



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 065 851** ⁽¹³⁾ **C1**
 (51) МПК⁶ **C 07 C 401/00, A 61 K 31/59**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 4831932/04, 16.02.1990

(30) Приоритет: 09.03.1989 US 321254

(46) Дата публикации: 27.08.1996

(86) Заявка РСТ:
 US 90/00952 (16.02.90)

(71) Заявитель:

Висконсин Алюмни Рисерч Фаундейшн (US)

(72) Изобретатель: Гектор Флloyd Делюка[US],

Хайнрих Константин Шнес[DE], Кейто Леонард
 Перлман[US]

(73) Патентообладатель:

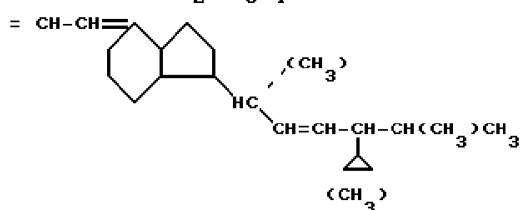
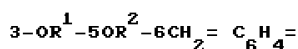
Висконсин Алюмни Рисерч Фаундейшн (US)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ α -ГИДРОКСИ-24-ЭПИВИТАМИНА D₂

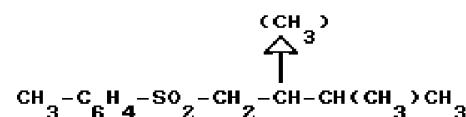
(57) Реферат:

Использование: в качестве витамина.

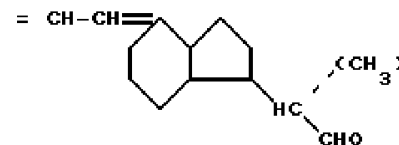
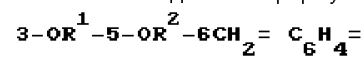
Сущность: способ получения нового соединения - 1-гидро-24-эпивитамина D₂ общей формулы:



где: R¹, R² - H, низший алкилсилил.
 Реагент 1: соединение формулы:



Реагент 2: соединение формулы



Условия реакции: реагент 1 подвергают взаимодействию с реагентом 2, полученный продукт при необходимости подвергают гидролизу для получения соединения формулы I, где R¹, R² - водород. 2 табл.

RU 2 065 851 C1

RU 2 065 851 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 065 851** ⁽¹³⁾ **C1**
 (51) Int. Cl.⁶ **C 07 C 401/00, A 61 K 31/59**

RUSSIAN AGENCY
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 4831932/04, 16.02.1990

(30) Priority: 09.03.1989 US 321254

(46) Date of publication: 27.08.1996

(86) PCT application:
 US 90/00952 (16.02.90)

(71) Applicant:
 Viskonsin Aljumni Riserch Faundejshn (US)

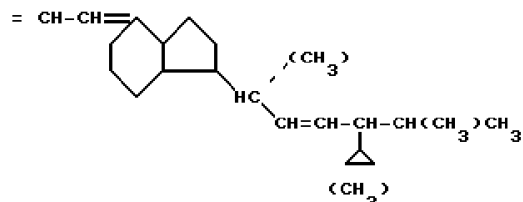
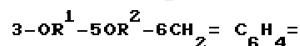
(72) Inventor: Gektor Flojd DeLjuka[US],
 Khajnrikh Konstantin Shnes[DE], Kejto Leonard
 Perlman[US]

(73) Proprietor:
 Viskonsin Aljumni Riserch Faundejshn (US)

(54) PROCESS FOR PREPARING D₂-HYDROXY-24-EPIVITAMINE D₂

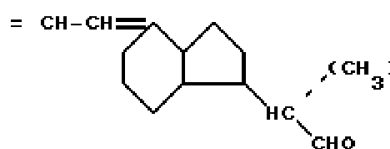
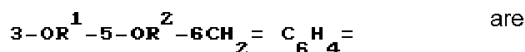
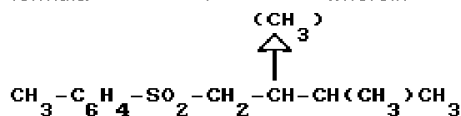
(57) Abstract:

FIELD: used as vitamin. SUBSTANCE:
 claimed process for preparing new compound
 such as 1-hydro-24-epivitamin D₂ of general
 formula: D₂ wherein D₂ and



are H or lower alkyl silyl comprises
 reacting reagent 1 of formula R¹ with reagent

2 of formula R² and subjecting the resulting
 product to hydrolysis to provide compound of
 formula I wherein



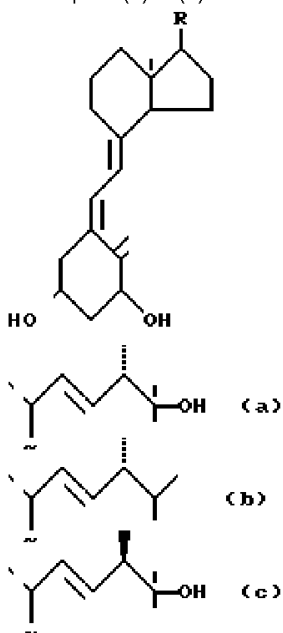
hydrogen. EFFECT: more efficient preparation
 process. 2 tbl

RU 2 065 851 C1

RU 2 065 851 C1

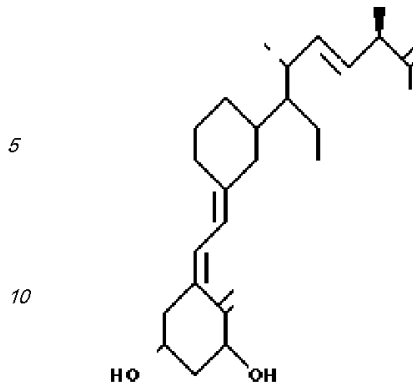
Изобретение относится к способу получения нового (24S)-эпимера 1α -гидрокси-витамина D_2 и некоторых его производных.

Природный гормон производное витамина D , $1\alpha, 25$ -дигидроксивитамина D_3 и его 25 -деокси-аналог, 1α -гидроксивитамин D , проявляют высокую активность *in vivo*, являясь известными в качестве сильных стимуляторов кишечной абсорбции кальция и мобилизации кальция из костей и в качестве эффективных промоторов костной кальцификации. Очень близкий характер активности проявляет $1\alpha, 25$ -дигидроксивитамин D_2 (1) и его 25 -деокси-аналог, 1α гидроксивитамин D_2 (2). По своему структурному строению $1\alpha, 25$ -дигидроксивитамин D_2 и 1α -гидроксивитамин D_2 характеризуются наличием C-24 стереохимии, как это имеет место в боковой цепи эргостерола, то есть эти соединения определяются структурами, показанными ниже, где R представляет собой боковые цепи (a) и (b) соответственно:



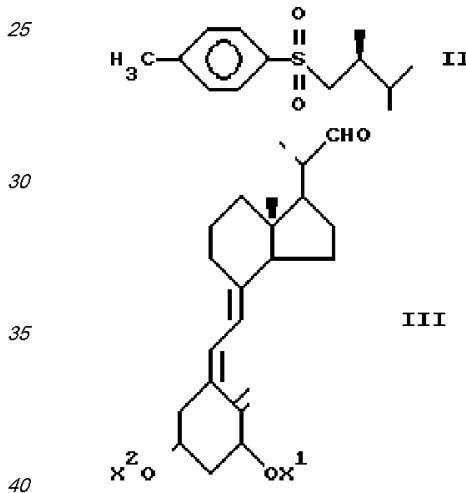
В последнее время был получен и испытан C-24-эпимер $1\alpha, 25$ -дигидроксивитамина D_2 (3). Данное соединение характеризуется структурой, показанной выше, где R представляет боковую цепь (c). Удивительно, что данное C-24-эпимерное производное витамина проявляет явно отличающийся профиль биологической активности в связи с тем, что оно является активным в стимулировании кишечной абсорбции кальция и в ускорении кальцификации костей, но не обнаруживает мобилизации костного кальция.

Данное изобретение представляет новый аналог витамина D , а именно 1α гидрокси-24-эпивитамин D_2 , который может быть представлен приведенной ниже структурой, а также алкилсилильным производным данного соединения.



Таким образом данное соединение отличается от известного 1α -гидроксивитамина D_2 наличием противоположной стереохимии метила при C-24 (то есть 24 S-конфигурации) и, кроме того, отличается по характеру биологической активности по сравнению с известным производным витамина D_2 .

Согласно способу изобретения (2S)-2,3-диметил-п-толилсульфон (II) подвергается взаимодействию с альдегидным производным 1α -гидроксивитамина D_2 (III)



где X^1 и X^2 представляют низший алкилсилил.

Полученный при этом продукт при необходимости подвергают гидролизу с получением соединения I, в котором X^1 и X^2 H.

Процесс данного изобретения приводит к получению свободного гидроксисоединения I, в котором X^1 и X^2 являются водородом, а также гидроксизащитных производных, таких как соединение (I), в котором X^1 и X^2 представляют собой алкилсилильную группу.

Процесс осуществления данного изобретения более конкретно описан в следующих иллюстративных примерах.

Пример 1

(2R)-2,3-диметилбутил-п-толилсульфоксид и (2S)-2,3-диметил-п-толилсульфоксид

Магнелиевая стружка (0,24 г, 10 ммоль) и кристаллы I_2 помещались в сухую колбу и покрывались 5,0 мл безводного тетрагидрофурана. Затем медленно при перемешивании добавлялся 1-бром-2,3-диметилбутан (1,54 г, 8 ммоль) в атмосфере азота и при периодическом охлаждении. Смесь перемешивалась при комнатной температуре в течение 1,5 часов или до тех пор, пока не израсходуется

большая часть магния. Данная смесь охлаждалась и к ней добавлялся метиловый эфир (-) (R)-(+)-п-толуолсульфиновой кислоты 2,35 г (10 ммоль) в 10 мл безводного тетрагидрофурана. Смесь перемешивалась в атмосфере азота в течение 16 часов при комнатной температуре, охлаждалась и разлагалась насыщенным раствором NH_4Cl . Органический слой отделялся, водная фаза экстрагировалась несколько раз эфиром. Смешанная органическая фаза промывалась водой и раствором хлористого кальция, сушилась MgSO_4 , фильтровалась и упаривалась. Остаток хроматографировался с использованием силикагелей колонки 70 270 меш, давая 1,26 г диастеромерной смеси сульфоксида. Смесь отделялась с помощью мгновенной хроматографии с использованием силикагелевой колонки 230 400 меш со смесями этилацетата и гексана или с помощью полупрепаративной HPLC (Zorbax Sil 9,4 x 25 см колонка) с использованием этилацетат-гексановых смесей. Первым элюированным соединением был

(S)-(-)-п-толил-(2S)-2,3-диметилбутилсульфоксид, а вторым (S)-(-)-п-толил-(2S)-2,3-диметилбутилсульфоксид MCM/z (относительная интенсивность 224 (M^+ , 6), 208 (14), 140 (100), 139(8), 124 (30), 92 (22), 91 (21), 44 (10), 43 (71), 28 (34), 27 (25);

1Н ЯМР (CDCl_3): 8 0,80 (3H, g, J 7,0 Гц), 0,89 (3H, g, J 7,0 Гц), 0,98 (3H, g, J 6,5 Гц), 1,6-1,82 (2H, м), 2,42 (3H, с, CH_3Ar), 2,71 (2H, м), 7,34 (2H, д, J 15 Гц), (Н-арил орто), 7,54 (2H, д, J 15 Гц), Н-арил орто), (2S) сульфоксид $[\alpha]_D^{20} = -153,5$ (с 4 в CHCl_3); (2R) сульфоксид $[\alpha]_D^{20} = -444,8$ (с 4 в CHCl_3).

Пример 2.

(2S)-2,3-диметилбутил-п-толилсульфон (2S)-2,3-диметилбутил-п-толилсульфоксид (52 мг, 0,2 ммоль) растворялся в 1 мл безводного дихлорметана и добавлялось 60 мг (0,3 ммоль) 3-хлорпероксибензойной кислоты (80 85% Sigma) при перемешивании. Реакционная смесь перемешивалась в течение 2-х часов и гасилась добавлением 10%-го раствора бикарбоната натрия. Затем добавлялся еще дихлорметан и смешанные органические экстракты промывались водным раствором сульфита натрия и раствором хлористого кальция, сушились с использованием MgSO_4 . Растворитель отгонялся в вакууме, а сырой (неочищенный) сульфоксид очищался с помощью силикагелевой хроматографии с использованием гексанэтилацетатных смесей с получением указанного сульфона в виде бесцветного масла. Для аналитических целей он очищался также с использованием HPLC (Zorbax Sil 9,4 x 25 см колонка) с применением 10%-го этилацетата в гексане, с образованием 42 мг чистого (2S)-сульфона: $[\alpha]_D^{20} = +17$ (с 3,5 в CHCl_3); 1 MC m/z (относительная интенсивность (240 (M^+ , 3), 197 (5), 157 (100) 92 (19), 91 (27), 85 (25), 84 (31), 43 (72);

1Н ЯМР 8.0.77 (3H, д, J 7 Гц), 0,82 (3H, д, J 7,0 Н), 1,00 (3H, д, J 7 Гц), 1,66-1,98 (2H, м), 2,45 (3H, с, CH_3 -арил), 2,86 (1H, дд, J 8, 11 Гц), 3,06 (1H, дд, J 4,12 Гц), 7,35

(2H, g, J 7,0 Гц, Н-арил орто), 7,75 (2H, д, J 8, Н-арил орто).

Пример 3

(2R)-2,3-диметилбутил-п-толилсульфон

(2R)-сульфон получался окислением сульфоксида с использованием экспериментального метода, описанного в вышеприведенном примере 2. Полученный (2R) сульфоксид показал оптическое вращение $[\alpha]_D^{20} = -19$ (с 1,4, CHCl_3).

Пример 4

1 α -гидрокси-24-эпивиитамин D₂.

К перемешиваемому раствору, содержащему 30 мг (125 мкмоль) (2S)-2,3-диметилбутил-п-толилсульфона в 300 мкл безводного тетрагидрофурана (содержащему 1,10-фенантролин в качестве индикатора), добавлялся в атмосфере аргона при -78°C 18 мкл (130 мкмоль) диизопропиламина с последующим добавлением 86 мкл раствора n-BuLi в гексане (1,50 M, 130 мкмоль). Раствор перемешивался в течение 15 минут при -78°C (темно-коричневого цвета) и к нему добавлялся защищенный альдегид 4 мг (7 мкл) ($\text{X}^1 \text{X}^2$ т Bu Ml_2Si) в 0,3 мл безводного тетрагидрофурана и смесь перемешивалась в течение 1 часа в аргоне при -78°C. Реакция гасилась добавлением 1 мл насыщенного раствора NH_4Cl , смесь подогревалась до 0°C и экстрагировалась этилацетатом, органическая фаза промывалась насыщенным NaCl. Органическая фаза сушилась MgSO_4 , фильтровалась и выпаривалась. Остаток вновь растворялся в этилацетате, пропускался Sep Pak колонку в этилацетате и выпаривался. Затем он очищался с использованием HPLC (Zorbax Sil колонка 9,4 x 25 см) с применением 10% этилацетата в гексане, давая 3,3 мг (58%) гидроксисульфоны ($\text{X}_1 \text{X}_2$ т Bu Ml_2/MC m/z (относительная интенсивность) 8,2 (M^+ , 20), 680 (34), 440 (52), 248 (64), 157 (65), 75 (100).

Насыщенный раствор Na_2HPO_4 в метаноле (1,0 мл) добавлялся при перемешивании к раствору 3,3 мг сульфона в 1 мл безводного тетрагидрофурана, затем добавлялся 160 мг безводного порошкообразного Na_2HPO_4 . Смесь перемешивалась в атмосфере аргона в течение 15 минут, охлаждалась до 0°C и к ней добавлялось 5% амальгамы натрия (около 400 мг). Смесь перемешивалась при 5°C в течение 20 часов; затем добавлялось 5 мл гексана и гексановый слой декантировался. Затем твердое вещество экстрагировалось 10%-ым этилацетатом в гексане (3 x 5 мл).

Объединенная органическая фаза промывалась насыщенным NaCl, фильтровалась через брикет Sep Pak и выпаривалась. Окончательная очистка с применением HPLC (Zorbax Sil 9,4 x 25 см колонка) (с использованием в качестве растворителя 10%-ого этилацетата в гексане) дала 1,05 мг (40%) производного витамина D₂ ($\text{X}_1 \text{X}_2$ т-Bu Ml_2SO). (В качестве побочного продукта было получено также 0,47 мг 22-гидроксильированного производного), MC m/z (относительная интенсивность) 640 (M^+ , 24), 508 (65), 248 (67), 147 (13), 73 (100), 69 (58);

1H-ЯМР d 0,54 (3H, c, 18-CH₃), 4,19 (1H, м, 3-H), 4,35 (1H, м, 1-H), 4,86 (1H, c, 19-Z-H), 5,17 (3H, м, 19-E-H и 22-23-H-S), 6,00 (1H, д, J 9,6 Гц, 7-H), 6,23 (1H, д, J 8,8 Гц), 6H, гидроксизащитный диод (двухатомный спирт) (800 мкг) растворялся в 0,5 мл безводного тетрагидрофурана и к раствору добавлялось 90 мкл 1 М раствора фторида тетрабутиламмония в тетрагидрофуране. Смесь перемешивалась в течение 1 часа в атмосфере аргона при температуре 55°C. Смесь охлаждалась и добавлялось 5 мл эфира. Органическая фаза промывалась насыщенным раствором NaCl, сушилась над безводным MgSO₄, выпаривалась и вновь растворялась в 20%-ом растворе 2-пропанола в гексане и фильтровалась через Sec Pak. Препаративная HPLC (Zorbax Sil 9,4 мм x 25 см колонка) в 20%-ом 2-пропаноле в гексане дала 308 мкг I α -гидрокси-24-эпивиитамина D₂ (X¹ X² H).

I α -гидрокси-24-эпивиитамин D₂ проявляет следующие спектральные свойства:

УФ (EtOH) I_{max}: 264 нм, λ_{mix} 228; MC/m/z

относительная интенсивность/ 412 (M⁺, 13), 394 (21), 376 (7), 287 (4), 269 (7), 251 (6), 252 (31), 251 (6), 152 (35), 151 (15), 134 (100), 69 (50), 55 (73);

1H-ЯМР (CDCl₃ δ 0,49 (3-H, c, 18-CH₃), 0,77 (3-H, д, J 7,126 или 27-CH₃), 0,85 (3H, д, J 6,8, 28-CH₃), 0,94 (3H, д, J 6,5, 21-CH₃), 4,94 (1H, c, 19 Z-H), 5,13 (2H, м, 22 b 23H) (5,11, 5,13, 5,14), 5,26 (1H, c, 19Z-H) 5,99 (1H, д, J 11,2 Гц, 7-H), 6,35 (1H, д, J 11,2 (Гц, 6-H)), 4,21 (1H, м, 3-H), 4,41 (1H, м, 1-H), I α -гидрокси-24-эпивиитамин D₂ можно отличить от известного ранее I α -гидроксивитамина с помощью обращено-фазной HPLC (4,6 мм x 25 мм, ODS Zorbax колонка) с 15%-ной водой в ацетонитриле. Первым соединением, элюируемым из этой системы, был I α -гидрокси-24-эпивиитамин D₂, а вторым - известный I α -гидроксивитамин D₂.

Биологическая активность I α -гидрокси-24-эпивиитамина.

Новый аналог испытывался на крысах с дефицитом витамина D. Эти испытания показали, что I α -гидрокси-24-эпивиитамин D₂ имеет спектр биологической активности, заметно отличающийся от спектра биологической активности известного ранее I α -гидроксивитамина D₂. В таблице 1, представленной ниже, дан анализ полученных характерных результатов. Эти результаты включают активность в перемещении кишечного кальция ("S/M отношение") и костной минеральной мобилизации, как отражающие уровень кальция в сыворотке. Эти испытания проводились в соответствии со стандартными методиками (см. например, патент США N 4588176). Крысы, используемые в этих испытаниях, были приведены в состояние дефицита витамина D путем содержания их при низко-кальциевой диете (0,02% Ca, 0,37% P), без витамина D в течение 3 - 1/2 недели. Они получали испытываемые соединения (или только носители D контрольная группа) за 20 часов до умерщвления.

Данные таблицы 1 показывают, что новый

аналог, I α -гидрокси-24-эпивиитамин D₂, проявляет высокую активность в усилении перемещения кишечного кальция, по существу, эквивалентную активности известного I α -гидроксивитамина D₂. Но в противоположность последнему, новое соединение не проявляет активности по выведению кальция из костей. Таким образом, новое соединение, хотя и являющееся по своему строению близким к известному I α -гидроксивитамину D₂, обнаруживает существенное отличие в профиле активности. Стимулируя абсорбцию кальция, но не вызывая при этом выведение его из костей, новый аналог является чрезвычайно пригодным терапевтическим средством для его использования при физиологических состояниях, характеризующихся потерей костной массы.

Результаты таблицы 1 демонстрируют, что по своему кальциемическому действию новый препарат I α -гидрокси-24-эпивиитамин D₂ проявляет спектр биологической активности, аналогичный известному I α -25-дигидрокси-24-эпивиитамину D₂.

Однако, дальнейшие испытания показали, что новое соединение полностью отличается от известного 24-эпи-D₂-производного по своей активности, связанной с дифференциацией злокачественных тканей (клеток) в отношении моноцит-макрофагов. Дифференцирующая активность испытывалась с использованием лейкемических клеток человека (HL-60 клетки) в соответствии с двумя стандартными методами, а именно восстановление нитро-голубого тетразолия (NBT-восстановление) и анализа на фагоцитоз, и, как показывает таблица 2, новое соединение сравнивалось с I α -25-дигидроксивитамин D₃ (агентом с высокой способностью к дифференциации) и с I α -25-дигидрокси-24-эпивиитамин D₂.

Испытания проводились, как описано в работах Ostrem и др. (J.Biol. Chem. 262, 14164-14177, 1987), Desuca и др. (Патент США N 4717721). Результаты, приведенные в таблице 2, показывают, что стандарт I α , 25-дигидроксивитамин, D₃, имеет, как и ожидалось, заметную активность в дифференциации клеток HL-60. Даже при такой низкой дозе, как 10⁻⁸ M, это соединение дает приблизительно 64-67% -ную дифференциацию в 4-х дневный период по обоим методам: по NBT-восстановлению и по фагоцитозному анализу. I α , 25-дигидро-24-эпивиитамин D₂ несколько менее активен (приблизительно в 5 раз менее активен, чем I α 25-дигидроксивитамин D₃-эталон), но также показывает достаточно высокую активность в этой системе, например, более чем 60%-ую дифференциацию при 5 x 10⁻⁸ M и 80%-ую дифференциацию при концентрации 10⁻⁷ M. В противоположность этому I α -гидрокси-24-эпивиитамин D₂ почти или совсем не обладает активностью по дифференциации клеток. В лучшем случае лишь 16-20%-ая дифференциация наблюдалась при концентрации 10⁻⁷ M, а при концентрации 1 2 x 10⁻⁸ M, где I α , 25-дигидрокси-24-эпивиитамин D₂ показывает

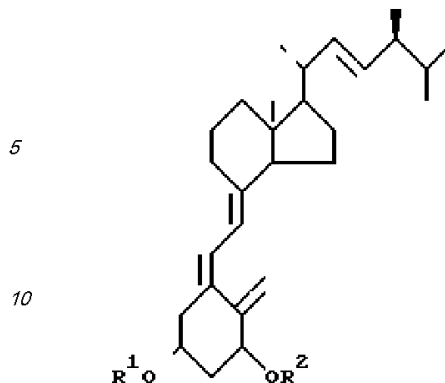
40-50%-ную дифференциацию, новый аналог не проявляет значительной реакции по дифференциации. Таким образом, 1α -гидрокси-24-эпиви타민 D_2 почти не имеет или вообще не имеет активности в промотировании дифференциации промиелоцитов и моноцитов. Эти результаты показывают существенное биологическое отличие данного соединения и предшествующего продукта 1,25-дигидрокси-24-эпивитамину D_2 .

Таким образом представленный выше анализ демонстрирует, что новое соединение 1α -гидрокси-24-эпиви타민 D_2 проявляет отчетливый и уникальный спектр активности, а именно, высокую способность стимуляции транспортировки кальция, никакой активности по выведению кальция из костей и лишь незначительную, если она вообще имеется, активность по дифференциации, что явно отличает данное соединение от аналогичных, используемых ранее в этой области.

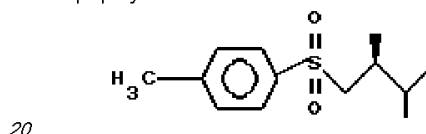
Следовательно, новое соединение представляет собой ценный вклад в арсенал полезных терапевтических средств и может с успехом применяться в условиях, когда особенно требуется усиление перемещения кишечного кальция, например при болезнях, таких, как остеодистрофия или остеопороз, характеризующихся потерей костной массы. ТТТ1

Формула изобретения:

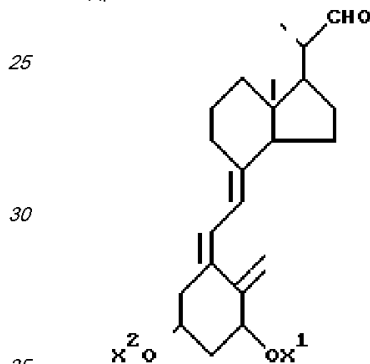
Способ получения 1α -гидрокси-24-эпи-витамина D_2 общей формулы I



где R^1 , R^2 водород, низший алкилсиллил, отличающийся тем, что соединение общей формулы II



подвергают взаимодействию с альдегидным производным 1α -гидрокси-24-эпивитамину D-22 общей формулы III



где X^1 , X^2 низший алкилсиллил, полученный при этом продукт при необходимости подвергают гидролизу для получения соединений формулы I, где R^1 и R^2 водород.

40

45

50

55

60

Таблица 1

Активность 1α -гидроксивитамина D₂ и 1α -гидрокси-24-эпи-витамина D₂ по транспортировке кишечного кальция и костной мобилизации кальция

Группа	Количество (р моль)	Транспортировка Са Отношение S/M	Костная мобилизация Са Сыворотки мг %
-D- /контроль/ 1α -гидрокси-24-эпи-витамин	0	$2,5 \pm 0,35$	$3,7 \pm 0,20$
	325	$4,3 \pm 0,42^a$	$3,9 \pm 0,39^B$
	650	$4,4 \pm 0,70^a$	$4,1 \pm 0,23^B$
1α -гидроксивитамин D ₂	325	$5,4 \pm 0,37^a$	$5,3 \pm 0,15^a$

^a Значительная разница в сравнении с соответствующими контрольными группами, $p < 0,01$.

^B Нет значительной разницы по сравнению с контрольными группами.

Таблица 2

Активность 1α -гидрокси-24-эпи-витамина D₂ по дифференциации клеток H₄-60

Соединение	Концентрация	% дифференцировки NBT восстановление	Фагоцитоз
$1\alpha, 25$ -дигидроксивитамин D ₃	(M)		
	1×10^{-7}	87 ± 2	89 ± 3
	1×10^{-8}	64 ± 2	67 ± 3
$1\alpha, 25$ -дигидрокси-24-эпи-витамин D ₂	1×10^{-7}	80 ± 3	81 ± 3
	5×10^{-8}	64 ± 3	62 ± 3
	2×10^{-8}	48 ± 3	49 ± 2
	1×10^{-8}	39 ± 3	40 ± 3
1α -гидрокси-24-эпи-витамин D ₂	1×10^{-7}	22 ± 2	16 ± 2
	5×10^{-8}	14 ± 2	9 ± 1
	2×10^{-8}	6 ± 2	6 ± 3
	1×10^{-8}	4 ± 2	4 ± 2