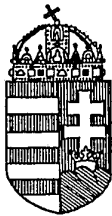


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

207 040 B

(21) A bejelentés száma: 2288/90
(22) A bejelentés napja: 1990. 02. 16.
(30) Elsőbbségi adatok:
321 254 1989. 03. 09. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 90/00952
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 90/10619

(51) Int. Cl.⁵

C 07 C 401/00

C 07 F 7/02

A 61 K 31/59

A 61 K 31/695

(40) A közzététel napja: 1991. 09. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1993. 03. 01. SZKV 93/03

(72) Feltalálók:

Deluca, Hector Floyd, Deerfield, Wisconsin (US)
Schnoes, Heinrich Konstantine,
Madison, Wisconsin (US)
Perlman, Kato Leonard, Madison, Wisconsin (US)

(73) Szabadalmas:

Wisconsin Alumni Research Foundation,
Madison, Wisconsin (US)

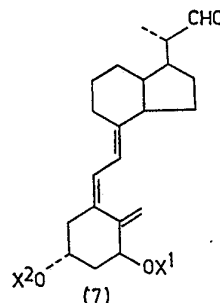
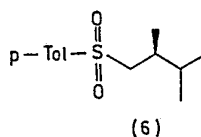
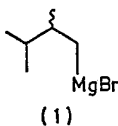
(54) **Eljárás az 1alfa-hidroxi-D₂-vitamin új epimerjének és származékainak,
valamint ezeket a vegyületeket tartalmazó gyógyászati készítményeknek
az előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az (I) általános képletű, új
D₂-vitamin-származékoknak az előállítására. Az (I)
képletben

X¹ és X² jelentése hidrogénatom, vagy tri-1-6 szén-
atomos alkil-szilil-csoport.

A találmány szerint az (I) általános képletű vegyü-



leteket úgy állítják elő, hogy egy (6) képletű vegyületet egy (7) általános képletű 1α -hidroxi-D₂-vitamin-származékkal reagáltatnak. Az új vegyületek közül legjelentősebb az 1α -hidroxi-24-epi-D₂-vitamin, amely az eddig ismert D-vitamin-származékoktól biológiai hatása alapján élesen megkülönböztethető, mivel – az eddig ismert származékoktól eltérően – jelentősen ser-

kenti a kalcium felszívódását a bélből, de nem mobilizálja a kalciumot a csontokból, és nem váltja ki rosszindulatú sejtek differenciálódását.

Az új D₂-vitamin-epimer elsősorban olyan kóros állapotok megelőzésében és kezelésében alkalmazható, ahol a kalcium bélből történő felszívódásának elősegítése kívánatos.

A találmány tárgya eljárás új D₂-vitamin-vegyületek, közelebbről az 1α -hidroxi-D₂-vitamin új (24S) epimerjének és egyes származékainak az előállítására. A találmány az ezen vegyületeket hatóanyagként tartalmazó gyógyászati készítmények előállítására is vonatkozik.

A természetes D-vitaminból származó hormon, az $1\alpha,25$ -dihidroxi-D₃-vitamin, valamint annak 25-dezoxi-analógja, az 1α -hidroxi-D₃-vitamin in vivo igen erős hatást fejtenek ki: hatásosan serkentik a kalcium bélből történő felszívódását és a kalcium mobilizálódását a csontból, valamint hatásosan előmozdítják a csontkalcifikálódását. Igen hasonló hatásprofilot mutat az $1\alpha,25$ -dihidroxi-D₂-vitamin (3 880 894 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), valamint annak 25-dezoxi-analógja, az 1α -hidroxi-D₂-vitamin (3 907 843 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás). Ezek a vegyületek a D-vitaminok teljes hatásspektrumával rendelkeznek, és mind emberen, mind állaton kiváltják a megfelelő fiziológiai válaszokat, így a bélben végbemenő kalcium-transzportot, a csont ásványi anyagainak mobilizálását, valamint a csontkalcifikálódását. Szerkezeti szempontból jellemző az $1\alpha,25$ -dihidroxi-D₂-vitaminra és az 1α -hidroxi-D₂-vitaminra, hogy 24-es helyzetű szénatomok sztereokémiája megegyezik az ergoszterin oldalláncában fennálló sztereokémiai viszonyokkal, tehát e vegyületek szerkezetét az (A) általános képlet ábrázolja, amelyben R az (a), illetve (b) képletű oldalláncot jelenti.

Újabban előállították és vizsgálták az $1\alpha,25$ -dihidroxi-D₂-vitamin C-24 epimerjét (lásd a 4 588 716 és 769 181 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat). E vegyületet szintén az (A) általános képlet ábrázolja, ha abban R jelentése a (c) képletű oldallánc csoport. Figyelemre méltó, hogy a D-vitamin C-24 epimerjének biológiai hatásprofilja élesen különbözik a D-vitaminszármazékok hatásprofiljától, amennyiben hatásosan serkenti a kalcium bélből történő felszívódását, és elősegíti a csontkalcifikálódását, azonban nem váltja ki a kalcium mobilizálását a csontból.

A jelen találmány tárgya eljárás egy új D-vitamin-analóg, közelebbről az 1α -hidroxi-24-epi-D₂-vitamin, valamint alkil-szilil-származékainak, azaz az (I) általános képletű vegyületeknek az előállítására, ahol az (I) képletben X¹ és X² jelentése hidrogénatom, vagy tri-1-6 szénatomos alkil-szilil-csoport. Az (I) általános képletű vegyületek csoportjába tartozó 1α -hidroxi-24-epi-D₂-vitamin szerkezetét a (10) képlet ábrázolja.

A (10) képletű vegyület az ismert 1α -hidroxi-D₂-vitamintól abban különbözik, hogy C-24 helyzetű metilcsoportjának sztereokémiája ellenkező értelmű [azaz (24S) konfigurációjú]; a különbség élesen eltérő biológiai

hatásprofiljában is fennáll, amint ez az alábbiakból kitűnik.

Az 1α -hidroxi-24-epi-D₂-vitamin szintézise megkívánja a megfelelő 24-es helyzetű szénatomos (S) sztereokémiájú oldallánc létesítését, és ennek az oldallánc egységnek a megfelelő 1α -hidroxilezett D-vitaminszármazékkal végbemenő kondenzációját, aminek útján a kívánt végtermék létrehozható.

Az optikailag aktív oldallánc szintézise úgy történik, hogy a kereskedelmi forgalomból beszerezhető, racém 2,3-dimetil-butanolt a megfelelő bromidvegyülettel alakítjuk, és ez utóbbiból ismert módszerrel készítjük az (1) képletű magnézium-bromid-származékot [T. Suda és munkatársai: J. Am. Chem. Soc. 82, 3396 (1960); Martinez és munkatársai: Gazz. Chim. Ital. 97, 96 (1967); valamint Organic Synthesis, Coll. Vol. 2, 358. old., Wiley & Sons, NY (1943)].

Az A) reakcióvázlat értelmében az (1) magnézium-bromid-származékot a (2) képletű (R)-(+)-p-toluolszulfonsav(-)-mentil-észterrel a Grignard-reakció körülményei között reagáltatjuk. E reakció kulcslépés, mert a (3) és (4) képletű diasztereomer szulfoxidok keverékéhez vezet, amelyek oszlopkromatográfiával vagy túlnyomásos (nagyteljesítményű) folyadékkromatográfiával (rövidítve: HPLC eljárással) könnyen elkülöníthetők, s így a (3) képletű (2R)- és a (4) képletű (2S)-sztereoisomerhez jutunk.

Ezt követően a (3) és (4) képletű p-tolil-(2,3-dimetil-butil)-szulfoxidokat oxidálva a megfelelő, optikailag aktív szulfonokat kapjuk. Amint az A) reakcióvázlatból kitűnik, a (3) képletű szulfoxid klór-perbenzoesavas oxidációja (2R)-(2,3-dimetil-butil)-p-tolil-szulfoxidhoz vezet [(5) képletű vegyület], míg a (4) képletű szulfoxid hasonló oxidációjával a (6) képletű (2S)-(2,3-dimetil-butil)-p-tolil-szulfoxid keletkezik.

A fentebb leírt reakciósor új és hatékony módszert jelent optikailag aktív oldallánc-egységek előállítására szulfonil-származékaik alakjában. Ez utóbbiak ismert eljárásokkal számos olyan sztereoid vagy D-vitamin oldalláncának kialakítására alkalmazhatók, amelyek a 24-es szénatomon királis centrumot tartalmaznak. A fentebb említett (5) és (6) toлил-szulfoxidok új vegyületek; a megfelelő, enantiomer fenil-szulfoxidokat régebben hosszadalmas és munkaigényes szintézisekkel állították elő [Mori és munkatársai: Tetrahedron Letters 38, 2099 (1982); Sakakibara és munkatársai: Heterocycles 17, 301 (1982); Ferraboschi és Santaniello: Synth Commun. 14, 1199 (1984); Kocienski és munkatársai: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 834 (1978)].

A célzott 1α -hidroxi-24-epi-D₂-vitamin analóg előállítására az A) reakcióvázlatban bemutatott eljárás-

sal kapott (2S)-(2,3-dimetil-butil)-p-tolil-szulfon, azaz a (6) képletű vegyület a megfelelő oldallánc-egység. Ennek megfelelően – amint ezt a B) reakcióválat illusztrálja – a (6) képletű vegyületet az ismert (7) általános képletű 1 α -hidroxi-D-vitamin-22-aldehid-származékkal reagáltatjuk, ahol a (7) képletben X¹ és X² jelentése hidroxil-védőcsoport, például valamilyen alkil-szilil-csoport, így például terc-butil-dimetil-szilil-csoport. E célra Kutner és munkatársai általános módszerét alkalmazzuk [J. Org. Chem. 53, 3450 (1988)]. E kondenzációs reakció útján a (8) képletű oldallánc-adtuktumot kapjuk, ahol a (8) képletben X¹ és X² hidroxil-védőcsoportot jelent. A (8) képletű vegyületet fém-amalgámmal redukálva jutunk a (9) általános képletű 24-epi-D₂-vitamin-származékhoz, ahol X¹ és X² hidroxil-védőcsoportot jelent. A hidroxil-védőcsoportokat ismert standard módszerrel eltávolítva kapjuk a kívánt 1 α -hidroxi-24-epi-D₂-vitamint, amelynek (10) képletében X¹ és X² jelentése hidrogénatom.

A fentiekből látható, hogy a találmány szerinti eljárással mind a (10) képletű, szabad hidroxilcsoportokat tartalmazó vegyülethez – ahol X¹ és X² jelentése hidrogénatom –, mind a (9) képletű, hidroxil-védőcsoportot tartalmazó származékokhoz – ahol X¹ és X² jelentése alkil-szilil-csoport – eljuthatunk. A (10) képletű termék alkil-szilil-származékai olyan esetekben alkalmazhatók, ahol fokozott lipid-oldékonyság igénye áll fenn.

Mind a leírásban, mind az igénypontokban az „alkil-szilil” kifejezés olyan trialkil-szilil-csoportot jelent, ahol valamilyen alkilcsoport 1–5 szénatomos, és bármely izomer alakjában jelen lehet; ilyen például a trimetil-szilil-, trietil-szilil- és a terc-butil-dimetil-szilil-csoport.

A találmány szerinti eljárást az alábbi, nem korlátozó jellegű kiviteli példákban részletesen ismertetjük. E példákban az előállított termékeket vagy közbelső termékeket a fenti ismertetésnek megfelelően arab számokkal (például 1, 2, 3) jelöljük.

1. példa

(2R)-(2,3-Dimetil-butil)-p-tolil-szulfoxid [(3) képletű vegyület] és (2S)-(2,3-dimetil-butil)-p-tolil-szulfoxid [(4) képletű vegyület] előállítása

0,24 g (10 mmól) magnéziumforgácsot és egy jódkristályt száraz lombikba helyezünk, 5,0 ml vízmentes tetrahidrofuránnal fedjük, és lassan, keverés közben nitrogénatmoszférában hűtéssel 1,54 g (8 mmól) 1-bróm-2,3-dimetil-butánt adagolunk hozzá lassú ütemben. Ezután a reakcióelegyet szobahőmérsékleten 90 percig keverjük, amíg a magnézium legnagyobb része fel nem oldódik. Ekkor az (1) képletű vegyületet tartalmazó keveréket lehűtjük, és 10,0 ml vízmentes tetrahidrofuránban oldott 2,35 g (R-(+)-p-toluol-szulfinsav(-)-mentil-észtert [(2) képletű vegyületet] adunk hozzá. Az elegyet nitrogéngáz alatt szobahőmérsékleten 16 órán át keverjük, majd lehűtjük, és telített ammónium-klorid oldattal elbontjuk. A szerves réteg elkülönítése után a vizes a vizes fázist éterrel többször extraháljuk, majd az egyesített szerves fázist előbb vízzel, utána konyhasóoldattal mos-

suk, vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és bepároljuk. A maradékot 70–270 mesh finomságú szilikagéllal töltött oszlopon kromatográfiával 1,27 g elegyet kapunk, amely a diasztereomer szulfoxidokból áll. E keveréket „flash” kromatográfiával választjuk el, amelyet 230–400 mesh finomságú szilikagéllal készült oszlopon végzünk, és az eluáláshoz 25% etil-acetátot tartalmazó hexán és 40% etil-acetátot tartalmazó hexán keveréket használjuk. Az elválasztást szemipreparatív HPLC eljárással is végezhetjük (ehhez 9,4x25 cm méretű Zorbax oszlopot alkalmazunk), az eluálást itt is 40% etil-acetát hexánal képzett elegyeivel végezzük. Az elsőként eluált vegyület a (3) képletű (S)-(-)-p-tolil-(2R)-(2,3-dimetil-butil)-szulfoxid [α]_D²⁰ = -444,8° (c = 4 kloroformban); a másodikként eluált vegyület a (4) képletű (S)-(-)-p-tolil-(2S)-(2,3-dimetil-butil)-szulfoxid, [α]_D²⁰ = -153,5° (c = 4 kloroformban).

Tömegszínkép (m/z viszonylagos intenzitás): (M⁺, 6), 208 (14), 140 (100), 139 (8), 124 (30), 92 (22), 91 (21), 44 (10), 43 (71), 28 (34), 27 (25);

¹H-NMR színkép (CDCl₃, δ ppm): 0,80 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,89 (3H, d, J = 7,0 Hz), 0,98 (3H, d, J = 6,5 Hz), 1,6–1,82 (2H, m), 2,42 (3H, s, CH₃-Ar), 2,71 (2H, m), 7,34 (2H, d, J = 15 Hz), (H-aril-orto), 7,54 (2H, d, J = 15 Hz, H-aril-orto).

2. példa

(2S)-(2,3-Dimetil-butil)-p-tolil-szulfon [(6) képletű vegyület] előállítása

51 mg (0,2 mmól) (4) képletű (2S)-(2,3-dimetil-butil)-p-tolil-szulfoxid 1,0 ml vízmentes diklórmetánnal készült oldatához keverés közben 60 mg (0,3 mmól) 80–85%-os 3-klór-peroxi-benzoésavat adunk. A reakcióelegyet 2 órán át keverjük, majd 10%-os nátrium-hidrogén-karbonát oldattal elbontjuk. Diklór-metán hozzáadása után az egyesített szerves kivonatot vizes nátrium-szulfid oldattal, majd konyhasóoldattal mossuk, és vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk. Az oldószert vákuumban lepároljuk, és a visszamaradó nyers szulfont szilikagéllal „flash” kromatográfiának vetjük alá. Eluálószerként az 1. példa szerinti etil-acetát keverékeket használjuk, s így a (6) képletű szulfont szintelen olaj alakjában kapjuk. E terméket analitikai célra HPLC módszerrel tisztítjuk (ehhez 9,4x24 cm méretű Zorbax-Sil oszlopot alkalmazunk), az eluálásra 10% etil-acetátot tartalmazó hexánt használunk. Így 42 mg tiszta (6) képletű (2S)-szulfont kapunk, [α]_D²⁰ = +17° (c = 3,5 kloroformban). Tömegszínkép (m/z viszonylagos intenzitás): 240 (M⁺, 3), 197 (5), 157 (100), 92 (19), 91 (27), 85 (25), 84 (31), 43 (72);

¹H-NMR színkép (δ ppm): 0,77 (3H, d, J = 7 Hz), 0,82 (3H, d, J = 7,0 Hz), 1,00 (3H, d, J = 7,0 Hz), 1,66–1,98 (2H, m), 2,45 (3H, s, CH₃-aril), 2,86 (1H, dd, J = 8, 11 Hz), 3,06 (1H, dd, J = 4, 12 Hz), 7,35 (2H, d, J = 7,0 Hz), (H-aril-orto), 7,75 (2H, d, J = 8, H-aril-orto).

3. példa

(2R)-(2,3-Dimetil-butil)-p-tolil-szulfon [(5) képletű vegyület] előállítása

A cím szerinti szulfont a (3) képletű szulfoxid

oxidációjával állítjuk elő a 2. példában leírt kísérleti módszerrel. Az így kapott (5) képletű (2R)-szulfon optikai forgatóképessége $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ ($c = 1,4$ kloroformban).

4. példa

1 α -Hidroxi-24-epi-D₂-vitamin [(10) képletű vegyület] előállítás

30 mg (125 μ mol) (6) képletű (2S)-(2,3-dimetil-butil)-p-tolil-szulfon és – indikátorként 1,10-fenantrolint tartalmazó – 300 μ l vízmentes tetrahydrofurán oldathoz argongáz alatt -78°C hőmérsékleten előbb 18 μ l (130 μ mol) diizopropil-amint, majd 86 μ l (130 μ mol) 1,50 mólos hexános n-butil-lítium-oldatot adunk, utána az elegyet 15 percig -78°C hőmérsékleten keverjük (színe sötétbarna), majd 4 mg (7 μ mol) védett aldehid [(7) képletű vegyület, ahol X¹ és X² terc-butil-dimetil-szilil-csoportot jelent] 0,3 ml vízmentes tetrahydrofuránnal készült oldatát adjuk hozzá, és argongáz alatt -78°C -on 1 órán át keverjük. Ekkor a reakcióelegyet 1 ml telített ammónium-kloriddal elbontjuk, 0°C -ra hagyjuk melegedni, etil-acetáttal extraháljuk, és a szerves fázist telített konyhasóoldattal mossuk. A szerves fázist magnézium-szulfáton szárítjuk, szűrjük, és bepároljuk. A maradékot etil-acetátban oldjuk, Sep Pak oszlopon vezetjük át, majd bepároljuk. A maradékot HPLC segítségével tisztítjuk (ehhez 9,4 \times 25 cm méretű Zorbax Sil oszlopot alkalmazunk), eluálószerként 10% etil-acetátot tartalmazó hexánt használunk. Így 3,3 mg (58%) hozammal kapjuk a (8) képletű hidroxi-szulfont, amelyben X¹ és X² egyaránt terc-butil-dimetil-szilil-csoportot jelent.

Tömegszínkép (m/z) viszonylagos intenzitás): 8,2 (M⁺, 20), 680 (34), 440 (52), 248 (64), 157 (65), 75 (100).

1,0 ml telített metanolos nátrium-hidrogén-foszfát oldatot adunk 3,3 mg (8) képletű szulfon 1,0 ml vízmentes tetrahydrofuránnal készült oldatához, majd az elegyhez 160 mg porított, vízmentes nátrium-hidrogén-foszfátot adagolunk keverés közben. Ezt követően az elegyet argongáz alatt 15 percig keverjük, majd 0°C -ra hűtjük, és körülbelül 400 mg frissen készített 5%-os nátrium-amalgámot adunk hozzá. A reakcióelegyet 20 órán át 5°C -on keverjük, majd 5 ml hexánt adunk hozzá, és a hexános réteget dekantáljuk. A szilárd terméket 3 \times 5 ml, 10% etil-acetátot tartalmazó hexánnal extraháljuk, az egyesített szerves fázist telített konyhasóoldattal mossuk, Sep Pak tölteten szűrjük, és bepároljuk. A végső tisztítást HPLC segítségével érjük el (ezt 9,4 \times 25 cm méretű oszlopon Zorbax Sil adsorbensen végezzük), az eluáláshoz 10% etil-acetátot tartalmazó hexánt használunk, s így 1,05 mg (40%) hozammal kapjuk a (9) képletű D₂-vitamin-származékot, ahol a (9) képletben X¹ és X² egyaránt terc-butil-dimetil-szilil-csoportot jelent.

(Melléktermékként 0,47 mg 22-hidroxilezett származékot is kapunk). Tömegszínkép (m/z viszonylagos intenzitás): 640 (M⁺, 24) 508 (65), 248 (67), 147 (13), 73 (100), 69 (58).

¹H-NMR színkép (δ ppm): 0,54 (3H, s, 18-CH₃), 4,19

(1H, m, 3-H), 4,35 (1H, m, 1-H), 4,86 (1H, s, 19H), 5,17 (3H, m, 19E-H és 22-23-H-S), 6,00 (1H, d, J = 9,6 Hz, 7-H), 6,23 (1H, d, J = 8,8 Hz, 6-H).

800 μ g (9) képletű, hidroxilcsoporton védett diolt

5 0,5 ml vízmentes tetrahydrofuránban oldunk, és 90 μ l 1 mólos tetrahydrofurános tetrabutil-ammónium-fluorid oldatot adunk hozzá, majd az elegyet argongáz alatt 1 órán át 55°C hőmérsékleten keverjük. Ezután az elegyet lehűtjük, 5 ml étert adunk hozzá, a szerves fázist telített konyhasóoldattal mossuk, vízmentes magnézium-szulfáton szárítjuk, bepároljuk. A maradékot 20% izopropanolt tartalmazó hexánban oldjuk, és Sep Pak-on szűrjük. A tisztítás preparatív HPLC eljárással végezzük (ehhez 9,4 mm \times 25 cm méretű Zorbax Sil oszlopot alkalmazunk), az eluálást 20% izopropanolt tartalmazó hexánnal végezzük. Így 308 μ g hozammal kapjuk a cím szerinti 1 α -hidroxi-24-epi-D₂-vitamint. E termék színképi jellemzői az alábbiak:

UV (etanolban) λ_{max} : 264 nm, λ_{min} : 228 nm;

20 Tömegszínkép (m/z viszonylagos intenzitás): 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);

25 ¹H-NMR színkép (CDCl₃, δ ppm): 0,49 (3-H, s, 18-CH₃), 0,77 (3-H, d, J = 7,1 26 vagy 27-CH₃), 0,85 (3H, d, J = 6,8, 28-CH₃), 0,94 (3H, d, J = 6,5, 21-CH₃), 4,94 (1H, s, 19Z-H), 5,13 (2H, m, 22 és 23 H) (5,11, 5,13, 5,14), 5,26 (1H, s, 19E-H), 5,99 (1H, d, J = 11,2 Hz, 7-H), 6,35 (1H, d, J = 11,2 Hz, 6-H), 4,21 (1H, m, 3-H), 4,41 (1H, m, 1-H).

30 Az így kapott 1 α -hidroxi-24-epi-D₂-vitamin az előzőleg ismert 1 α -hidroxi-D₂-vitamintól fordított fázisú HPLC eljárással különböztethető meg (ehhez 4,6 mm \times 25 mm méretű ODS-Zorbax oszlopot és 15% vizet tartalmazó acetonitrilt alkalmazunk). Ebben a rendszerben előbb az 1 α -hidroxi-24-epi-D₂-vitamint, majd másodikként az ismert 1 α -hidroxi-D₂-vitamint eluáljuk.

Az 1 α -hidroxi-24-epi-D₂-vitamin biológiai hatása

40 Az új analógot D-vitamin-hiányos patkányokon vizsgáltuk. A tesztek arra utaltak, hogy az 1 α -hidroxi-24-epi-D₂-vitamin biológiai hatásspektruma határozottan különbözik az ismert 1 α -hidroxi-D₂-vitamin hatásprofiljától. E vizsgálataink reprezentatív eredményeit az alábbi 1. táblázatban foglaltuk össze. Vizsgáltuk az új analóg hatását a kalcium bélben végbemenő transzportjára (az úgynevezett „S/M arányt”), valamint a csontok ásványi anyagának a mobilizálódását, ami a szérumban kalciumkoncentrációjában (kalciumtükrében) mutatkozik meg. E meghatározásainkat standard eljárásokkal végeztük (lásd például a 4588 176 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást). E kísérleteink során a patkányokat úgy tettük D-vitamin-hiányossá, hogy D-vitamintól mentes, csekély mennyiségű kalciumot (0,02% Ca, 0,37% P) tartalmazó étrenden tartottuk az állatokat három és fél héten át. Az állatoknak a vizsgálandó vegyületeket (vagy a -D kontrollcsoport esetében csak a vivőanyagot) 20 órával az állatok leölése előtt adagoltuk.

Az 1. táblázat adataiból kitűnik, hogy az új analóg, az 1α -hidroxi-24-epi- D_2 -vitamin igen erősen serkenti (stimulálja) a bélben végbemenő kalcium-transzportot, és hatása lényegében egyenértékű az ismert 1α -hidroxi- D_2 -vitamin aktivitásával. Ezzel ellentétben az új vegyület nem fejt ki hatást a kalciumnak csontból történő mobilizálására. Így tehát ez az új vegyület – jóllehet szerkezetileg közeli rokonságban áll az ismert 1α -hidroxi- D_2 -vitaminnal – figyelemre méltóan különböző hatásprofilal rendelkezik. Mivel az új analóg serkenti a kalcium felszívódását, de nem befolyásolja a kalciumnak csontból történő felszabadulását, igen alkalmas terápiás hatóanyag olyan fiziológiai állapotok megelőzésére vagy kezelésére, amelyekre a csonttömegvesztés jellemző.

1. táblázat

Az 1α -Hidroxi- D_2 -vitamin és az 1α -Hidroxi-24-epi- D_2 -vitamin hatása a bélben végbemenő kalcium-transzportra és a kalcium csontból történő felszabadulására

Hatóanyag	Mennyiség pmól	Ca-transzport S/M-arány	Felszabadulás a csontból: szérum-Ca, mg%
-D (kontroll)	0	2,5±0,35	3,7±0,20
1α -Hidroxi-24-epi- D_2 -vitamin	325 650	4,3±0,42 ^a 4,4±0,70 ^a	3,9±0,39 ^b 4,1±0,23 ^b
1α -Hidroxi- D_2 -vitamin	325	5,4±0,37 ^a	5,3±0,15 ^a

^a Szignifikáns különbség a megfelelő kontrolcsoportokkal összehasonlítva, $p < 0,001$.

^b A kontrolcsoporttal összehasonlítva nincsen szignifikáns különbség.

Az 1. táblázatban összefoglalt eredmények – a vér kalcium-koncentrációjának vonatkozásában – azt mutatják, hogy az új 1α -hidroxi-24-epi- D_2 -vitamin biológiai hatásspektruma az ismert $1\alpha,25$ -dihidroxi-24-epi- D_2 -vitamin hatásprofiljához hasonló; további tesztek azonban azt mutatják, hogy az új vegyületek aktivitása az ismert 24-epi- D_2 -származékétól nagyon lényegesen különbözik, amennyiben az utóbbi képes kiváltani rosszindulatú sejtek differenciálódását normális monocita-makrofágokká. A differenciálódásra kifejtett hatást emberi leukémiasejteken (HL-60 sejteken) mértük két standard módszerrel: egyrészt a nitrokek-tetraazolum redukcióval (rövidítve: NBT-redukcióval), másrészt a fagocitózis vizsgálatával. A 2. táblázatban összehasonlítottuk az új vegyületek hatását az $1\alpha,25$ -dihidroxi- D_3 -vitamin – amely igen hatásos differenciálószer –, valamint az $1\alpha,25$ -dihidroxi-24-epi- D_2 -vitamin hatásával.

E vizsgálatokat Ostrem és munkatársai eljárásával [J. Biol. Chem. 262, 14164 (1987)], valamint DeLuca és munkatársai módszerével (4717721 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás) végeztük. A 2.

táblázatban feltüntetett eredményeink azt mutatják, hogy a standardként alkalmazott $1\alpha,25$ -dihidroxi- D_3 -vitamin – amint ez várható volt – jelentős differenciáló hatást fejt ki a HL-60 sejtekre; még 10^{-8} M koncentrációban is megközelítőleg 64–67%-os differenciálódást vált ki a négynapos kísérleti időszakban (mind az NBT-redukció, mind a fagocitózis mérése alapján). Az $1\alpha,25$ -dihidroxi-24-epi- D_2 -vitamin – valamint kevésbé aktív (körülbelül ötször kevésbé hatásos, mint a standardként alkalmazott $1\alpha,25$ -dihidroxi- D_3 -vitamin), azonban még így is igen hatásos ebben a rendszerben, így például 5×10^{-8} M koncentrációban differenciáló hatása 60%-nál nagyobb, és 10^{-7} M koncentrációban 80%-os differenciálódást vált ki. Ezzel ellentétben az 1α -hidroxi-24-epi- D_2 -vitamin csak kevésbé vagy egyáltalán nem hat a sejtek differenciálódására legjobb esetben, 10^{-7} M koncentrációban 16–20%-os differenciáló hatást figyeltünk meg, és $1-2 \times 10^{-8}$ M koncentráció esetén – amelyben az $1\alpha,25$ -dihidroxi-24-epi- D_2 -vitamin 40–50%-os differenciáló hatást mutat, az új analóg szignifikáns differenciálódási választ nem vált ki. Így az 1α -hidroxi-24-epi- D_2 -vitamin alig, vagy egyáltalán semmiféle hatást sem fejt ki promielociták monocitákká differenciálódásának az előmozdításában. Ezek az eredmények éles biológiai különbségre utalnak a jelen találmány szerinti vegyület és az ismert $1\alpha,25$ -dihidroxi-24-epi- D_2 -vitamin között.

2. táblázat

Az 1α -hidroxi-24-epi- D_2 -vitamin HL-60 sejtek differenciálódására kifejtett hatása

Hatóanyag	Koncentráció	Differenciáló hatás %	
		NBT-redukció alapján	Fagocitózis alapján
$1\alpha, 25$ -Dihidroxi- D_3 -vitamin	1×10^{-7}	87±2	89±3
	1×10^{-8}	64±2	67±3
$1\alpha, 25$ -Dihidroxi-24-epi- D_2 -vitamin	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 -Hidroxi-24-epi- D_2 -vitamin	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

Fenti vizsgálataink azt mutatják, hogy az új vegyület, azaz az 1α -hidroxi-24-epi- D_2 -vitamin élesen megkülönböztethető, különleges hatásspektrumokkal rendelkezik: igen erősen serkenti a kalcium-transzportot (a kalcium felszívódását), nem befolyásolja a kalcium csontból történő mobilizálódását (felszabadulását), és csak kevésbé vagy egyáltalán nem hat a sejtek differenciálódására. Mindezek alapján a technika jelenlegi állása szerinti ismert vegyületektől világosan megkülönböztethető.

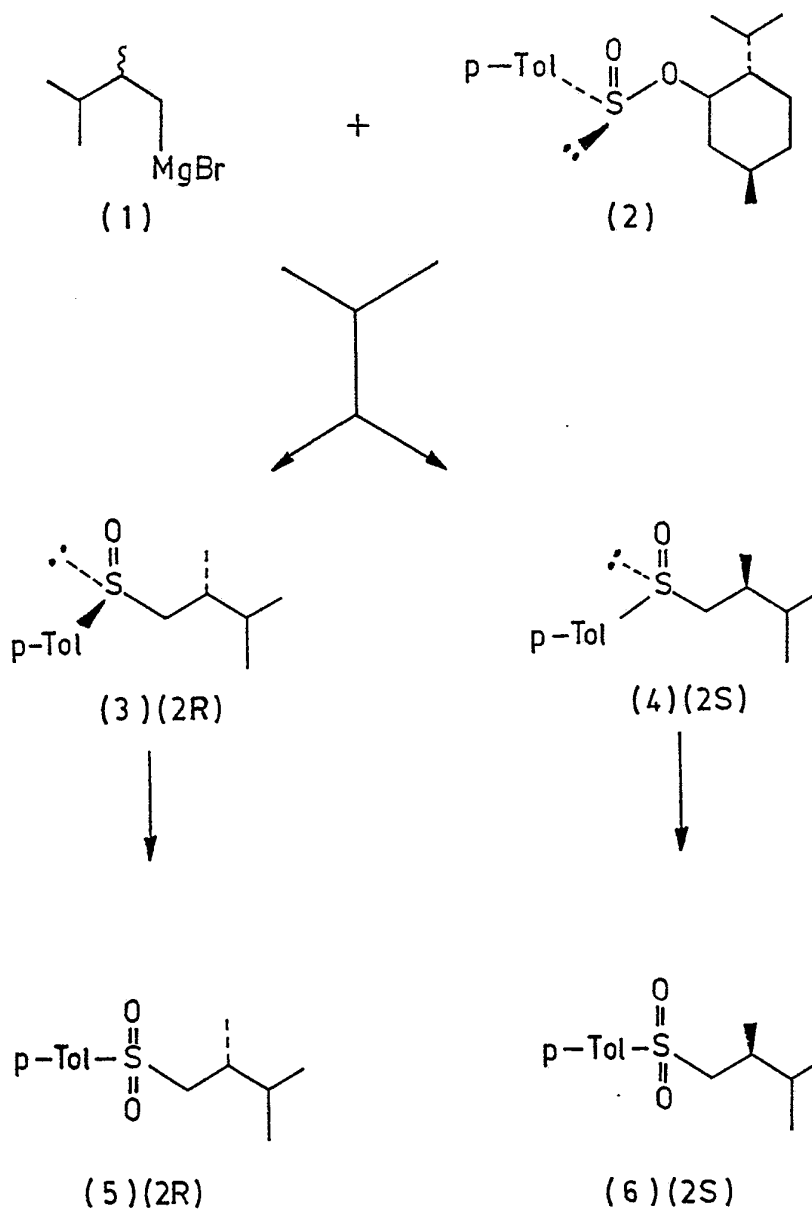
A találmány szerinti új vegyület a hasznos terápiás szerek tárának értékes bővülését jelenti: előnyösen alkalmazható olyan esetekben, ahol a kalcium bélből való felszívódásának stimulálása kívánatos, például olyan betegségekben, mint a csontképzési zavarok vagy a csonttritkulás, amelyekre a csonttömegvesztés jellemző.

Adagolás céljára a találmány szerinti vegyületet ismert módon ártalmatlan oldószerekkel oldattá, vagy alkalmas oldószerekkel vagy vivőanyagokkal emulzióvá, szuszpenzióvá vagy diszperzióvá alakíthatjuk; vagy például szilárd vivőanyagokkal pirulákká, tablettákká vagy kapszulákká alakíthatjuk. A találmány szerinti vegyületet előnyösen befecskendezéssel, vagy megfelelő steril oldatok intravénás infúziójával, vagy az emésztőcsatornán át folyékony vagy szilárd gyógyszerformában adagolhatjuk. Kezelés céljára naponta 1 µg-tól 50 µg-ig terjedő mennyiségben adagolhatjuk az 1α-hidroxi-24-epi-D₂-vitamint; az adagot a kezelésre szoruló kóros állapotnak és a beteg válaszának megfelelően kell beállítani, amint ez a területen jártas szakember számára nyilvánvaló. Mivel az új vegyület hatása specifikus, előnyösen önmagában adagoljuk olyan kóros állapotokban, ahol csupán a kalciumtranszport (kalcium-felszívódás) serkentése kívánatos; vagy egy másik hatásos D-vitamin-vegyülettel – például 1α-hidroxi-D₂-vitaminnal, 1α-hidroxi-D₃-vitaminnal vagy 1α,25-dihidroxi-D₃-vitaminnal – együtt alkalmazhatjuk olyan kóros állapotokban, ahol bizonyos mértékű csont-kalcium felszabadulása a kalcium felszívódásának előmozdításával együttesen előnyös.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az (I) általános képletű vegyületek előállítására – ahol az (I) képletben
- 5 X¹ és X² jelentése hidrogénatom, tri-1–6 szénatomos alkil-szilil-csoport, *azzal jellemezve*, hogy egy (6) képletű vegyületet egy (7) általános képletű 1α-hidroxi-D-vitamin-22-aldehid-származékkal – ahol X¹ és X² jelentése a tárgyi körben
- 10 megadottakkal azonos – reagáltatunk és a kapott (8) általános képletű vegyületet fém-amalgámmal redukáljuk, majd kívánt esetben a tri-alkil-szilil-csoportot eltávolítjuk.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás az (I) általános képletű vegyületek csoportjába tartozó (10) képletű
- 15 vegyület előállítására – ahol az (I) képletben X¹ és X² jelentése hidrogénatom –, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiinduló anyagokat alkalmazzuk.
3. Eljárás a kalcium bélből való felszívódását
- 20 (bélrezorpcióját) elősegítő hatású gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként valamely, az 1. igénypont szerint előállított (I) általános képletű vegyületet – ahol az (I) képletben X¹ és X² jelentése az 1. igénypontban meghatározott – a gyógyszergyártásban
- 25 szokásos hordozó-, vivő- és segédanyagokkal összekeverjük és gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.
- A 3. igénypont szerinti eljárás, hatóanyagként a 2. igénypont szerint előállított (10) képletű vegyületet –
- 30 amelynek (I) képletében X¹ és X² jelentése hidrogénatom – alkalmazzuk.

A) reakcióvázlat



B) reakcióvázlat

