

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480006636.1

[51] Int. Cl.

C12P 17/02 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008年7月9日

[11] 授权公告号 CN 100400669C

[22] 申请日 2004.3.10

[21] 申请号 200480006636.1

[30] 优先权

[32] 2003.3.12 [33] IN [31] 0275/DEL/2003

[86] 国际申请 PCT/IB2004/000670 2004.3.10

[87] 国际公布 WO2004/081219 英 2004.9.23

[85] 进入国家阶段日期 2005.9.12

[73] 专利权人 科学和工业研究委员会

地址 印度新德里

[72] 发明人 纳韦恩·阿南德 穆尼希·卡普尔

苏巴实·昌卓·塔尼加

苏里德·库尔 兰塔·拉尔·夏尔马

吴拉姆·纳比·卡齐

[56] 参考文献

CN1197070A 1998.10.28

CN1273608A 2000.11.15

审查员 杨帆

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 丁香兰

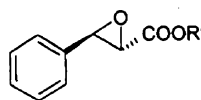
权利要求书4页 说明书15页

[54] 发明名称

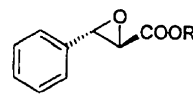
用于制备旋光上经富集的苯基缩水甘油酸酯的立体选择性化学酶方法

[57] 摘要

本发明涉及一种新的有效制备具有旋光活性的反式苯基缩水甘油酸烷基酯的化学酶方法。本发明尤其公开了一种新的用于合成反式苯基缩水甘油酸烷基酯的两种对映体(即分别由式7和式8所代表的(2S, 3R)-苯基缩水甘油酸烷基酯和(2R, 3S)-苯基缩水甘油酸烷基酯)的化学酶方法。

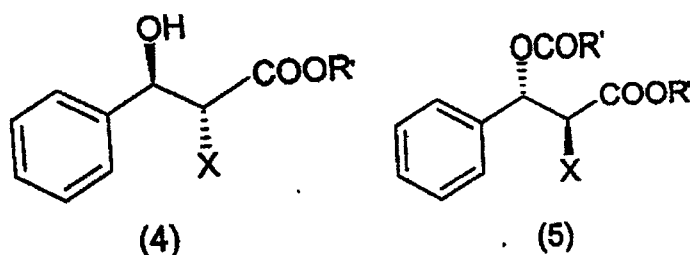


(7)
(2S,3R)



(8)
(2R,3S)

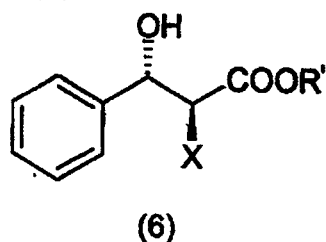
示的(2*S*,3*S*)-3-酰氧基-2-卤代-3-苯基丙酸烷基酯；



d. 通过常规的色谱法分离经水解的式 4 所表示的(2*R*,3*R*)-2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯和未水解的式 5 所表示的(2*S*,3*S*)-3-酰氧基-2-卤代-3-苯基丙酸烷基酯；

e. 在有机溶剂的存在下在水性缓冲相中将具有旋光活性的未水解的式 5 所表示的苯基丙酸酯与得自黑曲霉的脂肪酶的粗制干粉温育以进一步提高对映体纯度；

f. 使具有旋光活性的式 5 所表示的产物与酸反应以得到式 6 所表示的具有旋光活性的(2*S*,3*S*)-2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯，和



g. 在有机相或水相中用碱处理式 4 和式 6 所表示的化合物，所述处理通过环化作用形成环氧化物环，从而分别得到式 7 和式 8 所表示的具有旋光活性的(2*S*,3*R*)-苯基缩水甘油酸烷基酯和(2*R*,3*S*)-苯基缩水甘油酸烷基酯。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中用于制备式 2 所表示的反式卤代醇的卤化剂选自由 N-卤代琥珀酰亚胺、溴酸钠、高碘酸、1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲、碘和溴组成的组。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述 N-卤代琥珀酰亚胺为 N-溴代琥珀酰亚胺或 N-碘代琥珀酰亚胺。

4. 如权利要求 2 所述的方法，其中卤羟基化步骤在水性相或有机相或含水的有机相中进行，其中所述有机相选自水溶性溶剂。

5. 如权利要求 4 所述的方法, 其中所述水溶性溶剂选自丙酮、四氢呋喃、二噁烷、二甲基甲酰胺和甲醇。
6. 如权利要求 4 所述的方法, 其中所述卤羟基化步骤在 0~60°C 的温度进行。
7. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述的碱选自吡啶或 N,N-二甲基氨基吡啶。
8. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述脂肪酶得自黑曲霉的粗制干粉。
9. 如权利要求 1 所述的方法, 其中使用所述得自黑曲霉的脂肪酶的粗制干粉进行动力学拆分。
10. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述水性缓冲相是水性磷酸盐缓冲液。
11. 如权利要求 10 所述的方法, 其中所述水性磷酸盐缓冲液的 pH 为 5~7.5。
12. 如权利要求 1 所述的方法, 其中立体专一性水解在浓度为 10%~90% 的有机助溶剂的存在下进行。
13. 如权利要求 12 所述的方法, 其中所述有机助溶剂为己烷、甲苯、二氯甲烷、丙酮、乙腈、二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、甲醇或乙醇。
14. 如权利要求 1 所述的方法, 其中立体专一性水解是在 30°C 的温度下进行。
15. 如权利要求 1 所述的方法, 其中温育期为 48 小时。
16. 如权利要求 1 所述的方法, 其中形成具有旋光活性的式 7 所表示的缩水甘油酸酯的环化作用是在有机碱或无机碱的存在下进行。
17. 如权利要求 16 所述的方法, 其中所述无机碱为氢氧化钠或碳酸钠。
18. 如权利要求 16 所述的方法, 其中所述有机碱选自三乙胺、哌啶、1,4-二氮杂双环[2,2,2]辛烷或 1,8-二氮杂双环[5,4,0]-十一基-7-烯。
19. 如权利要求 1 所述的方法, 其中形成具有旋光活性的式 8 所表示的缩水甘油酸酯的环化作用是在有机酸或无机酸的存在下进行。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其中所述酸为盐酸、硫酸、三氟乙酸或三氟化硼。

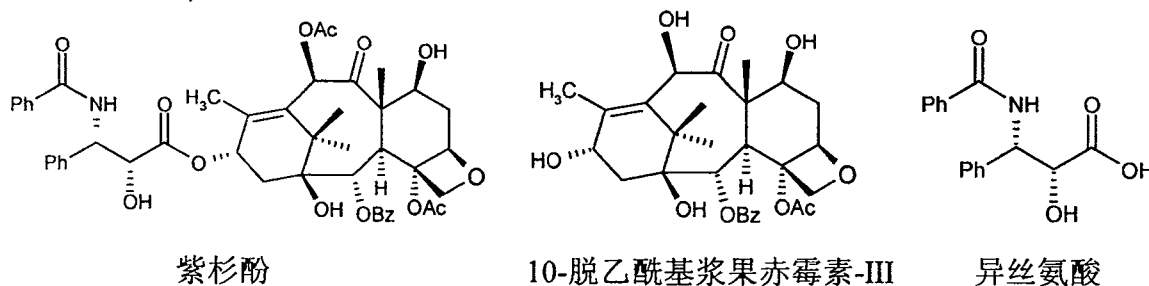
用于制备旋光上经富集的苯基缩水甘油酸酯的 立体选择性化学酶方法

技术领域

本发明涉及一种新的有效制备具有旋光活性的反式苯基缩水甘油酸烷基酯的化学酶方法。本发明尤其公开了一种新的用于合成反式苯基缩水甘油酸烷基酯的两种对映体（即分别由式 7 和式 8 所代表的 (2*S*,3*R*)-苯基缩水甘油酸烷基酯和 (2*R*,3*S*)-苯基缩水甘油酸烷基酯）的化学酶方法。

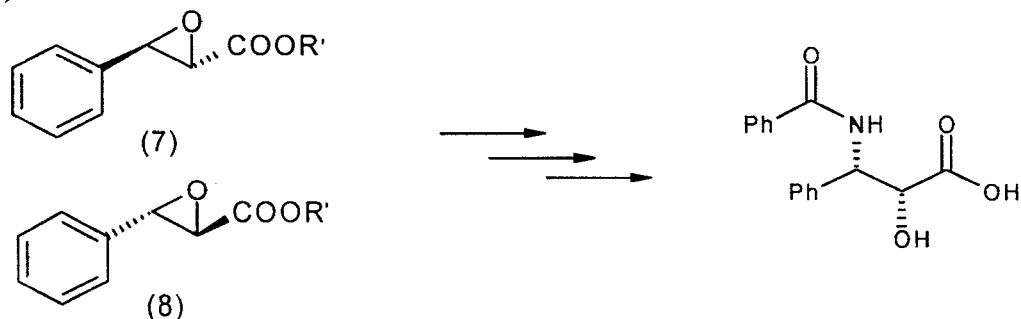
背景技术

式 7 和式 8 所表示的旋光上经富集的 (2*S*,3*R*)-苯基缩水甘油酸烷基酯和 (2*R*,3*S*)-苯基缩水甘油酸烷基酯是用于合成 N-苯甲酰基-(2*R*,3*S*)-3-苯基异丝氨酸（紫杉酚侧链）的关键中间体。紫杉醇（Paclitaxel）或紫杉酚（Taxol）是从太平洋紫杉（短叶紫杉属，*Taxus brevifolia*）的皮中分离出来的（Wani 等 *J Am Chem Soc.* 93, 2325~2327, 1971）并且已经被批准用于治疗各种类型的癌症（Holmes 等 *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 1797~1805, 1991）。



尽管作为最有希望的抗癌药物之一，但它在自然界中极低的存在量（40 mg/kg~165 mg/kg）成为生产中的主要阻碍。幸运的是已经发现结构上与紫杉酚紧密相关的 10-脱乙酰基浆果赤霉素-III 具有相对较高的浓度（大约 1 g/kg），并且可以容易地从欧洲紫杉（浆果紫杉属，*Taxus baccata*）的新鲜叶子中分离出来。又据报道紫杉醇的效力比 10-脱乙酰基浆果赤霉

素-III 高 1000 倍，其更高的活性是由于具有含 N-苯甲酰基-(2*R*,3*S*)-3-苯基异丝氨酸部分的 C-13 侧链。(Wani 等 *J Am Chem Soc.* 93, 2325~2327, 1971)。



因此作为合成 N-苯甲酰基-(2*R*,3*S*)-3-苯基异丝氨酸的关键手性前体的式 7 和式 8 所表示的具有旋光活性的(2*S*,3*R*)-苯基缩水甘油酸酯和(2*R*,3*S*)-苯基缩水甘油酸酯的合成对于实用且有效的对映体纯的异丝氨酸链合成路线的开发是至关重要的。

除了不对称合成以外，还有很多关于通过生化法或化学酶方法来制备这些手性中间体的报道。这些报道中的大多数涉及通过酶水解(H.Honig 等, *Tetrahedron* 46, 3841-3850, 1990; Peter G. M Wuts 等, *Tetrahedron Asymmetry* 11, 2117~2123, 2000)、或通过酯交换反应(Ching-Shih Chen 等, *J. Org. Chem.* 58, 1287~1289, 1993; Ching-Shih Chen 等, 美国专利 6,020,174, 申请人为高等教育主管委员会(The Board of Governors for Higher Education), Rhodes Island; Marco Villa 等, 美国专利 6,187,936, 申请人为 Zambon Group S.p.A; Tanebe JP 06/078790)或通过氮杂环丁酮的拆分(C.J Sih 等, *J. Org. Chem.* 58, 1068~1075, 1993; R.N. Patel 等, *J. American Oil Chemists Society*, 73, 1363~1375, 1996; R. A. Holton 等, WO 2001029245, EP 1222305, 申请人为 Bristol-Myers Squibb; R.N. Patel 等, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 20, 23~33, 1994)来进行外消旋的 2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸酯的动力学拆分。

由参考文献可以很清楚地知道对于外消旋的 2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸酯的动力学拆分并没有可以利用的现有技术，其中 X 代表溴基和碘基且 R'代表 C-1 至 C-5 的烷基。因此使用溴醇和碘醇通过动力学途径制备所需要的(2*S*,3*R*)-苯基缩水甘油酸酯和(2*R*,3*S*)-苯基缩水甘油酸酯基本

上是新的并且在文献中或本领域所已知的紫杉酚侧链前体的合成中没有报道过。

因此本发明公开了使用脂肪酶通过动力学拆分卤代醇中间体的方法来制备(2*S*,3*R*)-苯基缩水甘油酸酯和(2*R*,3*S*)-苯基缩水甘油酸酯,其中 X 和 R'如上定义。

发明内容

因此本发明的主要目的是用化学酶方法通过拆分式 2 所代表的外消旋前体反式 2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯来合成式 7 和式 8 所代表的具有旋光活性的 (2*S*,3*R*)-苯基缩水甘油酸烷基酯和(2*R*,3*S*)-苯基缩水甘油酸烷基酯,其中 X 代表溴或碘和 R'代表 C-1 至 C-5 的烷基。使用溴醇和碘醇中间体的优点在于它们容易以几乎定量的产率制备并且可以以结晶形式获得。而且这些化合物可以容易地通过酸和碱催化的转化以几乎定量的产率转变为相应的环氧化物(缩水甘油酸酯)。另外,使用得自于黑曲霉(*Aspergillus niger*)的脂肪酶使得反式 2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯的拆分很容易进行。

本发明涉及一种新的有效制备具有旋光活性的反式苯基缩水甘油酸烷基酯的化学酶方法。本发明尤其公开了一种新的用于合成反式苯基缩水甘油酸烷基酯的两种对映体(即分别由式 7 和式 8 所代表的 (2*S*,3*R*)-苯基缩水甘油酸烷基酯和 (2*R*,3*S*)-苯基缩水甘油酸烷基酯)的化学酶方法。

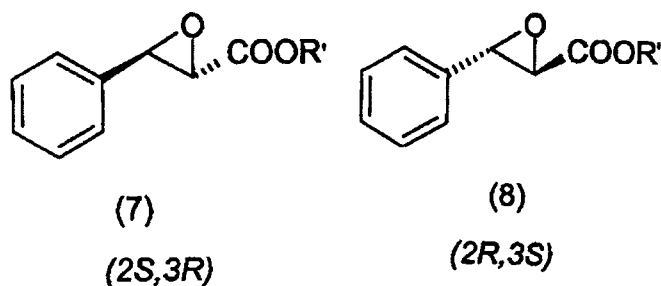
它们的合成方法包括式 I 所表示的肉桂酸烷基酯的共卤化反应(cohalogenation),其中 R'代表 C-1 至 C-5 的烷基,以形成式 2 所表示的反式 2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸酯,其中 X 代表 Br 或 I,然后将式 2 所表示的卤代醇转变成相应的式 3 所表示的烷基酰化物,其中 X 和 R'如上所定义,接着在有机溶剂的存在下在水性缓冲相中将式 3 所表示的 2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯的酰基衍生物与得自黑曲霉的脂肪酶的粗制干粉进行温育,随后通过常规方法从混和物中分离经水解的卤代醇即式 4 所表示的(2*R*,3*R*)-2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯和未水解的酯即式 5 所

表示的 (2*S*,3*S*)-2-卤代-3-酰氧基-3-苯基丙酸烷基酯, 如果需要则在有机溶剂的存在下在水性缓冲相中将旋光上经富集的式 5 所表示的酰基衍生物与得自黑曲霉的脂肪酶的粗制干粉再次温育以进一步提高对映体纯度, 随后通过旋光上经富集的式 5 所表示的产物与酸的反应得到旋光上经富集的式 6 所表示的(2*S*,3*S*)-2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯, 最后在有机相或水相中用碱处理式 4 和式 6 所表示的化合物以分别得到旋光上经富集的式 7 和式 8 所表示的(2*S*,3*R*)-苯基缩水甘油酸烷基酯和(2*R*,3*S*)-苯基缩水甘油酸烷基酯。

对于反式 2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯的动力学拆分, 得自黑曲霉的脂肪酶的使用是新颖的, 其中 X 和 R'如上所定义, 同样用于经拆分的式 4 和式 6 所表示的反式 2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯的环化反应的酸催化步骤和随后的碱催化步骤在其合成领域中也未曾报道过。

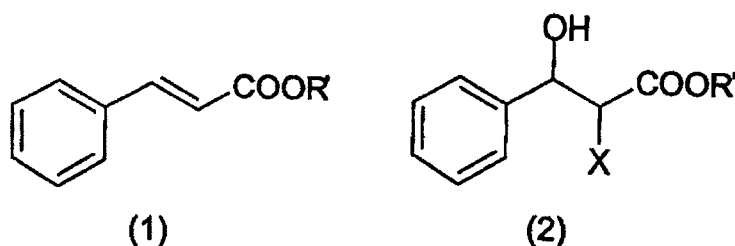
具体实施方式

本发明涉及一种用于合成旋光上经富集的反式苯基缩水甘油酸烷基酯的立体选择性化学酶方法, 其中所述反式苯基缩水甘油酸烷基酯分别以式 7 和式 8 所表示的(2*S*,3*R*)-苯基缩水甘油酸烷基酯和(2*R*,3*S*)-苯基缩水甘油酸烷基酯的对映体形式存在,

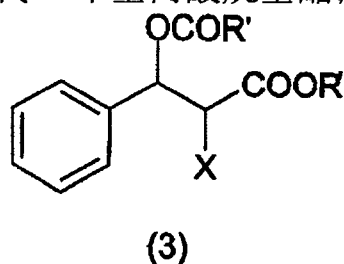


其中所述方法包括下列步骤,

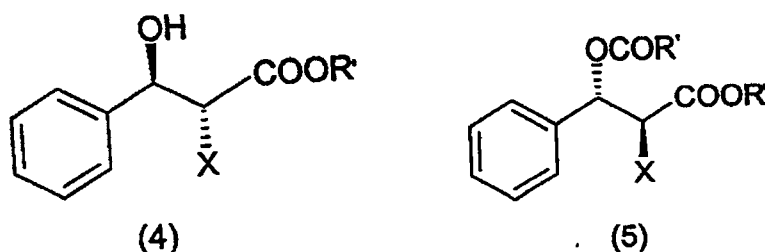
- a. 通过卤化剂的作用将式 1 所表示的肉桂酸烷基酯卤化得到式 2 所表示的卤代醇, 其中 X 代表溴或碘, R'代表 C-1 至 C-5 的烷基;



b. 在碱的存在下用酰基酸酐将式 2 所表示的卤代醇酰化以得到式 3 所表示的反式 3-酰氧基-2-卤代-3-苯基丙酸烷基酯；



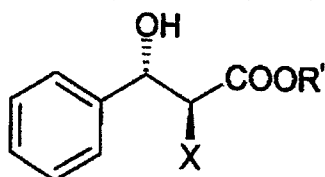
c. 在存在或不存在有机介质的条件下在 10°C~40°C 的温度将式 3 所表示的反式 3-酰氧基-2-卤代-3-苯基丙酸烷基酯与脂肪酶的干粉在水性缓冲相中温育 30~55 小时以促进反应，从而得到经水解的式 4 所表示的 (2*R*,3*R*)-2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯和未水解的式 5 所表示的 (2*S*,3*S*)-3-酰氧基-2-卤代-3-苯基丙酸烷基酯；



d. 通过常规的色谱法分离经水解的式 4 所表示的 (2*R*,3*R*)-2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯和未水解的式 5 所表示的 (2*S*,3*S*)-3-酰氧基-2-卤代-3-苯基丙酸烷基酯；

e. 在有机溶剂的存在下在水性缓冲相中将旋光上经富集的未水解的式 5 所表示的苯基丙酸酯与得自黑曲霉的脂肪酶的粗制干粉温育以进一步提高对映体纯度；

f. 使旋光上经富集的式 5 所表示的产物与酸反应以得到式 6 所表示的旋光上经富集的(2*S*,3*S*)-2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯, 和



(6)

g. 在有机相或水相中用碱处理式 4 和式 6 所表示的化合物, 所述处理通过环化作用形成环氧化物环, 从而分别得到式 7 和式 8 所表示的旋光上经富集的(2*S*,3*R*)-苯基缩水甘油酸烷基酯和(2*R*,3*S*)-苯基缩水甘油酸烷基酯。

在本方法的步骤“a”中, 在由式 1 所表示的肉桂酸烷基酯至式 2 所表示的卤代醇的卤代醇的制备方法的优选实施方案中, 卤化剂选自诸如 N-溴代琥珀酰亚胺、N-碘代琥珀酰亚胺等 N-卤代琥珀酰亚胺或溴酸钠、高碘酸、1,3-二溴-5,5-二甲基乙内酰脲、碘、溴, 但更优选在水性相或有机水混和相中用溴酸钠进行溴羟基化或用高碘酸进行碘羟基化, 其中有机溶剂可以选自水溶性溶剂, 例如丙酮、四氢呋喃、二噁烷、乙腈。

在另一实施方案中, 卤代醇的生成在 0~60°C 的温度范围内进行, 更优选在 30°C~40°C 进行。

在又一实施方案中, 在式 2 所表示的化合物向式 3 所表示的酰化物转化的步骤“b”中, 所述酰化剂选自诸如乙酸酐、丙酸酐和丁酸酐等酰基酸酐或相应的酰氯, 但最适合的是在例如吡啶、N,N-二甲基氨基吡啶 (DMAP) 等碱, 更优选 DMAP 存在下的乙酸酐。

在又一实施方案中, 在本方法的步骤“c”中, 通过单独在已缓冲的水性相中或在作为促进水解反应的助溶剂的有机介质的存在下在已缓冲的水性相中在得自黑曲霉的粗制脂肪酶 (AS AMANO) 的存在下温育式 3 所表示的化合物, 来实现式 3 所表示的化合物的动力学拆分。缓冲剂的 pH 适当地调节至 5~7.5, 更适当地调节至 6~7.5, 最适合的是 7。

在又一实施方案中, 反应温度在 10°C~40°C 中选择, 但更合适地是在 20°C~35°C 中选择, 最合适地是 30°C。

在又一实施方案中温育期大约为 48 小时。

在另一实施方案中，优选的水性相是水、磷酸盐缓冲液（0.1M 至 0.2M）或乙酸盐缓冲液，最优选的一种是磷酸盐缓冲液（0.1M）。以 10%~90%的比例加入的优选的助溶剂是己烷、甲苯、二氯甲烷、丙酮、乙腈、二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、甲醇和乙醇等。更优选是甲苯、丙酮和乙腈，最优选是乙腈。

在另一实施方案中，在水解反应完成后，在本方法的步骤“d”中，经水解的式 4 所表示的醇和未水解的式 5 所表示的酯的分离通过常规的色谱法在硅胶柱上通过柱色谱来进行。

在又一实施方案中，在本方法的步骤“e”中，用碱催化的式 4 所表示的化合物（经水解的酯）向式 7 所表示的(2*S*, 3*R*)-苯基缩水甘油酸烷基酯的转化，用无机碱或有机碱来进行，所述无机碱例如氢氧化钠和碳酸钠等，所述有机碱选自三乙胺、哌啶、1,4-二氮杂双环[2,2,2]辛烷（DABCO）、1,8-二氮杂双环[5,4,0]-十一基-7-烯（DBU）等等，更优选的碱是 DBU。

在又一实施方案中，在本方法的步骤“f”中，首先用酸催化的式 5 所表示的化合物(2*S*, 3*S*)-3-酰氧基-2-卤代-3-苯基丙酸烷基酯（未水解的酯）向式 6 所表示的(2*S*, 3*S*)-2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸烷基酯的转化，在有机溶剂例如二乙醚、甲醇和丙酮等中用无机酸例如盐酸、硫酸或有机酸或路易斯酸例如三氟乙酸、三氟化硼（BF₃）来进行，但优选的酸性条件为溶于甲醇的 1N、2N 和 5N 的 HCl，最优选是 2N 的 HCl，最后向式 8 所表示的(2*R*, 3*S*)-苯基缩水甘油酸烷基酯的转化用步骤“e”中所描述的碱来进行。

在本发明的又一实施方案中，上述方法导致式 7 所表示的产物的对映体过量为 86%~95%。

在本发明的又一实施方案中，上述方法导致式 8 所表示的产物的对映体过量为 60%~99.5%。

这里参照下面的实施例来描述本发明。这些实施例不应该被认为是对本发明范围的限制。

步骤“a”

实施例 (i)

式 2 所表示的(±) 2-溴-3-羟基-3-苯基丙酸甲酯的合成, 其中 X=Br 且 R'=CH₃

将溴酸钾 (4g, 24 mmol) 溶于 40 ml 水中并用 2M H₂SO₄ 将 pH 调节至 1~2。向所得溶液中加入溶于 40 ml 乙腈的肉桂酸甲酯(3g, 20 mmol)。在搅拌下在 40°C 用 2 小时的时间将 1M 亚硫酸氢钠溶液(5.2g 溶于 50 ml) 加入到上述混合物中。将反应混合物再搅拌 36 小时直至完全反应(用薄层色谱法(TLC)监测)。所得溶液用乙酸乙酯(3×100 ml)萃取, 所合并的有机层用亚硫酸钠水溶液进行洗涤, 随后用无水硫酸钠干燥。将内容物真空浓缩得到粗产物, 通过结晶进行提纯(苯:己烷, 1:1)以得到式 2 所表示的化合物, 熔点(m.pt) 63°C (产率 70%)。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 7.37(5H, s, Ar-H), 5.08(1H, d, J=8.25 Hz, CH-OH), 4.38(1H, d, J=8.24 Hz, CH-Br), 3.80(3H, s, COOCH₃)。

实施例 (ii)

式 2 所表示的(±) 2-溴-3-羟基-3-苯基丙酸乙酯的合成, 其中 X=Br 且 R'=C₂H₅

该化合物可以根据步骤“a”的实施例(i)中所给的方法由肉桂酸乙酯(3.26g, 20 mmol)和溴酸钾(4g, 24 mmol)来制备, m.pt 76°C~77°C, 产量为 3.7g, (70%)。

¹H NMR(CDCl₃) δ: 7.38(5H, s, Ar-H), 5.08(1H, d, J=8.29 Hz, CH-OH), 4.54(1H, d, J=8.28 Hz, CH-Br), 4.25(2H, q, J=7.11 Hz, CH₂), 1.25(3H, t, J=7.12 Hz, CH₃)。

实施例 (iii)

式 2 所表示的(±)3-羟基-2-碘-3-苯基丙酸甲酯的合成, 其中 X=I 且 R'=CH₃

对于经搅拌的肉桂酸甲酯 (3g, 20 mmol)、 $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.2g, 24 mmol)、12 ml 水和 40 ml 乙腈的悬浮液, 在搅拌下在 30°C 用 3 至 4 小时的时间向上述混合物中加入 1M 亚硫酸氢钠溶液 (5.2g 溶于 50ml)。将反应混合物再搅拌 36 小时直至完全反应 (用 TLC 监测)。所得溶液用乙酸乙酯 (3×50 ml) 萃取, 所合并的有机层用亚硫酸钠水溶液洗涤, 随后用无水硫酸钠干燥。将内容物真空浓缩得到粗产物, 通过结晶进行提纯 (苯 : 己烷, 1 : 1) 以得到式 2 所表示的化合物, m.pt 63°C , 产量为 3g (65%)。

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 7.35(5H, s, Ar-H), 5.05(1H, d, $J=8.42$ Hz, CH-OH), 4.55(1H, d, $J=8.43$ Hz, CH-Br), 3.75(3H, s, CH_3)。

实施例 (iv)

式 2 所表示的(±)3-羟基-2-碘-3-苯基丙酸乙酯的合成, 其中 $\text{X}=\text{I}$ 且 $\text{R}'=\text{C}_2\text{H}_5$

该化合物可以根据步骤“a”的实施例(iii)中所给的方法由肉桂酸乙酯 (3.26g, 20 mmol) 和 $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.2g, 24 mmol) 来制备, 产量为 4g (77%), m.pt 79°C 。

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 7.38(5H, s, Ar-H), 5.05(1H, d, $J=8.29$ Hz, CH-OH), 4.55(1H, d, $J=8.29$ Hz, CH-Br), 4.25(2H, q, $J=7.11$ Hz, CH_2), 1.25(3H, t, $J=7.12$ Hz, CH_2CH_3)。

步骤 “b”

实施例 (i)

式 3 所表示的(±)3-乙酰氧基-2-溴-3-苯基丙酸甲酯的合成, 其中 $\text{X}=\text{Br}$ 且 $\text{R}'=\text{CH}_3$

将式 2 所表示的化合物 (2.59g, 10 mmol)、乙酸酐 (12 mmol) 和二甲基 N,N -二甲氨基吡啶 (DMAP) (催化量) 溶于 10 ml 无水二氯甲烷中形成溶液, 将该溶液在室温下保存过夜。将反应混合物倒入冰冷却的水中并用二氯甲烷萃取 (3×100 ml)。洗涤有机层, 干燥, 蒸发以得

到式 3 所表示的化合物，将式 3 所表示的化合物用柱色谱进行纯化（硅胶，乙酸乙酯：己烷；3：97），产率为 90%~95%，m.pt. 56□。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.45(5H, s, Ar-H), 6.23(1H, d, $J=10.00$ Hz, CH-OAc), 4.58(1H, d, $J=10.00$ Hz, CH-Br), 3.83(3H, s, COOCH_3), 2.03(3H, s, OCOCH_3)。

实施例 (ii)

式 3 所表示的(±)3-乙酰氧基-2-溴-3-苯基丙酸乙酯的合成，其中 X=Br 且 $\text{R}'=\text{C}_2\text{H}_5$

该化合物可以根据步骤“b”的实施例(i)中所给的方法由式 2 所表示的化合物（2.73g, 10 mmol）、乙酸酐（12 mmol）和 N,N-二甲基氨基吡啶（DMAP）（催化量）来制备，产率为 90%~95%。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.50(5H, s, Ar-H), 6.23(1H, d, $J=10.50$ Hz, CH-OAc), 4.53(1H, d, $J=10.50$ Hz, CH-Br), 4.33(2H, q, $J=7.11$ Hz CH_2), 2.06(3H, s, OCOCH_3), 1.33(3H, t, $J=7.12$ Hz CH_2CH_3)。

实施例 (iii)

式 3 所表示的(±)3-乙酰氧基-2-碘-3-苯基丙酸甲酯的合成，其中 X=I 且 $\text{R}'=\text{CH}_3$

该化合物可以根据步骤“b”的实施例(i)中所给的方法由式 2 所表示的化合物（3.06g, 10 mmol）、乙酸酐（12 mmol）和 N,N-二甲基氨基吡啶（DMAP）（催化量）来制备，产率为 90%~95%，m.pt, 58°C。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.40(5H, s, Ar-H), 6.15(1H, d, $J=10.75$ Hz, CH-OAc), 4.62(1H, d, $J=10.75$ Hz, CH-Br), 3.17(3H, s, COOCH_2), 2.00(3H, s, CH_3)。

实施例 (iv)

式 3 所表示的(±)3-乙酰氧基-2-碘-3-苯基丙酸乙酯的合成，其中 X=I 且 $\text{R}'=\text{C}_2\text{H}_5$

该化合物可以根据步骤“b”的实施例(i)中所给的方法由式2所表示的化合物(3.19g, 10 mmol)、乙酸酐(12 mmol)和N,N-二甲基氨基吡啶(DMAP)(催化量)来制备,产率为90%~95%。

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 7.50(5H, s, Ar-H), 6.15(1H, d, $J=10.50$ Hz, CH-OAc), 4.62(1H, d, $J=10.50$ Hz, CH-Br), 4.25(2H, q, $J=7.11$ Hz COOCH_2), 2.06(3H, s, OCOCH_3), 1.25(3H, t, $J=7.12$ Hz CH_2CH_3)。

步骤“c”

实施例(i)

通过动力学拆分来制备式4所表示的(-)(2*R*,3*R*)-2-溴-3-羟基-3-苯基丙酸甲酯,其中X=Br且R'=CH₃

将其中X=Br且R'=CH₃的式3所表示的(±)3-乙酰氧基-2-溴-3-苯基丙酸甲酯(800 mg)加入到水性磷酸盐缓冲液(16ml, 0.1M pH 7.0)和甲苯(1.6 ml)的两相系统中。在持续搅拌下向上述溶液中加入黑曲霉脂肪酶的粗制干粉(Amano AS, 400 mg, 12-15 单位/mg)并通过添加0.5N氢氧化钠溶液将pH维持在7.0。在反应过程中将温度维持在30℃。每隔6小时后用TLC和HPLC(高效液相色谱法)来监测反应进程。反应完成后(48小时,约43%转化),通过在10,000g至15,000g离心分离混合物以除去酶和悬浮颗粒来终止反应。清液和经离心分离的固体物质分别用乙酸乙酯(3×20 ml)萃取。合并有机层并且用水洗涤。然后干燥所合并的溶剂层并减压蒸发以得到含有经水解的醇和未水解的酯的混合物,该混合物用己烷:乙酸乙酯(97:3)作为洗脱液在硅胶上用柱色谱进行分离以得到式4所表示的(-)(2*R*,3*R*)-2-溴-3-羟基-3-苯基丙酸甲酯(250 mg, 85%),其对映体纯度(EE)为92%, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}-19.7^{\circ}$ (c,1,CHCl₃),以及式5所表示的未水解的酯(+)(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-溴-3-苯基丙酸甲酯(378 mg, 83%),其对映体纯度(EE)为70%(手性HPLC), $[\alpha]_{\text{D}}^{25}+36.4^{\circ}$ (c,1,CHCl₃)。

实施例(ii)

通过动力学拆分来制备式 4 所表示的(-)(2*R*,3*R*)-2-溴-3-羟基-3-苯基丙酸乙酯, 其中 X=Br 且 R'=C₂H₅

该化合物可以按照步骤“c”的实施例(i)中所给的方法由式 3 所表示的(±)3-乙酰氧基-2-溴-3-苯基丙酸乙酯(800 mg)、磷酸盐缓冲液(16 ml, 0.1M, pH 7.0)、甲苯(1.6 ml)和黑曲霉脂肪酶的粗制干粉(Amano AS, 400 mg, 12-15 单位/mg)来制备。48 小时后(45%转化)获得经水解的醇(256 mg, 82%), 其对映体纯度(EE)为 86%, [α]_D²⁵-14.8⁰ (c,1,CHCl₃), 以及式 5 所表示的未水解的酯(+)(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-溴-3-苯基丙酸乙酯(375 mg, 85%), 其对映体纯度(EE)为 73%(手性 HPLC), [α]_D²⁵+37.5⁰ (c,1,CHCl₃)。

实施例 (iii)

通过动力学拆分来制备式 4 所表示的(-)(2*R*,3*R*)-3-羟基-2-碘-3-苯基丙酸甲酯, 其中 X=I 且 R'=CH₃

该化合物可以按照步骤“c”的实施例(i)中所给的方法由式 3 所表示的(±)3-乙酰氧基-2-碘-3-苯基丙酸甲酯(800 mg)、磷酸盐缓冲液(16ml, 0.1M, pH 7.0)、甲苯(1.6 ml)和黑曲霉脂肪酶的天然粗制干粉(Amano AS, 400 mg, 12-15 单位/mg)来制备。36 小时后(44%转化)获得经水解的醇(274 mg, 88%), 其对映体纯度(EE)为 94%, [α]_D²⁵ 0.0⁰ (c,1,CHCl₃); -3.0⁰ (c,1, MeOH), 以及式 5 所表示的未水解的酯(+)(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-碘-3-苯基丙酸甲酯(415 mg, 92%), 其对映体纯度(EE)为 76%(手性 HPLC), [α]_D²⁵+48.0⁰ (c,1,CHCl₃)。

实施例 (iv)

通过动力学拆分来制备式 4 所表示的(-)(2*R*,3*R*)-3-羟基-2-碘-3-苯基丙酸乙酯, 其中 X=I 且 R'=C₂H₅

该化合物可以按照步骤“c”的实施例(i)中所给的方法由式 3 所表示的(±)3-乙酰氧基-2-碘-3-苯基丙酸乙酯(800 mg)、磷酸盐缓冲液(16 ml, 0.1M, pH 7.0)、甲苯(1.6 ml)和黑曲霉脂肪酶的粗制干粉(Amano AS,

400 mg, 12-15 单位/mg) 来制备。40 小时后 (40%转化) 获得经水解的醇 (250 mg, 88%), 其对映体纯度 (EE) 为 95%, $[\alpha]_D^{25} -9.3^0$ (c,1,CHCl₃) 以及式 5 所表示的未水解的酯(+)(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-溴-3-苯基丙酸乙酯 (440 mg, 91%), 其对映体纯度 (EE) 为 60% (手性 HPLC), $[\alpha]_D^{25} +36.0^0$ (c,1,CHCl₃)。

实施例 (v)

通过双重动力学拆分来制备式 5 所表示的(+)(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-溴-3-苯基丙酸甲酯, 其中 X=Br 且 R'=CH₃。

该化合物可以按照步骤“c”的实施例(i)中所给的方法由旋光上经富集的式 5 所表示的(+)(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-溴-3-苯基丙酸甲酯 (EE 为 70%, 350 mg)、磷酸盐缓冲液 (7 ml, 0.1M, pH 7.0)、甲苯 (0.7 ml) 和黑曲霉脂肪酶的粗制干粉 (Amano AS, 100 mg, 12-15 单位/mg) 来制备。反应完成 (72 小时) 后, 通过分离未水解的酯 (290 mg) 发现所具有的对映体过量 (EE) >99% (手性 HPLC), $[\alpha]_D^{25} +52.0^0$ (c,1, CHCl₃)。

实施例 (vi)

通过双重动力学拆分来制备式 5 所表示的(+)(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-溴-3-苯基丙酸乙酯, 其中 X=Br 且 R'=C₂H₅

该化合物可以按照步骤“c”的实施例(i)中所给的方法由旋光上经富集的式 3 所表示的(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-溴-3-苯基丙酸乙酯 (EE 为 73%, 350 mg)、磷酸盐缓冲液 (7 ml, 0.1M, pH 7.0)、甲苯 (0.7 ml) 和黑曲霉脂肪酶的粗制干粉 (Amano AS, 100 mg, 12-15 单位/mg) 来制备。65 小时后, 通过分离未水解的酯 (290 mg) 发现所具有的对映体过量 (EE) 为 98% (手性 HPLC), $[\alpha]_D^{25} +50.5^0$ (c,1, CHCl₃)。

实施例 (vii)

通过双重动力学拆分来制备式 5 所表示的(+)(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-碘-3-苯基丙酸甲酯, 其中 X=I 且 R'=CH₃

该化合物可以按照步骤“c”的实施例(i)中所给的方法由旋光上经富集的式3所表示的(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-碘-3-苯基丙酸甲酯(EE为76%, 350 mg)、磷酸盐缓冲液(7 ml, 0.1M, pH 7.0)、甲苯(0.7 ml)和黑曲霉脂肪酶的粗制干粉(Amano AS, 100 mg, 12-15 单位/mg)来制备。发现式5所表示的未水解的酯(300 mg)的对映体过量(EE)为94%(手性HPLC), $[\alpha]_D^{25} + 59.0^0$ (c,1, CHCl₃)。

实施例 (viii)

通过双重动力学拆分来制备式5所表示的(+)(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-碘-3-苯基丙酸乙酯, 其中 X=I 且 R'=C₂H₅

该化合物可以由旋光上经富集的式3所表示的(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-碘-3-苯基丙酸甲酯(EE为60%, 350 mg)、磷酸盐缓冲液(7 ml, 0.1M, pH 7.0)、甲苯(0.7 ml)和黑曲霉脂肪酶的粗制干粉(Amano AS, 100 mg, 12-15 单位/mg)来制备。发现未水解的酯(315 mg)(72小时)的对映体过量(EE)为73%(手性HPLC), $[\alpha]_D^{25} + 43.5^0$ (c,1, CHCl₃)。

实施例 (ix)

在助溶剂乙腈的存在下通过动力学拆分来制备式4所表示的(-)(2*R*,3*R*)-2-碘-3-羟基-3-苯基丙酸甲酯, 其中 X=I 且 R'=CH₃

将式3所表示的(±)3-乙酰氧基-2-碘-3-苯基丙酸甲酯(200 mg)加入到水性磷酸盐缓冲液(3.6 ml, 0.1M, pH 7.0)和乙腈(0.4 ml)的两相系统中。在持续搅拌下向上述溶液中加入黑曲霉脂肪酶的粗制干粉(Amano AS, 100 mg, 12-15 单位/mg)并通过添加0.5N的氢氧化钠溶液来将pH维持在7.0。在反应期间将反应温度维持在30°C。每隔6小时后监测反应的进程。反应完成后(9小时, 约43%转化), 通过在10,000~15,000g下离心分离混合物以除去酶和悬浮颗粒来终止反应。分别用乙酸乙酯(3×30 ml)来萃取清液和经离心分离的固体物质。合并有机层并用水洗涤。然后干燥所合并的溶剂层并减压蒸发以得到含有经水解的醇和未水解的酯的混合物, 该混合物用己烷: 乙酸乙酯(97:3)作为洗脱液

在硅胶上用柱色谱进行分离以得到式 4 所表示的(2*R*,3*R*)-3-羟基-2-碘-3-苯基丙酸甲酯 (65 mg, 85%), 其对映体纯度 (EE) 为 92%, 以及式 5 所表示的未水解的酯(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-碘-3-苯基丙酸甲酯 (92 mg, 77%), 用手性 HPLC 进行测定, 其对映体纯度(EE)为 62%。

步骤 “e”

实施例 (i)

制备式 7 所表示的(+)(2*S*,3*R*)-苯基缩水甘油酸甲酯, 其中 $R' = \text{CH}_3$

在 20°C 将 0.2 ml 的 1,8-二氮杂双环[5,4,0]-十一基-7-烯 (DBU) 加入到旋光上经富集的式 4 所表示的卤代醇 (200 ml) 的甲醇 (4 ml) 溶液中 5 分钟。减压除去溶剂并用 10 ml 水稀释反应混合物, 用乙酸乙酯萃取, 除去溶剂以得到式 7 所表示的化合物; 得到 98 mg, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 155.0^{\circ}$ (c, 1, CHCl_3)。

步骤 “f”

实施例 (i)

制备式 6 所表示的(+)(2*S*,3*S*)-2-卤代-3-羟基-3-苯基丙酸甲酯, 其中 $R' = \text{CH}_3$

将式 5 所表示的(2*S*,3*S*)-3-乙酰氧基-2-卤代-3-苯基丙酸烷基酯 (200 mg) 溶于 4 ml 的甲醇中, 并加入 0.2ml 的 2N HCl, 将反应混合物在室温下搅拌 24 小时直至式 5 所表示的化合物完全转化为式 6 所表示的化合物。蒸发除去过量的溶剂并用 10 ml 水稀释反应混合物, 用乙酸乙酯萃取, 除去溶剂以得到式 6 所表示的化合物, 获得 150 mg。

实施例 (ii)

制备式 8 所表示的(-)(2*R*,3*S*)-苯基缩水甘油酸甲酯, 其中 $R' = \text{CH}_3$

该化合物可以按照用于制备式 7 所表示的化合物的步骤 “f” 的实施例 (i) 中所给的方法由式 6 所表示的化合物来制备。 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 153.0^{\circ}$ (c, 1, CHCl_3)