

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 158786 B



(21) Patentansøgning nr.: 0094/74

(51) Int.Cl.⁵ C 07 C 401/00

(22) Indleveringsdag: 09 jan 1974

(41) Alm. tilgængelig: 11 jul 1974

(44) Fremlagt: 16 jul 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 10 jan 1973 US 322462 21 maj 1973 US 362339

(71) Ansøger: *RESEARCH INSTITUTE FOR MEDICINE AND CHEMISTRY INC.; Cambridge; Massachusetts 02142, US

(72) Opfinder: Derek Harold Richard *Barton; GB, Ezio *Rizzardo; AU, Robert Henry *Hesse; US

(74) Fuldmægtig: Kontor for Industriel Eneret

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af 1alfa-hydroxyvitamin D3 eller diacetatet deraf

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer. Chemical Abstracts, bind 74, (1971), nr. 135914. Tetrabedron Letters, (1972), s. 4147-4150. Fieser og Fieser: "Steroids", Reinhold Publishing Corporation, New York, (1967), s. 146-150. Kirk-Othmer: "Encyclopedia of Chemical Technology", The Interscience Encyclopedia, Inc., New York, bind 14, (1955) s. 838-839.

DK 158786 B

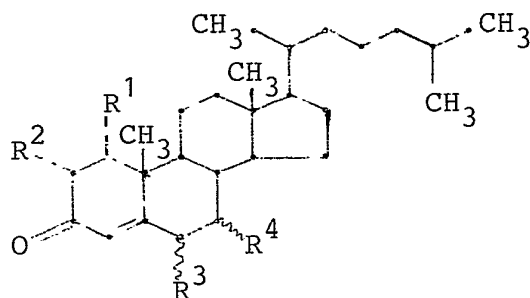
Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af den hidtil ukendte forbindelse 1α -hydroxyvitamin D_3 , der har den i krav 1's indledning viste almene formel I, eller diacetatet deraf. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

1α -Hydroxyvitamin D-derivater som tillige indeholder en 25-hydroxygruppe vides at have fordelagtige biokemiske egenskaber der giver dem en betydelig værdi i terapien. De er således både hurtigere virkende og elimineres hurtigere fra systemet end de tilsvarende 1α -usubstituerede forbindelser, og som resultat heraf er deres sandsynlighed for at inducere vitaminforgiftning mindre end de konventionelle vitamin D-forbindelser, der kun langsomt elimineres fra systemet. Desuden er de hydroxylerede derivater effektive med hensyn til at lindre symptomer på åbenbar vitamin D-mangel, der ikke reagerer på behandling med de konventionelle vitaminer.

De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendte udgangsmaterialer med formlen II kan fremstilles ved, at 1α -hydroxy- og $1\alpha,2\alpha$ -epoxysteroid-4,6-dien-3-oner og tilsvarende 6-substituerede steroid-4-en-3-oner, hvor 6-substituenten er et reduktivt eliminerbart atom eller gruppe, reduceres direkte til den tilsvarende $1\alpha,3\beta$ -dihydroxysteroid-5-en ved omsætning med et alkalimetal/flydende ammoniak- eller alkalimetal/flydende amin-reduktionsmiddel i nærværelse af en protonkilde. Under disse betingelser undergår de i høj grad oxyderede udgangsmaterialer sekvensreduktion til det ønskede produkt praktisk talt uden nogen isomerisation af dobbeltbindinger eller eliminering af substituenten i β -stilling i forhold til karbonylgruppen i 3-stillingen. Man kan herved nå frem til en forbindelse med formel IV.

Egnede keton-udgangsmaterialer til fremstilling af et sådant 1α -hydroxysteroid-udgangsmateriale kan gengives ved den almene formel

2

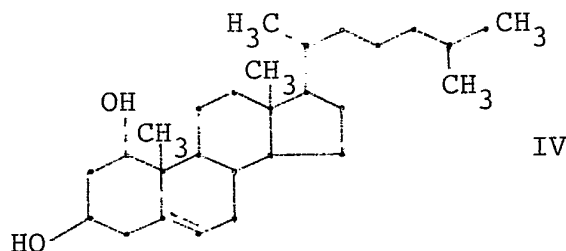


III

5

hvor R^1 er en hydroxylgruppe og R^2 et hydrogenatom, eller
 hvor R^1 og R^2 tilsammen danner en epoxydgruppe —O— ,
 10 hvor R^3 er et reduktivt eliminerbart atom eller en reduk-
 tivt eliminerbar gruppe og R^4 er et hydrogenatom, eller
 hvor R^3 og R^4 tilsammen danner en kulstof-kulstof-dobbelt-
 binding.

Reduktion af en forbindelse med den almene formel
 15 III fører til dannelse af en $1\alpha,3\beta$ -diol der gengives med
 formelen



IV

20

Reduktivt eliminerbare substituentter som kan være
 til stede i 6-stillingen i udgangsmaterialet, dvs. som
 25 gruppen R^3 i formel III, er fx halogenatomer såsom fluor-,
 klor-, eller bromatomer, samt kulbrintesulfonatgrupper som
 fx aromatiske kulbrintesulfonatgrupper såsom p-tosylat el-
 ler alifatiske kulbrintesulfonatgrupper såsom mesylatgruppen.

Alkalimetaller i reduktionsmidlet kan fx være li-
 30 tium, natrium og kalium, idet litium er det fore-
 trukne metal. Anvendelige flydende aminer er bl.a. primæ-
 re, sekundære og tertiære alkylaminer, dialkylaminer, dia-
 miner og mættede heterocykliske aminer.

Protonkilder i reaktionen er bl.a. ammonium- og
 35 aminsalte, nitrater, sulfater og lavtkogende alkanoler.

Reduktionen udføres hensigtsmæssigt i et inaktivt
 organisk opløsningsmiddel, fx tetrahydrofuran, dioxan el-

ler hexan. Det kan være fordelagtigt at udelukke fugtighed og/eller oxygen fra reaktionssystemet. Når der bruges et opløsningsmiddel, udføres reduktionen hensigtsmæssigt ved en temperatur mellem opløsningsmidlets frysepunkt og 100°C, fordelagtigt i kulden.

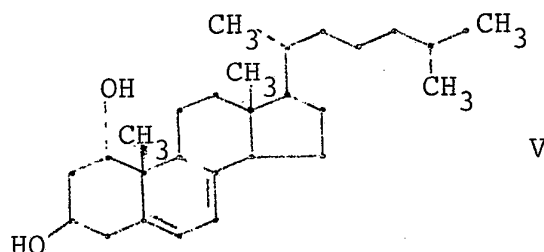
Det foretrækkes i almindelighed at beskytte 1 α -hydroxygruppen i steroid-udgangsmaterialet, fx med en fraspaltelig beskyttelsesgruppe, for at undgå dannelse af et $\Delta^{6,7}$ -steroid som resultat ved intern protonoverføring. Egne beskyttelsesgrupper er bl.a. silylgrupper.

De dannede 1 α ,3 β -dihydroxy-steroid-5-ener kan omdannes til de tilsvarende 1 α ,3 β -dihydroxy-steroid-5,7-diener ved fx konventionel teknik såsom bromering i 7-stillingen, efterfulgt af dehydrobromering, fx med et amid såsom dime-tylacetamid i nærværelse af et jordalkalimetalkarbonat. Dehydrobromering kan også ske ved behandling med trimetyl-fosfit eller en base såsom kollidin, pyridin eller diazabicyklooktan.

7,8-Dobbeltbindingen kan også indføres under anvendelse af den af Daubin et al udarbejdede metode, fx ved at oxydere 1 α ,3 β -dihydroxysteroid-5-enen til den tilsvarende steroid-5-en-7-on med et kromtrioxyd-oxydationsmiddel, hvorefter man omsætter denne keton med et sulfonylhydrazin til dannelse af den tilsvarende 7-sulfonylhydrazon, som derefter underkastes en Wolff-Kishner-reduktion til dannelse af den ønskede 5,7-dien.

Det kan være fordelagtigt at beskytte 1 α - og 3 β -hydroxygrupper såsom ved forestring til fx dibenzoatet for at undgå uønskede bireaktioner under den reaktionsfølge der behøves til indførelse af 7,8-dobbeltbindingen.

Den steroid-5,7-dien, der fremkommer ved behandling af en forbindelse med den almene formel IV på en eller anden af de foran beskrevne metoder gengives ved formelen



Bestråling af en forbindelse med formel V, fortrinsvis med næsten ultraviolet lys, fx med en bølglængde på 275-300 nm, bevirker dannelsen af et 1α -hydroxyleret prævitamin som kan gengives med den i krav 1's kendetegnende del viste formel II.

5 Forbindelsen med formel II kan eventuelt være i termisk ligevægt med 1α -hydroxyvitamin D_3 med formel I og omdannes ifølge opfindelsen dertil ved opvarmning fx i en alkohol eller et kulbrinte-opløsningsmiddel. Forbindelsen har den i krav 1 viste cis-konfiguration. Dannelsen
10 af uønskede oxyderede biprodukter under denne omdannelse kan minimeres ved forestring af 1α - og 3β -hydroxygrupperne, med eddikesyre eller et reaktivt derivat deraf.

Udgangsmaterialet med formel III kan fremstilles ved en hvilken som helst hensigtsmæssig måde, fx ved oxydering af den tilsvarende 3-hydroxysteroid-5-en, fx ved anvendelse af et quinol/quinon-oxydationsmiddel såsom diklordicyanquinon efterfulgt af behandling med et peroxyd, fx hydrogenperoxyd sammen med en base såsom natriumhydroxyd, hensigtsmæssigt i et vandigt alkoholisk medium, til dannelse af $1\alpha,2\alpha$ -epoxydet,
20 der om ønsket kan omdannes til den tilsvarende 1α -hydroxyforbindelse ved reduktion, fx under anvendelse af zink og en syre såsom eddikesyre.

1α -Hydroxyvitamin D_3 har ikke blot højere vitaminaktivitet end vitamin D_2 og vitamin D_3 , men også end de
25 kendte $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D-forbindelser. Således udviser fx 1α -hydroxyvitamin D_3 en langt kraftigere virkning på knoglemetabolismen end disse; forsøg i vitamin D_3 -rækken viser at 1α -hydroxyvitamin D_3 er 10-50 gange så aktivt som usubstitueret vitamin D_3 , mens $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin
30 D_3 kun er 3-5 gange så kraftigt som det usubstituerede vitamin. Disse resultater er særlig overraskende i betragtning af tidligere formodninger om, at 25-hydroxygruppen er involveret i metabolismen og derfor må formodes at være aktivitetsfremmende. 1α -Hydroxyvitamin D_3 er også hurtigt
35 virkende og elimineres hurtigt fra organismen, så de problemer man tidligere har stødt på med hensyn til vitamin-

forgiftning praktisk taget undgås ved anvendelse af denne forbindelse.

1 1α -Hydroxyvitamin D_3 er bl.a. i stand til at stimulere tarmens kalciumtransport, knoglernes kalciummobilisering, knoglemineralisering og knogledannelse.

10 1α -Hydroxyvitamin D_3 har betydningsfulde profylaktiske og terapeutiske anvendelser til forebyggelse eller behandling af mangeltilstande såsom rachitis og osteomalaci, og det er værdifuldt til behandling af sygdomme der reagerer på vitamin D såsom hypoparathyreoidisme, hypofosfatæmi, hypokalcæmi og beslægtede knoglelidelser, nyreforstyrrelser og nyresvigt og hypokalcæmisk tetani. Desuden gør den kraftigere virkning af 1α -hydroxyvitamin D_3 i sammenligning med konventionelle 1-hydrogenvitamin D-forbindelser 1α -hydroxyvitamin D_3 værdifuld til behandling af
15 sådanne forstyrrelser som vitamin D-resistent rachitis, renal osteodystrofi, steatorré galde-cirroze og andre funktionsfejl i absorption, osteoporose, sekundær hypokalcæmi og/eller knoglelidelser stammende fra dysfunktioner i lever, nyre eller mave-tarmkanalen, samt sekundær hypokalcæmi eller knoglesygdomme stammende fra behandling med dilantin, barbiturater såsom fenylbarbitone og beslægtede lægemidler, der viser sig modstandsdygtige over for konventionelle forbindelser såsom vitamin D_3 .

25 I almindelighed kan 1α -hydroxyvitamin D_3 indgives parenteralt sammen med en injicerbar væskeformet bærer såsom sterilt pyrogenfrit vand, sterilt peroxydfrit ætyloleat, dehydratiseret alkohol, propylenglykol eller en dehydratiseret blanding af alkohol og propylenglykol. Sådanne
30 præparater kan indgives intravenøst, intraperitonealt eller intramuskulært. Injicerbare forbindelser oparbejdes fortrinsvis i dosisenhedsform, fx i ampuller, således at hver enhed med fordel indeholder 0,1-200 μ g og fortrinsvis 0,2-20 μ g af den aktive vitaminforbindelse. Den normale dosis
35 til behandling af voksne mennesker vil i almindelighed være i området 0,1-200 μ g om dagen, idet lavere doser inden for dette område, fx 0,1-2 μ g bruges ved profylakse og

højere doser, fx 5-50 µg, ved terapeutisk behandling.

I betragtning af følsomheden af 1α-hydroxyvitamin D₃ for oxydation foretrakkes det i almindelighed at farmaceutiske præparater indeholdende disse materialer indeholder i det mindste spor af en antioxydant såsom ascorbinsyre, butyleret hydroxylanisol eller hydroquinon.

Det har meget overraskende vist sig at 1α-hydroxyvitamin D₃ har fremragende aktivitet ved oral indgift. Denne egenskab var fuldstændig uventet i betragtning af tidligere resultater med hensyn til 1α,25-dihydroxyvitamin D₃, der har vist at orale doser af dihydroxyvitaminet har meget lav aktivitet (fx bestemt ved målinger over den antirakitiske aktivitet) og at parenteral indgift af dihydroxyvitaminet er nødvendig for at opnå gunstige terapeutiske resultater; man ville normalt forvente at 1α-hydroxyvitamin D-forbindelserne ville udvise analog almen opførsel med det tilsvarende dihydroxyvitamin i betragtning af ligheden i arten af den biologiske aktivitet hos disse forbindelser i andre henseender.

Den følgende tabel, der viser effekten på serumkalций- og fosforniveauet for parathyreoidektomiserede/thyreoidektomiserede rotter (hanrotter af stammen Charles River med en vægt på 80-100 g; hver forsøgsgruppe med 6 rotter) af oral indgift af 1α-hydroxyvitamin D₃ og 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ (0,1 µg/kg ved gastrisk intubation), godtgør at 1α-hydroxyvitamin D₃ har god aktivitet ved oral indgift, hvilket fremgår af stigningen i serumkalций-niveauet i forhold til de ubehandlede kontroldyr, hvorimod oralt indgivet 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ er forholdsvis inaktivt og ikke frembringer nogen signifikant ændring i serumkalций-niveauet i forhold til kontroldyrene.

Tabellen viser også at de metaboliske ændringer, der frembringes af 1α-hydroxyvitamin D₃ er af forholdsvis kort varighed, idet serumkalций-niveauet hos de med 1α-hydroxyvitamin D₃ behandlede rotter ligger tæt ved niveauet hos kontrolrotterne inden for 24 timer efter indgiften

af vitaminet. Dette bekræfter at 1α -hydroxyvitamin D_3 hurtigt elimineres af systemet og dermed ikke giver nævneværdig risiko for at frembringe bivirkninger i form af uønskede vitaminforgiftninger.

5

Tabel I

Virkning af oralt indgivet 1α -hydroxyvitamin D_3 og $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 på serumkalciumniveauet og fosforniveauer hos parathyreoidektomiserede/thyreoidektomiserede rotter.

10

Vitamin indgivet	Serumkalciumniveau (mg/100 ml)		Serumfosforniveau (mg/100 ml)	
	8 timer efter indgift	24 timer efter indgift	8 timer efter indgift	24 timer efter indgift
15				
- (kontrol)	4,5 $\pm$ 0,43	4,8 $\pm$ 0,46	12,0 $\pm$ 0,44	14,1 $\pm$ 1,9
1α -hydroxy- vitamin D_3	9,9 $\pm$ 0,80	6,4 $\pm$ 0,73	9,5 $\pm$ 1,1	14,5 $\pm$ 1,0
20 $1\alpha,25$ -dihydro- xyvitamin D_3	5,9 $\pm$ 0,56	5,8 $\pm$ 0,52	13,3 $\pm$ 1,73	13,0 $\pm$ 1,44

Virkningen efter oral indgift og den deraf følgende nemhed ved indgiften af 1α -hydroxyvitamin D_3 giver den forbindelse meget betydelig terapeutisk værdi ved en lang række anvendelser og gør den særlig nyttig i sammenligning med kendte, parenteralt indgivelige $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D-derivater.

1α -Hydroxyvitamin D_3 kan fx bruges som næringstilskud eller komponenter i næringstilskud, fx i kombination med andre vitaminer. Et eksempel på en sådan anvendelse er berigelse af mælk, idet inkorporering af 0,1-0,5 μ g 1α -hydroxyvitamin D_3 pr. liter mælk vil være af profylaktisk værdi til forhindring af forstyrrelser som fx rachitis og osteomalaci.

35

Tilsvarende kan 1α -hydroxyvitamin D_3 oparbejdes til oralt indgivelige farmaceutiske præparater til mange forskellige anvendelser, fx behandling af en hvilken som helst af de ovennævnte tilstande der reagerer på vitamin D, eller de kan bruges til behandling af en hvilken som helst af de tilstande der reagerer på 1α -hydroxyvitamin D, men som normalt er modstandsdygtige mod vitamin D, og navnlig kan de bruges til en langvarig behandling af sådanne sygdomme som osteoporose samt profylaktisk som vitamin og i multivitaminpræparater.

Oralt indgivelige præparater indeholdende det omhandlede 1α -hydroxyvitamin D_3 kan om ønsket indeholde en eller flere fysiologisk forenelige bærere og/eller excipienter, og præparaterne kan være faste eller flydende. Præparaterne kan have en hvilken som helst hensigtsmæssig form som fx tabletter, overtrukne tabletter, kapsler, pastiller, vandige eller olieagtige suspensioner, opløsninger, emulsioner, saft, eliksir eller tørre produkter egnede til rekonstitution med vand eller en anden egnet væske før anvendelsen. Præparaterne oparbejdes fortrinsvis i dosisenhedsform således at hver dosis med fordel indeholder 0,2-20 μg , fortrinsvis 0,5-5 μg 1α -hydroxyvitamin D_3 . Den dosis af 1α -hydroxyvitamin D_3 , der bruges til behandling af voksne mennesker, vil typisk være i området 0,2-20 μg om dagen. Tabletter og kapsler indeholdende 1α -hydroxyvitamin D_3 kan eventuelt indeholde konventionelle bestanddele såsom bindemidler, fx sirup, akaciegummi, gelatine, sorbitol, traganth eller polyvinylpyrrolidon; fyldstoffer som fx laktose, sukker, majsstivelse, kalciumfosfat, sorbitol eller glycin; smøremidler som fx magnesiumstearat, talkum, polyætylenglykol eller kiselsyreanhydrid; sønderdelingsmidler som fx kartoffelstivelse; eller acceptable befugtningsmidler såsom natriumlaurylsulfat. Tabletter kan overtrækkes ved i og for sig velkendte metoder.

Flydende præparater af 1α -hydroxyvitamin D_3 kan indeholde konventionelle additiver såsom suspenderingsmid-

ler, fx sorbitolsaft, metylcellulose, glukose/sukkersirup, gelatine, hydroxymethylcellulose, karboxymethylcellulose, aluminiumstearatgel eller hydrogenerede spiselige fedtstoffer, emulgeringsmidler som fx lecithin, sorbitanmono-
5 oleat, akaciegummi; ikke-vandige bærestoffer som kan indbefatte spiselige olier som fx vegetabiliske olier såsom jordnøddeolie, mandelolie, fraktioneret kokosolie, fiskeleverolier, olieagtige estere såsom polysorbat 80, propylenglykol eller ætylalkohol; og præserveringsmidler som fx metyl-
10 eller propyl-p-hydroxybenzoat eller sorbinsyre. Flydende præparater kan hensigtsmæssigt indkapsles i fx gelatine for at give et produkt i dosisenhedsform.

Sådanne præparater kan indeholde andre terapeutisk nyttige bestanddele såsom kalciumsalte (fx laktatet, natrium-
15 umlaktat, fosfat, glukonat eller hypofosfit) og/eller salte af andre essentielle sporelementer såsom magnesium, mangan, jern, kobber, zink og jod og/eller andre vitaminer såsom vitamin A, vitamin B₁, vitamin B₂, nikotinamid, pantothen-syre eller salte deraf som fx kalciumsaltet, vitamin B₆, vitamin B₁₂, folinsyre, vitamin C og vitamin E. Multi-vitamin-
20 præparater omfattende de hidtil ukendte 1 α -hydroxyforbindelser kan oparbejdes på en måde, som er analog til den, der anvendes ved fremstilling af multivitaminpræparater, der indeholder konventionelle 1-hydrogen-
25 vitamin D-forbindelser.

Aktiviteten af 1 α -hydroxyvitamin D₃ gør det også velegnet til rektal indgift, og farmaceutiske præparater til dette formål, indeholder fx en effektiv dosis af 1 α -hydroxyvitamin D₃ iblandet et konventionelt suppositorie-
30 grundlag såsom kakaosmør eller et andet glycerid.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen skal i det følgende belyses ved nogle eksempler.

Eksempel 1

1 α -Hydroxyvitamin D₃A. Udgangsmateriale5 a) Kolesta-1,4,6-trien-3-on

19,3 g kolesterol og 38 g diklordicyanoquinon i 500 ml tørt dioxan opvarmedes under tilbagesvaling i 22 timer. Derpå afkøledes blandingen, filtreredes og filtratet ind-dampedes til tørhed. Kromatografering af remanensen på alu-miniumoxyd og eluering med benzen/hexan efterfulgt af elue-ring med benzen gav trienonen som en lys olie i en mængde på 11,5 g, der størknede ved henstand. Materialets fysiske egenskaber stemte med den tilskrevne struktur.

15 b) 1 α ,2 α -Epoxykolesta-4,6-dien-3-on

1 g af trienonen fra (a) i 50 ml ætanol behandlede ved 0°C med 0,25 ml 10% vandigt natriumhydroxyd og 2,5 ml 30% vandigt H₂O₂. Blandingen opbevarede ved 5°C natten over og det resulterende epoxyd frafiltreredes, vaskedes med vandig alkohol og tørredes, hvorved der fremkom 0,86 g af den i overskriften angivne forbindelse. Omkrystalli-sation fra ætanol gav farveløse nåle med smp. 107-109°C.

c) 1 α ,3 β -Dihydroxykolest-5-en

25 Til en under omrøring værende opløsning af 0,2 g litiummetal i 80 ml flydende ammoniak og 50 ml tørt tetrahydrofuran indeholdende 0,5 g ammoniumklorid sættes der en deoxygeneret opløsning af 4,3 g af epoxydet fra (b) i 25 ml tørt tetrahydrofuran, idet tilsætningen skete dråbevis. Da den blå farve var forsvundet, afbrødes til-sætningen af steroidet, og der tilsattes yderligere 0,2 g litium og 1 g ammoniumklorid, efterfulgt af yderligere tilsætning af epoxydopløsningen. Denne behandlingsfølge gentoges indtil hele mængden af steroidet var blevet til-sat. På dette punkt tilsattes der yderligere et stykke litium (0,2 g, i alt 0,8 g) efterfulgt af yderligere am-moniumklorid til en total mængde på 8,0 g. Man lod derefter

det meste af ammoniakken afdampe, og den tilbageværende blanding udhældtes i isvand og ekstraheredes med kloroform. Koncentrering af kloroformekstrakten gav en brun gummi som kromatograferedes på 160 g aluminiumoxyd. Eluering med

5 ætylacetat/benzen gav $1\alpha,3\beta$ -diolen som en glas, der hurtigt krystalliserede ved tilsætning af ætanol. Omkrystallisation fra vandig ætanol gav 1,7 g af den i overskriften angivne forbindelse, smeltepunkt $161,5-163^{\circ}\text{C}$.

Beregnet for $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_2$: C 80,54 H 11,52

10 Fundet: C 80,40 H 11,39%

d) 1α -Hydroxykolesta-4,6-dien-3-on

130 mg af epoxydienonen fra afsnit b) i 10 ml ætanol behandledes med 1 g zinkstøv under omrøring, efterfulgt af tilsætning af 3 dråber eddikesyre. Derefter

15 filtreredes blandingen og filtratet koncentredes til tørhed. Kromatografering på silikagel gav kolesta-1,4,6-trien-3-on (der kunne opsamles og recirkuleres), efterfulgt af den i overskriften angivne forbindelse med λ_{max}

20 3600, 3400, 1675, 1625 og 1590 cm^{-1} ; δ 6,15 (2 protoner, s, H6, H7), 5,73 (1 protonsinglet H4), δ 4,15 (1 proton, smal multiplet, H1).

e) $1\alpha,3\beta$ -Dihydroxykolest-5-en

25 0,6 g af hydroxydienonen fra d) omdannedes til trimetylsilylæteren deraf ved behandling af en opløsning i 2 ml tetrahydrofuran og 2 ml pyridin med 1,5 ml hexametyldisilazan og 0,6 ml trimetylklorsilan. Den rå trimetylsilylæter opløstes i 10 ml tetrahydrofuran og opløs-

30 ningen sættes dråbevis til en under omrøring værende opløsning af ca. 200 mg litiummetal i 20 ml flydende ammoniak. Efter nogle få minutter tilsattes der 2 g ammoniumklorid og opløsningen omrørtes. En yderligere portion litiummetal (omtrent 100 mg) tilsattes. På ny omrørtes

35 opløsningen. Derefter tilsattes der en yderligere portion ammoniumklorid og blandingen udhældtes i koldt vand. Produktet isoleredes ved ekstraktion med æter og metylen-

diklorid, efterfulgt af søjlekromatografi der gav den i
overskriften angivne forbindelse som efter krystallisa-
tion fra ætanol havde smeltepunkt $158-161^{\circ}\text{C}$. Efter om-
krystallisation var smeltepunktet $161,5-163^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}}$
5 $(\text{CHCl}_3) = -38^{\circ}$. Dette materiale var identisk med pro-
duktet fra eksempel 1 (c), og gav ved hydrogenering en
prøve af $1\alpha,3\beta$ -dihydroxy- 5α -kolestan, der i enhver hen-
seende var identisk med en autentisk prøve af dette stof.

10 f) $1\alpha,3\beta$ -Dibenzoyloxykolest-5-en

1,2 g $1\alpha,3\beta$ -dihydroxykolest-5-en behandledes i 10
ml pyridin indeholdende 20 mg dimetylaminopyridin med 5
ml benzoylchlorid. Efter opbevaring natten over ved stue-
temperatur udhældtes blandingen i vand og produktet ek-
15 straheredes med æter og vaskedes med fortyndet vandig
saltsyre, mættet bikarbonatopløsning og vand. Inddamp-
ning af den æteriske portion gav 1,6 g af dibenzoatet
med smeltepunkt $147-150^{\circ}\text{C}$. Efter omkrystallisation fra
ætanol havde produktet smeltepunkt $151-153^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}} = +24^{\circ}$.
20 Beregnet for $\text{C}_{41}\text{H}_{54}\text{O}_4$: C 80,61 H 8,91
Fundet: C 80,43 H 8,74%

g) $1\alpha,3\beta$ -Dibenzoyloxykolesta-5,7-dien

En opløsning af 0,58 g af det under f) beskrevne
25 dibenzoat i 10 ml hexan behandledes med 0,15 g dibrom-
dimetylhydantoin og opvarmedes under tilbagesvaling i 25
minutter. Efter afkøling filtreredes blandingen og fil-
tratet koncentreredes til en lys olie. Denne olie opløs-
tes i 3 ml tørt xylen og sættes dråbevis til en tilbage-
30 svalingskogende opløsning af 0,4 ml trimetylfosfit i 5
ml xylen. Opvarmningen under tilbagevaling fortsattes i
1 3/4 time hvorefter opløsningsmidlerne fjernedes under
nedsat tryk og remanensen krystalliseredes fra acetone/
metanol til den i overskriften angivne forbindelse. Ef-
35 ter omkrystallisation fra ætanol/acetone havde produktet
smeltepunktet $161-162^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}} = -8^{\circ}$.

Beregnet for $C_{41}H_{52}O_4$: C 80,88 H 8,61
Fundet: C 80,69 H 8,66%

h) $1\alpha,3\beta$ -Dihydroxykolesta-5,7-dien

5 300 mg af dibenzoatet fra (g), opløst i 30 ml ætanol og 0,5 ml vand indeholdende 0,6 mg KOH, opbevarede ved 80°C under argon i $\frac{1}{2}$ time. Derefter afkøledes reaktionsblandingen og fortyndedes med vand og ekstraheredes med æter. Inddampning af den æteriske ekstrakt gav den i
10 overskriften angivne forbindelse som et krystallinsk fast stof. Omkrystallisation fra metanol gav et produkt med smeltepunkt $155-158^\circ\text{C}$, λ_{max} (ætanol) 263 (7700); 272 (11000); 282 (11900); 295 (7000) nm.

15 B. Slutprodukt

i) 1α -Hydroxyvitamin D_3

 95 mg af produktet fra h) i 200 ml deoxygeneret æter bestråledes i 12 minutter ved hjælp af en 200 watt Hanovia lampe omgivet af en filtreret opløsning af 24
20 ml toluen og 4 ml CS_2 pr. liter metanol. Den kolde opløsning overførtes til en kolbe fyldt med argon og æteren fjernedes ved 0°C . Remanensen opløstes i 8 ml deoxygeneret absolut alkohol og opvarmedes under tilbagesvaling i $1\frac{1}{2}$ time. Biologisk bedømmelse udført på kyllinger med
25 vitamin D-mangel viste at det 1α -hydroxy-vitamin D_3 , der var dannet (λ_{max} 264 (19000)) var karakteriseret ved en meget hurtig indsætning af fysiologisk virkning (under 3 timer), hvilket tidligere kun var iagttaget for det
30 naturlige produkt der forsøgsvis har været karakteriseret som $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin- D_2 .

Eksempel 2

1 α -Hydroxyvitamin D₃

A. Fremstilling af udgangsmateriale ved bestråling af

5 1 α ,3 β -diacetoxykolesta-5,7-dien-----

50 mg 1 α ,3 β -diacetoxykolesta-5,7-dien, smp. 118-119°C, fremstillet ved omsætning af 1 α ,3 β -dihydroxykolesta-5,7-dien med eddikesyreanhydrid under anvendelse af en lignende metode som beskrevet i eksempel 1 f) bestråles
10 i 11 minutter i 200 ml deoxygeneret æter. Blandingens ultraviolette spektrum viste den ønskede forøgelse i absorptionen i området 220-268 nm og aftagen i området 268-295 nm. Blandingen var i det væsentlige homogen på silikagel (CHCl₃), men adskilte sig i to rene pletter på 1% AgNO₃-
15 silikagel-kloroform, idet den nedre plet svarede til udgangsmaterialet med hensyn til R_F. Det mindst polære materiale (ca. 20 mg) havde et bredt ultraviolet absorptionsbånd med et "fladt" maximum omkring 262-272 nm (lille pukkel ved 282 og 295 nm) og et minimum ved 234 nm. Dette ma-
20 teriale indeholdt rå prævitamin. En ringe mængde af denne blanding opløstes i hexan og det ultraviolette spektrum opnoteredes (anslået koncentration ca. 20 mg pr. liter). Blandingen behandledes derefter med en opløsning af jod i hexan således at den samlede koncentration af jod var
25 ca. 0,4 mg. pr. liter, og det hele holdtes i diffust lys i 45 minutter. Hexanopløsningen vaskedes med tyndt vandigt tiosulfat og derefter med vand, den tørredes og det ultraviolette spektrum genopnoteredes. Det viste absorptionskarakteristikker for et tachysterol-derivat (maximum
30 ved 282 nm og skuldre ved 272 og 292 nm), og absorptionen var steget med en faktor på 2,2.

B. Slutprodukt, 1 α -hydroxyvitamin D₃

35 Hele mængden af det rå prævitamin opløstes i 10 ml deoxygeneret iso-oktan. Absorptionen ved 262 nm var 0,39 når en 30 μ l stor prøve fortyndedes til 3 ml. Derefter op-

varmedes opløsningen til ca. 75°C under argon i ialt 2 1/4 timer, i løbet af hvilken periode absorptionen ved 262-265 nm steg til et maximum på 0,54 (for en opløsning af samme koncentration som ovenfor). Som ventet steg absorptionen først hurtigt og derefter langsomt efterhånden som blandingen nærmede sig ligevægtstilstanden. Behandling af en prøve med jod i hexan som beskrevet ovenfor viste absorptionskarakteristikken for tachysterol, men stigningen i absorptionen var kun fra 0,43 til 0,47. Blandingen i ligevægt var i det væsentlige homogen både på silikagel og 1% AgNO₃-silikagel (fremkaldt i kloroform).

Ca. 12 mg af blandingen opløstes i 1,0 ml deoxygeneret metanol og opløsningen behandledes med 0,5 ml deoxygeneret 1,5% metanolisk KOH og holdtes under argon ved stuetemperatur i 1 1/2 time. Fortynding med vand og ekstraktion med æter gav 1α,3β-diolerne, der viste sig som to meget tætbeliggende hovedpletter på silikagel (fremkaldt med 4% metanol-CHCl₃). Den mindst polære fraktion (ca. 5 mg) udviste bred absorption i ultraviolet med et maximum ved 264 nm og et minimum ved 228 nm. Dette var 1α-hydroxyvitamin D₃. Behandling af en prøve med jod i hexan som beskrevet ovenfor frembragte ændring i maximumet til 270 nm, hvilket skyldtes omdannelse til 5,6-trans-vitamin.

Den mest polære fraktion havde et glat absorptionsbånd i det ultraviolette med maximum ved 260 nm og minimum ved 235 nm. Dette var prævitaminet. Behandling af dette med jod som ovenfor gav et komplekst UV-spektrum med maxima ved 268, 276, 286, 298, 312 og 327 nm.

Eksempel 3

1α-Hydroxyvitamin D₃

Bestråling af 135 mg 1α,3β-diacetoxystero-5,7-dien (fremstillet som i eksempel 2) i deoxygeneret æter (200 ml) i 15 minutter og adskillelse af produkterne på 1% AgNO₃-silikagel (CHCl₃) (præparativ tyndtlagskromatogra-

fi) gav 68 mg udgangsmateriale (mest polære fraktion) og det rå prævitamin (54 mg, mindst polære fraktion).

Det således vundne prævitamin opvarmedes ved 75°C i 2 timer i deoxygeneret isooktan (15 ml) under argon.

5 Den resulterende blanding af vitamin og prævitamin opløstes i 4 ml metanol og opløsningen behandledes med 1 ml 2,5% metanolisk KOH og holdtes ved stuetemperatur i 2 timer. Fortynding med vand og ekstraktion med æter gav vitamin- og prævitamindiolerne, som adskiltes på silika-
 10 gel (præparativ tyndtlagskromatografi) (8% MeOH-CHCl₃), hvorved der vandtes 13 mg vitamin (R_f 0,35) og 8 mg prævitamin (R_f 0,31). Omkrystallisation af vitaminet fra æter-pentan gav fine farveløse nåle med smp. 132-133°C (opvarmningshastighed 1°C/4 sekunder), og smp. 128-129°C (opvarmningshastighed 1°C/25 sek.). UV-spektrum (æter) λ_{max} 264 nm (20200), λ_{min} 229 nm (10800). Der er 9% usikkerhed i ekstinktionsværdier, men forholdet $\frac{\lambda_{max}}{\lambda_{min}}$ er $1,87 \pm 10\%$. $[\alpha]_D^{20}$ (æter, $c \sim 0,3\%$) = $+26^\circ \pm 2^\circ$. Produktet $[\alpha]_D^{20} \times$ ekstinktion ved 264 nm $\sim 5,2 \times 10^5 \pm 10\%$. ν_{max} (CHCl₃)
 15 3700, 3500, 1600-1650, 1040 cm⁻¹. NMR (d₆-acetone) H₆+H₇ AB kvartet ved δ 6,20 (tilsyneladende J=11,5 Hz). H₁₉, to smalle én-proton-multipler ved δ 4,92 og δ 5,37 ppm.

11 mg af prævitaminet (λ_{max} 260 nm, λ_{min} 232 nm) fra to særskilte bestrålinger opløstes i 8 ml deoxygeneret isooktan og opvarmedes til 75°C i 1 1/2 time. Isolering
 25 ved præparativ tlc som foran gav yderligere 4,6 mg af vitaminet. Der indtrådte sønderdeling her, og der var praktisk talt ikke noget prævitamin tilbage. Analyse for 1 α -hydroxyvitamin D₃:

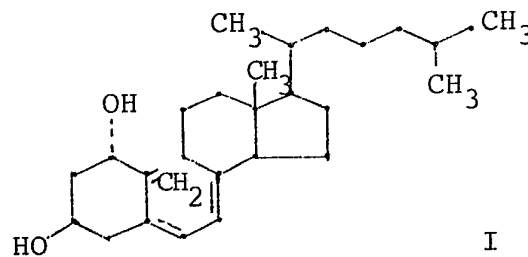
30 Beregnet for C₂₇H₄₄O₂: C 80,9 H 11,07
 Fundet: C 80,6 H 11,04%

P a t e n t k r a v

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af 1α -hydroxy-vitamin D_3 med formelen

5

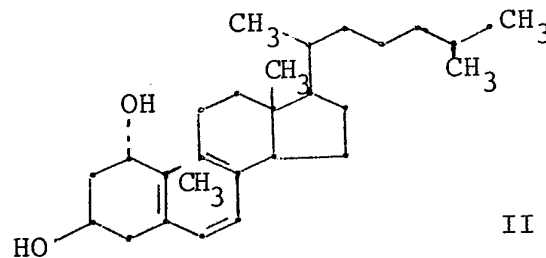
10



eller diacetatet deraf, k e n d e t e g n e t ved at man isomeriserer 1α -hydroxyprævitamin D_3 med formelen

15

20



eller diacetatet deraf ved opvarmning til dannelse af den ønskede vitamin D_3 -forbindelse.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at prævitamin D_3 -forbindelsen er 1α -hydroxyprævitamin D_3 - $1\alpha,3\beta$ -diacetat.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at 1α -hydroxyvitamin D_3 udvindes i kry-stallinsk form.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at 1α -hydroxyprævitamin D_3 -forbindelsen isomeriseres ved opvarmning i et alkohol- eller kulbrinte-opløsnings-middel.

35