

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT (11) 147912 B



DIREKTORATET FOR  
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

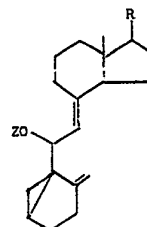
- (21) Patentansøgning nr.: 3650/79  
(22) Indleveringsdag: 31 aug 1979  
(24) Løbedag: 15 jan 1979  
(41) Alm. tilgængelig: 31 aug 1979  
(44) Fremlagt: 07 jan 1985  
(86) International ansøgning nr.: PCT/US79/00024  
(86) International indleveringsdag: 15 jan 1979  
(85) Videreførelsesdag: 31 aug 1979  
(30) Prioritet: 16 jan 1978 US 869448 12 jun 1978 US 914796

(51) Int.Cl.<sup>4</sup>: C 07 C 172/00

- (71) Ansøger: \*WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION; Madison, US.  
(72) Opfinder: Hector F. de \*Luca; US, Heinrich K. \*Schnoes; US, David E. \*Hamer; US, Herbert E. \*Paaren;  
US.

(74) Fuldmægtig: Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard

- (54) Fremgangsmåde til fremstilling af 1 $\alpha$ -hydroxy-  
lerede vitamin D-forbindelser  
(57) Sammendrag:

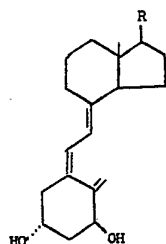


hvor R har den anførte betydning, og Z er H, alkyl, eller acyl, hvorved man opnår en tilsvarende 1 $\alpha$ -hydroxyforbindelse, som derpå acyleres og solvolyseres, hvorpå solvolyseproduktet omdannes til den ønskede hydroxyforbindelse. Som oxidationsmiddel anvendes fortrinsvis selen dioxide.

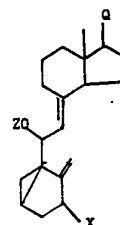
Følgende forbindelser anvendes eller dannes som mellemprodukter:

3650-79

1 $\alpha$ -Hydroxylerede calciferoler med formlen



hvor R betegner en vilkårlig sterol-sidekæde, fremstilles direkte ved allyloxydation af forbindelsen med formlen



hvor Z har den tidligere angivne betydning, Q er en vilkårlig sterol-sidekæde og X betegner -H, -OH, hvor Y er acyl eller hydrogen.

De fremstillede 1 $\alpha$ -hydroxylerede calciferoler har D-vitaminlignende virkning.

DK 147912 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangs-  
måde til fremstilling af  $1\alpha$ -hydroxylerede vitamin D for-  
bindelser gennem et cyclo-vitamin-D-syntesemellempro-  
dukt.

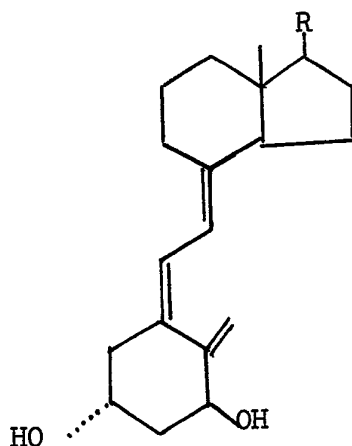
- 5 Det er velkendt, at D-vitaminerne udviser visse biologi-  
ske virkninger såsom stimulering af calcium-absorptionen  
i mave-tarmkanalen, stimulering af resorptionen af uor-  
ganiske bestanddele af knogler samt forebyggelse af ra-  
kitis. Det er ligeledes velkendt, at sådan biologisk virk-  
10 ning er afhængig af, at disse vitaminer ændres in vivo,  
d.v.s. metaboliseres til hydroxylerede derivater. For-  
nyligt fremført nyt materiale indikerer f.eks., at  $1\alpha$ ,  
25-dihydroxyvitamin- $D_3$  er den in vivo aktive form for  
vitamin- $D_3$ , og at det er den forbindelse, der er ansvar-  
15 lig for de ovennævnte biologiske virkninger.

- De syntetiske  $1\alpha$ -hydroxyvitamin-D-analoge såsom  $1\alpha$ -hydro-  
xyvitamin- $D_3$  og  $1\alpha$ -hydroxyvitamin- $D_2$  udviser ligeledes  
kraftig biologisk effekt, og sådanne forbindelser såvel  
som de naturlige metabolitter har vist sig meget lovende  
20 som midler til behandling af et antal forskellige syg-  
domstilstande i forbindelse med calcium-metabolisme og  
knogler, såsom osteodystrofi, osteomalaci og osteoporose.

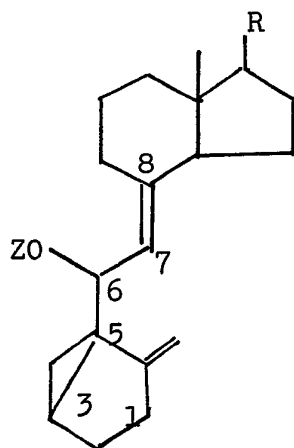
- Eftersom  $1\alpha$ -hydroxylering er et essentielt element i bi-  
bringelsen af biologisk virkning til D-vitaminforbindel-  
serne og disses derivater, har der været stadig stigende  
25 interesse for fremgangsmåder til kemisk gennemførelse af  
sådan hydroxylering. Med undtagelse af en foreslået frem-

- gangsmåde til total syntese af  $1\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>3</sub> (Lythgoe et al., J.Chem. Soc., Perkin Trans I, p. 2654 (1974)) har samtlige syntesiser af  $1\alpha$ -hydroxyleret vitamin-D-forbindelser forud for den foreliggende opfindelse omfattet fremstillingen af et  $1\alpha$ -hydroxyleret steroid, fra hvilket
- 5 den ønskede D-vitaminforbindelse opnås ved velkendte fotokemiske omsætninger efter omdannelsen til det tilsvarende  $1\alpha$ -hydroxy-5,7-dien-sterolderivat. De tilgængelige syntesiser er således flertrins-fremgangsmåder, og de er i de fleste tilfælde lidet effektive samt arbejdskrævende.
- 10
- Eksempler på andre syntesiser, der indbefatter  $1\alpha$ -hydroxylering af forbindelser beslægtet med vitamin D, kan findes i: Fremgangsmåde til fremstilling af steroid-derivater, Ishikawa et al., USA patentskrift nr. 3 929 770
- 15 udstedt 30. december 1957; fremgangsmåde til fremstilling af  $1\alpha$ , 25-dihydroxycholecalciferol, Matsunaga et al., USA patentskrift nr. 4 022 768 udstedt 10. maj 1977,  $1\alpha$ -hydroxycholecalciferol, DeLuca et al., USA patentskrift
- 20 nr. 3 741 996 udstedt 26. juni 1973;  $1\alpha$ -hydroxyergocalciferol samt fremgangsmåde til fremstilling deraf, DeLuca et al., USA patentskrift nr. 3 907 843 udstedt 23. september 1975; The Selenium Dioxide Oxidation of Cholecalciferol, Bohumil Pelc, Steroids, Bind 30, Nr. 2, august 1977.
- 25
- Man har nu fundet en hidtil ukendt fremgangsmåde til indføring af en hydroxylgruppe ved carbon 1 (C-1) stillingen i vitamin D eller vitamin D derivaters molekyler, en fremgangsmåde der i sit princip og sin udførelse adskiller sig grundlæggende fra eksisterende syntesiser. Denne fremgangsmåde, som i det følgende vil blive grundigere
- 30 beskrevet, indebærer den direkte indførelse af en oxygenholdig gruppe ved C-1 gennem en allyl-oxidation.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse omfatter generelt fremstillingen af 1 $\alpha$ -hydroxylerede vitamin-D forbindelser med følgende formel:



5 og er ejendommelig ved at man udsætter forbindelser (der i det følgende bliver betegnet med den almene betegnelse "cyclovitamin D") med formlen



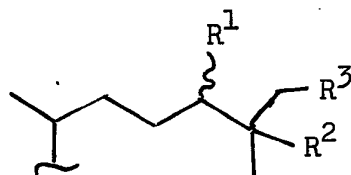
10 for allyl-oxidation, at man om ønsket reducerer eventuelt dannet, tilsvarende 1-oxocyclovitamin-D-derivat med hydridreaktanter, at man udvinder den således dannede 1 $\alpha$ -hydroxylerede cyclovitamin-D-forbindelse fra allyl-oxidationens reaktionsblanding, at man acylerer den indvundne forbindelse og udvinder

det således dannede  $1\alpha$ -O-acylderivat, at man underkaster dette derivat syrekatalyseret solvolyse, udvinder den ønskede  $1\alpha$ -O-acyl-vitamin-D-forbindelse og hydrolyserer (eller reducerer med hydrid-reaktanter) det  $1\alpha$ -O-acylerede reaktionsprodukt til dannelsen af  $1\alpha$ -hydroxyvitamin-D-forbindelserne.

I den ovenfor beskrevne fremgangsmåde er R valgt blandt substituerede eller usubstituerede, mættede eller umættede, cholesterolsidekæde-grupper, eller R har samme opbygning som sidekæden i cholensyre, homocholensyre, pregnenolon, 27-nor-25-ketosterol eller 24-ketosterol, og Z betyder hydrogen eller en lavere alkyl- eller en lavere acylgruppe eller en aromatisk acylgruppe. R vil fortrinsvis være en kolesterol- eller ergosterolsidekædegruppe, kendetegnet ved tilstedeværelsen af hydrogen eller en hydroxylgruppe i den position, der vil blive carbon-25 (C-25) stillingen i det tilstræbte produkts molekyle.

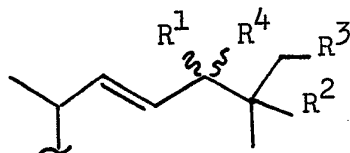
Når som helst man her og i patentkravene anvender "lavere" som en beskrivelse for alkyl eller acyl, er det hensigten at betegne en carbonhydridkæde med fra 1 til 4 carbonatomer, som kan være enten ligekædet eller forgrenet. En aromatisk acylgruppe er en gruppe såsom benzoyl eller substitueret benzoyl. I de forskellige afbildede formler indikerer en bølgeformet linie til en hvilken som helst substituent, at denne substituent befinder sig i enten  $\alpha$  eller  $\beta$  stereoisomerformen.

Ved udførelsen af fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er R i de foregående formler såvel som i de følgende og i patentkravene fortrinsvis en kolesterol-sidekædegruppe kendetegnet ved formlen



- hvor i hver af R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> er udvalgt fra en gruppe bestående af hydrogen, hydroxyl, lavere alkyl, substitueret lavere alkyl, O-lavere alkyl, substitueret O-lavere alkyl samt fluor. Den mest foretrukne sidekædegruppe med ovennævnte konfiguration er en, hvor i R<sup>1</sup> og R<sup>3</sup> betyder hydrogen, og R<sup>2</sup> betyder hydroxyl. Andre foretrukne sidekædegrupper er sådanne, hvor i R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> og R<sup>3</sup> er hydrogen, eller hvor R<sup>1</sup> er hydroxyl, og R<sup>2</sup> og R<sup>3</sup> er hydrogen, eller hvor i R<sup>1</sup> og R<sup>2</sup> er hydroxyl, og R<sup>3</sup> er hydrogen.

- 10 En anden foretrukne sidekædegruppe betegnet med R er ergosterolsidekædegruppen kendetegnet ved formlen

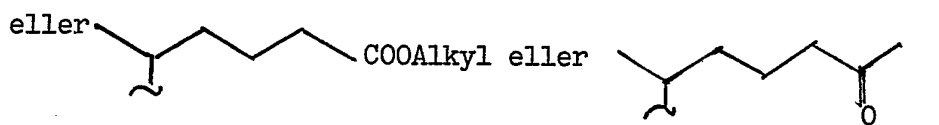
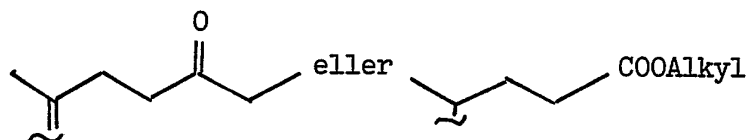


- hvor i hver af R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> og R<sup>3</sup> er udvalgt fra en gruppe bestående af hydrogen, hydroxyl, lavere alkyl, substitueret lavere alkyl, O-lavere alkyl, substitueret O-lavere alkyl samt fluor, og R<sup>4</sup> er hydrogen eller lavere alkyl. De mest foretrukne sidekædegrupper med den anførte ergosterolsidekædekonfiguration er sådanne, hvor i R<sup>1</sup> og R<sup>3</sup> er hydrogen, R<sup>2</sup> er hydroxyl, og R<sup>4</sup> er methyl, eller hvor i R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> og R<sup>3</sup> er hydrogen, og R<sup>4</sup> er methyl, og hvor den stereokemiske konfiguration af R<sup>4</sup> er den samme som i ergosterol.

Det må forstås, at når som helst der forekommer hydroxylgrupper i sidekædegruppen R i cyclovitamin D udgangsmaterialet, kan sådanne gruppe være acylerede, f. eks.

lavere acyl såsom acetyl eller substitueret lavere acyl, benzoyl eller substitueret benzoyl, skønt sådan acylering ikke kræves for den heldige gennemførelse af omsætningen.

- 5 Den i den foreliggende opfindelse beskrevne fremgangsmåde er en almen fremgangsmåde, der også kan anvendes i forbindelse med cyclovitamin D forbindelser, som besidder sidekæderne i pregnenolon, chølensyre eller homochølensyre. Der kan bekvemt fremstilles cyclovitamin D forbindelser, hvori sidekædegruppen R f.eks.
- 10 kan have følgende strukturformler

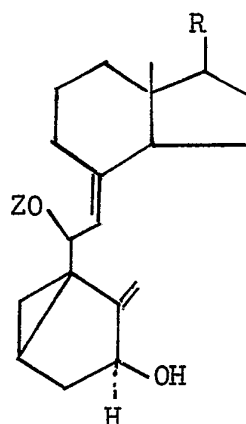


og disse er egnede udgangsmaterialer for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse.

- 15 Det som udgangsmateriale for oxidationsomsætningen anvendte cyclovitamin fremstilles bekvemt fra en D-vita-

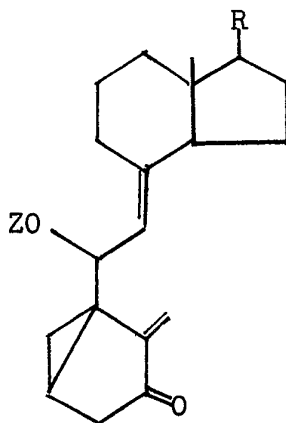
minforbindelse ved en tottrinsfremgangsmåde som omfatter omdannelsen af en D-vitaminforbindelse indeholdende en  $3\beta$ -hydroxylgruppe til det tilsvarende  $3\beta$ -tosylatderivat og derpå ved solvolysering af dette tosylat i en passende pufferet opløsningsmiddelblanding såsom methanol/acetone indeholdende natriumacetat til dannelse af cyclovitaminproduktet. Detaljeret beskrivelse heraf findes i dansk patentansøgning nr. 4361/82.

Ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse udføres allyl-oxidationen normalt i et passende opløsningsmiddel såsom f. eks.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ , dioxan eller tetrahydrofuran under anvendelse af seleniumdioxid som oxidationsmiddel. På grund af arten af denne oxidationsomsætning foretrækker man, at den udføres ved stuetemperatur eller ved lavere temperaturer. Oxidationsomsætningen udføres ligeledes mest fordelagtigt i nærvær af et hydroperoxid såsom tert-butyl-hydroperoxid. Oxidationsproduktet d.v.s. et  $1\alpha$ -hydroxycyclovitamin-D-forbindelsen genvindes let fra reaktionsblandingen ved opløsningsmiddelekstraktion (f. eks. ether), og det renses bekvemt yderligere ved chromatografering. Man kan anvende andre allyl-oxidanter om ønsket, idet det må forstås, at med sådanne andre oxidanter kan man støde på variationer i udbyttet af slutproduktet, og at det kan være nødvendigt at foretage justeringer af de betingelser, under hvilke oxidations-omsætningen udføres, således som det vil være klart for fagmanden. De ved allyl-oxidation af cyclovitamin-D-forbindelser med den ovenfor viste strukturformel, hvori Z betyder lavere alkyl (f. eks. methyl), fremstillede produkter kan let belyses ved følgende formel:



hvor  $R$  betyder en hvilken som helst af de tidligere definerede sidekædestrukturer, og hvor  $Z$  betyder lavere alkyl (f. eks. methyl).

- 5 Oxidation af cyclovitaminerne ved fremgangsmåden ved den foreliggende opfindelse fører til dannelsen af 1-hydroxycyclovitaminer i besiddelse af den ønskede  $1\alpha$ -stereokemiske konfiguration, d.v.s den stereokemiske konfiguration for de biologisk aktive 1-hydroxylerede vitamin-D-metabolitter. Selektiviteten med hensyn til såvel stillingen som den stereokemiske konfiguration samt oxidations-omsætningens bemærkelsesværdige høje virkningsgrad er såvel hidtil ukendt som uventet, og samtlige de anførte  $1\alpha$ -hydroxycyclovitaminer er hidtil ukendte forbindelser.
- 10
- 15 Produkter i mindre omfang, der fremkommer ved seleniumdioxid-oxidation af cyclovitamin-D-forbindelser, er 1-oxo-cyclovitamin-D-derivater med følgende strukturformel:

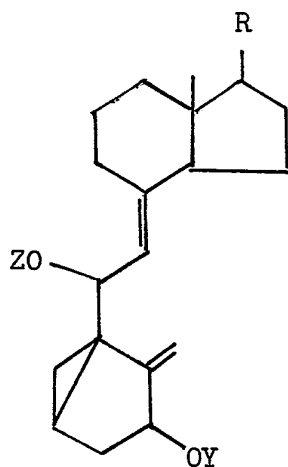


hvori Z betyder lavere alkyl og R betyder en hvilken-  
 helst af de tidligere definerede sidekædegrupper. Disse  
 1-oxocyclovitamin-D-derivater reduceres let med hydrid-  
 reaktanter (f. eks.  $\text{LiAlH}_4$  eller  $\text{NaBH}_4$  eller tilsvaren-  
 5 de reaktanter) til dannelsen fortrinsvis af  $1\alpha$ -hy-  
 droxycyclovitamin-D-derivater med den tidligere anførte  
 formel. Den lette reduktion af 1-oxocyclovitamin-D-for-  
 bindelserne, og særligt den overvejende dannelse af 1-  
 hydroxycyclovitamin-D-forbindelser med  $1\alpha$ -stereokemisk  
 10 konfiguration er et uventet resultat, eftersom mekanistis-  
 ke betragtninger ville have ført til forudsigelse af en  
 indtrængen af hydrid-reduktionsmidlet fra den mindre  
 blokerede side af 1-oxocyclovitamin-D-molekylet, hvilket  
 ville have ført til den overvejende dannelse af  $1\beta$ -hydro-  
 15 xycyclovitamin-epimeren.

Acyleringen af den indvundne  $1\alpha$ -hydroxycyclovitamin-D-  
 forbindelse udføres bekvemt ved standardmetoder under  
 anvendelse af velkendte acyleringsmidler, idet eddike-  
 syreanhydrid er et eksempel, i et passende opløsnings-  
 20 middel f. eks. pyridin, og den udføres normalt ved stue-  
 temperatur i et tidsforløb på adskillige timer f. eks.  
 natten over. Acyleringsproduktet er den tilsvarende  $1\alpha$ -  
 O-acylcyclovitamin-D-forbindelse, der bekvemt indvindes  
 i en tilstrækkelig høj renhedsgrad til yderligere omsæt-  
 25 ninger ved opløsningsmiddelekstraktion (f. eks. ether)

fra reaktionsmilieuet og efterfølgende afdampning af opløsningsmidlerne.

Under disse betingelser kan man forvente ligeledes at acylere en hvilken som helst primær eller sekundær hydroxylgruppe, der er til stede i sidekæden (R) af 1 $\alpha$ -hydroxycyclovitamin-D-forbindelsen. Dersom man ønsker fuldstændig acylering af tertiære hydroxylgrupper (f. eks. 25-hydroxygrupperne), er det normalt nødvendigt at anvende kraftigere acyleringsbetingelser f. eks. forhøjede temperaturer (75 - 100° C). I sådanne tilfælde er det tilrådeligt at udføre omsætningen under en nitrogenatmosfære for at undgå nedbrydning af labile forbindelser. Reaktionsprodukterne af sådanne acyleringer kan belyses med følgende formel



hvor Y betyder en lavere acylgruppe eller en aromatisk acylgruppe, og Z betyder lavere alkyl, og hvor R kan betyde en hvilken som helst af de tidligere definerede steroid-sidekæder, idet det må forstås, at oprindeligt tilstedeværende sekundære eller primære hydroxylgrupper nu vil forefindes som de tilsvarende O-acylsubstituent, og at en hvilken som helst oprindeligt tilstedeværende

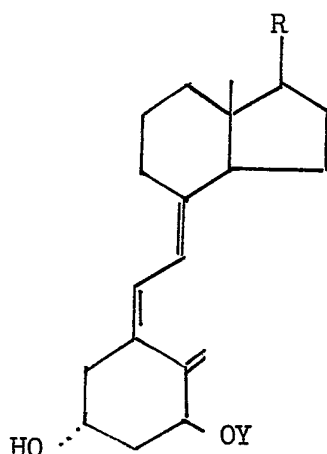
tertiær hydroxylgruppe kan foreligge som hydroxy eller O-acyl afhængig af de valgte reaktionsbetingelser.

5 Omdannelse  $1\alpha$ -O-acyl-cyclovitaminet til  $1\alpha$ -O-acyl-vitamin-D-derivatet udføres ved syrekatalyseret solvolyse af cyclovitaminet. Opvarmning af  $1\alpha$ -O-acyl-cyclovitamin-D med p-toluensulfonsyre i en passende opløsningsmiddelblanding ( f.eks. dioxan/ $H_2O$ ) fører således til  $1\alpha$ -O-acyl-vitamin-D-forbindelsen. Sheves og Mazur anvendte denne omsætning til omdannelse af cyclovitamin  $D_3$  til  
10 vitamin  $D_3$  (J. Am. Chem. Soc. 97, 6249 (1975)).

15 Et hidtil ukendt og uventet overraskende resultat, der ikke var klart ud fra den kendte teknik, bestod i, at  $1\alpha$ -O-acyl-cyclovitamin-D-forbindelserne omdannes præcist og med høje udbytter til de tilsvarende  $1\alpha$ -O-acyl-vitaminer ved sur solvolyse. Dette resultat var fuldstændig umuligt at forudsige, eftersom den allyliske  $1\alpha$ -oxygengruppe i en  $1\alpha$ -hydroxycyclovitamin-D-forbindelse kunne forventes at være labil under solvolysens reaktionsbetingelser. Direkte solvolyse af  $1\alpha$ -hydroxycyclovitamin-D kan udføres i nærvær af organiske carboxylsyrer f. eks.  
20 eddikesyre, myresyre med efterfølgende indvinding af det tilsvarende 3-O-acyl- $1\alpha$ -hydroxyvitamin-D-derivat samt omdannelse af et sådant derivat til den tilsvarende hydroxyforbindelse.

25 Det er ligeledes vigtigt, at en hvilkensomhelst terciær eller allylalkoholgruppe, der måtte befinde sig i sidekæden, beskyttes i form af de tilsvarende acylater eller andre egnede syrestabile beskyttelsesgrupper. Det fremstillede  $1\alpha$ -O-acyl-vitamin-D indvindes fra solvolyséblandingen ved opløsningsmiddelekstraktion, og det oprenses yderligere ved chromatografering. Solvolyse-omsætningen fører såvel til  $1\alpha$ -O-acyl-vitamin-D, der er i be-  
30 siddelse af den naturlige 5,6-cis-dobbeltbindingsgeometri, som til det tilsvarende  $1\alpha$ -O-acyl-vitamin-D med

5 en 5,6-trans-geometri i et indbyrdes mængdeforhold på ca. 5:1. Disse produkter kan let adskilles ved opløsningsmiddelekstraktion og chromatografering til dannelse i ren form af  $1\alpha$ -O-acyl-vitamin-D-produkt med den nedenfor anførte almene strukturformel (såvel som om ønsket den tilsvarende 5,6-trans-isomere),



10 hvori Y betyder en lavere acylgruppe ( f.eks. acetyl) eller en aromatisk acylgruppe (f.eks. benzoyl), og hvori R betyder en hvilken som helst af de tidligere definerede sterol-sidekæder, idet det må forstås, at alle hydroxylgrupper foreligger som deres tilsvarende O-acyl-derivater.

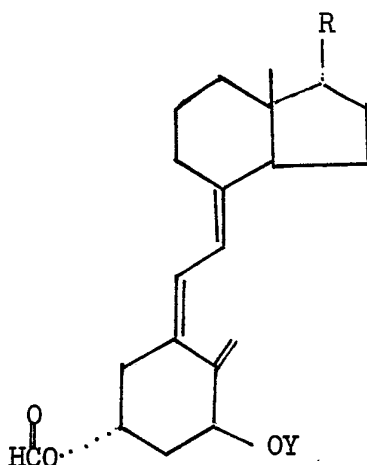
15  $1\alpha$ -O-acyl-vitamin-D-derivaterne omdannes let til de ønskede  $1\alpha$ -hydroxyvitamin-D-forbindelser ved hydrolytisk eller reducerende fjernelse af acyl-beskyttelsesgrupperne. Den særlige metode, der vælges, vil afhænge af arten af forbindelser, og særligt ligeledes af arten af sidekædegruppen R og dennes substituent. Det må f. eks. forstås, at man ikke vil anvende reduktionen med hydrid, hvis man skal undgå samtidig reduktion af en anden gruppe, 20 der er udsat for reduktion f. eks. en keton eller ester, idet man ellers på passende måde vil modificere sådanne

grupper forud for fjernelsen ved reduktion af acyl-grupperne. Behandling af den acylerede forbindelse med et passende hydrid-reduktionsmiddel (f. eks. lithium-aluminiumhydrid) fører således til den tilsvarende  $\alpha$ -hydroxyvitamin-D-forbindelse. Tilsvarende omdanner en mild basisk hydrolyse (f. eks. KOH/MeOH) den acylerede forbindelse til det ønskede  $\alpha$ -hydroxyderivat, idet man må forstå, at i de tilfælde, hvor sidekæden indeholder sterisk hindrede (f.eks. tertiære) O-acylgrupper, vil det være påkrævet at anvende kraftigere reaktionsbetingelser (forhøjede temperaturer, forlænget reaktionstid). De ved begge metoder fremstillede  $\alpha$ -hydroxyvitamin-D-forbindelser indvindes let i ren form ved opløsningsmiddelekstraktion (f. eks. ether) og chromatografering og/eller omkrystallisation ud fra et egnet opløsningsmiddel.

En alternativ og hidtil ukendt fremgangsmådevariant til omdannelse af  $\alpha$ -O-acyl-cyclovitamin-D-forbindelserne til de tilsvarende vitamin-D-derivater består i syrekatalyseret solvolyse af cyclovitamin-D-forbindelsen i et reaktionsmilieu betående af en organisk syre (f. eks. eddikesyre, myresyre) eller af en organisk syre med et co-opløsningsmiddel såsom acetone eller dioxan, hvis dette er nødvendigt til solubilisering af cyclovitaminet. Det er en særlig fordel ved denne fremgangsmåde, at dersom sidekædegruppen R indeholder en tertiær hydroxylgruppe (f.eks. 25-hydroxygruppen), er beskyttelsen af sådanne grupper f. eks. i form af deres acyl-derivater ikke nødvendig. Som et eksempel vil således solvolyse af  $\alpha$ -O-acetoxycyclovitamin-D<sub>3</sub> i iseddikesyre føre til  $\alpha$ -acetoxyvitamin-D<sub>3</sub>-3 $\beta$ -acetat, såvel som til noget af den tilsvarende 5,6-trans-forbindelse (indbyrdes produktforhold ca. 3:1). Disse reaktionsprodukter kan adskilles ved chromatografering, eller blandingen kan hydrolyseres under basiske betingelser (såsom KOH/MeOH) til dannelse af  $\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>3</sub> og det tilsvarende  $\alpha$ -hydroxy-5,6-trans-

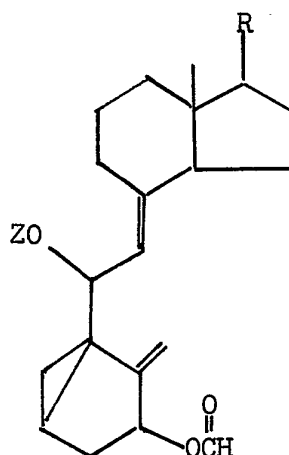
vitamin-D<sub>3</sub>, som derpå kan adskilles ved chromatografi. Denne metode kan anvendes på en hvilken som helst 1α-O-acyl-cyclovitamin-D-forbindelse, der har en hvilken som helst af de tidligere i denne fremstilling definerede sidekædegrupper R.

Endnu mere fordelagtigt kan solvolysen af  $\alpha$ -O-acyl-cyclovitaminerne udføres i myresyre eller myresyre plus et egnet co-opløsningsmiddel såsom dioxan. Denne omsætning fører til dannelsen af  $\alpha$ -O-acyl-vitamin-D- $3\beta$ -formiat-derivaterne, som er gengivet ved følgende formel:



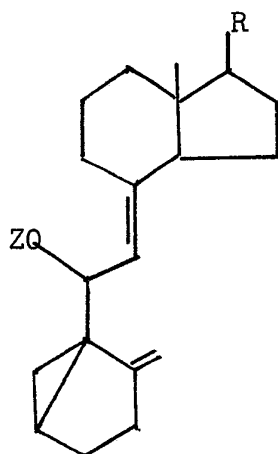
15 hvori Y betyder en lavere acylgruppe (fortrinsvis ikke  
formyl) eller en aromatisk acylgruppe, og hvori R bety-  
der en hvilkensomhelst af de tidligere definerede side-  
kædegrupper. Den tilsvarende 5,6-trans-forbindelse dannes  
igen her ligeledes i mindre omfang. Eftersom 3 $\beta$ -O-formyl-  
gruppen meget let hydrolyseres under betingelser, hvor-  
ved 1 $\alpha$ -O-acylgruppen ikke påvirkes (f. eks. ved behand-  
ling med kaliumcarbonat i nogle få minutter, således  
som det vises ved specifikke eksempler), omdannes den

- ovenfor beskrevne blanding 3-O-formylreaktionsprodukter  
let til  $1\alpha$ -O-acyl-vitamin-D og dettes tilsvarende 5,6-  
trans-isomere. Denne blanding kan bekvemt adskilles  
på dette trin ved chromatografiske fremgangsmåder til  
5 dannelsen af rent  $1\alpha$ -O-acyl-vitamin D og det tilsvarende  
5,6-trans- $1\alpha$ -O-acyl-vitamin D, som nu hver for sig kan  
underkastes basisk hydrolyse eller en reducerende spalt-  
ning af acylgruppen til dannelsen af  $1\alpha$ -hydroxyvitamin-D-  
forbindelse samt 5,6-trans- $1\alpha$ -hydroxyvitamin-D-forbindelsen.
- 10 En anden hidtil ukendt fremgangsmådevariant til omdannelse  
af  $1\alpha$ -O-acyl-cyclovitamin-derivater til  $1\alpha$ -O-acyl-3 $\beta$ -for-  
myl-vitamin-D-forbindelser med den ovenfor anførte for-  
mel indebærer anvendelsen af såkaldte kroneether-  
-katalysatorer. F. eks. omdanner et tofasesystem bestå-  
15 ende af myresyre og et carbonhydrid (f. eks. hexan/ben-  
zen) som opløsningsmiddel for  $1\alpha$ -O-acyl-cyclovitamin-  
D, og som indeholder en passende kroneether (f. eks.  
15-krone-5, Aldrich Chemical Company, Milwaukee) samt  
formiat-ionen  $1\alpha$ -O-acyl-cyclovitaminet til  $1\alpha$ -O-acyl-  
20 3 $\beta$ -O-formyl-vitamin-D-derivatet med et godt udbytte.  
Den tilsvarende 5,6-trans-isomere dannes i mindre mæng-  
de og kan bekvemt frasepareres ved chromatografering.
- En yderligere variant af de ovenfor beskrevne fremgangs-  
måder består i, at man omdanner en  $1\alpha$ -hydroxycyclovitamin-  
25 D-forbindelse til det tilsvarende  $1\alpha$ -O-formylderivat  
(f. eks. ved hjælp af eddikesyre-myresyreanhydrid i py-  
ridin), og denne forbindelse kan beskrives med følgende  
formel:



hvori R betyder en hvilken som helst af de tidligere de-  
 finerede sidekædegrupper, og Z betyder lavere alkyl, og  
 idet man underkaster dette mellemprodukt solvolyse i  
 iseddikesyre som tidligere beskrevet til dannelsen af  
 5  $\alpha$ -formyloxy-vitamin-D-3 $\beta$ -acetat og som et produkt i  
 ringere omfang den tilsvarende 5,6-trans-isomere.  
 Fjernelse af formylgruppen fører som ovenfor beskrevet  
 til  $\alpha$ -hydroxyvitamin-D-3-acetat og dets 5,6-trans-  
 isomere, som bekvemt kan adskilles på dette trin ved chro-  
 10 matografering og derpå hver for sig underkastes hydro-  
 lyse eller reducerende spaltning af acetaterne til dan-  
 nelse af en ren  $\alpha$ -hydroxyvitamin-D-forbindelse og dennes  
 5,6-trans-isomere.

15 Allyl-oxidationsfremgangsmåden ifølge den foreliggende  
 opfindelse kan ligeledes udføres på cyclovitamin-D-for-  
 bindelser, der indeholder 6-hydroxyl eller 6-O-acyl-  
 grupper. Cyclovitamin-D-forbindelser med følgende struk-  
 turformel:



5 hvori Z betyder hydrogen og R betyder en hvilken som helst af de tidligere definerede sidekædegrupper, kan således oxideres ved carbon 1 ved hjælp af allyl-oxidationsfremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse til dannelsen af 1 $\alpha$ -hydroxy-6-hydroxycyclovitamin-D-forbindelser samt 1-oxo-6-hydroxycyclovitamin-D-forbindelser.

Under de ovenfor beskrevne oxydationsbetingelser kan også forekomme i nogen udstrækning cycloreversion af  $1\alpha$ -hydroxy-6-hydroxycyclovitamin-D-forbindelsen til en blanding af 5,6-cis og 5,6-trans- $1\alpha$ -hydroxyvitamin-D-forbindelserne.

5 Samtlige produkter indvindes let fra oxydationsblandingen ved chromatografering. De ved allyl-oxydation fremstillede  $1\alpha$ -hydroxy-6-hydroxycyclovitamin-D-forbindelser kan let acyleres (f.eks. acetyleres) ved hjælp af den tidligere beskrevne standardfremgangsmåde, og de således fremstillede 10 1,6-diacyl-cyclovitamin-D-syntesemelleprodukter omdannes let ved syresolvolyse, som ovenfor omtalt, til 5,6-cis og 5,6-trans- $1\alpha$ -O-acyl-vitamin-D-forbindelser, der let adskilles ved chromatografering. Hydrolyse (ved kendte metoder) af 1-O-acyl-derivaterne fører til de ønskede  $1\alpha$ -hydroxyvitamin-D-produkter samt henholdsvis disses 5,6-trans-isomerer. 15 1-oxo-6-hydroxycyclovitamin-D-produkterne reduceres let ved hjælp af hydrid-reaktanter til  $1\alpha$ -hydroxycyclovitamin-derivater.

På tilsvarende måde kan man omdanne cyclovitamin-D-forbindelser med den viste strukturformel, hvor Z betyder acyl (f.eks. acetyl, benzoyl), og R betyder en hvilken som helst 20 af de tidligere nævnte sidekædegrupper, ved hjælp af på hinanden følgende allyl-oxydation, acylering, syresolvolyse og til sidst hydrolyse af acylgrupperne som beskrevet i forbindelse med de 6-hydroxyanaloge til  $1\alpha$ -hydroxyvitamin-D-produkter og disses tilsvarende 5,6-trans-isomerer. 25

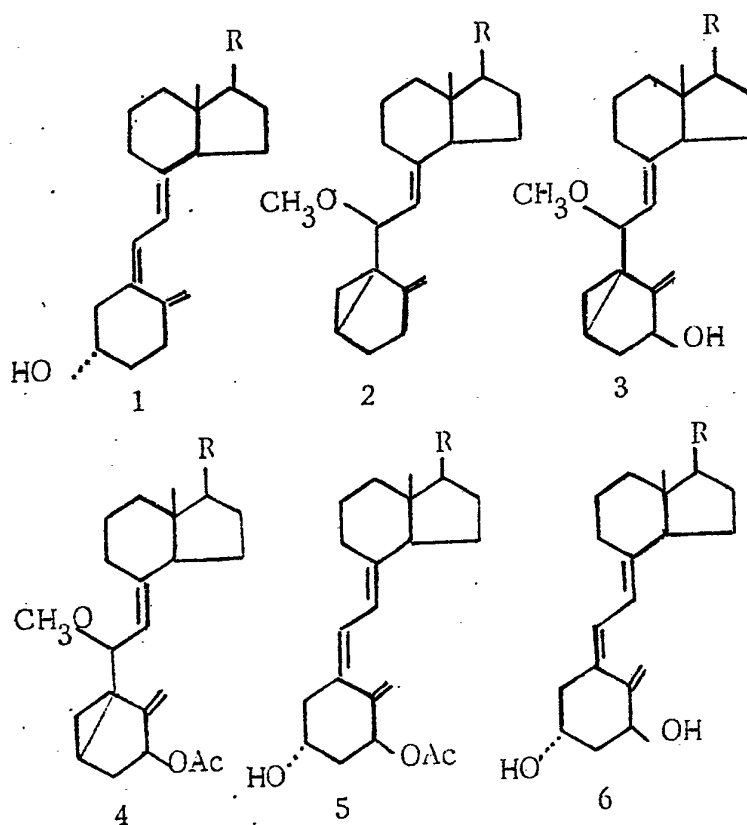
En yderligere bemærkelsesværdig og uventet opdagelse, der blev gjort under udarbejdelsen af den foreliggende opfindelse, er det forhold, at  $1\alpha$ -hydroxyvitamin-D-forbindelser 30 let og med stort udbytte omdannes til  $1\alpha$ -hydroxycyclovitamin-D-forbindelser ved solvolyse af  $3\beta$ -tosylaterne (eller mesylaterne) af  $1\alpha$ -hydroxy- eller  $1\alpha$ -O-acyl-vitamin-D-derivaterne. For eksempel fører  $1\alpha$ -acetoxycyclovitamin-D<sub>3</sub>-3-tosylat ved solvolyse under anvendelse af de tidligere beskrevne 35 reaktionsbetingelser, f. eks. opvarmning i methanol som

opløsningsmiddel indeholdende  $\text{NaHCO}_3$  til 1 $\alpha$ -hydroxy-6-methoxy-3,5-cyclovitamin- $\text{D}_3$ . Oxydation af dette reaktionsprodukt (f. eks. med  $\text{MnO}_2$  i  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  som opløsningsmiddel) fører til den tilsvarende 1-oxo-6-methoxy-3,5-cyclovitamin- $\text{D}_3$ -analoge som

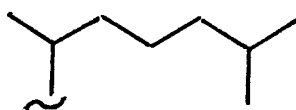
5 beskrevet i de særlige eksempler.

I de efterfølgende eksempler, som udelukkende er ment som belysende, svarer de tal, der identificerer enkelte produkter, f.eks. 3a for 1 $\alpha$ -hydroxycyclovitamin- $\text{D}_3$  til de i de efterfølgende formelbilleder anbragte numre ved de til sådanne

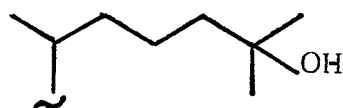
10 produkter hørende forskellige strukturformler.



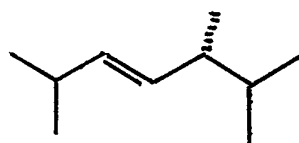
a: R =



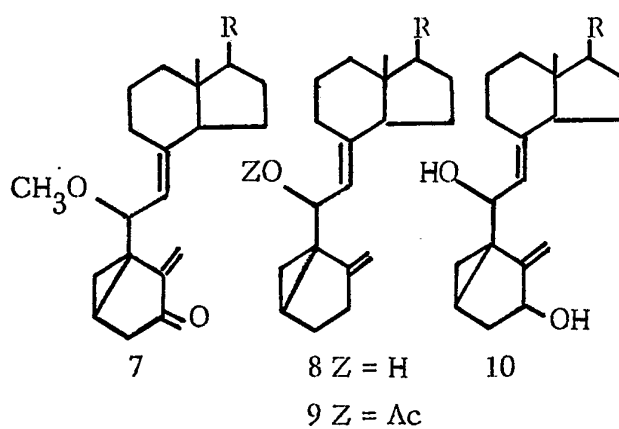
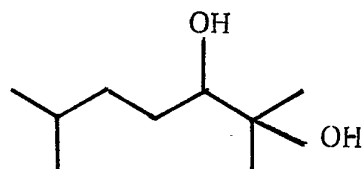
b: R =

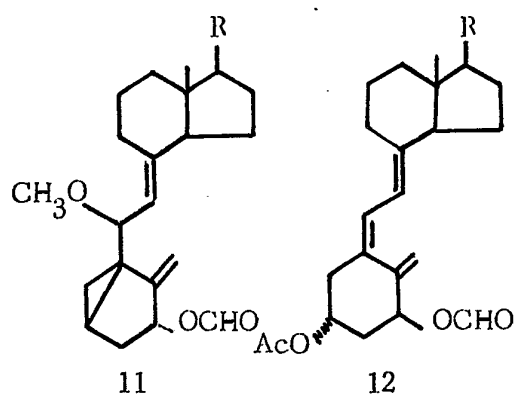


c: R =

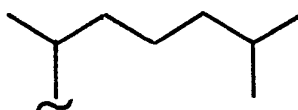


d: R =

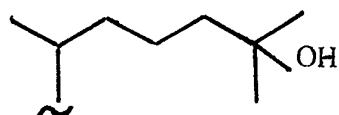




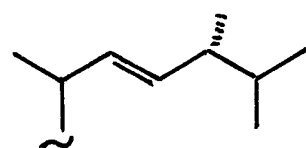
a: R =



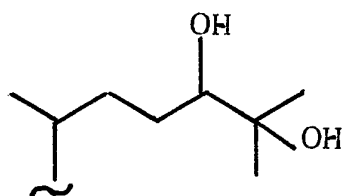
b: R =



c: R =



d: R =



Eksempel 1

1 $\alpha$ -Hydroxycyclovitamin-D<sub>3</sub> (3a) og 1-oxo-cyclovitamin-D<sub>3</sub> (7a):

Til en under omrøring værende suspension af 1,4 mg ( $1,2 \times 10^{-5}$  mol) SeO<sub>2</sub> i 1,0 ml tørt CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> tilsættes 7  $\mu$ l ( $5,1 \times 10^{-5}$  mol) af en 70% opløsning af tert-butyl-hydroperoxid (t-BuOOH). Efter omrøring i 25 minutter tilsættes dråbe for dråbe en opløsning af 9 mg ( $2,3 \times 10^{-5}$  mol) 3,5-cyclovitamin-D<sub>3</sub> (forbindelse 2a fremstillet ud fra vitamin-D<sub>3</sub> (1a) ved den af Sheves & Mazur i J. Am. Chem. Soc. 97, 6249 (1975) angivne metode) i 0,5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Blandingen omrøres ved stuetemperatur i yderligere 25 minutter. Derpå tilsættes 2,0 ml 10% NaOH, og den således fremstillede blanding fortyndes med 15 ml diethylether. Den organiske fase frasepareres og vaskes efter hinanden med 10% NaOH (2 x 10 ml), H<sub>2</sub>O (2 x 10 ml), mættet FeSO<sub>4</sub> (3 x 10 ml) og mættet NaCl (15 ml), hvorpå der tørres over MgSO<sub>4</sub>. Fjernelse af opløsningsmidlet under vacuum fører til et olieagtigt råprodukt, som efter chromatografering på en silicagel-tyndtlagsplade (10 x 20 cm, 750  $\mu$ m) fremkaldes i 30% ethylacetat/Skellysolve B, hvilket fører til 4,5 mg (43% udbytte) af 1 $\alpha$ -hydroxy-3,5-cyclovitamin-D<sub>3</sub> (3a): massespektrum: (m/e 414(30), 382(70), 341(35), 269(20), 247(45), 174(25), 165(30), 135(65); NMR,  $\delta$ , 0,53(3H, s 18-H<sub>3</sub>), 0,61 (2H, m, 4-H<sub>2</sub>), 0,87 (6H, d, 26-H<sub>3</sub> og 27-H<sub>3</sub>), 0,92 (3H, d, 21-H<sub>3</sub>), 3,26 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 4,18 (1H, d, J=9,0 Hz, 6-H), 4,22 (1H, m, 1-H), 4,95 1H, d, J=9 Hz, 7-H), 5,17 (1H, d, J=2,2 Hz, 19(Z)-H), 5,25 (1H, d, J=2,2 Hz, 19(E)-H).

Som en bestanddel i mindre mængde 2,0 mg (19% udbytte) 1-oxo-cyclovitamin-D<sub>3</sub> (7a) isoleret fra reaktionsblandingen: massespektrum: (m/c 412(40), 380(50), 267(15), 247(23), 135(50), 133(100); NMR,  $\delta$ , 0,49 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,58 (2H, m, 4-H<sub>2</sub>), 0,87 (6H, d, 26-H<sub>3</sub>), 0,93 (3H, d, 21-H<sub>3</sub>), 3,30 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 4,07 (1H, d, J=9,0 Hz, 6-H), 5,02 (1H, d, J=9,0 Hz, 7-H), 5,62 (1H, s, 19(Z)-H), 6,04 (1H, s, 19(E)-H); UV 248 (4000).

1 $\alpha$ -Acetoxy-cyclovitamin-D<sub>3</sub> (4a):

Forbindelsen 3a (1,5 mg) opløses i 200  $\mu$ l tør pyridin og 50  $\mu$ l eddikesyreanhydrid. Blandingen holdes ved stuetemperatur natten over og fortyndes derpå med 5 ml mættet NaHCO<sub>3</sub> opløsning. Denne opløsning ekstraheres med tre 5 ml portioner ether, og de organiske ekstrakter vaskes med H<sub>2</sub>O (2 x 10 ml), tørres over MgSO<sub>4</sub>, og opløsningsmidlet fjernes under vacuum, hvilket fører til forbindelsen 4a: NMR,  $\delta$ , 0,53 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,69 (2H, m, 4-H<sub>2</sub>), 0,87 (6H, d, 26-H<sub>3</sub> og 27-H<sub>3</sub>), 0,92 (3H, d, 21-H<sub>3</sub>), 2,10 (3H, s, 1-OAc), 3,26 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 4,18 (1H, d, J=9,2 Hz 6-H), 4,98 (1H, d, J=9,2 Hz, 7-H), 4,98 (1H, d, J=2, 1 Hz, 19(Z)-H), 5,23 (1H, m, 1-H), 5,25 (1H, d, J=2, 1 Hz, 19(e)-H).

1 $\alpha$ -Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub> (6a):

En opløsning af 1,3 mg af forbindelsen (4a) i 0,5 ml af en blanding i forholdet 3:1 af 1,4-dioxan og H<sub>2</sub>O opvarmes til 55°C, 0,2 mg p-toluensulfonsyre i 4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O tilsættes, og opvarmningen fortsættes i 0,5 timer. Omsætningen slukkes derpå med 2 ml mættet NaHCO<sub>3</sub>, og der ekstraheres med to 10 ml portioner ether. De organiske ekstrakter tørres over MgSO<sub>4</sub>, og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Råproduktet tilføres derpå en 10 x 20 cm silicagelplade, der fremkaldes i 30% ethylacetat/Skellysolve B til dannelse af 400  $\mu$ g af produktet 5a: UV,  $\lambda$  max 264 nm; massespektrum, m/e 442 (M<sup>+</sup>, 75), 382(70), 269(15), 134(100); NMR,  $\delta$ , 0,52 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,86 (6H, d, J=5,5 Hz, 26-H<sub>3</sub> og 27-H<sub>3</sub>), 0,91 (3H, d, J=5,9 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 2,03 (3H, s, 1-OCOCH<sub>3</sub>), 4,19 (1H, m, 3-H), 5,04 (1H, d, J=1,5 Hz, 19(Z)-H), 5,31 (1H, m(skarp), 19(E)-H), 5,49 (1H, m, 1-H), 5,93 (1H, d, J=11,4 Hz, 7-H), 6,37 (1H, d, J=11,4 Hz, 6-11).

Produktet 5a opløses i 0,5 ml ether og behandles med overskud af  $\text{LiAlH}_4$ . Omsætningen slukkes med mættet  $\text{NaCl}$  opløsning, og produktet isoleres ved filtrering og afdampning af opløsningsmidlet under vacuum. Det eneste produkt (6a) co-chromatograferes sammen med en standardprøve af  $1\alpha$ -hydroxyvitamin- $\text{D}_3$  i 97:3  $\text{CHCl}_3$ : $\text{CH}_3\text{OH}$  ( $1\alpha$ -hydroxyvitamin- $\text{D}_3$   $R_f=0,10$ ,  $1\beta$ -hydroxyvitamin- $\text{D}_3$   $R_f = 0,15$ , reaktionsprodukt (6a),  $R_f = 0,10$ ). Dette produkt har  $\lambda_{\text{max}} = 264 \text{ nm}$  og et massespektrum og NMR spektrum identisk med de for autentisk  $1\alpha$ -hydroxyvitamin- $\text{D}_3$  fundne.

### Eksempel 2

#### 25-Hydroxycyclovitamin- $\text{D}_3$ (2b):

En opløsning af 100 mg 25-hydroxyvitamin- $\text{D}_3$  (1b) og 150 mg p-toluensulfonylchlorid i 0,5 ml tør pyridin får lov til at omsætte sig i 24 timer ved  $30^\circ\text{C}$ , hvorpå der slukkes med 5 ml mættet  $\text{NaHCO}_3$ . Den vandige fase ekstraheres med ether (2 x 10 ml), og etherekstrakten vaskes med mættet  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 10 ml), 3%  $\text{HCl}$  (2 x 10 ml) og  $\text{H}_2\text{O}$  (2 x 10 ml) og tørres derpå over  $\text{MgSO}_4$ . Opløsningsmidlet fjernes under vacuum, og den rå inddampningsrest (25-hydroxyvitamin- $\text{D}_3$ -3-tosylat) optages i 1,5 ml vandfri methanol og 0,3 ml vandfri acetone; der tilsættes 170 mg (8 ækvivalenter)  $\text{NaOAc}$ , og opløsningen opvarmes til  $55^\circ\text{C}$  i 20 timer. Blandingen køles, fortyndes med 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  og ekstraheres med 3 x 10 ml ether. De organiske ekstrakter vaskes med tre 10 ml portioner  $\text{H}_2\text{O}$ , tørres over  $\text{MgSO}_4$ , og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Denne rå inddampningsrest påføres en 20 cm x 20 cm silicagel TLC-plade (750  $\mu\text{m}$  tyk), som fremkaldes en gang i et system af Skellysolve B:ethylacetat (8:2), hvilket fører til 48 mg (45% totaludbytte beregnet ud fra 1b) af (2b): massespektrum, m/e: 414 ( $\text{M}^+$ , 40), 399(10), 382(80), 253(50), 59(100); NMR,  $\delta$ , 0,53 (3H, s, 18- $\text{H}_3$ ), 0,74 (2H, m, 4- $\text{H}_2$ ), 0,94 (3H,

d,  $J=6,2$  Hz,  $21-H_3$ ), 1,21 (6H, s,  $26-H_3$  og  $27-H_3$ ), 3,25 (3H, s,  $6-OCH_3$ ), 4,16 (1H, d,  $J=9,2$  Hz, 6-H), 4,89 (1H, m(skarp), 19(Z)-H), 4,99 (1H, d,  $J=9,3$  Hz, 7-H), 5,04 (1H, m(skarp), 19(E)-H).

- 5 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycyclovitamin- $D_3$  (3b) og 1-oxo-hydroxycyclovitamin- $D_3$  (7b):

En blanding af 2,45 mg (0,5 ækv.)  $SeO_2$ , 14  $\mu$ l (2 ækv.) t-BuOOH og 1,2 ml tør  $CH_2Cl_2$  får lov til at omsætte sig ved stuetemperatur i 30 minutter. En opløsning af cyclovitamin (2b) i 10 0,5 ml  $CH_2Cl_2$  tilsættes dråbe for dråbe til dette oxyderende miljø, og omsætningen fortsættes i 15 minutter. Omsætningen slukkes derpå med 2,0 ml 10% NaOH og fortyndes med 20 ml diethylether. Den organiske fase frasepareres og vaskes på hinanden følgende med 10% NaOH,  $H_2O$ , mættet  $FeSO_4$  opløsning, mættet 15  $NaHCO_3$  og igen med  $H_2O$ , og derpå tørres den over  $MgSO_4$ . Opløsningsmidlet fjernes under vacuum, og den rå inddampningsrest sættes på en silicagel tyndtlagsplade (20 cm x 20 cm, 750  $\mu$ m tyk), som fremkaldes i et system Skellysolv B:ethylacetat (6:4), hvilket fører til 11 mg (53% udbytte) af produktet (3b): massespektrum: m/e 430( $M^+$ , 15), 412(12), 380(35), 269(10), 59(100); NMR,  $\delta$  0,53 (3H, s,  $18-H_3$ ), 0,61 (2H, m, 4- $H_2$ ), 0,93 (3H, d,  $J=6,2$  Hz,  $21-H_3$ ), 1,21 (6H, s,  $26-H_3$  og  $27-H_3$ ), 3,25 (3H, s,  $6-OCH_3$ ), 4,17 (1H, d,  $J=9,2$  Hz, 6-H), 4,20 (1H, m, 1-H), 4,95 (1H, d,  $J=9,2$  Hz, 7-H), 5,19 20 (1H, d,  $J=1,9$  Hz, 19(Z)-H), 5,22 (1H, d,  $J=1,9$  Hz, 19(E)-H). Som komponent i mindre mængde blev 1-oxo-25-hydroxycyclovitamin- $D_3$  (7b) isoleret (15%) fra reaktionsblandingen. Massespektrum: m/e 428 ( $M^+$ ).

1 $\alpha$ ,25-Dihydroxycyclovitamin-D<sub>3</sub>-1,25-diacetat (4b-25-OAc):

En opløsning af 7 mg (3b) i 200  $\mu$ l tør pyridin behandles med 10  $\mu$ l eddikesyreanhydrid. Reaktionssystemet gennem-  
bobbles med N<sub>2</sub> og opvarmes til 97°C i 16,0 timer. Efter  
5 køling fortyndes blandingen med 5 ml mættet NaHCO<sub>3</sub>. Den  
vandige blanding ekstraheres med to 10 ml portioner ether,  
og den organiske fase vaskes på hinanden følgende med to  
10 ml portioner mættet NaHCO<sub>3</sub> og derpå med 10 ml H<sub>2</sub>O.  
Efter tørring over MgSO<sub>4</sub> fjernes opløsningsmidlet og til-  
bageværende pyridin ved azeotrop destillation med ben-  
10 zen under vacuum. Råproduktet sættes derpå til en silica-  
gel tyndtlagsplade (10 cm x 20 cm, 750  $\mu$ m tyk), der frem-  
kaldes i Skellysolve B:ethylacetat (8:2) til dannelse af  
6 mg (72%) af diacetatet (4b, 25-OAc) og 1,2 mg af det  
15 tilsvarende 3-acetoxy-25-hydroxy-derivat.

1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-1,25-diacetat (5b,25-OAc):

Til 3,8 mg af (4b,25-OAc), der er opløst i 400  $\mu$ l dioxan:  
H<sub>2</sub>O (3:1), og som er opvarmet til 55°C, tilsættes 8  $\mu$ l af  
en opløsning af p-toluensulfonsyre i H<sub>2</sub>O, og opvarmningen  
20 fortsættes i 10 minutter. Omsætningen slukkes med mættet  
NaHCO<sub>3</sub>, og der ekstraheres med to 10 ml ether. Etheropløs-  
ningen vaskes med to 10 ml portioner H<sub>2</sub>O og tørres over  
MgSO<sub>4</sub>. Opløsningsmidlet fjernes under vacuum, og indamp-  
ningsresten sættes til en silicagel tyndtlagsplade (5 x 20  
25 cm, 250  $\mu$ m tyk), som fremkaldes i Skellysolve B:ethylacetat  
(8:2) til dannelse af 1,8 mg (45%) af produktet (5b,25-OAc):  
UV;  $\lambda$  max 265 nm; massespektrum: m/e 500(M<sup>+</sup>, 25), 440(55), 422(15),  
398(10), 380(45), 134(100); NMR,  $\delta$ , 0,52 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,92  
(3H, d, J=6,2 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,42 (6H, s, 26-H<sub>3</sub> og 27-H<sub>3</sub>), 1,97

(3H, s, 25-OCOCH<sub>3</sub>), 2,03 (3H, s, 1-OCOCH<sub>3</sub>), 4,18 (1H, m, 3-H), 5,03 (1H, d, J=1,1 Hz, 19(Z)-H), 5,31 (1H, m (skarp), 19(E)-H), 5,49 (1H, m, 1-H), 5,93 (1H, d, J=11,4 Hz, 7-H), 6,37 (1H, d, J=11,4 Hz, 6-H).

### 5 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> (6b):

Til en under omrøring værende opløsning af 1,0 mg af diacetatet (5b, 25-OAc) i 1,5 ml ether sættes 0,5 ml af en etheropløsning mættet med LiAlH<sub>4</sub>. Efter 10 minutter ved stuetemperatur slukkes omsætningen med mættet NaCl opløsning, og saltene opløses ved tilsætning af 3% HCl. Den vandige fase ekstraheres med ether, og etherekstrakterne vaskes med H<sub>2</sub>O og tørres derpå over MgSO<sub>4</sub>. Tyndtlagchromatografi (5 x 20 cm silicagelplader, 250  $\mu$ m tyk) under anvendelse af 5% MeOH: CHCl<sub>3</sub> fører til 0,6 mg (70%) 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> (6b), der udviser et UV-spektrum med  $\lambda_{\text{max}}$  265 nm. Identiteten af 6b som værende 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> fastslås ved direkte sammenligning af masse og NMR spektre med sådanne, som opnås fra autentisk materiale, såvel som ved co-chromatografering af produktet 6b sammen med autentisk 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>.

### Eksempel 3

#### Cyclovitamin D<sub>2</sub> (2c):

En opløsning af 100 mg vitamin D<sub>2</sub> (1c) og 100 mg p-toluensulfonylchlorid i 0,3 ml pyridin får lov til at omsætte sig i 24 timer ved 3<sup>o</sup>C, og omsætningen slukkes derpå med 10 ml mættet NaHCO<sub>3</sub>. Den vandige blanding ekstraheres med to 10 ml portioner ether, og etherekstraktet vaskes på hinanden følgende med mættet NaHCO<sub>3</sub> (3 x 10 ml), 3% HCl (2 x 10 ml), og H<sub>2</sub>O (2 x 10 ml), hvorpå det tørres over MgSO<sub>4</sub>. Opløsningsmidlet fjernes under vacuum, og det rå vitamin-D<sub>2</sub>- $\beta$ -tosylat

- opløses i 1,5 ml vandfri methanol og 0,3 ml vandfri acetone. Efter tilsætning af 170 mg natriumacetat opvarmes opløsningen til 55°C i 20 timer. Efter nedkøling fortyndes opløsningen med 10 ml H<sub>2</sub>O og ekstraheres med tre 10 ml portioner ether.
- 5 De organiske ekstrakter vaskes med tre 10 ml portioner H<sub>2</sub>O, tørres med MgSO<sub>4</sub>, og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Inddampningsresten chromatograferes på en silicagel tyndtlagsplade (20 x 20 cm, 750 µm) i Skellysolve B:ethylacetat (8:2), hvilket fører til 60 mg (59%) af (2c): massespektrum:
- 10 m/e 410(M<sup>+</sup>, 15), 378(40), 253(40), 119(60); NMR,  $\delta$ , 0,55 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,74 (2H, m, 4-H<sub>2</sub>), 0,82 og 0,84 (6H, dd, J=4,1 Hz, 26-H<sub>3</sub> og 27-H<sub>3</sub>), 0,91 (3H, d, J=7,0 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,02 (3H, d, J=6,6 Hz, 28-H<sub>3</sub>), 3,26 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 4,13 (1H, d, J=9,6 Hz, 6-H), 4,89 (1H, m, 19(Z)-H), 5,00 (1H, d, J=9,4 Hz, 7-H), 5,04 (1H, m(skarp), 19(E)-H), 5,20 (2H, m, 22-H og 23-H).

1 $\alpha$ -Hydroxycyclovitamin-D<sub>2</sub> (3c) og 1-oxo-cyclovitamin-D<sub>2</sub> (7c):

- En blanding af 2,7 mg SeO<sub>2</sub> og 13,4 µl 70% t-BuOOH i 1,5 ml tør CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> får lov til at omsætte sig i 30 minutter. Forbindelsen 2c (30 mg) i 0,5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> tilsættes derpå dråbe for dråbe, og omsætningen fortsættes igennem 15 minutter og slukkes derpå med 2,0 ml 10% NaOH. Opløsningen fortyndes med 15 ml ether, etherfasen frasepareres og vaskes på hinanden følgende med 10%
- 25 NaOH, H<sub>2</sub>O, mættet FeSO<sub>4</sub> opløsning, mættet NaHCO<sub>3</sub> og atter med H<sub>2</sub>O. Efter tørring over MgSO<sub>4</sub> fjernes opløsningsmidlet under vacuum, og indampningsresten påføres en silicagel tyndtlagsplade (20 x 20 cm, 750 µm), som fremkaldes en gang i et system Skellysolve B:ethylacetat (8:2), hvilket fører til 9,5
- 30 mg (45%) af forbindelsen (3c): massespektrum: m/e 426 (M<sup>+</sup>, 55), 394(75), 353(30), 269(40), 135(95); NMR,  $\delta$ , 0,53 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,63 (2H, m, 4-H<sub>2</sub>), 0,82 og 0,84 (6H, dd, 26-H<sub>3</sub> og 27-H<sub>3</sub>), 0,92 (3H, d, J=6,0 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,02 (3H, d, J=6,4 Hz, 28-H<sub>3</sub>),

- 3,26 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 4,18 (1H, d, J=9,6 Hz, 6-H), 4,21 (1H, m, 1-H), 4,94 (1H, d, J=9,6 Hz, 7-H), 5,17 (1H, m(skarp), 19(Z)-H), 5,19 (2H, m, 22-H og 23-H), 5,24 (1H, m(skarp), 19(E)-H). Endnu en komponent i mindre mængde isoleret fra reaktionsblandingen viste sig at være 1-oxo-cyclovitamin-D<sub>2</sub> (7c): massespektrum: m/e 424 (M<sup>+</sup>).

1α-Hydroxycyclovitamin-D<sub>2</sub>-1-acetat (4c):

- Til 6,5 mg af forbindelsen (3c) i 300 µl tørt pyridin tilsættes 150 µl eddikesyreanhydrid. Denne opløsning opvarmes til 55°C i 1,5 timer og fortyndes derpå med 5 ml mættet NaHCO<sub>3</sub> samt ekstraheres med to 10 ml portioner ether. De organiske ekstrakter vaskes med mættet NaHCO<sub>3</sub> og med H<sub>2</sub>O, tørres over MgSO<sub>4</sub>, og den resterende pyridin samt opløsningsmidlet fjernes ved azeotrop destillation med benzen under vacuum, hvilket fører til forbindelsen 4c: massespektrum: m/e 468 (M<sup>+</sup>, 40), 408(20), 376(65), 251(60), 135(100).

1α-Hydroxyvitamin-D<sub>2</sub>-1-acetat (5c):

- En opløsning af 5,0 mg af forbindelsen (4c) i 400 µl dioxan: H<sub>2</sub>O (3:1) opvarmes til 55°C; 12 µl af en vandig opløsning af p-toluensulfonsyre (50 µg/µl) tilsættes, og opvarmningen fortsættes i 10 minutter. Omsætningen slukkes derpå med mættet NaHCO<sub>3</sub>, og der ekstraheres med to 10 ml portioner ether. Den fraseparerede etherfase vaskes med 10 ml mættet NaHCO<sub>3</sub> og to 10 ml portioner H<sub>2</sub>O, tørres over MgSO<sub>4</sub>, og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Præparativ tyndtlagschromatografi på silicagel (Skellysolve B:ethylacetat, 8:2) fører til 1,6 mg af forbindelsen 5c (32% udbytte): UV; λ<sub>max</sub> 265 nm; masse-

- spektrum:  $m/e$  454( $M^+$ , 80), 394(80), 376(20), 269(40), 135(100);  
 NMR,  $\delta$ , 0,53 (3H, s, 18- $H_3$ ), 0,81 og 0,84 (6H, d,  $J=4,4$  Hz, 26- $H_3$  og 27- $H_3$ ), 0,91 (3H, d,  $J=7,0$  Hz, 21- $H_3$ ), 1,01 (3H, d,  $J=6,7$  Hz, 28- $H_3$ ), 2,03 (3H, s, 3- $OCOCH_3$ ), 4,18 (1H, m, 3-H),  
 5,03 (1H, d,  $J=1,5$  Hz, 19(Z)-H), 5,19 (2H, m, 22-H og 23-H),  
 5,3 (1H, m(skarp), 19(E)-H), 5,48 (1H, m, 1-H), 5,92 (1H, d,  $J=11,0$  Hz, 7-H), 6,37 (1H, d,  $J=11,0$  Hz, 6-H).

1 $\alpha$ -Hydroxyvitamin-D<sub>2</sub> (6c):

- 10 En opløsning af 1,1 mg af forbindelsen (5c) i 1,5 ml ether behandles med 0,5 ml af en etheropløsning, der er mættet med  $LiAlH_4$ . Efter 10 minutter ved stuetemperatur slukkes omsætningen med mættet NaCl, og saltene opløses i 3% HCl. Denne vandige opløsning ekstraheres med ether, og de organiske ekstrakter vaskes med vand og tørres over  $MgSO_4$ . TLC på 250  $\mu m$  tykke plader, 5 x 20 cm, i 5% methanol:chloroform fører til  
 15 0,8 mg (75% udbytte) af 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>2</sub>: UV:  $\lambda_{max}$  265 nm; massespektrum:  $m/e$  412( $M^+$ ), 394, 376, 287, 269, 251, 152, 134 (basetop); NMR:  $\delta$ , 0,56 (3H, s, 18- $H_3$ ), 0,82 og 0,84 (6H, dd,  $J=4,4$  Hz, 26- $H_3$  og 27- $H_3$ ), 0,92 (3H, d,  $J=6,6$  Hz, 21- $H_3$ ), 1,02 (3H, d,  $J=6,6$  Hz, 28- $H_3$ ), 4,23 (1H, m, 3-H), 4,42 (1H, m, 1-H), 5,00 (1H, m(skarp), 19(Z)-H), 5,20 (2H, m, 22-H og 23-H), 5,32 (1H, dd,  $J=1,4$  Hz, 19(E)-H), 6,02 (1H, d,  $J=11,1$  Hz, 7-H), 6,38 (1H, d,  $J=11,6$  Hz, 6-H). Disse spektraldata er  
 20 i fuld overensstemmelse med data, der er opnået for 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>2</sub>, som er fremstillet på en fuldstændig forskellig måde (Lam et al. Science, 186, 1038-1040 (1974)).  
 25

Eksempel 4Solvolyse af 1 $\alpha$ -Acetoxycyclovitamin-D i eddikesyre:

En opløsning af 3,0 mg 1 $\alpha$ -hydroxycyclovitamin-D<sub>3</sub>-1-acetat (4a) i 200  $\mu$ l iseddikesyre opvarmes 55°C i 15 minutter og slukkes derpå med iskold mættet NaHCO<sub>3</sub>. Den vandige blanding ekstraheres med diethylether, og den organiske fase vaskes med mættet NaHCO<sub>3</sub> og vand, tørres over MgSO<sub>4</sub> og filtreres til dannelse af en opløsning af 5,6-cis- og 5,6-trans-1 $\alpha$ -acetoxycyclovitamin-D<sub>3</sub>-3-acetaterne (UV:  $\lambda_{\text{max}}$  267-269 nm). Den tørrede etheropløsning behandles med en lille mængde (1,0 mg) lithiumaluminiumhydrid, slukkes med mættet NaCl, filtreres, og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Den rå olie påføres en 5 x 20 cm silicagel TLC plade (250  $\mu$ m tyk), som fremkaldes i 5% methanol:chloroform til dannelse af 1,6 mg af en blanding (UV,  $\lambda_{\text{max}}$  267-269 nm) af 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>3</sub> (6a) samt den tilsvarende 5,6-trans-isomere (5,6-trans-1 $\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>) i et indbyrdes forhold på 3:1, som fastlagt ved NMR-analyse: karakteristiske resonanser for cis-isomeren (6a):  $\delta$ , 6,38 og 6,01 (d, J=11,4 Hz, 6-H og 7-H), 5,33 (dd, J=1,5 Hz, 19(E)-H), 5,01 (skarp m, 19(Z)-H), 0,54 (s, 18-H<sub>3</sub>); for 5,6-trans-isomeren: 6,58 og 5,88 (d, J=11,4 Hz, 6-H og 7-H), 5,13 (d, J=1,4 Hz, 19(E)-H), 4,98 (skarp m, 19(Z)-H), 0,56 (s, 18-H<sub>3</sub>).

Den samme fremgangsmåde kan anvendes til at gennemføre spaltningen af cyclopropanringen (cycloreversionen) af andre cyclovitaminer eller deres C-1-oxygenerede analoge. Opvarmning som oven for beskrevet i iseddikesyre af 1 $\alpha$ -acetoxycyclovitamin-D<sub>3</sub> (forbindelse 4b, der kræves ikke beskyttelsesgruppe for 25-OH-gruppen) fører således til 1 $\alpha$ -acetoxycyclovitamin-D<sub>3</sub>-3-acetat som hovedproduktet (plus noget af den tilsvarende 5,6-trans-isomere som et mindre produkt), og denne blanding kan direkte hydrolyseres (MeOH/KOH) eller underkastes hydridreduktion som ovenfor beskrevet, hvilket fører til 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> som hovedproduktet samt 5,6-trans-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> som biproduktet.

EKSEMPEL 5Myresyre-katalyseret solvolyse af 1 $\alpha$ -acetoxycyclovitamin-D<sub>3</sub>:

En opløsning af 1 $\alpha$ -acetoxycyclovitamin-D<sub>3</sub> (4a) i tør dioxan opvarmes til 55°C og behandles med en opløsning i forholdet 1:1 af 98% s myresyre og dioxan (50  $\mu$ l/mg cyclovitamin) i 5 15 minutter. Reaktionen slukkes derpå med isvand, og der ekstraheres med ether. Etherextrakterne vaskes med vand, mættet NaHCO<sub>3</sub>, mættet NaCl, tørret over MgSO<sub>4</sub>, og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Råproduktet (1 $\alpha$ -acetoxy-3 $\beta$ - 10 formylvitamin-D<sub>3</sub> og dets 5,6-trans-isomere) opløses i en opløsning i forholdet 1:1 af dioxan og methanol, og en ækvi-valent mængde vandig K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 mg/100  $\mu$ l) tilsættes. Efter 5 minutter ved stuetemperatur fortyndes opløsningen med vand, og den ekstraheres gentagne gange med ether. Etherextrakterne 15 vaskes med vand, tørres over MgSO<sub>4</sub>, og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Den rå cis- og trans-blanding af 1-acetoxy-3-hydroxyvitaminerne chromatograferes derpå på en 10 x 20 cm, 750  $\mu$ m tyk silicagel plade i 1:3 ethylacetat:Skellysolve B, hvilket fører til det rene cis-1 $\alpha$ -acetoxyvitamin-D<sub>3</sub>. Basisk 20 hydrolyse (NaOH i methanol) fører til et produkt, som chromatografisk og spektralt er identisk med en autentisk prøve af 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>.

EKSEMPEL 66-Hydroxy-cyclovitamin-D<sub>3</sub> (8a):

25 En opløsning af 100 mg vitamin-D<sub>3</sub>, 100 mg TsCl og 500  $\mu$ l tør pyridin holdes ved 5°C i 24 timer og fortyndes derpå med ether og vaskes adskillige gange med mættet NaHCO<sub>3</sub>. Det organiske lag tørres over MgSO<sub>4</sub>, og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Det rå D<sub>3</sub>-tosylat bringes i suspension 30 i 4,0 ml acetone:H<sub>2</sub>O (9:1) sammen med 175 mg (8 ækv.) NaHCO<sub>3</sub>. Den således fremkomne blanding opvarmes til 55°C natten over, fortyndes med mættet NaCl og ekstraheres to

gange med ether. Etherextrakten vaskes en gang med vand, tørrres over  $\text{MgSO}_4$ , og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Præparativ TLC (20 x 20 cm, 750  $\mu\text{m}$ , 8:2 Skellysolve B: ethylacetat) fører til 55 mg af 6-hydroxy-3,5-cyclovitamin- $\text{D}_3$  (8a); massespektrum: m/e 384 ( $\text{M}^+$ ), 366, 253, 247.

$\text{SeO}_2$ /t-BuOOH-oxidation af 6-hydroxy-cyclovitamin- $\text{D}_3$  (8a):

Til en under omrøring værende suspension af 2,0 mg  $\text{SeO}_2$  i 1,5 ml tør  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  tilsættes 10  $\mu\text{l}$  70%'s t-BuOOH (tertiært butylhydroperoxid). Når homogenitet er opnået, tilsættes dråbe for dråbe en opløsning af 14 mg 6-hydroxy-cyclovitamin- $\text{D}_3$  (8a) i 500  $\mu\text{l}$  tør  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , og omsætningen fortsættes i 1,5 time ved stuetemperatur. Omsætningen slukkes med 10%'s NaOH, reaktionsblandingen fortyndes med ether, vaskes med 10%'s NaOH og vand, tørrres over  $\text{MgSO}_4$ , og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Den rå, olieagtige inddampningsrest chromatograferes (10 x 20 cm, 750  $\mu\text{m}$ , 1:1 ethylacetat: Skellysolve B) til dannelse af 1,5 mg (10%) 1-oxo-6-hydroxy-cyclovitamin- $\text{D}_3$ : massespektrum: (m/e), 398 (35), 380 (25), 247 (25), 135 (40), 133 (100); 2,0 mg (15%) 1 $\alpha$ ,6-dihydroxy-cyclovitamin- $\text{D}_3$  (10a): massespektrum: (m/e), 400 (50), 382 (80), 269 (20), 247 (40), 135 (80), 133 (40); samt 2,0 mg (15%) 1 $\alpha$ -hydroxy-vitamin- $\text{D}_3$  (6a) og den tilsvarende 1 $\alpha$ -hydroxy-5,6-trans-isomere.

EKSEMPEL 7

Omdannelse af 1 $\alpha$ ,6-dihydroxy-cyclovitamin- $\text{D}_3$  (10a) til 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin- $\text{D}_3$  (6a):

En opløsning af 400  $\mu\text{l}$  tør pyridin, 200  $\mu\text{l}$  eddikesyre-anhydrid og 2,0 mg 1 $\alpha$ ,6-dihydroxy-cyclovitamin- $\text{D}_3$  (10a) opvarmes til 55°C i 2,0 time. Reaktionsblandingen fortyndes derpå med toluen og inddampes til tørhed. Den således fremkomne olie (1 $\alpha$ ,6-diacetoxy-cyclovitamin- $\text{D}_3$ ) optages i 100  $\mu\text{l}$  THF og behandles med 200  $\mu\text{l}$  97%'s  $\text{HCO}_2\text{H}$  i

15 minutter ved 55°C. Fortynding med mættet NaCl, ekstraktion med ether, vask med mættet NaHCO<sub>3</sub>, tørring over MgSO<sub>4</sub>, samt fjernelse af ether under vacuum fører til de rå 1-acetox-3-formiat-cis- samt trans-vitaminderivater. Selektiv  
 5 formiat-hydrolyse med K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> efterfulgt af chromatografering fører til ren 1α-acetox-3-vitamin-D<sub>3</sub> (5a), som omdannes til 1α-hydroxy-3-vitamin-D<sub>3</sub> (6a) ved simpel KOH/MeOH hydrolyse.

#### EKSEMPEL 8

##### 24(R),25-Dihydroxy-cyclovitamin-D<sub>3</sub> (2d):

10 Til 150 µl tør pyridin tilsættes 10,4 mg 24R,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> samt 7,13 mg (1,5 ækv.) TsCl. Reaktionsblandingen holdes ved 0°C i 72 timer og fortyndes derpå med mættet NaHCO<sub>3</sub> samt ekstraheres med ether. Efter vask af etherextrakten med mættet NaHCO<sub>3</sub>, tørring over MgSO<sub>4</sub> og fjernelse af opløsningsmidlet under vacuum bringer man det rå tosylat (~70% ved TLC) i  
 15 suspension i 2 ml vandfrit MeOH sammen med 25 mg NaHCO<sub>3</sub>, og der opvarmes under N<sub>2</sub> ved 58°C i 20 timer. Reaktionsblandingen fortyndes derpå med mættet NaCl og ekstraheres med ether. Etherextrakterne vaskes med vand, tørres over MgSO<sub>4</sub>, og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Præparativ TLC (10 x 20  
 20 cm, 750 µm silicagel, 6:4 Skellysolve B: ethylacetat) fører til 2,5 mg indvunden 24R,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> samt 4,4 mg 24R,25-dihydroxy-cyclovitamin-D (2d): massespektrum: (m/e), 430 (15), 398 (65), 253 (40), 159 (45), 119 (55), 59 (100); NMR, 8,0,55 (3H, s, 18-H<sub>3</sub>), 0,74 (2H, m, 4-H<sub>2</sub>), 0,94 (3H, d, J=6,2 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,17 (3H, s, 26-H<sub>3</sub>), 1,22 (3H, s, 27-H<sub>3</sub>),  
 25 3,26 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 3,34 (1H, m, 24-H), 4,17 (1H, d, J=9,0 Hz, 6-H), 4,88 (1H, m(skarp), 19(Z)-H), 5,00 (1-H, J=9,0 Hz, 7-H), 5,04 (1H, m, (skarp), 19 (E)-H).

##### 1α,24(R),25-Trihydroxy-cyclovitamin-D<sub>3</sub> (3d):

30 Til en i forvejen fremstillet opløsning af 1,12 mg SeO<sub>2</sub> og 12 µl 70 % t-BuOOH i 1,0 ml tør CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sættes 4,2 mg 24R,25-dihydroxy-cyclovitamin-D<sub>3</sub> i 500 µl CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Efter

30 minutters forløb tilsættes en yderligere portion bestående af 1,12 mg  $\text{SeO}_2$  og 12  $\mu\text{l}$  70%'s  $t\text{-BuOOH}$  i 500  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , og omsætningen fortsættes i yderligere 1 time. Omsætningen slukkes med 10%'s  $\text{NaOH}$ , fortyndes med ether og vaskes to gange med 10%'s  $\text{NaOH}$  efterfulgt af en vandvask. Den organiske opløsning tørres over  $\text{MgSO}_4$ , opløsningsmidlet fjernes under vacuum, og den således dannede olie chromatograferes på en 5 x 20 cm, 250  $\mu\text{m}$  silicagel-plade i ethylacetat:Skellysolve B (1:1) til dannelse af 1,6 mg  $1\alpha,24(\text{R}),25\text{-trihydroxy-cyclovitamin-D}_3$  (3d): massespektrum: (m/e), 446 (30), 414 (50), 396 (40), 269 (30), 135 (80), 59 (100); NMR,  $\delta$  0,55 (3H, s,  $18\text{-H}_3$ ), 0,65 (2H, m,  $4\text{-H}_2$ ), 0,96 (3H, d,  $J=6,0$  Hz,  $21\text{-H}_3$ ), 1,19 (3H, s,  $26\text{-H}_3$ ), 1,24 (3H, s,  $27\text{-H}_3$ ), 3,28 (3H, s,  $6\text{-OCH}_3$ ), 3,35 (1H, m,  $24\text{-H}$ ), 4,20 (1H, d,  $J=9,0$  Hz,  $6\text{-H}$ ), 4,22 (1H, m,  $1\text{-H}$ ), 4,97 (1H, d,  $J=9,0$  Hz,  $7\text{-H}$ ), 5,18 (1H, m (skarp),  $19(\text{Z})\text{-H}$ ), 5,26 (1H, d,  $J=2,2$  Hz,  $19(\text{E})\text{-H}$ ),  $1\text{-oxo-}24(\text{R}),25\text{-dihydroxy-cyclovitamin-D}_3$  (7d) isoleres ligeledes som en mindre bestanddel (< 20%).

$1\alpha,24(\text{R}),25\text{-Trihydroxyvitamin-D}_3$  (6d):

Til 200  $\mu\text{l}$  tør pyridin og 150  $\mu\text{l}$   $\text{Ac}_2\text{O}$  sættes 1,4 mg  $1\alpha,24\text{R},25\text{-trihydroxy-cyclovitamin-D}_3$  (3d). Det samlede system gennemskylles med  $\text{N}_2$  og opvarmes til  $95^\circ\text{C}$  i 20 timer. Reaktionsblandingen fortyndes derpå med tør toluen og azeotropdestilleres til tørhed. Det olieagtige produkt  $1\alpha,24(\text{R}),25\text{-triacetoxy-cyclovitamin-D}_3$  (4d,24,25-diacetat) opløses i 200  $\mu\text{l}$  THF, og det sættes til 500  $\mu\text{l}$  af en opløsning i forholdet 1:1 af 97%'s  $\text{HCO}_2\text{H}$  og THF, og det opvarmes til  $55^\circ\text{C}$  i 15 minutter. Den nedkølede reaktionsblanding fortyndes med ether, vaskes med  $\text{H}_2\text{O}$ , mættet  $\text{NaHCO}_3$ , mættet  $\text{NaCl}$  samt tørres over  $\text{MgSO}_4$ . Efter fjernelse af opløsningsmidlet under vacuum opløses det rå  $1\alpha,24\text{R},25\text{-triacetoxy-}3\beta\text{-formiat-vitamin-D}$ -mellemprodukt i 200  $\mu\text{l}$  THF, og det behandles med 1,0 mg  $\text{K}_2\text{CO}_3$  i 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  og 90  $\mu\text{l}$   $\text{MeOH}$  i 5 minutter ved stuetemperatur. Fortynding med mættet  $\text{NaCl}$ , ekstraktion med ether og chromatografering på en 5 x 20

cm, 250  $\mu$ m, silicagel-plade i ethylacetat:Skellysolve B (4:6) fører til  $1\alpha,24R,25$ -triacetoxy-vitamin- $D_3$ . Behandling af dette triacetat med  $LiAlH_4$  fører til  $1\alpha,24R,25$ -trihydroxy-vitamin- $D_3$  (6d), som i alle måder er identisk med en auten-

5 tisk prøve.

#### EKSEMPEL 9

##### Hydrid-reduktion af 1-oxo-cyclovitamin- $D_3$ (7a) til 3a:

En opløsning af 2,0 mg 1-oxo-cyclovitamin- $D_3$  fremkommet ved allyl-oxidation af 3,5-cyclovitamin- $D_3$  som beskrevet i eksem-

10 pel 1, i 500  $\mu$ l ether behandles med 300  $\mu$ l ether, der er mæt-

tet med  $LiAlH_4$ . Efter 30 minutter slukkes reaktionen omhyggeligt ved dråbevis tilsætning af mættet NaCl. De uopløselige salte fjernes ved filtrering, og filtratet tørres over  $MgSO_4$ . Opløsnings-

15 midlet fjernes under vacuum, hvilket fører til 1,7 mg af

en blanding i forholdet 95:5 af  $1\alpha$ -hydroxycyclovitamin- $D_3$  (3a) og den tilsvarende  $1\beta$ -hydroxycyclovitamin- $D_3$ -isomere, som adskilles ved chromatografi. Tilsvarende behandling af 1-oxo-cyclovitamin- $D_3$  med 300  $\mu$ l 100%'s ethanol, der er mættet med  $NaBH_4$ , fører til en blanding i forholdet 8:2

20 af  $1\alpha$ -hydroxy- og  $1\beta$ -hydroxycyclovitamin- $D_3$ -forbindelserne (3a samt dets  $1\beta$ -epimere).

##### Omdannelse af 1-hydroxycyclovitamin- $D_3$ (3a) til $1\alpha$ -hydroxy-vitamin- $D_3$ (6a) gennem 1-formyl-mellemproduktet (11a):

En 200  $\mu$ l portion eddikesyreanhydrid køles til 0°C, og 100  $\mu$ l

25 97%'s myresyre tilsættes langsomt. Opløsningen opvarmes kortvarigt (15 minutter) til 50°C og køles derpå til 0°C. En 100  $\mu$ l portion af eddikesyre/myresyreanhydrid sættes derpå til en opløsning af 5 mg  $1\alpha$ -hydroxy-cyclovitamin- $D_3$  (3a) i pyridin ved 0°C. Efter 2,0 timers forløb fortyndes reaktions-

blandingen med mættet NaCl, ekstraheres med ether, vaskes med H<sub>2</sub>O og tørres over MgSO<sub>4</sub>. Det rå 1 $\alpha$ -formyl-cyclovitamin-D<sub>3</sub> (11a), der opnås efter fjernelse af opløsningsmidlet under vacuum, opløses i iseddikesyre og opvarmes til 55°C i 15 minutter. Fortynding med mættet NaCl, ekstraktion med ether og isolering af de organiske produkter fører til et råprodukt bestående af 1-formyloxyvitamin-D<sub>3</sub>-acetat (12a) og den tilsvarende 5,6-trans-isomere. Behandling af den rå blanding med K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O/MeOH efterfulgt af chromatografering (5 x 20 cm, 250  $\mu$ m, silicagel, 3:7 ethylacetat:Skellysolve B) fører til det rene 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-3-acetat og til 5,6-trans-1 $\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-3-acetat, som omdannes hydrolytisk (KOH/MeOH) til henholdsvis det tilsvarende 1 $\alpha$ -hydroxy-vitamin-D<sub>3</sub> (6a) og dettes 5,6-trans-isomere.

#### 15 EKSEMPEL 10

Kroneether-katalyseret cycloomdannelse af 1 $\alpha$ -acetoxy-cyclovitamin-D<sub>3</sub>:

En 0,5 M hexan:benzen (1:1) opløsning af såkaldt 15-krone-5 (Aldrich Chemical Co., Milwaukee) mættes med fint fordelt vandfrit natriumacetat. Til 300  $\mu$ l af denne opløsning sættes 11,0 mg 1 $\alpha$ -acetoxy-cyclovitamin-D<sub>3</sub> (4a) i 600  $\mu$ l tør hexan efterfulgt af 200  $\mu$ l 97%'s myresyre. Denne to-fase blanding omrøres kraftigt med mellemrum i løbet af 30 minutter og fortyndes derpå med hexan, hvorefter syrelaget fjernes. Den organiske fase vaskes med mættet NaHCO<sub>3</sub>, mættet NaCl, tørres over MgSO<sub>4</sub>, og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Råolien optages i 300  $\mu$ l THF samt 300  $\mu$ l methanol og behandles med 10 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Efter 5 minutter ved stuetemperatur fortyndes reaktionsblandingen med mættet NaCl og ekstraheres med to portioner ether. Det organiske lag vaskes med H<sub>2</sub>O, tørres over MgSO<sub>4</sub>, og opløsningsmidlet fjernes under vacuum. Den således fremkomne blanding underkastes præparativ TLC (750  $\mu$ m, 10 x 20 cm, 75:25 Skellysolve B: ethylacetat) til dannelse af 5,7 mg (54%) 1 $\alpha$ -acetoxy-vitamin D<sub>3</sub>

(5a) samt 2,1 mg (20%) 5,6-trans-1 $\alpha$ -acetoxy-vitamin-D<sub>3</sub>.

EKSEMPEL 11

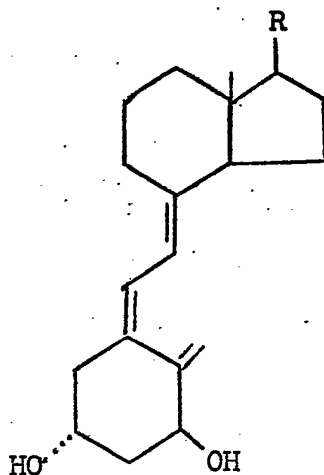
Direkte solvolyse af 1 $\alpha$ -hydroxycyclovitamin-D-forbindelser:

- 3,8 ml iseddikesyre sættes til 380 mg 1 $\alpha$ -hydroxy-cyclovitamin-D<sub>3</sub>, og opløsningen opvarmes i 10 minutter ved 60°C. Efter nedkøling sættes denne blanding til en under omrøring værende opløsning af is/NaHCO<sub>3</sub>. Den neutraliserede vandige opløsning ekstraheres med diethylether, de samlede organiske ekstrakter vaskes en gang med vand og tørres over MgSO<sub>4</sub>. Råproduktet efter fjernelse af opløsningsmidlet chromatograferes på en 1,5 x 60 cm søjle af 50 g neutral silicagel, elueres med 100 ml 4%'s, 100 ml 8%'s, 100 ml 12%'s og 400 ml 16%'s EtOAc/Skellysolve B. Den ønskede 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-3-acetat-isomere elueres før 1 $\alpha$ -hydroxy-5,6-trans-vitamin-D<sub>3</sub>-3-acetat; der opnås 175 mg 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-3-acetat; UV:  $\lambda_{\max}$  264 nm; MS (m/e) 442 (M<sup>+</sup>, 8), 382 (70), 364 (15), 269 (20), 134 (100).

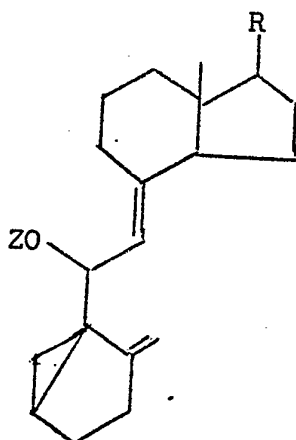
Hydrolyse af 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-3-acetat (10% NaOH/MeOH, 2 timer reaktionstid) fører til 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>.

## P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af  $1\alpha$ -hydroxy-  
lerede vitamin D forbindelser med den almene formel



- 5 hvori R er valgt blandt substituerede eller usubstituere-  
de, mættede eller umættede cholesterol-sidekædegrupper,  
eller hvor R kan have samme struktur som sidekæden i cholen-  
syre, homocholensyre, pregnenolon, 27-nor-25-ketochole-  
sterol eller i 24-ketocholesterol, k e n d e t e g n e t  
ved, at man udsætter forbindelser med den almene formel



hvor  $R$  har den ovenfor anførte betydning, og hvor  $Z$  er udvalgt fra en gruppe bestående af hydrogen, lavere alkyl, lavere acyl og aromatisk acyl, for allyloxidation, at man om ønsket reducerer eventuelt dannet, tilsvarende  
5 1-oxocyclovitamin-D-derivat med hydridreaktanter, at man opsamler den tilsvarende  $\alpha$ -hydroxyforbindelse, at man acylerer den således opsamlede  $\alpha$ -hydroxyforbindelse og opsamler  $\alpha$ -O-acyl-derivatet, og at man solvolyserer dette derivat og omdanner det solvolyserede produkt til den tilsvarende hydroxyforbindelse.  
10

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt og tegnet ved, at den omtalte allyloxidation udføres med selen-dioxid.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, kendt og tegnet ved, at den omtalte allyloxidation udføres i nærvær af  
15 et hydroperoxid.

4. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af de forudgående krav, kendt og tegnet ved, at den fra allyloxidationen indvundne  $\alpha$ -hydroxylforbindelse direkte  
20 solvolyseres i nærvær af en organisk carboxylsyre, og at det tilsvarende 3-O-acyl- $\alpha$ -hydroxy-vitamin-D-derivat indvindes og omdannes til den tilsvarende hydroxyforbindelse.

Fremdragne publikationer:

---