

19



Octrooiraad
Nederland

11 193245

12 C OCTROOI

21 Aanvraag om octrooi: 8420137

51 Int.Cl.⁶
C07C401/00, A61K31/59

22 Ingediend: 09.05.84

86 Oorspronkelijke internationale aanvraag:
PCT/US84/00714

87 Publicatienummer en -datum oorspronkelijke
internationale aanvraag: WO 84/04527 22.11.84

30 Voorrang:
09.05.83 US 0000492863
04.05.84 US 0000607327

73 Octrooihouder(s):
Wisconsin Alumni Research Foundation te
Madison, Wisconsin, Verenigde Staten van
Amerika (US).

43 Ter inzage gelegd:
01.04.85 I.E. 85/07

74 Gemachtigde:
Mr. G.L. Kooy c.s. te 2514 BB Den Haag.

44 Openbaargemaakt:
01.12.98 I.E. 98/12

47 Dagtekening:
02.04.99

45 Uitgegeven:
01.06.99 I.E. 99/06

54 Aan $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_2 verwante verbinding en farmaceutisch preparaat met een het calciummetabolisme regulerende werking dat een dergelijke verbinding bevat.

Aan $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_2 verwante verbinding en farmaceutisch preparaat met een het calciummetabolisme regulerende werking dat een dergelijke verbinding bevat

- De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een aan $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_2 verwante verbinding.
- 5 De verbinding $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_2 is bekend uit het Amerikaanse octrooischrift 3.880.894. Deze literatuurplaats beschrijft de isolatie en identificatie van deze vitamine D_2 metabooliet. In deze verbinding, weergegeven in de onderhavige formule 9a, heeft de methylgroep aan positie 24 de S-configuratie. Deze literatuurplaats vermeldt verder dat $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_2 een aanzienlijk grotere antirachitische activiteit heeft dan vitamine D_3 .
- 10 Het Amerikaanse octrooischrift 4.225.596 beschrijft het gebruik van $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_3 voor het verbeteren van de calciumbalans en calciumabsorptie en in het bijzonder voor de behandeling van postmomenopauzale osteoporosis. Enige verwante derivaten van vitamine D_3 of vitamine D_2 , waaronder het volgens het Amerikaanse octrooischrift 3.880.894 verkregen $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_2 , zouden in wezen hetzelfde resultaat geven.
- 15 Gevonden zijn nu nieuwe aan $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_2 verwante verbindingen met onverwacht gunstige eigenschappen als het calciummetabolisme regulerende middelen.
- De uitvinding voorziet aldus in een aan $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_2 verwante verbinding, met het kenmerk, dat de verbinding de formule A heeft, waarin R_1 , R_2 en R_3 , die gelijk of verschillend kunnen zijn, een waterstofatoom of een acylgroep voorstellen, X een alkylgroep met 1–6 koolstofatomen is en de
- 20 methylgroep aan positie 24 de R-configuratie heeft.
- Zoals hier gebruikt betekent de uitdrukking "acyl" een alifatische acylgroep (alkanoylgroep) met 1–6 koolstofatomen, in alle mogelijke isomere vormen, bijvoorbeeld formyl, acetyl, butyryl, isobutyryl of valeryl, of een aromatische acylgroep (aroylgroep) zoals benzoyl, of de met methyl, halogeen of nitro gesubstitueerde benzoylgroepen, of een acylgroep, afgeleid van een dicarbonsuur met de algemene formules
- 25 $ROOC(CH_2)_nCO-$ of $ROOCCH_2-O-CH_2CO$, waarin n een geheel getal is van 0 tot en met 4 en waarin R waterstof of een alkylrest voorstelt. Representatieve voorbeelden van dergelijke dicarboxylische acylgroepen zijn oxalyl, malonyl, succinoyl, glutaryl, adipyl en diglycolyl. De uitvinding "alkylgroep met 1–6 koolstofatomen" heeft betrekking alle isomere vormen van een dergelijke groep, bijvoorbeeld methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl.
- 30 De verbindingen van de uitvinding kunnen worden bereid volgens de in het reactieschema I aangegeven reacties. Een golflijn naar de substituent (methyl) bij C-24 betekent dat deze substituent ofwel de R- of S-configuratie kan bezitten. Het in reactieschema I aangegeven eindproduct volgens de uitvinding met de formule A is de verbinding met de formule 9b (X is methyl).
- Een geschikt uitgangsmateriaal voor het bereiden van de verbindingen van de uitvinding is het vitamine
- 35 D ketaalderivaat met de formule 1. Men kan deze verbinding gebruiken als een mengsel van de 24-R- en 24-S-epimeren, waarbij de scheiding van de afzonderlijke 24-R- en 24-S-epimeren in een latere trap van de werkwijze wordt bewerkstelligd. Bij gebruik van het zuivere 24-R-epimeer van (1) zal na de behandeling via de aangegeven synthetische trappen uitsluitend het (24-R)- $1\alpha,25$ -gedihydroxyleerde product met de formule 9b worden verkregen.
- 40 De uitgangsstof met de formule 1 (waarvan de bereiding beschreven is in de op 4 april 1984 gepubliceerde Britse octrooiaanvraag 2.127.023) wordt omgezet in de gewenste 1α -gehydroxyleerde vorm via cyclovitamine D derivaten, overeenkomstig de methode van DeLuca c.s., Amerikaans octrooischrift 4.260.549. Aldus resulteert de behandeling van verbinding (1) met tolu eensulfonylchloride op de gebruikelijke wijze in het overeenkomstige 3-tosylaat met de formule 2, dat in een alcoholisch medium wordt
- 45 gesolvolyseerd onder vorming van het 3,5-cyclovitamine D derivaat met de formule 3, waarin Z de van de alcohol met de formule Z-OH afkomstige organische rest is. De solvolyse in bijvoorbeeld methanol geeft het cyclovitamine met de structuur (3), waarin Z = methyl. De allyloxydatie van intermediair (3) met seleniumdioxide en een hydroperoxyde geeft het 1α -hydroxy-analoog met de formule 4, waarin Z de zojuist genoemde betekenis heeft. Een daarna volgende acetylering van verbinding (4) verschaft het overeenkomstige
- 50 1-acetaat met de formule 5 ($R_1 = \text{acetyl}$). Desgewenst worden andere 1-O-acylaten (structuur 5, waarin $R_1 = \text{acyl}$, bijvoorbeeld het formiaat, propionaat, butyraat, benzoaat) bereid volgens analoge gebruikelijke acyleringsreacties. Het 1-O-acyl-derivaat wordt vervolgens onderworpen aan een door een zuur gekatalyseerde solvolyse. Wanneer deze solvolyse wordt uitgevoerd in een oplosmiddelmedium, dat water bevat, verkrijgt men het 5,6-cis-vitamine D intermediair met de formule 6 ($R_1 = \text{acyl}$, $R_2 = \text{H}$) en de overeenkomstige 5,6-trans-verbinding in een verhouding van ongeveer (3–4):1. Deze 5,6-cis- en 5,6-trans-isomeren kunnen in deze trap worden gescheiden, bijvoorbeeld voor HPLC. Desgewenst kan de acylgroep (R_1) worden verwijderd door hydrolyse met een base ter verkrijging van de verbinding met de formule 6, waarin

R_1 en R_2 voorstellen H. Anderzijds kunnen de 1-O-monoacylaten verder worden geacyleerd bij de C-3-hydroxylgroepen onder toepassing van gebruikelijke acyleringsomstandigheden, ter verkrijging van de overeenkomstige 1,3-di-O-acylaten met de formule 6, waarin R_1 en R_2 , die gelijk of verschillend kunnen zijn, acylgroepen voorstellen. Voorts kan het hydroxycyclovitamine met de formule 4 worden onderworpen aan
5 een door een zuur gekatalyseerde solvolyse in een medium, bevattende een laag moleculair organisch zuur, ter verkrijging van de 5,6-cis-verbindingen met de formule 6, waarin $R_1 = H$ en $R_2 = acyl$, waarbij de acylgroep is afgeleid van het bij de solvolysereactie gebruikte zuur, alsmede de overeenkomstige 5,6-trans-verbindingen.

De volgende trap van de werkwijze omvat de verwijdering van de ketaal-beschermingsgroep onder
10 vorming van het overeenkomstige 25-keton met de formule 8. Deze trap is een essentiële trap, omdat de omzetting van het ketaal in het keton moet worden bewerkstelligd zonder een daarmee gepaard gaande isomerisatie van de 22(23)-dubbelbinding tot de geconjugeerde 23(24)-positie, die kan optreden onder de zure omstandigheden, die vereist zijn voor de ketaal-hydrolyse. Verder moeten de omstandigheden zodanig worden gekozen, dat een eliminering van de gevoelige allylische C-1-zuurstof-groep wordt vermeden. De
15 omzetting wordt succesvol bewerkstelligd door een voorzichtige hydrolyse bij matige temperaturen onder toepassing van een katalyse met een organisch zuur, overeenkomstig de in het Amerikaanse octrooischrift 4.264.513 beschreven methode voor het omzetten van 25,25-ethyleendioxy-27-norcholest-5- α ,3 β -diol in 1 α ,3 β -dihydroxy-27-norcholest-5-en-25-on. Aldus geeft de behandeling van de 5,6-cis-verbinding (6) in waterige alcohol met p-tolueensulfonzuur het overeenkomstige keton (8). Teneinde een ongewenste
20 eliminering van de C-1-zuurstof-groep gedurende deze reactie te voorkomen is het voordelig dat de C-1-hydroxylgroep in verbinding (6) wordt beschermd (bijvoorbeeld $R_1 = acyl$, $R_2 = waterstof$ of acyl). Zie in dit verband het reeds genoemde Amerikaanse octrooischrift 4.260.549.

De daarna volgende reactie van keton (8) met een methyl-Grignard-reagens is analoog aan de in het Amerikaanse octrooischrift 4.264.513 beschreven methode voor het bereiden van 1 α ,25-dihydroxyvitamine
25 D_3 uit 1 α -hydroxy-25-oxo-27-norvitamine D_3 . Zij verschaft de gewenste 1 α ,25-dihydroxyvitamine D_2 verbinding met de formule 9b. Indien het uitgangsmateriaal, verbinding (1), gebruikt bij de bovenstaande werkwijze, een mengsel is van de twee C-24-epimeren zal naast de verbinding volgens de uitvinding met de formule 9b ook worden verkregen de overeenkomstige 24-S-epimeer met de formule 9a. De scheiding van dit epimeer-mengsel kan worden bewerkstelligd door chromatografische methodes ter verkrijging van
30 1 α ,25-dihydroxyvitamine D_2 (structuur 9a, 24-S-stereochemie) en zijn 24-R-epimeer, 1 α ,25-dihydroxy-24-epivitaminen D_2 , met de structuur 9b, beide in zuivere vorm.

De zijketen-ketonen met de formule 8 kunnen tevens gebruikt worden voor de bereiding van de overige aan 1 α ,25-dihydroxyvitamine D_2 verwante verbindingen volgens de uitvinding met de formule A, zijnde
35 5,6-cis-1 α ,25-dihydroxyvitamine D_2 analogen met de algemene zijketen met de formule 7, waarin X en de configuratie van de methylgroep aan positie 24 de eerder in verband met de uitvinding genoemde betekenissen hebben. Bijvoorbeeld geeft de behandeling van keton (8) met ethylmagnesiumbromide het overeenkomstige hydroxyvitamine D_2 analoog met de hierboven aangegeven zijketenstructuur, waarin X een ethylgroep voorstelt. Op analoge wijze geeft de behandeling van (8) met isopropylmagnesiumbromide het zijketen-analoog, waarin X isopropyl voorstelt.

Eveneens in analogie met het uit het Amerikaanse octrooischrift 4.264.513 bekende voorziet de reactie van de keto-intermediären (8) met een isotopisch gemerkt Grignard-reagens (bijvoorbeeld C^3H_3MgBr ,
40 $^{14}CH_3MgBr$, C^2H_3MgBr) in een geschikte methode voor de bereiding van 1 α ,25-dihydroxy-24-epivitaminen D_2 in een isotopisch gemerkte vorm, dat wil zeggen als de verbindingen met de bovengenoemde zijketen, waarin X voorstelt C^3H_3 , $^{14}CH_3$, C^2H_3 , $^{13}CH_3$, of een willekeurig gekozen andere isotopisch-gemerkte
45 alkylgroep met 1-6 koolstofatomen.

De verbindingen volgens de uitvinding met de formule A waarin X een alkylgroep met 2-6 koolstofatomen voorstelt zijn bruikbare vervangingsmiddelen voor de verbindingen met de formule 9b in situaties waarin een grotere lipofiliteitsgraad wenselijk is, terwijl de bovengenoemde isotopisch gemerkte verbindingen toepassing vinden als reagens bij analytische toepassingen.

50 Voor therapeutische toepassingen worden de verbindingen volgens de uitvinding in het algemeen gebruikt in de vorm van de vrije hydroxy-verbindingen, voorgesteld door de bovengenoemde formule A, waarin R_1 , R_2 en R_3 voorstellen H. Voor sommige van dergelijke toepassingen zijn ook de overeenkomstige geacyleerde verbindingen, voorgesteld door de bovengenoemde algemene formule A, waarin één of meer van de groepen R_1 , R_2 en R_3 een acylgroep voorstellen, bruikbaar, al dan niet bij voorkeur.

55 Dergelijke acylderivaten worden op geschikte wijze bereid uit de vrije hydroxy-verbindingen onder toepassing van gebruikelijke acyleringsprocedures, bijvoorbeeld met een acylhalogenide of zuuranhydride in een geschikt oplosmiddel, zoals pyridine of een alkylpyridine. Door een geschikte keuze van de reactieduur,

het acyleermiddel, de temperatuur en het oplosmiddel, zoals in de techniek bekend is, worden de gedeeltelijk of volledig geacyleerde derivaten, weergegeven door de bovengenoemde formule A, verkregen.

Bijvoorbeeld geeft de behandeling van $1\alpha,25$ -dihydroxy-24-epivitamine D_2 (9b) in pyridine als oplosmiddel met azijnzuuranhydride bij kamertemperatuur het overeenkomstige 1,3-diacetaat, terwijl dezelfde reactie, uitgevoerd bij verhoogde temperatuur, resulteert in het overeenkomstige 1,3,25-triacetaat. Het 1,3-diacetaat kan verder worden geacyleerd bij C-25 met een andere acylgroep; bijvoorbeeld verkrijgt men door behandeling met benzoylchloride of barnsteenzuur-anhydride respectievelijk het 1,3-diacetyl-25-benzoyl- of 1,3-diacetyl-25-succinoyl-derivaat. Een 1,3,25-triacyl-derivaat kan selectief in een milde base worden gehydrolyseerd onder vorming van de 1,3-dihydroxy-25-O-acylverbinding, waarvan de vrije hydroxygroepen desgewenst kunnen worden heracyleerd met verschillende (andere) acylgroepen. Op analoge wijze kan een 1,3-diacyl-derivaat worden onderworpen aan een gedeeltelijke acyl-hydrolyse ter verkrijging van de 1-O-acyl- en 3-O-acyl-verbindingen, die op hun beurt kunnen worden heracyleerd met andere acylgroepen.

Evenals de reeds eerder bekende vitamine D_2 metabooliet, $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_2 (9a), vertonen de nieuwe verbindingen volgens de uitvinding een uitgesproken vitamine D-achtige activiteit. De verbindingen volgens de uitvinding hebben daarbij, zoals hierna zal worden toegelicht, slechts een zeer geringe werking ten aanzien van het mobiliseren van beendercalcium, maar een goede werking ten aanzien van het stimuleren van het ingewandscalciumtransport en de mineralisatie van nieuwe beenderen. Daarom zijn zij bij vele therapeutische en veterinaire toepassingen wenselijke vervangingen van de bekende vitamine D_2 of D_3 metaboolieten. In dit opzicht genieten de verbindingen met de formule 9b en hun geacyleerde derivaten in het bijzonder de voorkeur. De nieuwe verbindingen kunnen worden gebruikt voor het corrigeren of verbeteren van verscheidene stoornissen van de calcium- en fosfaatbalans die het gevolg zijn van uiteenlopende ziekten zoals met name osteoporosis.

Het is algemeen bekend dat vrouwelijke individuen tijdens de menopauze een aanzienlijk verlies van beendermassa vertonen, hetgeen tenslotte leidt tot osteopenia, dat op zijn beurt aanleiding geeft tot spontane vergruizingsfracturen van de wervels en fracturen van de lange beenderen. Deze ziekte is algemeen bekend als postmenopausale osteoporosis en is een belangrijk medisch probleem, zowel in de Verenigde Staten als in de meeste andere landen waarin de vrouwen leeftijden bereiken van ten minste 60 jaren. In het algemeen wordt de ziekte, die dikwijls gepaard gaat met pijn in de botten en een verminderde fysieke activiteit, gediagnostiseerd door één of twee vertebrale (wervel) vergruizingsfracturen met een door röntgenstralen aangetoonde verminderde beendermassa. Het is bekend dat deze ziekte gepaard gaat met een verminderd vermogen calcium te absorberen, verminderde niveaus van de geslachtshormonen, in het bijzonder oestrogeen en androgeen, en een negatieve calciumbalans.

De tot nu toe toegepaste methodes voor de behandeling van de ziekte variëren in aanzienlijke mate. Bijvoorbeeld is een calciumaanvulling op zichzelf niet succesvol bij het voorkomen of genezen van de ziekte. De insputing van geslachtshormonen, in het bijzonder oestrogeen, dat vermeld is doeltreffend te zijn bij het voorkomen van het snelle verlies van beendermassa dat zich voordoet bij postmenopausale vrouwen, wordt gecompliceerd door de vrees van de mogelijke carcinogeniciteit daarvan. Andere behandelingen, voor welke weer variabele resultaten werden vermeld, omvatten een combinatie van vitamine D in grote doses, calcium en fluoride. Het belangrijkste probleem bij deze behandeling is dat fluoride structureel ongezond been, aangeduid als geweven bot, veroorzaakt en bovendien een aantal nevenwerkingen geeft, zoals een toenemend voorkomen van fracturen en een maag-darmreactie op de grote hoeveelheden toegediend fluoride.

Analoge symptomen karakteriseren de seniele osteoporosis en de door steroïden geïnduceerde osteoporosis, waarbij deze laatste een erkend resultaat is van een langdurige cortico-steroid therapie voor zekere ziekte-toestanden.

Hoewel variërende metaboolieten van vitamine D_3 de calciumabsorptie en calciumretentie binnen het lichaam van zoogdieren die een bewezen of een fysiologische neiging vertonen tot het verlies van beendermassa, vergroten, worden zij eveneens gekarakteriseerd door de complementaire vitamine D-achtige eigenschap van het mobiliseren van het calcium in de beenderen in respons op fysiologische behoeften. Gevonden werd nu dat de 24-epi-verbindingen volgens deze uitvinding met de formule A, in het bijzonder $1\alpha,25$ -dihydroxy-24-epivitamine D_2 (24-epi- $1,25$ -(OH) $_2$ D $_2$), buitengewoon goed geschikt zijn voor het voorkomen of behandelen van fysiologische stoornissen bij zoogdieren, die gekarakteriseerd worden door het verlies van beendermassa, omdat, hoewel zij enkele van de erkende vitamine D-achtige eigenschappen, die het calciummetabolisme beïnvloeden, zoals het vergroten van het calciumtransport in de ingewanden en het bewerkstelligen van een beendermineralisering, vertonen, zij de serum-calciumniveaus, zelfs bij hoge doseringen, niet vergroten. Deze waargenomen eigenschap bewijst dat de verbindingen volgens de uitvinding na de toediening het beendermateriaal niet mobiliseren. Dit feit, samen met het

vermogen van de verbindingen na de toediening de beenderen te mineraliseren, wijst er op dat zij ideale verbindingen zijn voor het voorkomen of behandelen van heersende calciumstoornissen, die blijken uit een verlies van beendermassa, bijvoorbeeld postmenopausale osteoporosis, seniele osteoporosis en door steroïd geïnduceerde osteoporosis. Het zal duidelijk zijn dat de verbindingen eveneens kunnen worden toegepast voor het voorkomen of behandelen van andere ziekte-toestanden, waarbij het verlies van beendermassa een indicatie is, zoals bij de behandeling van patiënten, die een nierdialyse ondergaan, waarbij een verlies van beendermassa optreedt als gevolg van de dialyse.

De volgende proeven A en B dienen ter illustratie van de eigenschappen van 24-epi-1,25-(OH)₂D₂, die een bijdrage leveren aan de buitengewone geschiktheid daarvan voor het voorkomen of behandelen van ziekte-toestanden, waarbij een verlies van beendermassa optreedt.

Proef A

Pas gespeende mannetjes ratten worden geplaatst op het vitamine D deficiënte dieet, beschreven door Suda c.s., *Journal of Nutrition* 100, 1049–1052 (1970), op zodanige wijze gemodificeerd, dat het 0,02% calcium en 0,3% fosfor bevatte. Na twee weken op dit dieet werd aan de dieren ofwel 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₂ ofwel 1 α ,25-dihydroxy-24-epivitamin D₂ dagelijks door subcutane injectie in 0,1 ml 5%’s ethanol in propaandiol toegediend. 12 Uren na de laatste dosis werden de dieren gedood en werd het bloedcalcium- en ingewandscalciumtransport gemeten. De resultaten van deze metingen voor de aangegeven hoeveelheden van de toegediende verbindingen zijn aangegeven in figuren 1 en 2. De ingewandscalciumtransportmetingen, aangegeven in figuur 2, werden uitgevoerd volgens de methode van Martin en DeLuca, *American Journal of Physiology* 216, 1351–1359 (1969).

Proef B

Pas gespeende mannetjes ratten werden geplaatst op een hoog calcium (1,2% calcium) en laag fosfor (0,1% fosfor) dieet als beschreven door Suda c.s. (zie hierboven). De ratten werden met dit dieet gevoed gedurende een periode van 3 weken, waarna zij werden gescheiden in twee groepen. Aan één groep werd toegediend 1,25-(OH)₂D₂ (formule 9a) terwijl aan de andere groepen 24-epi-1,25-(OH)₂D₂ (formule 9b) werd toegediend, beide in 0,1 ml 5%’s ethanol in propaandiol, waarbij de toediening subcutaan werd bewerkstelligd bij doseringshoeveelheden van de verbindingen als aangegeven door de gegevenspunten in figuur 3. Deze doses werden dagelijks gedurende een periode van 7 dagen voortgezet, na afloop van welke tijd de dieren werden gedood en het anorganische fosfor in het serum werd bepaald. De resultaten zijn aangegeven in figuur 3.

De hoeveelheid beenderas werd bepaald door verwijdering van de dijbenen uit de ratten. De dijbenen werden vrijgesneden van vasthechtend bindweefsel en daarna gedurende 24 uren geëxtraheerd in absolute ethanol en gedurende 24 uren in diëthylether, onder gebruikmaking van een Soxhlet-extractie-apparaat. De beenderen werden vervolgens gedurende 24 uren bij 600°F verast. Het asgewicht werd bepaald door wegen tot constant gewicht. De resultaten zijn aangegeven in figuur 4.

Uit de resultaten van de twee onderzoekingen, beschreven in de bovenstaande proeven A en B, blijkt dat de werking van 24-epi-1,25-(OH)₂D₂ bij benadering gelijk is aan die van 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₂ (1,25-(OH)₂D₂) voor wat betreft het bewerkstelligen van de mineralisering van beenderen en het stimuleren van het ingewandscalciumtransport. Er is geen aanzienlijk verschil tussen de twee groepen in figuur 2 en figuur 4. Anderzijds wordt de verhoging van het anorganische fosfor in het serum, die resulteert uit de mobilisering van beendermateriaal, in het geval van het lage fosfor dieet in zeer duidelijke mate beïnvloed door 1,25-(OH)₂D₂, maar nauwelijks gestimuleerd door 24-epi-1,25-(OH)₂D₂. Op analoge wijze had bij de mobilisering van calcium uit beendermateriaal, zoals blijkt uit de serum-calciumniveaus (figuur 1), zelfs bij de buitengewoon hoge doseringshoeveelheid van ongeveer 750 pmolen/dag, de 24-epiverbinding geen effect, terwijl het mobiliseringseffect duidelijk blijkt bij veel lagere doses van 1 α ,25-dihydroxyvitamine D₂. Daar de stijging in het serum-calcium van ratten op een laag calciumdieet het vermogen tot het mobiliseren van beendermateriaal meet en daar de verhoging van het bloedfosfor van dieren op een laag fosfordieet eveneens de beendermobilisering meet, blijkt uit deze resultaten dat 24-epi-1,25-(OH)₂D₂ voorziet in een verrassende eigenschap, namelijk dat het een minimale werking vertoont ten aanzien van het mobiliseren van beendercalcium, terwijl het volledig in staat is het ingewandscalciumtransport en de mineralisering van nieuwe beenderen te stimuleren, welke eigenschappen deze verbinding in hoge mate geschikt maken voor de behandeling van ziekte-toestanden, waarbij een beenderverlies optreedt.

De unieke eigenschappen van 24-epi-1,25-(OH)₂D₂, zoals hierboven aangegeven, bieden de zeldzame gelegenheid de variërende vitamine D responsieve processen (ingewandscalciumabsorptie, beender-

mineraalmobilisering en beenmineralisering) te controleren op een wijze en in een mate, die tot nu toe niet uitvoerbaar was. Deze mogelijkheid resulteert uit het feit dat de 24-epi-verbinding volgens deze uitvinding aan het zoogdier ofwel alleen (met geschikte en aanvaardbare excipiëntia) ofwel in combinatie met andere vitamine D derivaten, die het volledige spectrum van D-achtige activiteit vertonen, kan worden toegediend.

- 5 Door dergelijke maatregelen is het daarom mogelijk (in welke gewenste graad dan ook) de specificiteit van de werking van het 24-epi-analoog te combineren met de algemeenheid van de werking van andere vitamine D metabolieten of analogen. De toediening van 24-epi-1,25-(OH)₂D₂ alleen zal, zoals hierboven aangetoond, het ingewandscalciumptransport en de beendermineralisering stimuleren met geen enkele of een minimale beendermineraalmobilisering, maar deze laatste activiteit kan worden geïnduceerd door
- 10 gelijktijdige toediening van één of meer van de bekende vitamine D derivaten (bijvoorbeeld 1α,25-(OH)₂D₃, 1α,25-(OH)₂D₂, 1α-OH-D₃). Door instelling van de relatieve hoeveelheden van de toegediende verbindingen kan een graad van controle op de relatieve grootten van de ingewandscalciumpabsorptie- ten opzichte van de beendermineraalmobiliseringprocessen worden uitgeoefend op een wijze, die niet mogelijk was met de tot nu toe bekende vitamine D derivaten. De gelijktijdige toediening van de 24-epi-verbinding en andere
- 15 vitamine D verbindingen met een beendermobiliseringsactiviteit kan bijzonder voordelig zijn in situaties, waarin een zekere graad van beendermobilisering wenselijk is. Bijvoorbeeld wordt aangenomen dat in zekere omstandigheden het beendermateriaal eerst moet worden gemobiliseerd alvorens nieuw beendermateriaal kan worden afgezet. In dergelijke situaties zal de behandeling met vitamine D of een vitamine D derivaat, dat een beendermobilisering zal bewerkstelligen, bijvoorbeeld 1α-hydroxyvitamine D₃ of -D₂,
- 20 1α,25-dihydroxyvitamine D₃ of -D₂, 25-hydroxyvitamine D₃ of -D₂, 24,24-defluor-25-hydroxyvitamine D₃, 24,24-difluor-1α,25-dihydroxyvitamine D₃, 24-fluor-25-hydroxyvitamine D, 24-fluor-1α,25-dihydroxyvitamine D₃, 2β-fluor-1α-hydroxyvitamine D₃, 2β-fluor-25-hydroxyvitamine D₃, 2β-fluor-1α,25-dihydroxyvitamine D₃, 26,26,26,27,27,27-hexafluor-1α,25-dihydroxyvitamine D₃, 26,26,26,27,27,27-hexafluor-25-hydroxyvitamine D₃, 24,25-dihydroxyvitamine D₃, 1α,24,25-trihydroxyvitamine D₃, 25,26-dihydroxyvitamine D₃ of 1α,25,26-
- 25 trihydroxyvitamine D₃, in combinatie met 24-epi-1,25-(OH)₂D₂ volgens de uitvinding, door instelling van de hoeveelheden van de 24-epi-verbinding en de beendermobiliserende vitamine D verbinding bij het behandelingsregime het mogelijk maken de mate van de beendermineralisering in te stellen teneinde de gewenste medische en fysiologische doeleinden te bereiken. Geschikte en doeltreffende mengsels zijn bijvoorbeeld de combinatie van 1α,25-dihydroxyvitamine D₂ en 1α,25-dihydroxy-24-epivitamin D₂ (9a en
- 30 9b).

De uitvinding heeft derhalve eveneens betrekking op een farmaceutisch preparaat met een het calcium-metabolisme regulerende werking dat een aan 1α,25-dihydroxyvitamine D₂ verwante verbinding en een farmaceutisch aanvaardbaar excipiëns bevat, met het kenmerk, dat de verbinding de formule A heeft, waarin R₁, R₂, R₃, X en de configuratie van de methylgroep aan positie 24 de eerder in verband met de

35 uitvinding genoemde betekenissen hebben. Bij voorkeur bevat het farmaceutisch preparaat volgens de uitvinding bovendien ten minste één verbinding die de beendermobilisering bevordert.

- De verbindingen volgens deze uitvinding of combinaties daarvan met andere vitamine D derivaten of andere therapeutische middelen kunnen gemakkelijk als steriele parenterale oplossingen door injectie of intraveneus worden toegediend. Ook kunnen zij worden toegediend via het spijsverteringskanaal in de vorm
- 40 van orale doseringen, of transdermaal of via zetpillen. De verbindingen worden met voordeel toegediend in doseringshoeveelheden van 0,1–100 microgram per dag. In het geval van osteoporosis zijn in het algemeen doses van ongeveer 0,5 tot ongeveer 25 microgram per dag doeltreffend. De verbindingen volgens de uitvinding met de formule A kunnen ofwel alleen ofwel in combinatie met andere vitamine D derivaten worden toegediend, waarbij de hoeveelheden van elke van de verbindingen in de combinatie afhankelijk zijn
- 45 van de speciale ziekte-toestand, die moet worden behandeld, en van de gewenste graad van de beendermineralisering en/of beendermobilisering. Bij de behandeling van osteoporosis, waarbij de voorkeursverbinding volgens de uitvinding 24-epi-1α,25-(OH)₂D₂ is, is de in feite gebruikte hoeveelheid van de 24-epi-verbinding niet aan scherpe grenzen gebonden. In alle gevallen moet een voldoende hoeveelheid van de verbinding voor het induceren van een beendermineralisering worden gebruikt. Hoeveelheden van groter dan ongeveer
- 50 25 microgram per dag van de 24-epi-verbinding of de combinatie van deze verbinding met beendermobiliserende vitamine D derivaten, zijn in het algemeen niet noodzakelijk voor het bereiken van de gewenste resultaten en kunnen op grond van economische overwegingen ongewenst zijn. In de praktijk worden hogere doses van de verbindingen gebruikt wanneer de therapeutische behandeling van een ziekte-toestand het gewenste doel is, terwijl de lagere doses in het algemeen worden gebruikt voor
- 55 profylactische doeleinden, waarbij het duidelijk zal zijn dat de toegediende specifieke dosis in ieder gegeven geval zal worden ingesteld in overeenstemming met de toegediende specifieke verbindingen, de te behandelen ziekte, de toestand van de patiënt en de andere relevante medische feiten, die de activiteit van

het geneesmiddel of de respons van de patiënt kunnen modificeren, zoals algemeen bekend is aan deskundigen op dit gebied van de techniek.

Doseringsvormen van de verbindingen kunnen worden bereid door deze te combineren met niet-toxische farmaceutisch aanvaardbare dragers, zoals in de techniek algemeen bekend is. Dergelijke dragers kunnen ofwel vast ofwel vloeibaar zijn, zoals bijvoorbeeld maiszetmeel, lactose, sucrose, pinda-olie, olijfolie, sesamolie en propyleenglycol. Indien een vaste drager wordt gebruikt kan de doseringsvorm van de verbindingen in de vorm zijn van tabletten, capsules, poeders, "troches" of zuigtabletten. Indien een vloeibare drager wordt gebruikt kunnen zachte gelatine-capsules, of stroop of vloeibare suspensies, emulsies of oplossingen de doseringsvorm zijn. De doseringsvormen kunnen eveneens toevoegsels, zoals conserveermiddelen, stabilisermiddelen, bevochtigungs- of emulgeermiddelen, of oplossingbevorderende middelen bevatten. Zij kunnen eveneens andere therapeutisch waardevolle stoffen, zoals vitaminen, zouten, suikers, proteïnen of hormonen bevatten.

De werkwijze ter bereiding van de verbindingen volgens de onderhavige uitvinding is meer in het bijzonder beschreven in het onderstaande voorbeeld. In dit voorbeeld heeft de aanduiding van de specifieke producten door arabische cijfers (bijvoorbeeld verbindingen 1, 2, 3) betrekking op de aldus in reactieschema I genummerde structuren.

Voorbeeld

a. 25,25-Ethyleendioxy-1 α -hydroxy-3,5-cyclovitamine D₂ (4, Z = methyl).

20 Een oplossing van 50 mg van verbinding (1) als een mengsel van de 24-R- en S-epimeren in droge pyridine (300 μ l) wordt behandeld met 50 mg p-tolueensulfonylchloride bij 4°C gedurende 30 uren. Het mengsel wordt uitgegoten op ijs/verzadigde NaHCO₃ onder roeren en het product wordt geëxtraheerd met benzeen. De gecombineerde organische fasen worden gewassen met waterige NaHCO₃, H₂O, waterig CuSO₄ en water, dan gedroogd boven MgSO₄ en vervolgens ingedampt.

25 Het ruwe 3-tosyl-derivaat (2) wordt direct gesolvolyseerd in watervrije methanol (10 ml) en NaHCO₃ (150 mg) door verhitting op 55°C gedurende 8,5 uren onder roeren. Het reactiemengsel wordt vervolgens afgekoeld tot kamertemperatuur en onder verminderde druk geconcentreerd tot ongeveer 2 ml. Benzeen (80 ml) wordt vervolgens toegevoegd en de organische laag wordt gewassen met water, gedroogd en ingedampt. Het resulterende cyclovitamine (3) [Z = methyl] kan zonder verdere zuivering bij de daarna
30 volgende oxydatie worden gebruikt.

Het ruwe product (3) in CH₂Cl₂ (4,5 ml) wordt toegevoegd aan een met ijs gekoelde oplossing van SeO₂ (5,05 mg) en t-BuOOH (16,5 μ l) in CH₂Cl₂ (8 ml), bevattende watervrij pyridine (50 μ l). Na roeren gedurende 15 minuten bij 0°C laat men de temperatuur van het reactiemengsel oplopen tot kamertemperatuur. Na nog 30 minuten wordt het mengsel overgebracht in een scheidrecther en geschud met 10%'s NaOH (30 ml).

35 Diëthylether (150 ml) wordt toegevoegd en de afgescheiden organische fase wordt gewassen met 10%'s NaOH en water, dan gedroogd en daarna ingedampt. Het olie-achtige residu wordt gezuiverd op silicagel-dunnelaagplaten (platen van 20 x 20 cm; AcOEt/hexaan 4:6), waarbij 20 mg 1 α -hydroxyderivaat (4) [Z = methyl] wordt verkregen: massaspectrum, m/e: 470 (M⁺, 5), 438 (20), 87 (100); NMR (CDCl₃), maxima bij δ -waarden: 0,53 (3H, s), 0,63 (1H, m), 4,19 (1H, d, J=9,5 Hz), 4,2 (1H, m), 4,95 (1H, d, J=9,5 Hz), 5,17 en
40 5,25 (2H, elk m), 5,35 (2H, m).

b. Acetylering van verbinding (4).

Een oplossing van 18 mg van cyclovitamine (4) [A = methyl] in pyridine (1 ml) en azijnzuuranhydride (0,33 ml) wordt gedurende 2 uren op 55°C verhit. Het mengsel wordt uitgegoten in met ijs gekoelde
45 verzadigde NaHCO₃ en geëxtraheerd met benzeen en diëthylether. De gecombineerde organische extracten worden gewassen met water, verzadigde CuSO₄ en waterige NaHCO₃ oplossingen, dan gedroogd en daarna ingedampt, waarbij het 1-acetoxy-derivaat (5) [Z = methyl, R₁ = acetyl] (19 mg) wordt verkregen: massaspectrum, m/e: 512 (M⁺, 5), 420 (5), 87 (100); NMR (CDCl₃), maxima bij δ -waarden: 0,53 (3H, s), 4,18 (1H, d, J=9,5 Hz), 4,97 (2H, m), 5,24 (2H, m), 5,35 (2H, m).

50 c. Solvolyse van 25,25-ethyleendioxy-1 α -acetoxy-3,5-cyclovitamine (5) [R₁ = acetyl, Z = methyl].

Een oplossing van 4,5 mg van cyclovitamine (5) in een 3:1 mengsel van dioxan/H₂O (1,5 ml) wordt op 55°C verhit. p-Tolueensulfonzuur (1 mg in 20 μ l H₂O) wordt vervolgens toegevoegd en de verhitting wordt gedurende 15 minuten voortgezet. Het mengsel wordt uitgegoten in verzadigd NaHCO₃/ijs en geëxtraheerd
55 met benzeen en diëthylether. De organische fasen worden gewassen met NaHCO₃ en water en gedroogd boven MgSO₄. Door verdamping van de oplosmiddelen verkrijgt men een residu, bevattende verbindingen (6) (waarin R₁ = acetyl en R₂ = H) en de overeenkomstige transisomeer, die gescheiden worden door HPLC

over een kolom van 6,2 mm x 25 cm Zorbax-Sil (silicagel in de vorm van microdeeltjes) onder gebruikmaking van 2% 2-propanol in hexaan als elueermiddel. Zonodig kan de verbinding (6) verder worden gezuiverd door een herhaalde chromatografie.

5 d. Ketaal-hydrolyse van verbinding (6) ter verkrijging van keton (8).

Aan een oplossing van 1,35 mg van ketaal (6) [$R_1 = \text{acetyl}$, $R_2 = \text{H}$] in ethanol (1,5 ml) wordt p-tolueensulfonzuur (0,34 mg en 45 μl H_2O) toegevoegd en het mengsel wordt gedurende 30 minuten onder terugvloei-cooling verhit. Het reactiemengsel wordt uitgegoten in verdunde NaHCO_3 en geëxtraheerd met benzeen en diëthylether. De gecombineerde organische extracten worden gewassen met water, gedroogd

10 boven MgSO_4 en ingedampd. Hogedruk-vloeistofchromatografie van het ruwe mengsel (4% 2-propanol/hexaan, 6,2 mm x 25 cm Zorbax-Sil) geeft een kleine hoeveelheid niet-gereageerd ketaal (6) [0,12 mg, verzameld bij 48 ml] en het gewenste keton (8) [$R_1 = \text{acetyl}$, $R_2 = \text{H}$] (0,36 mg, verzameld bij 52 ml), dat gekarakteriseerd wordt door de volgende gegevens: massaspectrum, m/e: 454 (M^+ , 9), 394 (17), 376 (10), 134 (23), 43 (100); NMR (CDCl_3), maxima bij δ -waarden: 0,53 (3H, s), 1,03 (3H, d, $J = 6,5$ Hz), 1,13 (3H, d, $J = 7,0$ Hz), 2,03 (3H, s), 2,12 (3H, s), 4,19 (1H, m), 5,03 (1H, m), 5,33 (3H, breed m), 5,49 (1H, m), 5,93 (1H, d, $J = 11$ Hz), 6,37 (1H, d, $J = 11$ Hz); UV (EtOH) λ_{max} 266 nm, 250 nm, λ_{min} 225 nm.

e. Reactie van keton (8) met methylmagnesiumbromide ter verkrijging van producten (9a) en (9b).

20 Keton (8) [$R_1 = \text{acetyl}$, $R_2 = \text{H}$] in waterrijke diëthylether wordt behandeld met een overmaat CH_3MgBr (2,85 M. oplossing in diëthylether). Het reactiemengsel wordt gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur geroerd, vervolgens afgeschrikt met waterige NH_4Cl en daarna geëxtraheerd met benzeen, diëthylether en CH_2Cl_2 . De organische fasen worden gewassen met verdunde NaHCO_3 , gedroogd boven MgSO_4 en ingedampd. Het aldus verkregen mengsel van (9a) en (9b) wordt gescheiden door HPLC (6% 2-propanol/hexaan, 4,6 mm x 25 cm Zorbax-Sil), ter verkrijging van, in de elutie-volgorde, de uit het Amerikaanse

25 octrooischrift 3.880.894 bekende S-epimeer (9a) en de overeenkomstige R-epimeer (9b) volgens de uitvinding. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamine D_2 (9a): UV (EtOH) λ_{max} 265,5 nm, λ_{min} 227,5 nm; massaspectrum, m/e 428 (M^+ , 6), 410 (4), 352 (4), 287 (6), 269 (10), 251 (10), 152 (42), 134 (100), 59 (99); NMR (CDCl_3), maxima bij δ -waarden: 0,56 (3H, s), 1,01 (3H, d, $J=6,5$ Hz), 1,04 (3H, d, $J=6,5$ Hz), 1,14 en 1,18 (6H, elk s), 4,24 (1H, m), 4,43 (1H, m), 5,01 (1H, m), $\sim 5,34$ (3H, breed m), 6,02 (1H, d, $J=11$ Hz), 6,39 (1H, d, $J=11$ Hz).

30 Hz).

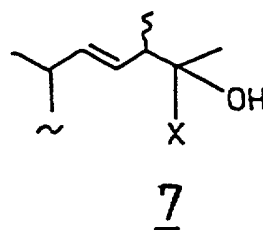
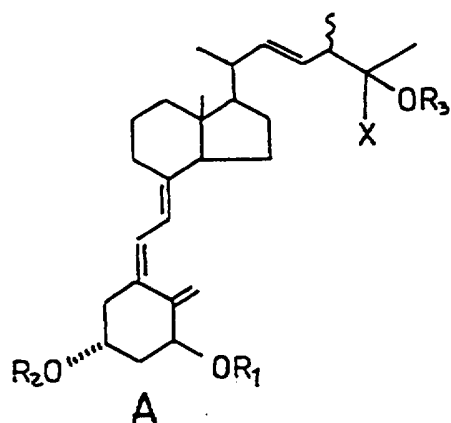
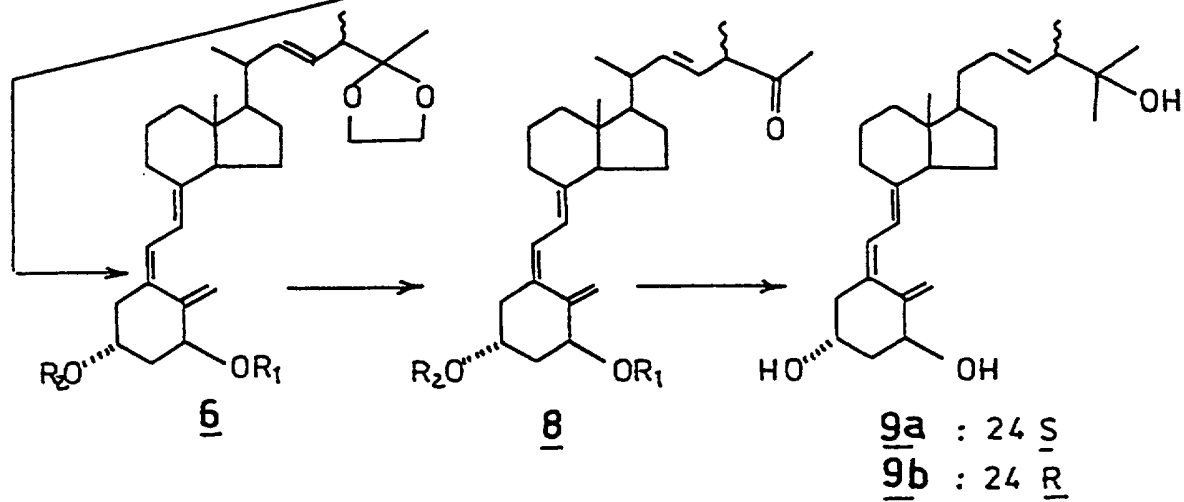
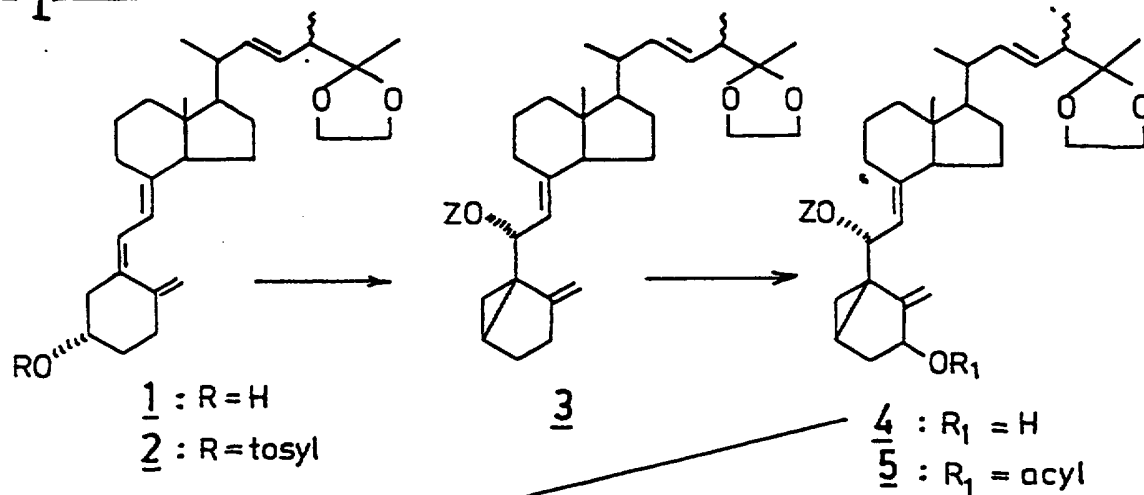
$1\alpha,25$ -Dihydroxy-24-epivitaminen D_2 (9b): UV (EtOH) λ_{max} 265,5 nm, λ_{min} 227,5 nm; massaspectrum, m/e 428 (M^+ , 13), 410 (9), 352 (7), 287 (11), 269 (15), 251 (13), 152 (52), 134 (100), 59 (97).

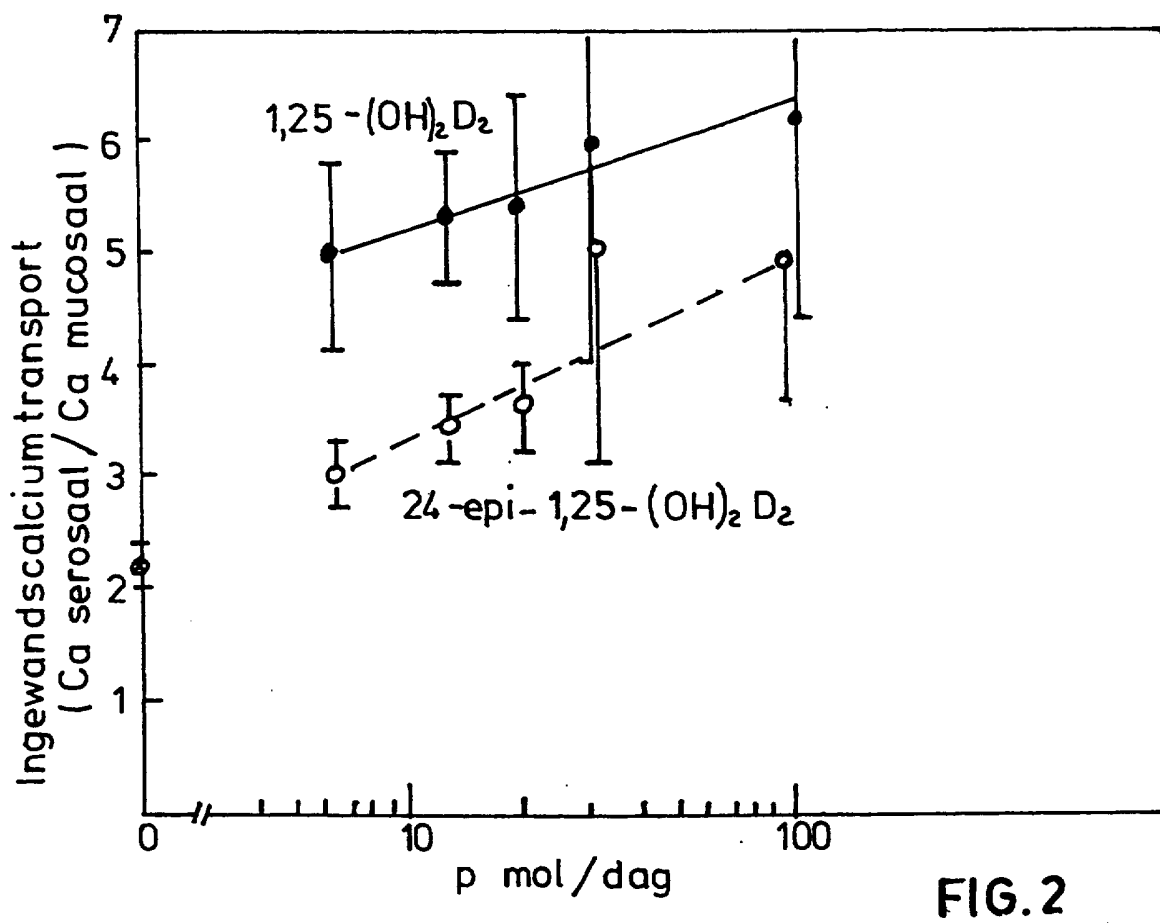
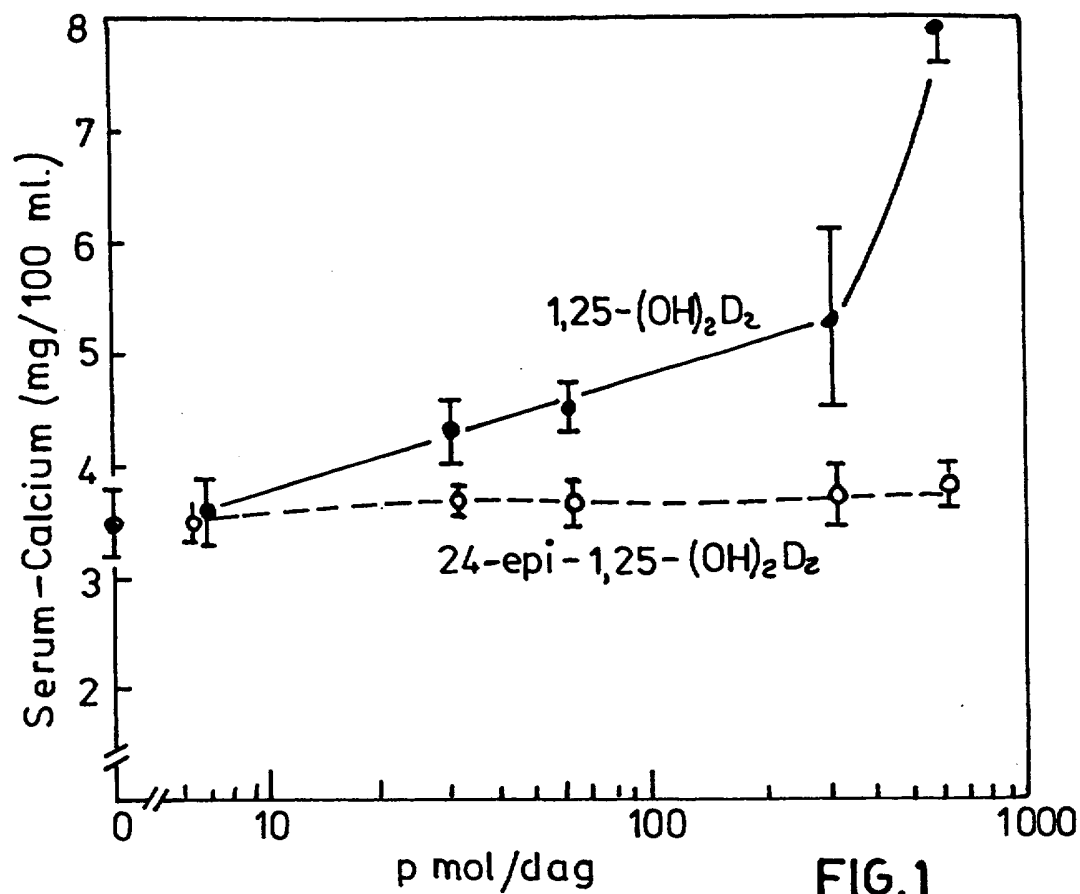
35 Conclusies

1. Aan $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_2 verwante verbinding, met het kenmerk, dat de verbinding de formule A heeft, waarin R_1 , R_2 en R_3 , die gelijk of verschillend kunnen zijn, een waterstofatoom of een acylgroep voorstellen, X een alkylgroep met 1–6 koolstofatomen is en de methylgroep aan positie 24 de R-configuratie
- 40 heeft.
2. Farmaceutisch preparaat met een het calciummetabolisme regulerende werking dat een aan $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D_2 verwante verbinding en een farmaceutisch aanvaardbaar excipiëns bevat, met het kenmerk, dat de verbinding de formule A heeft, waarin R_1 , R_2 , R_3 , X en de configuratie van de methylgroep aan positie 24 de in conclusie 1 genoemde betekenissen hebben.
- 45 3. Farmaceutisch preparaat volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het bovendien ten minste één verbinding bevat die de beendermobilisering bevordert.

Hierbij 3 bladen tekening

— I —





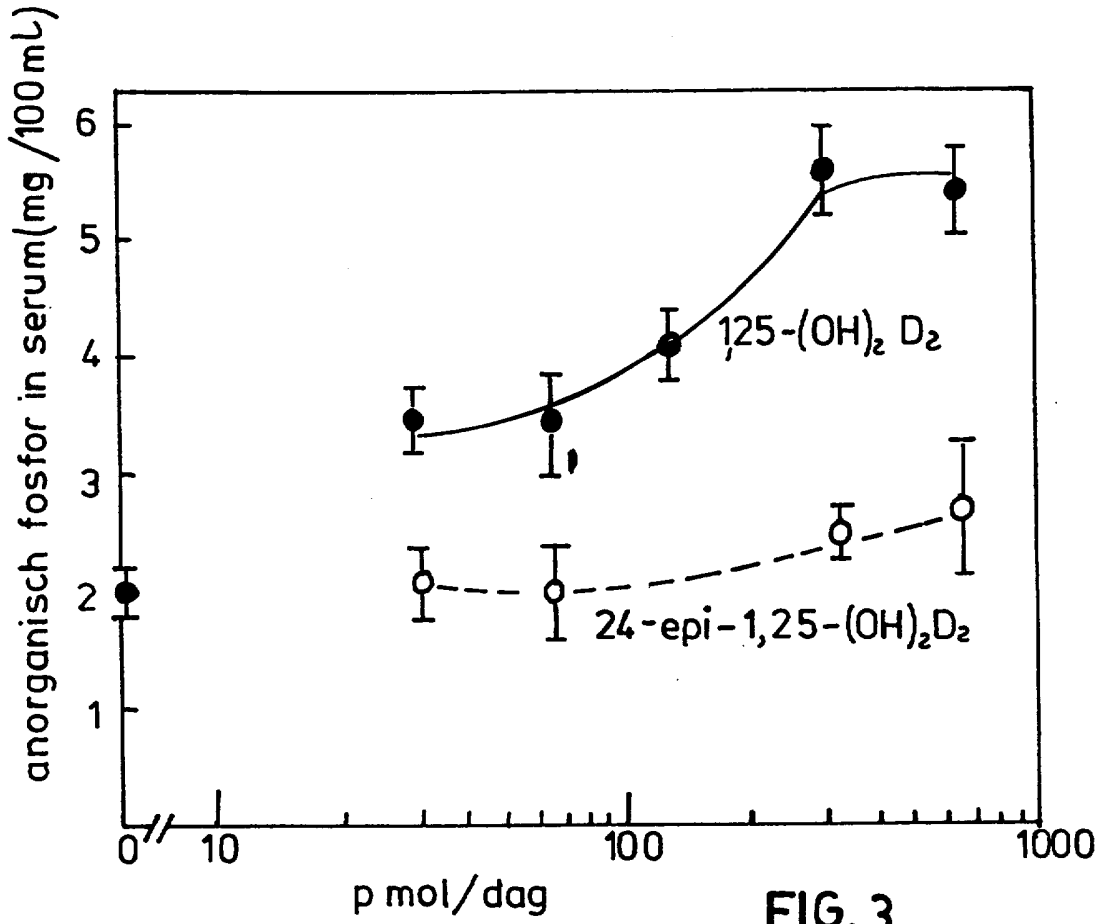


FIG. 3

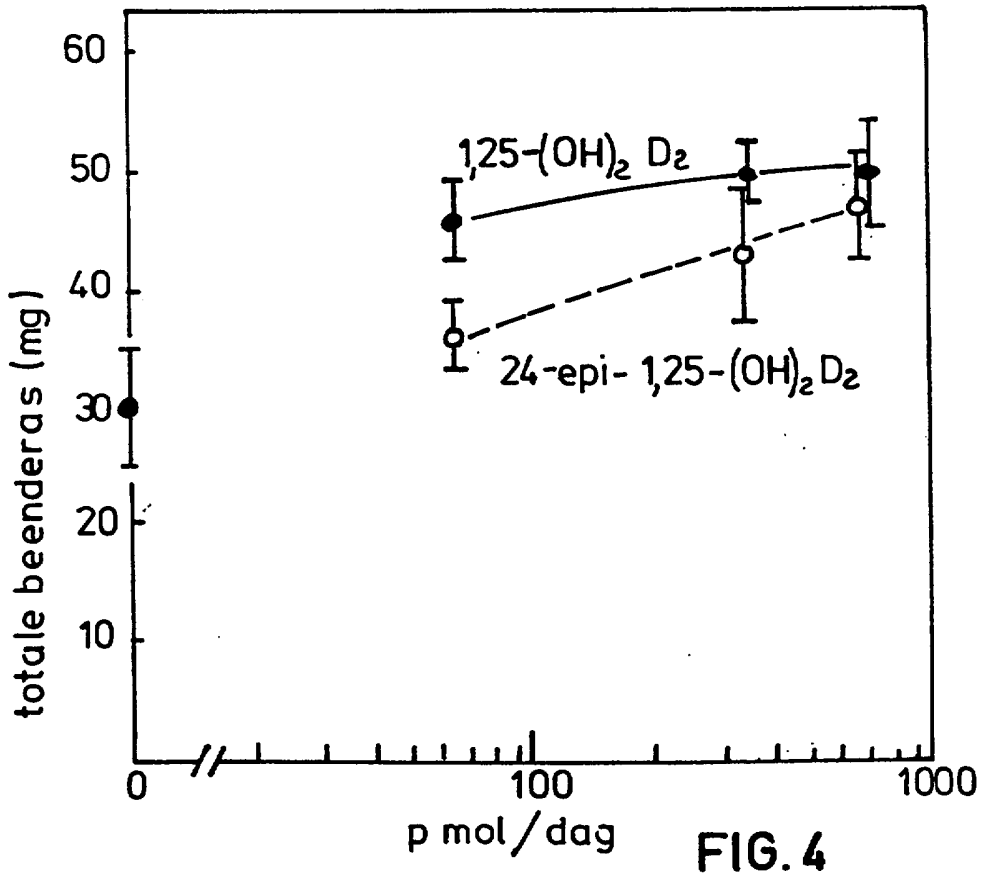


FIG. 4