



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101668532 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 20

(21) 申请号 200880013367. X

A61P 43/00(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 04. 25

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

CN 1085211 A, 1994. 04. 13, 参见全文.

60/913, 849 2007. 04. 25 US

JP 2004175750 A, 2004. 06. 24, 参见说明书

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

实施例 7、14、16.

2009. 10. 23

审查员 韩征

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2008/003480 2008. 04. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/047644 EN 2009. 04. 16

(73) 专利权人 赛特克罗公司

地址 加拿大安大略

(72) 发明人 马丁·P·佩特科维奇

克里斯丁·F·黑尔维希

萨米尔·P·塔巴什

(74) 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司

11018

代理人 王琦 王珍仙

(51) Int. Cl.

A61K 31/592(2006. 01)

A61K 31/593(2006. 01)

权利要求书2页 说明书15页 附图5页

(54) 发明名称

治疗维生素 D 不足和缺乏、继发性甲状旁腺功能亢进症和维生素 D- 响应疾病的组合物及其相应的制药用途

(57) 摘要

本发明涉及降低与维生素 D3、维生素 D3 的 25- 羟基化和 1- 羟基化形式及其类似物给药相关的毒性的方法和组合物。

1. 一种组合物,包括含有大于  $50 \mu\text{g}$  的 25-羟基维生素  $\text{D}_3$ 、维生素  $\text{D}_2$  补充剂和药学可接受的赋形剂的单位剂量形式,所述维生素  $\text{D}_2$  补充剂包括 25-羟基维生素  $\text{D}_2$  或麦角钙化醇,其中所述 25-羟基维生素  $\text{D}_3$  与所述维生素  $\text{D}_2$  补充剂的重量比或摩尔浓度比例为 60 : 1 至 1 : 20。

2. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述维生素  $\text{D}_2$  补充剂包括 25-羟基维生素  $\text{D}_2$ 。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的组合物,其中 25-羟基维生素  $\text{D}_3$  与维生素  $\text{D}_2$  补充剂的重量比或摩尔浓度比例为至少 1.5 : 1。

4. 一种组合物,包括含有大于  $50 \mu\text{g}$  的 25-羟基维生素  $\text{D}_3$  和药学可接受的赋形剂的单位剂量形式,并进一步包括维生素  $\text{D}_2$  补充剂,所述维生素  $\text{D}_2$  补充剂包括 25-羟基维生素  $\text{D}_2$ ,其中所述 25-羟基维生素  $\text{D}_3$  与 25-羟基维生素  $\text{D}_2$  的重量比或摩尔浓度比例为至少 1.5 : 1 且小于或等于 60 : 1。

5. 如权利要求 1 或 4 所述的组合物,其中所述维生素  $\text{D}_2$  补充剂以能有效降低维生素 D 毒性的量存在。

6. 根据权利要求 1 或 4 所述的组合物,其中所述 25-羟基维生素  $\text{D}_3$  与维生素  $\text{D}_2$  补充剂的重量比或摩尔浓度比例至少为 2 : 1。

7. 一种试剂盒,包括维生素  $\text{D}_3$  补充剂和维生素  $\text{D}_2$  补充剂,以及对受治疗者共给予所述补充剂的说明,其中所述维生素  $\text{D}_3$  补充剂包括 25-羟基维生素  $\text{D}_3$  或胆钙化醇,且所述维生素  $\text{D}_2$  补充剂包括 25-羟基维生素  $\text{D}_2$  或麦角钙化醇,其中所述 25-羟基维生素  $\text{D}_3$  与所述维生素  $\text{D}_2$  补充剂的重量比或摩尔浓度比例为 60 : 1 至 1 : 20。

8. 根据权利要求 7 所述的试剂盒,进一步包括对人类受治疗者给予所述补充剂的说明。

9. 根据权利要求 7 所述的试剂盒,进一步包括对诊断为维生素 D 不足和 / 或缺乏的患者给予所述补充剂的说明。

10. 根据权利要求 7 所述的试剂盒,其中所述补充剂中的至少一种为单位剂量形式。

11. 维生素  $\text{D}_3$  补充剂和维生素  $\text{D}_2$  补充剂在制备用于对受治疗者联合给药以治疗所述受治疗者的维生素 D 不足和 / 或缺乏、继发性甲状旁腺功能亢进症和 / 或维生素 D- 响应疾病的药物中的应用,其中所述维生素  $\text{D}_3$  补充剂为 25-羟基维生素  $\text{D}_3$ ,其中所述维生素  $\text{D}_2$  补充剂为 25-羟基维生素  $\text{D}_2$ ,其中所述 25-羟基维生素  $\text{D}_3$  与所述维生素  $\text{D}_2$  补充剂的重量比或摩尔浓度比例为 60 : 1 至 1 : 20。

12. 如权利要求 11 所述的应用,其中所述联合给药包括以治疗有效量给予所述维生素  $\text{D}_3$  补充剂,以及以能有效降低维生素 D 毒性的量给予所述维生素  $\text{D}_2$  补充剂。

13. 根据权利要求 11 或 12 所述的应用,其中所述维生素  $\text{D}_3$  补充剂与所述维生素  $\text{D}_2$  补充剂的重量比或摩尔浓度比例范围为 60 : 1 ~ 1 : 1。

14. 根据权利要求 13 所述的应用,其中所述维生素  $\text{D}_3$  补充剂与维生素  $\text{D}_2$  补充剂的重量比或摩尔浓度比例至少为 1.5 : 1。

15. 根据权利要求 14 所述的应用,其中所述维生素  $\text{D}_3$  补充剂与维生素  $\text{D}_2$  补充剂的重量比或摩尔浓度比例至少为 2 : 1。

16. 根据权利要求 11 或 12 所述的应用,其中所述给药为以大于  $2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{天}$  的量给予 25-羟基维生素  $\text{D}_3$ 。

17. 根据权利要求 11 或 12 所述的应用,其中所述维生素 D<sub>3</sub> 补充剂和所述维生素 D<sub>2</sub> 补充剂在相互间隔 6 小时内给药;其中可选地所述给药包括 (i) 首先给予所述维生素 D<sub>3</sub> 补充剂,然后在血清中可检测到所述维生素 D<sub>3</sub> 补充剂或维生素 D<sub>3</sub> 补充剂的代谢产物时给予所述维生素 D<sub>2</sub> 补充剂;或 (ii) 首先给予维生素 D<sub>2</sub> 补充剂,然后在血清中可检测到所述维生素 D<sub>2</sub> 补充剂或维生素 D<sub>2</sub> 补充剂的代谢产物时给予所述维生素 D<sub>3</sub> 补充剂。

18. 根据权利要求 11 或 12 所述的应用,其中所述给予所述维生素 D 补充剂为对诊断患有维生素 D 不足和 / 或缺乏的患者给予所述维生素 D 补充剂。

19. 根据权利要求 18 所述的应用,其中所述给予所述维生素 D 补充剂为以足以提高和 / 或保持受治疗者的血清 25- 羟基维生素 D 水平为至少 30ng/mL 的量给予所述维生素 D 补充剂。

20. 根据权利要求 11 或 12 所述的应用,其中所述受治疗者是人。

## 治疗维生素 D 不足和缺乏、继发性甲状旁腺功能亢进症和 维生素 D- 响应疾病的组合物及其相应的制药用途

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据 35U. S. C. § 119(e) 法条要求 2007 年 4 月 25 日提交的美国临时专利申请 60/913,849 的权益。

### 技术领域

[0003] 本发明主要涉及用于降低与使用维生素 D<sub>2</sub>、激素原 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>、活性激素 1, 25-二羟基维生素 D<sub>3</sub> 或维生素 D<sub>3</sub> 类似物（包括羟基形式和二羟基形式）治疗相关的毒性的方法和剂型。

### 背景技术

[0004] 称为 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>（总称为“25-羟基维生素 D”）的维生素 D 代谢物是维生素 D 激素的脂溶性类固醇激素原，它们有利于保持血流中钙和磷的正常水平。主要通过位于肝脏内的一种或多种酶，由维生素 D<sub>2</sub>（麦角钙化醇）产生激素原 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>，由维生素 D<sub>3</sub>（胆钙化醇）产生 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>。这两种激素原还可在肝脏外由某些细胞中的维生素 D<sub>2</sub> 和维生素 D<sub>3</sub>（总称为“维生素 D”）产生，这些细胞，例如为肠上皮细胞，包含与肝脏中发现的酶相同或相似的酶。

[0005] 这些激素原进一步在肾脏中代谢为有效激素。激素原 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 代谢为称作 1 $\alpha$ , 25-二羟基维生素 D<sub>2</sub> 的激素；同样，25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 代谢为 1 $\alpha$ , 25-二羟基维生素 D<sub>3</sub>（骨化三醇）。激素原产生这些激素也可在肾脏外包含所需酶的细胞中出现。

[0006] 维生素 D 激素对人类健康具有必不可少的作用，这些作用由细胞内的维生素 D 受体（VDR）介导。具体地，维生素 D 激素通过控制小肠对饮食钙的吸收和肾脏对钙的再吸收来调节血钙水平。过量的激素水平，无论是暂时的还是长期的，都会导致不正常提高的尿钙（高钙尿症）、血钙（高钙血症）和血磷（高磷血症）。维生素 D 激素还参与细胞分化和生长的调节、甲状旁腺对甲状旁腺激素（PTH）分泌的调节和正常的骨形成和代谢的调节。此外，维生素 D 激素为肌肉骨骼系统、免疫系统和肾素-血管紧张素系统的正常机能所需。基于已证实的几乎每个人体组织中都存在细胞内 VDR 和多种维生素 D 响应基因，正在提出并阐明维生素 D 激素的许多其它作用。

[0007] 维生素 D 激素对具体组织的作用取决于它们结合到（或占据）那些组织中的细胞内 VDR 的程度。激素原 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 对 VDR 具有基本相同的亲和力，估计它们的亲和力比维生素 D 激素的亲和力低至少 100 倍。因此，在没有事先代谢成维生素 D 激素的情况下，生理浓度的 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 具有非常小的生物学作用（如果有的话）。但是，比正常高 10 ~ 1000 倍范围内的超生理浓度的 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 可充分占据 VDR 以发挥与维生素 D 激素一样的作用。

[0008] 在通过日晒或未补充的饮食而持续、充足供应维生素 D 的条件下，激素原和维生素 D 激素的血浓度在整个白天通常恒定。但是，在给予现行的维生素 D 补充剂后，特别是以

远超过预防维生素 D 缺乏症、佝偻病或骨软化症所需最小量的剂量给予维生素 D 补充剂后, 25-羟基维生素 D 的血浓度能显著提高。在 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 或 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的快速静脉给药后, 或者在立即释放剂型的这些化合物给药后, 激素原血浓度也会显著提高。

[0009] 当维生素 D 供应不足时, 例如在诸如维生素 D 不足或维生素 D 缺乏 (或者维生素缺乏症 D) 的情况下, 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的产生降低。25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的产生降低导致 25-羟基维生素 D 血浓度低。维生素 D 供应不足通常发生在下述这些人体中: 日晒不足、维生素 D 摄入长期不足, 或患有导致脂溶性维生素 (例如维生素 D) 肠吸收降低的疾病或经历过诸如肥胖手术 (bariatric surgery) 等临床过程。近来报道了生活在北纬的大部分人维生素 D 供应不足。如果不经治疗, 维生素 D 供应不足会导致严重的骨骼疾病, 包括佝偻病和骨软化症, 并会促使许多其它疾病发生, 包括骨质疏松症、脊柱和髌的非外伤性骨折、肥胖症、糖尿病、肌无力、免疫缺陷、自身免疫疾病、高血压、牛皮癣和各种癌症。

[0010] 美国国家科学院的医学研究院 (IOM) 已计算出取决于个体年龄和性别健康人体的维生素 D 的充足摄入量 (AI) 范围为每天 200 ~ 600IU [Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Dietary reference intakes: calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington, DC: National Academy Press (1997), 通过引用合并于此]。维生素 D 的 AI 主要基于足以预防维生素 D 缺乏症、佝偻病或骨软化症的血清 25-羟基维生素 D 浓度 (或者至少 11ng/mL) 来确定。基于更高剂量伴随有增加高钙尿症、高钙血症和相关后遗症, 包括心脏心律不齐、癫痫发作 (seizures), 以及普遍的血管和其它软组织钙化的风险的证据, IOM 还建立了每天 2000IU 的维生素 D 的可耐受最高摄入量 (UL)。

[0011] 现行的口服维生素 D<sub>3</sub> 补充剂对于安全地实现并保持最佳的血液 25-羟基维生素 D 浓度远远不够理想。这些制剂通常包含 400IU ~ 5000IU 的维生素 D<sub>3</sub> 并配制为在胃肠道中快速立即释放。当长期高剂量服用时, 如为了保证维生素 D 充足而通常所要求的, 这些产品会产生毒性。

[0012] 在某些个体中经常需要 UL 以上的维生素 D<sub>3</sub> 补充; 但是, 由于给予会产生毒性的高剂量的维生素 D 化合物问题, 现行的口服维生素 D<sub>3</sub> 补充剂不太适于保持血液 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 浓度为最佳浓度。

[0013] 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的给药会产生血液和细胞内 25-羟基维生素 D 浓度的激增或峰值, 从而增大了表现为高钙血症和高钙尿症的毒性。

[0014] 显然, 在现行口服维生素 D 补充剂面临的安全问题上, 需要维生素 D 补充的备选方法。

## 发明内容

[0015] 本发明主要涉及有效并安全地恢复血液 25-羟基维生素 D 至最佳浓度 (对患者定义为 > 30ng/mL 25-羟基维生素 D, 或 > 75nmol/L) 并保持血液 25-羟基维生素 D 浓度在该最佳水平的方法, 防止血液 25-羟基维生素 D 浓度降低至低于该最佳水平的方法, 以及预防或治疗继发性甲状旁腺功能亢进症的方法。

[0016] 血清 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的过度提高会产生毒性。这种毒性的一种表现可归因于

提高的血清钙浓度,包括心脏心律不齐、癫痫发作以及普遍的血管和其它软组织钙化。本发明基于以下论证,即通过 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 的联合给药能降低或消除与使用激素原 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 治疗有关的毒性。本发明还基于以下思想,即 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 与 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 一起联合给药能比单独给予任何一种更有效地提高 25-羟基维生素 D 的血清浓度而不产生毒性。

[0017] 因此,本发明涉及能用于以安全且有效的方式恢复血清 25-羟基维生素 D 浓度至正常水平(至少 30ng/mL)或高于正常水平的方法、组合物、剂型和试剂盒,以防止不正常水平的血清 25-羟基维生素 D 的出现或严重化,和/或预防或治疗继发性甲状旁腺功能亢进症。

[0018] 在一个方案中,本发明的方法包括按足以降低与一种或多种维生素 D<sub>3</sub> 补充剂给药相关的维生素 D 毒性的量,对受治疗对象(动物或人类患者)按剂量给予一种或多种维生素 D<sub>2</sub> 补充剂。在示例性实施方式中,根据本发明的维生素 D<sub>3</sub> 补充剂为维生素 D<sub>3</sub>(胆钙化醇)、25-羟基维生素 D<sub>3</sub>、1 $\alpha$ ,25-二羟基维生素 D<sub>3</sub>,或维生素 D<sub>3</sub> 类似物(包括所有已知的羟基和二羟基形式),包括 1,25-二羟基-19-去甲-维生素 D<sub>3</sub>(1,25-dihydroxy-19-nor-vitamin D<sub>3</sub>)、1 $\alpha$ -羟基维生素 D<sub>3</sub>,以及本领域已知的其它化合物。在示例性实施方式中,根据本发明的维生素 D<sub>2</sub> 补充剂为麦角钙化醇或 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 或 1,25-二羟基维生素 D<sub>2</sub>,以及本领域已知的其它化合物。

[0019] 可在治疗期间单独或以某一组合给予一种或多种维生素 D<sub>2</sub> 补充剂;类似地,可在治疗期间单独或以某一组合给予一种或多种维生素 D<sub>3</sub> 补充剂。优选地,维生素 D<sub>3</sub> 补充剂以治疗有效量给药(例如能有效预防或治疗维生素缺乏症 D 和/或继发性甲状旁腺功能亢进症的量),同时维生素 D<sub>2</sub> 补充剂以能有效降低维生素 D 毒性的量给药。在一些实施方式中,维生素 D<sub>2</sub> 补充剂的给予使得维生素 D<sub>3</sub> 补充剂可以以正常预计会产生副作用或毒性的量给药。维生素 D<sub>2</sub> 补充剂和维生素 D<sub>3</sub> 补充剂可用相同或不同途径给药,例如口服给药、静脉给药、局部给药、腹膜内给药和/或透皮给药,并可在相同或不同组合物中给药。维生素 D<sub>2</sub> 补充剂和维生素 D<sub>3</sub> 补充剂在治疗期间可同时给药或在不同但交叠的时间(例如每隔一日或同一天的不同时间)给药。优选地,维生素 D<sub>2</sub> 补充剂和维生素 D<sub>3</sub> 补充剂在同一天给药。

[0020] 在示例性实施方式中,维生素 D<sub>3</sub> 与维生素 D<sub>2</sub> 补充剂的比例(重量或摩尔浓度)范围为 100 : 1 ~ 1 : 20,例如 75 : 1、60 : 1、50 : 1、40 : 1、30 : 1、20 : 1、15 : 1、10 : 1、5 : 1、4 : 1、3 : 1、2 : 1、1.5 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 10 或 1 : 15。尽管本文中试验的比例是用重量测定的比例,但是此处所检测的 D<sub>2</sub> 和 D<sub>3</sub> 化合物的分子量相近;预计活性是基于摩尔的,由此该结果同样适用于用摩尔浓度测定的比例。

[0021] 在另一个方案中,本发明的方法包括向患者提供维生素 D<sub>3</sub> 补充剂(可选地以治疗有效量),并告知患者通过与维生素 D<sub>2</sub> 补充剂的联合给药可减少与这种维生素 D<sub>3</sub> 补充剂给药相关的副作用。

[0022] 在一个示例性实施方式中,该方法包括以简单组合的制剂或以两种分开的制剂通过包括静脉给药、口服给药、局部给药、腹膜内给药和透皮给药的各种途径联合给予 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 的组合。在相关实施方式中,25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 以治疗有效量给药以提高血清 25-羟基维生素 D 浓度,优选提高 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 浓度至 30ng/mL 或更高,且 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 以毒性降低的量给药。与单独给予 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 相比,

25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 与一定量的 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 联合给药能有效提高血清 25-羟基维生素 D 浓度,同时显著降低毒性程度或毒性的危险。因此,25-羟基维生素 D 的血清浓度可更快速并安全地提高,和 / 或可给予更大量的 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>。

[0023] 在又一个实施方式中,本发明提供麦角钙化醇和胆钙化醇联合给药的方法,该方法与胆钙化醇单独给药相比具有安全性优点。

[0024] 在又一个实施方式中,本发明提供 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 与麦角钙化醇一起联合给药或胆钙化醇与 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 一起联合给药的方法。

[0025] 在本发明的方法中,维生素 D<sub>2</sub> 补充剂和维生素 D<sub>3</sub> 补充剂的剂量在它们的给药实现本发明说明的安全性益处的时间框架内一起给药或分别给药。例如,25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 可在 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 给药之前的 1 小时、6 小时、12 小时、24 小时或 2 天给药。相反,25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 可在 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 的给药之前的 1 小时、6 小时、12 小时、24 小时或 2 天给药。或者,可给患者指令每星期服用 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 一次、两次或三次,且每星期服用 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 一次、两次或三次,只要维生素 D<sub>2</sub> 补充剂和维生素 D<sub>3</sub> 补充剂每星期各服用至少一次(或者两次或三次)。根据以上说明的实施方式,25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 或它们的组合(可选地与其它治疗试剂一起)可以以每天约 1 ~ 100 μg 的累计剂量,以每天约 5 ~ 50 μg 的优选剂量,例如约 10 ~ 25 μg 的剂量给药。

[0026] 在另一个相关方案中,本发明提供包含维生素 D<sub>2</sub> 补充剂和维生素 D<sub>3</sub> 补充剂的组合物。在一些实施方式中,维生素 D<sub>3</sub> 补充剂以治疗有效量存在,而维生素 D<sub>2</sub> 补充剂以毒性降低量存在。在一些实施方式中,维生素 D<sub>3</sub> 补充剂将以如果单独提供则预计会产生副作用或毒性的量存在。这些组合物可以上文说明的任何比例包括上述维生素 D<sub>2</sub> 补充剂和 / 或维生素 D<sub>3</sub> 补充剂的任何一种。在示例性实施方式中,这些组合物为每单位剂量约 1 ~ 100 μg,例如每单位剂量约 10、25、50、75 或 100 μg 的累计单位剂量(25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 一起的总量)。在另一个示例性实施方式中,这些组合物是包含约 10、25、50、75 或 100 μg 的 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 以及另外的毒性降低量的 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 的单位剂量。

[0027] 在示例性实施方式中,一定量的 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 一起包括在制剂中,并在需要治疗时对人体或动物每天口服给药。在另一个实施方式中,一定量的 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 包括在适于静脉给药的等渗无菌制剂中,并在需要治疗时以每星期三次的方式逐渐注入人体或动物中。

[0028] 在又一个方案中,本发明的试剂盒包括包含维生素 D<sub>3</sub> 补充剂(可选地以治疗有效量)的容器,并贴有使用说明的标签,告知患者与该维生素 D<sub>3</sub> 补充剂给药相关的副作用可通过维生素 D<sub>2</sub> 补充剂的联合给药来降低。该试剂盒可进一步包括维生素 D<sub>2</sub> 补充剂(可选地以毒性降低的量)。

[0029] 前述简单说明已总体概述了本发明的特征方案,并将有助于进一步理解以下更完整详细的说明。参照该说明,将更清楚地理解本发明不限于文中说明的制造、化学组合物或应用的实施的方法或细节。制造、化学组合物、应用或实施的任何其它变体应明显认为是本发明的可选实施方式。本发明的具体变化、组成变更和化学物理属性的其它优点和更完整的理解将由详细说明书的查阅得到。

[0030] 同时,应理解的是文中使用的用词和术语用于说明的目的,并不应理解为对本发明的限制。文中“包括”、“具有”以及“包含”及其变体的使用旨在涵盖其后列出的条目及

其等价物,以及它们的补充条目和等价物。

### 附图说明

[0031] 图 1 示出了给予了 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的多种组合的大鼠中总的 25-羟基维生素 D 水平的分析结果。在图 1 中,\* 表示 P < 0.05,\*\* 表示 P < 0.001,且 \*\*\* 表示 P < 0.0001 的统计学意义。

[0032] 图 2 示出了给予了 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的多种组合的大鼠中血清钙水平的分析结果。

[0033] 图 3 示出了给予了 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的多种组合的大鼠肾脏中 CYP24 水平的分析结果。在图 3 中,\* 表示 P < 0.05 的统计学意义。

[0034] 图 4 示出了给予了 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的多种组合的大鼠中 1,25-二羟基维生素 D<sub>3</sub> 水平的分析结果。

[0035] 图 5 示出了给予了 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的各种组合的大鼠中 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 的代谢物水平的分析结果。

[0036] 图 6 示出了给予了 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的多种组合的大鼠中血清钙水平分析的不同研究的结果。

### 具体实施方式

[0037] 本发明涉及以组合的方式用足量的 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 与 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 一起对需要补充维生素 D 的受治疗者(动物或人类患者)剂量给药的方法,以有效且安全地恢复血液 25-羟基维生素 D 水平至最佳水平(对人类受治疗者和患者定义为 > 30ng/mL 25-羟基维生素 D)、保持血液 25-羟基维生素 D 水平为该最佳水平、防止血液 25-羟基维生素 D 降低至欠佳的浓度和预防或治疗继发性甲状旁腺功能亢进症。

[0038] 本发明的方法、组合物和试剂盒包括通过一种或多种维生素 D<sub>2</sub> 补充剂的联合给药来降低或消除与一种或多种维生素 D<sub>3</sub> 补充剂的给药有关的毒性。维生素 D<sub>2</sub> 补充剂与维生素 D<sub>3</sub> 补充剂一起的联合给药会导致诸如 CYP24 等分解代谢酶的诱导降低,因此导致与任何一种单独给药相比更有效地提高了总的 25-羟基维生素 D 的血清浓度。基于如下发现,即 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 表现出更易发生分解代谢成 24,25-二羟基维生素 D<sub>2</sub>,而 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 更易新陈代谢成活性 1,25-二羟基维生素 D<sub>3</sub> 形式,优选维生素 D<sub>3</sub> 补充剂与维生素 D<sub>2</sub> 补充剂的比例至少为 1 : 1、1.5 : 1、2 : 1、3 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1、60 : 1、75 : 1、100 : 1 或更高。

[0039] 维生素 D<sub>3</sub> 补充剂和维生素 D<sub>2</sub> 补充剂的联合给药可使得维生素 D<sub>3</sub> 补充剂可以以否则会被认为是接近、等于或高于长期给药而不产生副作用的上限的量给药;或者以大于约 1 μg/kg/天(基于该上限)的维生素 D<sub>3</sub> 的等量(分成每星期一次、两次或三次的剂量);或者大于 2 ~ 6 μg/kg/天的 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的等量(分成每星期一次、两次或三次的剂量);或者大于 0.01 ~ 0.02 μg/kg/天的 1,25-二羟基维生素 D<sub>3</sub> 的等量(分成每星期一次、两次或三次的剂量)。因此,本发明中可预期包含大于 50 μg 的维生素 D<sub>3</sub>、大于 50 μg 的 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 或大于 1 μg 的 1,25-二羟基维生素 D<sub>3</sub> 的单位剂量形式。

[0040] 如文中所用,以下定义会有助于技术从医者理解本发明:



[0041] 当针对维生素 D<sub>2</sub> 补充剂或维生素 D<sub>3</sub> 补充剂使用时,术语“联合给药”的意思是在交叠时间阶段内这两种试剂以允许它们都发挥各自药理学作用的方式给药。这些试剂能在相同制剂或不同制剂内给药、同时或不同时给药、通过相同途径或不同途径给药。例如,联合给药可包括在维生素 D<sub>2</sub> 补充剂给药后,当血清中可检测出维生素 D<sub>2</sub> 补充剂或者至少一种或所有代谢产物时的某个时间,例如 6 小时、8 小时、12 小时、24 小时(1 天)或 2 天内给予维生素 D<sub>3</sub> 补充剂。或者,联合给药可包括在维生素 D<sub>3</sub> 补充剂给药后,当血清中可检测出维生素 D<sub>3</sub> 补充剂或者至少一种或所有代谢产物时的某个时间,例如 6 小时、8 小时、12 小时、24 小时(1 天)或 2 天内给予维生素 D<sub>2</sub> 补充剂。在另一个实施方式中,可给患者总体指导为每星期服用维生素 D<sub>3</sub> 补充剂一次、两次或三次,同时每星期服用维生素 D<sub>2</sub> 补充剂一次、两次或三次,只要维生素 D<sub>2</sub> 补充剂和维生素 D<sub>3</sub> 补充剂每星期各服用至少一次(或者两次或三次)。

[0042] 术语“治疗有效量”取决于患者情况,为对实现所需临床效果有效的量,例如保持实验室测试值在正常范围内或对于该患者情况推荐的范围内,或者为对减少疾病的临床体征或临床症状的出现或严重性有效的量。在一些实施方式中,治疗有效量是对保持血清 25-羟基维生素 D 浓度或 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 浓度为约 30ng/mL(等于约 75nmol/L)或更高浓度有效的平均量。这种浓度可保持较长时间,例如至少一个月、至少三个月、至少六个月、九个月、一年或更长。在另一个实施方式中,治疗有效量是不需治疗而对实现血清甲状旁腺激素浓度(iPTH)由基准浓度降低至少 15%、20%、25%或 30%有效的平均量。在又一个实施方式中,治疗有效量是对达到 CKD 阶段-特异性 iPTH 目标范围有效的平均量,该目标范围对于阶段 3 为 35~70pg/mL(等于 3.85~7.7pmol/L),对于阶段 4 为 70~110pg/mL(等于 7.7~12.1pmol/L),对于阶段 5 为 150~300pg/mL(等于 16.5~33.0pmol/L)(在 K/DOQI Guideline No. 1 中定义)。当涉及维生素 D<sub>3</sub> 补充剂的量使用时,“治疗有效”可指单独给药时的维生素 D<sub>3</sub> 补充剂的有效量,或者指与维生素 D<sub>2</sub> 补充剂组合给药时的维生素 D<sub>3</sub> 补充剂的有效量。

[0043] 如文中所用,术语“维生素 D 毒性”的意思是指由 25-羟基维生素 D 的过量给药和过度提高的 25-羟基维生素 D 血液浓度产生的副作用,包括恶心、呕吐、多尿症、高钙尿症、高钙血症和高磷血症。在一些实施方式中,毒性表现为血清钙升到 10.2mg/dL 以上,和/或血清磷升到 4.6mg/dL 以上,和/或血清钙 x 磷产物升到 55 以上,和/或尿钙:肌酐比例升到 300mg/24 小时以上。

[0044] “维生素 D 不足和缺乏”通常定义为血清 25-羟基维生素 D 浓度低于 30ng/mL(等于约 75nmol/L)(National Kidney Foundation guidelines, NKF, Am. J. Kidney Dis. 42: S1-S202(2003),通过引用合并于此)。

[0045] 除非另作说明,文中所用的“25-羟基维生素 D<sub>2</sub>/25-羟基维生素 D<sub>3</sub>”旨在涵盖 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>、25-羟基维生素 D<sub>3</sub>,或它们的组合。

[0046] 除非另作说明,“25-羟基维生素 D”意在总体指代 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>。例如,25-羟基维生素 D 的检验血液浓度将包括 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>(如果存在的话)。

[0047] 文中所用的术语“维生素 D<sub>2</sub> 补充剂”是指麦角钙化醇、25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 或 1,25-二羟基维生素 D<sub>2</sub> 的前体、类似物或衍生物,它们具有能降低与维生素 D<sub>3</sub> 补充剂给药有

关的维生素 D 毒性的能力。

[0048] 文中所用术语“维生素 D<sub>3</sub> 补充剂”是指活化维生素 D 受体或能在人体内新陈代谢转变成活化维生素 D 受体的化合物的维生素 D<sub>3</sub>(胆钙化醇)、25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 或 1 $\alpha$ , 25-二羟基维生素 D<sub>3</sub> 的前体、类似物或衍生物,包括 1 $\alpha$ -羟基维生素 D<sub>3</sub>。

[0049] 还应特别理解的是文中引用的任何数值包括从最低值至最高值的所有值,即最低值和最高值之间计数的数值的所有可能组合将认为已在本申请中明确记载。例如,如果浓度范围或有益效果范围记为 1%~50%,意思是诸如 2%~40%、10%~30%或 1%~3%等值在本申请文件中明确列举。这些只是特别预期的实例。

[0050] 医学研究院的食品与营养委员会已断定建立维生素 D 的推荐饮食允许量 (RDA) 的科学数据不足。相反,推荐摄入量以充足摄入量 (AI) 给出,这代表维持健康人群中骨骼健康和正常钙代谢的日常维生素 D 摄入量。AI 通常设定为在具体年龄和性别群的几乎所有成员中满足或超过预防维生素 D 缺乏症、佝偻病或骨软化症所需的量(或者  $\geq 11\text{ng/mL}$ )。维生素 D 的 AI 可以微克 ( $\mu\text{g}$ ) 或国际单位 (IU) 列出。1  $\mu\text{g}$  维生素 D 的生物活性设定为等于 40IU。对于婴儿、儿童和成人的维生素 D 的 AI 示于以下表 1 中。

[0051] 表 1

[0052]

年龄	儿童 ( $\mu\text{g}/\text{天}$ )	男性 ( $\mu\text{g}/\text{天}$ )	女性 ( $\mu\text{g}/\text{天}$ )	妊娠 ( $\mu\text{g}/\text{天}$ )	哺乳 ( $\mu\text{g}/\text{天}$ )
出生~13 岁	5 (= 200IU)				
14~18 岁		5 (= 200IU)	5 (= 200IU)	5 (= 200IU)	5 (= 200IU)
19~50 岁		5 (= 200IU)	5 (= 200IU)	5 (= 200IU)	5 (= 200IU)
51~70 岁		10 (= 400IU)	10 (= 400IU)		
71 岁以上		15 (= 600IU)	15 (= 600IU)		

[0053] 医学研究院的食品和营养委员会已设定维生素 D 的可耐受最高摄入量 (UL) 为:对于婴儿至 12 个月龄为 25  $\mu\text{g}$  (1000IU),对于儿童、成人、怀孕和哺乳的妇女为 50  $\mu\text{g}$  (2000IU)。总的来说,UL 设定为关于维生素 D 的不会对健康产生副作用的最大日摄入量。长期高于 UL 的摄入会增加对健康的副作用的风险。对于婴儿、儿童和成人的维生素 D 的 UL 在以下表 2 中示出。

[0054] 表 2

[0055]

年龄	男性 ( $\mu\text{g}/\text{天}$ )	女性 ( $\mu\text{g}/\text{天}$ )	妊娠 ( $\mu\text{g}/\text{天}$ )	哺乳 ( $\mu\text{g}/\text{天}$ )
0~12 个月	25 (= 1,000IU)	25 (= 1,000IU)		
1~13 岁	50 (= 2,000IU)	50 (= 2,000IU)		
14~18 岁	50 (= 2,000IU)	50 (= 2,000IU)	50 (= 2,000IU)	50 (= 2,000IU)
19+ 岁	50 (= 2,000IU)	50 (= 2,000IU)	50 (= 2,000IU)	50 (= 2,000IU)

[0056] 其它报告表明 95  $\mu\text{g}/\text{天}$  (= 3800IU) 是观察到副作用的最低剂量。

[0057] 本发明的组合物、方法和试剂盒用于治疗需要补充维生素 D 的任何受治疗者,无论是预防性地防止维生素 D 不足或缺乏,还是治疗性地将低血清 25(OH) 维生素 D 浓度提高至正常范围或以上。本发明的组合物和方法还用于预防或治疗由低维生素 D 浓度导致的继发性甲状旁腺功能亢进症。通常,低于 5ng/mL 的血清 25(OH)D 值表明与佝偻病和骨软化症有关的严重缺乏症。尽管已建议 30ng/mL 作为正常范围的低端,更新的研究表明 PTH 浓度和钙吸收在血清总的 25(OH)D 浓度达到约 40ng/mL 时才为最佳 [还参见 Vieth, R. Prog Biophys Mol Biol. 2006Sep ;92(1) :26-32.]。文中所用术语“受治疗者”包括人类、哺乳动

物(例如狗、猫、啮齿类动物、绵羊、马、牛、山羊)、家养动物(veterinary animal)和动物园动物。

[0058] 需要补充维生素 D 的患者包括健康的受治疗者和具有维生素 D 不足或缺乏风险的受治疗者,例如,患有阶段 1、2、3、4 或 5 的慢性肾病的受治疗者;未饮用维生素 D 强化乳的婴儿、儿童和成人(例如乳糖不耐受的受治疗者,患有牛奶过敏性的受治疗者,不食用牛奶的素食者和母乳喂养的婴儿);患有佝偻病的受治疗者;深肤色的受治疗者(例如,在美国,4%的白种女性维生素 D 缺乏,相比之下,42%的 15 ~ 49 岁年龄的非洲裔美国女性维生素 D 缺乏);老年人(他们在日照时皮肤中合成维生素 D 的能力降低,并且还更可能待在室内);机构化的成人(institutionalized adult)(他们可能待在室内,包括患有阿尔茨海默病或精神病的受治疗者);遮盖所有暴露皮肤的受治疗者(诸如某些地区或文化的成员);总是使用遮光剂的受治疗者(例如使用阳光防护因子(SPF)为 8 的遮光剂使维生素 D 的产生降低 95%,且更高的 SPF 可进一步降低皮肤维生素 D 产生);患有脂肪吸收障碍综合症的受治疗者(包括但不限于囊肿性纤维化、胆汁淤积性肝病、其它肝病,胆囊疾病、胰酶缺乏、克罗恩病、炎性肠病、口炎性腹泻或乳糜泻,或者外科去除部分或全部胃和 / 或肠);患有炎性肠病的受治疗者;患有克罗恩病的受治疗者;已进行小肠切除术的受治疗者;患有齿龈病的受治疗者;服用提高维生素 D 分解代谢的药物的受治疗者,这些药物包括苯妥英、磷苯妥英、苯巴比妥、卡马西平和利福平;服用降低维生素 D 吸收的药物的受治疗者,这些药物包括消胆胺、考来替泊、奥利司他、矿物油和脂肪代用品;服用抑制维生素 D 活化的药物的受治疗者,包括酮康唑;服用降低钙吸收的药物的受治疗者,包括皮质类固醇;患有肥胖症的受治疗者(沉积在身体脂肪堆积物中的维生素 D 更难以生物利用);患有骨质疏松症的受治疗者和 / 或绝经后的妇女。根据医学研究院关于维生素 D 饮食参照摄入量的报告,食品消耗数据表明对于年轻妇女和年长妇女的维生素 D 的中值摄入量低于现行的推荐值;数据表明多于 50% 的年轻和年长妇女未消耗推荐量的维生素 D。可选择地,患有肾性骨营养不良症(包括骨软化症和囊性纤维性骨炎)的受治疗者的治疗排除在本发明的方法外。

[0059] 在另一个方案中,本发明的组合物和方法用于维生素 D- 响应疾病,即维生素 D、25(OH)D 或活性维生素 D(例如 1,25(OH)<sub>2</sub>D) 预防疾病发生或发展,或减轻疾病体征或疾病症状的疾病的预防性或治疗性治疗。这些维生素 D- 响应疾病包括癌症(例如乳癌、肺癌、皮肤癌、黑素瘤癌、结肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、前列腺癌和骨癌)。已观察到将 1,25(OH)<sub>2</sub>D 诱导细胞分化和 / 或抑制体外细胞增殖成大量细胞。维生素 D- 响应疾病还包括自身免疫疾病,例如, I 型糖尿病、多发性硬化、风湿性关节炎、多肌炎、皮炎、硬皮病、纤维变性、毒性弥漫性甲状腺肿、淋巴瘤性甲状腺肿、急性或慢性移植排斥反应、急性或慢性移植物抗宿主病、炎性肠病、克罗恩氏病、系统性红斑狼疮、斯耶格伦氏综合症、湿疹和牛皮癣、皮炎,包括特应性皮炎、接触性皮炎、过敏性皮炎和 / 或慢性皮炎。维生素 D- 响应疾病还包括其它炎性疾病,例如,哮喘、慢性阻塞性肺病、多囊肾病(PKD)、多囊卵巢综合症、胰腺炎、肾炎、肝炎,和 / 或感染。还报道了维生素 D- 响应疾病包括高血压和心血管疾病。因此,本发明预期了有心血管疾病风险或患有心血管疾病的受治疗者的预防性治疗或治疗性治疗,例如,患有以下疾病的受治疗者:动脉粥样硬化、动脉硬化、冠心病、脑血管病、周围血管疾病、心肌梗塞、心肌缺血、脑缺血、中风、充血性心力衰竭、心肌症、肥胖症或其它体重异常、脂类异

常（例如，高血脂、包括相关的糖尿病血脂异常和混合血脂异常低  $\alpha$ -脂蛋白血症、高甘油三酯血症、高胆固醇血症和低 HDL（高密度脂蛋白）、代谢障碍（例如新陈代谢综合症、II 型糖尿病、I 型糖尿病、高胰岛素血症、葡萄糖耐量降低、胰岛素耐受、包括神经病、肾病、视网膜病、糖尿病足溃疡和白内障的糖尿病并发症），和 / 或血栓症。

[0060] 本发明包括包含 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-维生素 D<sub>3</sub> 的口服、静脉和局部制剂的组合物和给予这些制剂以治疗 25-羟基维生素 D 不足和缺乏症，而不会导致与维生素 D 补充相关的严重副作用（维生素 D 毒性）的方法。

[0061] 本发明的组合物包括非常稳定的药用制剂，在这些制剂中为了便于日常口服将 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 合并于其中。公开的组合物在长期持续规则给药后，产生稳定持续的 25-羟基维生素 D 血液水平，并具有双重意想不到的好处：与迄今已知的维生素 D 或 25-羟基维生素 D 的制剂相比，在恢复血液 25-羟基维生素 D 至最佳浓度方面具有无以伦比的效果以及未被超越的安全性。

[0062] 在本发明的另一个实施方式中，可制备适于静脉给药的 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 与 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 组合的无菌、等渗制剂。为用于注射，这种制剂通过将 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 与 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 溶解在无水乙醇、丙二醇或其它适宜溶剂中，并将所得溶液与表面活性剂、盐和防腐剂在适宜体积的水中混合制备。这些制剂可直接给药、或通过肝素固定（heparin lock）由注射器缓慢给药，或通过加入到随时间平稳输入的更大体积的无菌溶液（例如生理盐水溶液）中给药。

[0063] 上述剂型还可包含佐剂，诸如保存或稳定化佐剂。它们还可包含其它有治疗价值的物质或可包含本说明书和所附权利要求书中说明的一种以上的物质。

[0064] 有利地，根据以上说明的实施方式，维生素 D<sub>2</sub> 补充剂和维生素 D<sub>3</sub> 补充剂与其它治疗试剂一起的组合可以每天 1 ~ 200mcg 的剂量口服或静脉给药，优选剂量总量为每天 5 ~ 100mcg。如果本发明的化合物与其它治疗试剂组合给药，将要给药的组合中的各化合物比例将取决于针对的具体疾病状态。例如，人们可选择口服给药维生素 D<sub>2</sub> 补充剂和维生素 D<sub>3</sub> 补充剂与一种或多种钙盐（拟作为钙补充剂或饮食磷酸盐结合剂）、双膦酸盐、拟钙剂（calcimimetics）、烟酸、铁、磷酸盐结合剂、活性维生素 D 固醇、升胰岛素（glycemic）和高血压控制剂，以及多种抗肿瘤药。此外，人们可选择与活性维生素 D 固醇、升胰岛素和高血压控制剂以及多种抗肿瘤药一起静脉给药 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>，或者 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和胆钙化醇，或者 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和麦角钙化醇。实际上，当所想要的目标是疾病状态的治疗时，可使用较高剂量的本发明的化合物，而较低剂量通常用于预防目的，应理解的是任何给定情况下给药的具体剂量应根据将要给药的具体化合物、要治疗的疾病、受治疗者的状况和其它可改变药物活性或受治疗者响应的相关医学因素调节，这对本领域技术人员是已知的。

[0065] 在上述服药方法中包含维生素 D<sub>3</sub> 补充剂和维生素 D<sub>2</sub> 补充剂的组合使得产生的剂型用于安全地支持维生素 D<sub>3</sub> 和维生素 D<sub>2</sub> 内分泌系统。目前可用的口服维生素 D 补充剂和先前销售的 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的口服剂型只支持一种或另一种系统。

[0066] 通过以下实施例进一步解释本发明，这些实施例不应理解为限制本发明的范围。

[0067] 实施例 1

[0068] 各种组合的 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 的联合给药降低了单独使用

25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 治疗观察到的毒性。

[0069] 为了测定与单独给予 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 相比,与 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 一起联合给药相关的毒性的降低,用 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 的各种组合对 90 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (SD 大鼠) 静脉给药连续治疗五天。在研究开始之前的一天,将大鼠随机选择、分成组并如表 3 中所示治疗:

[0070] 表 3

[0071]

组	25-羟基维生素 D <sub>2</sub> 用量(μg/kg)	25-羟基维生素 D <sub>3</sub> 用量(μg/kg)	动物数量/ 性别	剂量体积 (mL/kg)	给药频率	取血样时间 (hr)
1	0	0	6 雄性	0.8	每天一次,连续 5天,静脉 注射	给药前,24 h (第 2天) 和 120 h (第6天)
2	0.1	0				
3	0.3	0				
4	1.6	0				
5	6	0				
6	0	0.3				
7	0.1	0.3				
8	0.3	0.3				
9	1.6	0.3				
10	6	0.3				
11	0	6				
12	0.1	6				
13	0.3	6				
14	1.6	6				
15	6	6				

[0072] 对于各动物每天的治疗,通过静脉注射给药适宜材料。每天的治疗在每天的 3 小时范围内进行。在治疗的第一天(给药前)和第二次剂量给药前的第 2 天的 24 小时时间点(第一次注射的时间为 0),从组 1 ~ 15 中动物的颈静脉导管采集血液(~1mL)到未保存的试管中。将血清分离出来,并转移到新试管中,将新试管在约 -80°C 立即冷冻。在处死所有动物之前,在第 6 天的 120 小时,从所有动物的颈静脉导管采集血液(~2mL)至未保存的试管中。将血清分离出来,转移到新试管中,并在约 -80°C 立即冷冻。同样,在第 6 天 120 小时(最后一次给药后 24 小时)时,所有动物通过吸入二氧化碳安乐死,用心脏穿刺法收集全部血液。将血液放入未保存的(即红色塞子的)试管中。将血清分离,转移至新试管(1mL 等分部分)并在约 -80°C 立即冷冻。然后对所有动物进行尸体解剖。为了避免自溶变化,尸体的解剖检查尽可能快进行。对于各个动物,尸体解剖由外部检查以及内部“简化”检查构成,外部检查包括所有临床记录的损伤参数。

[0073] 用高效液相色谱法采用串联质谱检测法在血清样品中测定首次给药后的 120 小时时的总 25-羟基维生素 D 的浓度。该方法用于测定血清中 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 的单个浓度,且总浓度测定为以上浓度的总和。最后一次给药后 24h 时,对从动物收集的血清分析 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>、25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 和它们的代谢物的浓度变化。

[0074] 在肾脏中测定 CYP24 诱导如下：将八分之一 (1/8) 的肾脏切片并匀浆用于采用 TRIzol 法进行 RNA 分离。DNA 合成后，通过实时 RT-PCR 使用特异性 CYP24 探针，估计 Cyp24mRNA 的水平，并针对 Gapdh mRNA 标准化。

[0075] 图 1, 25-羟基维生素 D 浓度，表示了当连续 5 天每天对大鼠以上述剂量单独或组合给予 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 时总的血清 25-羟基维生素 D 的提高。

[0076] 表 4, 如下所示，表明了 5 天给药研究后总的动物尸体解剖发现的结果。仅在接受最高剂量的单独的 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> (6 μg/kg) 的一组动物中观察到严重的毒性症状（肺中有血液）。

[0077] 表 4

[0078]

组	25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (μg/kg)	25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (μg/kg)	总的尸体解剖发现
1	0	0	无
2	0.1	0	无
3	0.3	0	无
4	1.6	0	无
5	6	0	无
6	0	0.3	无
7	0.1	0.3	无
8	0.3	0.3	无
9	1.6	0.3	无
10	6	0.3	无
11	0	6	4/6 动物肺中有血
12	0.1	6	无
13	0.3	6	无
14	1.6	6	无
15	6	6	无

[0079] 图 2, 血清钙浓度，表明在接受了单独的 6 μg/kg 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的 11 组中观察到达到的最高血清钙浓度。这些动物还具有总的尸体解剖中的毒性症状。通过 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 的联合给药可降低或消除毒性，即使总的 25-羟基维生素 D 剂量浓度超过 6 μg/kg。

[0080] 该研究结果表明通过 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 的联合给药可降低或消除与 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 剂量有关的毒性，包括血清钙提高。即使小比例 (1 : 60) 的加入 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 可显著降低由 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 引起的血清钙的提高。在最极端的实例中，在 5 天的治疗期间给予 6 μg/kg 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的动物表现出了高钙血症，治疗过的 6 只动物中的 4 只尸体解剖时呈现出肺组织中有血。令人惊奇地，如果对动物用 0.1 μg/kg 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 6 μg/kg 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 联合给药，血清钙浓度达到正常且动物们不会呈现出任何毒性症状。即使对动物给药的 25-羟基维生素 D 的总量是 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 诱发毒性的量的两倍 (6 μg/kg/天 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 6 μg/kg/天 25-羟基维生素 D<sub>2</sub>)，也能保持其安全性优点。这些研究论证了将 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 用作 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 治疗中的保护剂。

[0081] 图 3 中的数据表明与 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 单独给药相比，25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 的联合给药导致更小的 CYP24 的上调。因此，数据表明 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 一起联合给药比任何一种单独给药能更有效地提高 25-羟基维生素 D 的

血清浓度。

[0082] 实施例 2

[0083] 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 的各种组合的联合给药降低了单独使用 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 治疗观察到的毒性的另一个研究。

[0084] 进行另一个研究以在 102 只雄性 SD 大鼠上评价与单独给予 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 相比, 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 与 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 联合给药的效果。将约 3 日龄、重量为约 175 ~ 250g 的大鼠分成每六只雄性一组。根据以下表 5, 每天一次连续五天通过颈静脉导管对这些组进行 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 各种组合 (或者相同体积的对照赋形剂) 的静脉给药。

[0085] 表 5

[0086]

治疗组( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	动物数量/性别	大鼠	剂量体积 ( $\text{mL}/\text{kg}$ )	给药频率
1. 赋形剂	6 只雄性	正常 装有颈静脉导 管	0.8	每天一 次连续 五天, 通 过颈静 脉导管 静脉注 射
2. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (4)				
3. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (8)				
4. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (4) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (0.2)				
5. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (4) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (0.4)				
6. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (4) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (0.8)				
7. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (4) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (1.6)				
8. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (4) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (2.4)				
9. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (4) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (3)				
10. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (4) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (4)				
11. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (8) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (0.4)				
12. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (8) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (0.8)				
13. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (8) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (1.6)				
14. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (8) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (3.2)				
15. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (8) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (4.8)				
16. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (8) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (6)				
17. 25-羟基维生素 D <sub>3</sub> (8) + 25-羟基维生素 D <sub>2</sub> (8)				

[0087] 每天相似时间进行给药, 在最后一次给药时间的三小时治疗窗范围内。第 0 天 (治疗的第一天) 采集血液用于分析, 且每天监控动物两次。所有组的动物在第 5 天, 最后一次给药后 24 小时安乐死, 用心脏穿刺收集血液。对所有大鼠进行简化尸体解剖。



[0088] 治疗第 5 天时的大鼠的血清钙浓度显示在图 6 中并证实了上文对于实施例 1 说明的数据。例如,  $4 \mu\text{g}/\text{kg}$  或  $8 \mu\text{g}/\text{kg}$  剂量的单独的 25-羟基维生素  $\text{D}_3$  导致高钙血症, 而  $8 \mu\text{g}/\text{kg}$  25-羟基维生素  $\text{D}_3$  与  $8 \mu\text{g}/\text{kg}$  25-羟基维生素  $\text{D}_2$  的组合剂量得到正常的血清钙浓度, 表明了包含 25-羟基维生素  $\text{D}_2$  能减轻与 25-羟基维生素  $\text{D}_3$  相关的毒性。

#### [0089] 实施例 3

[0090] 在用高剂量剂型的维生素 D 激素治疗晚期前列腺癌患者中的疗效和安全性研究。

[0091] 在用高剂量骨化三醇每周一次治疗的患有晚期前列腺癌的患者三个月研究中检测 25-羟基维生素  $\text{D}_2$  口服制剂的疗效和安全性。对于该研究, 25-羟基维生素  $\text{D}_2$  配制为包含在软胶胶囊中。将正在用高剂量骨化三醇和多西他赛进行治疗的患有晚期前列腺癌的 40 个患者分成两个相等的组。与每周的骨化三醇剂量一起, #1 组接受 2 ~ 20mcg 之间的 25-羟基维生素  $\text{D}_2$ , 而 #2 组接受安慰剂。参加之前, 所有的受治疗者提供两份空腹晨血样, 这两份血样的取样相隔至少一星期, 以确定血清钙、血浆完整的 PTH 和血清 25-羟基维生素 D 的治疗前基线值。每星期给药的骨化三醇给药后 24 小时由各受治疗者得到另外的空腹血样和 24 小时的尿采集样本, 用于测定血清钙和血清 25-羟基维生素 D。整个研究中, 在饮食学专家的指导下, 所有的受治疗者坚持约 1000 ~ 1500mg 的元素钙日摄入量 (根据需要, 由自己选择的饮食和钙补充剂中获取)。当研究结束时, 在对基线值适宜校正后按治疗组和试验剂型分析实验数据。所有组预计对于血清 25-羟基维生素 D (范围: 10.7 ~ 20.9ng/mL) 和血清钙 (范围: 8.72 ~ 9.31mg/mL) 具有对等的平均基线值。预计在研究过程中在安慰剂 (对照) 组中观察到增大的血清钙的实验平均值, 而预计在该治疗组中观察到血清钙浓度变化小很多 (例如无变化或增加减少)。在给药的第一个 2 ~ 3 个月期间, 预计接受 25-羟基维生素  $\text{D}_2$  的治疗组中的受治疗者表现出逐渐增大的血清 25-羟基维生素 D 浓度, 然后达到稳定状态浓度。预计在安慰剂组中比治疗组中更频繁地观察到高钙血症 (定义为血清钙高于 10.2mg/dL) 的出现 (Episode)。预期该研究的数据证明了用高剂量骨化三醇治疗前列腺癌患者的治疗中血清钙的提高可通过将 25-羟基维生素  $\text{D}_2$  加入到治疗计划中来控制或完全减轻。

#### [0092] 实施例 4

[0093] 呈现出维生素 D 缺乏的末期肾病患者中的疗效和安全性研究

[0094] 在要求规律的血液透析和诊断为维生素 D 不足的患有末期肾病 (ESRD) 的患者的三个月研究中测试静脉 25-羟基维生素  $\text{D}_3$ /25-羟基维生素  $\text{D}_2$  组合在恢复血清 25-羟基维生素 D 至最佳浓度 (> 30ng/mL) 中的疗效和安全性。该研究中检测的制剂是只包含 20mcg 25-羟基维生素  $\text{D}_3$  自身 (试验制剂 #1) 或 20mcg 25-羟基维生素  $\text{D}_3$  与 10mcg 25-羟基维生素  $\text{D}_2$  组合 (试验制剂 #2) 中任意一种的水性等渗无菌溶液。一共 75 个健康的高加索、亚洲、西班牙和非洲裔 - 美国人受治疗者参与该研究, 他们全部进行至少四个月规律的血液透析并具有低于 15ng/mL 的血清 25-羟基维生素 D 浓度。参与之前, 所有受治疗者提供两份空腹晨血样, 两份血样的取样相隔至少一星期, 以确定血清钙、血浆完整 PTH 和血清 25-羟基维生素 D 的治疗前基线值。在第 1 天的早晨, 将受治疗者随机分到三个治疗组中之一, 且开始对他们用试验制剂 #1 或 #2 或者用匹配的安慰剂每周给药三次。所有给药在规律的预定的血液透析期间进行, 并通过逐步注射 (1 ~ 5 分钟以上的时间内) 到从血液透析装置中出来的血液中。每隔一季度从各受治疗者获得其它空腹血样和 24-小时尿采集样本用于测定

血清钙、血浆完整 PTH 和血清 25-羟基维生素 D。整个研究中,在饮食学专家的指导下,所有的受治疗者坚持约 1000 ~ 1500mg 的元素钙日摄入量(根据需要,由自己选择的饮食和钙补充剂中获取)。当研究结束时,在对基线值适宜校正后按治疗组和试验剂型分析实验数据。所有组预计对于血清 25-羟基维生素 D(范围:10.7 ~ 11.9ng/mL)、血浆完整 PTH(范围:45.3 ~ 51.2pg/mL)和血清钙(范围:8.72 ~ 9.31mg/mL)具有对等的平均基线值。预计在安慰剂(调节)组中观察到任何一个实验平均值在研究过程中都没有明显变化。在给药的第一个 3 个月期间,预计接受 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 自身或 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>/25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 组合的两个治疗组中的受治疗者表现出逐渐增大的血清 25-羟基维生素 D 浓度,然后达到稳定状态浓度。在接受 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的治疗组中预计平均血清钙由基线显著增大,并预计显著高于安慰剂组中观察到的平均血清钙。预计接受 25-羟基维生素 D<sub>3</sub>/25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 组合的治疗组中的受治疗者表现出的血清钙浓度显著低于对于只有 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 自身的治疗组观察到的血清钙浓度,但与安慰剂组中观察到的血清钙浓度没有显著不同。预计在只接受 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 的治疗组中更频繁地观察到高钙血症(定义为血清钙高于 10.2mg/dL)的出现。预期该研究的数据证明了在提高血清 25-羟基维生素 D 方面,25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 与 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 组合的静脉剂型与只由 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 组成的剂型相比同等有效或更有效,而不会导致血清钙浓度显著提高。预计由该研究的结论支持将 25-羟基维生素 D<sub>3</sub> 和 25-羟基维生素 D<sub>2</sub> 组合是提高血清 25-羟基维生素 D 浓度的安全方式。

[0095] 文中引用的所有专利、出版物和文献通过引用完全合并于此。如果本发明和合并的专利、出版物和文献有矛盾,应遵照本发明。

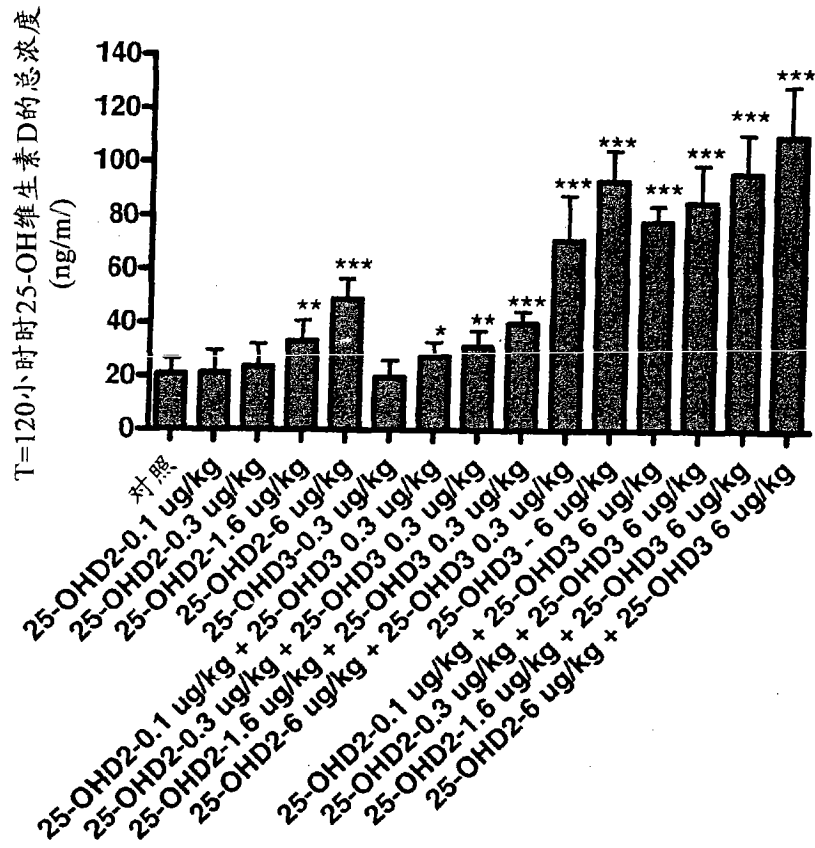


图 1

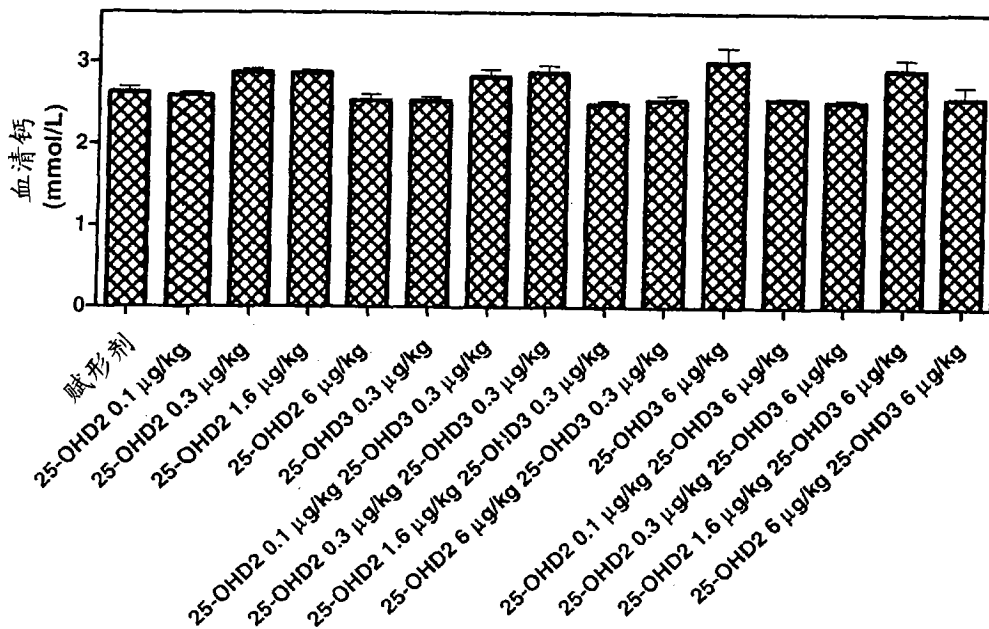


图 2

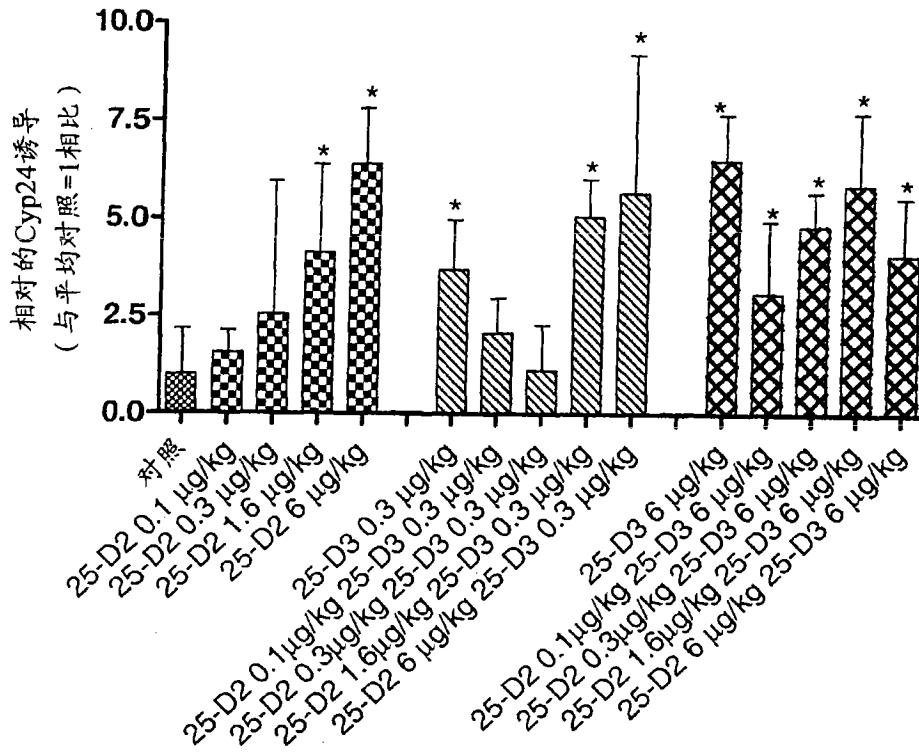


图 3

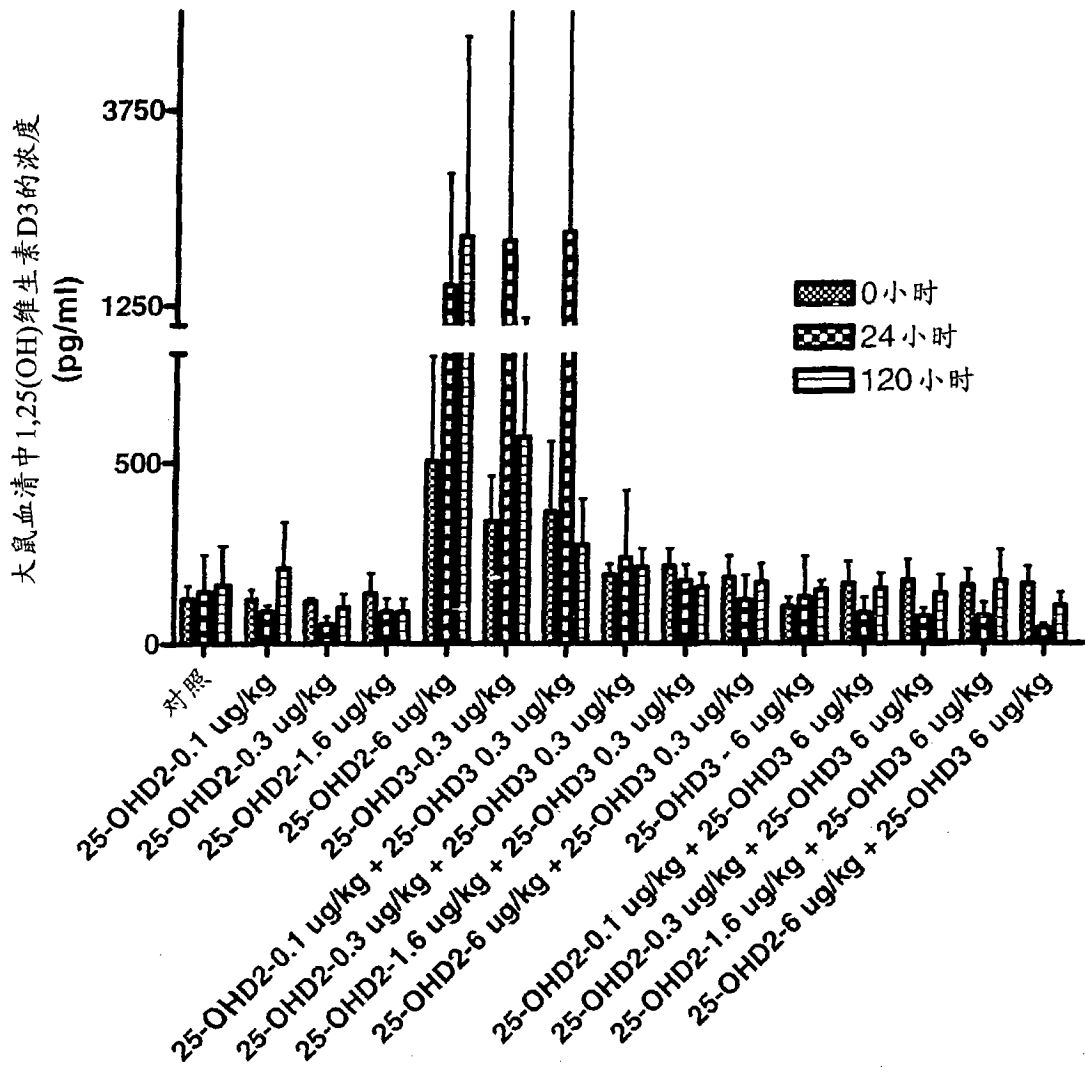


图 4

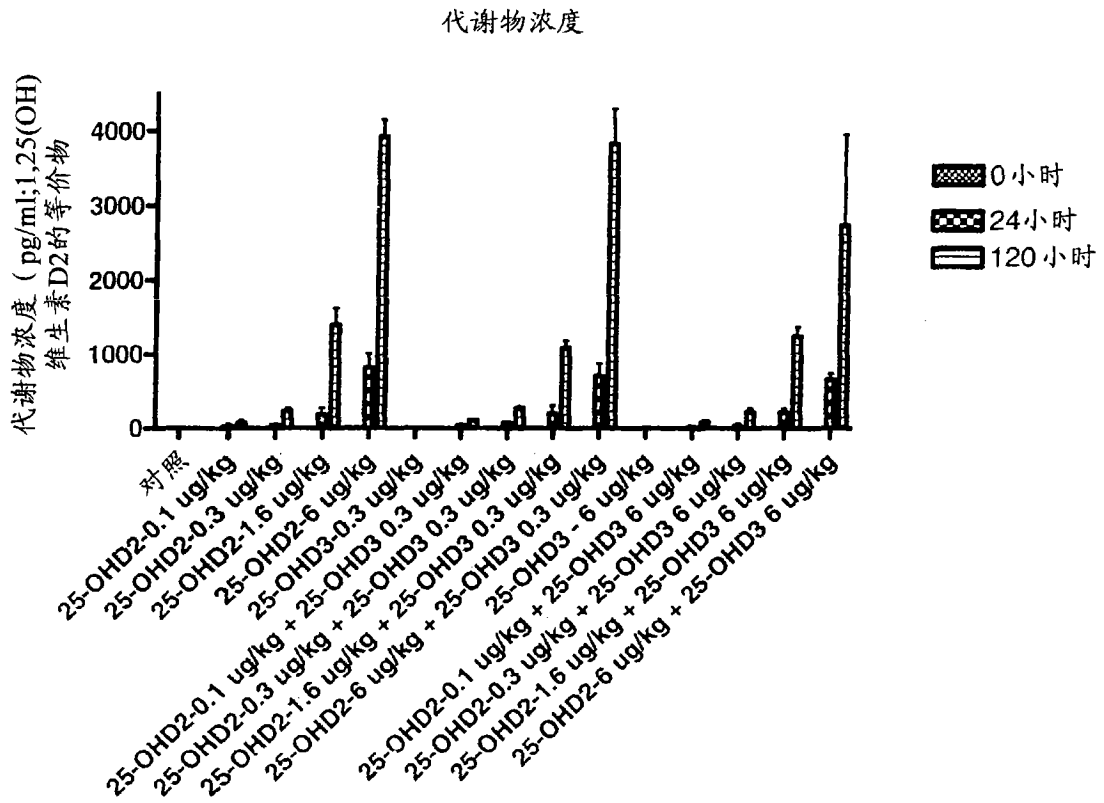


图 5

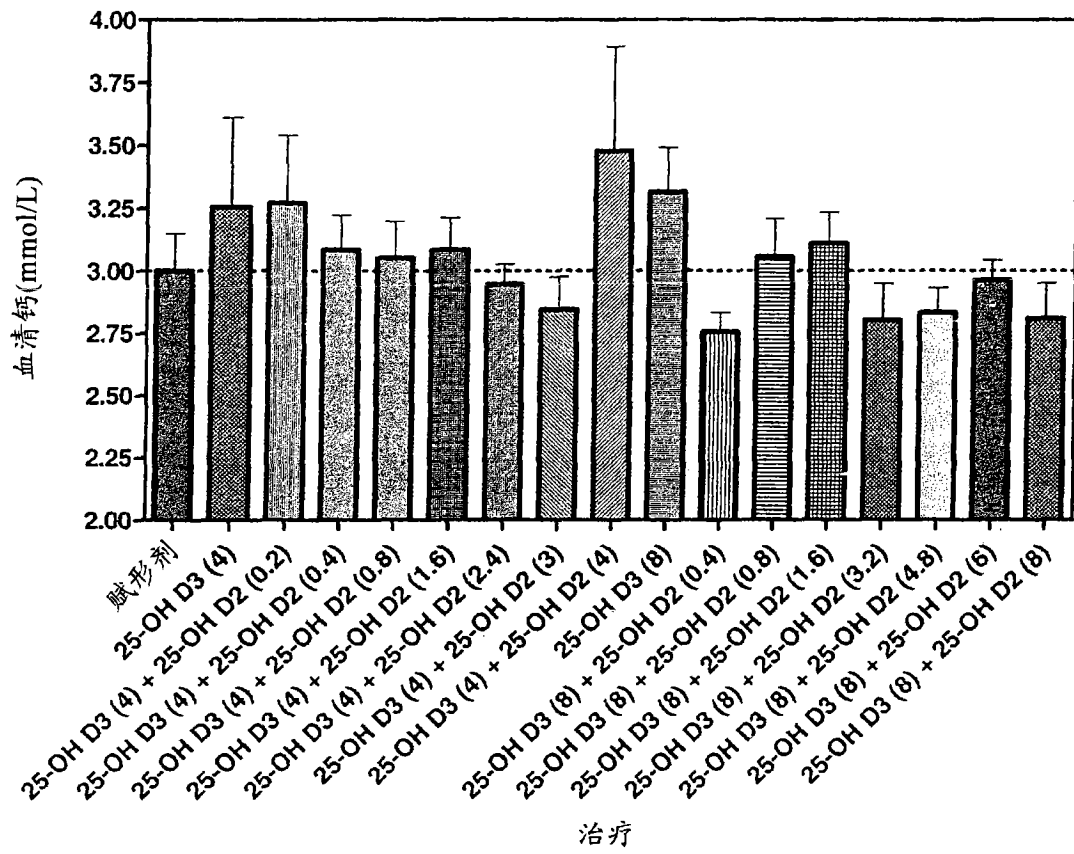


图 6