

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D211/90

C07D401/14

/(C07D401/14, 20

9:00, 211:00)

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95194785.0

[45] 授权公告日 2002 年 8 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1089337C

[22] 申请日 1995.8.11

[21] 申请号 95194785.0

[30] 优先权

[32] 1994.8.29 [33] JP [31] 227,227/94

[86] 国际申请 PCT/JP95/01606 1995.8.11

[87] 国际公布 WO96/06829 日 1996.3.7

[85] 进入国家阶段日期 1997.2.26

[73] 专利权人 美而香株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 一色邦夫 松本直树 中岛崇

土桥和之 鹤田拓朗 吉冈武男

[56] 参考文献

JP61-257983A 1986.11.15 _

WO9405637A 1994.3.17 _

审查员 李 越

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

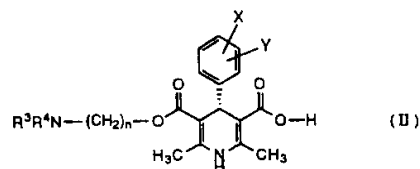
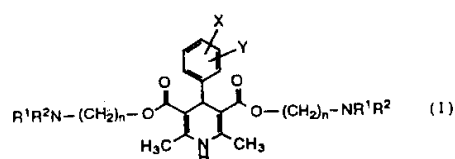
代理人 吴惠中

权利要求书 2 页 说明书 34 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 1,4-二氢吡啶衍生物

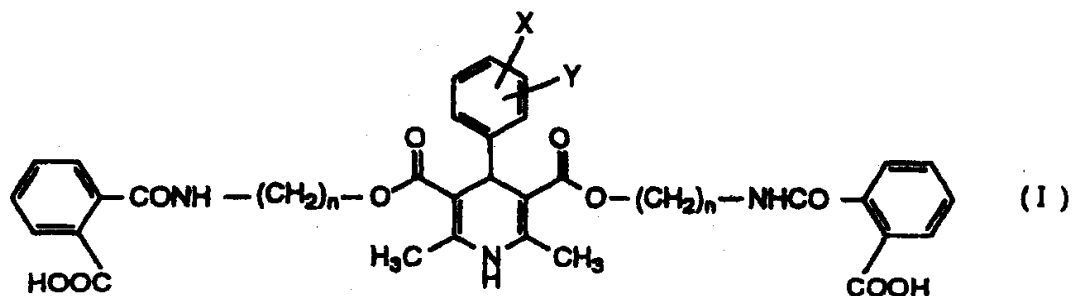
[57] 摘要

提供通式(I)表示的 1,4-二氢吡啶衍生物和其盐以及由上述衍生物通过微生物或酶的生化反应而得到的可用作缺血性心脏病和高血压等的预防和治疗药物的光学活性的 1,4-二氢吡啶衍生物的制造中间体即通式(II)表示的 1,4-二氢吡啶衍生物及其盐。(式中, X 和 Y 表示 H、NO₂、CN、卤素; R¹ 和 R² 表示 H、CHO、取代的烷基羰基、巴豆酰基、肉桂酰基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、苄氧基羰基、羧基苯甲酰基或 R¹ 和 R² 合在一起表示邻苯二甲酰基; n 表示 1-3。)



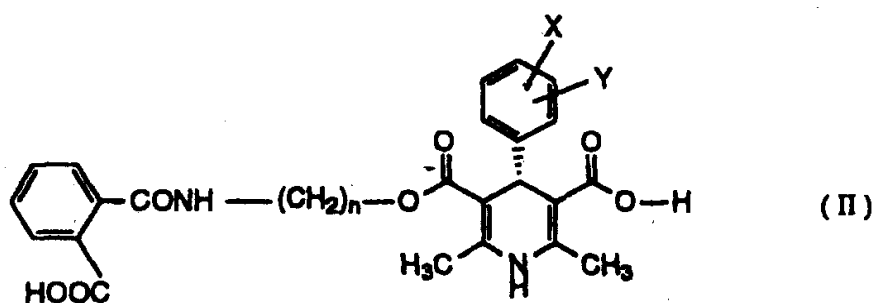
权 利 要 求 书

1. 1,4-二氢吡啶衍生物或其盐, 其特征在于, 由通式 (I) 表示,



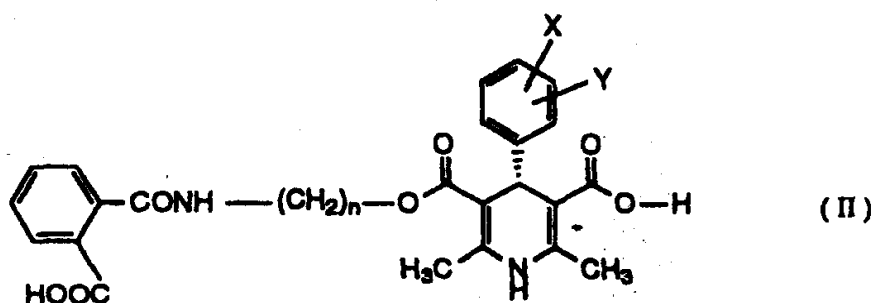
5 式中, X 和 Y 各自独立地表示氢原子、硝基、腈基或卤原子, n 表示 1-3 的整数。

2. 1,4-二氢吡啶衍生物, 其特征在于, 由通式 (II) 表示,



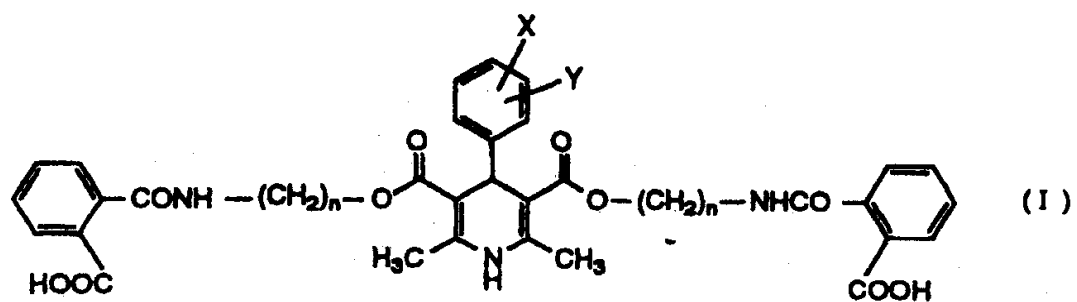
10 式中, X、Y 和 n 的定义与权利要求 1 的相同。

3. 通式 (II) 表示的光学活性的 1,4-二氢吡啶衍生物或其盐的制造方法,



式中, X、Y 和 n 的定义与权利要求 1 的相同;

15 其特征在于, 对通式 (I) 表示的 1,4-二氢吡啶衍生物或其盐, 进行使用微生物或酶的不对称水解反应,



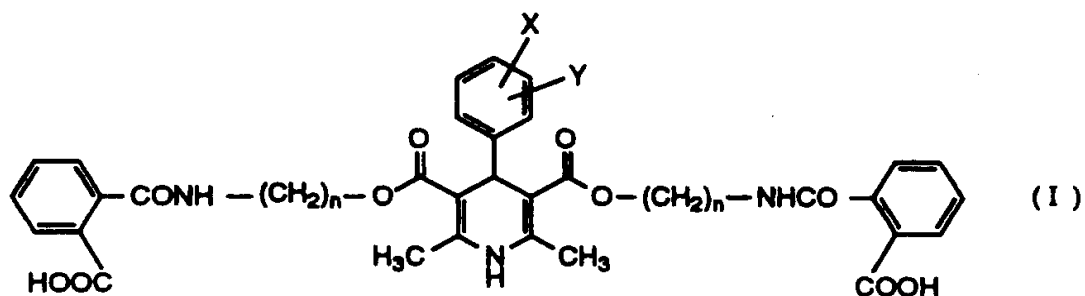
式中，X、Y 和 n 的定义与权利要求 1 的相同。

说明书

1, 4 - 二氢吡啶衍生物

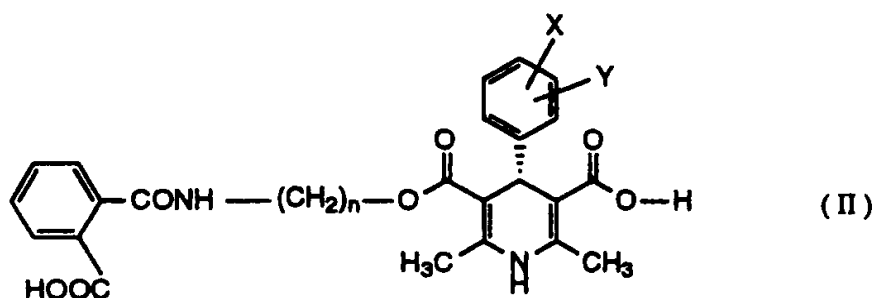
5 技术领域

本发明涉及可用作缺血性心脏病和高血压等的预防和治疗药物的光学活性的 1, 4 - 二氢吡啶衍生物的制造中间体。更具体地说, 涉及下面的通式 (I) 表示的新颖的 1, 4 - 二氢吡啶衍生物及其盐 (所述 1, 4 - 二氢吡啶衍生物及其盐是在通过使用微生物或酶的生化反应来制备 1, 4 - 二氢吡啶衍生物时有用的底物或该底物的中间体)



(式中符号的定义与后述的相同)

以及通过生化反应由上述通式 (I) 表示的底物得到的通式 (II) 表示的新颖的光学活性的 1, 4 - 二氢衍生物及其盐。



(式中符号的定义与后述的相同)

20 背景技术

结合在 1, 4 - 二氢吡啶类化合物的二氢吡啶环的 3 位和 5 位上的 2 个羧酸酯互相不同的化合物在其 4 位上具有手性碳原子, 存在 2 种光学异构体。最近, K.Tamazawa 等在对这些化合物的生物学性质进行研究后报道, 各光学活性体之间存在药理活性、体内动态、安全性等差异 [*J. Med. Chem.*, Vol.29, 2504 (1986)]。

使用这种具有手性碳原子的化合物作为医药品时，从不给人体增加额外负担的角度出发，目前，一般趋于仅使用作为宜作为医药品的一方的异构体。从这个观点出发，人们对光学活性的 1, 4 - 二氢吡啶衍生物的制造方法展开了研究。

5 作为合成光学活性的 1, 4 - 二氢吡啶衍生物的一般方法，已知有以 (4R) - 1, 4 - 二氢吡啶二羧酸单酯作为中间体，在该中间体上导入酯基的方法 [A. Ashimori et al., *Chem. Pharm. Bull.*, Vol. 39, 108 (1991)]。

10 作为该 (4R) - 1, 4 - 二氢吡啶 - 3, 5 - 二羧酸单酯的制造方法，已知有柴沼等的化学的方法 [*Chem. Pharm. Bull.*, Vol. 28, 2809 (1980)]、阿知波等 [*Tetrahedron Letter*, 32, 5805 (1991)] 和 Charles J. Sih 等 [*Tetrahedron Letter*, 32, 3465 (1991)] 的酶方法。

在这些方法中，酶方法由于将前手性的 1, 4 - 二氢吡啶 - 3, 5 - 二羧酸单酯不对称水解，不会象化学的方法那样，使不需要一方的异构体浪费，因此，作为制造方法具有优越性。

15 但使用酶方法时，由于其特性的缘故，必须在水系介质中进行反应，按以 1, 4 - 二氢吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二酯为底物的惯用方法，即使使用助溶剂 (丙酮、甲醇、二甲亚砜、二甲基甲酰胺等)，也不能提高底物浓度，反应效率受到限制。

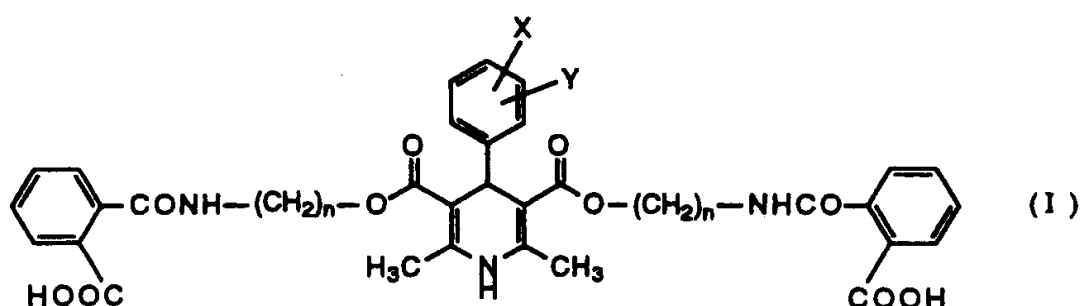
因此，需要开发使用极性更大、可溶于水的底物的效率良好的光学活性物质即 (4R) - 1, 4 - 二氢吡啶 - 3, 5 - 二羧酸单酯的制造方法。

20 发明的公开

本发明者为解决上述问题进行了深入的研究，结果发现了水溶性大的底物，该底物适合使用微生物或酶来制造 (4R) - 1, 4 - 二氢吡啶 - 3, 5 - 二羧酸单酯衍生物的方法，从而完成了本发明。

即，本发明提供下述 1, 4 - 二氢吡啶衍生物。

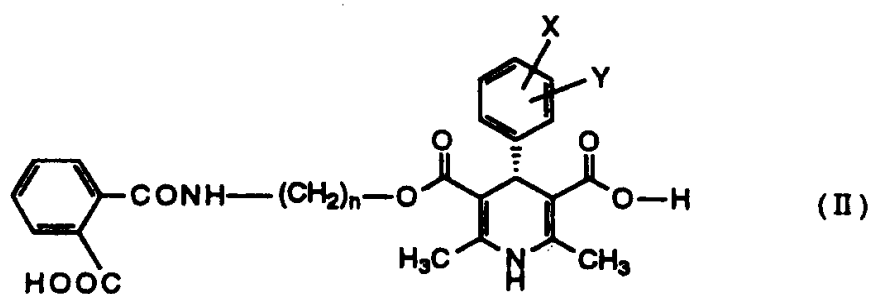
25 1) 通式 (I)



(式中，X 和 Y 各自独立，表示氢原子、硝基、腈基或卤原子，n 表示 1 - 3 的整数。)

30 表示的 1, 4 - 二氢吡啶衍生物或其盐。

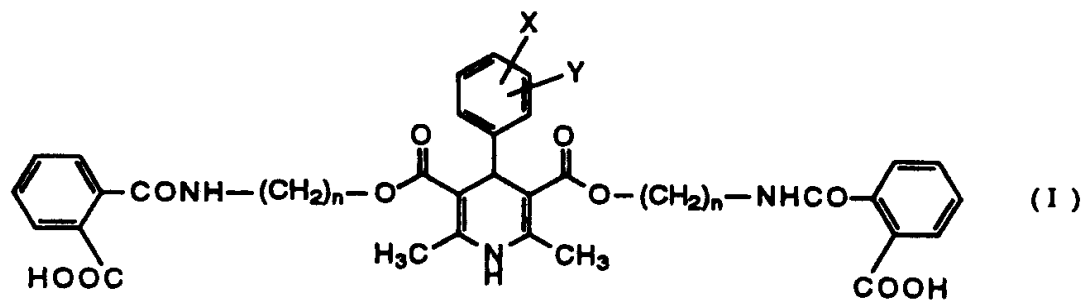
2) 通式 (II)



(式中, X、Y和n的定义同上。)

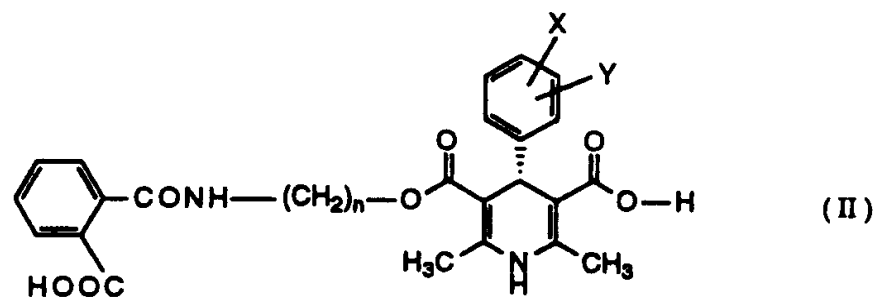
表示的光学活性的1, 4-二氢吡啶衍生物或其盐。

5 3) 以对通式(I)



(式中, X、Y和n的定义同上。)

表示的1, 4-二氢吡啶衍生物或其盐进行使用微生物或酶的不对称水解反应为特征的通式(II)



(式中, X、Y和n的定义同上。)

表示的光学活性的1, 4-二氢吡啶衍生物或其盐的制造方法。

上述通式(I)表示的1, 4-二氢吡啶衍生物及其盐在水中的溶解性大, 是在使用微生物或酶通过生化反应来制备光学活性的1, 4-二氢吡啶衍生物时有用的新颖底物。

此外, 上述通式(II)表示的光学活性的1, 4-二氢吡啶衍生物及其盐为可由上述通式(I)表示的化合物通过生化反应而高效率地得到的新颖的光学活性的1, 4-二氢吡啶衍生物, 是可用作缺血性心脏病和高血压等的预防和治疗药物的化合物的制造中间体。

在通式(I)或通式(II)的化合物中, 对吡啶环4位的苯基的取代基X和Y(即, 硝基、腈基和卤原子)的位置无特殊限制, 可是2位、3位和4位中的任何位置。

X和Y表示的卤原子的具体例子包括氟、氯、溴和碘原子，优选氯原子。

在通式(I)或通式(II)的化合物中，n表示1-3的整数，优选2和3，最好是2。

〔盐〕

- 5 通式(I)和通式(II)的化合物可通过常法转化成盐。通式(I)表示的化合物以游离态用作使用微生物或酶的生化反应的底物，其盐也可用作底物。

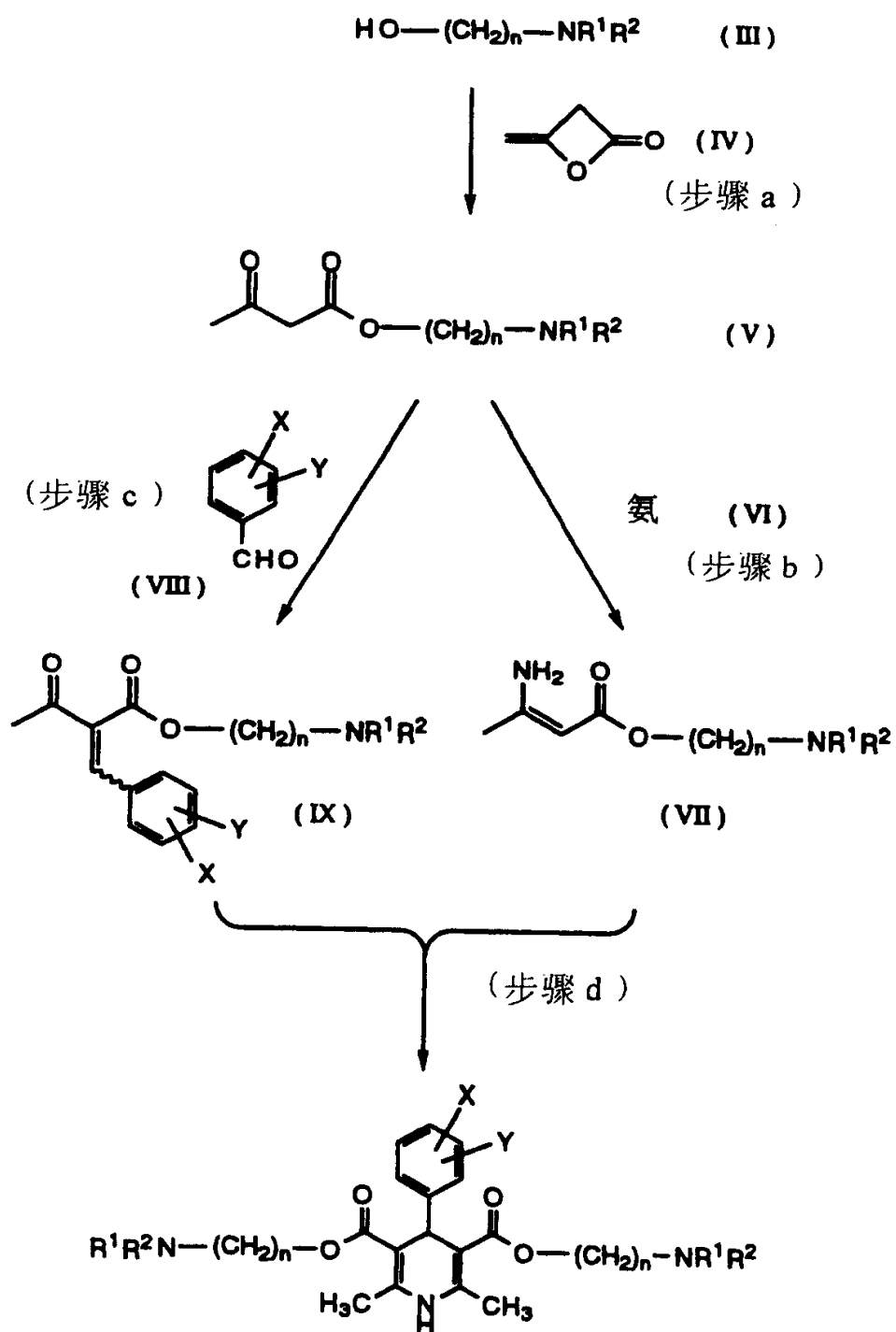
通式(I)和通式(II)表示的化合物的盐的具体例子包括乙酸、酒石酸、苯磺酸、三氟乙酸等有机酸的盐、盐酸、硫酸等无机酸的盐、吗啉、三乙胺、三亚乙基二胺等有机碱的盐、钠、钾、锂等碱金属的盐等。

- 10 〔化合物(I)的制造方法〕

通式(I)表示的化合物可通过组合其自身公知的方法来加以制造。

通式(I)表示的化合物可通过例如下页所示反应流程图1进行制造。

反应流程图 1



在反应流程图中, R^1 和 R^2 表示氢原子和 2-羧基苯甲酰基的组合或二者合在一起表示邻苯二甲酰基。其他符号的定义与上述的相同。

简单说明反应流程图。

首先, 将双烯酮 (IV) 与氨基被保护了的乙醇胺衍生物 (III) 反应, 得到乙酰乙酸酯衍生物 (V) (步骤 a)。然后, 将乙酰乙酸酯衍生物 (V) 与氨 (VI) 反应, 得到 β -氨基巴豆酸酯衍生物 (VII) (步骤 b)。另外, 使乙酰乙酸酯衍生物 (V) 和苯甲醛衍生物 (VIII) 缩合, 制备 α -亚苄基- β -酮酯衍生物 (IX) (步骤 c)。接着, 通过将 β -氨基巴豆酸酯衍生物 (VII) 和 α -亚苄基- β -酮酯衍生物 (IX) 加热缩合 (步骤 d), 可制备目的化合物。

步骤 a 可通过在碱 (三乙胺等) 的存在下, 往在惰性溶剂 (四氢呋喃 (THF) 等) 中溶解了乙醇胺衍生物 (III) 的溶液中滴加双烯酮 (IV), 于 0 - 100 °C 加热搅拌 1 - 24 小时来进行

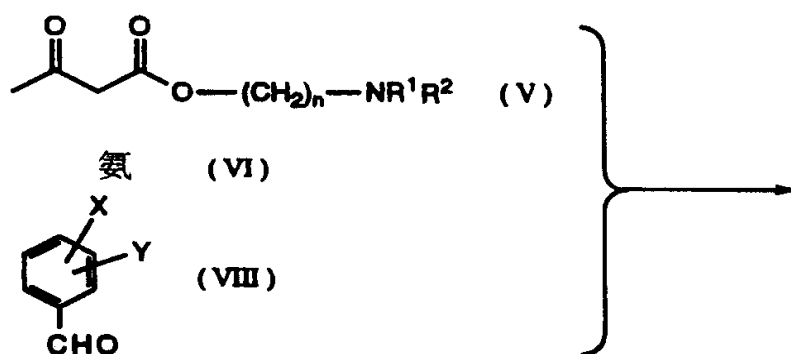
步骤 b 可通过使用容易使用的铵盐 (碳酸铵等), 往乙酰乙酸酯衍生物 (V) 的惰性溶剂 (乙醇等) 溶液中添加上述铵盐, 在 15 - 60 °C 搅拌 1 - 24 小时来进行。

步骤 c 可通过往在惰性溶剂 (二噁烷等) 中溶解了乙酰乙酸酯衍生物 (V) 的溶液中添加苯甲醛衍生物 (VIII), 于 80 - 110 °C 搅拌加热 2 - 24 小时来进行。

步骤 d 可通过将 β -氨基巴豆酸酯衍生物 (VII) 和 α -亚苄基- β -酮酯衍生物 (IX) 在有或无惰性溶剂 (二噁烷等) 的存在下, 于 50 - 90 °C 加热搅拌 2 - 24 小时来进行。

另外, 上述步骤 b、步骤 c 和步骤 d 也可一次进行。即, 可通过将乙酰乙酸酯衍生物 (V) 2 当量和氨 (VI) 以及苯甲醛衍生物 (VIII) 加热缩合来一步制备 (反应流程图 2)。

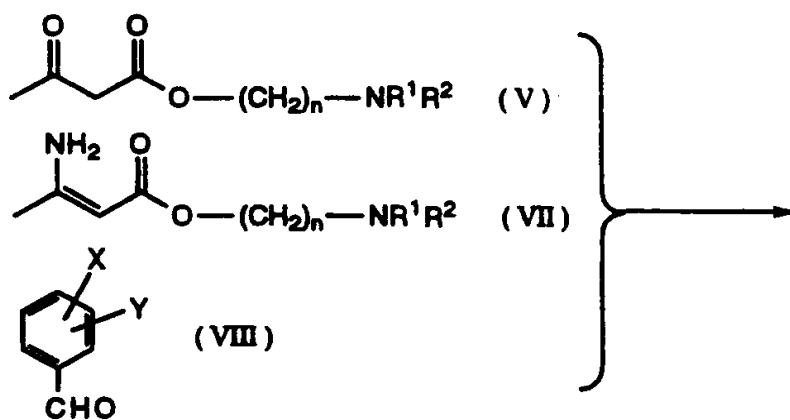
反应流程图 2



此外, 也可通过将乙酰乙酸酯衍生物 (V) 和 β -氨基巴豆酸酯衍生物 (VII) 以及苯甲醛衍生物 (VIII) 加热缩合的方法 (反应流程图 3) 或将乙酰

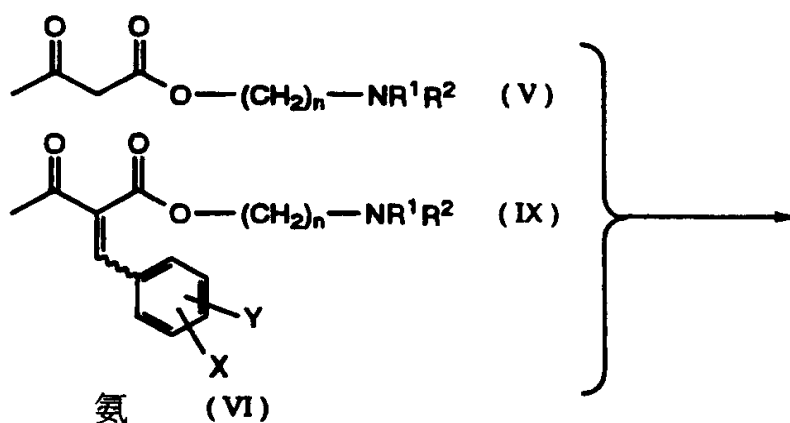
乙酸酯衍生物 (V) 和 (VII) 和 α -亚苄基- β -酮酯衍生物 (IX) 以及氨 (VI) 加热缩合的方法 (反应流程图 4) 来一步制备。

反应流程图 3

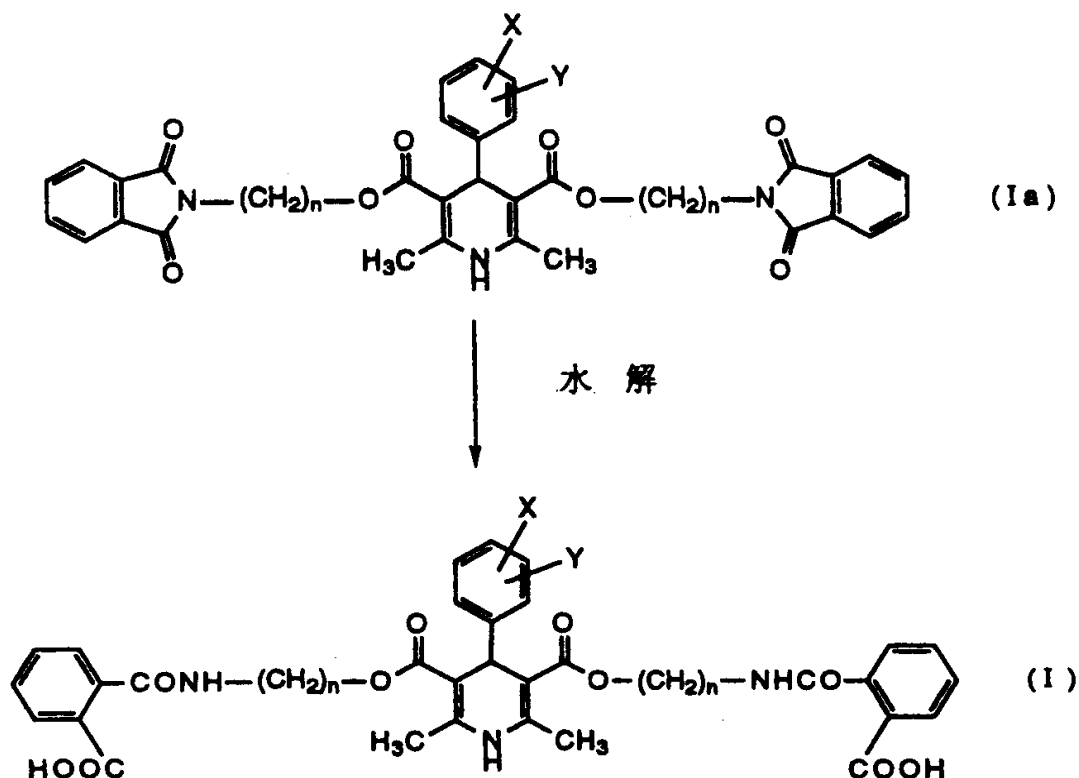


5

反应流程图 4



在如此得到的化合物中, R^1 和 R^2 合在一起表示邻苯二甲酰基的化合物 (Ia) 10 可通过水解反应转化成通式 (I) 的化合物。



〔化合物 (II) 的制造方法〕

- 5 通式 (II) 表示的光学活性的 1, 4 - 二氢吡啶化合物可通过将通式 (I) 表示的化合物进行使用微生物或酶的不对称水解来制备。

作为反应中使用的微生物, 可利用属于链霉菌属、拟青霉属、球二孢属、交链孢属或长蠕孢属的、具有不对称水解能的微生物。这些微生物的具体例子包括 FI - 4 菌株、FI - 741 菌株、FI - 1007 菌株和 A - 914 菌株。下面说明这些

10 菌的形态特征。

FI - 4 菌株

在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上形成薄灰白色棉状菌丝层, 随着培养的进行, 基部变成黑灰色。分生丝为从分生丝柄的顶端的小孔生出的马球型分生丝, 被隔膜分隔, 呈砖叠起来的形状。分生丝的底部为圆形, 顶部突出, 为褐色。

15 FI - 741 菌株

在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上形成发育良好的白色棉状菌丝层, 随着培养的进行, 基部变成褐色。分生孢子形成在开口的被称为分生孢子壳的球形器官内。分生孢子为略长形, 平滑, 无粘性。成熟时, 变成褐色, 细胞壁变厚。

FI - 1007 菌株

- 20 在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上形成薄灰白色菌丝层, 随着培养的进行, 基部变成略带粉红的褐色。分生孢子为从分生孢子柄上的最前端枝 (瓶梗) 出现的瓶梗孢子。分生孢子柄基本上不分枝, 但瓶梗的分枝较多, 呈细长结构。

以上述形态特征为基础, 对 *The General of Fungi Sporulating in Pure Culture*

[J. A. von ARX 著 (1970)] 进行了检索, 结果鉴定 FI - 4 为交链孢属 (*Alternaria* sp.), FI - 741 为球二孢属 (*botryodiplodia* sp.), FI - 1007 为拟青霉属 (*Paecilomyces*) 。

A - 914 菌株

- 5 在 ISP - 2 琼脂培养基上形成淡褐色的坚固的菌落。随着培养的进行, 菌落表面变成略带灰色的绿色。不会产生黑色素和其他扩散性色素。培养基中的菌丝不会被截断, 发育良好, 存在气菌丝。在气菌丝上附生大量连锁成螺旋状的分生孢子。分生孢子的表面平滑。细胞壁成分中含有 L - 二氨基庚二酸。不能利用 L - 羟基脯氨酸。对 100 μ g/ml 夹竹桃霉素易感。以上述特征为基础, 对 Bergey 的
- 10 *Mannual of Systematic Bacteology* Volume 4 进行了检索, 结果鉴定 A - 914 为 *Streptomyces viridosporus* 。

FI - 4 菌株 1993 年 3 月 18 日保藏在日本工业技术院生命工学工业技术研究所, 保藏号为 FERM P - 13535。其后, 1993 年 6 月 14 日转为根据布达佩斯条约的保藏, 保藏号为 FERM BP - 4335。

- 15 此外, FI - 741 菌株、FI - 1007 菌株和 A - 914 菌株分别在 1992 年 7 月 29 日保藏在日本工业技术院生命工学工业技术研究院, 保藏号为 FERM P - 13097、FERM P - 13096 和 FERM P - 13098。其后, 在 1993 年 6 月 14 日转为根据布达佩斯条约的保藏, 保藏号分别为 FERM BP - 4333、FERM BP - 4332 和 FERM BP - 4334。

- 20 另外, 可用于本发明的微生物的具体例子还包括链霉菌属 ATCC11862 和长蠕孢菌属 (*helminthosporium zonatame*) IFO6678。这些微生物分别保存在美国典型培养物保藏中心和 (财团法人) 发酵研究所, 可容易地得到。

对用于培养上述微生物的培养基无特殊限制, 只要是可用于通常的微生物培养的培养基即可。

- 25 例如, 作为碳源, 只要是上述微生物可利用的, 任何碳源均可。具体地说, 可使用葡萄糖、果糖、蔗糖、糊精等糖类; 丙三醇、山梨糖醇等糖醇; 富马酸、枸橼酸等有机酸。这些碳源往培养基中的添加量通常宜为 0.1 - 10 重量% 左右。

- 作为氮源, 例如可使用氯化铵、硫酸铵、磷酸铵等无机酸铵盐; 富马酸铵、枸橼酸铵等有机酸铵盐; 肉膏、酵母膏、玉米浆、酪蛋白水解物等天然有机氮源
- 30 等。其中, 在许多时候, 有机氮源可兼用作碳源。氮源的添加量通常以 0.1 - 10 重量% 为宜。

作为无机盐类, 例如, 可使用磷酸钾、磷酸钠等磷酸碱金属盐; 氯化钾、氯化钠等碱金属氯化物; 硫酸镁、硫酸亚铁等硫酸金属盐等。其使用量以 0.001 - 1 重量% 为宜。

- 35 微生物的培养可在上述培养基中, 于 20 - 40 $^{\circ}$ C (最好在 28 - 37 $^{\circ}$ C) 和 pH5 - 9 (最好为 pH6 - 8), 在需氧条件下进行。

使用微生物的反应系通过微生物或其处理物与通式 (I) 表示的化合物的反应而进行。与微生物的反应通常为与包含在微生物培养物中的酶的反应。

作为微生物的培养物, 可使用被培养的该微生物菌体、培养滤液和培养液。

微生物的处理物是指被培养的该微生物菌体、培养滤液和培养液等处理物, 此类处理物的具体例子包括干燥菌体如冻干菌体、喷雾干燥菌体, 或用有机溶剂如丙酮、甲苯、甲醇、丁醇等处理过的菌体、菌体提取物、固定化处理物等。此外, 培养滤液和培养液的处理物的具体例子包括培养液的浓缩物、干燥粉末、喷雾干燥粉末。

此外, 也可用从该培养菌体和培养滤液分离、纯化的酶与上述原料化合物的处理物进行反应。

实施本发明时, 将微生物在培养基上接种后, 例如, 于 20 - 40 °C 培养 12 - 120 小时, 由此得到 1ml 中含 $10^6 - 10^{10}$ 个微生物的菌株培养液。往该培养液中添加溶解在水中的原料化合物即通式 (I) 的化合物, 使最终浓度为 0.5 - 5mg/ml, 通常在 28 °C 反应 18 - 72 小时。然后, 将 pH 调至 5, 用氯仿、乙酸乙酯、乙酸丁酯、丁醇等有机溶剂等提取, 进行结晶化操作或通过转溶、沉淀化等手段可得到目的产物即光学活性的通式 (II) 的化合物。

另外, 可用于酶反应的酶的具体例子包括蛋白酶如蛋白酶 P - 6 (日本天野制药株式会社产品) 等。使用酶来实施本发明时, 通常, 将原料化合物即通式 (I) 的化合物溶解在调至 pH5 - 10 的缓冲液中, 使最终浓度为 1 - 100mg/ml, 然后再将酶溶解其中, 于 25 - 40 °C 进行反应。接着, 与使用微生物菌体进行反应时同样, 用有机溶剂提取、进行结晶化操作或通过转溶、沉淀化等手段可得到目的产物即光学活性的通式 (II) 的化合物。

〔优选的化合物〕

在通式 (I) 表示的化合物中, 作为生化反应的底物, 可转化为通式 (II) 的光学活性的 1, 4 - 二氢吡啶衍生物的、通式 (I) 表示的优选的化合物的具体例子包括:

(1) 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯

(2) 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2 - 氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯

(3) 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯

(4) 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2, 3 - 二氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯

(5) 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2 - 氟苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯

(6) 1, 4-二氢-2, 6-二甲基-4-(3-氟苯基)吡啶-3, 5-二羧酸二〔2-(2-羧基苯甲酰基)氨基乙〕酯

(7) 1, 4-二氢-2, 6-二甲基-4-(3-氯苯基)吡啶-3, 5-二羧酸二〔2-(2-羧基苯甲酰基)氨基乙〕酯

5 (8) 1, 4-二氢-2, 6-二甲基-4-(2-硝基苯基)吡啶-3, 5-二羧酸二〔2-(2-羧基苯甲酰基)氨基乙〕酯

(9) 1, 4-二氢-2, 6-二甲基-4-(3-硝基苯基)吡啶-3, 5-二羧酸二〔2-(2-羧基苯甲酰基)氨基丙〕酯

10 (10) 1, 4-二氢-2, 6-二甲基-4-(3-硝基苯基)吡啶-3, 5-二羧酸二〔2-(2-羧基苯甲酰基)氨基甲〕酯

通式(II)表示的优选的光学活性的1, 4-二氢吡啶衍生物的具体例子包括:

(11) (4R)-1, 4-二氢-2, 6-二甲基-3-〔2-(2-羧基苯甲酰基)氨基乙基〕氧羰基-4-(3-硝基苯基)吡啶-5-羧酸

15 (12) (4R)-1, 4-二氢-2, 6-二甲基-3-〔2-(2-羧基苯甲酰基)氨基乙基〕氧羰基-4-(2, 3-二氯苯基)吡啶-5-羧酸

(13) (4R)-1, 4-二氢-2, 6-二甲基-3-〔2-(2-羧基苯甲酰基)氨基乙基〕氧羰基-4-(3-氯苯基)吡啶-5-羧酸

20 (14) (4R)-1, 4-二氢-2, 6-二甲基-3-〔2-(2-羧基苯甲酰基)氨基乙基〕氧羰基-4-(3-氟苯基)吡啶-5-羧酸

(15) (4R)-1, 4-二氢-2, 6-二甲基-3-〔3-(2-羧基苯甲酰基)氨基丙基〕氧羰基-4-(3-硝基苯基)吡啶-5-羧酸

(16) (4R)-1, 4-二氢-2, 6-二甲基-3-〔(2-羧基苯甲酰基)氨基甲基〕氧羰基-4-(3-硝基苯基)吡啶-5-羧酸等。

25

工业上应用的可能性

以通式(I)表示的1, 4-二氢吡啶衍生物和上述通式(II)表示的1, 4-二氢吡啶衍生物以及它们的盐如下面的试验例所示, 与以往用作不对称水解底物的前手性的1, 4-二氢吡啶-3, 5-二羧酸二酯相比, 其在水中的溶解性
30 高出数百倍乃至数万倍, 作为通过使用微生物或酶的生化反应来制造光学活性的1, 4-二氢吡啶衍生物时的底物是极为有用的。

此外, 通式(I)表示的1,4-二氢吡啶衍生物可用作上述通式(II)的原料。

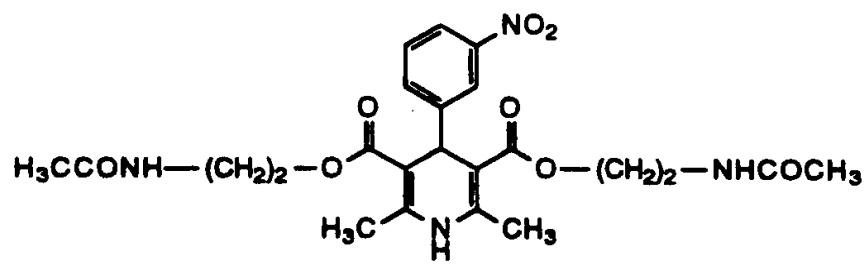
35 还有, 通过以通式(I)的化合物为底物的生化反应而高效率地得到的通式(II)表示的新颖的光学活性的1, 4-二氢吡啶衍生物可用作作为缺血性疾病和高血压等的预防和治疗药物有用的光学活性的1, 4-二氢吡啶衍生物的制造中间体。

即, 上述通式 (I) 和通式 (II) 表示的新颖化合物可适宜地用作例如 (4R) - (2 - 烟酰氨基) 乙基 (3 - 硝基氧代) 丙基 - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸酯 (日本药学会第 112 回年会, 医药品部会 30ZF 11 - 2、讲演要旨集 245 页, 日本专利公开公报 1990 年第 223580 号)、(4S) - 2, 6 - 二甲基 - (3 - 硝基苯基) - 1, 4 - 二氢吡啶 - 3, 5 - 二羧酸 (3S) - 3 - (1 - 苄基 - 3 - 吡咯烷) 酯·甲酯 [*J. Med. Chem.*, 29, 2504 (1988)] 和 (4S) - 2, 6 - 二甲基 - (3 - 硝基苯基) - 1, 4 - 二氢吡啶 - 3, 5 - 二羧酸 3 - { 2 - [4 - (4 - 二苯甲基 - 3 - 哌嗪基) 苯基] 乙 } 酯·甲酯 [*Chem. Pharm. Bull.*, 39, 108 (1991)] 等的制造中间体, 其利用价值很大。

实施本发明的最佳方式

下面通过参考例、实施例和试验例说明本发明, 但本发明不受下述例子的限制。若无特别说明, 在下述例子中, % 表示重量 %。此外, 使用的 TLC 吸附剂是硅胶 (Merck 公司生产的 Art5715)。

参考例 1: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 乙酰氨基乙) 酯的制备

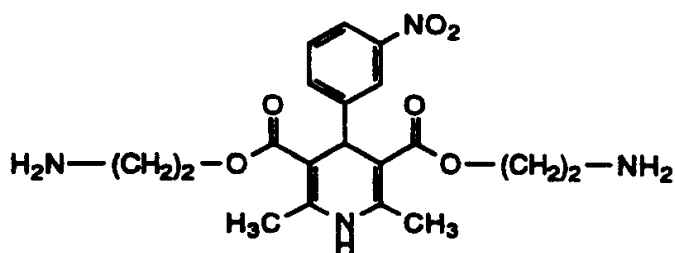


往 N - 乙酰基乙醇胺 25g 在二噁烷 100ml 中的溶液中加入三乙胺 0.34ml, 并缓慢滴加双烯酮 18.7ml。发热反应结束后, 加入浓氨水 8.1ml 和间硝基苯甲醛 18.3g, 于 80 °C 的油浴中加热搅拌 17 小时。减压蒸去溶剂, 将所得残渣在装填了 700g 硅胶的层析柱上, 以甲苯-丙酮 (2: 1) 混合溶剂为展开系统进行纯化, 得到目的化合物 24g。

¹H-NMR (CDCl₃): δ 8.23 (1H,t,J=2Hz), 8.00 (1H,td,J=1Hz,2Hz,8Hz), 7.70(1H, td,J=1Hz,2Hz,8Hz), 7.40(1H,t,J=8Hz), 6.85 (2H,t,J=6Hz), 6.67(1H,s), 5.11(1H,s), 4.20(2H,m), 3.95(2H,m), 3.60(2H,m), 3.48(2H,m), 2.36(6H,s), 1.98(6H,s).

FAB-MS(m/z): 489(M+H)⁺

参考例 2: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 氨基乙) 酯的制造



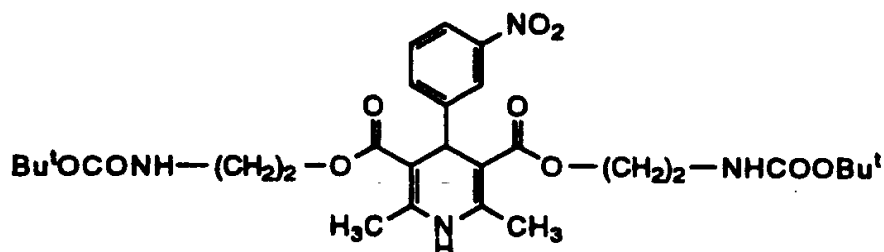
5 将由参考例 1 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 乙酰胺基乙) 酯 100mg 悬浮在四氢呋喃 1ml 和 1N 盐酸 1ml 的混合溶剂中, 在 60 °C 的油浴中加热搅拌 4 小时。往反应混合物中加入水 20ml, 减压蒸去四氢呋喃后, 加入乙酸乙酯 20ml, 进行分液。往该水相中加入 1N 氢氧化钠水溶液, 调至 pH10 后, 用乙酸乙酯 100ml 分液、提取。将该有机相水洗后, 用无水硫酸钠干燥, 减压蒸去溶剂, 得到标题化合物 32mg。

TLC: Rf 0.18 (丁醇: 乙酸: 水 = 4: 1: 2)

¹H-NMR(D₂O-DCl): δ 8.17(1H,s), 8.10(1H,d,J=8Hz), 7.80(1H,d,J=8Hz), 7.56(1H,t,J=8Hz), 5.07(1H,s), 4.5-4.2(4H,m), 3.36(4H,br), 2.36(6H,s).

10 FAB-MS(m/z): 405(M+H)⁺ 甘油基质

参考例 3: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 叔丁氧羰基氨基乙) 酯的制造

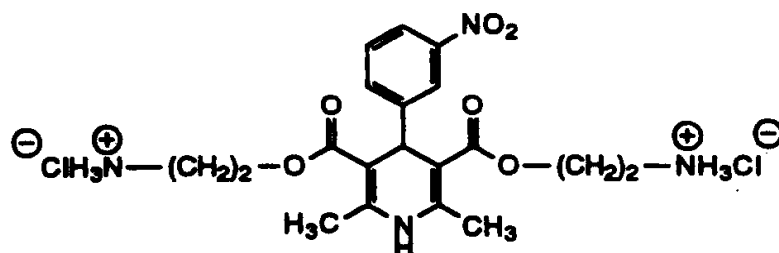


15 往 2 - 叔丁氧羰基氨基乙醇 1.875g 在四氢呋喃 8ml 中的溶液中加入三乙胺 0.16ml, 再滴加双烯酮 0.99ml, 室温下搅拌 3 小时。减压浓缩反应混合物, 将所得乙酰乙酸 2 - 叔丁氧羰基氨基乙酯溶解在乙醇 10ml 中, 再加入碳酸铵 280mg, 在 45 °C 搅拌 2 小时。将反应混合物再度减压浓缩, 并将所得乙酰乙酸酯和 β - 氨基巴豆酸酯的混合物溶解在二噁烷 10ml 中, 加入间硝基苯甲醛 879mg, 在 80 °C 加热搅拌 18 小时。浓缩反应混合物, 将所得残渣加载在充填了硅胶 500ml 的层析柱上, 以甲苯-丙酮混合溶剂 (混合比为 20: 1) 为展开系统进行纯化, 得到标题化合物 2.23g (得率 63 %)。

TLC: Rf 0.21 (甲苯: 丙酮 = 5: 1)

25 ¹H-NMR (CDCl₃): δ 8.11(1H,s), 8.02(1H,d,J=8Hz), 7.67(1H,d,J=8Hz), 7.42(1H,t,J=8Hz), 5.96(1H,br), 5.08(1H,s), 4.65(2H,br), 4.10(4H,m), 3.5-3.2(4H,m), 2.37(6H,s), 1.42(18H,s).

参考例 4: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 氨基乙) 酯·二盐酸盐的制造



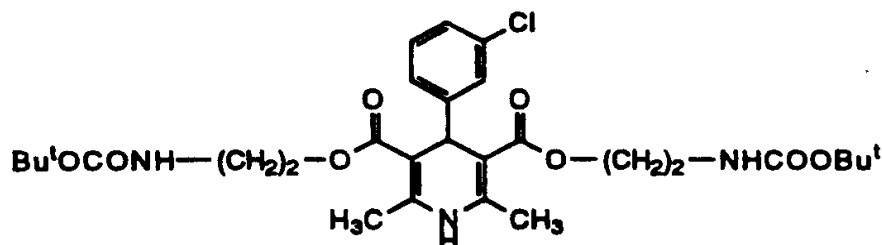
5 将由参考例 3 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 叔丁氧羰基氨基乙) 酯 1.996g 溶解在氯仿 10ml 中, 加入盐酸-二噁烷溶液 (2N) 13ml, 在 40 °C 加热搅拌 4 小时。滤取生成的不溶物, 用己烷 20ml 洗涤后, 干燥, 得到黄色粉末状的标题化合物 1.49g。

TLC: Rf 0.18 (丁醇: 乙酸: 水 = 4: 1: 2)

¹H-NMR(D₂O): δ 8.17(1H,s), 8.10(1H,d,J=8Hz), 7.80(1H,d,J=8Hz), 7.56(1H,t,J=8Hz), 5.07(1H,s), 4.5-4.2(4H,m), 3.36(4H,br), 2.36(6H,s).

10 FAB-MS(m/z): 405(M+H)⁺ 甘油基质

参考例 5: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 叔丁氧羰基氨基乙) 酯的制造



15 将按与参考例 3 同样的方法制得的乙酰乙酸 2 - 叔丁氧羰基氨基乙酯 1.00g 粗品溶解在乙醇 5ml 中, 加入碳酸铵 137mg, 在 50 °C 搅拌 2.5 小时后, 加入 3 - 氯苯甲醛 0.254ml, 加热回流 3 小时。减压蒸去溶剂, 将所得残渣加载在充填了硅胶 100g 的层析柱上, 以甲苯-丙酮混合溶剂 (混合比为 6: 1) 为展开系统进行纯化, 得到标题化合物 1.00g (得率 83%)。

TLC: Rf 0.35 (甲苯: 丙酮 = 4: 1)

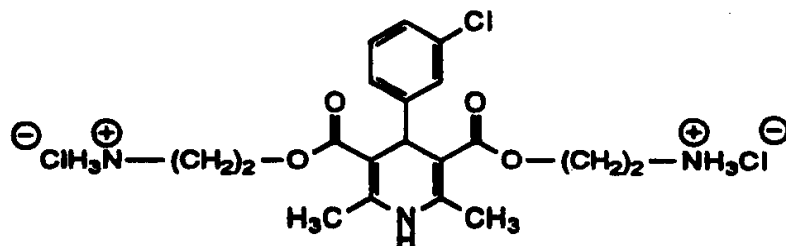
20 ¹H-NMR(CDCl₃): δ 7.3-7.1(4H,m), 5.79(1H,s), 4.93(1H,bs), 4.58(2H,bs), 4.2-4.0(4H,m), 3.5-3.3(4H,m), 2.35(6H,s), 1.43(18H,s).

FAB-MS(m/z): 594(M+H)⁺ m-硝基苄醇基质

IR(KBr): 3339, 2978, 1692, 1493, 1273, 1213, 1171, 1117cm⁻¹

25 参考例 6: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氯苯基) 吡啶 - 3, 5

- 二羧酸二(2-氨基乙)酯·二盐酸盐的制造



5 将由参考例 5 制得的 1, 4-二氢-2, 6-二甲基-4-(3-氯苯基)吡啶-3, 5-二羧酸二(2-叔丁氧羰基氨基乙)酯 492mg 溶解在 THF 4ml 中, 加入浓盐酸 1ml, 在 50℃ 搅拌 2.5 小时。减压蒸去溶剂, 往所得残渣中加入乙醇 2ml, 在 0℃ 搅拌 10 分钟, 过滤, 用冷乙醇洗涤后, 干燥, 得到标题化合物 139mg (得率 36%)。

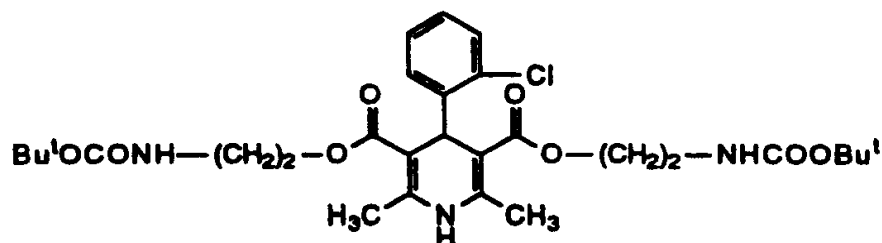
TLC: Rf 0.47 (丁醇: 乙酸: 水 = 4: 1: 1)

$^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: δ 7.39(1H,s), 7.35-7.25(3H,m), 4.92(1H,s), 4.42-4.27(4H,m), 3.35-3.25(4H,m), 2.33(6H,s).

10 FAB-MS(m/z): 394(M+H)⁺ 甘油基质

IR(KBr): 3246, 2975, 1688, 1483, 1273, 1213, 1115, 1100cm⁻¹

参考例 7: 1, 4-二氢-2, 6-二甲基-4-(2-氯苯基)吡啶-3, 5-二羧酸二(2-叔丁氧羰基氨基乙)酯的制造



15

使用 2-氯苯甲醛 0.253ml, 按与参考例 5 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 965mg (得率 80%)。

TLC: Rf 0.37 (甲苯: 丙酮 = 4: 1)

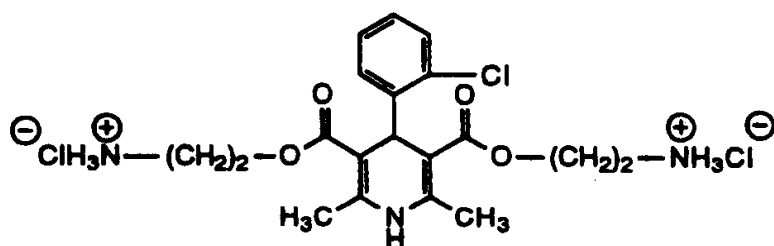
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.43-7.39(1H,m), 7.31-7.23(1H,m), 7.21-7.16(1H,m), 7.11-7.06(1H,m), 5.81(1H,bs), 5.34(1H,s), 4.64(2H,bs), 4.15-4.03(4H,m),

20 3.4-3.2(4H,m), 2.32(6H,s), 1.44(18H,s).

FAB-MS(m/z): 594(M+H)⁺ m-硝基苄醇基质

IR(KBr): 3347, 2978, 1696, 1497, 1273, 1209, 1171, 1115cm⁻¹

25 参考例 8: 1, 4-二氢-2, 6-二甲基-4-(2-氯苯基)吡啶-3, 5-二羧酸二(2-氨基乙)酯·二盐酸盐的制造



使用由参考例 7 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2 - 氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 叔丁氧羰基氨基乙) 酯 673mg, 按与参考例 6 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 426mg (得率 81 %)。

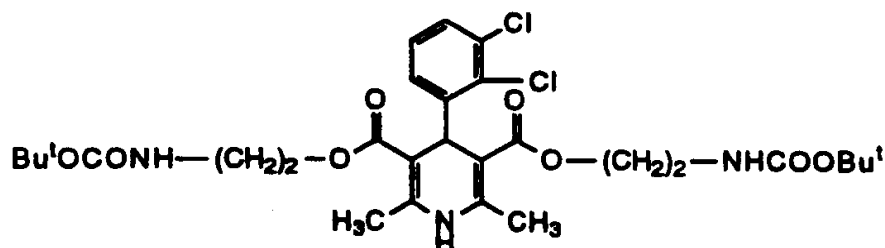
TLC: R_f 0.45 (丁醇: 乙酸: 水 = 4: 1: 1)

5 ¹H-NMR(D₂O): δ 7.59-7.56(1H,m), 7.43-7.39(1H,m), 7.35-7.30(1H,m), 7.26-7.20(1H,m), 5.34(1H,s), 4.4-4.2(4H,m), 3.40-3.25(4H,m), 2.32(6H,s).

FAB-MS(m/z): 394(M+H)⁺ 甘油基质

IR(KBr): 3434, 2978, 1698, 1493, 1273, 1209, 1113cm⁻¹

10 参考例 9: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2, 3 - 二氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 叔丁氧羰基氨基乙) 酯的制造



使用 2, 3 - 二氯苯甲醛 392mg, 按与参考例 5 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 964mg (得率 75 %)。

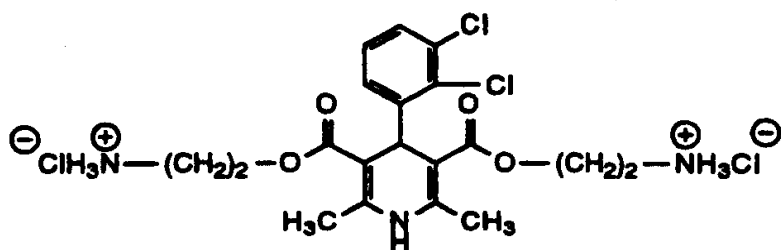
TLC: R_f 0.43 (甲苯: 丙酮 = 3: 1)

15 ¹H-NMR(CDCl₃): δ 7.35-7.25(2H,m), 7.15-7.09(1H,m), 5.83(1H,bs), 5.42(1H,s), 4.66(2H,bs), 4.15-4.05(4H,m), 3.45-3.25(4H,m), 2.32(6H,s), 1.43(18H,s).

FAB-MS(m/z): 628(M+H)⁺ m - 硝基苄醇基质

IR(KBr): 3349, 2978, 1696, 1497, 1275, 1211, 1171, 1115cm⁻¹

20 参考例 10: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2, 3 - 二氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 氨基乙) 酯·二盐酸盐的制造



使用由参考例 9 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2, 3 - 二氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 叔丁氧羰基氨基乙) 酯 455mg, 按与参考例 6 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 223mg (得率 61 %)。

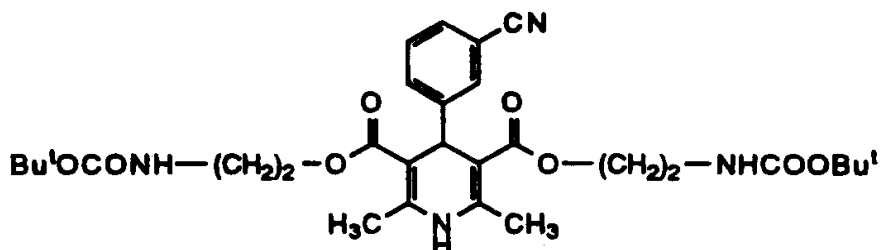
TLC: Rf 0.45 (丁醇: 乙酸: 水 = 4: 1: 1)

5 $^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: δ 7.54-7.48(1H,m), 7.46-7.41(1H,m), 7.29-7.24(1H,m), 5.42(1H,s), 4.41-4.22(4H,m), 3.38-3.24(4H,m), 2.31(6H,s).

FAB-MS(m/z): 428(M+H) $^+$ 甘油基质

IR(KBr): 3432, 2975, 1690, 1489, 1277, 1211, 1113 cm^{-1}

10 参考例 11: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氰基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 叔丁氧羰基氨基乙) 酯的制造



使用由 3 - 氰基苯甲醛 300mg, 按与参考例 5 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 900mg (得率 76 %)。

TLC: Rf 0.36 (甲苯: 丙酮 = 4: 1)

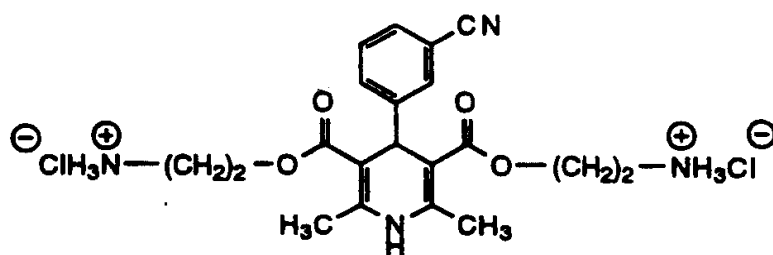
15 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.60-7.55(2H,m), 7.45(1H,d,J=7.7Hz), 7.35(1H,t,J=7.7Hz), 5.91(1H,bs), 5.00(1H,s), 4.62(2H,bs), 4.15-4.05(4H,m), 3.43-3.25(4H,m), 2.36(6H,s), 1.44(18H,s).

FAB-MS(m/z): 585(M+H) $^+$ m - 硝基苄醇基质

IR(KBr): 3368, 2978, 2230, 1692, 1491, 1213, 1171, 1119 cm^{-1}

20

参考例 12: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氰基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 氨基乙) 酯·二盐酸盐的制造



使用由参考例 11 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氰基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 叔丁氧羰基氨基乙) 酯 422mg, 按与参考例 6 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 201mg (得率 61 %)。

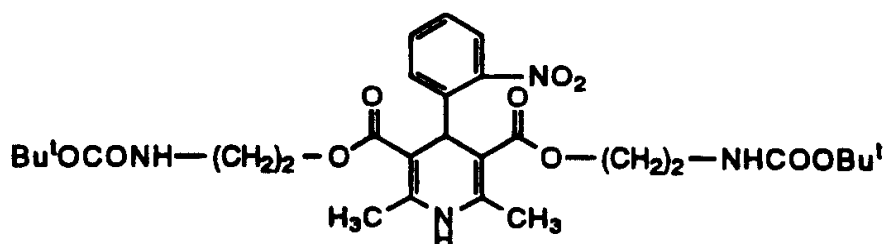
TLC: Rf 0.43 (丁醇: 乙酸: 水 = 4: 1: 1)

5 $^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: δ 7.74-7.68(2H,m), 7.61(1H,d,J=7.7Hz), 7.49(1H,t,J=7.7Hz), 4.99(1H,s), 4.44-4.28(4H,m), 3.36-3.30(4H,m), 2.35(6H,s).

FAB-MS(m/z): 385(M+H)⁺ 甘油基质

IR(KBr): 3434, 3013, 2228, 1711, 1495, 1273, 1209, 1113, 1092cm⁻¹

10 参考例 13: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 叔丁氧羰基氨基乙) 酯的制造



使用 2 - 硝基苯甲醛 339mg, 按与参考例 5 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 779mg (得率 63 %)。

TLC: Rf 0.26 (甲苯: 丙酮 = 4: 1)

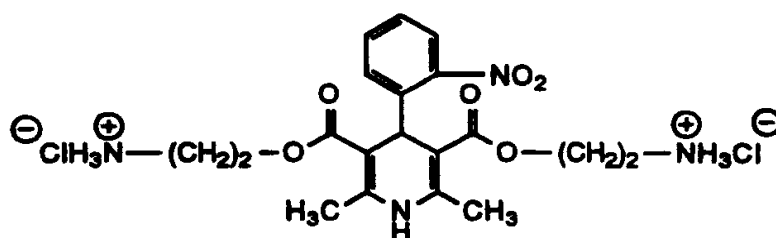
15 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.71(1H,d,J=7.7Hz), 7.53-7.46(2H,m), 7.31-7.26(1H,m), 5.94(1H,bs), 5.81(1H,s), 4.83(2H,bs), 4.23-3.96(4H,m), 3.35-3.25(4H,m), 2.34(6H,s), 1.43(18H,s).

FAB-MS(m/z): 605(M+H)⁺ m - 硝基苄醇基质

IR(KBr): 3391, 2978, 1698, 1532, 1497, 1213, 1171, 1115cm⁻¹

20

参考例 14: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 氨基乙) 酯·二盐酸盐的制造



使用由参考例 13 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 叔丁氧羰基氨基乙) 酯 418mg, 按与参考例 6 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 271mg (得率 82 %)。

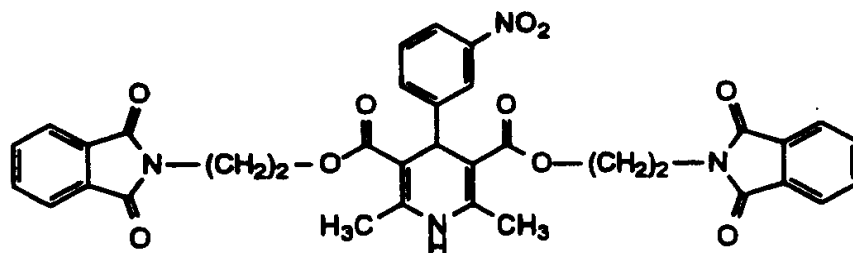
硅胶 TLC: Rf 0.40 (丁醇: 乙酸: 水 = 4: 1: 1)

5 $^1\text{H-NMR}(\text{D}_2\text{O})$: δ 7.83-7.80(1H,m), 7.70-7.62(2H,m), 7.46-7.40(1H,m), 5.65(1H,s), 4.43-4.16(4H,m), 3.32-3.27(4H,m), 2.32(6H,s).

FAB-MS(m/z): 405(M+H)⁺ 甘油基质

IR(KBr): 3432, 1696, 1524, 1489, 1209, 1111cm⁻¹

10 参考例 15: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 邻苯二甲酰氨基乙) 酯的制造



往 2 - 邻苯二甲酰氨基乙醇 1.0g 在四氢呋喃 2ml 中的溶液中加入三乙胺 0.036ml, 再滴加双烯酮 0.45ml 在四氢呋喃 0.5ml 中的溶液, 于 55 °C 搅拌 1 小时。

15 减压浓缩反应混合物, 将所得乙酰乙酸酯粗品溶解在含 95 % 乙醇的水溶液 2ml 中, 加入碳酸铵 200mg, 在 40 °C 搅拌 2 小时。再往该反应混合物中加入间硝基苯甲醛 480mg、枸橼酸 80mg 和水 1ml, 在 90 °C 的油浴中加热回流 4 小时。浓缩反应混合物, 将所得残渣溶解在乙酸乙酯 50ml 中, 水洗后, 用无水硫酸钠干燥有机相。将该有机相减压浓缩, 并将所得残渣加载在充填了硅胶 50ml 的层析柱上, 以甲苯-丙酮混合溶剂 (混合比为 5: 1) 为展开系统进行纯化, 得到标题化合物 1.02g。

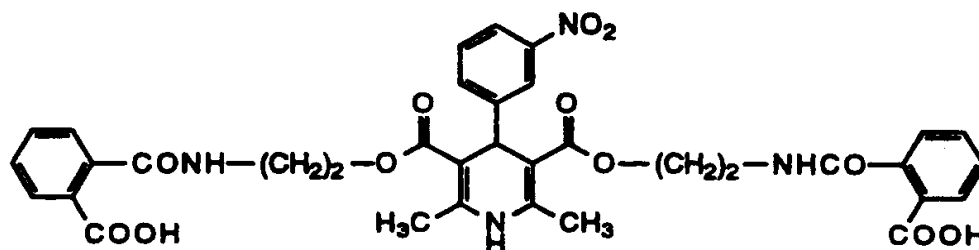
TLC: Rf 0.25 (甲苯: 乙酸乙酯 = 2: 1)

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 8.04(1H,s), 7.80(4H,m), 7.8-7.7(5H,m), 7.55(1H,d,J=7.7Hz), 7.08(1H,t,J=7.7Hz), 5.89(1H,br), 4.96(1H,s), 4.33-4.22(4H,m), 4.06-3.99(2H,m), 3.90-3.84(2H,m), 2.31(6H,s).

25 FAB-MS(m/z): 665(M+H)⁺ m - 硝基苄醇基质

熔点: 233 ~ 236 °C

实施例 1: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二〔2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙〕酯的制造



5

将 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 邻苯二甲酰氨基乙) 酯 1.0g 溶解在丙酮 20ml 中, 加入 20 % 碳酸钠水溶液 20ml, 并于 50 ~ 60 °C 加热搅拌 3 小时。往反应混合物中加入水 20ml, 减压蒸去丙酮后, 加入乙酸乙酯 20ml, 进行分液。往水相中加入 1N 盐酸水溶液

10 50ml, 调至 pH2 后, 用乙酸乙酯 100ml 分液、提取。水洗有机相后, 用无水硫酸钠干燥, 减压蒸去溶剂, 得到标题化合物 980mg。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 8.13(1H,t,J=2.2Hz) , 7.92(2H,d,J=7.7Hz) , 7.87(1H,d,J=7.7Hz) , 7.71(1H,d,J=7.7Hz) , 7.57-7.48(4H,m) , 7.33(2H,d,J=7.7Hz), 7.28(1H,t,J=8.1Hz), 5.15(1H,s), 4.25-4.19(2H,m), 4.16-

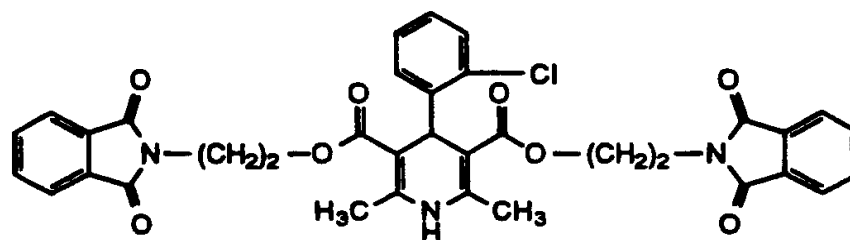
15 4.11(2H,m), 3.64-3.57(2H,m), 3.50-3.43(2H,m), 2.34(6H,s).

FAB-MS(m/z): 699(M - H)⁻ m - 硝基苄醇基质

熔点: 136 ~ 139 °C

参考例 16: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2 - 氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 邻苯二甲酰氨基乙) 酯的制造

20



使用 2 - 氯苯甲醛 608mg, 按与参考例 15 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 1.62g。

TLC: R_f 0.21 (甲苯: 乙酸乙酯 = 2: 1)

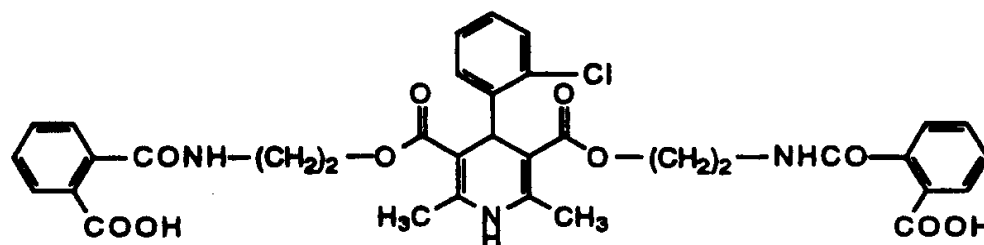
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.81(4H,dd,J=5.5Hz, 3.3Hz), 7.71(4H,dd,J=5.5Hz, 3.3Hz), 7.30(1H,d,J=7.7Hz) , 6.99-6.95(1H,m) , 6.72-6.69(2H,m), 5.61(1H,s) , 5.11(1H,s), 4.27-4.21(2H,m), 4.18-4.12(2H,m), 3.96-3.86(2H,m), 3.84-

25

3.77(2H,m), 2.28(6H,s).

FAB-MS(m/z): 654(M+H)⁺ m - 硝基苄醇基质

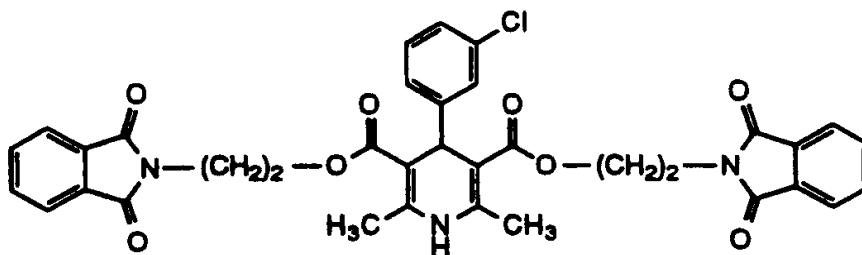
- 5 实施例 2: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2 - 氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二〔2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙〕酯的制造



使用由参考例 16 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2 - 氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 邻苯二甲酰氨基乙) 酯 500mg, 按与实施例 1 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 338mg.

- 10 ¹H-NMR(CD₃OD₃): δ 7.93(2H,d,J=7.7Hz), 7.60-7.50(4H,m), 7.40(1H,d,J=8.1Hz), 7.36(2H,d,J=7.7Hz), 7.06(2H,t,J=8.1Hz), 6.92(1H,t,J=8.1Hz), 5.41(1H,s), 4.23-4.18(2H,m), 4.15-4.10(2H,m), 3.62-3.56(2H,m), 3.53-3.47(2H,m), 2.28(6H,s).
FAB-MS(m/z): 688(M-H)⁻ m - 硝基苄醇基质

- 15 参考例 17: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 邻苯二甲酰氨基乙) 酯的制造

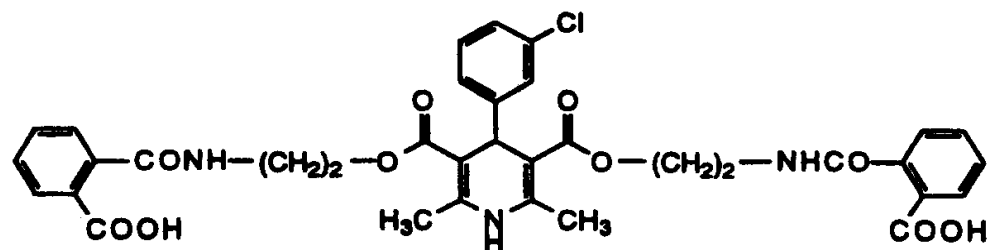


使用 3 - 氯苯甲醛 608mg, 按与参考例 15 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 1.85g.

TLC: R_f 0.21 (甲苯: n 乙酸乙酯 = 2: 1)

- 20 ¹H-NMR(CDCl₃): δ 7.83(4H,dd,J=5.5Hz, 3.3Hz), 7.71(4H,dd,J=5.5Hz, 3.3Hz), 7.12(1H,s), 7.06-7.03(1H,m), 6.82-6.81(2H,m), 5.63(1H,s), 4.84(1H,s), 4.35-4.30(2H,m), 4.26-4.20(2H,m), 4.05-3.98(2H,m), 3.92-3.86(2H,m), 2.29(6H,s).
FAB-MS(m/z): 654(M+H)⁺ m - 硝基苄醇基质

- 25 实施例 3: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二〔2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙〕酯的制造

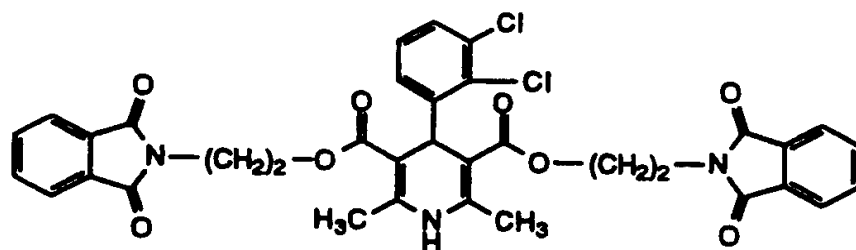


使用由参考例 17 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 邻苯二甲酰氨基乙) 酯 500mg, 按与实施例 1 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 399mg。

- 5 $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 7.94-7.91(2H,m), 7.58-7.49(4H,m), 7.35-7.33(2H,m), 7.23-7.19(2H,m), 7.03-6.95(2H,m), 5.02(1H,s), 4.25-4.14(4H,m), 3.63-3.58(2H,m), 3.52-3.47(2H,m), 2.29(6H,s).

FAB-MS(m/z): 688($M - H$)⁻ m - 硝基苄醇基质

- 10 参考例 18: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2, 3 - 二氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 邻苯二甲酰氨基乙) 酯的制造



使用 2, 3 - 二氯苯甲醛 763mg, 按与参考例 15 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 1.04g。

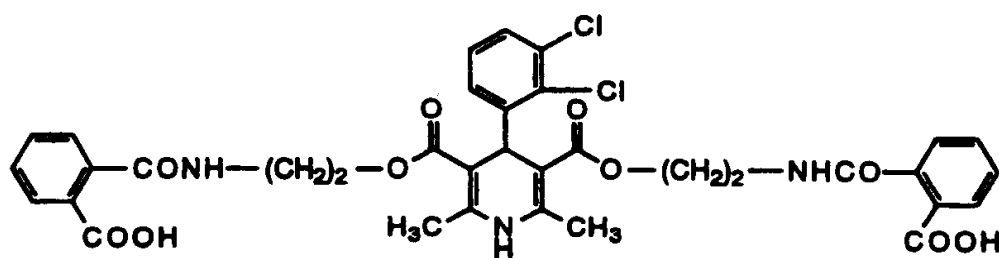
TLC: R_f 0.21 (甲苯: 乙酸乙酯 = 2: 1)

- 15 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.80(4H,dd, $J=5.5\text{Hz}$, 3.3Hz), 7.71(4H,dd, $J=5.5\text{Hz}$, 3.3Hz), 7.26-7.25(1H,m), 7.23(1H,d, $J=2.2\text{Hz}$), 6.89(1H,t, $J=7.7\text{Hz}$), 6.83(1H,d, $J=7.7\text{Hz}$), 5.61(1H,s), 5.17(1H,s), 4.11-4.26(4H,m), 3.98-3.91(2H,m), 3.83-3.77(2H,m), 2.28(6H,s).

FAB-MS(m/z): 688($M+H$)⁺ m - 硝基苄醇基质

20

实施例 4: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2, 3 - 二氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯的制造



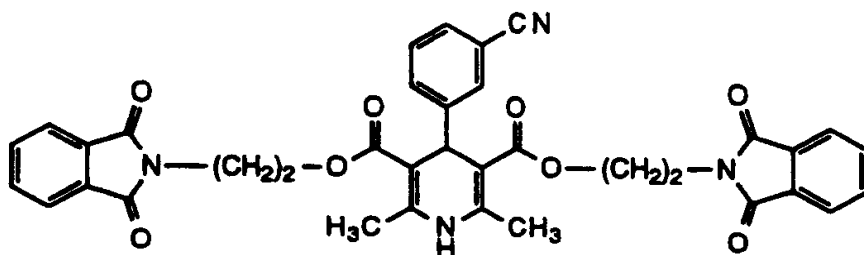
使用由参考例 18 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2, 3 - 二氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 邻苯二甲酰氨基乙) 酯 500mg, 按与实施例 1 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 302mg.

- 5 $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 7.93(2H,dd,J=7.7Hz, 1.5Hz), 7.57(2H,td,J=7.7Hz, 1.5Hz), 7.51(2H,td,J=7.7Hz,1.5Hz), 7.38(3H,m), 7.18(1H,dd,J=8.1Hz,1.8Hz), 7.06(1H,t,J=8.1Hz), 5.49(1H,s), 4.26-4.20(2H,m), 4.13-4.08(2H,m), 3.64-3.57(2H,m), 3.52-3.46(2H,m), 2.28 (6H,s).

FAB-MS(m/z): 722(M - H)⁻ m-硝基苄醇基质

10

参考例 19: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氰基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 邻苯二甲酰氨基乙) 酯的制造



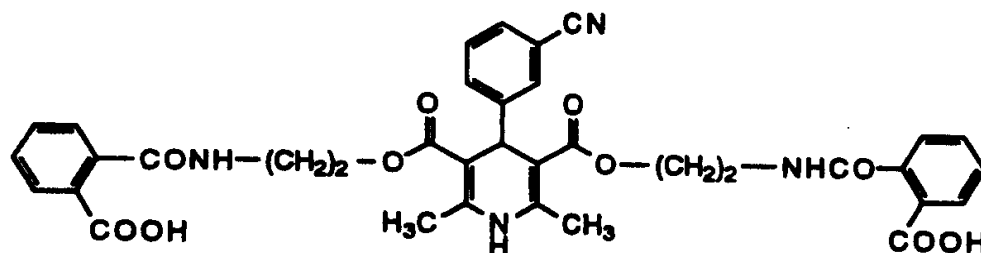
- 15 使用 3 - 氰基苯基苯甲醛 572mg, 按与参考例 15 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 2.00g.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.84(4H,dd,J=5.5Hz, 3.3Hz), 7.73(4H,dd,J=5.5Hz, 3.3Hz), 7.47-7.44(2H,m), 7.15(1H,d,J=7.7Hz), 7.00(1H,t,J=7.7Hz), 5.70(1H,s), 4.87(1H,s), 4.34-4.21(4H,m), 4.03-3.97(2H,m), 3.91-3.85(2H,m), 2.30(6H,s).

FAB-MS(m/z): 645(M + H)⁺ m - 硝基苄醇基质

20

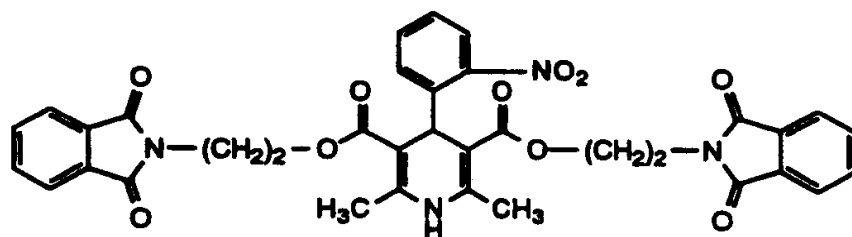
实施例 5: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氰基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯的制造



使用由参考例 19 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氟基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 邻苯二甲酰氨基乙) 酯 500mg, 按与实施

- 例 1 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 429mg.
¹H-NMR(CD₃OD): δ 7.93(2H,d,J=7.7Hz), 7.61(1H,t,J=8.0Hz), 7.57-7.49(5H,m),
 5 7.37-7.33(3H,m), 7.23(1H,t,J=7.7Hz), 5.07(1H,s), 4.26-4.20(2H,m), 4.16-4.09(2H,m), 3.63-3.56(2H,m), 3.50-3.44(2H,m), 2.33(6H,s).
 FAB-MS(m/z): 679(M - H)⁻ m - 硝基苄醇基质

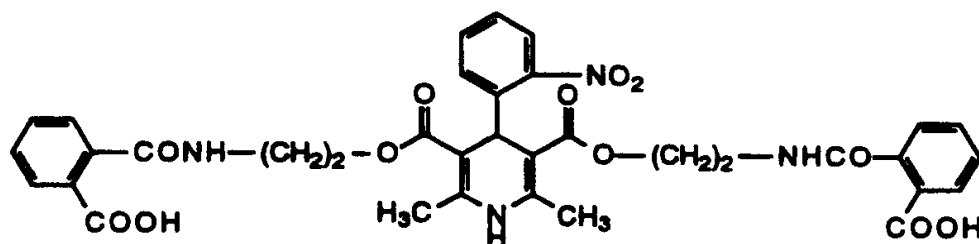
- 参考例 20: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 邻苯二甲酰氨基乙) 酯的制造



使用 2 - 硝基苯甲醛 660mg, 按与参考例 15 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 958mg.

- ¹H-NMR(CDCl₃): δ 7.78(4H,dd,J=5.5Hz, 3.3Hz), 7.70(4H,dd,J=5.5Hz, 3.3Hz),
 15 7.44(1H,d,J=8.1Hz), 7.33(1H,t,J=7.7Hz), 7.16(1H,d,J=8.1Hz),
 6.92(1H,t,J=7.7Hz), 5.71(1H,s), 5.43(1H,s), 4.24-4.10(4H,m), 3.90-3.74(4H,m), 2.30(6H,s).
 FAB-MS(m/z): 665(M+H)⁺ m - 硝基苄醇基质

- 20 实施例 6: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯的制造

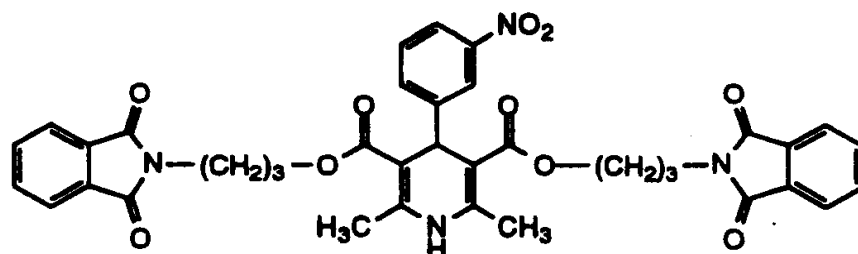


- 使用由参考例 20 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 邻苯二甲酰氨基乙) 酯 500mg, 按与实施

- 例 1 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 239mg.
¹H-NMR(CD₃OD): δ 7.92(2H,d,J=7.3Hz), 7.59-7.44(7H,m), 7.38(2H,d,J=7.3Hz),
 25 7.19(1H,t,J=7.3Hz), 5.75(1H,s), 4.30-4.24(2H,m), 4.08-4.02(2H,m), 3.54-3.51(4H,m), 3.30(6H,s).

FAB-MS(m/z): 699(M - H)⁻ m - 硝基苄醇基质

参考例 21: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基)吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二(3 - 邻苯二甲酰氨基丙)酯的制造



5 往 3 - 邻苯二甲酰氨基丙醇 3.0g 在四氢呋喃 6ml 中的溶液中加入三乙胺 0.1ml, 再滴加双烯酮 1.5ml 在四氢呋喃 2ml 中的溶液, 于 55 °C 搅拌 1 小时。减压浓缩反应混合物, 将所得乙酰乙酸酯粗品溶解在含 90 % 乙醇的水溶液 6ml 中, 加入碳酸铵 562mg, 在 40 °C 搅拌 2 小时。再往该反应混合物中加入间硝基苯甲
10 醛 1.33g、枸橼酸 230mg 和水 1.5ml, 在 90 °C 的油浴中加热回流 4 小时。浓缩反应混合物, 将所得残渣溶解在乙酸乙酯 200ml 中, 水洗后, 用无水硫酸钠干燥有机相。将该有机相减压浓缩, 并将所得残渣加载在充填了硅胶 200ml 的层析柱上, 以甲苯-乙酸乙酯混合溶剂(混合比为 5: 1)为展开系统进行纯化, 得到标题化合物 2.51g。

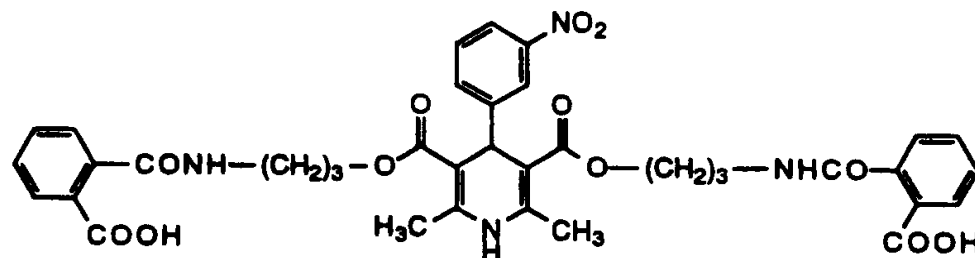
TLC: R_f 0.24 (甲苯: 乙酸乙酯 = 2: 1)

15 ¹H-NMR(CDCl₃): δ 8.18(1H,t,J=1.8Hz), 7.99(1H,d,J=7.7Hz), 7.83(1H,d,J=7.7Hz), 7.78(4H,dd,J=5.5Hz, 3.3Hz), 7.67(4H,dd,J=5.5Hz, 3.3Hz), 7.43(1H,t,J=7.7Hz), 6.09(1H,s), 5.17(1H,s), 4.15-4.08(4H,m), 3.77-3.74(4H,m), 2.39(6H,s), 2.08-2.01(4H,m).

FAB-MS(m/z): 693(M+H)⁺ m - 硝基苄醇基质

20

实施例 7: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基)吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二〔3 - (2 - 羧基苯甲酰基)氨基丙〕酯的制造

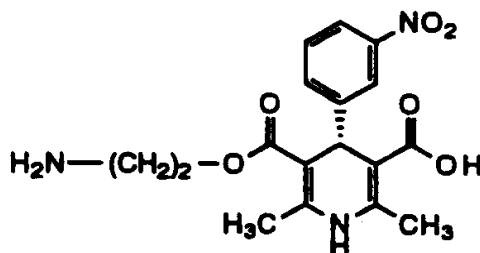


25 使用由参考例 21 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基)吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二(3 - 邻苯二甲酰氨基丙)酯 1g, 按与实施例 1 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 504mg。

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 8.13(1H,t,J=1.8Hz), 8.00(1H,d,J=8.1Hz), 7.92(2H,dd,J=7.3Hz, 1.5Hz), 7.74(1H,d,J=7.7Hz), 7.57-7.46(5H,m), 7.38(2H,dd,J=7.3Hz, 1.5Hz), 5.12(1H,s), 4.15(4H,t,J=6.2Hz), 3.36(4H,t,J=6.6Hz), 2.35(6H,s), 1.99-1.89(4H,m).
FAB-MS(m/z): 727(M - H)⁻ m - 硝基苄醇基质

5

参考例 22: (4R) - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 3 - (2 - 氨基乙基) 氧羰基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸的制造 (微生物法)



10 将由参考例 4 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 氨基乙) 酯·二盐酸盐 30mg 溶解在 0.5M 磷酸盐缓冲液 (pH8.0) 0.5ml 中。往该溶液中加入按下述方法配制的 *Streptomyces viridosporus* A - 914 菌株培养液离心分离上清液 0.5ml, 在 40℃ 的振荡机上反应 48 小时。让反应混合物通过充填了 Dia-ion HP - 20 (三菱化成工业株式会社产品) 5ml 的色谱柱, 使其吸附。用 10ml 蒸馏水和含 20% 甲醇的水溶液 10ml
15 洗涤色谱柱后, 用含 40% 甲醇的水溶液 20ml 进行洗脱, 收集含 TLC (正丁醇: 乙酸: 水 = 4: 1: 1) 的 R_f 值为 0.61 的、对茚三酮显色的目的物的部分, 浓缩干固, 得到标题化合物 12.4mg。

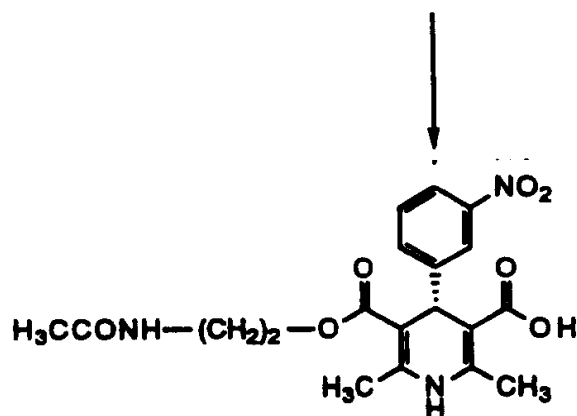
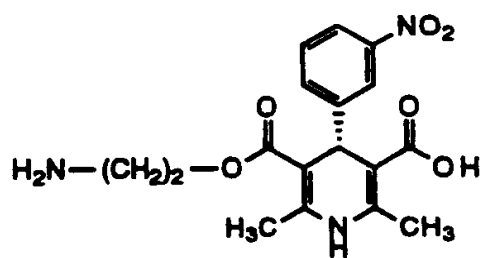
$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 8.12(1H,t,J=2.0Hz), 7.97(1H,dd,J=8.0Hz,2.4Hz), 7.67(1H,d,J=8.0Hz), 7.43(1H,t,J=8.0Hz), 5.26(1H,s), 4.26(1H,m), 3.97(1H,m),
20 3.06(2H,t,J=5.4Hz), 2.36(3H,s), 2.23(3H,s).

FAB-MS(m/z): 362(M+H)⁺ m - 硝基苄醇基质

[*Streptomyces viridosporus* A - 914 菌株的培养]

25 将 *Streptomyces viridosporus* A - 914 菌株接种在含 30ml 的 C 培养基 (马铃薯淀粉 2%、肉汁 2%、酵母膏 0.5%、食盐 0.25%、碳酸钙 0.32%、硫酸亚铁 7 水合物 0.0005%、硫酸锰 4 水合物 0.0005%、硫酸锌 7 水合物 0.0005%、pH7) 的 250ml 烧瓶中, 于 28℃ 培养 3 天, 以 5000rpm 离心分离 10 分钟, 进行配制。

参考例 23: (4R) - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 3 - (2 - 氨基乙基) 氧羰基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸的光学纯度测定

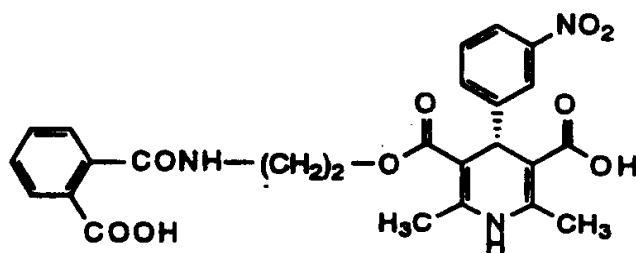


按下述方法转化成已知化合物 (4R) - 3 - (2 - 乙酰氨基乙基) 氧羰基 - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸 (WO94/05637) 后测定参考例 22 的化合物的光学纯度。

将由参考例 22 制得的 (4R) - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 3 - (2 - 氨基乙基) 氧羰基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸 10mg 溶解在去离子水 2ml 中, 室温下边搅拌边加入乙酸酐 0.2ml。继续搅拌 30 分钟后, 用乙酸乙酯 5ml 提取反应混合物 3 次, 并用饱和食盐水 10ml 洗涤。使乙酸乙酯层吸附在制备性 TLC 板上, 用氯仿-甲醇 (7: 1) 展开, 将 Rf 值为 0.22 的、具有 UV 吸收的馏分洗脱, 减压干固, 得到 (4R) - 3 - (2 - 乙酰氨基乙基) 氧羰基 - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸 3.7mg。通过使用 Diacel 工业公司生产的光学拆解用色谱柱 (手性 AGP, 4mm × 100mm) 的 HPLC (移动相: 0.35 % 异丙醇-0.1M 磷酸缓冲液 (pH4.4), 流速: 0.8ml/分) 进行分析。其结果, 测得 4R 型化合物的光学纯度为 100 %, 保留时间为 14.3 分钟。

¹H-NMR(CDCl₃) : δ 8.11(1H,t,J=2.0Hz), 7.99(1H,dd,J=8.0Hz,2.4Hz), 7.66(1H,d,J=8.0Hz), 7.44(1H,t,J=8.0Hz), 5.10(1H,s), 4.2-4.0(2H,m), 3.40(2H,t,J=5.5Hz), 2.34(6H,s), 1.91(3H,s).

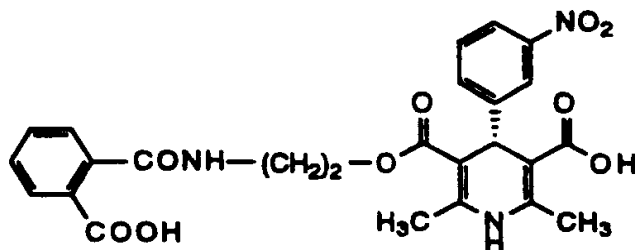
实施例 8: (4R) - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 3 - [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙基] 氧羰基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸的制造 (酶法)



将 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯 50mg 溶解在 pH9 的水溶液中, 加入蛋白酶 P - 6 (天野制药株式会社产品) 50mg, 在 28 °C 搅拌 23 小时。将反应液用 1N 盐酸溶液调至酸性后, 加入乙酸乙酯 20ml。水洗乙酸乙酯层, 用芒硝脱水干燥后, 减压浓缩。并用制备性 TLC 纯化残留物, 得到标题化合物 17.1mg。¹H-NMR(CD₃OD): δ 8.14(1H,t,J=2.2Hz), 7.92(1H,d,J=8.1Hz), 7.69-7.66(2H,m), 7.44-7.33(4H,m), 5.13(1H,s), 4.23-4.16(2H,m), 3.58-3.50(2H,m), 2.35(3H,s), 2.31(3H,s).

10 FAB-MS(m/z): 508(M-H)⁻

实施例 9: (4R) - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 3 - [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙基] 氧羰基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸的制造 (微生物法)



15

从 FERMP - 13098 (A - 914 菌株) 的斜面培养物中取一个接种环量, 并将其接种在放入了种菌培养基 (马铃薯淀粉 2 %、葡萄糖 2 %、肉汁 2 %、酵母膏 0.5 %、食盐 0.25 %、碳酸钙 0.32 %、硫酸亚铁 7 水合物 0.0005 %、硫酸锰 4 水合物 0.0005 %、硫酸锌 7 水合物 0.0005 %) 30ml 的 250ml 的三角烧瓶中, 将烧瓶放置在旋转式摇床上, 在 28 °C 培养 2 天, 作为种菌。

20

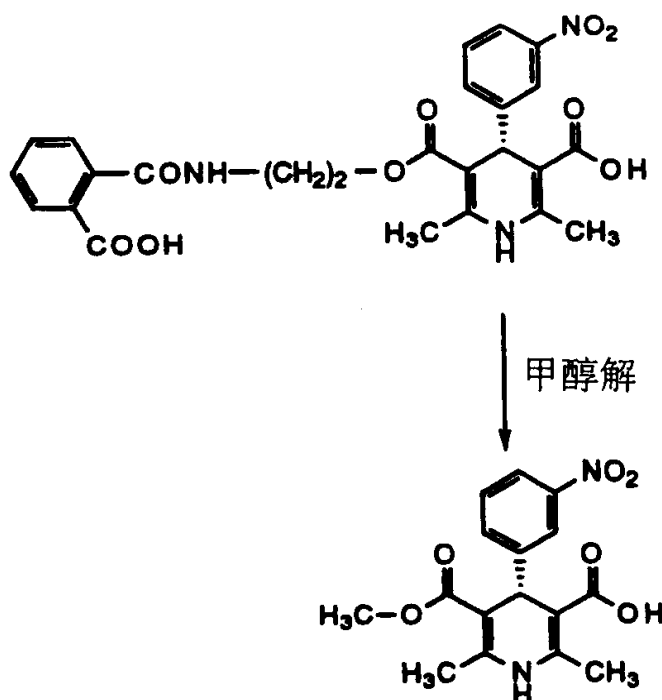
将由此培养得到的种菌 1ml 加至放入了其组分与种菌培养基相同的生产培养基 100ml 的 500ml 的三角烧瓶中, 在培养温度 28 °C 培养 5 天。过滤所得的培养液, 得到滤液 80ml。

25

将 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯 1.0g 溶解在上面得到的培养滤液 50ml 中, 在装备有 pH 计和搅拌装置的反应容器中边用 1N 氢氧化钠水溶液调整至 pH8.5 ~ 8.6, 边在 40 °C 搅拌 72 小时。用 1N 盐酸将反应混合物调至 pH3.0

后，再用乙酸乙酯 100ml 提取 2 次。然后用饱和食盐水 50ml 洗涤乙酸乙酯层，并用无水硫酸钠干燥。滤去干燥剂，浓缩干固，得到黄色固体。让该混合物吸附在制备性 TLC 板上，用乙酸乙酯-甲醇-乙酸（10：2：0.1）展开，将 R_f 值为 0.36 的具有 UV 吸收的馏分洗脱，减压干固，得到（4R）-1，4-二氢-2，6-二甲基-3-〔2-（2-羧基苯甲酰基）氨基乙基〕氧羰基-4-（3-硝基苯基）吡啶-5-羧酸 350mg。NMR 谱显示，与实施例 8 的化合物相同。

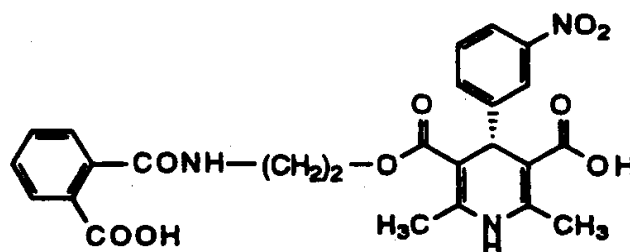
参考例 24：（4R）-1，4-二氢-2，6-二甲基-3-〔2-（2-羧基苯甲酰基）氨基乙基〕氧羰基-4-（3-硝基苯基）吡啶-5-羧酸的光学纯度测定



往由实施例 8 制得的（4R）-1，4-二氢-2，6-二甲基-3-〔2-（2-羧基苯甲酰基）氨基乙基〕氧羰基-4-（3-硝基苯基）吡啶-5-羧酸 50mg 中加入甲醇钠（28% 甲醇溶液）5ml，在 50℃ 搅拌 2 小时。将反应液用水 10ml 稀释后，再用乙酸乙酯 5ml 洗涤，将水层调至 pH3 后，用乙酸乙酯 10ml 提取 3 次。乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥，接着干固，将所得黄色物质通过充填了 120ml 的 Sephadex LH-20 的色谱柱（溶剂：甲醇）进行纯化，得到（4R）-1，4-二氢-2，6-二甲基-3-甲基氧羰基-4-（3-硝基苯基）吡啶-5-羧酸 22mg。将该物质的光学纯度通过使用 Diacel 工业公司生产的光学拆解用色谱柱 CHIRALPAK AS（4.6mm × 250mm）的 HPLC（移动相：己烷：乙醇：乙酸 = 90：10：0.1，流速：1.0ml/分，检测：UV254nm）进行分析。其结果，测得光学纯度为 100%，保留时间为 12.5 分钟。

¹H-NMR(CD₃OD)：δ 8.09(1H,s)，7.99(1H,d,J=9.5Hz)，7.65(1H,d,J=7.7Hz)，

实施例 10: (4R) - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 3 - [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙基] 氧羰基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸的制造 (微生物法)

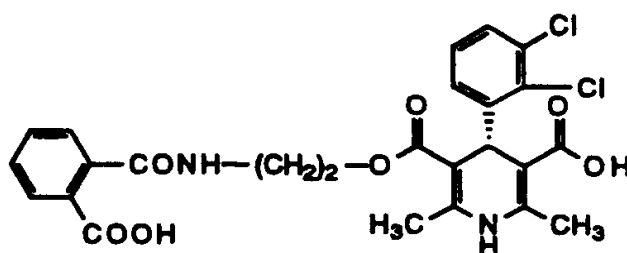


将球二孢菌属 SP - FI - 741 接种在放入了 30ml 的 FI 培养基 (马铃薯淀粉 2 %、肉汁 2 %、 KH_2PO_4 0.1 %、硫酸镁 7 水合物 0.05 %、葡萄糖 1 %、ADECANOL LG109 0.05 %) 的 250ml 的三角烧瓶中, 在 28 °C 培养 3 天。

10 将 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯 100mg 溶解在蒸馏水 0.75ml 中后加至上面得到的培养液中, 再在 28 °C 继续振荡 2 天。接着, 按与实施例 9 同样的操作得到 (4R) - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 3 - [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙基] 氧羰基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸 30mg。

15

实施例 11: (4R) - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 3 - [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙基] 氧羰基 - 4 - (2, 3 - 二氯苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸的制造

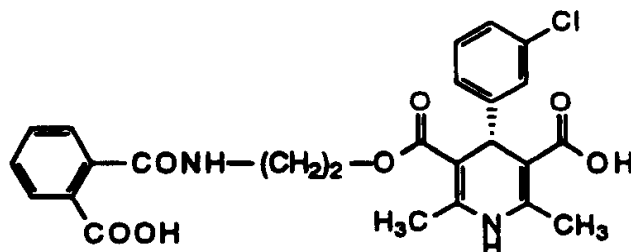


20 使用 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (2, 3 - 二氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯 50mg, 按与实施例 8 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 3.4mg。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 7.74-7.71(1H,m), 7.44-7.43(3H,m), 7.35(1H,dd,J=8.1Hz, 1.5Hz), 7.22(1H,dd,J=7.7Hz,1.5Hz), 7.08(1H,t,J=7.7Hz), 5.48(1H,s), 4.26-4.20(1H,m), 4.13-4.07(1H,m), 3.61-3.52(2H,m), 2.28(3H,s), 2.24(3H,s).

FAB-MS(m/z): 531(M-H)⁻

实施例 12: (4R) - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 3 - [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙基] 氧羰基 - 4 - (3 - 氯苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸的制造

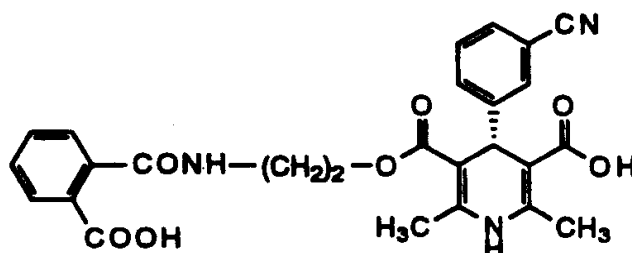


5 使用由实施例 3 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氯苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯 50mg, 按与实施例 8 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 4.0mg.

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 7.68-7.66(1H,m), 7.43-7.37(3H,m), 7.21-7.17(2H,m), 7.09-7.01(2H,m), 5.02(1H,s), 4.26-4.16(2H,m), 3.59-3.57(2H,m), 2.33(3H,s), 2.28(3H,s).

10 $\text{FAB-MS}(\text{m/z})$: 497(M-H) $^-$

实施例 13: (4R) - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 3 - [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙基] 氧羰基 - 4 - (3 - 氰基苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸的制造

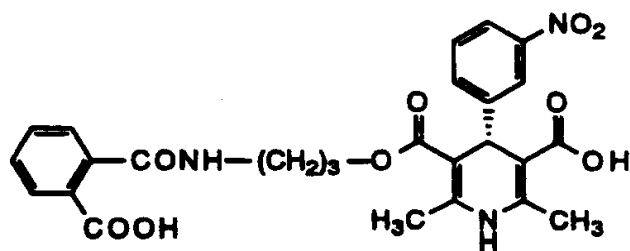


15 使用由实施例 5 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 氰基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 [2 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基乙] 酯 50mg, 按与实施例 8 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 8.2mg.

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 7.73-7.71(1H,m), 7.59-7.55(2H,m), 7.47-7.39(4H,m), 7.30(1H,t,J=7.7Hz), 5.05(1H,s), 4.28-4.22(1H,m), 4.20-4.15(1H,m), 3.59-3.57(2H,m), 2.34(3H,s), 2.30(3H,s).

20 $\text{FAB-MS}(\text{m/z})$: 488(M-H) $^-$

实施例 14: (4R) - 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 3 - [3 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基丙基] 氧羰基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 5 - 羧酸的制造



使用由实施例 7 制得的 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二〔3 - (2 - 羧基苯甲酰基) 氨基丙〕酯 50mg, 按与实施例 8 同样的方法反应、处理、纯化, 得到标题化合物 2.8 mg.

5 $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 8.11(1H,t,J=1.8Hz), 8.00-7.97(1H,m), 7.79-7.77(1H,m), 7.69(1H,d,J=7.7Hz), 7.48-7.43(4H,m), 5.11(1H,s), 4.15(2H,t,J=6.2Hz), 3.35(2H,t,J=6.6Hz), 2.36(3H,s), 2.33(3H,s), 1.95-1.90(2H,m).

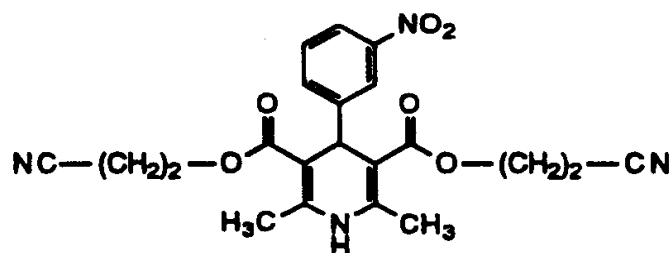
FAB-MS(m/z): 522(M-H) $^-$

10 试验例 1: 在水中的溶解性试验

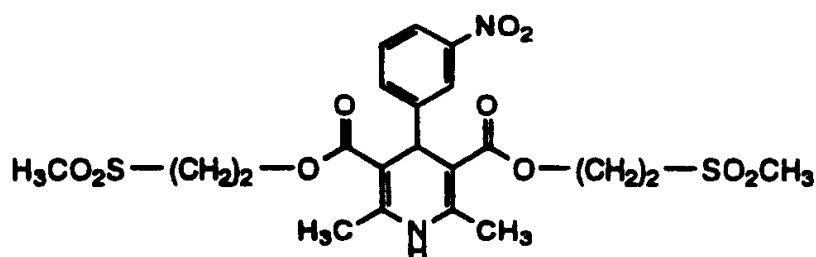
测定由参考例 4、实施例 1 和 7 制得的化合物在 0.05M 磷酸缓冲液 (PB) (pH8) 和 0.01M 磷酸缓冲液 (PB) (pH9) 中的溶解度。测定系将磷酸缓冲液 1 - 10ml 和底物 1 - 50mg 混合后, 用电磁搅拌器搅拌 1 分钟, 根据不溶物的有无求出临界值 (溶解度)。

15 此外, 作为对照化合物, 对

A: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 氰基乙) 酯、

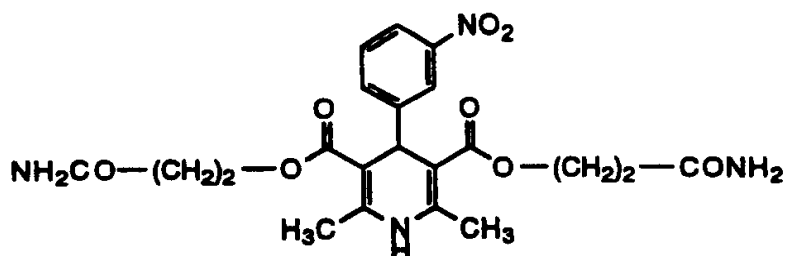


B: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (2 - 甲磺酰基乙) 酯



和

C: 1, 4 - 二氢 - 2, 6 - 二甲基 - 4 - (3 - 硝基苯基) 吡啶 - 3, 5 - 二羧酸二 (氨基甲酰基甲) 酯



5

的溶解度也同样地进行测定。结果见表 1。

表 1 二氢吡啶衍生物的溶解度 (mg/ml)

10

底物编号	0.05M PB (pH8)	0.01M PB (pH9)
参考例 4	102	> 50
实施例 1	373	> 50
实施例 7	> 50	> 50
A (对照)	0.006	< 0.1
B (对照)	0.109	< 0.1
C (对照)	0.106	- -

由表 1 可知, 本发明化合物在成为生化反应的介质的磷酸缓冲液中的溶解度远大于惯用的对照化合物 (A、B、C), 可高效率地进行反应。

15 试验例 2: 酶反应的转换率

使用参考例 4、实施例 1 的化合物和上述试验例 1 记载的化合物 A (对照化合物), 测定用 A - 914 菌株纯化酶粗品进行的不对称水解反应的反应转换率。

反应是在底物浓度为 10mg/ml 的 0.25M 磷酸缓冲液 (pH9.0) 中在振荡机上, 于 40 °C 振荡 48 小时来进行的。然后通过 HPLC 分析反应混合物。HPLC 的分析条件如下所示。

20

HPLC 条件

[参考例 4 的化合物和对照化合物 A]

色谱柱: YMCA - 302 (4.6ID × 150mm)

移动相: 0.02M KH₂PO₄-磷酸 (pH3.0) : 甲醇 = 60 : 40, 0.5ml/分

25 检测: UV350nm

标准洗出时间：参考例 4 的化合物： 4.3 分钟，生成物： 7.2 分钟
对照化合物 A : 10.9 分钟，生成物： 12.3 分钟

〔实施例 1 的化合物〕

色谱柱： Kaseisorb LC ODS SUPER (4.6ID × 150mm)

5 移动相： 60 % 甲醇： 乙酸 = 1000 : 1 , 0.8ml/分

检测： UV254nm

标准洗出时间： 7.9 分钟，生成物： 5.3 分钟

结果见表 2。

10

表 2

底物编号	反应转换率
参考例 4	61.7 %
实施例 1	65.3 %
A (对照)	18.5 %

从表 2 可知，本发明化合物在使用酶的不对称水解反应中，与惯用的对照化合物 (A) 相比，具有很高的转换效率。