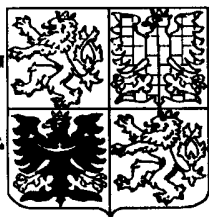


ČESKÁ  
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

# ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 14.12.92  
(32) 13.12.91  
(31) 91/4141746  
(33) DE  
(40) 18.01.95

(21) 1416-94

(13) A3

5(51)

C 07 C 401/00

C 07 C 39/23

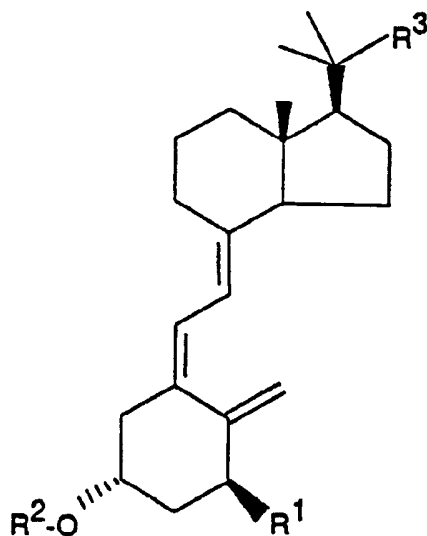
A 61 K 31/59

(71) SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, Berlin, DE;

(72) Neef Günter, Berlin, DE;  
Steinmeyer Andreas, Berlin, DE;  
Kirsch Gerald, Berlin, DE;  
Schwarz Katica, Berlin, DE;  
Thieroff-Ekerdt Ruth, Berlin, DE;  
Wiesinger Herbert, Berlin, DE;  
Haberey Martin, Berlin, DE;

(54) 20-methylsubstituované deriváty vitamínu D,  
způsob jejich výroby, farmaceutické preparáty  
tyto látky obsahující a jejich použití

(57) Řešení se týká 20-methylsubstituovaných derivátů vitamínu D obecného vzorce I, ve kterém mají substituenty významy uvedené v popisné části, způsobu jejich výroby, farmaceutických preparátů tyto látky obsahujících a použití těchto látek pro výrobu léčiv. Uvedené sloučeniny mají ve srovnání s kalcitriolem silně zlepšenou indukci diferenciacce buněk (HL 60).



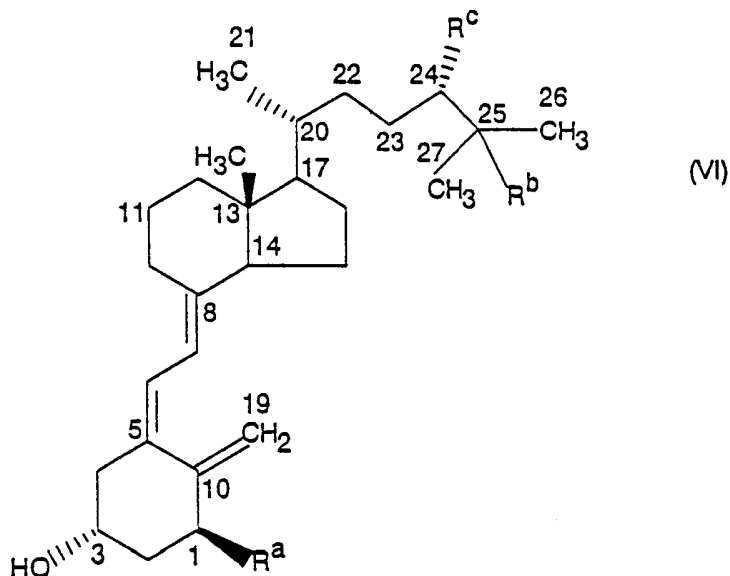
20-methylsubstituované deriváty vitamínu D , způsob jejich  
výroby, farmaceutické preparáty tyto látky obsahující  
a jejich použití

Oblast techniky

Vynález se týká 20-methylsubstituovaných derivátů vitamínu D, způsobu jejich výroby, farmaceutických preparátů tyto látky obsahujících a použití těchto látek pro výrobu léčiv.

Dosavadní stav techniky

Přírodní vitamíny  $D_2$  a  $D_3$  (viz obecný vzorec VI) jsou samy o sobě biologicky inaktivní a teprve po hydroxylaci v poloze 25 v játrech, popřípadě v poloze 1 v ledvinách, se přeměňují na biologicky aktivní metabolity. Účinek vitamínů  $D_2$  a  $D_3$  spočívá ve stabilizaci hladiny plasma- $Ca^{++}$  a plasma-fosfátu ; působí proti poklesu hladiny plasma- $Ca^{++}$ .



Ergokalciferol :  $R^a = R^b = H$  ,  $R^c = CH_3$                       vitamin  $D_2$   
dvojná vazba C-22/23

Cholekalciferol :  $R^a = R^b = R^c = H$                                       vitamin  $D_3$

25-hydroxycholekalciferol :  $R^a = R^c = H$  ,  $R^b = OH$

1 $\alpha$ -hydroxycholekalciferol :  $R^a = OH$  ,  $R^b = R^c = H$

1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholekalciferol :  $R^a = R^b = OH$  ,  $R^c = H$  ->  
-> kalcitriol.

Vedle význačného účinku na výměnu vápníku a foafátů mají vitaminy  $D_2$  a  $D_3$  a jejich syntetické odvozeniny účinky inhibující proliferaci a diferencující buňky (H. F. De Luca, "The Metabolism and Function of Vitamin D" v Biochemistry of Steroid Hormones, Hrsg. H. L. J. Makin, 2. edice, Blackwell Scientific Publications 1984, str. 71-116).

Při použití vitamínu D může ale dojít k jevům předávkování (hyperkalcemie).

1 $\alpha$ -cholekalciferoly, hydroxylované v poloze 24 , vyplývají již z DE-AS-25 26 981 ; mají nižší toxicitu než odpovídající nehydroxylovaný 1 $\alpha$ -cholekalciferol. Hydroxylované sloučeniny vykazují selektivní aktivaci intestinální absorpce vápníku a slabší absorpční účinek v kostech než 1 $\alpha$ -cholekalciferol.

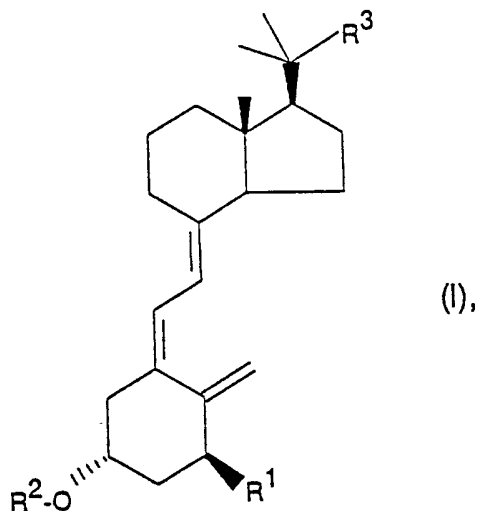
Analogy 24-hydroxy-vitamínu D , popsané v mezinárodní přihlášce WO 87/00834 , mohou u lidí a zvířat sloužit pro aplikaci při poruchách, vyvolaných abnormální proliferací buněk a/nebo diferenciací buněk.

Pro různé deriváty 1,25-dihydroxy-homo-vitamínu D je

disociace, týkající se vlastností absorpčního účinku v kostech a HL-60 diferenciaci buněk již krátce uvažována De Lucou. Absorpční účinek v kostech in vitro je při tom přímo mírou mobilisace kalcia in vivo.

### Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu jsou deriváty 20-methylsubstituovaného vitaminu D obecného vzorce I



ve kterém

- $R^1$  značí vodíkový atom, hydroxylovou skupinu nebo alkanoyloxyskupinu s 1 až 12 uhlíkovými atomy, popřípadě benzoyloxyskupinu,
- $R^2$  značí vodíkový atom, alkanoyloxyskupinu s 1 až 12 uhlíkovými atomy, popřípadě benzoyloxyskupinu a
- $R^3$  značí nasycenou nebo nenasycenou, přímou nebo rozvětvenou uhlovodíkovou skupinu s až 18 uhlíkovými atomy, která je popřípadě přerušena a/nebo substituována

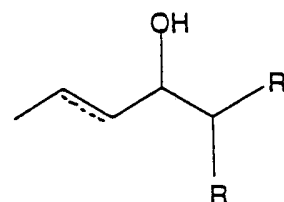
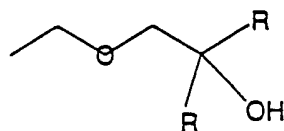
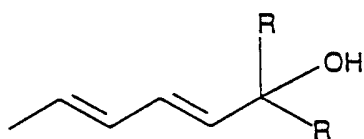
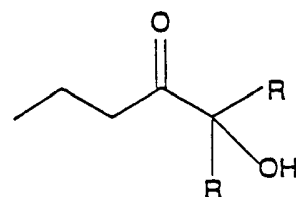
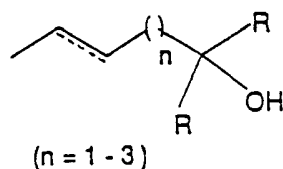
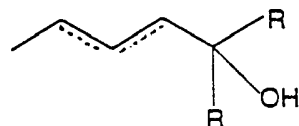
jednou nebo několika karbocyklickými strukturami (cykloalkylové nebo cykloalkenylové zbytky se 3 až 10 uhlíkovými atomy, poslední s až dvěma dvojnými vazbami), která je popřípadě substituovaná jednou nebo několika hydroxyskupinami, oxoskupinami, aminoskupinami a/nebo jedním nebo několika atomy halogenu a která popřípadě má jeden nebo několik atomů kyslíku, síry a/nebo dusíku (jako =NH) jako můstkové členy v uhlovodíkovém zbytku.

Alkanoyloxyskupiny a alkanoylové skupiny s 1 až 12 uhlíkovými atomy, možné jako zbytky  $R^1$ , popřípadě  $R^2$ , jsou odvozené obzvláště od nasycených karboxylových kyselin. Tyto zbytky mohou být cyklické, acyklické, karbocyklické nebo heterocyklické a všechny mohou být popřípadě také nenasycené. Výhodné zbytky se odvozují od alkankarboxylových kyselin s 1 až 9 uhlíkovými atomy, obzvláště se 2 až 5 uhlíkovými atomy, jako je například acetyl(oxy)skupina, propionyl(oxy)skupina a butyryl(oxy)skupina.

Jako zbytky  $R^3$  přicházejí v úvahu všechny postranní řetězce, popsané s účinky pro vitamin D, které jsou například popsané v následujících spisech :

- US-P 4 927 815 (22.05. 1990, De Luca a kol.)
- US-P 4 906 785 (06.03. 1990, Baggiolini a kol.)
- US-P 4 897 387 (30.01. 1990, Ikekawa a kol.)
- US-P 4 866 048 (12.09. 1989, Calverley a kol.)
- US-P 4 857 518 (15.08. 1989, De Luca a kol.)
- US-P 4 851 401 (25.07. 1989, De Luca a kol.)
- EP-A 0 421 561 (Kirsch a kol.)
- EP-A 0 441 467 (Neef a kol.) a
- EP-A 0 450 743 (Neef a kol.)

Výhodné zbytky  $R^3$  mají následující strukturní řetězce :



R = alkylová skupina s 1 až 4 uhlíkovými atomy, hydroxyalkylová skupina nebo O-alkylová skupina (alkoxyskupina).

Obzvláště je možno jmenovat následující sloučeniny podle předloženého vynálezu :

$1\alpha, 25$ -dihydroxy-20,26,27-trimethyl-23-oxa-vitamin  $D_3$  ,

$1(S), 3(R)$ -dihydroxy-20-(5-hydroxy-5-methyl-hexa-1E,3E-dien-1-yl)-20-methyl-9,10-secopregna-5Z,7E,10(19)-trien ,

$1\alpha, 25$ -dihydroxy-20-methyl-vitamin  $D_3$  ,

$1\alpha, 25$ -dihydroxy-20-methyl-24-homo-vitamin  $D_3$  ,

$1\alpha, 24(S)$ -dihydroxy-20-methyl-vitamin  $D_3$  ,

$1\alpha, 25$ -dihydroxy-20-methyl-23-oxa-vitamin  $D_3$  ,

$1\alpha, 24(R), 25$ -trihydroxy-20-methyl-vitamin  $D_3$  ,

$1\alpha, 24(S), 25$ -trihydroxy-20-methyl-vitamin  $D_3$  ,

$1\alpha, 25$ -dihydroxy-20-methyl-24-oxo-vitamin  $D_3$  ,

(5Z,7E)-(1S,3R)-20-methyl-20-vinyl-9,10-seko-pregna-5,7,10-

(19)-trien-1,3-diol,

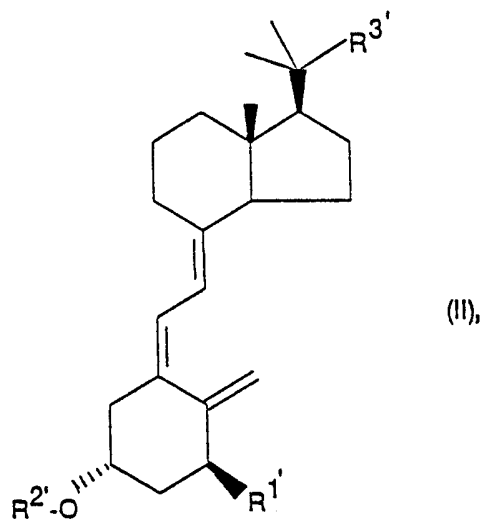
(5Z,7E)-(1S,3R)-20-ethyl-20-methyl-9,10-seko-pregna-5,7,10-(19)-trien-1,3-diol,

(5Z,7E)-(1S,3R)-20-hydroxymethyl-20-methyl-9,10-seko-pregna-5,7,10(19)-trien-1,3-diol,

1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20-methyl-23,24-dehydro-vitamin D<sub>3</sub> a

1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20.26,27-trimethyl-23,24-dehydro-vitamin D<sub>3</sub>.

Předmětem předloženého vynálezu je dále způsob výroby sloučenin obecného vzorce I, jehož podstata spočívá v tom, že se sloučenina obecného vzorce II



ve kterém

R<sup>1'</sup> značí vodíkový atom nebo chráněnou hydroxyskupinu,

R<sup>2'</sup> značí ochrannou skupinu hydroxyskupiny, stabilní vůči alkáliím a

R<sup>3'</sup> značí totéž jako substituent R<sup>3</sup> ve sloučenině obecného vzorce I,

příčemž popřípadě přítomné hydroxylové skupiny jsou chráněné,

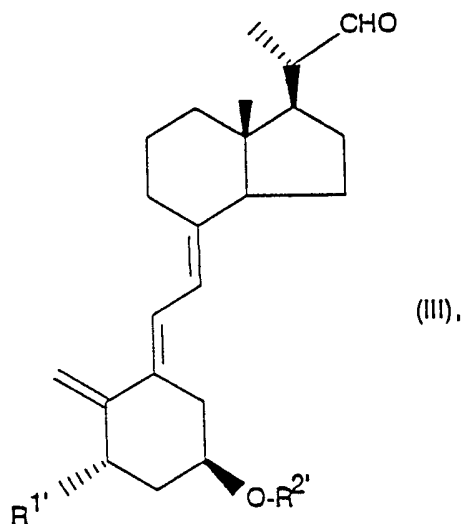
převeďte odštěpením přítomných ochranných skupin hydroxyskupin a popřípadě parcielní nebo úplnou esterifikací hydroxyskupin na sloučeninu vzorce I .

U ochranných skupin hydroxyskupin, stabilních vůči alkáliím, které všeobecně slouží k ochraně hydroxyskupin v poloze 1 a/nebo v postranním řetězci  $R^3$ , se jedná výhodně o ter.-butyldimethylsilylovou skupinu nebo di-terc.-butyldifenylsilylovou skupinu nebo o jiné terciární silylové skupiny. Odštěpování terciárních silylových skupin se provádí například za použití tetra-n-butyl-amoniumfluoridu.

Po odštěpení ochranných skupin se mohou volné hydroxylové skupiny podle potřeby esterifikovat. Esterifikace různých hydroxylových skupin se může podle obvyklých způsobů provádět parcielně nebo úplně s odpovídajícími halogenidy kyselin (halogenid = chlorid nebo bromid) nebo s anhydridy kyselin.

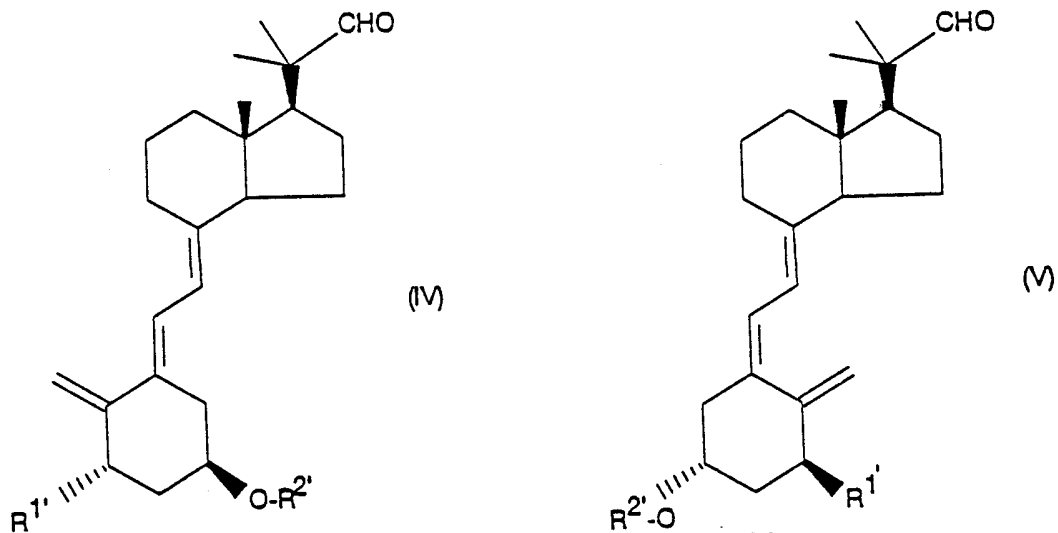
Výroba výchozích sloučenin obecného vzorce II podle předloženého vynálezu vychází ze známých aldehydů obecného vzorce III





ve kterém mají  $R^{1'}$  a  $R^{2'}$  výše uvedený význam (viz M.J. Calverley, Tetrahedron 43, 4609, 1987 ; G. Neef a kol., Tetrahedron Lett. 1991, 5073).

Jejich  $\alpha$ -alkylace obvyklým způsobem dává dimethylované aldehydy obecného vzorce IV, které se potom rovněž známým způsobem triplet-sensibilovanou fotoisomerisací přemění na centrální meziprodukty obecného vzorce V.



přičemž v uvedených vzorcích mají  $R^{1'}$  a  $R^{2'}$  výše uvedený význam.

Methylace se provádí například jodmethanem nebo dimethylsulfátem za přítomnosti base, jako jsou například

hydroxidy, hydridy a amidy alkalických kovů, v aprotických rozpouštědlech, jako je například tetrahydrofuran, diethylether, hexan, ethylenglykoldimethylether nebo toluen, popřípadě za přídavku tetraalkylamoniové soli jako fázového transferového katalysátoru.

Ozářením ultrafialovým světlem za přítomnosti takzvaného "triplet-sensibilisátoru" (v rámci předloženého vynálezu se zde používá anthracen) se dají sloučeniny obecného vzorce IV převést na sloučeniny obecného vzorce V. Štěpením  $\pi$ -vazby 5,6-dvojně vazby, rotací A-kruhu o  $180^\circ$  okolo 5,6-jednoduché vazby a retablací 5,6-dvojně vazby se obrátí stereoisomerie na 5,6-dvojně vazbě.

Nakonec se musí ještě zavést zbytek  $R^{3'}$  kopulací aldehydu obecného vzorce V s pro kopulaci vhodným předchůdcem  $R^{3'}$ . Toto se provede analogicky jako ve známých způsobech; experimentální provedení tohoto způsobu je popsáno například M.J. Caverleyem, Tetrahedron 43, 4609, 1987; G. Neefem a A. Steinmeyerem, Tetrahedron Lett. 1991, 5073; v mezinárodní patentové přihlášce WO 91/00855, v DE-A 39 33 034 a v DE-A 40 11 682. Jako příklad je možno uvést reakci aldehydu obecného vzorce V s Wittigovým činidlem nebo redukcí aldehydu na alkohol a prodloužení jeho řetězce reakcí s odpovídající omega-halogenloučeninou.

Nové deriváty vitamínu D obecného vzorce I se vyznačují ve srovnání s již známými sloučeninami s modifikovaným postranním řetězcem s aktivitou vitamínu D přídavnou methylovou skupinou na uhlíkovém atomu 20. Tímto způsobem ztrácí poloha C-20 charakter asymetrického centra.

Vedle tím způsobeného zjednodušení při syntese a čiš-

tění meziproductů a konečných produktů takto vznikají nové sloučeniny, které mají vysokou biologickou účinnost. Když se bere jako standard kalcitriol ( $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin  $D_3$ ), vykazují substance podle předloženého vynálezu při srovnatelné afinitě ke kalcitriolreceptoru o několik desítek procent zlepšenou indukci diferenciaci buněk (HL-60) a jsou proto vhodné obzvláštním způsobem pro ošetření onemocnění, která se vyznačují hyperproliferací a porušenou diferenciací, jako jsou například hyperproliferativní onemocnění kůže (Psoriasis), maligní nádory (leukemie, colon-carcinom, Mammacarcinom) a akne (J. Invest. Dermatol. Vol. 92, č. 3, 1989).

Při obzvláště výhodné formě provedení předloženého vynálezu se před ošetřením prokazují v cílovém orgánu kalcitriolové receptory.

Vedle toho se nové sloučeniny přirozeně používají podobným způsobem jako známé odvozeniny vitaminu D pro ošetření poruch látkové výměny vápníku, pro imunomodulaci a pro zpomalení stárnutí kůže.

Vitamin D-aktivita sloučenin podle předloženého vynálezu se stanovuje pomocí kalcitriol-receptorového testu. Provádí se za použití specifického receptorproteinu ze střev mladých prasat. Vazný protein, obsahující receptory, se inkubuje s  $^3H$ -kalcitriolem ( $5 \times 10^{-10}$  mol/l) v reakčním objemu 0,270 ml za nepřítomnosti a přítomnosti zkoušené substance po dobu 2 hodin při teplotě  $4^\circ C$  v testovacích kyvetách. Pro oddělení volného a na receptory vázaného kalcitriolu se provádí absorpce charconal-dextran. K tomu se do každé testovací kyvety přidá 250  $\mu$ l suspence charconal-dextran a inkubuje se po dobu 20 minut při teplotě

4 °C . Potom se vzorky odstřeďují po dobu 5 minut při teplotě 4 °C při 10000 x g . Kapalina se oddekantuje a po jednohodinové ekvilibraci v Picofluoru 15 TM se měří na β-měřiči.

Kompetitivní křivky, získané s různými koncentracemi zkoušené substance, jakož i referenční substance (neznačený kalcitriol) při konstantní koncentraci značené substance (<sup>3</sup>H-kalcitriol) se dosadí do vzájemného vztahu a zjistí se kompetitivní faktor (KF) .

Je definován jako kvocient z koncentrací odpovídající substance a referenční substance, která je potřebná pro 50% kompetitici :

$$KF = \frac{\text{koncentrace zkoušené substance při 50\% kompetitici}}{\text{koncentrace referenční substance při 50\% kompetitici}}$$

Podle tohoto mají

1(S), (3R)-dihydroxy-20-(5-hydroxy-5-methyl-hexa-1E,3E-dien-1-yl)-20-methyl-9,10-secopregna-5Z,7E,10(19)-trien,  
1α,25-dihydroxy-20,26,27-trimethyl-23-oxa-vitamin D<sub>3</sub> a  
1α,25-dihydroxy-20-methyl-23,24-dehydro-vitamin D<sub>3</sub>  
hodnoty KF 3,4 , 1,6 , popřípadě 0,8 .

Silně zlepšená indukce diferenciaci buněk u nových sloučenin vyplývá z dále popsaného testu.

Je známé z literatury (Mangelsdorf, D.J. a kol, J. Cell. Biol. 98 : 391-398 /1984/) , že zpracování lidských leukemických buněk (buněčná linie promyelocytů HL 60) in

vitro pomocí kalcitriolu indukuje diferenciaci buněk na makrofágy.

Buňky HL-60 se kultivují v mediu pro tkáňové kultury (RPMI - 10% fetální telecí sérum) při teplotě 37 °C v atmosféře 5% oxidu uhličitého ve vzduchu.

Pro testování substance se buňky odstředí a vyjme se  $2,8 \times 10^5$  buněk/ml do media pro tkáňové kultury, prostého fenolové červeně. Testované substance se rozpustí v ethylalkoholu a zředí se mediem pro tkáňové kultury bez fenolové červeně na požadovanou koncentraci. Zředovací stupně se s buněčnou suspenzí mísí v poměru 1 : 10 a vždy 100  $\mu$ l této se se substancí smísené buněčné suspense se pipetuje do prohlubně testovací destičky s 96 otvory. Pro kontrolu se buněčná suspense analogicky smísí s rozpouštědlem.

Po inkubaci po dobu 96 hodin při teplotě 37 °C v 5% oxidu uhličitém ve vzduchu se k buněčné suspenzi pipetuje 100  $\mu$ l roztoku NBT-TPA (nitromodřtetrazolium /NBT/, konečná koncentrace ve vsázce 1 mg/ml, tetradekanoylforbolmyristát-13-acetát /TPA/, konečná koncentrace ve vsázce  $2 \times 10^{-7}$  mol/l) .

Inkubací po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C a v 5% oxidu uhličitém ve vzduchu se v důsledku intracelulárního uvolnění kyslíkových radikálů ( $O_2^{2-}$ ), stimulovaného TPA, v na makrofágy diferenciovaných buňkách redukuje NBT na nerozpustný formazan.

Pro ukončení reakce se obsah prohlubní v testovací destičce odsaje, přilnuté buňky se fixují přidavkem methylalkoholu a po fixaci se usuší.

K roztoku vytvořených intracelulárních formazanových krystalů se do každého zředění pipetuje 100  $\mu$ l hydroxidu draselného (2 mol/l) a 100  $\mu$ l dimethylsulfoxidu a po dobu jedné minuty se zpracovává ultrazvukem. Koncentrace formazanu se měří spektrofotometricky při 650 nm.

Jako míra pro indukci diferenciac buněk HL 60 na makrofágy platí koncentrace vytvořeného formazanu. Relativní účinnost testované substance vyplývá k kvocientu  $ED_{50}$  testované substance/ $ED_{50}$  kalcitriolu. Sloučeniny podle předloženého vynálezu se při tom jeví jako o několik desítek procent účinnější než kalcitriol.

Imunomodulatorický účinek sloučenin podle předloženého vynálezu vyplývá z inhibice proliferace stimulovaných humánních lymfocytů a jejich produkce interleukinu 2 (IL 2).

Nyní bylo zjištěno, že sloučeniny podle předloženého vynálezu jsou výkonné inhibitory proliferace a syntesy interleukinu 2 (IL 2) humánních leukocytů.

Pro stanovení proliferace leukocytů se získají mononukleární buňky z citrátové krve hustotní gradientovou centrifugací a kultivuje se 5 x 10<sup>4</sup> buněk/200  $\mu$ l na mikrotitračních destičkách ve 200  $\mu$ l media pro tkáňové kultury (RPMI 1640 za přídavku 10% fetálního telecího séra). Při výsevu se přidá fythemaglutinin (PHA) (5  $\mu$ g) a různé koncentrace testované substance nebo kalcitriolu (1,25-dihydroxycholekalCIFerol) jako standard a buňky se inkubují po dobu 96 hodin při teplotě 37 °C v atmosféře 5% oxidu uhličitého ve vzduchu. Pro posledních 6 hodin se k buňkám přidá 0,2  $\mu$ Ci/prohlubeň [<sup>3</sup>H]-thymidinu. Potom se buňky odsají přes filtr ze skelných vláken a měří

se radioaktivita filtru jako míra pro zabudování [<sup>3</sup>H]-thymidinu a tím pro proliferaci buněk v  $\beta$ -counter.

Pro stanovení sekrece IL 2 se připravují mononukleární buňky z humánní krve jako pro stanovení proliferace a kultivuje se  $2 \times 10^6$  buněk v 1 ml media pro tkáňové kultury (RPMI 1640 za přídavku 2% fetálního telecího séra) na zkušební destičce se 24 otvory. Při výsevu se přidá PHA (20  $\mu$ g) a různé koncentrace testované substance nebo kalcitriolu jako standard. 24 hodin po kultivaci při teplotě 37 °C v atmosféře 5% oxidu uhličitého ve vzduchu se kapalina nad tkáňovou kulturou získá centrifugací a kvantifikuje se zde koncentrace IL 2 pomocí ELISA.

Proliferace lymfocytů se inhibuje o 50 % působením  $1\alpha,25$ -dihydroxy-20-methyl-23,24-dehydro-vitaminu D<sub>3</sub> v koncentraci  $1 \times 10^{-11}$  a kalcitriolu v koncentraci  $4 \times 10^{-10}$ .

Sekrece IL 2 se inhibuje působením  $1\alpha,25$ -dihydroxy-20-methyl-23,24-dehydro-vitaminu D<sub>3</sub> ve stejném rozmezí koncentrací.

V důsledku inhibice proliferace lymfocytů a syntesy IL 2 v nižších koncentracích jsou sloučeniny podle předloženého vynálezu obecného vzorce I vhodné pro terapii onemocnění imunitního systému, například onemocnění atopického oběhu (atopická dermatitis, astma), autoimunní onemocnění, zahrnující diabetes melitus, šokové reakce po transplantacích a AIDS.

Pro kalcitriol bylo zjištěno, že na základě mechanismu zprostředkovaného receptory inhibuje nejen sekreci IL 2, ale také produkci jiných cytokinů, způsobujících záněty.

Vzhledem k tomu, že se sloučeniny obecného vzorce I vážou zrovna tak dobře na receptory jako kalcitriol, jsou vhodné pro ošetření zánětlivých onemocnění, jako je arthritida, Colitis ulcerosa a Morbus Crohn.

Při ošetření autoimunních onemocnění, šokových reakcí po transplantacích a AIDS se mohou sloučeniny podle předloženého vynálezu obecného vzorce I kombinovat výhodně s jinými imunosupresivně účinnými látkami, jako je cyklosporin A a FK 506 .

Předložený vynález se také týká farmaceutických preparátů, které obsahují alespoň jednu sloučeninu obecného vzorce I společně s farmaceuticky přijatelným nosičem. Sloučeniny se mohou formulovat jako roztoky ve farmaceuticky přijatelných rozpouštědlech, nebo jako emulze, suspence nebo disperse ve vhodných farmaceutických rozpouštědlech nebo nosičích, nebo jako pilulky, tablety nebo kapsle, které obsahují o sobě známé pevné nosiče. Pro topickou aplikaci se uvedené sloučeniny formulují výhodně jako krémy nebo masti nebo jako podobné, pro topické použití vhodné lékové formy. Každý takovýto preparát může obsahovat také jiné farmaceuticky přijatelné a netoxické pomocné látky, jako jsou stabilisátory, antioxidanty, pojiva, barviva, emulgátory nebo látky korigující chuť. Uvedené sloučeniny se výhodně aplikují pomocí injekcí nebo intravenosní infuze vhodných sterilních roztoků, nebo jako orální dávky přes zažívací trakt, nebo topicky ve formě krémů, mastí, toaletních vod nebo transdermálních náplastí, jak je popsáno například v EP-A-0 387 077 .

Denní dávka je v rozmezí

0,1 µg/pacient/den až 1000 µg (1 mg)/pacient/den



výhodně

1,0 µg/pacient/den až 500 µg/pacient/den.

Kromě uvedeného se předložený vynález týká také použití sloučenin obecného vzorce I pro výrobu léčiv.

Následující příklady provedení slouží pro bližší objasnění předloženého vynálezu.

#### Příklady provedení vynálezu

##### P ř í k l a d 1

1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20,26,27-trimethyl-23-oxa-vitamin D<sub>3</sub>

a) K suspensi 213 mg hydridu sodného (80% v oleji) ve 42 ml absolutního tetrahydrofuranu se přikape za chlazení ledovou vodou roztok 4,5 g 1(S)-(terc.-butyldimethylsilyloxy)-3(R)-(terc.-butyldifenylsilyloxy)-20(S)-formyl-9,10-sekopregna-5E,7E,10(19)-trienu ve 40 ml absolutního tetrahydrofuranu. Po přidavku 1,18 ml jodmethanu se reakční směs míchá po dobu 2 hodin při teplotě místnosti, potom se vlije do vody a extrahuje se ethylesterem kyseliny octové.

Surový produkt, získaný po zahuštění extraktu, se vyjme do 400 ml toluenu a po přidavku 432 mg anthracenu a 0,2 ml triethylaminu se po dobu 20 minut ozařuje v kouřové aparatuře (pyrexové sklo) vysokotlakou rtuťovou lampou (Philips HPK 125). Po zahuštění reakčního roztoku se získaný zbytek chromatografuje na silikagelu za použití směsi hexanu a ethylesteru kyseliny octové a získá se takto

2,38 g 1(S)-(terc.-butyldimethylsilyloxy)-3(R)-(terc.-butyldifenylsilyloxy)-20-formyl-20-methyl-9,10-sekopregna-5Z,7E,10(19)-trienu ve formě bezbarvé olejovité kapaliny.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  = 0,52 ppm (s, 3H, H-18); 4,23 (m, 1H, H-3); 4,46 (m, 1H, H-1); 4,85 a 5,21 (m, 1H, H-19); 6,04 a 6,11 (d,  $J=11$  Hz, 1H, H-6 a H-7); 9,66 (s, 1H, CHO) .

b) K roztoku aldehydu, získaného postupem podle odstavce a) , ve 25 ml tetrahydrofuranu a 25 ml methylalkoholu se nejprve přikape roztok 1,41 g  $\text{CeCl}_3$  (heptahydrát) ve 25 ml methylalkoholu. Po přidavku 91 mg natriumborohydridu se reakční směs míchá po dobu 90 minut při teplotě 25 °C , potom se vlije do vody a extrahuje se ethylesterem kyseliny octové. Po chromatografii na silikagelu za použití směsi hexanu a ethylesteru kyseliny octové se získá 1,86 g 1(S)-(terc.-butyldimethylsilyloxy)-3(R)-(terc.-butyldifenylsilyloxy)-20-hydroxymetyl-20-methyl-9,10-sekopregna-5Z,7E,10(19)-trienu ve formě bezbarvé olejovité kapaliny.

c) Dvoufázový systém, sestávající z 10,1 ml 25% hydroxidu sodného, 2,74 ml terc.-butylesteru kyseliny bromoctové, 1,67 g alkoholu, získaného podle odstavce b) , ve 25 ml toluenu a 48 mg tetrabutylamoniumhydrogensíranu se míchá po dobu 6 hodin při teplotě v rozmezí 50 až 60 °C. Po ochlazení se reakční směs zředí toluenem, toluenová fáze se oddělí, promyje se vodou, vysuší se pomocí bezvodého síranu sodného a zahustí se. Po chromatografii na silikagelu za použití směsi hexanu a ethylesteru kyseliny octové se získá 830 mg 1(S)-(terc.-butyldimethylsilyloxy)-3(R)-(terc.-butyldifenylsilyloxy)-20-(terc.-bu-

toxykarbonylmethoxymethyl)-20-methyl-9,10-sekopregna-5Z,7E,10(19)-trienu ve formě žlutavé olejovité kapaliny.

d) Ze 490 mg hořčíku (hoblíny) a 1,5 ml bromethanu ve 13 ml absolutního tetrahydrofuranu se obvyklým způsobem vyrobí organohořečnatá sloučenina. Po přidavku 810 mg butylesteru, získaného podle odstavce c) , se reakční směs míchá po dobu 3 hodin při teplotě místnosti. Reakční roztok se potom pro zpracování vlije do roztoku chloridu amonného a extrahuje se ethylesterem kyseliny octové.

e) Surový produkt, získaný po zahuštění extraktu z předchozího stupně, se rozpustí v 15 ml tetrahydrofuranu a po přidavku 1,3 g tetrabutylamoniumfluoridu se reakční směs míchá po dobu 2 hodin při teplotě 50 °C . Po obvyklém zpracování se chromatografuje na neutrálním oxidu hlinitém za použití směsi hexanu a ethylesteru kyseliny octové. Krystalisací hlavní frakce ze směsi diisopropyletheru a ethylesteru kyseliny octové se získá 145 g v názvu uvedené sloučeniny s teplotou tání 146 až 148 °C .

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) :  $\delta$  = 0,63 ppm (s, 3H); 0,92 (s, 3H); 1,00 (s, 3H); 3,16 (s, 2H); 3,23 (AB-q, J=9 a 7 Hz, 2H); 4,23 (m, 1H); 4,43 (m, 1H); 4,98 (m, 1H); 5,32 (m, 1H); 5,90 (d, J=11 Hz, 1H); 6,38 (d, J=11 Hz, 1H).

## P ř í k l a d 2

1(S),3(R)-dihydroxy-20-(5-hydroxy-5-methyl-hexa-1E,3E-dien-1-yl)-20-methyl-9,10-sekopregna-5Z,7E,10(19)-trien

Reakční sekvence, popsaná v PCT přihlášce WO 91/00855,

se provede se 2,12 g aldehydu, získaného podle příkladu 1a) . Po Wittigově reakci s methoxykarbonyl-trifenylfosforanem, redukcí diisobutylaluminiumhydridem, oxidací pyridiniumdichromátem, nové Wittigově olefinaci pomocí methoxykarbonyltrifenylfosforanem, reakci získaného esteru s methylithiem a odštěpení ochranných skupin pomocí tetrabutylamoniumpfluoridu se získá 600 mg v názvu uvedené sloučeniny ve formě bezbarvé olejovité kapaliny.

$[\alpha]_D^{25} -65,5^\circ$  (CDCl<sub>3</sub>, c = 0,525)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  = 0,57 ppm (s, 3H); 1,04 (s, 3H); 1,09 (s, 3H); 1,34 (s, 6H); 4,23 (m, 1H); 4,43 (m, 1H); 4,98 (m, 1H); 5,72 (d, J=15 Hz, 1H); 5,87 (d, J=10 Hz, 1H); 5,88 (dd, J=15 a 10 Hz, 1H); 6,00 (d, J=11 Hz, 1H); 6,19 (dd, J=15 a 10 Hz, 1H); 6,37 (d, J=11 Hz, 1H) .

### P ř í k l a d 3

(5Z,7E)-(1S,3R)-20-hydroxymethyl-20-methyl-9,10-seko-pregna-5,7,10(19)-trien-1,3-diol

Pomocí silyletherového štěpení alkoholu, získaného podle příkladu 1b) za podmínek podle příkladu 1e) se získá v názvu uvedená sloučenina o teplotě tání 183 až 185 °C .

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub> + DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  = 0,22 , 0,46 a 0,58 ppm (3 x s, 3H, H-18 a 20-methyl); 3,73 (m, 1H, H-3); 3,95 (m, 1H, H-1); 4,49 a 4,90 (2 x s, 1H, H-19); 5,62 a 5,87 (2 x d, J=11 Hz, 1H, H-6 a H-7) .

P ř í k l a d 4

(5Z,7E)-(1S,3R)-20-methyl-20-vinyl-9,10-seko-pregna-5,7,10  
(19)-trien-1,3-diol

Reakcí aldehydu, popsaného v příkladě 1a) , s methy-  
lentrifenyfosforanem a následujícím silyletherovým štěpením  
podle příkladu 1e) se získá v názvu uvedená sloučenina s  
teplotou tání 139 až 142 °C .

$[\alpha]_D^{23}$ , 9° (CDCl<sub>3</sub>, c = 0,255)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  = 0,57 ppm (s, 3H, H-18); 1,03 a  
1,08 (2 x s, 3H, 20-methyl); 4,22 (m, 1H, H-3); 4,43  
(m, 1H, H-1); 4,82 - 4,93 (m, 2H, vinyl-CH<sub>2</sub>); 4,99 a  
5,32 (2 x s, 1H, H-19); 5,93 - 6,05 (m, 2H, H-6 a vi-  
nyl-CH); 6,37 (d, J=11 Hz, 1H, H-7) .

P ř í k l a d 5

(5Z,7E)-(1S,3R)-20-ethyl-20-methyl-9,10-seko-pregna-5,7,10  
(19)-trien-1,3-diol

Homologisací aldehydu, získaného podle příkladu 1a)  
(například podle M.J. Caverley, Synlett 1990, 155), následu-  
jící redukcí podle příkladu 1b), převedením takto získané-  
ho alkoholu na odpovídající jodid (naříklad podle G.L.  
Langeho a C. Gottarda, Synth. Commun. 1990, 20, 1473), re-  
dukci jodidu pomocí LiAlH<sub>4</sub> v tetrahydrofuranu a následu-  
jícím silyletherovým štěpením se získá v názvu uvedená slou-  
čenina.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  = 0,64 ppm (s, 3H, H-18); 0,87 a  
0,93 (2 x s, 3H, 20-methyl); 4,23 (m, 1H, H-3); 4,42

(m, 1H, H-1); 5,01 a 5,34 (2 x s, 1H, H-19); 6,01 a 6,39 (2 x d, J=11 Hz, 1H, H-6 a H-7) .

#### P ř í k l a d 6

##### 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20-methyl-23-dehydro-vitamin D<sub>3</sub>

Homologisací aldehydu, popsaného v příkladě 1a) (například podle Synlett 1990, 155), Wittig-Hornerovou olefinací takto získaného homologního aldehydu s methylesterem kyseliny dimethylfosfonoctové (hydrid sodný, tetrahydrofuran) , reakcí takto získaného nenasyceného esteru s methylmagnesiumbromidem v tetrahydrofuranu a silyletherovým štěpením se získá v názvu uvedená sloučenina ve formě bezbarvé olejovité kapaliny.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  = 0,64 ppm (s, 3H, H-18); 0,89 a 0,95 (2 x s, 3H, 20-methyl); 1,33 (s, 6H, 25-methyl); 4,23 (m, 1H, H-3); 4,43 (m, 1H, H-1); 5,00 a 5,23 (2 x s, 1H, H-19); 5,55 - 5,72 (m, 2H, H-23 a H-24); 6,00 a 6,38 (2 x d, J=11 Hz, 1H, H-6 a H-7) .

#### P ř í k l a d 7

##### 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20-methyl-24-oxo-vitamin D<sub>3</sub>

Homologisací aldehydu, popsaného v příkladě 1a) (například podle Synlett 1990, 155), Wittig-Hornerovou olefinací takto získaného homologního aldehydu s kyselinou dimethylfosfono-ethoxyoctovou (podle W. Grella a H. Machleidta, Liebigs Ann. Chem. 699, 53, 1966) , addicí methylmagnesiumbromidu, enoletherovým štěpením (70% kyselina octová) a odstraněním silyletherových ochranných skupin se získá

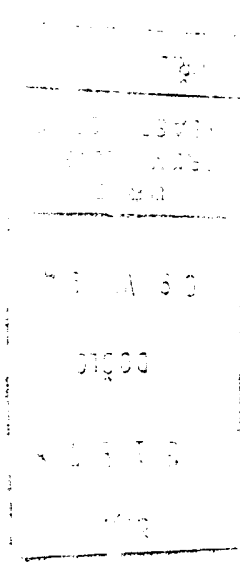
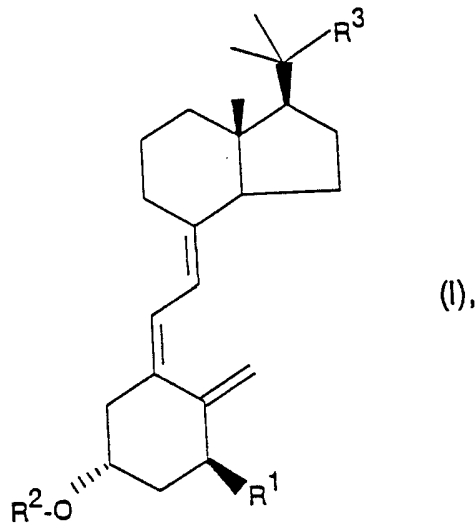
v názvu uvedená sloučenina o teplotě tání 141 - 144 °C .

$[\alpha]_D^{+14,7^\circ}$  (CDCl<sub>3</sub>, c = 0,505)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) :  $\delta$  = 0,65 ppm (s, 3H, H-18); 0,90 a 0,98 (2 x s, 3H, 20-methyl); 1,40 (s, 6H, 25-methyl); 4,23 (m, 1H, H-3); 4,44 (m, 1H, H-1); 5,00 a 5,33 (2 x s široký, 1H, H-19); 6,01 a 6,38 (2 x d, J=11 Hz, 1H, H-6 a H-7) .

P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. 20-methylsubstituované deriváty vitamínu D obecného vzorce I



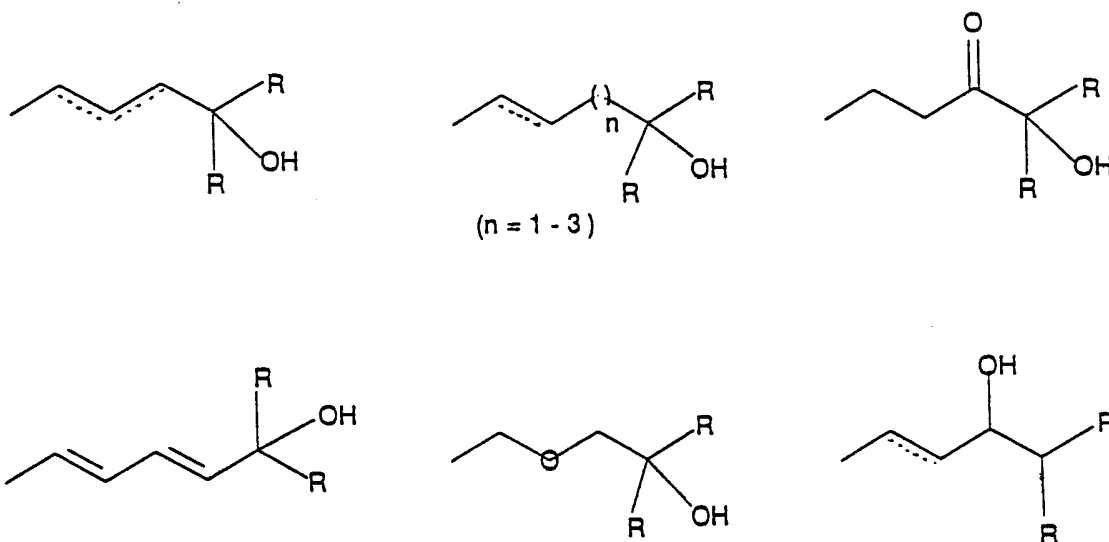
ve kterém

- R<sup>1</sup> značí vodíkový atom, hydroxylovou skupinu nebo alkanoyloxyskupinu s 1 až 12 uhlíkovými atomy, popřípadě benzoyloxyskupinu,
- R<sup>2</sup> značí vodíkový atom, alkanoyloxyskupinu s 1 až 12 uhlíkovými atomy, popřípadě benzoyloxyskupinu a
- R<sup>3</sup> značí nasycenou nebo nenasycenou, přímou nebo rozvětvenou uhlovodíkovou skupinu s až 18 uhlíkovými atomy, která je popřípadě přerušena a/nebo substituována jednou nebo několika karbocyklickými strukturami (cykloalkylové nebo cykloalkenylové zbytky se 3 až 10



uhlíkovými atomy, poslední s až dvěma dvojnými vazbami), která je popřípadě substituovaná jednou nebo několika hydroxyskupinami, oxoskupinami, aminoskupinami a/nebo jedním nebo několika atomy halogenu a která popřípadě má jeden nebo několik atomů kyslíku, síry a/nebo dusíku (jako =NH) jako můstkové členy v uhlovodíkovém zbytku.

2. Deriváty vitamínu D podle nároku 1 obecného vzorce I, ve kterém značí  $R^3$  následující zbytky



příčemž

R značí alkylovou skupinu s 1 až 4 uhlíkovými atomy, hydroxyalkylovou skupinu nebo 0-alkylovou (alkoxylovou) skupinu.

3. Deriváty vitamínu D podle nároku 1 obecného vzorce I, kterými jsou

1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20,26,27-trimethyl-23-oxa-vitamin D<sub>3</sub>,

1(S),3(R)-dihydroxy-20-(5-hydroxy-5-methyl-hexa-1E,3E-dien-

-1-yl)-20-methyl-9,10-secopregna-5Z,7E,10(19)-trien ,

1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20-methyl-vitamin D<sub>3</sub> ,

1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20-methyl-24-homo-vitamin D<sub>3</sub> ,

1 $\alpha$ ,24(S)-dihydroxy-20-methyl-vitamin D<sub>3</sub> ,

1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20-methyl-23-oxa-vitamin D<sub>3</sub> ,

1 $\alpha$ ,24(R),25-trihydroxy-20-methyl-vitamin D<sub>3</sub> ,

1 $\alpha$ ,24(S),25-trihydroxy-20-methyl-vitamin D<sub>3</sub> ,

1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20-methyl-24-oxo-vitamin D<sub>3</sub> ,

(5Z,7E)-(1S,3R)-20-methyl-20-vinyl-9,10-seko-pregna-5,7,10-(19)-trien-1,3-diol,

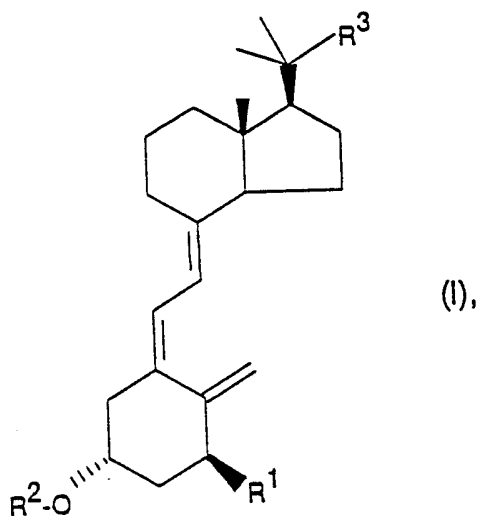
(5Z,7E)-(1S,3R)-20-ethyl-20-methyl-9,10-seko-pregna-5,7,10-(19)-trien-1,3-diol,

(5Z,7E)-(1S,3R)-20-hydroxymethyl-20-methyl-9,10-seko-pregna-5,7,10(19)-trien-1,3-diol,

1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20-methyl-23,24-dehydro-vitamin D<sub>3</sub> a

1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-20,26,27-trimethyl-23,24-dehydro-vitamin D<sub>3</sub>.

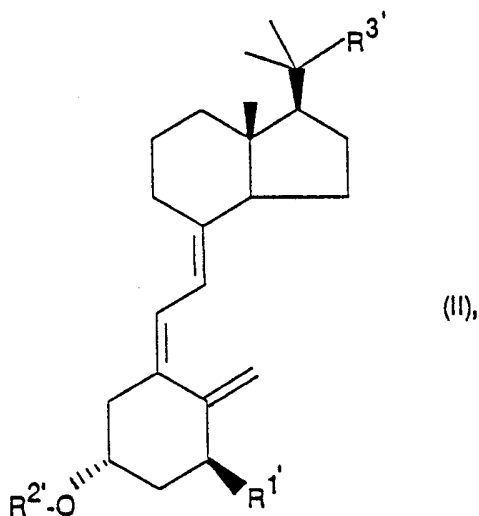
4. Způsob výroby 20-methylsubstituovaných derivátů vitamínu D obecného vzorce I ,



ve kterém

- $R^1$  značí vodíkový atom, hydroxylovou skupinu nebo alkanoyloxyskupinu s 1 až 12 uhlíkovými atomy, popřípadě benzoyloxyskupinu,
- $R^2$  značí vodíkový atom, alkanoyloxyskupinu s 1 až 12 uhlíkovými atomy, popřípadě benzoyloxyskupinu a
- $R^3$  značí nasycenou nebo nenasycenou, přímou nebo rozvětvenou uhlovodíkovou skupinu s až 18 uhlíkovými atomy, která je popřípadě přerušena a/nebo substituována jednou nebo několika karbocyklickými strukturami (cykloalkylové nebo cykloalkenylové zbytky se 3 až 10 uhlíkovými atomy, poslední s až dvěma dvojnými vazbami), která je popřípadě substituovaná jednou nebo několika hydroxyskupinami, oxoskupinami, aminoskupinami a/nebo jedním nebo několika atomy halogenu a která popřípadě má jeden nebo několik atomů kyslíku, síry a/nebo dusíku (jako =NH) jako můstkové členy v uhlovodíkovém zbytku,

v y z n a č u j í c í s e t í m , že se sloučenina obecného vzorce II



ve kterém

$R^{1'}$  značí vodíkový atom nebo chráněnou hydroxyskupinu,

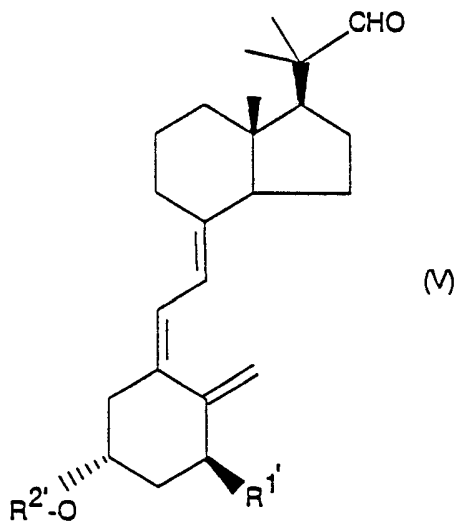
$R^{2'}$  značí ochrannou skupinu hydroxyskupiny, stabilní vůči alkáliím a

$R^{3'}$  značí totéž jako substituent  $R^3$  ve sloučenině obecného vzorce I ,

přičemž popřípadě přítomné hydroxylové skupiny jsou chráněné,

převeďte odštěpením přítomných ochranných skupin hydroxyskupin a popřípadě parciální nebo úplnou esterifikací hydroxyskupin na sloučeninu vzorce I .

5. Meziprodukt pro výrobu sloučenin vzorce I obecného vzorce V



ve kterém

$R^{1'}$  značí vodíkový atom nebo chráněnou hydroxyskupinu a

R<sup>2'</sup> značí ochrannou skupinu hydroxyskupiny, stabilní vůči alkáliím.

6. Farmaceutické preparáty,  
v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahují alespoň  
jednu sloučeninu podle nároků 1 až 3 , jakož i farmaceutic-  
ky přijatelný nosič.

7. Použití sloučenin podle nároků 1 až 3 pro výrobu  
léčiv.