



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111465699 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 20

(21) 申请号 201880074226.2

(22) 申请日 2018.11.16

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111465699 A

(43) 申请公布日 2020.07.28

(30) 优先权数据
17202282.4 2017.11.17 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.15

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/081517 2018.11.16

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/096973 EN 2019.05.23

(73) 专利权人 恩齐米克斯公司
地址 德国格赖夫斯瓦尔德
专利权人 罗斯托克大学

(72) 发明人 扬·冯朗格曼 丹尼斯·胡斯韦德
马尔科·滕茨勒
乌尔夫·梅尼耶斯 菲利普·聚斯

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事
务所(普通合伙) 11413
专利代理师 陈丹丹 刘继富

(51) Int.Cl.
C12P 13/00 (2006.01)

(56) 对比文件
EP 3486324 A1, 2019.05.22
WO 2011026556 A1, 2011.03.10
HOLSEWEDE ET AL. Development of an in situ-product crystallization (ISPC)-concept to shift the reaction equilibria of selected amine transaminase-catalyzed reactions.《EUROPEAN JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY》.2018,1-5.

HULSEWEDE ET AL. Application of in situ product crystallization and related techniques in biocatalytic processes.《CHEMISTRY - A EUROPEAN JOURNAL》.2018,第25卷(第2期),1-15.

审查员 杨光

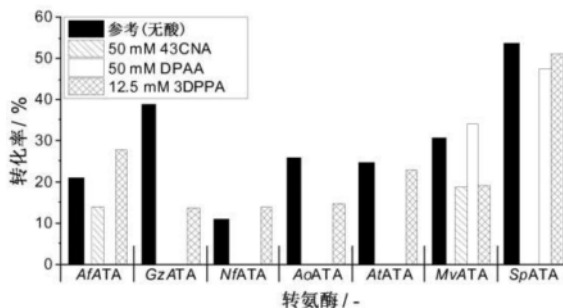
权利要求书6页 说明书39页
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

在盐沉淀下通过转氨酶反应由羰基化合物制备胺的方法

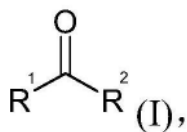
(57) 摘要

本发明涉及一种制备氨基盐化合物的方法,该方法包括:i)提供羰基化合物;ii)使根据(i)提供的羰基化合物在转氨酶存在下与ii-a)至少一种伯胺和ii-b)至少一种羧酸反应;从而获得包含至少部分结晶的氨基盐化合物的混合物,该氨基盐化合物包含阳离子和基于根据(ii-b)添加的至少一种羧酸的羧酸根阴离子。本发明还涉及通过该方法获得或可获得的氨基盐化合物以及该氨基盐化合物本身。此外,本发明涉及一种组合物,其包含:a)通式(IIa)的胺;和b)至少一种通式(III)的羧酸。



1. 一种制备氨基盐化合物的方法,其包括:

i) 提供通式 (I) 的羰基化合物



其中

R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-O-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中在多于一个脂族、杂脂族、芳香族或杂芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ;和

R^2 选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C5烷基-O-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C5-C10芳基、C6-C10烷基芳基和C6-C10芳基烷基,其中在多于一个芳香族环体系的情况下,环体系是稠合的或分开的,其中残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} ;或

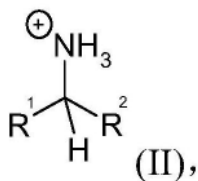
R^1 、 R^2 一起形成C3-C10环烷基或C3-C10环烯基,其中C3-C10环烷基或C3-C10环烯基各自具有至少一个选自氢原子、C1-C5烷基、C1-C4杂烷基和C1-C5烷基- R^y 的取代基 R^x ,其中 R^y 是羟基或巯基;

ii) 在转氨酶的存在下使根据 (i) 提供的羰基化合物与以下物质反应:

ii-a) 至少一种伯胺;和

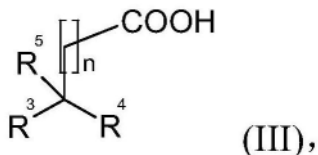
ii-b) 至少一种羧酸;

从而获得包含至少部分结晶的氨基盐化合物的混合物,该氨基盐化合物包含通式 (II) 的阳离子和基于根据 (ii-b) 添加的至少一种羧酸的羧酸根阴离子,



其中 R^1 和 R^2 如通式 (I) 所定义;

其中根据 (ii-b) 的至少一种羧酸为通式 (III) 的羧酸



其中

n 为零或1;残基 R^3 和 R^4 均为苯基或一起形成苯环,其中苯环具有至少一个选自氢原子、卤素原子的其他取代基;残基 R^5 为氢原子或甲基,或如果 R^3 和 R^4 一起形成苯环,则 R^5 不存在。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中取代基 R^{1a} 和取代基 R^{2a} 各自独立地选自F、Cl、Br、I。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中根据(ii)获得的氨基盐化合物在pH 7的水中的溶解度小于根据(ii-a)添加的至少一种伯胺在水中的溶解度。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中根据(ii)获得的氨基盐化合物在pH 7的水中的溶解度 $\leq 30\text{mmol/l}$ 。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中根据(ii)获得的氨基盐化合物在pH 7的水中的溶解度 $\leq 25\text{mmol/l}$ 。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中根据(ii)获得的氨基盐化合物在pH 7的水中的溶解度 $\leq 10\text{mmol/l}$ 。
7. 根据权利要求1或2所述的方法,其中残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C10烷基、C5-C10环烷基和C5-C20芳基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中 R^1 选自甲基、异丙基、环己基和苯基,其中苯基具有至少一个选自氢原子、卤素原子和甲氧基的取代基 R^{1a} 。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中取代基 R^{1a} 是氟或氯。
10. 根据权利要求8所述的方法,其中取代基 R^{1a} 是间甲氧基或对甲氧基。
11. 根据权利要求1或2所述的方法,其中残基 R^2 选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基,其中残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} 。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中残基 R^2 选自带支链或直链的C1-C3烷基。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中 R^2 为甲基。
14. 根据权利要求1或2所述的方法,其中根据(ii)的转氨酶选自转氨酶的组。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中根据(ii)的转氨酶选自胺类转氨酶的组。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中根据(ii)的转氨酶选自具有如SEQ ID NO 1所示的序列的来自烟曲霉的胺类转氨酶(AfATA)、具有如SEQ ID NO 2所示的序列的来自玉蜀黍赤霉的胺类转氨酶(GzATA)、具有如SEQ ID NO 3所示的序列的来自费氏新萨托菌的胺类转氨酶(NfATA)、具有如SEQ ID NO 4所示的序列的来自米曲霉的胺类转氨酶(AoATA)、具有如SEQ ID NO 5所示的序列的来自土曲霉的胺类转氨酶、具有如SEQ ID NO 6所示的序列的来自范巴伦氏分枝杆菌的胺类转氨酶(MvATA)、具有如SEQ ID NO 7所示的序列的来自Silicibacter pomeroyi的胺类转氨酶(SpATA)、和与SEQ ID NO 1至7中的任一项具有至少65%序列同一性并且与具有如SEQ ID NO 1至7所示的序列的胺类转氨酶具有相同功能的同源酶。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中根据(ii)的转氨酶选自具有如SEQ ID NO 6所示的序列的来自范巴伦氏分枝杆菌的胺类转氨酶(MvATA)、具有如SEQ ID NO 7所示的序列的来自Silicibacter pomeroyi的胺类转氨酶(SpATA)、和与SEQ ID NO 6或7中的任一项具有至少65%序列同一性并且与具有如SEQ ID NO 6或7所示的序列的胺类转氨酶具有相同功能的同源酶。
18. 根据权利要求1或2所述的方法,其中根据(ii-a)的至少一种伯胺选自具有1至10个

碳原子的一元胺和二元胺。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中根据(ii-a)的至少一种伯胺选自1,5-二氨基-戊烷(尸胺)、丙氨酸、2-氨基丁烷(仲丁胺)和2-氨基丙烷。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中2-氨基丙烷是非质子化或质子化形式的2-氨基丙烷(异丙胺),其中质子化形式与合适的阴离子组合存在。

21. 根据权利要求1或2所述的方法,其中根据(ii-b)的至少一种羧酸是选自以下的羧酸:二苯基乙酸(DPAA)、2,2-二苯基丙酸(2DPPA)、3,3-二苯基丙酸(3DPPA)、3,4-二氯苯甲酸(34CA)、3,4-二硝基苯甲酸(34NA)和4-氯-3-硝基苯甲酸(43CNA)。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中根据(ii-b)的至少一种羧酸选自二苯基乙酸(DPAA)、2,2-二苯基丙酸(2DPPA)和3,3-二苯基丙酸(3DPPA)。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中根据(ii-b)的至少一种羧酸是2,2-二苯基丙酸(2DPPA)或3,3-二苯基丙酸(3DPPA)。

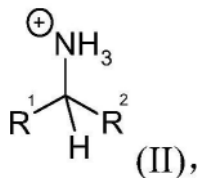
24. 根据权利要求23所述的方法,其中根据(ii-b)的至少一种羧酸至少是3DPPA。

25. 根据权利要求1或2所述的方法,其中将根据(ii-a)的至少一种伯胺和根据(ii-b)的至少一种羧酸以包含质子化形式的至少一种伯胺和去质子化形式的至少一种羧酸的一种或多种盐使用。

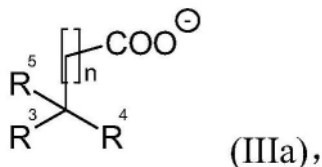
26. 根据权利要求25所述的方法,其中将根据(ii-a)的至少一种伯胺和根据(ii-b)的至少一种羧酸以包含质子化形式的至少一种伯胺和去质子化形式的至少一种羧酸的一种盐使用。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中将根据(ii-a)的至少一种伯胺和根据(ii-b)的至少一种羧酸以3,3-二苯基丙酸异丙基铵使用。

28. 根据权利要求1或2所述的方法,其中根据(ii)获得的氨基盐化合物包含通式(II)的阳离子和基于至少一种羧酸的阴离子,该阴离子为通式(IIIa)的阴离子:



其中 R^1 和 R^2 如通式(I)所定义,



其中

n 为零或1;

残基 R^3 和 R^4 均为苯基或一起形成苯环,其中苯环具有至少一个选自氢原子、卤素原子和硝基的其他取代基,残基 R^5 为氢原子或甲基,或如果 R^3 和 R^4 一起形成苯环,则 R^5 不存在。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中苯环的至少一个其他取代基是氯。

30. 根据权利要求28所述的方法,其中通式(IIIa)的阴离子选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根、3,4-二氯-苯甲酸根、3,4-二硝基-苯甲酸根和4-氯-3-硝

基-苯甲酸根。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中通式(IIIa)的阴离子选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中通式(IIIa)的阴离子是2,2-二苯基丙酸根或3,3-二苯基丙酸根。

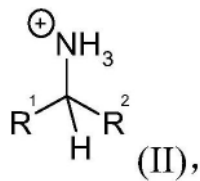
33. 根据权利要求32所述的方法,其中通式(IIIa)的阴离子是3,3-二苯基丙酸根。

34. 根据权利要求1或2所述的方法,其还包括:

iii) 从混合物中分离根据(ii)获得的至少部分结晶的胺盐化合物,从而获得结晶的胺盐化合物。

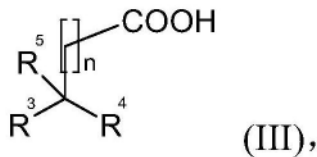
35. 通过根据权利要求1至10任一项所述的方法获得的或能够获得的氨基盐化合物,所述氨基盐化合物包含

-通式(II)的阳离子和基于根据(ii-b)添加的至少一种羧酸的羧酸根阴离子,



其中 R^1 和 R^2 如权利要求1中通式(I)所定义;

其中根据(ii-b)的至少一种羧酸为通式(III)的羧酸

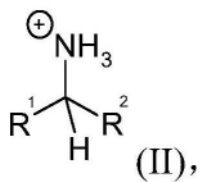


其中

n 为零或1;残基 R^3 和 R^4 均为苯基或一起形成苯环,其中苯环具有至少一个选自氢原子、卤素原子的其他取代基;残基 R^5 为氢原子或甲基,或如果 R^3 和 R^4 一起形成苯环,则 R^5 不存在。

36. 一种氨基盐化合物,其包含

-通式(II)的阳离子



其中

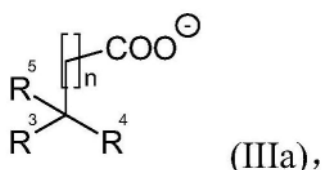
R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中在多于一个脂族、杂脂族、芳香族或杂芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ;和

R^2 选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C5-C10芳基、C6-C10烷基芳基和C6-C10芳基烷基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系是稠合的或分开的,其中残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} ;或

R^1 、 R^2 一起形成C3-C10环烷基或C3-C10环烯基,其中C3-C10环烷基或C3-C10环烯基各自具有至少一个选自氢原子、C1-C5烷基、C1-C4杂烷基和C1-C5烷基- R^y 的取代基 R^x ,其中 R^y 是羟基或巯基;

和

-通式(IIIa)的阴离子



其中

n 为零或1;

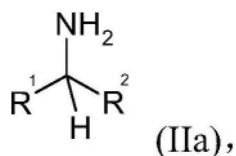
残基 R^3 和 R^4 均为苯基或一起形成苯环,其中苯环具有至少一个选自氢原子、卤素原子和硝基的其他取代基;残基 R^5 是氢原子或甲基,或如果 R^3 和 R^4 一起形成苯环,则 R^5 不存在。

37. 根据权利要求36所述的氨基盐化合物,其中取代基 R^{1a} 和取代基 R^{2a} 各自独立地选自F、Cl、Br、I。

38. 根据权利要求36所述的氨基盐化合物,其中苯环的至少一个其他取代基是氯。

39. 一种组合物,其包含:

a) 通式(IIa)的胺



其中

R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中在多于一个脂族、杂脂族、芳香族或杂芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ;和

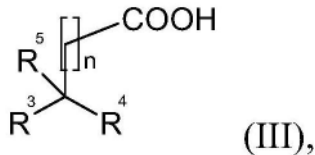
R^2 选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C5-C10芳基、C6-C10烷基芳基和C6-C10芳基烷基,其中在多于一个芳香族环体系的情况下,环体系是稠合的或分开的,其中残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取

代基 R^{2a} ;或

R^1 、 R^2 一起形成C3-C10环烷基或C3-C10环烯基,其中C3-C10环烷基或C3-C10环烯基各自具有至少一个选自氢原子、C1-C5烷基、C1-C4杂烷基和C1-C5烷基- R^y 的取代基 R^x ,其中 R^y 是羟基或巯基;

和

b) 至少一种通式(III)的羧酸



其中

n 为零或1;

残基 R^3 和 R^4 均为苯基或一起形成苯环,其中苯环具有至少一个选自氢原子、卤素原子和硝基的其他取代基;残基 R^5 是氢原子或甲基,或如果 R^3 和 R^4 一起形成苯环,则 R^5 不存在,其中至少一种羧酸以其质子化形式存在或作为具有合适反荷离子的羧酸盐存在。

40. 根据权利要求39所述的组合物,其中取代基 R^{1a} 和取代基 R^{2a} 各自独立地选自F、Cl、Br、I。

41. 根据权利要求39所述的组合物,其中苯环的其他取代基是氯。

42. 根据权利要求39所述的组合物,其中所述组合物包含根据(a)的胺,其量为90重量%至99.9重量%。

43. 根据权利要求42所述的组合物,其中所述组合物包含根据(a)的胺,其量为95重量%至99.9重量%。

44. 根据权利要求43所述的组合物,其中所述组合物包含根据(a)的胺,其量为98重量%至99.9重量%。

45. 根据权利要求39至44中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含根据(b)的至少一种羧酸,其量为至少0.003重量%。

46. 根据权利要求45所述的组合物,其中所述组合物包含根据(b)的至少一种羧酸,其量为0.003重量%至5重量%。

47. 根据权利要求46所述的组合物,其中所述组合物包含根据(b)的至少一种羧酸,其量为0.003重量%至3重量%。

在盐沉淀下通过转氨酶反应由羰基化合物制备胺的方法

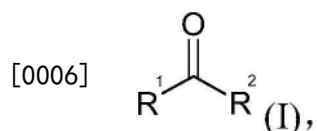
[0001] 本发明涉及一种制备氨基盐化合物的方法,该方法包括:i)提供羰基化合物;ii)使根据(i)提供的羰基化合物在转氨酶存在下与ii-a)至少一种伯胺,和ii-b)至少一种羧酸反应,从而获得包含至少部分结晶的氨基盐化合物的混合物,该氨基盐化合物包含氨基阳离子和基于(ii-b)添加的至少一种羧酸的羧酸根阴离子。

[0002] 在过去的几十年中,生物转化已成为在实验室和工业规模上合成有价值的化合物的强大技术。近年来,依赖5'-磷酸吡哆醛(PLP)的转氨酶(TA),尤其是胺类转氨酶(ATA)在光学纯胺的合成中获得了显著的影响,该光学纯胺是各种农用化学品和活性药物成分(例如西他列汀)的有价值的结构单元。这些酶主要催化伯胺(胺供体)的脱氨作用,同时催化醛或酮(胺受体)的氨基化。转氨反应可以以外消旋胺的动力学拆分或由相应的前手性酮的不对称合成来进行。由于最大产率为100%,理论上优选不对称合成,特别是在使用具有高对映选择性的催化剂的情况下。不幸的是,热力学的局限性和某些产物的抑制趋向于限制转氨酶在不对称合成中的适用性,这需要为合成目的而克服。除了使用不经济的过量的胺供体以外,目前还考虑了复杂的(副)产物去除技术,例如酶级联反应、膜工艺和非催化副反应。不幸的是,这样的技术总是(通常)增加了生物催化反应系统的总体复杂性、需要额外的或量身定制的共底物并产生更多的副产物。

[0003] 因此,本发明的目的是提供一种克服上述缺点的通过生物转化,特别是使用转氨酶来制备所需产物胺的方法。

[0004] 通过制备氨基盐化合物的方法实现了该目的,该方法包括:

[0005] i)提供通式(I)的羰基化合物



[0007] 其中

[0008] R¹选自带支链或直链的C₂-C₂₀烷基、带支链或直链的C₂-C₂₀烯基、带支链或直链的C₂-C₂₀炔基、带支链或直链的C₁-C₅烷基-0-C₁-C₅烷基、带支链或直链的C₁-C₁₀烷氧基、C₄-C₂₀环烷基、C₅-C₂₀环烯基、C₅-C₂₀环炔基、C₅-C₂₀芳基、C₆-C₂₀烷基芳基、C₆-C₂₀芳基烷基、C₂-C₂₀杂烷基、C₃-C₂₀环杂烷基、C₄-C₂₀杂芳基、C₅-C₂₀烷基杂芳基和C₅-C₂₀杂芳基烷基,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中残基R¹具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C₁-C₃硫代酸酯、C₁-C₃硫醚、C₁-C₃烷基和C₁-C₃烷氧基的取代基R^{1a};和

[0009] R²选自氢原子、带支链或直链的C₁-C₅烷基、带支链或直链的C₁-C₅烷基-0-C₁-C₅烷基、带支链或直链的C₁-C₁₀烷氧基、C₅-C₁₀芳基、C₆-C₁₀烷基芳基和C₆-C₁₀芳基烷基,其中在多于一个芳香族环体系的情况下,环体系是稠合的或分开的,其中残基R²具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C₁-C₃硫代酸酯、C₁-C₃硫醚、C₁-C₃烷基和C₁-C₃烷氧基的取代基R^{2a};或

[0010] R¹、R²一起形成C₃-C₁₀环烷基或C₃-C₁₀环烯基,其中C₃-C₁₀环烷基或C₃-C₁₀环烯基

各自具有至少一个选自氢原子、C1-C5烷基、C1-C4杂烷基和C1-C5烷基-R^y的取代基R^x,其中R^y是羟基或巯基;

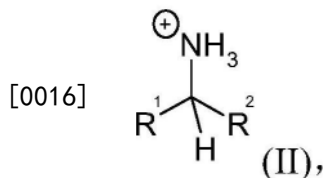
[0011] ii) 在转氨酶的存在下使根据(i)提供的羰基化合物与以下物质发生反应

[0012] ii-a) 至少一种伯胺;和

[0013] ii-b) 至少一种羧酸;

[0014] 从而获得包含至少部分结晶的氨基盐化合物的混合物,该化合物包含

[0015] -通式(II)的阳离子



[0017] 其中R¹和R²如通式(I)所定义,和

[0018] -基于根据(ii-b)添加的至少一种羧酸的羧酸根阴离子。

[0019] 表述“氨基盐化合物”包含如上所述的阳离子和阴离子。氨基盐化合物可以以纯盐化合物(非溶剂化的、无水的)或以溶剂合物或水合物或其混合物的形式存在,其中水合物包括半水合物、一水合物和多水合物,并且溶剂合物包括半溶剂合物、一溶剂合物和多溶剂合物。“至少部分结晶”是指至少50%,优选至少60%,更优选至少70%,更优选至少80%,更优选至少90%的胺盐化合物以结晶形式沉淀。

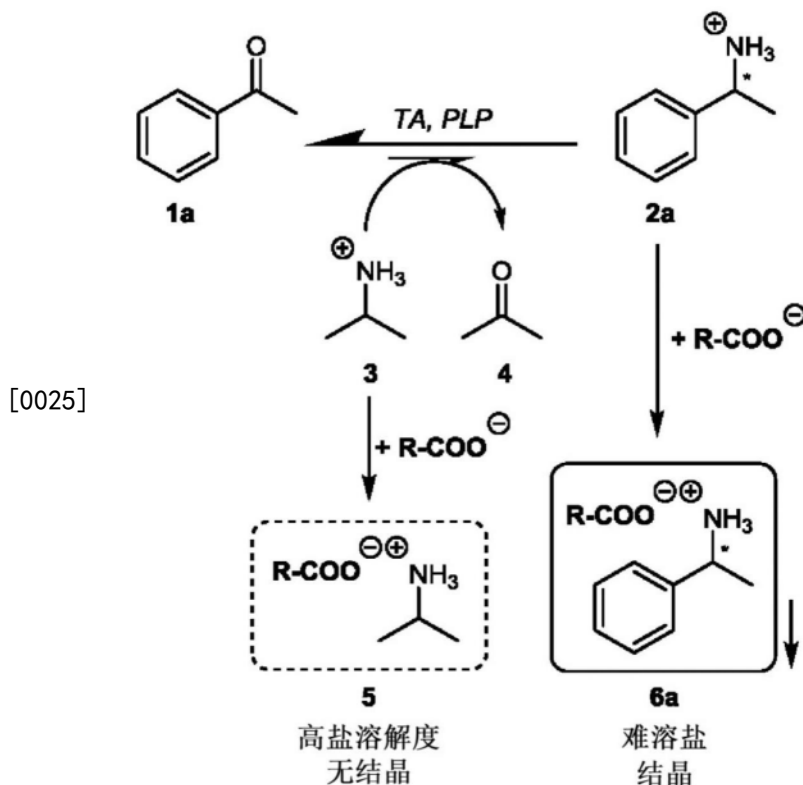
[0020] 术语“杂”是指存在杂原子,如果没有另外说明,则杂原子选自氮原子、硫原子和氧原子。杂原子作为相应链或环结构的成员存在。

[0021] 残基R^{1a}、R^{2a}如上所定义。必须注意,R^{1a}和R^{2a}都不是包含电荷的取代基,即,具有电荷的取代基被排除为R^{1a}和R^{2a}。例如,R^{1a}和R^{2a}都不是羧基/羧酸根、不是磷酸根、不是磺酸根。

[0022] 在一个优选的实施方案中,排除了R¹、R^{1a}是全氟烷基的组合。对于R²和R^{2a}同样适用,即,也排除了R²和R^{2a}是全氟烷基的组合。换句话说,R¹和R^{1a}的组合或R²和R^{2a}的组合都不是全氟烷基。

[0023] 关于R¹和R²一起形成C3-C10环烷基或C3-C10环烯基的实施方案,所示的C原子数包括位于R¹和R²之间的羰基C原子。

[0024] 利用如上所述的这种方法,发明人现在提出了一种基于结晶的方法,用于从转氨酶催化的反应中直接移出所需的产物胺。方案1显示了基于示例性的产物胺1-苯基乙胺的方法。产物胺2在本文中从溶液中选择性地结晶为几乎不溶的胺盐6,而所有其他反应物,特别是施加的供体胺(异丙胺,3)保留在溶液中。这种原位产物结晶(ISPC)使所需的产物胺不断地从溶液中移出,因此产生了偏向产物的平衡转移。将反荷离子(此处显示为羧酸根)直接添加到反应溶液中,并且反荷离子可以从形成的固体盐中分离出来再利用。与所施加的胺相比,不需要化学计量地使用羧酸盐(见下文)。



[0026] 方案1:原位产物结晶 (ISPC) 与转氨酶催化反应的结合,产生几乎不溶的1-苯基乙胺盐;所示反应物的质子化是基于pH 7.5的水溶液;TA=转氨酶,PLP=5'-磷酸吡哆醛,R=代表合适的含碳残基的示例性残基。

[0027] 首先,该概念的主要要求是选择特定的反荷离子,即特定的羧酸,其与目标胺生成几乎不溶的盐以用于其结晶,而供体胺盐不结晶。不幸的是,最常用的胺盐,特别是卤化胺盐在水溶液中显示出非常高的溶解度,因此不适用于这种ISPC概念。因此,该方法的一个优选实施方案是,根据(ii)获得的氨基盐化合物在pH 7的水中的溶解度小于根据(ii-a)添加的至少一种伯胺在水中的溶解度。该方法的更优选的实施方案是根据(ii)获得的氨基盐化合物在pH 7的水中的溶解度为 $\leq 30\text{mmol/l}$,优选 $\leq 25\text{mmol/l}$,更优选 $\leq 10\text{mmol/l}$ 。

[0028] 根据一个优选的实施方案,伯胺盐的溶解度和氨基盐化合物的溶解度之间的溶解度差($\Delta_{\text{溶解度}}$)为至少 10mmol/l 。如上所述,伯胺盐的溶解度(溶解度_{伯胺盐})高于氨基盐化合物的溶解度(溶解度_{氨基盐化合物}),即:

[0029] 溶解度_{伯胺盐} > 溶解度_{氨基盐化合物}。

[0030] 其次,所使用的转氨酶必须能够耐受所选化合物的所需浓度。第三,所形成的盐必须在工艺条件下是稳定的并且应易于从反应混合物中回收。

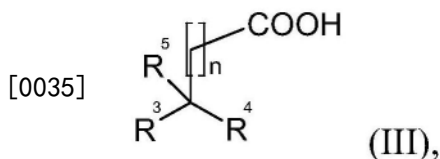
[0031] 羧酸

[0032] 根据步骤(ii),使根据(i)提供的羰基化合物在转氨酶存在下与(ii-a)至少一种伯胺和(ii-b)至少一种羧酸反应。

[0033] 关于用于(ii-b)的羧酸,选择可商购的脂族、芳香族和杂芳香族羧酸(R-COOH),并筛选为相对于转氨酶催化反应的普通胺的相应羧酸盐。1-苯基乙胺及其取代的衍生物2a-f用作模型产物胺,并与典型的供体胺如异丙胺3、外消旋2-丁胺、DL-丙氨酸和L-丙氨酸进行比较(进一步的细节参见实施例部分)。在此,产物胺的盐需要比其供体胺盐对应物具有显

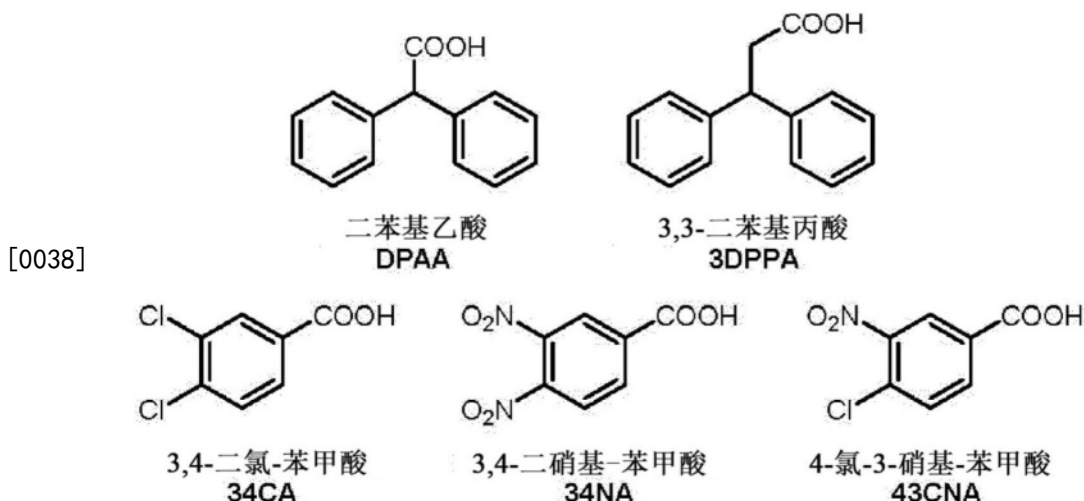
著更低的溶解度,因为供体胺仍然过量使用。

[0034] 优选地,根据(ii-b)的至少一种羧酸以其质子化形式或以具有合适反荷阳离子的去质子化形式使用。上述直接筛选方法导致如下发现:根据(ii-b)的至少一种羧酸优选为通式(III)的羧酸



[0036] 其中n为零或1;

[0037] 残基R³和R⁴均为苯基或一起形成苯环,其中每个苯环具有至少一个选自氢原子,卤素原子,优选氯,和硝基的其他取代基;残基R⁵是氢原子或甲基,或如果R³和R⁴一起形成苯环,则R⁵不存在。直接的筛选方法尤其产生了符合上述标准的两种基于苄基苯的酸和三种苯甲酸衍生物(在pH 7.5时分别为羧酸根离子)(方案2)。



[0039] 方案2:用于由转氨酶催化反应进行胺的原位产物结晶的可能的羧酸及其缩写。

[0040] 另外,将2,2-二苯基丙酸(2DPPA)鉴定为合适的羧酸。因此,该方法的优选实施方案涉及根据(ii-b)的至少一种羧酸是选自二苯基乙酸(DPA)、2,2-二苯基丙酸(2DPPA)、3,3-二苯基丙酸(3DPPA)、3,4-二氯-苯甲酸(34CA)、3,4-二硝基-苯甲酸(34NA)和4-氯-3-硝基-苯甲酸(43CNA)的羧酸。更优选地,根据(ii-b)的至少一种羧酸选自二苯基乙酸(DPA)、2,2-二苯基丙酸(2DPPA)和3,3-二苯基丙酸(3DPPA),更优选2,2-二苯基丙酸(2DPPA)或3,3-二苯基丙酸(3DPPA),更优选至少3DPPA。

[0041] 羰基化合物

[0042] 根据步骤(i),提供通式(I)的羰基化合物。优选地,

[0043] R¹选自带支链或直链的C₂-C₂₀烷基、带支链或直链的C₂-C₂₀烯基、带支链或直链的C₂-C₂₀炔基、带支链或直链的C₁-C₅烷基-0-C₁-C₅烷基、带支链或直链的C₁-C₁₀烷氧基、C₄-C₂₀环烷基、C₅-C₂₀环烯基、C₅-C₂₀环炔基、C₅-C₂₀芳基、C₆-C₂₀烷基芳基、C₆-C₂₀芳基烷基、C₂-C₂₀杂烷基、C₃-C₂₀环杂烷基、C₄-C₂₀杂芳基、C₅-C₂₀烷基杂芳基和C₅-C₂₀杂芳基烷基,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为耦合的或分开的,其中每个残基R¹具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C₁-C₃硫代酸

酯、C1-C3硫醚, C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ; 和

[0044] R^2 选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C5-C10芳基、C6-C10烷基芳基和C6-C10芳基烷基, 其中在多于一个芳香族环体系的情况下, 环体系是稠合的或分开的, 其中每个残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} 。

[0045] 更优选地, 残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基, 其中C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基中的杂原子是氧或硫, 并且C2-C20杂烷基和C3-C20环杂烷基中的杂原子选自氧、硫和氮, 其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下, 环体系为稠合的或分开的, 其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚, C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。

[0046] 根据该方法的优选实施方案, 残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基, 其中杂原子选自氧、硫和氮, 其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下, 环体系为稠合的或分开的, 其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚, C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。根据该方法的更优选的实施方案, 残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基和C5-C20芳基, 其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下, 环体系为稠合的或分开的, 其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。根据该方法的更优选的实施方案, 残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C10烷基、C5-C10环烷基和C5-C20芳基, 其中在多于一个脂族基或芳香族环体系的情况下, 环体系为稠合的或分开的, 其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ; R^1 优选选自甲基、异丙基、环己基和苯基, 其中苯基具有至少一个选自氢原子、卤素原子, 优选氟或氯, 和甲氧基, 优选间甲氧基或对甲氧基的取代基 R^{1a} 。

[0047] 对于 R^1 是带支链或直链的C2-C20烷基或带支链或直链的C2-C20烯基, 优选的实施方案涉及 R^1 是带支链或直链的C4-C20烷基或带支链或直链的C4-C20烯基。

[0048] 根据该方法的一个优选实施方案, 残基 R^2 选自氢原子、带支链或直链C1-C5烷基, 其中每个残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} 。根据该方法的更优选的实施方案, 残基 R^2 选自带支链或直链C1-C3烷基, R^2 优选为甲基。

[0049] 转氨酶

[0050] 根据步骤(ii), 使根据(i)提供的羰基化合物在转氨酶的存在下反应。优选地, 根据(ii)的转氨酶选自转氨酶的组, 优选选自胺类转氨酶的组, 更优选选自根据SEQ ID NO 1

的来自烟曲霉 (*Aspergillus fumigates*) 的胺类转氨酶 (AfATA)、根据SEQ ID NO 2的来自玉蜀黍赤霉 (*Gibberella zeae*) 的胺类转氨酶 (GzATA)、根据SEQ ID NO 3的来自费氏新萨托菌 (*Neosartorya fischeri*) 的胺类转氨酶 (NfATA)、根据SEQ ID NO 4的来自米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的胺类转氨酶 (AoATA)、根据SEQ ID NO 5的来自土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 的胺类转氨酶、根据SEQ ID NO 6的来自范巴伦氏分枝杆菌 (*Mycobacterium vanbaalenii*) 的胺类转氨酶 (MvATA)、根据SEQ ID NO 7的来自 *Silicibacter pomeroyi* 的胺类转氨酶 (SpATA)、和与SEQ ID NO 1至7中的任一项具有至少65%序列同一性并且与SEQ ID NO 1至7的胺类转氨酶具有相同功能的同源酶,更优选选自根据SEQ ID NO 6的来自范巴伦氏分枝杆菌的胺类转氨酶 (MvATA)、根据SEQ ID NO 7的来自 *Silicibacter pomeroyi* 的胺类转氨酶 (SpATA)、和与SEQ ID NO 6或7中的任一项具有至少65%序列同一性并且与SEQ ID NO 6或7的胺类转氨酶具有相同功能的同源酶。表1列出了优选的胺类转氨酶的情况:

[0051] 表1:SEQ ID No 1至7的胺类转氨酶

名称	缩写	SEQ ID NO.	NCBI*登记号	GenBank*登记号
来自烟曲霉的胺类转氨酶	AfATA	1	XP_748821.1	
来自玉蜀黍赤霉的胺类转氨酶	GzATA	2	XP_011317603.1	
来自费氏新萨托菌的胺类转氨酶	NfATA	3	XP_001261640.1	
来自米曲霉的胺类转氨酶	AoATA	4		BAE56564.1
来自土曲霉的胺类转氨酶	AtATA	5	XP_001209325.1	
来自范巴伦氏分枝杆菌的胺类转氨酶	MvATA	6	WP_083062280.1	
来自 <i>Silicibacter pomeroyi</i> 的胺类转氨酶	SpATA	7	WP_011049154.1	

[0053] *国家生物技术信息中心 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的数据库,状态:2017年10月24日

[0054] 表述“与SEQ ID NO 1至7中任一项的胺类转氨酶具有相同功能”是指该同源酶催化胺类转氨酶反应的效率至少为SEQ ID NO 1至7中任一项的转氨酶催化效率的90%。优选地,同源酶与SEQ ID NO 1至7中的任一项具有至少75%,优选至少85%,更优选至少90%,更优选至少95%,更优选至少98%,更优选至少99%的序列同一性,并且与SEQ ID NO 1至7的胺类转氨酶具有相同的功能。

[0055] 伯胺

[0056] 根据步骤(ii),使根据(i)提供的羰基化合物在转氨酶存在下与ii-a)至少一种伯

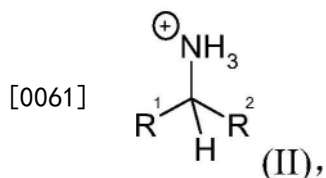
胺和ii-b)至少一种羧酸反应。优选地,根据(ii-a)的至少一种伯胺以非质子化形式或以具有合适反荷阴离子的质子化形式使用。

[0057] 根据该方法的优选实施方案,根据(ii-a)的至少一种伯胺选自具有1至10个碳原子的一元胺和二元胺,优选选自1,5-二氨基-戊烷(尸胺)、丙氨酸、2-氨基丁烷(仲丁胺)和2-氨基丙烷,优选非质子化或质子化形式的2-氨基丙烷(异丙胺),其中质子化形式与合适的阴离子组合存在。

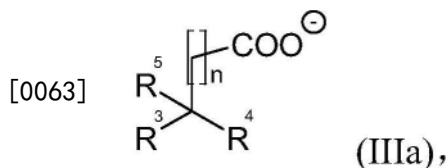
[0058] 根据该方法的一个更优选的实施方案,将根据(ii-a)的至少一种伯胺和根据(ii-b)的至少一种羧酸以包含质子化形式的至少一种伯胺和去质子化形式的至少一种羧酸的一种或多种盐使用,优选以包含质子化形式的至少一种伯胺和去质子化形式的至少一种羧酸的一种盐使用,更优选以3,3-二苯基丙酸异丙基铵使用。

[0059] 氨基盐化合物

[0060] 根据步骤(ii),获得氨基盐化合物。优选地,根据(ii)获得的氨基盐化合物包含通式(II)的阳离子和基于至少一种羧酸的阴离子,其优选为通式(IIIa)的阴离子:



[0062] 其中R¹和R²如通式(I)所定义,



[0064] 其中n为零或1;

[0065] 残基R³和R⁴均为苯基或一起形成苯环,其中每个苯环具有至少一个选自氢原子,卤素原子,优选氯,和硝基的其他取代基,残基R⁵为氢原子或甲基,或如果R³和R⁴一起形成苯环,则R⁵不存在;其中通式(IIIa)的阴离子优选选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根、3,4-二氯-苯甲酸根、3,4-二硝基-苯甲酸根和4-氯-3-硝基苯甲酸根,更优选选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根,更优选2,2-二苯基丙酸根或3,3-二苯基丙酸根,更优选3,3-二苯基丙酸根。

[0066] 其他反应条件

[0067] 根据该方法的优选实施方案,根据(ii)的反应在水溶液中进行,以水溶液的总重量为基准计,该水溶液优选包含至少80重量%,更优选至少90重量%,更优选至少95重量%,更优选至少98重量%的水。水溶液优选包含缓冲液,优选选自三(羟甲基)氨基甲烷缓冲液(TRIS缓冲液)、3-(N-吗啉代)丙烷磺酸缓冲液(MOPS缓冲液)、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸缓冲液(BES缓冲液)、N-(三(羟基甲基)甲基)甘氨酸缓冲液(Tricine缓冲液)、碳酸盐缓冲液、N-环己基-2-氨基乙磺酸缓冲液(CHES缓冲液)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸缓冲液(HEPES缓冲液)和磷酸盐缓冲液,更优选至少磷酸盐缓冲液。

[0068] 根据该方法的更优选的实施方案,根据(ii)的反应在6.0至9.5的pH值下进行,更优选在6.5至9.0的pH值下进行,更优选在7.0至8.0的pH值下进行。根据该方法的更优选的

实施方案,根据(ii)的反应进行至少1小时,更优选进行1小时至1000小时,更优选进行5小时至500小时,更优选进行10小时至200小时。根据该方法的另一优选实施方案,根据(ii)的反应在10°C至50°C的温度下进行,更优选在15°C至45°C的温度下进行,更优选在20°C至40°C的温度下进行,更优选在25°C至35°C的温度下进行。

[0069] 根据该方法的更优选的实施方案,对于至少一种羧酸是根据通式(III)的羧酸,其中残基 R^3 和 R^4 一起形成苯环,优选选自以下的羧酸:3,4-二氯-苯甲酸(34CA)、3,4-二硝基-苯甲酸(34NA)和4-氯-3-硝基-苯甲酸(43CNA),在步骤(ii)中,将至少一种羧酸的浓度保持为0.001mM至50mM,优选为1mM至45mM,更优选为5mM至40mM。根据该方法的更优选的实施方案,对于至少一种羧酸是根据通式(III)的羧酸,其中残基 R^3 和 R^4 各自为苯环,优选选自以下的羧酸:二苯基乙酸(DPAA)、2,2-二苯基丙酸(2DPPA)和3,3-二苯基丙酸(3DPPA),在步骤(ii)中,至少一种羧酸的浓度为 ≤ 50 mM。

[0070] 其他反应步骤

[0071] 如上所述,该方法包括反应步骤(i)和(ii)。根据优选实施方案,该方法还包括:

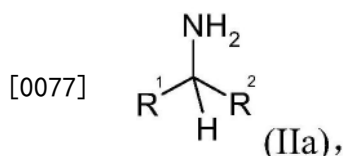
[0072] iii)从混合物中分离根据(ii)获得的至少部分结晶的胺盐化合物,从而获得结晶的胺盐化合物。

[0073] 优选通过沉淀、离心或过滤,优选通过过滤从混合物中分离根据(iii)的结晶的胺盐化合物。

[0074] 根据更优选的实施方案,除(i)、(ii)和(iii)之外,该方法还包括:

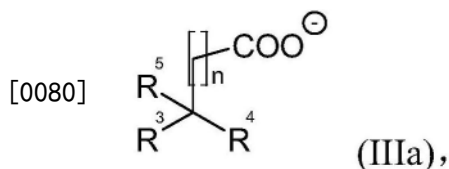
[0075] (iv)任选地,优选用水或有机溶剂或其混合物,更优选用水或甲基叔丁基醚或其混合物洗涤根据(iii)获得的分离的结晶的氨基盐化合物,从而获得洗涤的结晶的氨基盐化合物;

[0076] (v)将根据(iii)获得的结晶的氨基盐化合物或任选地根据(iv)获得的洗涤的结晶的氨基盐化合物溶解在包含至少一种碱、优选包含氢氧根离子的碱且pH值为10至14的水溶液中,从而获得包含通式(IIa)的胺的水溶液:



[0078] 其中 R^1 和 R^2 如通式(I)所定义;

[0079] (vi)用与水不混溶的有机溶剂萃取根据(v)获得的水溶液至少一次,从而获得包含至少部分通式(IIa)的胺的有机相和包含至少部分通式(IIIa)的阴离子的水相:



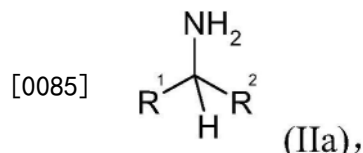
[0081] 其中n为零或1;并且其中残基 R^3 和 R^4 均为苯基或一起形成苯环,其中每个苯环具有至少一个选自氢原子,卤素原子,优选氯,和硝基的其他取代基,残基 R^5 为氢原子或甲基,或如果 R^3 和 R^4 一起形成苯环,则 R^5 不存在;其中通式(IIIa)的阴离子优选选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根、3,4-二氯-苯甲酸根、3,4-二硝基-苯甲酸根和4-

氯-3-硝基苯甲酸根,更优选选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根,更优选2,2-二苯基丙酸根或3,3-二苯基丙酸根,更优选3,3-二苯基丙酸根。

[0082] 根据(vi)的与水不混溶的有机溶剂的 K_{ow} 值优选为至少0.5,更优选为至少0.6,更优选为至少0.7,更优选为至少0.8。根据一个优选的实施方案,根据(vi)的与水不混溶的有机溶剂选自醚,更优选选自脂族醚,更优选MTBE(甲基叔丁基醚)。

[0083] 根据更优选的实施方案,除(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)和(vi)之外,该方法还优选包括:

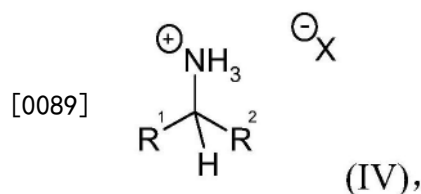
[0084] (vii-a)从(vi)中获得的有机相中除去与水不混溶的有机溶剂,从而获得通式(IIa)的胺,



[0086] 其中 R^1 和 R^2 如通式(I)所定义。

[0087] 根据替代的优选实施方案,除(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)和(vi)之外,该方法还优选包括:

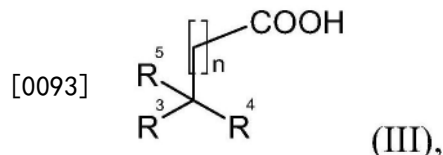
[0088] (vii-b)向根据(vi)获得的有机相中加入至少一种酸HX,优选HCl,从而获得通式(IV)的盐



[0090] 其中 R^1 和 R^2 如通式(I)和(II)所定义,并且X是基于至少一种酸HX的离子,优选Cl⁻的离子。

[0091] 根据一个替代的优选实施方案,除(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)和(vii-a)之外,或除(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)和(vii-b)之外,该方法优选还包括:

[0092] (viii)任选地通过将pH值调节至0至6,优选通过加入HCl使来自根据(vi)获得的水相的至少一种通式(III)的羧酸沉淀:



[0094] 其中

[0095] n为零或1;

[0096] 残基 R^3 和 R^4 均为苯基或一起形成苯环,其中每个苯环具有至少一个选自氢原子,卤素原子,优选氯,和硝基的其他取代基,残基 R^5 为氢原子或甲基,或如果 R^3 和 R^4 一起形成苯环,则 R^5 不存在;优选地,至少一种羧酸选自二苯基乙酸(DPAA)、2,2-二苯基丙酸(2DPPA)、3,3-二苯基丙酸(3DPPA)、3,4-二氯苯甲酸(34CA)、3,4-二硝基苯甲酸(34NA)和4-氯-3-硝基苯甲酸(43CNA),更优选选自二苯基乙酸(DPAA)、2,2-二苯基丙酸(2DPPA)和3,3-二苯基

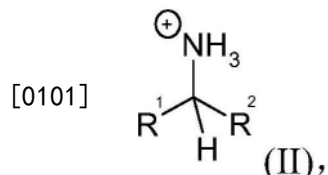
丙酸(3DPPA),更优选2,2-二苯基丙酸(2DPPA)或3,3-二苯基丙酸(3DPPA),更优选至少3DPPA,和

[0097] (ix) 任选地使根据(viii)沉淀的至少一种羧酸再循环至上述过程,优选再循环至步骤(ii)。

[0098] 本发明还涉及通过上述方法获得的或可获得的氨基盐化合物。

[0099] 在另一方面,本发明涉及一种氨基盐化合物,其包含

[0100] -通式(II)的阳离子



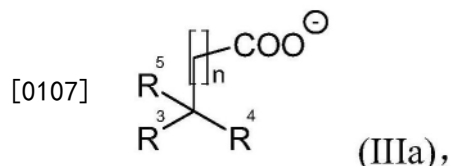
[0102] 其中

[0103] R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-O-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ;和

[0104] R^2 选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C5烷基-O-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C5-C10芳基、C6-C10烷基芳基和C6-C10芳基烷基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系是稠合的或分开的,其中每个残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} ;或

[0105] R^1 、 R^2 一起形成C3-C10环烷基或C3-C10环烯基,其中C3-C10环烷基或C3-C10-环烯基各自具有至少一个选自氢原子、C1-C5烷基、C1-C4杂烷基和C1-C5烷基- R^y 的取代基 R^x ,其中 R^y 是羟基或巯基;和

[0106] -通式(IIIa)的阴离子



[0108] 其中

[0109] n为零或1;

[0110] 残基 R^3 和 R^4 均为苯基或一起形成苯环,其中每个苯环具有至少一个选自氢原子,卤素原子,优选氯,和硝基的其他取代基;残基 R^5 是氢原子或甲基,或如果 R^3 和 R^4 一起形成苯环,则 R^5 不存在。

[0111] 优选地,胺盐化合物的通式(IIIa)的阴离子选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根、3,4-二氯苯甲酸根、3,4-二硝基-苯甲酸根和4-氯-3-硝基苯甲酸

根,更优选选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根,更优选2,2-二苯基丙酸根或3,3-二苯基丙酸根,更优选3,3-二苯基丙酸根。

[0112] 根据氨基盐化合物的优选实施方式,

[0113] R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ;和

[0114] R^2 选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C5-C10芳基、C6-C10烷基芳基和C6-C10芳基烷基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系是稠合的或分开的,其中每个残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} 。

[0115] 更优选地,残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基中的杂原子是氧或硫,并且C2-C20杂烷基和C3-C20环杂烷基中的杂原子选自氧、硫和氮,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。根据氨基盐化合物的更优选的实施方式,残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。根据氨基盐化合物的更优选的实施方式,残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。根据氨基盐化合物的更优选的实施方式,残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C10烷基、C5-C10环烷基和C5-C20芳基,其中在多于一个脂族基或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ; R^1 优选选自甲基、异丙基、环己基和苯基,其中苯基具有至少一个选自氢原子、卤素原子,优选氟或氯,和甲氧基,优选间甲氧基或对甲氧基的取代基。

[0116] 对于 R^1 是带支链或直链的C2-C20烷基或带支链或直链的C2-C20烯基,优选的实施方案涉及 R^1 是带支链或直链的C4-C20烷基或带支链或直链的C4-C20烯基。

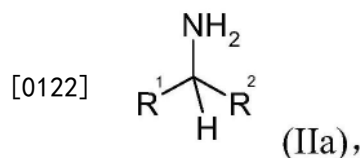
[0117] 根据另一个优选实施方案的一个优选实施方案,残基 R^2 选自氢原子、带支链或直链C1-C5烷基,其中每个残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} 。优选地,残基 R^2 选自带支链或直链C1-C3烷基, R^2 优选为甲基。

[0118] 在一个优选的实施方案中,排除了 R^1 、 R^{1a} 是全氟烷基的组合。对于 R^2 和 R^{2a} 同样适用,即,也排除了 R^2 和 R^{2a} 是全氟烷基的组合。换句话说, R^1 和 R^{1a} 的组合或 R^2 和 R^{2a} 的组合都不是全氟烷基。

[0119] 关于 R^1 和 R^2 一起形成C3-C10环烷基或C3-C10环烯基的实施方案,所示的C原子数包括位于 R^1 和 R^2 之间的羰基C原子。

[0120] 另一方面,本发明涉及一种组合物,其包含

[0121] a) 通式 (IIa) 的胺



[0123] 其中

[0124] R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-O-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为耦合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ;和

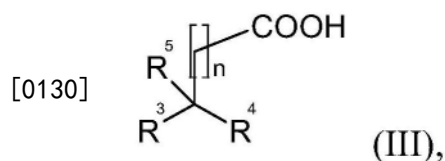
[0125] R^2 选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C5烷基-O-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C5-C10芳基、C6-C10烷基芳基和C6-C10芳基烷基,其中在多于一个芳香族环体系的情况下,环体系是耦合的或分开的,其中每个残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} ;

[0126] 或

[0127] R^1 、 R^2 一起形成C3-C10环烷基或C3-C10环烯基,其中C3-C10环烷基或C3-C10环烯基各自具有至少一个选自氢原子、C1-C5烷基、C1-C4杂烷基和C1-C5烷基- R^y 的取代基 R^x ,其中 R^y 是羟基或巯基;

[0128] 和

[0129] b) 至少一种通式 (III) 的羧酸



[0131] 其中

[0132] n为零或1;

[0133] 残基R³和R⁴均为苯基或一起形成苯环,其中每个苯环具有至少一个选自氢原子、卤素原子,优选氯,和硝基的其他取代基;残基R⁵是氢原子或甲基,或如果R³和R⁴一起形成苯环,则R⁵不存在,其中至少一种羧酸以其质子化形式存在或作为具有合适反荷离子的羧酸盐存在。

[0134] 根据该组合物的优选实施方案,

[0135] R¹选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基R¹具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基R^{1a};和

[0136] R²选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C5-C10芳基、C6-C10烷基芳基和C6-C10芳基烷基,其中在多于一个芳香族环体系的情况下,环体系是稠合的或分开的,其中每个残基R²具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基R^{2a}。

[0137] 更优选地,根据(b)的至少一种羧酸是选自二苯基乙酸(DPAA)、2,2-二苯基丙酸(2DPPA)、3,3-二苯基丙酸(3DPPA)、3,4-二氯-苯甲酸(34CA)、3,4-二硝基-苯甲酸(34NA)和4-氯-3-硝基-苯甲酸(43CNA),更优选选自二苯基乙酸(DPAA)、2,2,2-二苯基丙酸(2DPPA)和3,3-二苯基丙酸(3DPPA),更优选2,2-二苯基丙酸(2DPPA)或3,3-二苯基丙酸(3DPPA),更优选至少3DPPA的羧酸。

[0138] 根据组合物的更优选的实施方案,根据(a)的胺的残基R¹选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基中的杂原子是氧或硫,并且C2-C20杂烷基和C3-C20环杂烷基中的杂原子选自氧、硫和氮,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基R¹具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基R^{1a}。优选地,根据(a)的胺的残基R¹选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基R¹具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基R^{1a}。更优选地,根据(a)的胺的残基R¹选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支

链或直链的C2-C20炔基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基和C5-C20芳基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为耦合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。更优选地,根据(a)的胺的残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C10烷基、C5-C10环烷基和C5-C20芳基,其中在多于一个脂族基或芳香族环体系的情况下,环体系为耦合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ; R^1 优选选自甲基、异丙基、环己基和苯基,其中苯基具有至少一个选自氢原子、卤素原子,优选氟或氯,和甲氧基,优选间甲氧基或对甲氧基的取代基。

[0139] 对于 R^1 是带支链或直链的C2-C20烷基或带支链或直链的C2-C20烯基,优选的实施方案涉及 R^1 是带支链或直链的C4-C20烷基或带支链或直链的C4-C20烯基。

[0140] 根据该组合物的一个更优选实施方案,根据(a)的胺的残基 R^2 选自氢原子、带支链或直链C1-C5烷基,其中每个残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} 。

[0141] 优选地,根据(a)的胺的残基 R^2 选自带支链或直链C1-C3烷基, R^2 优选为甲基。

[0142] 在该组合物的一个优选的实施方案中,排除了 R^1 、 R^{1a} 是全氟烷基的组合。对于 R^2 和 R^{2a} 同样适用,即,也排除了 R^2 和 R^{2a} 是全氟烷基的组合。换句话说, R^1 和 R^{1a} 的组合或 R^2 和 R^{2a} 的组合都不是全氟烷基。

[0143] 关于该组合物的实施方案,其中 R^1 和 R^2 一起形成C3-C10环烷基或C3-C10环烯基,所示的C原子数包括位于 R^1 和 R^2 之间的羰基C原子。

[0144] 根据组合物的一个优选实施方案,组合物包含根据(a)的胺,其量为90重量%至99.9重量%,优选为95重量%至99.9重量%,更优选为98重量%至99.9重量%。根据组合物的更优选的实施方案,组合物包含至少一种根据(b)的羧酸(质子化形式或具有合适反荷离子的羧酸盐),其量为至少0.003重量%,优选0.003重量%至5重量%,更优选0.003重量%至3重量%。

[0145] 下面,更详细地描述发明人进行的研究:

[0146] 如上所述,选择可商购的脂族、芳香族和杂芳香族羧酸($R-COOH$),并筛选为相对于转氨酶催化反应的普通胺的相应羧酸盐。1-苯基乙胺及其取代的衍生物2a-f用作模型产物胺,并与典型的供体胺如异丙胺3、外消旋2-丁胺、DL-丙氨酸和L-丙氨酸进行比较。直接筛选方法尤其导致鉴定出两种符合所需标准的基于苄基苯的酸和三种苯甲酸衍生物:DPAA、3DPPA、34CA、34NA和43CNA。另外,鉴定出2DPPA为合适的羧酸。

[0147] 例如,4-氯-3-硝基苯甲酸(43CNA)的异丙胺盐5显示出 $993\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的非常高的溶解度,而43CNA的1-苯基乙胺盐6a则具有 $22\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的较低溶解度。如Le Chatelier原理所述,如果将过量化学计量的羧酸盐添加到母液中,则可以进一步降低胺盐的溶解度,这会将平衡从解离的形式(存在于溶液中)推向其未解离的固体盐形式。

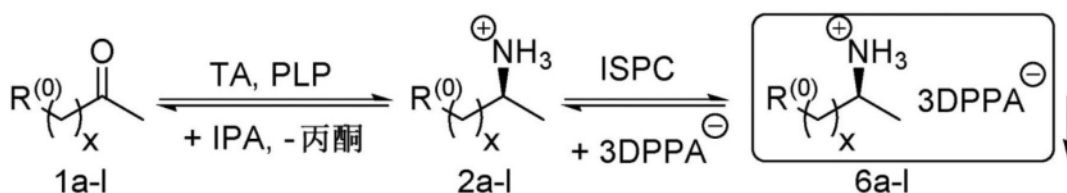
[0148] 除了一般的溶解度差异之外,用来自烟曲霉的胺类转氨酶(AfATA)、来自玉蜀黍赤霉的胺类转氨酶(GzATA)、来自费氏新萨托菌的胺类转氨酶(NfATA)、来自米曲霉的胺类转氨酶(AoATA)、来自土曲霉的胺类转氨酶(AtATA)、来自范巴伦氏分枝杆菌的胺类转氨酶(MvATA)和来自Silicibacter pomeroyi的胺类转氨酶(SpATA)的7种示例性胺类转氨酶测试了这3种酸(43CNA、DPAA和3DPPA)的适用性(图1)。结果表明,几乎所有研究的胺类转氨酶

都被50mM的更可溶的酸43CNA和DPAA强烈抑制。在本文中,MvATA和SpATA被确定为最稳定的酶。这些结果中明显的例外是酸3DPPA,它仅微溶于缓冲溶液。这有效地将水溶液中的羧酸盐浓度限制为最大 $\leq 25\text{mM}$,具体取决于温度和pH值,而反应混合物中仍保留有过量的固体3DPPA。这种低3DPPA浓度也不会显著抑制所研究的ATA。幸运的是,所研究的3DPPA盐显示出产物胺盐6的最低溶解度,这完全符合上述ISPC要求(请参见实施例部分和表4)。因此,3DPPA被认为是用于胺类转氨酶催化反应中胺2的基于结晶的原位产物分离(ISPR)的最有价值的酸。

[0149] 3DPPA与100mM苯乙酮1a向(S)-1-苯乙胺的示例性SpATA催化转化的组合使用清楚地显示了基于酸的ISPC的合成优势(图2)。具有仅250mM异丙胺的低供体胺浓度的经典反应方法产生19%的不足的转化率。简单添加1.25当量的固态3DPPA可以将总转化率直接提高到约75%,无论用作全细胞生物催化剂还是部分纯化的细胞提取物。然后大部分产物2以固体盐6形式存在,在将反应混合物冷却至 0°C 后,几乎可以通过过滤将其定量回收。因此,采用3DPPA的ISPC概念转化为更加原子高效的合成方法,因为所需的供体胺更少,并且简化了下游处理方法(见下文)。值得注意的是,3DPPA的低溶解度并不会限制胺盐的结晶,因为通过同时溶解3DPPA(来自过量的固体3DPPA),3DPPA从水溶液中的不断去除持续补偿回其原始溶解度极限。

[0150] 所示的采用酸3DPPA的ISPC概念也已成功用于选择的苯乙酮衍生物1b-g和其它非芳香族底物1h-k的SpATA催化转化(表2)。

[0151] 表2: ISPC支持的手性胺的SpATA催化合成



底物	R ⁽⁰⁾	x	转化率 参考 / %	转化率 ISPC / %	e.e. / % ^[a]
1a	Ph	0	19	75	>99.5
1b	m-F-Ph	0	21	69	>99.5
[0152] 1c	p-F-Ph	0	11	61	>99.5
1d	m-Cl-Ph	0	8	46	>99.5
1e	p-Cl-Ph	0	8	65	>99.5
1f	m-MeO- Ph	0	10	37	>99.5
1g	p-MeO-Ph	0	4	8	>99.5
1h	Cy	0	0	8	n.d.
1i	Me	3	37	72	>99.5
1j	Me	4	20	78	98.7
1k	<i>i</i> Pr	1	36	96	n.d.

[0153] [a]给出了ISPC支持的反应的值；条件：200mM磷酸盐缓冲液pH 7.5、100mM底物、250mM异丙胺、15mg · mL⁻¹冻干全细胞，30°C；适用于ISPC的125mM 3DPPA

[0154] 如预期的那样，由于使用了250mM异丙胺的量少，但化学计量仍然过高，因此在不采用ISPC的情况下，所有底物的转化率都较低。简单添加3DPPA显著增加了几乎所有研究底物的产物形成。改进范围为2倍到8.1倍，其中1k的产率高达96%，而产物则选择性地结晶为其3DPPA盐。剩余的母液（包括过量的异丙胺）可以直接重新使用，以进一步提高转氨酶催化反应的原子效率。甚至更高的供体胺浓度将进一步提高转化率，但是存在不希望的供体胺盐结晶的风险，这最终会导致产物形成的减少。

[0155] 可以通过将产物盐6溶解在高pH的水溶液中，然后萃取和蒸发溶剂例如MTBE来容易地实现产物胺2的分离。替代地，可以通过小心地加入浓HCl将相应的盐酸盐直接从醚相中结晶出来。另外，由于3DPPA在低pH值下的溶解度低，废酸3DPPA也可以通过用浓HCl酸化而从剩余的水相中沉淀出来。

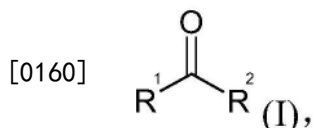
[0156] 总而言之，所提出的通过添加选定的酸/羧酸盐使来自转氨酶催化反应的胺原位产物结晶提供了强效的合成替代方案，取代了使用特制的供体胺和复杂的级联反应系统。该ISPC的主要优点是以原子效率更高的方式使用了传统廉价供体胺，以及通过简单过滤的

简化的下游加工方案。然后可以从其盐中提取目标产物胺,并且所施加的3DPPA酸易于回收。

[0157] 通过下面的实施方案和如各自的引用关系和反向引用所指示的实施方案的组合来进一步说明本发明。特别地,要注意的是,在提到实施方案范围的每种情况下,例如在“实施方案1至4中任一项所述的方法”这样的术语的上下文中,该范围内的每个实施方案均旨在向本领域技术人员明确地公开,即该术语的措词应被本领域技术人员理解为与“实施方案1、2、3和4中任一项所述的方法”同义。

[0158] 1.一种制备氨基盐化合物的方法,其包括:

[0159] i) 提供通式 (I) 的羰基化合物



[0161] 其中

[0162] R¹选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基R¹具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基R^{1a};和

[0163] R²选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C5-C10芳基、C6-C10烷基芳基和C6-C10芳基烷基,其中在多于一个芳香族环体系的情况下,环体系是稠合的或分开的,其中每个残基R²具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基R^{2a};

[0164] 或

[0165] R¹、R²一起形成C3-C10环烷基或C3-C10环烯基,其中C3-C10环烷基或C3-C10环烯基各自具有至少一个选自氢原子、C1-C5烷基、C1-C4杂烷基和C1-C5烷基-R^y的取代基R^x,其中R^y是羟基或巯基;

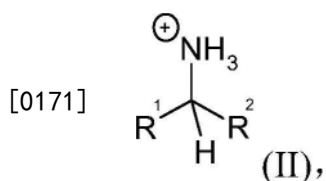
[0166] ii) 在转氨酶的存在下使根据(i)提供的羰基化合物与以下物质反应:

[0167] ii-a) 至少一种伯胺;和

[0168] ii-b) 至少一种羧酸;

[0169] 从而获得包含至少部分结晶的氨基盐化合物的混合物,该氨基盐化合物包含

[0170] -通式 (II) 的阳离子



[0172] 其中R¹和R²如通式 (I) 所定义,和

[0173] -基于根据(ii-b)添加的至少一种羧酸的羧酸根阴离子。

[0174] 2. 根据实施方案1所述的方法,其中根据(ii)获得的氨基盐化合物在pH 7的水中的溶解度小于根据(ii-a)添加的至少一种伯胺在水中的溶解度。

[0175] 3. 根据实施方案1或2所述的方法,其中根据(ii)获得的氨基盐化合物在pH 7的水中的溶解度为 $\leq 30\text{mmol/l}$,优选 $\leq 25\text{mmol/l}$,更优选 $\leq 10\text{mmol/l}$ 。

[0176] 4. 根据实施方案1至3中任一项所述的方法,其中残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基中的杂原子是氧或硫,并且C2-C20杂烷基和C3-C20环杂烷基中的杂原子选自氧、硫和氮,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。

[0177] 5. 根据实施方案1至4中任一项所述的方法,其中残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基,其中杂原子选自氧、硫和氮,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。

[0178] 6. 根据实施方案1至5中任一项所述的方法,其中残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基和C5-C20芳基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。

[0179] 7. 根据实施方案1至6中任一项所述的方法,其中残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C10烷基、C5-C10环烷基和C5-C20芳基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ; R^1 优选选自甲基、异丙基、环己基和苯基,其中苯基具有至少一个选自氢原子、卤素原子,优选氟或氯,和甲氧基,优选间甲氧基或对甲氧基的取代基 R^{1a} 。

[0180] 8. 根据实施方案1至7中任一项所述的方法,其中残基 R^2 选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基,其中每个残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} 。

[0181] 9. 根据实施方案1至8中任一项所述的方法,其中残基 R^2 选自带支链或直链的C1-C3烷基, R^2 优选为甲基。

[0182] 10. 根据实施方案1至9中任一项所述的方法,其中根据(ii)的转氨酶选自转氨酶的组,优选选自胺类转氨酶的组,更优选选自根据SEQ ID NO 1的来自烟曲霉的胺类转氨酶(AfATA)、根据SEQ ID NO 2的来自玉蜀黍赤霉的胺类转氨酶(GzATA)、根据SEQ ID NO 3的

来自费氏新萨托菌的胺类转氨酶(NfATA)、根据SEQ ID NO 4的来自米曲霉的胺类转氨酶(AoATA)、根据SEQ ID NO 5的来自土曲霉的胺类转氨酶、根据SEQ ID NO 6的来自范巴伦氏分枝杆菌的胺类转氨酶(MvATA)、根据SEQ ID NO 7的来自Silicibacter pomeroyi的胺类转氨酶(SpATA)、和与SEQ ID NO 1至7中的任一项具有至少65%序列同一性并且与SEQ ID NO 1至7的胺类转氨酶具有相同功能的同源酶,更优选选自根据SEQ ID NO 6的来自范巴伦氏分枝杆菌的胺类转氨酶(MvATA)、根据SEQ ID NO 7的来自Silicibacter pomeroyi的胺类转氨酶(SpATA)、和与SEQ ID NO 6或7中的任一项具有至少65%序列同一性并且与SEQ ID NO 6或7的胺类转氨酶具有相同功能的同源酶。

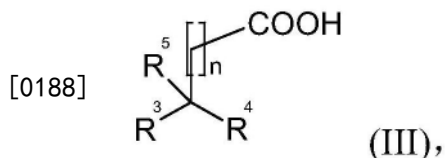
[0183] 11. 根据实施方案10所述的方法,其中同源酶与SEQ ID NO 1至7中的任一项具有至少75%,优选至少85%,更优选至少90%,更优选至少95%,更优选至少98%,更优选至少99%的序列同一性,并且与SEQ ID NO 1至7的胺类转氨酶具有相同的功能。

[0184] 12. 根据实施方案1至11中任一项所述的方法,其中根据(ii-a)的至少一种伯胺以非质子化形式使用或以具有合适反荷阴离子的质子化形式使用。

[0185] 13. 根据实施方案1至12中任一项所述的方法,其中根据(ii-a)的至少一种伯胺选自具有1至10个碳原子的一元胺和二元胺,优选选自1,5-二氨基-戊烷(尸胺)、丙氨酸、2-氨基丁烷(仲丁胺)和2-氨基丙烷,优选是非质子化或质子化形式的2-氨基丙烷(异丙胺),其中质子化形式与合适的阴离子组合存在。

[0186] 14. 根据实施方案1至13中任一项所述的方法,其中根据(ii-b)的至少一种羧酸以其质子化形式使用或以具有合适反荷阳离子的去质子化形式使用。

[0187] 13. 根据实施方案1至12中任一项所述的方法,其中根据(ii-b)的至少一种羧酸为通式(III)的羧酸



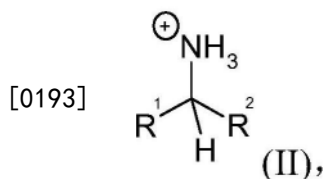
[0189] 其中n为零或1;

[0190] 残基R³和R⁴均为苯基或一起形成苯环,其中每个苯环具有至少一个选自氢原子,卤素原子,优选氯,和硝基的其他取代基,残基R⁵为氢原子或甲基,或如果R³和R⁴一起形成苯环,则R⁵不存在;优选地,根据(ii-b)的至少一种羧酸是选自以下的羧酸:二苯基乙酸(DPAA)、2,2-二苯基丙酸(2DPPA)、3,3-二苯基丙酸(3DPPA)、3,4-二氯苯甲酸(34CA)、3,4-二硝基苯甲酸(34NA)和4-氯-3-硝基苯甲酸(43CNA),更优选选自二苯基乙酸(DPAA)、2,2-二苯基丙酸(2DPPA)和3,3-二苯基丙酸(3DPPA),更优选2,2-二苯基丙酸(2DPPA)或3,3-二苯基丙酸(3DPPA),更优选至少3DPPA。

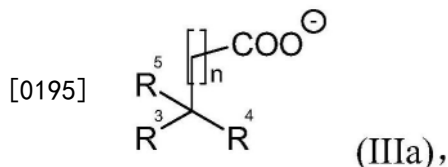
[0191] 16. 根据实施方案1至15中任一项所述的方法,其中将根据(ii-a)的至少一种伯胺和根据(ii-b)的至少一种羧酸以包含质子化形式的至少一种伯胺和去质子化形式的至少一种羧酸的一种或多种盐使用,优选以包含质子化形式的至少一种伯胺和去质子化形式的至少一种羧酸的一种盐使用,更优选以3,3-二苯基丙酸异丙基铵使用。

[0192] 17. 根据实施方案1至16中任一项所述的方法,其中根据(ii)获得的氨基盐化合物包含通式(II)的阳离子和基于至少一种羧酸的阴离子,该阴离子优选为通式(IIIa)的阴离

子:



[0194] 其中R¹和R²如通式(I)所定义,



[0196] 其中n为零或1;

[0197] 残基R³和R⁴均为苯基或一起形成苯环,其中每个苯环具有至少一个选自氢原子,卤素原子,优选氯,和硝基的其他取代基,残基R⁵为氢原子或甲基,或如果R³和R⁴一起形成苯环,则R⁵不存在;其中通式(IIIa)的阴离子优选选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根、3,4-二氯-苯甲酸根、3,4-二硝基-苯甲酸根和4-氯-3-硝基苯甲酸根,更优选选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根,更优选2,2-二苯基丙酸根或3,3-二苯基丙酸根,更优选3,3-二苯基丙酸根。

[0198] 18. 实施方案1至17中任一项所述的方法,其中根据(ii)的反应在水溶液中进行,以水溶液的总重量为基准计,该水溶液优选包含至少80重量%,更优选至少90重量%,更优选至少95重量%,更优选至少98重量%的水。

[0199] 19. 根据实施方案18的方法,其中水溶液包含缓冲液,优选选自三(羟甲基)氨基甲烷缓冲液(TRIS缓冲液)、3-(N-吗啉代)丙烷磺酸缓冲液(MOPS缓冲液)、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸缓冲液(BES缓冲液)、N-(三(羟基甲基)甲基)甘氨酸缓冲液(Tricine缓冲液)、碳酸盐缓冲液、N-环己基-2-氨基乙磺酸缓冲液(CHES缓冲液)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸缓冲液(HEPES缓冲液)和磷酸盐缓冲液,更优选至少磷酸盐缓冲液。

[0200] 20. 根据实施方案1至19中任一项所述的方法,其中根据(ii)的反应在6.0至9.5的pH值下进行,优选在6.5至9.0的pH值下进行,更优选在7.0至8.0的pH值下进行。

[0201] 21. 根据实施方案1至20中任一项所述的方法,其中根据(ii)的反应进行至少1小时,优选进行1小时至1000小时,更优选进行5小时至500小时,更优选进行10小时至200小时。

[0202] 22. 根据实施方案1至21中任一项所述的方法,其中根据(ii)的反应在10°C至50°C的温度下进行,优选在15°C至45°C的温度下进行,更优选在20°C至40°C的温度下进行,更优选在25°C至35°C的温度下进行。

[0203] 23. 根据实施方案1至22中任一项所述的方法,其中,对于至少一种羧酸是根据通式(III)的羧酸,其中残基R³和R⁴一起形成苯环,优选选自3,4-二氯-苯甲酸(34CA)、3,4-二硝基-苯甲酸(34NA)和4-氯-3-硝基-苯甲酸(43CNA)的羧酸:,在步骤(ii)中将至少一种羧酸的浓度保持为0.001mM至50mM,优选为1mM至45mM,更优选为5mM至40mM。

[0204] 24. 根据实施方案1至22中任一项所述的方法,其中,对于至少一种羧酸是根据通式(III)的羧酸,其中残基R³和R⁴各自为苯环,优选选自二苯基乙酸(DPAA)、2,2-二苯基丙酸

(2DPPA) 和 3,3-二苯基丙酸 (3DPPA) 的羧酸, 在步骤 (ii) 中, 至少一种羧酸的浓度为 $\leq 50\text{mM}$ 。

[0205] 25. 根据实施方案 1 至 24 中任一项所述的方法, 其还包括:

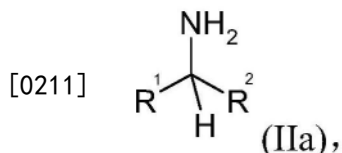
[0206] iii) 从混合物中分离根据 (ii) 获得的至少部分结晶的胺盐化合物, 从而获得结晶的胺盐化合物。

[0207] 26. 根据实施方案 26 所述的方法, 其中通过沉淀、离心或过滤, 优选通过过滤, 从混合物中分离根据 (iii) 的结晶的胺盐化合物。

[0208] 27. 根据实施方案 1 至 24 中任一项所述的方法, 其还包括:

[0209] (iv) 任选地, 优选用水或有机溶剂或其混合物, 更优选用水或甲基叔丁基醚或其混合物洗涤根据 (iii) 获得的分离的结晶的氨基盐化合物, 从而获得洗涤的结晶的氨基盐化合物;

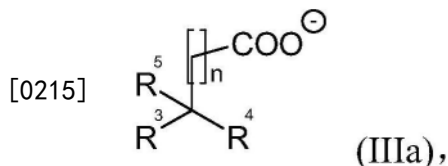
[0210] (v) 将根据 (iii) 获得的结晶的氨基盐化合物或任选地根据 (iv) 获得的洗涤的结晶的氨基盐化合物溶解在包含至少一种碱, 优选包含氢氧根离子的碱且 pH 值为 10 至 14 的水溶液中, 从而获得包含通式 (IIa) 的胺的水溶液:



[0212] 其中 R^1 和 R^2 如通式 (I) 所定义;

[0213] (vi) 用与水不混溶的有机溶剂萃取根据 (v) 获得的水溶液至少一次, 从而获得包含至少部分通式 (IIa) 的胺的有机相;

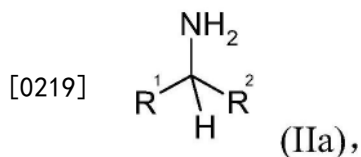
[0214] 和包含至少部分通式 (IIIa) 的阴离子的水相:



[0216] 其中 n 为零或 1; 并且其中残基 R^3 和 R^4 均为苯基或一起形成苯环, 其中每个苯环具有至少一个选自氢原子, 卤素原子, 优选氯, 和硝基的其他取代基, 残基 R^5 为氢原子或甲基, 或如果 R^3 和 R^4 一起形成苯环, 则 R^5 不存在; 其中通式 (IIIa) 的阴离子优选选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根、3,4-二氯-苯甲酸根、3,4-二硝基-苯甲酸根和 4-氯-3-硝基苯甲酸根, 更优选选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根, 更优选 2,2-二苯基丙酸根或 3,3-二苯基丙酸根, 更优选 3,3-二苯基丙酸根。

[0217] 28. 根据实施方案 27 所述的方案, 其还包括:

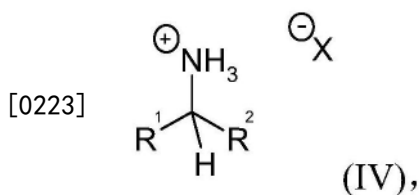
[0218] (vii-a) 从 (vi) 中获得的有机相中除去与水不混溶的有机溶剂, 从而获得通式 (IIa) 的胺,



[0220] 其中 R^1 和 R^2 如通式 (I) 所定义。

[0221] 29. 根据实施方案 27 所述的方案, 其还包括:

[0222] (vii-b) 向根据 (vi) 获得的有机相中加入至少一种酸HX, 优选HCl, 从而获得通式 (IV) 的盐

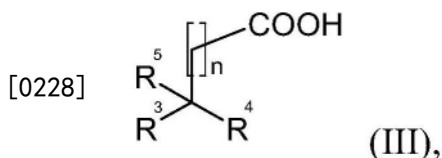


[0224] 其中R¹和R²如通式 (I) 和 (II) 所定义, 并且X是基于至少一种酸HX的离子, 优选Cl⁻的离子。

[0225] 30. 根据实施方案27或28所述的方法, 其中根据 (vi) 的与水不混溶的有机溶剂的K_{ow}值为至少0.5, 更优选为至少0.6, 更优选为至少0.7, 更优选为至少0.8。

[0226] 31. 根据实施方案27至30中任一项所述的方法, 其还包括:

[0227] (viii) 任选地通过将pH值调节至0至6, 优选通过加入HCl使来自根据 (vi) 获得的水相的至少一种通式 (III) 的羧酸沉淀:



[0229] 其中n为零或1;

[0230] 残基R³和R⁴均为苯基或一起形成苯环, 其中每个苯环具有至少一个选自氢原子, 卤素原子, 优选氯, 和硝基的其他取代基, 残基R⁵为氢原子或甲基, 或如果R³和R⁴一起形成苯环, 则R⁵不存在; 优选地, 至少一种羧酸选自二苯基乙酸 (DPAA)、2,2-二苯基丙酸 (2DPPA)、3,3-二苯基丙酸 (3DPPA)、3,4-二氯苯甲酸 (34CA)、3,4-二硝基苯甲酸 (34NA) 和4-氯-3-硝基苯甲酸 (43CNA), 更优选选自二苯基乙酸 (DPAA)、2,2-二苯基丙酸 (2DPPA) 和3,3-二苯基丙酸 (3DPPA), 更优选2,2-二苯基丙酸 (2DPPA) 或3,3-二苯基丙酸 (3DPPA), 更优选至少3DPPA,

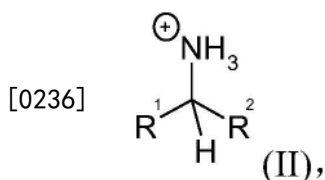
[0231] 和

[0232] (ix) 任选地使根据 (viii) 沉淀的至少一种羧酸再循环至所述过程, 优选再循环至步骤 (ii)。

[0233] 32. 通过根据实施方案1至31任一项所述的方法获得的或能够获得的氨基盐化合物。

[0234] 33. 一种氨基盐化合物, 其包含

[0235] -通式 (II) 的阳离子



[0237] 其中

[0238] R¹选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、

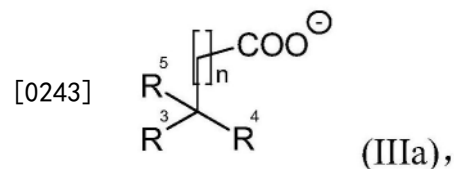
C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ;和

[0239] R^2 选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C5-C10芳基、C6-C10烷基芳基和C6-C10芳基烷基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系是稠合的或分开的,其中每个残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} ;或

[0240] R^1 、 R^2 一起形成C3-C10环烷基或C3-C10环烯基,其中C3-C10环烷基或C3-C10环烯基各自具有至少一个选自氢原子、C1-C5烷基、C1-C4杂烷基和C1-C5烷基- R^y 的取代基 R^x ,其中 R^y 是羟基或巯基;

[0241] 和

[0242] -通式(IIIa)的阴离子



[0244] 其中n为零或1;

[0245] 残基 R^3 和 R^4 均为苯基或一起形成苯环,其中每个苯环具有至少一个选自氢原子,卤素原子,优选氯,和硝基的其他取代基;残基 R^5 是氢原子或甲基,或如果 R^3 和 R^4 一起形成苯环,则 R^5 不存在。

[0246] 34. 根据实施方案33所述的氨基盐化合物,其中通式(IIIa)的阴离子优选选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根、3,4-二氯苯甲酸根、3,4-二硝基-苯甲酸根和4-氯-3-硝基苯甲酸根,更优选选自二苯基乙酸根、2,2-二苯基丙酸根、3,3-二苯基丙酸根,更优选2,2-二苯基丙酸根或3,3-二苯基丙酸根,更优选3,3-二苯基丙酸根。

[0247] 35. 根据实施方案33或34所述的氨基盐化合物,其中残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基中的杂原子是氧或硫,并且C2-C20杂烷基和C3-C20环杂烷基中的杂原子选自氧、硫和氮,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。

[0248] 36. 根据实施方案33至35中任一项的氨基盐化合物,其中残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、

C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3-烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。

[0249] 37. 根据实施方案33至36中任一项所述的氨基盐化合物,其中残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。

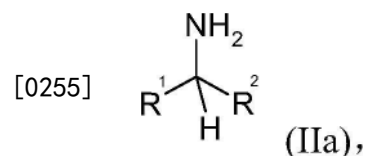
[0250] 38. 根据实施方案33至37中任一项所述的氨基盐化合物,其中残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C10烷基、C5-C10环烷基和C5-C20芳基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ; R^1 优选选自甲基、异丙基、环己基和苯基,其中苯基具有至少一个选自氢原子、卤素原子,优选氟或氯,和甲氧基,优选间甲氧基或对甲氧基的取代基。

[0251] 39. 根据实施方案33至38中任一项所述的氨基盐化合物,其中残基 R^2 选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基,其中每个残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} 。

[0252] 40. 根据权利要求33至39中任一项所述的氨基盐化合物,其中残基 R^2 选自带支链或直链的C1-C3烷基, R^2 优选为甲基。

[0253] 41. 一种组合物,其包含:

[0254] a) 通式 (IIa) 的胺



[0256] 其中

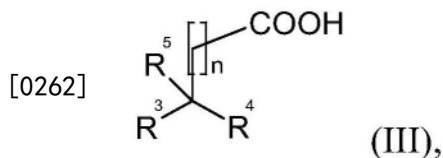
[0257] R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} ;和

[0258] R^2 选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C5-C10芳基、C6-C10烷基芳基和C6-C10芳基烷基,其中在多于一个芳香族环体系的情况下,环体系是稠合的或分开的,其中每个残基 R^2 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{2a} ;或

[0259] R^1 、 R^2 一起形成C3-C10环烷基或C3-C10环烯基,其中C3-C10环烷基或C3-C10环烯基各自具有至少一个选自氢原子、C1-C5烷基、C1-C4杂烷基和C1-C5烷基- R^y 的取代基 R^x ,其中 R^y 是羟基或巯基;

[0260] 和

[0261] b) 至少一种通式 (III) 的羧酸



[0263] 其中n为零或1;

[0264] 残基 R^3 和 R^4 均为苯基或一起形成苯环,其中每个苯环具有至少一个选自氢原子,卤素原子,优选氯,和硝基的其他取代基;残基 R^5 是氢原子或甲基,或如果 R^3 和 R^4 一起形成苯环,则 R^5 不存在,其中至少一种羧酸以其质子化形式存在或作为具有合适反荷离子的羧酸盐存在。

[0265] 42. 根据实施方案41所述的组合物,其中根据 (b) 的至少一种羧酸是选自二苯基乙酸 (DPAA)、2,2-二苯基丙酸 (2DPPA)、3,3-二苯基丙酸 (3DPPA)、3,4-二氯-苯甲酸 (34CA)、3,4-二硝基-苯甲酸 (34NA) 和4-氯-3-硝基-苯甲酸 (43CNA) 的羧酸,更优选选自二苯基乙酸 (DPAA)、2,2,2-二苯基丙酸 (2DPPA) 和3,3-二苯基丙酸 (3DPPA),更优选2,2-二苯基丙酸 (2DPPA) 或3,3-二苯基丙酸 (3DPPA),更优选至少3DPPA。

[0266] 43. 根据实施方案41或42所述的组合物,其中根据 (a) 的胺的残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基、C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基,其中C4-C20杂芳基、C5-C20烷基杂芳基和C5-C20杂芳基烷基中的杂原子是氧或硫,并且C2-C20杂烷基和C3-C20环杂烷基中的杂原子选自氧、硫和氮,其中在多于一个(杂)脂族或(杂)芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。

[0267] 44. 根据实施方案41至43中任一项所述的组合物,其中根据 (a) 的胺的残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、带支链或直链的C1-C5烷基-0-C1-C5烷基、带支链或直链的C1-C10烷氧基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基、C5-C20芳基、C6-C20烷基芳基、C6-C20芳基烷基、C2-C20杂烷基、C3-C20环杂烷基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤素原子(F、Cl、Br、I)、羟基、巯基、C1-C3硫代酸酯、C1-C3硫醚、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基 R^{1a} 。

[0268] 45. 根据实施方案41至44中任一项所述的组合物,其中根据 (a) 的胺的残基 R^1 选自带支链或直链的C2-C20烷基、带支链或直链的C2-C20烯基、带支链或直链的C2-C20炔基、C4-C20环烷基、C5-C20环烯基、C5-C20环炔基和C5-C20芳基,其中在多于一个脂族或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基 R^1 具有至少一个选自氢原子、卤

素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基^{1a}。

[0269] 46. 根据实施方案41至45中任一项所述的组合物,其中根据(a)的胺的残基^{R1}选自带支链或直链的C2-C10烷基、C5-C10环烷基和C5-C20芳基,其中在多于一个脂族基或芳香族环体系的情况下,环体系为稠合的或分开的,其中每个残基^{R1}具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基^{1a}; ^{R1}优选选自甲基、异丙基、环己基和苯基,其中苯基具有至少一个选自氢原子,卤素原子,优选氟或氯,和甲氧基,优选间甲氧基或对甲氧基的取代基。

[0270] 47. 根据实施方案41至46中任一项所述的组合物,其中根据(a)的胺的残基^{R2}选自氢原子、带支链或直链的C1-C5烷基,其中每个残基^{R2}具有至少一个选自氢原子、卤素原子、C1-C3烷基和C1-C3烷氧基的取代基^{2a}。

[0271] 48. 根据实施方案41至47中任一项所述的组合物,其中根据(a)的胺的残基^{R2}选自带支链或直链的C1-C3烷基,^{R2}优选为甲基。

[0272] 49. 根据实施方案41至48中任一项所述的组合物,其中组合物包含根据(a)的胺,其量为90重量%至99.9重量%,优选为95重量%至99.9重量%,更优选为98重量%至99.9重量%。

[0273] 50. 根据实施方案41至49中任一项所述的组合物,其中组合物包含根据(b)的至少一种羧酸(质子化形式或具有合适反荷离子的羧酸盐形式),其量为至少0.003重量%,优选0.003重量%至5重量%,更优选0.003重量%至3重量%。

附图说明

[0274] 图1:43CNA、DPAA和3DPPA对所选胺类转氨酶的影响;条件:200mM磷酸盐缓冲液pH 7.5、10mM苯乙酮1、500mM(43CNA和DPAA)或250mM(3DPPA)异丙胺、5mg·mL⁻¹冻干细胞提取物,30°C,22h;有意将所得到的2的浓度保持在产物盐6的溶解度极限以下,以防止不希望的原位产物结晶;选择43CNA作为所鉴定的苯甲酸衍生物的代表;

[0275] 图2:在有和没有原位产物结晶(ISPC)的情况下,SpTA催化的(S)-1-苯乙胺形成的时间进程曲线;具有125mM 3DPPA的□-全细胞或■-细胞提取物,不含3DPPA的○-全细胞或●-细胞提取物;条件:200mM磷酸盐缓冲液pH 7.5、100mM苯乙酮、250mM异丙胺、15mg·mL⁻¹冻干细胞提取物或全细胞,30°C;

[0276] 图3:(S)-4-氯-1-苯基乙胺盐沉淀的示例性结果。

[0277] 实验部分

[0278] 1. 基本信息

[0279] 材料:所有化学品均购自商业供应商,并按原样使用。在整个研究过程中使用去离子水。所研究的酶(粗提取物和全细胞)从Enzymicals AG((德国格赖夫斯瓦尔德)以冻干物获得;ECS-ATA01(来自烟曲霉的转氨酶(TA),SEQ ID NO.1)、ECS-ATA02(来自玉蜀黍赤霉的TA,SEQ ID NO.2)、ECS-ATA03(来自费氏新萨托菌的TA,SEQ ID NO.3)、ECS-ATA04(来自米曲霉的TA,SEQ ID NO.4)、ECS-ATA05(来自土曲霉的TA,SEQ ID NO.5)、ECS-ATA07(来自范巴伦氏分枝杆菌的TA,SEQ ID NO.6)和ECS-ATA08(来自Silicibacter pomeroyi的TA,SEQ ID NO.7)。

[0280] 气相色谱法:使用Thermo Scientific(德国,德赖艾希)的Trace 1310气相色谱仪

测量转化率,该色谱仪配备有1300火焰离子化检测器和Chirasil-Dex-CB色谱柱(25m x 0.25mm x 0.25 μ m)。在所有测量中,将正癸烷用作内标。进样器和检测器的温度设置为250 $^{\circ}$ C。

[0281] 温度程序:

[0282] 化合物1a/2a、1b/2b和1c/2c:从90 $^{\circ}$ C开始,然后以2K/min的速率加热至114 $^{\circ}$ C,然后以20K/min的速率加热至150 $^{\circ}$ C

[0283] 化合物1d/2d、1e/2e、1f/2f和1g/2g:从90 $^{\circ}$ C开始,然后以2K/min的速率加热至100 $^{\circ}$ C,以20K/min的速率加热至130 $^{\circ}$ C,以2K/min的速率加热至150 $^{\circ}$ C和以20K/min的速率加热至160 $^{\circ}$ C

[0284] 化合物1i/2i、1j/2j、1k/2k:从90 $^{\circ}$ C开始,然后以2K/min的速率加热至96 $^{\circ}$ C,然后以20K/min的速率加热至110 $^{\circ}$ C。

[0285] HPLC:对映体过量使用Agilent(美国加利福尼亚州圣克拉拉)的1100系列HPLC进行测量,该仪器配有二极管阵列检测器,具有Chiralcel OD-H(长度250mm,内径4.6mm,粒径:5 μ m)和25 $^{\circ}$ C下1mL/min的流速。各种胺的洗脱液组成为:针对2f为99%正庚烷/1%乙醇;针对2b、2c和2g为98%正庚烷/2%乙醇;针对2a、2d和2e为95%正庚烷/5%乙醇

[0286] 酶活性分析:使用来自Analytik Jena(德国耶拿)的分光光度计Specord 200在波长为245nm的条件下测量酶活性。苯乙酮的消光系数:11.852(mM \cdot cm) $^{-1}$ 。

[0287] 测定的组成:250 μ L缓冲溶液、250 μ L缓冲溶液中的10mM(S)-1-苯乙胺、250 μ L缓冲溶液中的10mM丙酮酸钠和250 μ L含0.1mM磷酸吡哆醛的缓冲溶液中的酶样品。所有测量均针对参考溶液进行,而酶溶液则用200 μ L缓冲溶液和50 μ L缓冲溶液中的10mM磷酸吡哆醛代替。缓冲液:具有0.25%DMSO的50mM磷酸盐缓冲液pH 8。

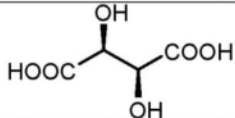
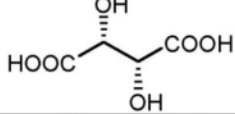
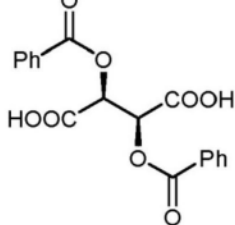
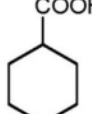
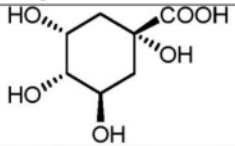
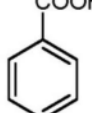
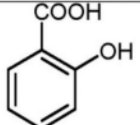
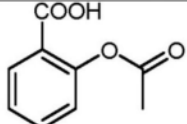
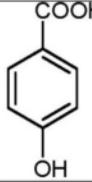
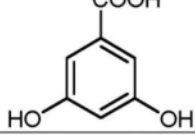
[0288] 2.用于胺原位结晶的研究的酸

[0289] 总共选择了79种酸用于相关胺的筛选程序(表3)。该选择主要基于商业可得性和水溶液的稳定性。

[0290] 表3:用于ISPC概念的研究的酸列表

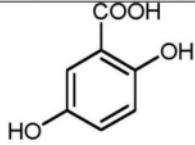
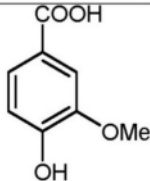
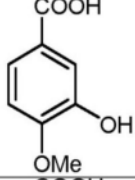
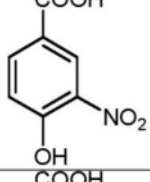
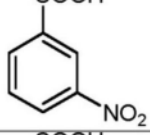
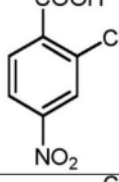
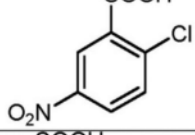
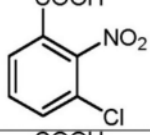
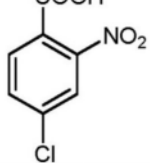
[0291]

条目	缩写	全称	化学结构	摩尔质量 [g/mol]
1	FCC	甲酸	HCOOH	46.03
2	ACC	乙酸		60.05
3	PPA	丙酸		74.08
4	BCA	丁酸		88.11
5	VCA	戊酸		102.13
6	HXCA	己酸		116.16
7	HA	庚酸		130.19
8	CCA	辛酸		144.21
9	nNA	壬酸		158.23
10	DCC	癸酸		172.27
11	OA	草酸	HOOC-COOH	90.03
12	MA	丙二酸	HOOC-CH2-COOH	104.06
13	SCCA	琥珀酸	HOOC-CH2-CH2-COOH	118.09
14	GA	戊二酸	HOOC-CH2-CH2-CH2-COOH	132.12
15	APS	己二酸	HOOC-CH2-CH2-CH2-CH2-COOH	146.14
16	PIA	庚二酸	HOOC-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-COOH	160.17
17	SBCA	辛二酸	HOOC-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-COOH	174.20
18	AA	壬二酸	HOOC-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-COOH	188.22
19	SCA	癸二酸	HOOC-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-CH2-COOH	202.25
20	TMPA	三甲基丙酮酸		130.14
21	GCA	乙醇酸	HO-CH2-COOH	76.05
22	TG	惕格酸		100.116
23	IS	衣康酸		130.10
24	FA	富马酸		116.07
25	LMA	L-苹果酸		134.09

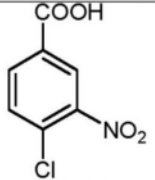
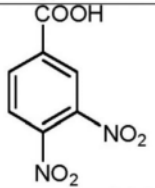
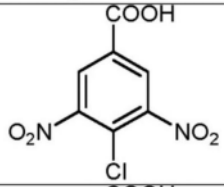
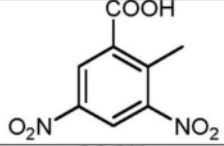
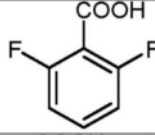
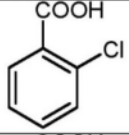
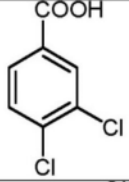
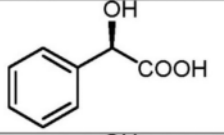
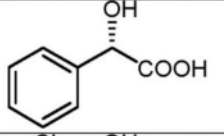
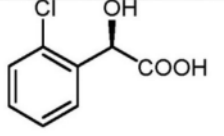
26	DTA	D-(-)-酒石酸		150.09
27	LTA	L-(-)-酒石酸		150.09
28	DBDT	二苯甲酰基 -D-酒石酸		358.30
29	CHCA	环己烷羧酸		128.17
30	DQA	D-(-)-奎宁酸		192.17
31	BZA	苯甲酸		122.12
32	SA	水杨酸		138.12
33	ASA	乙酰水杨酸		180.16
34	4HBA	4-羟基苯甲酸		138.12
35	35HBA	3,5- 二羟基 苯甲酸		154.12

[0292]

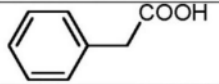
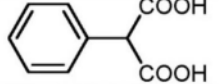
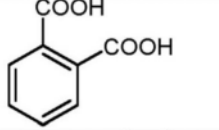
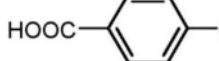
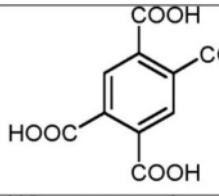
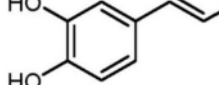
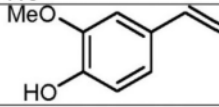
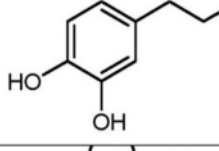
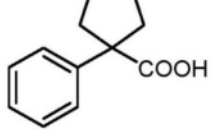
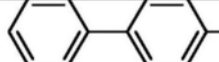
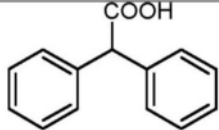
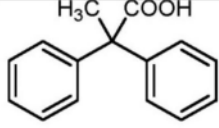
[0293]

36	25DHBA	2,5-二羟基苯甲酸		154.12
37	VA	香草酸		168.15
38	IVA	异香草酸		168.15
39	43HNBA	4-羟基-3-硝基苯甲酸		183.12
40	3NA	3-硝基苯甲酸		167.12
41	24CNA	2-氯-4-硝基苯甲酸		201.56
42	25CNA	2-氯-5-硝基苯甲酸		201.56
43	32CNA	3-氯-2-硝基苯甲酸		201.56
44	42CNA	4-氯-2-硝基苯甲酸		201.56

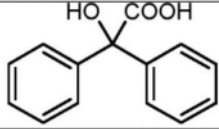
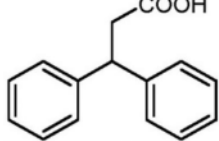
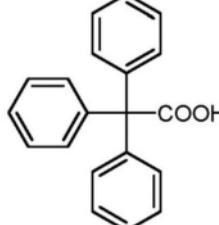
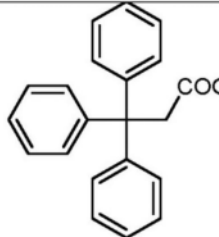
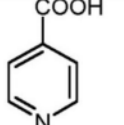
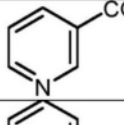
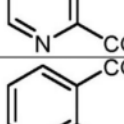
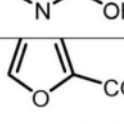
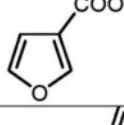
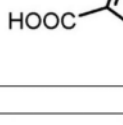
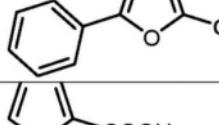
[0294]

45	43CNA	4-氯-3-硝基苯甲酸		201.56
46	34NA	3,4-二硝基苯甲酸		212.12
47	435CNBA	4-氯-3,5-二硝基苯甲酸		246.56
48	35DNOT	3,5-二硝基邻甲苯甲酸		226.14
49	26FBA	2,6-二氟苯甲酸		158.10
50	2CA	2-氯苯甲酸		156.57
51	34CA	3,4-二氯苯甲酸		191.01
52	RMA	(R)-扁桃酸		152.15
53	SMA	(S)-扁桃酸		152.15
54	CMA	R-(-)-2-氯扁桃酸		186.59

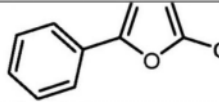
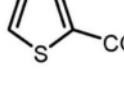
[0295]

55	PAA	苯乙酸		136.15
56	PMA	苯丙二酸		180.16
57	PA	邻苯二甲酸		166.13
58	TPA	对苯二甲酸		166.13
59	BTA	1,2,4,5- 苯四羧酸		254.15
60	CA	咖啡酸		180.16
61	FCA	阿魏酸		194.18
62	34HHCAA	3,4-二羟基- 氢化肉桂酸		182.17
63	PCPA	1-苯基 环戊烷 羧酸		190.24
64	BPA	4-联苯甲酸		198.22
65	DPAA	二苯乙酸		212.24
66	2DPPA	2,2'- 二苯基 丙酸		226.27

[0296]

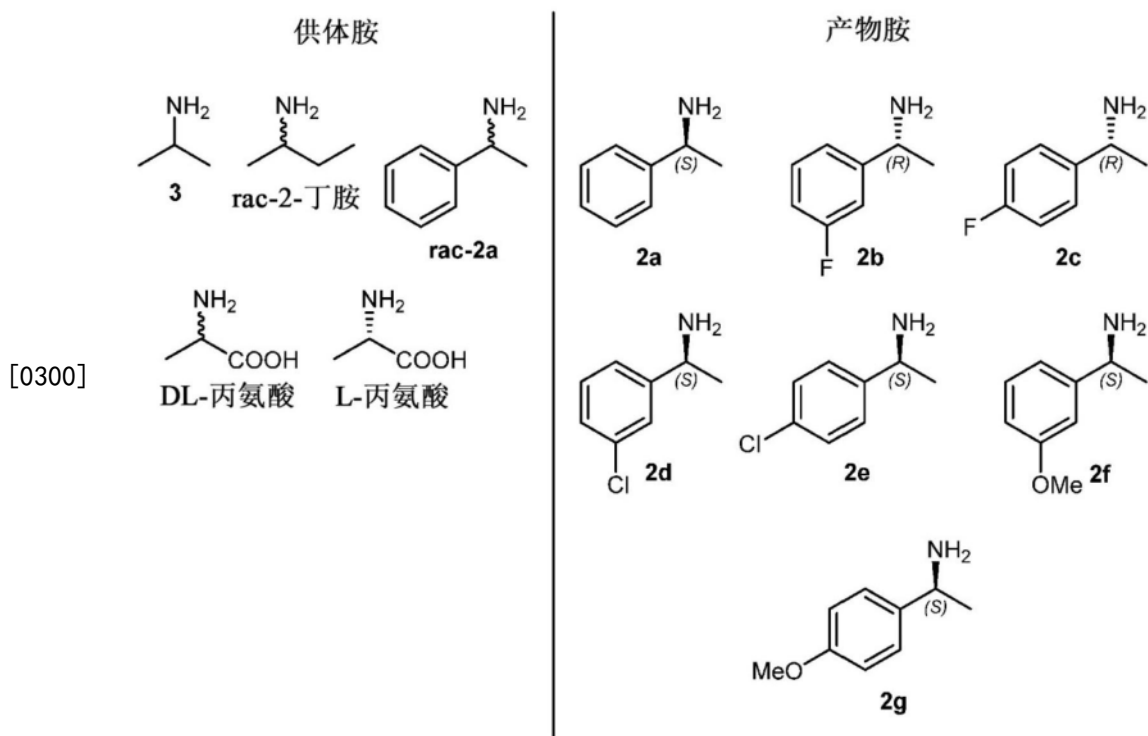
67	BA	二苯乙醇酸		228.25
68	3DPPA	3,3-二苯丙酸		226.27
69	TPAA	三苯乙酸		288.34
70	TPPA	3,3,3-三苯基丙酸		302.37
71	INA	异烟酸		123.11
72	NCC	烟酸		123.11
73	PCC	吡啶甲酸		123.11
74	2HNA	2-羟基烟酸		139.11
75	2FCA	2-呋喃甲酸		112.08
76	3FCA	3-呋喃甲酸		112.08
77	25FDCA	2,5-呋喃二羧酸		156.09

[0297]

78	PFA	5-苯基-2-呋喃甲酸		188.18
79	2TPCA	2-噻吩羧酸		128.15

[0298] 3. 沉淀筛选合适的酸

[0299] 用对映体纯的1-苯基乙胺2a及其6种衍生物作为模型产物胺以50mM进行合适的酸的筛选。作为典型的供体胺,外消旋的2-丁胺、外消旋的丙氨酸与L-丙氨酸(100mM)和异丙胺3与外消旋的1-苯基乙胺rac-2a(在250mM和1000mM下)(方案3)。各个产物胺对映体的选择与溶解度筛选无关,因为对映体除了平面偏振光在相反方向的旋转之外,具有相同的物理化学性质(包括溶解度)。外消旋胺的结果可能存在显著差异。



[0301] 方案3:用于酸筛选的示例性产物和供体胺

[0302] 中和的酸溶液:

[0303] 通过将各自的酸溶解在pH 7.5的50mM磷酸盐缓冲液中来制备所有79种单独的400mM酸溶液(通常为20mL)。然后,在所有所得溶液中,将pH小心地调回至7.5。请注意,由于先前的pH调整后需要额外的溶解过程,因此水溶性较低的酸可能需要多次调整pH。过滤具有剩余固体部分的酸溶液,并以其得到的浓度(未知)使用。

[0304] 中和的胺溶液:

[0305] 将所选的示例性产物胺溶解在pH 7.5的50mM磷酸盐缓冲液中,每种浓度为100mM,然后将pH小心地调回至7.5。制备供体胺的类似溶液(对于外消旋的2-丁胺为200mM,对于外消旋的丙氨酸和L-丙氨酸为200mM,对于异丙胺和外消旋的1-苯基乙胺为500mM和2000mM)。

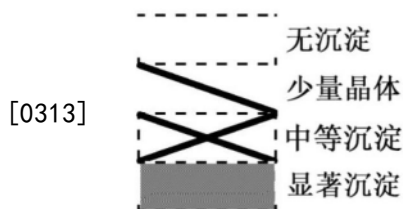
[0306] 沉淀筛选程序

[0307] 将200 μ l中和的酸溶液(总共79份)分别加入96孔板中,并记录其位置。然后,将200 μ l的一种中和的胺溶液添加到每个填充的孔中,这导致溶液澄清或几乎立即产生沉淀。1h和24h后,在黑色背景下目视观察和照相,记录结果。图3显示了1小时后(S)-4-氯-1-苯基乙胺盐的示例性结果。对所有胺溶液重复该过程,并将结果互相比对(表4)。如阴影代码所示,沉淀的强度用作盐溶解度及其差异的定性近似值。

[0308]

表 4: 筛选结果的图形表示

浓度	示例性供体胺			示例性产物胺						
	异丙胺	rac-1-苯基-乙胺	L-丙氨酸	(S)-1-PEA	(S)-3Cl-1-PEA	(R)-3F-1-PEA	(R)-4F-1-PEA	(S)-3MeO-1-PEA	(R)-4MeO-1-PEA	
	3	rac-2a	LD-丙氨酸	2a	2b	2c	2d	2e	2f	
	1000 mM	1000 mM	2-丁胺	每种 100 mM						2g
	250 mM	250 mM	每种 100 mM	每种 100 mM						2f
24CNA										
25CNA										
25DHBA										
25FDCA										
26FBA										
2CA										
2DPPA										
2FCA										
2HNA										
2TPCA										
32CNA										
34CA										
34HHCAA										
34NA										
35DNOT										
35HBA										
3DPPA										



[0314] 表4的结果清楚地表明,某些酸使得所研究的盐之间的溶解度产生显著差异。在该筛选中,特别地,以产物胺与常用供体胺异丙胺/丙氨酸之间的差异为目标。基于此考虑,以下酸似乎最适用:34CA、34NA、43CNA和3DPPA。另外,鉴定出2DPPA为合适的酸。差异较小的酸为PCPA、24CNA、25CNA、35DNOT、3NA和435CNBA,它们可能对其他产物胺有用。由于某些盐溶液的未知分解反应(强烈的变色),随后将PCPA从可能的酸中排除。

[0315] 4. 结合原位产物结晶的转氨酶催化的产物胺合成

[0316] 胺类转氨酶催化的2a-k合成与通过3DPPA的产物胺6a-k的原位产物结晶相结合的总体半制备程序:向pH 7.5的25ml 200mM磷酸盐缓冲液中加入532 μ L异丙胺(\cong 250 mM)和707mg 3DPPA(\cong 125 mM),并用H₃PO₄水溶液将所得悬浮液的pH调节至7.5。然后加入PLP、加入底物(\cong 100 mM)和生物催化剂,然后将所得混合物以200rpm的速度振摇。反应完成后,将所得混合物过滤以获得形成的产物胺盐(此固体将包含剩余的生物催化剂和过量的3DPPA)。然后,将固体级分用10mL MTBE洗涤以除去剩余的底物和部分过量的3DPPA。然后将固体倒入5mL水中,添加0.5mL浓NaOH以增加pH,并用5mL MTBE萃取所形成的产物2。相分离后,通过向醚相中缓慢加入浓HCl,得到产物盐酸盐。通过加入浓HCl可以从剩余的水溶液中沉淀出3DPPA,例如用于回收(分离产率71%)。

[0317] 总体反应控制程序:定期取样(500 μ L),并通过涡旋混合器与50 μ L浓NaOH充分混合,以淬灭反应并增加pH。然后加入500 μ L MTBE,通过涡旋混合器再次混合并离心(2分钟,3000rpm)以加强相分离。从有机层中取出200 μ L,与50 μ L在MTBE(内标)中的25mM正癸烷溶液合并,然后通过气相色谱法进行分析(色谱柱:美国Agilent的CP-Chirasil-Dex CB;25m、0.25mm、0.25 μ m)。

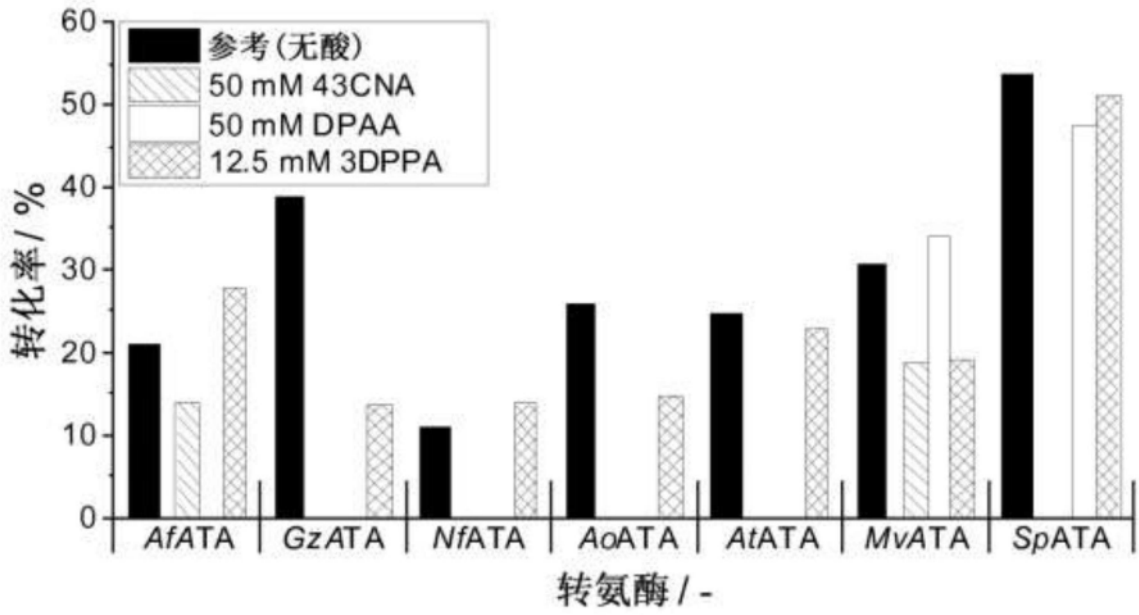


图1

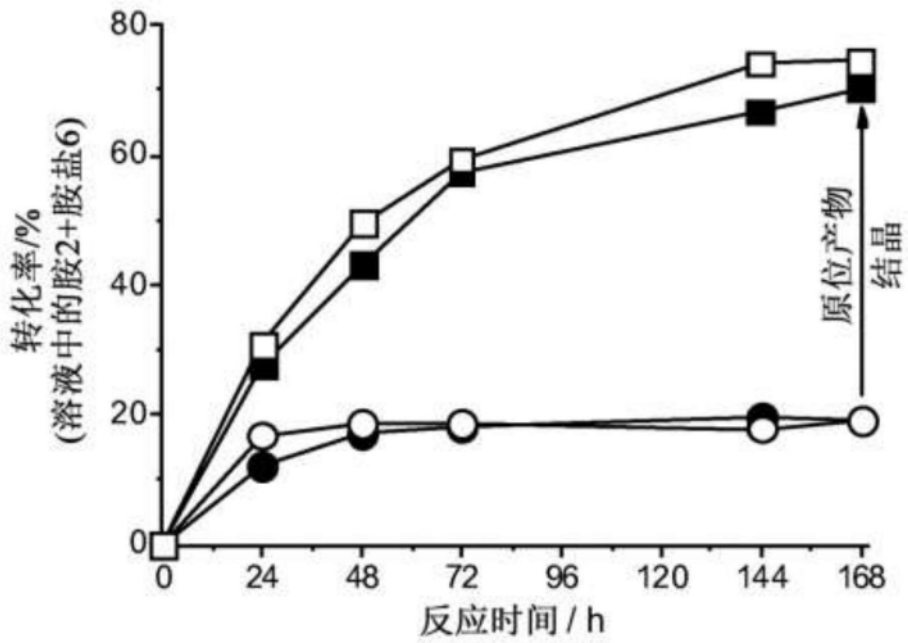


图2

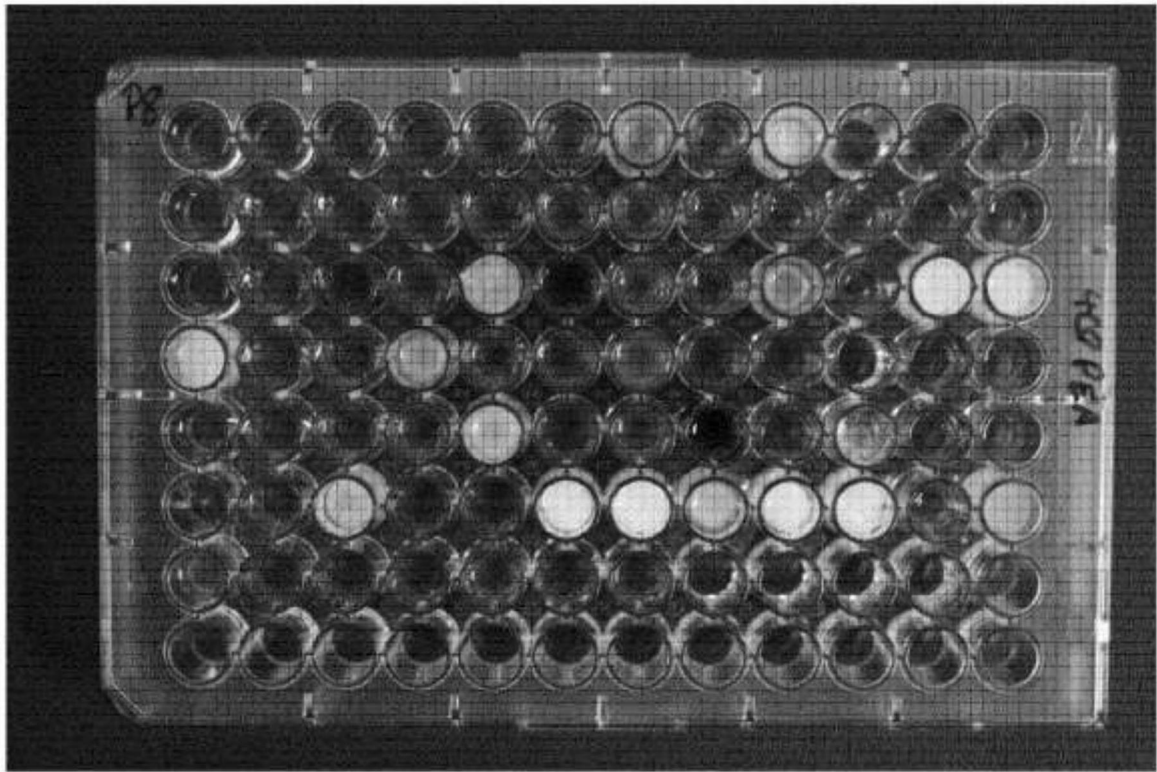


图3