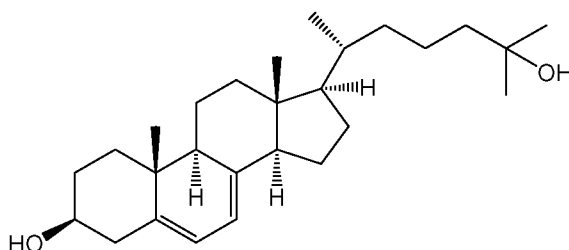


SPOSÓB WYTWARZANIA 25-HYDROKSYPROWITAMINY D₃

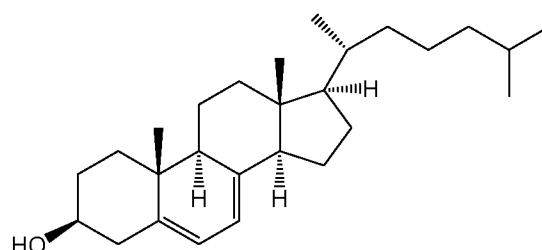
Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 25-hydroksyprowitaminy D₃, cholesta-5,7-dieno-3 β ,25-diolu (wzór 1) z 7-dehydrocholesterolu (wzór 2) w wyniku selektywnego utlenienia za pomocą dioksiranów lub trifluorooctanu chromyłu.

wzór 1



wzór 2



Cholesta-5,7-dieno-3 β ,25-diol (wzór 1) jest stosowany do wytwarzania 25-OH-D₃ (inne nazwy: hydroksycholekalcyferol, kalcydiol, kalcyfediol, solcidiol). W porównaniu z cholekalcyferolem (witamina D₃), jego 25-hydroksylowa pochodna lepiej wchłania się z przewodu pokarmowego (niemal w 100%) z powodu bardziej hydrofilowego charakteru. Zaleca się stosowanie takiej formy witaminy D pacjentom, którzy cierpią z powodu schorzeń wątroby oraz osobom otyłym.

Witaminy z grupy D są rozpuszczalnymi w tłuszczach związkami steroidowymi. Mają one wielostronne działanie fizjologiczne, polegające przede wszystkim na regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz utrzymywaniu prawidłowej struktury i funkcji kośćca. Witamina D₃ jest powszechnie stosowana w profilaktyce krzywicy oraz w leczeniu hipokalcemii i osteoporozy. Ponadto uczestniczy ona w zjawiskach odpornościowych oraz proliferacji i różnicowaniu komórek, zapobiega postawianiu komórek nowotworowych. Może zmniejszać ryzyko zachorowania na gripę i Covid-

19. Witaminy D powstają z prowitamin, którymi są występujący w drożdżach ergosterol (prowitamina D₂) oraz 7-dehydrocholesterol (prowitamina D₃). Ten ostatni związek występujący w skórze organizmów zwierząt ulega pod wpływem promieniowania słonecznego izomeryzacji początkowo do prewitaminy, która z kolei na skutek ciepłoty ciała przekształca się w witaminę D₃ (cholekalcyferol). Witaminy D tradycyjnie zalicza się do witamin, chociaż pełnią one w organizmie człowieka funkcję prohormonów, gdyż w wyniku przekształceń metabolicznych ulegają aktywacji do form hormonalnie aktywnych.

Po połączeniu z białkiem wiążącym witamina D₃ jest transportowana do wątroby, gdzie ulega pierwszej hydroksylacji w pozycji 25. W tej postaci (25-OH-D₃) krąży w organizmie i dociera do nerek (a także do niektórych innych tkanek, np. skóry oraz komórek odpornościowych), gdzie zachodzi druga hydroksylacja w pozycji 1α. Powstaje w ten sposób 1α,25-(OH)₂D₃ (cholekalcytriol), czyli hormon witaminowy. W procesach hydroksylacji uczestniczy zespół hydroksylaz należących do cytochromu P450.

Do tej pory opisano kilka metod syntezy cholesta-5,7-dieno-3β,25-diolu. W charakterze substratów stosowane były m.in. desmosterol, ergosterol, stigmasterol, kwas cholenowy, cholesterol.

Z *desmosterolu*:

- Hydroksyrtęciowanie (Hg(OAc)₂, NaBH₄) wiązania podwójnego C24-C25 w desmosterolu (Shul'man, A. I.; Mikhailova, N. P.; Sarkisov, Yu. S.; V'yunov, K. A., *Zh. Org. Khim.* 1988, 24, 2342-2346).
- Epoksydowanie wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym desmosterolu za pomocą kwasu m-chloroperoksybenzoesowego, a następnie redukcja LiAlH₄ (Shul'man, A. I.; Mikhailova, N. P.; Viktorovskii, I. V.; V'yunov, K. A., *Zh. Obsh. Khim.* 1988, 58, 214-223).
- Hydroksybromowanie wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym desmosterolu za pomocą NBS, a następnie redukcja LiAlH₄ (Sun, B; Jin, C; Su, W., *J. Chem. Res.* 2016, 40, 213-215).

Z ergosterolu lub stigmasterolu:

- Ozonoliza wiązania C22-C23 w zabezpieczonym ergosterolu, a następnie kilkietapowa odbudowa łańcucha bocznego z jednoczesnym prowadzeniem grupy 25-OH z wykorzystaniem reagentów magnezo- lub miedzio-organicznych (Scherlitz-Hofmann, I.; Dubs, M.; Prousa, R.; Schönecker, B.; Droescher, P.; Schick, H.; Schrötter, E., *Synthesis* 1999, 1331-1334; Fuse, S.; Mifune, Y.; Tanabe, N.; Takahashi, T., *Org. Biomol. Chem.* 2012, 10, 5205-5211; Tachibana, Y.; Yokoyama, S.; Tsuji, M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1989, 62, 2599-2603; Datla, A.; Nagre, P.; Tamore, J.; Prabhu, M. S.; Kadam, S. V., WO 2021/005619 A1).
- Podobna synteza ze stigmasterolu jako substratu. W tym jednak przypadku zachodzi dodatkowo konieczność wprowadzenia podwójnego wiązania C7-C8 na drodze allilowego bromowania i dehydrobromowania (Datla, A.; Nagre, P.; Tamore, J.; Prabhu, M. S.; Kadam, S. V.; Shirsath, A., WO 2020/225830 A1).
- Synteza cholesta-5,7-dieno-3 β ,25-diolu i jego pochodnych z (20S)-20-formylo-3 β -hydroksypregn-5-en-7-onu (otrzymanego na drodze ozonolizy wiązania podwójnego C22-C23 w zabezpieczonym stigmasterolu), której kluczowe etapy to: wprowadzenie łańcucha bocznego z grupą 25-OH z wykorzystaniem reakcji Wittiga, konstrukcja układu 5,7-dienowego oraz selektywna redukcja wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym (William G. Salmond, 1976, US4116985A).

Z kwasu cholenowego:

- Synteza z kwasu cholenowego polegająca na homologacji łańcucha bocznego metodą Arndta-Eisterta, wprowadzeniu wiązania podwójnego C7-C8 oraz reakcji Grignarda z CH₃MgBr (Campbell, J. A.; Squires, D. M.; J. C. Babcock, *Steroids* 1969, 13, 567-577).

Kutner *et al.* zaproponowali alternatywną syntezę tego samego homocholenianu polegającą na zamianie grupy karboksylowej na brom, a następnie reakcji bromku steroidowego z malonianem metylu i demetoksykarbonylacji (Kutner, A.; Chodyński, M.; Masnyk, M.; Wicha, J., *Org. Proc. Res. Dev.* 1998, 2, 290-293).

Z cholesterolu:

- Ozonowanie dibromo pochodnej cholesterolu zaadsorbowanej na suchym żelu krzemionkowym (Cohen, Z.; Mazur, Y., *J. Org. Chem.* 1979, 44, 13, 2318-2320).
- Reakcja Grignarda otrzymanego z cholestesterolu 3 β -hydroksy-27-norcholesta-5,7-dien-25-onu z CH₃Mgl (Blunt, J. W.; DeLuca, H. F., *Biochemistry* 1969, 8, 671-675).
- Enzymatyczne metody C25 hydroksylacji różnych pochodnych cholesterolu, w tym 7-dehydrocholesterolu. Przy zastosowaniu steroidowej C25 dehydrogenazy, która należy do rodziny enzymów zawierających molibden, uzyskano 25-hydroksy-pochodną z wydajnością 99% (Warnke, M.; Jung, T.; Dermer, J.; Hipp, K.; Jehmlich, N.; von Bergen, M.; Ferlino, S.; Fries, A.; Müller, M.; Boll, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 1881-1884).

Należy zauważyć, że metodą enzymatyczną można przeprowadzić 25-hydroksylację nie tylko 7-dehydrocholesterolu (prowitaminy), ale także gotowej witaminy D₃ (Rugor, A.; Szaleniec, M.; Staroń, J. PL 2015/235932B1).

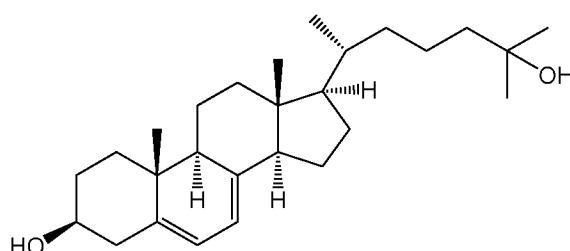
Wśród opisanych metod wyróżniają się swoją prostotą syntezy cholesta-5,7-dieno-3 β ,25-diolu z desmosterolu. Jednak surowiec ten jest trudnodostępny, podobnie jak kwas cholenowy, który należy do rzadkich kwasów żółciowych. Sterol roślinny stigmasterol i produkowany przez drożdże ergosterol są łatwo dostępne, ale opisane z tych surowców syntezy, polegające na degradacji łańcucha bocznego, a następnie jego odbudowy, są wieloetapowe i dość kłopotliwe. Największy potencjał mają metody polegające na bezpośredniej hydroksylacji pozycji C25, w tym metody mikrobiologiczne, najczęściej polegające na wykorzystaniu oczyszczonych enzymów. Wadą tych metod jest jednak kłopotliwy proces wyodrębniania produktu hydroksylacji z mieszaniny reakcyjnej. Z tego powodu Twórcy niniejszego wynalazku podjęli poszukiwania prostych metod chemicznych, które pozwoliłyby na selektywną hydroksylację trzeciorzędowego atomu węgla C25. Ze względu na podatność układu dienowego w 7-dehydrocholesterolu na utlenianie należy go odpowiednio zabezpieczyć, w sposób umożliwiając łatwe jego odtworzenie.

Celem niniejszego wynalazku było opracowanie nowego sposobu wytwarzania cholesta-5,7-dieno-3 β ,25-diolu z 7-dehydrocholesterolu.

Cel ten został osiągnięty w wyniku czteroetapowej syntezy cholesta-5,7-dieno-3 β ,25-diolu (wzór 1) z 7-dehydrocholesterolu (wzór 2), łatwo dostępnego znanymi metodami z cholesterolu.

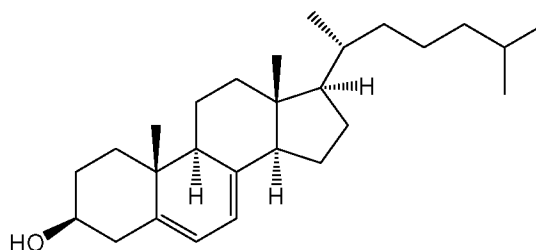
A zatem, przedmiotem niniejszego wynalazku jest sposób wytwarzania cholesta-5,7-dieno-3 β ,25-diolu o wzorze 1

wzór 1



z 7-dehydrocholesterolu o wzorze 2

wzór 2



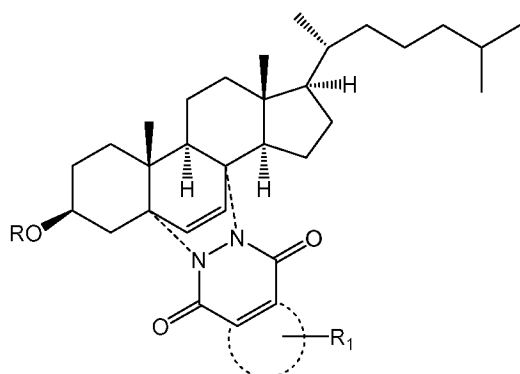
charakteryzujący się tym, że obejmuje etapy, w których

a) zabezpiecza się ugrupowanie dienowe w 7-dehydrocholesterolu o wzorze 2 w postaci adduktu Dielsa-Aldera w reakcji cykloaddycji z cyklicznym albo łańcuchowym azadienofilem;

b) zabezpiecza się grupę 3 β -hydroksylową w 7-dehydrocholesterolu o wzorze 2 w postaci estru lub eteru w reakcji estryfikacji lub eteryfikacji;

z wytworzeniem 7-dehydrocholesterolu z zabezpieczonym ugrupowaniem dienowym i zabezpieczoną grupą 3 β -hydroksylową o wzorze 3 albo o wzorze 4 albo o wzorze 5

wzór 3

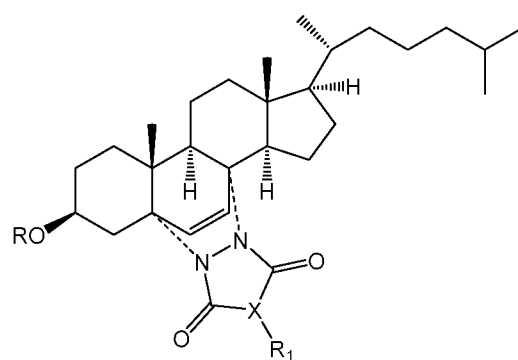


○ nasycony lub aromatyczny pięcio- lub sześciocząłonowy hetero- lub karbo-cykliczny pierścień

R = acyl, alkil, trialkilosilil

R₁ = H, alkil, aryl, halogen, nitro

wzór 4

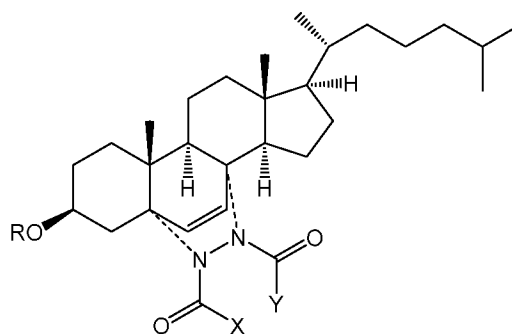


R = acyl, alkil, trialkilosilil

R₁ = alkil, aryl, acyl

X = C lub N

wzór 5



R = acyl, alkil, trialkilosilil

X, Y = alkil, aryl, alkoksyl, NH₂, NHR', N(R')₂,
gdzie R' = alkil, aryl,

w którym

acyl oznacza C₁₋₁₈ alkanoil, C₃₋₁₈ alkenoil, C₆₋₁₀ aryl-C(O)-, przy czym każda z tych grup może być dowolnie podstawiona grupami, takimi jak C₁₋₆ alkil, C₁₋₆ alkoksyl, halogen, NO₂;

alkil oznacza prosty lub rozgałęziony łańcuch węglowodorowy o długości C₁₋₁₈;

C₁₋₁₈ alkanoil oznacza C₁₋₁₇ alkil-C(O)-;

C₃₋₁₈ alkenoil oznacza C₃₋₁₇ alkenyl-C(O)-, gdzie alkenyl to prosty lub rozgałęziony łańcuch węglowodorowy zawierający wiązanie podwójne;

trialkilosilil oznacza grupę $R_1(R_2)(R_3)Si$, gdzie podstawniki R_1 , R_2 , R_3 oznaczają niezależnie C_{1-18} alkil albo C_{6-10} aryl;

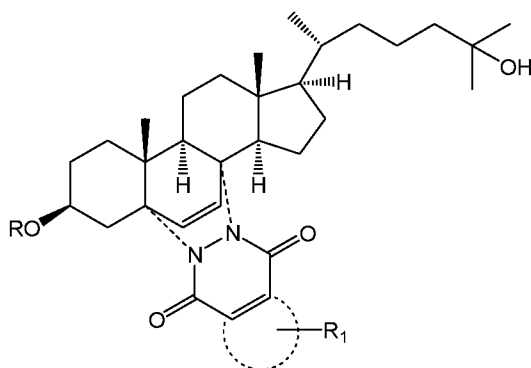
aryl oznacza grupę zawierającą od 6 do 10 atomów węgla i co najmniej jeden pierścień aromatyczny, korzystnie fenyl;

alkoksyl oznacza grupę C_{1-18} alkil-O-

halogen oznacza chlor, brom, jod.

c) przeprowadza się regioselektywną hydroksylację w pozycji 25 zabezpieczonego 7-dehydrocholesterolu o wzorze 3 albo o wzorze 4 albo o wzorze 5 z wytworzeniem związku o wzorze 6 albo o wzorze 7 albo o wzorze 8

wzór 6

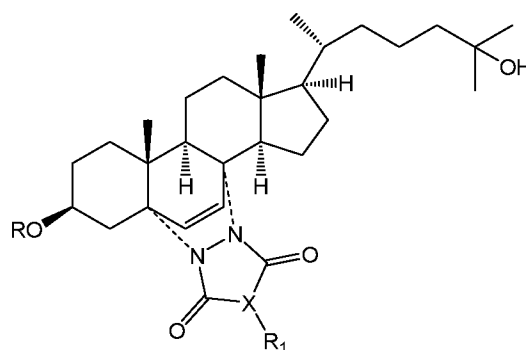


○ nasycony lub aromatyczny pięcio- lub sześciocłonowy hetero- lub karbo-cykliczny pierścień

R = acyl, alkil, trialkilosilil

R_1 = H, alkil, aryl, halogen, nitro

wzór 7

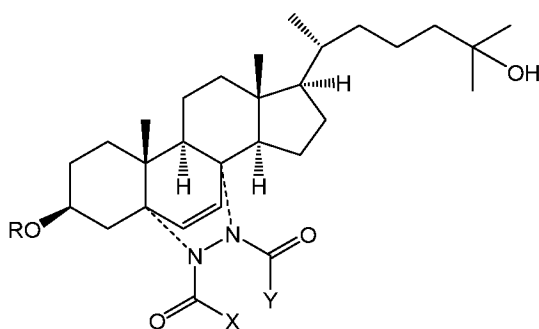


R = acyl, alkil, trialkilosilil

R_1 = alkil, aryl, acyl

X = C lub N

wzór 8



R = acyl, alkil, trialkilosilil

X, Y = alkil, aryl, alkoksyl, NH_2 , NHR, NR_2

w którym wszystkie podstawniki mają takie same znaczenia jak zdefiniowano powyżej dla wzorów od 3 do 5;

d) usuwa się grupy ochronne z zabezpieczonego 7-dehydrocholesterolu hydroksylowanego w pozycji 25 z wytworzeniem cholesta-5,7-dieno-3 β ,25-diolu o wzorze 1 z odtworzonym układem 5,7-dien-3 β -olu,

przy czym

- etap a) i etap b) realizuje się w dowolnej kolejności;
- w etapie d) grupy ochronne usuwa się na drodze reakcji redukcji.

Korzystnie, reakcję redukcji w etapie d) prowadzi się stosując LiAlH₄ albo naftalidek litu.

Korzystnie, w etapie c) regioselektywną hydroksylację w pozycji 25 przeprowadza się, stosując:

metylotrifluorometylodioksiran generowany *in situ* z trifluoroacetonu przy użyciu mononadsiarczanu potasu w buforze o pH 7-8 w układzie dwufazowym chlorek metylenu/woda albo chloroform/woda w obecności katalizatora przeniesienia międzyfazowego albo w mieszaninie acetonitryl/woda

albo

dimetylodioksiran generowany *in situ* z acetonu przy użyciu mononadsiarczanu potasu w buforze o pH 7-8 w układzie dwufazowym chlorek metylenu/woda albo chloroform/woda w obecności katalizatora przeniesienia międzyfazowego albo w mieszaninie acetonitryl/woda lub aceton/woda w temperaturze od 0°C do temperatury pokojowej.

Korzystnie, w etapie c) regioselektywną hydroksylację w pozycji 25 przeprowadza się, stosując trifluorooctan chromylu wytwarzany *in situ* z bezwodnika trifluorooctowego i bezwodnika chromowego, przy czym:

- reakcję utleniania prowadzi się przez 5 do 15 minut w temperaturze -18°C,

- oziębiony roztwór związku o wzorze 3 albo o wzorze 4 albo o wzorze 5 w chlorku metylenu albo czterochlorku węgla dodaje się jednorazowo do roztworu trifluorooctanu chromylu w czterochlorku węgla.

Korzystnie, w etapie b) reakcję estryfikacji prowadzi się, stosując bezwodnik octowy.

Sposób otrzymywania cholesta-5,7-dieno-3 β ,25-diolu, według wynalazku charakteryzuje się tym, że najpierw zabezpiecza się podatny na utlenianie układ dienowy w pierścieniu B i grupę hydroksylową w pozycji 3 β . W tym celu 7-dehydrocholesterol poddaje się reakcji cykloaddycji z cyklicznymi lub łańcuchowymi azadienofilami np. ftalazyno-1,4-dionem lub 4-fenilo-1,2,4-triazolo-3,5-dionem (PTAD) i następnie estryfikacji np. bezwodnikiem octowym lub eteryfikacji. Kolejność zakładania grup ochronnych może być dowolna. Otrzymane pochodne, związki o strukturach przedstawionych wzorami od 3 do 5 poddaje się reakcji 25-hydroksylowania.

Jako utleniacz stosuje się dioksiran generowany *in situ* z 1,1,1-trifluoroacetonu (TFA) lub acetonu za pomocą mononadsiarczanu potasu dostępnego na rynku jako reagent Oxone®. Reakcje utlenienia prowadzi się w obecności NaHCO₃ lub NaHCO₃ i Na₂EDTA w układzie dwufazowym chlorek metylenu/woda (chloroform/woda) bądź w mieszaninie acetonitryl/woda lub aceton/woda w temperaturze od 0°C do temperatury pokojowej maksymalnie przez 3 doby. Utleniacz (wytworzony *in situ* z 20-100 ekw. TFA i 6-20 ekw. Oxone®) i NaHCO₃ (1-2 ekw. w stosunku do Oxone®) jest dodawany jednorazowo lub porcjach. W przypadku utleniania dimetylooksiranem generowanym z acetonu jest on jednocześnie rozpuszczalnikiem.

Reakcje 25-hydroksylowania pochodnych 7-dehydrocholesterolu z zabezpieczonym układem dienowym i grupą hydroksylową (związki o strukturach przedstawionych wzorami od 3 do 5) przeprowadza się także z użyciem trifluorooctanu chromylu. Utleniacz przygotowuje się *in situ* przez mieszanie bezwodnika trifluorooctowego (TFAA) z bezwodnikiem chromowym przez 16-20 godzin w atmosferze argonu i bez dostępu światła. Następnie do oziębionego do temperatury -18°C roztworu trifluorooctanu chromylu w czterochlorku węgla dodaje się jednorazowo oziębiony

roztwór zabezpieczonej pochodnej 7-dehydrocholesterolu (związki o wzorach od 3 do 5) w chlorku metylenu lub czterochlorku węgla. Reakcje prowadzi się przez 5 do 15 minut utrzymując temperaturę -18°C . Oprócz 25-hydroksylowej pochodnej (związki o wzorach od 6 do 8, główny produkt) w reakcji wyizolowano produkty następnych reakcji utlenienia – 25,26,27-trinor-24-aldehyd i 26-aldehyd, powstające z wydajnościami poniżej 5%.

Odpowiednie zabezpieczenie układu dienowego w pierścieniu B w postaci adduktu Dielsa-Aldera (wzory 3 - 5) powinno być dobrane w zależności od zastosowanego utleniacza (dioksiranu lub trifluorooctanu chromylu). W reakcji utlenienia niektórych adduktów, np. 3β -acetoksy-4'-fenylo-[1,2,4]triazolo[1',2':6,7](6,7-diaza-5,8-etenocholestano)-3',5'-dionu za pomocą dioksiranu generowanego *in situ* z 1,1,1-trifluoroacetonu za pomocą Oxone® otrzymano oprócz produktu 25-hydroksylowania, także 6,7-epoksyd jako produkt uboczny. Podobnie w przypadku niektórych zabezpieczonych substratów (np. 3β -acetoksy-5,8-etenofalazyno[2',3':6,7]-(6,7-diazacholestano)-1',4'-dionu) w reakcji ich utlenienia za pomocą trifluorooctanu chromylu zaobserwowano rozpad adduktu Dielsa-Aldera.

W ostatnim etapie 25-hydroksy pochodne (wzory 6 - 8) poddaje się reakcjom redukcyjnego usunięcia grup ochronnych w pierścieniu A i B za pomocą np. LiAlH_4 .

Sposób otrzymywania cholesta-5,7-dieno- 3β ,25-diolu będącego przedmiotem wynalazku ilustrują następujące przykłady.

PRZYKŁADY

Przykład 1.

Synteza 3β -acetoksy-5,8-etenofalazyno[2',3':6,7](6,7-diazacholestano)-1',4'-dionu

Zabezpieczenie grupy hydroksylowej i układu dienowego w 7-dehydrocholesterolu (wzór 2)

Estryfikacja 7-dehydrocholesterolu za pomocą bezwodnika octowego

Do roztworu 7-dehydrocholesterolu (2 g, 5,2 mmol) w bezwodnej pirydynie (15 ml) dodano w temperaturze pokojowej bezwodnik octowy (1,97 ml, 20,7 mmol) w atmosferze argonu. Mieszaninę reakcyjną mieszano 24 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie, po kontroli TLC (heksan/octan etylu, 8:2), pirydynę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w CH_2Cl_2 i przemyto 5% roztworem HCl i wodą, osuszono bezwodnym siarczanem sodu, rozpuszczalnik odparowano. Surowy produkt bez oczyszczania poddano dalszym transformacjom.

Cykloaddycja ftalazyno-1,4-dionu do octanu 7-dehydrocholesterylu

Do oziębionego w łaźni lodowej roztworu octanu 7-dehydrocholesterylu (1,717 g, 4,47 mmol) w suchym chlorku metylenu (10 ml) dodano w atmosferze argonu ftalohydrazyd (3,12 g, 19,2 mmol) i roztwór $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ (3,2 g, 7,24 mmol) w lodowatym kwasie octowym (3 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze 0-5°C, kontrolując przebieg reakcji za pomocą TLC (heksan - octan etylu, 8:2). Po godzinie do kolby reakcyjnej dodano obojętny tlenek glinu (8 g) i mieszaninę mieszano w temperaturze 0-5°C przez 30 minut. Po tym czasie mieszaninę przesączono. Przesącz przemyto 1M roztworem NaHCO_3 i wodą, osuszono nad bezwodnym siarczanem(VI) sodu, rozpuszczalnik odparowano. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Czysty produkt wyeluowano mieszaniną heksan – octan etylu (80 : 10) z wydajnością 77%.

3 β -acetoksy-5,8-etenoftalazyno[2',3':6,7](6,7-diazacholestano)-1',4'-dion: **¹H NMR** (400 MHz, CDCl_3): δ 8.17-8.12 (m, 2H), 7.73-7.68 (m, 2H), 6.67 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 6.31 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 4.74-4.69 (m, 1H), 4.04-4.00 (m, 1H), 3.95-3.91 (m, 1H), 2.25 (dd, $J_1=12.3$, $J_2=13.7$ Hz, 1H), 2.15-2.11 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.04 (s, 3H), 0.94 (d, $J=5.9$ Hz, 3H), 0.884 (d, $J=6.2$ Hz, 3H), 0.878 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 0.84 (s, 3H) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl_3): δ 170.1 (C), 162.2 (C), 159.8 (C), 137.7 (CH), 132.84 (CH), 132.76 (CH), 130.5 (C), 129.9 (C), 129.1 (CH), 127.0 (CH), 126.9 (CH), 70.0 (CH), 68.3 (C), 66.8 (C), 56.6 (CH), 50.3 (CH), 48.7 (CH), 44.4 (C), 40.4 (C), 39.5 (CH_2), 39.3 (CH_2),

35.8 (CH₂), 35.2 (CH), 34.9 (CH₂), 31.1 (CH₂), 28.0 (CH), 27.6 (CH₂), 26.1 (CH₂), 24.5 (CH₂), 23.7 (CH₂), 22.8 (CH₃), 22.6 (CH₃), 21.8 (CH₂), 21.3 (CH₃), 18.5 (CH₃), 18.4 (CH₃), 13.1 (CH₃) ppm; **HRMS** (ESI): obliczone C₃₇H₅₁N₂O₄⁺ [M+H]⁺ 587,3843, znalezienie 587,3846; **IR** (ATR): $\nu_{\max}$ 1732, 1650, 1602, 1309, 1238, 1169, 1026, 725, 695.

Przykład 2.

25-Hydroksylowanie 3 β -acetoksy-5,8-etenoftalazyno[2',3':6,7](6,7-diazacholestano)-1',4'-dionu za pomocą metylotrifluorometylodioksiranu w układzie dwufazowym CH₂Cl₂/woda

Mieszaninę reakcyjną zawierającą 3 β -acetoksy-5,8-etenoftalazyno[2',3':6,7](6,7-diazacholestano)-1',4'-dion (100 mg 0,17 mmola), Bu₄NHSO₄ (5% mol, 3 mg), CH₂Cl₂ (6 ml) i wodę (6 ml) ochłodzono w łaźni lodowej po czym dodano Oxone® (10 ekw.; 1,05 g; 1,7 mmola) oraz NaHCO₃ (20 ekw; 286 mg; 3,4 mmola). Kolbę reakcyjną zamknięto szczelnie gumowym septum. Następnie do mieszaniny reakcyjnej w 0°C dodano strzykawką oziębiony do -19°C 1,1,1-trifluoroaceton (50 ekw., 8,5 mmola, 0,76 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszało w temperaturze pokojowej przez 20 godzin. Następnie do kolby reakcyjnej dodano wodę i produkt wyekstrahowano CH₂Cl₂. Warstwę organiczną przemyto wodą i osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, rozpuszczalnik odparowano. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Stosując jako eluent mieszaninę heksan – octan etylu (90 : 10) odzyskano substrat z wydajnością 5%. Czysty produkt, 3 β -acetoksy-25-hydroksy-5,8-etenoftalazyno[2',3':6,7](6,7-diazacholestano)-1',4'-dion, wyeluowano mieszaniną heksan – octan etylu (80 : 10). Produkt otrzymano z wydajnością 48% (uwzględniając odzysk substratu z wydajnością 51%).

3 β -acetoksy-25-hydroksy-5,8-etenoftalazyno[2',3':6,7](6,7-diazacholestano)-1',4'-dion:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.16-8.11 (m, 2H), 7.71-7.68 (m, 2H), 6.66 (d, J =8.2 Hz, 1H), 6.30 (d, 1H, J =8.2 Hz, 1H), 4.74-4.68 (m, 1H), 4.04-3.99 (m, 1H), 3.96-3.91 (m, 1H), 2.28-2.21 (m, 1H), 2.14-2.10 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.23 (s, 6H), 1.05 (s, 3H), 0.95 (d, 3H, J =6.1 Hz), 0.84 (s, 3H) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ 170.1 (C), 162.1

(C), 159.7 (C), 137.7 (CH), 132.8 (CH), 132.7 (CH), 130.4 (C), 129.8 (C), 129.0 (CH), 127.0 (CH), 127.0 (CH), 71.0 (C), 69.9 (CH), 68.3 (C), 66.8 (C), 56.6 (CH), 50.3 (CH), 48.7 (CH), 44.3 (CH₂+C), 40.4 (C), 39.2 (CH₂), 36.0 (CH₂), 35.2 (CH), 34.9 (CH₂) 31.0 (CH₂), 29.2 (2xCH₃), 27.6 (CH₂), 26.0 (CH₂), 24.4 (CH₂), 21.7 (CH₂), 21.3 (CH₃), 20.6 (CH₂), 18.4 (CH₃), 18.3 (CH₃), 13.1 (CH₃) ppm; **HRMS** (ESI): obliczone C₃₇H₅₁N₂O₅⁺ [M+H]⁺ 603,3792, znalezione 603,3795; **IR** (ATR): $\nu_{\max}$ 3446, 1732, 1644, 1602, 1310, 1237, 1026, 725, 695.

Przykład 3.

25-Hydroksylowanie 3 β -acetoksy-5,8-etenofalazyno[2',3':6,7](6,7-diazacholestano)-1',4'-dionu za pomocą metylotrifluorometyldioksyranu w układzie dwufazowym CH₂Cl₂/woda na skalę 0,5 g

Do roztworu 3 β -acetoksy-5,8-etenofalazyno[2',3':6,7](6,7-diazacholestano)-1',4'-dionu (0,5 g, 0,85 mmola) w CH₂Cl₂ (20 ml) dodano Oxone® (10 ekw., 5,23 g, 8,5 mmola), Bu₄NHSO₄ (2.5% mol, 8 mg) i wodę (10 ml). Kolbę reakcyjną zamknięto szczelnie gumowym septum, przepuszczono strumień argonu i ochłodzono w łaźni lodowej. Następnie do mieszaniny reakcyjnej w temperaturze 0°C dodano strzykawką oziębiony 1,1,1-trifluoroaceton (50 ekw., 3,8 ml, 42,5 mmola) oraz roztwór NaHCO₃ (10 ekw., 0,72 g, 8,5 mmola) w 10 ml wody. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej. Po 24 godzinach przebieg reakcji skontrolowano za pomocą chromatografii TLC (heksan/ octan etylu, 6:4) i dodano nową porcję Oxone® (5 ekw., 2,62 g, 4,3 mmola) w 5 ml wody. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury 0°C i dodano 1,1,1-trifluoroaceton (25 ekw., 1,9 ml, 21 mmola) i roztwór NaHCO₃ (5 ekw., 0,357 g, 4,3 mmola) w 10 ml wody i mieszano przez kolejne 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do kolby reakcyjnej dodano wodę i produkt wyekstrahowano CH₂Cl₂. Warstwę organiczną przemyto wodą i osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, rozpuszczalnik odparowano po zmniejszonym ciśnieniu. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Czysty produkt 25-hydroksylowania wyeluowano mieszaniną heksan – octan etylu (80 : 20). Produkt otrzymano z wydajnością 46%.

Przykład 4.

25-Hydroksylowanie 3β -acetoksy-5,8-etenofalazyno[2',3':6,7](6,7-diazacholestano)-1',4'-dionu za pomocą dimetylodioksiranu

Do roztworu 3β -acetoksy-5,8-etenofalazyno[2',3':6,7](6,7-diazacholestano)-1',4'-dionu (50 mg, 0,085 mmola) w 3,3 ml acetonu oraz 1,3 ml wody dodano Oxone® (10 ekw., 524 mg, 0,85 mmola) oraz NaHCO₃ (20 ekw., 140 mg, 1,7 mmola). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny i ponownie dodano porcję Oxone® (5 ekw., 262 mg, 0,425 mmola) oraz NaHCO₃ (10 ekw., 70 mg, 0,85 mmola). Po kolejnych 24 godzinach zawartość kolby reakcyjnej przelano do rozdzielacza, dodano 5 ml wody i produkt ekstrahowano CH₂Cl₂ (3x20 ml). Warstwę organiczną osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, a rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surową mieszaninę oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Stosując jako eluent mieszaninę heksan – octan etylu (90:10) odzyskano substrat z wydajnością 24%, a czysty produkt 25-hydroksylowania wyeluowano mieszaniną heksan - octan etylu (80:20). Produkt otrzymano z wydajnością 26% (uwzględniając odzysk substratu z wydajnością 34%).

Przykład 5.

Usunięcie grup zabezpieczających w 3β -acetoksy-25-hydroksy-5,8-etenofalazyno[2',3':6,7](6,7-diazacholestano)-1',4'-dionie (synteza cholesta-5,7-dieno- 3β ,25-diolu, wzór 1)

Do roztworu 3β -acetoksy-25-hydroksy-5,8-etenofalazyno[2',3':6,7](6,7-diazacholestano)-1',4'-dionu (0,052 g, 0,086 mmola) w bezwodnym THF (10 ml) dodano w temperaturze 0°C w atmosferze argonu LiAlH₄ (0,033 g, 0,86 mmola). Następnie mieszaninę reakcyjną mieszano przez 3 godziny w temperaturze 45°C. Po tym czasie reakcję oziębiono do 0°C i nadmiar LiAlH₄ rozłożono dodając kolejno mieszaninę THF/woda, 15% roztwór NaOH (10 ml) i wodę (30 ml). Mieszaninę przesączono przez warstwę celitu, przemywając ją dodatkowo dwoma porcjami eteru (po 20 ml). Otrzymany przesącz przemyto wodą, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu i

rozpuszczalnik odparowano. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Czysty produkt wyeluowano mieszaniną heksan – octan etylu (70 : 30). Produkt otrzymano z wydajnością 61%.

Cholesta-5,7-dieno-3 β ,25-diol (wzór 1): **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ 5.60-5.58 (m, 1H), 5.41-5.39 (m, 1H), 3.68-3.62 (m, 1H), 2.51-2.46 (m, 1H), 2.33-2.26 (m, 1H), 2.12-2.08 (m, 1H), 1.23 (s, 6H), 0.97 (d, 3H, $J=6.6$ Hz), 0.96 (s, 3H), 0.63 (s, 3H) ppm. **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ 141.4 (C), 139.8 (C), 119.6 (CH), 116.3 (CH), 71.1 (C), 70.5 (CH), 55.8 (CH), 54.5 (CH), 46.2 (CH), 44.4 (CH₂), 42.9 (C), 40.8 (CH₂), 39.2 (CH₂), 38.4 (CH₂), 37.0 (C), 36.4 (CH₂), 36.1 (CH), 32.0 (CH₂), 29.4 (CH₃), 29.2 (CH₃), 28.1 (CH₂), 23.0 (CH₂), 21.1 (CH₂), 20.8 (CH₂), 18.8 (CH₃), 16.3 (CH₃), 11.8 (CH₃) ppm. Literaturowe dane spektroskopowe: Warnke, M.; Jung, T.; Dermer, J.; Hipp, K.; Jehmlich, N.; von Bergen, M.; Ferlino, S.; Fries, A.; Müller, M.; Boll, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 1881 – 1884.

Przykład 6.

Synteza 3-acetoksy-4'-fenylo-[1,2,4]triazolo[1',2':6,7](6,7-diaza-5,8-etenocholestano)-3',5'-dionu

Zabezpieczenie grupy hydroksylowej i układu dienowego w 7-dehydrocholesterolu

Cykloaddycja 4-fenylo-1,2,4-triazolo-3,5-dionu (PTAD) do 7-dehydrocholesterolu

Do mieszanej energicznie mieszaniny 4-fenylo-1,2,4-triazolo-3,5-dionu (PTAD) (1.2 ekw. 0,11 g, 0,621 mmola), Oxone® (1,2 ekw., 0,384 g, 0,624 mmola), KBr (0,24 ekw., 0,015 g, 0,126 mmola) i CH₂Cl₂ (4 ml) dodano w temperaturze pokojowej 0,1 ml wody. Mieszanie kontynuowano przez następne 20 minut, aż mieszanina zmieniła barwę na intensywnie czerwoną. Mieszaninę reakcyjną przesączono przez lejek ze spiekami, przemywając osad dodatkową porcją CH₂Cl₂ (2 ml). Przesącz zawierający 4-fenylo-1,2,4-triazolo-3,5-dion (PTAD) przeniesiono do kolby okrągłodennej i w temperaturze pokojowej dodano roztwór 7-dehydrocholesterolu (0,2 g, 0,52 mmola) w CH₂Cl₂ (5 ml). Otrzymaną mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, kontrolując przebieg reakcji za pomocą chromatografii TLC (heksan/ octan

etylu, 1:1). Następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Czysty addukt wyeluowano mieszaniną heksan – octan etylu (65 : 35) z wydajnością 98% i poddano acetylowaniu według poniższej procedury.

Acetylowanie za pomocą bezwodnika octowego

Do roztworu 3-hydroksy-4'-fenylo-[1,2,4]triazolo[1',2':6,7](6,7-diaza-5,8-etenocholestano)-3',5'-dionu (0,285 g, 0,51 mmola) i DMAP (0,1 ekw. 6,2 mg, 0,051 mmola) w bezwodnej pirydynie (3 ml) dodano w atmosferze argonu w temperaturze pokojowej bezwodnik octowy (0,5 ml, 5,3 mmola). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 16 godzin. Po tym czasie, po kontroli TLC (heksan/octan etylu, 1:1), pirydynę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w CH₂Cl₂ i przemyto 5% roztworem HCl i wodą, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, rozpuszczalnik odparowano. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Czysty produkt, 3β-acetoksy-4'-fenylo-[1,2,4]-triazolo[1',2':6,7](6,7-diaza-5,8-etenocholestano)-3',5'-dion, wyeluowano mieszaniną heksan – octan etylu (80 : 20) z wydajnością 89%.

3-acetoksy-4'-fenylo-[1,2,4]triazolo[1',2':6,7](6,7-diaza-5,8-etenocholestano)-3',5'-dion:
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.46-7.39 (m, 4H), 7.32-7.27 (m, 1H), 6.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.50-5.44 (m, 1H), 3.27-3.22 (m, 1H), 2.57-2.51 (m, 1H), 2.37-2.32 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.875 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.870 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 26/27-CH₃), 0.81 (s, 3H) ppm; **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ 170.0 (C), 149.0 (C), 146.5 (C), 135.2 (CH), 131.7 (C), 129.2 (CH), 128.8 (2xCH), 127.7 (CH), 126.2 (2xCH), 70.5 (CH), 65.3(C), 65.0 (C), 55.0 (CH), 52.8 (CH), 49.2 (CH), 44.0 (C), 41.1 (C), 39.4 (CH₂), 38.2 (CH₂), 35.8 (CH₂), 35.3 (CH), 33.7 (CH₂), 30.9 (CH₂), 28.0 (CH), 27.4 (CH₂), 25.9 (CH₂), 23.6 (CH₂), 23.3 (CH₂), 22.8 (CH₃), 22.5 (CH₃), 22.4 (CH₂), 21.3 (CH₃), 18.9 (CH₃), 17.5 (CH₃), 12.9 (CH₃) ppm; **IR** (ATR): *v*_{max} 2948, 2866, 1732, 1652, 1601, 1462, 1307, 1240, 1026 cm⁻¹; **HRMS** (ESI): obliczone C₃₇H₅₂N₃O₄⁺ [M+H]⁺ 602,3952, znalezione 603,3953.

Literaturowe dane spektroskopowe: Morzycki, J. W.; Siciński, R. R. *Acta Chimica Hungarica*, **1985**, 120, 239 – 246.

Przykład 7.

25-Hydroksylowanie 3β -acetoksy-4'-fenylo-[1,2,4]triazolo[1',2':6,7](6,7-diaza-5,8-etenocholestano)-3',5'-dionu za pomocą trifluorooctanu chromylu

Wstępnie osuszony w piecu (110°C) bezwodnik chromowy (0,062 g, 0,62 mmola) roztarto i przeniesiono do kolby typu Schlenk i suszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 130°C przez 4 godziny. Po ochłodzeniu do temperatury 0-5°C dodano w atmosferze argonu bezwodnika trifluorooctowego (0,087 ml, 0,617 mmola). Mieszanie kontynuowano w temperaturze pokojowej przez 16 godzin, zabezpieczając kolbę reakcyjną przed dostępem światłem (w czasie reakcji czerwona zawiesina CrO_3 w TFAA przekształca się w żółto-brązowy osad trifluorooctanu chromylu). Następnie nadmiar TFAA usunięto delikatnym strumieniem argonu.

Tak przygotowany trifluorooctan chromylu bez izolowania i oczyszczania użyto bezpośrednio do reakcji utlenienia 3β -acetoksy-4'-fenylo-[1,2,4]triazolo[1',2':6,7](6,7-diaza-5,8-etenocholestano)-3',5'-dionu. Kolbę reakcyjną zawierającą wytworzony trifluorooctan chromylu ochłodzono do temperatury -18°C (lód + NaCl). Następnie dodano bezwodny CCl_4 (3 ml) oraz ochłodzony do temperatury -18°C (lód + NaCl) roztwór 3β -acetoksy-4'-fenylo-[1,2,4]triazolo[1',2':6,7](6,7-diaza-5,8-etenocholestano)-3',5'-dionu (0,05 g, 0,083 mmol) w bezwodnym CH_2Cl_2 (10 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 10 minut kontrolując przebieg reakcji za pomocą TLC (heksan/octan etylu, 1:1). Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano nasycony roztwór siarczanu(IV) sodu, mieszano jeszcze przez 10 min., a następnie przeniesiono do rozdzielacza i ekstrahowano chloroformem (3 x 10 ml). Połączone ekstrakty organiczne przemyto solanką i wodą, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu, rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surową mieszaninę oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Stosując jako eluent mieszaninę heksan – octan etylu (83:17) odzyskano substrat z wydajnością 20%, a czysty produkt, 3β -acetoksy-25-hydroksy-4'-fenylo-[1,2,4]triazolo[1',2':6,7](6,7-

diaza-5,8-etenocholestano)-3',5'-dion, wyeluowano mieszaniną heksan - octan etylu (75:25). Produkt otrzymano z wydajnością 20% (uwzględniając odzysk substratu - 25%).

Trifluorooctanu chromylu można także przygotować jako roztwór w bezwodnym CCl_4 postępując zgodnie z opisaną wyżej procedurą, ale przed dodaniem do bezwodnika chromowego TFAA dodaje się wówczas CCl_4 (3 ml). W miarę postępu reakcji czerwona zawiesina CrO_3 w CCl_4 przekształca się w brązowawy roztwór trifluorooctanu chromylu.

3β -acetoksy-25-hydroksy-4'-fenylo-[1,2,4]triazolo[1',2':6,7](6,7-diaza-5,8-etenocholestano)-3',5'-dion: **$^1\text{H NMR}$** (400 MHz, CDCl_3): δ 7.43-7.40 (m, H), 7.33-7.28 (m, 1H), 6.44-6.42 (m, 1H), 6.28-6.24 (m, 1H), 5.50-5.44 (m, 1H), 3.24 (dd, $J = 13.9, 4.9$ Hz, 1H), 2.58-2.51 (m, 1H), 2.37-2.32 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.22 (s, 6H), 1.00 (s, 3H), 0.96 (d, $J = 6.4$ Hz), 0.81 (s, 3H) ppm; **$^{13}\text{C NMR}$** (100 MHz, CDCl_3): δ 170.0 (C), 148.9 (C), 146.4 (C), 135.2 (CH), 131.6 (C), 129.2 (CH), 128.8 (2xCH), 127.7 (CH), 126.2 (2xCH), 71.1 (C), 70.5 (CH), 65.3 (C), 64.9 (C), 55.0 (CH), 52.7 (CH), 49.2 (CH), 44.3 (CH₂), 44.0 (C), 41.0 (C), 38.1 (CH₂), 36.1 (CH₂), 35.2 (CH), 33.6 (CH₂), 30.9 (CH₂), 29.3 (CH₃), 29.2 (CH₃), 27.5 (CH₂), 25.9 (CH₂), 23.3 (CH₂), 22.4 (CH₂), 21.3 (CH₃), 20.6 (CH₂), 18.9 (CH₃), 17.4 (CH₃), 12.9 (CH₃) ppm; **IR** (ATR): ν_{max} 3473, 2938, 1746, 1694, 1500, 1395, 1026, 756, 722 cm^{-1} . Literaturowe dane spektroskopowe: Eyley, S. C.; Williams, D. H. *J. Chem. Soc., Perkin trans. 1*, **1976**, 731 - 735.

Przykład 8.

Usunięcie grup zabezpieczających w 3β -acetoksy-25-hydroksy-4'-fenylo-[1,2,4]triazolo[1',2':6,7](6,7-diaza-5,8-etenocholestano)-3',5'-dionie (otrzymanie cholesta-5,7-dieno- 3β ,25-diolu, wzór 1)

Do roztworu 3β -acetoksy-25-hydroksy-4'-fenylo-[1,2,4]triazolo[1',2':6,7](6,7-diaza-5,8-etenocholestano)-3',5'-dion (0,02 g, 0,032 mmola) w bezwodnym THF (5 ml) dodano w temperaturze 0°C i w atmosferze argonu LiAlH_4 (0,012 g, 0,32 mmola). Następnie mieszaninę reakcyjną mieszano przez 2 godziny w wrzeniu. Po tym czasie

mieszaninę reakcyjną oziębiono do temperatury 0°C i nieprzereagowany LiAlH_4 rozłożono dodając ostrożnie mieszaninę THF/woda, a następnie roztwór kwasu solnego. Produkt wyekstrahowano eterem dietylowym. Warstwę organiczną przemyto roztworem NaHCO_3 i wodą, osuszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu i rozpuszczalnik odparowano. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Czysty produkt wyeluowano mieszaniną heksan – octan etylu (70 : 30). Produkt otrzymano z wydajnością 72%.

Joanna

Dargiewicz

Elektronicznie
podpisany przez
Joanna Dargiewicz
Data: 2023.04.24
18:46:02 +02'00'