PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1572-98

(19)

ČESKÁ REPUBLIKA

(22) Přihlášeno: **13. 11. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.11.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/008744**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 09. 98**
(Věstník č. 9/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP96/04954**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/19058**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6]:
C 07 C 401/00
A 61 K 31/59

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

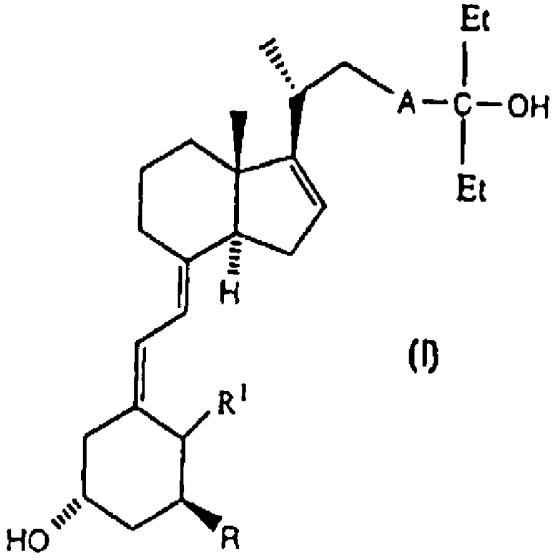
(71) Přihlašovatel:
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basle, CH;

(72) Původce:
Iacobolli Jerome Anthony, Paramus, NJ, US;
Uskokovic Milan Radoje, Upper Montclair, NJ, US;

(74) Zástupce:
Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
25-Hydroxy-16-en-26,27-bishomocholekalciferoly

(57) Anotace:
Sloučeniny vzorce I, kde A je dvojná vazba mezi uhlíky s E nebo Z stereochemickou konfigurací nebo A je trojná vazba mezi uhlíky, Et je ethyl, a R je hydroxy a R^1 je vodík nebo $=CH_2$, nebo R je vodík nebo fluor a R^1 je $=CH_2$. Sloučeniny stimulují HL-60 buněčnou diferenciaci.



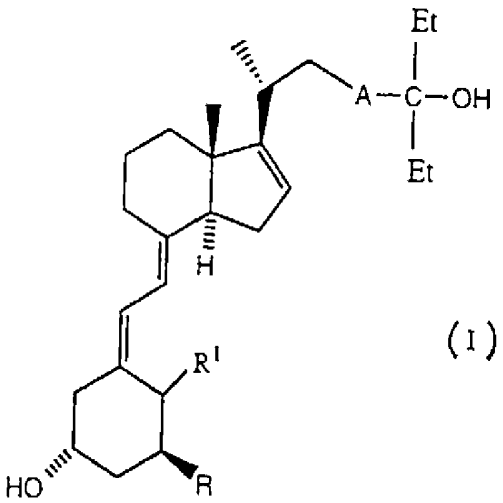
(I)

CZ 1572-98 A3

25.05.98

25-Hydroxy-16-en-26,27-bishomocholekalciferoly

Vynález se týká 25-hydroxy-16-en-26,27-bishomocholekalciferolových derivátů vzorce I



(I)

kde

A je dvojná vazba mezi uhlíky s E nebo Z stereochemickou konfigurací nebo A je trojná vazba mezi uhlíky,

Et je ethyl a

R je hydroxy a

R^1 je vodík nebo $=CH_2$, nebo

R je vodík nebo fluor a R^1 je $=CH_2$.

Sloučeniny vzorce I stimulují HL-60 buněčnou diferenciaci a tím jsou užitečné jako prostředky pro léčení neoplastických chorob jako je leukémie.

25.05.99

Jak je zde použito, výraz "nižší alkyl" označuje alkylovou skupinu s přímým nebo rozvětveným řetězcem, obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, například methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, terc.butyl a podobně.

Výraz "ar nižší alkyl" znamená p-tolyl, benzyl, fenylethyl, fenylpropyl a podobně.

Výraz "aryl" znamená skupinu odvozenou od aromatického uhlovodíku, která může být nesubstituovaná nebo substituovaná jedním nebo více nižšími alkylovými skupinami. Příkladně "aryl" znamená fenyl a p-methylfenyl.

Vynález se dále týká kompozice zahrnující sloučeninu vzorce I nebo směs dvou nebo více sloučenin vzorce I, stejně jako použití těchto sloučenin pro výrobu léčiv pro stimulaci diferenciace HL-60 buněk a pro léčení neoplastických chorob jako je leukémie. Vynález se také týká sloučenin vzorce I jako prostředků pro léčení výše uvedených chorobných stavů. Vynález se také týká způsobu přípravy sloučenin vzorce I a meziproduktů, které se v něm vyskytují.

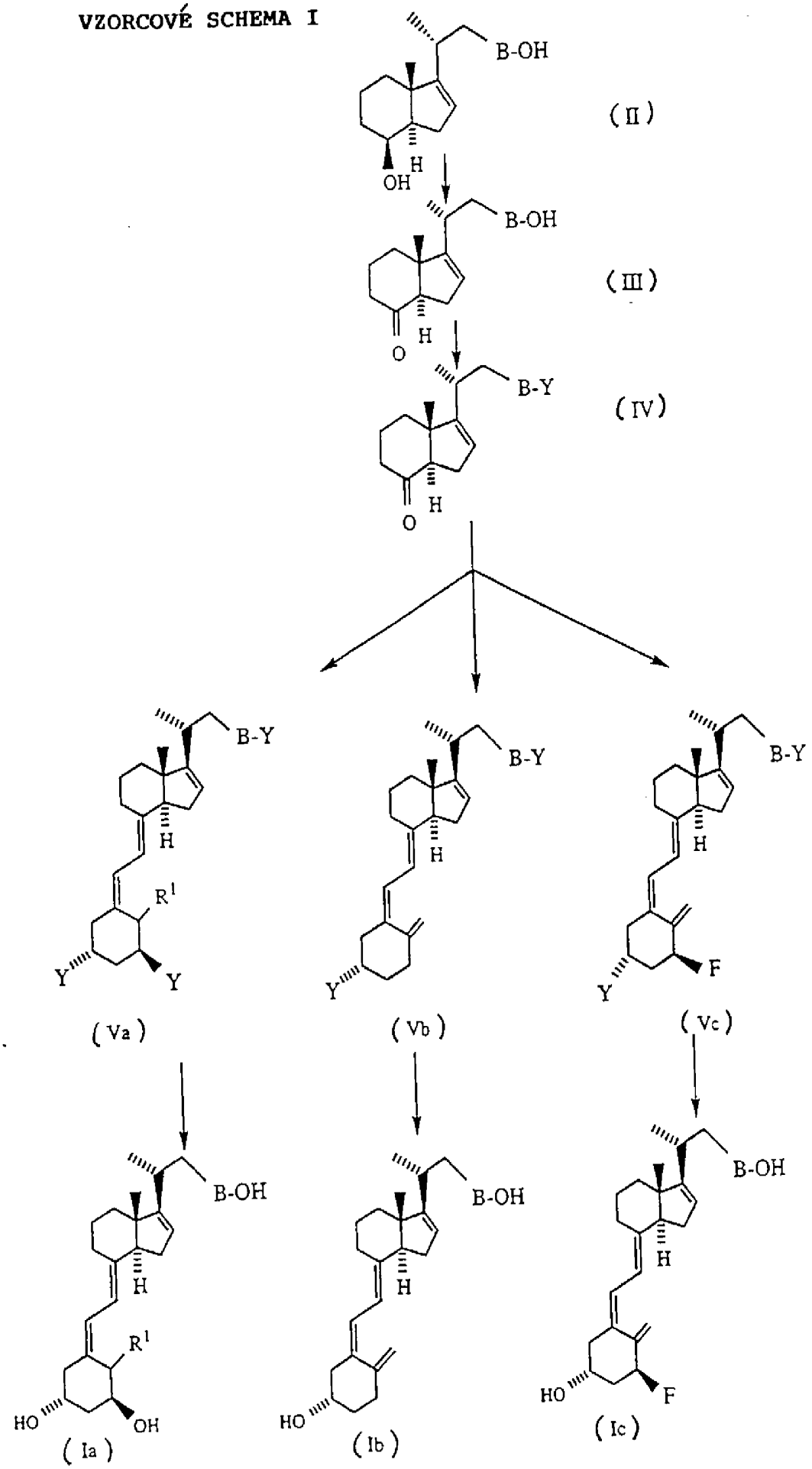
Výhodné jsou sloučeniny vzorce I, kde R je hydroxy a R^1 je $=CH_2$, zejména sloučenin A, B a C, příslušně:
1,25-dihydroxy-16-en-23-in-26,27-bishomocholekalciferol,

1,25-dihydroxy-16,23Z-dien-26,27-bishomocholekalciferol,

1,25-dihydroxy-16,23E-dien-26,27-bishomocholekalciferol.

Sloučeniny vzorce I, kde A je -C≡C- se připraví jak je zde popsáno se zvláštním odkazem na vzorcové schema I a dále uvedené příklady.

VZORCOVÉ SCHEMA I



kde

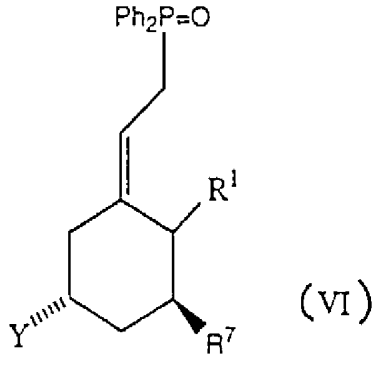
R^1 má výše popsaný význam, B je $-C\equiv CC(Et)_2-$,

Y je $-OSi(R^4,R^5,R^6)$, Et je ethyl, R^4 a R^6 jsou nižší alkyly a R^5 je nižší alkyl, aryl nebo ar-nižší alkyl.

Ve výše uvedeném vzorcovém schematu I se sloučenina vzorce II převede na sloučeninu vzorce III zpracováním s oxidačním prostředkem jako je 2,2'-bipyridiniumchlorchromat nebo pyridiniudichromat při teplotě místnosti v aprotickém rozpouštědle jako je suchý tetrahydrofuran nebo výhodněji suchý methylenchlorid. Sloučenina vzorce III se zpracuje konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

Sloučenina vzorce III se převede na sloučeninu vzorce IV reakcí s například (trialkylsilyl)imidazolem jako je 1-(trimethylsilyl)imidazol v aprotickém organickém rozpouštědle jako je suchý tetrahydrofuran nebo výhodněji suchý methylenchlorid. Sloučenina vzorce IV se zpracuje konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

Sloučenina vzorce IV se převede na sloučeninu vzorce Va, Vb nebo Vc reakcí s odpovídající sloučeninou vzorce VI



(VI)

kde Ph je fenyl, R^7 je vodík, fluor nebo Y,
a Y a R^1 mají výše uvedený význam.

25.05.99

Reakce se provádí při -60 °C až -90 °C, výhodně -78 °C v polárním, aprotickém, organickém rozpouštědle jako je suchý ether nebo výhodněji suchý tetrahydrofuran v přítomnosti silné báze jako je alkyllithium, jako je butyllithium. Sloučenina vzorce Va, Vb nebo Vc se zpracuje konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

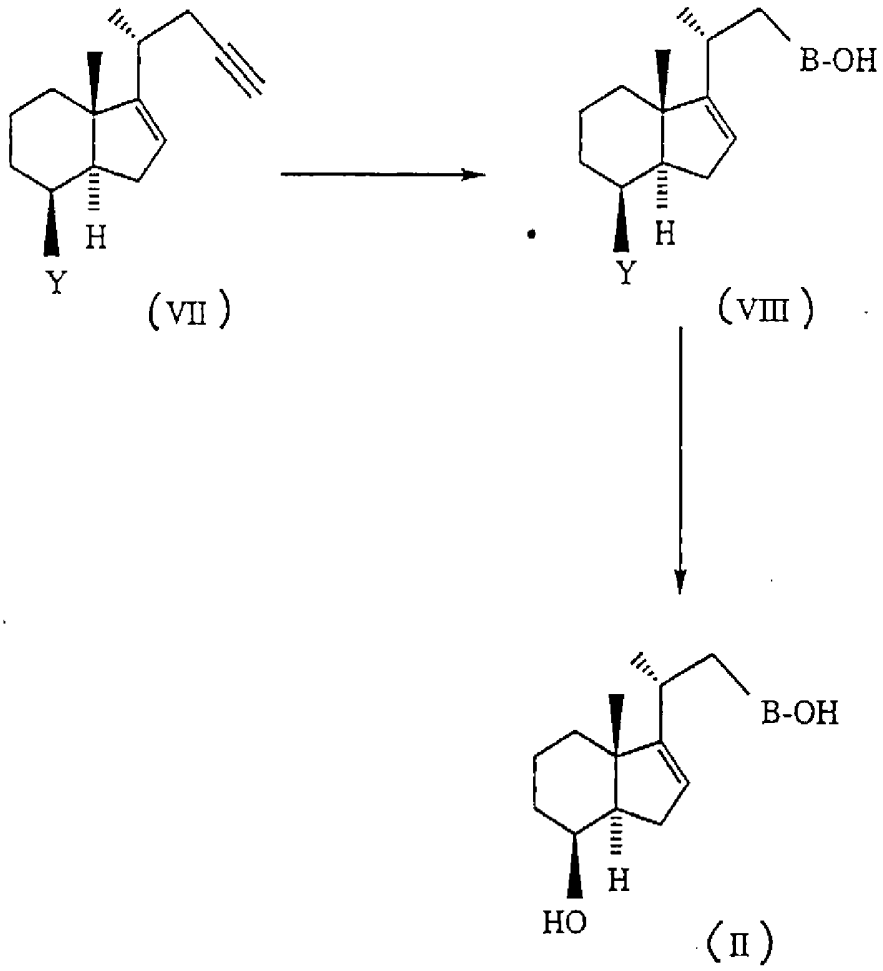
Sloučeniny vzorce VI jsou známy nebo mohou být připraveny známými postupy.

Chránicí skupiny sloučeniny vzorce Va, Vb nebo Vc se odstraňují reakcí se solí fluoru jako je tetrabutylamonium-fluorid v polárním, organickém rozpouštědle jako je suchý ether nebo výhodněji suchý tetrahydrofuran, čímž se získá odpovídající sloučenina vzorce Ia, Ib nebo Ic.

Meziprodukt vzorce II jak je výše popsán, se připraví jak je dále popsáno se zvláštním odkazem na vzorcové schema II a následující příklady.

25.05.98

VZORCOVÉ SCHEMA II



kde Y a B mají výše uvedený význam.

Ve výše uvedeném vzorcovém schematu II se sloučenina vzorce VII převede na sloučeninu vzorce VIII reakcí s 3-pentanonem. Tato reakce se provádí při -60 °C až -90 °C, výhodně -78 °C v polárním aprotickém organickém rozpouštědle jako je suchý ether nebo výhodněji suchý tetrahydrofuran v přítomnosti silné báze jako je alkyllithium, jako butyllithium.

25.05.98

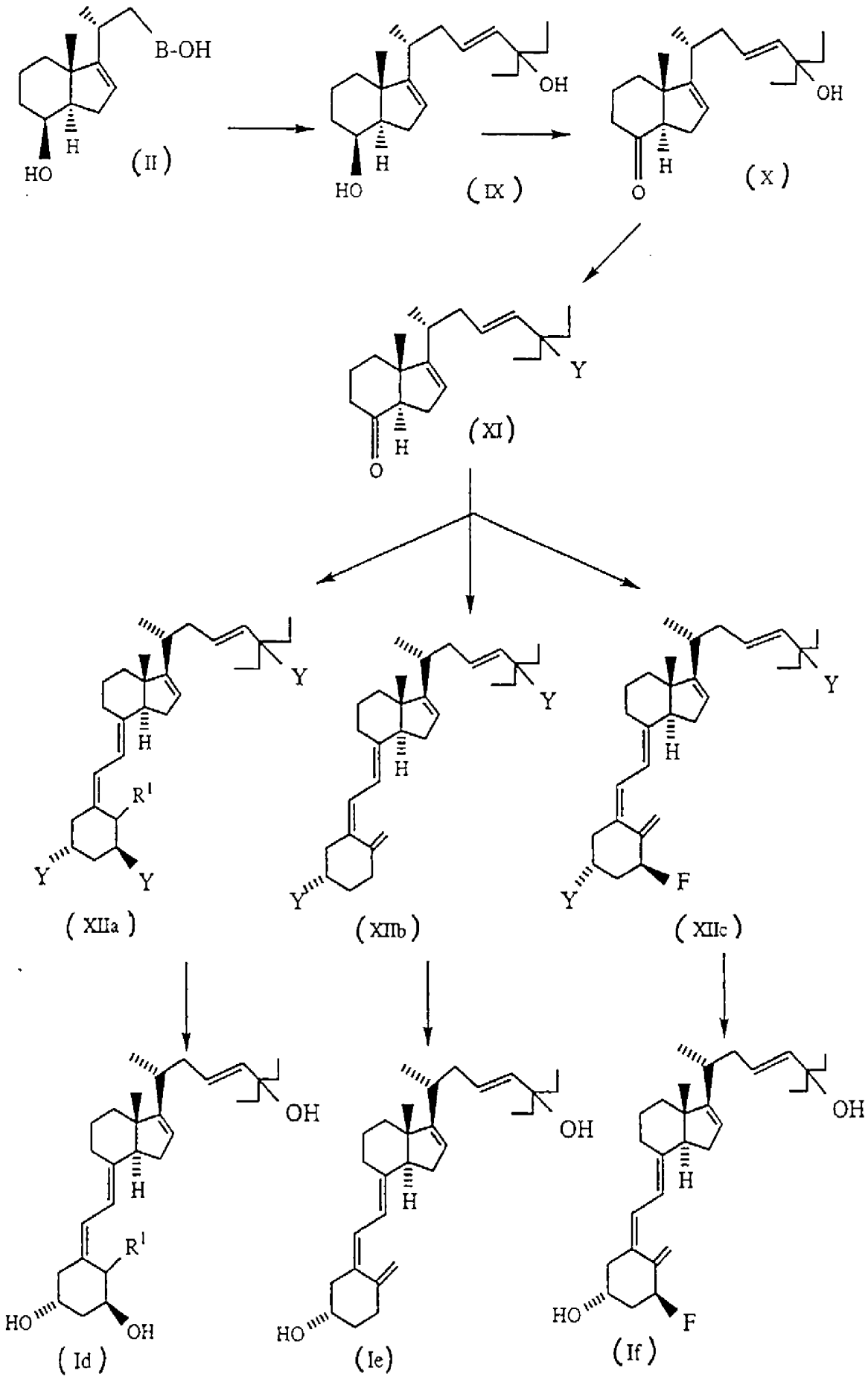
Sloučenina vzorce VIII se zpracuje konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

Sloučenina vzorce VII je známa z US patentu č. 5 087 619 a US patentu č. 5 145 846, které jsou oba začleněny odkazem.

Sloučenina vzorce VIII se převede na sloučeninu vzorce II reakcí se solí fluoru jako je tetrabutylamoniumfluorid v polárním organickém rozpouštědle jako je suchý ether nebo výhodněji tetrahydrofuran. Sloučenina vzorce II se zpracuje konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

Sloučeniny vzorce I, kde A je dvojná vazba mezi uhlíky s E konfigurací se připraví jak je zde dále popsáno se zvláštním odkazem na vzorcové schema III a následující příklady.

VZORCOVÉ SCHEMA III



25.05.98

kde Y, B a R^1 mají výše uvedený význam.

Ve výše uvedeném vzorcovém schematu III se sloučenina vzorce II parciálně redukuje, čímž se získá sloučenina vzorce IX reakcí s redukčním prostředkem jako je lithiumaluminiumhydrid, výhodně v přítomnosti alkoxidu alkalického kovu jako je methoxid sodný v aprotickém organickém rozpouštědle jako je suchý ether nebo výhodněji suchý tetrahydrofuran při refluxní teplotě (asi 80 °C pro tetrahydrofuran) po dobu asi 24 hodin a ochladí se na asi 0 °C. Sloučenina vzorce IX se zpracuje konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

Výsledná sloučenina vzorce IX se oxiduje na sloučeninu vzorce X zpracováním s oxidačním prostředkem jako je 2,2'-bipyridiniumchlorchromat nebo pyridiniumdichromat při teplotě místnosti v aprotickém rozpouštědle jako je suchý tetrahydrofuran nebo výhodněji suchý methylenchlorid. Sloučenina vzorce X se zpracuje konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

Sloučenina vzorce X se převede na sloučeninu vzorce XI reakcí s, například, (trialkylsilyl)imidazolem jako je 1-(trimethylsilyl)imidazol v aprotickém organickém rozpouštědle jako je suchý tetrahydrofuran nebo výhodněji suchý methylenchlorid. Sloučenina vzorce XI se zpracuje konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

Sloučenina vzorce XI se převede na sloučeninu vzorce XIIa, XIIb nebo XIIc reakcí s odpovídající sloučeninou vzorce VI. Reakce se provádí při -60 °C až -90 °C výhodně -78 °C v polárním aprotickém organickém rozpouštědle jako je suchý ether nebo výhodněji suchý tetrahydrofuran v přítomnosti silné báze jako je alkyllithium, jako je butyllithium.

25.05.98

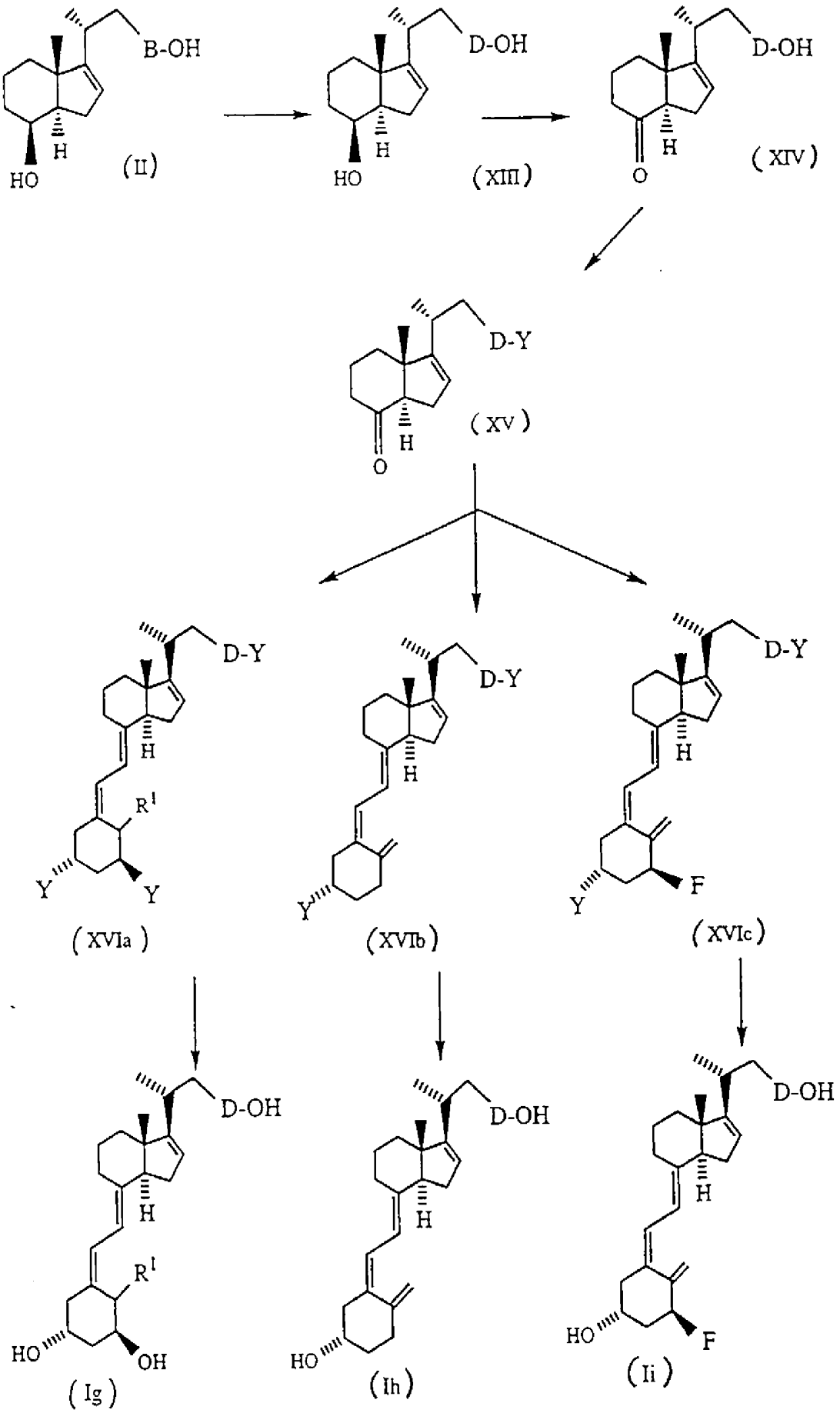
Sloučeniny vzorce XIIa, XIIb nebo XIIc se zpracují konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

Chránicí skupiny sloučenin vzorce XIIa, XIIb nebo XIIc se odstraní reakcí se solí fluoru jako je tetrabutylamoniumfluorid v organickém rozpouštědle jako je suchý ether nebo výhodněji tetrahydrofuran, čímž se získá odpovídající sloučenina vzorce Id, Ie nebo If.

Sloučeniny vzorce I, kde A je dvojná vazba mezi uhlíky s Z konfigurací se připraví jak je dále popsáno se zvláštním odkazem na vzorcové schema IV a následující příklady.

25.05.98

VZORCOVÉ SCHEMA IV



25.05.98

kde Y, B a R^1 mají výše uvedený význam a D je skupina $-CH=CHC(Et)_2-$ s Z konfigurací, a Et je ethyl.

Ve výše uvedeném vzorcovém schematu IV se sloučenina vzorce II hydrogenuje na sloučeninu vzorce XIII reakcí s vodíkem a Lindlarovým katalyzátorem v organickém rozpouštědle jako je kombinace ethylacetatu, hexanu a ethanolu v přítomnosti chinolinu. Sloučenina vzorce XIII se zpracuje konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

Výsledná sloučenina vzorce XIII se oxiduje na sloučeninu vzorce XIV zpracováním s oxidačním prostředkem jako je 2,2'-bipyridiniumchlorchromat nebo pyridiniumdichromat při teplotě místnosti v aprotickém rozpouštědle jako je suchý tetrahydrofuran nebo výhodněji suchý methylenchlorid. Sloučenina vzorce XIV se zpracuje konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

Sloučenina vzorce XIV se převede na sloučeninu vzorce XV reakcí s například (trialkylsilyl)imidazolem jako je 1-(trimethylsilyl)imidazol v aprotickém organickém rozpouštědle jako je suchý tetrahydrofuran nebo výhodněji suchý methylenchlorid. Sloučenina vzorce XV se zpracuje konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

Sloučenina vzorce XV se převede na sloučeninu vzorce XVIa, XVIb nebo XVIc reakcí s odpovídající sloučeninou vzorce VI. Reakce se provádí při -60 °C až -90 °C, výhodně -78 °C v polárním aprotickém organickém rozpouštědle jako je suchý ether nebo výhodněji suchý tetrahydrofuran v přítomnosti silné báze jako je alkyllithium jako je butyllithium. Sloučeniny vzorce XVIa, XVIb nebo XVIc se zpracují konvenčními prostředky jako je extrakce následovaná chromatografií.

25.05.98

Chránicí skupiny sloučeniny vzorce XVIIa, XVIIb, XVIIc se odstraní reakcí se solí fluoru jako je tetrabutylamonium-fluorid v organickém rozpouštědle jako je suchý ether nebo výhodněji tetrahydrofuran, čímž se získá odpovídající sloučenina vzorce Ig, Ih nebo Ii.

Sloučeniny vzorce I jak jsou výše popsány mohou být podávány orálně pro léčení neoplastických chorob jako je leukémie u teplokrevných živočichů, kteří potřebují takovéto léčení. Konkrétněji, sloučeniny vzorce I jak jsou výše popsány, mohou být podávány orálně dospělým lidem v dávkách, které jsou v rozmezí 0,05 až 50 mikrogramů na den pro léčení neoplastických chorob jako je leukémie.

Užitečný účinek sloučenin vzorce I jako prostředků pro léčení neoplastickýc chorob může být demonstrován následujícími zkušebními postupy.

Diferenciace HL-60 buněk

Indukce diferenciace HL-60 buněk byla zkoušena měřením jejich oxidačního tržného potenciálu pomocí redukce nitro-bluetetrazolia. (NBT)

HL-60 buňky byly udržovány v RPMI 1640 mediu doplněném 10 % fetálního telecího séra (FCS), 2 mM L-glutaminu, 1 mM pyruvatu sodného, 1 % neesenciálních aminokyselin, 50 j/ml penicilinu a 50 mikrog/ml streptomycinu. HL-60 buňky (30 tisíc buněk v 90 mikrolitrech doplněného RPMI media) byly naočkovány do plochých mikrolitrových prohlubní hned po naočkování 10 mikrolitrů testovaných sloučenin uvedených dále v tab. 1 zředěných v doplněném RPMI mediu bylo přidáno do důlků, čímž se získaly konečné koncentrace mezi 10^{-11} až 10^{-6} M (vycházeje

25.05.98

ze zásobních roztoků 10^{-2}M v ethanolu, uskladněných při -20°C a chráněných před světlem). Po 3 dnech bylo médium odstraněno z důlků vícekanálkovou pipetou a nahraženo 100 mikrol. NBT roztoku (1 mg/ml ve fosfátem pufrovaném solném roztoku s 200 nM forbomyristatacetatu).

Po další hodinové inkubaci při 37 °C byl NBT roztok odstraněn a přidáno 100 mikrol. 10%ního dodecylsulfatu sodného v 0,01 N HCl. Množství redukovaného NBT bylo kvanatifikováno fotometricky při 540 nm za použití automatického plotnového čítače. Byl vypočten průměr ze 3 důlků. SEM byly mezi 5 až 10 %. Hodnoty byly vyjádřeny jako procento maximální diferenciace dosažené s 100-1000 nM kalcitriolem (sloučenina X při stejném experimentu. Koncentrace (nM) vedoucí k 50 % této maximální hodnoty je určena graficky a uvedena dálo v tabulce jako ED_{50}.

Sloučenina	ED_{50} (nM)	HTD mikrog/kg
X	6,0	0,5
A	2,5	4,0
B	6,2	2,5
C	3,8	2,0

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že sloučeniny vzorce I indikují diferenciaci HL-60 buněk a tím zastavují růst těchto nádorových buněk. Tím jsou sloučeniny vzorce I užitečné při léčení neoplastických chorob jako je leukémie.

25.05.98

Test kalciové tolerance

Vážné změny u kalciové homeostázy silně ovlivňují hmotnostní vývoj u myší.

Myši (25 až 30 g tělesné hmotnosti) obdržely denně subkutánní podání testované sloučeniny po dobu 4 po sobě jdoucích dní. Tělesná hmotnost byla registrována právě před a na konci 5denní léčebné periody. "Nejvyšší tolerovaná dávka" (MTD) je dávka, která má za následek nulový hmotnostní přírůstek během této léčebné periody. Výsledky jsou shrnuty ve výše uvedené tabulce.

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že sloučeniny vzorce I jsou lépe tolerovány než 1,25-dihydroxycholekalciferol.

Orální dávkovací formy obsahující sloučeniny vzorce I tohoto vynálezu mohou být začleněny v tobolkách, tabletách a podobně s farmaceuticky akceptovatelnými nosiči. Ilustrativní z farmaceuticky akceptovatelných nosných materiálů, které mohou být začleněny do tobolek a podobně jsou následující: pojivo jako je pryskyřičný trakant, klovatina, kukuřičný škrob nebo želatina, excipient jako je fosforečnan dvojvápenatý, desintegrační prostředek jako je kukuřičný škrob, bramborový škrob, algenová kyselina a podobně, lubrikant jako je stearan hořečnatý, sladidlo jako je sacharosa, laktosa nebo sacharin, ochucovací prostředek jako je silice z máty peprné, olej z libavky položené nebo višně. Různé jiné materiály mohou být přítomné jako povlaky nebo jinak modifikovat fyzikální formu nebo dávkovací jednotku. Například tablety mohou být povlečeny šelakem, cukrem nebo oběma.

Sirup nebo tinktura mohou obsahovat aktivní sloučeninu, sacharosu jako sladidlo, methyl a propylparabeny jako konzervační prostředek a ochucení jako je višňové nebo pomerančové ochucení.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady provedení jsou opatřeny pro další popis vynálezu a nejsou určeny k jeho jakémukoli omezení.

Příklad 1

/1(R^*),3aR^*(3aα,4β,7aβ)/-3a,4,5,6,7,7a-Hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3-heptinyl)-7a-methyl-4-/(trimethylsilyl)-oxy/-3H-inden

Do roztoku 1,02 g (3,51 mmol) /3aS-/1(R^*),3aβ,7β,7aα/-3α,4,5,6,7,7a-hexahydro-3-/1-methyl-3-butinyl/-3a-methyl-7-/(trimethylsilyl)oxy/-1H-indenu v 10 ml bezvodého tetrahydrofuranu při -78 °C bylo pomalu přidáno 2,5 ml (3,861 mmol), 1,6M n-butyllithia v hexanu. Po míchání při -78 °C po dobu 1 hodiny bylo přidáno 2,5 ml 3-pentanonu a míchání pokračovalo po dalších 15 minut. Reakční směs byla zředěna vodou a extrahována 4 x 50 ml hexanu. Sloučené extrakty byly promyty vodou a solankou, vysušeny nad síranem sodným a odpařeny do sucha. Surový produkt byl vyčištěn mžikovou chromatografií, čímž se získalo 273 mg regenerovaného výchozího materiálu a 1 g (75 %) nadepsané sloučeniny. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 0,06 (s, 9H, $3CH_3$), 1,02 (t, 6H, J = 7,5 Hz, $2CH_3$), 1,02 (s, 3H, CH_3), 1,10 (d, 3H, J = 6Hz, CH_3), 1,62 (m, 4H, $2CH_2$), 2,08-2,57 (m, 4H, CH, CH_2, CH z CH_2), 4,08 (brs, 1H, CH), 5,32 (brs, 1H, CH).

25.05.98

Příklad 2

/1(R*),3aR*(3aα,4β,7aβ)/-3a,4,5,6,7,7a-Hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3-heptinyl)-7a-methyl-3H-inden-4-ol

Do míchaného roztoku 1,178 g (3,12 mmol) /1(R*),3aR*-(3aα,4β,7aβ)/-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-1-/1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3-heptinyl)-7a-methyl-4-/(trimethylsilyl)oxy/-3H-indenu v 15 ml bezvodého tetrahydrofuranu bylo přidáno 6 ml (6mmol 1M tetrabutylamoniumfluoridu. Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti přes noc v argonové atmosféře. Pak byla zředěna 150 ml směsi voda-solanka 1:1 a extrahována důkladně ethylacetatem. Sloučené extrakty byly promyty ě x 30 ml vody, vysušeny nad síranem sodným a odpařeny do sucha. Surový produkt byl vyčištěn mžikovou chromatografií, čímž se získalo 900 mg (94,5 %) nadepsané sloučeniny jako bílé krystalické tuhé látky.

$[\alpha]_D^{25}$ -20,5° (c 0,2, EtOH); ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 1,01 (t, 6H, J = 7,3 Hz, $2CH_3$), 1,07 (s, 3H, CH_3), 1,10 (d,3H,J = 6Hz, CH_3), 140(dt,1H,Jvic = 3,5 a 12,5 Hz, Jgem = 12,5 Hz, CH z CH_2), 1,63 (m, 4H, 2 CH_2), 1,98 (ddd, 1H, Jvic = 3,5 a 5,5 Hz, Jgem = 15 Hz, CH z CH_2), 2,20 - 2,45 (m, 4H, CH_2, 2CH z CH_2), 4,19 (brs, 1H, CH), 5,39 (s, 1H, CH). Analýza vyp.pro $C_{20}H_{32}O_2$: C 78,90, H 10,59.Nalez.:C 78,92, H 10,30.

Příklad 3

[1(R*),3aR*(3aα,7aβ)]-3,3a,5,6,7,7a-Hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3-heptinyl)-7a-methyl-4H-inden-4-on

Do míchaného roztoku 253 mg (0,83 mmol) /1(R*),3aR*)-3aα,4β,7aβ)/-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-1(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3-heptinyl)-7a-methyl-3H-inden-4-olu v 15 ml bezvodého

25.05.98

methylenchloridu při teplotě místnosti v argonové armosféře byl přidán 1 g (2,65 mmol) pyridiniumdichromatu. Reakční směs byla míchána po dobu 2 hodin, bylo přidáno 0,5 g 3A molekulárních sít a míchání pokračovalo po dobu 1 hodiny. Po přídavku 25 ml etheru a míchání po dobu 15 minut byla provedena filtrace skrz celitovou vložku. Vložka byla promyta 3 x 50 ml ethylacetatu. Sloučené filtráty byly promyty 2N hydrogenuhličitanem draselným, vodou a solankou, vysušeny nad síranem sodným a odpařeny do sucha. Surový produkt byl vyčištěn mžikovou chromatografií, čímž se získalo 157 mg (62 %) nadepsané sloučeniny.

Příklad 4

[1(R*),3aR*(3aα,7aβ)]-3,3a,5,6,7,7a-Hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-[(trimethylsilyl)oxy]-3-heptinyl)-7a-methyl-4H-inden-4-on

Do roztoku 223 mg (0,737 mmol) [1(R*),3aR*-(3aα,7aβ)]-3,3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3-heptinyl)-7a-methyl-4H-inden-4-onu v 10 ml bezvodého methylenchloridu bylo přidáno 0,67 ml (4,42 mmol) 1-(trimethylsilyl)-imidazolu. Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti v argonové atmosféře přes noc. Reakční směs byla zchlazena vodou a extrahována hexanem. Hexanové extrakty byly promyty vodou a solankou, vysušeny nad síranem sodným a odpařeny do sucha. Surový produkt byl vyčištěn mžikovou chromatografií hexan-ethylacetatem 10:1, čímž se získalo 272 mg (98 %) nadepsané sloučeniny. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 0,15 (s, 9H, $3CH_3$), 0,83 (s, 3H, CH_3), 0,91 (t, 6H, J = 7,5 Hz, $2CH_3$), 1,16 (m, 3H, CH_3), 1,57 (q, 4H, J = 7,5, $2CH_2$), 2,85 (dd, 1H, Jvic = 7 Hz, Jgem = 10 Hz, CH ≠ CH_2), 5.37 (brs, 1H, CH).

25.05.98

Příklad 5

1,25-Dihydroxy-16-en-23-in-26,27-bishomocholekalciferol

Do míchaného roztoku 694 mg (1,19 mmol) /3S-(1Z,3α, 5β-/2-/3,5-bis/(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl/oxy/-2-methylencyklohexyliden/ethyl/difenylfosfinoxidu v 10 ml bezvodého tetrahydrofuranu při -78 °C bylo přidáno 0,75 ml (1,2 mmol) 1,6 M n-butyllithia v hexanu. Reakční směs ihned zčervenala a barva vytrvala během přídavku 270 mg (0,72 mmol) /1(R*),3aR*)-3aα,7aβ,)/-3,3a,5,6,7,7a-hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-/(trimethylsilyl)oxy/-3-heptinyl)-7a-methyl-4a-inden-4-onu v 8 ml bezvodého tetrahydrofuranu. Reakční směs byla míchána při -78 °C po dobu 90 minut a pak zchlazena solankou a extrahována ethylacetatem. Sloučené extrakty byly promyty vodou a solankou, vysušeny nad síranem sodným a odpařeny do sucha. Surový meziprodukt byl vyčištěn mžikovou chromatografií směsí hexan-ethylacetatem 40:1, čímž se získalo 498 mg trisilylovaného meziproduktu.

Do roztoku trisilylovaného meziproduktu (498 mg) v 10 mg bezvodého tetrahydrofuranu bylo přidáno 5,04 ml (5,04 mmol) 1M tetrabutylamoniumfluoridu. Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti pod argonem po dobu 48 hodin a pak zředěna vodou a extrahována ethylacetatem. Sloučené extrakty byly promyty vodou a solankou, vysušeny nad síranem sodným a odpařeny do sucha. Surový produkt byl vyčištěn mžikovou chromatografií hexan-ethylacetatem 1:3 a preparativní HPLC s hexan-ethylacetatem 1:4, čímž se získalo 267 mg (84,5 %) nadepsané sloučeniny.

$[\alpha]_D^{25}$ + 6° (c 0,2, EtOH); UV λmax:262/3nm (ε 19 100); 1H-NMR ($CDCl_3$): δ 0,72 (s, 3H, CH_3), 1,01 (t,6H,J = 6,8 Hz, 2 CH_3), 1,14 (d,3H,J = 6,2 Hz, CH_3), 1,62 (m,4H, 2CH_2), 1,92 (ddd, 1H, Jvic = 3,5 a 8,5 Hz, Jgem = 12,5 Hz, CH z CH_2), 2,61 (br dd, 1H, Jvic = 3,5 Hz, Jgem = 12,5 Hz, CH z CH_2), 2,82 (dd, 1H, Jvic = 4Hz, Jgem = 12 Hz, CH z CH_2), 4,24 (brm, 1H, CH), 4,45 (brm, 1H, CH), 5,02, 5,34 (2s, 2H, CH_2), 5,38 (s, 1H, CH), 6,11, 6,38 (AB;2H, J = 11,4 Hz, CH CH).

Příklad 6

[1(R*),3aR*(3aα,4β,7aβ)]-3a,5,6,7,7a-Hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3E-heptenyl)-7a-methyl-3H-inden-4-ol

Do míchané suspenze 190 mg (5 mmol) lithiumaluminium-hydridu v 15 ml bezvodého tetrahydrofuranu ochlazeného v ledové lázni bylo nejdříve pečlivě přidáno 270 mg (5 mmol) tuhého methoxidu sodného, načež následoval přídavek 252 mg (0,852 mmol) [1(R*),3aR*-(3aα,4β,7aβ)]-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3-heptinyl)-7a-methyl-3H-inden-4-olu a reakční směs byla zahřívána při refluxu po dobu 24 hodin. Po ochlazení v ledové lázni byla reakční směs zchlazena pečlivým přídavkem 1 ml vody, načež následoval přídavek 1 ml 2N NaOH. Po přídavku 20 ml etheru byla směs míchána po dobu 0,5 h, bylo přidáno 2,2 $MgSO_4$ a mícháno další 0,5 h.

Směs pak byla zfiltrována, promyta etherem a sloučené etherové filtráty byly odpařeny do sucha. Surový produkt byl vyčištěn mžikovou chromatografií a preparativní HPLC hexan-ethylacetatem 2:1, čímž se získalo 133 mg (53 %) nadepsané sloučeniny.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 0,84 (t, 6H, J = 7,5 Hz, $2CH_3$), 0,99 (d, 3H, J = 6Hz, CH_3), 1,03 (s, 3H, CH_3), 1,51 (q, 4H, J = 7,5 Hz, $2CH_2$), 4,17 (brs, 1H, CH), 5,32 (brs, 1H, CH), 5,38 (d, 1H, Jtrans = 16,5 Hz, CH), 5,52 (dt, 1H, Jvic = 6,5 Hz, Jtrans = 16,5 Hz, CH).

Příklad 7

[1(R*),3aR*(3aα,7aβ)]-3,3a,5,6,7,7a-Hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3E-heptenyl)-7a-methyl-4H-inden-4-on

25.05.98

Do míchaných 133 mg (0,434 mmol) [1(R^*,3aR^*,3aα,4β,7aβ)]-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3E-heptenyl)-7a-methyl-3H-inden-4-olu ve 4 ml bezvodého methylenchloridu bylo přidáno 950 mg (2,527 mmol) pyridiniumdichromatu při teplotě místnosti v argonové atmosféře. Reakční směs byla míchána po dobu 5 hodin, pak bylo přidáno 25 ml etheru a mícháno po dobu 15 minut, zfiltrováno přes celitovou vložku a vložka byla promyta 3 x 40 ml ethylacetatu. Sloučené filtráty byly odpařeny do sucha. Surový produkt byl vyčištěn mžikovou chromatografií hexan-ethylacetatem 5:2, čímž se získalo 111 mg (84 %) nadepsané sloučenin.

Příklad 8

[1(R*),3aR*(3aα,7aβ)]-3,3a,5,6,7,7a-Hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-[(trimethylsilyl)oxy]-3E-heptenyl)-7a-methyl-4H-inden-4-on

Do roztoku 111 mg (0,365 mmol) [1-(R^*),3aR^*-(3aα,7aβ)]-3,3a,5,6,7,7a-hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3E-heptenyl)-7a-methyl-4H-inden-4-onu ve 4 ml bezvodého methylenchloridu bylo přidáno 0,375 ml (2,56 mmol) 1-(trimethylsilyl)-imidazolu. Reakční směs byla míchána v argonové atmosféře po dobu 23 hodin. Pak byla zchlazena přídavkem 10 ml vody, míchána po dobu 15 minut, bylo přidáno 20 ml solanky a provedena extrakce 3 x 90 ml ethylacetatu. Organické vrstvy byly promyty 5 x směsí voda-solanka 1:1, vysušeny nad síranem sodným a odpařeny do sucha. Surový produkt byl vyčištěm mžikovou chromatogafií hexan-ethylacetatem 10:1, čímž se získalo 131 mg (95 %) nadepsané sloučeniny.

25.05.98

Příklad 9

1,25-Dihydroxy-16,23E-dien-26,27-bishomocholekalciferol

Do míchaného roztoku 405 mg (0,695 mmol) [3S-(1Z,3α,5β)]-[2-[3,5-bis[[1,1-dimethylethyl(dimethylsilyl]oxy]-2-methylencyklohexyliden]ethyl]difenylfosfinoxidu v 5 ml bezvodého tetrahydrofuranu při -78 °C bylo přidáno 0,434 ml (0,694 mmol) 1,6M n-butyllithia v hexanu po kapkách v argonové atmosféře.

Po 5 minutách míchání do takto získaného červeného roztoku byl přidán po kapkách během 10minutové periody roztok 131 mg (0,348 mmol) [1(R*),3aR*(3aα,7aβ)]-3,3a,5,6,7,7a-hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-[(trimethylsilyl)oxy]-3E-heptenyl)-7a-methyl-4H-inden-4-onu ve 4 ml bezvodého tetrahydrofuranu. Reakční směs pak byla míchána při -78 °C po dobu 2 hodin., Byla zchlazena přídavkem 10 ml 2N roztoku Rochellovy soli a zahřáta na teplot místnosti, pak extrahována 3 x 90 ml ethylacetatu. Sloučené extrakty byly promyty třikrát solankou, vysušeny nad síranem sodným a odpařeny do sucha. Zbytek byl vyčištěn mžikovou chromatografií hexan-ethylacetatem 30:1, čímž se získalo 220 mg trisilylovaného meziproduktu.

Do roztoku trisilylovaného meziproduktu (220 mg) ve 3 ml bezvodého tetrahydrofuranu bylo přidáno 3,2 ml (3,2 mmol) 1M tetrabutylamoniumfluoridu v tetrahydrofuranu a tato reakční směs byla míchána při teplotě místnosti v argonové atmosféře po dobu 19 hodin. Pak bylo přidáno 5 ml vody, míchá-no po dobu 15 minut, zředěno 20 ml solanky a extrahováno 3 x 90 ml ethylacetatu.

Sloučené extrakty byly promyty vodou se solankou 1:1, vysušeny nad síranem sodným a odpařeny do sucha. Surový produkt byl vyčištěn mžikovou chromatografií a preparativní HPLC

hexanem s ethylacetatem 1:5, čímž se získalo 126 mg (82 %) krystalické nadepsané sloučeniny o teplotě tání 133 až 135 °C (ze směsi 4:6 tetrahydrofuran-methylformat).

$[\alpha]_D^{25}$ + 26° (c0,2, EtOH); UV λmax (EtOH): 263 nm (ε 18.200); ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 0,69 (s, 3H,CH_3), 0,85 (t, 6H, J = 7,5 Hz, $2CH_3$), 1,02 (d,3H, J = 6,7 Hz, CH_3). 1,52 (m, 4H, $2CH_2$), 1,68 (m, 1H, CH z CH_2), 1,91 (ddd, 1H, Jvic = 3.5 a 8,5 Hz, Jgem = 12.5 Hz, CH z CH_2), 2,60 (dd, 1H, Jvic = 3,5 Hz, Jgem = 12,5 Hz, CH z CH_2), 2,82 (m, 1H, CH z CH_2), 4,24 (m, 1H, CH), 4,45 (m, 1H, CH), 5,02, 5,34 (2s, 2H, CH_2), 5,32 (brs, 1H, CH), 5,38 (d, 1H, Jtrans = 15,5 Hz, CH), 5,52 (dt, 1H, Jvic = 7Hz, Jtrans = 15,5 Hz, CH), 6,11, 6,38 (AB, 2H, J = 11,5 Hz, CH CH);

Analýza: vypočteno pro $C_{29}H_{44}O_3$: C 79,04, H 10,06.

Nalezeno: C 78,78, H 19,21

Příklad 10

[1(R*),3aR*-(3aα,4β,7aβ)]-3a,4,5,6,7,7a-Hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3Z-heptenyl)-7a-methyl-3H-inden-4-ol

Směs 215 mg (0,71 mmol) [1(R*),3aR*-(3aα,4β,7aβ)]-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3-heptinyl)-7a-methyl-3-inden-4-olu, 5 ml ethylacetatu, 12,5 ml hexanu, 0,35 ml absolutního ethanolu, 0,0175 ml chinolinu a 35 mg Lindlarova katalyzátoru byla hydrogenována při teplotě místnosti anormálním tlaku po dobu 1,5 hodin. Reakční směs byla zfiltrována přes celitovou vložku a vložka byla promyta ethylacetatem. Sloučené filtráty byly promyty 1N HCl, vodou, 2N hydrogenuhličitanem draselným, vodou a solankou, vysušeny nad síranem sodným a odpařeny do sucha. Surový produkt byl vyčištěn preparativní HPLC (YMC kolona), čímž se získalo 200 mg (92,5 %) nadepsané sloučeniny.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 0,90 (t,6H,J = 7,5 Hz, $2CH_3$, 1,01 (d,3H, J = 6,5 Hz, CH_3), 1,05 (s, 3H, CH_3), 1,57(q, 4H, J = 7,5 Hz, $2CH_2$), 4,17 (brs, 1H, CH), 5,22 (br dt, 1H, Jvic = 1,5 Hz, Jcis = 12 Hz, CH), 5,38 (dt, 1H, Jvic = 7 Hz, Jcis = 12 Hz, CH).

Příklad 11

[1(R*),3aR*-(3aα,7aβ)]-3,3a,5,6,7,7a-Hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3Z-heptenyl)-7a-methyl-4H-inden-4-on

Do míchaného roztoku 200 mg (0,652 mmol) [1(R^*),3aR^*-(3aα,4β,7aβ)]-3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3Z-heptenyl)-7a-methyl-3H-inden-4-olu v 10 ml bezvodého methylenchloridu bylo přidáno 0,1286 g (3,301 mmol) pyridiniumdichromatu při teplotě místnosti v argonové atmosféře. Reakční směs byla míchána po dobu 6 hodin. Bylo přidáno 25 ml etheru a bylo mícháno po dobu 15 minut, zfiltrováno přes celitovou vložku a vložka byla promyta 3 x 25 ml ethylacetatu. Sloučené filtráty byly odpařeny do sucha. Surový produkt byl vyčištěn mžikovou chromatografií hexan-ethylacetatem 3:1, čímž se získalo 182 mg (91,5 %) nadepsané sloučeniy.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 0,81 (s, 3H, CH_3), 0,88 (t, 6H, J = 7,5 Hz, $2CH_3$), 1,06 (d, 3H, J = 6,5 Hz, CH_3), 1,56 (q, 4H, J = 7,5 Hz, $2CH_2$), 2,84 (dd, 1H, Jvic = 6,5 Hz, Jgem = 10 Hz, CH z CH_2), 5,22 (d, 1H, Jcis = 12 Hz, CH), 5,33 (s, 1H, CH), 5,35 (dt, 1H, Jvic = 6,5 Hz, Jcis = 12 Hz, CH).

Příklad 12

[1(R*),3aR*-(3aα,7aβ)]-3,3a,5,6,7,7a-Hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-[(trimethylsilyl)oxy-3Z-heptenyl)-7a-methyl-4H-inden-4-on

Do roztoku 182 mg (0,597 mmol) [1(R*),3aR*-(3aα,7aβ)]-3,3a,5,6,7,7a-hexahydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5-hydroxy-3Z-heptenyl)-7a-methyl-4a-inden-4-onu v 10 ml bezvodého methylenchloridu bylo přidáno 0,542 ml (3,58 mmol) 1-(trimethylsilyl)imidazolu. Reakční směs byla míchána při teplotě místnosti přes noc. Reakční směs pak byla zředěna hexanem, promyta vodou a solankou, vysušena nad síranem sodným a odpařena do sucha. Surový produkt byl vyčištěn mžikovou chromatografií hexan-ethylacetatem 10:1, čímž se získalo 218 mg (97 %) nadepsané sloučeniny.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 0,12 (s,9H,$3CH_3$), 0,80 (s, 3H, CH_3), 0,86(t, 6H, J = 7,5 Hz, $2CH_3$), 1,05 (d, 3H, J = 6,5 Hz, CH_3), 1,55 (q, 4H, J = 7,5 Hz, $2CH_2$), 2,84 (dd, 1H, Jvic = 6,5 Hz, Jgem = 10 Hz, CH z CH_2), 5,08 (br dt, 1H, Jvic = 1,5 Hz, Jcis =11,5 Hz, CH), 5,25 (dt, 1H, Jvic = 6,5 Hz, Jcis = 11,5 Hz, CH), 5,31 (brs, 1H, CH).

Příklad 13

1,25-Dihydroxy-16,23Z-dien-26,27-bishomocholekalciferol

Do míchaného roztoku 578 mg (0,992 mmol) [3S-(1Z,3α,5β)]-[2-[3,5-bis[[(1,1-dimethylethyl)dimethylsilyl]oxy]-2-methylencyklohexyliden]ethyl]difenylfosfinoxidu v 8 ml bezvodého tetrahydrofuranu při -78 °C bylo přidáno 0,62 ml (0,992 mmol) 1,6M n-butyllithia v hexanu po kapkách v argonové atmosféře. Reakční směs zčervenala a tato barva vytrvala během přídavku 218 mg (0,578 mmol) [1(R*),3aR*(3aα,7aβ)]-3,3a,5,6,7,7a-hexa-

hydro-1-(1-methyl-5-ethyl-5/(trimethylsilyl)oxy/-3Z-heptenyl)-7a-methyl-4H-inden-4-onu v 8 ml bezvodého tetrahydrofuranu. Reakční směs byla míchána při -78 °C po dobu 2 hodin, pak zchlazena vodou a extrahována důkladně ethylacetatem. Sloučené extrakty byly promyty vodou a solankou, vysušeny nad síranem sodným a odpařeny do sucha. Surový meziprodukt byl vyčištěn mžikovou chromatografií s hexan-ethylacetatem 20:1, čímž se získalo 328 mg trisilylovaného meziproduktu.

Do roztoku trisilylovaného meziproduktu (328 mg) v 10 ml bezvodého tetrahydrofuranu byly přidány 4 ml (4 mmol) 1M tetrabutylamoniumfluoridu v tetrahydrofuranu a reakční směs byla míchána při teplotě místnosti přes noc. Pak byla zředěna vodou a extrahována ethylacetatem. Sloučené extrakty byly promyty vodou a solankou, vysušeny nad síranem sodným a odpařeny do sucha. Surový produkt byl vyčištěn preparativní HPLC (YMC kolona), hexan-ethylacetatem 1:4, čímž se získalo 191 mg (75 %) nadepsané sloučeniny jako bílá pěna.

$[\alpha]_D^{25}$ + 20,5° (c 0,2, EtOH); UVλ (EtOH): 262-263 nm (ε = 14450); ^{1}H-NMR ($CDCl_3$); δ 0,7 (s, 3H, CH_3), 0,9 (t,6H, J = 7,3 Hz, 2 CH_3), 1,05 (d, 3H, J = 6,8 Hz, CH_3), 1,57 (m, 4H, 2CH_2), 1,91 (ddd, 1H, Jvic = 3,5 a 8,5 Hz, Jgem = 12,5 Hz, CH z CH_2), 2,48 (m, 2H, CH_2), 2,61 (br d, 1H, Jgem = 12,5 Hz, CH z CH_2), 2,82 (br m, 1H, CH z CH_2), 4,24 (br m, 1 H, CH), 4,45 (br m, 1H, CH), 5,02, 5,34 (2s, 2H, CH_2), 5,23 (d, 1H, Jcis = 12,3 Hz, CH), 5,35 (s, 1H, CH), 5,37 (dt, 1H, Jvic = 7Hz, Jcis = 12,3 Hz, CH), 6,11, 6,38 (AB, 2H, J = 11,3 Hz, CH CH).

25.05.98

Příklad a

Orální dávkovací forma měkká želatinová tobolka

	mg na tobolku
Sloučenina C	0,0005 - 0,050
butylovaný hydroxytoluen (BHT)	0,016
butylovaný hydroxyanisol (BHA)	0,016
Myglyol ® -812 do	160

Příklad b

Orální dávkovací forma měkká želatinová tobolka

	mg na tobolku
Sloučenina C	0,0005 - 0,050
α -tokoferol	0,016
Myglyol ® -812 do	160

1. Suspenduj BHT a BHA (příklad a) nebo α -tokoferol (příklad b) v Myglyolu ® -812. Zahřej na asi 50 °C a míchej až do rozpuštění.

25.05.90

2. Rozpusť sloučeninu C v roztoku ze stupně 1.

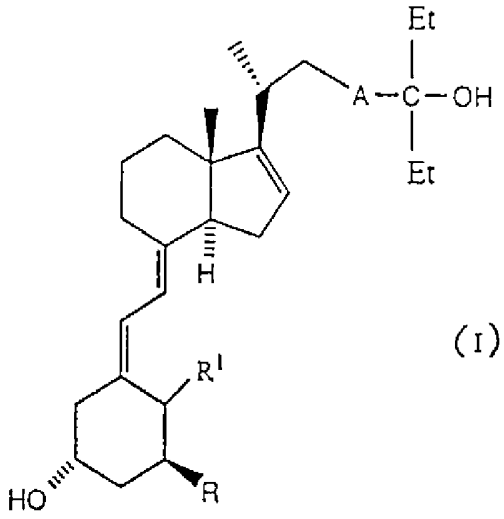
3. Naplň roztok ze stupně 2 do měkkého želatinového víčka.

Všechny stupně se provádějí pod atmosférou dusíku a chráněné před světlem.

25.05.98

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. 25-Hydroxy-16-en-26,27-bishomocholekalciferolové deriváty vzorce I



(I)

kde A je dvojná vazba mezi uhlíky s E nebo Z stereochemickým uspořádáním nebo A je trojná vazba mezi uhlíky, Et je ethyl, a R je hydroxy a R^1 je vodík nebo $=CH_2$ nebo R je vodík nebo fluor a R^1 je $=CH_2$.

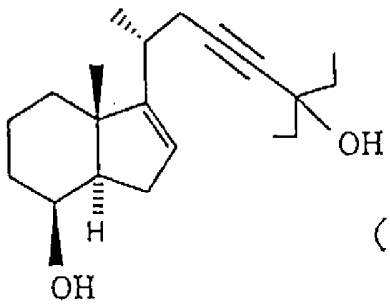
2. Sloučenina podle nároku 1, kde A je dvojná vazba mezi uhlíky s E konfigurací, zejména kde R je hydroxy, speciálně kde R^1 je $=CH_2$, výhodně 1,25-dihydroxy-16,23E-dien-26,27-bishomocholekalciferol.

3. Sloučenina podle nároku 1, kde A je dvojná vazba mezi uhlíky s Z konfigurací, zejména kde R je hydroxy, speciálně kde R^1 je $=CH_2$, výhodně 1,25-dihydroxy-16,23Z-dien-26,27-bishomocholekalciferol.

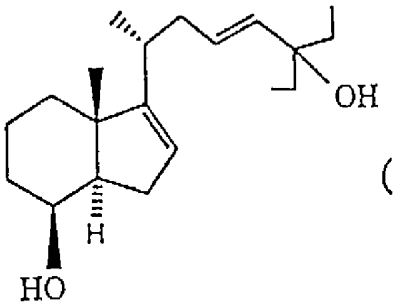
4. Sloučenina podle nároku 1, kde A je trojná vazba mezi uhlíky, zejména kde R je hydroxy, speciálně kde R^1 je $=CH_2$, výhodně 1,25-dihydroxy-16-en-23-in-26,27-bishomocholekalciferol.

5. Sloučenina podle nároku 1, kterou je 1α-fluor-25-hydroxy-16,23E-dien-26,27-bishomocholekalciferol.

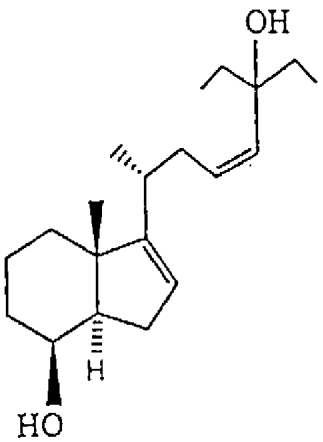
6. Sloučenina vzorců



(II)



(IX)



(XIII)

25.10.96

7. Farmaceutická směs, zejména pro léčení neoplastických chorob jako je leukémie vyznačená tím, že obsahuje účinné množství alespoň jedné sloučeniny vzorce I jako v nároku 1, 2, 3, 4 nebo 5, a inertní nosič.

8. Sloučeniny podle nároku 1, 2, 3, 4 nebo 5 pro použití jako stimulačních prostředků HL-60 buněčné diferenciace, zejména pro léčení neoplastických chorob jako je leukémie.

9. Použití sloučenin jako v nároku 1, 2, 3, 4 nebo 5 pro výrobu léčiva pro léčení neoplastických chorob jako je leukémie.

Zastupuje: JUDr. Ing. Milan Hořejš