



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8220265**

Nederland

⑲ NL

---

⑤4 **26,26,26,27,27,27,-hexafluor-1alfa,25-dihydroxycholecalciferol  
alsmede werkwijze voor de bereiding daarvan.**

⑤1 Int.Cl.<sup>3</sup>: C07C 172/00, A61K 31/59.

⑦1 Aanvrager: Wisconsin Alumni Research Foundation te Madison, Wisconsin,  
Ver.St.v.Am.

⑦4 Gem.: Ir. L.W. Kooy c.s.  
Octroobureau Vriesendorp & Gaade  
Dr. Kuiperstraat 6  
2514 BB 's-Gravenhage.

---

②1 Aanvraag Nr. 8220265.

⑧6 Aanvraagnummer oorspronkelijke internationale aanvraag: PCT/US82/00909.

②2 Ingediend 6 juli 1982.

③2 Voorrang vanaf 27 juli 1981.

③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).

③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 286790 .

⑥2 - -

---

④3 Ter inzage gelegd 1 juni 1983.

⑧7 Publicatiedatum oorspronkelijke internationale aanvraag: 3 februari 1983.

⑧7 Publicatienummer oorspronkelijke internationale aanvraag: WO83/00335.

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

---

26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol  
alsmede werkwijze voor de bereiding daarvan.

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

Meer in het bijzonder heeft de uitvinding  
5 betrekking op een derivaat van vitamine D<sub>3</sub>, op een werkwijze  
voor de bereiding van zulke verbindingen en op nieuwe tussen-  
verbindingen die tijdens deze werkwijze gevormd worden.

Vitamine D<sub>3</sub> is een algemeen bekend middel  
voor het beheersen van de calcium- en fosfor-homeostase. Het  
10 is bekend dat deze verbinding bij het normale dier of de nor-  
male mens het intestinale calciumtransport en de beender-cal-  
cium-mobilisatie stimuleert en effectief is in het voorkomen  
van rachitis.

Ook is het tegenwoordig algemeen bekend  
15 dat vitamine D<sub>3</sub> om effectief te zijn in vivo moet worden  
omgezet in de gehydroxyleerde vormen daarvan. Bijvoorbeeld  
wordt het vitamine eerst gehydroxyleerd in de lever ter vor-  
ming van 25-hydroxy-vitamine D<sub>3</sub> en wordt het verder gehydroxy-  
leerd in de nieren ter verschaffing van 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-  
20 vitamine D<sub>3</sub> of 24,25-dihydroxy-vitamine D<sub>3</sub>. De 1 $\alpha$ -gehydroxy-  
leerde vorm van het vitamine wordt in het algemeen beschouwd  
als de fysiologisch werkzame of hormonale vorm van het vita-  
mine en wordt verantwoordelijk geacht voor wat de vitamine D-  
achtige werkingen worden genoemd, zoals het verhogen van de  
25 intestinale absorptie van calcium en fosfaat, het mobiliseren  
van beendermineraal en het vasthouden van calcium in de nieren.

Sinds de ontdekking van biologisch actieve  
metabolieten van vitamine D is er veel belangstelling geweest  
voor de bereiding van structurele analogen van deze metabolie-  
30 ten, omdat zulke verbindingen bruikbare therapeutische midde-

len kunnen vormen voor de behandeling van ziekten die resulteren uit stoornissen van het calciummetabolisme. Een verscheidenheid van vitamine D-achtige verbindingen is gesynthetiseerd. Zie bijvoorbeeld de Amerikaanse octrooischriften

5 3.741.996, gericht op  $1\alpha$ -hydroxycholecalciferol; 3.907.843 gericht op  $1\alpha$ -hydroxyergocalciferol; 3.786.062 gericht op 22-dehydro-25-hydroxycholecalciferol; 3.906.014 gericht op 3-deoxy- $1\alpha$ -hydroxycholecalciferol; en 4.069.321 gericht op de bereiding van diverse zijketen-gefluoreerde vitamine  $D_3$ -derivaten en zijketen-gefluoreerde vitamine  $D_3$ -derivaten en zijketen-gefluoreerde dihydrotachysterol-analogen.

Een fluorderivaat van de aanvaarde hormonale vorm van het vitamine, 1,25-dihydroxycholecalciferol ( $1,25-(OH)_2D_3$ ) dat van bijzonder belang is is 24,24-difluor- $1,25-(OH)_2D_3$  omdat dit wordt gekenmerkt door een even grote

15 zo niet grotere activiteit dan  $1,25-(OH)_2D_3$ . (Zie het Amerikaanse octrooischrift 4.201.881).

Ook van belang is het 26,26,26,27,27,27-hexafluor-derivaat van 25-hydroxycholecalciferol (zie het

20 Amerikaanse octrooischrift 4.248.791) dat een grotere vitamine D-achtige werking vertoont dan 25-hydroxycholecalciferol.

Volgens de uitvinding is nu een nieuw derivaat van vitamine D bereid dat wordt gekenmerkt door een aanzienlijk grotere vitamine D-achtige activiteit dan de hormonale vorm van het vitamine,  $1,25-(OH)_2D_3$ , als gemeten aan

25 het vermogen ervan het calciumtransport in de darmen te stimuleren, calcium uit beenderen te mobiliseren (serum-calcium-spiegel-verhoging) en in de anti-rachitische werking ervan als gemeten door de "rat line rest".

Dit derivaat is geïdentificeerd als

30 26,26,26,27,27,27-hexafluor-1,25-dihydroxycholecalciferol ( $26,26,26,27,27,27-F_6-1\alpha,25-(OH)_2D_3$ ).

De uitzonderlijk sterke vitamine D-achtige werking van de verbinding indiceert de gemakkelijke toepasbaarheid ervan als vervangingsmiddel voor vitamine D in de diverse

35 bekende toepassingen daarvan en als therapeutisch middel bij

de behandeling van ziekten zoals hypoparathyroidisme, pseudo-hypoparathyroidisme, renale osteodystrofy, osteoporose en andere typen van beenderstoornissen die symptomatisch zijn voor calcium- en fosfor-onevenwichtigheid. Andere potentiële toepassingen zouden gelegen kunnen zijn in de behandeling van melkkoortsziekte bij vee, zwakke poten bij kalkoenen, kippen en ander gevogelte, en als profylacticum tegen zwakke poten bij andere huisdieren.

De verbindingen volgens de uitvinding kunnen gemakkelijk worden gesynthetiseerd volgens de onderstaande beschrijving aan de hand van reactieschema A, waarbij als uitgangsmateriaal 26,26,26,27,27,27-hexafluor-25-hydroxy-cholesterol-3-THP-ether (Amerikaans octrooischrift 4.248.791) wordt gebruikt. In het reactieschema en in de onderstaande beschrijving zijn dezelfde verbindingen met dezelfde cijfers aangegeven.

De verbinding van formule 1 werd gehydrolyseerd met p-tolueensulfonzuur ter verschaffing van de 3-ol-verbinding van formule 2, welke werd geoxydeerd met dichloordicyaanbenzochinon (DDQ). Het 1,4,6-trieen-3-on van formule 3 werd verkregen met een opbrengst van 55 %. Behandeling van het trieen-on van formule 3 met alkalisch waterstofperoxyde gaf het 1,2-epoxyde van formule 4 (opbrengst 97 %), dat werd gereduceerd met lithiiummetaal en ammoniumchloride in vloeibare ammoniak/tetrahydrofuran, ter verschaffing van de 1-hydroxyverbinding van formule 5 (65 %). Na acyleren werd het triacetaat van formule 6 behandeld met N-broomsuccinimide en daarna met collidine ter verschaffing van de 5,7-dieen van formule 7. De 5,7-dieen werd bestraald met een kwiklamp van gematigde druk in benzeen-EtOH, gevolgd door thermische isomerisatie in benzeen-EtOH onder terugvloeiing ter verschaffing van het hexafluor-1,25-diacetoxyvitamine D<sub>3</sub> van formule 8, dat vervolgens werd gehydrolyseerd tot het overeenkomstige hexafluor-1,25-dihydroxy-vitamine D<sub>3</sub> van formule 9.

35

8220265

Synthese van 26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-  
cholecalciferol.

26,26,26,27,27,27-Hexafluor-25-hydroxycholesterol (2).

De THP-ether (1) werd gesynthetiseerd  
5 volgens de procedure van Y. Kobayashi, T. Taguchi, N. Kanuma,  
N. Ikekawa en J. Oshida, J.C.S. Chem. Comm. 459 (1980). Na  
behandeling van (1) (354 mg) met p-tolueensulfonzuur (10 mg) in  
een mengsel van CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 ml) en MeOH (8 ml) bij kamertem-  
peratuur gedurende 2 h, werd NaHCO<sub>3</sub>-oplossing toegevoegd aan  
10 het reactie-mengsel dat daarna met CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> werd geëxtraheerd.  
Het extract werd geherkristalliseerd uit benzeen-cyclohexaan  
ter verschaffing van 212 mg (2), smp. 180-181°C, MS m/e 510  
(M<sup>+</sup>), 495, 492, 477, 255, 213; NMR (aceton-D<sub>6</sub>-D<sub>2</sub>O)  $\delta$  0,71  
(s, 18-H<sub>3</sub>), 0,95 (d, J=6 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,02 (s, 19-H<sub>3</sub>), 3,40  
15 (1H, m, 3H), 5,32 (1H, m, 6-H). Anal. Berekend voor  
C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>F<sub>6</sub>O<sub>2</sub>: C 63,51, H 7,90, F 22,33. Gevonden: C 63,72,  
H 7,84, F 22,54.

26,26,26,27,27,27-Hexafluor-25-hydroxycholest-1,4,6-trien-  
3-on (3).

20 Een mengsel van (2) (893 mg) en DDQ (2,2  
g) in dioxan (50 ml) werd 15 h bij 80-90°C geroerd en daarna  
4 h verwarmd onder terugvloeiing. Na afkoeling tot kamertem-  
peratuur werd het neerslag afgefiltreerd en het filtraat werd  
verdund met ether die achtereenvolgens was gewassen met  
25 1N KOH en zoutoplossing. Het extract werd gezuiverd met behulp  
van een silicagelkolom (AcOEt-n-hexaan, 1:20 ter verschaffing  
van 490 mg (55 %) van het triënon (3); smp. 166-168°C (uit  
AcOEt-cyclohexaan), MS m/e 504 (M<sup>+</sup>), 489; IR (KBr), 3180,  
1650, 1595 cm<sup>-1</sup>; NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0,72 (s, 18-H<sub>3</sub>), 0,95 (d, J=6  
30 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,18 (s, 19-H<sub>3</sub>), 5,88-6,33 (4H, m, 2-, 4-, 6- en  
7-H), 7,04 (1H, d, J=10 Hz, 1-H). Anal. Berekend voor  
C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>F<sub>6</sub>O<sub>2</sub>: C 64,27, H 6,79, F 22,59. Gevonden: C 64,17,  
H 6,81, F 22,34.

26,26,26,27,27,27-Hexafluor-25-hydroxy-1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ -epoxycholest-  
4,6-diën-3-on (4).

35 Aan een oplossing van 27 mg NaOH en 1 ml  
30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ontgast MeOH (20 ml) werd een THF-oplossing

(10 ml) van 497 mg triënon (3) en vervolgens werd het reactiemengsel 20 uren geroerd bij kamertemperatuur. Het reactiemengsel werd verdund met zoutoplossing en geëxtraheerd met ether. Het etherische extract werd onderworpen aan silicagelkolomchromatografie (AcOEt-n-hexaan, 1:4) ter verschaffing van 499 mg (97 %) van het epoxyde (4); smp. 181-184°C (uit AcOEt-cyclohexaan), MS m/e 520 ( $M^+$ ), 505, 503; NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  0,70 (s, 18-H<sub>3</sub>), 0,95 (d, J=6 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,00 (s, 19-H<sub>3</sub>), 3,45 (1H, m, 2-H), 3,62 (1H, d, J=6 Hz, 1-H), 4,10 (1H, s, OH), 5,62 (1H, bs, 4-H), 6,04 (2H, s, 6- en 7-H).

26,26,26,27,27,27-Hexafluor-1 $\alpha$ ,15-dihydroxycholesterol (5)

Aan een oplossing van 1,2 g lithium in 80 ml vloeibare ammoniak (gedestilleerd boven Na) werd 443 mg van het epoxyde van formule 4 in THF (70 ml) druppelsgewijs in 1 uur toegevoegd onder koeling met een bad van vast koolzuur en aceton en vervolgens werd het reactiemengsel 1 uur geroerd onder terugvloeiing. Het reactiemengsel werd weer afgekoeld door een bad van vast koolzuur en aceton en hieraan werd vast  $NH_4Cl$  (12 g) toegevoegd in kleine porties gedurende 1 uur en vervolgens werd het 3 uur onder terugvloeiing gehouden. Na doorborrelen van argongas om  $NH_3$  te verwijderen werd water aan het reactiemengsel toegevoegd en dit werd geëxtraheerd met AcOEt. Het extract werd onderworpen aan silicagelkolomchromatografie. De fractie die werd geëluëerd met n-hexaan en AcOEt (1:2) leverde 274 mg (65 %) van de triol (5) op, smp. 201-202°C (uit  $CHCl_3$ ), MS Berekend voor  $C_{27}H_{40}F_6O_3$ : 526,2879. Gevonden: 526,2878. NMR ( $CDCl_3$ ) en aceton- $D_6$   $\delta$  0,69 (s, 18-H<sub>3</sub>), 0,93 (d, J=6 Hz, 21-H<sub>3</sub>), 1,03 (s, 19-H<sub>3</sub>), 3,83 (1H, m, 1-H), 4,00 (1H, m, 3-H), 5,53 (1H, m, 6-H).

26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholesterol-triacetaat (6)

Een oplossing van 216 mg van de triol (5) en katalytische hoeveelheden (ca 20 mg) 4-dimethylaminopyridine in azijnzuuranhydride (1,5 ml) en pyridine (3 ml) werd 20 uur bij kamertemperatuur geroerd. Nadat het reactiemeng-

8220265

sel onder vacuum was ingedampt werd het residu gechromatografeerd over silicagel (n-hexaan-AcOEt, 10:1) ter verschaffing van 263 mg (98 %) van het triacetaat (6), dat werd gedroogd op 70°C (5 mm Hg) gedurende 20 h. 6: glas; MS m/e 592 ( $M^+$ -AcOH), 532 ( $M^+$ -2AcOH), 517, 413, 253; NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  0,66 (s, 18- $H_3$ , 0,94 (d,  $J=6$  Hz, 21-H), 1,10 (s, 19- $H_3$ ), 2,03, 2,06 en 2,16 (9H, elk s, acetyl), 4,98 (1H, m, 3-H), 5,06 (1H, m, 1-H), 5,53 (1H, m, 6-H).

26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,25-triacetoxycholest-5,7-dien (7).

N-broomsuccinimide (14 mg) werd toegevoegd aan een onder terugvloeiing verwarmde oplossing van 35 mg triacetaat van formule 6 in 2 ml  $CCl_4$  en het reactiemengsel werd verder verwarmd onder terugvloeiing onder argonatmosfeer. Na afkoeling in een bad van ijs en water werd het resulterende neerslag afgefiltreerd. Het filtraat werd drooggedampt beneden 40°C. Het residu in xyleen (1 ml) werd druppelsgewijs toegevoegd aan een onder terugvloeiing verwarmde oplossing van xyleen (1,5 ml) en s-collidine (0,5 ml) en het verwarmen onder terugvloeiing werd voortgezet onder argonatmosfeer gedurende 20 minuten. Het reactiemengsel werd geëxtraheerd met AcOEt, gewassen met 2N HCl, verzadigd  $NaHCO_3$ , zoutoplossing en de oplossing werd boven  $MgSO_4$  gedroogd. Na verwijdering van het oplosmiddel werd het residu behandeld met een katalytische hoeveelheid pTsoH in aceton (10 ml) bij kamertemperatuur gedurende 16 uur onder argon in het donker. Het mengsel werd geëxtraheerd met AcOEt en het extract werd gewassen met verzadigde  $NaHCO_3$  en zoutoplossing en daarna boven  $MgSO_4$  gedroogd. Verwijdering van het oplosmiddel gaf een ruwe 5,7-dien, welke werd gezuiverd door preparatieve dunne laagchromatografie, tweemaal ontwikkeld met een oplossing van n-hexaan-AcOEt (10:1). De band met een Rf-waarde van 0,26 werd afgeschraapt en geëluëerd met AcOEt. Verwijdering van het oplosmiddel gaf 8,8 mg (25 %) van het produkt van formule 7; UV (EtOH)  $\lambda_{max}$ , 294, 282, 272 nm.

8220265

26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>  
triacetaat (8)

Een oplossing van het 5,7-dieen (7) (8,8 mg) in benzeen (90 ml) en EtOH (40 ml) werd bestraald met een kwiklamp van matige druk via een Vycor-filter gedurende 2,5 minuten met ijs-koeling onder argon. Vervolgens werd het mengsel gedurende een uur onder argon verwarmd onder terugvloeiing. Verdamping van het oplosmiddel gaf een ruw vitamine D derivaat, dat werd onderworpen aan preparatieve dunnelaagchromatografie (tweemaal ontwikkeld met hexaan-AcOEt (10:1). De band van Rf-waarde 0,36 werd afgeschraapt en geëlueerd met AcOEt. Verwijdering van het oplosmiddel gaf een zuiver produkt (8) (1,6 mg) (25 %), UV (EtOH)  $\lambda_{\max}$  264,5,  $\lambda_{\min}$  228 nm.

26,26,26,27,27,27-hexafluor-1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (9)

Een oplossing van het triacetaat (8) (1,6 mg) in 5 % KOH-MeOH (2 ml) en THF (2 ml) werd bij kamertemperatuur onder argon in het donker geroerd gedurende 14 uren. Het reactiemengsel werd aangezuurd met 2N HCl en tweemaal geëxtraheerd met AcOEt. Het extract werd gewassen met verzadigd NaHCO<sub>3</sub> en zoutoplossing en gedroogd boven MgSO<sub>4</sub>. Verwijdering van het oplosmiddel gaf het produkt van formule 9 (1,13 mg, 90 %) dat werd gezuiverd door hogedruk-vloeistofchromatografie. Verbinding (9), UV (EtOH)  $\lambda_{\max}$  264,5 nm,  $\lambda_{\min}$  228 nm; MS m/e 524 M<sup>+</sup>, 506, 488, 473, 462, 383, 287, 269, 251, 152, 134.

Het 26,26,26,27,27,27-F<sub>6</sub>-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-produkt kan desgewenst worden verkregen in kristallijne vorm door oplossen in een geschikt oplosmiddel of oplosmiddelsysteem, bijvoorbeeld ether, ether-hexaan, methanol-ether, ethylacetaat-alkaan, en daarna verwijderen van het oplosmiddel of de oplosmiddelen door verdamping of op andere wijze, zoals op zichzelf bekend.

Ook kan desgewenst de 5,7-dieen van formule 7 worden gehydrolyseerd volgens de bovenstaande procedure of andere milde basische hydrolyseprocedures die op zichzelf bekend zijn, voorafgaand aan bestraling, om de acetoxysubstituenten in hydroxyl om te zetten.

8220265

De biologische potentie van  $26,26,26,27,27,27\text{-F}_6\text{-1,25(OH)}_2\text{-D}_3$  werd vastgesteld door ge-eigende in vivo proeven met ratten, in vergelijking met de biologische werking van  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ .

5 Mannelijke pas gespeende ratten, gekocht van Holtzman Co. (Madison, WI) kregen ad libitum water en het-zij een dieet met weinig fosfor, veel calcium en een tekort aan vitamine D (rachitogeen dieet) als beschreven door Tanaka en DeLuca (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1974) 71, 1040)  
10 hetzij een dieet met weinig calcium, een juiste hoeveelheid fosfor en een tekort aan vitamine D, als beschreven door Suda e.a. (J. Nutrition (1970) 100, 1049), gedurende 3 weken.

Ratten die drie weken gevoerd waren met het rachitogene dieet werden in 5 groepen van elk 5-6 ratten  
15 verdeeld en kregen hetzij  $3,25\text{ pmol}$  hetzij  $13\text{ pmol}$  van hetzij  $26,26,26,27,27,27\text{-F}_6\text{-1,25-(OH)}_2\text{D}_3$  hetzij  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$  opgelost in  $0,1\text{ ml}$  mengsel van propyleenglycol en ethanol (95:5), sub-cutaan, dagelijks gedurende 7 dagen. Ratten in de controle-groep kregen  $0,1\text{ ml}$  van de propyleenglycol-ethanol-drager op  
20 dezelfde wijze. 24 uur na de laatste dosis werden ze door ont-hoofding gedood, het bloed werd verzameld voor meting van de concentratie van anorganisch fosfor in het serum, de twaalf-vingere darm werd verwijderd om de intestinale calciumtrans-port-activiteit te meten en de spaakbeenderen en de ellepijpen  
25 werden verwijderd ter meting van de antirachitische werking als hieronder beschreven.

De intestinale calciumtransportactiviteit in respons op elk van de verbindingen werd gemeten volgens de methode beschreven door Martin en DeLuca (Am. J. Physiol.  
30 (1969), 216, 1351). De resultaten worden weergegeven in tabel A, eerste kolom.

De meting van anorganisch fosfor in het serum vond als volgt plaats. Het bloed werd onmiddellijk ge-centrifugeerd ter verschaffing van het serum. 10 % trichloor-  
35 azijnzuur werd aan het serum toegevoegd en de bovendrijvende vloeistof, gewonnen na centrifugeren, werd geanalyseerd vol-

gens de methode beschreven door P.S. Chen e.a. (Anal. Chem. (1956) 28, 1756). De resultaten worden weergegeven in tabel A, tweede kolom.

De anti-rachitis-werking werd als volgt  
5 bepaald. Spaakbeenderen en ellepijpen van ratten werden verwijderd, overlangs gespleten en gekleurd in een 1,5 %-ige zilvernitraatoplossing. De evaluatie van de anti-rachitis werking vond plaats volgens de "rat line test", beschreven  
10 in U.S. Pharmacopoeia (15<sup>e</sup> Editie, Mack Publishing Co., Easton, PA). De resultaten worden weergegeven in tabel A, derde kolom.

8220265

Tabel A

Intestinaal calciumtransport, toeneming in de concentratie van anorganisch fosfor in het serum en antirachitis werking van 26,26,26,27,27,27-F<sub>6</sub>-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

| Verbinding                                                              | Hoeveelheid<br>(pmol/dag) | Intestinaal calcium-<br>transport<br>(Ca serosaal/Ca mucosaal) | Anorganisch fosfor<br>in het serum<br>(mg/100 ml) | Anti-rachitis-<br>werking<br>(eenheden) |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| drager                                                                  |                           | 3,5 ± 0,3 <sup>a</sup>                                         | 1,7 ± 0,5 <sup>a</sup>                            | 0                                       |
| 26,26,26,27,27,27-F <sub>6</sub> -1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> | 3,25                      | 8,8 ± 1,1 <sup>b</sup>                                         | 2,4 ± 0,2 <sup>b</sup>                            | 0-1                                     |
|                                                                         | 13                        | 7,6 ± 1,1 <sup>c</sup>                                         | 4,0 ± 0,1 <sup>c</sup>                            | >5                                      |
| 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>                                   | 3,25                      | 7,1 ± 0,9 <sup>d</sup>                                         | 2,5 ± 0,4 <sup>d</sup>                            | 0                                       |
|                                                                         | 13                        | 9,6 ± 2,1 <sup>e</sup>                                         | 3,1 ± 0,1 <sup>e</sup>                            | 1,3 ± 1,1                               |
| Significantie van het verschil:                                         |                           |                                                                |                                                   |                                         |
|                                                                         |                           | a van b, c, d, & e<br>p < 0,001                                | a van b & d<br>p < 0,025                          |                                         |
|                                                                         |                           | b van d                                                        | a van c & e                                       |                                         |
|                                                                         |                           | N.S.                                                           | p < 0,001                                         |                                         |
|                                                                         |                           | c van e                                                        | c van e                                           |                                         |
|                                                                         |                           | N.S.                                                           | p < 0,001                                         |                                         |

\* Standaard-deviatie van het gemiddelde.

Beendercalciummobilisatie.

Ratten die drie weken gevoerd waren met het dieet met weinig calcium (0,02 % Ca), een juiste hoeveelheid fosfor en een tekort aan vitamine D werden verdeeld in zes groepen van elk 5 tot 6 ratten en kregen respectievelijk 65 pmol van hetzij 26,26,26,27,27,27-F<sub>6</sub>-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hetzij 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> opgelost in 0,05 ml 95 % ethanol intrajugulaire, hetzij 24 uur hetzij 72 uur voor het doden. Ratten in de controle-groepen kregen op dezelfde wijze de ethanoldrager toegediend. De ratten werden gedood door onthoofding en het bloed werd verzameld. Het werd gecentrifugeerd om serum te verkrijgen. 0,1 ml serum werd gemengd met 1,9 ml 0,1 %-ige lanthaanchloride-oplossing en de calciumconcentratie werd gemeten met een atoomabsorptiespectrofotometer (Perkin-Elmer Model 214). Daar de opneming van calcium uit het dieet ver-  
 waarloosbaar laag is reflecteert de toeneming van de calciumconcentratie in het serum in respons op 26,26,26,27,27,27-F<sub>6</sub>-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> het vermogen van de verbinding beendercalcium te mobiliseren. De resultaten worden weergegeven in tabel B.

Tabel B

Toeneming in serum-calciumconcentratie in respons op een enkelvoudige dosis van 65 pmol 26,26,26,27,27,27-F<sub>6</sub>-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> gegeven 24 of 72 h voor het doden van ratten op een dieet met weinig calcium.

| Verbinding                                                              | Serum-calciumconcentratie (mg/100 ml) |                        |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|
|                                                                         | 24 h                                  | 72 h                   |
| ethanol                                                                 | 3,7 ± 0,1 <sup>xa</sup>               | 3,7 ± 0,1 <sup>a</sup> |
| 26,26,26,27,27,27-F <sub>6</sub> -1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> | 5,3 ± 0,3 <sup>b</sup>                | 4,4 ± 0,2 <sup>b</sup> |
| 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>                                   | 4,4 ± 0,2 <sup>c</sup>                | 3,9 ± 0,2 <sup>c</sup> |
| Significantie van het verschil                                          | a van b & c<br>p < 0,001              | a van e<br>N.S.        |
|                                                                         | b van c<br>p < 0,001                  | a van b<br>p < 0,001   |
|                                                                         |                                       | b van c<br>p < 0,005   |

\* Standaard-deviatie van het gemiddelde.

8220265

Uit de bovenstaande gegevens kan worden afgeleid dat in de op vitamine D responderende systemen van dieren met een tekort aan vitamine D  $26,26,26,27,27,27-F_6-1,25-(OH)_2D_3$  een werking vertoont die ten minste 10 maal zo groot is als die van  $1,25-(OH)_2D_3$ , de hormonale vorm van het vitamine, en derhalve beschouwd als het biologisch meest krachtige vitamine D-derivaat.

Het  $26,26,26,27,27,27-F_6-1,25-(OH)_2D_3$  volgens de uitvinding kan gemakkelijk worden toegediend in steriele parenterale oplossingen door injectie of intraveneus of door het spijsverteringskanaal in de vorm van orale doseringen, of door zetpillen. Doseringen van ongeveer 0,1 tot ongeveer 2,5  $\mu g$  per dag zijn effectief voor het verkrijgen van de beschreven fysiologische calciumbalansresponsen welke kenmerkend zijn voor vitamine D-achtige werking, waarbij onderhoudsdoseringen van ongeveer 0,1 tot 1,0  $\mu g$  geschikt zijn.

Doseringsvormen van de verbinding kunnen worden bereid door het combineren met een niet-toxische farmaceutisch aanvaardbare drager zoals algemeen bekend volgens de stand van de techniek. Zulke dragers kunnen hetzij vast hetzij vloeibaar zijn, zoals bijvoorbeeld maiszetmeel, lactose, sucrose, aardnootolie, olijfolie, sesamolie en water. Indien een vaste drager wordt gebruikt kunnen de doseringsvormen van de verbindingen volgens de uitvinding tabletten, capsules, poeders, pillen of zuigtabletten zijn. Indien een vloeibare drager wordt gebruikt kunnen zachte gelatine-capsules of siroop- of vloeistofsuspensie, emulsies of oplossingen de doseringsvorm zijn. De doseringsvormen kunnen ook toevoegsels bevatten, zoals conserveermiddelen, stabiliseermiddelen, bevochtigingsmiddelen of emulgeermiddelen, oplossing bevorderende middelen, enz. Ze kunnen ook andere therapeutisch waardevolle stoffen bevatten.

Het spreekt vanzelf dat ofschoon doseringstrajecten worden gegeven de specifieke dosering die aan een gastheer wordt toegediend zal afhangen van de specifieke ziekte-toestand die behandeld wordt en de eindresultaten die be-

oogd worden in een specifiek geval, alsmede andere factoren die bekend zijn aan deskundigen op het gebied van de therapeutische toepassing van zulke medicinale middelen.

8220265

# C o n c l u s i e s

1. Verbindingen van formule 10 waarin R wordt gekozen uit waterstof of acyl met 1 tot ongeveer 4 koolstofatomen.
2. Verbinding volgens conclusie 1 waarin R, R<sub>1</sub> en R<sub>2</sub> waterstof zijn.
3. Verbinding volgens conclusie 1, waarin R, R<sub>1</sub> en R<sub>2</sub> acetylgroepen zijn.
4. Verbinding volgens conclusie 2, in kristallijne vorm.
5. 26,26,26,27,27,27-hexafluor-25-hydroxycholesterol.
6. 26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholesterol.
7. 26,26,26,27,27,27-hexafluor-25-hydroxycholest-1,4-triën-3-on.
8. 26,26,26,27,27,27-hexafluor-25-hydroxy-1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ -epoxycholest-4,6-diën-3-on.
9. 26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,25-trihydroxycholest-5,7-dieën.
10. Werkwijze voor de bereiding van 26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol, met het kenmerk, dat men 26,26,26,27,27,27-hexafluor-25-hydroxycholesterol-3-tetrahydropyranyl-ether hydrolyseert, de resulterende 26,26,26,27,27,27-hexafluor-25-hydroxycholesterol oxydeert, de resulterende 26,26,26,27,27,27-hexafluor-25-hydroxycholest-1,4,6-triën-3-on behandelt met waterstofperoxyde ter verkrijging van 26,26,26,27,27,27-hexafluor-25-hydroxy-1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ -epoxycholest-4,6-diën-3-on, het genoemde 1,2-epoxyde reduceert ter verkrijging van 26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholesterol, de genoemde 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholesterol acetyleert tot 26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholesterol-tri-

8220265

acetaat,

dit triacetaat omzet in 26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,25-triacetoxycholest-5,7-dieen,

dit dieen achtereenvolgens blootstelt aan ultraviolette

5 straling en aan thermische isomerisatie ter verkrijging van 26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol-triacetaat, en

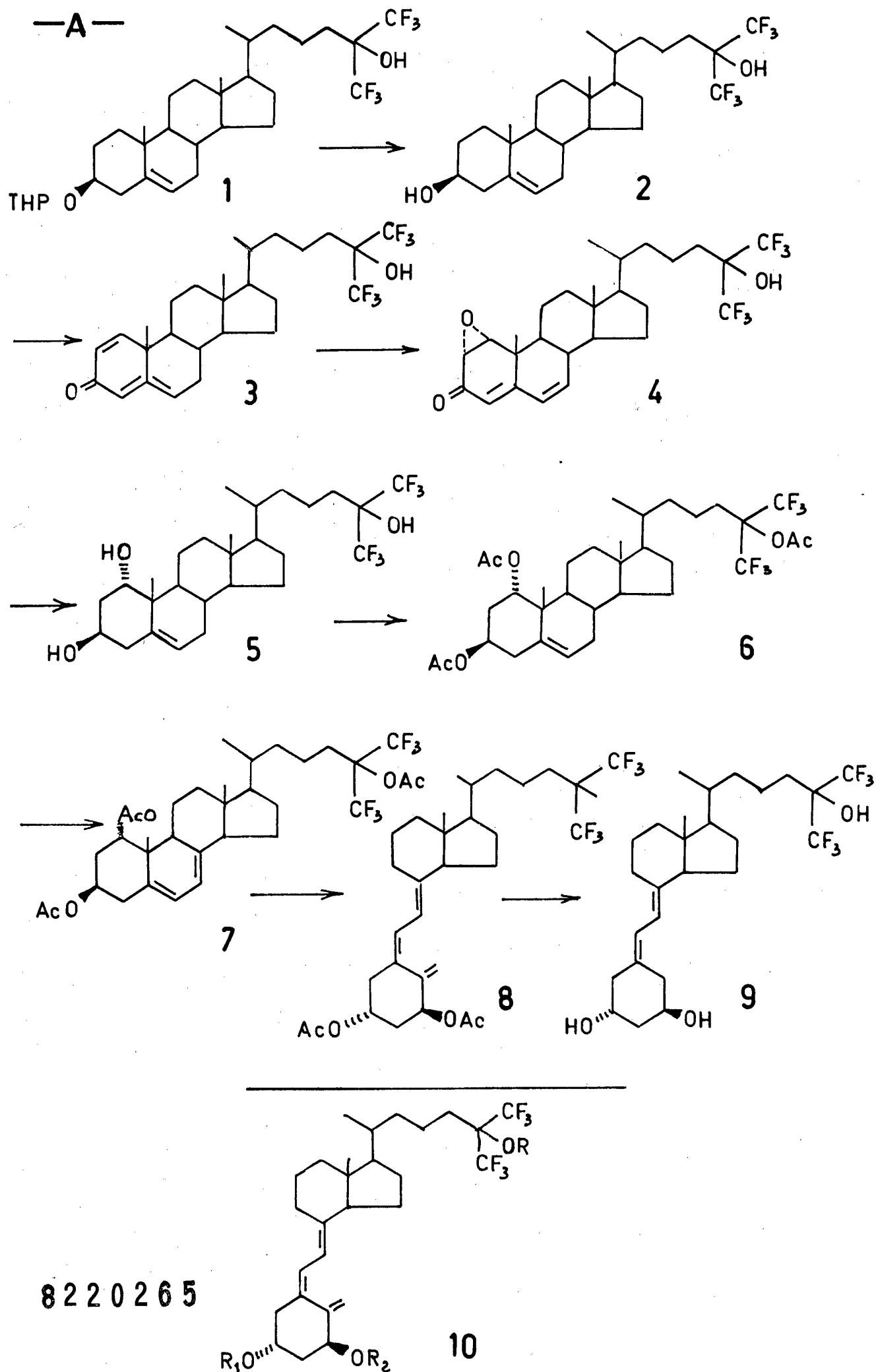
dit cholecalciferol-triacetaat hydrolyseert ter verkrijging van 26,26,26,27,27,27-hexafluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol.

10

8220265



—A—



8220265

10