



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **7920190**

Nederland

⑲ NL

---

- ⑤4 **24,24-Difluor-1 alfa, 25-dihydroxycholecalciferol.**
- ⑤1 Int.Cl<sup>3</sup>: C07C172/00, A61K31/59.
- ⑦1 Aanvrager: Wisconsin Alumni Research Foundation te Madison, Wisconsin, Ver.St.v.Am.
- ⑦4 Gem.: Ir. C.M.R. Davidson c.s.  
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade  
Dr. Kuiperstraat 6  
2514 BB 's-Gravenhage.
- 
- ②1 Aanvraag Nr. 7920190.
- ⑧6 Aanvraagnummer oorspronkelijke internationale aanvraag: PCT/US79/00899.
- ②2 Ingediend 15 oktober 1979.
- ③2 Voorrang vanaf 28 maart 1979.
- ③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 24848 .
- ⑥2 - -
- 

- ④3 Ter inzage gelegd 30 januari 1981.
- ⑧7 Publicatiedatum oorspronkelijke internationale aanvraag: 2 oktober 1980.
- ⑧7 Publicatienummer oorspronkelijke internationale aanvraag: WO80/02028.

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 afdruk 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.

---

24,24-Difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol.

Onderwerp van de uitvinding.

De uitvinding heeft betrekking op een verbinding met vitamine D-achtige activiteit, en in het bijzonder op een derivaat van vitamine D<sub>3</sub>.

5 Vitamine D<sub>3</sub> is een bekend middel voor het regelen van de calcium- en fosforhomeostase. Het is bekend, dat deze verbinding normaal bij mens en dier het intestinale calciumtransport en de calciummobilisatie uit beenweefsel stimuleert en rachitis voorkomt. Verder is het bekend, dat wil vitamine D<sub>3</sub> werkzaam zijn,  
10 het in vivo moet worden omgezet in gehydroxyleerde vormen daarvan. Zo wordt het vitamine bijvoorbeeld eerst in de lever gehydroxyleerd tot 25-hydroxy-vitamine D<sub>3</sub> om daarna in de nier verder te worden gehydroxyleerd tot 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-vitamine D<sub>3</sub> of 24,25-dihydroxy-vitamine D<sub>3</sub>. De 1 $\alpha$ -gehydroxyleerde vorm van het vitamine wordt alge-  
15 meen beschouwd als de fysiologisch actieve of hormonale vorm van het vitamine en verantwoordelijk te zijn voor wat wordt genoemd de vitamine D-achtige activiteiten zoals verhoging van de intestinale calcium- en fosfaatabsorptie, mobilisatie van beenmineraal en retentie van calcium in de nieren.

20 Stand van de techniek.

Sinds de ontdekking van biologisch actieve metaboliëten van vitamine D heeft men veel belangstelling getoond voor de bereiding van structurele analoga van deze metaboliëten omdat deze verbindingen bruikbare therapeutica kunnen zijn voor het be-  
25 handelen van aandoeningen die het gevolg zijn van stoornissen in het calciummetabolisme. Verschillende vitamine D-achtige verbindingen zijn gesynthetiseerd. Zie bijvoorbeeld het Amerikaans octrooi-schrift 3.741.996 dat betrekking heeft op 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol, het Amerikaans octrooi-schrift 3.907.843 dat betrekking heeft op  
30 1 $\alpha$ -hydroxyergocalciferol, het Amerikaans octrooi-schrift 3.786.062 dat betrekking heeft op 22-dehydro-25-hydroxycholecalciferol, het Amerikaans octrooi-schrift 3.906.014 dat betrekking heeft op 3-deoxy-

1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol en het Amerikaans octrooischrift 4.069.321 dat betrekking heeft op de bereiding van verschillende zijketen-gefluoreerde vitamine D<sub>3</sub> derivaten en zijketen-gefluoreerde dihydrotachysterol analoga. Aangetoond is dat vele van deze ver-  
 5 bindingen sterke vitamine D-achtige activiteit vertonen, en dat sommige andere praktische voordelen bezitten zoals betrekkelijk eenvoudig te bereiden of gedeeltelijk selectief werkzaam. Het is echter gebleken, dat geen enkel van deze verbindingen in vivo even actief is als 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol (1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vita-  
 10 mine D<sub>3</sub>) dat thans algemeen wordt beschouwd als de target-weefsel-actieve hormonale vorm van vitamine D.

Beschrijving van de uitvinding.

Een nieuw vitamine D derivaat is nu bereid, dat tenminste even potent is als 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> zoals  
 15 vastgesteld aan het vermogen om het calciumtransport door de darmwand en de calciummobilisatie uit beenweefsel te stimuleren. Dit derivaat is geïdentificeerd als 24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol (24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> of 24,F<sub>2</sub>-1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>).

20 Dit nieuwe derivaat kan een voorkeursmiddel worden voor vele therapeutische toepassing omdat het voor verdere metabolisering aan het 24-koolstofatoom is geblokkeerd. Het is algemeen bekend, dat 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> in vivo verder kan metaboliseren tot 1 $\alpha$ ,24R,25-trihydroxy vitamine D<sub>3</sub>. Deze 24-gehydroxyleerde vorm is echter minder actief dan 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> zelf, en 24-hydroxylering kan dan ook de eerste stap naar  
 25 ontleding en eliminatie van deze verbinding uit het lichaam betekenen. Omdat in het derivaat volgens de uitvinding aan het 24-koolstofatoom twee fluoratomen aanwezig zijn, wordt hydroxylering van dit koolstofatoom voorkomen zodat de activiteit van de verbinding  
 30 ten gevolge van metabolisering zoals bij 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol, niet vermindert. Vanwege het uitblijven van dit zijketen metabolisme zou het analogon langer op een hoger weefselgehalte kunnen blijven wat natuurlijk voor vele therapeutische toepassingen  
 35 een voordeel betekent.

7920190

Beste manier om de uitvinding te realiseren.

24,24-Difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> wordt vlot bereid uit 24,24-difluor-25-hydroxy vitamine D<sub>3</sub> door enzymatische hydroxylering in vitro van laatstgenoemde verbinding aan het  
5 1 -koolstofatoom zoals weergegeven in schema B.

De hydroxylering aan het 1-koolstofatoom wordt uitgevoerd door de precursor 24,24-difluor-25-hydroxy vitamine D<sub>3</sub> te incuberen met een homogenaat bereid uit nierweefsel van vitamine D-deficiënte kuikens. Een dag oude leghorn kuikens worden een maand  
10 op een vitamine D-deficiënt dieet dat 1 % calcium bevat, gezet (Omdahl et al, Biochemistry, 10, 2935-2940 (1971)). De kuikens worden dan gedood waarna de nieren worden verwijderd waaruit een 20 %-ig (gew./vol.) homogenaat wordt bereid in ijskoude 0,19 M sucrose-oplossing die 15 mM Tris-acetaat (trihydroxymethylaminoethaanacetaat)  
15 (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)).

Bij incuberen op kleine schaal bijvoorbeeld wordt 3  $\mu$ g 24,24-difluor-25-hydroxy vitamine D<sub>3</sub> (in 25  $\mu$ l 95 %-ige  
20 ethanol) toegevoegd aan een evenmatige hoeveelheid nierhomogenaat (bereid zoals boven aangegeven uit ongeveer 600 mg nierweefsel) gesuspenseerd in 4,5 ml bufferoplossing (pH 7,4) die 0,19 M sucrose, 1,5 mM tris-acetaat, 1,9 mM magnesiumacetaat en 25 mM succinaat bevat. Na 2 uren schudden van het mengsel bij 37<sup>o</sup> C wordt de reactie  
25 door toevoegen van een mengsel van methanol en chloroform (2:1) beëindigd. De organische fase wordt van het gevormde mengsel afgescheiden (gravitatie-bezinking) en ingedampt waarna het residu dat het gewenste 24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> bevat, chromatografisch wordt gezuiverd.

30 Het residu wordt als een oplossing in 1 ml van een mengsel van chloroform en hexaan (65:35) opgebracht op een Sephadex LH-20 (een hydroxypropylether derivaat van een polydextran, Pharmacia Corp., Piscataway, N.J.) kolom (0,7 x 14 cm) gepakt en geëquilibreerd in een mengsel van chloroform en hexaan (65:35). Na  
35 elutie van 11 ml oplosmiddel (dat wordt verwijderd) worden de

7920190

volgende 25 ml verzameld en in vacuo ingedampt. Het residu wordt als een oplossing in 1 ml van een mengsel van hexaan, chloroform en methanol (9:1:1) gechromatografeerd over een Sephadex LH-20 kolom (0,7 x 14 cm) geëquilibreerd en geëluëerd met een mengsel van  
 5 hexaan, chloroform en methanol (9:1:1). De eerste 9 ml eluens worden verwijderd waarna de volgende 30 ml worden verzameld en ingedampt.

Het produkt wordt verder gezuiverd door hogedruk-vloeistofchromatografie onder gebruikmaking van een hogedruk-vloeistofchromatograaf model ALC/GPC 204 (Waters Associates, Medford, Mass.) voorzien van een ultraviolet-detector bedreven bij 254 nm.  
 10 Het verkregen monster wordt geïnjecteerd in een silicagelkolom (Zorbax-SIL, 0,46 x 25 cm van Dupont, Inc.) die bedreven onder een druk van 6894 kPa een stroomsnelheid geeft van 2 ml/min.. Onder  
 15 gebruikmaking van een oplosmiddelsysteem dat 9 % 2-propanol in hexaan bevat, wordt het monster 2 keer door deze kolom in kringloop rondgevoerd (door het instrument in zijn recycle-stand te schakelen) en daarna verzameld. Het oplosmiddel wordt door verdampen verwijderd waarna het residu verder wordt gezuiverd over een kolom met omge-  
 20 keerde fase [Zorbax-ODS (octadecylsilaan gebonden aan een fijnkorrelige silicagel) 0,45 x 25 cm van Dupont & Co.,] onder gebruikmaking van dezelfde hogedruk-vloeistofchromatograaf bedreven onder een druk van 20682 kPa. Het produkt wordt geëluëerd met een mengsel van water en methanol (1:3), een maal in kringloop rondgevoerd en  
 25 daarna verzameld. De verzamelde fracties worden ingedampt waarna het residu opnieuw wordt gechromatografeerd over een silicagelkolom met normale fase (Zorbax-SIL, 0,46 x 25 cm) onder precies dezelfde omstandigheden als boven aangegeven. Na 2 keer in kringloop rondvoeren wordt het monster verzameld en ingedampt waarbij een zuiver  
 30 produkt wordt verkregen.

De identiteit van het produkt als 24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> kan door zijn spectroscopische eigenschappen worden bevestigd. Het produkt vertoont de kenmerkende vitamine D-achtige ultraviolette absorptie met een maximum bij  
 35 264 nm. Het massaspectrum van het produkt bevat een moleculair ion

7920190

bij m/e 452 zoals voor een 24,24-difluor derivaat van  $1\alpha,25$ -dihydroxy vitamine  $D_3$  vereist. Eliminatie van 1 en 2 moleculen water komt tot uitdrukking in fragment-ionen bij m/e 434 en 416. Verlies van de gehele steroid zijketen resulteert in een fragment bij m/e 287 dat bij eliminatie van 1 en 2 moleculen water pieken vertoont bij m/e 269 en 251. Daarnaast vertoont het spectrum opvallende pieken bij m/e 152 en m/e 134 ( $152-H_2O$ ) afkomstig van ring A fragmenten en kenmerkend voor  $1\alpha,3\beta$ -dihydroxy vitamine  $D_3$  verbindingen.

Het uitgangs 24,24-difluor-25-hydroxy vitamine  $D_3$  voor de bereiding van het  $1\alpha$ -hydroxy analogon volgens de uitvinding, kan worden bereid volgens reactieschema A.

Onder verwijzing naar reactieschema A wordt choleenzuur (formule 1) behandeld met dihydroppyran in een geschikt organisch oplosmiddel (methyleenchloride) bij  $0^\circ C$  in aanwezigheid van p-tolueensulfonzuur en daarna met 1 N natriumhydroxyde in ethanol bij  $20^\circ C$  onder vorming van de choleenzuurtetrahydropyranyl-ether (bescherming van de hydroxylgroep in de A-ring). Deze verbinding wordt dan 4 uren behandeld met een overmaat methyllithium in tetrahydrofuran/ethylether bij  $0^\circ C$  waarna de beschermende tetrahydropyranylgroep wordt verwijderd door 24 uren behandelen met p-tolueensulfonzuur in methyleenchloride/methanol bij  $20^\circ C$ . Bij daaropvolgende acetylering ( $AC_2O$ -pyridine/methyleenchloride) gedurende 24 uren bij  $20^\circ C$  ontstaat het methylketon (formule 2) (smeltpunt  $148-151^\circ C$ ).

Bij refluxen van het methylketon (formule 2) gedurende 7 uren in azijnzuuranhydride bij aanwezigheid van p-tolueensulfonzuur (enolacetylering) ontstaat het diacetaat (formule 3) (smeltpunt  $109-110^\circ C$ , m/e 396 (M-60)). Het diacetaat wordt dan omgezet in het difluorcyclopropan (formule 4) door 30 min. verhitten met natriumchloordifluoracetaat in diglyme bij  $170^\circ C$  (opbrengst 34 %, smeltpunt  $112-115^\circ C$ ).

Door de verbinding met de formule 4 2 uren te behandelen met lithiumhydroxyde in tetrahydrofuran/methanol/water bij  $20^\circ C$  en daarna te acetyleren ( $AC_2O$ /pyridine/methyleenchloride) gedurende 24 uren bij  $20^\circ C$  wordt, na chromatograferen over silica-

7920190

gel, het difluorketon (formule 5) (smeltpunt 135-136,5° C) verkregen (als een mengsel van het 23(E)- en 23(Z)-geconjugeerde keton; het difluorketon wordt door chromatograferen over silicagel afgescheiden).

- 5 Het difluorketon (formule 5) wordt tot reactie gebracht met een overmaat methylmagnesiumjodide in ethylether bij 0° C gedurende 15 min. en daarna geacetyleerd (AC<sub>2</sub>O/pyridine/methyleenchloride) gedurende 20 uren bij 20° C onder vorming van het 25-carbinol (formule 6) in een opbrengst van 85 % (smeltpunt 163-10 164,5° C,  $\delta$  1,28 (6H, s, C-26,27), m/e 420 (M-60)). Het carbinol (formule 6) wordt vervolgens allylisch gebromeerd door reactie met N-broomsuccinimide in tetrachloorkoolstof onder refluxen gedurende 25 min.. De gebromeerde verbinding wordt daarop direkt gedehydrobromeerd door 15 min. behandelen met s-collidine in xyleen onder 15 refluxen waarbij een mengsel van het 4,6-dieën en 5,7-dieën (formule 7) ontstaat. Het 5,7-dieën ( $\lambda$  max 263, 272, 282 en 292 nm) wordt afgezonderd door het reactiemengsel 15 uren te behandelen met p-tolueensulfonzuur in aceton bij 20° C gevolgd door preperatieve dunnelaagchromatografie (benzeen/ethylacetaat (15:1), drie keer). 20 Het verkregen 5,7-dieën wordt verzeept door 15 uren behandelen met 5 %-ige kaliumhydroxyde/methanol bij 20° C en daarna bestraald (Hanová hoge druk kwarts kwiklamp model 654A36, 200 W) in een mengsel van ethanol en benzeen gedurende 2,5 min. bij 0° C onder vorming van het previtamine (formule 8) in oplossing. De bestraalde oplossing wordt 1 uur gerefluxt en daarna gefractioneerd door dunnelaagchromatografie (silicagel, benzeen/ethylacetaat (5:1), drie keer) en hogedrukvloeistofchromatografie (Zorbax-SIL, 25 cm x 2,1 mm i.d. van Dupont Co., Wilmington, Delaware) met methyleenchloride als eluerend oplosmiddel waarbij het 24,24-difluor-25-hydroxy vitamine 25 D<sub>3</sub> (formule 9) wordt verkregen ( $\lambda$  max 264 nm,  $\lambda$  min 228 nm, m/e 30 436 (M+), 421, 418, 403, 377, 271, 253, 136, 118).

- Het spreekt vanzelf dat het 24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> ook geheel chemisch kan worden verkregen. Uitgaande van 24,24-difluor-25-hydroxy vitamine D<sub>3</sub> omvat een bijzon- 35 der geschikte bereidingswijze rechtstreekse hydroxylering aan het

7920190

1-koolstofatoom via 3,5-cyclovitamine D tussenprodukten volgens de algemene methoden beschreven door Paaren et al in Proc. Nat. Acad. Sci., Amerika, 75, 2080-2081 (1978). Deze synthese is weergegeven in reactieschema C.

- 5                                      Onder verwijzing naar reactieschema C wordt een oplossing van 24,24-difluor-25-hydroxy vitamine D<sub>3</sub> (formule 9) in pyridine 24 uren behandeld met 1-1,5 equivalent p-tolueensulfonylchloride bij 3<sup>o</sup> C. Na afloop wordt aan het reactiemengsel een verzadigde oplossing van natriumwaterstofcarbonaat toegevoegd waarna
- 10 het mengsel wordt geëxtraheerd met ether. Na verwijderen van de ether door verdampen wordt het gevormde 3-monogetosyleerde derivaat opgelost in watervrije methanol en behandeld met 5-10 equivalent natriumacetaat. Het mengsel wordt 20 uren verwarmd bij 55<sup>o</sup> C en na afloop gekoeld, verdund met water en geëxtraheerd met ether. Door
- 15 de ether uit de oplossing te verdampen wordt het gewenste 24,24-difluor-25-hydroxy-6-methyl-3,5-cyclovitamine D<sub>3</sub> (formule 10 waarin Z methyl is) verkregen in een totale opbrengst van 50 %. Wanneer in plaats van methanol een andere alcohol wordt gebruikt bijvoorbeeld ethanol of propanol, worden analoge cyclovitamine D verbindingen
- 20 met de formule 10 waarin Z bijvoorbeeld ethyl of propyl is, verkregen. Dergelijke analoga kunnen met even goed gevolg voor de hierna beschreven stappen worden gebruikt. Het cyclovitamine D produkt kan desgewenst worden gezuiverd door silicagel dunnelaagchromatografie met als oplosmiddelsysteem hexaan/ethylacetaat (8:2), maar kan ook
- 25 rechtstreeks voor de volgende stap worden gebruikt. Deze omvat behandelen van het cyclovitamine tussenprodukt als een oplossing in een halogeenkoolstof oplosmiddel (bijvoorbeeld methyleenchloride) met seleendioxyde (0,5 equivalent) en tert.butylhydroperoxyde (2 equivalent) volgens de methoden beschreven door Paaren et al. supra.
- 30 Na 15 min. reageren bij kamertemperatuur wordt een 10 %-ige natriumhydroxyde-oplossing toegevoegd waarna het produkt met ether wordt geëxtraheerd. De etherfase wordt gewassen met achtereenvolgens waterige alkali en water waarna de ether door verdampen wordt verwijderd. Het residu wordt onderworpen aan dunnelaagchromatografie
- 35 (onder gebruikmaking van silicagel en hexaan/ethylacetaat (6:4) als

7920190

oplosmiddel) waarbij zuiver 24,24-difluor-1 $\alpha$ -25-dihydroxy-6-methoxy-3,5-cyclovitamine D<sub>3</sub> (formule 11 waarin Z methyl is) wordt verkregen (opbrengst 55 %). Door dit produkt 15 min. te behandelen met ijs-  
 5 azijn bij 60° C gevolgd door neutralisatie van het azijnzuur met  
 waterige alkali en extraheren met ether, wordt na verdampen van de  
 ether een mengsel verkregen van 24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vita-  
 mine D<sub>3</sub> 3-acetaat (formule 12) en het overeenkomstige 5,6-trans-  
 isomeer (formule 13) (in een verhouding van ongeveer 3:1). Deze  
 isomeren kunnen eenvoudig van elkaar worden gescheiden hetzij door  
 10 kolomchromatografie of dunnelaagchromatografie (onder gebruikmaking  
 van bijvoorbeeld silicagel en hexaan/ethylacetaat als oplosmiddel),  
 hetzij door hogedrukvlloeistofchromatografie. Het aldus verkregen  
 zuivere 24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> 3-acetaat wordt  
 dan verzeept door behandelen met een base (bijvoorbeeld 5 %-ig  
 15 natriumhydroxyde in methanol gedurende 2 uren bij kamertemperatuur)  
 gevolgd door extraheren met ether. Na verdampen van de ether uit de  
 oplossing wordt het gewenste 24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine  
 D<sub>3</sub> (formule 14) in zuivere vorm verkregen. Het produkt vertoont  
 spectrale eigenschappen zoals beschreven voor het produkt dat is  
 20 verkregen langs enzymatische weg.

Het 5,6-trans-24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy  
 vitamine D<sub>3</sub> 3-acetaat isomeer (formule 13) dat na boven beschreven  
 chromatograferingsstap in zuivere vorm is verkregen, wordt gehydro-  
 lyseerd met een verdunde base (bijvoorbeeld 5 %-ig natriumhydroxyde  
 25 in methanol gedurende 2 uren bij kamertemperatuur) gevolgd door  
 extraheren met ether. Na verdampen van de ether uit de oplossing  
 wordt zuiver 5,6-trans-24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub>  
 (formule 15) verkregen. Het massaspectrum van deze verbinding komt  
 sterk overeen met dat van het overeenkomstige 5,6-cis-isomeer maar  
 30 het U.V. spectrum vertoont een maximum bij 270 nm dat karakteri-  
 stiek is voor de 5,6-transvitamine<sup>D</sup> chromofoor.

Het 5,6-trans-24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy  
 vitamine D<sub>3</sub> kan in 24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> worden  
 omgezet door fotochemische isomerisatie van de 5,6-dubbele binding  
 35 onder toepassing van de methode van bijvoorbeeld Inhoffen et al.

7920190

beschreven in Chem. Ber. 90, 2544 (1957). In plaats daarvan kan het 5,6-trans-3-acetaat tussenprodukt (formule 13) zoals verkregen bij de hoger beschreven solvolyse van de cyclovitamine verbinding, door bestralen met U.V. worden geïsommeriseerd tot het 5,6-cis-3-acetaat (formule 12). Deze verbinding wordt dan omgezet in het gewenste 24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> analogon door verzeppen met een milde base zoals hoger beschreven.

Biologische activiteit.

De biologische activiteit van het nieuwe analogon werd in vivo onderzocht aan ratten.

Mannetjes Weanling ratten werden 3,5 weken op een laag-calciumvitamine D gesupplementeerd dieet van Suda et al. (J. Nutr. 100, 1049-1052 (1970)) gezet en daarna in drie groepen van elk 5-6 verdeeld. Twee groepen werden intrajugulair geïnjecteerd met een bepaalde hoeveelheid van respectievelijk 24,24-difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> (24,24-F<sub>2</sub>-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) en 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamine D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) als een oplossing in 0,05 ml ethanol. Een controlegroep werd intrajugulair geïnjecteerd met 0,05 ml ethanol. Op passende tijden werd het effect van de proefverbindingen op het calciumtransport door de darmwand en op de serum-calciumspiegel (een maat voor de mobilisatie van calcium uit beenweefsel) bepaald volgens standaard bepalingmethoden (Martin en DeLuca, Am. J. Phys. 216, 1351-1359 (1969) en Tanaka et al., Biochemistry 14, 3293-3296 (1975)). De resultaten zijn in onderstaande tabel samengevat.

7920190

Biologische activiteit van 24,24-F<sub>2</sub>-1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

|    | Toegediende<br>verbinding             | Dosis<br>(pmol) | Tijd na<br>toediening,<br>uren | Intestinaal Ca<br>transport ( <sup>45</sup> Ca<br>seros/ <sup>45</sup> Ca mucos) | Serumcal-<br>cium, mg/100<br>ml |
|----|---------------------------------------|-----------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 5  | EtOH                                  |                 |                                | 1,9 ± 0,4 <sup>a</sup>                                                           | 3,2 ± 0,1 <sup>a</sup>          |
|    | 24,24-F <sub>2</sub> -                | 65              | 6                              | 4,6 ± 0,8 <sup>b</sup>                                                           | 4,3 ± 0,2 <sup>b</sup>          |
|    | 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> |                 | 24                             | 4,7 ± 0,9 <sup>c</sup>                                                           | 4,1 ± 0,3 <sup>b</sup>          |
|    | 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> | 65              | 6                              | 4,8 ± 0,7 <sup>d</sup>                                                           | 4,2 ± 0,3 <sup>b</sup>          |
| 10 |                                       |                 | 24                             | 5,7 ± 0,7 <sup>e</sup>                                                           | 4,1 ± 0,4 <sup>c</sup>          |
|    | Verschilsignificantie                 |                 | b,c,d,e t.o.v. a               |                                                                                  | b t.o.v. a                      |
|    |                                       |                 | P < 0,001;                     |                                                                                  | P < 0,001;                      |
|    |                                       |                 | c t.o.v. e                     |                                                                                  | c t.o.v. a                      |
|    |                                       |                 | , niet significant             |                                                                                  | P < 0,005;                      |

15

Uit de resultaten blijkt, dat 24,24-F<sub>2</sub>-1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> het calciumtransport door de darmwand en de calciummobilisatie uit beenweefsel stimuleert, en dat de verbinding tenminste even actief is als 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, het meest actieve vitamine D derivaat dat tot nog toe bekend is.

20

Het 24,24-difluor-1α,25-dihydroxycholecalciferol en 24,24-difluor-1α,25-dihydroxy-5,6-trans-cholecalciferol volgens de uitvinding kunnen gemakkelijk worden toegediend als steriele parenterale oplossingen door injectie of intraveneus, of langs orale of rectale weg. Doses van ongeveer 0,1-2,5 µg/dag zijn voldoende om de beschreven fysiologische calcium balans responsies die karakteristiek zijn voor vitamine D-achtige activiteit, te bereiken, bij een geschikte onderhoudsdosis van ongeveer 0,25 µg/dag.

25

De verbindingen kunnen worden verwerkt tot preparaten door vereniging met een niet-toxische farmaceutisch aanvaardbare drager. De dragers kunnen vast of vloeibaar zijn zoals bijvoorbeeld maïszetmeel, lactose, sucrose, arachisolie, olijfolie, sesamolie en water. Vaste preparaten kunnen in de vorm verkeren van pillen, capsules, poeders en platte of ruitvormige tabletten.

30

Vloeibare preparaten omvatten zachte gelatinecapsules, siropen,

35

7920190

suspensies, emulsies en oplossingen. De preparaten kunnen toevoegingen bevatten zoals conserveermiddelen, stabilisatoren, bevochtigingsmiddelen, emulgatoren en oplosbaarheidsbevorderende middelen. Verder kunnen de preparaten andere therapeutische middelen bevatten.

5                   Het is duidelijk, dat het boven aangegeven doseringstraject niet imperatief is en dat de juiste dosering afhankelijk is van de te behandelen aandoening, het beoogde resultaat en van andere factoren die een rol spelen bij de therapeutische toepassing van dergelijke geneesmiddelen.

10

7920190

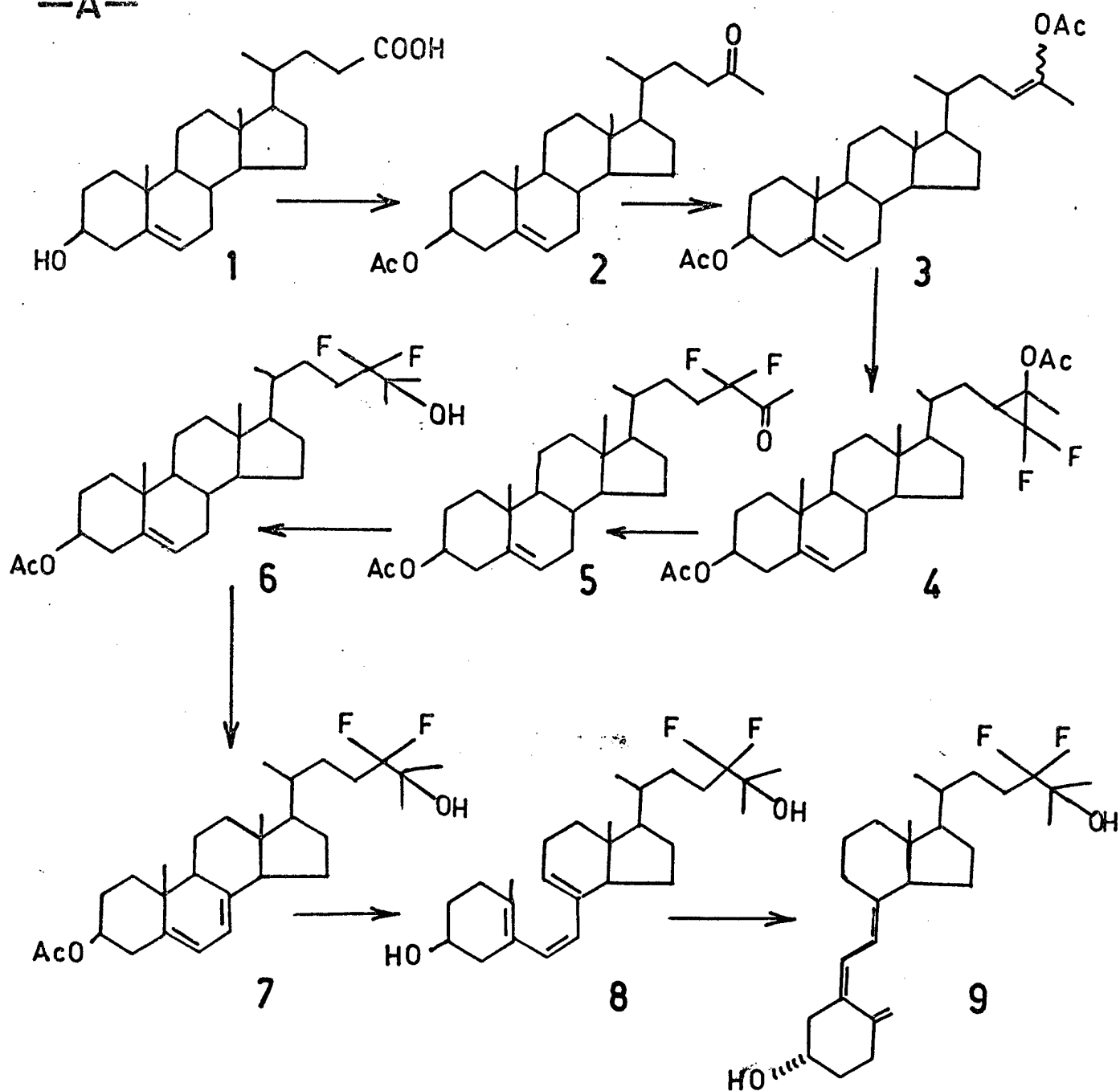
C O N C L U S I E S

1. 24,24-Difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol.
2. Verbinding volgens conclusie 1 in kristallijne  
vorm.
- 5 3. 24,24-Difluor-1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-5,6-trans-chole-  
calciferol.
4. Verbinding volgens conclusie 3 in kristallijne  
vorm.
5. Verbindingen met de formule 16 waarin R een  
10 koolwaterstofgroep met 1 tot ongeveer 4 koolstofatomen en R<sub>1</sub> een  
waterstofatoom of hydroxylgroep voorstellen.
6. Farmaceutisch preparaat dat een verbinding  
volgens conclusie 1 of 3 bevat samen met een farmaceutisch excipiëns.

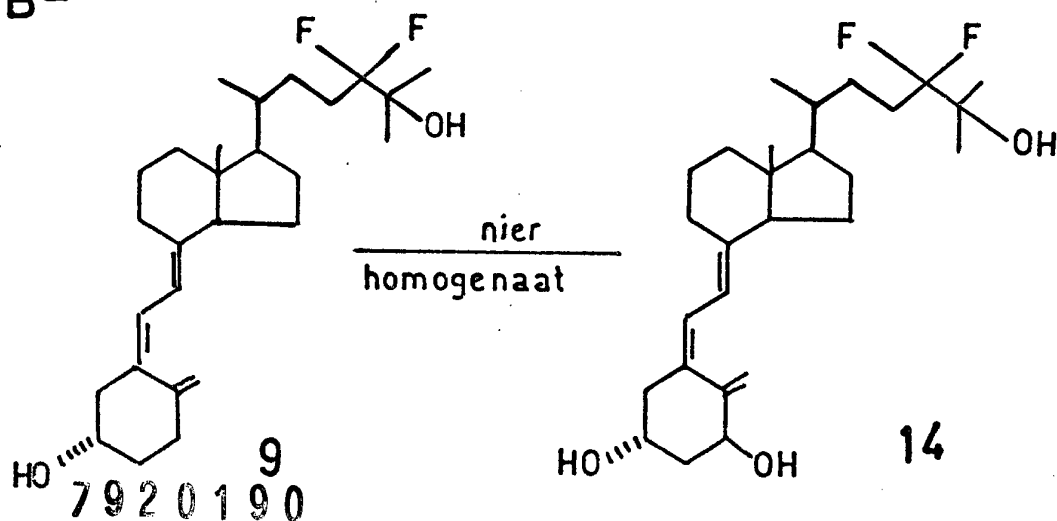
15

7920190

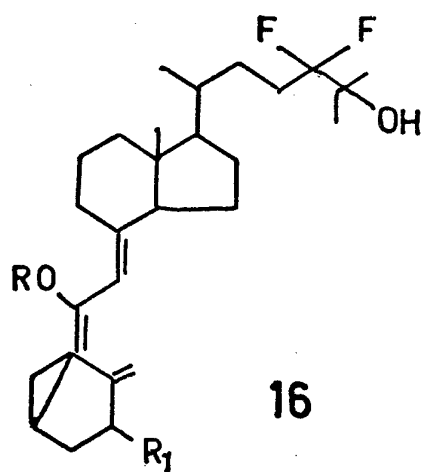
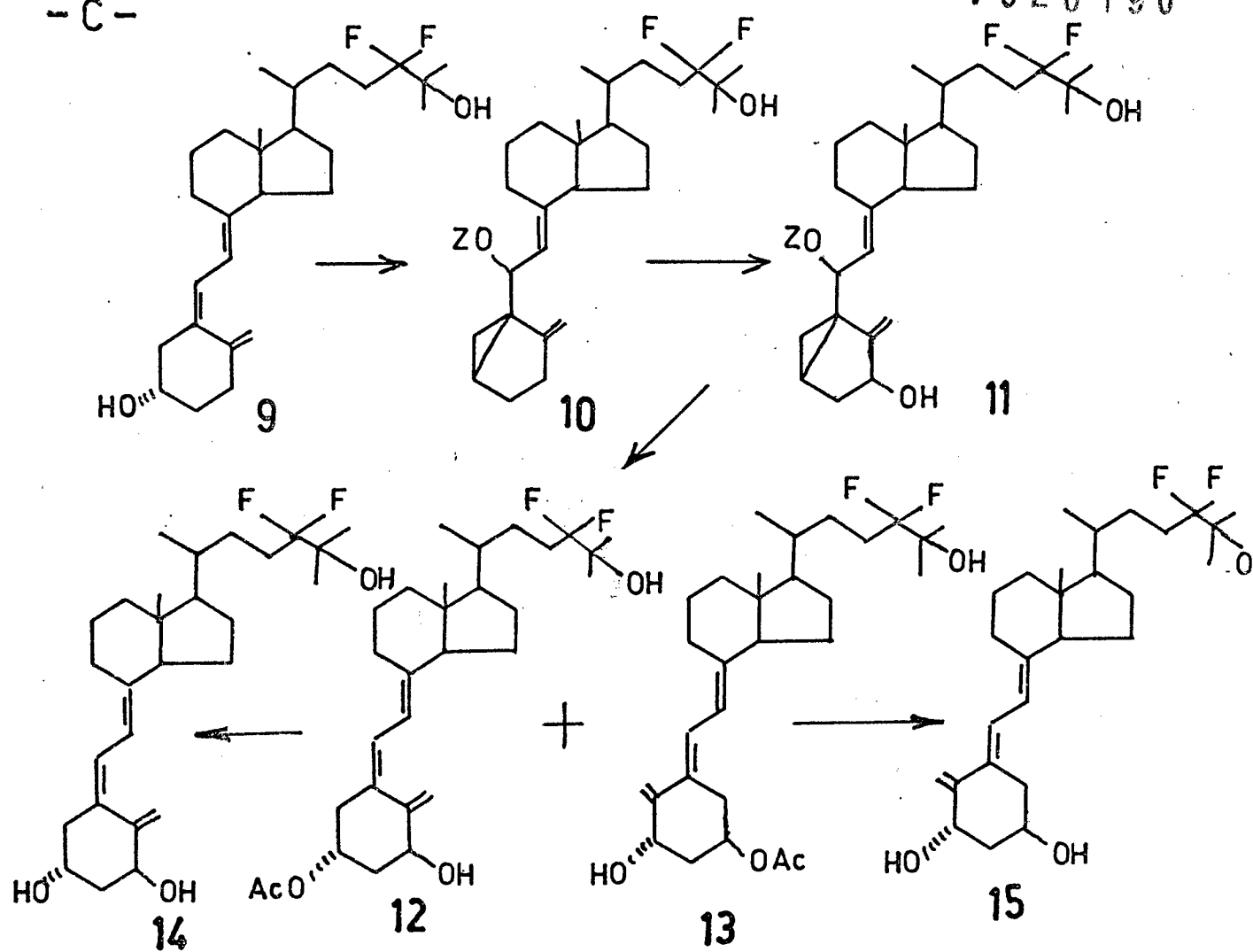
-A-



-B-



7920190



7920190