



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1275/80

(51) Int.Cl.⁴ C 07 C 172/00

(22) Indleveringsdag: 25 mar 1980

(24) Løbedag: 24 jul 1979

(41) Alm. tilgængelig: 25 mar 1980

(44) Fremlagt: 25 sep 1989

(86) International ansøgning nr.: PCT/US79/00529

(86) International indleveringsdag: 24 jul 1979

(86) Videreførelsesdag: 25 mar 1980

(30) Prioritet: 26 jul 1978 US 928279

(71) Ansøger: *WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION; 614 North Walnut Street; Madison; Wisconsin 53705, US

(72) Opfinder: Hector F. *DeLuca; US, Heinrich K. *Schnoes; US, Joseph L. *Napoli Jr.; US, Bruce L. *Onisko; US

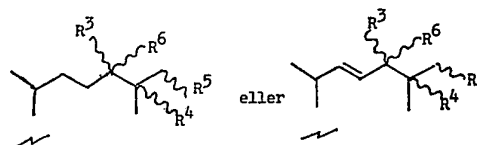
(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af 1-fluorerede vitamin D-forbindelser eller 1-fluor-5,6-trans vitamin D-forbindelser eller 1-fluor-3,5-cyclovitamin D-forbindelser

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

hvor i R har formelen

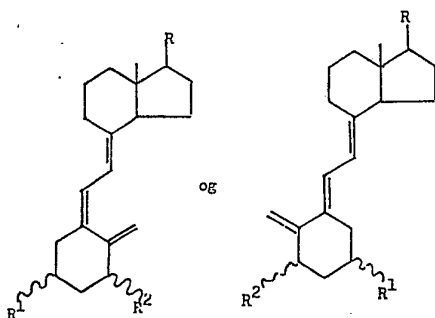


og hvori R¹ betegner hydrogen, hydroxy, O-acyl eller O-alkyl, R² fluor, R³, R⁴ og R⁵ er valgt blandt hydrogen, hydroxy, O-acyl, O-alkyl og fluor og R⁶ hydrogen eller alkyl, og fluorerede mellemprodukter herfor fremstilles ved forskellige fremgangsmåder.

Forbindelserne udviser vitamin D-lignende virkninger.

1275-80

1-fluorvitamin D-forbindelserne I og II



Opfindelsen angår en særlig fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte 1-fluorvitamin D forbindelser eller 1-fluor-5,6-transvitamin D forbindelser eller 1-fluor-3,5-cyclovitamin D forbindelser.

5 Vitamin D₃ og D₂ er velkendte midler til at kontrollere calcium- og phosphorhomeostase. Disse forbindelser stimulerer hos normale dyr eller mennesker tarmcalciumtransporten og knoglecalciummobiliseringen, og de er i stand til at forhindre rakitis. Videnskabelige undersøgelser i lø-

10 bet af det sidste decennium har imidlertid vist, at vitamin D₂ og D₃ må omdannes til deres hydroxylerede former, inden de udviser biologisk aktivitet. Nylige undersøgelser har f. eks. vist, at 1,25-dihydroxyvitamin D₃, det dihydroxylerede omsætningsprodukt af vitamin D₃, er den forbindelse,

15 der er ansvarlig for de tidligere nævnte biologiske virkninger. På lignende måde er 1,25-dihydroxyvitamin D₂ den aktive form af vitamin D₂.

Henvisninger til forskellige vitamin D derivater findes inden for patent- og anden litteratur. Se f. eks. USA patent numrene: 3 565 924, der omhandler 25-hydroxychole-

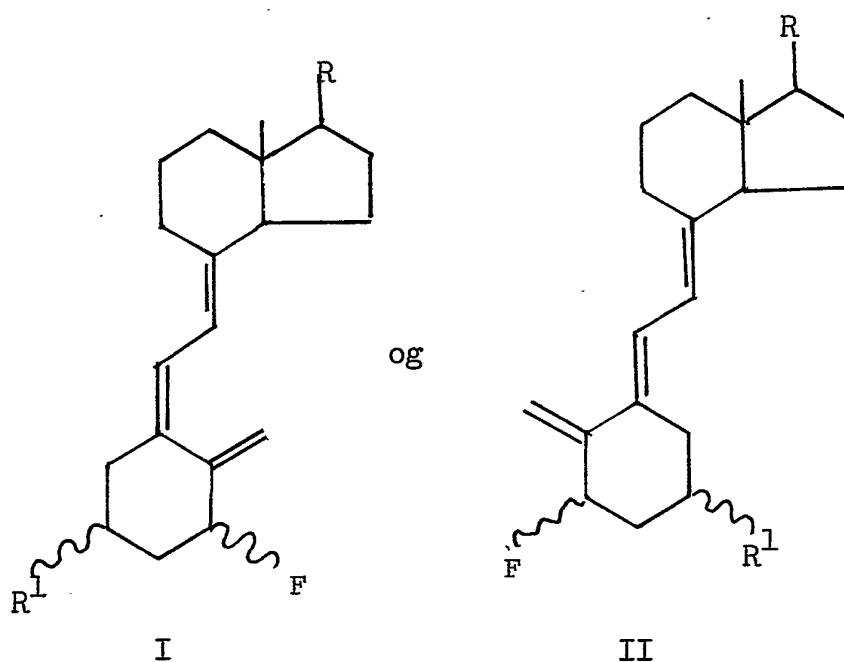
20 calciferol; 3 697 559, der omhandler 1,25-dihydroxycholecalciferol; 3 741 996, der omhandler 1 α -hydroxycholecalciferol; 3 743 661, der omhandler 5,6-trans-25-hydroxycholecalciferol; 3 907 843, der omhandler 1 α -hydroxyergocalciferol; 3 715 374, der omhandler 24,25-

25 dihydroxycholecalciferol; 3 739 001, der omhandler 25,26-dihydroxycholecalciferol; 3 786 062, der omhandler 22-dehydro-25-hydroxycholecalciferol; 3 847 955, der omhandler 1,24,25-trihydroxycholecalciferol; 3 906 014,

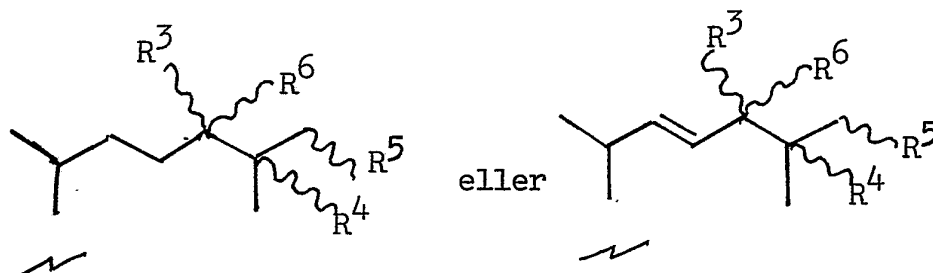
30 der omhandler 3-deoxy-1 α -hydroxycholecalciferol; 4 069 321, der omhandler fremstillingen af forskellige sidekædefluorerede vitamin D₃ derivater og sidekædefluorerede dihydrotachysterol₃ analoge.

Det har nu vist sig, at 1-fluorerede vitamin D forbindelser også er i besiddelse af vitamin D-lignende virkning. Sådanne fluoranaloge er derfor værdifulde forbindelser ved behandling af forskellige sygdomme som f.eks. osteomalacia, osteodystrophi og hyperparathyroidisme.

Specielt angår opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af fluorvitamin D forbindelser med den almene formel I og 5,6-trans-fluorvitamin D forbindelser med den almene formel II

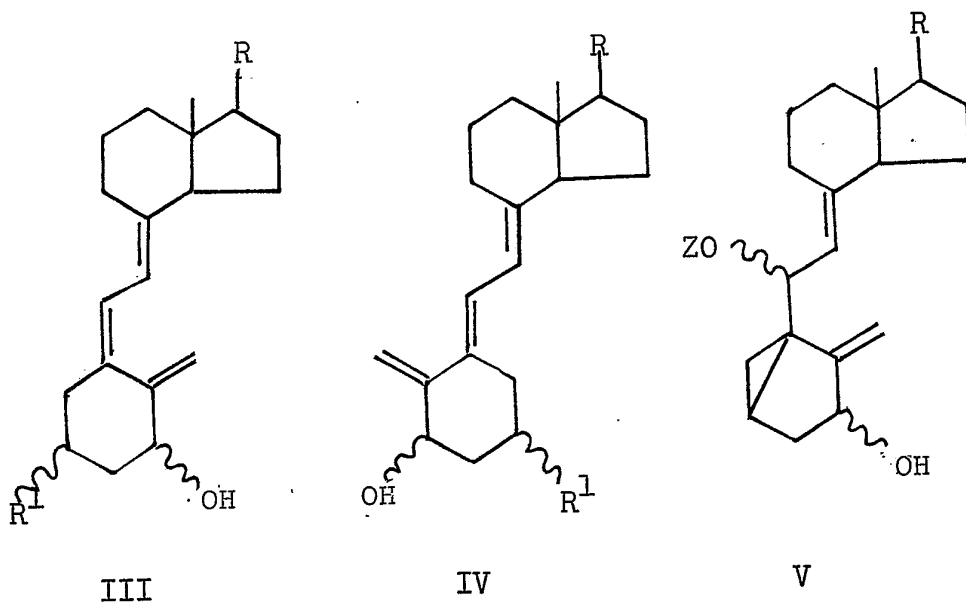


hvor R betegner en steroid sidekæde med formlen

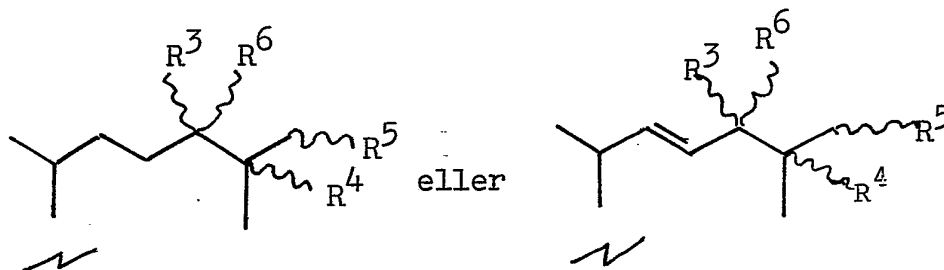


hvor R^1 er valgt blandt hydrogen, hydroxy, 0-lavere alkyl eller 0-acyl, og hvor hver af R^3 , R^4 og R^5 er valgt blandt hydrogen, hydroxy, 0-lavere alkyl, o-acyl og fluor, og hvor R^6 betegner hydrogen eller lavere alkyl.

- 5 Opfindelsen tilvejebringer en fremgangsmåde til fremstilling af 1-fluorvitamin D forbindelser eller 1-fluor-5,6-trans-vitamin D forbindelser eller 1-fluor-3,5-cyclovitamin D forbindelser, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.
- 10 Velegnede udgangsmaterialer til denne fluorering omfatter hydroxyvitamin D forbindelser med den almene formel III angivet nedenfor eller hydroxy-5,6-trans-vitamin D forbindelser med den almene formel IV eller hydroxy-3,5-cyclovitamin D forbindelser med den almene formel V ligeledes angivet nedenfor.
- 15



hvor R betegner en steroid sidekæde med formelen



og hvor R¹ er valgt blandt hydrogen, hydroxy, 0-lavere
alkyl og 0-acyl, og hver af R³, R⁴ og R⁵ er valgt blandt
hydrogen, hydroxy, 0-lavere alkyl og 0-acyl, og hvor R⁶
5 betegner hydrogen eller lavere alkyl, og hvor Z betegner
lavere alkyl.

I den foreliggende beskrivelse med krav betegner udtryk-
ket "lavere alkyl" en carbonhydridgruppe indeholdende fra
1 - 5 carbonatomer, der kan være lige eller forgrenet
10 (f.eks. methyl, ethyl, isopropyl), og udtrykket "acyl"
betegner en alifatisk acylgruppe indeholdende 1 - 5 car-
bonatomer (f.eks. acetyl, propionyl) eller en aromatisk
eller substitueret aromatisk acylgruppe (f.eks. benzoyl
eller nitrobenzoyl).

15 Fluorvitamin D forbindelserne med den almene formel I
fremstilles ud fra udgangsmaterialerne med den almene
formel III, medens fluor-5,6-trans-vitamin D forbindel-
serne med formel II fremstilles ud fra forbindelserne
med formel IV, og fluorering af cyclovitamin D udgangs-
20 materialet med formel V efterfulgt af omdannelser som
beskrevet nedenfor fører til begge de fluorerede forbindel-
delser I og II.

Udgangsmaterialerne for fluoreringen f.eks. forbindelser-
ne med den almene formel III - V kan fremstilles ved vel-
kendte metoder. Hydroxyvitamin D forbindelserne med den
25 almene formel III kan således tilvejebringes ved syntese

- eller som isolerede naturlige forbindelser. (se f. eks. Schnoes og DeLuca, i Bioorganic Chemistry, E. E. Tamelen, Vol. 2, kap. 12 p. 299 - 335, Academic Press, NY 1978).
5,6-trans-vitamin D forbindelserne med den almene formel
5 IV kan fremstilles ud fra tilsvarende 5,6-cis forbindelser (almen formel III) ved den velkendte isomeriseringsreaktion, hvor man anvender iodkatalysator (Verloop et al. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas. 78, 1004 (1969)).
- 3,5-cyclovitamin D forbindelserne med den almene formel
10 V kan fremstilles ved fremgangsmåderne beskrevet af Sheves og Mazur, J. Am. Chem. Soc. 97, 6249 (1975), og Paaren et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 2080 (1978).
- Jones et al. (USA patentskrift nr. 4 069 321) har beskrevet fremstillingen af forskellige sidekædefluorerede vitamin D₃ derivater og sidekædefluorerede dihydrotachysterolanalogue. Fremgangsmåderne beskrevet i disse patenter
15 indebærer fluorering af et precursorsteroid og efterfølgende omdannelse af fluorsteroidet til den ønskede fluor-vitamin D forbindelse.
- 20 Det har nu imidlertid vist sig, at ring A- og eventuelt sidekædefluorerede vitamin D forbindelser eller analoge med de almene formler I og II meget let kan fremstilles ved direkte indførelse af fluor i de intakte hydroxy-vitamin D forbindelser og analoge deraf med formlerne III -
25 V ved hjælp af et fluorerende middel, der er et dialkylaminosvovltrifluorid f. eks. diethylaminosvovltrifluorid. Ved hjælp af disse reagenser kan en eller flere fluor-substituenten indføres i et vitamin D molekyle ved direkte ombytning af hydroxyfunktionen/funktionerne i udgangsmaterialet.
30
- Middleton (J. Org. Chem. 40, 574, (1975)) har beskrevet anvendelsen af diethylaminosvovltrifluorid til ombytning

af hydroxyfunktionerne med fluor i organiske forbindelser, men hans anvendelse er begrænset til enkle og stabile molekyler, der ikke giver nogen basis for at bedømme reagensets effektivitet til direkte indførelse af fluor i vitamin D forbindelser uden forandring af den følsomme trienchromophor. Det er denne kemiske reaktivitet af vitamin D chromophoren, der har ledt andre inden for dette felt til at anvende indirekte og besværlige veje, når man har forsøgt at syntetisere fluorvitamin D forbindelser. F. eks. har Jones et al. i USA patentskrift nr. 4 069 321 foreslået fremgangsmåder til fremstilling af adskillige fluorvitamin D analoge, idet der anvendtes diethylaminosvovltrifluorid kun til indførslen af fluor i precursorsteroiderne, der herefter omdannedes til de fluorvitamin D analoge. Der er faktisk kun en tidligere anvendelse af diethylaminosvovltrifluorid til direkte syntese af 25-fluorvitamin D₃ ud fra 25-hydroxyvitamin D₃ (se Onisko, Schnoes og DeLuca, Tetrahedron Letters (No. 13) 1107 (1977)).

Det har nu vist sig, at det tidligere nævnte diethylaminosvovltrifluoridreagens kan anvendes ikke alene til indførslen af fluor ved forskellige stillinger (f. eks. carbon 24, 25, 26) i vitamin D molekylets sidekæde eller analoge heraf, men også til indførslen af fluor ved carbon 1, og at det således udgør en effektiv og direkte vej til de ønskede 1-fluorprodukter såvel som C-1- og sidekædefluorerede forbindelser. Disse C-1-fluorvitamin D og C-1-fluor-5,6-trans-vitamin D forbindelser er hidtil ukendte forbindelser.

Den direkte med held udførte fluorering ved carbon 1 i vitamin D molekylet er særlig bemærkelsesværdig og overraskende, fordi tilgængelige informationer har antydnet, at vitaminchromophoren, der er stærkt tilbøjelig til at omlejres, ville undergå uønskede og irreversible forandringer efter fluorindførsel ved carbon 1. Faktisk er den tilsyneladende analoge reaktion nemlig indførsel af fluor ved carbon 3 ved at behandle en C-3-hydroxyvitamin D₃ for-

bindelse eller analog heraf med diethylaminosvovltrifluorid ikke mulig netop på grund af chromophoromlejrning. Ombytning af hydroxyfunktionen ved denne stilling med diethylaminosvovltrifluorid fører til en uønsket forbindelse, i hvilken den chromophore er forandret. Den lette fremstilling af 1-fluorvitamin D forbindelser og vitamin D analoge er derfor et hidtil ukendt og uventet resultat. Det har også vist sig, at mere end ét fluoratom kan indføres samtidig simpelthen ved at underkaste fler-hydroxylerede (f. eks. di-, trihydroxy) vitamin D udgangsmaterialer for fluorering. Da fluoreringen medfører ombytning af den frie hydroxygruppe /grupper, er det nødvendigt at eventuelle andre hydroxyfunktioner i udgangsmaterialet, der ikke skal ombyttes med fluor, beskyttes på passende måde ved acylering som f. eks. acetylering og benzoyletering. Specielt, dersom C-3-hydroxyfunktionen findes i udgangsmaterialet, er det nødvendigt at beskytte ved acylering, da som allerede nævnt behandling af C-3-hydroxyvitamin D forbindelser eller analoge med diethylaminosvovltrifluorid fører til uønsket chromophoromlejrning. Beskyttelse af hydroxygrupperne kan let udføres ved velkendte metoder, og efter fluoreringen kan acylgrupperne naturligvis let fjernes, dersom det ønskes, ved hydrolyse under basiske betingelser.

Det vide anvendelsesområde for den direkte fluoreringsproces, hvor fluorvitamin D forbindelser med den almene formel I og fluor-5,6-trans-vitamin D forbindelser med formel II kan fremstilles ud fra udgangsmaterialerne med formlerne III, IV og V illustreres nærmere ved følgende typiske omdannelser.

(1) $1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3\text{-3-O-acyl} \longrightarrow 1, 25\text{-difluorvitamin D}_3\text{-3-O-acyl}$

(2) $1\alpha\text{-hydroxyvitamin D}_3\text{-3-O-acyl} \longrightarrow 1\text{-fluorvitamin D}_3\text{-3-O-acyl}$

(3) $1\alpha,25$ -dihydroxy-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D_3

trin 1 1,25-difluor-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D_3
(fluorering)

trin 2 1,25-difluorvitamin D_3 + 1,25 difluor-5,6-
(solvolyse)
trans-vitamin D_3

- 5 Som det vil fremgå, er det foranstående reaktionsskema kun illustrerende. Eksemplerne er opført for at vise, at fremgangsmåden tilvejebringer en bekvem indførsel af fluor i ring A og eventuelt i steroidmolekylets sidekæde, og specielt, at vitamin D forbindelser og analoge med fluor-
- 10 substituenten ved carbonatom 10g et vilkårligt eller ved flere af carbonatomerne 24, 25 eller 26 let kan fremstilles ud fra de tilsvarende hydroxylerede udgangsmaterialer.

- Som angivet ovenfor i skemaet giver fluorering af udgangsmaterialerne III eller IV de tilsvarende 1-fluorforbin-
- 15 delser direkte, men afhængigt af det anvendte udgangsmateriale og det ønskede produkt, kan et forudgående hydroxybeskyttelsestrin (acylering) og et efter-
- følgende trin for fjernelse af beskyttelsen være nødvendig. Med cyclovitamin D udgangsmaterialet med formel V.
- 20 er den totale proces og specielt fluoreringstrinnet det samme, bortset fra at efter fluorindførslen kan der tilføjes et solvolysetrin for at udvinde både cis- og trans-formerne af fluorvitaminforbindelserne. Solvolysetrinnet kan imidlertid formelt set betragtes som et alternativt trin til
- 25 fjernelse af beskyttelse, ved hvilket den "beskyttede" (dvs. for øjeblikket fraværende) C-3-substituent såvel som både den cis og trans trienchromophore atter gendannes.

- Et foretrukket middel til fluorering er diethylamino-svovltrifluorid (Middleton, J. Org. Chem. 40, 574 (1975)).
- 30 Reaktionen udføres bekvemt i et halogen-carbonhydridopløsningsmiddel som f.eks. methylenchlorid, carbontetrachlorid eller trichlorfluormethan ved lav temperatur f. eks.

-78 °C. For at ombytte hydroxygrupperne med fluor er korte reaktionstider f.eks. 15 - 45 minutter tilstrækkelige. Skønt reagenset også angriber ketogrunderne i molekylet, gør det dette betydeligt langsommere, og beskyttelsen af eventuel tilstedeværende ketofunktioner er normalt ikke nødvendig under de betingelser, hvor ombytning af hydroxygrupper ønskes.

Som tidligere nævnt og som illustreret i reaktionsskemaerne må eventuelle hydroxygrupper i udgangsmaterialet, der ikke skal erstattes med fluor ved denne proces, acyleres (f.eks. acetyleres eller benzoyleteres). Specielt kræver en hydroxyfunktion ved carbon 3 (således som den almindeligvis er til stede i vitamin D forbindelser eller analoge) at blive beskyttet ved acylering, idet som nævnt ovenfor, fluorering i nærværelse af en C-3-hydroxygruppe kan føre til uønskede forbindelser. Acylering af hydroxygrupper er naturligvis en velkendt fremgangsmåde, og den udføres normalt ved at behandle hydroxyforbindelsen med et acylerende middel (f.eks. eddikesyreanhydrid, benzoylchlorid) i et passende opløsningsmiddel (f.eks. pyridin). Primære og sekundære hydroxygrupper i vitamin D forbindelserne eller deres analoge kan let acyleres under anvendelse af disse reagenser og opløsningsmidler ved stuetemperatur (eller ved let forhøjede temperaturer som f.eks. 50 °C) i løbet af 2 - 6 timer. Acylering af tertiære hydroxygrupper kræver naturligvis kraftigere reaktionsbetingelser f.eks. forhøjede temperaturer (f.eks. 75 - 100 °C) og passende reaktionstider f.eks. 4 - 24 timer. Det foretrækkes at udføre reaktionen under en nitrogenatmosfære for at undgå dekomponering af materialet. Selektiv acylering af særlige kemisk forskellige hydroxylgrupper kan derfor let udføres. Hvor selektiv acylering af kemisk ens hydroxygrupper kræves, kan chromatografisk adskillelse af forbindelserne være nødvendig. Således kan α -hydroxyvitamin D_3 -3-acetat fremstilles ved at udføre en acetylering

ved stuetemperatur og afbryde reaktionen, inden fuldstændig acetylering er sket. Under disse betingelser fås en blanding af 4 forbindelser: 1 α -hydroxyvitamin D₃, 1 α -hydroxyvitamin D₃-1-acetat, 1 α -hydroxyvitamin D₃-3-acetat og 1 α -hydroxyvitamin D₃-1,3-diacetat, ud fra hvilken den 5 ønskede forbindelse f.eks. 1 α -hydroxyvitamin D₃-3-acetat (se reaktion 2) fås ved chromatografi. Andre delvis acylerede forbindelser, der kræves som udgangsmaterialer for den efterfølgende fluorering (f.eks. som reaktionen 1) 10 kan fås på analog måde. Alternativt kan delvis acylerede forbindelser fås ved først at acylere alle hydroxygrupperne og herefter fjerne en eller flere af acylfunktionerne ved hydrolyse. Således kan 1,25-dihydroxyvitamin D₃-3,25-di-0-acyl forbindelsen fås ved delvis hydrolyse 15 under basiske betingelser af 1,25-dihydroxyvitamin D₃-1,3,25-tri-0-acylderivatet. Eksemplerne er givet for at vise, at mange forskellige metoder er kendte og mulige at anvende for at fremstille 0-beskyttede vitamin D forbindelser, således som det kræves for den efterfølgende fluorering. 20

Når første fluoret er blevet indført i molekylet kan alle eventuelle tilstedeværende acylgrupper fjernes ved basisk hydrolyse f.eks. ved behandling af den acylerede fluoranaloge med 5% KOH i MeOH ved en temperatur på 25 - 80 °C i 25 1 - 4 timer. De herved fremkomne deacylerede fluorerede forbindelser kan herefter bekvemt yderligere renses ved chromatografi. Anvendelsen af cyclovitamin D forbindelser med formel V giver naturligvis udgangsmaterialer med indbygget beskyttelse af C-3-stillingen og den trienchromophore, og med hensyn til fluoreringen kan den 3,5-cyclopropano-"beskyttende gruppe" betragtes ved oparbejdningen 30 som værende ækvivalent med 3-0-acylbeskyttelsen, når det drejer sig om cis og transvitamin udgangsmaterialerne III og IV, naturligvis bortset fra at eventuel "fjernelse af beskyttelsen" fra disse cyclopropanmellemprodukter kræver 35

syrekatalyseret solvolyse. Når som helst et cyclovitamin-
udgangsmateriale bærer hydroxyfunktioner, der ikke skal
fluoreres (f.eks. i sidekæden), kan disse hydroxyfunktio-
ner beskyttes ved acylering, idet man anvender fremgangs-
5 måder, der er fuldstændig analoge med de ovenfor beskrevne.

Fluorering af cyclovitamin D forbindelserne med formel V
udgør en generel og bekvem metode til fremstilling af båd-
de fluorvitamin D forbindelser og fluor-5,6-transvitamin
D forbindelser med formlerne I og II, hvori R^1 er valgt
10 blandt hydrogen, hydroxy, 0-acryl eller 0-lavere-alkyl og
hvori R , R^3 , R^4 , R^5 og R^6 betegner de tidligere definerede
substituentter.

De nødvendige cyclovitamin D udgangsmaterialer kan bekvemt
fremstilles ud fra C-3-hydroxyvitamin D forbindelser ved
15 fremgangsmåderne omtalt af Sheves og Mazur (J. Am.Chem.
Soc. 97, 6249 (1975)) og Paaren et al. (Proc. Nat. Acad.
Sci. USA 75, 2080 (1978)). Ved at anvende fremgangsmåden
ifølge opfindelsen fluoreres disse forbindelser let ved
carbon 1 og eventuelt ved en vilkårlig af sidekædestillingerne.
20 Efter indførsel af fluor kan fluorcyclovitaminderivaterne
underkastes syrekatalyseret solvolyse således som beskrev-
vet af Sheves og Mazur og Paaren et al. i de ovenfor an-
førte litteraturhenvisninger for at give både fluorvitamin
D forbindelser og 5,6-trans-fluorvitamin forbindelser.

25 Disse C-1-fluorerede cis og trans reaktionsforbindelser
kan let adskilles ved chromatografi på dette stadium (så-
ledes som beskrevet af Paaren et al. i den ovenfor nævnte
litteraturhenvisning), og de kan hver for sig herefter un-
derkastes hydrolyse (hvis acylbeskyttelsen skal fjernes)
30 under anvendelse af standardbetingelserne beskrevet tid-
ligere f.eks. 0,1 M KOH i methanol ved 60 °C i 1 - 4 ti-
mer. Det skal bemærkes, at fjernelsen af acylgrupperne
principielt (under anvendelse af de ovenfor nævnte betin-

gelser) kan udføres på et hvilket som helst stadium efter indførslen af fluor. Således kan acylgrupperne fjernes også inden solvolysen eller inden adskillelsen af cis og trans solvolyseprodukterne. Valget mellem disse muligheder afhænger af praktiske hensyn og/eller det ønskede produkt. Sædvanligvis foretrækkes deacyleringen som det sidste trin.

Afhængig af de nøjagtige solvolysebetingelser fås 5,6-cis og -transforbindelser med forskellige C-3-substituent-
10 ter. Dersom solvolysen udføres i et medium, der består af vandig dioxan og en katalytisk mængde af p-toluen-sulfonsyre får man fluorerede 5,6-cis og -transforbindelser, der indeholder en C-3-hydroxysubstituent. Solvolyse af
15 fluorcyclovitamin D mellemprodukter i sure alkoholiske opløsningsmidler (f. eks. methanol, ethanol, isopropanol) fører til 3-O-alkyl-5,6-cis og -transforbindelser, hvor alkylgruppen svarer til alkyldelen af det anvendte alkoholiske opløsningsmiddel. Solvolyse af fluorcyclovitamin D forbindelser i varm eddikesyre (f. eks. 50 - 60° C)
20 giver 5,6-cis og -transfluorvitamin D forbindelser indeholdende en C-3-acetoxysubstituent, og dersom solvolysen af fluorcyclovitaminerne udføres i dioxan/myresyreopløsningsmidler, får man de tilsvarende 3-O-formyl-5,6-cis og -transforbindelser. Dersom det ønskes, kan de C-
25 3-O-acylerede forbindelser let omdannes til de tilsvarende C-3-hydroxyforbindelser ved mild basisk hydrolyse.

Fremstillingen af både 5,6-cis og 5,6-trans-1-fluorvitamin D forbindelserne (der let kan adskilles ved chromatografi) ud fra 3,5-cyclovitamin D udgangsmaterialerne
30 er et fordelagtigt træk ved denne fluorering, og C-1-fluorerede-3,5-cyclovitamin D derivaterne er hidtil ukendte og særdeles værdifulde mellemprodukter.

EKSEMPEL 11 α -hydroxyvitamin D₃-3-acetat:

5 1 α -hydroxyvitamin D₃ (25 mg, 0,063 mmol) og eddikesyre-anhydrid (50 μ l) i pyridin-benzen (2 ml, 1:1) opvarmes under argon ved 50° C i 4 timer. Reaktionsblandingen afkøles, vand og ether tilsættes, og faserne adskilles.

10 Etherlaget vaskes med vand, 1 N HCl (2 gange), fortyndet NaHCO₃, mættet NaCl og tørres (Na₂SO₄). Opløsningsmidlet afdampes, og remanensen chromatograferes på en silicagelplade (20 x 20 cm, 0,75 cm tyk), der fremkal-

des med ethylacetat/"Skellysolve" B (1:1). Fire bånd for R_f 0,20, 0,38, 0,49 og 0,64 er synlige. Båndet ved R_f 0,49 stemmer overens med forbindelsen 1 α -hydroxyvitamin D₃-3-acetat, 6,0 mg (22%).

15 Båndene ved R_f 0,64, 0,38 og 0,20 stemmer overens med henholdsvis 1 α -hydroxyvitamin D₃-1,3-diacetat, 1 α -hydroxyvitamin D₃-1-acetat og udgangsmaterialet (7,3 mg, 29%). Det uønskede 1-acetat og diacetatet slås sammen (6,8 mg, 23 - 25%)

20 hydrolyseres (1 ml 0,1 M KOH/MeOH; 1 ml ether, 1,25 timer ved stuetemperatur) og slås herefter sammen med udgangsmaterialet for at give 14 mg 1 α -hydroxyvitamin D₃. Denne proces gentages yderligere 2 gange, hvorved man ialt får 12 mg (43%) 1 α -hydroxyvitamin D₃-3-acetat :

25 UV (95% EtOH) $\lambda_{\max}$ 265, $\lambda_{\min}$ 228; NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 0,54 (s, 18-CH₃), 0,87 (d, J = 6,6 Hz, 26,27-(CH₃)₂), 0,92 (d, J = 6,1 Hz, 21-CH₃), 2,03 (s, 3 AcO-), 4,41 m, 1 β -H), 5,02, 5,34 (19-H'er), 5,34 (3 α -H), 6,02, 6,34 (AB kvartet, J = 11,4 Hz, 6 og 7 H'er).

EKSEMPEL 21-fluorvitamin D₃:

Til 2 mg 1 α -hydroxyvitamin D₃-3 β -acetat i CH₂Cl₂ (0,4 ml) ved -78° C sættes diethylaminosvovltrifluorid (12 μ l) under kraftig omrøring. Afkølingsbadet fjernes, og 5 minutter senere bratkøles reaktionen med 5% K₂CO₃. Der tilsættes ether, og faserne adskilles. Den organiske fase vaskes med vand og saltopløsning, og der koncentrerer til 0,5 ml. Til den organiske fase sættes 0,1 M KOH/MeOH (1 ml). Efter 1,5 timer ved stuetemperatur fjernes opløsningsmidlet, ether og vand tilsættes, og man adskiller faserne. Etherfasen vaskes med vand og saltopløsning og filtreres gennem Na₂SO₄. Den opnåede remanens efter afdampning af etheren chromatograferes over en findelt silicagelsøjle (5 μ -partikler, 0,7 x 25 cm), der elueres med 0,5% isopropanol/hexan. Den ønskede forbindelse elueres i 78 ml (0,85 mg):

UV $\lambda_{\max}$ 265, $\lambda_{\min}$ 226 nm, $\lambda_{\max}/\lambda_{\min}$ 2,1; NMR (benzen-d₆) δ 0,63 (s, C-18 methyl), 0,98 (d, J = 6,1 Hz, C-26, 27 methyler), 1,01 (d, J = 6,5 Hz, C-21 methyl), 3,52 (m, w_{1/2} 24 Hz, 3 α -proton), 4,71 (doublet af multipletter, J = 50 Hz, w_{1/2} 20 Hz), 5,23, 5,55 (to s, 19-protoner), 6,38, 6,52 (ABq, J = 11 Hz, 6- og 7-protoner); masse-spektrum m/e (relativ intensitet) 402, 3320 (M⁺, 0,10, beregnet til C₂₇H₄₃FO, 402,3298), 382 (M⁺ -HF, 0,40), 364 (M⁺ -HF-H₂O, 0,28), 349 (M⁺ -HF-H₂O, 0,28), 349 (M⁺ -HF-H₂O-CH₃, 0,04), 289 (M⁺ -sidekæde, 0,05), 269 (M⁺ -sidekæde-HF, 0,08), 251 (M⁺ -sidekæde-HF-H₂O, 0,10), 135 (1,00).

EKSEMPEL 31 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-3-acetat:

1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (25 mg) og eddikesyreanhydrid

(50 μ l) i pyridin-benzen (12 ml, 1:1) opvarmes under argon i 4 timer ved 50° C. Den sædvanlige oparbejdelse giver en blanding af delvis acetylerede forbindelser (herunder 1-acetatet, 3-acetatet og 1,3-diacetatet) fra hvilke det ønskede 3-acetat kan adskilles ved præparativ lagchromatografi på silicagel, der fremkaldes med 40% ethylacetat i "Skellysolve" B. Recirkulering af det uønskede 1,3-diacetat og 1-acetat forbedrer totaludbyttet.

10 EKSEMPEL 4

1,25-difluorvitamin D₃:

1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-3-acetat (3 mg) i CH₂Cl₂ behandles under argon ved -78° C med diethylaminosvovltrifluorid (20 μ l). Man lader opløsningen opvarme til stuetemperatur, og der afkøles med 5% K₂CO₃. Oparbejdelse af reaktionsblandingen foregår således som beskrevet i eksempel 2. Chromatografi af det udvundne materiale på en silicagelplade, der fremkaldes med 25% ethylacetat i "Skellysolve" B, giver rent 1,25-difluorvitamin D₃-3-acetat.

20 Hydrolyse (1 ml 0,1 M KOH/MeOH, 1 ml ether, stuetemperatur, 2 timer) og chromatografi igen over silicagel (ethylacetat/"Skellysolve" B) giver 1,25-difluorvitamin D₃.

25 UV: $\lambda_{\max}$ 265 nm; NMR δ 0,53 (3H.s.18-CH₃) 0,93 (3H.d.J=6,0 Hz.21-CH₃), 1,34 (6H.d.J=22Hz.26- og 27-CH₃), 3,98 (1H.m.3-H), 5,02 (1H.d-m.J=52Hz.1-H), 5,12 (1H.m(skarp), 19(Z)-H), 5,41 (1H(skarp).19(E)-H), 6,03 (1H.d.J=11,0Hz.7-H), 6,44 (1H.d.J=11,0Hz.6-H); massespektrum, m/e.420 (M⁻.20), 400 (70), 382 (35), 135 (100).

EKSEMPEL 51,25-dihydroxyvitamin D₃-25-acetat:

En opløsning af 10 mg 1,25-dihydroxyvitamin D₃ opvarmes ved 90° C i 16 timer under argon med 0,5 ml eddikesyre-anhydrid i 2 ml pyridin. Den sædvanlige oparbejdning giver en blanding, ud fra hvilken 1,25-dihydroxyvitamin D₃-1,3,25-triacetatet (9,5 mg) fraskilles ved hjælp af chromatografi på et præparativt lag af silicagel, der fremkaldes med 25% ethylacetat/"Skellysolve" B, eller ved højtryksvæskechromatografi på en silicagelsøjle, der elueres med en blanding af 0,5% 2-propanol i hexan. Selektiv hydrolyse (0,1 M KOH/MeOH, ether, 1,5 timer, 25° C) af 1- og 3 acetatgrupperne giver 7 mg 1,25-dihydroxyvitamin D₃-25-acetat, der renses ved chromatografi på silicagel-tyndtlagsplader, idet man anvender 50% ethylacetat i "Skellysolve" B som opløsningsmiddel.

EKSEMPEL 61,25-dihydroxyvitamin D₃-3,25-diacetat:

1,25-dihydroxyvitamin D₃-25-acetat (7 mg) acetyleres under anvendelse af de i eksempel 1 beskrevne betingelser. Fra blandingen af forbindelser isoleres 1,25-dihydroxyvitamin D₃-3,25-diacetatet (4 mg) ved silicageltyndtlagschromatografi, idet man anvender ethylacetat/"Skellysolve" B (1:1) som opløsningsmiddelsystem.

EKSEMPEL 71,25-difluor-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₃:

En opløsning af 1 mg 1,25-dihydroxy-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₃ (fremstillet ved fremgangsmåden beskrevet af

Paaren et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 2080 (1978))
 i CH_2Cl_2 ved -78°C under argon behandles med diethylamino
 svovltrifluorid (2 mg). Efter 10 minutters forløb lader
 man reaktionsblandingsens temperatur stige til stuetempe-
 5 ratur, og der bratkøles med 5% K_2CO_3 . Efter den sædvanli-
 ge oparbejdning (se eksempel 2) isoleres 1,25-difluor-6-
 methoxy-3,5-cyclovitamin D_3 (250 μg) i ren form ved hjælp
 af højtrykssvæskechromatografi, idet man anvender en sili-
 cagelsøjle, der elueres med 10% tetrahydrofuran/hexan. Al-
 10 ternativt kan forbindelsen renses ved tyndtlagschromato-
 grafi på silicagel, idet man anvender 20% ethylacetat i
 "Skellysolve" B som fremkaldningsopløsningsmiddel.
 NMR, 0,53 (3H.s.18- CH_3), 0,98 (3H.d.J=6,0Hz.21- CH_3), 1,34
 (6H.d.J=22Hz.26-og 27- CH_3), 3,25 (3H.s.6- OCH_3), 4,18 (1H.
 15 d.J=9,6Hz.6-H), 4,97 (1H.d.J=9,6Hz,7-H), 5,18 (1H.dd.J=58
 Hz.1-H), 5,45 (1H.d.J=4,0Hz.19(Z)-H), og 5,51 (1H.d.J=4,0
 Hz.19(E)-H); massespektrum: m/e 431 (M, 40), 402 (50), 271
 (50), 245 (40), 135 (100).

Biologisk virkning af fluorvitamin D-forbindelserne

20 De omhandlede fluorvitamin D-forbindelser udviser signi-
 fikant vitamin D-lignende biologisk virkning, når de af-
 prøves over for vitamin D manglende dyr. Den vitamin D-
 lignende virkning, som de omhandlede fluorvitamin D-for-
 bindelser udviser, omfatter stimulering af tarmcalcium-
 25 transporten, stimulering af calciummobiliseringen fra
 knogler og kalcifikation af knogler. For at demonstrere
 disse virkninger er et udmærket forsøgsdyr en fravænnet
 hanrotte holdt på en vitamin D-manglende lav calciumdiæt
 eller en vitamin D-manglende, lav-phosphordiæt således
 30 som beskrevet af Suda et al. J. Nutr. 100. 1049 (1970).
 For dyr, der er holdt på en lav calciumdiæt, kan tarmcal-
 ciumabsorptionen efterprøves ved hjælp af den udkrænge-
 de tarmteknik beskrevet af Martin og DeLuca (Am. J.
 Physiol. 216, 1351 (1969)) og knoglecalciummobiliseringen
 35 kan bestemmes ved forøgelse af serumcalciumet, således

som det er beskrevet af Blunt et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 1503 (1968); graden af endochondral kalcifikation kan efterprøves ved "linieforsøg"-metoden, der er beskrevet i U.S. Pharmacopeia (15. reviderede udgave, p. 889, Mack Publ. Easton, PA (1955)), idet man anvender dyr, der er holdt på en lavphosphordiæt. Under anvendelse af disse metoder kan den biologiske virkning af de omhandlede 1-fluorvitamin D eller 1-fluor-5,6-trans-vitamin D-forbindelser let eftervises. Således bevirker 1-fluor-vitamin D₃ administreret intraperitonealt til rotter, der er holdt på en vitamin D manglende lav-phosphordiæt en signifikant kalcifikation af knogler, således som det fremgår af tabel 1.

TABEL 1

Antirakitis virkning af 1-fluorvitamin D₃^a

Daglig dosis (ng) ^b	Serum phosphor (mg/100 ml)	Linie-forsøgs- karakter
1,2-propandiol	3,1 ± 0,3	0
vitamin D ₃ (20)	4,5 ± 0,3	3,6 ± 0,7
1-fluorvitamin D ₃ (270)	4,0 ± 0,2	3,2 ± 0,4

^aData som middeltal ± SEM af 3 - 5 rotter

^bForsøgsforbindelsen indgivet intraperitonealt i 1,2-propandiol opløsningsmiddel i 7 dage.

Ligeledes frembringer administrering af 1-fluorvitamin D₃ til vitamin D manglende dyr, der er holdt på en lav calciumdiæt, signifikant forøgelse af serumcalciumni-

veauerne, og den stimulerer effektivt tarmcalciumtransporten, således som det er vist ved typiske dosisresponsforsøg angivet i tabel 2.

TABEL 2

Dosisresponsdata for 1-fluorvitamin D₃^a

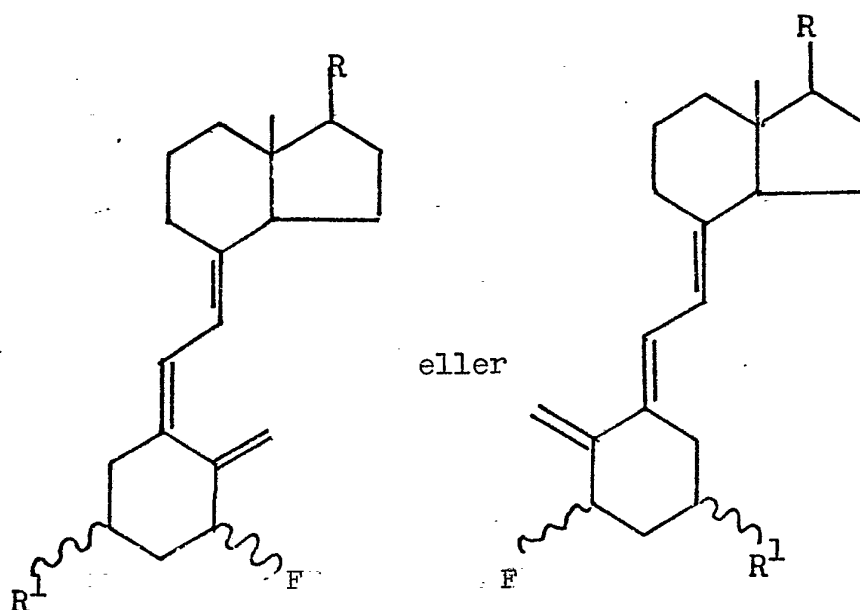
Dosis (ng) ^b	Knoglecalciummobilisering	
	Serumcalcium (mg/100 ml)	Tarmcalcium- transport
Ethanol (kontrol)	4,6 ± 0,1	1,7 ± 0,2
Vitamin D ₃ (24)	5,2 ± 0,2	3,1 ± 0,3
1-fluorvitamin D ₃ (280)	5,1 ± 0,02	2,0 ± 0,2
" (700)	5,5 ± 0,2	2,7 ± 0,2
" (1260)	5,8 ± 0,1	3,8 ± 0,4
" (2450)	6,2 ± 0,3	2,8 ± 0,2

^aData som middeltal ± SEM af 5 - 6 rotter.

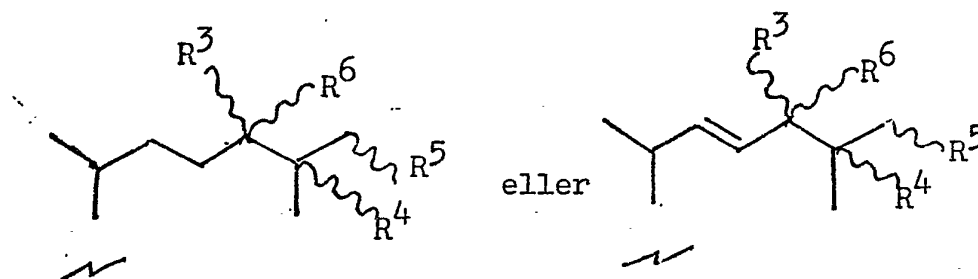
^bForbindelser administreret ved intrajugular injektion i 50 µl ethanolopløsningsmiddel.

P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af 1-fluorvitamin D-forbindelser eller 1-fluor-5,6-trans-vitamin D-forbindelser eller 1-fluor-3,5-cyclovitamin D-forbindelser, k e n d e t e g n e t ved, at de tilsvarende 1-hydroxylerede vitamin D-forbindelser eller 1-hydroxylerede 5,6-trans-vitamin D-forbindelser eller 1-hydroxylerede-3,5-cyclovitamin D-forbindelser, eventuelt efter beskyttelse af en eller flere andre hydroxylgrupper heri mod fluorering ved acylering, behandles med et dialkylaminosvovltrifluorid, hvorved hydroxylgruppen, der findes i de behandlede forbindelser, erstattes med fluor, og at den tilsvarende 1-fluorerede forbindelse udvindes, og at forbindelsen, dersom den er en 1-fluor-3,5-cyclovitamin D-forbindelse eventuelt underkastes syrekatalyseret solvolyse, hvorved der opnås en blanding af 1-fluorvitamin D- og 1-fluor-5,6-trans-vitamin D-forbindelser, og at disse udvindes hver for sig, og at eventuelt beskyttende acylgrupper, efter at fluoreringen er udført, om ønsket fjernes ved hydrolyse under basiske betingelser.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man i udgangs- 1-hydroxyvitamin D-forbindelserne eller -1-hydroxy-5,6-trans-vitamin D-forbindelserne kun acylerer en eventuel tilstedeværende C-3-hydroxyfunktion inden behandlingen med det fluorerende middel.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1-2, k e n d e t e g n e t ved, at det fluorerende middel er diethylaminosvovltrifluorid.
4. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at den fremstillede forbindelse har en af formlerne:



hvor R har formelen



og hvori R^1 betegner hydrogen, hydroxy, O-acyl eller O-lavere alkyl, og hvor

R^3 , R^4 og R^5 er valgt blandt hydrogen, hydroxy, O-acyl, O-lavere alkyl og fluor, og hvor

R^6 betegner hydrogen eller lavere alkyl.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, kendt tegnet ved, at R^3 og R^4 betegner hydrogen, hydroxy eller fluor.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, kendt tegnet ved, at R^6 betegner methyl, og at forbindelserne har ergosterolsidekædens stereokemiske konfiguration.