

發明專利說明書

公告本

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96112717

C12P 33/02 12000000

※申請日期：96年04月11日

※IPC分類：

C12P 33/06 12000000

一、發明名稱：

(中) 分別對類固醇施以對映異構選擇性還原和氧化之方法

(英) Process for the enantioselective reduction and oxidation,
respectively, of steroids

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓 名：(中) I E P 有限公司
(英) IEP GMBH代表人：(中) 1. 安特杰 古塔
(英) 1. GUPTA, ANTJE地 址：(中) 德國維斯巴登雷高街一九〇——一九六號
(英) 190-196 Rheingastrasse, D-65203 Wiesbaden, Germany

國籍：(中英) 德國 GERMANY

三、發明人：(共 3 人)

1. 姓 名：(中) 安特杰 古塔
(英) GUPTA, ANTJE國 籍：(中) 德國
(英) GERMANY2. 姓 名：(中) 安克 茲赫安爾
(英) TSCHENTSCHER, ANKE國 籍：(中) 德國
(英) GERMANY3. 姓 名：(中) 瑪麗亞 包克法
(英) BOBKOVA, MARIA國 籍：(中) 俄羅斯
(英) RUSSIA

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 奧地利 ; 2006/04/11 ; A627/2006 ☒ 有主張優先權

(1)

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種對映異構選擇性酶催化還原包含類固醇結構（ABCD）的化合物之方法，該類固醇結構（ABCD）包括一或數個雜原子、一或數個雙鍵及/或一個芳香系組份（位在環結構內）且具有至少一個合氧基（位在類固醇環系內的第 3、7、11、12 或 17 位置上或類固醇骨架（=酮類固醇化合物）之任何碳部位（moiety）的 α 位置上），其中該酮類固醇化合物在輔因子 NADH 或 NADPH 的存在下藉由羥類固醇去氫酶而還原。

另言之，本發明係關於一種氧化包含類固醇結構（ABCD）的化合物之方法，該類固醇結構（ABCD）包括一或數個雜原子、一或數個雙鍵及/或一個芳香系組份（位在環結構內）且具有至少一個羥基（位在類固醇環系內的第 3、7、11、12 或 17 位置上或類固醇骨架（=羥類固醇化合物）之任何碳部位的 α 位置上），其中該羥類固醇化合物在輔因子 NAD 或 NADP 的存在下藉由羥類固醇去氫酶而氧化。

【先前技術】

類固醇為具有膽固醇環系的化合物，其各別差異處在於雙鍵的數目、官能基的種類、數目及位置、甲基的數目、烷基側鏈及鏈結組態。類固醇化合物係發現於動物體內及真菌與植物中，並呈現多重生物活性，例如：作為雄性

(2)

與雌性激素、作為腎上腺的激素、作為維生素、作為膽酸 (bile acid)、作為類固醇皂苷配基 (steroid sapogenines)、作為心活化物質且作為蟾蜍毒液。

藉由酮類固醇化合物，可在本文後文中瞭解最初定義的類固醇種類，即具有至少一個酮官能基的類固醇（其中該官能基可包括於上述環系內或位在上述類固醇骨架上的側鏈內）。

藉由羥類固醇化合物，可在本文後文中瞭解最初定義的類固醇種類，即具有至少一個羥官能基的類固醇（其中該官能基可包括於上述環系內或位在上述類固醇骨架上的側鏈內）。

由於類固醇具有多重生理效用，醫界顯然亦大量使用了類固醇化合物及衍生物作為治療上有效的物質和醫藥品。

舉例而言，全世界廣泛使用助孕物質 (progestogen) 及雌性素衍生物作為避孕劑；使用雄性素（睪固酮）作為合成代謝物質 (anabolics)，且在例如前列腺癌的治療法中使用抗雄性素。醣類皮質激素（英文名稱為 glucocorticoids）（皮質酮 (cortisone)、皮質醇 (cortisol)、普賴蘇稜 (prednisolone) 及普賴蘇 (prednisone)）及其衍生物，由於其具有消炎 (antiphlogistic)、抗過敏及免疫抑制效用，故廣泛使用該等激素於治療處理皮膚疾病、風濕疾病、過敏反應、腎疾病、胃腸疾病及許多其他病症。

(3)

生物性活化的類固醇化合物，具有龐大的全球市場。在產生各種具有不同效用之類固醇衍生物的過程中，生物轉化（biotransformations）扮演了重要角色。尤其，藉由羥化酶和去氫酶所催化的反應因而十分重要。有關於此， δ -1-去氫作用、 11β -還原作用、 20β -還原作用、 17β -還原作用、在第3及7位置上的立體選擇性還原作用及尤其在第3、7、12及17位置上的羥基氧化作用，係扮演了特定角色。

在工業上，對類固醇進行生物還原，目前僅使用完整全細胞，其受質濃度遠低於10公克/公升。首先，此係歸因於目前尚未分別辨別並表達出負責生物轉化的酶；再者，尚未有令人滿意的解決方案，以一方面改善類固醇難溶解於水性介質的問題且另一方面改善再生輔因子NADH及NADPH至足夠程度的問題。

對類固醇進行氧化，目前係在工業中利用化學方法實施。

G. Carrea 從西元1975至1988年，曾實質地記載了藉由分離酶而對映選擇性還原類固醇的想法（參見 Eur. J. Biochemistry 44, 1974 p. 401-405; Biotechnology and Bioengineering, Vol 17, 1975, p. 1101-1108; Enzyme Microb. Technol. Vol 6, July, 1984, p. 307-311; Biotechnology and Bioengineering, Vol 26, 1984, p. 560-563; J. Org. Chem. 51, 1986, p. 2902-2906; J. Org. Chem. 58, 1993, p. 499-501; J. Org. Chem., 53, 1988, p. 88-92;

(4)

Enzyme Microb. Technol., Vol 10, June, p. 333-339;
Archives of Biochemistry and Biophysics, 159, 1973, p. 7-10)。

有各種羥類固醇去氫酶 (hydroxysteroid dehydrogenases, HSDH) 係用於進行上述過程，其中本質上係藉由來自酵母菌的乳酸去氫酶、甲酸去氫酶或醇去氫酶等酶進行偶合，以達到再生輔因子 NADH。使用葡萄糖去氫酶會影響 NADP 的再生。為克服溶解性的問題，在具有乙酸乙酯及乙酸丁酯作為有機相的二相系統中進行實驗。在此二相系統中亦利用分離酶，以通常遠低於 10 公克/公升的濃度範圍內進行操作，其中所達到的「全部更換數 (total turn over numbers)」(TTN = 還原的酮類固醇化合物之莫耳數/所使用的輔因子之莫耳數) 亦遠低於 1000，因而此方法相較於全細胞方法並無法提供實質上的經濟效益。

再者，有文獻記載著，藉由偶合氧化和還原作用，以完成羥基自 7α 轉換至 7β 的反應。此係藉由偶合 7α HSDH 和 7β HSDH 而達成 (參見 Pedrini et al., Steroids 71 (2006), p. 189-198)。且在此方法中，以遠低於 10 公克/公升的濃度範圍內來進行操作，而所達到的「全部更換數」(TTN = 還原的酮類固醇化合物之莫耳數/所使用的輔因子之莫耳數) 遠低於 100，故而此等方法亦無關於經濟效益。

(5)

【發明內容】

本發明旨在避免上述缺點及困難，其目的係提供分別對映選擇性還原和氧化酮類固醇化合物和羥類固醇化合物的方法，其中係具有較高的更換程度、較高的濃度範圍及輔因子的較高 TTN，因而其方式更具經濟性。

利用最初提及之方法，達到上述目的的過程如下：

a) 在反應中提供該酮類固醇化合物，其濃度為 ≥ 50 g/l，

b) 藉由通式 $R_X R_Y CHOH$ 之二級醇的氧化作用（其中 R_X 、 R_Y 係各別表示氫、分支或未分支的 C1-C8-烷基且 C 全部 ≥ 3 ）或藉由 C4-C6 環烷醇的氧化作用，持續再生成由羥類固醇去氫酶形成的氧化輔因子 NAD 或 NADP，及

c) 另使用氧化還原酶/醇去氫酶以分別氧化該通式 $R_X R_Y CHOH$ 之二級醇或該環烷醇。

利用最初提及之另外方法，達到上述目的的過程如下：

a) 在反應中提供該羥類固醇化合物，其濃度為 ≥ 50 g/l，

b) 藉由通式 $R_X R_Y CO$ 之酮化合物的還原作用（其中 R_X 、 R_Y 係各別表示氫、分支或未分支的 C1-C8-烷基且 C 全部 ≥ 3 ）或藉由 C4-C6 環烷酮的還原作用，持續再生成由羥類固醇去氫酶形成的還原輔因子 NADH 或 NADPH，及

c) 另使用氧化還原酶/醇去氫酶以分別還原該通式 $R_X R_Y CO$ 之酮化合物或該環烷酮。

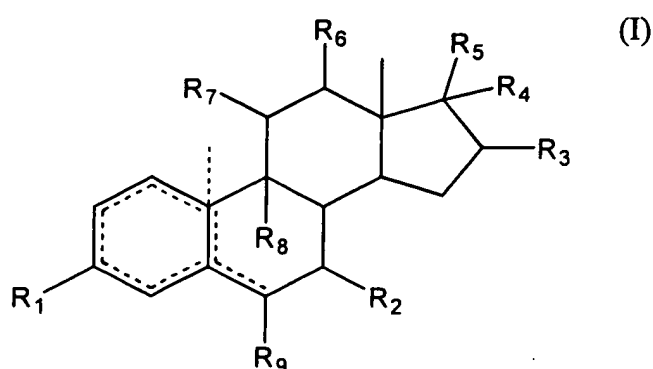
(6)

相較於先前技術，本發明實質上改善了在類固醇骨架上的對映選擇性酶還原和氧化反應。本發明得以藉由遠超過彼等先前技術所敘者之濃度範圍內的自由酶，分別還原和氧化酮類固醇化合物和相對應之羥類固醇。

【實施方式】

在如本發明之方法中，係使用 NADH 或 NADPH 作為輔因子。用詞「NADP」係瞭解為菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸，「NADPH」係瞭解為還原菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸。用詞「NAD」意指菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸，用詞「NADH」意指還原菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸。

如一較佳實施例，如本發明之方法係使用下列通式 I 化合物作為該酮類固醇化合物，



其中：

R₁ 代表氫、甲基、羥基或合氧基，

R₂ 代表氫、甲基、羥基或合氧基，

R₃ 代表氫、羥基、合氧基或甲基，

(9)

式 $R_X R_Y CO$ 之酮或上述 C4-C6-環烷酮，且分別有上述通式 $R_X R_Y CHOH$ 之二級醇或上述 C4-C6-環烷醇。

如本發明之若干方法，較佳係在水/有機之二相系統中實施。藉此，用於再生成輔酶的輔受質係適宜地未與水溶合，並因此形成該水/有機之二相系統之有機相。

如進一步之可能實施例，在上述方法中係另使用未涉及再生成輔因子的有機溶劑，諸如例如二乙醚、三級丁基甲基醚、二異丙醚、二丁醚、乙酸乙酯、乙酸丁酯、庚烷、己烷或環己烷。

進一步言之，如本發明方法之 TTN 較佳係為 $\geq 10^3$ 。

再者，在 2 至 96 小時內分別將較佳至少 50% 所使用的酮類固醇化合物或羥類固醇化合物，還原為相對應之羥類固醇化合物或氧化為酮類固醇化合物。

如本發明之較佳實施例，其中使用作為酮類固醇化合物者，例如酮基石膽酸（式 II）、地塞米松（dexamethasone）（式 III）、4-雄烯-3,17-二酮（式 IV）、1,4-雄二烯-3,17-二酮（式 V）、雌酮（式 VI）、孕烯醇酮（式 VII）及皮質酮（式 VIII）。

如本發明之方法的較佳實施例，其中進一步使用作為羥類固醇化合物者，例如膽酸（bile acid）之各種衍生物，其諸如膽酸（cholic acid）、鵝去氧膽酸（chenodeoxycholic acid）、12-酮膽酸（12-oxocholic acid）、3-羥基-12-酮膽酸、酮基石膽酸、石膽酸或氫皮質酮。

(10)

一般瞭解，羥類固醇去氫酶為在類固醇骨架上分別催化以下反應之酶：酮基還原至羥基的反應或羥基氧化至相對應酮基的反應。此氧化作用或還原作用係因而發生在該類固醇本身的環系上（例如：7- α 羥類固醇去氫酶）或該類固醇骨架結構之碳部位上（例如：20- β 羥類固醇去氫酶）。

還原酮類固醇化合物之適合的羥類固醇去氫酶，例如 3- α 羥類固醇去氫酶（HSDH）、3 β HSDH、12 α HSDH、20 β HSDH、7 α HSDH、7 β HSDH、17 β HSDH 及 11 β HSDH。

適合的 3- α 羥類固醇去氫酶，可取自例如睪丸酮假單胞菌（*Pseudomonas testosteroni*）（J. Biol. Chem. 276（13），9961-9970（2001））者，並可用於分別氧化 3- α -羥類固醇和還原 3-酮類固醇，諸如例如 3-酮基-膽酸類（3-keto-bile acids）、黃體固酮（progesterone）、4-雄烯-3,17-二酮、5- α -雄固烷-3,17-二酮等。

具有 3- β 羥類固醇去氫酶活性之適合的酶，可取自例如無害芽胞梭菌（*Clostridium innocuum*）（Applied and Environmental Microbiology, June 1989, p. 1656-1659）或睪丸酮假單胞菌者，並可用於分別氧化 3- β -羥類固醇及還原 3-酮類固醇，諸如例如 3-酮基-膽酸類（3-keto-bile acids）、黃體固酮、4-雄烯-3,17-二酮、5- α -雄固烷-3,17-二酮。

12 α HSDH 可取自例如芽胞梭菌屬（*Clostridia*）（

(11)

Eur. J. Biochem. 196 (1991) 439-450) 者，並可用於分別氧化 12- α -羥類固醇（例如膽酸（cholic acid））和還原 12-酮類固醇，諸如例如 12-酮基-膽酸（12-酮基鵝去氧膽酸、去氫膽酸）。亦有記載說明，來自芽胞梭菌屬之酶亦具有 12- β 羥類固醇去氫酶活性（Biochim. Biophys. Acta 1988 Oct. 14; 962 (3) : 362-370）。

具有 20- β 羥類固醇去氫酶活性之酶，可取自例如鏈絲菌屬（*Streptomyces*）（The Journal of Biological Chemistry, 1977, Vol 252 No 1, Jan 10, 205-211）群的有機體者，並可用於還原皮質酮及皮質醇衍生物（皮質酮、皮質醇、去氧皮質醇（cortexolone）、黃體固酮）至相對應的 20- β -羥類固醇（例如 20- β -羥基黃體固酮）。

具有 20- α 羥類固醇去氫酶活性之相對應酶，可取自例如芽胞梭菌屬者（尤其自斯登氏梭菌（*Clostridium scindens*）（Journal of Bacteriology, June 1989, p. 2925-2932））及自梨形四膜蟲（*Tetrahymena pyriformis*（Biochem. J. (1994) 297, 195-200）者。適合的 7- α 羥類固醇去氫酶，可從他者之中取得，其中有自腸內微生物的有機體，諸如例如自芽胞梭菌屬（不同梭菌（*Clostridium absonum*）、索氏梭菌（*Clostridium sordellii*））（Journal of Bacteriology, Aug. 1994, p. 4865-4874）、自大腸桿菌（*Escherichia coli*）（Journal of Bacteriology Apr., 1991, p. 2173-2179）、自鬆脆桿菌（*Bacteroides fragilis*）（Current Microbiology, Vol 47（

(12)

2003) 475-484)、布氏桿菌屬 (*Brucella*)、真菌屬 (*Eubacterium*)，並可用於分別氧化 7- α -羥類固醇 (鵝石膽酸 (chenolithocholic acid)) 和還原 7-酮類固醇 (諸如例如 7-酮基-膽酸 (酮基石膽酸))。

具有 7- β 羥類固醇去氫酶活性之相對應酶，亦有記載說明其可取自芽胞梭菌屬、分別自瘤胃球菌 (*ruminococci*) (J. Biochemistry 102, 1987, p. 613-619) 或消化鏈球菌 (*peptostreptococci*) (Biochimica and Biophysica Acta 1004, 1989, p. 230-238) 科的微生物、自產氣真桿菌 (*Eubacterium aerofaciens*) (Applied and Environmental Microbiology, May 1982, p. 1057-1063) 及自嗜麥芽黃單胞菌 (*Xanthomonas maltophila*) (Pedrini et al, Steroids 71 (2006) p. 189-198)。舉例而言，藉由 7- β HSDH 可自酮基石膽酸產生熊去氧膽酸 (ursodeoxycholic acid)。

吾人已知者，17- β 羥類固醇去氫酶係來自真菌，諸如圓柱膠菌 (*Cylindrocarpon radicola*) (J. Biochemistry 103, 1988, 1039-1044) 及月狀旋孢腔菌 (*Cochliobolus lunatus*) (J. Steroid Biochem. Molec. Biol. Vol 59, 1996, No.2, p. 205-214)、自鏈絲菌科 (*Streptomyces*) (Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem, Vol. 356, 1975, 1843-1852) 的細菌、假單胞菌 (*Pseudomonas*) (The Journal of Biological Chemistry, Vol. 252 No. 11, June 10, 1977, p. 3775-3783) 及產鹼桿菌 (*Alcaligenes*) (The Journal

(13)

of Biological Chemistry, Vol. 260, No. 25, Nov 5, 1985, p. 13648-13655)。

舉例而言，17- β 羥類固醇去氫酶可用於分別氧化 17- β -羥類固醇和還原 17-酮類固醇（諸如例如 4-雄烯-3,17-二酮、雄固酮、雌酮）。

具有 17- α 羥類固醇去氫酶活性之相對應酶，有記載說明其可取自真菌之種（*Eubacterium* sp.）（*Journal of Lipid Research*, Vol. 35, 1994, p. 922-929）。

吾人已知者，11- β 羥類固醇去氫酶係來自高等哺乳動物，並可用於例如將皮質醇氧化至皮質酮的用途。

然而，任何其他會分別催化在類固醇骨架上的氧化作用和還原作用之氧化還原酶，係亦可用作為羥類固醇去氫酶。

在使用例如 17- β 羥類固醇去氫酶（來自睪丸酮假單胞菌）、3- β 羥類固醇去氫酶（來自無害芽胞梭菌）或 7- α 羥類固醇去氫酶（來自鬆脆桿菌）者時，分別再生成 NADH 或 NAD 之適合的二級醇去氫酶為例如彼等如上文所述者，並且係分離自假絲酵母菌屬（*Candida*）及畢赤酵母菌屬（*Pichia*）之酵母菌，諸如例如：羧基還原酶（來自近平滑假絲酵母（*Candida parapsilosis*）（CPCR）（US 5,523,223 和 US 5,763,236；*Enzyme Microb. Technol.* 1993 Nov; 15 (11):950-8））、囊狀畢赤酵母（*Pichia capsulata*）（DE 10327454.4）、粉狀畢赤酵母（*Pichia farinosa*）（A 1261/2005, K1. C12N）、芬蘭畢

(14)

赤酵母 (*Pichia finlandica*) (EP 1179595 A1)、新芽假絲酵母 (*Candida nemodendra*) (A 1261/2005, K1. C12N)、喜海藻糖畢赤酵母 (*Pichia trehalophila*) (A 1261/2005, K1. C12N)、膠紅酵母 (*Rhodotorula mucilaginosa*) (A 1261/2005, K1. C12N)、長孢狀洛德酵母 (*Lodderomyces elongisporus*) (A 1261/2005, K1. C12N)、樹幹畢赤酵母菌 (*Pichia stipidis*) (A 1261/2005, K1. C12N)。

進一步言之，藉由上文所述的二級醇去氫酶/氧化還原酶亦影響 NADH 再生成，其中該等酶係分離自放射菌 (*actinobacteria*) 綱的細菌，例如自紅串紅球菌 (*Rhodococcus erythropolis*) (US 5,523,223)、福卡氏諾卡氏菌 (*Nocardia fusca*) (Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (10) (1999), pp. 1721-1729; Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003 Sep; 62 (4):380-6, Epub 2003 Apr 26)、赤紅球菌 (*Rhodococcus ruber*) (J. Org. Chem. 2003 Jan 24; 68 (2):402-6.) 或微桿菌屬之種 (*Microbacterium spec.*) (A 1261/2005, K1. C12N)。

在使用例如 12- α 羥類固醇去氫酶 (來自類腐敗梭菌 (*Clostridium paraputrificum*))、17- α 羥類固醇去氫酶 (來自各種真菌屬 (*Eubacterium sp.*)) 或 7- α 羥類固醇去氫酶 (來自索氏梭菌) 者時，用於分別再生成 NADPH 或 NADP 之適合的二級醇去氫酶/氧化還原酶為例如彼等如上文所述者，並且係分離自乳桿菌目 (*Lactobacillales*)。

(15)

）的有機體（克菲爾乳桿菌（*Lactobacillus kefir*（US 5,200,335））、短乳桿菌（*Lactobacillus brevis*）（DE 19610984 A1; Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2000 Dec; 56 Pt 12:1696-8）、微小乳桿菌（*Lactobacillus minor*）（DE 10119274）、肉色明串珠菌（*Leuconostoc carnosum*）（A 1261/2005, K1. C12N），或者為彼等所記載來自布氏熱厭氧菌（*Thermoanaerobium brockii*）、嗜熱厭氧乙醇菌（*Thermoanaerobium ethanolicus*）或拜氏梭菌（*Clostridium beijerinckii*）者。

羥類固醇去氫酶和氧化還原酶/醇去氫酶二者，較佳係在大腸桿菌（*Escherichia coli*）中經過重組之過度表達的狀態中而使用。在如本發明的方法中，羥類固醇去氫酶和醇去氫酶/氧化還原酶，係可在完全純化的狀態、部分純化狀態或在細胞內所包括的狀態中使用。所使用的細胞可呈現天然（native）、透性化（permeabilized）或溶解（lysed）狀態。

每公斤待轉換的酮類固醇化合物和羥類固醇化合物，係分別使用 50,000 至 1 千萬單位（U）的羥類固醇去氫酶和 50,000 至 1 千萬單位（U）的醇去氫酶（無上限）。

1U 之酶單位相當於為每分鐘轉換 1 微莫耳的酮類固醇化合物而所必需的羥類固醇去氫酶之酶量或為每分鐘氧化 1 微莫耳的 2-醇而所必需的醇去氫酶之酶量。

相當者，每公斤待轉換的的酮類固醇化合物或羥類固醇化合物，係可分別使用含有羥類固醇去氫酶的 *E. coli*

(16)

約 10 克至 500 克的生物上濕質量，或含有醇去氫酶/氧化還原酶的 *E. coli* 約 10 克至 500 克的生物上濕質量（無上限）。

在所說明的方法中，利用酶耦合的方式會影響 NAD (P) H 的再生成。

在如本發明的方法中，酮類固醇化合物或羥類固醇化合物分別於其中進行轉換作用的二相系統如下：含有分別用於再生成輔因子的 2-醇或酮基化合物、羥類固醇去氫酶、醇去氫酶、水、輔因子及分別的酮類固醇化合物或羥類固醇化合物。進一步言之，可包括額外的有機溶劑，該有機溶劑未涉及輔因子再生成，亦即未分別含有任何藉由所使用的醇去氫酶而可氧化的羥基或藉由該醇去氫酶而可還原的酮基。

在此二相系統中，以反應總體積為基礎而計，未與水溶合的有機組份之部分，其可佔介於 10%與 90%之間的範圍，較佳從 20%至 80%。以該反應批的總體積為基礎而計，水性部分可佔從 90%至 10%的範圍，較佳從 80%至 20%。

可將緩衝液加入至水中，其中該緩衝液為例如磷酸鉀、tris/HCl、甘胺酸或三乙醇胺緩衝液，其具 pH 值為從 5 至 10，較佳為從 6 至 9。再者，該緩衝液可包含用於安定化或活化上述二者酶的離子，例如鎂離子或鋅離子。

再者，在如本發明的方法中，亦可進一步使用安定化羥類固醇去氫酶和醇去氫酶等酶的添加物，諸如例如甘油

(17)

、山梨醇、1,4-DL-二硫蘇糖醇 (1,4-DL-dithiothreitol , DTT) 或二甲基亞 (DMSO) 。

以水相為基礎而計，輔因子 NAD (P) H 的濃度為從 0.001 mM 至 10 mM 的範圍，尤其為從 0.01 mM 至 1.0 mM 。視所使用酶的特性而定，其溫度為從 10°C 至 70°C 的範圍，較佳為從 20°C 至 35°C 。

因此，在如本發明的方法中，所達到的 TTN (全部更換數 = 還原的酮類固醇化合物之莫耳數 / 所使用的輔因子之莫耳數) 一般可為 10^2 至 10^5 的範圍，較佳 $TTN > 10^3$ 。

通常而言，待還原的酮類固醇化合物和羥類固醇化合物分別係難溶於水。在反應期間，其受質可呈現完全或不完全的溶解狀態。若該受質未完全溶解於反應混合物中，該受質部分便呈現固態形式，可能因此形成第三固相。在轉換作用期間，反應混合物亦可能暫時形成乳膠狀。在如本發明的方法中，以反應批的總體積為基礎而計，分別使用待還原的酮類固醇化合物和待氧化的羥類固醇化合物，其用量為 ≥ 50 g/l 。酮類固醇化合物 / 羥類固醇化合物，較佳係使用介於 50 g/l 與 400 g/l 之間的量，特佳係使用介於 50 g/l 與 200 g/l 之間的量。

較佳的額外的未涉及輔因子再生成之有機溶劑，例如乙酸乙酯、乙酸丁酯、三級丁基甲基醚、二異丙醚、庚烷、己烷、甲苯、二氯甲烷或環己烷或其不同組成之混合物。

分別藉由通式 $R_X R_Y CHOH$ 之二級醇或 C4-C6-環烷醇

(18)

的氧化作用，達到 NAD(P)H 的再生成。在進行此過程中，係形成了通式 $\text{R}_x\text{R}_y\text{C}=\text{O}$ 或 C4-C6-環烷酮等酮作為反應產物。較佳的二級醇為脂肪族的 2-醇（諸如例如異丙醇、2-丁醇、2-戊醇、2-己醇、2-庚醇、2-辛醇、4-甲基-2-戊醇、5-甲基-2-己醇）以及環系二級醇（諸如環己醇、環戊醇）。原則上，亦可理解而使用二醇，諸如例如 1,4-環己烷二醇。

分別藉由通式 $\text{R}_x\text{R}_y\text{C}=\text{O}$ 或 C4-C6-環烷酮之酮基化合物的還原作用，達到 NAD(P) 的再生成。在進行此過程中，係形成了通式 $\text{R}_x\text{R}_y\text{CHOH}$ 之二級醇或 C4-C6-環烷醇作為反應產物。較佳的酮基化合物為酮類（諸如例如丙酮、2-丁酮、2-戊酮、2-己酮、2-庚酮、2-辛酮、4-甲基-2-戊酮、5-甲基-2-己酮）及環系酮（諸如環己酮、環戊酮）。原則上，亦可理解而使用諸如例如 1,4-環己烷二酮的二酮。

舉例而言，如本發明之方法，係在玻璃製或金屬製的反應容器內實施。為此目的，將若干組份個別轉移至該反應容器內，並在例如氮氣或空氣的氣體環境下攪拌。視所使用的酮類固醇化合物而定，反應時間為從 1 小時至 96 小時的範圍，尤其為從 2 小時至 48 小時的範圍。在此期間，將酮類固醇化合物還原為相對應的羥類固醇（至少 50% 的還原程度），或者將羥類固醇氧化為酮類固醇化合物（至少 50% 的氧化程度）。

下文中，係以實施例進一步說明本發明的詳細內容。

(19)

實施例：

1. 將雄烯-3,17-二酮還原成 17- β -羥基-4-雄烯-3-酮（睪固酮）

A) 用於輔酶再生成之二相系統，其利用 4-甲基-2-戊醇者為合成 17 β -羥基-4-雄烯-3-酮（睪固酮），將 100 毫克雄烯-3,17-二酮溶解於 0.4 毫升 4-甲基-2-戊醇的溶液，加入至 0.5 毫升的緩衝液（100 mM 三乙醇胺，pH = 7，1 mM MgCl₂，10%甘油），其中該緩衝液含有 0.1 毫克 NAD、30 單位的重組 17- β 羥類固醇去氫酶（取自睪丸酮假單胞菌（*J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44 (2), 133-139 (1993), Pubmed P19871)）及 50 單位的重組醇去氫酶（取自囊狀畢赤酵母（DE-A 103 27 454））。將此混合物於室溫保持 24 小時，當中並持續攪拌著。雄烯-3,17-二酮在總反應體積中的濃度，約為 100 g/l。

反應完成時，處理上述反應混合物（例如：利用有機溶劑萃取該反應混合物，並接續經由蒸餾法移除該溶劑）。

經過 24 小時之後，約有 94%所使用的雄烯-3,17-二酮，已轉換為 17- β -羥基-4-雄烯-3-酮（睪固酮）。

利用氣相層析法，監控雄烯-3,17-二酮轉換成 17- β -羥基-4-雄烯-3-酮（睪固酮）的情形。為此目的，使用 Shimadzu 的 GC-17 A 氣相層析儀，並搭配 12 米長的 Lipodex E 手性分離管柱（Machery-Nagel, Düren,

(20)

Germany) 、火焰電離偵測器，並利用氮氣為載氣。

B) 用於輔酶再生成之二相系統，其利用乙酸丁酯及 2-丙醇者

為合成 17- β -羥基-4-雄烯-3-酮 (睪固酮)，將 100 毫克雄烯-3,17-二酮溶解於 0.3 毫升乙酸丁酯及 0.1 毫升 2-丙醇的溶液，加入至 0.5 毫升的緩衝液 (100 mM 三乙醇胺，pH = 7，1 mM MgCl₂，10% 甘油)，其中該緩衝液含有 0.1 毫克 NAD、30 單位的重組 17- β -羥類固醇去氫酶 (取自睪丸酮假單胞菌 (J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 44 (2)，133-139 (1993)，Pubmed P19871)) 及 50 單位的重組醇去氫酶 (取自囊狀畢赤酵母 (DE-A 103 27 454))。將此混合物於室溫保持 24 小時，當中並持續攪拌著。雄烯-3,17-二酮在總反應體積中的濃度，約為 100 g/l。

反應完成時，處理上述反應混合物 (例如：利用有機溶劑萃取該反應混合物，並接續經由蒸餾法移除該溶劑)

經過 24 小時之後，約有 90-95% 所使用的雄烯-3,17-二酮，已轉換為 17- β -羥基-4-雄烯-3-酮 (睪固酮)。

2. 將酮基石膽酸還原成鵝石膽酸

A) 輔酶再生成，其利用 ADH (取自布氏熱厭氧菌) / 二相系統者

為合成 3 α -7 α -二羥基-5- β -膽烷酸 (鵝去氧膽酸)

(21)

，將 100 毫克 3α -羥基-7-合氧基-5- β -膽烷酸（酮基石膽酸）在 0.5 毫升甲基戊醇中的溶液，加入至 0.2 毫升的緩衝液（100 mM 磷酸鉀緩衝液，pH = 8.5，1 mM MgCl_2 ，10% 甘油），其中該緩衝液含有 0.1 毫克 NADP、10 單位的重組 7- α -羥類固醇去氫酶（取自斯登氏梭菌（Pubmed AAB61151））及 10 單位的重組醇去氫酶（取自布氏熱厭氧菌）。將此混合物於室溫保持 24 小時，當中並持續攪拌著。酮基石膽酸在總反應體積中的濃度，約為 100 g/l。

經過 24 小時之後，約有 90-98% 所使用的酮基石膽酸，已轉換成鵝去氧膽酸。

利用高性能液相層析法（HPLC），監控酮基石膽酸轉換成鵝去氧膽酸的情形。為此目的，使用 EC125/4 Nucleodur 100-5 C18ec 的分離管柱（Machery-Nagel, Düren, Germany）並以同溶劑方式使用甲醇/水（80:20）的混合液。

B) 輔酶再生成，其利用 ADH（取自乳桿菌（DE 10119274））/二相系統者

為合成 3α -7 α -二羥基-5- β -膽烷酸（鵝去氧膽酸），將 100 毫克 3α -羥基-7-合氧基-5- β -膽烷酸（酮基石膽酸）在 0.5 毫升辛醇中的溶液，加入至例如 0.3 毫升的緩衝液（100 mM 三乙醇胺緩衝液，pH = 7，1 mM MgCl_2 ，10% 甘油），其中該緩衝液含有 0.1 毫克 NADP、10 單位的重組 7- α -羥類固醇去氫酶（取自斯登氏梭菌（Pubmed

(22)

AAB61151)) 及 10 單位的重組醇去氫酶 (取自乳桿菌 (DE 10119274)) 。將此混合物於室溫保持 24 小時，當中並持續攪拌著。酮基石膽酸在總反應體積中的濃度，約為 100 g/l。

經過 24 小時之後，約有 70-80%所使用的酮基石膽酸，已轉換成鵝去氧膽酸。

3. 將 1,4-雄二烯-3,17-二酮還原成 17- β -羥基-1,4-雄二烯-3-酮

為合成 17- β -羥基-1,4-雄二烯-3-酮，將 100 毫克 1,4-雄二烯-3,17-二酮溶解於 0.4 毫升 4-甲基-2-戊醇的溶液，加入至 0.5 毫升的緩衝液 (100 mM 三乙醇胺，pH = 7，1 mM MgCl₂，10%甘油)，其中該緩衝液含有 0.1 毫克 NAD、30 單位的重組 17- β -羥類固醇去氫酶 (取自睪丸酮假單胞菌 (J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 44 (2)，133-139 (1993)，Pubmed P19871)) 及 5 單位的重組醇去氫酶 (取自囊狀畢赤酵母 (DE-A 103 27 454))。將此混合物於室溫保持 24 小時，當中並持續攪拌著。1,4-雄二烯-3,17-二酮在總反應體積中的濃度，約為 100 g/l。

反應完成時，處理上述反應混合物 (例如：利用有機相分離該反應混合物，並接續經由蒸餾法移除溶劑)。

經過 24 小時之後，約有 90-98%所使用的 1,4-雄二烯-3,17-二酮，已轉換為 17- β -羥基-1,4-雄二烯-3-酮。

利用氣相層析法，監控 1,4-雄二烯-3,17-二酮轉換成

(23)

17- β -羥基-1,4-雄二烯-3-酮的情形。爲此目的，使用 Perkin Elmer 的 Autosystem XL 之氣相層析儀，其裝配有質譜儀，並搭配 FS 的毛細管柱 Optima-5-MS (Machery-Nagel, Düren, Germany)，並利用氮氣爲載氣。

4. 將鵝石膽酸氧化成酮基石膽酸

A) 輔酶再生成，其利用 ADH (取自布氏熱厭氧菌) / 二相系統者

爲合成 3 α -羥基-7-合氧基-5- β -膽烷酸 (酮基石膽酸)，將 100 毫克 3 α -7 α -二羥基-5- β -膽烷酸 (鵝去氧膽酸) 在 0.5 毫升甲基異丁基酮中的溶液，加入至 0.4 毫升的緩衝液 (100 mM 磷酸鉀緩衝液，pH = 8.5，1 mM MgCl₂，10% 甘油)，其中該緩衝液含有 0.1 毫克 NADP、10 毫克生物上濕質量而含有經過度表達之 7- α -羥類固醇去氫酶 (取自斯登氏梭菌 (Pubmed AAB61151)) 的 E. coli 的及 5 毫克生物上濕質量而含有經過度表達之醇去氫酶 (取自布氏熱厭氧菌) 的 E. coli。將此混合物於室溫保持 24 小時，當中並持續攪拌著。酮基石膽酸在總反應體積中的濃度，約爲 100 g/l。

經過 24 小時之後，有多於 80% 所使用的鵝去氧膽酸，已轉換成酮基石膽酸。

利用薄層層析法，監控鵝去氧膽酸轉換成酮基石膽酸的情形。

(24)

B) 輔酶再生成，其利用 ADH (取自乳桿菌 (DE 10119274)) /二相系統者

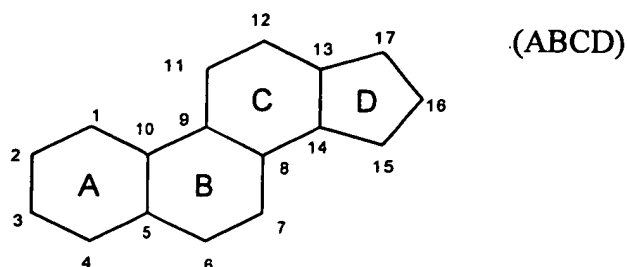
為合成 3α -羥基- 7α -合氧基- 5β -膽烷酸 (酮基石膽酸)，將 100 毫克 3α - 7α -二羥基- 5β -膽烷酸 (鵝去氧膽酸) 在 0.7 毫升甲基異丁酮中的溶液，加入至 0.15 毫升的緩衝液 (100 mM 磷酸鉀緩衝液，pH = 7.5，1 mM MgCl_2 ，10% 甘油)，其中該緩衝液含有 0.1 毫克 NADP、10 毫克生物上濕質量而含有經過度表達之 7α -羥類固醇去氫酶 (取自斯登氏梭菌 (Pubmed AAB61151)) 的 *E. coli* 及 5 毫克生物上濕質量而含有經過度表達之醇去氫酶 (取自乳桿菌 (DE 10119274)) 的 *E. coli*。將此混合物於室溫保持 24 小時，當中並持續攪拌著。酮基石膽酸在總反應體積中的濃度，約為 100 g/l。

經過 24 小時之後，有多於 90% 所使用的鵝去氧膽酸，已轉換成酮基石膽酸。

五、中文發明摘要

發明之名稱：分別對類固醇施以對映異構選擇性還原和氧化之方法

一種對映異構選擇性酶催化還原包含類固醇結構(ABCD)的化合物之方法，該類固醇結構(ABCD)包括一或數個雜原子、一或數個雙鍵及/或一個芳香系組份(位在環結構內)且具有至少一個含氧基(位在類固醇環系內的第3、7、11、12或17位置上或類固醇骨架(=酮類固醇化合物)之任何碳部位(moiety)的 α 位置上)，



其中該酮類固醇化合物在輔因子 NADH 或 NADPH 的存在下藉由羥類固醇去氫酶而還原，該方法的特徵在於：

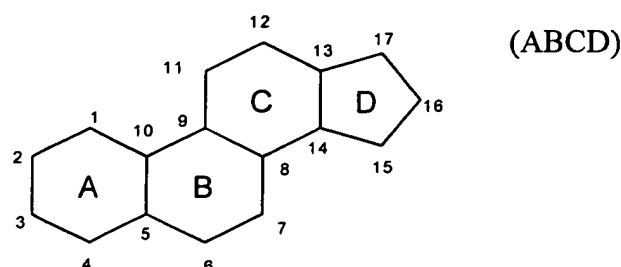
- 在反應中提供該酮類固醇化合物，其濃度為 ≥ 50 g/l，
- 藉由通式 $R_X R_Y CHOH$ 之二級醇的氧化作用(其中 R_X 、 R_Y 係各別表示氫、分支或未分支的 C1-C8-烷基且 C 全部 ≥ 3)或藉由 C4-C6 環烷醇的氧化作用，持續再生成由羥類固醇去氫酶形成的氧化輔因子 NAD 或 NADP，及
- 另使用氧化還原酶/醇去氫酶以分別氧化該通式 $R_X R_Y CHOH$ 之二級醇或該環烷醇。

六、英文發明摘要

發明之名稱：

Process for the Enantioselective Reduction and Oxidation, respectively, of Steroids

A process for the enantioselective enzymatic reduction of compounds which comprise a steroid structure (ABCD) including one or several heteroatoms, one or several double bonds and/or one aromatic component in the ring structure and have at least one oxo group at position 3, 7, 11, 12 or 17 in the steroid ring system or in the α -position at any carbon moiety on the steroid skeleton (=oxosteroid compound),



wherein the oxosteroid compound is reduced with a hydroxysteroid dehydrogenase in the presence of a cofactor NADH or NADPH, is characterized in that

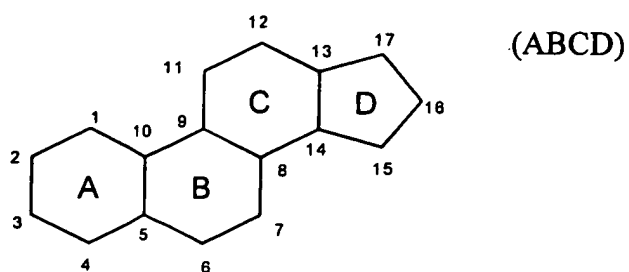
- the oxosteroid compound is provided in the reaction at a concentration of ≥ 50 g/l,
- the oxidized cofactor NAD or NADP formed by the hydroxysteroid dehydrogenase is regenerated continuously by oxidation of a secondary alcohol of general formula $R_X R_Y \text{CHOH}$, wherein R_X , R_Y independently represent hydrogen, a branched or unbranched C1-C8-alkyl and $C_{\text{total}} \geq 3$, or by oxidation of a C4-C6-cycloalkanol, and
- an additional oxidoreductase/alcohol dehydrogenase is used for the oxidation of the secondary alcohol of general formula $R_X R_Y \text{CHOH}$ or of the cycloalkanol, respectively.

七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：無

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：式(ABCD)



R_4 代表氫或羥基，

R_5 代表氫、 $-\text{COR}_{10}$ （其中 R_{10} 為未經取代或經羥基取代之 C1-C4-烷基或經取代或未經取代之 C1-C4-羧烷基），

或 R_4 和 R_5 一起代表合氧基，

R_6 代表氫、甲基、羥基或合氧基，

R_7 代表氫、甲基、羥基或合氧基，

R_8 代表氫、甲基或鹵化物，且

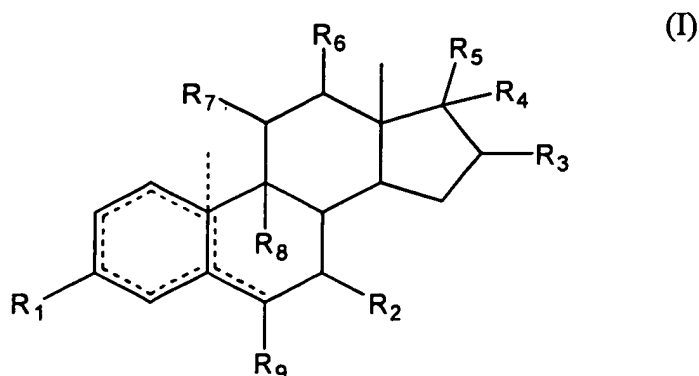
R_9 代表氫、甲基、羥基、合氧基或鹵化物，

其中 R_1 、 R_2 、 R_4+R_5 、 R_6 、 R_8 及 R_9 中至少一者為合氧基，或 R_5 為 $-\text{COR}_{10}$ ，且該結構元件



代表苯環或具有 0、1 或 2 個 C-C 雙鍵的 C6 環。

如一較佳實施例，如本發明之方法係使用下列通式 I 化合物作為該羥類固醇化合物，



其中：

98年10月26日修(更)正頁

R_1 代表氫、甲基、羥基或合氧基，

R_2 代表氫、甲基、合氧基或羥基，

R_3 代表氫、羥基、合氧基或甲基，

R_4 代表氫或羥基，

R_5 代表氫、 $-COR_{10}$ (其中 R_{10} 為未經取代或經羥基取代之 C1-C4-烷基或經取代或未經取代之 C1-C4-羧烷基)，

或 R_4 和 R_5 一起代表合氧基，

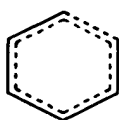
R_6 代表氫、甲基、合氧基或羥基，

R_7 代表氫、甲基、合氧基或羥基，

R_8 代表氫、甲基或鹵化物，且

R_9 代表氫、甲基、羥基、合氧基或鹵化物，

其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_8 及 R_9 中至少一者為羥基，且該結構元件



代表苯環或具有 0、1 或 2 個 C-C 雙鍵的 C6 環。

較佳係使用 2-丙醇、2-丁醇、2-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-己醇、2-庚醇、5-甲基-2-己醇或 2-辛醇作為上述通式 $R_X R_Y CHOH$ 之二級醇，且使用環己醇作為上述環醇。

較佳係使用丙酮、2-丁酮、2-戊酮、4-甲基-2-戊酮、2-己酮、2-庚酮、5-甲基-2-己酮或 2-辛酮作為上述通式 $R_X R_Y CO$ 之酮，且使用環己酮作為上述環烷酮。

在下文中，歸類於輔受質之通用詞者，分別有上述通

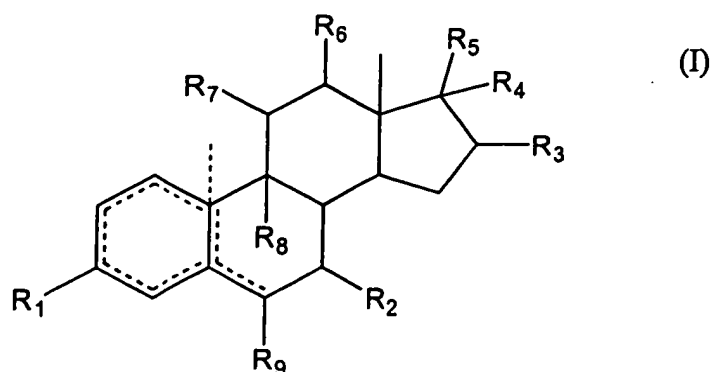
101年7月26日修(更)正本

附件 3A：第 096112717 號專利申請案中文申請專利範圍修正本

民國 101 年 7 月 26 日修正

十、申請專利範圍

1. 一種對映異構選擇性酶催化還原通式 I 之酮類固醇化合物之方法，



其中：

R_1 代表氫、甲基、羥基或合氧基，

R_2 代表氫、甲基、羥基或合氧基，

R_3 代表氫、羥基、合氧基或甲基，

R_4 代表氫或羥基，

R_5 代表氫、 $-\text{COR}_{10}$ （其中 R_{10} 為未經取代或經羥基取代之 C1-C4-烷基或經取代或未經取代之 C1-C4-羧烷基），

或 R_4 和 R_5 一起代表合氧基，

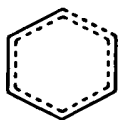
R_6 代表氫、甲基、羥基或合氧基，

R_7 代表氫、甲基、羥基或合氧基，

R_8 代表氫、甲基或鹵化物，且

R_9 代表氫、甲基、羥基、合氧基或鹵化物，

其中 R_1 、 R_2 、 R_4+R_5 、 R_6 、 R_8 及 R_9 中至少一者為合氧基，或 R_5 為 $-COR_{10}$ ，且該結構元件



代表苯環或具有 0、1 或 2 個 C-C 雙鍵的 C6 環，

其中該酮類固醇化合物在輔因子 NADH 或 NADPH 的存在下藉由羥類固醇去氫酶而還原，該方法的特徵在於：

a) 在反應中提供該酮類固醇化合物，其濃度為 $\geq 50 \text{ g/l}$ ，

b) 藉由通式 $R_X R_Y \text{CHOH}$ 之二級醇的氧化作用（其中 R_X 、 R_Y 係各別表示分支或未分支的 C1-C8-烷基且 C 全部 ≥ 3 ）或藉由 C4-C6 環烷醇的氧化作用，持續再生成由羥類固醇去氫酶形成的氧化輔因子 NAD 或 NADP，及

c) 另使用氧化還原酶/醇去氫酶以分別氧化該通式 $R_X R_Y \text{CHOH}$ 之二級醇或該環烷醇。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中使用 2-丙醇、2-丁醇、2-戊醇、4-甲基-2-戊醇、2-己醇、2-庚醇、5-甲基-2-己醇或 2-辛醇作為該通式 $R_X R_Y \text{CHOH}$ 之二級醇，且使用環己醇作為該環烷醇。

3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中該方法係在水/有機之二相系統中實施。

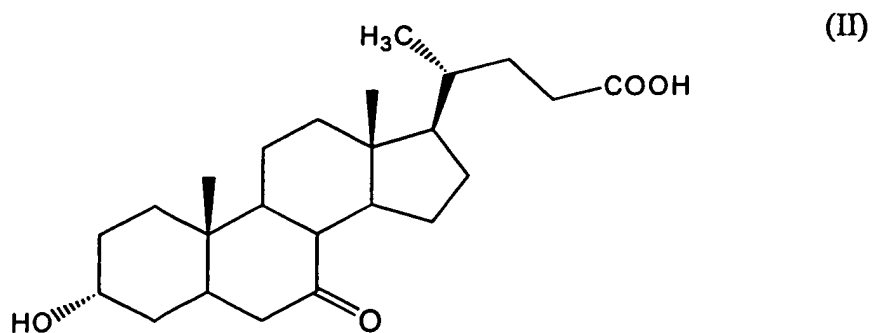
4. 如申請專利範圍第 3 項之方法，其中另使用選自二乙醚、三級丁基甲基醚、二異丙醚、二丁醚、乙酸乙酯

、乙酸丁酯、庚烷、己烷或環己烷之有機溶劑。

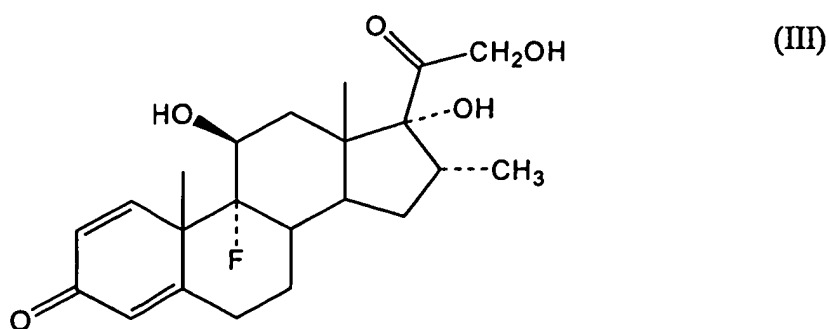
5. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中 TTN（全部更換數＝還原的酮類固醇化合物之莫耳數／所使用的輔因子之莫耳數）為 $\geq 10^3$ 。

6. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中在 2 至 96 小時內將至少 50% 所使用的酮類固醇化合物還原為羥類固醇化合物。

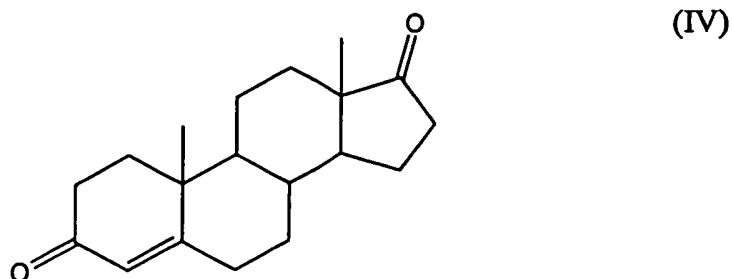
7. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係使用酮基石膽酸（式 II）作為該酮類固醇化合物



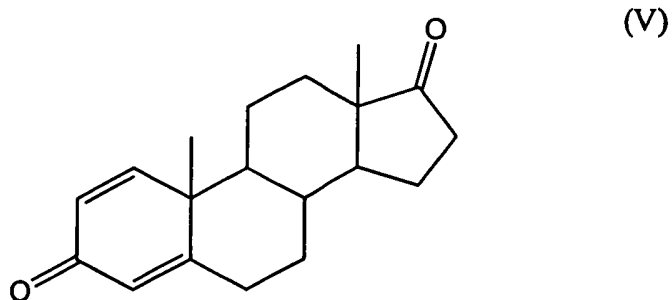
8. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係使用地塞米松（dexamethasone）（式 III）作為該酮類固醇化合物



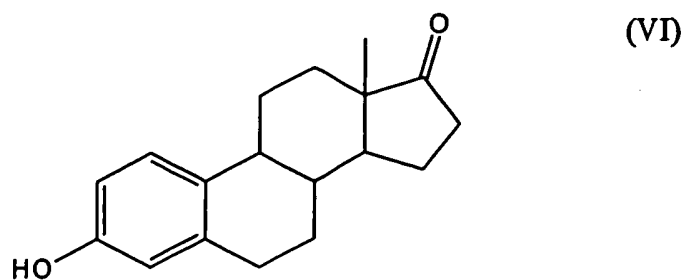
9. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係使用 4-雄烯-3,17-二酮（式 IV）作為該酮類固醇化合物



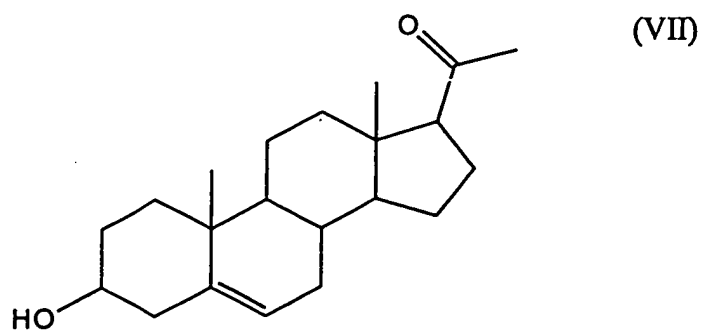
10. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係使用 1,4-雄甾二烯-3,17-二酮（式 V）作為該酮類固醇化合物



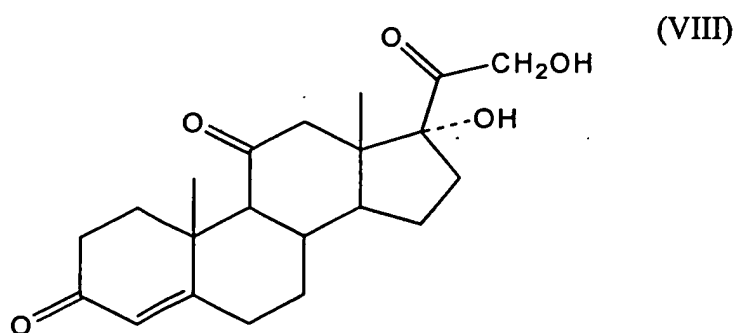
11. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係使用雌酮（式 VI）作為該酮類固醇化合物



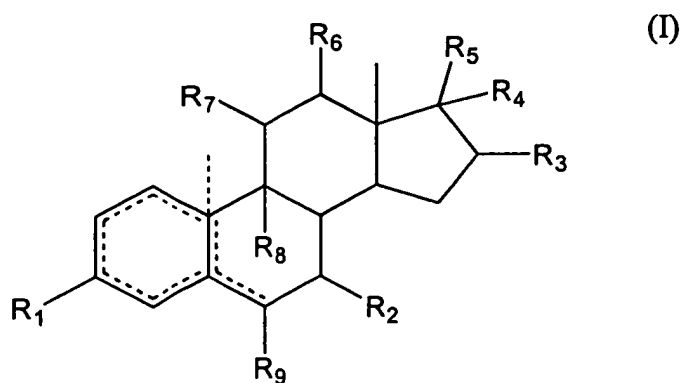
12. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係使用孕烯醇酮（式 VII）作為該酮類固醇化合物



13. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中係使用皮質酮（式 VIII）作為該酮類固醇化合物



14. 一種酶催化氧化通式 I 之羥類固醇化合物之方法



其中：

R_1 代表氫、甲基、羥基或合氧基，

R_2 代表氫、甲基、合氧基或羥基，

R_3 代表氫、羥基、合氧基或甲基，

R_4 代表氫或羥基，

R_5 代表氫、 $-COR_{10}$ （其中 R_{10} 為未經取代或經羥基取代之 C1-C4-烷基或經取代或未經取代之 C1-C4-羧烷基），

或 R_4 和 R_5 一起代表合氧基，

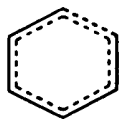
R_6 代表氫、甲基、合氧基或羥基，

R_7 代表氫、甲基、合氧基或羥基，

R_8 代表氫、甲基或鹵化物，且

R_9 代表氫、甲基、羥基、合氧基或鹵化物，

其中 R_1 、 R_2 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_8 及 R_9 中至少一者為羥基，且該結構元件



代表苯環或具有 0、1 或 2 個 C-C 雙鍵的 C6 環，

其中該羥類固醇化合物在輔因子 NAD 或 NADP 的存在下藉由羥類固醇去氫酶而氧化，該方法的特徵在於：

a) 在反應中提供該羥類固醇化合物，其濃度為 ≥ 50 g/l，

b) 藉由通式 $R_X R_Y CO$ 之酮化合物的還原作用（其中

R_X 、 R_Y 係各別表示分支或未分支的 C1-C8-烷基且 C_{全部} ≥ 3) 或藉由 C4-C6 環烷酮的還原作用，持續再生成由羧類固醇去氫酶形成的還原輔因子 NADH 或 NADPH，及

c) 另使用氧化還原酶/醇去氫酶以分別還原該通式 $R_X R_Y CO$ 之酮化合物或該環烷酮。

15. 如申請專利範圍第 14 項之方法，其中使用丙酮、2-丁酮、2-戊酮、4-甲基-2-戊酮、2-己酮、2-庚酮、5-甲基-2-己酮或 2-辛酮作為該通式 $R_X R_Y CO$ 之酮，且使用環己酮作為該環烷酮。

16. 如申請專利範圍第 14 或 15 項之方法，其中該方法係在水/有機之二相系統中實施。

17. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中另使用選自二乙醚、三級丁基甲基醚、二異丙醚、二丁醚、乙酸乙酯、乙酸丁酯、庚烷、己烷或環己烷之有機溶劑。

18. 如申請專利範圍第 14 或 15 項之方法，其中 TTN (全部更換數=氧化的羧類固醇化合物之莫耳數/所使用的輔因子之莫耳數) 為 $\geq 10^3$ 。

19. 如申請專利範圍第 14 或 15 項之方法，其中在 2 至 96 小時內將至少 50% 所使用的羧類固醇化合物氧化為酮類固醇化合物。