文章编号:1000-5404(2010)10-1051-04

论著

树化胺基甾醇类似物 6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇的合成

方 波[1],陶凌晖[2],周向东[2],周成合[1] (400715 重庆,西南大学化学化工学院生物有机药物化学实验室[1];400038 重庆,第三军医大学药学院药物化学教研室[2])

[摘要] **目的** 新法合成新型抗肿瘤树化胺基甾醇类似物 6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇。**方法** 以胆固醇为原料,3β,5α-二羟基胆甾-6-酮为关键中间体,亚胺化-还原为关键步骤,经 5 步反应合成 6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇。**结果** 以 62% 的总收率合成了目标化合物,其结构与实测 MS(476)、HRMS(476.446 5)、$[\alpha]_D^{25}$(-57.0°)、IR(3 387)、^{1}HNMR [2.67~2.61(1H, m, 6α-*H*)]、^{13}CNMR 和元素分析一致。**结论** 以本法合成 6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇,原料廉价易得、总收率高、易于工业化。

[关键词] 胆固醇;树化胺基甾醇;亚胺化-还原两步一锅法;抗肿瘤
[中图法分类号] R914.5; O629.21; R979.1 **[文献标志码]** A

Synthesis of 6β-butylaminocholestan-3β, 5α-diol, an analogue of anti-tumoral dendrogenin

Fang Bo[1], Tao Linghui[2], Zhou Xiangdong[2], Zhou Chenghe[1] ([1]Laboratory of Bioorganic & Medicinal Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing, 400715; [2]Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To synthesize 6β-butylaminocholestan-3β,5α-diol, a new analogue of anti-tumoral dendrogenin with a new method. **Methods** 6β-butylaminocholestan-3β,5α-diol was synthesized in 5 steps using cholesterol as the starting material, 3β,5α-dihydroxyl-cholestan-6-one as the key intermediate and imidation-reduction of one-pot 2 steps as the key steps. **Results** The target compound was synthesized in a total yield of 62% and its structure were consistent with MS (476), HRMS (476.446 5), $[\alpha]_D^{25}$(-57.0°), IR (3387), ^{1}HNMR [2.67~2.61 (1H, m, 6α-*H*)], ^{13}CNMR spectrum and elemental analyses. **Conclusion** Our synthetic route to 6β-butylaminocholestan-3β, 5α-diol is characterized by easily available and cheap starting material, high total yield and easy industrialization.

[Key words] cholesterol; dendrogenins; imidation-reduction of one-pot two steps; antitumor

Corresponding author:Zhou Xiangdong, Tel: 86-23-68753701, E-mail: zhouxd88@126.com

胺基甾醇是一类具有抗菌、抗真菌、抗肿瘤、抗病毒等多种重要生物活性的全新结构类型小分子化合物,其中角鲨多胺(squalamine)[1]作为血管生成抑制剂可用于治疗非小细胞肺癌、乳癌和卵巢癌等[2,3]。树化胺基甾醇(dendrogenins)是基于哺乳动物环氧化胆固醇代谢途径的、新近发现的具有 6β-胺基胆甾-3β,5α-二醇结构特点的胺基甾醇,它既能刺激单核细胞分化成树突状细胞,激活 T-淋巴细胞应答,又能刺激癌细胞再分化成免疫刺激外切体(immunostimulating exosomes),增强免疫系统对癌细胞的识别能力,还能抑制肿瘤细胞的增殖及血管生成[4]。树化胺基甾醇多重的抗肿瘤机制,使之既可作为化学探针研究肿瘤的免疫机制,又可作为先导化合物发展新型肿瘤免疫治疗药物。

目前树化胺基甾醇及其类似物的合成文献中仅有的方法是胆固醇经环氧化得 5α,6α-环氧胆固醇,再经胺对 5α,6α-环氧胆固醇 β-面环氧开环得树化胺基甾醇及其类似物[5]。尽管合成路线短,但反应温度高、反应时间长、收率低,不能提供足够的量供新药研究。基于胆固醇的环氧化开环合成树化胺基甾醇[6]和胆甾-6-酮的亚胺化-还原制备 6β-取代基胆甾类化合物[7]这两种方法,本研究报道新的合成方法合成树化

[通信作者] 周向东,电话:(023)68753701, E-mail: zhouxd88@126.com

胺基甾醇类似物-6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇,为研究开发树化胺基甾醇一类肿瘤免疫治疗新药打下基础。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器

原料:胆固醇、乙酸酐、正丁胺由成都科龙化工试剂厂生产,间氯过氧苯甲酸、高氯酸、四异丙氧基钛由上海晶纯试剂有限公司生产。薄层层析硅胶板(型号 GF-254)、柱层析硅胶(10~40 μ)由烟台市芝罘黄务硅胶开发试验厂所生产。柱层析用甲醇、氯仿、乙酸乙酯、石油醚(Pet)均为分析纯。反应用四氢呋喃、二氯甲烷、三乙胺、吡啶均重蒸后使用。

化合物熔点用上海精密科学仪器有限公司生产的 WRR 熔点仪测定,所有熔点均为未校正。^{1}HNMR 和 ^{13}CNMR 由美国 Varian 公司生产的 Mercury Plus-400 核磁共振谱仪测定,TMS 作内标,未经特别说明,均用 $CDCl_3$ 作溶剂。质谱由岛津 QP5050A 型质谱仪和 HP5989A 型质谱仪测定,红外光谱由傅立叶红外分光光度计 FTIR-8700 测定(KBr 压片),HRMS 由 Thermo MAT 95XP-Trap 高分辨质谱仪测定,元素分析由意大利 Carlo Erba model EA 1106 元素分析仪测定,比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ 由 JASCO P-1010 旋光仪测定,Na 光 D 线:λ_D = 589 nm。

1.2　合成路线

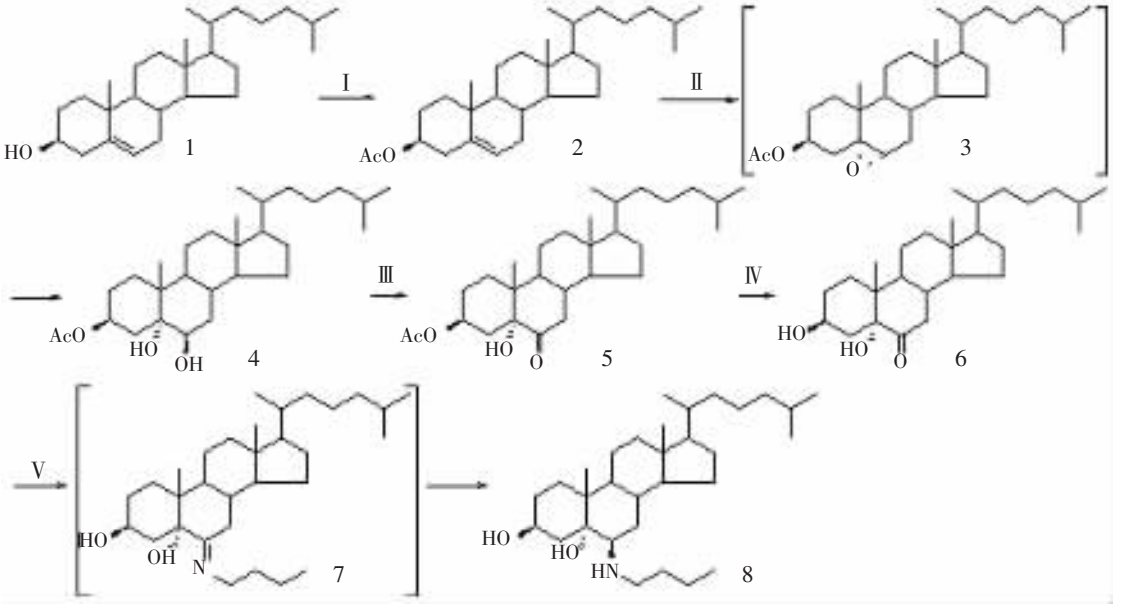
合成路线见图1。

1.2.1　3β-乙酰氧基胆甾-5-烯(**2**)的合成　250 ml 茄形瓶中,加入 12.288 g 胆固醇(31.8 mmol)、50 ml 吡啶和 100 ml 醋酐(1.06 mol),静置过夜,析出大量白色固体,抽滤。石油醚溶解,用大量水洗涤后,依次用 5% 的 HCl,5% 的 Na_2CO_3,饱和食盐水洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,重结晶(石油醚)得白色粉末状固体 13.360 g,收率 98%。

1.2.2　3β-乙酰氧基胆甾-5α,6β-二醇(**4**)的合成　500 ml 茄形瓶中,加入 9.287 g 3β-乙酰氧基胆甾-5-烯(21.7 mmol)和 150 ml 氯仿,室温搅拌下,分批加入 7.763 g 间氯过氧苯甲酸(45.0 mmol)。反应 4 h,原料消失,加入 60 ml 10% 的 Na_2SO_3 溶液,搅拌 25 min。冰浴下加入 40 ml 丙酮,搅拌 5 min,加入 70 ml 50% 的 $HClO_4$ 溶液,维持冰浴反应 6 h。TLC 监测。反应完成后,分去水层。有机相依次用饱和 Na_2CO_3 水溶液,饱和食盐水洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥。重结晶(乙酸乙酯/石油醚)得白色粉末状固体 9.932 g,收率 99%。

1.2.3　5α-羟基-3β-乙酰氧基胆甾-6-酮(**5**)的合成　500 ml 茄形瓶中,加入 10.109 g 氯铬酸吡啶(31.2 mmol)和 300 ml 氯仿,室温搅拌下分批加入 9.615 g 3β-乙酰氧基胆甾-5α,6β-二醇(20.8 mmol),反应 10 h。TLC 监测,反应完成后,抽滤,滤液用饱和食盐水洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥。重结晶(氯仿/石油醚)得白色粉末状固体 9.202 g,收率 96%。

1.2.4　3β,5α-二羟基胆甾-6-酮(**6**)的合成　250 ml 茄形瓶中,加入 8.231 g 5α-羟基-3β-乙酰氧基胆甾-6-酮(17.9 mmol)和 150 ml 四氢呋喃,室温搅拌下,加入 50 ml 10% 的 KOH/甲醇溶液,反应 30 min。TLC 监测。反应完成后,减压蒸出大部分溶剂,加入 150 ml 水,10% 的 HCl 调节 pH 至中性,乙酸乙酯萃取,依次用饱和 $NaHCO_3$ 溶液、饱和食盐水洗涤。无水 Na_2SO_4 干燥,浓缩,重结晶(乙酸乙酯/石油醚)得白色粉末状固体 7.345 g,收率 98%。



试剂及反应条件:(Ⅰ) Ac_2O, pyridine, rt, 98%;(Ⅱ) mCPBA, CH_2Cl_2, rt, then $HClO_4$, 0 ℃, 99%;(Ⅲ) PCC, $CHCl_3$, rt, 96%;(Ⅳ) KOH, THF, CH_3OH, rt, 98%;(Ⅴ) $CH_3(CH_2)_3NH_2$, Ti(Oi-Pr)$_4$, pyridine, 60 ℃, then $NaBH_3CN$, 60 ℃; 68%

1:胆固醇;2:3β-乙酰氧基胆甾-5-烯;3:5α,6α-环氧胆固醇;4:3β-乙酰氧基胆甾-5α,6β-二醇;5:3β-乙酰氧基-5α-羟基胆甾-6-酮;6:3β,5α-二羟基胆甾-6-酮;7:6-丁亚胺基胆甾-3β、5α-二醇;8:6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇

图1　树化胺基甾醇一类物的合成

1.2.5 6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇(**8**)的合成 100 ml 茄形瓶经真空火焰干燥,N_2 保护下,加入 5 ml 吡啶,426 mg 3β,5α-二羟基胆甾-6-酮(1.02 mmol)、0.4 ml 重蒸四异丙氧基钛(1.37 mmol)和 0.4 ml 正丁胺(4.10 mmol),搅拌下缓慢升温至 60 ℃反应 6 h,冷至室温后,加入 300 mg $NaCNBH_3$(4.77 mmol)继续升温至 60 ℃,反应 6 h。加入 5 ml 水,搅拌 20 min,用 10% 的 HCl 调节 pH 至 2~3,搅拌 10 min,用固体 Na_2CO_3 调节 pH 至 9~10,搅拌 10 min。乙酸乙酯提取,饱和食盐水洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,浓缩,柱层析(EtOAc/pet = 1/3),重结晶(乙酸乙酯)得白色针状晶体 330 mg,收率 68%。

2 结果

2.1 3β-乙酰氧基胆甾-5-烯(**2**)

Mp: 110~112 ℃[lit.[8] mp: 111~112 ℃]; MS(m/z): 429$[M+H]^+$; ^{1}HNMR(CD_3OD, 400 MHz)δ_{ppm}: 5.37(1H, d, J=5.2Hz, 6-*H*), 4.64~4.56(1H, m, 3α-*H*), 2.33~2.31(2H, m, 4-CH_2), 2.03(3H, s, $COCH_3$), 1.02(3H, s, 19-CH_3), 0.91(3H, d, J=6.8 Hz, 21-CH_3), 0.88~0.85(6H, dd, J=6.4 Hz, 26, 27-CH_3), 0.68(3 H, s, 18-CH_3)。

2.2 3β-乙酰氧基-胆甾-5α,6β-二醇(**4**)

Mp: 179~181 ℃[lit.[9] mp: 180~182 ℃]; MS(m/z): 463$[M+H]^+$; ^{1}HNMR(CD_3OD, 400 MHz)δ_{ppm}: 5.07~4.98(1H, m, 3α-*H*), 3.50(1H, s, 6-*H*), 2.00(3H, s, $COCH_3$), 0.91(3H, d, J=6.4 Hz, 21-CH_3), 0.87~0.85(6 H, dd, J=6.4 Hz, 26, 27-CH_3), 0.80(3 H, s, 19-CH_3), 0.64(3 H, s, 18-CH_3)。

2.3 5α-羟基-3β-乙酰氧基胆甾-6-酮(**5**)

Mp: 204~205 ℃[lit.[10] mp: 205~210 ℃]; MS(m/z): 461$[M+H]^+$; ^{1}HNMR(CD_3OD, 400 MHz)δ_{ppm}: 5.07~4.99(1H, m, 3α-*H*), 2.78~2.72(2H, m, 4-CH_2), 2.02(3H, s, $COCH_3$), 0.91(3H, d, J=6.8 Hz, 21-CH_3), 0.87~0.85(6H, dd, J=6.4 Hz, 26, 27-CH_3), 0.81(3H, s, 19-CH_3), 0.64(3H, s, 18-CH_3)。

2.4 3β,5α-二羟基胆甾-6-酮(**6**)

Mp: 224~225℃[lit.[11] mp: 229~231℃]; MS(m/z): 419$[M+H]^+$; ^{1}HNMR(CD_3OD, 400 MHz)δ_{ppm}: 4.02~3.95(1H, m, 3α-*H*), 2.76~2.67(2H, m, 4-CH_2), 0.91(3H, d, J=6.4 Hz, 21-CH_3), 0.87~0.85(6H, dd, J=6.8 Hz, 26, 27-CH_3), 0.79(3H, s, 19-CH_3), 0.64(3H, s, 18-CH_3)。

2.5 6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇(**8**)

Mp: 133~134 ℃; $[\alpha]_D^{25}$ - 57.0°(c 0.5, $CHCl_3$); MS(m/z): 476$[M+H]^+$; IR(KBr) cm^{-1}: 3 387(OH, NH), 2 939, 2 867(CH_3, CH_2), 1 620, 1 467, 1 451, 1 380, 1 111, 1 085, 1 037; ^{1}HNMR(CD_3OD, 400 MHz)δ_{ppm}: 4.14~4.06(1H, m, 3α-*H*), 2.67~2.61(1H, m, 6α-*H*), 1.28(3H, s, 19-CH_3), 0.90[3H, t, J=7.2 Hz, 6-NH$(CH_2)_3CH_3$], 0.89(3H, d, J=6.4 Hz, 21-CH_3), 0.87~0.85(6H, dd, J=6.8 Hz, 26, 27-CH_3), 0.67(3H, s, 18-CH_3); ^{13}CNMR(CD_3OD, 100 MHz)δ_{ppm}: 68.01, 65.15, 56.31, 55.92, 49.38, 46.40, 42.75, 41.53, 40.02, 39.53, 38.65, 36.19, 35.82, 32.89, 32.69, 31.05, 31.00, 30.44, 28.22, 28.01, 24.28, 23.87, 22.80, 22.55, 21.19, 20.44, 18.66, 17.41, 13.98, 12.20; HRMS(TOF) calcd. for $C_{31}H_{58}NO_2$ $[M+H]^+$: 476.4468; Found: 476.446 5. Anal. Calcd. for $C_{31}H_{57}NO_2$: C, 78.26; H, 12.08; N, 2.94. Found: C, 78.64; H, 11.81; N, 2.95。

3 讨论

树化胺基甾醇类化合物分子具有胆固醇的甾体母核和甾醇中普遍存在的 3β-羟基,其结构特点的研究主要集中于 5α-羟基和 6β-多胺的立体化学。为探索树化胺基甾醇类化合物的构效关系,我们设计了具有全新结构的树化胺基甾醇类似物——6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇,即在保留胆固醇甾体母核、3β,5α-羟基和 6β-胺基的立体化学特点的基础上,将多胺基转变成丁胺基,这种转变的目的在于借助丁胺基可稳定存在于空气中的性质,克服树化胺基甾醇中的多胺基(如组胺基、精胺基、亚精胺基等)易被氧化变质、不便于生产、保存及使用等缺点,且引入丁胺基可增加分子的亲脂特性,提高其对细胞膜的通透性,使之更快速、准确的到达作用靶点,从而有望获得活性更高的抗肿瘤免疫治疗先导化合物。

2003 年 Poirot 等[6] 首次报道了树化胺基甾醇一类物的合成方法,即通过胆固醇(**1**)环氧化得 5α,6α-环氧胆固醇(**3**),再在氩气保护下于乙醇中回流,高氯酸锂作用下胺从 β-面对环氧开环,反应 6 d,得 5α-羟基-6β-胺立体结构,以两步反应合成树化胺基甾醇一类物。2009 年,de-Medina 等[5] 用同样的反应条件,将环氧开环的时间缩短至 4 d,合成树化胺基甾醇,总收率为 31%,但反应温度高,反应时间长,合成规模小、无实际开发价值。

本研究的目的是建立树化胺基甾醇一类物新的合成方法,以合成全新结构的树化胺基甾醇类似物。合成路线如图 1 所示,即以胆固醇为起始原料,与醋酐-吡啶反应,以 98% 的收率得 3β-乙酰氧基胆甾-5-烯(**2**),经间氯过氧苯甲酸立体选择性环氧化[12]、高氯酸开环"两步一锅"[13] 以 99% 的收率合成 3β-乙酰氧基胆甾-5α,6β-二醇(**4**),化合物 **4** 再与 PCC 反应以 96% 的收率得 3β-乙酰氧基-5α-羟基胆甾-6-酮(**5**),化合物 **5** 碱性条件下脱水解,以 98% 的收率得 3β,5α-二羟基胆甾-6-酮(**6**)。从胆固醇到关键中间体 **6**,四步反应,

总收率为91.3%,具有易重结晶纯化、收率高、易于工业化生产等优点。

在合成关键中间体3β,5α-二羟基胆甾-6-酮(**6**)之后,主要目标转向关键步骤关键中间体3β,5α-二羟基胆甾-6-酮(**6**)亚胺化-还原制备6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇(**8**)反应条件的探索,即3β,5α-二羟基胆甾-6-酮中6-羰基先与胺缩合生成亚胺,再与还原剂作用,利用5α-羟基的位阻,使还原剂从β-面进攻,从而构建5α-羟基-6β-胺基的立体化学结构,合成6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇(**8**)。最初以THF、乙腈、乙醇、吡啶作溶剂,室温至80℃条件下,正丁胺与化合物**6**经亚胺化,再与$LiAlH_4$、$NaBH_4$、$NaBH_3CN$等还原剂进行还原反应[14],仅得到3β,5α-二羟基胆甾-6-酮的6-羰基直接被还原为羟基的产物胆甾-3β,5α,6ζ-三醇,而未得到预期产物6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇(**8**)。2007年Loncle等[7]报道,以甲醇作溶剂,在路易斯酸Ti(Oi-Pr)$_4$介导下,精胺、亚精胺及各种烷基二胺可与3β-乙酰基胆甾-7-酮的7-羰基进行亚胺化-还原两步一锅,得到7β-胺基胆甾-3β-醇类化合物。按Salmi[15]报道的亚胺化? 还原反应方法,通过试探溶剂THF、乙腈、乙醇、吡啶,还原剂$LiAlH_4$、$NaBH_4$、$NaBH_3CN$及温度等反应条件,最终以吡啶作溶剂,Ti(Oi-Pr)$_4$介导下3β,5α-二羟基胆甾-6-酮与正丁胺于60 ℃经亚胺化,再经$NaBH_3CN$还原,反应12 h以68%的收率合成了6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇(**8**),熔点:133~134 ℃;$[\alpha]_D^{25}$ -57.0°;化合物**8** IR中3387处的宽峰为OH与NH的吸收峰;HRMS(TOF)分子离子峰计算值为476.446 8($C_{31}H_{58}NO_2$,$[M+H]^+$),实测值为476.446 5;^{1}HNMR中δ_{ppm}为2.67~2.61一个氢的多峰是6α-*H*的特征吸收峰,由此可确定化合物**8**的6β-丁胺基立体结构,δ_{ppm}为0.90(3H, t, J=7.2Hz)是6-正丁胺基末端CH_3的特征吸收峰;元素分析计算值为C, 78.26; H, 12.08; N, 2.94($C_{31}H_{57}NO_2$),实测值为C, 78.64; H, 11.81; N, 2.95。

至此,我们以胆固醇为原料,3β,5α-二羟基胆甾-6-酮为关键中间体,胺化-还原两步一锅为关键步骤,经5步反应以62%的总收率合成6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇。本合成路线具有原料廉价易得、立体选择性好、总收率高、反应时间短、各步反应条件温和、易于放大的特点。该树化胺基甾醇类似物新合成方法的建立,为此类化合物的合成及构效关系研究打下了基础,并为将树化胺基甾醇及其类似物发展成为抗肿瘤新药作了物质准备,6β-丁胺基胆甾-3β,5α-二醇抗肿瘤免疫活性测试正在进行之中。

志谢 感谢四川大学刘波教授、西南大学亢为老师在光谱测试方面给予的帮助,感谢徐长荣老师在实验方面的指导

参考文献:

[1] Zhou X D, Cai F, Zhou W S. A stereoselective synthesis of squalamine [J]. Tetrahedron, 2002, 58(52): 10293-10299.

[2] Sills A K Jr, Williams J I, Tyler B M, *et al*. Squalamine inhibits angiogenesis and solid tumor growth *in vivo* and perturbs embryonic vasculature[J]. Cancer Res, 1998, 58(13): 2784-2792.

[3] Williams T J, Pinto A, Bedi G. In 4th international conference in chemical synthesis of antibiotic and related microbial products(C). Nashville. Indiana, 1994.

[4] Poirot M E, de-Medina P, Boubekeur N, *et al*. The dendrogenine A: a new aminosteroid for the immunotherapy of cancers[J]. Proc Amer Assoc Cancer Res, 2006, 47(9): 1305-1306.

[5] de-Medina P, Paillasse M R, Payre B, *et al*. Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases[J]. J Med Chem, 2009, 52(23): 7765-7777.

[6] Poirot M, de-Medina P. Sterol derivatives, method for the preparation thereof and medicaments comprising same. WO, 2003089449[P]. 2003-10-30.

[7] Loncle C, Salmi C, Letourneux Y, *et al*. Synthesis of new 7-aminosterol squalamine analogues with high antimicrobial activities through a stereoselective titanium reductive amination reaction[J]. Tetrahedron, 2007, 63(52): 12968-12974.

[8] Tadeus R. 3-Hydroxy-Δ5,6-steroids and derivatives: US, 2520656[P]. 1950-08-29.

[9] Snatzke G. 19-Nor-5β-methyl steroids. Ⅲ. Acetolyses of 3-methoxy steroids[J]. Justus Liebigs Ann Chem, 1965, 686: 167-181.

[10] Lapin H, Sannie C. Studies on sterolic sapogenins. V. Ruscogenin, 22α-spirostene-3β,19-diol, a new steroid sapogenin of ruscus aculeatus L[J]. Bull Soc Chim Fr, 1955, 1552-1555.

[11] Schultz R G. Some acetate migration and participation reactions in steroids[J]. J Org Chem, 1959, 24(12): 1955-1958.

[12] 马婷, 徐长荣, 周向东. 抗结核化合物24-酮帕格甾醇的设计合成[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(10): 902-905.

[13] 张琪, 徐长荣, 周向东. 24-亚甲基-胆甾-3β,5α,6β-三醇的合成[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(10): 906-909.

[14] Choucair B, Dherbomez M, Roussakis C, *et al*. Synthesis of spermidinylcholestanol and spermidinylcholesterol, squalamine analogues [J]. Tetrahedron, 2004, 60(50): 11477-11486.

[15] Salmi C, Loncle C, Vidal N, *et al*. New stereoselective titanium reductive amination synthesis of 3-amino and polyaminosterol derivatives possessing antimicrobial activities[J]. Eur J Med Chem, 2008, 43(3): 540-547.

(**收稿**:2010-02-04;**修回**:2010-03-08)

(编辑 王 红)