



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本 (11) 證書號數：TW I374894B1

(45) 公告日：中華民國 101 (2012) 年 10 月 21 日

(21) 申請案號：097151540 (22) 申請日：中華民國 97 (2008) 年 12 月 31 日

(51) Int. Cl. : C07K5/12 (2006.01) C07K1/02 (2006.01)

(71) 申請人：中化合成生技股份有限公司 (中華民國) (TW)

新北市樹林區東興街 1 號

(72) 發明人：李光宗 (TW)；董彥士 (TW)；方顥伶 (TW)

(74) 代理人：黃世興

(56) 參考文獻：

TW 515805B

WO 2007/057141A1

WO 2008/048627A1

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：1 共 0 頁

(54) 名稱

高轉化率之含氮雜環六肽之製備方法

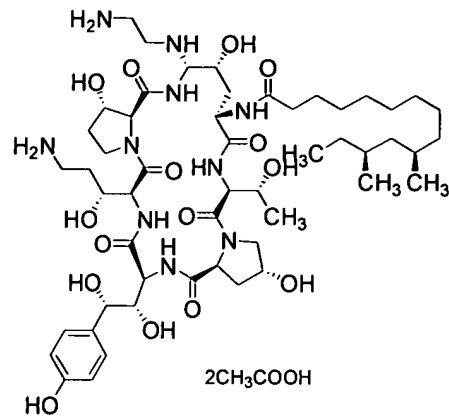
(57) 摘要

本發明係有關於高轉化率之含氮雜環六肽化合物之製備方法。在製備方法方面，第一步驟是以肺炎念珠菌素 B0(II)(pneumocandin B0)為起始物與三聚氰氯(cyanuric chloride)進行反應，將起始物中的一級的醯胺基(amide group)脫水成氰基(nitrile group)之化合物(V)，其轉化率高於 97%。步驟二係將化合物(V)在 10%鈀碳催化劑之催化下進行氫化反應，會將含氰基化合物(V)還原成一級胺化合物(III)，其轉化率也高於 97%。在第三步驟製備中間體(VI)，更以低毒、運送便利及低臭味之對甲苯磺酸進行製造含有亞硫酸甲酯之中間體(VI)。本發明方法具另一特色，即是製程中只需在最後一步驟以反相中壓液相管柱進行純化，處理簡便。

六、發明說明：

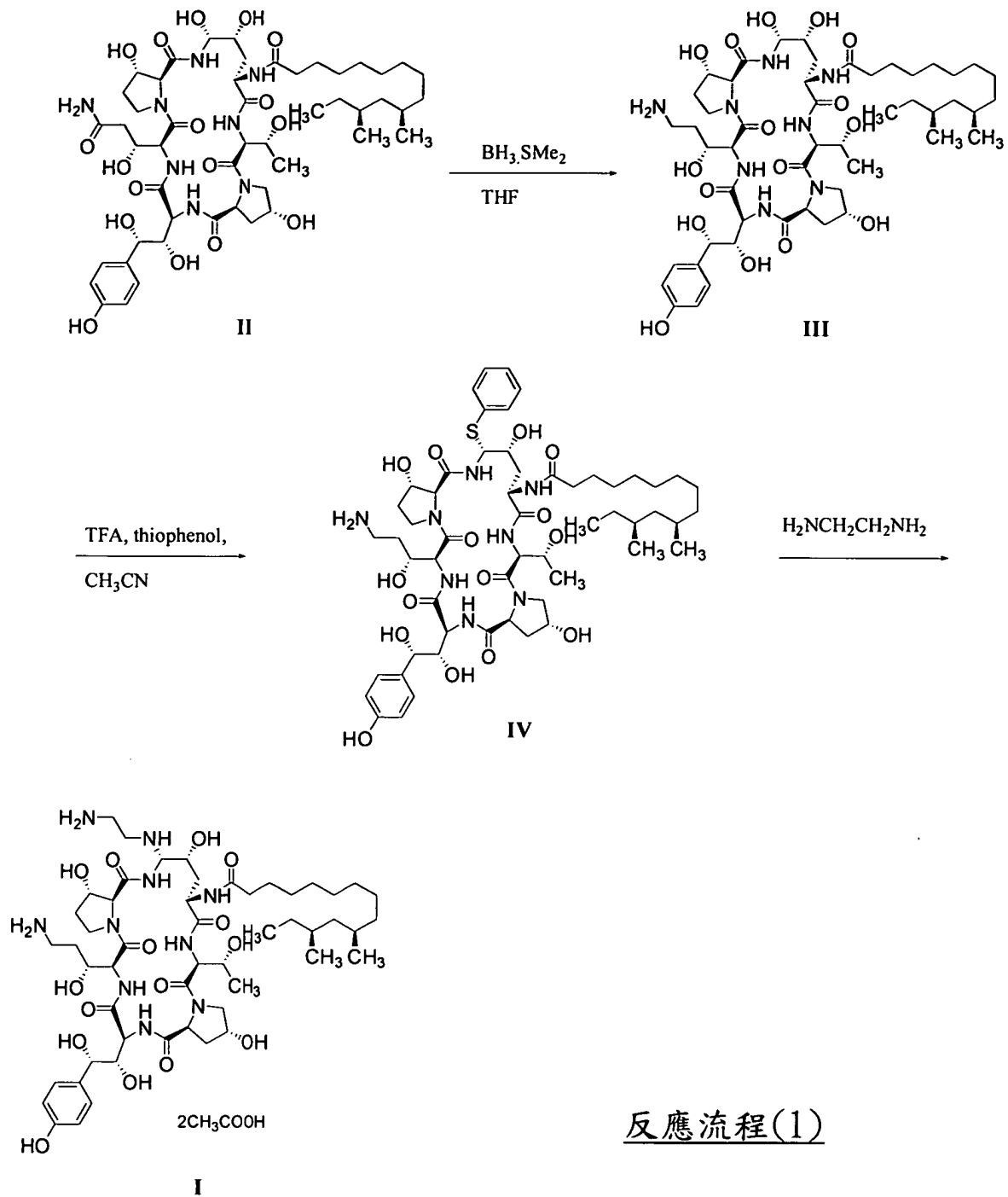
【發明所屬之技術領域】

本發明係有關一種製備結構式(化合物 I)如下式(I)所示之含氮雜環六肽的新方法：



I

【先前技術】

反應流程(1)

在美國專利 5378804、5552521、5936062 與 7214768 中，皆發表含氮環六肽是一種能抑制真菌細胞壁中 $\beta(1,3)\text{-D}$ -葡聚糖的合成之化合物。其中美國專利 5378804 發表含氮雜環六肽化合物 I(醋酸卡泊芬淨，Caspofungin acetate)製造方法係一立體選擇

性差之五個步驟的合成方法。而在美國專利 5552521 中發表含氮雜環六肽化合物 I(醋酸卡泊芬淨, Caspofungin acetate)製造方法,如反應流程(1)所示,步驟一起始物肺炎念珠菌素 B0 (II)與甲硼烷之複合物於四氫呋喃(THF)溶劑下,將一級的醯胺基還原成胺基化合物 III,但只有 47%的轉化率,而美國專利 5936062 中的報導其含苯硼酸之此醯胺基還原成胺基,也只有 61%的轉化率。在此步驟除了終止反應較激烈外,同時,也因為較低的轉化率,其未反應之近 50%的肺炎念珠菌素 B0 (II),若繼續進行反應會造成接下來之步驟之粗產物的純度,甚至純化工作的困難度,所以必須在此步驟進行一次反相中壓液相管柱純化,將未反應之起始物進行分離。

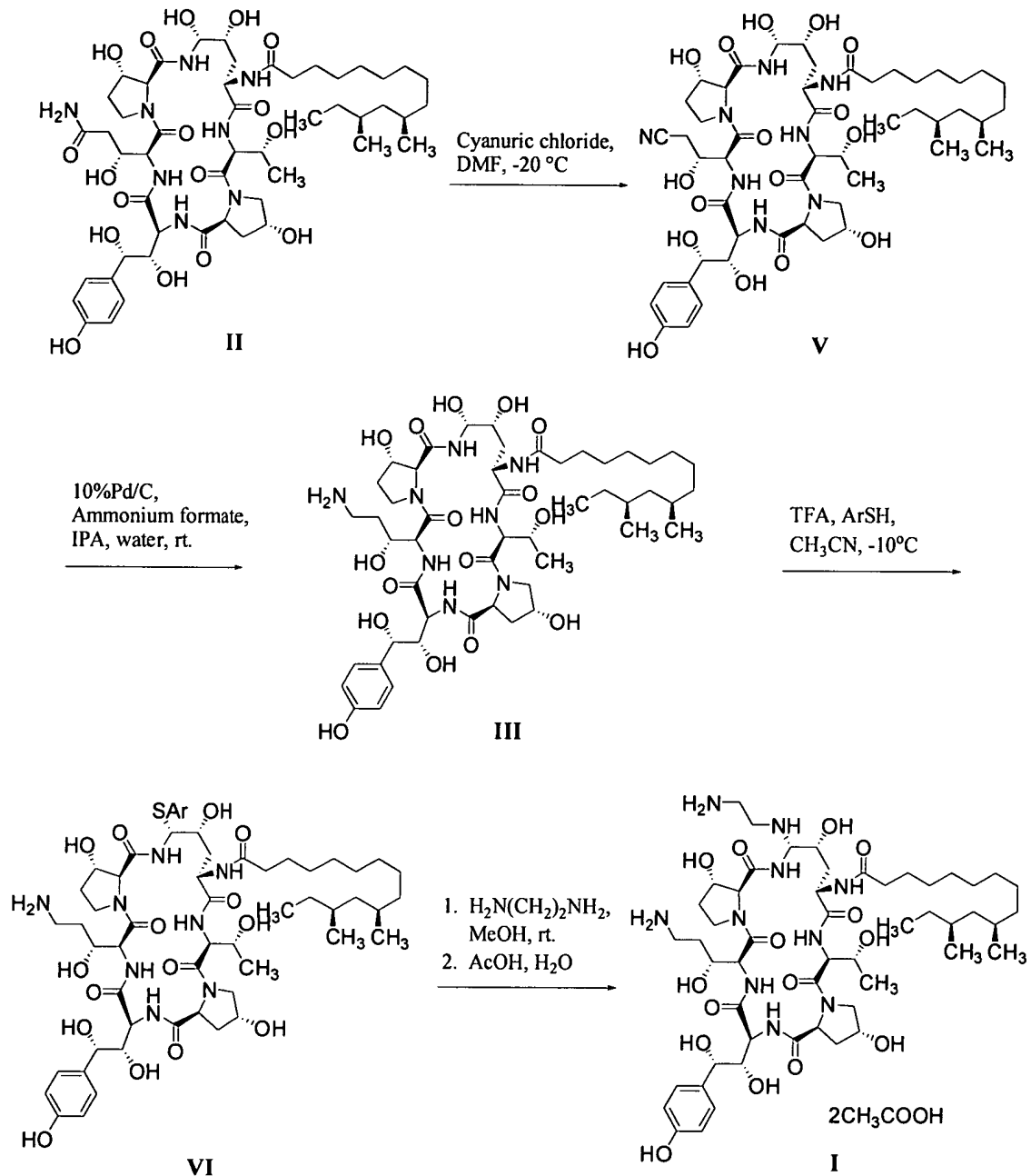
第二步驟係化合物 III 與苯硫酚在乙腈和三氟乙酸下進行製造含有亞硫酸甲酯之中間體 IV。苯硫酚的當量數會影響產物的量,而此步驟能產生 71%的產率,但苯硫酚(thiophenol)是屬於海運的化學品,除了是劇毒性物質且有惡臭氣味,如反應流程(1)所示。而美國專利 7214768 中的報導其硫化物試劑,除了上述之苯硫酚之外,尚有常見之苄硫醇(benzylthiol)和 4-甲氧基苯硫酚(4-methoxybenzenethiol)等硫化物,其中苄硫醇亦屬於劇毒性物質且有惡臭氣味,而 4-甲氧基苯硫酚雖屬低毒性物質,但價格昂貴、運輸不便和有惡臭氣味。

最後係以 1,2-二氨基乙烷與化合物 IV 進行苯硫基的置換,如

上述流程(1)所示。

【發明內容】

本發明之反應式流程係如下所示：



反應流程(2)

本發明係一關於高轉化率之含氮雜環六肽化合物 I(醋酸卡泊

芬淨)之製備方法，製備過程中適切的以低毒及低臭味之利於工業生產的對甲苯硫酚進行製造含有亞硫酸甲酯之中間體 VI，以及製程中只需在最終產物以反相中壓高效液相管柱進行純化，如反應流程(2)所示。

步驟一係以起始物肺炎念珠菌素 B0 (II)於二甲基甲醯胺(DMF)，控制反應溫度降在零下 20°C，加入三聚氰氯(cyanuric chloride)試劑，進行選擇性的脫水反應，所使用之溶劑為二甲基甲醯胺(DMF)、甲基吡咯烷酮(1-methyl-2-pyrrolidone; NMP)等，係將反應物中之一級的醯胺基轉變成氰基的化合物 V，反應進行中以高效能液相層析(HPLC)分析，直到起始物剩下 3%以下，再將反應終止，其轉化率大於 97%。在此利用產物不溶解於水的特性，產物會加水後析出，再經由簡單過濾，並以適當的水洗滌白色固體之化合物 V，產率為 69%。

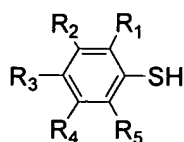
步驟二係化合物 V 在金屬試劑之催化下進行氫化還原反應，金屬試劑如鈀碳試劑(Pd/C)和銻/氧化鋁(Rh-Al₂O₃)，而氫化還原中之氫氣來源可為鋼瓶氫氣或甲酸銨(ammonium formate)所產生之氫氣。因此令化合物 V 於室溫下與異丙醇、水、冰醋酸和甲酸銨(ammonium formate)在 10% 鈀碳催化劑之催化下進行還原反應，會將含氰基化合物 V 還原成一級胺化合物 III，反應以高效能液相層析(HPLC)分析，其轉化率大於 97%。接著以活性白土輔助過濾，除去鈀碳催化劑和其他鹽類，濾液加水將反應之溶液稀釋，

裝入含反相碳-18 的固定相過濾器，利用甲醇沖提，收集產物，並使用旋轉濃縮儀濃縮，乾燥後即可得產物化合物 III，產率為 70%。

相較於先前技術[如反應流程(1)所示]，其步驟一除了終止反應較激烈外，也因只有 50%的轉化率，所以必須在此步驟進行一次反相中壓高效液相色譜分析方法進行純化，否則其未反應之進 50%的肺炎念珠菌素 B0(II)，若繼續進行反應會增加純化工作的困難度。而在本發明因連續兩步驟之高轉化率，同時反應處理亦相當簡便，所以不需在此過程進行純化工作。

先前技術之第二步驟係化合物 III 與苯硫酚在乙腈和三氟乙酸下進行製造含有亞硫酸甲酯之中間體 IV[如流程圖(1)所示]。其中苯硫酚是屬於海運的化學品，除了是屬於劇毒性物質外，而且有濃濃的惡臭氣味。而美國專利 7214768 中的報導其硫化物試劑，也報導苄硫醇 (benzylthiol) 和 4-甲氧基苯硫酚 (4-methoxybenzenethiol) 等硫化物，其中苄硫醇亦屬於劇毒性物質且有惡臭氣味，另外 4-甲氧基苯硫酚雖屬低毒性物質，但價格昂貴、運輸不便又有惡臭氣味。

本發明步驟三係令化合物 III 在適宜的溶劑中與硫醇反應製得化合物 VI。本合成方法之硫醇試劑(ArSH)可為如下式所示：



其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 係分別選自氫(hydrogen)、烷基、甲氧基或鹵素取代基，例如包括：對甲苯硫酚(*p*-toluenethiol)、苯硫酚(thiophenol)、鄰甲苯硫酚(*o*-toluenethiol)、間甲苯硫酚(*m*-toluenethiol)、苄硫醇(benzylthiol)、4-甲氧基苯硫酚(4-methoxybenzenethiol)、對溴苯硫酚(4-Bromobenzenethiol)、對氟苯硫酚(4-Fluorobenzenethiol)、對氯苯硫酚(4-Chlorobenzenethiol)、對異丙基苯硫酚(4-Isopropylbenzenethiol)、4-第三丁基苯硫酚(4-*tert*-Butylbenzenethiol)、2,5-二甲基苯硫酚(2,5-Dimethylbenzenethiol)、2,4-二甲基苯硫酚(2,4-Dimethyl benzenethiol)、3,4-二甲基苯硫酚(3,4-Dimethylbenzenethiol)、3-乙氧基苯硫酚(3-Ethoxythiophenol)、2,4,6-三甲基苯硫酚(2,4,6-Trimethylbenzene-1-thiol)等硫醇，其中步驟三係以對甲苯硫酚較適切，因甲苯硫酚為固體，價錢便宜，又可空運之化學品，同時低毒性及低臭味的物質，相當符合工業上大量生產之要件。所以此步驟係以化合物 III 與對甲苯硫酚在乙腈和三氟乙酸之試劑，於零下 8°C 至零下 10°C 下進行製造含有亞硫酸甲酯之中間體 VI (Ar 為對甲苯)，反應以高效能液相層析(HPLC)分析，其轉化率大於 97%。接著加水將反應之溶液稀釋，裝入含反相碳-18 的固定相過濾，利用甲醇沖提，收集產物，使用旋轉濃縮儀濃縮，乾燥後即可得化合物 VI (Ar 為對甲苯)，產率為 71%[如反應流程(2)所示]。

步驟四係以1,2-二氨基乙烷之試劑，在有溶劑或無溶劑存在下與化合物VI(Ar為對甲苯)進行對甲苯硫基的置換反應，在終止反應後，加水將反應之溶液稀釋，裝入含反相碳-18的固定相之過濾器，利用甲醇沖提，收集產物，使用旋轉濃縮儀濃縮，乾燥後即可得化合物I之粗產物[如流程(2)所示]。上述置換反應所使用之適切溶劑包括：甲醇、乙醇、異丙醇、四氫呋喃、二氯甲烷、乙腈、二甲基甲醯胺、三氟乙醇及水。

本方法於製程的每一步驟均有著相當高的轉化率，同時終止反應後的處理也相當的簡便，所以只需要在最後一步驟以反相中壓高效液相色譜分析方法進行純化，其方法是Lichroprep RP-18矽膠之製備級液相層析法，在紫外線偵檢器波長210nm的監控下，以沖提溶液為乙腈：0.15%醋酸水溶液為(1：4)進行純化，再經由冷凍乾燥法製得白色固體為雙醋酸鹽化合物I(醋酸卡泊芬淨)，以高效能液相層析分析純度98.57%，產率為40%[如流程(2)所示]。化合物I之結構鑑定部份，在氫核磁共振光譜與文獻報導(*J. Org. Chem.* 2007, 72, 2335-2343.)上所附錄之光譜圖比對，完全吻合，所以確定得到化合物I(醋酸卡泊芬淨)，氫核磁共振光譜如附圖所示。

【實施方式】

本發明可由以下諸實施例說明其製程，但本發明之範圍並非侷限在以下所述之實施例：

實施例 1

化合物II (肺炎念珠菌素B0) (2.0克, 1.78毫莫耳) 置於圓底瓶中, 於氮氣下加入二甲基甲醯胺(DMF) (30毫升), 然後將反應溫度降至-20°C, 加入三聚氰氯 (cyanuric chloride) (1.68克, 9.11毫莫耳), 待加完後持續攪拌, 反應進行中以HPLC分析, 待起始物剩下 < 3%, 逐滴加入水(50毫升)並超過10分鐘, 在使反應緩慢的回到室溫23°C, 再將反應之溶液加到正攪拌中的水浴(400毫升), 並攪拌約2小時, 接著過濾、並以水洗滌固體, 乾燥後即可得白色固體之化合物V (1.73克, 產率為69%)。

實施例 2

化合物 V (1.5 克, 1.0 毫莫耳) 置於圓底瓶中, 室溫 23°C 下依序加入異丙醇/水 (8/2) (150 毫升)、冰醋酸(1.95 毫升)、10% 鈦碳催化劑 (1.5 克, 1.4 毫莫耳) 和甲酸銨 (12 克, 190 毫莫耳), 反應進行中以 HPLC 分析, 待沒有起始物之吸收, 以活性白土輔助過濾, 將反應之溶液加水稀釋至 500 毫升, 裝入含 Licrhoprep RP-18 矽膠之過濾器, 再使用水沖提, 最後使用甲醇沖提, 即可利用旋轉濃縮儀濃縮, 乾燥後即可得白色固體之化合物 III (1.46 克, 產率為 70%)。

實施例 3

化合物 III (1.28 克, 0.66 毫莫耳) 置於反應瓶中, 於氮氣加入無水乙腈(40 毫升)並攪拌, 直到反應溫度冷切至 < -5°C 下, 加入

對甲苯硫酚 (786 毫克, 6.33 毫莫耳), 接著滴加入三氟乙酸(5.4 毫升, 72.7 毫莫耳)和乙腈(10 毫升)之溶液並超過 20 分鐘, 反應溫度保持在 $-8^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$ 下, 反應進行中以 HPLC 分析, 待起始物完全反應完, 逐滴加入水(50 毫升)並超過 10 分鐘, 在使反應緩慢的回到室溫, 將反應之溶液加水稀釋, 加入含 Licrhoprep RP-18 矽膠之過濾器, 使用 25%乙腈水溶液沖提, 最後使用甲醇: 乙腈(1:1)沖提, 利用旋轉濃縮儀濃縮, 乾燥後即可得淡黃色固體之化合物 VI (Ar 為對甲苯) (1.101 克, 產率為 71%)。

實施例 4

對苯基硫化物三氟甲磺酸鹽 VI (Ar 為對甲苯) (1.05 克, 0.44 毫莫耳) 置於反應瓶中, 於氮氣加入無水甲醇 (8 毫升) 並攪拌之, 冰浴下直到反應溫度冷切至 $< 4^{\circ}\text{C}$ 下, 接著滴加入 1,2-二氨基乙烷 (5 毫升, 120 毫莫耳)和無水甲醇(4 毫升)之溶液(超過 30 分鐘), 待滴加結束後使反應回至室溫, 反應進行中以 HPLC 分析, 待起始物完全反應完, 於冰浴下逐滴加入 60%醋酸水溶液(10 毫升)並超過 30 分鐘, 再以醋酸調 pH 值至 5.6, 然後加入正己烷(50 毫升)以萃取水層, 正己烷層再以水(100 毫升)萃取水層。收集所萃取水層後, 加水稀釋, 再裝入含 Licrhoprep RP-18 矽膠之過濾器, 使用水沖提後, 最後使用甲醇: 乙腈(1:1)沖提, 利用旋轉濃縮儀濃縮, 乾燥後即可得淡黃色固體。然後以直徑 26 釐米 Licrhoprep RP-18 矽膠 (80.2 克)之製備級液相層析法純化, 沖提溶液為乙腈: 0.15%醋酸

水溶液為(1:4)進行純化。最後經由冷凍乾燥法得白色固體為雙醋酸鹽化合物I(醋酸卡泊芬淨)(196毫克，純度為98.57%，產率為40%)。氫核磁共振光譜如附圖所示。

本發明可製得高轉化率之含氮雜環六肽，且純化處理簡便，製造過程既安全又環保，而優異於進步於諸先前技術。

【圖式簡單說明】

化合物 I 之氫核磁共振光譜圖。

【主要元件符號說明】

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 97151560

C07K 5/12 (2006.01)

※申請日： 97-12-31

※IPC 分類：

C07K 1/02 (2006.01)

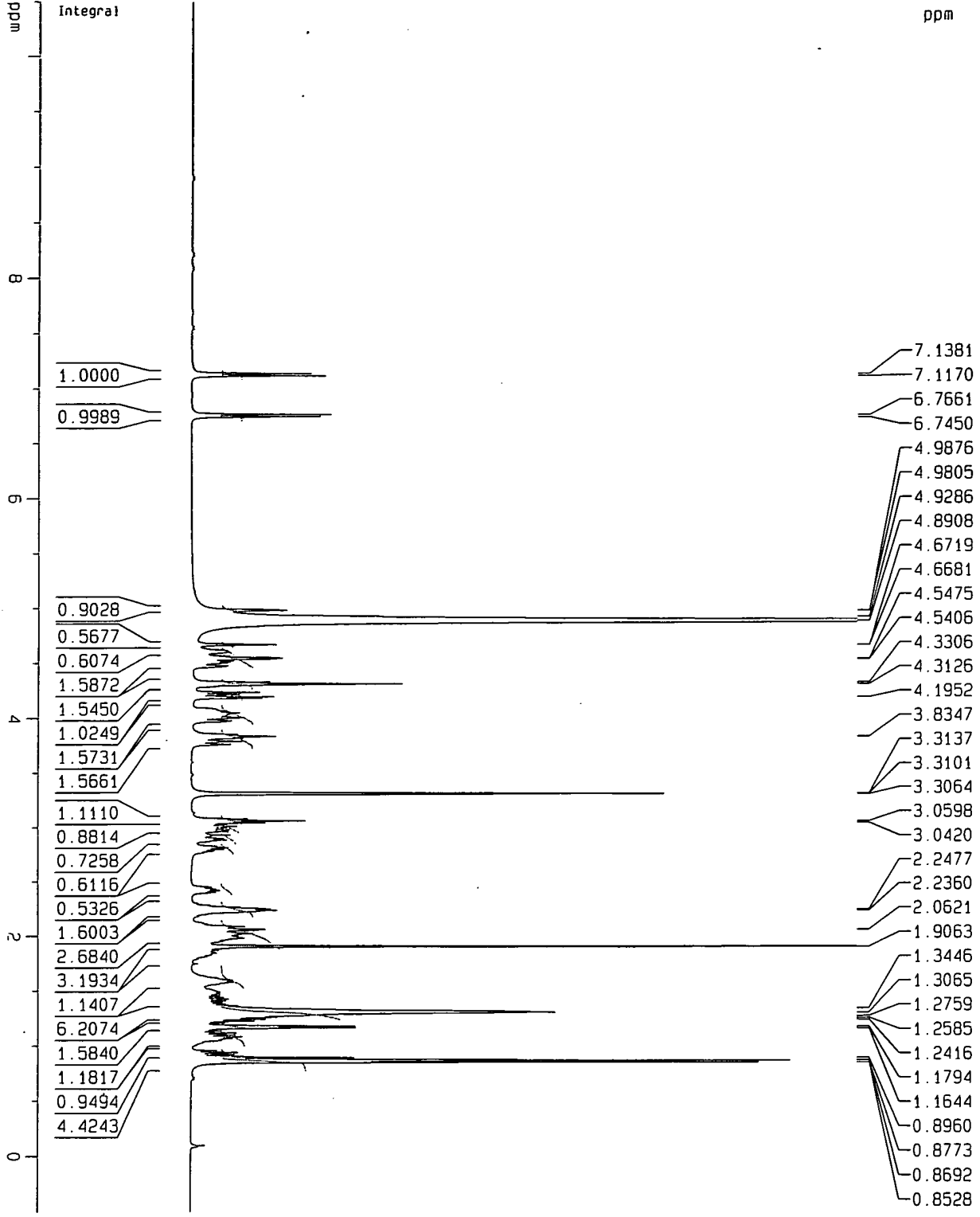
一、發明名稱：高轉化率之含氮雜環六肽之製備方法

二、中文發明摘要：

本發明係有關於高轉化率之含氮雜環六肽化合物之製備方法。在製備方法方面，第一步驟是以肺炎念珠菌素 B0 (II) (pneumocandin B0) 為起始物與三聚氰氯(cyanuric chloride) 進行反應，將起始物中的一級的醯胺基(amide group) 脫水成氰基(nitrile group) 之化合物(V)，其轉化率高於 97%。步驟二係將化合物(V) 在 10% 鈀碳催化劑之催化下進行氫化反應，會將含氰基化合物(V) 還原成一級胺化合物(III)，其轉化率也高於 97%。在第三步驟製備中間體(VI)，更以低毒、運送便利及低臭味之對甲苯硫酚進行製造含有亞硫酸甲酯之中間體(VI)。本發明方法具另一特色，即是製程中只需在最後一步驟以反相中壓液相管柱進行純化，處理簡便。

三、英文發明摘要：

八、圖式：



Current Data Parameters
 NAME 20081224-1
 EXPNO 6
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20081224
 Time 16.19
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBO BB-1H
 PULPROG zg30
 ID 16384
 SOLVENT CDCl3
 NS 64
 DS 0
 SWH 5995.204 Hz
 FIDRES 0.365918 Hz
 AQ 1.3664756 sec
 RG 101.6
 DW 83.400 usec
 DE 6.50 usec
 TE 297.7 K
 D1 1.50000000 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCMRK 0.01500000 sec

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 10.00 usec
 PL1 0.00 dB
 SF01 400.1326008 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 400.1300070 MHz
 WDM EM
 SSB 0
 LB 0.10 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 CY 40.00 cm
 F1P 10.500 ppm
 F1 4201.37 Hz
 F2P -0.500 ppm
 F2 -200.06 Hz
 PPMCM 0.55000 ppm/cm
 HZCM 220.07150 Hz/cm

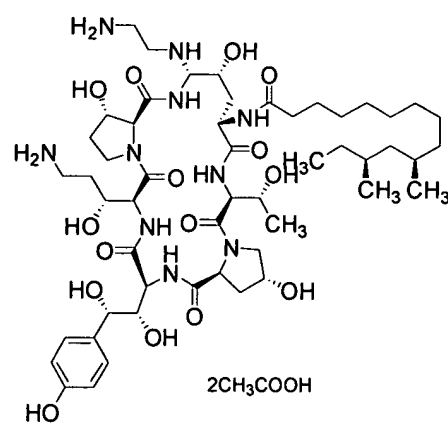
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(無)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

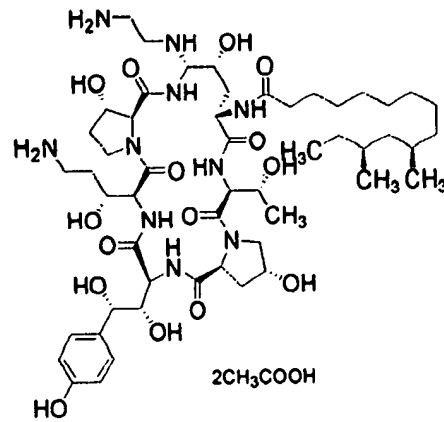
無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



七、申請專利範圍：

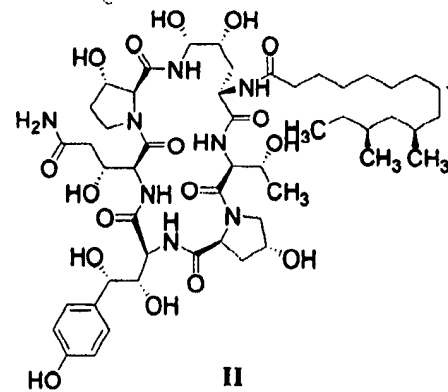
1. 一種製備結構式如下式(式 I)所示之含氮雜環六肽之方法：



10年8月22日修正本

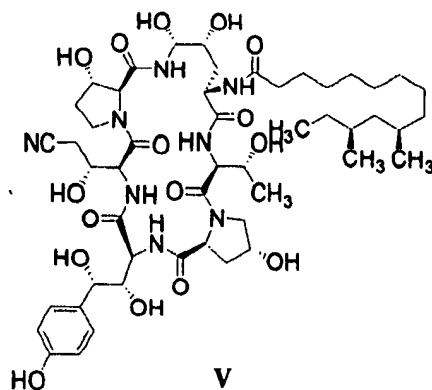
係包括下列步驟：

a. 令如下(II)之肺炎念珠菌素 B0

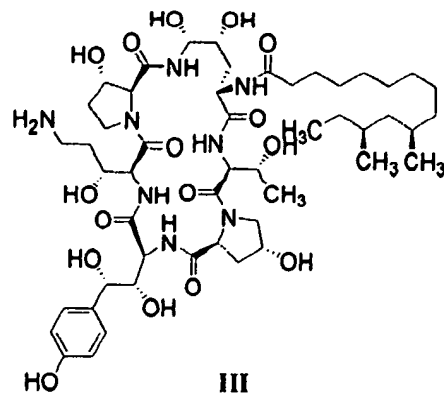


，以三聚氰氣為試劑，並於二甲基甲醯胺或甲基吡咯烷酮之溶劑存在下，進行選擇性脫水反應得到如下式(V)之氰基

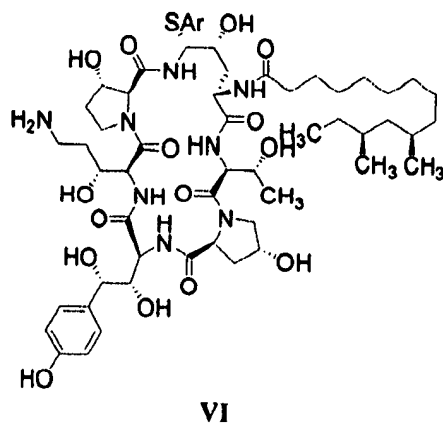
化合物



- b. 令該化合物 V 在選自鈀碳試劑及銻/氧化鋁之金屬催化劑下進行氫化反應得到如下式(III)之胺化合物



- c. 令該化合物 III 在適宜的溶劑中與芳香硫醇(ArSH)反應得到如下式(VI)之中間體化合物



；以及

- d. 以 1,2-二氯基乙烷置換該化合物 VI 上的硫基製得化合物 I。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，該化合物 V 在金屬催化劑下進行氫化反應所使用之氫氣係來自：鋼瓶氫氣或甲酸銨(ammonium formate)所產生的氫氣。
3. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該芳香硫醇係選自包括：對甲苯硫酚(*p*-toluenethiol)、苯硫酚(thiophenol)、鄰甲苯硫

酚 (*o*-toluenethiol)、間甲苯硫酚 (*m*-toluenethiol)、苄硫醇 (benzylthiol)、4-甲氧基苯硫酚 (4-methoxybenzenethiol)、對溴苯硫酚 (4-Bromobenzenethiol)、對氟苯硫酚 (4-Fluorobenzenethiol)、對氯苯硫酚 (4-Chlorobenzenethiol)、對異丙基苯硫酚 (4-Isopropyl benzenethiol)、4-三級丁基苯硫酚 (4-*tert*-Butylbenzenethiol)、2,5-二甲基苯硫酚 (2,5-Dimethylbenzenethiol)、2,4-二甲基苯硫酚 (2,4-Dimethylbenzenethiol)、3,4-二甲基苯硫酚 (3,4-Dimethylbenzenethiol)、3-乙氧基苯硫酚 (3-Ethoxythiophenol)、2,4,6-三甲基苯硫酚 (2,4,6-Trimethylbenzene-1-thiol) 硫醇。

4. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，該化合物 III 與芳香硫醇反應之適切溶劑為乙腈。
5. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 1,2-二氨基乙烷與化合物 VI，係在適切溶劑下或於無溶劑存在下進行置換反應以製得化合物 I。
6. 根據申請專利範圍第 5 項之方法，其中該適切溶劑係選自：甲醇、乙醇、異丙醇、四氫呋喃、二氯甲烷、乙腈、二甲基甲醯胺、三氟乙醇及水。