



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 653 004 A5

⑤ Int. Cl.4: C 07 C 172/00
C 07 C 49/242

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

// A 61 K 31/59

⑫ PATENTSCHRIFT A5

<p>⑳ Gesuchsnummer: 384/81</p> <p>㉑ Anmeldungsdatum: 29.04.1980</p> <p>⑳ Priorität(en): 21.05.1979 US 041081</p> <p>㉒ Patent erteilt: 13.12.1985</p> <p>④ Patentschrift veröffentlicht: 13.12.1985</p>	<p>㉓ Inhaber: Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison/WI (US)</p> <p>㉔ Erfinder: De Luca, Hector F., Madison/WI (US) Schnoes, Heinrich K., Madison/WI (US) Napoli, Joseph L., Dallas/TX (US) Fivizzani, Mary A., Madison/WI (US)</p> <p>㉕ Vertreter: Patentanwälte W.F. Schaad, V. Balass, E.E. Sandmeier, Zürich</p> <p>⑥ Internationale Anmeldung: PCT/US 80/00495 (En)</p> <p>⑦ Internationale Veröffentlichung: WO 80/02502 (En) 27.11.1980</p>
--	---

⑤ 1 α -Hydroxy-25-keto-27-nor-cholecalciferol.

⑤ 1 α -Hydroxy-25-keto-27-nor-Vitamin D₃ und seine Acylate weisen eine Vitamin D-artige Wirksamkeit auf und können Anwendung finden als Ersatz für Vitamin D-Verbindungen bei der Behandlung von Erkrankungszuständen, die aus einem Calcium-Phosphor-Ungleichgewicht resultieren. Die entsprechenden, ebenfalls neuen Prävitaminverbindungen konvergieren spontan zu den Vitaminverbindungen.

PATENTANSPRÜCHE

1. 1 α -Hydroxy-25-keto-27-nor-Vitamin D₃ und Acylate davon.
2. 1 α -Hydroxy-25-keto-27-nor-Prävitamin D₃ und Acylate davon.
3. 1 α -Hydroxy-25-keto-5,6-trans-27-nor-Vitamin D₃ und Acylate davon als Zwischenprodukt für die Herstellung der Verbindungen gemäss Anspruch 1.

Technisches Gebiet

Die Erfindung betrifft Verbindungen, die durch eine Vitamin D-artige Wirksamkeit charakterisiert sind bzw. spontan zu solchen Verbindungen konvergieren sowie ein Zwischenprodukt.

Insbesondere betrifft die Erfindung Derivate von Vitamin D₃.

Vitamin D₃ ist ein wohlbekanntes Mittel zur Steuerung der Calcium- und Phosphor-Homöostase. Es ist bekannt, dass diese Verbindung beim normalen Tier oder Menschen den intestinalen Calciumtransport und die Knochen-Calcium-Mobilisierung stimuliert und wirksam bei der Verhinderung von Rachitis ist.

Es ist nunmehr auch wohlbekannt, dass das Vitamin D₃, um wirksam zu sein, in vivo in seine hydroxylierten Formen umgewandelt werden muss. Beispielsweise wird das Vitamin zuerst in der Leber unter Bildung von 25-Hydroxyvitamin D₃ hydroxyliert und wird in der Niere weiter hydroxyliert unter Bildung von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ oder 24,25-Dihydroxyvitamin D₃. Die 1 α -hydroxylierte Form des Vitamins wird im allgemeinen als die physiologisch aktive oder hormonelle Form des Vitamins und als verantwortlich dafür angesehen, was als Vitamin D-artige Wirksamkeiten bezeichnet wird, wie die gesteigerte intestinale Absorption von Calcium und Phosphat, die Mobilisierung von Knochenmineral und die Zurückhaltung von Calcium in den Nieren.

Stand der Technik

Hinweise auf verschiedene Vitamin-D-Derivate finden sich in der Patentliteratur und anderer Literatur. Vergleiche beispielsweise die US-Patentschriften 3 565 924, gerichtet auf 25-Hydroxycholecalciferol;

- 3 697 559, gerichtet auf 1,25-Dihydroxy-cholecalciferol;
- 3 741 996, gerichtet auf 1 α -Hydroxy-cholecalciferol;
- 3 907 843, gerichtet auf 1 α -Hydroxyergocalciferol;
- 3 715 374, gerichtet auf 24,25-Dihydroxy-cholecalciferol;
- 3 739 991, gerichtet auf 25,26-Dihydroxy-cholecalciferol;
- 3 786 062, gerichtet auf 22-Dehydro-25-hydroxycholecalciferol;
- 3 847 955, gerichtet auf 1,24,25-Trihydroxycholecalciferol ;
- 3 906 014, gerichtet auf 3-Desoxy-1 α -hydroxycholecalciferol;
- 3 069 321, gerichtet auf die Herstellung von verschiedenen Seitenketten-fluorierten Vitamin D₃-Derivaten und Seitenketten-fluorierten Dihydrotrachysterin₃-Analogen und US-PS 4 199 577 gerichtet auf 1 α ,3 β -Dihydroxy-24-oxocholestra-5,7-dien.

Darstellung der Erfindung

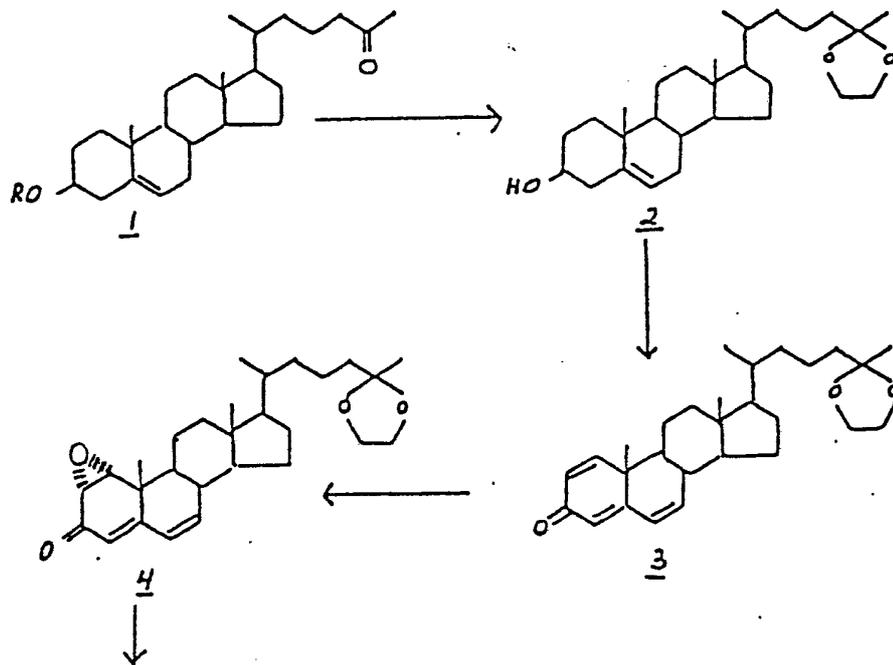
Es wurden nunmehr neue Derivate von Vitamin D₃ gefunden, die eine Vitamin D-artige Wirksamkeit aufweisen bzw. spontan zu solchen Verbindungen konvergieren und die daher als Ersatz für Vitamin D₃ in seinen verschiedenen bekannten Anwendungen dienen können und geeignet sind für die Behandlung verschiedener Erkrankungen wie Osteomalacie, Osteodystrophie und Hypoparathyroidismus.

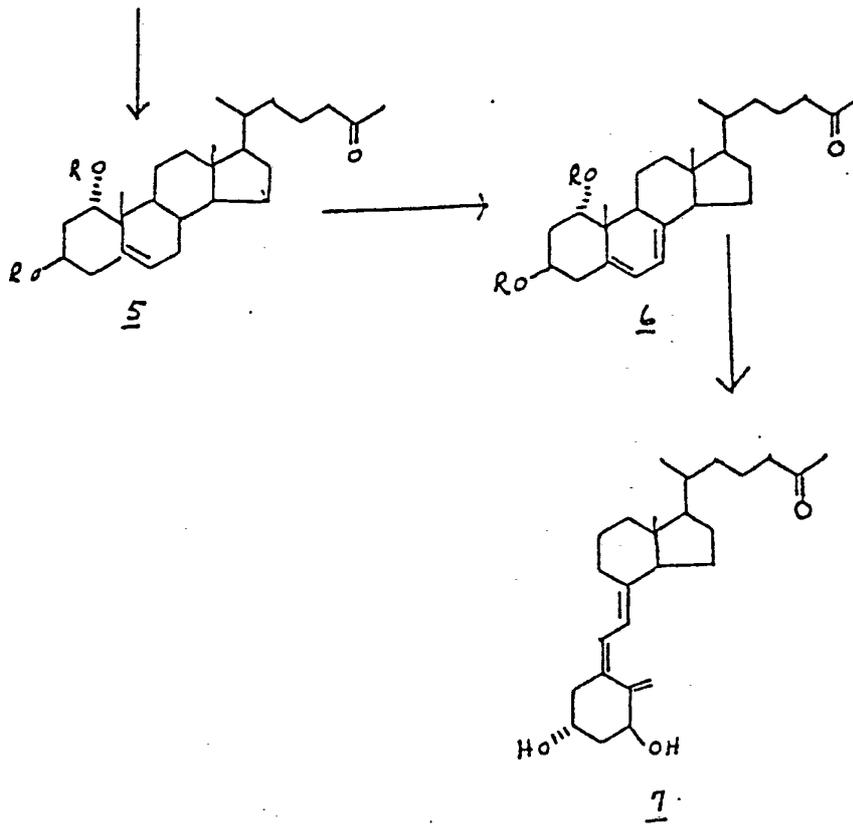
Es handelt sich bei den erfindungsgemässen Verbindungen um 1 α -Hydroxy-25-oxo-27-nor-cholecalciferol (1 α -Hydroxy-25-keto-27-nor-Vitamin D₃), 1 α -Hydroxy-25-keto-27-nor-Prävitamin D₃ sowie Acylate dieser Verbindungen. Die Acylate von 1 α -Hydroxy-25-keto-27-nor-Vitamin D₃ können als Zwischenprodukte zur Herstellung der letztgenannten Verbindung eingesetzt werden. Sie besitzen aber auch selber, wenn auch in geringerer Masse, eine Vitamin D-artige Aktivität, d. h. sie gehören nicht nur strukturell, sondern auch in ihrer Wirkung zur gleichen Verbindungs-

klasse. Die Prävitamine gehen, wie aus der Literatur bekannt ist, beim Stehenlassen oder Erwärmen spontan in das entsprechende Vitamin über, so dass sie, wie das entsprechende Vitamin eingesetzt, – infolge der Spontankonversion – die gleiche Wirkung wie das Vitamin entfalten.

Bester Weg zur Ausführung der Erfindung

Die erfindungsgemässen Verbindungen wurden nach dem in abgekürzter Form im folgenden Schema gezeigten Verfahren hergestellt:

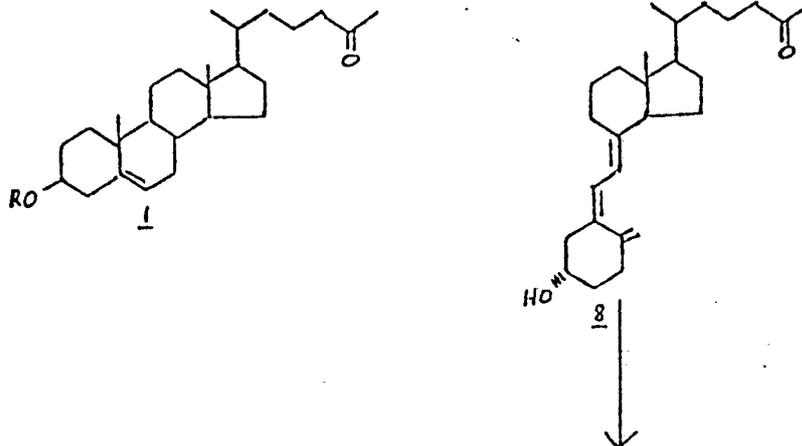


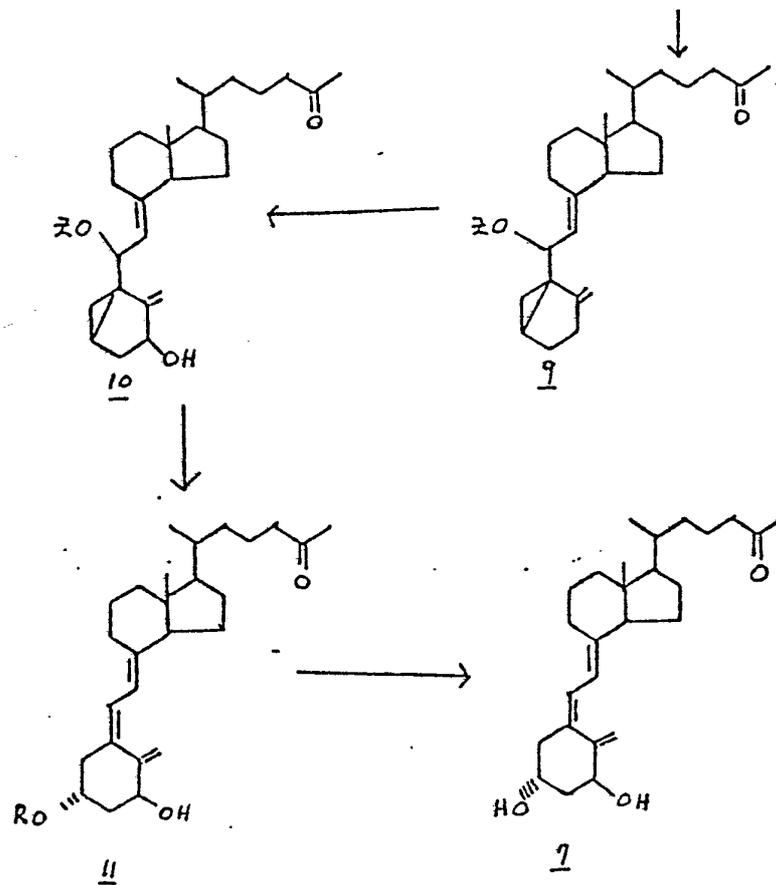


Dieses Verfahren umfasst die Umwandlung von 27-Norcholest-5-en-25-on (Struktur 1, R = H), das in der US-PS 4 145 346 beschrieben ist (wobei die US-PS 4 105 660 das entsprechende 5,7-Dien beschreibt), in das entsprechende 25-Ketalderivat (2). Ein 3-Acylderivat von 27-Norcholest-5-en-25-on (z. B. Struktur 1 mit R = Acetyl oder Benzoyl) ist auch ein geeignetes Ausgangsmaterial für diese Reaktionsstufe, wobei die Acylgruppe durch Hydrolyse in Base nach der Bildung des 25-Ketals entfernt wird. Das Ketal 2 wird einer Dehydrierung unterzogen unter Bildung des Trienons 3, das mit H₂O₂ in Base epoxydiert wird unter Bildung des 1 α ,2 α -Epoxy-4,6-dien-3-on-derivats (4). Die Reduktion des letzteren in Metall/Ammoniak-Lösungen (Barton et al., J. Am. Chem. Soc., 95, 2748 (1973)) ergibt 25,25-Äthylendioxy-27-norcholest-5-en-1 α ,3 β -diol, von dem die Ketalenschutzgruppe durch Hydrolyse unter sauren Bedingungen entfernt wird, unter Bildung von 27-Nor-5-cholesten-1 α ,3 β -diol-25-on (Verbindung 5, mit R = H). Die anschließende Acylierung dieses Zwischenprodukts (Acetylieren, Benzoylieren, usw.)

ergibt das 1,3-Diacyllderivat (Verbindung 5, worin R = Acyl), das umgewandelt wird in das 5,7-Dienderivat (6, R = Acyl) nach verschiedenen bekannten Verfahren, z. B. der Methode von Hunziker und Müllner (Helv. Chim. Acta, 61, 70 (1958)) oder über die 7-Keto- und 7-Tosylhydrozon-Zwischenprodukte (Onisko et al; Bioorganic Chem., 6, 203 (1977)). Falls gewünscht, können die Acylgruppen in dieser Stufe entfernt werden durch milde Basenhydrolyse (z. B. 10%ige alkoholische KOH) unter Bildung des entsprechenden 1,3-Dihydroxyderivats. Die Ultraviolettbestrahlung einer Lösung des 5,7-Diens 6 (R = Acyl) ergibt das 27-Nor-25-keto-1 α -hydroxy-Prävitamin D₃-diacylat, das zu dem entsprechenden Vitamin D₃-Analogen isomerisiert wird durch Erwärmen und nach Entfernung der Acylgruppen durch milde basische Hydrolyse das 27-Nor-25-keto-1 α -hydroxy-vitamin D₃ (Verbindung 7) ergibt.

Ein alternativer präparativer Weg zum 1 α -Hydroxy-25-keto-Vitaminanalogen 7 wird durch das nachstehende Verfahrensschema erläutert.





Dieses Verfahren umfasst die Umwandlung des gleichen Ausgangsmaterials (Verbindung 1, worin R Acyl ist, z. B. Acetyl oder Benzoyl) in das bekannte 27-Nor-25-ketovitamin D₃-Produkt (Verbindung 8) unter Anwendung beispielsweise der Verfahren von Blunt und DeLuca (Biochemistry, 8, 671 (1969)). Dieses Vitaminanaloge wird in sein 3-Tosylderivat umgewandelt, welches zu dem 3,5-Cyclovitamin-derivat (9) solvolysiert wird, worin Z dem Alkylteil des alkoholischen Lösungsmittels entspricht, das bei der Solvolyse verwendet wird, d. h. Z ist typischerweise Methyl oder Äthyl, kann jedoch auch Wasserstoff sein, wenn die Solvolyse in wässrigem Medium durchgeführt wird. Dieses Zwischenprodukt wird seinerseits mit Selenioxyd oxidiert zu dem 1 α -Hydroxy-cyclovitamin-derivat (10) unter Anwendung der Verfahrensweisen von Paaren et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 2080 (1978)). Die direkte Solvolyse von 10 ergibt nach der Reinigung des 1 α -Hydroxy-3-O-acylprodukt 11, (worin die Acylgruppe R dem Acylteil der organischen Carbonsäure entspricht, die für die Solvolyse verwendet wurde, d. h. R ist typischerweise Acetyl oder Formyl) und dieses acylierte Produkt wird anschliessend leicht in milder Base zum 1 α -Hydroxy-25-keto-27-nor-vitamin D₃ (Verbindung 7) hydrolysiert.

In den folgenden Beispielen beziehen sich die Nummern, die die speziellen Produkte identifizieren, auf die in den vorstehenden Verfahrensschemata derart nummerierten Verbindungen.

Beispiel 1

25,25-Äthylendioxy-27-nor-cholest-5-en-3 β -01

Eine Lösung von 3 β -Hydroxy-27-nor-cholest-5-en-25-on-3-acetat (1, R = Acetyl) (1,0 g, 2,33 mMol) und p-Toluolsulfonsäure (100 mg), gelöst in trockenem Benzol (150 ml) enthaltend Äthylenglykol (18 ml) wurde langsam über 8,5 Stunden destilliert. Die Dünnschichtchromatografie (TLC)

(20% Aceton/Hexan) zeigte einen Produktfleck (Rf 0,55) und kein verbliebenes Ausgangsmaterial. Die Reaktion wurde gekühlt und Benzol und Wasser wurden zugesetzt. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit zusätzlichem Benzol extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden zweimal mit Wasser und einmal mit Salzlösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde entfernt unter Bildung von 25,25-Äthylendioxy-27-norcholest-5-en-3 β -ol-3-acetat: NMR (270 MHz) δ 0,67 (s, 18-CH₃), 0,93 (d, J = CH₃, 21-CH₃), 1,01 (s, 19-CH₃), 1,28 (s, 26-CH₃), 2,03 (Acetat-CH₃), 2,91 (Äthylenketal), 4,52 (breites m, 3 α -H), 5,27 (m, 6-H).

Das Produkt wurde in Äther (5 ml) und 1 m KOH/Methanol (4 ml) gelöst und bei Raumtemperatur 2 Stunden stengelassen. TLC (20% Aceton/Hexan) zeigte das Reaktionsprodukt (Rf 0,23). Äther und Wasser wurden zugesetzt und die Phasen wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde mit Äther extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden zweimal mit Wasser und einmal mit Salzlösung gewaschen und über K₂CO₃ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand wurde aus Äther umkristallisiert unter Bildung von 25,25-Äthylendioxy-27-norcholest-5-en-3 β -ol, Verbindung (2), (0,7 g): Fp. 135–136 °C. Weitere 270 mg von (2), die nur einen Fleck bei der TLC-Analyse zeigten, wurden aus den Mutterlaugen gewonnen: NMR (270 MHz), 0,67 (s, 18-CH₃), 0,93 (d, J = 6,2 Hz, 21-CH₃), 1,01 (s, 19-CH₃), 1,31 (s, 26-CH₃), 3,93 (Äthylenketal), 3,52 (breites m, 3 α -H), 5,35 (m, 6-H).

Beispiel 2

25,25-Äthylendioxy-27-nor-cholesta-1,4,6-trien-3,25-dion (3)

Ein Gemisch von (2) (0,046 g, 0,11 mMol) und 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (0,08 g, 0,35 mMol) in Dioxan (1 ml) wurde 22 Stunden unter Rückfluss gehalten.

Das Reaktionsgemisch wurde gekühlt und filtriert. Der nach dem Verdampfen des Lösungsmittels erhaltene Rückstand wurde durch eine neutrale Aluminiumoxidsäule (0,5 × 7 cm) filtriert, eluiert mit Methylenchlorid. Das erhaltene Material wurde an einer präparativen Platte chromatografiert, die mit 15% Aceton/Hexan, zweimal entwickelt wurde, unter Bildung von zwei Produkten. Das Produkt vom Rf 0,21 war die gewünschte Verbindung (3) (10 mg): NMR (60 MHz) 0,78 (s, 18-CH₃), 0,93 (d, J = 6 Hz, 21-CH₃), 1,18 (s, 19-CH₃, 1,30 (s, 26-CH₃), 3,93 Äthylen-ketal), 5,90, 6,05, 6,22 (drei m, Trienprotonen); 6,98 (d, J = 10 Hz, Trienprotonen).

Das Produkt vom Rf 0,15 wurde identifiziert als 27-Norcholest-1,4,6-trien-3,25-dion (9,3 mg); NMR (60 MHz) 0,78 (s, 18-CH₃), 0,93 (d, J = 6 Hz, 21-CH₃), 1,18 (s, 19-CH₃), 2,1 (s, 26-CH₃), 5,90, 6,03, 6,22 (drei Multipletts, Trienprotonen), 6,95 (d, J = 10 Hz, Trien H).

Beispiel 3

25,25-Äthylendioxy-1 α ,2 α -oxido-27-nor-cholest-4,6-dien-3,25-dion (4)

Zu einer Lösung von 3 (0,14 g, 0,33 mMol) in Methanol (5 ml) und Benzol (4 ml) wurden 10% methanolische NaOH (0,04 ml) und 30% H₂O₂ (0,24 ml) gefügt. Nach 16 Stunden bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch auf -5 °C gekühlt und auf Eis gegossen. Das nach dem Extrahieren der wässrigen Phase mit Methylenchlorid erhaltene Material wurde an einer präparativen Schicht chromatografiert, die dreimal mit 30% Aceton/Hexan entwickelt wurde, unter Bildung von 0,09 g des 1 α ,2 α -Epoxyds 4 (Rf 0,66): UV (Hexan λ_{\max} 279, 288 nm (Schulter); NMR (60 MHz) δ 0,78 (s, 18-CH₃), 0,93 (d, J = 5 Hz, 21 CH₃), 1,14 (s, 19-CH₃), 1,25 (s, 26-CH₃), 3,87 (Äthylenketal), 3,35 (dd, J = 4,5 Hz, 2 Hz, Epoxy H), 3,52 (d, J = 4,5 Hz, Epoxy H), 5,54 (d, J = 1,8 Hz), 5,97 (s).

Beispiel 4

1 α ,3 β -Dihydroxy-27-norcholest-5-en-25-on-1,3-diacetat (5, R = Acetyl).

Zu einer Lösung von Na (0,1 g) in destilliertem flüssigem NH₃ (7 ml) bei -33 °C, wurde in einer Portion die Verbindung 4 (0,09 g, 0,2 mMol) in THF (7 ml) gefügt. Nach 5 Minuten wurde NH₄Cl (0,7 g) in kleinen Portionen während 0,75 Stunden zugesetzt. Das NH₃ wurde verdampft und durch Äther ersetzt. Die ätherische Phase wurde mit Wasser, 1 n HCl, Wasser, Salzlösung gewaschen und getrocknet (Na₂SO₄). Der nach dem Verdampfen des Äthers erhaltene Rückstand wurde an einer präparativen Schicht chromatografiert, die zweimal mit 30% Aceton/Hexan entwickelt wurde, unter Bildung von 25,25-Äthylen-dioxy-27-norcholest-5-en-1 α ,3 β -diol (0,0125 g, Rf 0,22): NMR (270 MHz) δ 0,68 (s, 18-CH₃), 0,93 (d, J = 6,9 Hz, 21-CH₃), 1,03 (s, 19-CH₃), 1,31 (s, 26-CH₃), 3,85 (m, 1 β -H), 3,93 (Äthylenketal), 3,97 (Septett, J = 5,4 Hz, 3 α -H), 5,58 (m, 6-H).

Eine Lösung dieses Produkts (12,5 mg, 0,028 mMol) und eine katalytische Menge von p-Toluolsulfonsäure in Äthanol (2 ml) wurde bei Raumtemperatur 5 Stunden gerührt. Die TLC (50% Aceton/Hexan, entwickelt dreimal) zeigte nur einen Fleck, Rf 0,55. Das Äthanol wurde entfernt und Methylenchlorid wurde zugesetzt. Die organische Phase wurde mit verdünntem NaHCO₃ und Wasser gewaschen und verdampft unter Bildung von 5 (R = Wasserstoff): NMR (270 MHz) δ 0,68 (s, 18-CH₃), 0,94 (d, J = 6,6 Hz, 21-CH₃), 1,04 (s, 19-CH₃), 2,13 (s, 26-CH₃), 3,85 (m, 1 α -H), 3,98 (m, 3 α -H), 5,60 (m, 6-H); Massenspektrum m/e (relative Intensität, berechnete Masse) 402,3151 (M⁺, 0,50, berechnet für C₂₆H₄₂O₃, 402,3134), 387,2898 (M⁺-CH₃, 0,07, 387,2899), 384,3042 (M⁺-H₂O, 1,00, 384,3028), 3,66,2922

(M⁺-2 × H₂O, 0,18, 366,2922), 289,2169 (M⁺-Seitenkette, 0,13, 289,2167), 271,2061 (M⁺-H₂O-Seitenkette), 0,13, 271,2061), 253,1957 (M⁺-2 × H₂O-Seitenkette, 0,13, 253,1957).

5 Eine Lösung des Diolproduktes in Pyridin (0,5 ml) und Essigsäureanhydrid (0,5 ml) wurde unter N₂ während 2,5 Stunden auf 90 °C erwärmt. Die Reaktion wurde mit kaltem Wasser und K₂CO₃ abgeschreckt. Das Produkt wurde mit Et₂O extrahiert. Die organische Phase wurde mit 1 n HCl, 10 verdünntem NaHCO₃, Wasser und Salzlösung gewaschen und getrocknet (Na₂SO₄). Durch Verdampfen des Äthers erhielt man 12,4 mg 5 (R = Acetyl), das bei der TLC (50% Aceton/Hexan, Rf 0,65) homogen war.

Beispiel 5

1 α ,3 β -Dihydroxy-27-norcholest-5,7-dien-25-on-1 α ,3 β -diacetat (6) (R = Acetyl).

Zu 5 (R = Acetyl) (12,4 mg, 0,025 mMol) und NaHCO₃ (14 mg) in Hexan (0,5 ml) wurde 1,3-Dibrom-5,5-dimethylhydantoin (3,9 mg, 0,013 mMol) gefügt. Nach 20 Minuten Erwärmen bei 80 °C unter N₂ wurde das Reaktionsgemisch gekühlt und filtriert. Das Hexan wurde verdampft und der Rückstand wurde in trockenem Xylol (0,5 ml) und 2,4,6-Trimethylpyridin (50 μ l) gelöst und unter Rückfluss unter N₂ 25 90 Minuten erwärmt. Das gekühlte Reaktionsgemisch wurde mit Benzol verdünnt und mit 1 n HCl, verdünntem NaHCO₃, Wasser und Salzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde zur Trockene verdampft und der erhaltene Rückstand wurde in Dioxan (0,5 ml), enthaltend p-Toluolsulfonsäure (1,5 mg) gelöst und 40 Minuten unter N₂ bei 30 70 °C erwärmt. Das nach dem Aufarbeiten erhaltene Material wurde durch TLC, entwickelt zweimal mit 10% Aceton/Hexan gereinigt unter Bildung des Dien-Diacetats 6 (R = Acetyl) (2,9 mg, Rf 0,29); UV (EtOH) λ_{\max} 293, 281, 271, 35 262 nm; Massenspektrum m/e (relative Intensität) 484 (M⁺, 0,01), 424 (M⁺-AcOH, 0,08), 364 (M⁺-2 × AcOH, 1,00), 549 (M⁺-2 × AcOH-CH₃, 0,05), 251 (M⁺-2 × AcOH-Seitenkette, 0,10), 118 (0,84).

Beispiel 6

1 α -Hydroxy-27-nor-25-ketovitamin D₃ (7)

Eine Lösung von 6 (R = Acetyl) in 20% EtOH/Benzol (150 ml) unter N₂ bei 0 °C wurde 20 Minuten in einem Quarzreaktionsgefäß mit einer 125-W-Hanovia-8A36-Lampe, ausgerüstet mit einem Corex-Filter, bestrahlt. Das Lösungsmittel wurde verdampft und das gewonnene 1 α -Hydroxy-25-keto-27-norprävitamin-D₃-1,3-diacetat wurde in Heptan gelöst und unter N₂ bei 85 °C während 4 Stunden erwärmt unter Bildung von 1 α -Hydroxy-25-keto-27-norvitamin-D₃-1,3-diacetat. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand wurde in Äther (0,5 ml) und 0,1 m KOH/MeOH (0,5 ml) gelöst und 2,5 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und Äther und Wasser wurden zugesetzt. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen. Das Vitaminanaloge 7 wurde durch Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC) (0,6 × 25 cm mikroteilchenförmige Siliziumdioxidgelsäule) gereinigt, entwickelt mit 6% 2-Propanol/Hexan. Die Verbindung 7 eluierte von 60 151 bis 158 ml. Eine analytische Probe war homogen bei erneuter Injektion in HPLC: UV (Äthanol) λ_{\max} 265, λ_{\min} 228 nm, $\lambda_{\max}/\lambda_{\min}$ 1,7; Massenspektrum m/e (relative Intensität) 400,2973 (M⁺, 0,10 berechnet für C₂₄H₄₀O₃, 400,2977), 382,2868 (M⁺-H₂O, 0,51, 382,2872), 364,2798 (M⁺-2 × H₂O, 0,39, 364,2766), 269,1913 (M⁺-H₂O-Seitenkette, 0,06, 269,1905), 251,1792 (M⁺-2 × H₂O-Seitenkette, 0,12, 215,1800), 152,0828 (0,36, C₉H₁₁O₂, 152,0837), 134,0735 (1,00, C₉H₁₀O, 134,0732).

Beispiel 7
Herstellung von 25-Keto-27-norvitamin D₃
(Verbindung 8)

Zu einer Lösung von 25-Keto-27-norcholesterin (2,0 g) in 5,0 ml Pyridin wurde 1,0 ml Essigsäureanhydrid gefügt und das Gemisch wurde 4 Stunden auf 50 °C erwärmt. Das Gemisch wurde anschliessend auf gebrochenes Eis gegossen, feste K₂CO₃ wurde zugesetzt und das wässrige Gemisch wurde mit Äther extrahiert. Die Ätherphasen wurden mit 1 n HCl-Lösung, verdünnter NaHCO₃-Lösung und anschliessend mit Wasser und Salzlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Verdampfen des Ätherlösungsmittels wurde der Rückstand an Siliziumdioxidgel (4,5 × 4 cm Säule) chromatografiert, eluiert mit 600 ml 30% Äthylacetat in Hexan, unter Bildung von 1,8 g des 3-Acetatprodukts (Verbindung 1, worin R = Acetyl). Zu 250 mg 25-Keto-27-norcholesterin-3-acetat (1, R = Acetyl), gelöst in 8,5 ml Hexan und 5,5 ml Benzol wurden festes NaHCO₃ (285 mg) und 115 mg (1,3-Dibrom-5,5-dimethylhydantoin) gefügt. Nach dem Erwärmen des Gemischs unter N₂ während 20 Minuten bei 80 °C wurde es filtriert und der Rückstand wurde gut mit trockenem Benzol gespült. Die gesamte Filtratlösung wurde verdampft und der Rückstand wurde in 8,5 ml trockenem Xylol aufgenommen, zu dem 2,5 ml s-Collidin gefügt wurden. Dieses Gemisch wurde 1,5 Stunden unter N₂ unter Rückfluss gehalten, anschliessend gekühlt, mit Wasser verdünnt und mit Äther extrahiert. Die Ätherextrakte wurden gewaschen (1 n HCl, verdünntes NaHCO₃, H₂O und Salzlösung) und getrocknet (Na₂SO₄), anschliessend filtriert und das Lösungsmittel wurde verdampft.

Der Rückstand wurde in 8 ml Dioxan gelöst, 35 mg p-Toluolsulfonsäure wurden anschliessend zugesetzt und das Gemisch wurde 30 Minuten bei 70 °C erwärmt. Wasser wurde zugesetzt und das Produkt wurde mit Äther extrahiert. Die Ätherphasen wurden gewaschen (verdünntes NaHCO₃, H₂O und Salzlösung), über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde verdampft.

Zu dem Rückstand in 5 ml Äther, wurden 3 ml 5% KOH in Methanol zugefügt und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 1 Stunde gerührt. Nach dem Zusatz von Wasser wurde das Gemisch mit Äther extrahiert, die Extrakte wurden gewaschen (H₂O und Salzlösung), getrocknet (Na₂SO₄) und das Lösungsmittel wurde verdampft. Der Rückstand ergab nach der Chromatografie an Siliziumdioxidgelplatten (0,75 mm dick), entwickelt mit 25% Äthylacetat in Chloroform, 88 mg des gewünschten Produkts, 25-Keto-27-nor-7-dehydrocholesterin. Dieses 5,7-Dienprodukt, gelöst in Äther (150 ml) wurde unter N₂ 5 Minuten bei 0 °C bestrahlt unter Verwendung einer Hanau-Lampe mit Vycor-Filter. Das Lösungsmittel wurde anschliessend verdampft und der Rückstand wurde an Siliziumdioxidgel-Dünnschichtplatten chromatografiert, zweimal entwickelt mit 25% Äthylacetat/CHCl₃, unter Bildung des Prävitaminprodukts (25-Keto-27-nor-prävitamin D₃).

Dieses Produkt, gelöst in 2 ml CCl₄, wurde 3,5 Stunden unter N₂ bei 80 °C erwärmt, um die Isomerisierung zu bewirken. Durch Verdampfen des Lösungsmittels erhielt man 25-Keto-27-nor-vitamin D₃ (Verbindung 8).

Beispiel 8
6-Methoxy-25-keto-27-nor-3,5-cyclovitamin D₃
(Verbindung 9, Z = Me)

Eine Lösung von 20 mg 25-Ketovitamin 8 in 0,25 ml trockenem Pyridin wurde mit 40 mg Toluolsulfonylchlorid behandelt. Nach 90 Stunden bei 5 °C wurden Eischnitzel und 10% NaHCO₃-Lösung zugesetzt und das Gemisch wurde in Äther extrahiert. Die Ätherphasen wurden gewaschen (1 n HCl, verdünntes NaHCO₃, Wasser, Salzlösung) und

über MgSO₄ getrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wurde das 3-tosylierte Produkt (20 mg) in 2 ml trockenem Methanol und 0,3 ml trockenem Benzol gelöst, 100 mg NaHCO₃ wurden zugesetzt und das Gemisch wurde 20 Stunden auf 55 °C erwärmt. Nach dem Zusatz von H₂O wurde das Gemisch mit Äther extrahiert, die Ätherextrakte wurden gewaschen (H₂O und Salzlösung), getrocknet (MgSO₄) und verdampft unter Bildung von 20 mg des gewünschten 3,5-Cyclovitaminprodukts 9 (Z = Methyl).

Beispiel 9
1α-Hydroxy-6-methoxy-25-keto-27-nor-3,5-cyclovitamin D₃
(10, Z = Me).

Zu 1,9 mg SeO₂ in 0,7 ml trockenem CH₂Cl₂ bei 0° wurden 10 µl 90% t-Butylhydroxyperoxid gefügt und das Gemisch wurde 30 Minuten bei 0° gerührt. Zu diesem Gemisch wurden 20 mg Cyclovitaminprodukt 9 (Z = Me) in 0,7 ml CH₂Cl₂ tropfenweise gefügt und die Reaktion konnte in 12 Minuten bei Raumtemperatur verlaufen. Die Reaktion wurde durch Zusatz von gesättigter NaHCO₃-Lösung abgeschreckt und das Gemisch wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Extrakte wurden gewaschen (verdünntes NaHCO₃, Wasser, Salzlösung), getrocknet (MgSO₄) und das Produkt wurde durch Dünnschichtchromatografie (Siliziumdioxidgel, 40% Äthylacetat/Hexan) gereinigt. Auf diese Weise erhielt man 5 mg 1α-Hydroxycyclovitaminprodukt 10 (Z = Methyl), das durch sein Massenspektrum und Protonen-NMR-Spektrum charakterisiert wurde.

Die Behandlung der Verbindung 10 (1 mg) mit Essigsäureanhydrid (0,1 ml) in Pyridin (0,1 ml) bei 55° während 1,5 Stunden ergab das entsprechende 1α-Acetoxyderivat. In gleicher Weise wird das 1α-Benzoat hergestellt durch Reaktion von 10 mit Benzoylchlorid (in Pyridin bei Raumtemperatur während 3 Stunden).

Beispiel 10
1α-Hydroxy-25-keto-27-norvitamin D₃ (Verbindung 7)
Das 1α-Hydroxy-6-methoxy-25-keto-27-nor-3,5-cyclovitamin-D₃-Produkt (10 mg) wurde in 0,5 ml Eisessig aufgenommen und 15 Minuten bei 55° erwärmt. Gebrochenes Eis und ausreichend NaHCO₃ zur Neutralisation des Reaktionsgemischs wurden anschliessend zugesetzt und das Gemisch wurde mit Äther extrahiert. Die Ätherextrakte wurden gewaschen (verdünntes NaHCO₃, H₂O, Salzlösung), getrocknet (MgSO₄) und verdampft. Der Rückstand, der hauptsächlich das gewünschte 1α-Hydroxy-25-keto-27-norvitamin-D₃-3-acetatprodukt (Verbindung 11, R = Acetyl) und das entsprechende 5,6-trans-Isomere enthielt, wurde anschliessend chromatografiert (Hochdruckflüssigkeitschromatografie unter Verwendung einer 0,62 × 25 cm Säule von Zorbax-SIL und 2,5% 2-Propanol in Hexan als Eluierlösungsmittel; Zorbax-SIL ist ein mikroteilchenförmiges Siliziumdioxidgelpräparat, ein Produkt der Dupont und Co., Wilmington, Del.). Das gewünschte cis-Vitaminprodukt 11 (R = Acetyl) eluierte bei 103 ml und nach dem einmaligen Recyclisieren wurde es in reiner Form (3,4 mg) erhalten und durch sein Protonen-NMR-Spektrum charakterisiert. Das entsprechende 5,6-trans-Isomere, 1α-Hydroxy-25-keto-5,6-trans-27-norvitamin-D₃-3-acetat, eluierte bei 112 ml und wurde in reiner Form gewonnen.

Das so erhaltene 3-Acetatprodukt 11 (R = Acetyl) wurde in einer Lösung von Äther (0,5 ml) und 0,1M KOH/MeOH (0,1 ml) hydrolysiert. Die Hydrolyse war nach 1 Stunde bei Raumtemperatur vollständig, worauf Wasser zugesetzt wurde und das Gemisch mit Äther extrahiert wurde. Die Extrakte wurden mit Wasser und Salzlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde verdampft unter Bildung von 2,9 mg 1α-Hydroxy-25-keto-27-norvit-

amin D₃ (Verbindung 7), das Ultraviolett-, kernmagnetische Resonanz- und Massenspektren zeigte, die genau mit der Struktur in Einklang standen und mit den Daten übereinstimmten, die für das gleiche Produkt, vorstehend in Beispiel 6 dokumentiert, erhalten wurden.

Die Identifizierungshydrolyse des 3-Acetatderivats des 5,6-trans-Produkts ergab das 1 α -Hydroxy-25-keto-5,6-trans-27-norvitamin D₃ (UV: λ_{\max} 273 nm; Massenspektrum m/e 400 (M⁺), 152, 134).

Biologische Aktivität

Männliche Säuglingsratten (Holtzman Co., Madison, Wis.) wurden in hängende Drahtkäfige eingesetzt und ad libitum mit einer Niedrigcalcium-, Vitamin-D-Mangel-Diät, wie von Suda et al. (J. Nutr. 100, 1049 (1970)) beschrieben, während 2 bis 3 Wochen vor ihrer Verwendung in den folgenden Versuchen, gefüttert.

Intestinaler Calciumtransport

Die Ratten wurden in sechs Gruppen von jeweils sechs Tieren aufgeteilt und jeder wurde eine einzige Dosis der Testverbindungen, gelöst in 0,05 ml 95% Äthanol, durch intrajuguläre Injektionen, verabreicht. Die verabreichten Mengen sind in der nachstehenden Tabelle angegeben. Die Gruppe 1, die Kontrollgruppe, erhielt nur das Lösungsmittel-Vehikel (0,05 ml 95% Äthanol). 24 Stunden nach der Injektion der Verbindung wurden die Ratten durch Köpfen getötet und ihre Duodena wurden zur Messung der Aktivität des Calciumtransports nach den Techniken von Martin und DeLuca (am. J. Physiol. 216, 1351 (1969)) verwendet. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Gruppe	Verabreichte Verbindung	⁴⁵ CA serosal/ ⁴⁵ CA mucosal (Mittel \pm SEM)
1	EtOH	2,1 \pm 0,2
2	12,5 ng 1,25-(OH) ₂ D ₃ ^a	4,6 \pm 0,2
3	0,5 μ g Verbindung 7 ^b	2,3 \pm 0,2
4	2,5 μ g Verbindung 7	3,2 \pm 0,3
5	12,5 μ g Verbindung 7	3,2 \pm 0,4
6	25 μ g Verbindung 7	3,7 \pm 0,3

^a 1,25-(OH)₂D₃ = 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃

^b Verbindung 7 = 1 α -Hydroxy-25-keto-27-norvitamin D₃

Knochencalciummobilisierung

(Erhöhung der Serum-Calciumkonzentration)

Ratten, die wie vorstehend gefüttert wurden, wurden in Gruppen von jeweils sechs Tieren aufgeteilt, denen 0,05 ml 95% Äthanol (die Kontrollgruppen) oder verschiedene Mengen der Testverbindungen (wie in der nachstehenden Tabelle angegeben), gelöst in 0,05 ml 95% Äthanol durch intrajuguläre Injektion verabreicht wurden. Die Materialien wurden in einzelnen Dosierungen 6 oder 24 Stunden vor der Tötung verabreicht. Die Ratten wurden durch Köpfen nach den angegebenen Zeiten getötet, ihr Blut wurde gesammelt und zur Erzielung des Serums zentrifugiert. Ein aliquoter Teil des Serums (0,1 ml) wurde mit 1,9 ml einer 0,1% Lanthanchloridlösung vermischt und die Calciumkonzentration im Serum (als ein Anzeichen für die Freisetzung von Knochencalcium als Reaktion auf die Testverbindung) wurde mit einem Atomabsorptions-Spektrophotometer (Perkin Elmer Model HO-214) gemessen. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Verabreichte Verbindung	Serum Ca ⁺⁺ (mg/100 ml)	
	6 Stunden Mittel \pm SEM	24 Stunden Mittel \pm SEM
5 EtOH (Kontrolle)	4,2 \pm 0,1	3,7 \pm 0,2
12,5 ng 1,25-(OH) ₂ D ₃ ^a	4,5 \pm 0,2	4,7 \pm 0,2
0,500 μ g Verbindung 7 ^b	4,5 \pm 0,1	3,6 \pm 0,1
2,5 μ g Verbindung 7	5,2 \pm 0,1	3,9 \pm 0,2
10 12,5 μ g Verbindung 7	5,3 \pm 0,2	4,3 \pm 0,2
25 μ g Verbindung 7	5,2 \pm 0,1	4,4 \pm 0,3

^a 1,25-(OH)₂D₃ = 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃

^b Verbindung 7 = 1 α -Hydroxy-25-keto-27-norvitamin D₃

Aus den vorstehenden Daten ist ersichtlich, dass 1 α -Hydroxy-25-keto-27-norvitamin D₃ (Verbindung 7) eine ausgeprägte Vitamin D-artige Wirksamkeit entwickelt. Besonders bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist der rasche Einsatz der Wirkung (vergleiche die 6-Stunden-Zeitpunkte der vorstehenden Tabelle), im Vergleich mit dem von 1,25-(OH)₂D₃, dem raschest wirksamen bisher bekannten Vitamin-D₃-Derivat.

Abgesehen von seiner Verwendbarkeit als biologisch aktives Analoges von Vitamin D₃ ist die erfindungsgemässe Verbindung auch nützlich als synthetisches Zwischenprodukt für die Herstellung anderer gewünschter Vitamin-D-Verbindungen. Beispielsweise führt die Behandlung dieser 1 α -Hydroxy-25-keto-Vitaminverbindung mit einem Methyl-Grignard-Reagens (z. B. CH₃MgBr oder CH₃MgI) oder einem Methylithiumreagens, zum 1 α -25-Dihydroxyvitamin D₃, dem wirksamsten bekannten Metaboliten von Vitamin D₃. Das 25-Ketoderivat kann so als Ausgangsmaterial für eine einfache und geradlinige Herstellung dieses hochere-wünschten Metaboliten dienen. Noch bedeutsamer kann das 25-Ketoderivat als Ausgangsmaterial für die Synthese von 1,25-(OH)₂D₃ in hochradioaktiver Form dienen. So ergibt die Behandlung des Ketons mit tritiiertem Methyl-Grignard- oder Methylithium-Reagens direkt das (26,27-³H)-1,25-(OH)₂D₃ und mit geeigneten ¹⁴C-markierten Reagentien ergibt die gleiche Reaktion das (26,27-¹⁴C)-1,25-(OH)₂D₃. Nach dieser Methode kann radiomarkiertes 1,25-(OH)₂D₃ mit äusserst hoher spezifischer Wirksamkeit in einer einfachen leicht durchzuführenden Reaktionsstufe hergestellt werden (z. B. kann (26,27-³H)-1,25-(OH)₂D₃ mit spezifischer Wirksamkeit von 80 Ci/mMol hergestellt werden). In gleicher Weise wird das Trideutero- oder ¹³C-markierte 1,25-(OH)₂D₃ leicht hergestellt durch Behandeln des Ketons (7) mit den in geeigneter Weise isotopisch markierten Grignard- oder Alkylithium-Reagentien, die leicht hergestellt werden nach bekannten Methoden aus den handelsüblichen isotopisch markierten Methylhalogeniden (z. B. C²H₃I, ¹³CH₃I, usw.).

Da 5,6-trans-Vitamin-D₃-Verbindungen isomerisiert werden können durch Bestrahlen mit Ultraviolettlicht zu den entsprechenden 5,6-cis-Isomeren, was auf dem Fachgebiet bekannt ist, ist das nach den obigen Verfahren erhaltene 5,6-trans-1 α -Hydroxy-25-keto-27-norvitamin-D₃-produkt brauchbar wegen seiner fotochemischen Umwandlung in das 5,6-cis-Produkt.

In den Ansprüchen bedeutet der Ausdruck «Niedrigalkyl» eine Alkylgruppe mit 1 bis etwa 4 Kohlenstoff, wie Methyl, Äthyl, Isobutyl, sec-Butyl, T-Butyl und der Ausdruck «Acyl» bedeutet eine Acylgruppe, wie Formyl, Acetyl, Benzoyl oder Nitrobenzoyl.