(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118871446 A
(43)申请公布日 2024.10.29

(21)申请号 202380028098.9
(22)申请日 2023.03.10
(30)优先权数据
PCT/EP2022/056471 2022.03.14 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/056138 2023.03.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/174810 EN 2023.09.21
(71)申请人 晖致亚太私人有限公司
地址 新加坡交易所
(72)发明人 斯蒂芬·阿贝勒 加雷斯·布朗 彼得·麦金太尔 斯蒂芬·米克斯
(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263
专利代理师 李献忠 张静
(51)Int.Cl.
C07F 9/6558(2006.01)
C07F 9/40(2006.01)

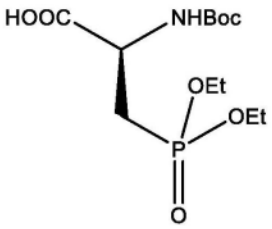
权利要求书4页 说明书29页 附图5页

(54)发明名称

(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸或其膦酸酯衍生物的合成方法

(57)摘要

本发明涉及(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸(“化合物”)、其膦酸酯衍生物或前述任一者的盐的合成方法;涉及化合物的结晶形式,及涉及化合物(尤其呈结晶形式的化合物)或其膦酸酯衍生物或盐用于制备4-((R)-2-{[6-((S)-3-甲氧基-吡咯啶-1-基)-2-苯基-嘧啶-4-羰基]-氨基}-3-膦酰基-丙酰基)-哌嗪-1-羧酸丁酯(也称为塞拉格雷)或其医药上可接受的盐的用途。

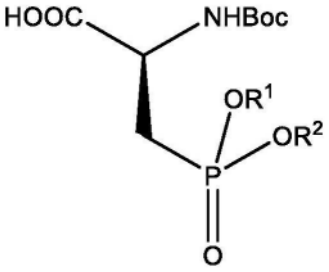


(I)

化合物

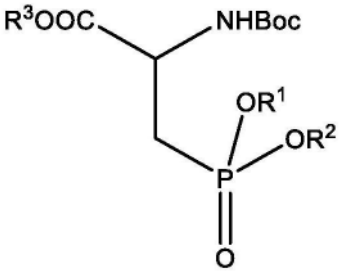
CN 118871446 A

1.一种制造式(I)化合物或其盐的方法,



式(I)

所述方法包括使式(II)化合物



式(II)

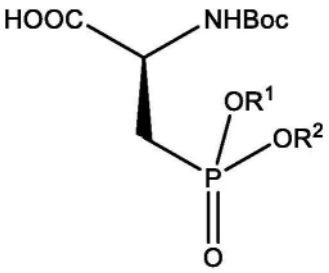
与水解酶反应以产生对映体过量(ee)至少70%的式(I)化合物的步骤,其中

R^1及R^2彼此独立地表示(C_{1-4})烷基;及

R^3表示甲基、乙基或正丙基。

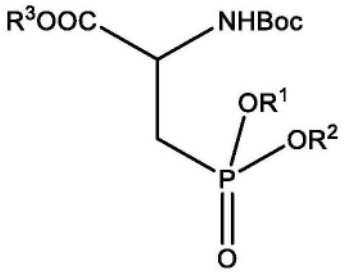
2.如权利要求1的方法,其中该水解酶选自AH002、AH008、AH012、AH016、AH017、AH018、AH019、AH022、AH023、AH025、AH027、AH028、AH032、AH034、AH035、AH036、AH037、AH041、AH042、AH044、AH045、AH047、AH048、AH051、AH052、AH055、AH056、AH057、AH059、AH060、AH061、AH062、CL055、CL067、蛋白酶M、EU62、DSM-A1、DSM-A2、DSM-A3、DSM-A6、DSM-B1、DSM-B2、DSM-B3、DSM-B6、DSM-C1、DSM-C2、DSM-C3、DSM-D2及DSM-D3。

3.一种制造式(I)化合物或其盐的方法,



式(I)

所述方法包括使式(II)化合物



式(II)

与水解酶反应的步骤，

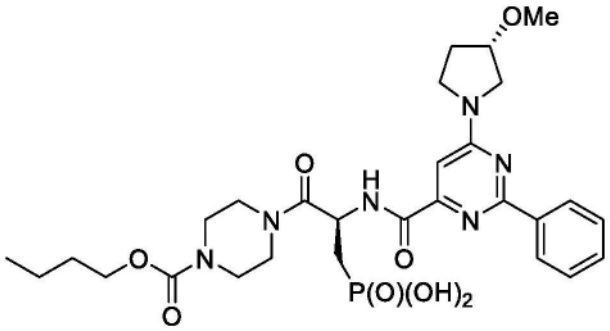
其中

R^1及R^2彼此独立地表示(C_{1-4})烷基；及

R^3表示甲基、乙基或正丙基；

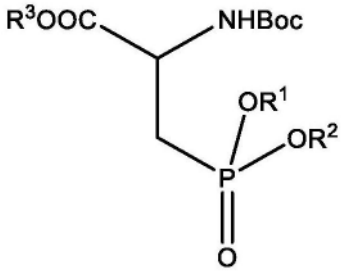
其中该水解酶选自AH002、AH008、AH012、AH016、AH017、AH018、AH019、AH022、AH023、AH025、AH027、AH028、AH032、AH034、AH035、AH036、AH037、AH041、AH042、AH044、AH045、AH047、AH048、AH051、AH052、AH055、AH056、AH057、AH059、AH060、AH061、AH062、CL055、CL067、蛋白酶M、EU62、DSM-A1、DSM-A2、DSM-A3、DSM-A6、DSM-B1、DSM-B2、DSM-B3、DSM-B6、DSM-C1、DSM-C2、DSM-C3、DSM-D2及DSM-D3。

4.一种制造塞拉格雷的方法，



塞拉格雷

其中该方法包括使式(II)化合物



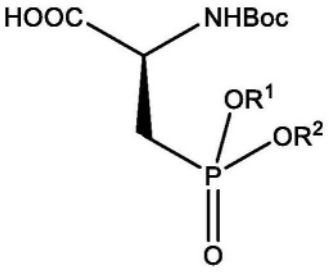
式(II)

其中

R^1及R^2彼此独立地表示(C_{1-4})烷基；及

R^3表示甲基、乙基或正丙基；

与水解酶反应以产生对映体过量(ee)至少70%的式(I)化合物或其盐的步骤



式(I)。

5.如权利要求1、3或4中任一项的方法,其中该水解酶选自AH018、AH022、AH023、AH027、AH034、AH044、AH047及蛋白酶M。

6.如权利要求1、3或4中任一项的方法,其中该水解酶系蛋白酶M。

7.如权利要求1至6中任一项的方法,其中该方法产生对映体过量(ee)至少96%的式(I)化合物。

8.如权利要求1至7中任一项的方法,其中R^1及R^2均表示乙基。

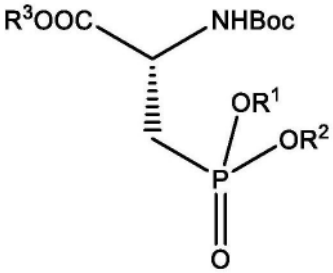
9.如权利要求1至8中任一项的方法,其中R^3表示甲基或乙基。

10.如权利要求1至9中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)在水与选自MTBE、DMSO、甲苯及其任何混合物的有机溶剂的混合物中进行。

11.如权利要求1至10中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)是在介于5.0与8.0之间的pH值下进行。

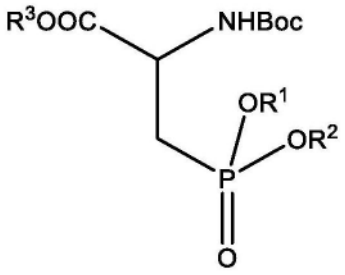
12.如权利要求1至11中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)是以介于0.2%与10%之间的酶载量进行。

13.如权利要求1至12中任一项的方法,其中该方法进一步包括使式(V)化合物



式(V)

与碱反应以产生式(II)化合物的步骤



式(II)

其中

R^1及R^2彼此独立地表示(C_{1-4})烷基;及

R^3表示甲基、乙基或正丙基;

且其中该式(V)化合物具有至少80%的对映体过量(ee)及该式(II)化合物具有小于10%的对映体过量(ee)。

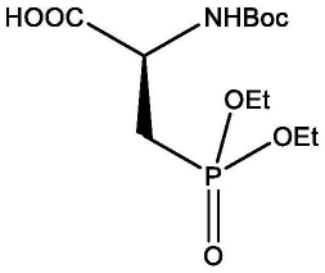
14.一种(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的结晶形式,其特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:9.8°、10.3°及17.5°。

15.如权利要求14的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的结晶形式,其特征为通过DSC量测的于约180℃的吸热峰。

(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸或其膦酸酯衍生物的合成方法

技术领域

[0001] 本发明涉及(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸(下文中也称为“化合物”)、其膦酸酯衍生物或前述任一者的盐的合成方法;涉及化合物的结晶形式,及涉及化合物(尤其呈结晶形式的化合物)或其膦酸酯衍生物或盐于制备4-((R)-2-{[6-((S)-3-甲氧基-吡咯啶-1-基)-2-苯基-嘧啶-4-羰基]-氨基}-3-膦酰基-丙酰基)-哌嗪-1-羧酸丁酯(也称为塞拉格雷(selatogrel))或其医药上可接受的盐的用途。



化合物

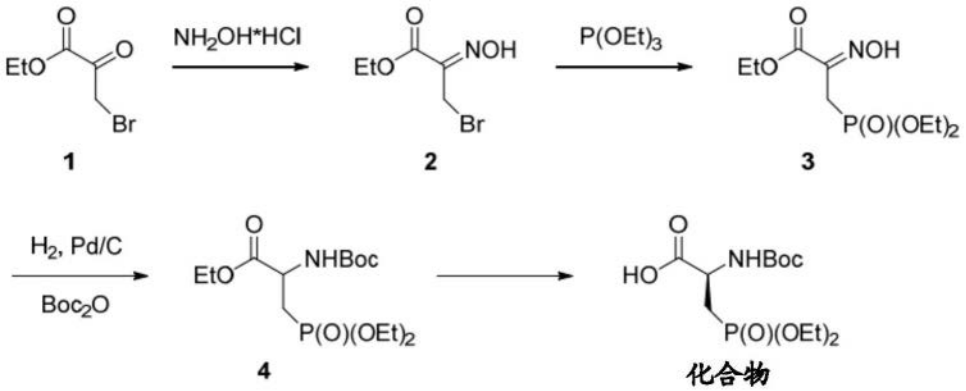
技术背景

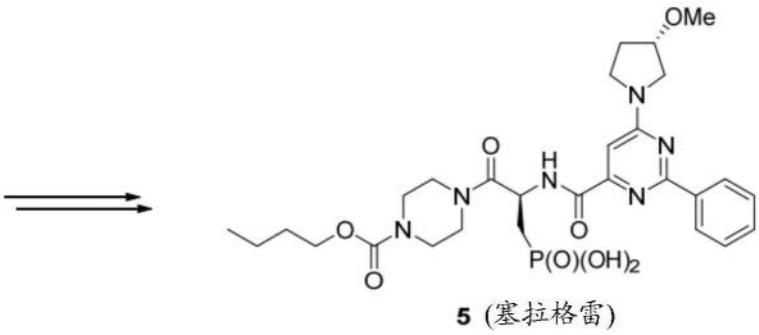
[0002] 自化合物制备塞拉格雷被描述于WO 2009/069100及Caroff E等人,J.Med.Chem.(2015),58,9133-9153中。塞拉格雷的医学用途例如被描述于WO 2018/167139;Baldoni D等人,Clin Drug Investig(2014),34(11),807-818;Storey R F等人,European Heart Journal,ehz807,doi:10.1093/eurheartj/ehz807;及Sinnaeve P R等人,J Am Coll Cardiol(2020),75(20),2588-97(doi.org/10.1016/j.jacc.2020.03.059)中。于多中心、双盲、随机、安慰剂对照、平行组研究中研究塞拉格雷以评估自我给药的皮下塞拉格雷于预防近期有急性心肌梗塞史的个体中全因死亡及治疗急性心肌梗塞的效用及安全性(ClinicalTrials.gov识别符:NCT04957719)。

[0003] 例如,可自市售(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-碘丙酸甲酯(Boc-3-碘-L-Ala-OMe)开始通过与亚磷酸三乙酯反应及后续于水及THF的混合物中用LiOH皂化制备化合物(WO 2009/069100及Caroff E等人,J.Med.Chem.(2015),58,9133-9153)。此方法的缺点是使用极昂贵的起始材料Boc-3-碘-L-Ala-OMe及其在艾伯左夫(Arbuzov)反应的条件下,尤其在大规模合成中趋于外消旋。可替代地,与其对映体呈外消旋混合物的化合物可根据方案1中显示的程序制备:化合物2可通过3-溴-2-氧代丙酸乙酯与盐酸羟胺反应制备。通过化合物2与亚磷酸三乙酯反应,可获得3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)-丙酸乙酯(化合物3),其可在作为催化剂的Pd/C的存在下通过氢化转化为化合物4并用Boc_2O保护氨基。化合物及其对映体的外消旋混合物可通过于水及甲苯的混合物中在约20℃的温度下用LiOH皂化获自化合物4(Stefan Abele,2015年8月17日于波士顿举行的第250届ACS全国会议上的演讲;Stefan Abele,2016年10月28日于巴塞尔举行的瑞士工业化学研讨会上的演讲)。

即使在化合物5(诸如,举例而言4-[2-叔丁氧基羰基胺基-3-(二乙氧基-磷酰基)-丙酰基]-哌嗪-1-羧酸丁酯)的合成中,于酯(化合物4)、最终酸(化合物的外消旋物)或后续中间物的阶段,通过手性管柱层析术或模拟移动床层析术分离对映体可为可能的,但对映体的此分离的缺点是有限的可缩放性及产出量且需大量溶剂。

[0004] 方案1:化合物的合成





发明内容

[0005] 令人惊讶地,发现化合物可通过用水解酶酶促拆分以极佳的产率及高对映体纯度大规模获得。

附图说明

[0006] 图1显示呈结晶形式(I)的化合物的X射线粉末衍射图,其中该X射线粉末衍射图用实验部分中描述的XRPD方法量测并相对于Cu Kα辐射显示。该X射线衍射图显示于指示的折射角2θ具有相较于该图中最强烈峰(most intense peak)的下列百分比的相对强度的峰(括号中给定相对峰强度)(报告从范围3至30°2θ的具有相对强度大于10%的选定峰):9.8°(100%)、10.3°(37%)、12.5°(12%)、13.3°(16%)、16.2°(23%)、17.5°(34%)、19.8°(14%)、20.7°(24%)、22.4°(25%)、22.7°(15%)、24.2°(23%)、24.7°(14%)、26.8°(12%)及27.3°(33%)。

[0007] 在图1的X射线衍射图中,折射角2θ(2θ)绘制于水平轴上及计数绘制于垂直轴上。

[0008] 为避免任何疑问,上文列举的峰描述图1中显示的X射线粉末衍射的实验结果。应了解,与上文峰列表相反,仅需要选择特征峰来完全且明确地表征呈本发明的各个结晶形式的化合物。

[0009] 图2显示在25℃下如获自实例4的呈结晶形式(I)的化合物的重力蒸汽吸附(GVS)图。

[0010] 在图2的重力蒸汽吸附图中,相对湿度(%RH)绘制于水平轴上及质量变化(%dm)绘制于垂直轴上。

[0011] 图3显示呈结晶形式(I)的化合物的差示扫描量热法(DSC)热谱图。在图3的DSC热谱图中,温度(℃)绘制于水平轴上及热流(mW)绘制于垂直轴上。

[0012] 图4显示呈结晶形式(A)的3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯的X射线粉末衍射图,其中该X射线粉末衍射图用实验部分中描述的XRPD方法量测并针对Cu Kα辐射显示。该X射线衍射图显示于指示的折射角2θ具有相较于该图中最强烈峰的下列百分比的相对强度的峰(括号中给定的相对峰强度)(报告自范围3°至40°2θ的具有相对强度大于8%的选定峰):10.2°(100%)、11.3°(99%)、13.2°(11%)、13.8°(9%)、15.2°(9%)、20.5°(13%)、22.7°(71%)、22.9°(33%)、25.3°(11%)、26.6°(18%)及34.3°(49%)。

[0013] 图5显示呈结晶形式(B)的3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯的X射线粉末衍射图,其中该X射线粉末衍射图用实验部分中描述的XRPD方法量测并针对Cu Kα辐射显示。该X射线衍射图显示于指示的折射角2θ具有相较于该图中最强烈峰的下列百分比的相对强度的峰(括号中给定的相对峰强度)(报告自范围3°至40°2θ的具有相对强度大于10%的选定峰):10.9°(31%)、18.2°(23%)、19.5°(100%)、19.8°(24%)、25.3°(10%)、27.2°(91%)、28.7°(11%)、29.5°(65%)、33.0°(24%)、34.7°(22%)及36.9°(30%)。

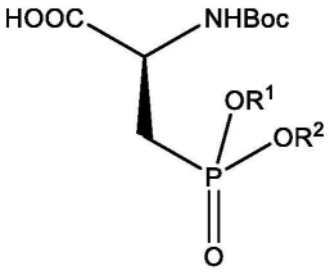
[0014] 分别在图4及图5的X射线衍射图中,折射角2θ(2θ)绘制于水平轴上及计数绘制于垂直轴上。

[0015] 为避免任何疑问,上文列举的峰描述图4及5中分别显示的X射线粉末衍射的实验结果。应了解,与上文峰列表相反,仅需要选择特征峰来完全且明确地表征呈本发明的各个结晶形式的3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯。

具体实施方式

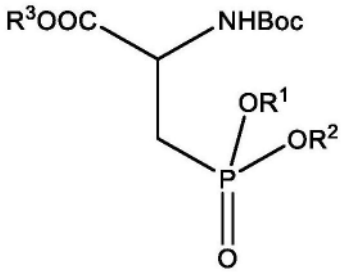
[0016] 在下文中,将描述本发明并呈现本发明的各种实施例。

[0017] 1)在第一实施例中,本发明涉及一种用于制造式(I)化合物或其盐的方法,



式(I)

所述方法包括使式(II)化合物



式(II)

与水解酶反应以产生对映体过量(ee)至少70％的式(I)化合物的步骤，

其中

R^1及R^2彼此独立地表示(C_{1-4})烷基(尤其乙基)；及

R^3表示甲基、乙基或正丙基(尤其乙基)。

[0018] 除非另有明确阐述定义提供更广泛或更狭隘的定义，否则本文提供的定义意欲一致地用于整个本说明书及权利要求范围中。应充分地了解术语的定义或优选定义限定且可替换独立于(及与其组合)如本文定义的任何或所有其他术语的任何定义或优选定义的各个术语。

[0019] 如“第一化合物的量相对于第二化合物的量是“X”当量”的语境中使用的术语“当量”意指给定混合物含有相对于第二化合物的量(以相同单位给定)为“X”倍的第一化合物的量(以与分子数相关的任何单位)。

[0020] 除非用于温度，否则于本申请中，置于数值“X”前的术语“约”是指自X减X的10％延伸至X加X的10％的区间，尤其是指自X减X的5％延伸至X加X的5％的区间且特别是指自X减X的2％延伸至X加X的2％的区间。在温度的特定情况下，在本申请中，置于温度“Y”前的术语“约”是指自温度Y减10℃延伸至Y加10℃的区间，尤其是指自Y减5℃延伸至Y加5℃的区间，且特别是指自Y减3℃延伸至Y加3℃的区间。室温意指约25℃的温度。

[0021] 每当使用字组“介于……之间”或“至”描述数值范围时，应了解该范围内明确包括指示范围的端点。例如：若将温度范围描述为介于40℃与80℃之间(或40℃至80℃)，则此意指该范围内包括端点40℃及80℃；或若将变量定义为介于1与4(或1至4)之间的整数，则此意指该变量是整数1、2、3或4。

[0022] 表述％w/w是指相较于考虑的组合物的总重量的重量百分比。同样，表述v/v是指相对于总体积的一种组分的体积比率(及％v/v是指各个百分比比率)。

[0023] 单独或组合使用的术语“烷基”是指含有一至四个碳原子的直链或分支链饱和烃链。术语“(C_{x-y})烷基”(x及y各为整数)是指如前文定义含有x至y个碳原子的烷基。例如(C_{1-4})烷基含有一至四个碳原子。(C_{1-4})烷基的实例是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基及叔丁基。在“R^1”表示“(C_{1-4})烷基”的情况下，术语“(C_{1-4})烷基”意指甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基及叔丁基，优选甲基、乙基及正丙基，及最优选乙基。在“R^2”表示“(C_{1-4})烷基”的情况下，术语“(C_{1-4})烷基”意指甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基及叔丁基，优选甲基、乙基及正丙基，及最优选乙基。

[0024] 任何提及与式(II)化合物反应以产生给定对映体过量的式(I)化合物的“水解酶”也意指该水解酶适用于在与式(II)化合物的反应中提供该给定对映体过量的式(I)化合

物。

[0025] 为避免疑问,式(I)化合物的对映体过量(ee)至少70%意指给定混合物或产物中该式(I)化合物与其对映体之间的比率是85:15或更高;因此,式(I)化合物的对映体过量(ee)至少96%意指给定混合物或产物中该式(I)化合物与其对映体之间的比率是98:2或更高。

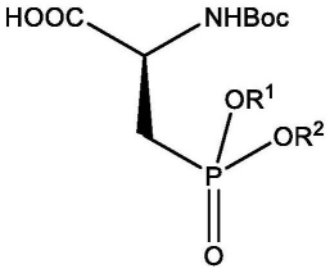
[0026] 应了解式(II)化合物是指以介于65:35与35:65之间的比率,特别以介于55:45与45:55之间的比率,且尤其以介于52:48与48:52之间的比率的各个(S)-对映体及各个(R)-对映体的任何混合物。最优选是含有该(S)-对映体及该(R)-对映体呈1:1比率的外消旋混合物。

[0027] 如"式(I)化合物或其盐"的语境中使用的术语"盐"是指其中羧酸官能的质子已经合适的阳离子置换以构建该式(I)化合物的盐的式(I)化合物。合适的阳离子尤其是重量低于110g/mol的阳离子及特别重量低于或等于30g/mol的金属阳离子。优选是式(I)化合物的碱金属及碱土金属盐;尤其该式(I)化合物的钠盐及钾盐且特别该式(I)化合物的钠盐。

[0028] 2)另一实施例涉及如实施例1)的方法,其中该水解酶选自AH002、AH008、AH012、AH016、AH017、AH018、AH019、AH022、AH023、AH025、AH027、AH028、AH032、AH034、AH035、AH036、AH037、AH041、AH042、AH044、AH045、AH047、AH048、AH051、AH052、AH055、AH056、AH057、AH059、AH060、AH061、AH062、CL055、CL067、蛋白酶M、EU62、DSM-A1、DSM-A2、DSM-A3、DSM-A6、DSM-B1、DSM-B2、DSM-B3、DSM-B6、DSM-C1、DSM-C2、DSM-C3、DSM-D2及DSM-D3。

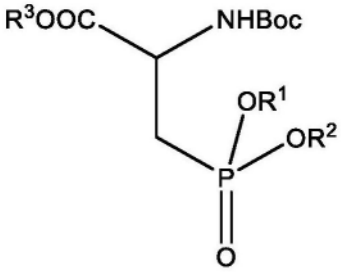
[0029] AH002、AH008、AH012、AH016、AH017、AH018、AH019、AH022、AH023、AH025、AH027、AH028、AH032、AH034、AH035、AH036、AH037、AH041、AH042、AH044、AH045、AH047、AH048、AH051、AH052、AH055、AH056、AH057、AH059、AH060、AH061、AH062、CL055及CL067是市售酶且可获自Almac;蛋白酶M为市售的且可获自Amano Enzyme(尤其Amano Enzyme Manufacturing,中国,江苏省,宿迁市);EU62为市售的且可获自Eucodis Bioscience;DSM-A1、DSM-A2、DSM-A3、DSM-A6、DSM-B1、DSM-B2、DSM-B3、DSM-B6、DSM-C1、DSM-C2、DSM-C3、DSM-D2及DSM-D3是市售酶且可获自DSM Innosyn/Innosyn。所有酶均亦可经由Almac获得。

[0030] 3)在另一实施例中,本发明涉及一种用于制造式(I)化合物或其盐的方法,



式(I)

该方法包括使式(II)化合物



式(II)

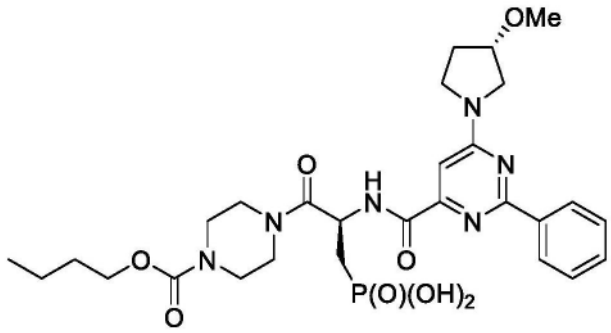
其中

R^1及R^2彼此独立地表示(C_{1-4})烷基(尤其乙基);及

R^3表示甲基、乙基或正丙基(尤其乙基);

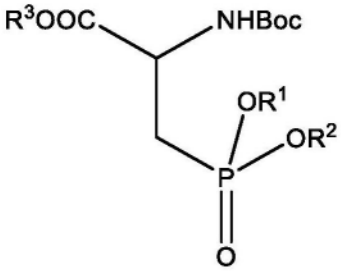
与水解酶反应的步骤,其中该水解酶选自AH002、AH008、AH012、AH016、AH017、AH018、AH019、AH022、AH023、AH025、AH027、AH028、AH032、AH034、AH035、AH036、AH037、AH041、AH042、AH044、AH045、AH047、AH048、AH051、AH052、AH055、AH056、AH057、AH059、AH060、AH061、AH062、CL055、CL067、蛋白酶M、EU62、DSM-A1、DSM-A2、DSM-A3、DSM-A6、DSM-B1、DSM-B2、DSM-B3、DSM-B6、DSM-C1、DSM-C2、DSM-C3、DSM-D2及DSM-D3。

[0031] 4)在另一实施例中,本发明涉及一种用于制造塞拉格雷的方法,



塞拉格雷

其中该方法包括使式(II)化合物



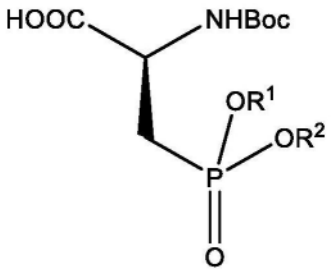
式(II)

其中

R^1及R^2彼此独立地表示(C_{1-4})烷基(尤其乙基);及

R^3表示甲基、乙基或正丙基(尤其乙基);

与水解酶反应以产生对映体过量(ee)至少70%的式(I)化合物或其盐的步骤,



式(I)。

[0032] 5)另一实施例涉及如实施例1)、3)或4)中任一项的方法,其中该水解酶选自AH012、AH016、AH017、AH018、AH022、AH023、AH025、AH027、AH028、AH032、AH034、AH035、AH036、AH041、AH042、AH044、AH047、AH048、AH051、AH052、AH055、AH059、AH061及蛋白酶M。

[0033] 6)另一实施例涉及如实施例1)、3)或4)中任一项的方法,其中该水解酶选自AH017、AH018、AH022、AH023、AH025、AH027、AH032、AH034、AH044、AH047、AH059、AH061及蛋白酶M。

[0034] 7)另一实施例涉及如实施例1)、3)或4)中任一项的方法,其中该水解酶选自AH018、AH022、AH023、AH027、AH034、AH044、AH047及蛋白酶M。

[0035] 8)另一实施例涉及如实施例1)、3)或4)中任一项的方法,其中该水解酶选自AH018、AH023、AH034及蛋白酶M。

[0036] 9)另一实施例涉及如实施例1)、3)或4)中任一项的方法,其中该水解酶系蛋白酶M。

[0037] 蛋白酶M(尤其蛋白酶M-SD)可自Amano Enzyme(尤其Amano Enzyme Manufacturing,中国,江苏省,宿迁市)购买获得,通过发酵获自米曲霉菌(Aspergillus oryzae),且具有高蛋白酶及肽酶活性。蛋白酶M-SD是指喷雾干燥的蛋白酶M。

[0038] 10)另一实施例涉及如实施例1)至9)中任一项的方法,其中该方法产生对映体过量(ee)至少85%的式(I)化合物。

[0039] 11)另一实施例涉及如实施例1)至9)中任一项的方法,其中该方法产生对映体过量(ee)至少96%的式(I)化合物。

[0040] 12)另一实施例涉及如实施例1)至9)中任一项的方法,其中该方法产生对映体过量(ee)至少99%的式(I)化合物。

[0041] 13)另一实施例涉及如实施例1)至12)中任一项的方法,其中R^1及R^2彼此独立地表示甲基、乙基或正丙基(尤其甲基或乙基)。

[0042] 14)另一实施例涉及如实施例1)至12)中任一项的方法,其中R^1及R^2表示选自甲基及乙基的相同烷基。

[0043] 15)另一实施例涉及如实施例1)至12)中任一项的方法,其中R^1及R^2均表示乙基。

[0044] 16)另一实施例涉及如实施例1)至15)中任一项的方法,其中R^3表示甲基或乙基。

[0045] 17)另一实施例涉及如实施例1)至15)中任一项的方法,其中R^3表示乙基。

[0046] 18)另一实施例涉及如实施例1)至17)中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)在水溶液中进行。

[0047] 该酶促拆分可于作为唯一溶剂的水中(尤其于纯化水中)或于水及合适的有机溶

剂(尤其MTBE、DMSO或甲苯)的溶剂混合物中进行。添加有机溶剂具有降低该溶液黏度的有利效应。

[0048] 19)另一实施例涉及如实施例1)至17)中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)在水及选自MTBE、DMSO、甲苯及其任何混合物的有机溶剂的混合物中进行。

[0049] 20)另一实施例涉及如实施例1)至17)中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)在水及选自MTBE、DMSO及甲苯的有机溶剂的混合物中进行。

[0050] 21)另一实施例涉及如实施例1)至17)中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)在水及MTBE的混合物中进行。

[0051] 22)另一实施例涉及如实施例18)至21)中任一项的方法,其中该有机溶剂的量介于0%至20%v/v之间。

[0052] 该有机溶剂的量的下限为0%v/v、3%v/v及5%v/v,上限为20%v/v、15%v/v及10%v/v。应了解各下限可与各上限组合。因此应于此明确揭示下限与上限的所有组合。优选是介于5%至15%v/v之间的有机溶剂的量。

[0053] 23)另一实施例涉及如实施例18)至22)中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)是在具有于水中在25℃下介于5.2与8.4之间的pKa值的缓冲液的存在下进行。

[0054] 该缓冲液的pKa值的下限为5.2、5.5及6.2,上限为8.4、7.9及7.4。应了解各下限可与各上限组合。因此在此应明确揭示下限与上限的所有组合。优选地,该缓冲液选自磷酸盐缓冲液及碳酸盐缓冲液。尤其优选是磷酸盐缓冲液。

[0055] 24)另一实施例涉及如实施例18)至23)中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)是在介于5.0与8.0之间的pH值下进行。

[0056] 该pH值的下限为5.0、6.0、6.5及6.7,上限为8.0、7.4、7.0及6.9。应了解各下限可与各上限组合。因此在此应明确揭示下限与上限的所有组合。优选地,该pH值介于6.5与7.0之间且尤其介于6.7与6.9之间。

[0057] 25)另一实施例涉及如实施例18)至24)中任一项的方法,其中该溶液的pH值是在该反应(酶促拆分)期间通过添加碱保持在加/减0.2(优选0.1)的范围内。

[0058] 该碱可循序或连续添加至反应混合物。优选地,该碱是以水溶液,尤其碳酸钾的水溶液的形式添加。该溶液的pH值优选保持在介于6.6与7.0之间(最优选介于6.7与6.9之间)的范围内。

[0059] 26)另一实施例涉及如实施例1)至25)中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)是在介于10℃与60℃之间的温度下进行。

[0060] 反应温度的下限为10℃、15℃、20℃及25℃,上限为60℃、40℃、33℃及30℃。应了解各下限可与各上限组合。因此在此应明确揭示下限与上限的所有组合。优选地,该反应温度介于20℃与33℃之间且尤其介于25℃与30℃之间。

[0061] 27)另一实施例涉及如实施例1)至26)中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)是以介于0.05%与100%之间的酶载量进行。

[0062] 术语“酶载量”是指酶的量与底物的使用量(也即式(II)化合物的使用量)的重量比。例如,1%的酶载量意指反应中每1g式(II)化合物使用10mg酶。该酶载量的下限为0.05%、0.2%、0.5%及0.8%,上限为100%、20%、10%及2%。应了解各下限可与各上限组合。因此在此应明确揭示下限与上限的所有组合。优选地,该酶载量介于0.2%与10%之间

且尤其介于0.5％与2.0％之间。

[0063] 28)另一实施例涉及如实施例1)至27)中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)是以介于每公升(L)水5.0g底物与每公升(L)水300g底物之间的底物负载于反应混合物中进行。

[0064] 术语“底物负载”是指反应混合物中每体积水(以公升计)所使用的底物的公克数,也即所使用的式(II)化合物的公克数。为避免疑问,仅考虑反应开始时的水体积,而不考虑在该反应过程中与碱一起添加以保持pH值恒定的水体积。该底物负载的下限为每L水5.0g底物、每L水20g底物及每L水100g底物,上限为每L水300g底物、每L水220g底物及每L水150g底物。应了解各下限可与各上限组合。因此在此应明确揭示下限与上限的所有组合。优选地,该底物负载介于每L水20g底物与每L水220g底物之间。

[0065] 29)另一实施例涉及如实施例1)至28)中任一项的方法,其中将二价金属阳离子的盐(尤其二价金属阳离子的氯化物盐)添加至该反应混合物。

[0066] 二价金属阳离子的优选盐是$ZnCl_2$、$FeCl_2$、$MnSO_4$、$CoCl_2$、$MgCl_2$、$CaCl_2$及$NiCl_2$(尤其$ZnCl_2$、$FeCl_2$及$MnSO_4$)。这些盐可按介于0.5mM与5.0mM之间(尤其介于1.0mM与3.0mM之间)的浓度使用。

[0067] 30)另一实施例涉及如实施例1)至29)中任一项的方法,其中该反应(酶促拆分)的反应时间介于5小时与36小时之间。

[0068] 术语“反应时间”是指将最后一种试剂添加至该反应混合物直至后处理程序(例如通过用有机溶剂萃取该反应混合物)开始之间的时间。该反应时间的下限为5小时、10小时及18小时,上限为36小时、28小时及24小时。应了解各下限可与各上限组合。因此在此应明确揭示下限与上限的所有组合。

[0069] 31)另一实施例涉及如实施例30)的方法,其中该反应(酶促拆分)的反应时间介于10小时与28小时之间。

[0070] 32)另一实施例涉及如实施例1)至31)中任一项的方法,其中该方法包括通过一种方法后处理该反应混合物,该方法包括以下步骤:添加碱的水溶液(尤其碳酸钾水溶液)以将pH值调整至介于7.4与9.0之间(尤其介于7.5与8.5之间且特别介于7.6与8.0之间);添加有机溶剂(尤其MTBE);分离有机层及水层;将酸(尤其盐酸)的水溶液添加至该水层以将该pH值调整至介于1.0与4.0之间(尤其介于1.2与2.0之间且特别介于1.4与1.6之间);及分离沉淀的式(I)化合物。

[0071] 33)另一实施例涉及如实施例1)至32)中任一项的方法,其中该方法包括该式(I)化合物自2-丙醇中再结晶的另一步骤。

[0072] (R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)-丙酸可自选自甲醇、乙醇、2-丙醇或其任何混合物的溶剂再结晶。再结晶溶液可含有高达20％w/w水。优选地,该再结晶溶液含有小于5％w/w水。由于水的存在导致较低的产率,因此该再结晶中的水含量优选是尽可能低。该再结晶具有降低蛋白质(酶)含量的优点。

[0073] 词组“选自甲醇、乙醇、2-丙醇或其任何混合物的溶剂”意指该溶剂是甲醇、乙醇、2-丙醇,或甲醇、乙醇及2-丙醇中的两种或三种的混合物。在该溶剂是混合物的情况下,该溶剂优选是甲醇、乙醇及2-丙醇中的两种的混合物。

[0074] 34)另一实施例涉及如实施例1)至33)中任一项的方法,其中该方法产生呈结晶形

式(I)的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)-丙酸。

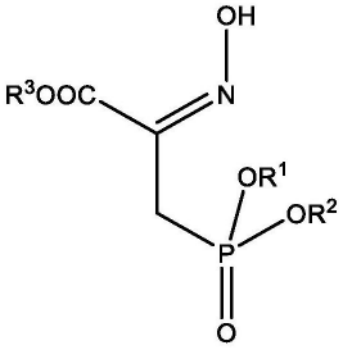
35)另一实施例涉及如实施例34)的方法,其中呈结晶形式(I)的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:9.8°、10.3°及17.5°。

[0075] 36)另一实施例涉及如实施例34)的方法,其中呈结晶形式(I)的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:9.8°、10.3°、16.2°、17.5°及27.3°。

[0076] 37)另一实施例涉及如实施例34)的方法,其中呈结晶形式(I)的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:9.8°、10.3°、12.5°、16.2°、17.5°、20.7°、22.4°、24.2°、24.7°及27.3°。

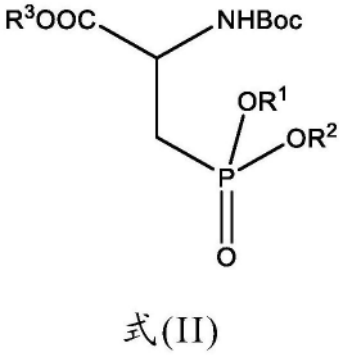
[0077] 38)另一实施例涉及如实施例34)至37)中任一项的方法,其中呈结晶形式(I)的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的特征为基本上显示如图2中绘示的重力吸湿曲线(吸附循环),其中该重力吸湿曲线是在25℃下量测。

[0078] 39)另一实施例涉及如实施例1)至38)中任一项的方法,其中该方法进一步使式(III)化合物



式(III)

与氢在炭载钯及Boc_2O的存在下反应以产生式(II)化合物的步骤



式(II)

其中

R^1及R^2彼此独立地表示(C_{1-4})烷基(尤其乙基);及

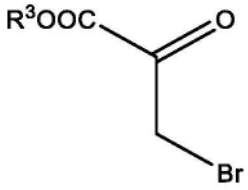
R^3表示甲基、乙基或正丙基(尤其乙基)。

[0079] 40)另一实施例涉及如实施例39)的方法,其中R^1、R^2及R^3表示乙基。

[0080] 41)另一实施例涉及如实施例39)或40)中任一项的方法,其中该方法在选自甲醇、乙醇及2-丙醇(尤其乙醇)的溶剂中进行。

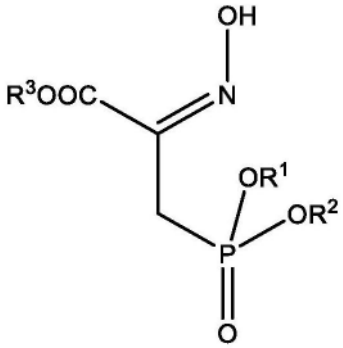
[0081] 42)另一实施例涉及如实施例39)至41)中任一项的方法,其中该氢化是在介于50℃与70℃之间(尤其介于55℃与65℃之间)的温度下进行。

[0082] 43)另一实施例涉及如实施例1)至42)中任一项的方法,其中该方法进一步包括使式(IV)化合物



式(IV)

循序与盐酸羟胺及亚磷酸三烷基酯(尤其亚磷酸三乙酯)反应以产生式(III)化合物的步骤



式(III)

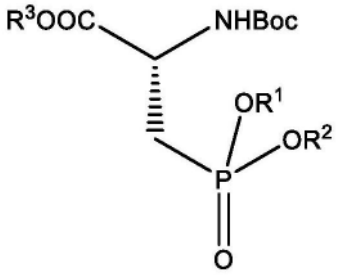
其中

R^1及R^2彼此独立地表示(C_{1-4})烷基(尤其乙基);及

R^3表示甲基、乙基或正丙基(尤其乙基)。

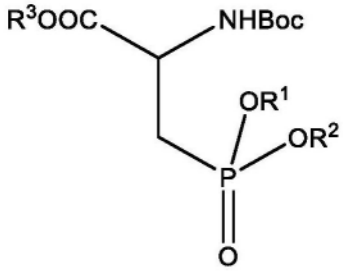
[0083] 44)另一实施例涉及如实施例43)的方法,其中R^1、R^2及R^3表示乙基。

[0084] 45)另一实施例涉及如实施例1)至44)中任一项的方法,其中该方法进一步包括使式(V)化合物



式(V)

与碱(尤其NaOEt)反应以产生式(II)化合物的步骤



式(II)

其中

R^1及R^2彼此独立地表示(C_{1-4})烷基(尤其乙基);及

R^3表示甲基、乙基或正丙基(尤其乙基);

且其中该式(V)化合物具有至少80%的对映体过量(ee)及该式(II)化合物具有小于10%(且尤其小于或等于2%)的对映体过量(ee)。

[0085] 本说明书及尤其实施例1)至31)中揭示的式(II)化合物的酶促拆分导致(在后处理粗反应混合物之前)式(I)化合物(尤其(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸及式(V)化合物(尤其(S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯)的混合物。该酸及酯的粗混合物可通过任何合适的方法(诸如萃取、一种组分的沉淀或层析术)分离。尤其,该酸及酯的粗混合物可通过分配于pH值高于7.4的水层(含有该酸)与有机层(含有该酯)之间分离。用于分配/萃取的优选有机溶剂是醚且尤其是MTBE。该酯(尤其(S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)-丙酸乙酯)可通过自萃取物移除该有机溶剂分离且可与碱一起用于循环步骤中以产生可再次用于该酶促拆分中的外消旋式(II)化合物(尤其2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯)。

[0086] 46)另一实施例涉及如实施例45)的方法,其中该式(V)化合物的对映体过量(ee)为至少90%(且尤其至少96%)。

[0087] 47)另一实施例涉及如实施例45)或46)中任一项的方法,其中该方法产生对映体过量(ee)小于4%(且尤其小于或等于2%)的式(II)化合物。

[0088] 48)另一实施例涉及如实施例45)至47)中任一项的方法,其中R^1及R^2彼此独立地表示甲基、乙基或正丙基(尤其甲基或乙基)。

[0089] 49)另一实施例涉及如实施例45)至47)中任一项的方法,其中R^1及R^2表示选自甲基及乙基的相同烷基。

[0090] 50)另一实施例涉及如实施例45)至47)中任一项的方法,其中R^1及R^2均表示乙基。

[0091] 51)另一实施例涉及如实施例45)至50)中任一项的方法,其中R^3表示甲基或乙基。

[0092] 52)另一实施例涉及如实施例45)至50)中任一项的方法,其中R^3表示乙基。

[0093] 53)另一实施例涉及如实施例45)至52)中任一项的方法,其中该反应(外消旋化)在选自乙醚、MTBE、THF或2-甲基-四氢呋喃的溶剂中进行。

[0094] 54)另一实施例涉及如实施例45)至52)中任一项的方法,其中该反应(外消旋化)在MTBE中进行。

[0095] 55)另一实施例涉及如实施例45)至54)中任一项的方法,其中该碱选自乙醇钠(NaOEt)及叔丁醇钾(KOtBu)(且尤其乙醇钠)。

[0096] 56)另一实施例涉及如实施例45)至54)中任一项的方法,其中该碱是乙醇钠(NaOEt)的乙醇溶液。

[0097] 57)另一实施例涉及如实施例55)至56)中任一项的方法,其中碱的量相对于该式(V)化合物量介于0.1当量与1.0当量之间(尤其介于0.4当量与0.8当量之间,且特别介于0.5当量与0.7当量之间)。

[0098] 58)另一实施例涉及如实施例45)至57)中任一项的方法,其中该反应(外消旋化)是在介于0℃与30℃之间(尤其介于0℃与10℃之间且特别介于0℃与5℃之间)的反应温度下进行。

[0099] 59)另一实施例涉及如实施例45)至58)中任一项的方法,其中该反应(外消旋化)的反应混合物中的水含量为≤0.5%v/v(尤其≤0.2%v/v,且特别≤0.1%v/v)。

[0100] 60)本发明的另一实施例涉及(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的结晶形式(结晶形式(I)),其特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:9.8°、10.3°及17.5°。

[0101] 应了解如实施例60)的结晶形式包含呈游离形式(非盐形式)的化合物。此外,该结晶形式可包含非配位和/或配位溶剂(尤其非配位和/或配位水)。配位溶剂(尤其配位水)在本文中用作结晶溶剂化物(尤其结晶水合物)的术语。为避免疑问,在本申请中,术语"结晶水合物"包含化学计量及非化学计量水合物(尤其化学计量水合物)。同样,非配位溶剂在本文中用作物理吸附或物理包埋的溶剂的术语(根据Polymorphism in the Pharmaceutical Industry(R.Hilfiker编,VCH,2006),第8章:U.J.Griesser:The Importance of Solvates的定义)。

[0102] 61)本发明的另一实施例涉及如实施例60)的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的结晶形式(结晶形式(I)),其特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:9.8°、10.3°、16.2°、17.5°及27.3°。

[0103] 62)本发明的另一实施例涉及如实施例60)的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的结晶形式(结晶形式(I)),其特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:9.8°、10.3°、12.5°、16.2°、17.5°、20.7°、22.4°、24.2°、24.7°及27.3°。

[0104] 63)本发明的另一实施例涉及如实施例60)至62)中任一项的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的结晶形式(结晶形式(I)),其基本上显示如图1中绘示的X射线粉末衍射图。

[0105] 64)本发明的另一实施例涉及如实施例60)至63)中任一项的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的结晶形式(结晶形式(I)),其特征为通过DSC量测的于约180℃(特别是于180℃±1℃,且尤其于180℃)的吸热峰。

[0106] 65)本发明的另一实施例涉及如实施例60)至64)中任一项的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的结晶形式(结晶形式(I)),其基本上显示如图2中绘示的重力吸湿曲线,其中该重力吸湿曲线是在25℃下量测。

[0107] 66)本发明的另一实施例涉及3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯的结晶形式(结晶形式(A)),其特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:10.2°、11.3°及22.7°。

[0108] 应了解如实施例66)的结晶形式包含呈游离形式(非盐形式)的3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯。此外,该结晶形式可包含非配位和/或配位溶剂(尤其非配位和/或配位水)。配位溶剂(尤其配位水)在本文中用作结晶溶剂化物(尤其结晶水合物)的术语。为避免疑问,在本申请中,术语"结晶水合物"包含化学计量及非化学计量水合物(尤其化学计量水合物)。同样,非配位溶剂在本文中用作物理吸附或物理包埋的溶剂的术语(根据Polymorphismin the Pharmaceutical Industry(R.Hilfiker编,VCH,2006),第8章:U.J.Griesser:The Importance of Solvates的定义)。

[0109] 67)本发明的另一实施例涉及如实施例66)的3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯的结晶形式(结晶形式(A)),其特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:10.2°、11.3°、13.2°、22.7°及22.9°。

[0110] 68)本发明的另一实施例涉及如实施例66)的3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯的结晶形式(结晶形式(A)),其特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:10.2°、11.3°、13.2°、13.8°、15.2°、20.5°、22.7°、22.9°、25.3°及26.6°。

[0111] 69)本发明的另一实施例涉及如实施例66)至68)中任一项的3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯的结晶形式(结晶形式(A)),其基本上显示如图4中绘示的X射线粉末衍射图。

[0112] 70)本发明的另一实施例涉及3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯的结晶形式(结晶形式(B)),其特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:10.9°、19.5°及27.2°。

[0113] 应了解如实施例70)的结晶形式包含呈游离形式(非盐形式)的3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯。此外,该结晶形式可包含非配位和/或配位溶剂(尤其非配位和/或配位水)。配位溶剂(尤其配位水)在本文中用作结晶溶剂化物(尤其结晶水合物)的术语。为避免疑问,在本申请中,术语"结晶水合物"包含化学计量及非化学计量水合物(尤其化学计量水合物)。同样,非配位溶剂在本文中用作物理吸附或物理包埋的溶剂的术语(根据Polymorphismin the Pharmaceutical Industry(R.Hilfiker编,VCH,2006),第8章:U.J.Griesser:The Importance of Solvates的定义)。

[0114] 71)本发明的另一实施例涉及如实施例70)的3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯的结晶形式(结晶形式(B)),其特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:10.9°、18.2°、19.5°、27.2°及29.5°。

[0115] 72)本发明的另一实施例涉及如实施例70)的3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯的结晶形式(结晶形式(B)),其特征为在X射线粉末衍射图中的波峰出现在下列折射角2θ:10.9°、18.2°、19.5°、19.8°、25.3°、27.2°、29.5°、33.0°、34.7°及36.9°。

[0116] 73)本发明的另一实施例涉及如实施例70)至72)中任一项的3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯的结晶形式(结晶形式(B)),其基本上显示如图5中绘示的X射线粉末衍射图。

[0117] 为避免任何疑问,每当上文实施例中的一项涉及"在X射线粉末衍射图中于下列折射角2θ的峰",该X射线粉末衍射图均是通过使用组合的Cu Kα1及Kα2辐射,无Kα2剥除获得;且应了解如本文提供的2θ值的精确度在+/-0.1至0.2°的范围内。特别地,当于本发明实施例及技术方案中针对峰指定折射角2θ(2θ)时,应了解给定的2θ值为自该值减0.2°至该值加

0.2°(2θ+/-0.2°)的区间;且优选自该值减0.1°至该值加0.1°(2θ+/-0.1°)的区间。

[0118] 当在例如X射线粉末衍射图中定义峰的存在时,一种常见方法是根据S/N比率(S=信号,N=噪声)来定义。根据此定义,当说明X射线粉末衍射图中必须存在峰时,应了解该X射线粉末衍射图中的峰是由大于x(x为大于1的数值),通常大于2,尤其大于3的S/N比率(S=信号,N=噪声)定义。

[0119] 在说明结晶形式基本上分别显示如图1、4或5中绘示的X射线粉末衍射图的语境中,术语"基本上"意指必须至少存在这些图式中绘示的图的主峰,也即具有相较于该图中最强烈峰的大于20%,尤其大于10%的相对强度的峰。然而,熟知X射线粉末衍射领域者将认知X射线粉末衍射图中的相对强度可由于优选定向效应而经受强强度变化。

[0120] 本文中使用的缩写及术语

缩写:

在整个本说明书及实例中使用下列缩写:

Ac 乙酰基

AcCN 乙腈

AcOH 乙酸

(L-)Ala(L-)丙胺酸

aq 水性

Boc 叔丁氧基羰基

DSC 差示扫描量热法

ee 对映体过量

eq. 当量

Et 乙基

EtOH 乙醇

GVS 重力蒸汽吸附

h 小时

HPLC 高效液相层析术

IPA 2-丙醇

JT 夹套温度

M 体积摩尔浓度/摩尔浓度

Me 甲基

min 分钟

MTBE 甲基叔丁基醚

NaOEt 乙醇钠

PDA 光二极管数组检测器

RBF 圆底烧瓶

rpm 每分钟转数

rt 滞留时间

RT 室温

THF 四氢呋喃

TFA 三氟乙酸

vol 1体积意指每1kg参考起始材料1L溶剂

%a/a 由面积比确定的百分比

[0121] 实验部分

X射线粉末衍射分析(XRPD)

[0122] 于配备以反射模式操作的Lynxeye检测器(耦合两个Θ/Θ)的Bruker D8 Advance X射线衍射仪上收集X射线粉末衍射图。通常,Cu X射线管是在40kV/40mA下运行。施加3至50°(2θ)的扫描范围内,0.02°(2θ)的步长及每步0.04sec的步长时间。将发散狭缝设定为固定样品照明(可变狭缝尺寸)及将防散射狭缝设定为0.3°。将粉末轻轻压入深度为0.5mm的单晶硅样品支架内并在量测期间于其等自身平面内旋转样品。使用Cu Kα ($\lambda = 1.5418$ Å)辐射报告衍射资料。如本文提供的2θ值的精确度在+/-0.1-0.2°的范围内,如其一般为常规记录的X射线粉末衍射图的情况。

[0123] 差示扫描量热法(DSC)

于配备34个位置自动采样器的Mettler Toledo STARe系统(DSC3模块,具有陶瓷传感器及STAR软件16.00b版的量测组件)上收集DSC数据。使用检定铟针对能量及温度校准该仪器。通常,在自动穿孔的铝锅中,以10℃min^{-1}加热1至5mg各样品,除非另有说明,否则自-20℃加热至250℃。于该样品上维持以20mL min^{-1}的氮吹扫。针对熔点报告峰温度。

[0124] 重力蒸汽吸附(GVS)分析

于在25℃下以步进模式操作的多样品仪器SPS-100n(ProUmid GmbH,Ulm,Germany)上进行量测。容许在40% RH下使样品平衡,然后开始预定义的湿度程序(40-0-95-40% RH,步长为5%ΔRH且应用每一步长24小时的最大平衡时间。使用约20至30mg各样品。吸湿性分类是根据欧洲药典技术指南(1999,第86页)进行,例如,不吸湿:质量增加小于0.2%质量/质量;微吸湿性:质量增加小于2%且等于或大于0.2%质量/质量;吸湿性:质量增加小于15%且等于或大于2%质量/质量。考虑首次吸附扫描中介于40%相对湿度与80%相对湿度之间的质量变化。

[0125] 高效液相层析术(HPLC):

HPLC(方法1):

HPLC系统: Agilent 1260系列系统

流量: 1.0mL/min

管柱温度: 30℃

自动采样器温度: 室温

注射体积: 5μL

管柱: Zorbax SB-Aq,150x 4.6mm,3.5μm

检测波长(UV): 210nm

溶剂A: 10mM K_2HPO_4水溶液(用85%磷酸调整至pH7.0)

溶剂B:AcCN

梯度:

时间(min)	%溶剂A	%溶剂B
0.0	90	10

20.0	30	70
20.1	90	10
25.0	90	10

HPLC(方法2)：

HPLC系统：Agilent 1260系列系统

流量：1.0mL/min

管柱温度：30℃

自动采样器温度：室温

注射体积：5μL

管柱：Zorbax SB-Aq,150x 4.6mm,3.5μm

检测波长(UV)：210nm

溶剂A：10mM K_2HPO_4水溶液(用85％磷酸调整至pH7.0)

溶剂B:AcCN

梯度：

时间(min)	％溶剂A	％溶剂B
0.0	90	10
20.0	30	70
25.0	30	70
25.1	90	10
33.0	90	10

HPLC(方法3)：

HPLC系统：Agilent 1260系列系统流量：1.0mL/min

管柱温度：40℃

自动采样器温度：室温注射体积：5μL

管柱：Atlantis T3,150x 4.6mm,3μm

检测波长(UV)：215nm

溶剂A：H_3PO_4的水溶液(1％v/v)

溶剂B：AcCN

梯度：

时间(min)	％溶剂A	％溶剂B
0.0	95	5
25.0	50	50
30.0	10	90
32.0	10	90
32.1	95	5
40.0	95	5

[0126] 手性HPLC：

手性HPLC(方法1)：

HPLC系统：Agilent 1260系列系统

流量：0.9mL/min
管柱温度：27℃
自动采样器温度：室温
注射体积：20μL
管柱：Chiralpak IC-3,250x 4.6mm,3μm
检测波长(UV)：215nm
运行时间 45min
流动相 0.05％TFA-AcCN/0.05％TFA-H_2O＝30/70
手性HPLC(方法2)：
流量：1mL/min
管柱温度：35℃
样品温度：35℃
注射体积：30μL
管柱：Chiralpak IC,250x 4.6mm,5μm
检测波长(UV)：220nm
运行时间 40min
流动相 20％ EtOH于庚烷中(+0.1％ TFA)
手性HPLC(方法3)：
流量：1mL/min
管柱温度：25℃
样品温度：25℃
注射体积：30μL
管柱：Chiralpak IC-3,250x 4.6mm,5μm
检测波长(PDA)：215nm
运行时间 32min
流动相 70 ： 30水(0.05％ TFA) ： CH_3CN (0.05％TFA)

[0127] 实例1：

3-溴-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯的合成：

[0128] 将盐酸羟胺(81.4kg)及水(460kg)装入反应器内,并添加3-溴-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯(69.0g)的晶种。在20至25℃下将该混合物搅拌0.5h并于1h内在20至25℃下添加3-溴-2-氧代丙酸乙酯(230kg,1.0当量)。将该反应混合物搅拌2至3h,添加甲苯(905kg)并在20至25℃下将该混合物搅拌4至5h。将层分离,将水(368kg)添加至有机层,在20至25℃下将该混合物搅拌0.5h,并将层分离。在45至50℃(夹套温度)下将该有机层浓缩至1.0至2.0体积并升温至45至50℃(内部温度)。添加3-溴-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯(138g)的晶种,在45至50℃下将该混合物搅拌0.5h,并在45至50℃下于2至4h内将正庚烷(840kg)添加至该混合物。于6至8 h内将该混合物冷却至0至5℃,在0至5℃下搅拌4至5 h,并离心。用正庚烷(88.4kg)清洗该固体并在30至35℃下在真空下干燥24 h以产生产物(136kg)。

[0129] 实例2：

3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯的合成：

[0130] 将亚磷酸三乙酯(129 kg,1.2当量)及正庚烷(223 kg)装入反应器中并将内部温度调整至70至75℃。在20至25℃下将3-溴-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯(136 kg,1.0当量)溶解于乙酸异丙酯(285 kg)中,并在70至75℃下于2至4 h内将该溶液缓慢添加至该反应。在70至75℃下将该反应混合物搅拌10至12 h并冷却至20至25℃。在20至25℃下将3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯(81.3 g)的晶种添加至该混合物,将该混合物搅拌1至2 h,并在20至25℃下于1至2 h内添加正庚烷(461 kg)。将该混合物冷却至0至5℃,搅拌2至3 h,并离心。用正庚烷(184 kg)清洗获得的固体并在真空中在20至25℃(JT)下干燥24 h以产生产物(150 kg)。取决于溶剂的精确量、结晶过程及接种期间的温度剖面,获得呈结晶形式(A)或结晶形式(B)的产物。

[0131] 表1:呈结晶形式(A)的3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)-丙酸乙酯的表征数据

技术	资料总结	备注
XRPD	结晶	参见图4及图5
纯度, HPLC (方法1)	99.6% rt = 8.3 min	

[0132] 实例3:

2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸乙酯的合成:

[0133] 将3-(二乙氧基磷酰基)-2-(羟基亚氨基)丙酸乙酯(105 kg,1.0当量)、EtOH(158 kg)及90%Boc_2O(116 kg,1.2当量)于THF中装入2000L高压釜中。在容器中制备20% Pd/C(2.62kg)及EtOH(131kg)的混合物并添加至该高压釜内。用EtOH(105kg)清洗该容器并将该EtOH添加至该高压釜。将该高压釜中的压力减小至50至100mbar,并用氮气增加至0.2MPa,及将该过程重复三次。将该高压釜中的压力减小至50至100mbar。然后用氢气将该高压釜中的压力增加至0.2MPa,减小至0.02MPa,及将该过程重复三次。以于0.5至1.0h内将该高压釜加压至0.4至0.5MPa使该混合物升温至55至65℃。将该高压釜加压至1.4至1.5MPa并在55至65℃下将该混合物搅拌1.0h。停止供应氢气,并将该混合物冷却至20至25℃。将该高压釜中的压力减小至0.02MPa。然后用氮气将该高压釜中的压力增加至0.2MPa,减小至0.02MPa,及将该过程重复三次。用氢气将该高压釜中的压力增加至0.2MPa,减小至0.02MPa,及将该过程重复三次。于0.5至1.0h内将该高压釜加压至0.4至0.5MPa,使该混合物升温至55至65℃。将该高压釜加压至1.4至1.5MPa并在55至65℃下将该混合物搅拌6.0h。停止供应氢气,并将该混合物冷却至20至25℃。将该高压釜中的压力减小至0.02MPa。然后用氮气将该高压釜中的压力增加至0.2MPa,减小至0.02MPa,及将该过程重复三次。用氢气将该高压釜中的压力增加至0.2MPa,减小至0.02MPa,及将该过程重复三次。于0.5至1.0h内将该高压釜加压至0.4至0.5MPa使该混合物升温至55至65℃。将该高压釜加压至1.4至1.5MPa并在55至65℃下将该混合物搅拌4.0h。停止供应氢气,并将该混合物冷却至20至25℃。将该高压釜中的压力减小至0.02MPa,用氮气增加至0.2MPa,及将该过程重复三次。释放该压力,并使该混合物滤过硅藻土。用EtOH(105kg)清洗滤饼并在45至55℃(夹套温度)下将该溶液浓缩至干燥。将MTBE(210kg)添加至残余物,及在45至55℃(夹套温度)下将该混合物浓缩至干燥并将该过程重复两次。将该残余物溶解于MTBE(68.3kg)中,并在20至30℃下将该溶液搅拌0.5h。该2-

((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸乙酯于MTBE中的溶液用于下一步骤。

[0134] HPLC(方法2):rt=13.6min

[0135] 实例4:

(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的合成:

[0136] 于3000L反应器中,在25至30℃下将KH_2PO_4(19.4kg)溶解于水(1403kg)中。在25至30℃下将K_2CO_3水溶液(20%)添加至该混合物以将pH值调整至6.7至6.9。在分开的容器中,在25至30℃下将2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯(281kg)溶解于MTBE(135kg)中并添加至该反应器。用MTBE(30.9kg)清洗该容器并将洗涤液添加至反应混合物。将蛋白酶M-SD(3.1kg,呈喷雾干燥形式的蛋白酶M,Amano)溶解于水(31.0kg)中并在25至30℃下添加至该混合物。在25至30℃下将该反应混合物搅拌24至36h并通过添加K_2CO_3水溶液(20%)使该pH值保持在6.7至6.9之间。然后将K_2CO_3水溶液(20%)添加至该混合物以将pH调整至7.6至8.0。在25至30℃下将MTBE(1044kg)及硅藻土(6.2kg)添加至该混合物并将该混合物搅拌0.5hr。将获得的悬浮液过滤,并用MTBE(64.5kg)及水(84.2kg)清洗滤饼。将层分离,并将有机层(含有剩余的酯)搁置一边。水层用MTBE(分别1044kg及519kg)萃取两次,冷却至10至20℃并通过滴加HCl水溶液(18.2%)将pH调整至1.4至1.6,使得呈酸性。于1至2h内将获得的悬浮液冷却至-2至+2℃,再搅拌0.5h并离心。将水(421kg)添加至获得的固体并在0至10℃下将该悬浮液搅拌0.5至1.0h。在离心后,用冷水(211kg)清洗湿固体并在70至75℃下溶解于2-丙醇(IPA)(842kg)中。将获得的悬浮液过滤,用热IPA(421kg)清洗该反应器并在40至50℃下将组合的滤液浓缩至约2体积。使该滤液升温至70至75℃,搅拌0.5h,于2至3h内冷却至-10至-15℃,并搅拌1h。将获得的悬浮液离心以获得白色固体,在真空中在35至40℃(JT)下将该固体干燥24h并在氮气氛下冷却至20至30℃以产生呈结晶形式(I)的产物(105kg)。

[0137] 表2:呈结晶形式(I)的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸的表征数据

技术	资料总结	备注
XRPD	结晶	参见图1
1H-NMR (400 MHz, d^6-DMSO)	δ = 12.7 (s, 1H), 7.07 (d, J = 8 Hz, 1H), 4.18 (m, 1H), 3.97 (m, 4H), 2.19 (dd, J1 = 16 Hz, J2 = 8 Hz, 2H), 1.38 (m, 9H), 1.22 (t, J = 8 Hz, 6H)	
纯度, HPLC (方法3)	99.5% rt = 17.9 min	
手性纯度, 手性 HPLC (方法1)	99.9% rt = 5.3 min ((S)-异构体: rt = 6.3 min)	
在25℃下的GVS	不吸湿	参见图2
DSC	熔点: T = 180 ± 2℃	参见图3

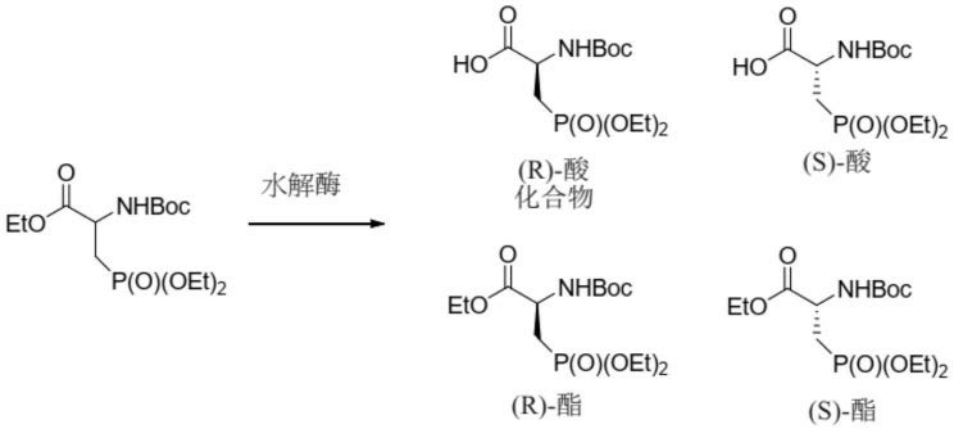
[0138] 实例5:

(S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯(来自实例4的副

产物)的外消旋化(“循环”):

[0139] 将(S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯(大约276 kg粗起始材料)于MTBE(起始材料及MTBE的总重量:570 kg)中的溶液装入反应器中并在40至50℃下在真空中浓缩至1.0至1.5体积。添加MTBE(1381 kg)并在40至50℃下在真空中浓缩至1.0至1.5体积。再次添加MTBE(1381 kg)并在40至50℃下在真空中浓缩至1.0至1.5体积。将MTBE(262 kg)添加至该混合物并在0至5℃下搅拌15 min。在0至5℃下于1至2 h内滴加NaOEt于EtOH(146 kg)中的20%溶液并在0至5℃下将该溶液再搅拌0.5至1 h。缓慢添加AcOH(30.4 kg),将该混合物搅拌0.5 h,在10至20℃下添加MTBE(829 kg)及饱和$NaHCO_3$水溶液(829 kg),并将该混合物搅拌0.5 h。将层分离,将有机层浓缩至干燥并将残余物溶解于MTBE(140 kg)中以获得2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯(201 kg粗产物)于MTBE中的溶液,其可用于根据实例4的酶促外消旋拆分中。

[0140] 实例6:酶筛选



根据下列程序筛选193种水解酶:

[0141] 将各个酶(10mg冻干酶粉末或30μL液体酶或10mg固定化酶)溶解于磷酸盐缓冲液(500μL,0.1M,pH 7.0)中并添加2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯(10mg)于MTBE(37.5μL)中的溶液。在25℃下以210rpm将该混合物振荡20h,用HCl水溶液(60μL,2M)调整至pH 1至2并用MTBE(3x 0.7mL)萃取。在真空中浓缩该溶液并将残余物溶解于EtOH(0.8mL)中,过滤并通过手性HPLC(方法2)分析;滞留时间:(R)-酸:rt=9.1min;(S)-酸:rt=23.8min;(R)-酯:rt=13.7min;(S)-酯:rt=29.8min。

[0142] 表3:酶筛选结果(针对导致酸的对映体过量(ee)至少80%的实验给定数据);给定量基于手性HPLC(方法2)的%a/a:

供货商	酶	编码	(R)-酸 [%a/a]	(R)-酯 [%a/a]	(S)-酸 [%a/a]	(S)-酯 [%a/a]
Almac	微生物水解酶	AH002	8.8	37.9	0.7	52.6
Almac	微生物水解酶	AH008	25.4	15.6	0.3	58.6
Almac	微生物水解酶	AH012	39.1	0.9	1.3	58.7
Almac	微生物	AH016	19.8	20.9	0.2	59.0

	水解酶					
Almac	微生物水解酶	AH017	39.0	0.1	3.6	57.3
Almac	微生物水解酶	AH018	35.7	2.2	0.5	61.6
Almac	微生物水解酶	AH019	39.0	0.1	1.1	59.7
Almac	微生物水解酶	AH022	38.2	0.3	0.8	60.7
Almac	微生物水解酶	AH023	45.0	1.4	1.7	51.9
Almac	微生物水解酶	AH025	38.0	0.6	0.9	60.4
Almac	微生物水解酶	AH027	37.5	1.5	0.9	60.2
Almac	微生物水解酶	AH028	34.2	0.7	0.2	65.0
Almac	微生物水解酶	AH032	36.4	0.1	0.4	63.1
Almac	微生物水解酶	AH034	43.9	0.5	0.4	55.2
Almac	微生物水解酶	AH035	33.1	8.8	0.5	57.6
Almac	微生物水解酶	AH036	34.6	9.1	0.5	55.8
Almac	微生物水解酶	AH037	8.9	39.3	0.3	51.5
Almac	微生物水解酶	AH041	42.4	0.7	1.7	55.2
Almac	微生物水解酶	AH042	21.2	20.4	0.5	57.9
Almac	微生物水解酶	AH044	41.6	0.1	1.2	57.1
Almac	微生物水解酶	AH045	26.8	12.1	1.2	59.9
Almac	微生物水解酶	AH047	40.3	0.5	1.3	58.0

Almac	微生物水解酶	AH048	28.5	16.8	0.5	54.2
Almac	微生物水解酶	AH051	34.7	9.6	0.8	54.8
Almac	微生物水解酶	AH052	17.1	26.7	0.2	55.9
Almac	微生物水解酶	AH055	37.2	0.7	0.9	61.3
Almac	微生物水解酶	AH056	20.5	21.3	1.2	57
Almac	微生物水解酶	AH057	44.6	0.1	3.2	52.1
Almac	微生物水解酶	AH059	38.8	0.0	0.8	60.4
Almac	微生物水解酶	AH060	9	38.3	0.3	52.3
Almac	微生物水解酶	AH061	39.1	0.1	0.9	60
Almac	微生物水解酶	AH062	42	0.9	2.5	54.5
Almac	微生物水解酶	CL055	41.1	1	1.2	56.7
Almac	微生物水解酶	CL067	40.8	0.5	0.7	58.1
Amano	来自米曲霉菌的蛋白酶	蛋白酶M	38.2	1.1	1.6	59.1
Eucodis	微生物水解酶	EU62	30.8	8.3	0.6	60.2
DSM Innosyn	猪肝酯酶变体	DSM-A1	41.1	0.1	4.6	54
DSM Innosyn	猪肝酯酶变体	DSM-A2	19.5	24.7	1.1	54.7
DSM Innosyn	猪肝酯酶变体	DSM-A3	35.5	4.8	0.6	59.1
DSM Innosyn	猪肝酯	DSM-A6	33.2	7.5	1.1	58.1

	酶变体					
DSM Innosyn	猪肝酯酶变体	DSM-B1	38.9	1.2	0.8	59
DSM Innosyn	猪肝酯酶变体	DSM-B2	39.1	0.7	0.9	59.3
DSM Innosyn	猪肝酯酶变体	DSM-B3	29.7	11.3	1.3	57.7
DSM Innosyn	猪肝酯酶变体	DSM-B6	9.8	37.7	1	51.5
DSM Innosyn	猪肝酯酶变体	DSM-C1	33.6	6.9	0.4	59.2
DSM Innosyn	猪肝酯酶变体	DSM-C2	28	11.7	1.17	59.1
DSM Innosyn	猪肝酯酶变体	DSM-C3	39.1	0.14	1.08	59.7
DSM Innosyn	猪肝酯酶变体	DSM-D2	9.7	35.7	0.4	54.2
DSM Innosyn	猪肝酯酶变体	DSM-D3	14.2	29.4	0.1	56.3

[0143] 实例7:酶负载的优化及共溶剂的用途

条件A:

[0144] 将各个酶(5mg冻干酶粉末)溶解于磷酸盐缓冲液(250μL,0.1M,pH 7.0)中并添加2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯(5mg)于MTBE(12.5μL)中的溶液。在30℃下以250rpm将该混合物振荡20h并根据后处理条件进一步处理。

[0145] 条件B:

用磷酸盐缓冲液(119μL,0.1M,pH 7.0)稀释各个酶(0.5mg)于磷酸盐缓冲液(119μL,0.1M,pH 7.0)中的储备溶液并添加2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯(5mg)于MTBE(12.5μL)中的溶液。在30℃下以250rpm将该混合物振荡20h并根据后处理条件进一步处理。

[0146] 条件C:

用2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯(5mg)于磷酸盐缓冲液(131μL,0.1M,pH 7.0)中的溶液处理各个酶(0.5mg)于磷酸盐缓冲液(119μL,0.1M,pH 7.0)中的储备溶液。在30℃下以250rpm将该混合物振荡20h并根据后处理条件进一步处理。

[0147] 条件D:

在30℃下以250rpm将2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯(25mg/mL溶剂)及各个酶(相对于酯每重量1%)于磷酸盐缓冲液(0.1M,pH 7.0)及MTBE(5%总体积)中的溶液振荡18h并根据后处理条件进一步处理。

[0148] 条件E:

在30℃下以250rpm将2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯(100mg/mL溶剂)及各个酶(相对于酯每重量1%)于磷酸盐缓冲液(0.1M,pH 7.0)及MTBE(5%总体积)中的溶液振荡18h并根据后处理条件进一步处理。

[0149] 后处理条件:

向各小瓶添加MTBE(1mL),接着添加HCl水溶液(20μL,2M)。在25℃下以200rpm将该混合物振荡30分钟,然后离心以获得不同层。移除一部分有机层(0.8mL)并通过$MgSO_4$移液管干燥至干净的埃彭多夫(Eppendorf)小瓶内。然后于Genevac旋转真空泵中移除该MTBE,溶解于EtOH(200μL)中并通过手性HPLC(方法2)分析;滞留时间:(R)-酸:rt=9.1min;(S)-酸:rt=23.8min;(R)-酯:rt=13.7min;(S)-酯:rt=29.8min。

[0150] 表4:在条件A(100%酶,5% MTBE)下的实验的酶筛选结果;给定量基于手性HPLC(方法2)的%a/a;表3中含有给定编码的供货商及酶详情:

编码	(R)-酸 [%a/a]	(R)-酯 [%a/a]	(S)-酸 [%a/a]	(S)-酯 [%a/a]
AH012	30.2	10.7	0.4	58.7
AH016	32.7	9.3	0.4	57.6
AH017	37.2	4.0	1.2	57.6
AH018	42.0	0.1	3.2	54.7
AH022	41.1	0.0	3.4	55.5
AH023	42.8	0.2	4.0	53.0
AH025	40.4	0.3	3.5	55.8
AH027	39.8	0.1	0.3	59.5
AH028	30.8	10.8	0.3	58.2
AH032	39.1	0.5	0.3	60.1
AH034	40.1	0.2	1.6	58.0
AH035	22.1	21.9	0.2	55.8
AH036	1.3	48.0	0.2	50.4
AH041	43.6	0.1	9.4	46.9
AH042	22.8	17.0	0.2	60.0
AH044	39.7	0.0	0.3	60.0
AH047	38.9	0.4	0.8	60.0
AH048	26.5	18.8	0.2	54.5
AH051	40.9	2.5	12.0	44.6
AH052	10.0	36.8	0.2	53.0
AH055	43.4	0.1	20.5	36.0
AH059	40.0	0.0	1.3	58.6
AH061	34.6	0.2	0.7	64.5
蛋白酶M	39.1	0.9	3.2	56.8

(R)-酸、(S)-酸、(R)-酯及(S)-酯:参见实例6

[0151] 表5:在条件B(10%酶,5% MTBE)下的实验的酶筛选结果;给定量基于手性HPLC(方法2)的%a/a;表3中含有给定编码的供货商及酶详情:

编码	(R)-酸 [%a/a]	(R)-酯 [%a/a]	(S)-酸 [%a/a]	(S)-酯 [%a/a]
AH012	1.9	47.1	0.2	50.8
AH016	5.6	42.4	0.3	51.8
AH017	12.6	32.5	0.4	54.6
AH018	36.8	0.6	0.7	61.9
AH022	36.4	0.2	0.9	62.5
AH023	31.8	3.3	0.2	64.7
AH025	29.9	10.6	1.0	58.5
AH027	34.2	3.3	0.3	62.1
AH028	8.9	37.9	0.5	52.8
AH032	2.4	45.2	0.4	52.0
AH034	35.7	1.0	0.3	62.9
AH035	4.3	43.0	0.3	52.4
AH036	1.3	46.5	0.5	51.7
AH041	37.8	0.0	2.1	60.1
AH042	3.9	40.0	1.7	54.4
AH044	35.8	1.6	0.3	62.3
AH047	35.9	1.2	0.5	62.4
AH048	1.8	47.6	0.2	50.3
AH051	39.3	0.2	4.5	55.9
AH052	0.2	49.6	0.3	49.8
AH055	35.8	1.3	0.3	62.6
AH059	38.2	0.0	6.7	55.1
AH061	34.8	0.7	0.3	64.3
蛋白酶M	37.0	0.1	0.4	62.6

(R)-酸、(S)-酸、(R)-酯及(S)-酯:参见实例6

[0152] 表6:在条件C(10%酶,无MTBE)下的实验的酶筛选结果;给定量基于手性HPLC(方法2)的%a/a;表3中含有给定编码的供货商及酶详情:

编码	(R)-酸 [%a/a]	(R)-酯 [%a/a]	(S)-酸 [%a/a]	(S)-酯 [%a/a]
AH012	2.0	43.9	1.1	53.1
AH016	6.3	41.2	0.4	52.1
AH017	12.0	34.6	0.3	53.1
AH018	37.4	0.0	0.7	61.9
AH022	37.1	0.1	0.6	62.2
AH023	36.6	0.1	0.6	62.8
AH025	30.0	5.6	0.8	63.6
AH027	32.4	4.4	0.2	63.1
AH028	6.8	40.5	0.4	52.4
AH032	4.5	44.0	0.8	50.7
AH034	36.0	0.1	0.4	63.6
AH035	4.9	45.4	0.2	49.8
AH036	1.8	46.6	0.3	51.0
AH041	36.3	0.1	2.4	61.2
AH042	4.4	44.2	0.4	51.0
AH044	36.8	0.0	0.3	62.8
AH047	37.0	0.0	0.5	62.4
AH048	1.4	46.8	0.4	51.5
AH051	39.6	0.0	7.0	53.4
AH052	4.6	42.4	2.0	51.0
AH055	38.6	0.1	10.2	51.1
AH059	37.2	0.8	0.5	62.0
AH061	35.2	3.1	0.5	61.2
蛋白酶M	36.7	0.0	0.7	62.6

(R)-酸、(S)-酸、(R)-酯及(S)-酯:参见实例6

[0153] 表7:在条件D(25mg/mL底物,1%酶,5% MTBE)下的实验的酶筛选结果;给定量基于手性HPLC(方法2)的%a/a;表3中含有给定编码的供货商及酶详情:

编码	(R)-酸 [%a/a]	(R)-酯 [%a/a]	(S)-酸 [%a/a]	(S)-酯 [%a/a]
AH018	34.9	0.7	0.3	64.1
AH022	34.4	2.1	0.29	63.2
AH023	36.4	0.2	0.19	63.2
AH027	6.0	40.0	0.26	53.7
AH034	33.7	1.9	0.26	64.2
AH044	24.9	15.4	0.2	59.5
AH047	14.4	30.5	0.26	54.8
蛋白酶M	35.5	0.4	0.24	63.9

(R)-酸、(S)-酸、(R)-酯及(S)-酯:参见实例6

[0154] 表8:在条件E(100mg/mL底物,1%酶,5% MTBE)下的实验的酶筛选结果;给定量基于手性HPLC(方法2)的%a/a;表3中含有给定编码的供货商及酶详情:

编码	(R)-酸 [%a/a]	(R)-酯 [%a/a]	(S)-酸 [%a/a]	(S)-酯 [%a/a]
AH018	9.4	36.7	0.06	53.7
AH022	9.6	36.7	0.1	53.6
AH023	17.4	26.2	0.01	56.3
AH027	2.4	45.3	0.1	52.2
AH034	12.9	32.2	0.1	54.8
AH044	5.1	42.2	0.1	52.5
AH047	3.0	44.5	0.1	52.3
蛋白酶M	19.2	24.3	0.06	56.4

(R)-酸、(S)-酸、(R)-酯及(S)-酯:参见实例6

[0155] 实例8:(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的合成(1g规模):

向50mL 3颈RBF添加于MTBE(0.5mL+0.1mL MTBE作为管路清洗)中的2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基-磷酰基)丙酸乙酯(1g,2.83mmol)。向此溶液添加磷酸盐缓冲液(0.1M,pH 7.0,9mL)并在搅拌下将双相混合物加热至30℃。向此双相溶液添加来自Amano的蛋白酶M(10mg于0.5mL磷酸盐缓冲液中)并将该溶液搅拌18小时。以添加20% K_2CO_3(水性)将反应pH维持在pH 6.8至7.0之间。将该反应调整至pH 8.0并用MTBE(2x 10mL)萃取。将水性部分重新装入反应容器中并用2M HCl调整至pH 1.5,此时发生快速沉淀。于冰-水浴中将悬浮液冷却至0℃并在此温度下搅拌30分钟。将该悬浮液过滤,用0.1M磷酸盐缓冲液(pH 1.5,2mL)及0.1M HCl(4mL)循序清洗,并于1小时内干燥。以99%ee(手性HPLC(方法3)获得呈白色固体(420mg,45.6%)的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸;滞留时间:(R)-酸:rt=5.7;(S)-酸:rt=6.6min;(R)-酯:rt=25.3min;(S)-酯:rt=28.1min。

[0156] 实例9:(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸的合成:

将水(3.6L;6.6体积)添加至10L反应器并剧烈搅动。添加磷酸二氢钾(49.0g;360mmol)并用20%(w/v)碳酸钾水溶液将反应器内容物的pH调整至pH 6.8(±0.2)。在1L玻璃瓶中将2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸乙酯(1.55mmol)溶解于MTBE(360mL)中并添加至该反应器。用MTBE(90mL)清洗该玻璃瓶并将该溶液添加至该反应器。在100mL瓶中将来自Amano的蛋白酶M(6.0g)溶解于纯化水(55mL)中并一次性添加至该反应器。用纯化水(27.5mL)清洗该瓶并将该溶液添加至反应器。在28±2℃下将该反应混合物搅拌8小时并通过添加20%(w/v)碳酸钾水溶液维持在pH 6.8。关闭外部加热并将该混合物再搅拌15小时。用20%(w/v)碳酸钾水溶液将该pH调整至7.8±0.2。将硅藻土(12.0g)及MTBE(4.1L)装入该反应器中并在10min后使该反应器内容物滤过布氏漏斗。将双相混合物重新装入该反应器中并容许分离层最少5min。将有机层(含有剩余的酯)储存于25L HDPE桶中并

将水层重新装入反应器中。添加MTBE(4.1L),将该混合物搅动5min,分离这些层并排出该水层。将该有机层与先前有机层组合。将该水层重新装入反应器中,添加MTBE(2.05L),将该混合物搅动5min,分离这些层并排出该水层。将该有机层与先前有机层组合。将该水层重新装入该反应器中并经由滴加18.5% HCl水溶液调整至pH 1.5。将反应器内容物冷却至3℃±2℃,轻轻搅拌30min并滤过布氏漏斗。用冰冷HCl水溶液(0.1M,820mL)清洗滤饼并于漏斗上干燥1小时。于真空中在50℃下将该滤饼进一步干燥至恒定重量以得到46%产率,98%纯度(NMR)及99.9%ee(手性HPLC(方法3))的(R)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-(二乙氧基磷酰基)丙酸。

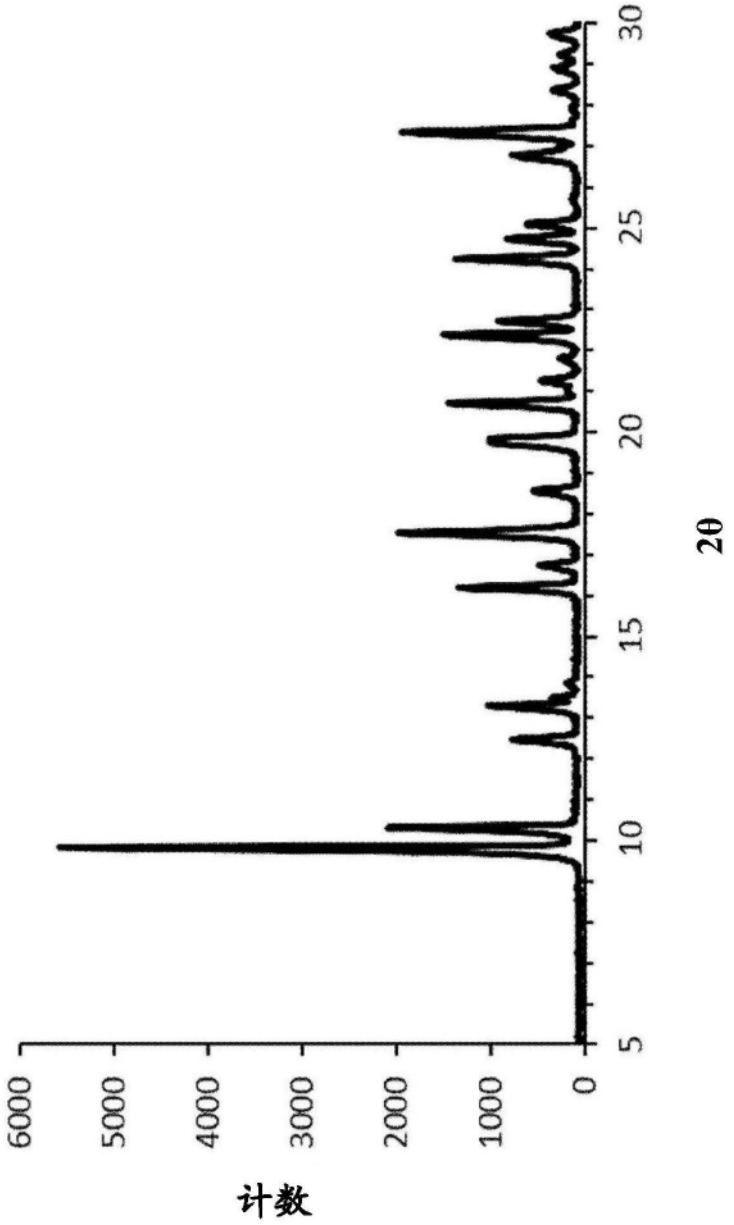


图1

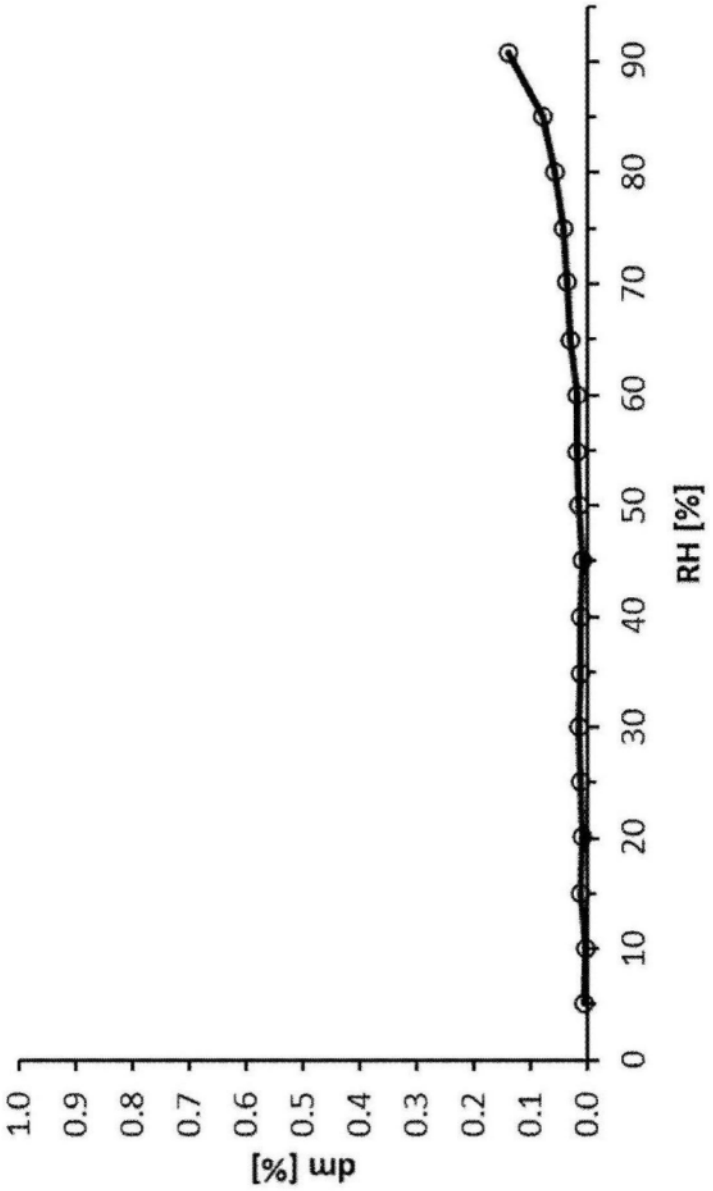


图2

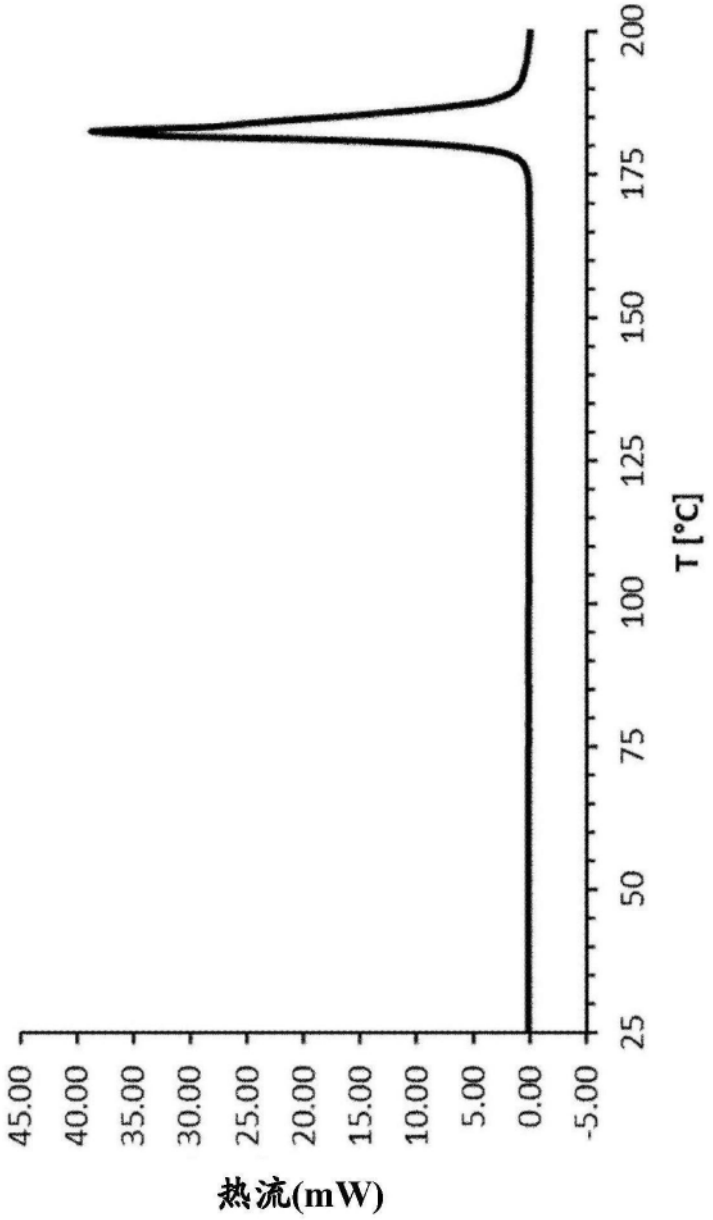

45.00
40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
-5.00
热流(mW)
25
50
75
100
125
150
175
200
T [°C]

图3

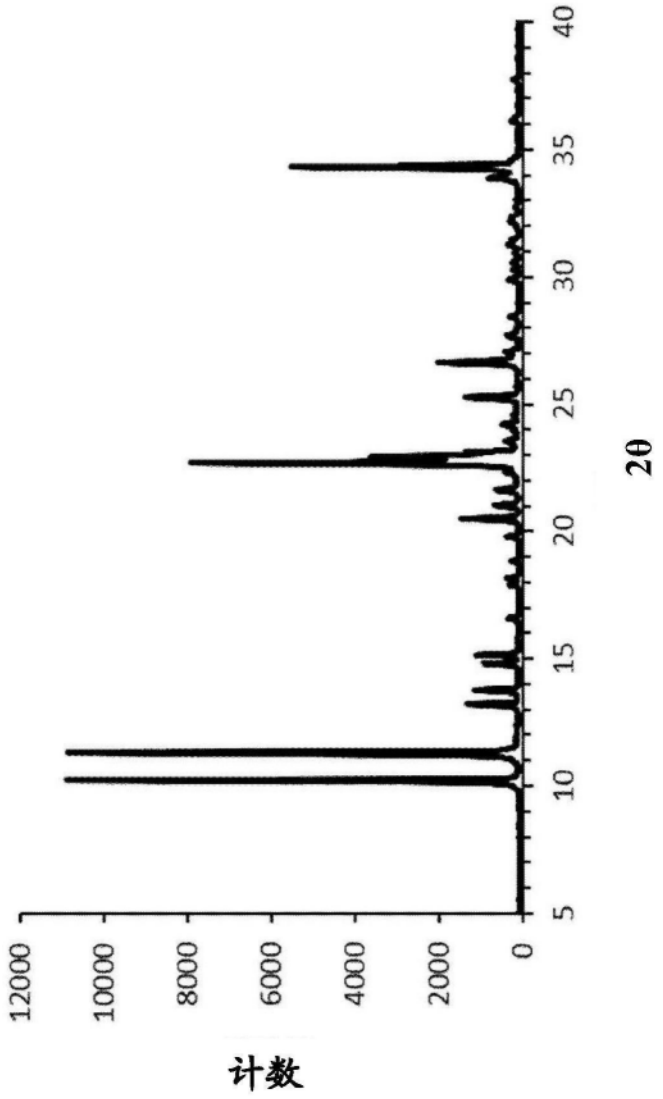


图4

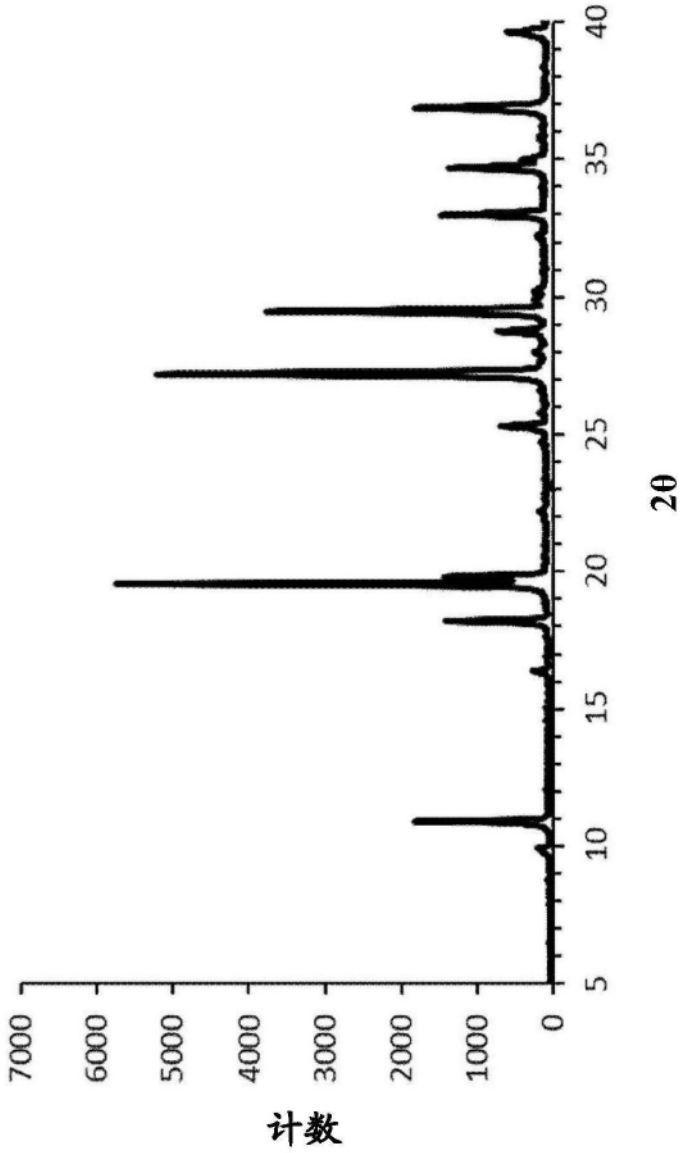


图5