潰瘍性大腸炎経口治療を目的とする大腸選択的
pro-antedrug の設計と合成¹⁾藤原由紀子・松田泰行・海野勝男・鈴木敏夫^{*1)},
黒崎勇二・中山太二・木村聡城郎^{*2)}*Design and syntheses of colon-specific pro-antedrugs for oral treatment of ulcerative colitis*

Both hydrophilic steroid derivatives, methyl 20- α -glucopyranosyloxy prednisolones(9 and 10) and methyl prednisolone 20-sodium sulfates(11 and 12) were synthesised from prednisolone via methyl 20(S/R)-dihydroprednisolones(1 and 2) based on a new colon-specific drug-delivery system. Optimal conditions for the syntheses of each isomers(1) and (2) were found by the extensive studies on the reaction rates from prednisolone under various concentrations of cupric acetate in dry methanol. Their configurations at C20 in (1) and (2) were determined by their formation mechanism and ¹HNMR spectroscopic studies of the corresponding acetates(3) and (4).

Yukiko Fujiwara・Yasuyuki Matsuda・
Katsuo Unno・Toshio Suzuki^{*1)},
Yuji Kurosaki・Taiji Nakayama・
Toshikiro Kimura^{*2)}*key words : pro-antedrug, ulcerative colitis,
methyl 20-dihydroprednisolone,
20- α -glucopyranosyloxy prednisolone,
methyl prednisolone 20-sodium sulfate*

炎症およびアレルギーの治療薬として、より強い作用を有し、かつ持続時間の長い鋭い切れ味を有する薬物を求め、多くの天然および半合成ステロイドが検討され、種々のステロイド剤が開発されてきた。現在では炎症、アレルギーをはじめ数々の疾患の治療薬として欠くことの出来ない薬物となっている。

しかしながら、ステロイド剤の副腎分泌機能の低下や、小児の成長障害などの全身的な副作用ゆえに、本剤の使用には量的および期間的に限界がある²⁾。これらの欠点はステロイドの化学構造に由来するものであり、抗炎症作用のみを有し、副作用の原因となる糖質コルチコイド作用を持たないステロイド剤の開発が望まれている。

本研究においては、難治性疾患として知られている潰瘍性大腸炎に的を絞る、その治療薬を開発することを目的とした。潰瘍性大腸炎の治療に用いられている prednisolone は、経口投与すると投与量の大部分が小腸において吸収されるため、大腸に到達する薬物は1%に満たず、一方、小腸で吸収されたステロイドは全身的副作用を引き起こすことが知られており、これらの事実がステロイドによる潰瘍性大腸炎の治療を困難なものにしている³⁾。これらの欠点を克服するために、粘膜局所に効率的に作用させ、かつ薬物吸収後の全身的副作用を軽減させるようアンテドラッグ⁴⁻⁶⁾を選び、さらに、経口投与後大腸の腸内細菌によりアンテドラッグを再生するプロドラッグとして、methyl 20-dihydroprednisolone の配糖体および硫酸抱合体を設計および合成したので、その間の詳細について報告する(図1)。

材 料

prednisolone は半井テクス(株)より、 α -D-glucopyranosyl bromide tetrabenzoate は Aldrich Chem. Co., Ltd. より、他の試薬、溶媒などはすべて和光純薬工業(株)より購入した。なお、溶媒は試薬特級を用い、酢酸エチルは蓄留を行ったあとに用いた。シリカゲルはカラムクロマトグラム用 Wakogel C-200 を用いた。なお、炭酸銀

^{*1)} Department of Pharmaceutical Science, Akita University Hospital, Hondo 1-1-1, Akita 秋田大学医学部附属病院薬剤部

^{*2)} Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Tsushima 1-1-1, Okayama 岡山大学薬学部薬剤学教室

図 1 New concept and design of colon-specific pro-antidrug for oral treatment of ulcerative colitis

表 1 Various reaction conditions for syntheses of methyl 20(R/S)-dihydroprednisolonate (1) and (2)

reaction		conditions	
prednisolone (mg)	dry MeOH (ml)	0.11 M soln. of Cu(OAc) ₂ in dry MeOH (ml)	prednisolone/Cu(OAc) ₂ (mol/mol)
20	2.95	0.05	0.1
20	2.90	0.10	0.2
20	2.75	0.25	0.5
20	2.50	0.50	1.0
20	2.00	1.00	2.0

は、硝酸銀と炭酸ナトリウムより McClosky らの方法¹¹⁾に準じて用時調製した。

方法

最初に母核となる methyl 20-dihydroprednisolonate の合成を検討した。本物質の合成およびその薬理作用は、すでに Lee らによりなされており、そのアンテドラッグとしての有用性が報告されている^{4,7,8)}。しかしながら、本化合物合成における反応の至適条件、20(R)および20(S)体の生成速度ならびに反応機構については報告されていない。

そこでまず最初に、methyl 20-dihydroprednisolonate 合成における反応条件を詳細に検討することにした。

(1) 種々の酢酸銅濃度下における methyl 20(S/R)-dihydroprednisolonate (1)および(2)の生成に対する定量分析

prednisolone の酸化剤としては、Lewbart らの方法⁹⁾に準じて無水酢酸銅を用い、反応の至適条件を検討するため、prednisolone に対する無水酢酸銅のモル比を表 1 に示したように、0.1, 0.2, 0.5, 1.0, および 2.0 に設定し、無水メタノール中室温にて攪拌、生成する methyl 20(S)および20(R)-dihydroprednisolonate (1)および(2)を、反応開始後 26 日目まで高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により経時的に追跡した(図 2)。

本反応によって得られる化合物(1)および(2)は、HPLC においては分離可能であったが、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離精製は困

図2 Time courses for the formation of the products (1) and (2) from prednisolone under various conditions

All reactions have been done by stirring a mixture of prednisolone and $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ in dry MeOH at room temperature.

Yields of the products (1) and (2) were determined by calculating the AUC of the corresponding peak A (r. t., 10.8 min.) and B (r. t., 7.7 min.) which were detected at 240 nm in HPLC measurement (mobile phase: MeOH : H_2O 6 : 4 v/v)

図3 Separation of the compounds (1) and (2) via the compounds (3) and (4) and syntheses of the inactive carboxylic acids (5) and (6)

難であった。そこで、化合物(1)および(2)の混合物をピリジン中、無水酢酸にてアセチル化を行ったところ、容易に分離し、 C_{20} 位に関する異性体(3)および(4)を単離することが出来た。ついでそれぞれ無水メタノール中、炭酸カリウムを用いて脱アセチル化することにより、当初目的とした異性体(1)および(2)を単一化合物として得ることが出来た。

なお、不活性物質として知られているカルボン酸(5)および(6)の物理化学的性質を明らかにするため、化合物(1)および(2)のそれぞれをメタノール中、2モル濃度の水酸カリウム溶液と処理することにより化合物(5)および(6)とした(図3)。

(2) Methyl 20(S/R)-dihydroprednisolunate (1)および(2)の C_{20} 位水酸基への糖の導入

ステロイドの C_{20} 位水酸基への糖の導入は、Chang らにより報告されており³⁾、糖を導入することにより、胃、小腸からの吸収が抑制されるとともに、大腸に到達した薬物は、大腸の腸内細菌により、グリコシド結合が容易に加水分解を受け、活性型に変換されることが示された。本法をアンテドラッグとして知られている methyl 20-dihydroprednisolunate に適用することにより、大腸粘膜特異性を有し、かつ全身的副作用を有さない理想的なステロイド剤の開発が可能となる。

化合物(1)および(2)の C_{20} 位水酸基への糖の導入は Koenigs-Knorr 反応¹⁰⁾を改良することにより

図4 Glucosidations of methyl 20-dihydroprednisolones (1) and (2)

図5 Sulfonations of methyl 20-dihydroprednisolones (1) and (2)

行った。すなわち、窒素気流、遮光下 methyl 20-dihydroprednisolone, および用時調製した5当量の炭酸銀¹¹⁾の無水塩化メチレン溶液に、塩化メチレンを蒸留しつつ6当量の α -D-glucopyranosyl bromide の無水塩化メチレン溶液を40~50分を要し滴下。反応混合物を2時間、塩化メチレンを補充しつつ加熱蒸留、反応成績体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付すことにより化合物(1)からは75.8%, (2)からは72.6%の収率で配糖体(7)および(8)を得た。

ついで、化合物(7)および(8)のそれぞれを無水メタノール中、炭酸カリウムと室温にて処理し脱ベンゾイル化することにより目的とする配糖体(9)および(10)をそれぞれ88.5, 92.7%の収率で得ることが出来た(図4)。

(3) Methyl 20(R/S)-dihydroprednisolone (1)および(2)の硫酸抱合体の合成

腸内細菌による硫酸エステルの開裂は, Jauchらにより報告されている¹²⁾。そこで Pala らの合成法¹³⁾に準じて methyl 20-dihydropred-

図 6 Reaction mechanism in the formation of (1) and (2) from prednisolone

図 7 Possible conformation of ketene intermediate and addition of MeOH

path a : more favored because of less hindrance between approaching proton and C18 angular methyl group

path b : less favored because of less hindrance between approaching proton and C18 angular methyl group, C16 β proton

nisolone の硫酸抱合体の合成を行った。すなわち、化合物(1)および(2)の無水ピリジン溶液に氷冷、窒素気流下 2.4 当量のクロルスルホン酸を注意ぶかく滴下後、反応混合物を室温にて 3 時間攪拌することにより、相当する硫酸抱合体(1)および(2)をそれぞれ 75.5 および 80.5% の収率で得ることが出来た(図 5)。

結果と考察

成績体(1)および(2)の収率は、いずれの条件下においても反応開始後 12 日目までは直線的に増加し、モル比 2.0 を除いては 22 日目にほぼ定常状態に達した。一方、成績体(2)においては、モル比 0.5 を除いては 12 日目でほぼ定常状態に達することが明らかとなった。事実、12 日目以降 HPLC において新たなピークがあらわれはじめ、そのピークは時間の経過とともに増加した。以上の事実は、12 日目以降は目的物(1)および(2)の生成と分解が同時に起っていることを示唆するものであり、その分解速度は、化合物(2)において酢酸銅のモル比が高くなるにつれ速くなることが明らかとなっ

た。

以上の結果から、化合物(1)を高収率で得るための条件は、酢酸銅の prednisolone に対するモル比を大きくし(少なくとも 2 倍)、かつ反応時間を長くする(26 日以上)ことであり、一方、化合物(2)および(1)+(2)の収率を上げるための条件としては、酢酸銅は 0.5 当量で十分であり、反応時間は 26 日程度とすることが妥当と考えられた。

化合物(1)および(2)の C₂₀ 位の立体配位については、Lee らはそれぞれの化合物を過剰の水素化ナトリウムによりメチルエステル基を還元し、いわゆる“delta-triol acetate”とし、これらの化合物がすでに C₂₀ 位の立体配位の知られている既存の化合物より導いた標準物質と一致することにより、その立体配位を明らかにしている⁸⁾。

本法は C₂₀ 位の立体配位が明らかであり、かつ目的とする化合物に誘導可能な場合にのみ成立する。

筆者らはより一般的、かつ普遍的な C₂₀ 位の立体配位を明らかにする方法を求め検討を加えることにした。まず最初に化合物(1)および(2)の生成速度を詳細に検討し、その反応性の差から C₂₀ 位の立体化学を明らかにしようとした。図 2 から明らかのように、化合物(1)の生成速度は化合物(2)のそれにくらべていずれの条件下においてもはやいことがわかる。この生成速度の差はつぎのように考えることにより合理的に説明することが出来る。すなわち、prednisolone から化合物(1)および(2)の生成過程における中間体と考えられるケテンは、銅存在下においては、C₁₇ 位および C₂₀ 位両水酸基と銅との間でキレート結合により図 7 に示したような立体配座をとり、安定化していると考えることが出来る。したがって、立体障害の少ない α 側からのプロトンの付加が β 側のそれより有利となり、(S)配位を有する化合物(1)の生成速度が

- 1: R¹=H, R²=OH 3: R¹=H, R²=OAc
2: R¹=OH, R²=H 4: R¹=OAc, R²=H

図8 Possible conformation of methyl 20-dihydroprednisolonate derivatives
Methyl group at C18 of the compound (3) shifts to downfield due to anisotropy of the acetyl group at C20 in NMR spectrum

(R)配位を有する化合物(2)のそれより速くなると結論づけることが出来る(図6, 7)。

以上の事実および考察の正しいことは、化合物(1)および(2)の相当するアセチル体(3)および(4)の¹HNMR スペクトルによっても支持される。

すなわち、化合物(1)および(2)の種々の物理化学的データより、両者はC₂₀位に関する異性体であることは明らかであるが、両者のスペクトルにはほとんど差がなく、C₂₀位の立体配位に関する情報は得られない。しかしながら、相当するアセチル体(3)および(4)の¹HNMR スペクトルにおいて、C₁₈位メチル基が化合物(3)においては1.05ppmに、化合物(4)においては1.23ppmにあらわれ有意の差が見出された。化合物(1), (2), (3)および(4)はC₁₇α位の水酸基とC₂₀位エステル基のケトンとの間で分子内水素結合を形成し、Aのような安定な立体配座をとっていると考えられ、化合物(4)においては、C₁₈位メチル基はC₂₀位アセチル基のアニソトロピー¹⁴⁾を受けるようになり、低磁場シフトしたものと考えることが出来る。

以上のように生成速度の遅い化合物のアセチル体のC₁₈位メチル基、生成速度の速い化合物のそれよりも低磁場にあらわれるという事実は、dexamethasone誘導体に関しても同様であり(20(R)体:1.23ppm; 20(S)体:1.08ppm)、本考察は、C₁₇位にこれら化合物と同様な官能基を有する他のステロイド誘導体に対しても適用可能であり、C₂₀位立体配位の一般的かつ簡易決定法として特に興味ぶかい(図8)。

配糖体(9)および(10)のグリコシド結合の配位ならびにベンゾイル基の位置については、それぞれの化合物の¹HNMR(500MHz)を詳細に検討することにより決定した。

一般に、α-グリコシド結合をしているアノメリックプロトンのカップリング定数は約4Hz(Hax-Heq)であり、一方、β-グリコシド結合をしているアノメリックプロトンのそれは約8Hz(Hax-Hax)であることが知られている^{3,16)}。配糖体(7), (8), (9)および(10)のアノメリックプロトンのカップリング定数は4.3~5.1Hzであり、いずれの化合物もα-グリコシン結合を有していることが明らかとなった。化合物(9)および(10)におけるベンゾイルの位置は、(9)においては4.36, (10)においては4.32ppmとベンゾイル基の影響を受け低磁場シフトしているC_{2'}位のプロトンがアノメリックプロトンとカップリングしていることから決定した。テトラベンゾイル体(7)および(8)の脱ベンゾイル化反応により、C_{2'}位にベンゾイル基が残った理由は、C_{2'}位の立体的な混み合いによるものと考えられる。

実験

融点は天澤 BY-1 微量融点測定器で測定し未補正である。IR スペクトルは JASCO 810 型測定装置、¹HNMR スペクトルは JEOL JNM-PMX-60, JEOL PMX-GSX 270, JEOL JNM-GX-400, JNM-GX-500 核磁気共鳴装置を用い、ケミカルシフトはテトラメチルシランを内部基準とし、δ(ppm)で表示した。

Mass スペクトルは、JEOL JMS-OISG-2, JEOL DX-300, VG70-SE 質量分析測定装置を用い、旋光度は、PM-101 旋光光度計で測定した。HPLC は Waters 600E, カラムは μBondapak C₁₈ 3.9×300 mm(Waters)を用い 240 nm(Waters 484)にて検出した。

(1) 種々の条件下における methyl(20S/R)-11β, 17-20-trihydroxy-4-oxo-pregnadien-21-oate (1)および(2)の生成に対する定量分析
0.11 Mの無水 Cu(OAc)₂ の無水 MeOH 溶液に prednisolone(20 mg)の無水 MeOH 溶液を表1に示した各条件下、室温攪拌しながら加え、HPLC を用いそれぞれの条件下において生成し

た(1)および(2)を26日間経時的に追跡した。

すなわち、反応混合物の50 μ lに塩化メチレン(10 ml)を加え、この溶液の6 μ lをとり、移動相としてMeOH:H₂O(6/4 v/v)、流速0.6 ml/minにて流出させた。流出液を240 nm(Water 484)を用い検出、retention time 10.8(化合物1)および7.7 min(化合物2)の二つのピークのAUCを計算することにより、それぞれの収率を計算しその結果を図2~4に示した。

(2) Methyl(20 S/R)-11 β ,17,20-trihydroxy-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (1)および(2)合成の代表例

Cu(OAc)₂(1.2 g, 0.007mol)の無水 MeOH 溶液(350 ml)に室温攪拌下、prednisolone(5 g, 0.0139mol)の無水 MeOH(350 ml)溶液を滴下した。反応混合物を室温にて26日間攪拌。EDTA(2.8 g, 0.0075mol)の水溶液(70 ml)を加えた後、溶媒を減圧下留去。得られた残留物をCHCl₃にて抽出。CHCl₃層を飽和食塩水にて洗浄、無水 MgSO₄にて乾燥後、溶媒を留去することにより粗反応成績体(5.5 g)を得た。

本物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃-MeOH(99:1 v/v)溶出液より methyl(20-11 β , 17, 20-trihydroxy-3-oxo-1, 4-pregnadien-21-oate(3.21 g)を20位に関してジアステリオマーの関係にある2種の化合物の混合物として得た。本物質は分離困難なためさらに精製することなしにつぎの反応に付した。

(3) (20S/R)-Acetoxy-11 β ,17-dihydroxy-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (3)および(4)

Methyl 20-(S/R)-11 β , 17, 20-trihydroxy-3-oxo-1, 4-pregnadien-21-oate の混合物(1 g)の無水ピリジン(3 ml)溶液に無水酢酸(3 ml)を滴下。滴下終了後反応混合物を室温にて20時間攪拌。反応終了後、少量の水を加え、無水酢酸を分解したあと、酢酸およびピリジンを減圧下留去した。残渣をクロロフォルムに溶解し、クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄、無水 MgSO₄で乾燥後溶媒を留去。得られる残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃-MeOH(99:1 v/v)流出液より2種類の無色カラメル状物質(30.3 mg, 16.2% from prednisolone, および 380 mg, 20.3% from prednisolone)を得た。

前者を MeOH より再結晶することにより (20R)-acetoxy-11 β , 17-dihydroxy-3-oxo-1, 4-pregnadien-21-oate (4)を無色プリズム晶として得た。[α]_D²²+69.3°(c=0.3, CHCl₃): mp. 236~238°•IR ν _{max}^{CHCl₃} cm⁻¹: 3600, 3550~3200(OH), 1746, 1660(CO), 1619, 1605(C=C); NMR(CDCl₃) δ : 7.23(3H, s, CH₃)1.47(3H, s, CH₃), 2.15(3H, s, COCH₃), 3.75(3H, s, CO₂CH₃)4.28~4.67(1H, m, C₁₁-H), 5.07(1H, s, C₂₀-H), 5.98(7H, brs, C₄-H), 6.12(1H, dd, J=10, 2Hz, C₂-H), 7.20(1H, d, J=10Hz, C₁-H): MS m/z Calcd. for C₂₄H₃₂O₇: 432. 2146(M⁺) Found 432. 2145(M⁺). さらに後者を MeOH より再結晶することにより(20S)-acetoxy-11 β , 17-dihydroxy-3-oxo-1, 4-pregnadien-21-oate (3)を無色針状晶として得た。[α]_D²²+44.7°(c=0.3, CHCl₃): mp. 203~204°•IR ν _{max}^{CHCl₃} cm⁻¹: 3575, 3550~3200(OH), 1749, 1660(CO), 1620, 1605(C=C): NMR(CDCl₃) δ : 1.05(3H, s, CH₃)1.45(3H, s, CH₃), 2.17(3H, s, COCH₃), 3.73(3H, s, CO₂CH₃), 5.08(1H, s, C₂₀-H), 4.30~4.53(1H, m, C₁₁-H), 5.97(1H, brs, C₄-H), 6.21(1H, dd, J=10, 2Hz, C₂-H), 7.20(1H, d, J=10Hz, C₁-H), MS m/z Calcd. for C₂₄H₃₂O₇: 432. 2147(M⁺) Found 432. 2142(M⁺).

(4) Methyl(20R)-11 β ,17,20-trihydroxy-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (2)

(20R)-Acetoxy-11 β , 17, 20-trihydroxy-3-oxo-1, 4-pregnadien-21-oate(4, 982 mg)の無水 MeOH(10 ml)溶液に K₂CO₃(98 mg)を加え室温にて10分攪拌、反応混合物にクロロフォルムを加え、飽和食塩水にて洗浄後、MgSO₄で乾燥、溶媒を留去することにより結晶性残留物を得た。MeOH より再結晶することにより, methyl(20R)-11 β , 17, 20-trihydroxy-3-oxo-1, 4-pregnadien-21-oate (2,750 mg)を無色プリズム晶として得た。[α]_D²³+36.7°(c=0.3, CHCl₃): mp. 263~264°•IR ν _{max}^{CHCl₃} cm⁻¹: 3600, 3575~3200(OH), 1727, 1660(CO), 1620, 1605(C=C): NMR(CDCl₃) δ : 1.13(3H, s, CH₃)1.45(3H, s, CH₃), 3.80(3H, s, CO₂CH₃), 4.0~4.67(2H, m, C₁₁-H, C₂₀-H), 6.0(1H, d, J=2Hz, C₄-H), 6.22(1H, dd, J=10, 2Hz, C₂-H), 7.18(1H, d, J=10Hz, C₁-

H): MS m/z Calcd. for $C_{22}H_{30}O_6$: 390. 2041(M^+), Found 390. 2036(M^+).

(5) Methyl(20S)-11 β ,17,20-trihydroxy-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (1)

(20S)-acetoxo-11 β ,17,20-trihydroxy-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (3, 1.0 g)の無水 MeOH (11 ml)溶液に K_2CO_3 (100 mg)を加え室温にて 20 分攪拌. 反応混合物にクロロフォルムを加え飽和食塩水にて洗浄後, $MgSO_4$ で乾燥した. 溶媒を留去し得られる残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し $CHCl_3$ -MeOH (99:1 v/v)溶出液より無色カラメル状物質 (805 mg)を得た. 本物質を acetone-hexane より再結晶することにより methyl(20S)-11 β ,17,20-trihydroxy-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (1)を無色プリズム晶として得た. $[\alpha]_D^{23} + 20.0^\circ$ ($c=0.3$, $CHCl_3$): mp. 176~178°: $IR \nu_{max}^{CHCl_3} cm^{-1}$: 3600, 3575~3200(OH), 1730, 1660(CO), 1620, 1605(C=C); NMR($CDCl_3$) δ : 1.15(3H, s, CH_3), 1.45(3H, s, CH_3), 3.75(3H, s, CO_2CH_3), 4.20~4.53(2H, m, C_{11} -H, C_{20} -H), 5.98(1H, d, $J=2$ Hz, C_4 -H), 6.23(1H, dd, $J=10$, 2Hz, C_2 -H), 7.32(1H, d, $J=10$ Hz, C_1 -H): MS m/z Calcd. for $C_{22}H_{30}O_6$: 390. 2044(M^+), Found 390. 2049(M^+).

(6) (20S)-11 β ,17,20-trihydroxy-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oic acid (5)

Methyl(20S)-11 β ,17,20-trihydroxy-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (1, 50 mg)の MeOH (0.5 ml)溶液に 2M KOH (0.1 ml)溶液を加え反応混合物を室温にて 18 時間攪拌後, 溶媒を留去. 得られた残留物に H_2O (0.5 ml)を加え, 6NHCl にて塩酸酸性としたのち AcOEt にて抽出, $MgSO_4$ にて乾燥後, 溶媒を留去. エーテルで洗浄後 acetone- H_2O より再結晶することにより (20S)-11 β ,17,20-trihydroxy-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oic acid (5, 36.2 mg, 75%)を無色プリズム晶として得た. $[\alpha]_D^{23} + 12.2^\circ$ ($c=0.13$, MeOH): mp. 173~174°: $IR \nu_{max}^{KBr} cm^{-1}$: 3600~3200(OH), 1724, 1655(CO), 1600(C=C), NMR($CDCl_3 + CD_3OD$) δ : 1.13(3H, s, CH_3), 1.43(3H, s, CH_3): MS m/z Calcd. for $C_{21}H_{28}O_6$: 376, 1884(M^+), Found 376. 1882(M^+).

(7) (20R)-11 β ,17,20-Trihydroxy-3-oxo-

1,4-pregnadien-21-oic acid (6)

Methyl(20R)-11 β ,17,20-trihydroxy-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (2, 30 mg)の MeOH (0.5 ml)溶液に 2 M KOH (0.1 ml)溶液を加えた反応混合物を室温にて 18 時間攪拌後, 溶媒を留去. 得られた残渣に H_2O (0.5 ml)を加え, 6NHCl にて塩酸酸性としたあと AcOEt にて抽出, $MgSO_4$ にて乾燥後, 溶媒を留去. エーテルで洗浄後 MeOH より再結晶することにより, (20R)-11 β ,17,20-trihydroxy-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oic acid (6, 22.3 mg, 77%)を無色プリズム晶として得た. $[\alpha]_D^{23} + 39.7^\circ$ ($c=0.13$, MeOH): mp 211~213°: $IR \nu_{max}^{KBr} cm^{-1}$ 3600~3200(OH), 1724, 1652(CO), 1586(C=C): NMR($CDCl_3 + CD_3OD$) δ : 1.17(3H, s, CH_3) 1.47(3H, s, CH_3): MS m/z Calcd. for $C_{21}H_{28}O_6$: 376. 1884(M^+), Found 376. 1879(M^+).

(8) Methyl(20R)-11 β ,17-dihydroxy-20-(2',3',4',6',tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosyloxy)-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (8)

Methyl ester 体 (2, 512 mg, 0.0013mol)と用時調整した Ag_2CO_3 (2.17 g, 0.079mol)の無水 CH_2Cl_2 (100 ml)懸濁溶液に無水 CH_2Cl_2 (50 ml)の α -D-glucopyranosyl bromide (4.33 g, 0.006 mol)溶液を加え加熱還流遮光下 50 分をかけ滴下. 滴下後反応混合物を 50 分加熱還流した. その間 CH_2Cl_2 を補充しつつ常圧にて連続的に留去した. 反応終了後, 不溶物を CH_2Cl_2 で洗浄しながら濾過・濾液を飽和食塩水で洗浄後, $MgSO_4$ で乾燥した.

溶媒を留去することにより得られる無色カラメル状物質 (5.62 g)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-AcOEt (1:1 v/v)溶出液より tetrabenzoyl glucoside (8, 922.6 mg, 72.6%)の無色飴状物質を得た. $[\alpha]_D^{24} + 24.1^\circ$ ($C=0.26$, $CHCl_3$): $IR \nu_{max}^{CHCl_3} cm^{-1}$: 1728, 1660(C=O), 1620, 1605(C=O): NMR($CDCl_3$) δ : 0.84(3H, s, CH_3) 1.34(3H, s, CH_3), 3.62(3H, s, CO_2CH_3) 3.86(1H, s, C_{20} -H), 3.92(1H, m, C_5' -H) 4.22(1H, m, C_{11} -H) 4.44(1H, dd, $J=12.2$ 2.5Hz, C_6' -H) 4.84(1H, ddd, $J=4.9$, 3.5, 1.2Hz, C_2' -H), 5.35(1H, dd, $J=8.6$, 1.2Hz, C_4' -H), 5.59(1H, dd, $J=3.5$, 1.2Hz, C_3' -H), 5.77(1H, d, $J=4.9$ Hz, C_1' -H),

5.91(1H, brs., C₄-H), 6.14(1H, dd, J=10.4, 1.8 Hz, C₂-H), 7.63~7.18(12H, m, PhH); 8.03~7.63 (8H, m, ortho PhH) FAB MS m/z Calcd. for C₅₆H₅₆O₁₅ 968(M⁺), Found 969(M⁺+1): さらに同流出液より原料である methyl ester 体(2, 83.4 mg)を回収した.

(9) Methyl(20S)-11 β ,17-dihydroxy-20-(2',3',4',6'-tetra-O-benzoyl- α -D-glucopyranosyloxy)-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (7)

Methyl ester(1, 700 mg, 0.0018mol)と用時調整した Ag₂CO₃(2.97 g, 0.0108mol)の無水 CH₂Cl₂(100 ml)懸濁溶液に無水 CH₂Cl₂(50 ml)中, α -D-glucopyranosyl bromide(5.92 g, 0.009mol)を加熱還流下 50 分をかけ滴下. 滴下後, 先と同様の処理を行うことにより得られる無色カラメル状物質をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl₃-MeOH(99:1 v/v)溶出液より tetrabenzoyl glucoside(7, 1.32 g, 75.8%)の無色飴状物質を得た. $[\alpha]_D^{25} + 30.3^\circ$ (c=0.35, CHCl₃): IR $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 1728, 1660(C=O) 1620, 1605(C=C): NMR(CDCl₃) δ : 0.56(3H, s, CH₃), 1.44(3H, s, CH₃), 3.78(3H, s, CO₂CH₃) 3.87(1H, m, C₅'-H), 4.08(1H, s, C₂₀-H), 4.35(1H, m, C₁₁-H), 4.29(1H, dd, J=12.2, 4.9Hz, C₆'-H), 4.45(1H, dd, J=12.2, 3.1Hz, C₆'-H), 4.82(1H, dd, J=4.3, 3.2Hz, C₂'-H), 5.43(1H, dd, J=9.2, 1.2Hz C₄'-H), 5.60(1H, dd, J=3.2, 1.2, C₃'-H), 6.0(1H, s, C₄-H), 6.15(1H, d, J=4.3Hz, C₁'-H), 6.25(1H, dd, J=9.8, 1.8Hz, C₂-H) 7.68~7.23(12H, m, PhH), 8.12~7.78(8H, m, ortho PhH): FAB MS m/z Calcd. for C₅₆H₅₆O₁₅: 968(M⁺), Found 969(M⁺+1).

(10) Methyl(20R)-11 β ,17-dihydroxy-20-(2'-O-benzoyl- α -D-glucopyranosyloxy)-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (10)

Tetrabenzoyl glucoside(8, 589 mg)および無水 K₂CO₃(50 mg)の無水 MeOH(5 ml)溶液を室温下 50 分攪拌後, クロロフォルムを加え, 有機層を飽和食塩水にて洗浄. MgSO₄ で乾燥後, 溶媒を留去して得られる残留物を CHCl₃-hexane より再結晶することにより, 目的とする monobenzoyl 体(10, 370 mg, 92.7%)を無色プリズム晶として得た. $[\alpha]_D^{25} + 68.3^\circ$ (c=0.21, MeOH): mp. 193~195°; IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3700~3100(OH), 1732, 1657

(C=O), 1620, 1605(C=C): NMR(CDCl₃) δ : 0.83(3H, s, CH₃) 1.31(3H, s, CH₃) 3.38(1H, ddd, J=5.1, 5.1, 2.6Hz, C₃'-H), 3.56(3H, s, CO₂CH₃), 3.83(1H, d, J=1.2Hz, C₂₀-H), 4.17(1H, brs, C₁₁-H), 4.32(1H, ddd, J=5.1, 5.1, 1.2Hz, C₂'-H) 7.20(1H, d, J=10.3Hz, C₁-H), 7.26~7.28(3H, m, PhH), 7.48~7.50(2H, m, ortho PhH): FAB MS m/z Calcd. for C₃₅H₄₄O₁₂ 656(M⁺), Found 657(M⁺+1)

(11) Methyl(20S)-11 β ,17-dihydroxy-20-(2'-O-benzoyl- α -D-glucopyranosyloxy)-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (9)

Tetrabenzoyl glucoside(7, 568 mg)および無水 K₂CO₃(50 mg)の無水 MeOH(5 ml)溶液を室温下 50 分攪拌後, クロロフォルムを加え, 有機層を飽和食塩水にて洗浄, MgSO₄ で乾燥後, 溶媒を留去して得られる残渣を CHCl₃-hexane より再結晶することにより, 目的とする monobenzoyl 体(9, 310 mg, 88.5%)を無色プリズム晶として得た. $[\alpha]_D^{25} + 63.4^\circ$ (c=0.21, MeOH): mp. 156~158° IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3700~3100(OH), 1726, 1657(C=O), 1620, 1605(C=C): NMR(CDCl₃) δ : 0.81(3H, s, CH₃), 1.38(3H, s, CH₃), 3.68(3H, s, CO₂CH₃), 3.93(1H, s, C₂₀-H), 4.23(1H, s, C₁₁-H), 4.36(1H, t, J=9Hz, C₂'-H), 5.96(1H, d, J=4.9Hz, C₁'-H), 6.0(1H, brs, C₄-H), 6.25(1H, dd, J=9.8, 1.8Hz, C₂-H), 7.64~7.67(3H, m, PhH), 8.02~8.05(2H, m, ortho PhH): FAB MS m/z Calcd. for C₃₅H₄₄O₁₂ 656(M⁺), Found 657(M⁺+1)

(12) Methyl(20R)-11 β ,17-dihydroxy-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate-20-sodium sulfate (12)

Methyl(20R)-11 β ,17,20-trihydroxy-3-oxo-pregnadien-21-oate(2, 420 mg, 0.0011mol)の無水ピリジン(2 ml)溶液に氷冷攪拌下クロルスルホン酸(172 μ l)を注意深く滴下後室温にて 3.5 時間攪拌. 反応終了後 H₂O(8 ml)を加え, ついで, 30% NaOH 水溶液にて pH11 に調整した. 水溶液をエーテルにて抽出することにより過剰なピリジンを除去したのち, 6NHCl にて pH8 とした. 溶媒を減圧下完対に留去することにより固形物を得た. 無水 MeOH を加え不溶物を濾過. 本操作

をさらに2度繰り返したあと MeOH より再結晶することにより目的とする硫酸抱合体(12, 425 mg, 80.3%)を無色プリズム晶として得た. $[\alpha]_D^{23} + 45.4^\circ$ ($c = 0.19$, MeOH) : mp. 196~198° IR $\nu_{\text{KBr max}}^{\text{cm}^{-1}}$: 3700~3050(OH), 1745, 1660(C=O), 1615, 1605(C=C) : NMR(DMSO- d_6) 1.25(3H, s, CH₃), 1.58(3H, s, CH₃), 3.73(3H, s, CO₂CH₃), 4.96(1H, s, C₂₀-H), 5.98(1H, d, J=2Hz, C₄-H), 6.24(1H, dd, J=9, 2Hz, C₂-H), 7.49 (1H, α , J=9Hz, C₁H), : FAB MS m/z C₂₂H₂₉O₉SNa Calcd. for 492(M⁺), Found 515(M⁺+23)

(13) Methyl(20S)-11 β ,17-dihydroxy-20-(sodium sulfate)-3-oxo-1,4-pregnadien-21-oate (11)

Methyl(20S)-11 β ,17,20-trihydroxy-3-oxo-pregnadien-21-oate(1, 180 mg)の無水ピリジン(1 ml)溶液に氷冷攪拌下クロルスルホン酸(73.6 μ l)を注意ぶかく滴下後, 室温にて4時間攪拌. 反応終了後 H₂O(3.5 ml)を滴下. ついで30% NaOH 水溶液にて pH11 に調整した. 水溶液をエーテルにて抽出することにより, 過剰なピリジンを除去したのち, 6NHCl にて pH8 とした. 溶媒を減圧下完全に留去することにより固形物を得た. 無水 MeOH により再結晶することにより目的とする硫酸抱合体(11, 171 mg, 75.5%)を無色プリズム晶として得た. $[\alpha]_D^{23} + 13^\circ$ ($c = 0.20$, MeOH) : mp. 168~170° IR $\nu_{\text{KBr max}}^{\text{cm}^{-1}}$: 3700~3050(OH), 1745, 1660(C=O), 1615, 1605(C=C) : NMR(DMSO- d_6) : δ 1.20(3H, s, CH₃), 1.47(3H, s, CH₃), 3.77(3H, s, CO₂CH₃), 4.85(1H, s, C₂₀-H), 5.95(1H, d, J=2, C₄-H), 6.25(1H, dd, J=9, 2Hz, C₂-H), 7.49(1H, d, J=9Hz, C₁-H) : FAB MS m/z C₂₂H₂₉O₉SNa Calcd. for 492(M⁺), Found 515(M⁺+23).

おわりに臨み ¹HNMR(500, 400, および 270MHz), High Mass ならびに FAB Mass の測

定を頂いた東北大学薬学部, 岡山大学薬学部, 星薬科大学の中央分析室のかたがたに深謝致します.

文 献

- 1) A preliminary report on this work has been presented : see : Abstracts, 6th Annual Meeting of the Journal of the Japan Society of Drug Delivery System. Nagasaki, Japan. Prodrug. Antedrug section, 1990, p207
- 2) Popper, T. L., Watnick, S. S. : Medicinal Chemistry. Vol 13, part 1, (ed. Scherrer, R. A., Whitehouse, M. W.), Academic Press, New York, 1974, p247-256.
- 3) Friend, D. R., Chang, G. W. : J. Med. Chem. 27 : 261-266, 1984 : and references cited therein.
- 4) Lee, H. J., Solimam, M. R. I. : Science 215 : 989-991, 1982.
- 5) 土屋晴嗣 : Prog. Med 5 : 2205-2210, 1985.
- 6) 木村聰城郎 : 日本臨床 47 : 70-79, 1989.
- 7) Kumari, D., Lee, H. J. : Drug Metab. Disp. 13 : 627-629, 1985 ; Al-habet, S. M. H., Taraporewala, I. B., Lee, H. J. : ibid. 18 : 55-60, 1990.
- 8) Kim, H. P., Bird, J., Heiman, A. S., Hudson, G. F., Taraporewala, I. B., Lee, H. J. : J. Med. Chem. 30 : 2239-2244, 1987.
- 9) Lewbart, M. L., Mattox, V. R. : J. Org. Chem. 28 : 1779-1786, 1963.
- 10) Review for Koenigs-Knorr reaction. see : Igarashi, K. : Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 34 : 234-283, 1977 and references cited therein ; recent reviews for O-glycosidation, see : Kato, S., Morishima, N., Zen, S. J. Syn. Org. Chem. 41 : 701-717, 1983.
- 11) McClosky, C. M., Coleman, G. H. : Organic Synthesis. Wiley, New York, Collect Vol. 3, 1955, 434-435.
- 12) Jauch, R., Hammer, R., Busch, U., Kopitar, Z., Ohnuma, N., Niki, T. : Anzein-Forsch 27 : 1045-1050, 1977.
- 13) Pala, G., Bietti, G. : Helv. Chim. Acta 51 : 1164-1167, 1968.
- 14) Bhacca, N. S., Williams, D. H. : Application of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry Holden-day, Inc., San Francisco, 1964.
- 15) Fieser, L. F., Fieser, M. : Steroid. Reinhold Publishing Corp., New York, 1959, p612-618.
- 16) Larsen, D. S., Stoodley, R. : J. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 : 1339-1352, 1990.