

①9



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

①1 CH 650 237 A5

⑤1 Int. Cl.⁴: C 07 C 17/16
C 07 C 33/44
C 07 C 35/52
C 07 C 69/62

// A 61 K 31/59

①2 PATENTSCHRIFT A5

②1 Gesuchsnummer: 2497/80	⑦3 Inhaber: Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison/WI (US)
②2 Anmeldungsdatum: 24.07.1979	⑦2 Erfinder: De Luca, Hector F., Madison/WI (US) Schnoes, Heinrich K., Madison/WI (US) Napoli, Joseph L., jun., Dallas/TX (US) Onisko, Bruce L., Moffett Field/CA (US)
③0 Priorität(en): 26.07.1978 US 928279	⑦4 Vertreter: Patentanwälte W.F. Schaad, V. Balass, E.E. Sandmeier, Zürich
②4 Patent erteilt: 15.07.1985	③6 Internationale Anmeldung: PCT/US 79/00529 (En)
④5 Patentschrift veröffentlicht: 15.07.1985	③7 Internationale Veröffentlichung: WO 80/00339 (En) 06.03.1980

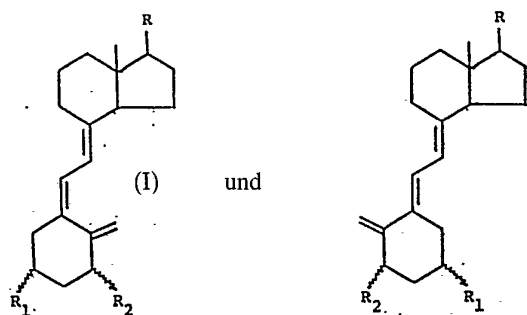
⑤4 1-fluorierte Vitamin D Verbindungen.

⑤7 Neue Fluor-substituierte Vitamin D Verbindungen, Verfahren zu Herstellung derartiger Verbindungen und neue fluorierte Zwischenverbindungen, die bei diesen Verfahren verwendet werden, werden beschrieben.

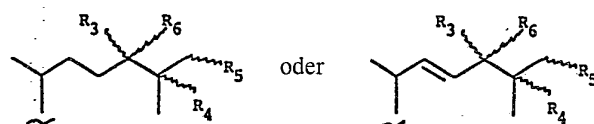
Die neuen Fluor-substituierten Vitamin D Verbindungen sind charakterisiert durch eine Vitamin D-ähnliche Wirksamkeit hinsichtlich ihres Vermögens, den intestinalen Calciumtransport und Knochenmobilisation zu stimulieren und die Calcifikation von rachitischem Knochen zu fördern. Diese Verbindungen lassen sich gut als Ersatz für Vitamin D Verbindungen bei der Behandlung von Erkrankungszuständen verwenden, bei denen ein Calcium-Phosphor-Ungleichgewicht auftritt und bei denen es der Fall sein kann, dass sie auf eine normale Vitamin D Therapie nicht ansprechen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verbindungen der Formel I und II



worin R die Strukturen hat von



und worin

- R_1 Wasserstoff, Hydroxy, O-Acyl oder O-niedrig-Alkyl ist und worin
 R_2 Fluor ist,
 R_3 , R_4 und R_5 jeweils ausgewählt sind aus der Gruppe von Wasserstoff, Hydroxy, O-Acyl, O-niedrig-Alkyl und Fluor, und worin
 R_6 Wasserstoff oder niedrig-Alkyl ist.

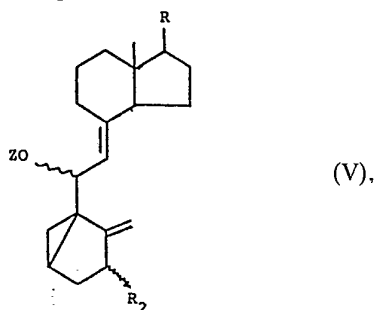
2. Verbindungen nach Anspruch 1, worin R_3 Wasserstoff, Hydroxy oder Fluor ist.

3. Verbindungen nach Anspruch 2, worin R_4 Wasserstoff, Hydroxy oder Fluor ist.

4. Verbindungen nach Anspruch 2 oder 3, worin R_6 Methyl ist, mit der stereochemischen Konfiguration der Ergosterinseitenkette.

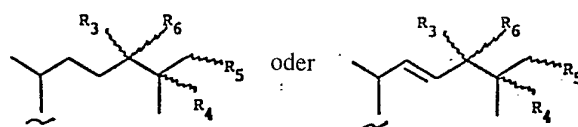
5. 1-Fluorvitamin D_3 nach Anspruch 1.
 6. 1-Fluor-5,6-trans-vitamin D_3 nach Anspruch 1.
 7. 1-Fluor-25-hydroxyvitamin D_3 nach Anspruch 1.
 8. 1-Fluor-25-hydroxy-5,6-trans-vitamin D_3 nach Anspruch 1.
 9. 1,25-Difluorvitamin D_3 nach Anspruch 1.
 10. 1,25-Difluor-5,6-trans-vitamin D_3 nach Anspruch 1.
 11. 1-Fluorvitamin D_2 nach Anspruch 1.
 12. 1-Fluor-5,6-trans-vitamin D_2 nach Anspruch 1.
 13. 1-Fluor-25-hydroxyvitamin D_2 nach Anspruch 1.
 14. 1-Fluor-25-hydroxy-5,6-trans-vitamin D_2 nach Anspruch 1.

15. Verbindungen der Formel V



worin

R eine Steroidseitenkette mit den Strukturen



ist und worin

Z niedrig-Alkyl ist,

R_2 Fluor ist,

R_3 , R_4 und R_5 jeweils ausgewählt sind aus der Gruppe von Wasserstoff, Hydroxy, O-niedrig-Alkyl, O-Acyl und Fluor und

R_6 Wasserstoff oder niedrig-Alkyl ist, als Zwischenprodukt für die Herstellung von Verbindungen gemäss Anspruch 1.

16. Verbindungen nach Anspruch 15, worin R_4 Wasserstoff,

Hydroxy oder Fluor ist.

17. Verbindungen nach Anspruch 15, worin R_3 Wasserstoff, Hydroxy oder Fluor ist.

18. Verbindungen nach Anspruch 15 oder 16, worin R_5 Wasserstoff ist und R_6 Methyl ist, mit der stereochemischen Seitenkettenkonfiguration von Ergosterin.

19. Verfahren zur Herstellung von 1-Fluorvitamin D Verbindungen der Formel I oder 1-Fluor-5,6-trans-vitamin D Verbindungen der Formel II oder 1-Fluor-3,5-cyclovitamin D Verbindungen der Formel V, durch Behandeln der entsprechenden 1-hydroxylierten Vitamin D Verbindungen oder 1-hydroxylierten 5,6-trans-Vitamin D Verbindungen oder 1-hydroxylierten 3,5-Cyclovitamin D Verbindungen mit einem Fluorierungsreagens, wodurch in den Ausgangsstoffen mindestens eine Hydroxygruppe durch Fluor ersetzt wird, und Gewinnen des jeweiligen 1-fluorierten Produktes.

20. Verfahren nach Anspruch 19, bei dem eine oder mehrere Hydroxygruppen, die in den 1-hydroxylierten Vitamin D, 5,6-trans- und 3,5-Cyclovitamin D Verbindungen vorhanden sind, geschützt sind gegen die Fluorierung durch Acylieren vor der Behandlung mit dem Fluorierungsreagens.

21. Verfahren nach Anspruch 20, bei dem mit 1-Hydroxyvitamin D Verbindungen oder 1-Hydroxy-5,6-trans-vitamin D Verbindungen als Ausgangsmaterial nur die C-3-Hydroxyfunktion vor der Behandlung mit dem Fluorierungsmittel durch Acylierung geschützt ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, bei dem die intermediär durch Acylgruppen geschützten Hydroxygruppen nach der Vollendung der Fluorierung wieder durch Hydrolyse unter basischen Bedingungen in Hydroxygruppen umgewandelt werden.

23. Verfahren nach Anspruch 19, bei dem das Fluorierungsmittel ein Dialkylaminoschwefel-trifluorid ist.

24. Verfahren nach Anspruch 23, bei dem das Fluorierungsmittel Diäthylaminoschwefel-trifluorid ist.

25. Verfahren zur Herstellung von 1-Fluorvitamin D Verbindungen der Formel I und 1-Fluor-5,6-trans-vitamin D Verbindungen der Formel II durch Behandeln der entsprechenden 1-hydroxylierten 3,5-Cyclovitamin D Verbindungen mit einem Fluorierungsreagens, wodurch im Ausgangsstoff mindestens eine Hydroxygruppe durch Fluor ersetzt wird und Unterziehen der dabei erhaltenen 1-Fluor-3,5-cyclovitamin D Verbindung einer säurekatalysierten Solvolyse, unter Bildung sowohl von 1-Fluorvitamin D Verbindungen der Formel I als auch Fluor-5,6-trans-vitamin D Verbindungen der Formel II und Gewinnen der beiden.

26. Verfahren nach Anspruch 25, bei dem eine oder mehrere Hydroxygruppen, die in den 1-hydroxylierten 3,5-Cyclovitamin D Verbindungen vorhanden sind, geschützt sind gegen die Fluorierung durch Acylieren vor der Behandlung mit dem Fluorierungsreagens.

27. Verfahren nach Anspruch 26, bei dem die intermediär durch Acylgruppen geschützten Hydroxygruppen nach der Vollendung der Fluorierung wieder durch Hydrolyse unter basischen Bedingungen in Hydroxygruppen umgewandelt werden.

28. Verfahren nach Anspruch 25, bei dem das Fluorierungsmittel ein Dialkylaminoschwefel-trifluorid ist.

29. Verfahren nach Anspruch 28, bei dem das Fluorierungsmittel Diäthylaminoschwefel-trifluorid ist.

Technisches Gebiet

Die Erfindung betrifft Verbindungen mit Vitamin D-artiger Aktivität und zwar Fluoroderivate von Vitamin D.

Vitamin D₃ und D₂ sind wohlbekannte Mittel zur Steuerung der Calcium-Phosphor-Homöostase. Diese Verbindungen stimulieren beim normalen Tier oder Menschen den intestinalen Calciumtransport und die Knochencalcium-Mobilisierung und sind wirksam zur Verhinderung der Rachitis. Untersuchungen während der vergangenen 10 Jahre haben jedoch gezeigt, dass Vitamin D₂ und D₃ in ihre hydroxylierten Formen metabolisiert werden müssen, bevor ihre biologische Aktivität zum Ausdruck kommt. Gegenwärtige Beweise zeigen beispielsweise, dass 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, der dihydroxylierte Metabolit von Vitamin D₃ die Verbindung ist, die für die vorstehend erwähnten biologischen Wirkungen verantwortlich ist. In gleicher Weise ist 1,25-Dihydroxyvitamin D₂ die aktive Form von Vitamin D₂.

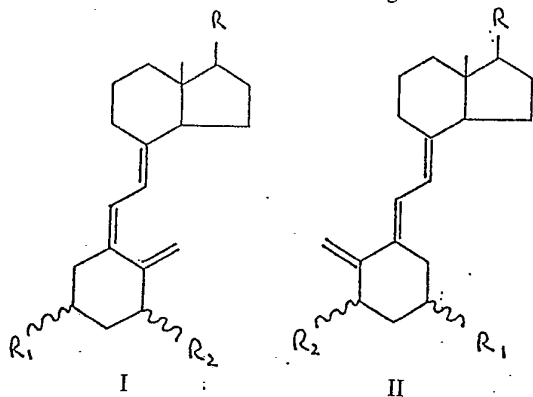
Stand der Technik

In der Patentliteratur oder in anderer Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf verschiedene Vitamin D Derivate. Vgl. beispielsweise die US-Patentschriften 3 565 924, gerichtet auf 25-Hydroxycholecalciferol; 3 697 559, gerichtet auf 1,25-Dihydroxycholecalciferol; 3 741 996, gerichtet auf 1 α -Hydroxycholecalciferol; 3 743 661, gerichtet auf 5,6-trans-25-Hydroxycholecalciferol; 3 907 843, gerichtet auf 1 α -Hydroxyergocalciferol; 3 715 374, gerichtet auf 24,25-Dihydroxycholecalciferol; 3 739 001, gerichtet auf 25,26-Dihydroxycholecalciferol; 3 786 062, gerichtet auf 22-Dehydro-25-hydroxycholecalciferol; 3 847 955, gerichtet auf 1,24,25-Trihydroxycholecalciferol; 3 906 014, gerichtet auf 3-Deoxy-1 α -hydroxycholecalciferol; 4 069 321, gerichtet auf die Herstellung verschiedener Seitenketten-fluorierter Vitamin D₃ Derivate und Seitenketten-fluorierter Dihydrotachysterin₃ Analoger.

Darstellung der Erfindung

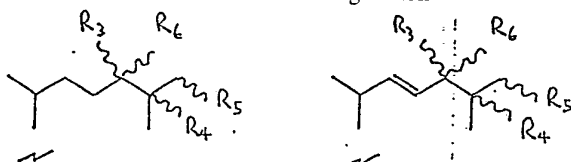
Es wurde nunmehr gefunden, dass fluorierte Vitamin D Verbindungen auch eine Vitamin D-artige Wirksamkeit aufweisen. Derartige Fluor-Analoga stellen daher nützliche Verbindungen zur Behandlung verschiedener Erkrankungen dar, wie Osteomalazie, Osteodystrophie und Hyperparathyreoidismus.

Die Erfindung betrifft Fluorvitamin D Verbindungen der nachstehenden allgemeinen Struktur I und 5,6-trans-Fluorvitamin D Verbindungen der nachstehenden allgemeinen Struktur II



worin

R eine Steroidseitenkette der Konfiguration



darstellt, worin

R₁ ausgewählt ist aus der Gruppe von Wasserstoff, Hydroxyl, O-niedrig-Alkyl oder O-Acyl, worin

R₂ Fluor bedeutet und worin jeder der Reste

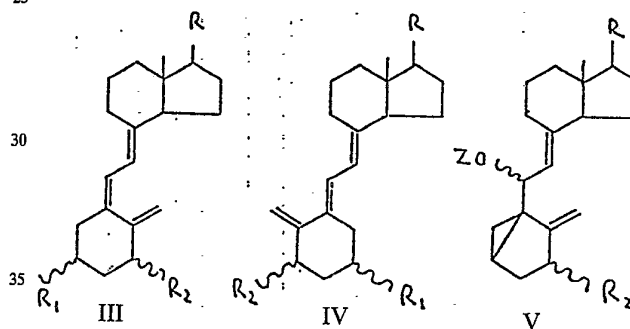
⁵ R₃, R₄ und R₅ ausgewählt ist aus der Gruppe von Wasserstoff, Hydroxyl, O-niedrig-Alkyl, O-Acyl und Fluor, und worin

R₆ Wasserstoff oder niedrig-Alkyl bedeutet.

10 Bester Weg zur Ausführung der Erfindung

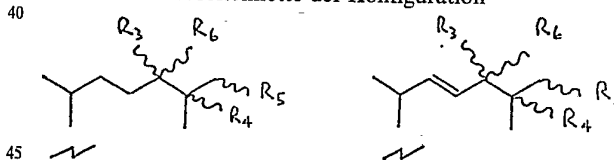
Diese Fluorverbindungen werden hergestellt durch ein Verfahren, das die Behandlung einer Hydroxyvitamin D Verbindung oder eines Hydroxyvitamin D Analogens mit einem Fluorierungsmittel und die direkte Erzielung der oder des entsprechende(n) ¹⁵ Fluorvitamin D Verbindung oder Fluorvitamin D Analogens, worin Fluor sich an dem Kohlenstoff befindet, der ursprünglich von der bzw. den Hydroxyfunktion(en) des Ausgangsmaterials besetzt wurde, einbezieht.

Geeignete Ausgangsmaterialien für diese Fluorierungsverfahren umfassen Hydroxyvitamin D Verbindungen der nachstehenden allgemeinen Struktur III oder Hydroxy-5,6-trans-vitamin D Verbindungen der nachstehenden allgemeinen Struktur IV oder Hydroxy-3,5-cyclo-vitamin D Verbindungen der nachstehenden allgemeinen Struktur V



worin

R eine Steroidseitenkette der Konfiguration



darstellt, und worin

R₁ ausgewählt ist aus der Gruppe von Wasserstoff, Hydroxy, O-niedrig-Alkyl oder O-Acyl, und worin

R₂ Hydroxy ist und jeder der Reste

⁵⁰ R₃, R₄ und R₅ ausgewählt ist aus Wasserstoff, Hydroxyl, O-niedrig-Alkyl und O-Acyl, und worin

R₆ Wasserstoff oder niedrig-Alkyl bedeutet, und worin

Z niedrig-Alkyl

darstellt.

⁵⁵ In der vorliegenden Beschreibung und in den Ansprüchen bezeichnen die Wörter «niedrig-Alkyl» einen Kohlenwasserstoffrest, der 1 bis 5 Kohlenstoffatome enthält, der eine normale oder verzweigte Konfiguration aufweisen kann (z. B. Methyl, Äthyl, Isopropyl) und das Wort «Acyl» bezeichnet eine

⁶⁰ aliphatische Acylgruppe, die 1 bis 5 Kohlenstoffatome enthält (z. B. Acetyl, Propionyl) oder eine aromatische oder substituierte aromatische Acylgruppe (z. B. Benzoyl oder Nitrobenzoyl). Fluorvitamin D Verbindungen der allgemeinen Struktur I werden hergestellt aus Ausgangsmaterialien der allgemeinen ⁶⁵ Struktur III, wohingegen Fluor-5,6-trans-vitamin D Verbindungen der Struktur II hergestellt werden aus Verbindungen der allgemeinen Struktur IV, und die Fluorierung von Cyclovitamin D Ausgangsmaterialien der allgemeinen Struktur V, gefolgt von

anschliessenden Umwandlungen, wie später beschrieben, führt sowohl zu den fluorierten Produkten I als auch II.

Die Ausgangsmaterialien für die Fluorierung, z. B. Verbindungen der allgemeinen Struktur III–V, können nach bekannten Methoden hergestellt werden. Hydroxyvitamin D Verbindungen der allgemeinen Struktur III sind verfügbar durch Synthese oder als isolierte Naturprodukte (vgl. beispielsweise Schnoes und DeLuca, in *Bioorganic Chemistry*, E. E. Van Tamelen, ed., Band 2, Kapitel 12, Seiten 299–335, Academic Press, NY 1978). Die 5,6-*trans*-Vitamin D Verbindungen der allgemeinen Struktur IV können hergestellt werden aus den entsprechenden 5,6-*cis*-Verbindungen (allgemeine Struktur III), nach der bekannten Isomerisierungsreaktion, unter Verwendung von Jodkatalysatoren (Verloop et al. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 78, 1004 [1969]).

3,5-Cyclovitamin D Verbindungen der allgemeinen Struktur V können hergestellt werden nach den Verfahrensweisen von Sheves und Mazur, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 6249 (1975), und Paaren et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75, 2080 (1978).

Jones et al. (US-PS 4 069 321) haben die Herstellung verschiedener Seitenketten-fluorierter Vitamin D₃ Derivate und Seitenketten-fluorierter Dihydrotachysterin₃ Analoger beansprucht. Die von diesen Forschern empfohlene Methode zur Herstellung bezieht die Fluorierung eines Vorläufersteroids und die anschliessende Umwandlung des Fluorsteroids in die gewünschte Fluorvitamin D Verbindung ein.

Es wurde nunmehr jedoch gefunden, dass Seitenketten- und/oder Ring A-fluorierte Vitamin D Verbindungen oder -Analoge der vorstehenden allgemeinen Strukturen I und III viel zweckmässiger hergestellt werden können durch direkte Einführung von Fluor in intakte Hydroxyvitamin D Verbindungen und -Analoge der vorstehenden allgemeinen Strukturen II–V, mittels Fluorierungsreagentien, wie einem Dialkylaminoschwefel-trifluorid, z. B. Diäthylaminoschwefel-trifluorid. Mit derartigen Reagentien können ein oder mehrere Fluorsubstituenten in ein Vitamin D Molekül eingeführt werden durch direkten Ersatz der Hydroxyfunktion(en) in das Ausgangsmaterial.

Middleton (*J. Org. Chem.* 40, 574 [1975]) hat die Verwendung von Diäthylaminoschwefel-trifluorid zum Ersatz von Hydroxyfunktionen durch Fluor in organischen Verbindungen beschrieben, jedoch sind seine Anwendungen auf einfache und stabile Moleküle begrenzt, die keine Basis für die Beurteilung der Wirksamkeit des Reagens zur direkten Einführung von Fluor in Vitamin D Verbindungen ohne Änderung des empfindlichen Trien-Chromophors liefern. Gerade diese chemische Reaktionsfähigkeit des Vitamin D Chromophors hat andere Forscher auf diesem Gebiet dazu veranlasst, indirekte und aufwendige Wege einzugehen, wenn sie die Synthese von Fluorvitamin D Verbindungen versuchten. Beispielsweise verwenden Jones et al. (US-Patentschrift 4 069 321) bei der Empfehlung von Methoden zur Herstellung verschiedener Fluorvitamin D Analoge, Diäthylaminoschwefel-trifluorid nur zur Einführung von Fluor in Vorläufersteroiden, die anschliessend in die Fluorvitamin D Analoge umgewandelt werden. Es gibt bisher tatsächlich nur eine Anwendung von Diäthylaminoschwefel-Trifluorid zur direkten Synthese von 25-Fluorvitamin D₃ aus 25-Hydroxyvitamin D₃ (vgl. Onisko, Schnoes und DeLuca, *Tetrahedron Letters* [Nr. 13] 1107 [1977]).

Es wurde nunmehr gefunden, dass das vorstehende Diäthylaminoschwefel-trifluoridreagens nicht nur zur Einführung von Fluor an verschiedenen Stellen (z. B. Kohlenstoff-24,25,26) der Seitenkette eines Vitamin D Moleküls oder -Analoge verwendet werden kann, sondern auch zur Einführung von Fluor am Kohlenstoff-1 und so einen wirksamen und direkten Weg zu den gewünschten 1-Fluorprodukten, sowie C-1- und Seitenketten-fluorierten Produkten bereitstellt. Diese C-1-Fluorvitamin D und C-1-Fluor-5,6-*trans*-vitamin D Produkte sind neue Verbindungen.

Die direkte erfolgreiche Fluorierung am Kohlenstoff-1 des Vitamin D Moleküls ist besonders bemerkenswert und überraschend, da bisherige Informationen nahelegten, dass der Vitamintrienchromophor, der einer Umlagerung sehr zugänglich ist, eine unerwünschte und irreversible Veränderung aufgrund der Einführung von Fluor am Kohlenstoff-1 eingehen würde. Tatsächlich ist die scheinbar analoge Reaktion, nämlich die Einführung von Fluor am Kohlenstoff-3 durch Behandlung einer C-3-Hydroxyvitamin D₃ Verbindung oder eines -Analoge mit Diäthylaminoschwefel-trifluorid präzise nicht erfolgreich, wegen der Umlagerung des Chromophors. Ein Ersatz der Hydroxyfunktion an dieser Stellung durch Diäthylaminoschwefel-trifluorid führt zu einem unerwünschten Produkt, in dem der Chromophor verändert ist. Die einfache Herstellung von 1-Fluorvitamin D Verbindungen und -vitamin D Analoge ist daher ein neues und unerwartetes Ergebnis. Es wurde auch festgestellt, dass mehr als ein Fluor gleichzeitig eingeführt werden kann, einfach durch Unterziehen von mehrfach hydroxylierten (z. B. Di-, Trihydroxy-)vitamin D Ausgangsmaterialien einer Fluorierung. Da das Fluorierungsverfahren den Ersatz der freien Hydroxyfunktion(en) mit sich bringt, ist es wesentlich, dass jegliche derartige Funktionen in den Ausgangsmaterialien, die nicht durch Fluor ersetzt werden sollen, zweckmässig geschützt werden, z. B. durch Acylieren, wie Acetylieren oder Benzoylieren. Insbesondere muss eine C-3-Hydroxyfunktion, falls sie in dem Ausgangsmaterial vorhanden ist, durch Acylieren geschützt werden, da, wie bereits vorstehend erwähnt, die Behandlung von C-3-Hydroxyvitamin D Verbindungen oder -Analoge mit Diäthylaminoschwefel-trifluorid zu einer unerwünschten Chromophorumlagerung führt. Der Schutz der Hydroxygruppen ist bequem durch bekannte Verfahren zu erzielen, und nach der Fluorierung können die Acylgruppen selbstverständlich gegebenenfalls bequem entfernt werden, durch Hydrolyse unter basischen Bedingungen.

Der Rahmen und die Durchführbarkeit des direkten Fluorierungsverfahrens, durch das Fluorvitamin D Verbindungen der vorstehenden allgemeinen Struktur I und Fluor-5,6-*trans*-vitamin D Verbindungen der vorstehenden allgemeinen Struktur II hergestellt werden können aus Ausgangsmaterialien der allgemeinen Strukturen III, IV und V wird durch die folgenden typischen Umwandlungen insbesondere veranschaulicht.

1. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ 3-O-Acyl $\longrightarrow$ 1,25-Difluorvitamin D₃ 3-O-Acyl
2. 1 α ,25-Hydroxyvitamin D₃ 3-O-Acyl $\longrightarrow$ 1-Fluorvitamin D₃ 3-O-Acyl
3. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ 3,25-Di-O-acyl $\longrightarrow$ 1-Fluor-25-hydroxyvitamin D₃ 3,25-Di-O-acyl
4. 1,24,25-Trihydroxyvitamin D₃ 3,24,25-Tri-O-acyl $\longrightarrow$ 1-Fluor-24,25-dihydroxyvitamin D₃ 3,24,25-Tri-O-acyl
5. 3-Deoxy-1 α -hydroxyvitamin D₃ $\longrightarrow$ 3-Deoxy-1-fluorvitamin D₃
6. 3-Deoxy-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ $\longrightarrow$ 3-Deoxy-1,25-difluorvitamin D₃
7. 1,25-Dihydroxyvitamin D₂ 3-O-Acyl $\longrightarrow$ 1,25-Difluorvitamin D₂ 3-O-Acyl
8. 1 α ,25-Dihydroxy-5,6-*trans*-vitamin D₃ 3-O-Acyl $\longrightarrow$ 1,25-Difluor-5,6-*trans*-vitamin D₃ 3-O-Acyl
9. 1,25-Dihydroxy-5,6-*trans*-vitamin D₂ 3,25-Di-O-acyl $\longrightarrow$ 1-Fluor-25-hydroxy-5,6-*trans*-vitamin D₂ 3,25-Di-O-acyl
10. 1 α ,25-Dihydroxy-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₃
 - Stufe 1
Fluorieren $\longrightarrow$ 1,25-Difluor-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₃
 - Stufe 2
Solvolyse $\longrightarrow$ 1,25-Difluorvitamin D₃ +
1,25-Difluor-5,6-*trans*-vitamin D₃
11. 1 α -Hydroxy-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₂

Stufe 1 Fluorieren	1-Fluor-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D ₂
Stufe 2 Solvolyse	1-Fluorvitamin D ₂ + 1-Fluor-5,6-trans-vitamin D ₂

Es sei erwähnt, dass die vorstehenden Reaktionen lediglich zur Veranschaulichung dienen. Die Beispiele werden vorgelegt, um zu zeigen, dass durch das Verfahren eine zweckmässige Einführung von Fluor in den Ring A und, falls gewünscht, die Seitenkette des Steroidmoleküls bereitgestellt wird und insbesondere dass Vitamin D Verbindungen und -Analoge mit Fluorsubstituenten an jedem beliebigen oder mehreren Kohlenstoffen 1,24,25 oder 26 leicht aus den entsprechend hydroxylierten Ausgangsmaterialien hergestellt werden können.

Wie durch die vorstehenden veranschaulichenden Reaktionen aufgezeigt, führt die Fluorierung von Ausgangsmaterialien des Typs III oder IV direkt zu den entsprechenden 1-Fluor-Produkten, jedoch in Abhängigkeit von dem verwendeten Ausgangsmaterial und dem spezifischen gewünschten Produkt können ein vorhergehender Hydroxyl-Schutzschritt (z. B. durch Acylierung) und ein abschliessender Abspaltungsschritt für die Schutzgruppe erforderlich sein. Bei den Cyclovitamin D Ausgangsmaterialien der allgemeinen Struktur V ist das Gesamtverfahren und insbesondere die Fluorierungsstufe die gleiche, mit der Ausnahme, dass anschliessend an die Einführung von Fluor eine Solvolysestufe angewendet wird, um sowohl die *cis*- als auch die *trans*-Formen der Fluorvitaminprodukte zu regenerieren. Die Solvolysestufe stellt jedoch in formaler Hinsicht eine alternative Schutzgruppenabspaltungsstufe dar, in der der «geschützte» (d. h.) zeitweise abwesende) C-3-Substituent sowohl wie der *cis*- als auch der *trans*-Trienchromophor regeneriert werden.

Ein bevorzugtes Reagens zur Fluorierung ist das Diäthylaminoschwefel-trifluorid (Middleton, J. Org. Chem. 40, 574 [1975]). Die Reaktion wird zweckmässig in einem Halogenkohlenstoff-Lösungsmittel, wie Methylenchlorid, Tetrachlorkohlenstoff oder Trichlorfluormethan, bei niedriger Temperatur, z. B. -78°C, durchgeführt. Zum Ersatz der Hydroxygruppen durch Fluor sind kurze Reaktionszeiten, z. B. 15–45 Minuten geeignet. Zwar greift das Reagens auch Ketogruppen in dem Molekül an, jedoch tut es dies mit einer wesentlich geringeren Geschwindigkeit, und daher ist der Schutz jeglicher vorhandener Ketofunktion normalerweise unter Bedingungen, bei denen der Ersatz der Hydroxygruppen gewünscht wird, nicht erforderlich.

Wie vorstehend erwähnt, und durch die vorstehenden Reaktionen veranschaulicht, müssen jegliche Hydroxygruppen in dem Ausgangsmaterial, die in diesem Verfahren nicht durch Fluor ersetzt werden sollen, geschützt werden, z. B. acyliert (acetyliert, benzoyliert). Insbesondere muss eine Hydroxyfunktion am Kohlenstoff 3 (die gewöhnlich in Vitamin D Verbindungen oder -Analogen vorhanden ist) durch Acylieren geschützt werden, da, wie vorstehend erwähnt, die Fluorierung in Anwesenheit einer C-3-Hydroxygruppe zu unerwünschten Produkten führen kann. Die Acylierung von Hydroxygruppen ist selbstverständlich eine wohlbekannte Verfahrensweise und wird normalerweise erzielt durch Behandlung der Hydroxyverbindung mit einem Acylierungsmittel (z. B. Essigsäureanhydrid, Benzoylchlorid) in einem geeigneten Lösungsmittel (z. B. Pyridin). Primäre und sekundäre Hydroxygruppen in Vitamin D Verbindungen oder ihren Analogon werden leicht unter Verwendung derartiger Reagentien und Lösungsmittel bei Raumtemperatur (oder leicht erhöhter Temperatur, z. B. 50°C) während eines Zeitraums von 2–6 h, acyliert. Die Acylierung von tertiären Hydroxylgruppen erfordert selbstverständlich heftigere Bedingungen, z. B. erhöhte Temperaturen, (z. B. 75–100°C) und geeignete Reaktionszeiten, z. B. 4–24 h. Vorzugsweise führt man die Reaktion unter einer Stickstoffatmosphäre durch, um eine Zersetzung des Materials zu vermeiden. Die selektive Acylierung von spezifischen chemisch unterschiedlichen Hydroxylgruppen kann daher leicht

erzielt werden. Ist eine selektive Acylierung von chemisch ähnlichen Hydroxylgruppen erforderlich, so kann eine chromatographische Trennung der Produkte notwendig sein. So kann 1 α -Hydroxyvitamin D₃ 3-Acetat hergestellt werden durch Durchführen einer Acetylierung bei Raumtemperatur und Unterbrechen der Reaktion, bevor eine vollständige Acetylierung eingetreten ist. Unter derartigen Umständen erhält man ein Gemisch von vier Verbindungen: 1 α -Hydroxyvitamin D₃, 1 α -Hydroxyvitamin D₃ 1-Acetat, 1 α -Hydroxyvitamin D₃ 3-Acetat und 1 α -Hydroxyvitamin D₃ 1,3-Diacetat, aus dem das gewünschte Produkt, z. B. 1 α -Hydroxyvitamin D₃ 3-Acetat (vgl. Reaktion [2]) durch Chromatographie erhalten wird. Andere teilweise acylierte Produkte, die als Ausgangsmaterialien für die anschliessende Fluorierung benötigt werden (z. B. wie in den Reaktionen 1, 7, 8) erhält man in analoger Weise. Alternativ können teilweise acylierte Verbindungen dadurch erhalten werden, dass man zuerst alle Hydroxygruppen acyliert und anschliessend eine oder mehrere der Acylfunktionen durch Hydrolyse entfernt. So kann die 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 3,25-Di-O-acylverbindung (Reaktion 3) erhalten werden durch partielle Hydrolyse des 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 1,3,25-Tri-O-acylderivats unter basischen Bedingungen. Diese Beispiele wurden angeführt, um zu zeigen, dass viele verschiedene Methoden bekannt und verfügbar sind, um O-geschützte Vitamin D Verbindungen herzustellen, die für die anschliessende Fluorierungsreaktion erforderlich sein können.

Wurde Fluor einmal in das Molekül eingeführt, können alle gegebenenfalls vorhandenen Acylgruppen durch basische Hydrolyse entfernt werden, z. B. durch Behandeln des acylierten Fluoranalogen mit 5 % KOH in MeOH bei einer Temperatur von 25 bis 80°C während 1–4 h. Die resultierenden entacylierten, fluorierten Produkte werden anschliessend zweckmässig weiter durch Chromatographie gereinigt. Die Anwendung von Cyclovitamin D Verbindungen der Struktur V führt selbstverständlich zu Ausgangsmaterialien mit einem inhärenten Schutz der C-3-Stellung und der Trienchromophore und für die Zwecke dieses Fluorierungsverfahrens kann die 3,5-Cyclopropano-«Schutzgruppe» als arbeitsmässig äquivalent zum 3-O-Acylschutz im Falle der *cis*- und *trans*-Vitamin-Ausgangsmaterialien III und IV angesehen werden, mit der Ausnahme, dass selbstverständlich eine evtl. «Abspaltung der Schutzgruppen» von diesen Cyclopropano-Zwischenprodukten eine sauer-katalysierte Solvolyse erfordert. Falls ein Cyclovitamin-Ausgangsmaterial Hydroxyfunktionen trägt, die nicht fluoriert werden sollten (z. B. in der Seitenkette), so können diese Hydroxyfunktionen nach Methoden, die völlig analog zu den vorstehend diskutierten sind, durch Acylieren geschützt werden.

Die Fluorierung von Cyclovitamin D Verbindungen der Struktur V stellt eine allgemeine und zweckmässige Methode zur Herstellung von sowohl Fluorvitamin D Verbindungen, als auch von Fluor-5,6-trans-vitamin D Verbindungen dar, die dargestellt werden durch die vorstehenden allgemeinen Strukturen I bzw. II, worin R₁ ausgewählt ist aus der Gruppe von Hydroxyl, O-Acyl oder O-niedrig-Alkyl und worin R, R₂, R₃, R₄, R₅ und R₆ Substituenten, wie vorstehend definiert, darstellen.

Diese erforderlichen Cyclovitamin D Ausgangsmaterialien werden zweckmässig hergestellt aus C-3-Hydroxyvitamin D Verbindungen nach den von Sheves und Mazur (J. Am. Chem. Soc. 97, 6249 [1975]) und Paaren et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 2080 [1978]) publizierten Methoden. Unter Verwendung des erfindungsgemässen Verfahrens werden diese Verbindungen leicht am Kohlenstoff 1 und/oder an jeglichen Seitenkettenstellen fluoriert. Nach der Einführung des Fluors können die Fluorcyclovitamininderivate einer sauer-katalysierten Solvolyse unterzogen werden, wie von Sheves und Mazur und Paaren et al. in den vorstehend genannten Literaturstellen beschrieben, unter Bildung sowohl der Fluorvitamin D Verbindungen als auch der 5,6-trans-Fluorvitamin D Verbindungen.

Diese C-1-fluorierten *cis*- und *trans*-Reaktionsprodukte können zweckmässig durch Chromatographie zu diesem Zeitpunkt getrennt werden (wie von Paaren et al. in der vorstehenden Literaturstelle beschrieben) und anschliessend getrennt der Hydrolyse unterzogen werden (falls Acylschutzgruppen entfernt werden müssen), unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Standardbedingungen, z. B. 0,1 m KOH in Methanol, 60°C, 1–4 h. Es sei festgestellt, dass im Prinzip die Entfernung der Acylgruppen, unter Verwendung der genannten Bedingungen, in jeder Stufe nach der Einführung des Fluors durchgeführt werden kann. So könnten Acylgruppen auch vor der Solvolyse oder vor der Trennung der *cis*- und *trans*-Solvolysenprodukte entfernt werden. Die Wahl zwischen diesen Möglichkeiten würde von praktischen Zweckmässigkeitsgründen und/oder dem evtl. gewünschten Produkt abhängen. Im allgemeinen stellt der bevorzugte Verfahrensweg die Entacylierung als Endstufe dar.

Je nach den genauen Solvolysenbedingungen werden 5,6-*cis*- und *trans*-Produkte mit verschiedenen C-3-Substituenten erhalten. So führt die Durchführung der Solvolyse in einem Medium, das aus wässrigem Dioxan und einer katalytischen Menge von *p*-Toluolsulfonsäure besteht, zu fluorierten 5,6-*cis*- und *trans*-produkten, die einen C-3-Hydroxysubstituenten tragen. Die Solvolyse von Fluorocyclovitamin D Zwischenprodukten in angesäuerten alkoholischen Lösungsmitteln (z. B. Methanol, Äthanol, Isopropanol) führt zu 3-O-Alkyl-5,6-*cis*- und *trans*-Produkten, worin die Alkylgruppe dem Alkylteil des verwendeten alkoholischen Lösungsmittels entspricht. Die Solvolyse von Fluorocyclovitamin D Verbindungen in warmer Essigsäure (z. B. 50 bis 60°C) führt zu 5,6-*cis*- und *trans*-Fluorvitamin D Verbindungen, die einen C-3-Acetoxy substituenten tragen, und, falls die Solvolyse von Fluorocyclovitaminen in Dioxan/Ameisensäure-Lösungsmitteln durchgeführt wird, so erhält man die entsprechenden 3-O-Formyl-5,6-*cis*- und *trans*-Produkte. Falls gewünscht, können diese C-3-O-acylierten Produkte leicht in die entsprechenden C-3-Hydroxyverbindungen durch milde Basen-Hydrolyse umgewandelt werden.

Die Herstellung von sowohl 5,6-*cis*-, als auch von 5,6-*trans*-1-Fluorvitamin D Verbindungen aus 3,5-Cyclovitamin D Ausgangsmaterialien (die durch Chromatographie leicht trennbar sind) stellt ein bevorzugtes Merkmal dieses Fluorierungsverfahrens dar, und die C-1-fluorierten 3,5-Cyclovitamin D Derivate sind neue und sehr gut brauchbare Zwischenprodukte.

Beispiel 1

1 α -Hydroxyvitamin D₃ 3-Acetat

1 α -Hydroxyvitamin D₃ (25 mg, 0,063 mMol) und Essigsäureanhydrid (50 μ l) in Pyridin-Benzol (2 ml, 1:1) werden unter Argon 4 h auf 50°C erwärmt. Das Reaktionsgemisch wird gekühlt, Wasser und Äther werden zugesetzt, und die Phasen werden getrennt. Die ätherische Schicht wird mit Wasser, 1 n-HCl (2mal), verdünntem NaHCO₃, gesättigtem NaCl gewaschen und getrocknet (Na₂SO₄). Das Lösungsmittel wird verdampft, und der Rückstand wird an einer Siliciumdioxidgelplatte chromatographiert (20×20 cm, 0,75 cm dick), entwickelt mit Äthylacetat/Skellysolve B (1:1). Es sind vier Banden vom R_f 0,20, 0,38, 0,49 und 0,64 ersichtlich. Die Bande vom R_f 0,49 besteht aus dem Produkt 1 α -Hydroxyvitamin D₃ 3-Acetat, 6,0 mg (22 %).

Die Banden vom R_f 0,64, 0,38 und 0,20 bestehen aus 1 α -Hydroxyvitamin D₃ 1,3-Diacetat, 1 α -Hydroxyvitamin D₃ 1-Acetat und Ausgangsmaterial (7,3 mg, 29 %). Das unerwünschte 1-Acetat und das Diacetat werden vereint (6,8 mg, 23 bis 25 %), hydrolysiert (1 ml, 0,1 m-KOH/MeOH; 1 ml Äther, 1,25 h, Raumtemperatur) und mit dem Ausgangsmaterial vereint, unter Bildung von 14 mg 1 α -Hydroxyvitamin D₃. Dieses Verfahren wird zwei weitere Male wiederholt, unter Bildung von insgesamt 12 mg (43 %) 1 α -Hydroxyvitamin D₃ 3-Acetat:

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's), 5,34 (3 α -H), 6,02, 6,34 (AB Quartett, J = 11,4 Hz, 5 6 und 7 H's).

Beispiel 2

1-Fluorvitamin D₃

Zu 2 mg 1 α -Hydroxyvitamin D₃ 3 β -Acetat in CH₂Cl₂ (0,4 ml) fügt man bei -78°C Diäthylaminoschwefel-trifluorid (12 μ l) unter gutem Rühren. Das Kühlbad wird entfernt, und 5 Minuten später wird die Reaktion mit 5 % K₂CO₃ abgeschreckt. Äther wird zugesetzt, und die Phasen werden getrennt. Die organische Phase wird mit Wasser und Salzlösung gewaschen und auf 0,5 ml konzentriert. Zu der organischen Phase fügt man 0,1 m-KOH/MeOH (1 ml). Nach 1,5 h bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel entfernt, Äther und Wasser werden zugesetzt, die Phasen werden getrennt. Die ätherische Phase wird mit Wasser und Salzlösung gewaschen und durch Na₂SO₄ filtriert. Der nach dem Verdampfen des Äthers erhaltene Rückstand wird über einer mikroteilchenförmigen Siliciumdioxidgelsäule chromatographiert (5- μ -Teilchen, 0,7×25 cm), eluiert mit 0,5 % Isopropanol/Hexan. Das gewünschte Produkt eluiert in 78 ml (0,85 mg):

UV $\lambda_{\max}$ 265, $\lambda_{\min}$ 226 nm, $\lambda_{\max}/\lambda_{\min}$ 2,1; NMR (Benzol-d₆) δ 0,63 (s, C-18 Methyl), 0,98 (d, J = 6,1 Hz, C-26,27 Methyl), 1,01 (d, J = 6,5 Hz, C-21 Methyl), 3,52 (m, w_{1/2} 24 Hz, 3 α -Protonen), 4,71 (Dublett von Multipletts, J = 50 Hz, w_{1/2} 20 Hz), 5,23, 5,55 (zwei s, 19-Protonen), 6,38, 6,52 (ABq, J = 11 Hz, 6- und 7-Protonen); Massenspektrum m/e (relative Intensität) 402,3320 (M⁺ 0,10, berechnet für 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⁺-Seitenkette 0,05), 269 (M⁺-Seitenkette-HF, 0,08), 251 (M⁺-Seitenkette-HF-H₂O, 0,10), 135 (1,00).

Beispiel 3

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ 3-Acetat

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (25 mg) und Essigsäureanhydrid (50 μ l) in Pyridin-Benzol (12 ml, 1:1) werden unter Argon 4 h auf 50°C erwärmt. Die übliche Aufarbeitung ergibt ein Gemisch von teilweise acetylierten Produkten (einschliesslich des 1-Acetats, des 3-Acetats und des 1,3-Diacetats), aus dem das gewünschte 3-Acetatprodukt abgetrennt wird durch Dünnschichtchromatographie an Siliciumdioxidgel, entwickelt mit 40 % Äthylacetat in Skellysolve B. Durch Recyclisieren des nicht-umgesetzten Ausgangsmaterials und Hydrolyse des ungewünschten 1,3-Diacetats und 1-Acetats wird die Gesamtausbeute verbessert.

Beispiel 4

1,25-Difluorvitamin D₃

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ 3-Acetat (3 mg) in CH₂Cl₂ werden bei -78°C mit Diäthylaminoschwefel-trifluorid (20 μ l) behandelt. Die Lösung lässt man auf Raumtemperatur erwärmen und schreckt sie mit 5 % K₂CO₃ ab. Die Aufarbeitung der Reaktion erfolgt, wie im Beispiel 2 beschrieben. Durch Chromatographie des gewonnenen Materials an einer Siliciumdioxidgelplatte, entwickelt mit 25 % Äthylacetat in Skellysolve B, erhält man gereinigtes 1,25-Difluorvitamin D₃ 3-Acetat. Die Hydrolyse (1 ml 0,1 m-KOH/MeOH, 1 ml Äther, Raumtemperatur 2 h) und erneute Chromatographie an Siliciumdioxidgel (Äthylacetat/Skellysolve B) ergibt 1,25-Difluorvitamin D₃.

Beispiel 5

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 25-Acetat

Eine Lösung von 10 mg 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wird 16 h unter Argon mit 0,5 ml Essigsäureanhydrid und 2 ml Pyridin auf 90°C erwärmt. Die übliche Aufarbeitung ergibt ein Gemisch, aus

dem 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 1,3,25-Triacetat (9,5 mg) durch Chromatographie an einer präparativen Schicht von Siliciumdioxidgel, entwickelt mit 25 % Äthylacetat/Skellysolve B oder durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie mit einer Siliciumdioxidgele Säule, eluiert mit Gemischen von 0,5 % 2-Propanol in Hexan, abgetrennt wird. Die selektive Hydrolyse (0,1 m-KOH/MeOH, Äther, 1,5 h, 25°C) der 1- und 3-Acetate ergibt 7 mg 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 25-Acetat, das gereinigt wird durch Chromatographie an Siliciumdioxidgel-Dünnschichtplatten, unter Verwendung von 50 % Äthylacetat in Skellysolve B als Lösungsmittel.

Beispiel 6

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 3,25-Diacetat

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 25-Acetat (7 mg) werden unter Verwendung der in Beispiel 1 beschriebenen Bedingungen acetyliert. Aus dem Produktgemisch wird 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 3,25-Diacetat (4 mg) durch Siliciumdioxidgel-Dünnschichtchromatographie isoliert, unter Verwendung von Äthylacetat-Skellysolve B (1:1) als Lösungsmittelsystem.

Beispiel 7

1-Fluor-25-hydroxyvitamin D₃

1,25-Dihydroxyvitamin D₃ 3,25-Diacetat (2 mg) werden in CH₂Cl₂ unter Argon bei -78°C mit Diäthylaminoschwefeltrifluorid (4 mg) behandelt. Das Reaktionsgemisch kann sich auf Raumtemperatur erwärmen und wird mit 5 % K₂CO₃ abgeschreckt. Durch Chromatographie des gewonnenen Materials an Siliciumdioxidgel unter Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, eluiert mit 1 % 2-Propanol in Hexan erhält man 0,7 g 1-Fluor-25-hydroxyvitamin D₃ 3,25-Diacetat. Die Hydrolyse (0,1 m-KOH/MeOH, Äther) und erneute Chromatographie an Siliciumdioxidgel, durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, entwickelt mit 5 % 2-Propanol/Hexan, führt zu 1-Fluor-25-hydroxyvitamin D₃ in reiner Form.

Beispiel 8

1-Fluor-25-hydroxy-5,6-trans-vitamin D₃

Eine Lösung von 2 mg 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ 3,25-Diacetat in 2 ml Äther, der einen Tropfen Pyridin enthält, wird mit 0,1 ml einer Lösung von Jod in Skellysolve B (0,5 mg/ml) behandelt und 15 Minuten gerührt. Nach Zusatz von 1 ml einer wässrigen Lösung von Natriumthiosulfat wird die organische Phase abgetrennt, und das Lösungsmittel wird verdampft. Das gewünschte Produkt, 1α,25-Dihydroxy-5,6-trans-vitamin D₃ 3,25-Diacetat wird durch Dünnschichtchromatographie an Siliciumdioxidgel unter Verwendung von 20 % Äthylacetat in Skellysolve B als Lösungsmittelsystem isoliert (Ausbeute 0,8 mg). Dieses Material wird direkt fluoriert unter Verwendung der in Beispiel 2 angegebenen Bedingungen (CH₂Cl₂-Lösung, 10 µl Diäthylaminoschwefeltrifluorid, -78°C), und nach dem Aufarbeiten, wie im Beispiel 2 beschrieben, wird das gewonnene Produkt hydrolysiert (0,1 m-KOH/MeOH/Äther, 60°C, 3 h). Durch Reinigen des Hydrolyseprodukts durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie an Siliciumdioxidgele Säulen, unter Verwendung von 3 % 2-Propanol in Skellysolve B als Lösungsmittel, erhält man 200 µg 1-Fluor-25-hydroxy-5,6-trans-vitamin D₃.

Beispiel 9

1,25-Difluor-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₃

Eine Lösung von 1 mg 1,25-Dihydroxy-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₃ (hergestellt nach der Methode von Paaren et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 2080 [1978]) in CH₂Cl₂ wird bei -78°C unter Argon mit Diäthylaminoschwefeltrifluorid (2 mg) behandelt. Nach 10 Minuten kann sich das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmen und wird mit 5 % K₂CO₃ abge-

schreckt. Nach dem üblichen Aufarbeiten (vgl. z. B. Beispiel 2) wird 1,25-Difluor-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₃ (250 µg) in reiner Form isoliert durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie, unter Verwendung einer Siliciumdioxidgele Säule, eluiert mit 10 % Tetrahydrofuran/Hexan. Alternativ kann das Produkt gereinigt werden durch Dünnschichtchromatographie an Siliciumdioxidgel, unter Verwendung von 20 % Äthylacetat in Skellysolve B als Entwicklungsmittel.

Beispiel 10

1-Fluor-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₂

Eine Methylenchloridlösung von 10 mg 1α-Hydroxy-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₂ (hergestellt wie von Paaren et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 75, 2080 [1978] beschrieben) wird auf -78°C gekühlt und mit 20 mg Diäthylaminoschwefeltrifluorid behandelt. Nach 15 Minuten wird die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt, wässriges NaHCO₃ (5 ml) und CH₂Cl₂ (10 ml) werden zugesetzt. Die organische Phase wird abgetrennt, das Lösungsmittel wird verdampft, und das Produkt wird gereinigt durch präparative Dünnschichtchromatographie (Siliciumdioxidgelplatten), 10 % Äthylacetat in Skellysolve B als Entwicklungsmittel, unter Bildung von 1-Fluor-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₂.

Beispiel 11

1-Fluorvitamin D₂ und 1-Fluor-5,6-trans-vitamin D₂

Eine Lösung von 3 mg 1-Fluor-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₂ (vgl. Beispiel 10) in trockenem Dioxan (2 ml) wird auf 55°C erwärmt und mit einem 1:1-Gemisch von 98 % Ameisensäure: Dioxan (150 µl) behandelt. Nach 15 Minuten wird Eis-Wasser zugesetzt, und die Produkte werden mit Äther extrahiert. Das Lösungsmittel wird verdampft, und das Produktgemisch (bestehend aus 1-Fluorvitamin D₂ 3-Formiat und 1-Fluor-5,6-trans-vitamin D₂ 3-Formiat) wird direkt durch Auflösen in Dioxan: Methanol (1:1) und Behandeln mit wässriger K₂CO₃-Lösung (10 mg/0,1 ml) hydrolysiert. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur ist die Hydrolyse vollständig, und die Lösung wird mit Wasser verdünnt, und die Produkte werden in Äther extrahiert. Durch Chromatographie an Siliciumdioxidgelplatten (750 µdick) unter Verwendung von 1:3 Äthylacetat:Skellysolve B als Eluierungsmittel, trennen sich die 5,6-cis- und 5,6-trans-Produkte, und man erhält reines 1-Fluorvitamin D₂ (1 mg) und 1-Fluor-5,6-trans-vitamin D₂ (0,3 mg).

Gewerbliche Verwertbarkeit

Die, wie vorstehend beschrieben, hergestellten neuen Fluorvitamin D Verbindungen zeigen eine beträchtliche Vitamin D-artige biologische Wirksamkeit bei Untersuchung an Tieren mit Vitamin D Mangel. Die Vitamin D-artigen Wirksamkeiten, die diese Fluorvitamin D Verbindungen zeigen, schliessen die Stimulierung des intestinalen Calciumtransports, die Stimulierung der Calcium-Mobilisierung aus Knochen und die Calcifizierung von Knochen ein. Zur Demonstration dieser Wirksamkeiten stellt ein günstiges Testtier die männliche Säuglingsratte dar, die auf einer Vitamin D Mangel niedrigen Calciumdiät gehalten wird oder auf einer Vitamin D Mangel niedrigen Phosphordiät, wie von Suda et al. J. Nutr. 100, 1049 (1970) beschrieben. Mit Tieren, die bei einer geringen Calciumdiät gehalten werden, kann die intestinale Calciumabsorption untersucht werden nach der Technik des umgekehrten Darmsacks von Martin und DeLuca (Am. J. Physiol. 216, 1351 [1969]) und die Knochencalcium-Mobilisation kann bestimmt werden durch die Anhebung des Serumcalciums, wie beispielsweise von Blunt et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 1503 (1968) beschrieben; der Grad der endochondralen Calcifizierung kann bewertet werden nach der «Leitungstest»-Methode, beschrieben in U.S. Pharmacopeia (15th revision, Seite 889, Mack. Publ. Easton, PA [1955]), unter Verwendung von Tieren, die unter einer Diät mit geringem Phosphor gehalten

wurden. Unter Verwendung solcher Methoden wird die biologische Wirksamkeit der 1-Fluor-5,6-trans-Vitamin-D-Produkte der Erfindung gut veranschaulicht. So bewirkt 1-Fluor-vitamin D₃, intraperitoneal an Ratten verabreicht, die bei einer Vitamin D-Mangel phosphorarmen Diät gehalten wurden, eine beträchtliche Calcifizierung des Knochens, wie in Tabelle I veranschaulicht:

Tabelle I

Antirachitische Eigenschaften von 1-Fluorvitamin D₃^a

Tägl. Dosen (ng) ^b	Serum-Phosphor (mg/100 ml)	Line-Test-Bewertung
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

^a Daten ausgedrückt als mittlere ± SEM von 3 bis 5 Ratten

^b Testverb. intraperitoneal verabreicht in 1,2-Propandiol-lösungsmittel, während 7 Tagen

In gleicher Weise ergibt die Gabe von 1-Fluorvitamin D₃ an Vitamin-D-Mangel-Tiere, die bei einer Diät mit wenig Calcium gehalten werden, beträchtliche Erhöhungen des Serum-Calciumspiegels und stimuliert den intestinalen Calciumtransport, wie durch die typischen Dosis-Reaktions-Daten der Tabelle II veranschaulicht.

Tabelle II

Dosis-Reaktions-Daten für 1-Fluorvitamin D₃^a
Knochen-Calcium-Mobilisation

10

Dosis (ng) ^b	Serumcalcium (mg/100 ml)	intestinaler Calciumtransport
Äthanol (Kontrollversuch)	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
1-Fluorvitamin D ₃ (700)	5,5 ± 0,2	2,7 ± 0,2
1-Fluorvitamin D ₃ (1260)	5,8 ± 0,1	3,8 ± 0,4
1-Fluorvitamin D ₃ (2450)	6,2 ± 0,3	2,8 ± 0,2

20

^a Daten als mittlere ± SEM von 3 bis 5 Ratten angegeben

^b Die Verbindungen wurden durch intrajuguläre Injektionen in 50 µl Äthanol-lösungsmittel verabreicht.