

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2013 年 11 月 14 日 (14.11.2013)



(10) 国际公布号
WO 2013/167012 A2

- (51) 国际专利分类号: 无分类
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/078154
- (22) 国际申请日: 2013 年 6 月 27 日 (27.06.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 凯莱英医药集团(天津)股份有限公司 (ASYMCHEM LABORATORIES (TIANJIN) CO., LTD) [CN/CN]; 中国天津市经济技术开发区洞庭三街 6 号, Tianjin 300457 (CN)。 凯莱英生命科学技术(天津)有限公司 (ASYMCHEM LIFE SCIENCE (TIANJIN) CO., LTD) [CN/CN]; 中国天津市经济技术开发区第七大街 71 号, Tianjin 300457 (CN)。 天津凯莱英制药有限公司 (TIANJIN ASYMCHEM PHARMACEUTICAL CO., LTD) [CN/CN]; 中国天津市经济技术开发区, Tianjin 300000 (CN)。 凯莱英医药化学(阜新)技术有限公司 (ASYMCHEM LABORATORIES (FUXIN) CO., LTD) [CN/CN]; 中国辽宁省阜新市经济技术开发区 E 路 42 号, Liaoning 123000 (CN)。 吉林凯莱英医药化学有限公司 (JILIN ASYMCHEM LABORATORIES CO., LTD) [CN/CN]; 中国吉林省敦化市经济开发区工业园区, Jilin 133700 (CN)。
- (72) 发明人: 洪浩 (HONG, Hao); 中国天津市经济技术开发区第七大街 71 号, Tianjin 300457 (CN)。 郑长

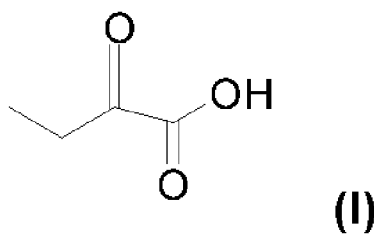
胜 (ZHENG, Changsheng); 中国天津市经济技术开发区第七大街 71 号, Tianjin 300457 (CN)。 郭莉娜 (GUO, Lina); 中国天津市经济技术开发区第七大街 71 号, Tianjin 300457 (CN)。

- (74) 代理人: 北京康信知识产权代理有限公司 (KANGXIN PARTNERS, P.C.); 中国北京市海淀区知春路甲 48 号盈都大厦 A 座 16 层, Beijing 100098 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[见续页]

(54) Title: SYNTHESIS METHOD FOR L-HETEROCYCLIC AMINO ACID AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION HAVING SAID ACID

(54) 发明名称: L-杂环氨基酸的合成方法及具有其的药物组合物



(57) Abstract: The present invention provides a synthesis method for L-heterocyclic amino acid and a pharmaceutical composition having said acid. Said synthesis method comprises: step a.) preparing heterocyclic keto acid, wherein the heterocycle of the heterocyclic keto acid is selected from one of a five-membered heterocycle, a six-membered heterocycle, a seven-membered heterocycle, an alkyl-substituted five-membered heterocycle, an alkyl-substituted six-membered heterocycle, and an alkyl-substituted seven-membered heterocycle, and wherein the keto acid group in the heterocyclic keto acid has the structural formula (I) and is located on any one of the carbon positions of the heterocycle, and step b.) mixing the heterocyclic keto acid with ammonium formate, phenylalanine dehydrogenase, formate dehydrogenase and coenzyme NAD⁺, and carrying out a reductive amination reaction to generate L-heterocyclic amino acid, wherein the phenylalanine dehydrogenase amino acid sequence is SEQ ID No. 1. Using a specific phenylalanine dehydrogenase with formate dehydrogenase and coenzyme NAD⁺ to enable a reductive amination reaction of cyclic keto acid so as to generate L-heterocyclic amino acid allows for a high conversion rate of raw materials and high chiral selectivity.

(57) 摘要:

[见续页]



WO 2013/167012 A2



RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

- 不包括国际检索报告，在收到该报告后将重新公布(细则 48.2(g))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

本国际公布：

- 根据申请人的请求，在条约第 21 条(2)(a)所规定的期限届满之前进行。

本发明提供了一种 L-杂环氨基酸的合成方法及具有其的药物组合物。该合成方法包括：步骤 A，制备杂环酮酸，其中，杂环酮酸中的杂环选自五元单杂环、六元单杂环、七元单杂环、五元烷基取代单杂环、六元烷基取代单杂环和七元烷基取代单杂环中的任一种，杂环酮酸中的酮酸基的结构式为 (I) 且位于杂环的任一碳位上；步骤 B，将杂环酮酸与甲酸铵、苯丙氨酸脱氢酶、甲酸脱氢酶以及辅酶 NAD⁺ 混合，进行还原氨基化反应，生成 L-杂环氨基酸，其中，苯丙氨酸脱氢酶的氨基酸序列为 SEQ ID No. 1。利用特定苯丙氨酸脱氢酶与甲酸脱氢酶、辅酶 NAD⁺ 使杂环酮酸发生还原氨基化反应生成 L-杂环氨基酸，原料转化率高，手性选择性强。

L-杂环氨基酸的合成方法及具有其的药物组合物

技术领域

本发明涉及医药合成领域，具体而言，涉及一种 L-杂环氨基酸的合成方法及具有其的药物组合物。

5 背景技术

目前，合成手性非天然的杂环氨基酸，主要是采用化学方法，包括使用贵金属不对称催化氢化来对某一关键中间体实现单一构型的转化、使用手性试剂拆分消旋体、利用手性辅基不对称合成、使用手性原料的定向合成等方法。然而这些方法存在以下一些缺陷：

10 (1) 使用贵金属不对称催化氢化来对某一关键中间体实现单一构型的转化，其缺点是贵金属不对称催化剂价格昂贵，反应需要大量有机溶剂，产物中有重金属残留且可能存在过度还原的副产物，而且因为合成的原料中含有杂环，常常会干扰重金属与配体的结合，造成催化效率不高。

15 (2) 采用传统的手性拆分方法，得到消旋体中一个需要的异构体，会造成另外一半的原料浪费。

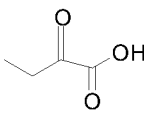
 (3) 利用手性辅基或手性原料的不对称合成，涉及到价格昂贵的手性原料、较长的合成路线以及大量的有机溶剂，而且对于某些杂环氨基酸的合成，得到的产品光学纯度不高，或者产品和杂质不易分离。

20 现有技术中也有一些文献报道采用生物合成的方法，通过使用特定的酶催化，将一些简单烷基的酮酸转化为对应的氨基酸。但是，由于杂环氨基酸的性质比较特殊，现有技术目前还没有找到合适的酶以及相应的反应条件，来通过生物转化合成带手性杂环结构的氨基酸。

发明内容

25 本发明旨在提供一种 L-杂环氨基酸的合成方法及具有其的药物组合物，得到了光学纯度较高的 L-杂环氨基酸。

为了实现上述目的，根据本发明的一个方面，提供了一种 L-杂环氨基酸的合成方法，包括：步骤 A，制备杂环酮酸，其中，杂环酮酸中的杂环选自五元单杂环、六元单杂环、七元单杂环、五元烷基取代单杂环、六元烷基取代单杂环和七元烷基取代单

杂环中的任一种，杂环酮酸中的酮酸基的结构式为  且位于杂环的任一碳位上；步骤 B，将杂环酮酸与甲酸铵、苯丙氨酸脱氢酶、甲酸脱氢酶以及辅酶 NAD⁺ 混合，进行还原氨基化反应，生成 L-杂环氨基酸，其中，苯丙氨酸脱氢酶的氨基酸序列为 SEQ ID No. 1。

进一步地，编码上述苯丙氨酸脱氢酶的基因序列为 SEQ ID No. 2。

进一步地，上述苯丙氨酸脱氢酶的表达过程包括：将包含基因序列的 DNA 片段插入载体，得到基因重组质粒；将基因重组质粒转化入宿主菌，在培养基上进行培养，用诱导剂诱导苯丙氨酸脱氢酶的产生；对宿主菌进行超声波破碎，然后离心分离得到粗酶混合液，粗酶混合液中包含苯丙氨酸脱氢酶以及甲酸脱氢酶。

进一步地，上述粗酶混合液中，苯丙氨酸脱氢酶的酶比活为 40~60U/ml，甲酸脱氢酶的酶比活为 20~30U/ml。

进一步地，上述步骤 B 包括：将杂环酮酸和甲酸铵加入水溶液中，调节 pH 值至 8.2~8.5，加入粗酶混合液以及辅酶 NAD⁺，于 30~40℃ 下反应至原料转化完毕，得到 L-杂环氨基酸。

进一步地，上述对应于每摩尔杂环酮酸，粗酶混合液的添加量为 2~10ml；对应于每摩尔杂环酮酸，辅酶 NAD⁺ 的添加量为 0.005~0.1 摩尔，甲酸铵的添加量为 1.5~5 摩尔。

进一步地，上述合成方法在步骤 B 之后还包括：在反应后的体系中加入浓盐酸，过硅藻土，得到滤出液；将滤出液 pH 值调节至 5.0~7.0 后过强酸性阳离子交换树脂，得到粗品；将粗品浓缩，加醇类溶剂洗涤，烘干，得到纯化的 L-杂环氨基酸。

进一步地，上述杂环酮酸的制备方法包括以下步骤：使杂环酮与乙酐、乙酸钠、N-乙酰基甘氨酸反应，得到中间产物，其中，杂环酮中的杂环选自五元单杂环、六元单杂环、七元单杂环、五元烷基取代单杂环、六元烷基取代单杂环和七元烷基取代单杂环中的任一种，杂环酮的酮基的结构式为 —C=O 且位于杂环酮的任一碳位上；使中间产物在路易斯碱存在的条件下发生水解反应，酸化后得到杂环酮酸。

进一步地，上述杂环酮酸的制备方法包括以下步骤：将杂环烷基化合物与草酸二乙酯在正丁基锂或叔丁醇钾存在的条件下反应，生成杂环酮酸酯，其中，杂环烷基化合物中的杂环选自五元单杂环、六元单杂环、七元单杂环、五元烷基取代单杂环、六元烷基取代单杂环和七元烷基取代单杂环中的任一种，杂环烷基化合物的烷基为甲基且位于杂环烷基化合物的任一碳位上；将杂环酮酸酯在路易斯碱存在的条件下发生水解反应，酸化得到杂环酮酸。

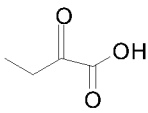
根据本发明的另一方面，提供了一种药物组合物，包括药物有效剂量的如权利要求 1 至 9 中任一项的合成方法合成得到的 L-杂环氨基酸以及药用载体。

应用本发明的技术方案，利用氨基酸序列为 SEQ ID No. 1 的特定苯丙氨酸脱氢酶与甲酸脱氢酶以及辅酶 NAD^+ 进行配合使杂环酮酸发生还原氨基化反应生成 L-杂环氨基酸，手性中心在苯丙氨酸脱氢酶和辅酶的催化作用下转化形成，原料的转化率达 80% 以上，手性选择性高，得到的产物不涉及异构体的分离和纯化，进而简化了 L-杂环氨基酸的合成工艺；而且，整个合成过程的反应条件温和，更能适应 L-杂环氨基酸的工业化大规模生产。

15 具体实施方式

需要说明的是，在不冲突的情况下，本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将结合实施例来详细说明本发明。

在本发明一种典型的实施方式中，提供了一种 L-杂环氨基酸的合成方法，包括：步骤 A，制备杂环酮酸，其中，杂环酮酸中的杂环选自五元单杂环、六元单杂环、七元单杂环、五元烷基取代单杂环、六元烷基取代单杂环和七元烷基取代单杂环中的任

一种，杂环酮酸中的酮酸基的结构式为  且位于杂环的任一碳位上；步骤 B，将杂环酮酸与甲酸铵、苯丙氨酸脱氢酶、甲酸脱氢酶以及辅酶 NAD^+ 混合，进行还原氨基化反应，生成 L-杂环氨基酸，其中，苯丙氨酸脱氢酶的氨基酸序列为 SEQ ID No. 1。

上述合成方法利用氨基酸序列为 SEQ ID No. 1 的特定苯丙氨酸脱氢酶与甲酸脱氢酶以及辅酶 NAD^+ 进行配合使杂环酮酸发生还原氨基化反应生成 L-杂环氨基酸，手性中心在苯丙氨酸脱氢酶和辅酶的催化作用下转化形成，原料的转化率达 80% 以上，手性选择性高，得到的产物不涉及异构体的分离和纯化，进而简化了 L-杂环氨基酸的合

成工艺；而且，整个合成过程的反应条件温和，更能适应 L-杂环氨基酸的工业化大规模生产。

本发明的杂环选自五元单杂环、六元单杂环、七元单杂环、五元烷基取代单杂环、六元烷基取代单杂环和七元烷基取代单杂环中的任意一种，其中的五元单杂环、五元
5 烷基取代单杂环包括但不限于吡咯、咪唑、三唑、呋喃、吡唑、噻吩及其对应的化学可接受的烷基取代单杂化环，六元单杂环、六元烷基取代单杂化包括但不限于吡啶、嘧啶、吡嗪、哒嗪及其对应的化学可接受的烷基取代单杂环，七元单杂环、七元烷基取代单杂环包括但不限于吡啶、喹啉、蝶啶、吡啶及其对应的化学可接受的烷基取代单杂环，且其中的烷基选自甲基、乙基、丙基和丁基中的任一种，优选甲基。上述合
10 成方法中，编码苯丙氨酸脱氢酶的基因序列为 SEQ ID No. 2。

上述基因序列编码的苯丙氨酸脱氢酶对催化杂环酮酸与甲酸铵合成 L-杂环氨基酸的选择性和催化转化率均较好。

在本发明的一种优选的实施例中，上述苯丙氨酸脱氢酶的表达过程包括：将包含上述基因序列的 DNA 片段插入载体，得到基因重组质粒；将上述基因重组质粒转化
15 入宿主菌，在培养基上进行培养，用诱导剂诱导苯丙氨酸脱氢酶的产生；对宿主菌进行超声波破碎，然后离心分离得到粗酶混合液，该粗酶混合液中包含苯丙氨酸脱氢酶以及甲酸脱氢酶。

上述利用具有上述基因序列的 DNA 片段插入载体后得到基因重组质粒，并且利用该基因重组质粒配合诱导剂的诱导作用得到的苯丙氨酸脱氢酶的活力和含量均较
20 好，将宿主菌破碎、离心后得到的粗酶混合液中既含有苯丙氨酸脱氢酶又含有甲基营养型宿主菌本身所含有的甲酸脱氢酶，本发明可直接利用该粗酶混合液催化酮酸向氨基酸的转化。

在上述实施例的实施过程中，温度、培养基的改变都会影响所得到的粗酶液中苯丙氨酸脱氢酶的以及甲酸脱氢酶的酶比活，所得到的粗酶混合液都能应用于本发明，
25 且优选得到的粗酶混合液中，苯丙氨酸脱氢酶的酶比活为 40~60U/ml，甲酸脱氢酶的酶比活为 20~30U/ml。利用具有上述酶比活的粗酶混合液在催化酮酸向 L-杂环氨基酸的转化过程中不仅手性选择性更高，催化效率更好。

在本发明的又一种优选的实施例中，上述合成方法的步骤 B 包括：将杂环酮酸和甲酸铵加入水溶液中，调节 pH 值至 8.2~8.5，加入粗酶混合液以及辅酶 NAD^+ ，于 30~
30 40℃ 下反应至原料转化完毕，得到 L-杂环氨基酸。上述步骤 B 中利用水做溶剂从而大

大降低了生产成本，而且无有机溶剂的产生，合成工艺绿色环保，进一步适应工业化的大规模生产。

为了进一步从原料上控制成本并且通过调控各原料的用量比来得到尽量多的产物，优选对应于每克杂环酮酸，粗酶混合液的添加量为 2~10ml；对应于每摩尔杂环酮酸，辅酶 NAD⁺的添加量为 0.005~0.1 摩尔，甲酸铵的添加量为 1.5~5 摩尔。

在本发明的又一种优选的实施例中，上述合成方法在步骤 B 之后还包括：在反应后的体系中加入浓盐酸，过硅藻土，得到滤出液；将滤出液 pH 值调节至 5.0~7.0 后过强酸性阳离子交换树脂，得到粗品；将粗品浓缩，调节 pH 值至 7.0，加醇类溶剂洗涤，烘干，得到纯化的 L-杂环氨基酸。由于本发明的手性选择性较高，在对产物的分离纯化中不涉及异构体的分离和纯化，进而使得本发明的分离方法比较简单，只需要将产物与酶、原料等进行分离即可。

在本发明的又一种优选的实施例中，上述合成方法中所应用的杂环酮酸的制备方法包括以下步骤：使杂环酮与乙酐、乙酸钠、N-乙酰基甘氨酸反应，得到中间产物，其中，杂环酮中的杂环选自五元单杂环、六元单杂环、七元单杂环、五元烷基取代单杂环、六元烷基取代单杂环和七元烷基取代单杂环中的任一种，杂环酮的酮基的结构式为 —C=O 且位于杂环酮的任一碳位上；使上述中间产物在路易斯碱存在的条件下发生水解反应，酸化后得到杂环酮酸。

上述合成杂环酮酸的路线较短，而且并没设计使用贵重金属催化剂，从而保证了得到的杂环酮酸中不存在重金属残留的问题；在后续的合成 L-杂环氨基酸的过程中没有使用贵重金属催化剂，进一步保证了得到的 L-杂环氨基酸中也不存在重金属残留的问题。

在本发明的又一种优选的实施例中，上述合成方法中所应用的杂环酮酸的制备方法包括以下步骤：将杂环烷基与草酸二乙酯在正丁基锂或叔丁醇钾存在的条件下反应，生成杂环酮酸酯，其中，杂环烷基化合物中的杂环选自五元单杂环、六元单杂环、七元单杂环、五元烷基取代单杂环、六元烷基取代单杂环和七元烷基取代单杂环中的任一种，杂环烷基化合物的烷基为甲基且位于杂环烷基化合物的任一碳位上；将杂环酮酸酯在路易斯碱存在的条件下发生水解反应，酸化得到杂环酮酸。

同样，上述合成杂环酮酸的路线较短，而且并没设计使用贵重金属催化剂，从而保证了得到的杂环酮酸中不存在重金属残留的问题；在后续的合成 L-杂环氨基酸的过程中也没有使用贵重金属催化剂，进一步保证了得到的 L-杂环氨基酸中也不存在重金属残留的问题。

在本发明的另一种典型的实施方式中，提供了一种药物组合物，包括药物有效剂量的上述合成方法合成得到的 L-杂环氨基酸以及药用载体。本发明的 L-杂环氨基酸的纯度较高，因此具有其的药物组合物的相对于现有技术中的具有 L-杂环氨基酸的药物组合物的靶点更小、副作用更低。

5 下面将结合实施例和对比例进一步说明本发明的有益效果。

以下实施例所用的苯丙氨酸脱氢酶为氨基酸序列为 SEQ ID No. 1 的苯丙氨酸脱氢酶，其中编码实施例 1 至 8 的苯丙氨酸脱氢酶的基因序列来源于球形芽孢杆菌。

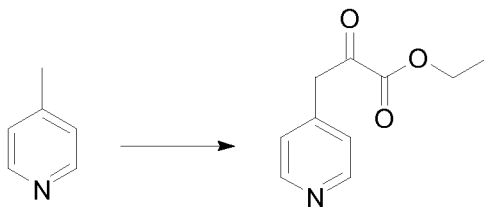
苯丙氨酸脱氢酶的表达过程如下：

10 将包含基因序列 SEQ ID No. 2 的 DNA 片段插入 pET-22b (+)载体，得到基因重组质粒；将上述基因重组质粒转化入大肠杆菌 BL21，在培养基上进行培养，用诱导剂诱导苯丙氨酸脱氢酶的产生；对大肠杆菌 BL21 进行超声波破碎，然后离心分离得到具有酶比活为 38~70U/ml 的苯丙氨酸脱氢酶和酶比活为 15~35U/ml 甲酸脱氢酶的粗酶混合液。

实施例 1

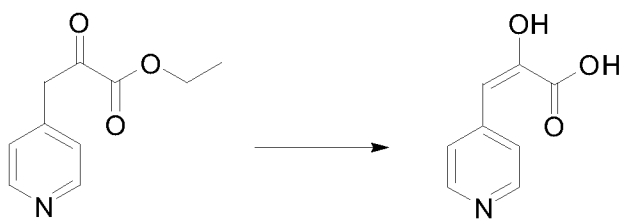
15 L-4-吡啶基丙氨酸的合成

1)、向四口瓶加入 904.2g、1.5eq 叔丁醇钾、2L 四氢呋喃和 500g 4-甲基吡啶，室温搅拌 2.5h，滴加 941.1g 草酸二乙酯，加毕，室温搅拌过夜至反应完毕，具体反应如下式。体系暂存直接投第二步。

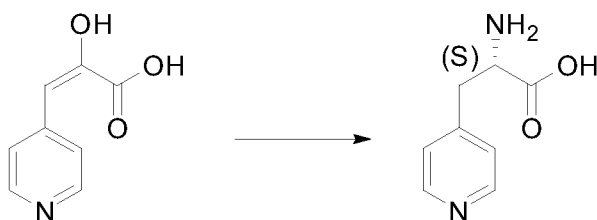


20 2)、将上一体系加入瓶中，然后向其中加入 1L 甲醇、2L H₂O，783.6g 叔丁醇钾，保温反应至无原料，具体反应如下式。然后浓缩，并将浓缩后的体系降至室温，用 6mol/L 盐酸调节 pH 值在 2~3 之间，向其中加 3 体积倍的水稀释，抽滤，滤液降至 0~5℃抽滤，得到 640g 固体，两步收率 72.2%。¹H NMR(400MHz, DMSO): δ8.45 (d, 2H), 8.03(d, 2H), 7.55(d, 1H)。

7



3)、向 2L 四口瓶中加入 150mL 纯化水、12.1g 氢氧化钠，搅拌至全溶，然后加入 50g 酮酸，继续搅拌至体系全溶，并检测到 pH 值在 9~10 之间，向其中加 28.6 甲酸铵，用 NaOH 将体系 pH 值调节至 8.2~8.5，加入具有酶比活为 50 U/ml 的苯丙氨酸脱氢酶和酶比活为 25U/ml 甲酸脱氢酶的粗酶混合液 500mL、2.0g NAD^+ ，然后将体系升温至 30~40℃反应至无原料，具体反应式如下。将反应后的体系用 100mL 浓盐酸调至 pH 值在 1~2 之间，过硅藻土得滤液，然后用 NaOH 将滤液调至 pH 值在 6~7 之间，过强酸性盐离子交换树脂得到粗品；将粗品浓缩然后用甲酸调至 pH 值为 7，加乙醇洗涤，得到类白色固体，L-杂环氨基酸的手性纯度为 99.5%。 ^1H NMR(400MHz, D_2O): δ 8.58 (d, 2H), 7.90(d, 2H), 4.45(t, 1H) , 3.47 (dd, 2H)



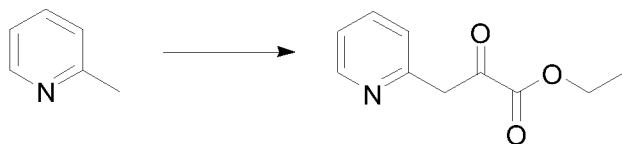
实施例 2

L-2-吡啶基丙氨酸的合成

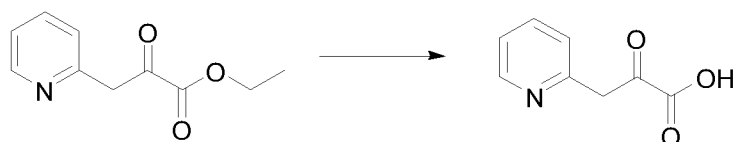
1)、2L 四口瓶中加入 800mL 四氢呋喃和 152g(1.4eq)重蒸二异丙胺，搅拌降温至 -50~-40℃，在 -50~-40℃下滴加 590mL 正丁基锂 (2.55N, 1.4eq) ,后搅拌 0.5h，继续降温至 -80~-70 度，在 -80~-70 度滴加 100g 2-甲基吡啶后保温反应 2h 后 TLC 跟踪至原料消失，得体系 A；

向 3L 四口瓶加入 200mL 四氢呋喃和 172g 草酸二乙酯，搅拌均匀后降温至 -80~-70℃，得体系 B；

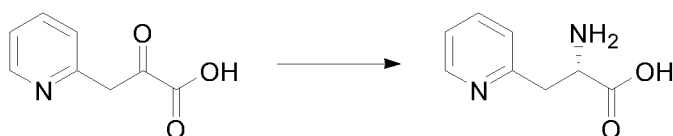
在 -80~-70℃下将体系 A 压入体系 B 中，搅拌 1h 后 TLC 跟踪至反应毕，回温至 -60℃，控制体系温度低于 -20℃用 2mol/L 的盐酸将体系 PH 调节至 5~6 之间，将体系升温至室温，分液后水相分别用 300mL 乙酸乙酯萃取三次，萃取后的有机相合并后用硫酸钠干燥过夜，抽滤后母液浓缩至有大量固体析出，继续抽滤得到 105g 粗品 1。



2)、将 100g 上述粗品 1 溶于 200mL 浓度为 2mol/L 氢氧化钠溶液中, 升温至 60~70℃, 保温反应 6~8h 后, TLC 跟踪反应完毕, 降温至 15~25℃后用 200mL 乙酸乙酯洗涤, 得到的水相降温至 0~5℃, 并在 0~5℃下用浓盐酸将水相的 pH 值调节至 1~2 析出固体, 抽滤, 滤饼用 40mL 冰水洗涤, 得到 26g 粗品 2。¹H NMR(400MHz,DMSO): 88.50 (d, 1H), 7.89 (t, 1 H), 7.47 (d, 1 H), 7.29 (t, 1 H), 6.53 (s, 1H)。



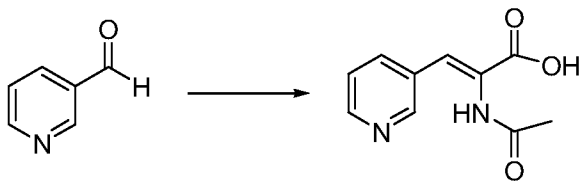
3)、向 1L 四口瓶中加入 7.91g NaOH、100mL 纯化水、酮酸 32.6g、甲酸铵 24.9g, 体系 pH 值在 8.2~8.5 之间, 向其中加入 326ml 具有酶比活为 40 U/ml 的苯丙氨酸脱氢酶和酶比活为 30U/ml 甲酸脱氢酶的粗酶混合液和 1.31g NAD⁺, 然后将体系升温至 30~40℃, 反应过夜后跟踪原料转化完毕, 然后向体系中加入 65mL 浓盐酸, 过硅藻土后得滤液, 用 NaOH 将该滤液的 pH 值调节至 7, 然后经过强酸性阳离子交换树脂得到粗品 3, 将该粗品 3 浓缩, 然后用甲酸将该粗品 3 的 pH 值调节至 7, 利用异丙醇水洗后得到 12.8g 固体, L-杂环氨基酸的手性纯度为 99.6%。¹H NMR(400MHz, D₂O): 88.66 (d, 1H), 8.48(t, 1H), 7.97(d, 1H), 7.91(t, 1H), 4.23 (t, 1H), 3.58 (d, 2H)。



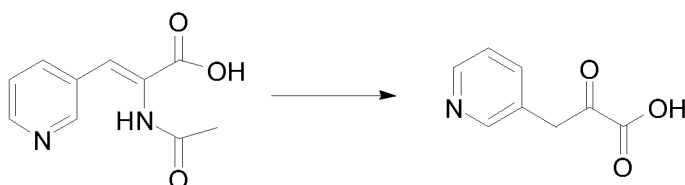
实施例 3

L-3-吡啶基丙氨酸的合成

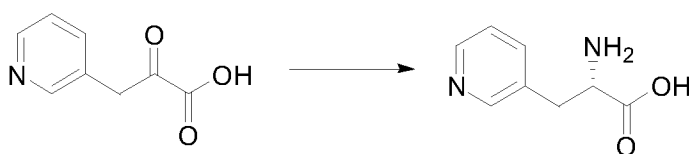
1)、向 20L 四口瓶中加入 5.7L 乙醚、946g 乙酸钠、1350g 乙酰基甘氨酸和 950g 3-吡啶甲醛, 升温至 100~105℃后反应 4h, 然后将体系降温至 5℃以下, 抽滤, 滤饼使用冰水洗, 得到 1100g 固体产物 1。¹H NMR(400MHz,CDCl₃): 89.01 (s, 1H), 8.58 (d, 1 H), 8.55 (d, 1H) ,7.38(t, 1 H), 7.04 (s, 1 H), 2.15 (s, 3H)。



2)、向 20L 四口瓶中加入 1100g 固体产物 1、5.5L 二氧六环和 5.5L 浓度为 4mol/L 的盐酸，体系回流反应 3.5h 后降至室温，然后将体系浓缩至大部分液体被蒸出，然后将浓缩后的体系抽滤，滤饼用 550mL 冰水淋洗，再用 550mL 丙酮淋洗得到 391g 黄色
5 固体产物 2。¹H NMR(400MHz, DMSO): δ 10.13 (d, 1H), 9.80 (d, 1H), 9.72(d, 1H), 9.01 (t, 1H), 7.56 (s, 1H)。



3)、室温下，向 3L 四口瓶中加入纯水及 36 gNaOH，向体系中加入 60g 2-羧基-3-
(吡啶-3-基) 丙酸，搅拌至全溶，向其中加入 45.4g 甲酸铵，600mL 具有酶比活为 60
10 U/ml 的苯丙氨酸脱氢酶和酶比活为 20U/ml 甲酸脱氢酶的粗酶混合液和 2.39g β -NAD⁺，
以浓氨水将体系 pH 值调节至 8.5 后升温至 30~40℃ 反应 4 天，4 天后向体系中缓慢滴
加 100 mL 浓盐酸以调节体系 pH 值为 1~2，分液后水相过 1~2cm 的硅藻土垫得滤液，
将滤液在冰浴下利用氢氧化钠将 pH 值调节至 7 后，与投料量分别为 63g 和 50g 并通
15 过上述过程得到的滤液合批过树脂柱纯化(树脂型号 001×7 强酸性阳离子交换树脂，树
脂量 15 L)，所得粗品在冰盐浴下加依次采用 90 mL 和 60 mL 纯水搅拌洗涤，抽滤得
滤饼，所得滤饼先后以异丙醇 100 mL、无水乙醇 80 mL 淋洗，烘干得 77 g 淡黄色固
体，L-杂环氨基酸的手性纯度为 99.5%。¹H NMR(400MHz, D₂O): δ 8.43 (d, 2H),
7.87(d, 1H), 7.50(t, 1H), 3.97(t, 1H), 3.24 (dd, 2H)。

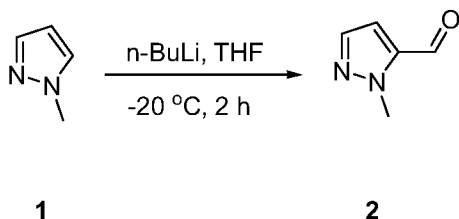


20 实施例 4

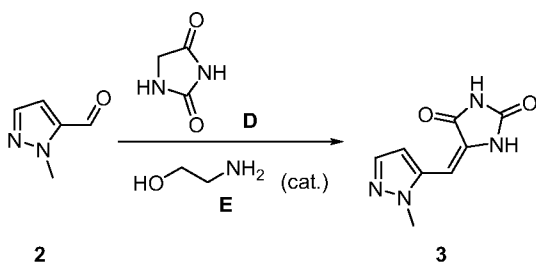
L-2-吡啶基丙氨酸的合成

1)、在-20℃氮气保护下，向 560ml 溶有 50g 化合物 1 的四氢呋喃的溶液滴加入 244ml 正丁基锂，将混合物在-20℃下搅拌 1h 后向其中逐滴加入 135 克二甲基甲酰胺，

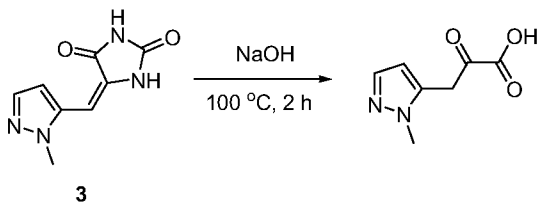
继续搅拌 2h 后, 具体反应式如下, 将反应物用 1mol/L 的氯化铵淬灭, 并浓缩以除去四氢呋喃, 将残余物溶于乙胺和水中, 分离、洗涤、合并的有机层用盐水洗涤, 用 Na_2SO_4 干燥、过滤、浓缩得到棕色油状物的粗化合物 2, 直接用于下一个步骤。



- 5 2)、在室温下向 286ml 含有 57.2g 化合物 D 的水溶液中加入 17.4 克化合物 E、63g 化合物 2 形成混合物, 将该混合物加热至 100℃。搅拌 3h 后冷却至室温, 过滤得沉淀物, 将该沉淀物用水洗涤后干燥, 得到 45g 黄色固体即化合物 3。¹H NMR (400MHz, DMSO): δ 7.47 (d, 1H), 6.93(d, 1H), 6.34(s, 1H), 3.88(s, 3H)。



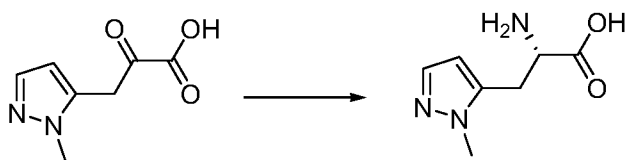
- 10 3)、向 300ml 溶有 52gNaOH 的水溶液中加入 50 克化合物 3 的混合溶液, 将所得的混合溶液加热至 100℃, 并搅拌 2h 后冷却至室温得混合物, 具体反应式如下, 用浓盐酸调整该混合物的 pH 值至 3• 4, 过滤该混合物, 将沉淀物用水洗涤干燥, 得到 26g 白色固体产物 59%收率。¹H NMR (400MHz, DMSO): δ 7.68 (d, 1H), 6.96(d, 1H), 6.68(s, 1H), 4.09(s, 3H)。



15

- 4)、向 10mL 溶有 0.475gNaOH 的水溶液中加入 2.0g 上步骤得到的白色固体产物和 1.51g 甲酸铵, 该混合物的 pH 值为 7.5• 8.0, 向其中加入具有酶比活为 50U/ml 的苯丙氨酸脱氢酶和酶比活为 25U/ml 甲酸脱氢酶的粗酶混合液 20mL 和 80mg 的 NAD^+ , 用氨水将 pH 值调节到 8.5, 然后将混合物在 30℃下反应 7 天, 具体反应式如下, 7 天后将约 2.5ml 的浓盐酸加入到混合物中, 过硅藻土过滤, 将滤液用 NaOH 调节 pH 值
- 20

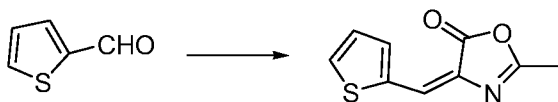
至 7.0, 通过强酸性阳离子交换树脂纯化产物得 1, L-杂环氨基酸的手性纯度为 98.5%。
¹H NMR (400MHz, D₂O): δ8.50 (d, 2H), 3.5(t, 1H), 2.87(d, 2H)。



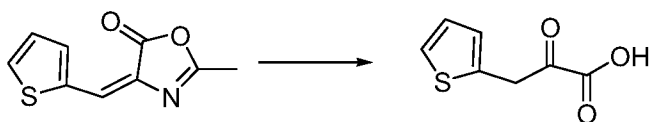
实施例 5

5 L-2-噻吩基丙氨酸的合成

1)、向 2L 四口瓶中加入 196.6g 2-噻吩基丙氨酸、267g N-乙酰基甘氨酸、187g 乙酸钠、1180mL 乙酸酐后将体系升温至 100~110°C 反应约 24h, 跟踪至原料转化毕, 具体反应式如下, 将体系降温至室温, 并向其中加入 540mL 正庚烷后抽滤, 滤饼用 2L 冰水淋洗、烘干得到 154.8 粗品, 收率 45.7%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ7.60 (d, 1H),
 10 7.48(d, 1H), 7.03(t, 1H), 2.28(s, 3H)。

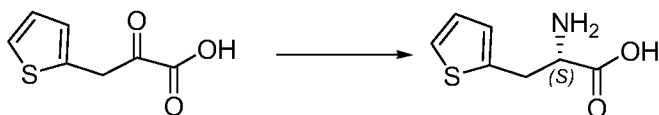


2)、向 1L 四口瓶中加入 81.84g 上述粗品、654mL 水、266.6g LiOH·H₂O, 搅拌升温至 60~70°C 反应约 11h, 跟踪至原料转化毕, 具体反应式如下, 降温至室温后向体系中滴加 580mL 浓盐酸使 pH 值调节至 3, 抽滤析出的固体, 将该固体水洗后直接用于下一步反应。¹H NMR (400MHz, DMSO): δ7.39 (d, 1H), 7.09(d, 1H), 6.99(t, 1H),
 15 6.50(s, 1H)。



3)、向 2L 四口瓶中加入 11.7g NaOH、250mL 纯水, 全溶后加入 50g 酮酸和 36.9g 甲酸铵, 将所形成的体系的 pH 值调节至 8.2~8.5, 然后向其中具有酶比活为 50 U/ml 的苯丙氨酸脱氢酶和酶比活为 25U/ml 甲酸脱氢酶的粗酶混合液 500mL 和 1.94g NAD⁺, 将体系升温至 30~40°C 反应约 40h 跟踪原料反应毕, 继续向体系中滴加 100mL 浓盐酸终止反应, 体系过硅藻土后得滤液, 用氢氧化钠固体将所得滤液的 pH 值调节至 5~6 之间, 继续降温至 -18°C 以析晶, 母液过强酸性阳离子交换树脂回收产品, 所有产品合并, 异丙醇洗后烘干得到类白色固体, L-杂环氨基酸的手性纯度为 99.7%。
 20

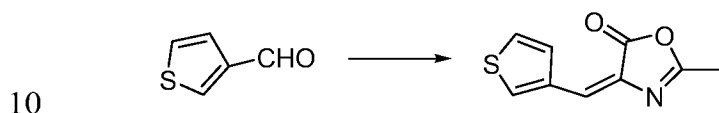
^1H NMR (400MHz, D₂O): δ 7.30 (d, 1H), 7.02(t, 1H), 6.93(s, 1H), 3.50(t, 1H, 3.15 (d, 2H)。



实施例 6

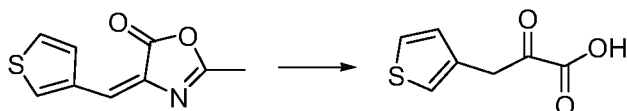
5 L-3-噻吩基丙氨酸的合成

1)、向 500mL 四口瓶中加入 25g 3-醛基噻吩、33.9g N-乙酰基甘氨酸、150mL 乙酸酐和 23.8g 乙酸钠, 搅拌升温至 97~103°C 反应 2h., 具体反应式如下, 反应后将体系降温至室温, 倒入 200g 冰水中, 抽滤、滤饼用 100mL 水洗, 得到 28.7g 黄色固体产物 1。



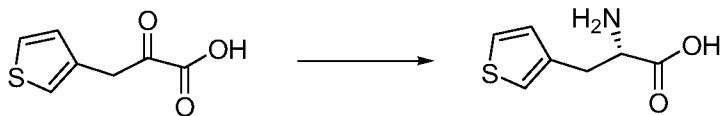
2)、向 1L 四口瓶中加入 23.8g 黄色固体 1、77.6g 一水合氢氧化锂和 190mL 水, 升温至 50~60°C 反应 2h 后加入 50mL 甲醇, 继续反应约 3h 后将体系降温至室温, 控制体系温度小于 20°C 用 6mol/L 的盐酸将体系的 pH 至调节至 1~2, 然后向体系中加入 600mL 乙胺过滤后水相再用 300mL 乙胺萃取两次, 萃取后的有机相合并后用活性炭脱色, 浓缩后的粗品使用 40mL 二氯甲烷洗, 得到 5.75g 产物 2。 ^1H NMR(400MHz, (CD₂)₂CO) 7.83 (d, 1H), 7.51(d, 1H), 7.46(d, 1H), 6.67(s, 1H)。

15



3)、向 50mL 反应瓶中加入 1.0g 酮酸、2mL 纯水、1.11g 甲酸铵、39mg NAD⁺以及 11.3mL 具有酶比活为 60U/ml 的苯丙氨酸脱氢酶和酶比活为 20U/ml 甲酸脱氢酶的粗酶混合液, 体系的 pH 值在 8.2~8.5 之间, 于 30~40°C 反应, 反应约 3 天跟踪原料转化完毕, 向体系中加入 6mL 浓盐酸终止, 过硅藻土后得到的滤液用 NaOH 使体系的 pH 值调节至 5~6 之间, 然后使用强酸性阳离子交换树脂纯化得到 0.2g 目标化合物, L-杂环氨基酸的手性纯度为 99.5%。 ^1H NMR (400MHz, D₂O): δ 7.51 (d, 1H), 7.26(s, 1H), 7.11(d, 1H), 3.58(t, 1H), 3.04 (d, 2H)。

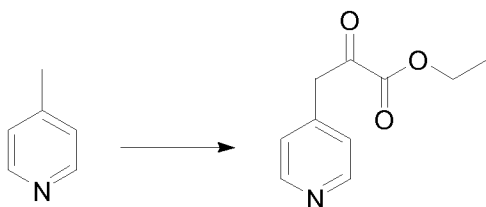
20



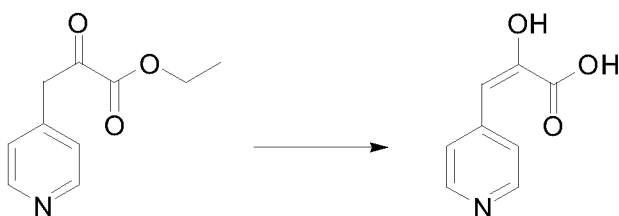
实施例 7

L-4-吡啶基丙氨酸的合成

1)、向四口瓶加入 904.2g、1.5eq 叔丁醇钾、2L 四氢呋喃和 500g 4-甲基吡啶，室温搅拌 2.5h，滴加 941.1g 草酸二乙酯，加毕，室温搅拌过夜至反应完毕，具体反应如下式。体系暂存直接投第二步。



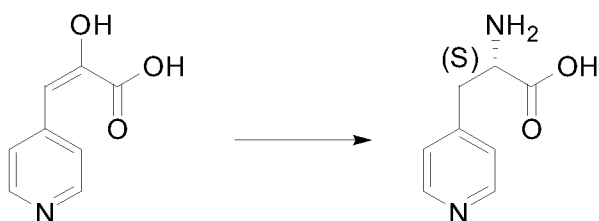
2)、将上一体系加入瓶中，然后向其中加入 1L 甲醇、2L H₂O，783.6g 叔丁醇钾，保温反应至无原料，具体反应如下式。然后浓缩，并将浓缩后的体系降至室温，用 6mol/L 盐酸调节 pH 值在 2~3 之间，向其中加 3 体积倍的水稀释，抽滤，滤液降至 0~5℃ 抽滤得到 640g 固体，两步收率 72.2%。¹H NMR(400MHz, DMSO): δ8.45 (d, 2H), 8.03(d, 2H), 7.55(d, 1H)。



3)、条件一：

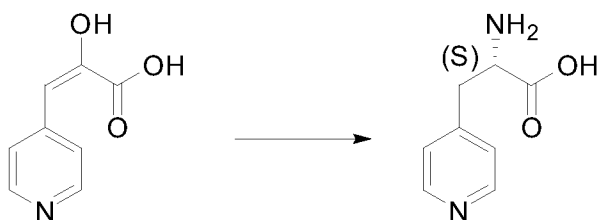
向 2L 四口瓶中加入 150mL 纯化水、12.1g 氢氧化钠，搅拌至全溶，然后加入 50g 酮酸，继续搅拌至体系全溶，并检测到 pH 值在 9~10 之间，向其中加入 28.6g 甲酸铵，用 NaOH 将体系 pH 值调节至 8.2~8.5，加入 500ml 具有酶比活为 70U/ml 的苯丙氨酸脱氢酶和酶比为 35U/ml 甲酸脱氢酶的粗酶混合液、2.0g NAD⁺，然后将体系升温至 30~40℃ 反应至无原料，具体反应式如下。将反应后的体系用 100mL 浓盐酸调至 pH 值在 1~2 之间，过硅藻土得滤液，然后用 NaOH 将滤液调至 pH 值在 6~7 之间，过强酸性盐离子交换树脂得到粗品；将粗品浓缩然后用甲酸调至 pH 值为 7.0，加乙醇洗涤，

得到类白色固体, 手性纯度为 99.1%。¹H NMR(400MHz, D₂O): δ8.58 (d, 2H), 7.90(d, 2H), 4.45(t, 1H) , 3.47 (dd, 2H)。



条件二:

- 5 向 2L 四口瓶中加入 150mL 纯化水、12.1g 氢氧化钠, 搅拌至全溶, 然后加入 50g 酮酸, 继续搅拌至体系全溶, 并检测到 pH 值在 9~10 之间, 向其中加入 28.6g 甲酸铵, 用 NaOH 将体系 pH 值调节至 7.5~8.0, 加入 500ml 具有酶比活为 70U/ml 的苯丙氨酸脱氢酶和酶比为 35U/ml 甲酸脱氢酶的粗酶混合液、2.0g NAD⁺, 然后将体系升温至 25~27℃反应至无原料, 具体反应式如下。将反应后的体系用 100mL 浓盐酸调至 pH
- 10 值在 1~2 之间, 过硅藻土得滤液, 然后 NaOH 将滤液调至 pH 值在 4.5 左右, 过强酸性盐离子交换树脂得到粗品; 将粗品浓缩然后用甲酸调至 pH 值为 8.0, 加乙醇洗涤, 得到类白色固体, L-杂环氨基酸的手性纯度为 99.1%。¹H NMR(400MHz, D₂O): δ8.58 (d, 2H), 7.90(d, 2H), 4.45(t, 1H) , 3.47 (dd, 2H)。



- 15 对比例 1

按照文献“Transition-Metal-Assisted Asymmetric Synthesis of Amino Acid Analogues. A New Synthesis of Optically Pure D- and L-Pyridylalanines”中记载的方法合成 L-甲基-2-乙酰氨基-3-(4-吡啶基)-丙酸甲酯

- 20 将 500mg 甲基-2-乙酰胺及-3-(4-吡啶基) 丙烯酸甲酯、60mg (R, R)-[Rh(DIPA MP)(COD)]+(BF₄⁻)和 12mL 甲醇加入到高压釜中, 通 H₂ 使压力达到 65psi, 跟踪至反应完后, 柱层析分离出产品 360 mg, 放置 3 个月后析出固体中间体, 结构验证数据如下: ¹H NMR (CDCl₃) 1.99 (s, 3 H, NHC-(OICH₃)), 3.07 (dd, 1 H, CH₂CH), 3.18 (d, 1 H, CH₂CH), 3.75 (s, 3 H, COOCH₃), 4.94 (t, 1 H, CH₂CH), 6.88 (br s, 1 H, NH), 7.08(d, 2 H, aromatic), 8.45 (d, 2 H, aromatic); ¹³C NMR (CDCl₃) 22.51, 36.8

1,52.17,123.11, 124.31,145.42,149.31,169.88,171.4; IR (neat)3272,3038,2955,1744,1661, 1605,1549,1437,1420,1374,1285,1217, 1179, 1003; MS (CI) [M + HI m/e 223]; GC, 97:3, 中间体的手性纯度为 94%。将此中间体使用 6mol/L 盐酸水解后得到手性纯度为 96%的 L-氨基酸。

5 对比例 2

利用 L-亮氨酸脱氢酶和甲酸脱氢酶来催化吡啶类酮酸转化成氨基酸的反应，使用核磁跟踪，未检测到产品产生。

利用 NMR 内标得到实施例 1 至 7 以及对比例 1 至 2 的 L-杂环氨基酸的手性纯度，并记录在表 1 中。

10

表 1

	实施 例 1	实施 例 2	实施 例 3	实施 例 4	实施 例 5	实施 例 6	实施 例 7	对比 例 1	对比 例 2
手性纯度 (%)	99.5	99.6	99.5	98.5	99.7	99.5	99.1	96	--

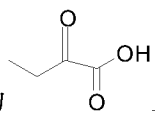
由表 1 中的数据可以看出，实施例 1 至实施例 7 采用本发明的制备方法得到的 L-杂环氨基酸的手性纯度均大于 98%，而且，由实施例 1 与对比例 1 至 2 的对比可以发现，采用本发明特定的苯丙氨酸脱氢酶对 L-杂环氨基酸的选择性得到了明显提高。

15 以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

1. 一种 L-杂环氨基酸的合成方法，其特征在于，包括：

步骤 A，制备杂环酮酸，其中，所述杂环酮酸中的杂环选自五元单杂环、六元单杂环、七元单杂环、五元烷基取代单杂环、六元烷基取代单杂环和七元

烷基取代单杂环中的任一种，所述杂环酮酸中的酮酸基的结构式为  且位于所述杂环的任一碳位上；

步骤 B，将所述杂环酮酸与甲酸铵、苯丙氨酸脱氢酶、甲酸脱氢酶以及辅酶 NAD^+ 混合，进行还原氨基化反应，生成 L-杂环氨基酸，其中，所述苯丙氨酸脱氢酶的氨基酸序列为 SEQ ID No. 1。

2. 根据权利要求 1 所述的合成方法，其特征在于，编码所述苯丙氨酸脱氢酶的基因序列为 SEQ ID No. 2。
3. 根据权利要求 2 所述的合成方法，其特征在于，所述苯丙氨酸脱氢酶的表达过程包括：

将包含所述基因序列的 DNA 片段插入载体，得到基因重组质粒；

将所述基因重组质粒转化入宿主菌，在培养基上进行培养，用诱导剂诱导所述苯丙氨酸脱氢酶的产生；

对所述宿主菌进行超声波破碎，然后离心分离得到粗酶混合液，所述粗酶混合液中包含所述苯丙氨酸脱氢酶以及所述甲酸脱氢酶。

4. 根据权利要求 3 所述的合成方法，其特征在于，所述粗酶混合液中，所述苯丙氨酸脱氢酶的酶比活为 40~60U/ml，所述甲酸脱氢酶的酶比活为 20~30U/ml。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的合成方法，其特征在于，所述步骤 B 包括：

将所述杂环酮酸和所述甲酸铵加入水溶液中，调节 pH 值至 8.2~8.5，加入所述粗酶混合液以及辅酶 NAD^+ ，于 30~40℃ 下反应至原料转化完毕，得到所述 L-杂环氨基酸。

6. 根据权利要求 5 所述的合成方法，其特征在于，

对应于每摩尔所述杂环酮酸，所述粗酶混合液的添加量为 2~10ml；

对应于每摩尔所述杂环酮酸，所述辅酶 NAD^+ 的添加量为 0.005~0.1 摩尔，所述甲酸铵的添加量为 1.5~5 摩尔。

7. 根据权利要求 1 所述的合成方法，其特征在于，所述合成方法在所述步骤 B 之后还包括：

在反应后的体系中加入浓盐酸，过硅藻土，得到滤出液；

将所述滤出液 pH 值调节至 5.0~7.0 后过强酸性阳离子交换树脂，得到粗品；

将所述粗品浓缩，加醇类溶剂洗涤，烘干，得到纯化的所述 L-杂环氨基酸。

8. 根据权利要求 1 所述的合成方法，其特征在于，所述杂环酮酸的制备方法包括以下步骤：

使杂环酮与乙酐、乙酸钠、N-乙酰基甘氨酸反应，得到中间产物，其中，所述杂环酮中的杂环选自五元单杂环、六元单杂环、七元单杂环、五元烷基取代单杂环、六元烷基取代单杂环和七元烷基取代单杂环中的任一种，所述杂环酮的酮基的结构式为 —C=O 且位于所述杂环酮的任一碳位上；

使所述中间产物在路易斯碱存在的条件下发生水解反应，酸化后得到所述杂环酮酸。

9. 根据权利要求 1 所述的合成方法，其特征在于，所述杂环酮酸的制备方法包括以下步骤：

将杂环烷基化合物与草酸二乙酯在正丁基锂或叔丁醇钾存在的条件下反应，生成杂环酮酸酯，其中，所述杂环烷基化合物中的杂环选自五元单杂环、六元单杂环、七元单杂环、五元烷基取代单杂环、六元烷基取代单杂环和七元烷基取代单杂环中的任一种，所述杂环烷基化合物的烷基为甲基且位于所述杂环烷基化合物的任一碳位上；

将所述杂环酮酸酯在路易斯碱存在的条件下发生水解反应，酸化得到所述杂环酮酸。

10. 一种药物组合物，其特征在于，包括药物有效剂量的如权利要求 1 至 9 中任一项所述的合成方法合成得到的 L-杂环氨基酸以及药用载体。