



(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **147525 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: **5822/83**

(51) Int.Cl.³: **C 07 C 172/00**

(22) Indleveringsdag: **16 dec 1983**

(24) Løbedag: **15 okt 1979**

(41) Alm. tilgængelig: **16 dec 1983**

(44) Fremlagt: **17 sep 1984**

(86) International ansøgning nr.: —

(62) Stamansøgning nr.: **5050/80**

(30) Prioritet: **28 mar 1979 US 024848**

(71) Ansøger: ***WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION; Madison, US.**

(72) Opfinder: **Hector F. *DeLuca; US, Heinrich K. *Schnoes; US, Nobuo *Ikekawa; JP, Yoko *Tanaka; US, Yoshiro *Kobayashi; JP.**

(74) Fuldmægtig: **Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard**

(54) **24,24-difluor-25-hydroxy-6-alkoxy-3,5-cyclo-
vitamin D₃ forbindelser**

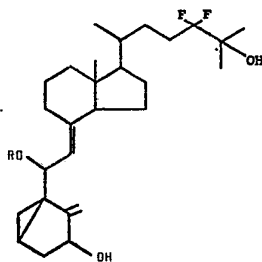
(57) Sammendrag:

hvor R er en carbonhydridgruppe.

Forbindelserne er mellemprodukter ved fremstillingen af
vitamin D₃-derivater.

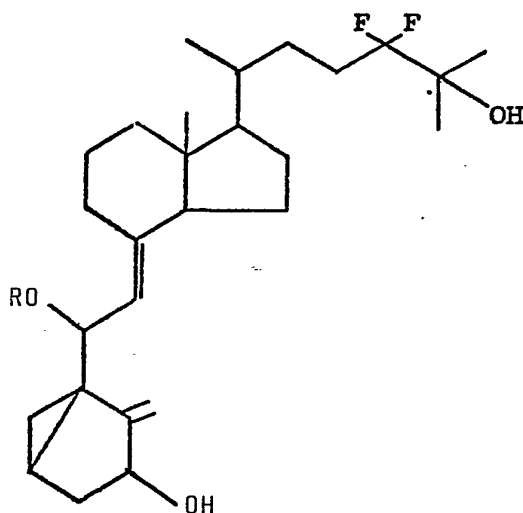
5822-83

24,24-difluor-25-hydroxy-6-alkoxy-3,5-cyclovitamin D₃-
forbindelser med formelen



DK 147525 B

Opfindelsen angår hidtil ukendte 24,24-difluor-25-hydroxy-6-alkoxy-3,5-cyclovitamin D₃ forbindelse med formlen



hvor R betegner en carbonhydridgruppe med 1 - 4 carbon-
atomer, der er mellemprodukter ved fremstillingen af det
5 hidtil ukendte 24,24-difluor-1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃.

Vitamin D₃ er et velkendt middel til at kontrollere kal-
cium- og phosphorhomeostase. Hos normale dyr eller menne-
sker vides denne forbindelse også at stimulere tarmkal-
ciumtransporten og knoglekalciummobiliseringen, og den
10 er i stand til at forebygge rakitis.

Det er også velkendt, at vitamin D₃ for at være virksomt
må omdannes in vivo til dets hydroxylerede former. F.eks.
hydroxyleres vitaminet først i leveren til dannelselse af 25-
hydroxy-vitamin D₃ og hydroxyleres yderligere i nyrerne,
15 hvorved der dannes 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ eller 24,-

25-dihydroxy-vitamin D₃. Den 1 α -hydroxylerede form af vitaminet antages sædvanligvis at være den fysiologisk aktive eller hormonale form af vitaminet og at være ansvarlig for, hvad der betegnes som den vitamin D-lignende virkning, som f.eks. forøget tarmabsorption af kalcium og fosfat, mobilisering af knoglemineral og tilbageholdelse af kalcium i nyrerne.

Siden opdagelsen af biologisk aktive metabolitter (metaboliseringsprodukter) af vitamin D har der været megen interesse for fremstilling af strukturanaloge af disse metabolitter, fordi sådanne forbindelser kan udgøre værdifulde terapeutiske midler til behandling af sygdomme, der skyldes uregelmæssigheder ved kalciummetabolismen. En hel række vitamin D-lignende forbindelser er blevet syntetiseret. Jfr. US patentskrifterne 3 741 996, der omhandler 1 α -hydroxycholecalciferol; 3 907 843, der omhandler 1 α -hydroxyergocalciferol; 3 786 062, der omhandler 22-dehydro-25-hydroxycholecalciferol; 3 906 014, der omhandler 3-deoxy-1 α -hydroxycholecalciferol og 4 069 321, der omhandler fremstillingen af forskellige sidekædefluorerede vitamin D₃-derivater og sidekædefluorerede dihydrotachysterolanaloge. Mange af disse forbindelser har faktisk vist sig at være i besiddelse af kraftig vitamin D-lignende virkning, og nogle af disse frembyder andre praktiske fordele, som f.eks. at de er forholdsvis lette at fremstille, eller at de har delvis selektiv virkningsmåde, men ingen har endnu vist sig så aktiv in vivo som 1 α , 25-dihydroxycholecalciferol (1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃), der nu sædvanligvis antages at være den targetcelleaktive hormonale form af vitamin D.

Man har nu fremstillet et nyt derivat af vitamin D, der er i det mindste så kraftigt som 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃, når man måler dets evne til at stimulere tarmkalciumtransporten eller dets evne til at mobilisere kalcium fra

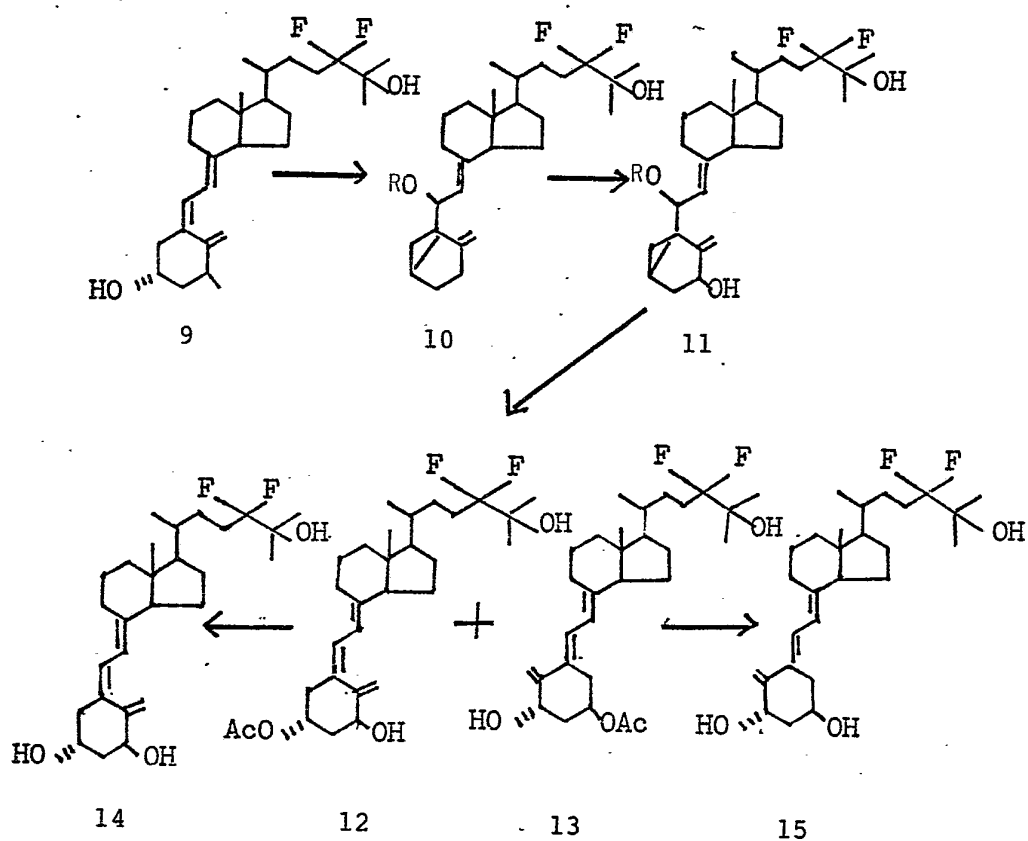
knogler. Dette derivat er blevet identificeret som 24,-
24-difluor-1 α ,25-dihydroxycholecalciferol (24,24-difluor-
1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ eller 24-F₂-1,25(OH)₂D₃).

5 Det omhandlede derivat kan udgøre et foretrukket middel
til mange terapeutiske formål, fordi det er blokeret for
yderligere metabolisme ved carbonatomet 24. Det er vel-
kendt, at 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ kan undergå yder-
ligere nedbrydning in vivo, hvorved der opstår 1 α ,24R,-
25-trihydroxy-vitamin D₃. Denne 24-hydroxylerede form er
10 imidlertid mindre aktiv end selve 1 α ,25-dihydroxy-vitamin
D₃, og 24-hydroxyleringen kan faktisk repræsentere et
første trin mod nedbrydning og fjernelse af denne for-
bindelse fra organismen. I det omhandlede derivat for-
hindrer tilstedeværelsen af 2 fluoratomer ved carbon-24
15 naturligvis hydroxyleringen af dette carbonatom, og for-
bindelsen er derfor ikke følsom for den aktivitetsfor-
mindskende nedbrydning, der påvirker 1,25-dihydroxychole-
calciferol. Forhindring af denne sidekædemetabolisme be-
virker, at det er muligt at opretholde højere cellenive-
20 auer af den analoge gennem et længere tidsrum, en faktor,
der har selvfølgelige fordele til mange terapeutiske for-
mål.

Identiteten af forbindelsen som 24,24-difluor-1 α ,25-di-
hydroxy-vitamin D₃ kan bekræftes ud fra de spektroskopi-
25 ske egenskaber. Forbindelsen udviser den typiske vitamin
D-lignende ultraviolette absorption med et maksimum ved
264 nm. Massespektret af forbindelsen indeholder en mo-
lekylarion ved m/e 452, således som der kræves for et
24,25-difluorderivat af 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃. Frag-
30 mentationerne m/e 434 og 416 repræsenterer fjernelsen af 1
og 2 molekyler H₂O. Tabet af hele steroidsidekæden bevir-
ker fragmentering af m/e 287, der ved fjernelse af 1 og 2
molekyler H₂O forårsager to toppe ved m/e 269 og 251. Her-
udover viser spektret udtalte toppe ved m/e 152 og m/e

134 ($152-H_2O$), der repræsenterer ring A fragmenter og som er typiske for $1\alpha,3\beta$ -dihydroxy-vitamin D_3 -forbindelser.

5 Fremstilling af 24,24-difluor- $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin D_3 kan udføres ved direkte C-1-hydroxylering via 3,5-cyclo-vitamin D-mellemprodukterne ifølge opfindelsen ved hjælp af almene metoder beskrevet af Paaren et al., (Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 75, 2080 - 2081 (1978)). Syntesen er vist på det skematiske processkema nedenfor



Behandling af en pyridinopløsning af 24,24-difluor-25-hydroxy-vitamin D₃ (9) med 1-1,5 ækvivalenter p-toluen-sulfonylchlorid i 24 timer ved 3°C, giver efter tilsætning en mættet opløsning af NaHCO₃, ekstraktion med ether, og efterfølgende afdampning af etheren, det tilsvarende 3-monotosylerede derivat. Dette materiale opløses i vandfrit methanol og behandles herefter med 5-10 ækvivalenter NaOAc. Efter opvarmning til 55°C i 20 timer afkøles blandingen, der fortyndes med H₂O og ekstraheres med ether. Den ønskede forbindelse 24,24-difluor-25-hydroxy-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₃ (10) (R = methyl) fås efter afdampning af etheren med et 50% totaludbytte. Anvendelsen af andre alkoholiske opløsningsmidler, såsom ethanol og propanol, i den ovenfor nævnte reaktion giver analoge cyclovitamin D-forbindelser med den almene formel (10), hvor R = ethyl, propyl. Disse analoge er lige så anvendelige til de efterfølgende syntetiske trin, som beskrives nedenfor. Dersom det ønskes, kan cyclovitamin D-forbindelsen renses ved hjælp af silicagel-tyndtlagschromatografi, idet man anvender hexan/ethylacetat (8:2) som opløsningsmiddelsystem, men den kan også anvendes direkte i det næste trin, der indebærer behandling af cyclovitaminmellemproduktet, opløst i et halogen-carbonhydridopløsningsmiddel (f.eks. CH₂Cl₂) med SeO₂ (0,5 ækvivalenter og t-butylhydroperoxid (2 ækvivalenter), således som beskrevet af Paaren et al. (ovenfor). Efter 15 minutters omsætning ved stuetemperatur tilsættes en 10% NaOH-opløsning, og produktet ekstraheres med ether. Etherfasen vaskes med vandig alkali og herefter med vand, der indampes og efter tyndtlagschromatografi af remanensen (idet man anvender silicagel og hexan/ethylacetat (6:4) som opløsningsmiddel) fås det rene 24,24-difluor-1α,25-dihydroxy-6-methoxy-3,5-cyclovitamin D₃ (11) (R = methyl) (udbytte 55%). Behandling af denne forbindelse med iseddikesyre ved 60°C i 15 minutter efterfulgt af neutralisering af eddikesyren med vandig alkali og ekstraktion

med ether giver efter afdampning af opløsningsmidlet en blanding af 24,24-difluor-1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃-3-acetat (12) og den tilsvarende 5,6-transisomere (13) (forhold ca. 3:1). Disse forbindelser kan bekvemt adskilles enten ved søjlechromatografi eller tyndtlagschromatografi (f.eks. silicagel, hexan:ethylacetatopløsningsmiddel) eller højtryksvæskechromatografi, og det således opnåede rene 24,24-difluor-1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃-3-acetat hydrolyseres ved behandling med base (f.eks. 5% NaOH/MeOH, 2 timer ved stuetemperatur), hvorefter man ved ekstraktion med ether og afdampning af etheren får den ønskede analoge 24,24-difluor-1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ (14) i ren form, der udviser samme spektrale egenskaber som en tilsvarende forbindelse, der er fremstillet enzymatisk ved hydroxylering af 24,24-difluor-25-hydroxy-vitamin D₃.

5,6-Trans-24,24-difluor-1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃-3-acetat (13) isomeren, der fås i ren form efter chromatografien beskrevet ovenfor, hydrolyseres i fortyndet base (5% NaOH/MeOH, 2 timer ved stuetemperatur), hvorved man efter etherekstraktion og afdampning af etheren får det rene 5,6-trans-24,24-difluor-1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ (15). Denne forbindelse viser et massespektrum, der er meget lig med den tilsvarende 5,6-cis-isomere, men den udviser et ultraviolet spektrum med et maksimum ved 270 nm, hvilket er karakteristisk for den 5,6-trans-vitamin D-chromofore.

5,6-Trans-24,24-difluor-1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃-forbindelsen kan naturligvis omdannes til 24,24-difluor-1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ ved den velkendte fotokemiske isomerisering af 5,6-dobbelbindingen, idet man anvender fremgangsmåden, f.eks. beskrevet af Inhoffen et al., (Chem. ber. 90, 2544 (1957)). Alternativt kan 5,6-trans-3-acetat-mellemproduktet (13) opnået ved solvolysen af

cyclovitaminforbindelsen, således som beskrevet ovenfor, isomeriseres ved bestråling med ultraviolet lys, hvorved man får 5,6-cis-3-acetatet (12), og omdannelsen af dette materiale til den ønskede 24,24-difluor-1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃-analoge kan herefter opnås ved hydrolyse i mild base, således som allerede beskrevet.

Biologisk aktivitet

Den biologiske effektivitet af den omhandlede analoge er bekræftet ved forsøg in vivo over for rotter.

- 10 Fravænnede hanrotter fodres med lav-kalcium, vitamin D-fri diæt, beskrevet af Suda et al. (J. Nutr. 100, 1049-1052 (1970)) i 3,5 uger. De opdeltes i tre grupper med 5-6 dyr i hver. Dyrene fra den ene gruppe (kontrolgruppen) fik 0,05 ml ethanol intrajugulært. Den anden og tredje gruppe
- 15 fik en kendt mængde af henholdsvis 24,24-difluor-1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ (24,24-F₂-1,25-(OH)₂D₃) og 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D₃ (1 α ,25-(OH)₂D₃) som opløsninger i 0,05 ml ethanol intrajugulært. Med passende mellemrum undersøgte virkningen af forsøgsforbindelserne på tarmkalci-
- 20 umtransporten og på serumkalciumniveauerne (et mål for knoglekalciummobilisering) ved standardmetoder (Martin and DeLuca, Am. J. Phys. 216, 1351 - 1359 (1969) og Tanaka et al., Biochemistry 14, 3293 - 3296 (1975) med følgende resultater:

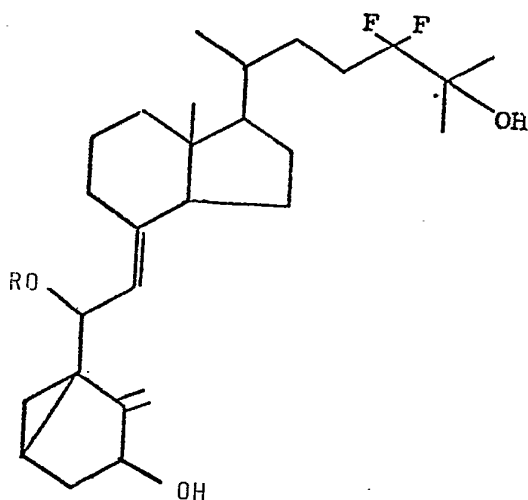
Biologisk aktivitet af $24,24\text{-F}_2\text{-}1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$

Indgiven forbindelse	Dosis (pmol)	Timer efter dosis	Tarm-Ca- transport (^{45}Ca Seros/ ^{45}Ca mucos)	Serum Calcium mg/100 ml
EtOH			$1,9 \pm 0,4^a$	$3,2 \pm 0,1^a$
$24,24\text{-F}_2$	65	6	$4,6 \pm 0,8^b$	$4,3 \pm 0,2^b$
$1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$		24	$4,7 \pm 0,9^c$	$4,1 \pm 0,3^b$
$1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$	65	6	$4,8 \pm 0,7^d$	$4,2 \pm 0,3^b$
		24	$5,7 \pm 0,7^e$	$4,1 \pm 0,4^c$
Signifikans af forskel			b,c,d,e fra a $P < 0,001$; c fra e ikke signi- fikant	b fra a $P < 0,001$; c fra a $P < 0,005$;

De ovenstående data viser, at $24,24\text{-F}_2\text{-}1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ er virksom både i tarmen og i knoglerne, og at forbindelsen er mindst lige så virksom som $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, det mest aktive, hidtil kendte vitamin D-derivat.

P a t e n t k r a v :

24,24-difluor-25-hydroxy-6-alkoxy-3,5-cyclovitamin D₃-
forbindelser med formlen



hvor R betegner en carbonhydridgruppe med 1-4 carbon-
atomer.

Fremdragne publikationer:
