Octrooiraad

(10)A **Terinzagelegging** (11) **8320218**

Nederland (19) **NL**

(54) **Nieuwe vitamine D analogen.**

(51) Int.Cl³.: 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.
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuyperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

(21) Aanvrage Nr. 8320218.

(86) Aanvraagnummer oorspronkelijke internationale aanvrage: PCT/US83/00965.

(22) Ingediend 22 juni 1983.

(32) Voorrang vanaf 26 juli 1982.

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

(31) Nummer van de voorrangsaanvrage: 401997 .

(62) - -

(43) Ter inzage gelegd 1 juni 1984.

(87) Publicatiedatum oorspronkelijke internationale aanvrage: 16 februari 1984.

(87) Publicatienummer oorspronkelijke internationale aanvrage: WO84/00550.

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

Beschrijving

Nieuwe vitamine D analogen

Technisch terrein

De uitvinding heeft betrekking op verbindingen, die worden gekenmerkt door vitamine D achtige werking.

De uitvinding heeft meer in het bijzonder betrekking op gefluoreerde vitamine D_3 analogen.

Technische achtergrond

Het staat nu duidelijk vast, dat de werking van vitamine D bij de regulering van de calcium- en fosfaathemeostase bij dieren en mensen afhankelijk is van het metabolisme van het vitamine in vivo tot gehydroxyleerde vormen. In het geval van vitamine D_3 behelst deze metabolische activering een aanvankelijke hydroxylering aan koolstof 25 onder verkrijging van 25-hydroxyvitamine D_3, gevolgd door een andere hydroxylering aan koolstof 1 onder vorming van 1α,25-dihydroxyvitamine D_3. Deze laatste verbinding wordt in het algemeen als de aktieve vorm van vitamine D_3 beschouwd en als zodanig is het middel rechtstreeks verantwoordelijk voor de stimulering van intestinaal calciumtransport en beendermineraalmobilisatie in vivo.

1α,25-dihydroxyvitamine D_3 is echter zelf onderhevig aan verder metabolisme in vivo, waarbij het bijvoorbeeld door enzymatische hydroxylering aan C-24 in 1α,24,25-trihydroxyvitamine D_3 wordt omgezet. Deze 24-gehydroxyleerde vorm is echter minder aktief dan 1α,25-dihydroxyvitamine D_3 zelf en 24-hydroxylering kan zelfs een stap naar inaktivering en afbraak van de aktieve vorm van het vitamine betekenen. Naarmate er zodoende 24-hydroxylering optreedt, put deze de lichaamsvoorraden aan de fysiologische aktiefste metaboliet,

1 α,25-dihydroxyvitamine D_3,uit. Om deze reden zijn 24,24-difluorverbindingen onlangs voorgesteld als farmakologisch gewenste analogen en vervangingsmiddelen, omdat de aanwezigheid van de 24-difluorsubstituenten de aktiviteit-dempende 24-hydroxyleringsreakties blokkeert. Er werd zelfs aangetoond, dat dergelijke verbindingen werkingen hebben, die tenminste equivalent en in het algemeen superieur zijn ten opzichte van de overeenkomstige niet gefluoreerde metaboliet (zie de Amerikaanse octrooischriften 4.196.133 en 4.201.881, Tanaka et al., J. Biol. Chem. 254, 7163 (1979); Tanaka et al., Arch. Biochem. Biophys. 199, 473 (1980)).

Beschrijving van de uitvinding

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op nieuwe verbindingen met de gewenste eigenschappen van sterke potentie en een geblokkeerde C-24-positie. Een voorbeeld van een dergelijke verbinding is 24-fluor-1,25-dihydroxyvitamine D_3, die kan worden voorgesteld met de formule 1 en op overeenkomstige acylderivaten van deze verbindingen, alsmede hun 5,6-transisomeren.

Bovengenoemde struktuur wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van de werking versterkende hydroxylgroepen aan koolstoffen 1 en 25, zoals deze optreden in de natuurlijke metaboliet en fluor als blokkerende substituent aan koolstof 24. De blokkerende substituent stoort de invoering door metabolisme in vivo van de 24-hydroxylgroep. Vanwege de aanwezigheid van een enkele fluorsubstituent hebben dergelijke verbindingen boven eerder voorgestelde 24-geblokkeerde analogen (bovengenoemde Amerikaanse octrooischriften 4.201.881 en 4.196.133) het voordeel, dat zij biologisch en chemisch gelijker en nauwer verwant aan de natuurlijke 1,25-dihydroxymetaboliet zijn en zodoende een gewenster vervangingsmiddel voor de natuurverbinding zijn. Ook vanwege deze mindere fluorsubstitutie kan het nieuwe analoog voordelig en beter worden gebruikt bij

de behandeling van beenderziekten en verwante calciumstoringen, aangezien het bij de praktische farmaceutische toepassingen van geneesmiddelen vaak gewenst is, de invoering van onnatuurlijke vreemde elementen zo veel mogelijk te vermijden.

24-fluor-1α,25-dihydroxyvitamine D_3 kan worden bereid door de enzymatische hydroxylering in vitro van 24-fluor-25-hydroxyvitamine D_3 (Amerikaans octrooischrift 4.305.880) aan koolstof 1, onder gebruikmaking van een homogenaat van nierweefsel, dat is verkregen uit vitamine D-deficiente kuikens. Het vereiste homogenaat wordt als volgt verkregen: een dag oude leghornkuikens worden gedurende een maand gevoederd met een vitamine D-deficient dieet, dat 1% calcium bevat (Omdahl et al., Biochemistry, 10, 2935-2940 (1971)). De kuikens worden daarna gedood, hun nieren worden verwijderd en er wordt een 20% (w/v) homogenaat bereid in ijskoude 0,19 M saccharoseoplossing, die 15 mM Tris-acetaat (trihydroxymethylaminoethaanacetaat) pH 7,4)) en 1,9 mM magnesiumacetaat bevat. (Omdahl, J., et al., Biochemistry, 10, 2935-2940 (1971) en Tanaka, Y., et al., Arch. Biochem. Biophys. 171, 521-526 (1975)).

Ter bereiding van het gewenste analoog, 24-fluor-1α,25-dihydroxyvitamine D_3, wordt de uitgangsstof, 24-fluor-25-hydroxyvitamine D_3 daarna met dit homogenaat geincubeerd. De volgende procedure toont een incubatie op kleine schaal, maar desgewenst kunnen de hoeveelheden natuurlijk op passende schaal worden vergroot.

Een monster (ca. 3 /ug) 24-fluor-25-hydroxyvitamine D_3 (in 25 /ul 95% ethanol) wordt toegevoegd aan een hoeveelheid nierhomogenaat (dat als boven beschreven is bereid en ongeveer 600 mg nierweefsel vertegenwoordigt), dat gesuspendeerd is in 4,5 ml bufferoplossing (pH 7,4), die 0,19 M saccharose, 1,5 mM Tris-acetaat, 1,9 mM magnesiumacetaat en 25 mM succinaat bevat. Na 2 uur schudden van het mengsel bij 37°C wordt de reaktie gestopt door toevoeging van een 2:1

oplosmiddelmengsel van methanol:$CHCl_3$. De organische fase van het resulterende mengsel wordt afgescheiden en ingedampt en het residu, dat het gewenste 24-fluor-1 α,25-dihydroxytamine D_3 bevat, wordt aan chromatografie onderworpen.

Aanvankelijke zuivering van het produkt geschiedt gemakkelijk door chromatografie over kleine Sephadex LH-20 (Pharmacia Corp., Piscataway, N.J.) kolommen,onder gebruikmaking van oplosmiddelsystemen als $CHCl_3$:hexaan (65:35, v/v) of hexaan:$CHCl_3$:MeOH (9:1:1, v/v), maar liefst wordt het produkt gezuiverd door hogedrukvloeistofchromatografie. (Een voor een dergelijk doel geschikte chromatograaf is een model ALC/GPC 204 hogedrukvloeistofchromatograaf (Waters Associates, Medford, MA), uitgerust met een ultravioletdetector, die bij 254 nm werkt.) Het als boven verkregen mengsel wordt geinjekteerd op een silicagelkolom (Zorbax-SIL, 0,46 x 25 cm, vervaardigd door Dupont, Inc.), die werkt onder een druk van 1000 psi, wat een stroomsnelheid van ongeveer 2 mm/min produceert. Onder gebruikmaking van een oplosmiddelsysteem, dat 9% 2-propanol in hexaan bevat, wordt het monster twee maal door deze kolom teruggeleid (door het instrument om te schakelen in zijn terugleidstand) en daarna opgevangen. Het oplosmiddel wordt verdampt en het residu wordt verder gezuiverd op een omgekeerde fasekolom /Zorbax-ODS (octadecylsilan, dat is gebonden aan een fijnkorrelige silicagel) 0,45 x 25 cm, een produkt van Dupont and Co./ onder gebruikmaking van dezelfde hogedrukvloeistofchromatograaf, die werkt bij een druk van 3000 psi. Het produkt wordt geelueerd met een oplosmiddelmengsel van H_2O/MeOH (1:3), een maal teruggeleid en daarna opgevangen. De opgevangen frakties worden ingedampt en het residu wordt opnieuw gechromatografeerd over de rechte fase silicagelkolom (Zorbax-SIL, 0,46 x 25 cm) onder gebruikmaking van precies dezelfde omstandigheden als boven beschreven. Na twee maal terugleiden wordt het monster opgevangen en na verdamping van het oplosmiddel wordt zuiver produkt (24-fluor-1 α,25-dihydroxyvitamine

D_3) verkregen en gekenmerkt en gekwantificeerd aan zijn ultravioletabsorptiemaximum bij 264 nm en zijn kenmerkende massaspektrumpatroon (molekuulgewicht = 434).

Uit het 24-fluor-1 α,25-dihydroxyvitamine D_3 wordt het overeenkomstige 5,6-trans-isomeer gemakkelijk bereid door met jodium gekatalyseerde isomerisatie volgens de algemene werkwijze van Verloop et al., Rec. Trav. Chim. Rays-Bas 78, 1004 (1969). Aldus levert behandeling van 24-fluor-1 α,25-dihydroxyvitamine D_3 in etheroplossing, die een druppel pyridine bevat, met een jodiumoplossing in hexaan (0,5 mg/ml) gedurende 15 minuten, gevolgd door toevoeging van een natriumthiosulfaatoplossing in water, afscheiding van de organische fase en verdamping van het oplosmiddel een residu op, waaruit het gewenste 24-fluor-1 α,25-dihydroxy-5,6-transvitamine D_3 wordt gewonnen door een combinatie van omgekeerde fase en rechte fase hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC) onder gebruikmaking van boven beschreven systemen of door dunnelaagchromatografie (TLC) aan silicagel onder gebruikmaking van ethylacetaat/hexaanoplosmiddelmengsels.

Geacyleerde derivaten van beide bovengenoemde verbindingen, die voor bepaalde toepassingen gewenst kunnen zijn, worden op gebruikelijke wijzen bereid, teweten door behandeling van een oplossing van de hydroxylverbinding met een acyleermiddel, zoals een acylanhydride of acylchloride. Verschillende uitvoeringsvormen voor dergelijke acyleringen zijn in de techniek goed bekend, alsmede de vereiste acyleerreagentia. Zo levert bijvoorbeeld behandeling van 24-fluor-1,25-dihydroxyvitamine D_3 met azijnzuuranhydride in pyridine, of mengsels van pyridine en een inert medeoplosmiddel, bij temperaturen beneden 50°C, het overeenkomstige 1,3-diacetaat op, terwijl onder krachtigere omstandigheden, bijvoorbeeld 80-90°C, het 1,3,25-triacetaat wordt verkregen. Andere acylaten, zoals propionaten, butyraten, benzoaten, nitrobenzoaten, hemisuccinaten, hemiglutamaten, hemiadipaten, hemidiglykolaten, enzovoort, worden op analoge wijze bereid

door reaktie van de vitaminealkohol met de overeenkomstige anhydriden of zuurchloriden. Desgewenst worden acylgroepen in dergelijke geacyleerde derivaten op gebruikelijke wijze verwijderd, zoals hydrolyse met zachte base (KOH/MeOH) of soortgelijke omstandigheden). Door selektieve acylering en/of deacylering, uitgevoerd aan 24-fluor-1α,25-dihydroxyvitamine D_3 of zijn 5,6-trans-isomeer kan men verbindingen verkrijgen met de struktuurformules 2 of 3, waarin R_1, R_2 en R_3, die hetzelfde of verschillend kunnen zijn, elk waterstof of acyl voorstellen.

In deze beschrijving en in de conclusies heeft de uitdrukking acyl betrekking op een alifatische acylgroep met 1 tot 6 koolstofatomen in alle mogelijke isomere vormen, zoals acetyl, propionyl, butyryl, enzovoort, of op gebruikelijke aromatische arylgroepen, zoals benzoyl, nitrobenzoyl, halogeenbenzoyl, methylbenzoyl, enzovoort, of op een dicarbonzure acylgroep met 2-6 atomen ketenlengte, zoals worden vertegenwoordigd door oxalyl, malonyl, succinyl, glutaryl, adipyl, diglykolyl, enzovoort.

De sterke vitamine D achtige werking van de nieuwe verbindingen van de uitvinding, gelijk aan die van het natuurlijke hormoon, 1,25-dihydroxyvitamine D_3, bemoedigt krachtig hun toepassing als therapeutische middelen voor aandoeningen, waarbij calcium- en fosfaatmetabolisme betrokken zijn, met misschien betere instandhouding van de verbindingsvoorraad in vivo, vanwege de verstoring van de 24-hydroxylering.

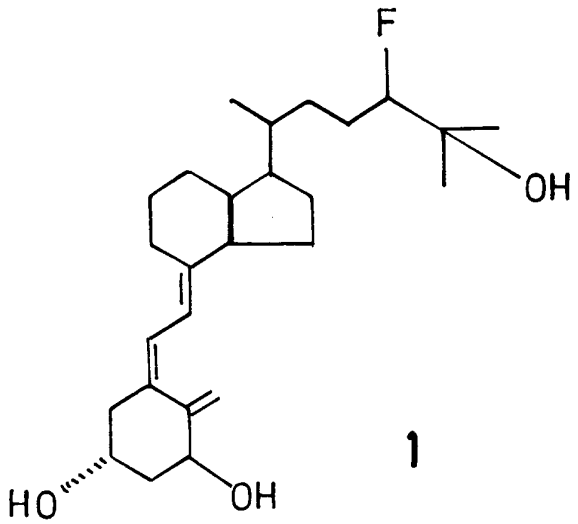
C O N C L U S I E S.

1. Verbindingen met de formule 2 of 3, waarin R_1, R_2 en R_3, die hetzelfde of verschillend kunnen zijn, elk uit waterstof of acyl geselekteerd zijn.

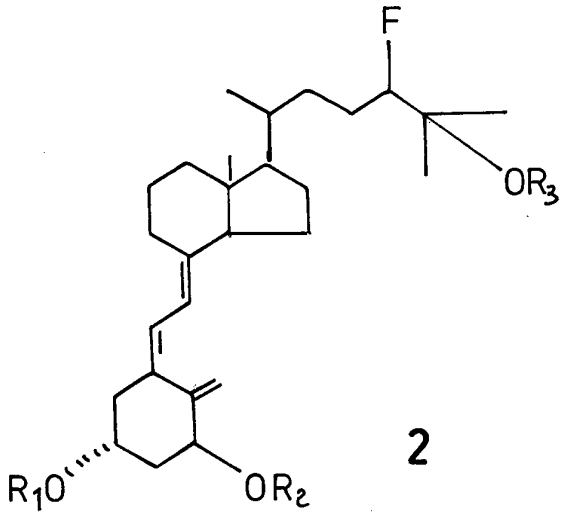
2. Verbindingen volgens conclusie 1, waarin R_1, R_2 en R_3 elk geselekteerd zijn uit de groep, bestaande uit waterstof, acetyl en benzoyl.

3. 24-fluor-1α,25-dihydroxyvitamine D_3.

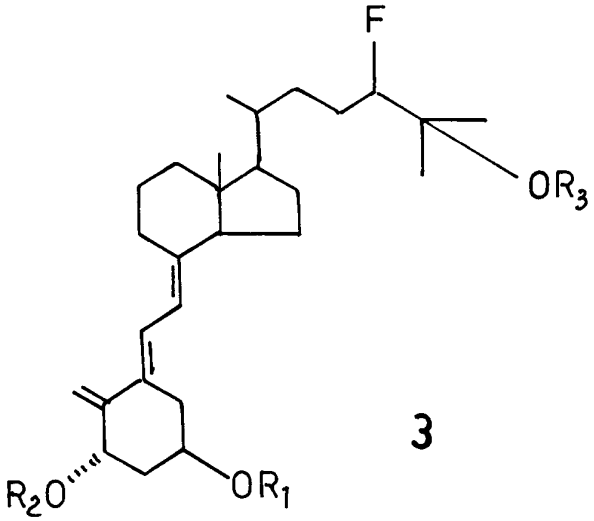
4. 24-fluor-1α,25-dihydroxy-5,6-trans-vitamine D_3.



1



2



3

8320218

Wisconsin Alumni Research Foundation, Madison, Wisconsin, Ver.St.v.Amerika