(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 558 828**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **85 01230**

(51) Int Cl⁴ : C 07 C 172/00; A 61 K 31/59.

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) Date de dépôt : 29 janvier 1985.

(30) Priorité : US, 30 janvier 1984, n° 575.114.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 31 du 2 août 1985.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : *Société dite : WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION.* — US.

(72) Inventeur(s) : Hector F. De Luca, Heinrich K. Schnoes, Rafal R. Sicinski et Yoko Tanaka.

(73) Titulaire(s) :

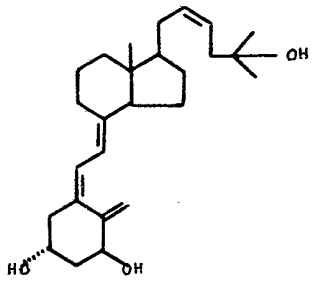
(74) Mandataire(s) : Bureau D. A. Casalonga, office Josse et Petit.

(54) « 1α,25-dihydroxy-22Z-déshydrovitamine D » composition pharmaceutique et procédé de préparation.

(57) L'invention concerne l'industrie pharmaceutique.

Elle a pour objet un nouveau dérivé de la vitamine D, à savoir la 1α,25-dihydroxy-22Z-déshydrovitamine D_2. Ce composé se distingue par une aptitude extrêmement élevée à augmenter les taux sériques de calcium.

Ce composé est donc préféré pour remplacer la vitamine D ou ses métabolites dans le traitement des affections osseuses et dans d'autres applications connues.



FR 2 558 828 - A1

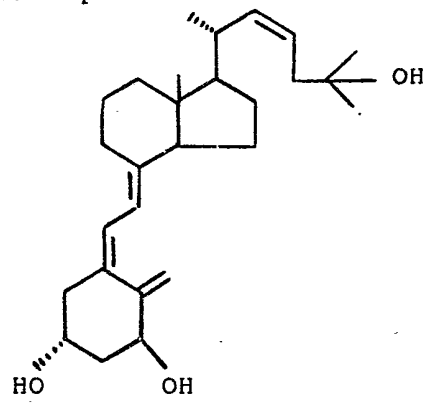
Vente des fascicules à l'IMPRIMERIE NATIONALE, 27, rue de la Convention — 75732 PARIS CEDEX 15

La présente invention concerne un dérivé biologiquement actif de la vitamine D, spécifiquement une vitamine D 1α,25-dihydroxylée comprenant une double liaison en 22,23-cis dans la chaîne latérale et un procédé pour la préparer.

L'homéostasie du calcium et du phosphate chez l'homme et les animaux est régie par les métabolites de la vitamine D et la 1α,25-dihydroxyvitamine D_3 est généralement considérée comme étant le dérivé le plus actif et le plus important de la vitamine D agissant comme régulateur de l'équilibre normal du calcium et du phosphate. Ce métabolite naturel et les composés qui lui sont apparentés par la structure sont dès lors d'un grand intérêt pharmaceutique comme agents efficaces pour la prévention et le traitement des affections osseuses et des troubles apparentés du métabolisme du calcium. Outre les métabolites D_3 naturels, on a préparé au cours des dernières années un certain nombre de composés qui, en raison de leur haute activité, trouvent une application ou sont prometteurs comme agents thérapeutiques, par exemple la 1α-hydroxyvitamine D_3, la 1α-hydroxyvitamine D_2, la 1α,25-dihydroxyvitamine D_2 et certains analogues fluorés. La plupart des analogues actifs connus sont caractérisés par la nature de la chaîne stéroïde latérale telle qu'elle existe dans la vitamine D_3 (c'est-à-dire une chaîne latérale saturée). Les analogues connus à chaîne latérale 22,23-insaturée sont des composés de la série de la vitamine D_2 (c'est-à-dire 22,23-trans-insaturés portant un radical méthyle en C-24) et sont notamment la 25-hydroxyvitamine D_2 et les dérivés 24- et 24,25-dihydroxylés, outre trois composés exempts du radical méthyle en C-24.

La Demanderesse a découvert à présent un

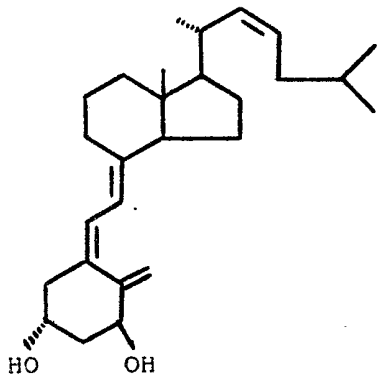
nouvel analogue de la vitamine D qui fait l'objet de l'invention et qui répond à la formule I



I

Ce nouveau composé est caractérisé par une double liaison en 22,23 dans la chaîne latérale ayant la géométrie en cis (ou Z). En raison de l'existence de cette double liaison en 22Z, qui conduit à une géométrie de la chaîne latérale fort différente de celle des composés comprenant une chaîne latérale saturée normale (comme dans la 1α,25-dihydroxyvitamine D_3) ou une chaîne 22,23-trans (22E)-insaturée (comme dans la 1α,25-dihydroxyvitamine D_2), il fallait s'attendre à ce que ce composé cis-insaturé ne manifeste que peu ou pas d'activité biologique. Chose surprenante, ce composé manifeste une activité élevée puisqu'il est aussi actif que la 1α,25-dihydroxyvitamine D_3 par son aptitude à élever les taux sériques de calcium chez les animaux soumis à l'épreuve.

Le composé de l'invention (composé I) peut être préparé d'une 22Z-déshydrovitamine D, qui est un précurseur de formule II ci-après, par une hydroxylation enzymatique in vitro au niveau de l'atome de carbone 25 au moyen d'une préparation homogénéisée de foie provenant de rats déficients en vitamine D.



II

On applique le procédé suivant: on donne à des rats mâles qui viennent d'être sevrés une alimentation pauvre en calcium et déficiente en vitamine D telle que décrite par Suda et al. [J.Nutr. 100, 1049 (1970)] pendant 2 semaines. On les sacrifie par décapitation et on prélève les foies. On prépare un produit d'homogénéisation à 20% (p/v) dans du saccharose 0,25 M glacé. On exécute l'incubation dans 10 ml de milieu d'incubation dans un Erlenmeyer de 125 ml contenant une aliquote du produit d'homogénéisation de foie représentant un 1 g de tissu, du saccharose 0,125 M, du tampon au phosphate 50 mM (pH 7,4),du glucose-6-phosphate 22,4 mM, de l'ATP 20 mM, du nicotinamide 160 mM, du succinate 25 mM, du NADP 0,4 mM, du $MgCl_2$ 5 mM, du KCl 0,1 M et 0,5 unité de glucose-6-phosphate-déshydrogénase. On amorce la réaction par addition de 400 µg du substrat ou composé II ci-dessus en solution dans 100 µl d'éthanol à 95%. On met le mélange à incuber à 37°C avec secouage à 80 oscillations par minute pendant 3 heures. On arrête la réaction par addition de 20 ml de méthanol et de 10 ml de dichlorométhane. Après addition d'encore 10 ml de dichlorométhane, on recueille la phase organique tandis qu'on ré-extrait la phase aqueuse avec 10 ml de dichlorométhane. On combine les phases organiques d'un total de trois extractions et on les évapore à l'évaporateur rotatif. On dissout le résidu

contenant le produit recherché dans 1 ml d'un mélange $CHCl_3$:hexane (65:35) et on l'applique sur une colonne de Sephadex LH-20 (0,7 cm x 14 cm) remplie, mise à l'équilibre et éluée avec le même solvant. On rejette les 10 premiers ml et on recueille les 40 ml suivants qu'on évapore. On dissout le résidu ensuite dans du 2-propanol à 8% dans de l'hexane et on le soumet à la chromatographie liquide à haute performance (Modèle LC/GPC 204 HPLC, Waters Associates, Medford, MA, EUA) au moyen d'une colonne Zorbax-SIL (4,6 mm x 25 cm, Dupont, Wilmington, Delaware, EUA) fonctionnant sous une pression de 1000 livres par pouce carré (70 kg/cm^2) au débit de 2 ml/minute. On élue le produit 25-hydroxylé recherché à 44 ml. On purifie ce produit davantage par chromatographie liquide à haute performance sur une colonne à phase inversée (Richrosorb Rp-18, 4,6 mm x 25 cm, E. Merck, Darmstadt, République Fédérale Allemande) fonctionnant sous une pression de 1200 livres par pouce carré (84 kg/cm^2) au débit de 2 ml/minute. On élue la colonne avec 22% de H_2O dans du méthanol et on élue le composé à 50 ml. On purifie le produit davantage par HPLC au moyen de la colonne Zorbax-SIL dans les conditions indiquées ci-dessus. On soumet le produit résultant ensuite à la caractérisation physique.

Caractérisation du produit

Le spectre d'absorption UV du produit dans l'éthanol à 95% présente un λ_{max} à 265 nm et un λ_{min} à 228 nm, indiquant la présence du chromophore 5,6-cis-triène.

Le spectre de masse de la substance contient un ion moléculaire à m/e 414, comme requis pour un produit 25-hydroxylé. L'élimination d'une et de deux molécules de H_2O donne des ions de fragments à m/e 396 et 378. La perte de toute la chaîne stéroïde latérale

(rupture à la liaison C_{17}/C_{20}) fait apparaître le fragment de m/e 287 qui, par élimination d'une et de deux molécules de H_2O, donne naissance aux pics à m/e 269 et 251. Le spectre comprend des pics importants à m/e 152 et 134 (152-H_2O) qui sont les fragments du cycle A et sont caractéristiques pour les 1α,3β-dihydroxyvitamines D. De plus, le spectre comprend un pic très important d'un fragment à m/e 59 qui résulte de la rupture de la liaison C_{24}/C_{25}. La présence de cet ion confirme l'existence du radical 25-hydroxyle dans le composé. Ces données établissent donc que le composé obtenu est le composé 1α,25-dihydroxylé de structure I ci-dessus.

Activité biologique

Les activités biologiques du nouvel analogue sont démontrées par une épreuve in vivo chez le rat. On donne à des rats mâles qui viennent d'être sevrés l'alimentation pauvre en calcium et déficiente en vitamine D de Suda et al. (voir ci-dessus) pendant 3 semaines. On les répartit ensuite en groupes comptant chacun 5 rats. On administre aux rats du groupe de contrôle 0,05 ml d'éthanol à 95% par injection à la jugulaire et on administre aux rats des autres groupes 325 pmoles de composé I ou de 1α,25-dihydroxyvitamine D_3 en solution dans 0,05 ml d'éthanol à 95%. On sacrifie les rats par décapitation 18 heures plus tard et on recueille le sang. On isole le sérum par centrifugation du sang et on le dilue avec une solution à 0,1% de chlorure de lanthane (1:20), puis on détermine la concentration sérique en calcium au spectrophotomètre d'absorption atomique. Les résultats sont rassemblés au tableau suivant:

Augmentation de la concentration sérique en calcium sous l'effet d'une dose unique de 325 pmoles du composé I ou de 1α,25-dihydroxyvitamine D_3 administrée 18 heures avant le sacrifice

Composé administré	Concentration sérique en calcium (mg/100 ml) ± écart type
éthanol	4,2 ± 0,1 a)
composé I	5,2 ± 0,2 b)
1α,25-dihydroxyvitamine D_3	5,4 ± 0,4 b)

b) est significativement différent de a) avec $p < 0,001$

Les résultats ci-dessus montrent que le nouvel analogue est hautement actif et manifeste une activité biologique sensiblement équivalente à celle de la 1α,25-dihydroxyvitamine D_3.

En raison de cette haute activité, le composé de l'invention peut trouver son application comme agent thérapeutique pour le traitement ou la prophylaxie de différentes affections comme les divers types de rachitisme, d'hypoparathyroïdisme, d'ostéodystrophie, d'ostéomalacie ou d'ostéoporose chez l'homme, ou bien pour le traitement d'insuffisances calciques pathologiques apparentées chez les animaux (par exemple fièvre de lait, ostéomalacie, fragilité de la coquille des oeufs). De même, le composé peut être administré pour le traitement de certaines affections malignes, comme la leucémie chez l'homme.

A des fins thérapeutiques, le composé peut être administré par toute voie classique et sous toute forme appropriée. Le composé peut être associé à un excipient pharmaceutique acceptable inoffensif quelconque sous forme, par exemple, de pilules, de comprimés, de capsules de gélatine ou de suppositoires ou sous forme de solutions, d'émulsions, de disper-

sions ou de suspensions dans des huiles ou solvants inoffensifs et ces compositions peuvent contenir d'autres constituants thérapeutiquement actifs et utiles que peut requérir l'application spécifique. Pour une application en médecine humaine, le composé est avantageusement administré en quantité, par exemple, de 0,25 à 10 µg/jour, la dose spécifique étant ajustée en fonction de la nature de l'affection à traiter, ainsi que du passé médical, de l'état et de la réponse du sujet, comme il est évident.

Le 22Z-déshydro-précurseur ou substrat (composé II) peut lui-même être préparé suivant le procédé du schéma I ci-après. Dans cette description, la désignation d'un composé par un chiffre arabe (comme (1), (2), (3), etc.) renvoie aux structures ainsi numérotées dans le schéma. Le substrat souhaité (composé II) est identifié par des chiffres arabes (11) dans le schéma I.

(22Z-3β-(Méthoxyméthoxy)-5α,8α-(4-phényl-1,2-urazolo)-cholesta-6,22-diène (2).

On fait réagir à 3-5°C sous agitation du bromure d'isopentényltriphosphonium $[(CH_3)_2CHCH_2CH_2PPh_3Br]$ (1,67 g, 4,04 millimoles) dans du tétrahydrofurane sec (73 ml) avec du n-butyllithium (solution 1,7 M dans l'hexane, 2,42 ml, 4,11 millimoles). Après 1 heure d'agitation à la température ambiante, on refroidit la solution rouge orangé jusqu'à 3°C et on y ajoute l'aldéhyde (1) (1,84 g, 3,36 millimoles) dans du THF sec (24 ml). On agite le mélange de réaction incolore jusqu'au lendemain à la température ambiante et on le verse ensuite dans de l'eau, puis on l'extrait au benzène. On lave l'extrait organique avec du HCl à 5%, du bicarbonate de sodium saturé et de l'eau, on le sèche (Na_2SO_4) et on le concentre sous vide en une huile qu'on purifie sur une colonne de

gel de silice. Par élution avec un mélange benzène-éther (94:6), on obtient le produit d'addition (2) (1,38 g, 68%) sous la forme d'une mousse:
RMN δ 0,83 (3H, s, 18-H_3), 0,89 et 0,91 (6H, chacun d, J=6,8 Hz, 26-H_3 et 27-H_3), 0,97 (3H, d, J=6,8 Hz, 21-H_3), 0,98 (3H, s, 19-H_3), 3,30 (1H, dd, J_1=4,4 Hz, J_2=14Hz, 9-H), 3,38 (3H, s, OCH_3), 4,33 (1H, m, 3-H), 4,70 et 4,81 (2H, q AB, J=6,8 Hz, OCH_2O), 5,21 (2H, m 1, 22-H et 23-H), 6,23 et 6,39 (2H, q AB, J=8,5 Hz, 6-H et 7-H), 7,41 (5H, m 1, Ar-H);
IR: 1756, 1703, 1601, 1397, 1046 cm^{-1};
spectre de masse, m/z 601 (M^+, 1%), 426 (4), 364 (61), 349 (16), 253 (18), 251 (18), 119 (PhNCO, 100).

(22Z)-5α,8α-(4-Phényl-1,2-urazolo)cholesta-6,22-diène-3β-ol (3).

On agite pendant 2 jours à la température ambiante une solution du produit d'addition (2) (601 mg, 1 millimole) et d'acide p-toluènesulfonique (523 mg, 2,75 millimoles) dans un mélange méthanol (20 ml)-THF (12 ml). On verse le mélange de réaction dans du bicarbonate de sodium saturé et on l'extrait à plusieurs reprises au benzène. On lave les extraits à l'eau, on les sèche (Na_2SO_4) et on les évapore sous pression réduite. Par purification du produit brut par chromatographie sur colonne (benzène-éther 70:30 comme éluant), on obtient le produit d'addition hydroxylé (3) (550 mg, 99%) sous la forme d'une mousse:
RMN δ 0,83 (3H, s, 18-H_3), 0,89 et 0,91 (6H, chacun d, J=6,8 Hz, 26-H_3 et 27-H_3), 0,95 (3H, s, 19-H_3), 0,98 (3H, d, J=6,8 Hz, 21-H_3), 3,16 (1H, dd, J_1=4,4 Hz, J_2=14 Hz, 9-H), 4,44 (1H, m, 3-H), 5,22 (2H, m 1, 22-H et 23-H), 6,22 et 6,39 (2H, q AB, J=8,5 Hz, 6-H et 7-H), 7,40 (5H, m 1, Ar-H);
IR: 3447, 1754, 1700, 1600, 1397 cm^{-1};
spectre de masse, m/z 557 (M^+, 1%), 382 (35), 349

(33), 253 (20), 251 (33), 119 (100), 55 (82).

(22Z)-Cholesta-5,7,22-triène-3β-ol (4).

On convertit le produit d'addition (3) (530 mg, 0,95 millimole) en le diène (4) par réduction au moyen d'hydrure de lithium-aluminium (1 g) dans du tétrahydrofurane (60 ml) au reflux pendant 18 heures. Après isolement de la manière habituelle, on purifie le produit par chromatographie sur de la silice (benzène-éther 94:6 comme éluant) pour obtenir à l'état de pureté le diène (4) (290 mg, 76%) après cristallisation dans l'éthanol, P.F. 148-151°C;

$[\alpha]_D^{24}$ = -132° (c=0,9, $CHCl_3$);

RMN δ 0,66 (3H, s, 18-H_3), 0,90 et 0,91 (6H, chacun d, J=6,8 Hz, 26-H_3 et 27-H_3), 0,96 (3H, s, 19-H_3), 0,98 (3H, d, J=6,9 Hz, 21-H_3), 3,64 (1H, m, 3-H), 5,20 (2H, m 1, 22-H et 23-H), 5,39 et 5,57 (2H, q AB, J=6 Hz, 7-H et 6-H);

UV λ_{max} 281 nm;

IR: 3346, 1463, 1375, 1364, 1067, 1040, 831 cm^{-1};

spectre de masse, m/z 382 (M^+, 100), 349 (65); 323 (32), 271 (15), 253 (30).

(5Z,7E,22Z)-9,10-Secocholesta-5,7,10(19),22-tétraène-3β-ol (5)

On irradie le 5,7-diène (4) (150 mg, 0,39 millimole) en solution dans de l'éther (120 ml) et du benzène (30 ml) (dégazé à l'argon pendant 40 minutes) à 0°C pendant 13 minutes au moyen d'une lampe UV et d'un filtre en Vycor. Par HPLC (1% de 2-propanol dans de l'hexane) du mélange résultant, on obtient la prévitamine (56,9 mg, 38%) sous la forme d'une huile incolore:

RMN δ 0,75 (3H, s, 18-CH_3), 0,90 et 0,91 (6H, chacun d, J=6,7 Hz, 26-H_3 et 27-H_3), 0,99 (3H, d, J=6,8 Hz, 21-H_3), 1,64 (3H, s, 19-H_3), 3,90 (1H, m, 3-H), 5,20

(2H, m 1, 22-H et 23-H), 5,69 et 5,95 (2H, q AB, J= 12 Hz, 7-H et 6-H);

UV λ_{max} 261 nm, λ_{min} 234 nm.

Par isomérisation thermique de cette prévitamine intermédiaire (56 mg, 0,15 millimole) dans de l'éthanol au reflux (3 heures), on obtient la vitamine analogue (5) huileuse (43 mg, 77%) après séparation par HPLC.

RMN δ 0,60 (3H, s, 18-H_3), 0,89 et 0,90 (6H, chacun d, J=6,7 Hz, 26-H_3 et 27-H_3), 0,97 (3H, d, J=6,6 Hz, 21-H_3), 3,96 (1H, s, 3-H), 4,82 et 5,05 (2H, chacun m étroit, 19-H_2), 5,20 (2H, m 1, 22-H et 23-H), 6,04 et 6,24 (2H, q AB, J=11,4 Hz, 7-H et 6-H);

UV λ_{max} 265,5 nm, λ_{min} 228 nm;

IR: 3427, 1458, 1379, 1048, 966, 943, 892 cm^{-1};

spectre de masse, m/z 382 (M^+, 21), 349 (5), 271 (8), 253 (14), 136 (100), 118 (82).

La vitamine analogue (5) est un composé connu (Bogoslovskii et al., J. Gen.Chem. USSR 48 (4), 828 (1978).

1-Hydroxylation du composé (5)

On ajoute du chlorure de p-toluènesulfonyle fraîchement recristallisé (50 mg, 0,26 millimole) à une solution de la vitamine (5) (50 mg, 0,13 millimole) dans de la pyridine sèche (300 microlitres). Après 30 heures à 4°C, on verse le mélange de réaction dans un mélange glace/$NaHCO_3$ saturé sous agitation. On agite le mélange pendant 15 minutes et on l'extrait au benzène. On lave l'extrait organique au $NaHCO_3$ saturé, au sulfate de cuivre saturé et à l'eau, on le sèche (Na_2SO_4) et on le concentre sous vide pour obtenir le tosylate huileux (6). On fait réagir le tosylate huileux (6) avec du $NaHCO_3$ (150 mg) dans du méthanol anhydre (10 ml) et on agite le mélange pendant 8,5 heures à 55°C. Après refroidissement et concentra-

tion à 2 ml, on dilue le mélange avec du benzène (80 ml), on le lave à l'eau, on le sèche (Na_2SO_4) et on l'évapore sous pression réduite. La 3,5-cyclovitamine D huileuse (7) ainsi obtenue est suffisamment pure pour être utilisée au stade suivant d'oxydation sans aucune purification. On ajoute de l'hydroperoxyde de t-butyle (16,5 µlitres, 0,118 millimole) à une suspension vivement agitée de SeO_2 (5,1 mg, 0,046 millimole) dans du CH_2Cl_2 sec (5 ml). Après 30 minutes, on ajoute de la pyridine sèche (50 µlitres) et on agite le mélange pendant encore 25 minutes à la température ambiante, on le dilue au CH_2Cl_2 (3 ml) et on le refroidit à 0°C. On ajoute ensuite la 3,5-cyclovitamine brute (7) dans du CH_2Cl_2 (4,5 ml). On laisse la réaction progresser à 0°C pendant 15 minutes, puis on réchauffe le mélange lentement (30 minutes) jusqu'à la température ambiante. On transvase le mélange dans une ampoule à décantation et on l'agite avec 30 ml de NaOH à 10%. On ajoute de l'éther (150 ml) et on lave la phase organique séparée avec du NaOH à 10% et de l'eau, puis on la sèche sur du Na_2SO_4. Par concentration à siccité sous vide, on obtient un résidu huileux jaune qu'on purifie par CCM sur plaque de gel de silice qu'on développe avec de l'hexane-acétate d'éthyle 7:3 pour obtenir la 1-hydroxycyclovitamine recherchée (20 mg, 37%):
RMN δ 0,59(3H, s, 18-H_3), 0,63 (1H, m, 3-H), 0,89 et 0,90 (6H, chacun d, J=6,9 Hz, 26-H_3 et 27-H_3), 0,96 (3H, d, J=6,9 Hz, 21-H_3), 3,25 (3H, s, -OCH_3), 4,17 (2H, m, 1-H et 6-H), 4,96 (1H, d, J=9,3 Hz, 7-H), 5,1-5,4 (4H, m 1, 19-H_2, 22-H et 23-H);
spectre de masse, m/z 412 (M^+, 26), 380 (48), 339 (22), 269 (28), 245 (20), 135 (100).
Le produit est composé principalement par la 1α-hydroxycyclovitamine D (8), ainsi que par une petite quan-

tité du 1β-hydroxy-épimère correspondant. On peut séparer ces constituants à ce stade si la chose est souhaitée, mais cette séparation n'est pas nécessaire.

On chauffe (55°C/15 minutes) la 1-hydroxy-cyclovitamine (18 mg) obtenue comme ci-dessus dans l'acide acétique glacial (0,8 ml), on neutralise le mélange (glace/$NaHCO_3$ saturé) et on l'extrait au benzène et à l'éther pour obtenir, après séparation par HPLC (1,5% de 2-propanol dans l'hexane comme éluant) les 1α-hydroxy-3β-acétoxyvitamines (9) (6,60 mg, 34%, élution à 42 ml) et (10) (4,20 mg, 22%, élution à 50 ml) à l'état de pureté.

Composé (9):

RMN δ 0,60 (3H, s, 18-H_3), 0,90 et 0,92 (6H, chacun d, J=7,0 Hz, 26-H_3 et 27-H_3), 0,97 (3H, d, J=6,8 Hz, 21-H_3), 2,04 (3H, s, -OCOC$\underline{H}_3$), 4,41 (1H, m, 1-H), 5,02 (1H, m étroit, 19-H), 5,1-5,4 (4H, m l, 3-,19-, 22- et 23-H), 6,03 et 6,35 (2H, q AB, J=11,4 Hz, 7-H et 6-H);

UV λ_{max} 264,5 nm, λ_{min} 227,5 nm;

spectre de masse, m/z 440 (M^+, 10), 380 (72), 362 (7), 269 (31), 251 (12), 135 (100), 134 (99).

Composé (10):

RMN δ 0,60 (3H, s, 18-H_3), 0,90 et 0,91 (6H, chacun d, J=7,0 Hz, 26-H_3 et 27-H_3), 0,97 (3H, d, J=6,9 Hz, 21-H_3), 2,05 (3H, s, -OCOC$\underline{H}_3$), 4,49 (1H, m, 1-H), 5,00 et 5,14 (2H, chacun m étroit, 19-H_2), 5,20 (3H, m l, 3-,22- et 23-H), 5,82 et 6,59 (2H, q AB, J=12,0 Hz, 7-H et 6-H);

UV λ_{max} 270 nm; λ_{min} 228 nm;

spectre de masse, m/z 440 (M^+, 4), 380 (30), 269 (10), 135 (100), 134 (52).

Hydrolyse du radical 3β-acétoxy des composés (9) et (10)

On hydrolyse séparément chacun des 3β-acé-

toxy-dérivés (9) et (10) suivant le même mode opératoire. On ajoute du KOH à 10% dans du méthanol (0,8 ml) à une solution de la 3β-acétoxyvitamine (0,7-6 mg) dans de l'éthanol (0,1 ml) et on chauffe le mélange pendant 1 heure à 50°C. Après isolement de la manière habituelle et purification finale par HPLC (8% de 2-propanol dans l'hexane comme éluant), on obtient les 1-hydroxyvitamines correspondantes, à savoir:

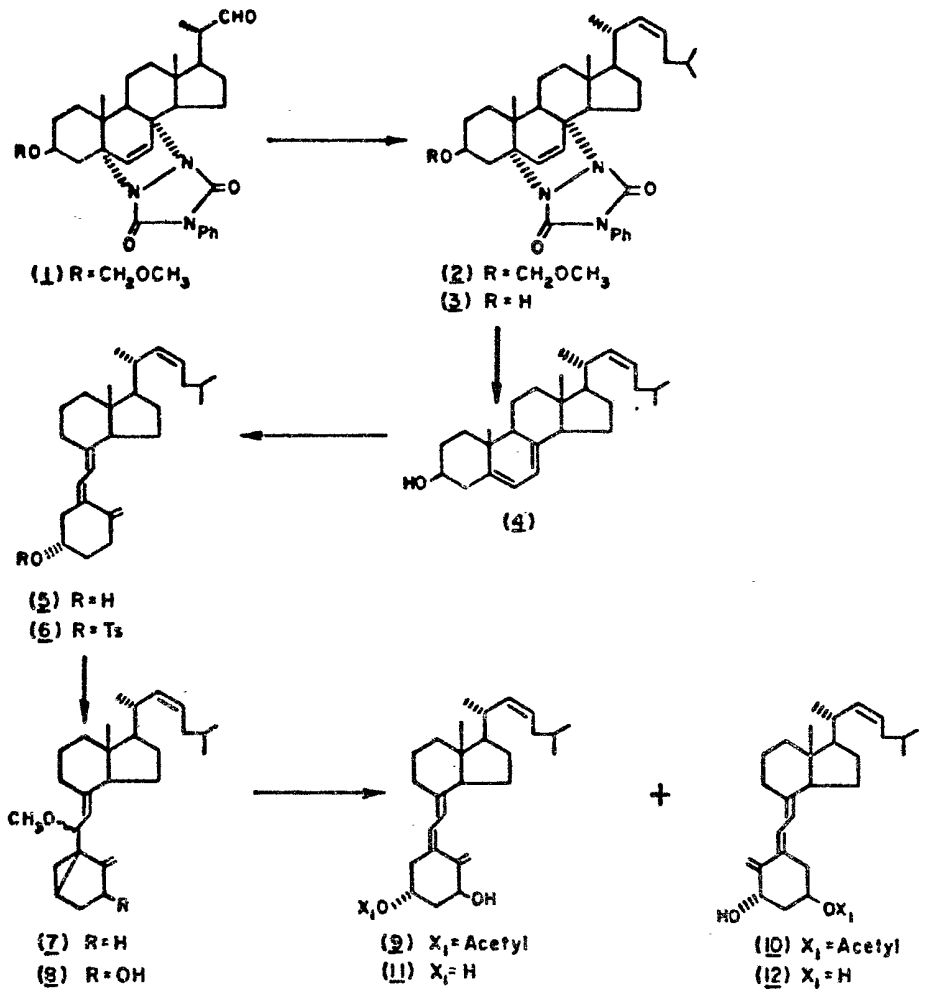
composé (11): (volume d'élution 39 ml).
RMN δ 0,59 (3H, s, 18-H_3), 0,89 et 0,90 (6H, chacun d, J=7,0 Hz, 26-H_3 et 27-H_3), 0,96 (3H, d, J=6,8 Hz, 21-H_3), 4,23 (1H, m, 3-H), 4,43 (1H, m, 1-H), 5,00 (1H, m étroit, 19-H), 5,1-5,4 (3H, m l, 19-, 22-, et 23-H), 6,02 et 6,39 (2H, q AB, J=11,4 Hz, 7-H et 6-H);
UV λ_{max} 264,5 nm, λ_{min} 227,5 nm;
spectre de masse, m/z 398 (M^+, 21), 380 (8), 287 (6), 269 (7), 251 (5), 152 (36), 134 (100).

Composé (12): (volume d'élution 38 ml).
RMN δ 0,61 (3H, s, 18-H_3), 0,89 et 0,91 (6H, chacun d, J=7,0 Hz, 26-H_3 et 27-H_3), 0,97 (3H, d, J=6,9 Hz, 21-H_3), 4,25 (1H, m, 3-H), 4,51 (1H, m, 1-H), 4,98 et 5,13 (2H, chacun m étroit, 19-H_2), 5,21 (2H, m l, 22-H et 23-H), 5,89 et 6,59 (2H, q AB, J=11,5 Hz, 7-H et 6-H);
UV λ_{max} 273 nm, λ_{min} 229,5 nm;
spectre de masse, m/z 398 (M^+, 17), 380 (4), 287 (5), 269 (5), 251 (4), 152 (29), 134 (100).

Dans le procédé décrit ci-dessus, on exécute la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) sur un appareil Waters Associates Modèle ALC/GPC 204 avec une colonne Zorbax-Sil (DuPont) (6,2 mm x 25 cm, débit 4 ml/minute, 1500 livres par pouce carré, 105 kg/cm^2). On exécute la chromatographie sur colonne sur du gel de silice 60 N° 70-230 ASTM (Merck). On

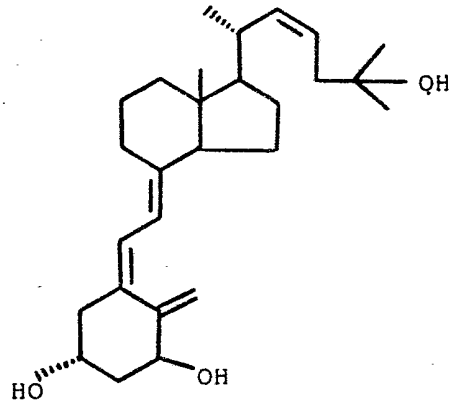
exécute la chromatographie préparative en couche mince (CCM) sur de la silice 60 PF-254 (plaques de 20 cm x 20 cm, 1 mm de gel de silice). On exécute les irradiations avec une lampe à arc au mercure Hanovia 608A36 munie d'un filtre en Vycor. Toutes les réactions sont effectuées de préférence en atmosphère inerte (par exemple d'argon). Si la chose est souhaitée, le composé de l'invention peut être obtenu aisément sous forme cristalline par cristallisation dans des solvants appropriés tels que l'hexane, des éthers ou des alcools (absolus ou aqueux),outre leurs mélanges, comme il est évident pour le spécialiste.

SCHEMA I


CHO
RO
N
N
O
N
Ph
O
(1) R = CH2OCH3
(2) R = CH2OCH3
(3) R = H
HO
(4)
RO
(5) R = H
(6) R = Ts
CH3O
R
(7) R = H
(8) R = OH
X1O
OH
(9) X1 = Acetyl
(11) X1 = H
+
HO
OX1
(10) X1 = Acetyl
(12) X1 = H

REVENDICATIONS

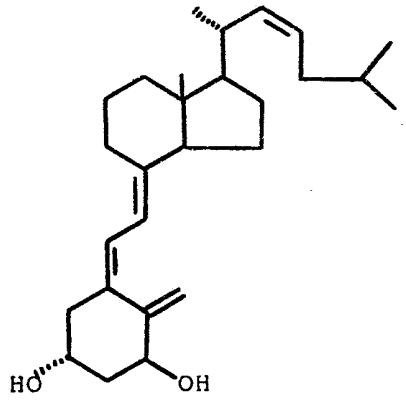
1 - Composé caractérisé par la formule:



2 - Composé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il se trouve sous forme cristalline.

3 - Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend le composé suivant la revendication 1 ou 2 conjointement avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

4 - Procédé de préparation d'un composé suivant la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on exécute l'hydroxylation d'un composé de formule



de manière connue.