

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 02528

(54) 1 α , 25-dihydroxy-2 β -fluorovitamine D₃.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 07 C 172/00; A 61 K 31/59.

(22) Date de dépôt..... 16 février 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *EUA*, 17 février 1981, n° 235.262.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 33 du 20-8-1982.

(71) Déposant : Société dite : WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION, résidant aux *EUA*.

(72) Invention de : Hector F. De Luca, Heinrich K. Schnoes, Nobuo Ikekawa, Yoko Tanaka, Masuo Morisaki et Jun-ichi Oshida.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Bureau D. A. Casalonga, office Josse et Petit,
8, av. Percier, 75008 Paris.

$1\alpha, 25$ -dihydroxy- 2β -fluorovitamine D_3 .

L'invention a pour objet un nouveau composé vitamine D.

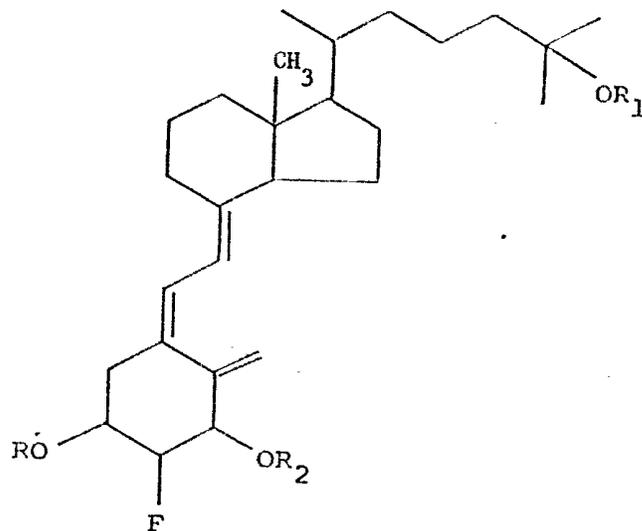
On sait que la vitamine D dirige le métabolisme du calcium et du phosphore chez les animaux et chez l'homme. Il est généralement accepté actuellement que l'action physiologique de la vitamine D dépend du métabolisme de la vitamine à des formes hydroxylées. Ainsi, la vitamine D_3 est hydroxylée in vivo en 25-hydroxyvitamine D_3 qui à son tour est transformée en $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamine D_3 . On pense que c'est ce dernier composé qui dirige de façon spécifique l'homéostasie du calcium et du phosphore, en favorisant le transport du calcium et du phosphore dans l'intestin et la mobilisation des minéraux de l'os.

Par suite de leur activité biologique élevée, ces formes hydroxylées de la vitamine D sont importantes et ont trouvé utilisation dans le traitement de divers désordres osseux. On a trouvé que certains analogues, que l'on ne trouve pas dans la nature, de ces métabolites de vitamine D hydroxylée sont très actifs.

On a découvert, selon l'invention, de nouveaux dérivés de la vitamine D_3 , qui présentent une activité biologique très élevée. Ce sont la $1\alpha, 25$ -dihydroxy- 2β -fluorovitamine D_3 ainsi que leur 1-, 3-, et 25-acylates, qu'on peut représenter par la formule :

5

10



où R, R₁ et R₂, identiques ou différents, désignent l'hydrogène
15 ou acyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone.

La 1,25-dihydroxy-2 β -fluorovitamine D₃ peut être
aisément préparée à partir de la 1 α -hydroxy-2 β -fluorovitamine
D₃ par hydroxylation enzymatique in vitro de ce dernier composé
sur le carbone 25. Ceci peut être réalisé en faisant incubé
20 ce composé avec un homogénéisat préparé à partir des tissus
du foie de rats ayant une déficience en vitamine D, comme
indiqué ci-après. La 1 α -hydroxy-2 β -fluorovitamine D₃ peut
être obtenue par la synthèse de Oshida et al (Tetrahedron
Letters, 21, 1755-1756 (1980)).

25 Des rats mâles qui viennent d'être sevrés sont
nourris pendant un mois avec un régime déficient en vitamine
D (Suda et al, J Nutr 100, 1049-1052, 1970). Ils sont
ensuite tués, on retire leur foie et on en prépare un homo-
nénéisat à 20% (poids/volume) dans un tampon de phosphate
30 0,1 M (pH 4), refroidi avec de la glace, contenant 0,25 M de
sucrose. L'incubation est mise en oeuvre dans un flacon
Erlenmeyer de 125 ml contenant une partie alicoté d'homo-
généisat de foie représentant 1 g de tissu de foie, en
suspension dans 10 ml de milieu d'incubation composé des
35 constituants suivants :

0,125 M sucrose, 50 mM tampon phosphate (pH 7,4),
22,4 mM glucose-6-phosphate, 20 mM ATP, 160 mM

nicotinamide, 25 mM succinate, 0,4 mM NADP, 5 mM $MgCl_2$,
0,1 M KCl, 10 μg N,N'-diphényl-p-phénylènediamine et
0,5 unités glucose-6-phosphate-déhydrogénase.

La réaction est amorcée par addition de 10 μg α -hydro-
5 xy-2 β -fluorovitamine D_3 dissous dans 25 μl d'éthanol à 95%.
On fait incuber le mélange à 37°C avec agitation à 100 oscil-
lations/min., pendant 2 heures. On arrête la réaction par
addition de 20 ml de méthanol et 10 ml de chloroforme. Après
une nouvelle addition de 10 ml de chloroforme et de 6 ml de
10 H_2O , on sépare la phase organique, on la fait évaporer et on
soumet le résidu contenant la 1,25-dihydroxy-2 β -fluorovitamine
 D_3 recherchée à la purification chromatographique.

On redissout le résidu dans 1 ml de $CHCl_3$: hexane
(65:35) qu'on applique à une colonne Sephadex LH-20 (0,7 x 14cm)
15 rempli et équilibré avec le même solvant. On élue la colonne
avec 36 ml du même solvant. On jette les premier 11 ml et on
recueille et on fait évaporer les 25 ml suivants. On dissout
ensuite le résidu dans du 2-propanol à 10% dans l'hexane et
on soumet à une chromatographie liquide à haut rendement
20 (modèle ALC/GPC 204, Waters Associates, Medford, MA, USA)
utilisant une colonne Zorbax-SIL (4,6 mm x 25 cm) (Dupont Inc,
Wilmington, DE USA), en opérant à une pression de 70 kg/cm^2
qui produit un débit de 2 ml/min. Le produit recueilli est à
nouveau purifié par une chromatographie à haut rendement
25 utilisant une colonne à base inversée (Richrosorb RP-18;
4,6 mm x 25 mm; E Merck, Darmstadt, RFA), en opérant à une
pression de 91 kg/cm^2 . Le produit élué avec un mélange de
solvant H_2O : méthanol (22:78) est recueilli, évaporé, et
chromatographie une fois de plus sur une colonne Zorbax-SIL
30 décrite ci-dessus, utilisant les mêmes conditions. Après
un double recyclage, le produit pur est obtenu pour identifi-
cation physique.

Le composé présente un maximum d'absorption à 265 nm
et un minimum à 228 nm, caractéristique pour la vitamine D,
35 déterminé dans l'éthanol à 95% avec un spectrophotomètre
enregistreur Beckman, modèle 24. Ces données indiquent la
présence du chromophore 5,6-cis-triène.

Le spectre de masse du produit contient un ion molé-

culaire à m/e 434 requis pour la 1,25-dihydroxy-2 β -fluorovitamine D₃. Des ions fragments à m/e 416 et 398 représentent l'élimination d'une ou de deux molécules de H₂O. La perte de toute la chaîne latérale de stéroïde (scission de la liaison C17/C20) donne le fragment à m/e 305, lequel par élimination d'une ou deux molécules H₂O donne les pics à m/e 287 et 269. Le spectre montre aussi le fragment diagnostique lui-même à m/e 170 (noyau A + C₆ + C₇), lequel par élimination de H₂O donne le pic à m/e 152, tandis que l'élimination alternative de HF donne le pic à m/e 150. De plus, le spectre montre un pic de fragment important à m/e 59 qui résulte de la scission de la liaison C24/C25 et correspond au ion ((CH₃)₂C=OH)⁺. La présence de ce ion est caractéristique pour la vitamine D hydroxylée en position 25 et ainsi confirme la présence d'un groupe 25-hydroxy dans le produit obtenu. Ces données prouvent que le produit obtenu par hydroxylation enzymatique de la 1 α -hydroxy-2 β -fluorovitamine D₃ est la 1 α ,25-dihydroxy-2 β -fluorovitamine D₃.

On peut obtenir aisément la 1 α ,25-dihydroxy-2 β -fluorovitamine D₃ sous forme cristalline par recristallisation à partir d'un solvant approprié ou d'un système de solvant, par exemple l'éthanol. Les dérivés acylés de la 1 α ,25-dihydroxy-2 β -fluorovitamine D₃ peuvent être facilement préparés par acylation du composé avec des anhydrides d'acyle ou des halogénures d'acyle. Ainsi, la réaction de la 1 α ,25-dihydroxy-2 β -fluorovitamine D₃ avec l'anhydride acétique dans la pyridine, à la température ambiante, fournit le dérivé 1,3-diacétate, tandis que la réaction à températures élevées (60-100°C) conduit au composé 1,3,25-triacétylé correspondant. En outre, il est possible d'hydrolyser sélectivement certains groupes acyle du dérivé triacylé pour obtenir d'autres produits partiellement acylés. Par exemple, l'hydrolyse basique (KOH/MeOH, à 30-50°C, pendant 1-2 h) donne la 1 α ,25-dihydroxy-2 β -fluorovitamine D₃-25-monoacétate que l'on peut acyler pour introduire différents groupes acyle en position C-1 et C-3. Il est ainsi évident que par combinaison de réaction d'acylation et/ou d'hydrolyse, on peut préparer une variété de dérivés partiellement ou totalement acylés, les groupes acyle étant les mêmes ou différents.

L'activité biologique des nouveaux composés analogues peut être démontrée par des essais in vivo chez le rat. Des rats mâles qui viennent d'être sevrés sont alimentés avec un régime à faible teneur en calcium, déficient en vitamine D (J. Nutr. 100, 1045-1052, 1970), pendant 3 semaines. On les utilise ensuite dans trois groupes de 5-6 rats chacun. On administre aux rats du groupe témoin 0,05 ml d'éthanol 95% par injection intrajugulaire. On administre aux rats du second groupe, de la même façon, une dose de 650 pmole de $1\alpha,25$ -dihydroxy- 2β -fluorovitamine D_3 ($1\alpha,25-(OH)_2-2\beta-F-D_3$) dissous dans 0,05 ml d'éthanol à 95%, tandis qu'on injecte aux rats du troisième groupe une dose de 650 pmole de $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_3 ($1\alpha,25-(OH)_2D_3$), en vue d'essais comparatifs. Vingt quatre heures après l'administration, on détermine l'effet des composés essayés sur le transport du calcium intestinal et sur la mobilisation du calcium osseux (mesuré par l'élévation de la concentration du calcium dans le sérum) par des procédés selon Martin & DeLuca (Am. J. Physiol. 216, 1351-1359 (1969)) et selon Tanaka et al. (Biochemistry 14, 3293-3296 (1975)) respectivement, les résultats étant les suivants :

Activité biologique de $1\alpha,25-(OH)_2-2\beta-F-D_3$

Composé	Transport du calcium intestinal (Ca séreuse/Ca muqueuse)	Mobilisation du calcium osseux Calcium dans le sérum (mg/100 ml)
EtOH(contrôle)	3,4 \pm 1,0 ^{*a}	4,3 \pm 0,1 ^d
$1\alpha,25-(OH)_2-2\beta-F-D_3$	6,0 \pm 0,6 ^b	5,1 \pm 0,4 ^e
$1\alpha,25-(OH)_2D_3$	5,3 \pm 0,9 ^c	5,1 \pm 0,3 ^e

* Déviation normale de la moyenne

Unification de la différence : b à a, $p < 0,001$; c à a, $p < 0,01$; e à d, $p < 0,001$.

Les données précédentes indiquent que la $1,25$ -dihydroxy- 2β -fluorovitamine D_3 est active à la fois dans l'intestin et dans les os et qu'en outre, ce nouveau composé est au moins aussi efficace que la $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_3 que l'on

considère comme le métabolite connu le plus actif de la vitamine D₃, rendant ce composé approprié pour le traitement de désordres osseux.

5 On peut administrer aisément la 1,25-dihydroxy-2 β -fluoro-
vitamine D₃ par injection de solutions parentérales stériles ou
par le canal alimentaire sous forme de doses orales ou par des
suppositoires. Des doses d'environ 0,1 μ g à environ 2,5 μ g/
jour apparaissent efficaces pour obtenir des réponses d'équi-
libre de calcium physiologique caractéristiques de l'activité du
10 type vitamine D, les doses d'entretien d'environ 0,1 à environ
0,5 μ m étant appropriées.

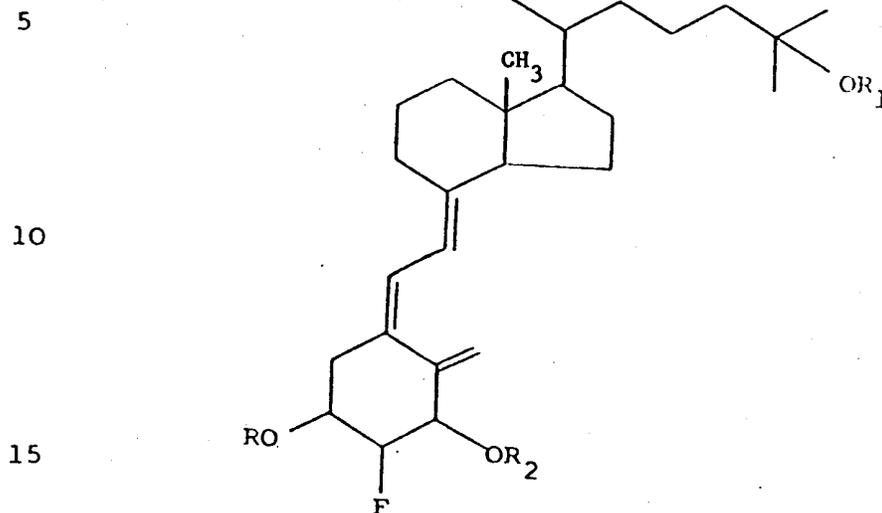
On peut préparer des doses administrables du composé
en combinant ce dernier avec un véhicule connu non toxique
pharmaceutiquement acceptable. De tels véhicules peuvent être,
15 soit des solides, soit des liquides, par exemple l'amidon
de maïs, le lactose, le sucrose, l'huile d'arachide, l'huile
d'olive, l'huile de sésame et l'eau. Si l'on utilise un
véhicule solide, les composés peuvent être administrés sous
forme de comprimés, capsules, poudres, pastilles. Lorsqu'on
20 utilise un véhicule liquide, les formes administrées peuvent
se présenter sous forme de capsules de gélatine, des suspensions
liquides ou sirops, des émulsions ou solutions.

Les formes administrées peuvent également renfermer
des adjuvants tels que des agents conservateurs, des stabili-
25 sants, des mouillants, des émulsifiants, des activateurs de
dissolution ainsi que d'autres substances thérapeutiquement
utiles.

Il est bien entendu que malgré l'indication de doses
générales, des doses particulières peuvent être administrées
30 selon la maladie spécifique et l'état du malade, le résultat
recherché ainsi que d'autres facteurs connus des médecins.

REVENDICATIONS

1. Composé de formule :



où R, R₁ et R₂, identiques ou différents, désignent hydrogène ou un groupe acyle ayant de 1 à 6 atomes de carbone.

20 2. Composé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le groupe acyle est un groupe acétyle.

3. α ,25-dihydroxy-2 β -fluorovitamine D₃.

4. Le composé de la revendication 3 sous forme cristalline.

25 5. Procédé de préparation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé par hydroxylation enzymatique de la α -hydroxy-2 β -fluorovitamine D₃ en position C-25 et éventuellement acylation du produit.