



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42024 (13) C2

(51) 7 C12P17/16, C12P11/00,
C07D495/04, C12N1/20МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ БІОКОНВЕРСІЇ ДЛЯ СИНТЕЗУ ТРАНС-ГІДРОКСИСУЛЬФОНУ

(21) 97041700

(22) 08 09 1995

(24) 15 10 2001

(31) 305,110

(32) 13 09 1994

(33) US

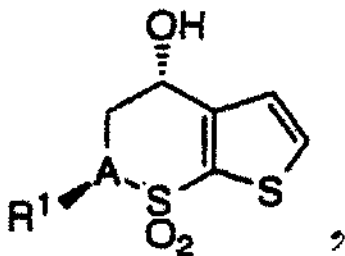
(86) PCT/US95/11243, 08 09 1995

(46) 15 10 2001, Бюл. № 9, 2001 р

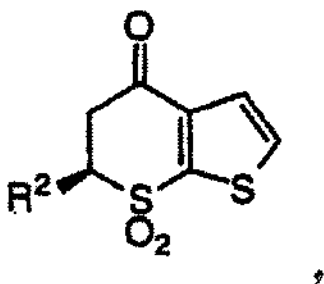
(72) Шартран Мішель М., FR, Катз Лоррейн Дж.,
US, Кінг Стівен А., US

(73) МЕРК ЕНД КО., ІНК., US

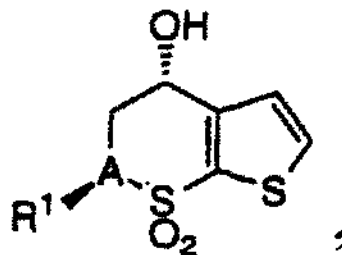
(56) US 5157129, 10 1992

(57) 1 Способ получения соединения, представ-
ленного формулой IIв которой А - углерод или азот и R¹ представляета) C₁₋₅ алкил с линейной или разветвленной це-
пью, особенно н-пропил или изобутил,б) C₃₋₅ алкенил, особенно аллил,в) C₃₋₅ алкинил, особенно пропаргил,

г) водород или

д) C₁₋₄ алкокси-C₁₋₄ алкил,включающий стадии культивирования мик-
роорганизма *Rhodotorula rubra* ATCC 74283 или
Rhodotorula pilulinae ATCC 32762 в питательной
среде, содержащей ассимилируемые источники
азота и углерода и субстратное Соединение фор-
мулы IIIв которой R²а) C₁₋₅ алкил с линейной или разветвленной це-
пью, особенно н-пропил или изобутил,б) C₃₋₅ алкенил, особенно аллил,в) C₃₋₅ алкинил, особенно пропаргил,

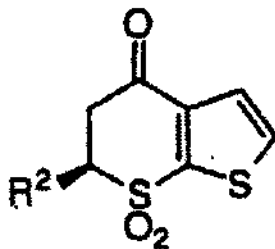
г) водород или

д) C₁₋₄ алкокси-C₁₋₄ алкил,в аэробных условиях до тех пор, пока не образу-
ется существенное количество Соединения II, и
выделения полученного соединения2 Способ по п 1, отличающийся тем, что микро-
организмом является *Rhodotorula rubra* ATCC
74283, субстрат растворяют в от около 1% до
около 15% об./об. этанола, метанола или ДМСО и
количество загруженного субстрата составляет от
около 1 до около 3 г/л3 Способ по п 2, отличающийся тем, что суб-
страт растворен в от около 1% до около 3% об./об.
ДМСО и количество загруженного субстрата со-
ставляет от около 1 до около 3 г/л4 Способ по п 1, отличающийся тем, что темпе-
ратура от около 30 до около 50°C и pH от около
4,5 до около 8,05 Способ по п 1, отличающийся тем, что темпе-
ратура от около 30 до около 35°C и pH от около
5,5 до около 6,56 Способ получения соединения, представленно-
го формулой IIв которой А - углерод или азот и R¹ представляета) C₁₋₅ алкил с линейной или разветвленной це-
пью, особенно н-пропил или изобутил,б) C₃₋₅ алкенил, особенно аллил,в) C₃₋₅ алкинил, особенно пропаргил,

г) водород или

д) C₁₋₄ алкокси-C₁₋₄ алкил,включающий стадии культивирования микроор-
ганизма *Rhodotorula rubra* ATCC 74283 в пита-

тельной среде, содержащей ассимилируемые источники азота и углерода и субстратное Соединение III



где R²

а) C₁₅ алкил с линейной или разветвленной цепью, особенно н-пропил или изобутил,

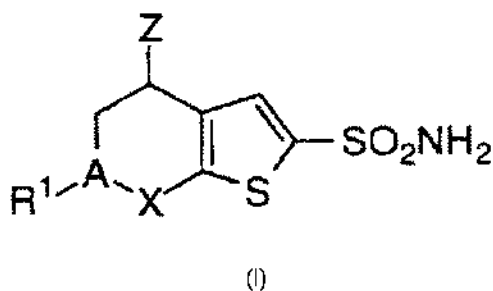
б) C₃₋₅ алкенил, особенно аллил,
в) C₃₋₅ алкинил, особенно пропаргил,
г) водород или
д) C₁₋₄ алкокси-C₁₋₄ алкил,

в аэробных условиях до тех пор, пока не образуется существенное количество Соединения II, и выделения полученного соединения, отличающийся тем, что субстрат растворяют в от около 1% до около 15% об/об этанола, метанола или ДМСО, и количество загруженного субстрата составляет от около 1 до около 3 г/л, температура от около 20 до около 50°C и pH от около 4,5 до 8,0

7 Способ по п 6, отличающийся тем, что субстрат растворен в от около 1% до около 3% об/об ДМСО и количество загруженного субстрата составляет от около 1 до около 3 г/л, температура от около 30 до около 35°C и pH от около 5,5 до около 6,5

Глаукома является глазным расстройством, связанным с повышенным внутриглазным давлением, которое является слишком высоким для нормального функционирования и может привести к необратимой потере зрения. При отсутствии лечения глаукома со временем может привести к слепоте. Глазная гипертензия, т.е. состояние повышенного внутриглазного давления без повреждения диска зрительного нерва или характерных для глаукомы дефектов поля зрения, как сейчас полагают многие современные офтальмологи, является ранней стадией глаукомы.

Соединения структурной формулы



индивидуальные диастереомеры, индивидуальные энантиомеры или их смеси, или офтальмологически приемлемая соль его, где

A - углерод или азот,

Z - NHR или -OR,

R - C₁₋₆ алкил с линейной или разветвленной цепью, R¹ - а) C₁₋₅ алкил с линейной или разветвленной цепью, особенно н-пропил или изобутил,

б) C₃₋₅ алкенил, особенно аллил,

в) C₃₋₅ алкинил, особенно пропаргил,

г) водород или

д) C₁₋₄ алкокси-C₁₋₄ алкил, и

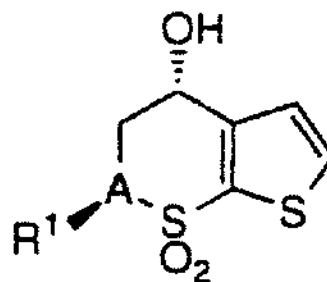
X - -SO₂ или -C(O)-,

известны из патентов США № 4797413 и 5157129. Соединения известны как ингибиторы карбонатдегидрогеназы местного действия (TCAI's), полезные при лечении глазной гипертензии. Синтез сое-

динений включает восстановление сульфокетона до предшественника транс-гидроксисульфона для указанных выше соединений. Однако, способы синтеза, описанные для их получения, дают диастереомерные или рацемические продукты, которые должны быть разделены и выделены с сопутствующей потерей по меньшей мере 50% продукта, чтобы получить наиболее активный энантиомер.

Теперь с настоящим изобретением обеспечен новый микробиологический способ биоконверсии промежуточного соединения сульфокетона в промежуточное соединение транс-гидроксисульфона.

Изобретение касается нового способа микробной биоконверсии для синтеза транс-гидроксисульфона, имеющего структурную формулу



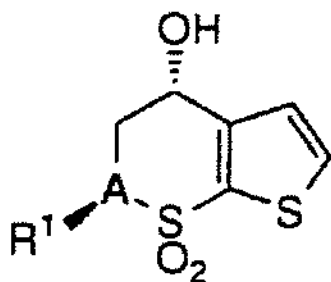
в которой A и R¹ - описаны выше. Транс-гидроксисульфен является предшественником конечного продукта, ингибитора карбонатдегидрогеназы приведенной выше формулы I. Конечный продукт обладает местным действием при лечении глазной гипертензии и глаукомы. Способ включает ферментацию субстрата сульфокетона в присутствии микроорганизма *Rhodotorula rubra*, (ATCC 74283) или *Rhodotorula pilulinae* (ATCC 32762), предпочтительно *Rhodotorula rubra*. Биоконверсию осуществляют в аэробных условиях погружения в водную углеводную среду, содержащую питательный

азот, при pH около 4,5-8,0, предпочтительно 6,0, в течение времени, достаточного для получения соединения структурной формулы II

Полученный аналог транс-гидроксисульфона обнаруживает диастереомерный избыток более, чем 95%. Ключевая стадия в этом новом способе (т.е. регулирование диастереомерного избытка гидроксисульфона) заключается в регулировании остаточной концентрации сульфокетона в реакционной среде биоконверсии.

Таким образом, предметом настоящего изобретения является микробиологический способ синтеза промежуточного соединения транс-гидроксисульфона.

Изобретение касается синтеза соединений структурной формулы

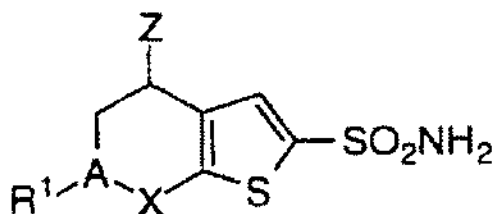


Транс-гидроксисульфен – II

в которой А - углерод или азот и R¹ представляет

- а) C₁₋₅ алкил с линейной или разветвленной цепью, особенно n-пропил или изобутил,
- б) C₃₋₅ алкенил, особенно аллил,
- в) C₃₋₅ алкинил, особенно пропаргил,
- г) водород или
- д) C₁₋₄ алкокси-C₁₋₄ алкил,

которое является предшественником соединений формулы



(I)

индивидуальных диастереомеров, индивидуальных энантиомеров или их смесей, или его офтальмологически приемлемой соли, где

А - углерод или азот,

Z - NHR или -OR,

R - C₁₋₆ алкил с линейной или разветвленной цепью,

R¹ - а) C₁₋₅ алкил с линейной или разветвленной цепью, особенно n-пропил или изобутил,

б) C₃₋₅ алкенил, особенно аллил,

в) C₃₋₅ алкинил, особенно пропаргил,

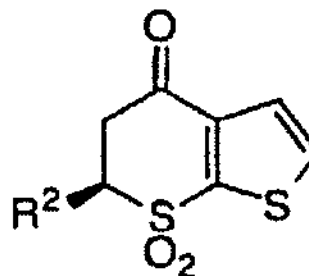
г) водород или

д) C₁₋₄ алкокси-C₁₋₄ алкил, и

X - -SO₂- или -C(O)-

Новый способ этого изобретения включает ферментацию микроорганизм *Rhodotorula rubra* или *Rhodotorula pilosissima*, предпочтительно

Rhodotorula rubra в присутствии субстрата соединения III, как показано



(III)

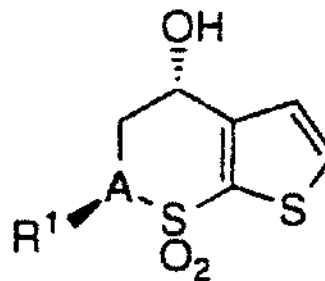
Сульфокетон - III

в которой R² -

- а) C₁₋₅ алкил с линейной или разветвленной цепью, особенно n-пропил или изобутил,
- б) C₃₋₅ алкенил, особенно аллил,
- в) C₃₋₅ алкинил, особенно пропаргил,
- г) водород или
- д) C₁₋₄ алкокси-C₁₋₄ алкил,

в питательной среде в аэробных условиях до образования существенного количества соединения II и выделение полученного соединения обычным способом. Соединения структурной формулы I пригодны для лечения глаукомы.

Предпочтительное воплощение этого изобретения, в котором соединение представлено формулой II

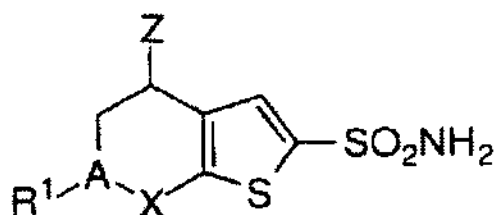


(II)

в которой А - углерод или азот и R¹ представляет

- а) C₁₋₅ алкил с линейной или разветвленной цепью, особенно n-пропил или изобутил,
- б) C₃₋₅ алкенил, особенно аллил,
- в) C₃₋₅ алкинил, особенно пропаргил,
- г) водород или
- д) C₁₋₄ алкокси-C₁₋₄ алкил,

которое является предшественником соединений, представленных формулой I



(I)

индивидуальных диастереомеров, индивидуальных энантиомеров или их смесей, или его офтальмологически приемлемой соли, где

A - углерод или азот,

Z - NHR или -OR,

R - C₁₋₆ алкил с линейной или разветвленной цепью,

R¹ - а) C₁₋₅ алкил с линейной или разветвленной цепью, особенно н-пропил или изобутил,

б) C₃₋₅ алкенил, особенно аллил,

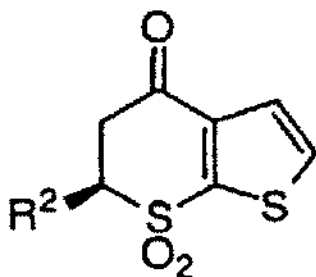
в) C₃₋₅ алкинил, особенно пропаргил,

г) водород или

д) C₁₋₄ алкокси-C₁₋₄ алкил, и

X - -SO₂ или -C(O)-,

включает стадии культивирования микроорганизма *Rhodotorula rubra*, (ATCC 74283) в питательной среде, содержащей ассимилируемые источники азота и углерода и субстратное соединение III



(III)

где R² -

а) C₁₋₅ алкил с линейной или разветвленной цепью, особенно н-пропил или изобутил,

б) C₃₋₅ алкенил, особенно аллил,

в) C₃₋₅ алкинил, особенно пропаргил,

г) водород или

д) C₁₋₄ алкокси-C₁₋₄ алкил,

в аэробных условиях до тех пор, пока не образуется существенное количество соединения II, и выделения полученного соединения, при этом субстрат растворен приблизительно в 1-15% об/об этанола, метанола или ДМСО, количество загружаемого субстрата составляет около 1-3 г/л, температуру поддерживают 20-50°C и pH около 4,5-8,0

Субстратное соединение III может быть синтезировано следующим не лимитирующим изобретением способом

Метил-3(R)-гидроксигексаноат

Метил-3-кетогексаноат (44,7 г, 310 ммоль) разбавляют метанолом (75 мл) и 0,2н HCl (2 мл). Добавляют Et₂NH₂ + Ru₂Cl₅-(BINAP)₂ (200 мг) и смесь нагревают при 60°C под давлением водорода 7,0307 кг/см² (100 фунт/дм²) в течение 2 ч. Добавляют толуол (100 мл) и смесь концентрируют до образования масла массой 75 г

Метил-3(R)-толилсульфонилоксигексаноат

Сырой раствор метил-3(R)-гидроксигексаноата (310 ммоль) растворяют в пиридине (100 мл) и добавляют п-толилсульфонилхлорид (59 г, 3100 ммоль). Смесь перемешивают при 5°C 24 ч, а затем при 15°C - 16 ч. Воду (15 мл) добавляют медленно в течение 1 ч, чтобы погасить избыточный реагент. Смесь выпаривают в 20% толуол/гек-

сан (600 мл) и промывают водой (3 x 250 мл). Органический слой концентрируют, чтобы получить 83 г продукта в виде масла 95% чистоты

Метил-3(S)-(2-тиофентии)гексаноат

н-Бутиллитий (1,84 M, 97,6 мл, 160 ммоль) добавляют к тиофену (15,1 г, 180 ммоль) в ТГФ (100 мл) при -20°C. После перемешивания в течение 30 минут добавляют серу (5,23 г) по частям. После этого через 1 ч добавляют дезоксигенированный формамид (100 мл) с последующим добавлением метил-3(R)-толилсульфонилоксигексаноата (40 г, 33,3 ммоль). Смесь перемешивают при комнатной температуре 24 ч и затем разбавляют этилацетатом (100 мл) и водой (50 мл). Слой разделяют и проводят обратную экстракцию водной части этилацетатом (100 мл). Объединенные органические вещества концентрируют с получением продукта в виде желтого масла массой 23,9 г. Общий выход из метил-3-кетогексаноата составляет 74%

5,6-Дигидро-6(S)-(пропил)-4Н-тиено[2,3b]тиопиран-4-он

Метил-3(S)-(2-тиофентии)гексаноат (125 г, 513 ммоль) нагревают при 100°C с уксусной кислотой (150 мл) и концентрированной HCl (150 мл) в течение 96 ч. Смесь экстрагируют толуолом (2 x 300 мл). Объединенные органические слои промывают и концентрируют до получения темно-коричневого масла, которое потящают толуолом (1200 мл). Смесь охлаждают до 0°C и добавляют ангидрид трифторуксусной кислоты (126 г, 600 ммоль). Через 45 минут смесь промывают водой (2 x 200 мл) и концентрируют до получения 151 г масла, которое переносят на следующую стадию без очистки

5,6-Дигидро-6(S)-(пропил)-4Н-тиено[2,3b]тиопиран-4-он-7,7-диоксид

5,6-Дигидро-6(S)-(пропил)-4Н-тиено[2,3b]тиопиран-4-он (4,25 г, 20 ммоль) растворяют в этилацетате (80 мл). Добавляют вольфрамат натрия (660 мг, 2 ммоль), 30%-ную перекись водорода (8,2 мл, 80 ммоль) и 10 капель серной кислоты. Через 24 ч реакционную смесь разбавляют этилацетатом (100 мл) и промывают 10% раствором Na₂SO₃ и насыщ. раствором NaHCO₃. Органический слой концентрируют и растирают с этанолом с получением 4,5 г продукта (95%)

Микроорганизмы

Биологически чистый образец *Rhodotorula piliminae* выделяют из личинки *Drosophila piliminae*, Гавайи, и он является общедоступным на основании Будапештского соглашения в постоянной коллекции культур Американской коллекции типовых культур, 12301 Parklawn Drive in Rockville, Maryland, в которой он зарегистрирован под номером ATCC 32762. Биологически чистый образец *Rhodotorula rubra* является общедоступным в постоянной коллекции культур Американской коллекции типовых культур, 12301 Parklawn Drive in Rockville, Maryland, в которой он зарегистрирован под номером ATCC 74283. Любые ограничения, относящиеся к публичному доступу к микроорганизму должны быть безотзывно исключены после выдачи патента. *Rhodotorula rubra* ATCC 74283 выделен из зараженных сквашенных сливок

Аналитическими способами, которые, в основном, используются в настоящем изоб-

ретенции, но не ограничивают его, являются следующие

Аналитические способы

Измерения биомассы

Биомассу измеряют по оптической плотности и по массе сухих клеток. Измерения оптической плотности проводят с использованием Hewlett Packard 8451A комплекта спектрофотометра с диодным блоком при 660 нм. Массу сухих клеток определяют с использованием миллипоровых фильтров типа HA, размер пор 0,45 мкм.

Глюкоза

Глюкозу отслеживают жидкостным хроматографом, снабженным классическим компьютером Макинтош для регистрирования и накопления данных, детектором абсолютного показателя преломления, автоинжектором A1-2 Dynamax, аналитическим HP насосом, модулем давления и Biorad Aminex HPX-87H ион-исключающей колонкой (300 x 78 мм), нагретой до 60°C. Элюент состоит из 0,005 M серной кислоты при 0,7 мл/мин.

Экстракция бульона

Цельный бульон экстрагируют путем добавления равного объема этилацетата. Смесь помещают в шейкер на 5 мин, затем центрифугируют при 2000 обор./мин в течение 10 минут с помощью центрифуги Beckman TJ-6. Полученный супернатант сушат и повторно суспендируют в метаноле для тонкослойной хроматографии или анализа ЖХВР.

Тонкослойная хроматография

Для тонкослойной хроматографии используют пластины F254 из силикагеля 60 с предварительным покрытием Kiesel. Подвижная фаза состоит из 94% метилхлорида, 5% метанола и 1% гидроксида аммония. Пробу наносят на пластину и высушивают. Один край пластины погружают в подвижную фазу и позволяют растворителю подниматься по пластине до тех пор, пока он не достигнет примерно 25,4 мм от верха пластины.

Жидкостная хроматография высокого разрешения

ЖХВР осуществляют с Rainin системой, снабженной классическим компьютером Макинтош для регистрирования и накопления данных, Dynaх детектором оптической плотности UV-M, автоинжектором A1-2 Dynаmax, двумя аналитическими HP насосами, модулем давления с Zorbax Aminex RX-C8 колонкой (4,6 x 250 мм), которую поддерживают при комнатной температуре. В способе используют два элюента, метанол и воду (0,1% об./об. H₃PO₄) при общей скорости потока 1,5 мл/мин и УФ детекции при 254 нм. Способ включает градиент от 30/70 метанол/подкисленная вода (об./об.) до 70/30 (об./об.) в течение 15 минут. Способ разделяет цис-гидроксисульфон, транс-гидроксисульфон и сульфокетон за 9,5, 10 и 12,8 минуты, соответственно.

Пример 1

Способы культивации

Продуцирование транс-гидроксисульфона происходит, например, во время культивации с отцеживанием или во встряхиваемой колбе, клетки *Rhodotorula rubra* ATCC 74283 инокулируют первоначально из Sabouraud декстрозных скошенных агаров (Difco) или позднее из замороженных гли-

цериновых суспензий клеток (1 мл) в колбы Эрленмейера емкостью 250 мл, содержащие 50 мл Sabouraud декстрозного бульона. Sabouraud декстрозный бульон коммерчески доступен и содержит 10 г/л Difco неопептона и 20 г/л Bacto декстрозы. Колбы инкубируют в течение 24 часов при 28°C при перемешивании со скоростью 220 оборотов в минуту для того, чтобы получить достаточную биомассу для использования в качестве инокулята. Инокулят переносят (5%/25 мл) в 2-литровую колбу Эрленмейера, содержащую 500 мл Sabouraud декстрозного бульона. Затем культуру инкубируют при 28°C с перемешиванием при 180 обор./мин в течение 42 часов. Клетки центрифугируют, промывают MES буфером pH 6,0 и повторно суспендируют в MES буфере pH 6,0 перед добавлением сульфокетона.

Биореакторную культивацию проводят в ферментере емкостью 23 литра, который инокулируют 2-литровой колбой Sabouraud декстрозного бульона, содержащего *Rhodotorula rubra* ATCC 74283, культивированный 42 часа, как описано выше. Параметры ферментера следующие: температура 28°C, перемешивание 200 обор./мин (минимальная отправная точка), аэрация 10 л/мин и обратное давление 0,0422 кг/кв.см. Давление растворенного кислорода поддерживают перемешиванием на уровне минимум 40%. Когда скорость поглощения кислорода (OUR) падает ниже 5 ммоль/л/ч, клетки собирают в стерильных условиях.

Параметры реакции

Оптимальные параметры биоконверсии таковы, при которых буферы (0,5 M) на основе 3-[N-морфолино]пропансульфоновой кислоты (MOPS) и 2-[N-морфолино]этансульфоновой кислоты (MES) используют примерно при 20-40°C в диапазоне pH 4,5-8,0, в результате чего биоконверсия происходит при скоростях около 0,011-0,150 г/г CDW/ч. Температурный диапазон - примерно 20-50°C, предпочтительно 30-35°C. Используемый растворитель и его количество, используемое для растворения субстрата сульфокетона, - это этанол, метанол или ДМСО, предпочтительно ДМСО, между 1-15%, предпочтительно 1-3%, соответственно. Количество загруженного субстрата - около 1-3 г/л, предпочтительно 1,5 г/л, чтобы достигнуть извлечения транс-гидроксисульфона (66%), имеющего диастереомерный избыток 95%, а клетки вызревают 16-60 часов, предпочтительно около 40-60 часов, что соответствует падению OUR ниже 5 ммоль/л/ч.

Биоконверсия и выделение транс-гидроксисульфона II (5,6-дигидро-4(S)-гидрокси-6(S)-пропип-4Н-тиено-[2,3-*b*]тиопиран-7,7-диоксида).

Аликвотные пробы бульона (10 или 50 мл), содержащие клетки *Rhodotorula rubra* центрифугируют при 4000 обор./мин в течение 10 мин с помощью центрифуги Beckman TJ-6 и декантируют супернатант. Лепешку повторно суспендируют в 0,5 M 2-[N-морфолино]этансульфоновом кислотном буфере (MES) при pH 6,0 и центрифугируют снова. Промытые клетки повторно суспендируют в 50 мл MES буфера. При необходимости клетки разбавляют для облегчения анализа степени реакции биоконверсии. Сырой субстрат сульфокетон (56% чистоты), эквивалентный 1 г/л чистого сульфокетона,

растворенный в этаноле (3% об/об), добавляют в колбы, содержащие промытые клетки. Колбы инкубируют при 32,5°C в водяной бане, которую непрерывно встряхивают. Бульон собирают экстракцией хлороформом (1 л, об/об) или этилацетатом (1 л, об/об), сушат и повторно суспендируют в метаноле. Затем проводят анализы экстрактов тонкослойной и жидкостной хроматографией высокого разрешения (ЖХВР). Времена удерживания ЖХВР для транс-гидроксисульфона, цис-гидроксисульфона и сульфокетона - 9,5, 10,0 и 12,8, соответственно. ¹H ЯРМ результаты для транс-гидроксисульфона (250 МГц, CDCl₃) показаны ниже: дельта 7,58 (д, J=5,1 Гц, 1H), 7,08 (д, J=5,1 Гц, 1H), 4,94 (т, J=3,6 Гц, 1H), 3,66 (м, 1H), 2,6-2,1 (м, 3H), 1,7-1,5 (м, 3H), 1,01 (т, J=7,01, 3H).

Клетки после биореакторной культивации собирают, когда OUR падает ниже 5 ммоль/л/ч, центрифугируют и промывают 0,5 М MES буфером pH 6,0. Клетки повторно суспендируют в 0,5 М MES буфере pH 6 и возвращают в ферментер. Параметры ферментера, установленные для биоконверсии, следующие: температура 32,5°C, перемешивание 400 обор./мин и аэрация 6 л/мин и обратное давление 0,0422 кг/кв.см. Сульфокетон (1,5 г/л) растворяют в ДМСО и добавляют в ферментер (3% об/об). Пробы отбирают периодически для контроля активности биоконверсии путем ЖХВР. Скорость биоконверсии 1,14 г/л/ч или 0,126 г/г CDW/ч и конечный выход 1,04 г/л-1 транс-гидроксисульфона, имеющего 96,4% диастереомерный избыток, достигают при сборе клеток. Бульон экстрагируют этилацетатом (0,5 л, об/об), а фазу растворителя концентрируют, используя ротаторный испаритель.

Пример 2

Биоконверсия транс-гидроксисульфона (5,6-дигидро-4(S)-гидрокси-6(S)-метил-4H-тиено-[2,3-b]тиопиран 7,7-диоксид).

Клетки культуры ATCC 74283, сохраненные на Sabouraud декстрозных скошенных агарх при 4°C, используют, чтобы инокулировать колбу Эрленмейера емкостью 250 мл, содержащую 50 мл Sabouraud декстрозного бульона. После инкубирования в течение 20 часов при 28°C при встряхивании кетосульфон, растворенный в этаноле (33,3 мг/мл), добавляют в колбы (1 мл на колбу). Культуры возвращают в те же самые условия инкубирования дополнительно на 24 часа. Остаточный кетосульфон и продуцированный гидроксисульфон экстрагируют из бульона одним объемом хлороформа. Анализы ТСХ и ЖХВР показывают полное превращение сульфокетона в транс-гидроксисульфон. ЯРМ анализы подтверждают структуру транс-гидроксисульфона: дельта 7,6 (д, 1H, C₂-H), 7,1 (д, 1H, C₃-H), 4,9 (м, 1H, C₄-H), 3,8 (м, 1H, C₆-H), 3,5-3,0 (ушир. с, 1H, OH), 2,6 (м, 1H, C₅-H), 2,4 (м, 1H, C₅-H), 1,5 (д, 3H, C₆-CH₃).

Пример 3

На этом примере способ получения соединений формулы I [5,6-дигидро-6(S)-пропил-4(S)-1-этиламино-4H-тиено[2,3-b]тиопиран-2-сульфонамид-7,7-диоксида] представлен следующим образом.

Стадия 1 Процедура

Транс-гидроксисульфон (7,32 г, 29,7 ммоль) суспендируют в ацетонитриле (38 мл) в кругло-

донной колбе емкостью 100 мл, снабженной магнитной мешалкой, термопарой и впуском азота. Раствор охлаждают до 0°C и добавляют серную кислоту (5 мл, 88,7 ммоль) по частям. Реакционную смесь затем перемешивают при комнатной температуре. Смесь охлаждают до 0-5°C. Колбу на 500 мл загружают водой (34 мл) и ацетонитрилом (43 мл), затем смесь охлаждают до 0-5°C и хорошо перемешивают. Затем осторожно добавляют реакционную смесь так, чтобы температура оставалась ниже 5°C. Насыщенный карбонат калия (30 мл) затем добавляют до установления pH водного слоя между 7-8 или до тех пор, пока не прекратится выделение диоксида углерода. Органический слой концентрируют в сырой маслянистый материал (14,1 г), по пробному анализу 42,5 масс.%. Выход составляет 5,99 г (73%).

Стадия 2 Процедура

Круглую колбу емкостью 100 мл, снабженную магнитной мешалкой и термопарой, загружают хлоросульфоновой кислотой (13,14 мл) и кислоту охлаждают до 0-5°C. Ацетамидосульфон (6,57 г) добавляют порциями в течение 30 мин так, чтобы внутренняя температура была ниже 15°C. Темную реакционную смесь затем нагревают до 33°C в течение 16 ч, а затем еще 5 ч до 50°C. Когда ЖХВР показывает, что остается <0,5% (против сульфоновой кислоты и сульфонила хлорида) ацетамидосульфона, смесь охлаждают до комнатной температуры. Затем по каплям добавляют тионилхлорид (13,14 мл). По окончании добавления темную смесь нагревают до 45°C. После 16 ч остается <0,5% по площади сульфокислоты. Смесь охлаждают до 0-5°C. Литровую колбу загружают водой (325 мл) и охлаждают до 0°C. Смесь для хлорирования затем добавляют по каплям в течение 30 минут к хорошо перемешиваемому охлаждаемому раствору, так что внутренняя температура остается ниже 5°C. Смесь перемешивают 45 мин и затем фильтруют. Влажную лепешку промывают холодной водой (10 мл) и сушат в потоке азота. Концентрированный водный аммиак (24 мл) и ТГФ (43 мл) загружают в колбу на 250 мл, снабженную магнитной мешалкой и термопарой. Смесь охлаждают примерно до -10°C. Неочищенный влажный твердый сульфонила хлорид добавляют порциями в течение 1 ч, поддерживая внутреннюю температуру ниже 0°C. После 2 ч остается менее, чем 1,8% сульфонила хлорида. Избыток аммиака нейтрализуют водной хлористоводородной кислотой (примерно 50 мл). Водный слой промывают ТГФ дважды. Слои ТГФ объединяют и концентрируют. Материал суспендируют снова в ТГФ и осторожно добавляют воду. Образуются коричневые кристаллы и остается желтый водный раствор. Смесь фильтруют и кристаллы сушат в вакууме. Выход ацетамидосульфонила - 5,58 г (66%).

Стадия 3 Процедура

Ацетамидосульфонила (4,21 г, 11,5 ммоль) сушат перегонкой с ТГФ (2 x 100 мл порции) в колбе на 250 мл. Колбу снабжают магнитной мешалкой, термопарой и впуском азота. Суспензию ацетамидосульфонила в 22,5 мл ТГФ охлаждают затем до 0-5°C. Боран-ТГФ (51 мл, 51 ммоль) добавляют по каплям в течение 45 минут, поддержи-

вая внутреннюю температуру ниже 5°C. После завершения выделения водорода (20 минут) раствор нагревают до 30-35°C. После завершения реакции (3 ч) смесь охлаждают до комнатной температуры. Круподонную колбу емкостью 250 мл, снабженную магнитной мешалкой, термпарой и впуском азота, загружают серной кислотой (60 мл) и охлаждают до 0-5°C. Реакционную смесь затем осторожно дозируют в хорошо перемешиваемый кислотный раствор, поддерживая внутреннюю температуру ниже 20°C. После добавления смесь

перемешивают при комнатной температуре до завершения выделения водорода. Колбу затем устанавливают для перегонки (1 атм) и смесь концентрируют, пока внутренняя температура не достигнет >97°C. После окончания перегонки смесь охлаждают до 20°C. Смесь затем нейтрализуют водным бикарбонатом калия и экстрагируют этилацетатом (100 мл). Органический слой концентрируют с получением 3,45 г 5,6-дигидро-6-(S)-пропил-4(S)-1-этиламино-4H-тиено[2,3-b]тиопиран-2-сульфонамид-7,7-диоксида.

Тираж 50 экз

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
