass die Verbindungen der Formel (I) eine wichtige pharmakologische Aktivität aufweisen, und zwar regulieren sie die Wirkstoffe für den Calcium-Stoffwechsel, insbesondere die Serum-Calcium-Konzentrationen. Die Verbindungen der Formel (I) erhöhen spezifisch Serum-Calcium-Konzentrationen bei Ratten mit Vitamin-D-Mangel. Es hat sich zudem herausgestellt, dass die Verbindungen der Formel (I) eine geringe Toxizität aufweisen, was ihre pharmazeutischen Eigenschaften stärkt. Verbindungen der Formel (I) besitzen eine Toxizität, wie durch den LD₅₀-Test ermittelt worden ist, die der entsprechender Vitamin-D₂-Verbindungen ähnlich ist und niedriger als die entsprechender Vitamin-D₃-Verbindungen ist. Die Verbindungen der Erfindung können in verschiedenen klinischen und veterinärmedizinischen Gebieten verwendet werden und eignen sich besonders für die Behandlung von abnormalem Calcium- und Phosphor-Stoffwechsel.

[0020] Die Verbindungen der Formel (I), vorzugsweise die, worin R, oder R₂ OH ist, wie z. B. 1 α ,24-Dihydroxyvitamin D₄, sind für die Verminderung der Zellvermehrungswirkung bei Ekzemen, Hautnässen und Talgabscheidung nützlich. Für die Behandlung solcher Hauterkrankungen wird insbesondere das (R)-Stereoisomer von 1 α ,24-Dihydroxyvitamin D₄, d. h. 1 α ,24(R)-Dihydroxyvitamin D₄, bevorzugt, das im Wesentlichen frei von seiner (S)-Form ist oder nur eine geringe Menge der (S)-Form aufweist.

[0021] Die Verbindungen der Formel (I), vorzugsweise die, worin R₁ oder R₂ OH ist, wie z. B. 1 α ,24-Dihydroxyvitamin D₄, sind zudem wertvoll, um die hyperproliferative Aktivität von bösartigen Zellen, d. h. Hautkrebszellen, zu hemmen. 1 α ,24-Dihydroxyvitamin D₄ wirkt als antiproliferativer Wirkstoff, wenn es mit bösartigen Zellen in Verbindung gebracht wird. Insbesondere bevorzugt für die Verwendung als antiproliferativer Wirkstoff ist das (R)-Stereoisomer von 1 α ,24-Dihydroxyvitamin D₄, d. h. 1 α ,24(R)-Dihydroxyvitamin D₄, das im Wesentlichen frei von seiner (S)-Form ist oder nur eine geringe Menge der (S)-Form aufweist. Das gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung hergestellte Medikament kann für die Behandlung von Krebszellen beim Menschen verwendet werden (d. h. indem es deren hyperproliferative Aktivität hemmt). Die Menge, in der die Verbindung der Formel (I) verwendet werden kann, reicht von etwa 1 μ g/Dosis bis zu etwa 500 μ g/Dosis.

[0022] Die Verbindungen der Formel (I) eignen sich als aktive Verbindungen in pharmazeutischen Zusammensetzungen, die im Vergleich zu den bekannten Analoga der aktiven Formen von Vitamin D₃ weniger Nebeneffekte und eine geringe Toxizität aufweisen.

[0023] Die pharmakologisch wirksamen Verbindung der Formel (I) können gemäß herkömmlichen pharmazeutischen Verfahren verarbeitet werden, um medizinische Wirkstoffe für die Verabreichung an Patienten, z. B. Säugetiere einschließlich Menschen, herzustellen. Die Verbindungen der Formel (I) können in Beimischungen mit herkömmlichen Arzneimittelträgern, z. B. pharmazeutisch annehmbaren Trägersubstanzen, die sich für die enterale (z. B. orale), parenterale oder topische Anwendung eignen und die keine schädliche Reaktion mit den aktiven Verbindungen hervorrufen, verwendet werden.

[0024] Geeignete pharmazeutisch annehmbare Träger umfassen, jedoch nicht ausschließlich, Wasser, Salzlösungen, Alkohole, Gummiarabikum, pflanzliche Öle (z. B. Maiskeimöl, Baumwollöl, Erdnussöl, Olivenöl, Kokosnussöl), Lebertran, ölige Ester wie Polysorbat 80, Polyethylenglykole, Gelatine, Kohlenhydrate (z. B. Lactose, Amylose oder Stärke), Magnesiumstearat, Talk, Kieselsäure, viskoses Paraffin, Fettsäuremonoglyceride und -diglyceride, Pentaerythritfettsäureester, Hydroxymethylcellulose, Polyvinylpyrrolidon etc.

[0025] Die pharmazeutischen Zubereitungen können sterilisiert werden und, falls erwünscht, mit Hilfsstoffen, wie z. B. Schmierstoffen, Konservierungsstoffen, Stabilisatoren, Benetzungsmitteln, Emulgatoren, Salzen, die den osmotischen Druck beeinflussen, Puffern, Farbstoffen, Aromastoffen und/oder einer oder mehreren anderen aktiven Verbindungen, z. B. Vitamin D₃ oder D₂ und ihren 1 α -hydroxylierten Metaboliten, konjugierten Östrogenen oder ihren Äquivalenten, Anti-Östrogenen, Calcitonin, Biphosphonaten, Calciumzusätzen, Cobalamin, Pertussis-Toxin und Bor, vermischt werden.

[0026] Für die parenterale Verabreichung eignen sich besonders injizierbare sterile Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, sowie Suspensionen, Emulsionen oder Implantate, einschließlich Suppositorien. Ampullen stellen praktische Dosierungseinheiten dar.

[0027] Für die Behandlung von Hautkrebs beträgt die parenterale Dosis der Verbindungen der Formel (I), vorzugsweise 1 α ,24-Dihydroxyvitamin D₄ und insbesondere 1 α ,24(R)-Dihydroxyvitamin D₄, das im Wesentlichen frei von seiner (S)-Form ist, etwa 0,5 μ g bis etwa 50 μ g pro Dosierungseinheit.

[0028] Für die Behandlung von hyperproliferativen Hauterkrankungen beträgt die parenterale Dosis der Verbindungen der Formel (I), vorzugsweise 1 α ,24-Dihydroxyvitamin D₄ und insbesondere 1 α ,24(R)-Dihydroxyvit-

amin D₄, das im Wesentlichen frei von seiner (S)-Form ist, etwa 0,5 µg bis etwa 50 µg pro Dosierungseinheit.

[0029] Für die enterale Anwendung eignen sich insbesondere Tabletten, Dragees, Flüssigkeiten, Tropfen, Suppositorien, Lutschtabletten, Pulver oder Kapseln. Falls ein gesüßtes Vehikel gewünscht ist, kann ein Sirup, Elixier oder dergleichen verwendet werden.

[0030] Auch Zusammensetzungen zur verzögerten oder gerichteten Abgabe, wie z. B. Liposome oder Verbindungen, bei denen die aktive Verbindung durch unterschiedlich rasch abbaubare Beschichtungen, z. B. durch Mikroverkapselung, mehrere Schichten etc., geschützt ist, können formuliert werden.

[0031] Bei der topischen Anwendung können nicht sprühbare viskose, halbfeste oder feste Formen verwendet werden, die einen für die topische Anwendung geeigneten Träger mit einer vorzugsweise höheren dynamischen Viskosität als Wasser umfassen. Geeignete Formulierungen umfassen, jedoch nicht ausschließlich, Lösungen, Suspensionen, Emulsionen, Cremes, Salben, Pulver, Linimente, Salben, Aerosole, transdermale Pflaster etc., die, falls erwünscht, sterilisiert oder mit Hilfsstoffen, wie z. B. Konservierungsstoffen, Stabilisatoren, Demulgatoren, Benetzungsmitteln etc., vermischt sind.

[0032] Topische Zubereitungen der Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung, die für die Behandlung von Hauterkrankungen nützlich sind, können auch Epithelisierung herbeiführende Wirkstoffe, wie Retinoide (z. B. Vitamin A), Chromanole wie Vitamin E, β -Agonisten wie Isoproterenol oder zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), entzündungshemmende Wirkstoffe wie Corticosteroide (z. B. Hydrocortison oder sein Acetat oder Dexamethason) und keratoplastische Wirkstoffe wie Kohlenteer oder Anthralin, umfassen. Wirksame Mengen dieser Wirkstoffe sind z. B. bei Vitamin A etwa 0,003 bis etwa 3 Gew.-% der Zusammensetzung, bei Vitamin E etwa 0,1 bis etwa 10 Gew.-%, bei Isoproterenol etwa 0,1 bis 2 Gew.-%, bei cAMP etwa 0,1 bis etwa 1 Gew.-%, bei Hydrocortison etwa 0,25 bis etwa 5 Gew.-%, bei Kohlenteer etwa 0,2 bis 20 Gew.-% und bei Anthralin etwa 0,05 bis etwa 2 Gew.-%.

[0033] Bei der topischen Behandlung von Hauterkrankungen beträgt die Dosis der Verbindungen der Formel (I), vorzugsweise 1 α ,24-Dihydroxyvitamin D₄ und insbesondere 1 α ,24(R)-Dihydroxyvitamin D₄, das im Wesentlichen frei von seiner (S)-Form ist, bei einer lokal angewendeten Zusammensetzung etwa 1 µg bis etwa 100 µg/Gramm der Zusammensetzung.

[0034] Bei der topischen Behandlung von Hautkrebs beträgt die Dosis der Verbindungen der Formel (I), vorzugsweise 1 α ,24-Dihydroxyvitamin D₄ und insbesondere 1 α ,24(R)-Dihydroxyvitamin D₄, das im Wesentlichen frei von seiner (S)-Form ist, bei einer lokal angewendeten Zusammensetzung etwa 1 µg bis etwa 100 µg/Gramm der Zusammensetzung.

[0035] Für die rektale Verabreichung werden die Verbindungen zu einer pharmazeutischen Zusammensetzung geformt, die eine Zäpfchengrundlage wie Kakaoöl oder Triglyceride enthält. Um die Haltbarkeitsdauer zu verlängern, umfasst die Zusammensetzung vorteilhaft ein Antioxidans wie Ascorbinsäure, butyliertes Hydroxyanisol oder Hydrochinon.

[0036] Bevorzugt wird die orale Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung. Im Allgemeinen werden die Verbindungen dieser Erfindung in Dosierungseinheiten mit etwa 0,5 µg bis etwa 25 µg in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger pro Dosierungseinheit verabreicht. Die Dosierung der Verbindungen gemäß dieser Erfindung beträgt im Allgemeinen etwa 0,01 bis etwa 0,5 µg/kg/Tag, vorzugsweise etwa 0,04 bis etwa 0,3 µg/kg/Tag.

[0037] Es versteht sich, dass die jeweiligen bevorzugten Mengen der aktiven Verbindung in einem spezifischen Fall je nach Wirksamkeit der verwendeten Verbindung, der jeweiligen formulierten Zusammensetzungen, der Anwendungsart und den zu behandelnden Stellen und Organismus variieren. Die spezifische Dosis für einen bestimmten Patienten hängt z. B. vom Alter, Körpergewicht, allgemeinen Gesundheitszustand, Geschlecht, von der Ernährung, dem Zeitablauf und der Art der Verabreichung, Ausscheidungsrate und den in Kombination verwendeten Medikamenten sowie der Schwere der jeweiligen Erkrankung ab, bei der die Therapie verwendet wird. Die Dosierungen für einen bestimmten Wirt können anhand herkömmlicher Überlegungen, z. B. durch üblichen Vergleich der unterschiedlichen Aktivitäten der jeweiligen Verbindungen und eines bekannten Wirkstoffs, beispielsweise durch eine geeignete herkömmliche pharmakologische Vorschrift, bestimmt werden.

[0038] Die folgenden Beispiele dienen lediglich der Illustration und grenzen die restliche Offenbarung in keins-

ter Weise ein. Bei den folgenden Beispielen sind sämtliche Temperaturen in Grad Celsius und alle Teile und Prozentsätze, wenn nicht anders angeführt, in Gew.-% bzw. Gewichtsteilen angegeben. Protonenkernmagnetische Spektren ($^1\text{H-NMR}$) wurden mittels eines IBM Sy-200 (200 MHz) und eines Bruker Am-400 (400 MHz) und eines aspect-3000-Computers in CDCl_3 -Lösungen mit CHCl_3 als internem Standard aufgezeichnet. Infrarot-Spektren wurden mit einer Fourier-Transformations-IR (FTIR) unter Verwendung von Proben als Kaliumbromid- (KBr-) Pellets oder als Flüssigkeiten aufgezeichnet. Massenspektren wurden mittels eines Finnigan-MAT-90-Massenspektrometers bei 20 eV/Cl aufgezeichnet. Die Schmelzpunkte wurden auf einem Hoover-Thomas-Uni-Melt (Kapillare) und einem Fisher-Johns-Schmelzpunktapparat (Deckglas) ermittelt.

Beispiel 1: Synthese von 1α -Hydroxyvitamin D_4

[0039] Ergosterol (II) wurde zu Ergosterolacetat (III) umgesetzt, indem 100 g (0,25 mol) Ergosterol in 600 ml wasserfreiem Pyridin und 68 ml (0,7 mol) Essigsäureanhydrid gelöst wurden. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend abgekühlt, indem 1,2 l Eis zugesetzt wurden, wodurch es zur Bildung eines Niederschlags kam. Der Niederschlag wurde fünf Mal mit jeweils 400 ml Wasser gewaschen und ein Mal mit 400 ml CH_3CN . Das resultierende Produkt wurde luftgetrocknet, um 79 g (71%) Ergosterolacetat als einen weißen kristallinen Feststoff mit den folgenden Eigenschaften zu erhalten: Schmelzpunkt (m. p., melting point) $169\text{--}171^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ ppm 2,05 (3H, s, $3\beta\text{-CH}_3\text{CO}$), 4,65–4,75 (1H, m, $3\alpha\text{-H}$), 5,15–5,25 (2H, m, 22-H und 23-H), 5,4 (1H, d, 6-H), 5,6 (1H, d, 7-H); FTIR [KBr]: 1734 cm^{-1} (C=O-Streckschwingung) 968 cm^{-1} (C-H-Deformationsschwingung).

[0040] Ergosterolacetat (III) (26 g, 0,062 M) wurde in 2,5 l frisch destilliertem sauerstofffreiem Toluol gelöst. Zu dieser Lösung wurden 9 ml (0,111 mol) Chromylchlorid, das in 240 ml trockenem CH_2Cl_2 gelöst war, unter Stickstoff bei -78°C über einen Zeitraum von 30 min zugesetzt. Das Reaktionssystem wurde bei -78°C für weitere 15 min gerührt, und dann wurden 62 ml einer gesättigten Lösung aus Natriumborhydrid in Ethanol auf einmal zugesetzt. Nach dem Rühren bei -78°C für weitere 15 min wurde die Reaktionslösung in ein Zwei-Phasen-System aus 3N Salzsäure (3 l) und Benzol (3 l) gegossen. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit Wasser (2 l) und zwei Mal mit einer Kochsalzlösung (2×1 l) gewaschen und anschließend mit wasserfreiem MgSO_4 getrocknet. Die getrocknete Lösung wurde filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das kristalline Rohprodukt wurde dann mit CH_3CN (280 ml) behandelt, und die Filtration der so geformten Aufschlammung ergab eine Ausbeute von 12,5 g (41%) an weißem kristallinem $3\beta\text{-Acetoxy-6}\alpha\text{-chlorergosta-7,22\text{-dien-5}\alpha\text{-ol}$ (IV) mit den folgenden Eigenschaften: m. p. $190\text{--}192^\circ\text{C}$, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ ppm 2,05 (3H, s, $3\beta\text{-OAc}$), 4,65 (1H, d, $6\beta\text{-H}$), 5,1 (1H, s, 7-H), 5,1–5,3 (2H, m, 22-H und 23-H); FTIR [KBr]: 1732 cm^{-1} (C=O-Streckschwingung), 968 cm^{-1} (C-H-Deformationsschwingung), 3437 cm^{-1} (O-H-Streckschwingung).

[0041] Das $3\beta\text{-Acetoxy-6}\alpha\text{-chlorergosta-7,22\text{-dien-5}\alpha\text{-ol}$ (IV) (21,4 g, 0,044 mol) in trockenem THF (900 ml) wurde langsam zu einer gerührten Suspension aus Lithiumaluminiumhydrid (2,66 g, 0,07 mol) in trockenem THF (750 ml) bei Raumtemperatur unter Stickstoff zugesetzt. Das Gemisch wurde 3 h lang unter Rückfluss erhitzt und dann auf 0°C abgekühlt. Überschüssiges Hydrid wurde mit gesättigter Na_2SO_4 -Lösung zersetzt. Die Filtration durch wasserfreies Na_2SO_4 und das Eindampfen des Filtrats ergaben einen Feststoff, der direkt mit Essigsäureanhydrid (110 ml) und trockenem Pyridin (220 ml) bei 0°C behandelt wurde. Durch Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde das Acetat (12,75 g, 61%) $3\beta\text{-Acetoxyergosta-7,22\text{-dien-5}\alpha\text{-ol}$ (V) mit den folgenden Eigenschaften erhalten: m. p. $229\text{--}232^\circ\text{C}$; FTIR [KBr]: 1736 cm^{-1} (C=O-Streckschwingung), 3460 cm^{-1} (O-H-Streckschwingung), 972 cm^{-1} (C-H-Deformationsschwingung).

[0042] $3\beta\text{-Acetoxyergosta-7,22\text{-dien-5}\alpha\text{-ol}$ (V) (2,5 g, 0,0055 mol) wurde 6 h lang mit frisch hergestelltem PtO_2 (0,5 g) in Ethylacetat (820 ml) unter H_2 -Gas (15 psi) geschüttelt. Der Katalysator wurde durch Filtration entfernt, und das Eindampfen des Filtrats ergab das rohe Acetat, das in CH_2Cl_2 gelöst und auf Kieselgel chromatographiert wurde. Durch die Elution mit CH_2Cl_2 wurde im Wesentlichen reines $3\beta\text{-Acetoxyergosta-7-en-5}\alpha\text{-ol}$ (VI) (2,15 g, 85%) als ein weißes kristallines Material mit den folgenden Eigenschaften erhalten: m. p. $228\text{--}232^\circ\text{C}$, $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ ppm 2,05 (3H, s, $3\beta\text{-OAc}$), 5,05–5,20 (2H, m, $3\alpha\text{-H}$ und 7-H); FTIR [KBr]: 1736 cm^{-1} (C=O-Streckschwingung), 3462 cm^{-1} (O-H-Streckschwingung).

[0043] Redestilliertes Thionylchlorid (9,7 ml) in trockenem Pyridin (170 ml) wurde zur Verbindung $3\beta\text{-Acetoxyergosta-7-en-5}\alpha\text{-ol}$ (VI) (12,0 g, 0,0262 mol) in trockenem Pyridin (800 ml) bei 0°C unter Stickstoff zugesetzt. Nach 2,5 h wurde die Lösung mit eiskaltem H_2O (1,5 l) verdünnt und mit zwei Teilen Ether (2,5 l + 1,5 l) extrahiert. Die vereinigten Ether-Extrakte wurden mit einer NaHCO_3 -Lösung (1,0 l \times 2), dann mit 1N HCl (1,5 l \times 2) und anschließend mit Wasser (1 l) gewaschen. Die Etherlösung wurde mit MgSO_4 getrocknet und nach der Filtration unter verringertem Druck eingedampft, um ein Rohprodukt zu erhalten, das mit CH_3CN (100 ml) in eine Aufschlammung umgewandelt wurde. Das Produkt wurde durch Filtration gesammelt und aus CH_3CN um-

kristallisiert, um 4,5 g (39%) eines weißen kristallinen 22,23-Dihydroergosterylacetats (VII) mit den folgenden Eigenschaften zu erhalten: m. p. 144–147°C, ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δppm 2,05 (3H, s, 3β-OAc), 4,65–4,75 (1H, m, 3α-H), 5,4 (1H, d, 6-H), 5,6 (1H, d, 7-H); FTIR [KBr]: 1734 cm⁻¹ (C=O-Streckschwingung).

[0044] 22,23-Dihydroergosterylacetat (VII) (4,8 g, 0,011 mol) wurde in einem zu einer gerührten Suspension aus Lithiumaluminiumhydrid (2,5 g, 0,066 mol) in trockenem Ether (1,1 l) bei Raumtemperatur zugesetzt. Das Gemisch wurde 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt. 5N NaOH wurde zugesetzt, um überschüssiges Lithiumaluminiumhydrid zu zerstören, und dann wurde H₂O (500 ml) zugesetzt. Die wässrige Lösung wurde dann vier Mal mit jeweils 250 ml Ether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte und die vereinigte organische Phase wurden mit Kochsalzlösung (1 l) gewaschen und dann mit NaSO₄ getrocknet. Durch Eindampfen des Ethers unter reduziertem Druck wurde die Verbindung 22,23-Dihydroergosterol (VIII) (4,1 g, 94%) als ein weißes kristallines Material mit den folgenden Eigenschaften erhalten: m. p. 147–150°C, ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δppm 3,6–3,7 (1H, m, 3α-H), 5,4 (1H, d, 6H), 5,6 (1H, d, 7-H); FTIR [KBr]: 3400 cm⁻¹ (O-H-Streckschwingung).

[0045] 22,23-Dihydroergosterol (VIII) (2,0 g, 5,0 mmol) wurde in einer Lösung aus Diethylether und Benzol (4 : 1, 600 ml) gelöst und mit Rühren unter Argon in einem wassergekühlten Quarzgefäß 3 h lang bestrahlt. Die Lösung wurde im Vakuum eingeengt, um einen gummiartigen Feststoff zu erhalten, der in 100 ml Ethanol neuerlich gelöst und unter Argon 8 h lang unter Rückfluss erhitzt wurde. Dann wurde die Lösung im Vakuum eingeengt, und der Rest wurde auf einer Kieselgelsäule adsorbiert und mit 30% Ethylacetat in Hexan eluiert, um Vitamin D₄ (22,23-Dihydroergocalciferol) (IX) in einer Ausbeute von 1,2 g (60%) und mit den folgenden Eigenschaften zu erhalten: ¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃), δppm 0,55 (3H, s, 18-H₃), 0,78 (6H, dd, 26-H₃ und 27-H₃), 0,87 (3H, d, 21-H₃), 0,93 (3H, d, 28-H₃), 3,94 (1H, m, 3-H), 4,82 (1H, m (scharf, 19-H), 5,04 (1H, m (scharf, 19-H), 6,04 (1H, d, 7-H), 6,24 (1H, d, 6-H).

[0046] Zu einer gerührten Lösung aus Vitamin D₄ (IX) (3,0 g, 7,5 mmol) in 10 ml trockenem Pyridin wurde frisch umkristallisiertes p-Toluolsulfonylchlorid (3,6 g, 19 mmol) bei 0°C zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 5°C 24 h lang gerührt und dann abgeschreckt, indem das Gemisch mit Rühren über Eis und gesättigtes NaHCO₃ (100 ml) gegossen wurde. Die wässrige Suspension wurde mit CH₂Cl₂ (3 × 300 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit 10% HCl (3 × 200 ml), mit gesättigtem NaHCO₃ (3 × 200 ml) und gesättigtem NaCl (2 × 200 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeengt, um 3,5 g (84%) des neuartigen Zwischenprodukts Vitamin-D₄-Tosylat (X) mit den folgenden Eigenschaften zu erhalten: ¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃), δppm 0,54 (3H, s, 18-H₃), 0,78 (6H, dd, 26-H₃ und 27-H₃), 0,87 (3H, d, 21-H₃), 0,96 (3H, d, 28-H₃), 2,45 (3H, s, CH₃ (Tosylat)), 4,68 (3H, m, 3-H), 4,82 (1H, m (scharf, 19-H), 5,04 (1H, m (scharf, 19-H), 5,95 (1H, d, 7-H), 6,09 (1H, d, 6-H), 7,34 und 7,79 (4H, d, aromatisch).

[0047] Zu einer gerührten Lösung aus NaHCO₃ (17,0 g, 202 mmol) in Methanol (200 ml) wurde tropfenweise eine Lösung aus Vitamin-D₄-Tosylat (X) (3,5 g, 6,3 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ (10 ml) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht unter Argon unter Rückfluss erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt und im Vakuum auf etwa 50 ml eingeengt. Das Reaktionskonzentrat wurde mit Ether (600 ml) verdünnt, mit Wasser (3 × 300 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rest wurde durch eine Kieselgelsäule geleitet und mit 10% Ethylacetat in Hexan eluiert, um das neuartige Zwischenprodukt 3,5-Cyclovitamin D₄ (XI) (schweres Öl) in einer Ausbeute von 1,5 g (58%) und mit den folgenden Eigenschaften zu erhalten: ¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃), δppm 0,56 (3H, s, 18-H₃), 0,78 (6H, dd, 26-H₃ und 27-H₃), 0,87 (3H, d, 21-H₃), 0,94 (3H, d, 28-H₃), 3,28 (3H, s, OCH₃), 4,2 (1H, d, 6-H), 4,91 (1H, m (scharf, 19-H), 4,98 (1H, d, 7-H), 5,08 (1H, m (scharf, 19-H).

[0048] Wasserfreies tert-Butylhydroperoxid in Toluol (3M) (2,6 ml, 7,8 mmol) wurde zu einer gerührten Suspension aus Selendioxid (0,22 g, 2 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ (150 ml) in einem Dreihalskolben zugegeben. Das Gemisch wurde 3 h lang unter Argon gerührt. Pyridin (0,3 ml, 3,7 mmol) wurde anschließend zugegeben und Cyclovitamin D₄ (XI) (1,5 g, 3,6 mmol) als eine Lösung in CH₂Cl₂ (50 ml) eingeleitet. Nach 30-minütigem Rühren wurde 10% wässrige NaOH-Lösung (200 ml) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit Ether (500 ml) verdünnt und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde mit 10% NaOH (3 × 200 ml), Wasser (2 × 200 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (2 × 200 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde auf einer Kieselgelsäule adsorbiert und mit 30% Ethylacetat in Hexan eluiert, um 0,45 g (29%) des neuartigen Zwischenprodukts 1α-Hydroxy-3,5-Cyclovitamin D₄ (XII) (Öl) mit den folgenden Eigenschaften zu erhalten: ¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃), δppm 0,54 (3H, s, 18-H₃), 0,78 (6H, dd, 26-H₃ und 27-H₃), 0,86 (3H, d, 21-H₃), 0,95 (3H, d, 28-H₃), 3,26 (3H, s, OCH₃), 4,2 (1H, d, 6-H), 4,22 (1H, m, 1-H), 4,95 (1H, d, 7-H), 5,18 (1H, d, 19-H), 5,25 (1H, d, 19-H).

[0049] Eine Lösung aus 1α-Hydroxy-3,5-Cyclovitamin D₄ (XII) (0,45 g, 1,05 mmol) wurde in einer Lösung aus

Dimethylsulfoxid (4,5 ml) und Eisessig (3,6 ml) unter Argon eine Stunde lang auf 50°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde dann über Eis und gesättigte NaHCO₃-Lösung (100 ml) gegossen und mit Ether (3 × 200 ml) extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte wurden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (3 × 200 ml), Wasser (3 × 200 ml) und gesättigter NaCl-Lösung (3 × 200 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingedunstet, um ein Gemisch mit 5,6-cis- und 5,6-trans-1 α -Hydroxyvitamin D₄ (etwa 4 : 1 durch ¹H-NMR) mit einer Ausbeute von 0,4 g (92%) zu erhalten. Das Gemisch aus 5,6-cis- und 5,6-trans-1 α -Hydroxyvitamin D₄ (0,4 g, 0,97 mmol) wurde in Ethylacetat (25 ml) gelöst und mit frisch umkristallisiertem Maleinsäureanhydrid (0,08 g, 0,8 mmol) behandelt. Dieses Reaktionsgemisch wurde unter Argon 24 h lang auf 35°C erhitzt. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohgemisch über eine Kieselgelsäule unter Verwendung von Ethylacetat und Hexan (1 : 1) als Elutionsmittel chromatographiert, um die neuartige aktive Form des Vitamins D₄, 5,6-cis-1 α -Hydroxyvitamin D₄ (XIII) mit einer Ausbeute von 90 mg (23%) und mit den folgenden Eigenschaften zu erhalten: m. p. 128–130°C; IR ν_{\max} (pur): 3400 cm⁻¹ (OH-Streckschwingung); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ ppm 0,55 (3H, s, 18-H), 0,79 (6H, dd, 26-H₃ und 27-H₃), 0,87 (3H, d, 21-H₃), 0,94 (3H, d, 28-H₃), 4,24 (1H, m, 3-H), 4,44 (1H, m, 1-H), 5,02 (1H, m (scharf), 19H), 5,34 (1H, m (scharf), 19-H), 6,02 (1H, d, 7-H), 6,4 (1H, d, 6-H); Massenspektrum [C] m/e (relative Intensität): 415 (M + 1, 41%), 397 (M + 1-OH 100%), 379 (27 %), 135 (22%).

Beispiel 2: Biologisches Testen von 1 α -Hydroxyvitamin D₄

[0050] Junge männliche Ratten (Holtzman-Stamm, Holtzman Company, Madison, Wisconsin) wurden mit Nahrung gefüttert, die Vitamin D in unzureichendem Ausmaß, jedoch genügend Calcium (0,47%) und Phosphor (0,3%) enthielt. Innerhalb von drei bis vier Wochen ruft diese Ernährung einen extremen Vitamin-D-Mangel gekennzeichnet durch niedriges Serumcalcium und geringes Wachstum hervor. Nach vier Wochen mit dieser Ernährung hatten die Ratten Serumcalciumwerte von weniger 7 mg/dl. Die Ratten wurden in vier Gruppen aufgeteilt und erhielten oral entweder 1 α -Hydroxyvitamin D₄ in einem Vehikel wie Kokosnussöl oder nur das Vehikel (Kontrollgruppe) für jeweils 14 Tage. 24 h nach der letzten Dosis wurden die Ratten getötet und das Blutcalcium durch Standard-Laborverfahren gemessen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 1 angeführt.

TABELLE 1
Anstieg der Serumcalcium-Konzentration

Verbindung	Dosis (μ g/kg/Tag)	Rattenanzahl	Serumcalcium-konzentration (mg/dl) \pm Standardabweichung
Kontrolle	-	10	6.1 \pm 0.48
1 α -OH-D ₄	0.042	8	7.1 \pm 0.80
1 α -OH-D ₄	0.250	7	11.6 \pm 0.45
1 α -OH-D ₄	1.500	9	12.7 \pm 0.37

[0051] Die Daten aus Tabelle 1 zeigen, dass 1 α -Hydroxyvitamin D₄ bei Ratten mit Vitamin-D-Mangel das Serumcalcium erhöht und dass die Reaktion von der Dosis abhängig zu sein scheint. Überraschenderweise lässt sich das Reaktionsausmaß gut mit dem von Wientroub et al. für die Verabreichung von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ an Ratten mit Vitamin-D-Mangel unter ähnlichen Versuchsbedingungen wie oben beschrieben vergleichen (siehe S. Wientroub, P. A. Price, A. H. Reddi, „The Dichotomy in the Effects of 1,25-dihydroxy vitamin D₃ und 24,25-dihydroxy vitamin D₃ on Bone Gamma-Carboxyglutamic Acid-Containing Protein in Serum and Bone in vitamin D-Deficient Rats“, *Calcif. Tissue Int.* 40, 166–172 (1987)).

Beispiel 3: Toxizitätstests

[0052] Die akute orale Toxizität von 1 α -OH-D₄ bei Ratten wurde durch Ermitteln der mittleren tödlichen Dosis (LD₅₀) anhand einer weithin bekannten Methode bestimmt. Ratten wurde 8–10 Wochen lang eine Standardla-

borernahrung verabreicht. Fünf Tieren jeden Geschlechts wurde eine orale Dosis von 1α -OH- D_4 verabreicht. Die Tiere wurden 14 Tage lang beobachtet und die Anzahl der Todesfälle aufgezeichnet. Der LD_{50} -Wert erwies sich bei männlichen Ratten bei etwa 1,0 mg/kg und bei weiblichen Ratten bei etwa 3,0 mg/kg.

[0053] Im Vergleich dazu fanden die Erfinder heraus, dass der LD_{50} -Wert für 1α -Hydroxyvitamin D_2 unter denselben Bedingungen bei 1,7 mg/kg für männliche Ratten und bei 1,8 mg/kg für weibliche Ratten lag. Die Toxizität von 1α -Hydroxyvitamin D_2 wurde früher als geringer als die von 1α -Hydroxyvitamin D_3 angegeben (G. Sjoeden, C. Smith, U. Lindgren und H. F. DeLuca, Proc. Soc. Experimental Biol. Med. 178, 432–436 (1985)).

Beispiel 4: Herstellung und Isolierung von 1,25-Dihydroxyvitamin D_4

[0054] Das 1α -Hydroxyvitamin D_4 der vorliegenden Erfindung wird mit kultivierten menschlichen Leberzellen inkubiert, die die Verbindung zu mehreren Produkten einschließlich des Metaboliten 1,25-Dihydroxyvitamin D_4 metabolisiert. Der 1,25-Metabolit wird isoliert und durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie gereinigt und durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie identifiziert. Bindungsstudien zeigen, dass das 1,25-Dihydroxyvitamin D_4 eine hohe Bindungsaffinität für das Säugetier-Vitamin-D-Rezeptorprotein aufweist, was darauf hindeutet, dass es biologisch aktiv ist. Die verwendeten Verfahren sind denen von Strugnell et al., Biochem. Pharm. 40, 333–341 (1990), beschriebenen ähnlich.

Beispiel 5: Herstellung und Isolierung von 1,24-Dihydroxyvitamin D_4

[0055] Die Herstellung und Isolierung von 1,24-Dihydroxyvitamin D_4 wird wie in Beispiel 4 oben beschrieben durchgeführt. Das 1α -Hydroxyvitamin D_4 der vorliegenden Erfindung wird mit kultivierten menschlichen Leberzellen inkubiert, die die Verbindung zu mehreren Produkten einschließlich des Metaboliten 1,24-Dihydroxyvitamin D_4 metabolisiert. Der 1,24-Metabolit wird isoliert und durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie gereinigt und durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie identifiziert. Bindungsstudien zeigen, dass der neue Metabolit eine hohe Bindungsaffinität für das Säugetier-Vitamin-D-Rezeptorprotein aufweist, was darauf hindeutet, dass es biologisch aktiv ist.

Beispiel 6: Hyperkalzämie-Test

[0056] Weibliche Ratten werden mit herkömmlicher Nahrung mit 0,8% Calcium und 0,6% Phosphor gefüttert. Die Ratten werden in vier Gruppen geteilt, und jeder Gruppe wird über 13 Wochen täglich entweder 1α -OH- D_4 in einem Vehikel wie Kokosnussöl oder nur das Vehikel (Kontrollgruppe) oral verabreicht. 24 h nach der letzten Dosis werden die Ratten getötet und ihr Serumcalcium durch ein Standardverfahren ermittelt.

[0057] Hierbei zeigt sich, dass die Serumcalciumkonzentration bei 1α -OH- D_4 -Dosen von bis zu 2,5 μ g/kg/Tag unverändert oder nur leicht erhöht ist.

Beispiel 7: Weitere biologische Tests

[0058] Junge männliche Ratten werden mit Nahrung, die mangelhaft an Vitamin D ist und wenig Calcium (0,02%) enthält, gefüttert. Nach einem Zeitraum von vier Wochen werden die Ratten in vier Gruppen unterteilt, und 1α -OH- D_4 in einem Vehikel wie Ethanol oder nur das Vehikel (Kontrollgruppe) wird intravenös verabreicht. 16 h nach der Verabreichung werden die Ratten getötet und der intestinale Calciumtransport unter Verwendung von umgestülpten Zwölffingerdarmsäcken gemäß dem Verfahren von Martin und DeLuca, Am. J. Physiol. 216, 1352–1359, gemessen.

[0059] Dieses Verfahren zeigt die Stimulation des intestinalen Calciumtransports in einer Dosis-abhängigen Art.

Beispiel 8: Medikamentherstellung

[0060] Eine topische Creme wird durch Auflösen von 1,0 mg $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 in 1 g Mandelöl hergestellt. Zu dieser Lösung werden 40 g Mineralöl und 20 g selbstemulgierendes Bienenwachs gegeben. Das Gemisch wird erhitzt, damit es flüssig wird. Nach der Zugabe von 40 ml heißem Wasser wird das Gemisch gut gemischt. Die resultierende Creme enthält etwa 10 μ g $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 pro Gramm Creme.

Beispiel 9:

[0061] Eine Salbe wird durch Auflösen von 1,0 mg $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 in 30 g Mandelöl hergestellt. Zu dieser Lösung werden 70 g weißes Weichparaffin gegeben, das so weit erhitzt wurde, dass es sich verflüssigt. Die Salbe wird gut gemischt und abkühlen gelassen. Diese Salbe enthält etwa 10 μg $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 pro Gramm Salbe.

Beispiel 10:

[0062] Zur Salbe aus Beispiel 9 werden unter gründlichem Mischen 0,5 g Adenosin und 2,0 g Papaverin-Base zugegeben, die beide in einer minimalen Menge an Dimethylsulfoxid gelöst sind. Die Zusatzstoffe liegen im Ausmaß von etwa 0,5 Gew.-% (Adenosin) und 2 Gew.-% (Papaverin-Base) vor.

Beispiel 11:

[0063] Zur Salbe aus Beispiel 9 werden unter gründlichem Mischen 10.000 U Vitamin A zugegeben, das in einer minimalen Menge an Pflanzenöl gelöst ist. Die resultierende Salbe enthält etwa 100 U Vitamin A pro Gramm Salbe.

Beispiel 12:

[0064] Eine dermatologische Lotion wird durch Auflösen von 1,0 mg $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 in 100 g trockenem Propylenglykol hergestellt. Die Lotion wird in einem Kühlschranks in einer braunen Flasche gelagert und enthält etwa 10 μg $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 pro Gramm Lotion.

Beispiel 13:

[0065] In 1 g Mandelöl werden 0,2 mg $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 gelöst. Zur Lösung werden 40 g Mineralöl und 20 g selbstemulgierendes Bienenwachs, gefolgt von 40 ml heißem Wasser zugegeben. Das Gemisch wird gut gemischt, um eine kosmetische Creme mit etwa 2,0 μg $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 pro Gramm Creme herzustellen.

Beispiel 14:

[0066] Zu einer kosmetischen Creme, die gemäß Beispiel 13 hergestellt wurde, werden 100 mg Adenosin zugegeben. Die Creme wird gut gemischt und enthält etwa 0,1 Gew.-% Adenosin.

Beispiel 15:

[0067] Eine Salbe wird durch Lösen von 100 μg $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 in 30 g Mandelöl hergestellt. Zur so hergestellten Lösung werden 70 g weißes Weichparaffin zugegeben, das gerade so stark erhitzt worden ist, dass es sich verflüssigt. Die Salbe wird gut gemischt und abkühlen gelassen. Die so hergestellte Salbe enthält etwa 1,0 μg $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 pro Gramm Salbe.

Beispiel 16:

[0068] Zur kosmetischen Salbe aus Beispiel 15 werden unter gründlichem Mischen 200 U/g Vitamin A zugegeben, das in einer minimalen Menge an Pflanzenöl gelöst war.

Beispiel 17:

[0069] Eine kosmetische Lotion wird durch Lösen von 300 μg $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 in 100 g trockenem Propylenglykol hergestellt. Die Lotion wird in einem Kühlschranks in einer braunen Flasche gelagert und enthält etwa 3,0 μg $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 pro Gramm Lotion.

Beispiel 18: Dermatologische Tests

[0070] Zusammensetzungen mit $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 werden auf ihre therapeutische Wirksamkeit bei der topischen Behandlung von Dermatitis (Kontakt und ektopisch) hin untersucht. Die evaluierte Zusammensetzung ist eine Salbe, die 10 μg $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 pro Gramm Salbe in einer Petrolatum-Mandel-

öl-Basis enthält. Die Kontrollzusammensetzung ist identisch, mit der Ausnahme, dass sie den aktiven Wirkstoff $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 nicht enthält. Die Patienten werden ambulant behandelt. Sie sind dazu angehalten, die Salbe zwei Mal täglich zu verwenden.

[0071] Die Salbe wird, so weit möglich, auf eine einzelne Läsion oder einen Erkrankungsbereich aufgetragen. Die Salbe und ihr Behälter werden vor Beginn der Behandlung gewogen, und die nicht aufgebrauchte Salbe wird nach dem Ende der Behandlung zurückgegeben, um erneut gewogen zu werden.

[0072] Der behandelte Läsionsbereich wird bewertet und aufgezeichnet, und die Läsion wird zusammen mit geeigneten „Kontrollläsionen“ fotografiert. Letzere sind vorzugsweise Läsionen mit ähnlicher Größe und Entwicklungsstadium, entweder in der Nähe der behandelten Läsion oder symmetrisch kontralateral. Die relevanten Details beim Fotografieren werden festgehalten, um bei der nächsten fotografischen Aufzeichnung der Läsionen wieder rekonstruiert werden zu können (Abstand, Blende, Winkel, Hintergrund etc.). Die Salbe wird zwei Mal täglich aufgetragen und vorzugsweise nicht bedeckt. Die „Kontrollläsionen“ werden unbehandelt gelassen, und wenn dies nicht möglich ist, dann wird die verwendete Behandlung aufgeschrieben.

[0073] Erythem, Schuppenbildung und Dicke werden jede Woche von einem Arzt bestimmt, wobei die Schwere der Läsion mit 0 bis 3 beurteilt wird. Die Endbeurteilung wird üblicherweise am Ende der vier- bis sechswöchigen Behandlung durchgeführt. Die mit $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_4$ behandelten Läsionen weisen eine niedrigere Beurteilung als die Kontrollläsionen auf. Zudem wurde ein unbedeutendes Auftreten von Hyperkalzämie beobachtet.

Beispiel 19: Epidermale Zelldifferenzierungs- und -vermehrungstests

[0074] Menschliche Keratinozyten werden gemäß bekannter Modifikationen des ursprünglich von Rheinwald und Green (Cell 6, 331 (1975)) beschriebenen Systems kultiviert. Das $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 , gelöst in Ethanol, wird zu den Zellen zugegeben, um eine Vielzahl von Konzentrationen zwischen 0,05 und 5 $\mu\text{g/ml}$ zu erhalten, wobei die Ethanolkonzentration 0,5 Vol.-% nicht überschreitet. Kontrollkulturen werden mit Ethanol in einer Endkonzentration von 0,5 Vol.-% ergänzt.

[0075] Differenzierung und Vermehrung von epidermalen Zellen in Kultur wurden wie folgt ermittelt:

1. Quantifizierung der verhornten Hüllen;
2. Quantifizierung der Zelldichte der an Scheiben haftenden Zellen;
3. Überwachen der Transglutaminase-Aktivität; oder
4. Überwachen der DNA-Synthese durch Inkorporation von ^3H -Thymidin.

[0076] Die mit $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 inkubierten Kulturen weisen mehr verhornte Hüllen, weniger anhaftende Zellen, höhere Transglutaminase-Aktivität und geringere DNA-Synthese als die Kontrollkulturen auf.

Beispiel 20: Aktivität von $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_4$ bei HL-60-Zelldifferenzierungsassays

[0077] Eine Dosis-Wirkung-Studie wird mit $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_4$ in dem wie von DeLuca und Ostrom (H. F. DeLuca und V. K. Ostrom, Prog. Clin. Biol. Res. 259, 41–55 (1988)) beschriebenen HL-60-Zelldifferenzierungstest durchgeführt. In dieser Studie wird $1\alpha,25$ -(OH) $_2D_3$ als positive Kontrolle und geeignete Lösungsmittel als negative Kontrolle verwendet. Die folgenden Variablen werden evaluiert: nicht spezifische Säure-Esterase-Aktivität, Nitroblau-Tetrazol- (NBT-) Reduktion und Thymidin-Inkorporation. Die Ergebnisse zeigen, dass $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_4$ die Differenzierung von HL-60-Promyelozyten zu Monozyten wirksam vorantreibt.

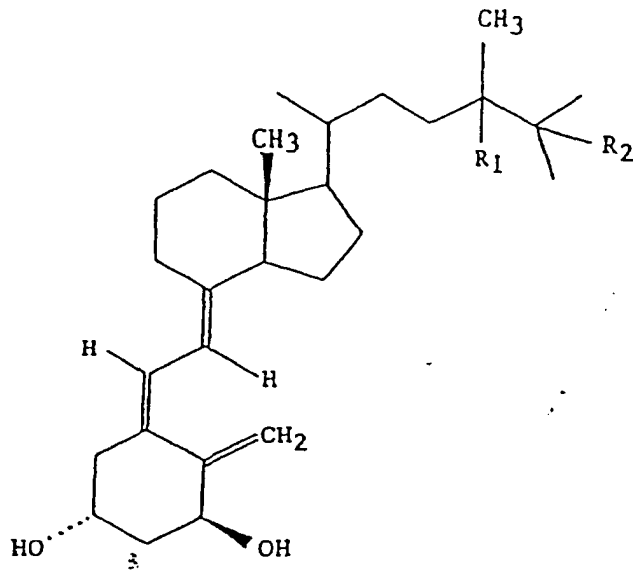
Beispiel 21: Antiproliferative Wirkung von $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_4$ bei menschlichen

Krebszelllinien

[0078] Dosis-Wirkung-Studien werden mit $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_4$ in einer Gruppe an menschlichen Krebszellen durchgeführt. Diese Zelllinien umfassen, jedoch nicht ausschließlich, Folgende: BCA-1 oder ZR-75-1 (Brust) und COL-1 (Dickdarm), wie von H. L. Shieh et al., Chem. Biol. Interact. 81, 35–55 (1982), beschrieben. In dieser Studie werden geeignete Lösungsmittel als negative Kontrollen verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass $1\alpha,24$ -(OH) $_2D_4$ eine starke (und reversible) antiproliferative Wirkung aufweist, wie die Hemmung der Thymidin-Inkorporation zeigt.

Patentansprüche

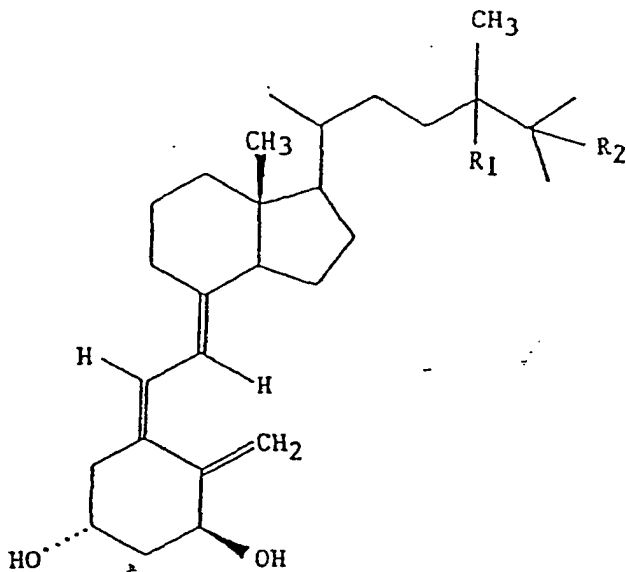
1. Verwendung einer Verbindung der Formel (I):



(I)

worin R_1 entweder H oder OH ist und R_2 entweder H oder OH ist, oder eines Salzes, eines Hydrats oder eines Solvats davon, bei der Herstellung eines Medikaments zum Hemmen der hyperproliferativen Aktivität von menschlichen Hautkrebszellen.

2. Verwendung einer Verbindung der Formel (I):



(I)

worin R_1 entweder H oder OH ist und R_2 entweder H oder OH ist, oder eines Salzes, eines Hydrats oder eines Solvats davon, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Menschen, um die Zellvermehrungswirkungen von Hautkrebs, Ekzemen, Hautnässen oder Talgausscheidung beim Menschen zu erleichtern.

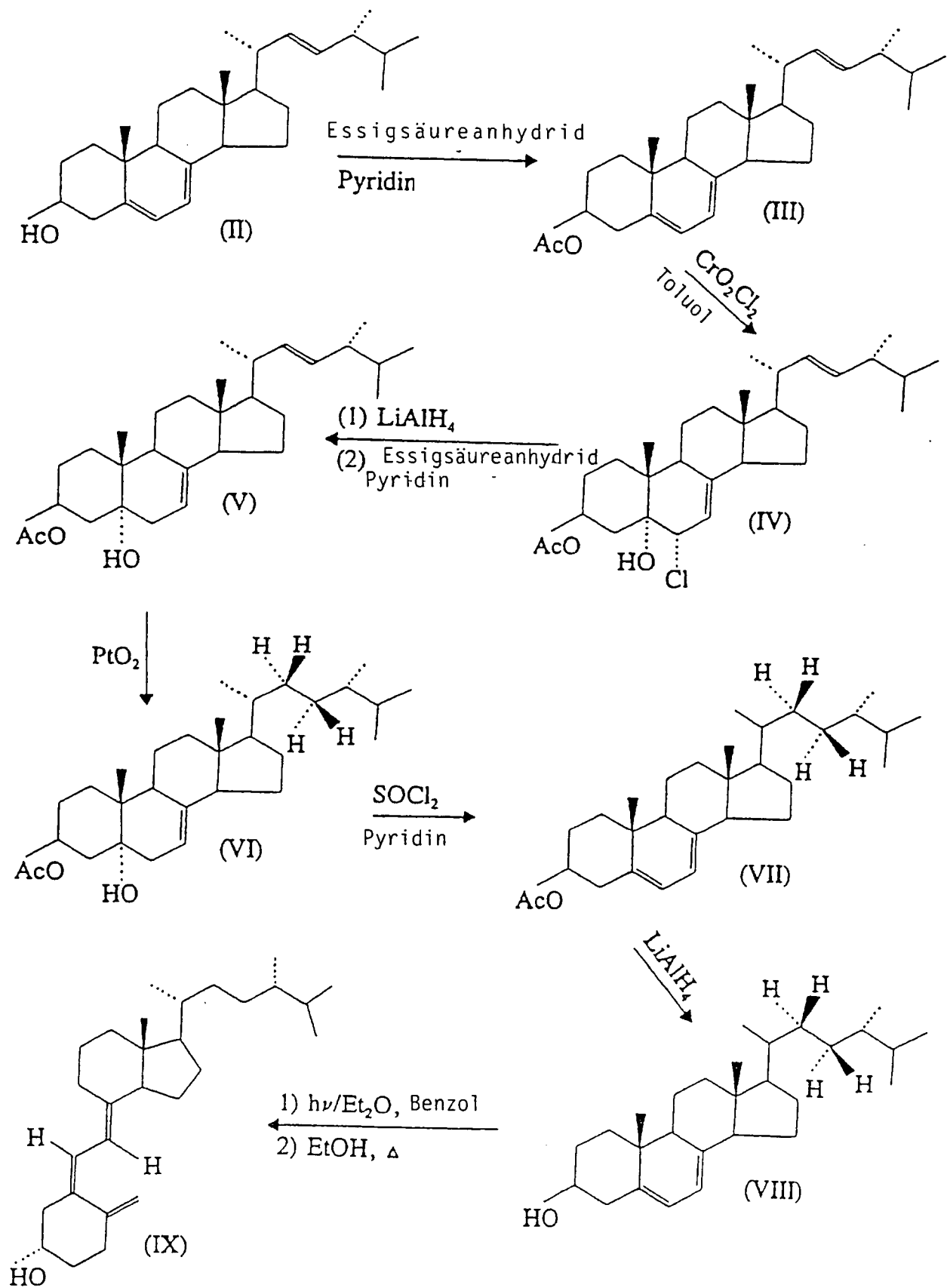
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, worin die Verbindung der Formel (I) $1\alpha,24$ -Dihydroxyvitamin D_4 ist.

4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, worin die Verbindung der Formel (I) $1\alpha,24(R)$ -Dihydroxyvitamin D_4 ist, das im Wesentlichen frei von seiner (S)-Form ist.

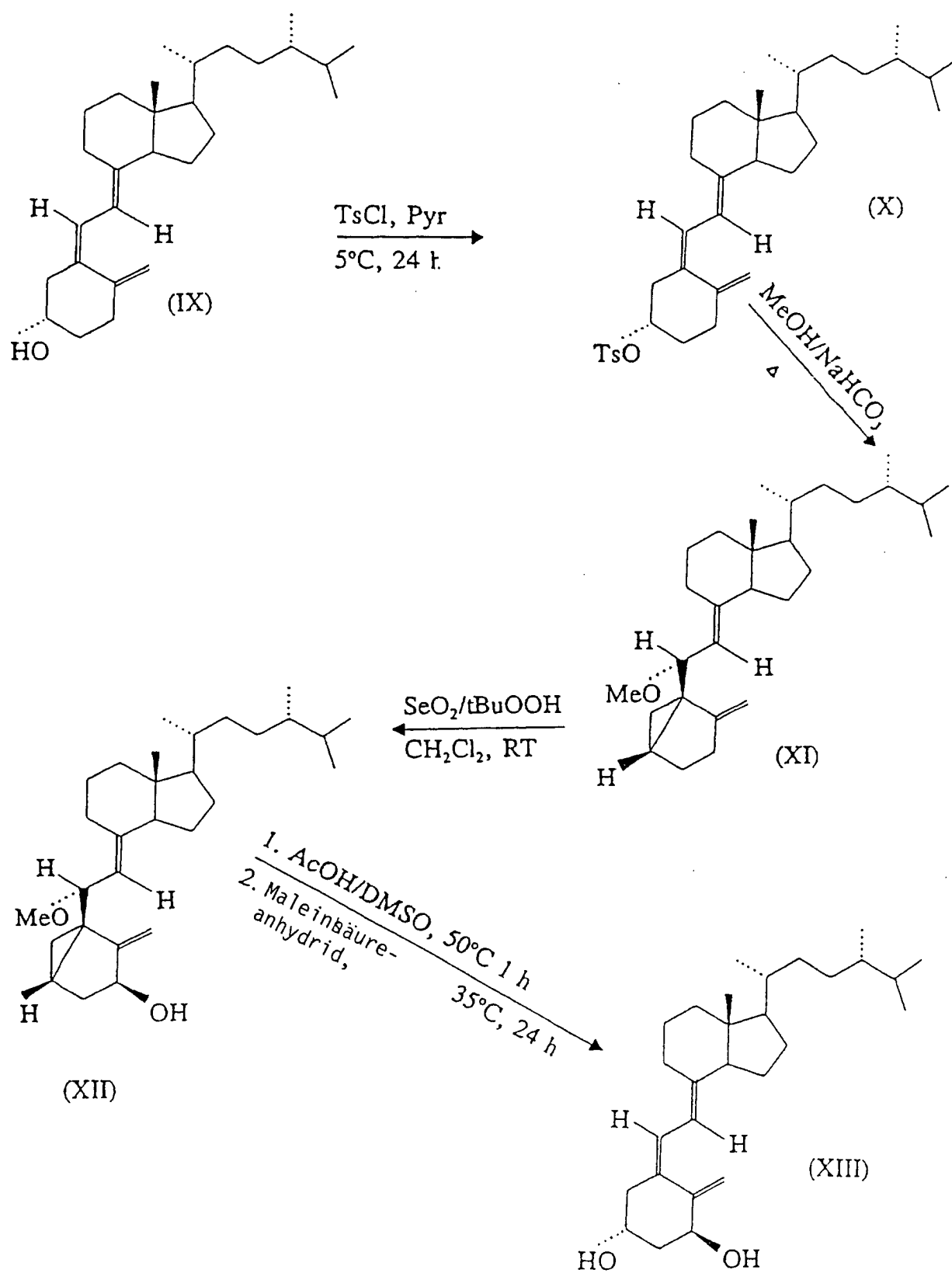
5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, worin das Medikament zur topischen Verabreichung dient.
6. Verwendung nach Anspruch 5, worin das Medikament auch eine zweite Wirksubstanz enthält, die aus der aus Retinoiden, Chromanolen, β_0 -Agonisten, entzündungshemmenden Mitteln, keratoplastischen Mitteln und Kombinationen davon bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
7. Verwendung nach Anspruch 5, worin das Medikament zur Verabreichung in Verbindung mit einem zweiten Mittel dient, das aus der aus Retinoiden, Chromanolen, β -Agonisten, entzündungshemmenden Mitteln, keratoplastischen Mitteln und Kombinationen davon bestehenden Gruppe ausgewählt ist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das Medikament zur oralen Verabreichung dient.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das Medikament zur parenteralen Verabreichung dient.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



FIGUR 1



FIGUR 2