



Nederland

⑫A **Terinzagelegging** ⑪ **8420179**

⑲ NL

- ⑤4 **23,23-difluro- 1 alfa, 25 dihydroxy-vitamine D₃.**
- ⑤1 Int.Cl⁸: C07C 172/00, A61K31/59.
- ⑦1 Aanvrager: Wisconsin Alumni Research Foundation te Madison, Wisconsin,
Ver. St. v. Am.
- ⑦4 Gem.: Ir. L.W. Kooy c.s.
Octroobureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuiperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8420179.
- ⑧6 Aanvraagnummer oorspronkelijke internationale aanvraag: PCT/US84/00912.
- ②2 Ingediend 13 juni 1984.
- ③2 Voorrang vanaf 18 augustus 1983.
- ③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ③1 Nummer van de voorrangs-aanvraag: 524268 .
- ⑥2 - -

-
- ④3 Ter inzage gelegd 1 juli 1985.
- ⑧7 Publicatiedatum oorspronkelijke internationale aanvraag: 28 februari 1985.
- ⑧7 Publicatienummer oorspronkelijke internationale aanvraag: WO85/00819.

Deze octrooiaanvraag werd ingediend als internationale octrooiaanvraag onder de bepalingen van het Verdrag tot samenwerking inzake octrooien (PCT). De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van een Nederlandse vertaling van de oorspronkelijk in een andere taal ingediende beschrijving met conclusie(s) en tekening(en). De Nederlandse octrooiaanvraag wordt geacht te zijn ingediend op de indieningsdatum van de internationale octrooiaanvraag.

Hp

- 23,23-difluor-1 α ,25-dihydroxy-vitamine D₃ -

De uitvinding heeft betrekking op een verbinding die gekenmerkt wordt door vitamine D-achtige activiteit.

In het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op een derivaat van vitamine D₃.

5 Vitamine D₃ is een bekend middel voor het regelen van calcium- en fosforhomeostasis. Het is bekend dat deze verbinding bij het normale dier of de mens het calcium-transport in het darmstelsel en de mobilisatie van calcium van de botten stimuleert en dat deze verbinding doeltreffend is bij het voorkomen van rachitis.

10 Het is thans ook bekend dat vitamine D₃, wil zij doeltreffend zijn, in vivo omgezet moet worden tot de gehydroxyleerde vormen ervan. De vitamine wordt bijvoorbeeld eerst gehydroxyleerd in de lever tot 25-hydroxy-vitamine D₃ en wordt verder gehydroxyleerd in de nier tot 1 α , 25-
15 dihydroxy-vitamine D₃ of 24,25-dihydroxy-vitamine D₃. Men is in het algemeen van mening, dat de op de 1-plaats gehydroxyleerde vorm van de vitamine de fysiologisch aktieve of hormonale vorm van de vitamine is, en dat deze verantwoordelijk is voor wat de vitamine D-achtige aktiviteiten ge-
20 noemd worden, zoals het doen toenemen van absorptie van calcium en fosfaat in het darmstelsel, het mobiliseren van botmineraal en het veroorzaken van terugabsorptie van calcium in de nieren.

25 Sinds de ontdekking van biologisch aktieve metabolieten van vitamine D is er veel belangstelling geweest voor de bereiding van structureel analoge verbindingen van deze metabolieten, omdat dergelijke verbindingen bruikbare thera-

peutische middelen kunnen blijken te zijn voor de behandeling van ziekten die het resultaat zijn van aandoeningen van het calciummetabolisme. Een aantal verschillende vitamine D-achtige verbindingen is gesynthetiseerd. Zie bijvoorbeeld de Amerikaanse octrooischriften 3.741.996 gericht op 1α -hydroxycholecalciferol; 3.907.843 gericht op 1α -hydroxyergocalciferol; 3.786.062 gericht op 22-dehydro-25-hydroxycholecalciferol; 4.069.321 gericht op de bereiding van verschillende aan dihydrotachysterol analoge verbindingen met fluor in de zijketen; 4.201.881 gericht op 24,24-difluor- 1α ,25-dihydroxycholecalciferol en 4.196.133 gericht op 24,24-difluor-25-hydroxycholecalciferol. Men neemt aan dat andere metabolieten verantwoordelijk zijn voor het metabolisme en de uiteindelijke eliminatie van vitamine D-verbindingen uit het lichaam, waarbij men algemeen erkent, dat 1α ,25-dihydroxycholecalciferol (Amerikaanse octrooischrift 3.697.559) de circulerende hormonale vorm van vitamine D is.

Een nieuw derivaat van vitamine D is nu gevonden, dat tenminste even krachtig is als 25-hydroxyvitamine D_3 (zie het Amerikaanse octrooischrift 3.565.924), geoordeeld naar het vermogen van dat derivaat calciumtransport in het darmstelsel te stimuleren of het vermogen calcium uit botten te mobiliseren. Dit derivaat is geïdentificeerd als 23,23-difluor- 1α ,25dihydroxycholecalciferol (23,23-difluor- $1,25$ -dihydroxy vitamine D_3 of $23,23-F_2-1,25(OH)_2D_3$).

Een belangrijke route voor het inaktiveren van vitamine D is 23S-hydroxylering van 25-hydroxyvitamine D_3 (Tanaka et al, Biochemistry 20, 3875-3879, 1981) en de daarop volgende omzetting tot 25R-hydroxy-26,23S-lacton (Tanaka et al, Proc.Nat'l.Acad.Sci. USA 78, 4805-4808, 1981). Met het oog op deze bevindingen van Tanaka et al lijkt het vitamine D-derivaat van de uitvinding, wegens de fluorsubstituenten op koolstofatoom 23, niet gemakkelijk op dat

8420179

koolstofatoom gehydroxyleerd te worden en lijkt het derivaat dan ook gekenmerkt te worden door langdurige vitamine D-achtige aktiviteit - een kenmerk dat een duidelijk voordeel bij vele therapeutische toepassingen zou zijn .

5 23,23-Difluor-1,25-dihydroxyvitamine D_3 met formule 17 van bijgaand formuleblad kan het best bereid worden uit 23,23-difluor-25-hydroxyvitamine D_3 met formule 16 door enzymatische hydroxylering in vitro van de laatst genoemde
10 verbinding op koolstofatoom 1 . Hydroxylering op koolstofatoom 1 kan worden uitgevoerd door de voorloper 23,23-difluor-25-hydroxyvitamine D_3 te incuberen met een homogenaat dat uit nierweefsel van vitamine D-deficiente kuikens bereid wordt.

 Leghoornkuikens van één dag oud werden gedurende twee weken gevoed met een vitamine D-deficient diëet dat 1%
15 calcium bevatte (Omdahl et al, Biochemistry, 10, 2935-2940 (1971). Zij werden vervolgens gedood, hun nieren werden verwijderd en een 20% (w/v) homogenaat werd bereid in ijskoude 0,19 M sucrose-oplossing die 15 mM tris-acetaat (trihydroxymethylaminoethaan acetaat) (pH 7,4 bij kamertemperatuur) en
20 1,9 mM magnesiumacetaat bevatte (Tanaka, Y. et al, Arch. Biochem. Biophys. 171, 521-526 (1975). De incubatie kwam neer op het toevoegen van 9 μ g 23,23-difluor-25-hydroxyvitamine D_3 , opgelost in 100 μ l 95% ethanol, aan een 125 ml Erlenmeyer-kolf die 1 g nierweefsel, 0,19 M sucrose, 1,5 mM trisacetaat,
25 1,9 mM magnesiumacetaat en 25 mM succinaat in het uiteindelijke volume van 7,5 ml bevatte. Nadat het mengsel gedurende 2 uur bij 37°C geschud was, werd de reactie gestopt met 15 ml MeOH en 7,5 ml CH_2Cl_2 . Nadat nog eens 7,5 ml CH_2Cl_2 aan het mengsel toegevoegd was, werd de organische fase afgescheiden
30 en onder vacuum ingedampt. Het residu dat de gewenste 23,23-difluor-1,25-dihydroxyvitamine D_3 bevatte, werd vervolgens chromatografisch gezuiverd door hoge druk vloeistofchromatografie met een model ALC/GPC 204 hoge druk vloeistofchroma-

tograaf (Waters Associates, Medford, Mass), voorzien van een ultraviolet detector die bij 254 nm werkt. Het residu, opgelost in 100 μ l 10% 2-propanol in hexaan, werd op een silicagelkolom geïnjecteerd (Zorbax-SIL, 0,46 x 25 cm, Dupont, Inc.) die bij een druk van 7000 kPa werkte waarbij een stroomsnelheid van 2 ml/min geproduceerd werd . Door toepassing van een oplosmiddelsysteem dat 10% 2-propanol in hexaan bevatte , werd het monster twee maal door deze kolom gezuiverd en vervolgens verzameld. Het vermeende 23,23-difluor-1,25-dihydroxyvitamine D₃ werd verder gezuiverd op een kolom met omgekeerde fase (Lichrosorb RP-15, 0,46 x 25 cm, E. Merck, Darmstadt, West-Duitsland), waarbij men dezelfde hoge druk vloeistofchromatograaf gebruikte, bij een druk van 14 000 kPa. Het produkt werd met een oplosmiddelmengsel van H₂O/MeOH (1/4) geelueerd en verzameld. Het residu werd opnieuw gechromatografeerd op de Zorbax SIL-kolom onder toepassing van precies dezelfde omstandigheden als hierboven beschreven zijn.

Het produkt werd geïdentificeerd als 23,23-difluor-1,25-dihydroxyvitamine D₃ door de spectroscopische eigenschappen ervan. De verbinding vertoonde de kenmerkende vitamine D-achtige ultraviolet absorptie met een maximum bij 264 nm. Het massaspectrum van het produkt bevatte een moleculair ion bij m/e 452 zoals vereist voor 23,23-difluor-1,25-dihydroxyvitamine D₃. Fragmenten bij m/e 434 en 416 stellen eliminatie van één en twee moleculen H₂O voor . Verlies van de gehele zijketen resulteert in het fragment bij m/e 287 dat , door eliminatie van één en twee moleculen H₂O, aanleiding geeft tot pieken bij m/e 269 en 251. Bovendien vertoont het spectrum in het oog vallende pieken bij m/e 152 en m/e 134 (eliminatie van één molecuul H₂O) die A-ringfragmenten voorstellen en kenmerkend zijn voor 1 α ,3 β -dihydroxyvitamine D₃- verbindingen.

De verbinding van deze uitvinding, 23,23-difluor-

8420179

1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃ , kan desgewenst in kristallijne vorm verkregen worden door opnieuw kristalliseren uit geschikte vloeibare koolwaterstoffen , of combinaties van dergelijke oplosmiddelen met alcoholische oplosmiddelen, bijvoorbeeld
5 een combinatie van hexaan en methanol , zoals bekend is in de organische chemie.

Synthese van de uitgangsstof

23,23-Difluor-25-hydroxyvitamine D₃ waaruit 23,23-difluor-1 α ,25-dihydroxyvitamine D₃ bereid wordt door de voor-
10 gaande werkwijze , kan volgens de hierna beschreven en in het bijgaande reaktieschema getoonde werkwijze verkregen worden.

De verschillende fysisch-chemische kenmerken van
15 de getoonde verbindingen werden bepaald met behulp van de hierna beschreven apparaten. De verschillende afkortingen en werkwijzen worden daarna gedefinieerd.

Smeltpunten werden bepaald met behulp van een smelt-
puntapparaat met microscoop en werden niet gecorrigeerd. UV-
20 spectra werden verkregen in oplossing in ethanol met een Shimadzu UV-200 spectrofotometer met dubbele stralenbundel. IR-spectra werden opgenomen met een JEOL IRA-1 infrarood spectrofotometer met buigingsrooster. ¹H-NMR-spectra werden opgenomen op een Varian EM-360L spectrometer in CDCl₃ tenzij
25 anders vermeld , met tetramethylsilaan als een interne referentie. ¹⁹F-NMR-spectra werden opgenomen op een Varian EM-360L spectrometer in CDCl₃ oplossing , met benzotrifluoride als een interne referentie (een plus betekent hoog veld). Massa-
spectra werden verkregen met een HITACHI dubbelfocuserende
30 massaspectrometer RMU-7L. Kolomchromatografie werd uitgevoerd met silicagel (Merck, 70-23 mesh). Preparatieve 'dunnelaag'-
chromatografie werd uitgevoerd op tevoren met silicagel bedekte platen (Merck, silicagel 60 F₂₅₄). Het gebruikelijke opwerken heeft betrekking op verdunnen met water, extraheren

met een organisch oplosmiddel, wassen tot de oplossing neutraal is, drogen over magnesiumsulfaat, filtreren en verwijderen van het oplosmiddel onder verminderde druk. De volgende afkortingen werden gebruikt: THF, tetrahydrofuran; ether, diethylether; HMPA, hexamethylfosforamide; TsOH, p-tolueen-sulfonzuur; THP, tetrahydropyran; s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; bs, breed singlet.

Synthese

10 6 β -Methoxy-3 α ,5-cyclo-23,24-dinor-5 α -cholan-22-al (2)

6 β -Methoxy-3 α ,5-cyclo-23,24-dinor-5 α -cholan-22ol (1) (2,0 g, 15,8 mmol), bereid volgens de literatuurmethode, werd aan een suspensie van pyridiniumchlorochromaat (3,8 g) en natriumacetaat (1,4 g) in dichloormethaan (40 ml) toegevoegd, waarna dit mengsel bij kamertemperatuur gedurende 2,5 uur geroerd werd. Vervolgens werd aan deze oplossing ether (100 ml) toegevoegd en werd het resulterende precipitaat afgefiltreerd en met ether (100 ml) gewassen. Het gecombineerde filtraat werd achtereenvolgens gewassen met 5% NaHCO₃ en pekelwater, en over magnesiumsulfaat gedroogd. Na verwijdering van het oplosmiddel in vacuo, werd het residu op een silicagelkolom (300 g) gebracht. Door elueren met n-hexaan/ether (10:1) werd het aldehyde (2) (1,44 g, 73%) in amorfe toestand verkregen. ¹H-NMR δ : 0,76 (3H, s, 18-H₃), 1,30 (3H, d, J=6Hz, 21-H₃), 1,17 (3H, s, 19-H₃), 2,76 (1H, m, 6-H), 3,33 (3H, s, -OCH₃), 9,51 (1H, d, J=3,5Hz, -CHO). MS m/z: 344 (M⁺), 329, 312.

20 6 β -Methoxy-23-triethylsilyloxy-3 α ,5-cyclo-5 α -cholan-22- α -24-zuur-methylester (3)

30 Aan een oplossing van diisopropylamine (1,05 ml, 7,5 mmol) in THF (10 ml) werd n-butyllithium (6 mmol) bij -78°C onder argonatmosfeer toegevoegd, waarna deze oplossing gedurende 5 minuten geroerd werd. Aan deze oplossing

8420179

werd methyl- α -triethylsilyloxy- α -dimethylfosfonoacetaat (1,56 g, 5 mmol) in THF (10 ml) toegevoegd, waarna dit mengsel gedurende 15 minuten bij kamertemperatuur geroerd werd. Vervolgens werd aan de resulterende oplossing het aldehyde
 5 (2) (491 mg, 1,43 mmol) in THF (10 ml) toegevoegd, waarna dit mengsel gedurende 4 uur bij kamertemperatuur geroerd werd. Het gebruikelijke opwerken (ether voor de extractie) leverde een ruw produkt op, dat op een silicagelkolom (150 g) werd gebracht. Door elueren met n-hexaan/ether (15:1) werd de
 10 onverzadigde ester (3) (615 mg, 81%), als kleurloze olie verkregen. $^1\text{H-NMR}$ δ : 3,30 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 3,73 (3H, s, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 5,26 (1H, d, $J=10\text{Hz}$, 22-H). MS m/z: 530 (M^+), 501, 469.

3 β -Acetoxy-23-oxochol-5-en-24-zuur-methylester (4)

15 Een oplossing van de onverzadigde ester (3) (1,53 g, 2,9 mmol) in azijnzuur (7 ml) werd gedurende 6 uur bij 80-90°C verhit. Het gebruikelijke opwerken (ether voor de extractie) leverde een ruw produkt op. Dit produkt en een katalytische hoeveelheid TSOH in dioxaan (10 ml) en
 20 water (10 ml) werden gedurende 7 uur bij 85-95°C verhit. Het gebruikelijke opwerken (ether voor de extractie) leverde een ruw produkt op, dat op een silicagelkolom (300 g) werd gebracht. Door elueren met n-hexaan/ether (15 : 1) werd de α -ketoester (4) verkregen (768 mg, 76%), smpt 146-147°C
 25 (n-hexaan). IR $\gamma_{\text{KBr MAX}} \text{ cm}^{-1}$: 1720, 1240. $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,73 (3H, s, 18- H_3), 0,93 (3H, d, $J=6\text{Hz}$, 21- H_3), 1,03 (3H, s, 19- H_3), 2,03 (3H, s, acetyl), 3,88 (3H, s, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$), 4,63 (1H, m, 3-H), 5,41 (1H, m, 6-H). MS m/z: 384 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$), 369. Anal berekend voor $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{O}_5$: C, 72,92; H, 9,08. Gevonden: C, 72,63; H, 9,13.

30 3 β -Acetoxy-23,23-difluorchol-5-en-24-zuur-methylester (5)

Een mengsel van de α -ketoester (4) (400 mg, 0,9 mmol) en diethylaminozweveltrifluoride (1,5 ml, 9,5 mmol) in

8420179

dichloormethaan (15 ml) werd gedurende 16 uur bij kamertemperatuur geroerd. Het gebruikelijke opwerken (ether voor de extractie) leverde een ruw produkt op, dat op een silica-gelkolom (100 g) werd gebracht. Door elueren met n-hexaan/ether (10:1) werd de difluorester (5) verkregen. (312 mg, 74%) smpt 132-132,5°C (n-hexaan). IR $\gamma_{\text{MAX}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} ; 1770, 1730, 1255. $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,70 (3H, s, 18-H₃), 1,0. (3H, s, 19-H₃), 1,10 (3H, d, J=6Hz, 21-H₃), 2,03 (3H, s, acetyl), 3,87 (3H, s, -CO₂CH₃), 4,60 (1H, m, 3-H), 5,38 (1H, m, 6-H). $^{19}\text{F-NMR}$: +40,3. MS m/z: 406 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{COOH}$). Anal. berekend voor C₂₇H₄₀O₄F₂: C, 69,50; H, 8,64; F, 8,14. Gevonden: C, 69,75; H, 8,75; F, 8,26.

23,23-Difluor-3 β -tetrahydropyranyloxychol-5-een-24-zuur-methylester (6)

De difluorester (5) (880 mg, 1,9 mmol) werd met 2% KOH-MeOH (30 ml) bij kamertemperatuur gedurende 2 uur behandeld. Het gebruikelijke opwerken (ether voor de extractie) leverde een ruw zuur op. Dit zuur werd in ether (10 ml) behandeld met een diazomethaanoplossing in ether tot de gasontwikkeling ophield. Deze oplossing werd onder verminderde druk geconcentreerd waarbij een residu achterbleef. Dit residu werd in dioxaan (10 ml) behandeld met 2,3-dihydropyran (516 μl) en TSOH (10 mg) gedurende 3 uur bij kamertemperatuur. Het gebruikelijke opwerken (ether voor de extractie) leverde een ruw produkt op, dat op een silicagelkolom (200 g) werd gebracht. Door elueren met n-hexaan/ether (15:1) werd de THP-ester (6) (907 mg, 95 %) in amorf toestand verkregen. $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,70 (3H, s, 18-H₃), 1,03 (3H, s, 19-H₃), 1,10 (3H, d, J=6Hz, 21-H₃), 3,53 (2H, m, THP), 3,86 (3H, s, -CO₂CH₃), 3,93 (1H, m, 3-H), 4,73 (1H, m, THP), 5,36 (1H, m, 6-H). $^{19}\text{F-NMR}$ δ : +40,0 MS m/z: 424 ($\text{M}^+ - \text{DHP}$), 406, 391.

23,23-Difluorchol-5-een-3 β ,24-diol-3-THP-ether (7)

Aan een suspensie van lithiumaluminiumhydride (63 mg, 1,65 mmol) in ether (10 ml) werd de difluorester (6)

9420179

(1,40 g, 2,76 mmol) in ether (10 ml) toegevoegd, waarna het mengsel gedurende 10 minuten bij 0°C geroerd werd en vervolgens gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur geroerd werd. Het gebruikelijke opwerken (ether voor de extractie) leverde
5 een ruw produkt op, dat op een silicagelkolom (100 g) werd gebracht. Door elueren met n-hexaan/ether (5:1) werd de alcohol (7) (1,13 g, 86%) als een visceuze olie verkregen.
 $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,73 (3H, s, 18-H₃), 1,03 (3H, s, 19-H₃), 1,13 (3H, d, J=6Hz, 21-H₃), 3,33-4,10 (5H, m, 24-H₂, 3-H, en THP),
10 4,76 (1H, m, THP), 5,38 (1H, m, 6-H). $^{19}\text{F-NMR}$ δ : + 43,3. MS m/z : 396 (M+ -DHP), 378.

23,23-Difluor-24-trifluormethaansulfonyloxychole-5-en-3 β -ol-3-THP-ether (8)

Het mengsel van pyridine (124 μ l) en trifluormethaansulfonzuuranhydride (206 μ l) in dichloormethaan (5 ml) werd bij -20°C onder argonatmosfeer gedurende 5 minuten geroerd. Aan deze oplossing werd de alcohol (7) (400 mg, 1,02 mmol) in dichloormethaan (10 ml) toegevoegd, waarna het mengsel gedurende 40 minuten bij kamertemperatuur geroerd
15 werd. Het gebruikelijke opwerken (dichloormethaan voor de extractie) leverde de verbinding (8) (612 mg) op, die bij de volgende stap zonder verdere zuivering gebruikt werd.
 $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,73 (3H, s, 18-H₃), 1,00 (3H, s, 19-H₃), 1,15 (3H, d, J=6Hz, 21-H₃), 3,56 (2H, m, THP), 3,85 (1H, m, 3-H), 4,50
20 (2H, t, J=12Hz, 24-H₂), 4,70 (1H, m, THP), 5,37 (1H, m, 6-H).
25 $^{19}\text{F-NMR}$ δ : +12,2 (3F), + 41,3 (2F).

23,23-Difluor-3 β -tetrahydropyranyloxycholest-5-ene-26,27-dizuur-diethylester (9).

Een mengsel van kalium tert.-butanolaat (1,1 g, 9,6 mmol) en diethylmalonaat (3,8 g, 24 mmol) in THF (25 ml) en HMPA (8 ml) werd gedurende 1 uur bij kamertemperatuur onder argonatmosfeer geroerd. Aan deze oplossing werd de verbinding (8) (1,47 g, 2,4 mmol) in THF (20 ml) toegevoegd, waarna het mengsel gedurende 26 uur bij kamer-

temperatuur geroerd werd. Het gebruikelijke opwerken (ether voor de extractie) leverde een ruw produkt op, dat op een silicagelkolom (100 g) gebracht werd. Door elueren met n-hexaan/ether (5:1) werd de diester (9) verkregen
5 (1,20 g , 81%), smpt 79-80°C (ethanol). IR $\nu_{\text{MAX}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1750, 1740. ¹H-NMR δ : 0,73 (3H, s, 18-H₃), 1,00 (3H, s, 19-H₃), 1,10 (3H, d, J= 6 Hz, 21-H₃), 1,27 (6H, t, J=7Hz, -CO₂CH₂CH₃), 3,46 (2H, m, THP), 3,62 (1H, t, J=6Hz, 25-H), 3,80 (1H, m, 3-H), 4,14 (4H, q, J=7Hz, -COCH₂CH₃), 4,64 (1H, m, THP),
10 5,30 (1H, m , 6-H). MS m/z: 538 (M⁺ -DHP), 520, 505. Anal. berekend voor C₃₆H₅₆O₆F₂: C, 69,40; H , 9,06; F, 6,10. Gevonden : C, 69,19; H, 9,11; F, 5,85.

25-Chloor-23,23-difluor-3 β -tetrahydropyranyloxy-cholest-5-een-26,27-dizuur-diethylester (10)

15 De diester (9) (700 mg, 1,125 mmol) werd met natriumhydride (39 mg , 1,625 mmol) in dimethoxyethaan (20 ml) gedurende 1 uur bij kamertemperatuur onder argon-atmosfeer behandeld. Vervolgens werd aan deze oplossing N-chloorsuccinimide (180 mg, 1,35 mmol) toegevoegd, waarna het
20 mengsel gedurende 1 uur bij kamertemperatuur geroerd werd. Het gebruikelijke opwerken (ether voor de extractie) leverde een ruw produkt op , dat op een silicagelkolom (20 g) werd gebracht. Door elueren met n-hexaan/ether (10:1) werd de chloordiest-
25 ter (10) (730 mg , 99 %) als glas verkregen. ¹H-NMR : 0,72 (3H, s, 18-H₃), 1,02 (3H,s, 19-H₃), 1,10 (3H, d, J=6Hz, 21-H₃), 1,30 (6H, t, J=7,5Hz, -CO₂CH₂CH₃), 2,95 (2H, t, J=15Hz, 24-H₂), 3,52 (2H, m, THP), 3,88 (1H, m, 3-H), 4,32 (4H, q, J=7,5Hz, -CO CH₂CH₃), 4,72 (1H, m, THP), 5,38 (1H, m, 6-H). MS m/z : 554, 520.

30 25-Chloor-23,23-difluorcholest-5-een-3 β ,26,27-triol-3-THP-ether (11)

Aan een oplossing van de chloordiest-
ter (10) (730 mg, 1,1 mmol) in ether (15 ml) werd lithiaaluminiumhydride (48 mg) toegevoegd, waarna het mengsel gedurende 1 uur bij

3420179

0°C geroerd werd en vervolgens bij kamertemperatuur gedurende 2 uur geroerd werd. Het gebruikelijke opwerken (ether voor de extractie) leverde een ruw produkt op, dat op een silica-gelkolom (50 g) gebracht werd. Door elueren met dichloormethaan werd de chloordiol (11) (250 mg, 39%) verkregen;
5 smpt 152-153°C (n-hexaan ether). ¹H-NMR δ: (CDCl₃-acetone d₆-DMSO d₆): 0,77 (3H, s, 18-H₃), 1,00 (3H, s, 19-H₃), 1,10 (3H, d, J=6Hz, 21-H₃), 3,50-4,50 (7H, m, 3-H, 26-H₂, en THP), 4,77 (3H, m, 26-OH, 27-OH, en THP), 5,38 (1H, m, 6-H); δ(CDCl₃-acetone d₆-DMSO d₆-D₂O): 3,60 (2H, m, THP), 3,77 (4H, s, 26-H₂ en 27-H₂), 4,77 (1H, m, THP). MS m/z: 434, 416, 404. Anal. berekend voor C₃₂H₅₁O₄ClF₂: C, 67,05; H, 8,97; Cl, 6,19; F, 6,63. Gevonden: C, 67,08; H, 8,89; Cl, 5,99; F, 6,53.

25 ε)-25,26-Epoxy-23,23-difluorcholest-5-ene-3 β,27-
15 diol-3-THP-ether (12)

De chloordiol (11) (183 mg, 0,32 mmol) werd behandeld met natriumhydride (18 mg, 0,75 mmol) in dimethoxyethaan (18 ml) gedurende 6 dagen bij kamertemperatuur. Het gebruikelijke opwerken (ether voor de extractie) leverde een ruw
20 produkt op, dat op een silicagelkolom (100 g) werd gebracht. Door elueren met dichloormethaan werd de epoxyalkohol (12) (56 mg, 32%), als glas verkregen. ¹H-NMR δ: 2,92 (2H, m, 26-H₂), 3,67-4,16 (3H, m, 3-H en 27-H₂). MS m/z: 434 (M⁺-THP OH), 416, 404. De chloordiol 11 werd eveneens
25 teruggewonnen (92 mg, 50%).

23,23-Difluorcholest-5-ene-3 β,25-diol-3-THP-ether
(13)

De epoxyalkohol (12) (55 mg, 0,103 mmol) werd met methaansulfonylchloride (20 μl) en triethylamine (30 μl) in
30 dichloormethaan (10 ml) gedurende 13 uur bij kamertemperatuur behandeld. Het gebruikelijke opwerken (ether voor de extractie) leverde het ruwe mesylaat (69 mg) op. Dit mesylaat werd met lithiumaluminiumhydride (5 mg) in ether (10 ml) gedurende 1,5 uur bij 0°C behandeld. Het gebruikelijke opwerken

1420179

(ether voor de extractie) leverde een ruw produkt op, dat op een silicagelkolom (20 g) gebracht werd. Door elueren met n-hexaan/ether (5:2) werd de 25-ol (13) verkregen (43,3 mg, 80%), smpt 148-149°C (n-hexaan-cyclohexaan). $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,72 (3H, s, 18-H₃), 1,01 (3H, s, 19-H₃), 1,10 (3H, d, J=6Hz, 21-H), 1,35 (6H, s, 26-H₃ en 27-H₃), 3,53 (2H, m, THP), 3,87 (1H, m, 3-H), 4,71 (1H, m, THP), 5,37 (1H, m, 6-H). MS m/z: 420 (M^+ -TEPOH), 405. Hoge resolutie MS berekend voor $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{F}_2\text{O}$ (M^+ -THPOH): 420, 3214. Gevonden: 420, 3208.

5

10 23,23-Difluorcholest-5- β -25-diol-3-acetaat (14)
De THP-ether (13) (26 mg, 0,0498 mmol) in methanol (4 ml) en THP (4 ml) werd met een katalytische hoeveelheid TsOH gedurende 1 uur bij kamertemperatuur behandeld. Het gebruikelijke opwerken (ethylacetaat voor de extractie) leverde de ruwe diol (21,4 mg) op . Deze diol werd met azijnzuuranhydride (1 ml) en pyridine (1 ml) gedurende 14 uur bij kamertemperatuur behandeld. Het gebruikelijke opwerken (ethylacetaat voor de extractie) leverde een ruw produkt op, dat op een silicagelkolom (5 g) werd gebracht. Door elueren met benzeen/ethylacetaat (10:1) werd het acetaat (14) verkregen (23,0 mg, 96%); smpt 168-170°C (methanol). $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,82 (3H, s, 18-H₃), 1,02 (3H, s, 19-H₃), 1,07 (3H, d, J=6Hz, 21-H₃), 1,35 (6H, s, 26-H₃ en 27-H₃), 2,03 (3H, s, acetyl), 4,55 (1H, m, 3-H), 5,36 (1H, m, 6-H). Hoge resolutie MS berekend voor $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{F}_2\text{O}$ (M^+ -CH₃COOH): 420, 3202. Gevonden 420, 3206.

15

20 23,23-Difluorcholesta-5,7-dieen-3,25-diol (15)
Aan een oplossing van het acetaat (14) (19 mg, 0,0396 mmol) in koolstoftetrachloride (2 ml) werd N-broom-succinimide (10 mg, 0,0571 mmol) toegevoegd, waarna dit mengsel gedurende 20 minuten onder argonatmosfeer verhit werd onder terugvloeiing. Na afkoelen tot 0°C werd het resulterende

25

30

8420179

precipitaat afgefiltreerd. Het filtraat werd beneden 40°C geconcentreerd waarbij het residu achterbleef. Dit residu werd in xyleen (2 ml) toegedruppeld aan een onder terugvloeïng kokende oplossing van S-collidine (0,5 ml) en
5 xyleen (1,5 ml), waarna het verhitten onder terugvloeïng gedurende 20 minuten werd voortgezet. Het gebruikelijke opwerken (ethylacetaat voor de extractie) leverde het ruwe dieen op. Dit dieen werd in aceton (10 ml) met een katalytische hoeveelheid TSOH gedurende 14 uur bij kamertemperatuur
10 onder argonatmosfeer in het donker behandeld. Het gebruikelijke opwerken (ethylacetaat voor de extractie) leverde het ruwe 5,7-dieenacetaat op. Dit acetaat werd in THF (5 ml) behandeld met 5% KOH-MeOH (1,0 ml) gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur onder argonatmosfeer^{in het donker}. Het gebruikelijke
15 opwerken (ethylacetaat voor de extractie) leverde een ruw produkt op, dat onderworpen werd aan preparatieve dunnelaagchromatografie (benzeen/ethylacetaat 2:1, tweemaal ontwikkeld). De band met een Rf-waarde van 0,47 werd afgeschraapt en met ethylacetaat geelueerd. Door verwijderen
20 van het oplosmiddel werd het 5,7-dieen (15) verkregen (3,75 mg, 21,7%). UV λ_{MAX} nm: 294, 282, 272.

23,23-Difluor-25-hydroxyvitamine D₃ (16)

Een oplossing van het 5,7-dieen (15) (3,75 mg, 8,60 μ mol) in benzeen (90 ml) en ethanol (40 ml) werd
25 bestraald met een middelmatige druk kwiklamp door een Vycor-filter met ijskoeling gedurende 2,5 minuten onder argonatmosfeer. Verwijdering van het oplosmiddel onder verminderde druk leverde een ruw produkt op, dat aan preparatieve dunnelaagchromatografie onderworpen werd (benzeen/ethylacetaat 2:1,
30 twee maal ontwikkeld). De band met een Rf-waarde van 0,59 werd afgeschraapt en met ethylacetaat geelueerd. Door verwijderen van het oplosmiddel werd het vitamine D₃-derivaat (16) (0,96 mg, 25,6 %) verkregen. Dit derivaat werd verder

8420179

gezuiverd door hoogwaardige vloeistofchromatografie op een Zorbax SIL kolom met normale fase (4,6 mm Ø x 15 cm) bij een stroomsnelheid van 2 ml/min met hexaan/dichloormethaan (1:2) als eluent. De retentietijd van (16) was 7,4 min.

5 UV $\lambda_{\max}$ nm : 265, $\lambda_{\min}$ nm: 228. $^1\text{H-NMR}$ δ : 0,58 (3H, s, 18- H_3), 1,07 (3H, d, $J=6$, 1Hz, 21- H_3), 1,34 (6H, s, 26- H_3 en 27- H_3), 3,95 (1H, m, 3-H), 4,81 (1H, bs, 19-H), 5,04 (1H, bs, 19-H), 6,03 (1H, d, $J=10$, 7Hz, 7-H), 6,23 (1H, d, $J=10$, 7Hz, 6-H). MS m/z: 436 (M^+), 418, 403, 398, 380, 378, 300, 271, 10 265, 145, 118. Hoge resolutie MS berekend voor $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{F}_2\text{O}_2$: 436, 3150. Gevonden : 436,3155.

De biologische aktiviteit van het nieuwe derivaat wordt aangetoond door geschikte in vivo bepalingen bij de rat.

15

Mannelijke pas gespeende ratten (Holtzman Company, Madison, Wis.) werden gedurende 2 weken gevoed met een vitamine D-deficient dieet met een laag calciumgehalte (0,02% calcium, 0,3% fosfor - J.Nut. 100, 1045-1052 (1970)).

20 Zij werden verdeeld in drie groepen van elk 6-7 ratten. Aan de ratten in de controlegroep werd 0,05 ml 95% ethanol gegeven met een intrajugulaire injectie. Aan elke rat in de andere twee groepen werd op dezelfde wijze een dosis van respectievelijk 100 pmol 1,25-dihydroxyvitamine

25 D_3 (1,25-(OH) $_2\text{D}_3$) in 0,05 ml ethanol of 23,23-difluor-1 α , 25-dihydroxyvitamine D_3 (23,23- F_2 -1,25-(OH) $_2\text{D}_3$) in 0,05 ml ethanol toegediend. 96 Uur na het toedienen werd het effect van de verbindingen op het calciumtransport in het darmstelsel bepaald met behulp van de methode van Martin en

30 DeLuca (Am. J.Physiol. 216, 1351-1359, 1969). Resultaten worden getoond in de tabel hieronder.

8420179

Tabel

Toegediende verbinding	Calciumtransport in het darmstelsel (Ca serosol/Ca mucosaal) (gem. $\pm$ SEM)
5 geen (slechts drager)	$2,6 \pm 0,1^a$
1,25-(OH) $_2$ D $_3$	$4,6 \pm 0,4^b$
23,23-F $_2$ -1,25-(OH) $_2$ D $_3$	$4,5 \pm 0,3^c$
10	Significantie van het verschil: b)&c) van a) $p < 0,001$
15	De bovenstaande gegevens geven aan dat 23,23-F $_2$ -1,25-(OH) $_2$ D $_3$ even actief is bij het bevorderen van calciumtransport in het darmstelsel als de circulerende hormonale vorm van vitamine D $_3$ 1,25-(OH) $_2$ D $_3$, waardoor sterk gesuggerend wordt dit derivaat te gebruiken als een vervangmiddel voor de hormonale vorm van de vitamine als een farmacologisch groter calciumtransport in het darmstelsel wenselijk is.
20	De 23,23-difluor-1 α ,25-dihydroxycholecalciferol-verbinding van de uitvinding kan gemakkelijk toegediend worden als een steriele parenterale oplossing door injectie of intraveneus of door het spijskanaal in de vorm van een orale dosering , of door een suppositorium. Doses van 0,1-10 μ g per dag zijn doeltreffend voor het verkrijgen van de beschreven reakties van het fysiologische calciuevenwicht , welke reakties kenmerkend zijn voor vitamine D-achtige aktiviteit, waarna handhavingsdoses van ongeveer 0,25 μ g geschikt zijn.
30	De doseervorm van de verbindingen kan worden bereid door ze met een niet-toxische farmaceutisch aanvaardbare drager te combineren zoals bekend is in de techniek. Dergelijke dragers kunnen vast of vloeibaar zijn, zoals bijvoorbeeld

8420179

graanzetmeel, lactose , sucrose , pindaolie, olijfolie, sesam-
zaadolie en water. Als een vaste drager gebruikt wordt kan
de doseervorm van de verbindingen van de uitvinding bestaan
uit tabletten, capsules , poeders , pastilles of zuigtabletten.
5 Als een vloeibare drager gebruikt wordt, kan de doseervorm
bestaan uit zachte gelatinecapsules, of stroopachtige of
vloeibare suspensies , emulsies of oplossingen . De doseer-
vormen kunnen ook toevoegsels bevatten, zoals conserveer-
middelen , stabilisatoren , bevochtiging bevorderende midde-
10 len of emulgatoren, middelen die het oplossen bevorderen,
enz. Ze kunnen ook andere therapeutisch waardevolle stoffen
bevatten.

Men dient te begrijpen dat, hoewel doseergebieden
gegeven worden, de bepaalde dosis die aan een gastheer toe-
15 gediend wordt, afhangt van het specifieke ziektebeeld dat
behandeld wordt, de resultaten waarnaar in een bepaald geval
gestreefd wordt , als ook van andere factoren die voor des-
kundigen wat betreft het therapeutisch gebruik van dergelijke
geneesmiddelen bekend zijn.

20

8420179

- C O N C L U S I E S -

1. 23,23-difluor-1,25-dihydroxyvitamine D₃.
2. De verbinding van conclusie 1 in kristallijne
vorm.
3. Werkwijze voor het bereiden van 23,23-difluor-
5 1,25-dihydroxyvitamine D₃ , met het kenmerk, dat men 23,23-
difluor-25-hydroxyvitamine D₃ onderwerpt aan enzymatische
hydroxylering in vitro op koolstofatoom 1 in het molecuul.

