

**肆、聲明事項：**

本案係符合專利法第二十條第一項  第一款但書或  第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

本案申請前已向下列國家（地區）申請專利：

1. 美國；2002 年 11 月 07 日；60/424,488

2.

3.

4.

5.

主張國際優先權(專利法第二十四條)：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國；2002 年 11 月 07 日；60/424,488

2.

3.

4.

5.

主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

## 玖、發明說明：

### 技術領域

某些特定的 C-7 經取代類固醇，例如：依普利酮 (eplerenone)，因其醛固酮對抗劑活性而已為吾人所熟知並因此對於循環系統疾病的治療和預防很有用。Eplerenone 是數個專利和申請案，如：美國專利號 4,559,332 和 5,981,744 及國際公告案 WO 98/25948 及 WO 97/21720 之主題。然而，由於 eplerenone 具有更新且更廣泛的臨床用途，因此有必要改善這個類固醇和其他相關類固醇的製造方法。對於 eplerenone 和其他相關類固醇化合物之有效合成的一個主要障礙就是在 C-7 位置上導入羧基或可能轉換成羧基之官能基。

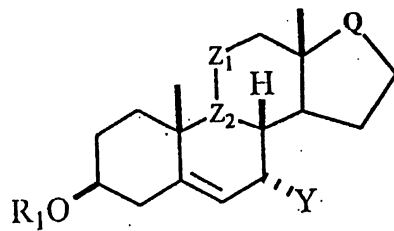
### 先前技術

烯丙衍生物，特別是烯丙基醋酸酯、苯甲酸酯、三甲基乙酸酯及其類似物，已為吾人所知在一路易士酸之影響下可和親核劑反應，此方法如前所述稱為烯丙化反應。烯丙化反應已經應用在很多受質上，例如，glycals 已顯示可藉烯丙化反應產生烯丙基糖苷、氰化糖苷和疊氮糖 (glycosal azide) (Yadav, J. S., et. al., Tetrahedron Lett., 2001, 42, 4057.)。烯丙基醋酸酯和碳酸酯可產生對應之氰化物 (Yasushi, T., et. al., J. Org. Chem., 1993, 58, 16)。多電子芳基和雜芳族可產生對應之烯丙化產物 (Malkov, A. V., et. al., J. Org. Chem., 1999, 64, 2751)。然而烯丙化反應，並未應用至類固醇以產生有利於轉變成 7-羧基取代類固醇例如依普

利酮之7-取代類固醇。3,17-二乙醯氧-7-羥雄固烷-5-烯，或對應之7-甲烷磺酸酯，已經利用粗觸媒氯化鋁與酚和甲氧苯反應(Negi, A. S., et. al., Steroids, 1995, 60, 470)。此結果物7-芳基衍生物則以C-7表異構物之混合物在低產量下產生。進而，要將此7-芳基衍生物使用在7-羧基取代類固醇之製備上將有困難。

### 發明內容

本發明係關於一種製備化學式I之新穎7-羧基取代類固醇化合物之方法，



化學式I

其中  $R_1$  是 H 或  $-COR_2$ ；

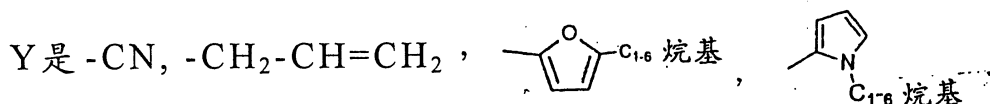
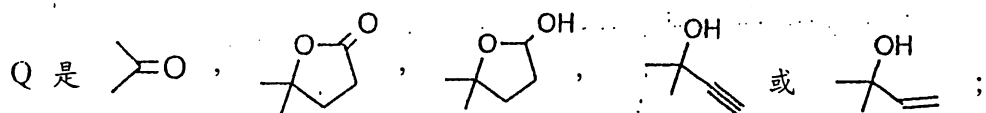
$R_2$  是  $C_1$ - $C_6$  烷基或是  $C_1$ - $C_6$  烷氧基；

$Z_1$  是  $CH_2$  或  $\begin{matrix} O-R_3 \\ | \\ -C- \\ || \end{matrix}$ ，此中的  $OR_3$  呈  $\alpha$  組態；

$R_3$  是 H 或  $-COR_2$ ；

$Z_2$  是  $-CH-$ ；或

$Z_1$  和  $Z_2$  之間可能形成碳-碳雙鍵；



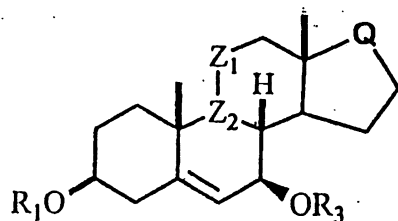
$\text{CHR}_4\text{C}(\text{O})\text{Ar}$  ,  $\text{CHR}_4\text{C}(\text{O})\text{C}_{1-6}$  烷基、 $\text{CHR}_4\text{C}(\text{O})\text{XAr}$  或  
 $\text{CHR}_4\text{C}(\text{O})\text{XC}_{1-6}$  烷基；

其中  $\text{R}_4 = \text{OC}_{1-6}$  烷基或芳基

$\text{X} = \text{O}$  或  $\text{S}$

此等新穎中間產物在製備 7-羧基取代類固醇化合物時很有用，而且特別的是，本發明是製備 9,11 $\alpha$ -環氧-17 $\alpha$ -羥基-3-氧娠-4-烯-7 $\alpha$ -21-二羧酸、 $\gamma$ -內酯、甲基醚（依普利酮；epoxymexrenone）的一個有利之新方法。

本發明之方法中的一個關鍵步驟是化學式 II 之新類固醇中間產物在一路易士酸觸媒存在下與一親核劑發生反應，



化學式 II

其中  $\text{R}_1$  和  $\text{R}_3$  係單獨自  $\text{H}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{OR}_2$  或  $\text{COR}_2$  選出以及  $\text{R}_1$  或  $\text{R}_2$  中至少有一個是  $\text{C}(\text{O})\text{OR}_2$  或  $\text{COR}_2$ ；

$\text{Z}_1$ 、 $\text{Z}_2$ 、 $\text{R}_2$  和  $\text{Q}$  同化學式 I 所示；

該親核劑係選自  $\text{C}_{1-4}$ -三烷基矽烷基氯化物、 $\text{C}_{1-4}$ -三烷基矽烷基烯醇醚、 $\text{C}_{1-4}$ -三烷基矽烷基氧烯酮硫縮醛（即  $\text{RCH}=\text{C}(\text{OSiR}_3)\text{SRC}_{1-6}$  烷基）、烯丙基三- $\text{C}_{1-4}$ -烷基矽烷、烯丙基三- $\text{C}_{1-4}$ -烷基錫烷、2- $\text{C}_{1-4}$ -烷基咪喃和 2- $\text{C}_{1-4}$ -烷基吡咯。

在化學式 II 之化合物中殘留一烯丙基醇類衍生物之結構元素於 C-5，-C6，-C7- $\text{OR}_3$ 。由此「烯丙化」反應所獲得之

新合成圖示將於「具體實例之說明」中詳細說明。

### 實施方式

#### 定義

在此詳細說明中，將使用下列定義。

「烷基」這個名詞，就其本身或是當成另一取代基之部分，意指(除非另有說明)一直鏈或帶有支鏈或是環烴自由基，或三者之結合。飽和烴自由基之實例包括(但不限於)例如甲基、乙基、正-丙基、異丙基、正-丁基、第三丁基、異丁基、第二丁基、環己基、(環己基)乙基、環丙基甲基、例如正-戊基、正己基、正庚基、正辛基和其他類似之同系物和異構物。

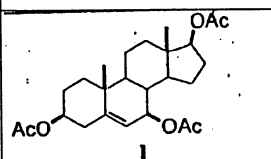
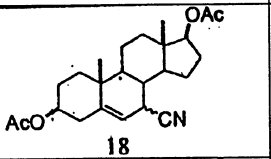
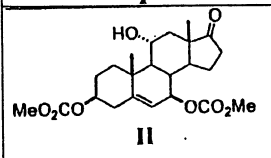
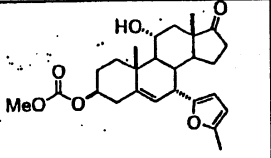
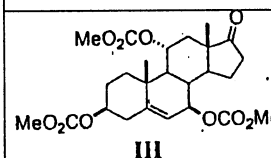
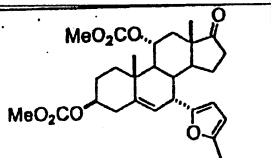
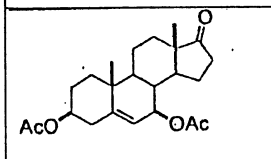
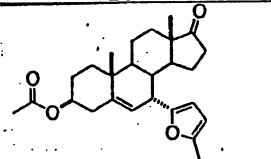
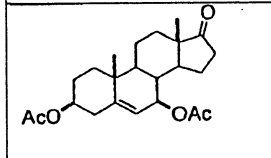
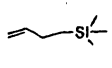
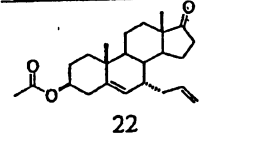
「芳基」(Ar)這個名詞，可單獨使用或和其他名詞結合使用(例如芳氧基、芳硫氧基、芳烷基)，係指(除非另有說明)一個單環或多環(最多三個環)之芳取代基，其係融合在一起或以共價鍵結。

「親核劑」這個名詞意指如 Morrison, R. T., et. al., Organic Chemistry, 6<sup>th</sup> edition, Prentice Hall pub., 1992, p. 172. 中說明之傾向於攻擊碳核之富電子試劑。

「路易氏酸」這個名詞意指如 McQuarrie, D. A., et. al., General Chemistry, third edition, W. H. Freeman and Company pub., 1991, p. 665. 中定義之電子對接受者。

驚訝的是，發明人已經發現化學式II之C-7-羥基-C-5<sup>Δ</sup><sup>6</sup>-烯類固醇之羧基衍生物將和多種親核劑發生烯丙化反應以產生如表一所示之化學式I之對應C-7取代類固醇衍生物。適

用之親核劑包括(但不限於)在一路易士酸觸媒存在下之C1-4-三烷基矽烷基氰化物、C1-4-三烷基矽烷基烯醇醚、C1-4-三烷基矽烷基氧烯酮硫縮醛(RCH=C(OSiR<sub>3</sub>)SRC<sub>1-6</sub>烷基)、烯丙基三-C1-4-烷基矽烷、烯丙基三-C1-4-烷基錫烷、2-C1-4-烷基咪喃和2-C1-4-烷基吡咯。適用之路易士酸包括(但不限於)過渡元素三氟甲磺酸鹽(triflates) (OTf=OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)例如 Sc(OTf)<sub>3</sub>、Ce(OTf)<sub>3</sub>、Fe(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>,和 Yb(OTf)<sub>3</sub>, 以及鉬(II)錯合物如 Mo(CO)<sub>5</sub>(OTf)<sub>2</sub>和 [Mo(CO)<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>]<sub>2</sub>。

| 類固醇受質  | 親核劑   | 觸媒                   | 溶劑/溫度          | 產物  | 產量 % |
|--|---|----------------------|----------------|---|------|
| <br>I    | TMSCN   | Sc(OTf) <sub>3</sub> | 乙腈/RT          | <br>18  | 40   |
| <br>II  | 二甲基咪喃   | Sc(OTf) <sub>3</sub> | 二氯甲烷<br>0-15°C | <br>19 | 74   |
| <br>III | 二甲基咪喃   | Sc(OTf) <sub>3</sub> | 乙腈/室溫          | <br>20 | 96   |
| <br>IV  | 二甲基咪喃   | Sc(OTf) <sub>3</sub> | 二氯甲烷/室溫        | <br>21 | 63   |
|  | 二甲基咪喃   | Sc(OTf) <sub>3</sub> | 乙腈/室溫          |   | 87   |
|  | 二甲基咪喃   | Ce(OTf) <sub>3</sub> | 乙腈/14°C        |   | 77   |
|  | 二甲基咪喃   | Yb(OTf) <sub>3</sub> | 乙腈/室溫          |   | 96   |
| <br>V   |  | Sc(OTf) <sub>3</sub> | 乙腈/室溫          | <br>22 | 83   |

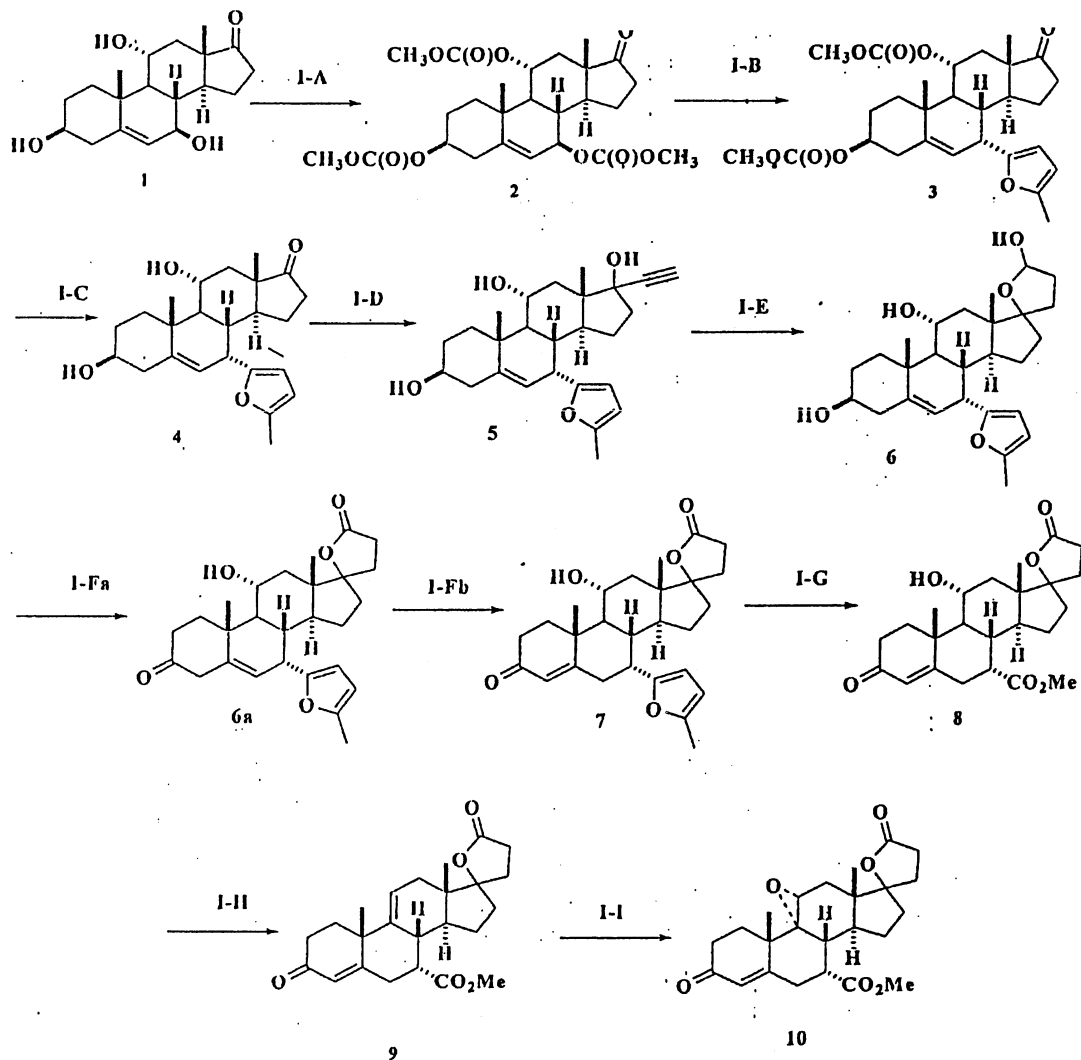
TMSCN=三甲基矽烷基氰化物

表 1

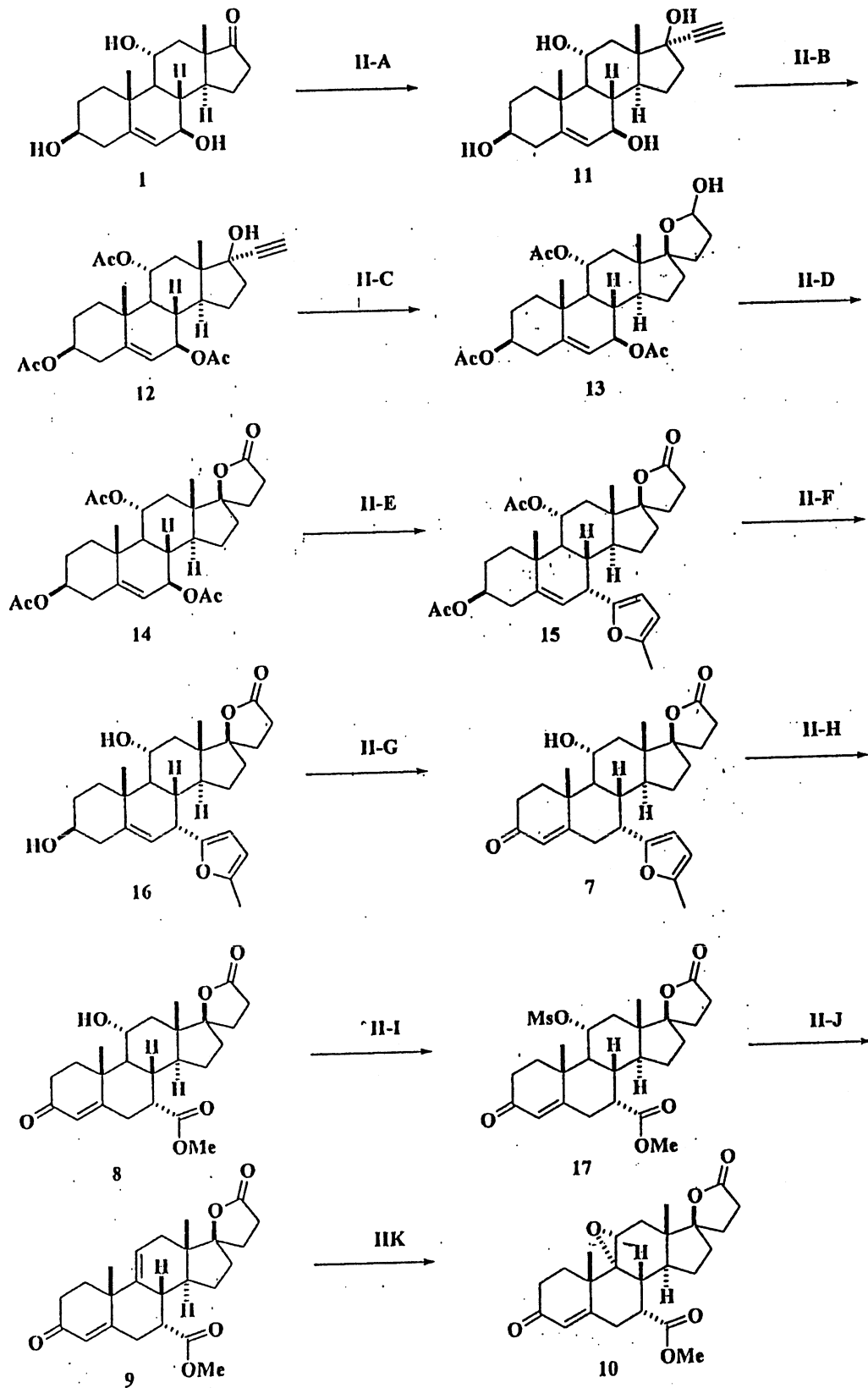
然而，在相似情況下，吡啶和苔黑酚之產量小於10%且生成錯化物混合物。乙烯三甲基矽烷和三甲基矽烷基乙醯烯不會反應。

### 圖示概要

如上述，化學式I之化合物可用於作為依普利酮之合成的起始物。反應圖I和II提供一利用本發明方法製造之化學式I之化合物製備依普利酮之反應流程圖例。



圖示 I



圖示 II

作為圖示 I-II 之起始物 1 (圖示 I) (3 $\beta$ ,7 $\beta$ -11 $\alpha$ -三羥-5-雄固烯 -

17-酮)之製備可由兩種方式獲得。一種方法是使5-雄固烯-3 $\beta$ -醇-17-酮首先接觸一浸有 *Diplodia gossypina* ATCC 20571(同 *Botryodiplodia theobromae* IFO 6469)的培養基以產生一5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -二醇-17-酮(見實例10)，之後讓5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -二醇-17-酮與一個浸有 *Aspergillus ochraceus* ATCC 18500之培養基接觸以產生5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -三醇-17-酮1(圖示I)。或者，可將5-雄固烯-3 $\beta$ -醇-17-酮與一浸有 *Absidia coerulea* ATCC 6647之培養基接觸以產生5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -三醇-17-酮1(圖示I)。

#### 步驟 I-A 和 IIB

羥基中間產物1和11(圖示II)在一個三級有機鹼存在下藉由此技藝中熟知之方法利用一醯化劑使其發生醯化作用以產生2和12。醯化劑包括低醇酐、低醇基氯化物、低烷基羰基氯化物、低烷基碳酸酐和其類似物。適合的三級有機鹼包括吡啶、4-二甲基胺基吡啶、三乙基胺、二異戊基乙基胺和其類似物。或者，混合碳酸鹽(RO-CO-O-)之製備可利用已公開的方法(Harada, T., et. al., J. Carbohydrate Chem., (1995), 14, 165)經修飾而在一三級有機鹼存在下藉由其與一烷氧基羰基氧苯三唑的反應而達成。

#### 步驟 I-B 和 II-E

經三醯化之化合物2(圖示I)和14(圖示II)在一路易士酸存在下，通常在一惰性溶劑例如乙腈或二氯甲烷下，與一親核劑所發生之反應，分別產生3(圖示I)和15(圖示II)。適用之親核劑包括(但不限於)三烷基矽烷基氯化物、3-矽烷取代烯

屬烴、烯醇醋酸酯、矽烷基烯醇醚、烯丙基錫烷、N-烷基吡咯、N,N-二烷基苯胺、矽烷基烯醇硫醚、矽烷基烯醇醚和富電子之雜芳族例如2-烷基取代咪喃。適用之路易士酸包括(但不限於)過渡元素三氟甲磺酸鹽(OTf = OSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)，例如 Sc(OTf)<sub>3</sub>、Ce(OTf)<sub>3</sub>和 Yb(OTf)<sub>3</sub>，以及鉬(II)錯合物如 Mo(CO)<sub>5</sub>(OTf)<sub>2</sub>和 [Mo(CO)<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>]<sub>2</sub>。

#### 步驟 I-C 和 II-F

3(圖示 I)和 5(圖示 II)之醯基經水解反應以產生 4(圖示 I)或 16(圖示 II)可利用甲醇當成溶劑，並視情況加入一共同溶劑，使用一鹼土族氫氧化物、碳酸氫鹽或碳酸鹽如氫氧化鈉、碳酸鉀、碳酸氫鈉、氫氧化銫、碳酸氫鋰和其類似物以完成反應。

#### 步驟 I-D 和 II-A

如文獻(見實例：Schwede, W., et.al., Steroids, 63 166(1998); Corey, E. J. et.al., J. Amer.Chem.Soc.(1999), 121, 710-714; Schwede, W. et.al., Steroids(1998), 63(3), 166-177; Ali, H. et.al., J. Med. Chem.(1993), 36(21), 3061; Turuta, A. M. et.al., Mendeleev Commun. (1992), 47-8; Kumar, V. et.al., Tetrahedron (1991), 47(28), 5099; Page, P. C., Tetrahedron(1991), 47, 2871-8; Curts, S. W. et. al., Steroids(1991), 56, 8; Kataoka, H. et. al., Chem. Lett. (1990), 1705-8; Christiansen, R. G. et. al., J. Med. Chem. (1990), 33(8), 2094-100)所述步驟，17-酮氧中間產物 4(圖示 I)和 1(圖示 I)可與乙炔反應以提供對應的加成化合物 5(圖示 I)和 11(圖

示II)。視情況，在步驟II-A中之三羥基化合物1可在添加乙炔前未經分離下進行三甲基矽烷化反應。矽烷化反應可利用六甲基二矽氮烷和一微酸觸媒例如氯化三甲基矽烷或糖精反應而達成。隨乙炔加入後，於進行微礦物酸、醋酸、磷酸、氯化四-烷基銨和其類似物反應期間將三甲基矽烷基移除。

#### 步驟E

乳酸- $\beta$ -萘酯中間產物6(圖示I)和13(圖示II)之形成可如文獻(Wuts, P. G. M., et. al., J. Org. Chem. 1989, 54, 5180; Botteghi, C., et. al., Tetrahedron, 2001, 57, 1631)中說明的方法由5和12與一氧化碳和氫在一達催化量的銻觸媒和一銻對應配位子的存在下進行氫化甲醜反應而達成。此反應可在每平方吋14-500磅(psi)的壓力下發生，最佳壓力範圍是每平方吋100-200磅(psi)。氫和一氧化碳的比例從1/5至5/1皆可，最佳比例為1/1。適合的銻觸媒包括醋酸銻、氯化銻和二羰基乙醜丙酮銻II。適合的配位子包括三芳膦、三烷基亞磷酸酯、雙配位基膦例如xantphos、二齒亞磷酸鹽和其類似物。

#### 步驟I-Fa和II-D

6(圖示I)形成6a以及16(圖示II)形成7(圖示II)之氧化反應可由多種標準氧化劑達成。適合的氧化劑實例包括：碘琥珀醜亞胺／四丁基銨碘化物(Kraus, George A. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2000), 10(9), 895-897; Barrett, A. G. M., et. al., J. Org. Chem. (1989), 54(14), 3321); 瓊斯試劑(鉻酸在丙酮中)(Panda, J., et. al., Tetrahedron Letters

(1999), 40, 6693; Tomioka, K., et. al., J. Org. Chem. (1988), 53(17), 4094); 碳酸銀 (Chow, T. J., et. al., J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1, (1999), 1847) ; 氯鉻酸吡啶鎔 (Pyridinium chlorochromate)(Uchiyama, M., et. al., Tetrahedron Letters (2000), 41(51), 10013; Vanderiei, J. M. de L., Synthetic Communications (1998), 28(16), 3047; Kassou, M., et. al., Journal of Organic Chemistry (1997), 62, 3696; Rehnberg, N., et. al., J. Org. Chem. (1990), 55(14), 4340-9; RuO<sub>4</sub>/四烷基銨鹽/三級胺N-氧化物, Jeewoo, K., et. al., Chem. Lett. (1995), (4), 299; 二鉻酸吡啶鎔 (pyridinium dichromate), Paquette, L. A., et. al., J. Am. Chem. Soc. (1995), 117(4), 1455-6); 次氯酸鈉 / 三級胺N-氧化物 (Waldemar, A., et. al., Chem. Rev., (2001), 101, 3499); 鋁烷氧化物 / 丙酮 (Ooi, T., et. al., Synthesis (2002), 279); Djerassi, C. et. al., Org. React. (1951), 6, 207); 三丙酮氧四碘苧烷 (Martin, J. C., et. al., J. Amer. Chem. Soc., (1991), 113, 7277)。

#### 步驟 Fb

在此些發生在步驟 Fa 之未共軛 5-6 雙鍵的氧化反應範例中，在 6a (圖示 I) 將雙鍵由 C<sub>5-6</sub> 位置移入 C<sub>4-5</sub> 位置之過程可在一惰性有機溶劑或一水性混合溶劑中於溫度 0°C - 80°C 利用 6a (圖示 I) 與一有機或無機酸進行接觸而完成。適合之有機酸包括 (但不限於) 甲苯磺酸、甲烷磺酸、苯磺酸、三氟醋酸、草酸、三氟醋酸和其類似物。適合之無機酸包括 (但不限於) 氫氯酸、氫溴酸、磷酸、過氯酸和其類似物。或者，觸媒可

為一三級有機鹼如三乙基胺、二氮雜雙環十一烷(DBU)和類似物或一無機鹼如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化鈣和其類似物。雙鍵移入反應已說明於Bakshi, et. al., U.S. Patent No. 5,237,064; Pollack, et. al., J. Amer. Chem. Soc., 1987, 109, 5048; Tsubuki, et. al., J. Org. Chem., 1992, 57, 2930; Zeng, et. al., J. Amer. Chem. Soc., 1991, 113, 3838。

步驟 I-H 和 II-I, J

11-羥基中間產物 7(圖示 I)和 18(圖示 II)之脫水反應可利用已說明於 U. S. Patent 4,559,332 之五氯化磷來完成。或者，11-羥基中間產物可轉變成一磺酸酯，例如一甲烷磺酸酯或一對-甲苯磺酸酯，接著如在 WO97/21720 和 WO98/25948 所說明之以一個鹼作用在脫水反應中來處理而完成。

步驟 I-H 和 II-H

在 7(圖示 I)中之呋喃環降解成 8(圖示 II)之甲基酯可由實例中所說明之臭氧分解、氧化作用和酯化作用而完成。

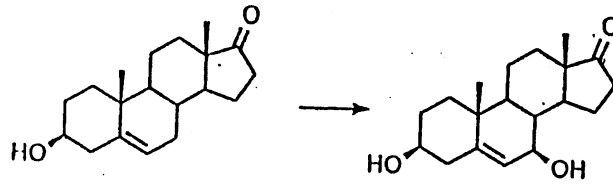
步驟 I-J 和 II-K

此已知中間產物 9(圖示 I)至 10(圖示 II)(依普利酮)的轉化反應在美國專利號碼 4,559,332 和 5,981,744 中已說明。

實例

起始物 1 之製備，方法 1

步驟 1：5-雄固烯-3 $\beta$ -醇-17-酮行生物轉化成 5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -二醇-17-酮



5-雄固烯-3 $\beta$ -醇-17-酮之生物轉化成5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -二醇-17-酮是利用一浸有 *Diplodia gossypina* ATCC 20571(同 *Botryodiplodia theobromae* IFO 6469)的培養基在一10公升之發酵槽中進行。

#### (A) 一級接種階段

*Diplodia gossypina* (ATCC 20571)之冷凍植物性細胞經解凍，轉換到蕃薯-右旋糖-瓊脂板(PDA)，並在28 $^{\circ}$ C培養72小時。單一菌絲塞(直徑6-7 mm)可用以接種至一含100 mL一級接種培養基之砂化(500 mL)脫色振盪燒瓶內。一級接種培養基的組成份(每公升逆滲透水)為：右旋糖50 g、黃豆粉35 g、cerelose 5 g、氯化鈷六水合物(cobalt chloride hexahydrate) 2 mg、聚矽氧消泡劑(SAG 471) 0.5 mL，以氫氧化鈉(2 N)將預滅菌之pH值調整至7.0-7.2。將 *Diplodia gossypina* ATCC 20571接種至培養基並利用一環境控制培養箱震盪器以280 r.p.m. (1" orbital stroke)之速度震盪在28 $^{\circ}$ C下培養48小時。

#### (B) 二級接種階段

10升二級接種發酵作用可利用1.2 mL植物性一級接種培養基(0.012% [v/v]接種率)來接種。二級接種培養基含有(每公升逆滲透水)：cerelose 60 g、黃豆粉25 g、大豆油30

mL、硫酸鎂七水合物 1 g、二氫磷酸鉀 0.74 g、聚氧乙基二烯花楸丹單油酸 2 mL、聚矽氧消泡劑(SAG 471) 0.5 mL，利用濃縮之硫酸將預滅菌 pH 值調整至 3.95-4.00。內含二級種子培養基之發酵器可利用套層和噴射兩種蒸氣法於 121°C 滅菌 20 分鐘。滅菌期間之攪拌速率是 200 r.p.m.。後滅菌作用進行時，利用無菌硫酸(5%)將培養基 pH 值調整至 4.0。利用下列初參數於 28°C 培養 *Diplodia gossypina* ATCC 20571：以 100 r.p.m. 攪拌、背壓 = 5 psig、氣流 = 2.5 SLM (0.25 VVM)、低 DO 設定點 30%、不需控制 pH 值。當 DO 值首次降至 30% 時，氣流將增加至 5 SLM (0.5 VVM)。當培養基再度達到低 DO 值時，可利用攪拌控制維持 30% 之 DO 值。於大約經過 60 小時之後接種過程，當 OUR 大約介於 10 和 15 mM/L/h 之間時，即可得二級接種培養基。

### (C) 類固醇生物轉化作用

10 升類固醇發酵作用可利用 500 mL 植物性二級接種培養基(5% [v/v] 接種率)來接種。類固醇生物轉化培養基和二級接種培養基相同，滅菌條件和 pH 值調整係如同說明過之二級接種培養基。*Diplodia gossypina* ATCC 20571 於 28°C 利用基本上與那些在二級接種培養基中使用之初參數相同之條件進行培養，例外的是低 DO 設定點將從 30% 增高至 50%。當 DO 值首次降至 50% 時，氣流將從 2.5 SLM (0.25 VVM) 增加至 5 SLM (0.5 VVM)。當培養基再度達到低 DO 值時，可利用攪拌控制維持 50% 之 DO 值。開始於 24 小時後接種作用中，將經微米化且攪入一極小體積之 0.2% 聚氧乙基花楸丹單油

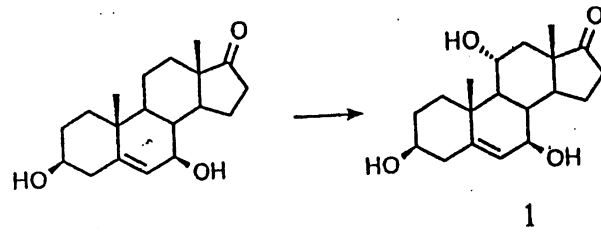
酸之5-雄固烯-3 $\beta$ -醇-17-酮以每一小時之時間間隔加入到發酵作用中直至加入總量達400 g為止。在大約3天之後接種培養中，將額外之100 g cerelose加入10 L發酵作用中。

生物轉化培養基應利用TLC每日檢定其5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -二醇-17-酮。一毫升之全啤酒可用10 mL甲醇萃取。細胞可利用離心法(3,000 x g離心10分鐘)由水性-甲醇混合物中分離出，且有數微升可應用在TLC板上。TLC板由環己烷：醋酸乙酯：甲醇(90:60:15)發展出來且此產物可藉由將50%硫酸噴霧灑在TLC板上接著在烤箱中烤成焦黑狀看出。將產物和人造標準產物比較後發現，此產物經噴灑50%硫酸後會轉為藍色。5-雄固烯-3 $\beta$ -醇-17-酮經生物轉化完全轉化成5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -二醇-17-酮約需4天之後接種作用。

#### (D)分離方法

將培養中之全啤酒固體經過離心並利用離心方法恢復其豐富固體。利用10 L二氯甲烷萃取豐富固體部分且利用離心方法恢復其豐富萃取物溫萃取物。將萃取物經磨光並利用蒸餾將其濃縮至大約1升且將結晶漿狀物冷卻至-10 $^{\circ}$ C，結晶可經由過濾復原、以二氯甲烷清洗使之脫色並經乾燥而產生227公克之5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -二醇-17-酮之純化結晶物。

步驟2：5-雄固烯-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -醇-17-酮之生物轉化形成5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -三醇-17-酮



5-雄固烯-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -醇-17-酮之生物轉化成5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -三醇-17-酮可利用一含有 *Aspergillus ochraceus* ATCC 18500(同NRRL 405)之培養基在一個10公升發酵槽中進行。

#### (A) 一級接種階段

*Aspergillus ochraceus* ATCC 18500之一級接種培養基可如實例12中所說明用以製備 *Diplodia gossypina* ATCC 20571之方法來製備。

#### (B) 二級接種階段

10升二級種子發酵作用可利用1.2 mL植物性一級種子培養基(0.012 % [v/v]接種率)來接種。二級種子培養基含有(每公升逆滲透水): cerelese 40 g、黃豆粉 25 g、黃豆油 30 mL、硫酸鎂六水合物 1 g、二氫磷酸鉀 0.74 g、壬基酚氧聚乙氧基乙醇 0.25 mL、聚矽氧消泡劑(SAG 471) 0.5 mL, 利用濃縮之硫酸將預滅菌pH值調整至3.95-4.00。內含二級種子培養基之發酵器可利用套層和噴射兩種蒸氣法於121 $^{\circ}$ C滅菌20分鐘。滅菌期間之攪拌速率是200 r.p.m., 後滅菌作用進行時, 利用無菌硫酸(5%)將培養基pH值調整至4.0。利用下列初始參數於28 $^{\circ}$ C下培養 *Aspergillus ochraceus* ATCC 18500: 以100 r.p.m.攪拌、背壓 = 5 psig、氣流 = 2.5 SLM

(0.25 VVM)、低DO設定點50%、不需控制pH值。當DO值首次降至50%時，氣流將增加至5 SLM (0.5 VVM)。當培養基再度達到低DO值時，可利用攪拌控制維持50%之DO值。經50-54小時之後接種過程，當OUR大約介於20和26 mM/L/h之間時即可得二級接種培養基。

### (C)類固醇生物轉化作用

10升類固醇發酵作用可利用500 mL植物性二級接種培養基(5%[v/v]接種率)來接種。類固醇生物轉化培養基基本上和二級接種培養基相同，例外的是壬基酚氧聚乙氧基乙醇將從0.25 mL/L增至2 mL/L，且以濃縮硫酸將預滅菌過程之pH值調整至2.95-3.00。滅菌條件和說明過之二級接種培養基相同。後滅菌過程中，培養基之pH值利用無菌硫酸(5%)調整至3.0。*Aspergillus ochraceus* ATCC 18500於28°C利用基本上與那些在二級接種培養基中使用之初參數相同之條件進行培養，例外的是攪拌最初是設定在200 r.p.m.。在大約18小時之後接種作用中，將200 g經微米化之5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -二醇-17-酮，並且攪入一極小體積之0.2%壬基酚氧聚乙氧基乙醇加入到10 L發酵作用中。

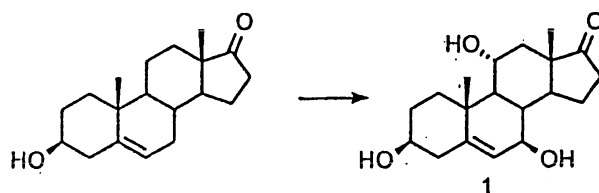
生物轉化培養基應利用TLC每日檢定其5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -三醇-17-酮，如實例10所說明。5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -二醇-17-酮經生物轉化完全轉化成5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -三醇-17-酮約需4天之後接種作用。

### (D)分離方法

將培養中之全啤酒固體經過離心。將液體丟棄，利用10

L 80%丙酮20%水於45°C至50°C萃取豐富固體部分且將溫萃取物利用過濾法使之澄清。豐富濾液經蒸餾法濃縮以除去會產生粗結晶水性漿液之丙酮。結晶漿液經過濾後將母液丟棄。水濕性結晶可用600 ml二氯甲烷研製以除去不純物，並將之溶解在700 ml甲醇中（藉由加熱至55°C），並在之後利用5 g Darco G-60碳脫色。經過濾除去碳之後，濾物可經濃縮結晶出此產物。此甲醇可進一步利用加入300 mL正-丁基醋酸加以除去並濃縮成一厚漿狀結晶。結晶物經過濾後，以醋酸正丁酯清洗，並予以乾燥產生158 g之5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -三醇-17-酮之純結晶物。

1之製備，方法2：5-雄固烯-3 $\beta$ -醇-17-酮之生物轉化形成5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -三醇-17-酮



1

5-雄固烯-3 $\beta$ -醇-17-酮之生物轉化成5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -三醇-17-酮可利用一含有*Absidia coerulea* ATCC 6647之培養基在一個10公升發酵槽中進行。

#### (A) 一級接種階段

*Absidia coerulea* ATCC 6647之一級接種培養基可如實例12中所說明之用以製備*Diplodia gossypina* ATCC 20571之方法來製備。

### (B) 二級接種階段

10升二級接種發酵作用可利用1.2 mL植物性一級種子培養基(0.012 % [v/v]接種率)來接種。二級接種培養基含有(每公升逆滲透水): 右旋糖50 g、黃豆粉35 g、cerelose 5 g、氯化鈷六水合物(cobalt chloride hexahydrate) 2 mg、聚矽氧消泡劑(SAG 471) 0.5 mL, 以氫氧化鈉(2 N)將預滅菌之pH值調整至4.95-5.00。內含二級種子培養基之發酵器可利用套層和噴射兩種蒸氣法於121°C滅菌20分鐘。滅菌期間之攪拌速率是200 r.p.m., 後滅菌作用進行時, 利用無菌硫酸(5%)將培養基pH值調整至5.0。利用下列初始參數於28°C下培養*Absidia coerulea* ATCC 6647: 以100 r.p.m.攪拌、背壓=5 psig、氣流=2.5 SLM (0.25 VVM)、低DO設定點50%、不需控制pH值。當DO值首次降至30%時, 氣流將增加至5 SLM (0.5 VVM)。當培養基再度達到低DO值時, 可利用攪拌控制維持30%之DO值。經76小時之後接種過程, 當OUR大約介於4和7 mM/L/h之間時即可得二級接種培養基。

### (C) 類固醇生物轉化作用

10升類固醇發酵作用可利用500 mL植物性二級接種培養基(5% [v/v]接種率)來接種。類固醇生物轉化作用培養基含有(每公升逆滲透水): 右旋糖50 g、黃豆粉35 g、cerelose 20 g、聚矽氧消泡劑(SAG 471) 0.5 mL, 以濃縮硫酸將預滅菌之pH值調整至2.95-3.00。滅菌條件和pH值調整和說明過之二級接種培養基相同。後滅菌作用中, 培養基之pH值可利用無菌硫酸(5%)調整至3.0。*Absidia coerulea*

ATCC 6647於28°C利用基本上與那些在二級接種培養基中使用之初參數相同之條件進行培養。於17小時後接種作用中，將200 g經微米化之5-雄固烯-3 $\beta$ -醇-17-酮，攪入一極小體積之0.2%壬基酚氧聚乙氧基乙醇加入到10 L發酵作用中。

生物轉化培養基應利用TLC每日檢定其5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -三醇-17-酮，如實例1所說明。5-雄固烯-3 $\beta$ -醇-17-酮經生物轉化完全轉化成5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -三醇-17-酮約需經6-7天之後接種作用。

#### (D)分離方法

全啤酒固體可經過離心而復原。將液體丟棄，利用10 L 85%丙酮15%水於45°C至50°C萃取豐富固體部分且將溫萃物利用過濾法使之澄清。豐富濾液經蒸餾法濃縮以除去會產生粗結晶水性漿液之丙酮。結晶漿液經過濾後將母液丟棄。水濕性結晶可用600 ml二氯甲烷研製以除去不純物，並將之溶解在700 ml甲醇中（藉由加熱至55°C），並在之後利用5 g Darco G-60碳脫色。經過濾除去碳之後，濾物可經濃縮結晶出此產物。此甲醇可進一步利用加入300 mL醋酸正丁酯加以除去並濃縮成一厚漿狀結晶。結晶物經過濾後，以醋酸正丁酯清洗，並予以乾燥產生75.5 g之5-雄固烯-3 $\beta$ ,7 $\beta$ ,11 $\alpha$ -三醇-17-酮之粗結晶物。

此粗結晶物可用600 ml二氯甲烷研製以除去不純物，並將之溶解在700 ml甲醇中（藉由加熱至55°C），並在之後利用5 g Darco G-60碳脫色。經過濾除去碳之後，濾物可經濃縮

結晶出此產物。此甲醇可進一步利用加入300 mL醋酸正丁酯加以除去並濃縮成一厚漿狀結晶。結晶物經過濾後，以醋酸正丁酯清洗，並予以乾燥產生42.1 g之5-雄固烯-3 $\beta$ , 7 $\beta$ , 11 $\alpha$ -三醇-17-酮之純結晶物。

實例1：三碳酸2之形成。

利用一3 N 250 ml RBF將三元醇1（圖示I）（10.00 g, 31 mmol）溶解在吡啶（100 ml）中，在此溶液中加入三乙基胺（31 ml, 218 mmol）、碳甲氧基苯三唑（24.2 g, 125 mmol）和4-N,N-二甲基胺基吡啶（1.2 g, 9.4 mmol）。將此漿狀物攪拌2小時使所有物質全部溶解，加入額外的碳甲氧基苯三唑（12 g, 62 mmol）和三乙基胺（10 ml, 73 mmol）。一旦固體溶解，反應就已完成。緩慢加入水（300 ml）並在冰浴中將此混合物冷卻。將沉澱物過濾並以10% HCl（2x35 ml）和己烷（3x50 ml）清洗並在真空烤箱中乾燥24小時以獲得標題化合物2（圖示I）。

$^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  217.78, 155.60, 155.23, 154.88, 144.48, 122.35, 78.58, 76.81, 75.39, 55.29, 54.93, 51.09, 49.47, 47.79, 38.48, 37.89, 36.19, 36.08, 27.96, 23.58, 19.07, 14.40。

實例2：咪喃3之形成。（圖示I）

將此反應7 mL乙腈中之三碳酸酯2（1.0 g, 2.02 mmol）溶液利用一2-甲基咪喃（0.2 mL, 2.22 mmol）和0.298 g之 $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ 處理一小時。利用薄層色層分析法TLC（30% EtOAc/Hex）顯示此反應已完成。以矽膠利用25% EtOAc/Hex進行色層分析法可產生0.92 g（96%產量）之咪喃3。 $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  217.88, 171.08, 155.34, 154.93, 152.38, 151.49, 140.72, 123.98,

110.56, 106.45, 77.50, 75.89, 60.51, 54.98, 54.71, 47.45, 46.57, 38.73, 37.66, 36.21, 35.91, 27.96, 22.22, 19.14, 13.98, 13.77。

實例 3：二元醇 4 之形成。（圖示 I）

將二碳酸酯 3 (1.0 g) 於 10 mL MeOH 之溶液經 500 mg  $K_2CO_3$  處理並加溫至 40°C。將此混合物攪拌至 TLC 顯示此反應已完成。完成時將此漿狀物倒入水中且產物可以 EtOAc 分離。有機濃縮物將產生二元醇 4 之黏性油脂。 $^1H$  NMR( $CDCl_3$ )  $\delta$  5.7 (s, H), 5.45(d,  $J=5.7$  Hz, 1 H), 3.45(m, 1 H), 3.29(t,  $J=5.1$  Hz, 1 H), 2.09(s, 3 H), 1.1(s, 3 H), 0.75(s, 3 H)。

實例 4：炔屬烴 5 之形成。（圖示 I）

將 2.8 g (25.0 mmol) t-BuOK 之 50 mL THF 之溶液在 -10°C 下利用乙炔噴霧 30 分鐘。之後在持續進行乙炔噴霧緩時慢慢加入 10 mL THF 中之酮類 11 溶液。在 -10°C 攪拌此混合物一小時並在之後加入含 2.0 mL 醋酸之 10 mL 水。在將混合物倒入水中之後以 EtOAc 萃取液分離出此產物。利用甲苯共沸液除去醋酸。此 NMR 光譜證明有少量醋酸和甲苯的存在。產量 2.25 g。 $^{13}C$  NMR( $CDCl_3$ )  $\delta$  153.77, 151.21, 142.66, 122.83, 110.12, 106.1, 87.3, 79.42, 74.03, 72.29, 69.48, 50.61, 47.49, 45.70, 43.64, 42.87, 39.38, 39.06, 38.29, 37.68, 31.84, 23.7, 21.26, 19.27, 14.19, 13.9。

實例 5：乳酸- $\beta$ -萘酯 6 之形成。（圖示 I）

將 1.55 g 炔屬烴 5 (圖示 I)、27 mg  $Rh_2(OAc)_2$  和 92 mg  $Ph_3P$  於 20 mL EtOAc 中之溶液利用 CO 加壓至 100 psi 並用  $H_2$  加

壓至 100 psi 並加熱隔夜至 80°C。將混合物濃縮並以矽膠利用 90% EtOAc/Hex 進行色層分析可產生 2 部分。部分 1 利用 NMR 顯示可恢復成起始物。部分 2 是希望得到之乳酸-β-萘酯。CMR 顯示乳酸-β-萘酯混合物在 94.8 和 94.5 ppm 有訊號顯示。

實例 6：5,6-烯酮 6a 之形成。(圖示 I)

將 - 2.0 g 乳酸-β-萘酯、50 mg 溴化鉀、12 mg TEMPO、800 mg NaHCO<sub>3</sub> 之混合物於 20 mL 之 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 和 5 mL 水中冷卻至 5°C，之後緩慢以 8 mL 之 1.1 M NaOCl 處理此混合物並保持溫度在 6°C 以下。經此加成反應之後攪拌此混合物 30 分鐘之後並利用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 將產物分離出以產生 6a (圖示 I)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 209.82, 176.37, 153.19, 151.78, 143.34, 128.15, 121.41, 110.62, 106.53, 94.35, 72.0, 55.39, 50.44, 47.99, 44.41, 42.26, 39.03, 38.63, 37.1, 35.67, 31.9, 29.19, 23.39, 18.33, 15.69, 14.07。

實例 7：利用酸形成 4,5-烯酮 7 (圖示 I)。

將 - 5,6-烯酮 6a (圖示 I) (500 mg) 和草酸 (200 mg) 之混合物在乙醇 (10 ml) 中於 40°C 加熱三小時。在減壓下除去乙醇並將殘留物溶解在醋酸乙酯 (50 ml) 中，將此有機溶液用水 (2x50 ml) 清洗過，以硫酸鈉乾燥並加以濃縮。此殘留物可利用管柱色層分析法以矽膠加以純化而得到 4,5-烯酮 7 (圖示 I)。

實例 8：利用鹼形成 4,5-烯酮 7。

將 - 5,6-烯酮 6a (500 mg) 和 DBU (200 mg) 之混合物於四氫呋

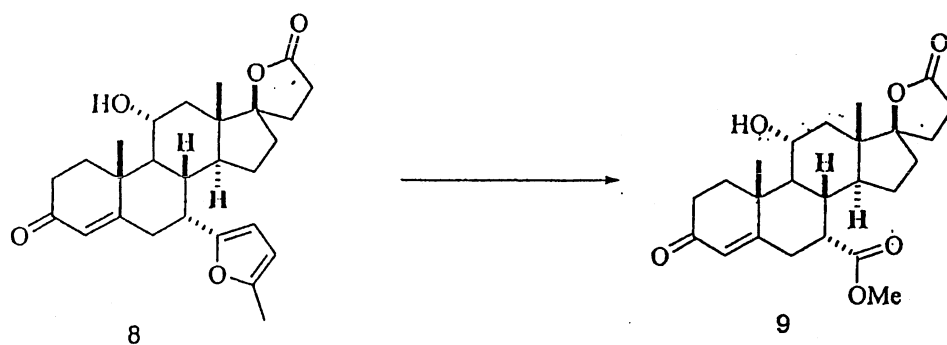
喃(5 ml)以回流方式加熱三小時，之後冷卻並用氯化銨溶液稀釋以及用醋酸乙酯萃取。此萃取物用硫酸鈉乾燥並加以濃縮。此殘留物可利用管柱色層分析法以矽膠加以純化而得到4,5-烯酮7。

實例9：二烯酮9之形成(圖示I)。

將1.2 g醇類7之溶液溶解在10 mL之THF中並冷卻至 $-33^{\circ}\text{C}$ ，之後將 $\text{PCl}_5$ (950 mg)全部一次加入。將溶液在 $-33^{\circ}\text{C}$ 下攪拌三小時之後並加水淬火。利用EtOAc將產物分離出而產生二烯9(圖示I)。利用矽膠色層分析法以EtOAc/Hex加以純化。

實例10：由呋喃取代物形成甲基酯。

方法A

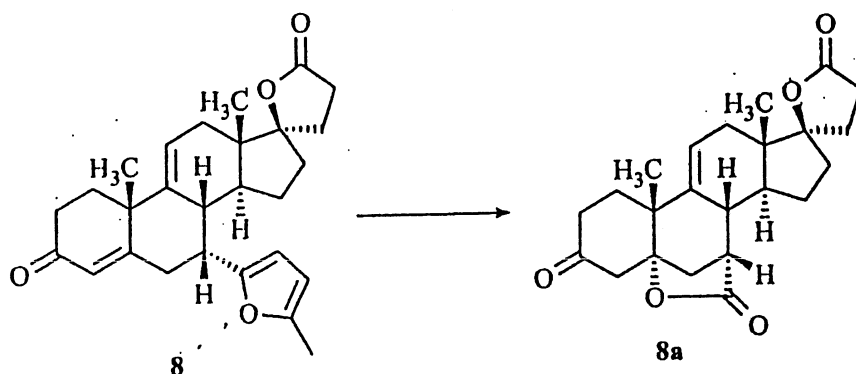


將一呋喃衍生物8(圖示I)(1.0 g, 2.280 mmol)在100 ml二氯甲烷之溶液冷卻至 $-79^{\circ}\text{C}$ ，將一臭氧/氧( $\text{O}_3/\text{O}_2$ )氣流通過此溶液10分鐘，之後將此混合物加溫之室溫，並濃縮成固體殘留物，將此放入50 ml 1/1 甲醇/二氯甲烷中，以1.0 ml吡啶處理，並在室溫下攪拌18小時。之後將此溶液冷卻至 $-18^{\circ}\text{C}$ 。將一臭氧/氧( $\text{O}_3/\text{O}_2$ )氣流通過此混合物4小時，之後用

100 ml 醋酸乙酯稀釋此混合物並用 70 ml 碳酸氫鈉水溶液萃取之。水相部分以氫氯酸水溶液進行酸化至 pH 0.5，之後用二氯甲烷萃取並濃縮成一泡沫(重：250 mg)。將此泡沫溶解在甲苯/甲醇中，在室溫下以三甲基矽烷基二偶氮甲烷(0.5 ml之 2.0 M 溶液在己烷中，1.0 mmoles)處理，之後將此溶液濃縮得到一如同油脂之酯 9。

### 方法 B

步驟 1)  $5\alpha, 17\beta$ -二羥基氧娠-9(11)-烯-3-酮、 $7\alpha, 21$ -二羧酸、雙- $\gamma$ -內酯 8a (圖示 I)。

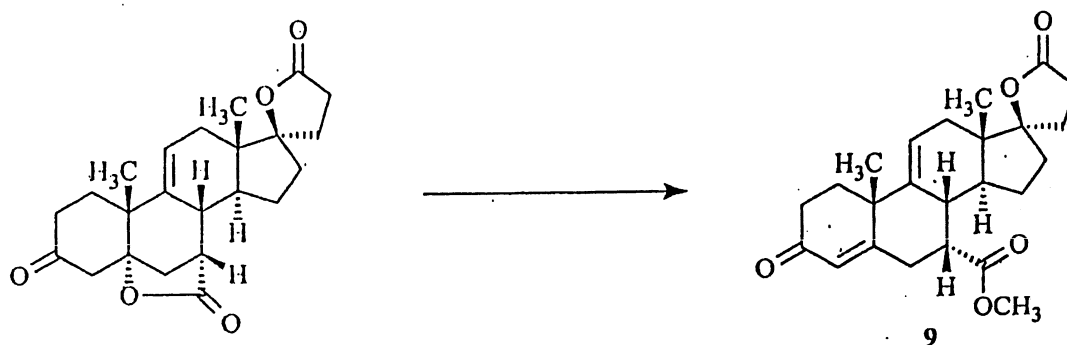


將  $17\beta$ -羥基- $7\alpha$ -(5'-甲基-2'-呋喃)-娠基-4,9(11)-二烯-3-酮-21-羧酸、 $\gamma$ -內酯(100 g, 0.23778 moles) 和醋酸鉀(50.0 g, 0.5094 moles, 2.14當量)在丙酮(500 ml)和水(150 ml)中之溶液冷卻至  $-10^{\circ}\text{C}$  並在水(100 ml)中以一 dibromantin 之漿狀物(34 g, 0.1189 moles, 0.50莫耳當量)處理直到一氧化還原電位發生升高情形為止。於此，可利用液體層析顯示其完全轉化成烯二酮(III-順式)。含有烯二酮(III-順式)之反應混合物接著利用異丁基乙烯基醚(1.0 ml, 0.768 g, 7.668 mmoles, 0.032當量)產生淬火，濃縮成一厚漿狀物，利用二

氯甲烷(200 ml)稀釋之，並以20℃濃縮之氫氯酸(50.0 ml, 0.50 moles, 2.10當量)處理。此混合物於20-25℃攪拌2小時，此時可利用液體層析法分析顯示完全轉化成烯二酮(III-反式)。分離出含有烯二酮(III-反式)之有機相，以二氯甲烷(80 ml)和甲醇(300 ml)稀釋，並冷卻至-48℃。將一臭氧/氧(O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub>)氣流通過此混合物產生氣泡直到液體層析顯示烯二酮(III-反式)完全消失為止，接著利用硫化二甲基(30.0 ml, 25.38 g, 0.4085 moles, 1.72當量)使此混合物淬火，於-20℃攪拌16小時，濃縮至體積約300 ml，以甲醇(350 ml)稀釋，濃縮至體積約300 ml，利用異戊醇(40 ml)和甲醇(80 ml)將之稀釋，之後利用一溫熱(55-60℃)之碳酸氫鉀(120 g, 1.1986 moles, 5.04當量)溶液在水中(240 ml)加以處理。將此漿狀物冷卻至5-10℃，之後加入過氧化氫(50%，66.0 g，含有33.0 g(0.9703 moles, 4.08當量)過氧化氫)超過三小時。攪拌此混合物四小時並以硫化二甲基(40 ml, 33.84 g, 0.5447 moles, 2.29當量)加以淬火。經過20-25℃攪拌23小時之後，利用二氯甲烷(100 ml)和水(80 ml)稀釋此混合物，並用濃縮之氫氯酸進行酸化至pH值=3.0。將此雙相混合物加熱至36℃，之後兩相分離並將水相以二氯甲烷(100 ml)萃取。將有機相結合，以水(75 ml)清洗，且將水相以二氯甲烷(25 ml)回復萃取，將有機相結合，濃縮至體積150 ml，之後以苯磺酸(1.0 g之90%純物質，含有0.90 g(5.690 mmole, 0.0239當量)苯磺酸)及丙酮(50 ml)處理。之後將此混合物於大氣中濃縮至體積160 ml，之後以丙酮(250 ml)稀釋，濃縮至體積

200 ml, 冷卻至 12°C, 並加以過濾。將濾餅以冷丙酮(2x25 ml)清洗並以氮氣乾燥以得到此標題之化合物 CMR(100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 206.08, 176.47, 175.41, 139.63, 124.00, 94.89, 90.97, 47.08, 43.90, 42.36, 41.58, 41.07, 38.93, 36.97, 35.16, 33.01, 32.42, 31.35, 29.10, 23.08, 22.98 和 14.23  $\delta$ ; NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 0.94, 1.40, 1.4-2.8 和 5.70; MS (CI,  $\text{NH}_3$ )  $m/e = 385$  (P + H, 100%)。

步驟 2) 17 $\beta$ -羥基-7 $\alpha$ -碳甲氧萜-4,9(11)-二烯-3-酮-21-羧酸、 $\gamma$ -內酯 9 (圖示 I)。



將 5 $\alpha$ ,17 $\beta$ -二羥基萜-9(11)-烯-3-酮、7 $\alpha$ ,21-二羧酸、雙- $\gamma$ -內酯 (50.0 g, 0.13005 moles) 和碳酸氫鉀(16.92 g, 0.1690 moles, 1.30當量)於丙酮(200 ml)和水(100 ml)中之混合物於 45°C 下攪拌 2 小時, 此時由液相層析 LC 完成 5,7-內酯(VII)轉化成羧酸(VI)之反應。形成之混合物之後經硫酸二甲基(22.92 g, 0.1817 moles, 1.40當量), 在 45°C 下攪拌 3 小時, 之後先以碳酸氫鉀溶液(1.3 g, 0.0130 moles, 0.100當量)在水中(10 ml)、接著以乾淨之三乙基胺(1.81 ml, 1.314 g, 0.0130 mole, 0.100當量)處理。將此混合物在 45°C 下攪拌 1 小

時，以濃縮之氫氯酸(1.92 ml, 2.304 g, 含有 0.852 g (0.0234 moles, 0.180當量)氫氯酸)，冷卻至0°C，在減壓下濃縮至體積150 ml (罐溫13°C)，之後過濾並將濾餅以水(2x25 ml)清洗並乾燥以得到此標題之化合物9 (圖示I)。

實例 11：依普利酮之形成。

如在美國專利號碼4,559,332和5,981,744，以及WO97/21720和WO98/25948中之說明將二烯酮9 (圖示I) 氧化以得到依普利酮。

實例 12：三甲基矽烷基氯化物和I之烯丙化反應。

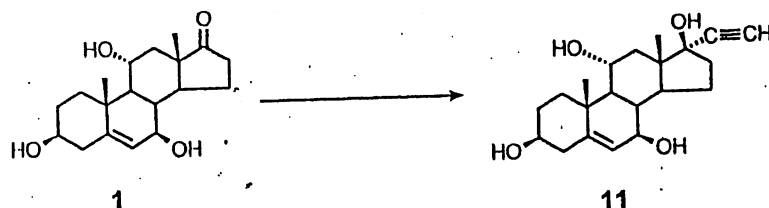
將一三醋酸酯I (表1) (1.0 g, 2.24 mmol) 於10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>之溶液冷卻至14°C並以0.6 mL TMSCN和100 mg Sc(OTf)<sub>3</sub>處理。將此混合物攪拌5小時並以醋酸乙酯萃取，期間濃縮之萃取結晶將從溶液中沉澱出來，將此些物質過濾並乾燥以得到一腈18之異構物混合物。<sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 147.31, 146.0, 131.68, 129.39, 128.12, 119.23, 115.47, 115.04, 62.74, 82.50, 51.13, 49.0, 47.72, 44.38, 43.67, 43.05, 37.32, 37.04, 36.32, 33.58, 32.09, 32.0, 27.92, 27.79, 26.75, 23.68, 23.32, 20.45, 19.13, 18.26, 12.30。

實例 13：烯丙基三甲基矽烷和V之烯丙化反應

將一三醋酸酯V(表1)和烯丙基三甲基矽烷於乙腈中之溶液以Sc(OTf)<sub>3</sub>於室溫下處理。一小時後慢慢加水到沉澱產物中，經過濾和乾燥產生烯丙基衍生物19。<sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 221.05, 170.89, 193.87, 137.62, 127.15, 116.36, 74.26, 47.81, 46.29, 38.61, 37.49, 36.23, 35.61, 35.31, 31.57, 28.04,

22.61, 20.56, 19.64, 13.48。

實例 14：乙炔形成 17-酮氧中間產物之加成作用。



步驟 1：

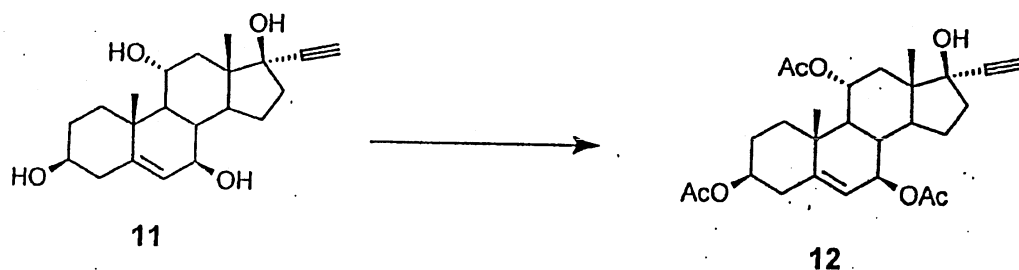
將六甲基二矽氮烷(HMDS)(100 ml)加至一含 50.0 g 三元醇 1 之 400 ml 二氯甲烷之攪拌泥漿液中。加入糖精(0.57 g)並於回流下將混合物加熱 3 小時期間泥漿液將緩慢溶解成一清澈琥珀色溶液。加水(5 ml)使任何過量之 HMDS 淬火。5 分鐘後將此混合物於回流下過濾流經一 350 ml 粗陶瓷玻璃濾器漏斗中含有 32.6 g magnesol 之  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  濕層。此濾液應清澈且幾乎無色。將此濾餅以 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  清洗 2 次。結合之濾液於減壓下濃縮並以蒸發方式利用 2 次 500 ml 之四氫呋喃(THF)除去殘留之二氯甲烷，在各次加成之後濃縮至乾燥以得到一白色固體。

步驟 2：

將一 t-氧化丁基鉀(potassium t-butoxide)於 500 ml THF 中之懸浮液利用一冰/甲醇浴冷卻至  $-9^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ 。將乙炔打成氣泡加入混合物之表面下並溫和攪拌至少 1 小時。將來自上面 THF(400 ml)中所得之矽烷化類固醇中間產物加入混合物中超過 30 分鐘並於期間維持  $0^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$  之反應溫度。加成之後，再於  $5^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$  之攪拌混合物一小時。緩慢加入水(100

ml)使反應混合物加溫至 $15^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。緩慢加入125 ml 10% HCl以降低pH值至2.5至3。在溫度 $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 並於pH值2.5至3下攪拌此混合物1至2小時，並視需要加入少量5% HCl以維持pH值在2.5至3。當此水解反應完成後，加入半飽和之 $\text{NaHCO}_3$ 溶液以升高pH值至5.5至6。用醋酸乙酯(500 ml)稀釋此混合物並且使之相分離。水相可利用醋酸乙酯萃取並用水、鹽水清洗此結合之醋酸乙酯相，利用硫酸鎂乾燥並濃縮得到加成產物2。 $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  141.99, 127.38, 89.37, 77.73, 75.24, 72.13, 70.54, 67.68, 54.13, 49.57, 47.43, 43.94, 42.58, 40.52, 40.22, 39.01, 38.09, 31.95, 25.8, 18.58, 14.09。

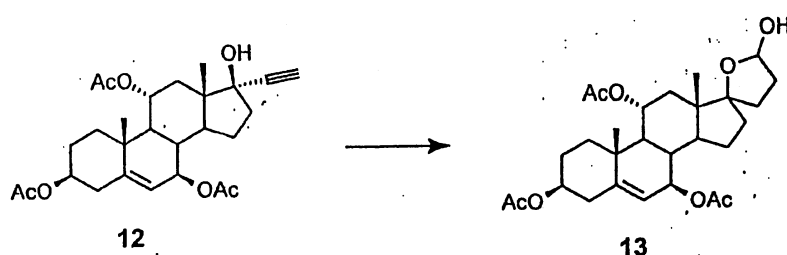
實例15：羥基乙醯化作用：



將四元醇11 (圖示II) (50.00 g, 144 mmol)溶解在吡啶(150 ml)之混合物在冰浴中冷卻至低於 $10^{\circ}\text{C}$ 。加入二甲基氨基吡啶(DMAP)(1.7 g, 14 mmol)接著以一可維持溶液溫度低於 $10^{\circ}\text{C}$ 之速度緩慢加入醋酸酐(41.4 ml, 439 mmol)。在加成反應之後，將此反應混合物加溫至室溫。用醋酸乙酯(75 ml)和水(50 ml)稀釋此混合物，攪拌5分鐘並使其相層分離。用10% HCl(4x25 ml)清洗有機層，接著以 $\text{H}_2\text{O}$ (2x50 ml)清洗，

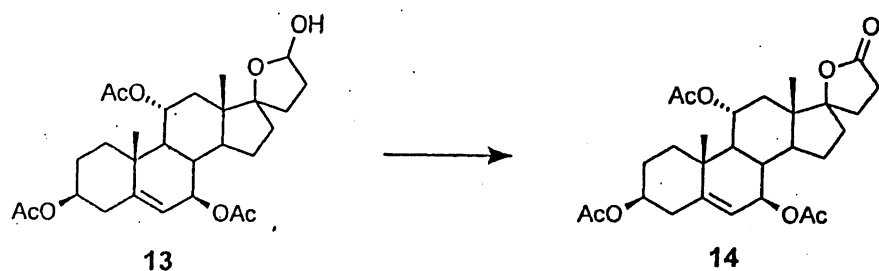
以  $\text{MgSO}_4$  乾燥並濃縮。此產物以甲苯 (100 ml) 再結晶化。 $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.68, 170.10, 143.48, 128.90, 128.10, 125.17, 122.59, 86.63, 78.21, 75.07, 74.40, 72.79, 71.47, 50.16, 48.07, 47.02, 38.76, 38.06, 37.83, 37.67, 36.92, 27.66, 24.18, 21.74, 21.44, 18.65, 13.06。

實例 16：乙炔加成物之氫甲醯化作用。



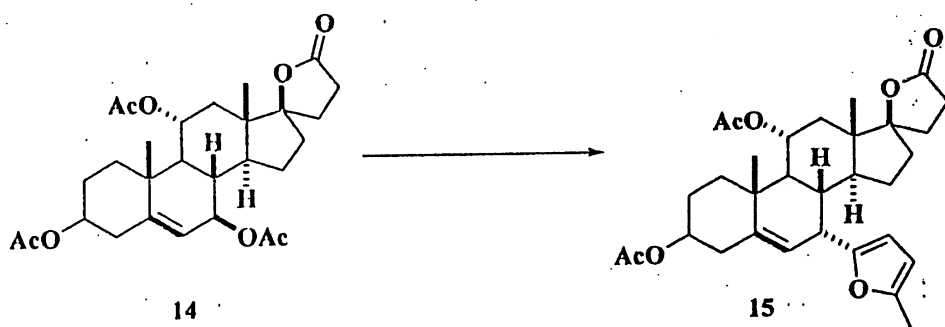
將一三醋酸酯 12 (圖示 II) (25.4 g, 54 mmol)、 $\text{PPh}_3$  (2.13 g, 8.1 mmol) 和  $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$  (716 mg, 1.62 mmol) 於醋酸乙酯 (200 ml) 之溶液在  $80^\circ\text{C}$ 、利用氫 / 一氧化碳以 1/1 混合之 170 psi 壓力加熱 12 小時。將此混合物於減壓下濃縮且利用管柱層析法 (70/30 EtOAc/Hex 和 500 g 矽石) 純化產物 13 (圖示 II)。此化合物之 CMR 光譜由於開環和閉環異構物而變得很複雜並且因此無法完全定性化。

實例 17：乳酸- $\beta$ -萘酯形成內酯之氧化反應。



將一乳酸- $\beta$ -萘酯4 (圖示I) (25 g, 50 mmol)、二氯甲烷 (250 ml)、水 (38 ml)、2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基 (TEMPO)(156 mg, 1 mmol)、溴化鉀 (595 mg, 5 mmol) 和  $\text{NaHCO}_3$  (5.5 g, 65 mmol) 之混合物在冰浴中冷卻至  $\leq 10^\circ\text{C}$ 。緩慢加入一 1.1 M 之次氯酸鈉 ( $\text{NaOCl}$ ) (50 ml, 55 mmol) 溶液。將此混合物加溫至室溫並以水 (50 ml) 稀釋，使相層分離且以鹽水 (2x50 ml) 清洗有機層。有機層以  $\text{MgSO}_4$  乾燥，過濾並濃縮以產生5之一非白色泡沫。 $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  177.94, 172.60, 172.15, 171.58, 145.49, 124.36, 96.18, (79.22, 78.90, 78.59  $\text{CDCl}_3$ ), 76.59, 74.57, 72.63, 52.14, 49.55, 47.75, 40.00, 39.75, 39.61, 38.65, 37.47, 32.74, 30.85, 29.56, 26.01, 23.61, 23.37, 23.17, 23.11, 20.52, 16.19。

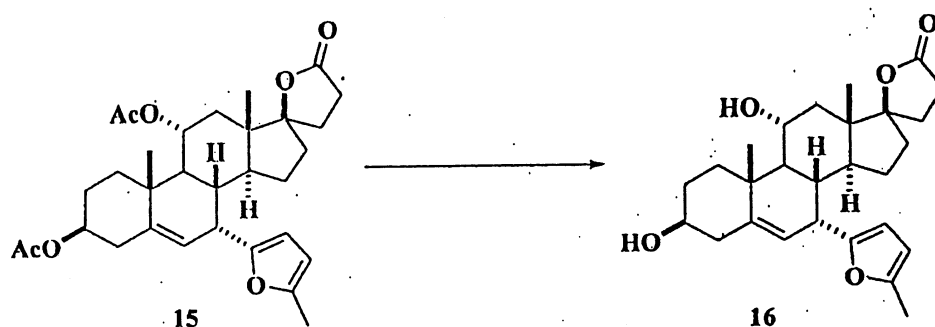
實例 18：呔喃化作用。



將一三醋酸酯14 (圖示I) (1.30 g, 2.58 mmol)、2-甲基呔喃 (0.8 mL) 於 25 mL 乙腈中之溶液以 250 mg  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  於  $20^\circ\text{C}$  下處理並攪拌1小時。此產物可利用  $\text{EtOAc}$  萃取液分離出來並利用色層分析法以矽膠和 40%  $\text{EtOAc}/\text{Hex}$  將之純化以得到 1.0 g (74% 產量) 之呔喃 15。 $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  176.27,

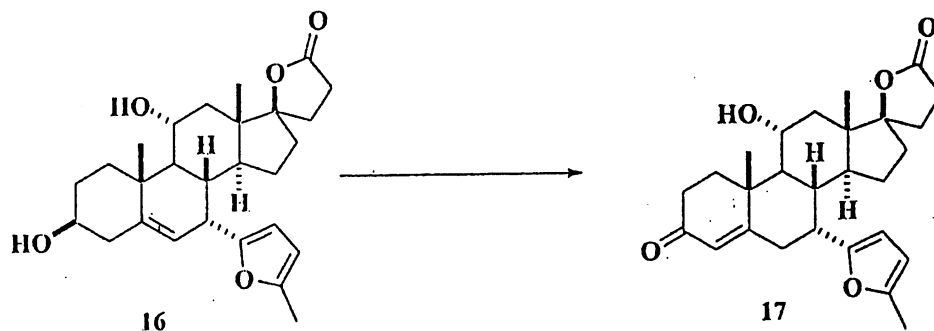
170.45, 169.85, 152.53, 150.96, 140.60, 123.45, 110.05, 106.01, 94.95, 73.39, 71.37, 46.50, 45.40, 44.60, 38.55, 38.37, 38.06, 37.78, 37.74, 36.89, 35.41, 31.81, 30.72, 28.96, 28.93, 27.69, 23.07, 22.63, 21.74, 20.98, 18.80, 14.83, 14.13, 14.06, 13.62。

實例 19：醋酸酯水解作用。



將一 810 mg 之二醋酸酯 15 (圖示 II)、120 mg  $K_2CO_3$  之混合物在 20 mL 甲醇中於反應過程中攪拌隔夜。TLC 顯示此反應未完成因此加入額外之 100 mg  $K_2CO_3$  並續攪拌直到 TLC 顯示出完成反應為止。將此混合物以 1M HCl 酸化且以 EtOAc 萃取產物。在利用色層分析之矽膠和 100% EtOAc 產生 610 mg (89.5% 產量) 之二元醇 16 (圖示 II)。 $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  176.68, 153.20, 150.79, 142.05, 122.32, 109.80, 105.94, 95.3, 71.83, 68.64, 50.13, 45.81, 44.88, 42.73, 42.62, 39.01, 38.56, 37.73, 36.81, 35.44, 31.57, 30.84, 29.06, 23.13, 18.81, 15.27, 13.64。

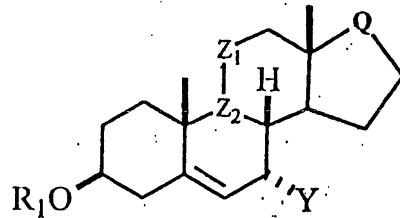
實例 20：16 形成 17 之氧化反應。



將二元醇16 (圖示II) 溶解在2 mL甲苯和0.1 mL丙酮中並以50 mg aluminum isopropoxide處理並加熱至100°C。數小時之後此將出現無轉化作用因此加入0.1 mL環己酮並將混合物加熱隔夜。利用醋酸乙酯當成溶析液藉由矽膠層析法將產物17 (圖示II) 分離出。<sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>) δ 199.96, 177.05, 170.32, 153.34, 150.74, 126.7, 109.14, 106.33, 95.54, 69.08, 52.50, 46.26, 46.0, 43.58, 40.13, 39.05, 38.8, 37.93, 36.92, 35.66, 34.59, 31.33, 29.47, 23.06, 18.83, 16.01, 13.90。

## 伍、中文發明摘要：

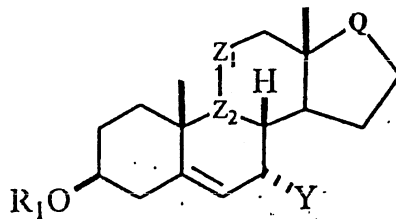
本發明係關於一種製備化學式 I 之 7-經取代類固醇之方法。



化學式 I

## 陸、英文發明摘要：

This invention relates to processes for the preparation of novel 7-substituted steroid compounds of Formula I,



Formula I

**柒、指定代表圖：**

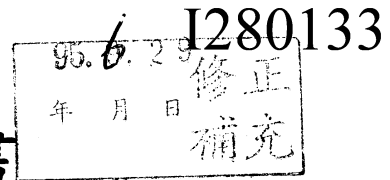
(一)本案指定代表圖為：第 ( ) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

**捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**



# 發明專利說明書



中文說明書替換本(95年6月)

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：P2106330

※申請日期：P2.3.21 ※IPC分類：A61K<sup>31</sup>/G05

## 壹、發明名稱：(中文/英文)

製備 C-7 經取代類固醇之方法

PROCESS FOR PREPARING C-7 SUBSTITUTED STEROIDS

## 貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商法瑪西亞-普強公司

PHARMACIA & UPJOHN COMPANY

代表人：(中文/英文)

詹姆士 D. 達恩利 二世

JAMES D. DARNLEY, JR.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國密西根州卡拉馬索市海利頓路 301 號

301 HENRIETTA STREET, KALAMAZOO, MICHIGAN, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

## 參、發明人：(共 1 人)

姓名：(中文/英文)

彼得 GM 伍姿

PETER GM WUTS

住居所地址：(中文/英文)

美國密西根州瑪塔瓦市北棕櫚島路 8835 號

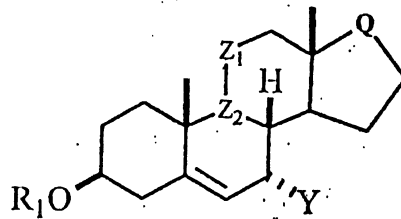
8835 PINE ISLAND COURT, N., MATTAWAN, MICHIGAN 49071,  
U.S.A.

國籍：(中文/英文)

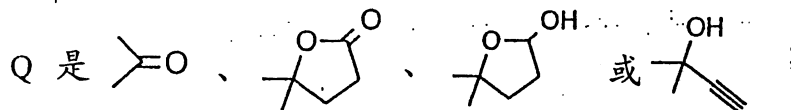
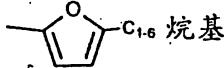
美國 U.S.A.

拾、申請專利範圍：

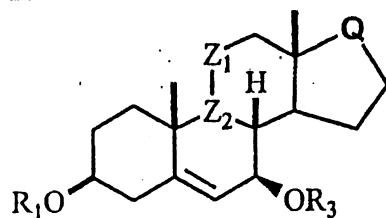
1. 一種製備式I之7-經取代類固醇化合物之方法，



式 I

其中  $R_1$  是 H 或  $-\text{COR}_2$ ； $R_2$  是  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  烷基或是  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  烷氧基； $Z_1$  是  $\text{CH}_2$  或  $-\overset{\text{O}-\text{R}_3}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-$ ，其中的  $\text{OR}_3$  呈  $\alpha$  組態； $R_3$  是 H 或  $-\text{COR}_2$ ； $Z_2$  是  $-\text{CH}-$ ；或 $Z_1$  和  $Z_2$  之間可能形成碳-碳雙鍵； $Y$  是  $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ 、  $\text{C}_{1-6}$  烷基或  $\text{C}(\text{O})\text{R}_4$ ，其中  $\text{R}_4 = \text{OC}_{1-6}$  烷基；

其包含將式II之類固醇中間產物與一親核劑在路易士酸觸媒存在下反應



式 II

其中  $R_1$  和  $R_3$ ,  $Z_1$ ,  $Z_2$ ,  $R_2$  和  $Q$  如式 I 所示。

2. 一種式 I 之化合物，

其中  $R_1$  是 H 或  $-\text{COR}_2$ ；

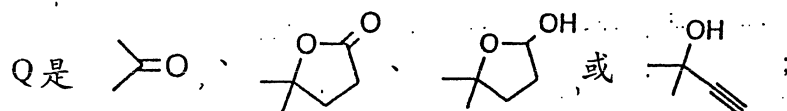
$R_2$  是  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  烷基或是  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  烷氧基；

$Z_1$  是  $\text{CH}_2$  或  $-\overset{\text{O}-R_3}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-$ ，其中的  $\text{OR}_3$  呈  $\alpha$  組態；

$R_3$  是 H 或  $-\text{COR}_2$ ；

$Z_2$  是  $-\text{CH}-$ ；或

$Z_1$  和  $Z_2$  之間可能形成碳-碳雙鍵；

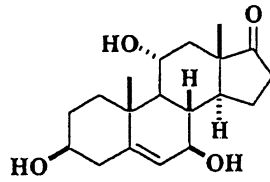


Y 是  $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 或  $\text{C}(\text{O})\text{R}_4$ ，

其中  $\text{R}_4 = \text{OC}_{1-6}$  烷基。

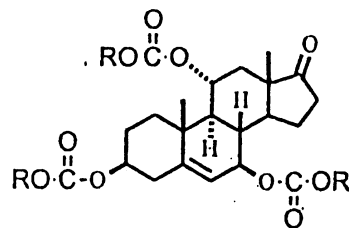
3. 一種製備依普利酮 (eplerenone) 之方法，其包含以下步驟：

a) 將式 I 之酮類固醇



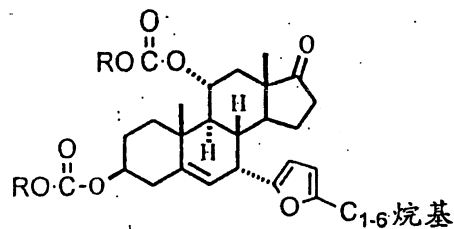
式 1

和  $C_1$ - $C_6$  烷基氯甲酸酯或苄基氯甲酸酯或烷氧羰基苯三唑，在三級有機鹼存在下進行反應，以產生式 2 之三碳酸酯其中 R 是  $C_1$ - $C_6$  烷基或苄基；



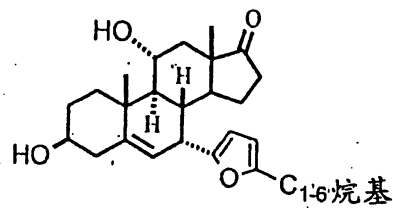
式 2

b) 將式 2 之三-醯基化合物和 2-  $C_1$ - $C_6$ -烷基呋喃在路易士酸觸媒存在下進行反應以產生式 3 之二醯酯化合物；



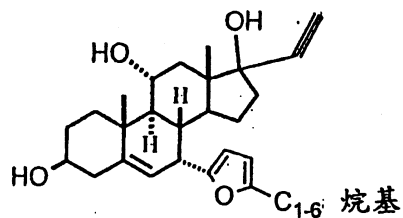
式 3

c) 在鹼存在下水解式 3 之二醯基酯化合物以產生式 4 之二羥基酯；



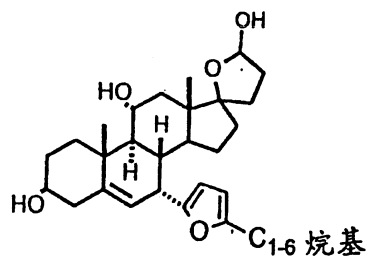
式 4

d) 在強鹼存在下將式 4 之化合物和乙炔進行反應以產生式 5 之炔類化合物；



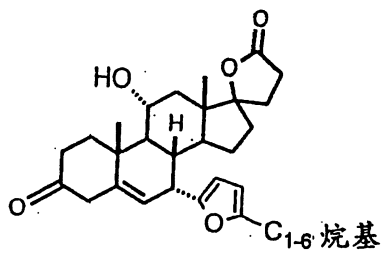
式 5

e) 在銻觸媒配位子存在下將式 XVII 之炔類化合物和一氧化碳進行反應以產生式 6 之乳酸-β-萜酯；



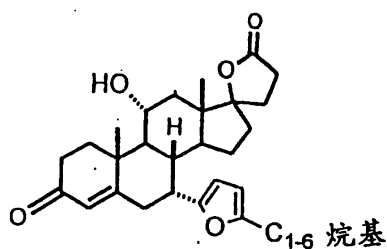
式 6

f) 氧化式 6 之乳酸-β-萜酯以產生式 6a 之內酯；



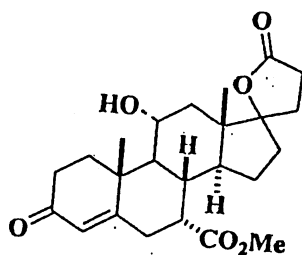
式 6a

g) 異構化式 6a 之 4,5-雙鍵以產生式 7 之內酯；



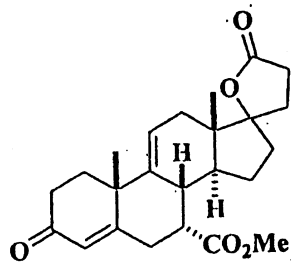
式 7

h) 溴化、臭氧化、氧化和酯化式 7 之化合物以產生式 8 之酯類；



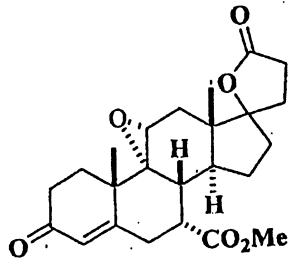
式 8

i) 將式 8 之化合物進行脫水反應以產生式 9 之中間產物；



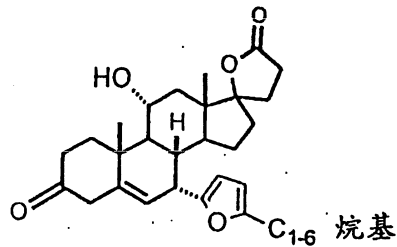
式 9

j) 氧化式 9 之二烯酮於此將獲得依普利酮 (式 10)。



式 10

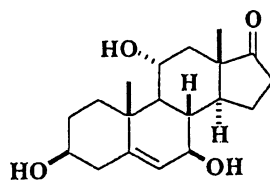
4. 一種式 6a 之化合物



式 6a

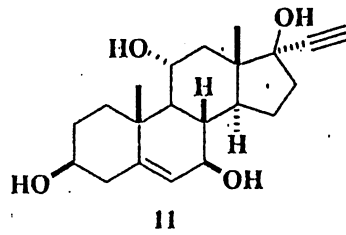
5. 一種製備依普利酮之方法，其包含以下步驟：

a) 將式 1 之酮類固醇



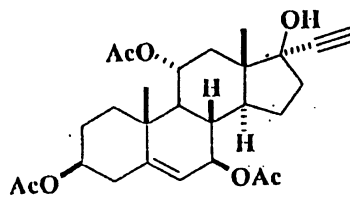
式 1

和乙炔進行反應以產生式11之化合物；



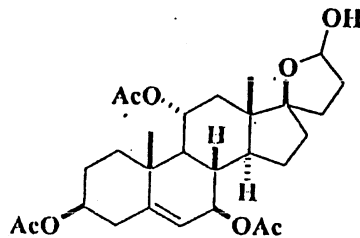
式 11

b) 醯化式11之化合物以產生式12之化合物；



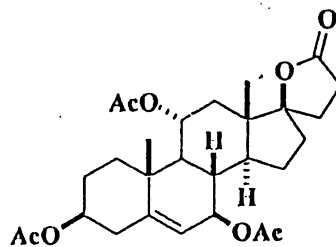
12

c) 氫甲基化式12之化合物以產生式13之化合物；



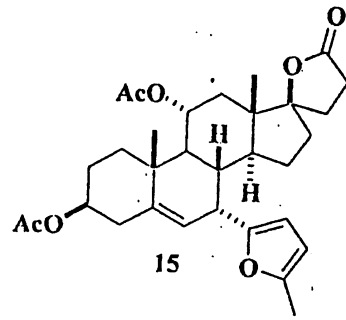
13

d) 氧化式13之化合物以產生式14之化合物；

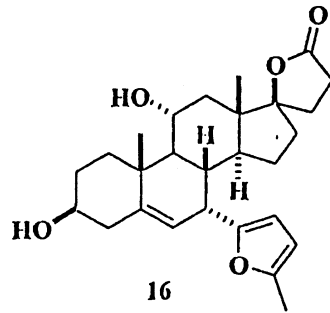


14

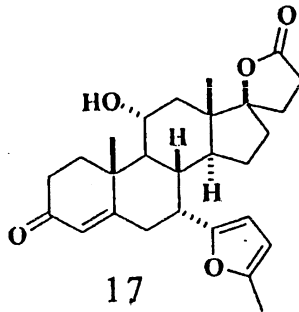
e) 在路易士酸存在下將式14之化合物與2-烷基咪喃進行接觸以產生式15之化合物；



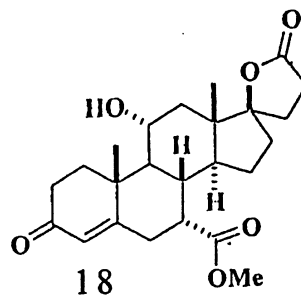
f) 水解式 15 之化合物以產生式 16 之化合物；



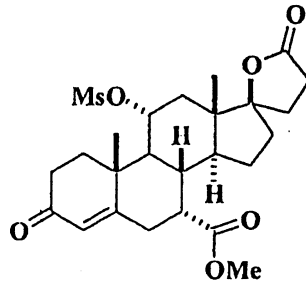
g) 氧化式 16 之化合物以產生式 17 之化合物；



h) 將式 17 化合物之呋喃環轉化成式 18 之甲基羰基化合物；

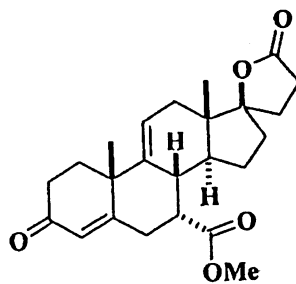


i) 將式 18 之化合物轉化成式 19 之磺酸酯；



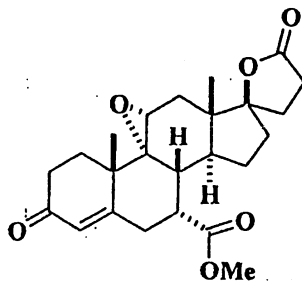
19

j) 移除式19之磺酸酯以產生式9之化合物；



9

k) 氧化式9之化合物以產生式10之化合物依普利酮；



10

6. 一種如申請專利範圍第5項之製備依普利酮之方法，其進一步包含式1化合物在其與乙炔反應前之矽烷化反應，以產生一矽烷化中間產物，並除去在式11化合物的分離期間之矽烷基。