202345856

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202345856 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：112109119 (22)申請日： 中華民國 112 (2023) 年 03 月 13 日

(51)Int. Cl.： *A61K31/675 (2006.01)* *C07F9/32 (2006.01)*

C07F9/6558 (2006.01) *A61P9/10 (2006.01)*

(30)優先權：2022/03/14 世界智慧財產權組織 PCT/EP2022/056471

(71)申請人：瑞士商愛杜西亞製藥有限公司 (瑞士) IDORSIA PHARMACEUTICALS LTD (CH) 瑞士

(72)發明人：阿貝雷 斯戴凡 ABELE, STEFAN (CH)；布朗 加雷思 BROWN, GARETH (GB)；麥金泰爾 彼得 MCINTYRE, PETER (GB)；米克斯 斯戴凡 MIX, STEFAN (DE)

(74)代理人：陳長文；朱淑尹；許文亭

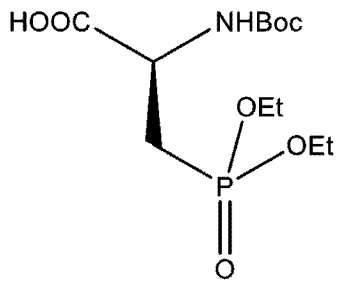
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：5 共 59 頁

(54)名稱

(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸或其膦酸酯衍生物之合成方法

(57)摘要

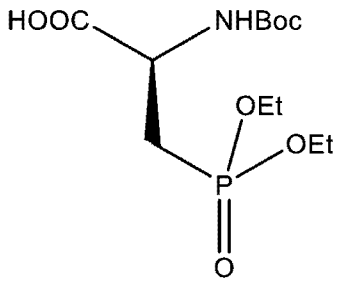
本發明係關於(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸(「**化合物**」)、其膦酸酯衍生物或前述任一者之鹽之合成方法；係關於**化合物**之結晶形式，及係關於**化合物**(尤其呈結晶形式之**化合物**)或其膦酸酯衍生物或鹽於製備 4-((R)-2-{[6-((S)-3-甲氧基-吡咯啶-1-基)-2-苯基-嘧啶-4-羰基]-胺基}-3-膦醯基-丙醯基)-哌嗪-1-羧酸丁酯(亦稱為塞拉格雷(selatogrel))或其醫藥上可接受之鹽之用途。



化合物

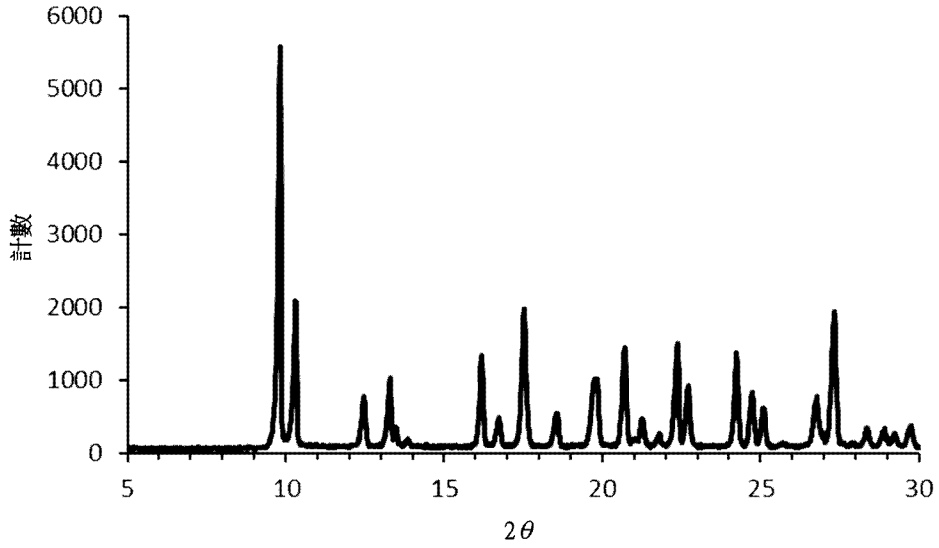
The present invention relates to a process for the synthesis of (R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(diethoxyphosphoryl)propanoic acid ("COMPOUND"), of phosphonate derivatives thereof, or of salts of any of the aforementioned; to a crystalline form of COMPOUND, and to the use of COMPOUND (especially of COMPOUND in crystalline form) or phosphonate derivatives or salts thereof for the preparation of 4-((R)-2-{[6-((S)-3-methoxy-pyrrolidin-1-yl)-2-phenyl-pyrimidine-4-carbonyl]-amino}-3-phosphono-propionyl)-piperazine-1-carboxylic acid butyl ester (also known as selatogrel), or of a pharmaceutically acceptable salt thereof.

TW 202345856 A



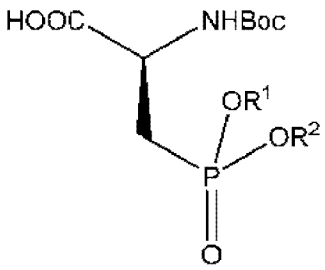
COMPOUND

指定代表圖：



【圖1】

特徵化學式：



式(I)

202348856
專利案號：112109119
202345856

【發明摘要】

【中文發明名稱】

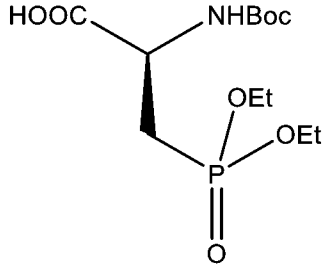
(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸或其膦酸酯衍生物之合成方法

【英文發明名稱】

A PROCESS FOR THE SYNTHESIS OF (R)-2-((TERT-BUTOXYCARBONYL)AMINO)-3-(DIETHOXYPHOSPHORYL)PROPANOIC ACID OR OF PHOSPHONATE DERIVATIVES THEREOF

【中文】

本發明係關於(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸(「**化合物**」)、其膦酸酯衍生物或前述任一者之鹽之合成方法；係關於**化合物**之結晶形式，及係關於**化合物**(尤其呈結晶形式之**化合物**)或其膦酸酯衍生物或鹽於製備4-((R)-2-{[6-((S)-3-甲氧基-吡咯啶-1-基)-2-苯基-嘧啶-4-羰基]-胺基}-3-膦醯基-丙醯基)-哌嗪-1-羧酸丁酯(亦稱為塞拉格雷(selatogrel))或其醫藥上可接受之鹽之用途。

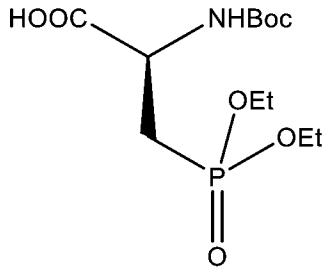


化合物

【英文】

The present invention relates to a process for the synthesis of (R)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-(diethoxyphosphoryl)propanoic acid

("COMPOUND"), of phosphonate derivatives thereof, or of salts of any of the aforementioned; to a crystalline form of COMPOUND, and to the use of COMPOUND (especially of COMPOUND in crystalline form) or phosphonate derivatives or salts thereof for the preparation of 4-((R)-2-{[6-((S)-3-methoxy-pyrrolidin-1-yl)-2-phenyl-pyrimidine-4-carbonyl]-amino}-3-phosphono-propionyl)-piperazine-1-carboxylic acid butyl ester (also known as selatogrel), or of a pharmaceutically acceptable salt thereof.



COMPOUND

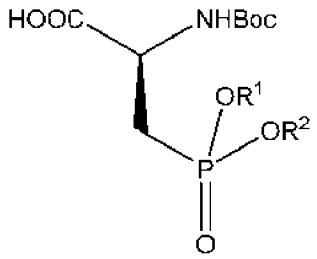
【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



式(I)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

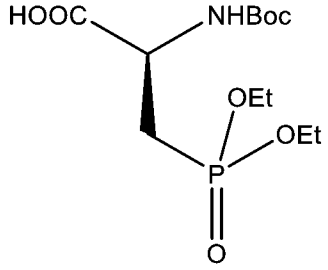
(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸或其膦酸酯衍生物之合成方法

【英文發明名稱】

A PROCESS FOR THE SYNTHESIS OF (R)-2-((TERT-BUTOXYCARBONYL)AMINO)-3-(DIETHOXYPHOSPHORYL)PROPANOIC ACID OR OF PHOSPHONATE DERIVATIVES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明係關於(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸(下文中亦稱為「**化合物**」)、其膦酸酯衍生物或前述任一者之鹽之合成方法；係關於**化合物**之結晶形式，及係關於**化合物**(尤其呈結晶形式之**化合物**)或其膦酸酯衍生物或鹽於製備4-((R)-2-{[6-((S)-3-甲氧基-吡咯啶-1-基)-2-苯基-嘧啶-4-羰基]-胺基}-3-膦醯基-丙醯基)-哌嗪-1-羧酸丁酯(亦稱為塞拉格雷(selatogrel))或其醫藥上可接受之鹽之用途。



化合物

【先前技術】

【0002】 自化合物製備塞拉格雷係描述於WO 2009/069100及Caroff E等人，J. Med. Chem. (2015), 58, 9133-9153中。塞拉格雷之醫

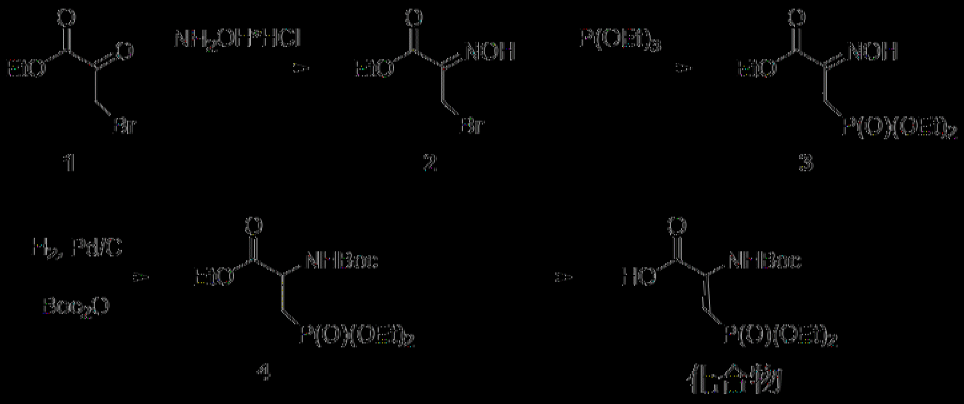
學用途係例如描述於WO 2018/167139；Baldoni D等人，Clin Drug Investig (2014), 34(11), 807-818；Storey R F等人，European Heart Journal, ehz807, doi:10.1093/eurheartj/ehz807；及Sinnaeve P R等人，J Am Coll Cardiol (2020), 75 (20), 2588-97 (doi.org/10.1016/j.jacc.2020.03.059)中。於多中心、雙盲、隨機、安慰劑對照、平行組研究中研究塞拉格雷以評估自我投與之皮下塞拉格雷於預防近期有急性心肌梗塞史之個體中全因死亡及治療急性心肌梗塞之效用及安全性(ClinicalTrials.gov識別符：NCT04957719)。

【0003】 例如，可自市售(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-碘丙酸甲酯(Boc-3-碘-L-Ala-OMe)開始藉由與亞磷酸三乙酯反應及後續於水及THF之混合物中用LiOH皂化製備化合物(WO 2009/069100及Caroff E等人，J. Med. Chem. (2015), 58, 9133-9153)。此方法之缺點係使用極昂貴之起始材料Boc-3-碘-L-Ala-OMe及其在艾伯左夫(Arbuzov)反應之條件下，尤其在大規模合成中趨於外消旋。或者，與其對映體呈外消旋混合物的化合物可根據方案1中顯示之程序製備：化合物2可藉由3-溴-2-側氧基丙酸乙酯與鹽酸羥胺反應製備。藉由化合物2與亞磷酸三乙酯反應，可獲得3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)-丙酸乙酯(化合物3)，其可在作為觸媒之Pd/C之存在下藉由氫化轉化為化合物4並用Boc_2O保護胺基。化合物及其對映體之外消旋混合物可藉由於水及甲苯之混合物中在約20℃之溫度下用LiOH皂化獲自化合物4 (Stefan Abele，2015年8月17日於波士頓舉行之第250屆ACS全國會議上之演講；Stefan Abele，2016年10月28日於巴塞爾舉行之瑞士工業化學研討會上之演講)。即使在化合物5 (諸如，舉例而言4-[2-第三丁氧基羰基胺基-3-(二乙氧基-磷醯基)-丙醯基]-哌嗪-1-羧

酸丁酯)之合成中，於酯(化合物4)、最終酸(化合物之外消旋物)或後續中間物之階段，藉由對掌性管柱層析術或模擬移動床層析術分離對映體可為可能的，但對映體之此分離之缺點係有限之可縮放性及產出量且需大量溶劑。

[0004]

方案1：化合物之合成



[發明內容]

[0005] 令人驚訝地，發現化合物可藉由用水解酶酵素解析法以極佳之產率及高對映體純度大規模獲得。

[圖式簡單說明]

[0006] 圖1顯示呈結晶形式(I)之化合物之X射線粉末繞射圖，其中該X射線粉末繞射圖係用實驗部分中描述之XRPD方法量測並係相對於Cu Kα輻射顯示。該X射線繞射圖顯示於指示之折射角2θ具有相較於該圖中最

強烈峰(most intense peak)之下列百分比之相對強度之峰(括弧中給定相對峰強度) (報告從範圍3至30° 2θ之具有相對強度大於10%之選定峰)：9.8° (100%)、10.3° (37%)、12.5° (12%)、13.3° (16%)、16.2° (23%)、17.5° (34%)、19.8° (14%)、20.7° (24%)、22.4° (25%)、22.7° (15%)、24.2° (23%)、24.7° (14%)、26.8° (12%)及27.3° (33%)。

【0007】 在圖1之X射線繞射圖中，折射角2θ (2θ)係繪製於水平軸上及計數繪製於垂直軸上。

【0008】 為避免任何疑問，上文列舉之峰描述圖1中顯示之X射線粉末繞射之實驗結果。應瞭解，與上文峰列表相反，僅需要選擇特徵峰來完全且明確地表徵呈本發明之各別結晶形式之化合物。

【0009】 圖2顯示在25℃下如獲自實例4之呈結晶形式(I)之化合物之重力蒸氣吸附(GVS)圖。

【0010】 在圖2之重力蒸氣吸附圖中，相對濕度(% RH)係繪製於水平軸上及質量變化(% dm)繪製於垂直軸上。

【0011】 圖3顯示呈結晶形式(I)之化合物之示差掃描量熱法(DSC)熱譜圖。於圖3之DSC熱譜圖中，溫度(℃)係繪製於水平軸上及熱流(mW)繪製於垂直軸上。

【0012】 圖4顯示呈結晶形式(A)之3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯之X射線粉末繞射圖，其中該X射線粉末繞射圖係用實驗部分中描述之XRPD方法量測並針對Cu Kα輻射顯示。該X射線繞射圖顯示於指示之折射角2θ具有相較於該圖中最最強烈峰之下列百分比之相對強度之峰(括弧中給定之相對峰強度) (報告自範圍3°至40° 2θ之具有相對強度大於8%之選定峰)：10.2° (100%)、11.3° (99%)、13.2° (11%)、13.8°

(9%)、15.2° (9%)、20.5° (13%)、22.7° (71%)、22.9° (33%)、25.3° (11%)、26.6° (18%)及34.3° (49%)。

【0013】 圖5顯示呈結晶形式(B)之3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯之X射線粉末繞射圖，其中該X射線粉末繞射圖係用實驗部分中描述之XRPD方法量測並針對Cu Kα輻射顯示。該X射線繞射圖顯示於指示之折射角2θ具有相較於該圖中最強烈峰之下列百分比之相對強度之峰(括弧中給定之相對峰強度) (報告自範圍3°至40° 2θ之具有相對強度大於10%之選定峰)：10.9° (31%)、18.2° (23%)、19.5° (100%)、19.8° (24%)、25.3° (10%)、27.2° (91%)、28.7° (11%)、29.5° (65%)、33.0° (24%)、34.7° (22%)及36.9° (30%)。

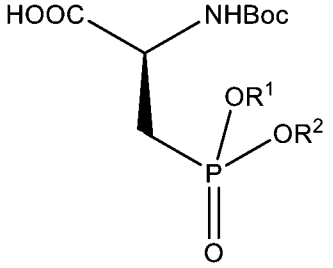
【0014】 分別在圖4及圖5之X射線繞射圖中，折射角2θ (2θ)係繪製於水平軸上及計數繪製於垂直軸上。

【0015】 為避免任何疑問，上文列舉之峰描述圖4及5中分別顯示之X射線粉末繞射之實驗結果。應瞭解，與上文峰列表相反，僅需要選擇特徵峰來完全且明確地表徵呈本發明之各別結晶形式之3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯。

【實施方式】

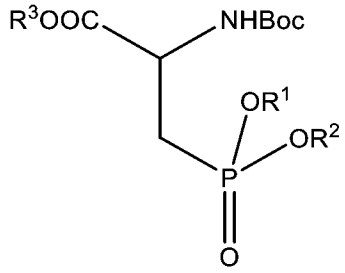
【0016】 在下文中，將描述本發明並呈現本發明之各種實施例。

【0017】 1)在第一實施例中，本發明係關於一種用於製造式(I)化合物或其鹽之方法，



式(I)

該方法包括使式(II)化合物



式(II)

其中

R^1及R^2彼此獨立地表示(C_{1-4})烷基(尤其乙基)；及

R^3表示甲基、乙基或正丙基(尤其乙基)；

與水解酶反應以產生對映體過量(ee)至少70%之式(I)化合物之步驟。

【0018】 除非另有明確闡述定義提供更廣泛或更狹隘之定義，否則本文提供之定義意欲一致地用於整個本說明書及申請專利範圍中。應充分地瞭解術語之定義或較佳定義定義且可替換獨立於(及與其組合)如本文定義之任何或所有其他術語之任何定義或較佳定義之各別術語。

【0019】 如「第一化合物之量相對於第二化合物之量係「X」當量」之內文中使用之術語「當量」意謂給定混合物含有相對於第二化合物之量(以相同單位給定)為「X」倍的第一化合物之量(以與分子數相關之任何單位)。

【0020】 除非用於溫度，否則於本申請案中，置於數值「X」前之術語「約」係指自X減X之10%延伸至X加X之10%之區間，尤其係指自X減X之5%延伸至X加X之5%之區間且特別係指自X減X之2%延伸至X加X之2%之區間。在溫度之特定情況下，在本申請案中，置於溫度「Y」前之術語「約」係指自溫度Y減10℃延伸至Y加10℃之區間，尤其係指自Y減

5℃延伸至Y加5℃之區間，且特別係指自Y減3℃延伸至Y加3℃之區間。室溫意謂約25℃之溫度。

【0021】 每當使用字組「介於……之間」或「至」描述數值範圍時，應瞭解該範圍內明確包括指示範圍之端點。例如：若將溫度範圍描述為介於40℃與80℃之間(或40℃至80℃)，則此意謂該範圍內包括端點40℃及80℃；或若將變量定義為介於1與4 (或1至4)之間的整數，則此意謂該變量係整數1、2、3或4。

【0022】 表述%w/w係指相較於考慮之組合物之總重量之重量百分比。同樣，表述v/v係指相對於總體積之一種組分之體積比率(及% v/v係指各別百分比比率)。

【0023】 單獨或組合使用之術語「烷基」係指含有一至四個碳原子之直鏈或分支鏈飽和烴鏈。術語「(C_{x-y})烷基」 (x及y各為整數)係指如前文定義含有x至y個碳原子之烷基。例如(C_{1-4})烷基含有一至四個碳原子。(C_{1-4})烷基之實例係甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基及第三丁基。在「R^1」表示「(C_{1-4})烷基」之情況下，術語「(C_{1-4})烷基」意謂甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基及第三丁基，較佳甲基、乙基及正丙基，及最佳乙基。在「R^2」表示「(C_{1-4})烷基」之情況下，術語「(C_{1-4})烷基」意謂甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基及第三丁基，較佳甲基、乙基及正丙基，及最佳乙基。

【0024】 任何提及與式(II)化合物反應以產生給定對映體過量之式(I)化合物之「水解酶」亦意謂該水解酶適用於在與式(II)化合物之反應中提供該給定對映體過量之式(I)化合物。

【0025】 為避免疑問，式(I)化合物之對映體過量(ee)至少70%意謂給定混合物或產物中該式(I)化合物與其對映體之間的比率係85:15或更高；因此，式(I)化合物之對映體過量(ee)至少96%意謂給定混合物或產物中該式(I)化合物與其對映體之間的比率係98:2或更高。

【0026】 應瞭解式(II)化合物係指以介於65:35與35:65之間的比率，特別以介於55:45與45:55之間的比率，且尤其以介於52:48與48:52之間的比率之各別(S)-對映體及各別(R)-對映體之任何混合物。最佳係含有該(S)-對映體及該(R)-對映體呈1:1比率之外消旋混合物。

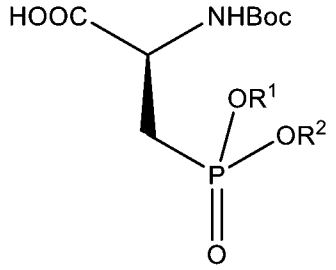
【0027】 如「式(I)化合物或其鹽」之內文中使用之術語「鹽」係指其中羧酸官能之質子已經合適之陽離子置換以構建該式(I)化合物之鹽的式(I)化合物。合適之陽離子尤其係重量低於110 g/mol之陽離子及特別重量低於或等於30 g/mol之金屬陽離子。較佳係式(I)化合物之鹼金屬及鹼土金屬鹽；尤其該式(I)化合物之鈉鹽及鉀鹽且特別該式(I)化合物之鈉鹽。

【0028】 2)另一實施例係關於如實施例1)之方法，其中該水解酶係選自AH002、AH008、AH012、AH016、AH017、AH018、AH019、AH022、AH023、AH025、AH027、AH028、AH032、AH034、AH035、AH036、AH037、AH041、AH042、AH044、AH045、AH047、AH048、AH051、AH052、AH055、AH056、AH057、AH059、AH060、AH061、AH062、CL055、CL067、蛋白酶M、EU62、DSM-A1、DSM-A2、DSM-A3、DSM-A6、DSM-B1、DSM-B2、DSM-B3、DSM-B6、DSM-C1、DSM-C2、DSM-C3、DSM-D2及DSM-D3。

AH002、AH008、AH012、AH016、AH017、AH018、AH019、

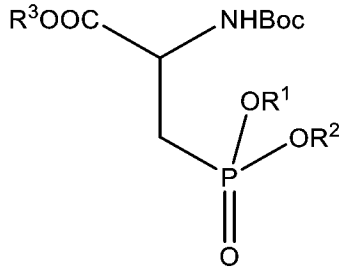
AH022、AH023、AH025、AH027、AH028、AH032、AH034、AH035、AH036、AH037、AH041、AH042、AH044、AH045、AH047、AH048、AH051、AH052、AH055、AH056、AH057、AH059、AH060、AH061、AH062、CL055及CL067係市售酶且可獲自Almac；蛋白酶M為市售的且可獲自Amano Enzyme (尤其Amano Enzyme Manufacturing，中國，江蘇省，宿遷市)；EU62為市售的且可獲自Eucodis Bioscience；DSM-A1、DSM-A2、DSM-A3、DSM-A6、DSM-B1、DSM-B2、DSM-B3、DSM-B6、DSM-C1、DSM-C2、DSM-C3、DSM-D2及DSM-D3係市售酶且可獲自DSM Innosyn / Innosyn。所有酶均亦可經由Almac獲得。

【0029】 3)在另一實施例中，本發明係關於一種用於製造式(I)化合物或其鹽之方法，



式(I)

該方法包括使式(II)化合物



式(II)

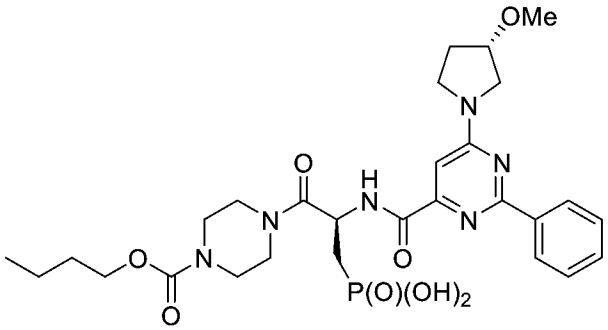
其中

R^1及R^2彼此獨立地表示(C_{1-4})烷基(尤其乙基)；及

R^3表示甲基、乙基或正丙基(尤其乙基)；

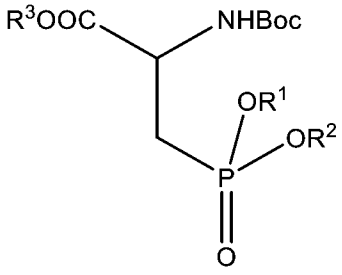
與水解酶反應之步驟，其中該水解酶係選自AH002、AH008、AH012、AH016、AH017、AH018、AH019、AH022、AH023、AH025、AH027、AH028、AH032、AH034、AH035、AH036、AH037、AH041、AH042、AH044、AH045、AH047、AH048、AH051、AH052、AH055、AH056、AH057、AH059、AH060、AH061、AH062、CL055、CL067、蛋白酶M、EU62、DSM-A1、DSM-A2、DSM-A3、DSM-A6、DSM-B1、DSM-B2、DSM-B3、DSM-B6、DSM-C1、DSM-C2、DSM-C3、DSM-D2及DSM-D3。

【0030】 4)在另一實施例中，本發明係關於一種用於製造塞拉格雷之方法，



塞拉格雷

其中該方法包括使式(II)化合物



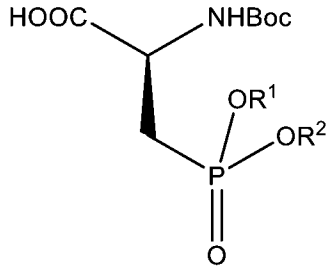
式(II)

其中

R^1及R^2彼此獨立地表示(C_{1-4})烷基(尤其乙基)；及

R^3表示甲基、乙基或正丙基(尤其乙基)；

與水解酶反應以產生對映體過量(ee)至少70%之式(I)化合物或其鹽之步驟，



式(I)。

【0031】 5)另一實施例係關於如實施例1)、3)或4)中任一項之方法，其中該水解酶係選自AH012、AH016、AH017、AH018、AH022、AH023、AH025、AH027、AH028、AH032、AH034、AH035、AH036、AH041、AH042、AH044、AH047、AH048、AH051、AH052、AH055、AH059、AH061及蛋白酶M。

【0032】 6)另一實施例係關於如實施例1)、3)或4)中任一項之方法，其中該水解酶係選自AH017、AH018、AH022、AH023、AH025、AH027、AH032、AH034、AH044、AH047、AH059、AH061及蛋白酶M。

【0033】 7)另一實施例係關於如實施例1)、3)或4)中任一項之方法，其中該水解酶係選自AH018、AH022、AH023、AH027、AH034、AH044、AH047及蛋白酶M。

【0034】 8)另一實施例係關於如實施例1)、3)或4)中任一項之方法，其中該水解酶係選自AH018、AH023、AH034及蛋白酶M。

【0035】 9)另一實施例係關於如實施例1)、3)或4)中任一項之方

法，其中該水解酶係蛋白酶M。

【0036】 蛋白酶M (尤其蛋白酶M-SD)可自Amano Enzyme (尤其Amano Enzyme Manufacturing，中國，江蘇省，宿遷市)購買獲得，係通過發酵獲自米麴黴菌(Aspergillus oryzae)，且具有高蛋白酶及肽酶活性。蛋白酶M-SD係指噴霧乾燥之蛋白酶M。

【0037】 10)另一實施例係關於如實施例1)至9)中任一項之方法，其中該方法產生對映體過量(ee)至少85%之式(I)化合物。

【0038】 11)另一實施例係關於如實施例1)至9)中任一項之方法，其中該方法產生對映體過量(ee)至少96%之式(I)化合物。

【0039】 12)另一實施例係關於如實施例1)至9)中任一項之方法，其中該方法產生對映體過量(ee)至少99%之式(I)化合物。

【0040】 13)另一實施例係關於如實施例1)至12)中任一項之方法，其中R^1及R^2彼此獨立地表示甲基、乙基或正丙基(尤其甲基或乙基)。

【0041】 14)另一實施例係關於如實施例1)至12)中任一項之方法，其中R^1及R^2表示選自甲基及乙基之相同烷基。

【0042】 15)另一實施例係關於如實施例1)至12)中任一項之方法，其中R^1及R^2均表示乙基。

【0043】 16)另一實施例係關於如實施例1)至15)中任一項之方法，其中R^3表示甲基或乙基。

【0044】 17)另一實施例係關於如實施例1)至15)中任一項之方法，其中R^3表示乙基。

【0045】 18)另一實施例係關於如實施例1)至17)中任一項之方法，其中該反應(酵素解析法)係於水溶液中進行。

【0046】 該酵素解析法可於作為唯一溶劑之水中(尤其於純化水中)或於水及合適之有機溶劑(尤其MTBE、DMSO或甲苯)之溶劑混合物中進行。添加有機溶劑具有降低該溶液黏度之有利效應。

【0047】 19)另一實施例係關於如實施例1)至17)中任一項之方法，其中該反應(酵素解析法)係於水及選自MTBE、DMSO、甲苯及其任何混合物之有機溶劑之混合物中進行。

【0048】 20)另一實施例係關於如實施例1)至17)中任一項之方法，其中該反應(酵素解析法)係於水及選自MTBE、DMSO及甲苯之有機溶劑之混合物中進行。

【0049】 21)另一實施例係關於如實施例1)至17)中任一項之方法，其中該反應(酵素解析法)係水及MTBE之混合物中進行。

【0050】 22)另一實施例係關於如實施例18)至21)中任一項之方法，其中該有機溶劑之量係介於0%至20% v/v之間。

【0051】 該有機溶劑之量之下限為0% v/v、3% v/v及5% v/v，上限為20% v/v、15% v/v及10% v/v。應瞭解各下限可與各上限組合。因此應於此明確揭示下限與上限之所有組合。較佳係介於5%至15% v/v之間的有機溶劑之量。

【0052】 23)另一實施例係關於如實施例18)至22)中任一項之方法，其中該反應(酵素解析法)係在具有於水中在25℃下介於5.2與8.4之間的pKa值之緩衝液之存在下進行。

【0053】 該緩衝液之pKa值之下限為5.2、5.5及6.2，上限為8.4、7.9及7.4。應瞭解各下限可與各上限組合。因此於此應明確揭示下限與上限之所有組合。較佳地，該緩衝液係選自磷酸鹽緩衝液及碳酸鹽緩衝液。

尤其較佳係磷酸鹽緩衝液。

【0054】 24)另一實施例係關於如實施例18)至23)中任一項之方法，其中該反應(酵素解析法)係在介於5.0與8.0之間的pH值下進行。

【0055】 該pH值之下限為5.0、6.0、6.5及6.7，上限為8.0、7.4、7.0及6.9。應瞭解各下限可與各上限組合。因此於此應明確揭示下限與上限之所有組合。較佳地，該pH值係介於6.5與7.0之間且尤其介於6.7與6.9之間。

【0056】 25)另一實施例係關於如實施例18)至24)中任一項之方法，其中該溶液之pH值係在該反應(酵素解析法)期間藉由添加鹼保持在加/減0.2 (較佳0.1)之範圍內。

【0057】 該鹼可循序或連續添加至反應混合物。較佳地，該鹼係以水溶液，尤其碳酸鉀之水溶液的形式添加。該溶液之pH值較佳保持在介於6.6與7.0之間(最佳介於6.7與6.9之間)的範圍內。

【0058】 26)另一實施例係關於如實施例1)至25)中任一項之方法，其中該反應(酵素解析法)係在介於10℃與60℃之間的溫度下進行。

【0059】 反應溫度之下限為10℃、15℃、20℃及25℃，上限為60℃、40℃、33℃及30℃。應瞭解各下限可與各上限組合。因此於此應明確揭示下限與上限之所有組合。較佳地，該反應溫度係介於20℃與33℃之間且尤其介於25℃與30℃之間。

【0060】 27)另一實施例係關於如實施例1)至26)中任一項之方法，其中該反應(酵素解析法)係以介於0.05%與100%之間的酶載量進行。

【0061】 術語「酶載量」係指酶之量與受質之使用量(亦即式(II)化合物之使用量)之重量比。例如，1%之酶載量意謂反應中每1 g式(II)化合

物使用10 mg酶。該酶載量之下限為0.05%、0.2%、0.5%及0.8%，上限為100%、20%、10%及2%。應瞭解各下限可與各上限組合。因此於此應明確揭示下限與上限之所有組合。較佳地，該酶載量係介於0.2%與10%之間且尤其介於0.5%與2.0%之間。

【0062】 28)另一實施例係關於如實施例1)至27)中任一項之方法，其中該反應(酵素解析法)係以介於每公升(L)水5.0 g受質與每公升(L)水300 g受質之間的受質負載於反應混合物中進行。

【0063】 術語「受質負載」係指反應混合物中每體積水(以公升計)所使用之受質之公克數，亦即所使用之式(II)化合物之公克數。為避免疑問，僅考慮反應開始時之水體積，而不考慮在該反應過程中與鹼一起添加以保持pH值恆定之水體積。該受質負載之下限為每L水5.0 g受質、每L水20 g受質及每L水100 g受質，上限為每L水300 g受質、每L水220 g受質及每L水150 g受質。應瞭解各下限可與各上限組合。因此於此應明確揭示下限與上限之所有組合。較佳地，該受質負載係介於每L水20 g受質與每L水220 g受質之間。

【0064】 29)另一實施例係關於如實施例1)至28)中任一項之方法，其中將二價金屬陽離子之鹽(尤其二價金屬陽離子之氯化物鹽)添加至該反應混合物。

【0065】 二價金屬陽離子之較佳鹽係$ZnCl_2$、$FeCl_2$、$MnSO_4$、$CoCl_2$、$MgCl_2$、$CaCl_2$及$NiCl_2$ (尤其$ZnCl_2$、$FeCl_2$及$MnSO_4$)。該等鹽可以介於0.5 mM與5.0 mM之間(尤其介於1.0 mM與3.0 mM之間)的濃度使用。

【0066】 30)另一實施例係關於如實施例1)至29)中任一項之方法，

其中該反應(酵素解析法)之反應時間係介於5小時與36小時之間。

【0067】 術語「反應時間」係指將最後一種試劑添加至該反應混合物直至後處理程序(例如藉由用有機溶劑萃取該反應混合物)開始之間的時間。該反應時間之下限為5小時、10小時及18小時，上限為36小時、28小時及24小時。應瞭解各下限可與各上限組合。因此於此應明確揭示下限與上限之所有組合。

【0068】 31)另一實施例係關於如實施例30)之方法，其中該反應(酵素解析法)之反應時間係介於10小時與28小時之間。

【0069】 32)另一實施例係關於如實施例1)至31)中任一項之方法，其中該方法包括藉由一種方法後處理該反應混合物，該方法包括以下步驟：添加鹼之水溶液(尤其碳酸鉀水溶液)以將pH值調整至介於7.4與9.0之間(尤其介於7.5與8.5之間且特別介於7.6與8.0之間)；添加有機溶劑(尤其MTBE)；分離有機層及水層；將酸(尤其鹽酸)之水溶液添加至該水層以將該pH值調整至介於1.0與4.0之間(尤其介於1.2與2.0之間且特別介於1.4與1.6之間)；及分離沈澱之式(I)化合物。

【0070】 33)另一實施例係關於如實施例1)至32)中任一項之方法，其中該方法包括該式(I)化合物自2-丙醇中再結晶之另一步驟。

【0071】 (R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)-丙酸可自選自甲醇、乙醇、2-丙醇或其任何混合物之溶劑再結晶。再結晶溶液可含有高達20%w/w水。較佳地，該再結晶溶液含有小於5%w/w水。由於水之存在導致較低之產率，因此該再結晶中之水含量較佳係儘可能低。該再結晶具有降低蛋白質(酶)含量之優點。

【0072】 片語「選自甲醇、乙醇、2-丙醇或其任何混合物之溶劑」

意謂該溶劑係甲醇、乙醇、2-丙醇，或甲醇、乙醇及2-丙醇中之兩種或三種之混合物。在該溶劑係混合物之情況下，該溶劑較佳係甲醇、乙醇及2-丙醇中之兩種之混合物。

【0073】 34)另一實施例係關於如實施例1)至33)中任一項之方法，其中該方法產生呈結晶形式(I)之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)-丙酸。

【0074】 35)另一實施例係關於如實施例34)之方法，其中呈結晶形式(I)之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：9.8°、10.3°及17.5°。

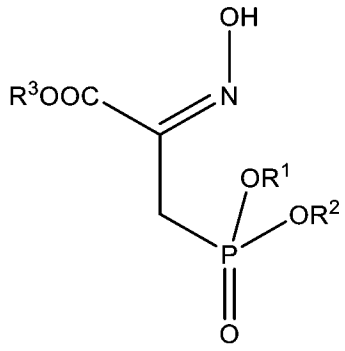
【0075】 36)另一實施例係關於如實施例34)之方法，其中呈結晶形式(I)之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：9.8°、10.3°、16.2°、17.5°及27.3°。

【0076】 37)另一實施例係關於如實施例34)之方法，其中呈結晶形式(I)之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：9.8°、10.3°、12.5°、16.2°、17.5°、20.7°、22.4°、24.2°、24.7°及27.3°。

【0077】 38)另一實施例係關於如實施例34)至37)中任一項之方法，其中呈結晶形式(I)之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之特徵為基本上顯示如圖2中繪示之重力吸濕概況(吸附循環)，其中該重力吸濕概況係在25℃下量測。

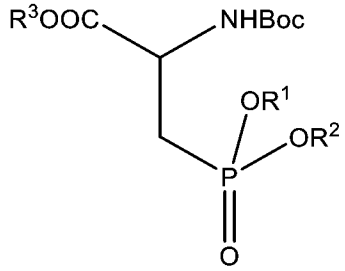
【0078】 39)另一實施例係關於如實施例1)至38)中任一項之方法，

其中該方法進一步使式(III)化合物



式(III)

與氫在炭載鈀及Boc_2O之存在下反應以產生式(II)化合物之步驟



式(II)

其中

R^1及R^2彼此獨立地表示(C_{1-4})烷基(尤其乙基)；及

R^3表示甲基、乙基或正丙基(尤其乙基)。

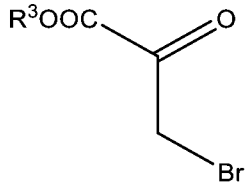
【0079】 40)另一實施例係關於如實施例39)之方法，其中R^1、R^2及R^3表示乙基。

【0080】 41)另一實施例係關於如實施例39)或40)中任一項之方法，其中該方法係於選自甲醇、乙醇及2-丙醇(尤其乙醇)之溶劑中進行。

【0081】 42)另一實施例係關於如實施例39)至41)中任一項之方法，其中該氫化係在介於50℃與70℃之間(尤其介於55℃與65℃之間)的溫度下進行。

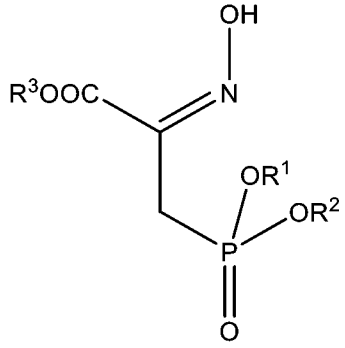
【0082】 43)另一實施例係關於如實施例1)至42)中任一項之方法，

其中該方法進一步包括使式(IV)化合物



式(IV)

循序與鹽酸羥胺及亞磷酸三烷基酯(尤其亞磷酸三乙酯)反應以產生式(III)化合物之步驟



式(III)

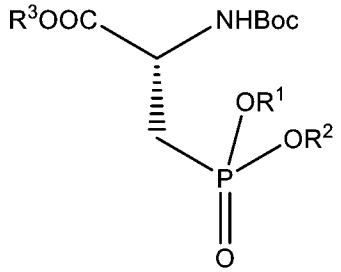
其中

R^1及R^2彼此獨立地表示(C_{1-4})烷基(尤其乙基)；及

R^3表示甲基、乙基或正丙基(尤其乙基)。

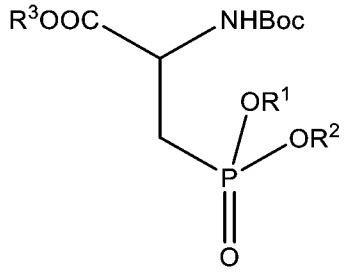
【0083】 44)另一實施例係關於如實施例43)之方法，其中R^1、R^2及R^3表示乙基。

【0084】 45)另一實施例係關於如實施例1)至44)中任一項之方法，其中該方法進一步包括使式(V)化合物



式(V)

與鹼(尤其NaOEt)反應以產生式(II)化合物之步驟



式(II)

其中

R^1及R^2彼此獨立地表示(C_{1-4})烷基(尤其乙基)；及

R^3表示甲基、乙基或正丙基(尤其乙基)；

且其中該式(V)化合物具有至少80%之對映體過量(ee)及該式(II)化合物具有小於10% (且尤其小於或等於2%)之對映體過量(ee)。

【0085】 本說明書及尤其實施例1)至31)中揭示之式(II)化合物之酵素解析法導致(在後處理粗反應混合物之前)式(I)化合物(尤其(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸及式(V)化合物(尤其(S)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)丙酸乙酯)之混合物。該酸及酯之粗混合物可藉由任何合適之方法(諸如萃取、一種組分之沈澱或層析術)分離。尤其，該酸及酯之粗混合物可藉由分配於pH值高於7.4之水層(含有該酸)與有機層(含有該酯)之間分離。用於分配/萃取之較佳有機溶劑係醚且尤其MTBE。該酯(尤其(S)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)-丙酸乙酯)可藉由自萃取物移除該有機溶劑分離且可與鹼一起用於循環步驟中以產生可再次用於該酵素解析法中之外消旋式(II)化合物(尤其2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)丙酸乙酯)。

【0086】 46)另一實施例係關於如實施例45)之方法，其中該式(V)化合物之對映體過量(ee)係至少90% (且尤其至少96%)。

【0087】 47)另一實施例係關於如實施例45)或46)中任一項之方法，其中該方法產生對映體過量(ee)小於4% (且尤其小於或等於2%)之式(II)化合物。

【0088】 48)另一實施例係關於如實施例45)至47)中任一項之方法，其中R^1及R^2彼此獨立地表示甲基、乙基或正丙基(尤其甲基或乙基)。

【0089】 49)另一實施例係關於如實施例45)至47)中任一項之方法，其中R^1及R^2表示選自甲基及乙基之相同烷基。

【0090】 50)另一實施例係關於如實施例45)至47)中任一項之方法，其中R^1及R^2均表示乙基。

【0091】 51)另一實施例係關於如實施例45)至50)中任一項之方法，其中R^3表示甲基或乙基。

【0092】 52)另一實施例係關於如實施例45)至50)中任一項之方法，其中R^3表示乙基。

【0093】 53)另一實施例係關於如實施例45)至52)中任一項之方法，其中該反應(外消旋化)係於選自乙醚、MTBE、THF或2-甲基-四氫呋喃之溶劑中進行。

【0094】 54)另一實施例係關於如實施例45)至52)中任一項之方法，其中該反應(外消旋化)係於MTBE中進行。

【0095】 55)另一實施例係關於如實施例45)至54)中任一項之方法，其中該鹼係選自乙醇鈉(NaOEt)及第三丁醇鉀(KOtBu) (且尤其乙醇鈉)。

【0096】 56)另一實施例係關於如實施例45)至54)中任一項之方法，其中該鹼係乙醇鈉(NaOEt)於乙醇中之溶液。

【0097】 57)另一實施例係關於如實施例55)至56)中任一項之方法，

其中鹼之量相對於該式(V)化合物量係介於0.1當量與1.0當量之間(尤其介於0.4當量與0.8當量之間，且特別介於0.5當量與0.7當量之間)。

【0098】 58)另一實施例係關於如實施例45)至57)中任一項之方法，其中該反應(外消旋化)係在介於0℃與30℃之間(尤其介於0℃與10℃之間且特別介於0℃與5℃之間)的反應溫度下進行。

【0099】 59)另一實施例係關於如實施例45)至58)中任一項之方法，其中該反應(外消旋化)之反應混合物中之水含量係≤ 0.5% v/v (尤其≤ 0.2% v/v，且特別≤ 0.1% v/v)。

【0100】 60)本發明之另一實施例係關於(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之結晶形式(結晶形式(I))，其特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：9.8°、10.3°及17.5°。

【0101】 應瞭解如實施例60)之結晶形式包含呈游離形式(非鹽形式)之化合物。此外，該結晶形式可包含非配位及/或配位溶劑(尤其非配位及/或配位水)。配位溶劑(尤其配位水)於本文中用作結晶溶劑化物(尤其結晶水合物)之術語。為避免疑問，在本申請案中，術語「結晶水合物」包含化學計量及非化學計量水合物(尤其化學計量水合物)。同樣，非配位溶劑於本文中用作物理吸附或物理包埋之溶劑之術語(根據Polymorphism in the Pharmaceutical Industry (R. Hilfiker編，VCH, 2006)，第8章：U.J. Griesser: The Importance of Solvates之定義)。

【0102】 61)本發明之另一實施例係關於如實施例60)之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之結晶形式(結晶形式(I))，其特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：9.8°、10.3°、16.2°、17.5°及27.3°。

【0103】 62)本發明之另一實施例係關於如實施例60)之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之結晶形式(結晶形式(I))，其特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：9.8°、10.3°、12.5°、16.2°、17.5°、20.7°、22.4°、24.2°、24.7°及27.3°。

【0104】 63)本發明之另一實施例係關於如實施例60)至62)中任一項之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之結晶形式(結晶形式(I))，其基本上顯示如圖1中繪示之X射線粉末繞射圖。

【0105】 64)本發明之另一實施例係關於如實施例60)至63)中任一項之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之結晶形式(結晶形式(I))，其特徵為藉由DSC量測的於約180℃(特別於180℃ ± 1℃，且尤其於180℃)之吸熱峰。

【0106】 65)本發明之另一實施例係關於如實施例60)至64)中任一項之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之結晶形式(結晶形式(I))，其基本上顯示如圖2中繪示之重力吸濕概況，其中該重力吸濕概況係在25℃下量測。

【0107】 66)本發明之另一實施例係關於3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯之結晶形式(結晶形式(A))，其特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：10.2°、11.3°及22.7°。

【0108】 應瞭解如實施例66)之結晶形式包含呈游離形式(非鹽形式)之3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯。此外，該結晶形式可包含非配位及/或配位溶劑(尤其非配位及/或配位水)。配位溶劑(尤其配位水)於本文中用作結晶溶劑化物(尤其結晶水合物)之術語。為避免疑問，在本申請案中，術語「結晶水合物」包含化學計量及非化學計量水合物

(尤其化學計量水合物)。同樣，非配位溶劑於本文中用作物理吸附或物理包埋之溶劑之術語(根據Polymorphism in the Pharmaceutical Industry (R. Hilfiker編，VCH, 2006)，第8章：U.J. Griesser: The Importance of Solvates之定義)。

【0109】 67)本發明之另一實施例係關於如實施例66)之3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯之結晶形式(結晶形式(A))，其特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：10.2°、11.3°、13.2°、22.7°及22.9°。

【0110】 68)本發明之另一實施例係關於如實施例66)之3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯之結晶形式(結晶形式(A))，其特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：10.2°、11.3°、13.2°、13.8°、15.2°、20.5°、22.7°、22.9°、25.3°及26.6°。

【0111】 69)本發明之另一實施例係關於如實施例66)至68)中任一項之3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯之結晶形式(結晶形式(A))，其基本上顯示如圖4中繪示之X射線粉末繞射圖。

【0112】 70)本發明之另一實施例係關於3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯之結晶形式(結晶形式(B))，其特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：10.9°、19.5°及27.2°。

【0113】 應瞭解如實施例70)之結晶形式包含呈游離形式(非鹽形式)之3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯。此外，該結晶形式可包含非配位及/或配位溶劑(尤其非配位及/或配位水)。配位溶劑(尤其配位水)於本文中用作結晶溶劑化物(尤其結晶水合物)之術語。為避免疑問，在本申請案中，術語「結晶水合物」包含化學計量及非化學計量水合物

(尤其化學計量水合物)。同樣，非配位溶劑於本文中用作物理吸附或物理包埋之溶劑之術語(根據Polymorphism in the Pharmaceutical Industry (R. Hilfiker編，VCH, 2006)，第8章：U.J. Griesser: The Importance of Solvates之定義)。

【0114】 71)本發明之另一實施例係關於如實施例70)之3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯之結晶形式(結晶形式(B))，其特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：10.9°、18.2°、19.5°、27.2°及29.5°。

【0115】 72)本發明之另一實施例係關於如實施例70)之3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯之結晶形式(結晶形式(B))，其特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：10.9°、18.2°、19.5°、19.8°、25.3°、27.2°、29.5°、33.0°、34.7°及36.9°。

【0116】 73)本發明之另一實施例係關於如實施例70)至72)中任一項之3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯之結晶形式(結晶形式(B))，其基本上顯示如圖5中繪示之X射線粉末繞射圖。

【0117】 為避免任何疑問，每當上文實施例中之一項係關於「在X射線粉末繞射圖中於下列折射角2θ之峰」，該X射線粉末繞射圖均係藉由使用組合之Cu Kα1及Kα2輻射，無Kα2剝除獲得；且應瞭解如本文提供之2θ值之精確度係於+/- 0.1至0.2°之範圍內。特別地，當於本發明實施例及技術方案中針對峰指定折射角2θ (2θ)時，應瞭解給定之2θ值為自該值減0.2°至該值加0.2° (2θ +/- 0.2°)之區間；且較佳自該值減0.1°至該值加0.1° (2θ +/- 0.1°)之區間。

【0118】 當在例如X射線粉末繞射圖中定義峰之存在時，一種常見

方法係根據S/N比率(S =信號，N =雜訊)來定義。根據此定義，當說明X射線粉末繞射圖中必須存在峰時，應瞭解該X射線粉末繞射圖中之峰係由大於x (x為大於1之數值)，通常大於2，尤其大於3之S/N比率(S =信號，N =雜訊)定義。

【0119】 在說明結晶形式基本上分別顯示如圖1、4或5中繪示之X射線粉末繞射圖之內文中，術語「基本上」意謂必須至少存在該等圖式中繪示之圖之主峰，亦即具有相較於該圖中最強烈峰之大於20%，尤其大於10%的相對強度的峰。然而，熟習X射線粉末繞射領域者將認知X射線粉末繞射圖中之相對強度可由於較佳定向效應而經受強強度變化。

【0120】

本文中使用之縮寫及術語

縮寫：

在整個本說明書及實例中使用下列縮寫：

Ac	乙醯基
AcCN	乙腈
AcOH	乙酸
(L-)Ala	(L-)丙胺酸
aq	水性
Boc	第三丁氧基羰基
DSC	示差掃描量熱法
ee	對映體過量
eq.	當量
Et	乙基

EtOH	乙醇
GVS	重力蒸氣吸附
h	小時
HPLC	高效液相層析術
IPA	2-丙醇
JT	夾套溫度
M	體積莫耳濃度/莫耳濃度
Me	甲基
min	分鐘
MTBE	甲基第三丁基醚
NaOEt	乙醇鈉
PDA	光二極體陣列偵測器
RBF	圓底燒瓶
rpm	每分鐘轉數
rt	滯留時間
RT	室溫
THF	四氫呋喃
TFA	三氟乙酸
vol	1體積意謂每1 kg參考起始材料1 L溶劑
% a/a	由面積比確定之百分比

【0121】

實驗部分

X射線粉末繞射分析(XRPD)

【0122】 於配備以反射模式操作之Lynxeye偵測器(耦合兩個Θ/Θ)之Bruker D8 Advance X射線繞射儀上收集X射線粉末繞射圖。通常，Cu X射線管係在40 kV/40mA下運行。施加3至50° (2θ)之掃描範圍內，0.02° (2θ)之步長及每步0.04 sec之步長時間。將發散狹縫設定為固定樣品照明(可變狹縫尺寸)及將防散射狹縫設定為0.3°。將粉末輕輕壓入深度為0.5 mm之單晶矽樣品支架內並在量測期間於其等自身平面內旋轉樣品。使用Cu Kα (λ = 1.5418 Å)輻射報告繞射資料。如本文提供之2θ值之精確度係於+/- 0.1-0.2°之範圍內，如其一般為習知記錄之X射線粉末繞射圖之情況。

【0123】

示差掃描量熱法(DSC)

於配備34個位置自動進樣器之Mettler Toledo STARe系統(DSC3模塊，具有陶瓷感測器及STAR軟體16.00b版之量測元件)上收集DSC資料。使用檢定銦針對能量及溫度校準該儀器。通常，於自動穿孔之鋁鍋中，以10℃ min^{-1}加熱1至5 mg各樣品，除非另有說明，否則自-20℃加熱至250℃。於該樣品上維持以20 mL min^{-1}之氮吹掃。針對熔點報告峰溫度。

【0124】

重力蒸氣吸附(GVS)分析

於在25℃下以步進模式操作之多樣品儀器SPS-100n (ProUmid GmbH, Ulm, Germany)上進行量測。容許在40% RH下使樣品平衡，然後開始預定義之濕度程序(40-0-95-40% RH，步長為5% ΔRH且應用每一步長24小時之最大平衡時間。使用約20至30 mg各樣品。吸濕性分類係根據歐洲藥典技術指南(1999，第86頁)進行，例如，不吸濕：質量增加係小於

0.2%質量/質量；微吸濕性：質量增加係小於2%且等於或大於0.2%質量/質量；吸濕性：質量增加係小於15%且等於或大於2%質量/質量。考慮首次吸附掃描中介於40%相對濕度與80%相對濕度之間的質量變化。

【0125】

高效液相層析術(HPLC)：

HPLC (方法1)：

HPLC系統：　Agilent 1260系列系統

流量：　1.0 mL/min

管柱溫度：　30℃

自動進樣器溫度：　室溫

注射體積：　5 µL

管柱：　Zorbax SB-Aq，150 x 4.6 mm，3.5 µm

偵測波長(UV)：　210 nm

溶劑A：　10 mM K_2HPO_4水溶液(用85%磷酸調整至pH 7.0)

溶劑B：　AcCN

梯度：

時間(min)	%溶劑A	%溶劑B
0.0	90	10
20.0	30	70
20.1	90	10
25.0	90	10

HPLC (方法2)：

HPLC系統：　Agilent 1260系列系統

流量：　1.0 mL/min

管柱溫度：　30℃

自動進樣器溫度： 室溫

注射體積： 5 μL

管柱： Zorbax SB-Aq，150 x 4.6 mm，3.5 μm

偵測波長(UV)： 210 nm

溶劑A： 10 mM K_2HPO_4水溶液(用85%磷酸調整至pH 7.0)

溶劑B： AcCN

梯度：

時間(min)	%溶劑A	%溶劑B
0.0	90	10
20.0	30	70
25.0	30	70
25.1	90	10
33.0	90	10

HPLC (方法3)：

HPLC系統： Agilent 1260系列系統

流量： 1.0 mL/min

管柱溫度： 40℃

自動進樣器溫度： 室溫

注射體積： 5 μL

管柱： Atlantis T3，150 x 4.6 mm，3 μm

偵測波長(UV)： 215 nm

溶劑A： H_3PO_4之水溶液(1% v/v)

溶劑B： AcCN

梯度：

時間(min)	%溶劑A	%溶劑B
0.0	95	5

25.0	50	50
30.0	10	90
32.0	10	90
32.1	95	5
40.0	95	5

【0126】

對掌性HPLC：

對掌性HPLC (方法1)：

HPLC系統：　Agilent 1260系列系統

流量：　0.9 mL/min

管柱溫度：　27℃

自動進樣器溫度：　室溫

注射體積：　20 μL

管柱：　Chiralpak IC-3，250 x 4.6 mm，3 μm

偵測波長(UV)：　215 nm

運行時間　45 min

流動相　0.05%TFA-AcCN/0.05%TFA-H_2O = 30/70

對掌性HPLC (方法2)：

流量：　1 mL/min

管柱溫度：　35℃

樣品溫度：　35℃

注射體積：　30 μL

管柱：　Chiralpak IC，250 x 4.6 mm，5 μm

偵測波長(UV)：　220 nm

運行時間　40 min

流動相　20% EtOH於庚烷中(+ 0.1% TFA)

對掌性HPLC (方法3)：

流量：	1 mL/min
管柱溫度：	25℃
樣品溫度：	25℃
注射體積：	30 μL
管柱：	Chiralpak IC-3，250 x 4.6 mm，5 μm
偵測波長(PDA)：	215 nm
運行時間	32 min
流動相	70 : 30水(0.05% TFA) : CH_3CN (0.05% TFA)

【0127】

實例1：

3-溴-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯之合成：

【0128】 將鹽酸羥胺(81.4 kg)及水(460 kg)裝入反應器內，並添加3-溴-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯(69.0 g)之晶種。在20至25℃下將該混合物攪拌0.5 h並於1 h內在20至25℃下添加3-溴-2-側氧基丙酸乙酯(230 kg，1.0當量)。將該反應混合物攪拌2至3 h，添加甲苯(905 kg)並在20至25℃下將該混合物攪拌4至5 h。將層分離，將水(368 kg)添加至有機層，在20至25℃下將該混合物攪拌0.5 h，並將層分離。在45至50℃ (夾套溫度)下將該有機層濃縮至1.0至2.0體積並升溫至45至50℃ (內部溫度)。添加3-溴-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯(138 g)之晶種，在45至50℃下將該混合物攪拌0.5 h，並在45至50℃下於2至4 h內將正庚烷(840 kg)添加至該混合物。於6至8 h內將該混合物冷卻至0至5℃，在0至5℃下攪拌4至5 h，並離心。用正庚烷(88.4 kg)清洗該固體並在30至35℃下在真空下乾燥24 h以產生產物

(136kg)。

【0129】

實例2：

3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯之合成：

【0130】 將亞磷酸三乙酯(129 kg，1.2當量)及正庚烷(223 kg)裝入反應器中並將內部溫度調整至70至75℃。在20至25℃下將3-溴-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯(136 kg，1.0當量)溶解於乙酸異丙酯(285 kg)中，並在70至75℃下於2至4 h內將該溶液緩慢添加至該反應。在70至75℃下將該反應混合物攪拌10至12 h並冷卻至20至25℃。在20至25℃下將3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯(81.3 g)之晶種添加至該混合物，將該混合物攪拌1至2 h，並在20至25℃下於1至2 h內添加正庚烷(461 kg)。將該混合物冷卻至0至5℃，攪拌2至3 h，並離心。用正庚烷(184 kg)清洗獲得之固體並在真空中在20至25℃ (JT)下乾燥24 h以產生產物(150 kg)。取決於溶劑之精確量、結晶過程及接種期間之溫度剖面，獲得呈結晶形式(A)或結晶形式(B)之產物。

【0131】 表1：呈結晶形式(A)之3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)-丙酸乙酯之表徵資料

技術	資料總結	備註
XRPD	結晶	參見圖4及圖5
純度， HPLC (方法1)	99.6% rt = 8.3 min	

【0132】

實例3：

2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸乙酯之合成：

【0133】 將3-(二乙氧基磷醯基)-2-(羥基亞胺基)丙酸乙酯(105 kg，

1.0當量)、EtOH (158 kg)及90% Boc_2O (116 kg，1.2當量)於THF中裝入2000 L高壓釜中。於容器中製備20% Pd/C (2.62 kg)及EtOH (131 kg)之混合物並添加至該高壓釜內。用EtOH (105 kg)清洗該容器並將該EtOH添加至該高壓釜。將該高壓釜中之壓力減小至50至100 mbar，並用氮氣增加至0.2 MPa，及將該過程重複三次。將該高壓釜中之壓力減小至50至100 mbar。然後用氫氣將該高壓釜中之壓力增加至0.2 MPa，減小至0.02 MPa，及將該過程重複三次。以於0.5至1.0 h內將該高壓釜加壓至0.4至0.5 MPa使該混合物升溫至55至65℃。將該高壓釜加壓至1.4至1.5 MPa並在55至65℃下將該混合物攪拌1.0 h。停止供應氫氣，並將該混合物冷卻至20至25℃。將該高壓釜中之壓力減小至0.02 MPa。然後用氮氣將該高壓釜中之壓力增加至0.2 MPa，減小至0.02 MPa，及將該過程重複三次。用氫氣將該高壓釜中之壓力增加至0.2 MPa，減小至0.02 MPa，及將該過程重複三次。於0.5至1.0 h內將該高壓釜加壓至0.4至0.5 MPa，使該混合物升溫至55至65℃。將該高壓釜加壓至1.4至1.5 MPa並在55至65℃下將該混合物攪拌6.0 h。停止供應氫氣，並將該混合物冷卻至20至25℃。將該高壓釜中之壓力減小至0.02 MPa。然後用氮氣將該高壓釜中之壓力增加至0.2 MPa，減小至0.02 MPa，及將該過程重複三次。用氫氣將該高壓釜中之壓力增加至0.2 MPa，減小至0.02 MPa，及將該過程重複三次。於0.5至1.0 h內將該高壓釜加壓至0.4至0.5 MPa使該混合物升溫至55至65℃。將該高壓釜加壓至1.4至1.5 MPa並在55至65℃下將該混合物攪拌4.0 h。停止供應氫氣，並將該混合物冷卻至20至25℃。將該高壓釜中之壓力減小至0.02 MPa，用氮氣增加至0.2 MPa，及將該過程重複三次。釋放該壓力，並使該混合物濾過矽藻土。用EtOH (105 kg)清洗濾餅並在45

至55℃ (夾套溫度)下將該溶液濃縮至乾燥。將MTBE (210 kg)添加至殘餘物，及在45至55℃ (夾套溫度)下將該混合物濃縮至乾燥並將該過程重複兩次。將該殘餘物溶解於MTBE (68.3 kg)中，並在20至30℃下將該溶液攪拌0.5 h。該2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸乙酯於MTBE中之溶液係用於下一步驟。

【0134】 HPLC (方法2)：rt = 13.6 min

【0135】

實例4：

(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之合成：

【0136】 於3000 L反應器中，在25至30℃下將KH_2PO_4 (19.4 kg)溶解於水(1403 kg)中。在25至30℃下將K_2CO_3水溶液(20%)添加至該混合物以將pH值調整至6.7至6.9。於分開的容器中，在25至30℃下將2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)丙酸乙酯(281 kg)溶解於MTBE (135 kg)中並添加至該反應器。用MTBE (30.9 kg)清洗該容器並將洗滌液添加至反應混合物。將蛋白酶M-SD (3.1 kg，呈噴霧乾燥形式之蛋白酶M，Amano)溶解於水(31.0 kg)中並在25至30℃下添加至該混合物。在25至30℃下將該反應混合物攪拌24至36 h並藉由添加K_2CO_3水溶液(20%)使該pH值保持在6.7至6.9之間。然後將K_2CO_3水溶液(20%)添加至該混合物以將pH調整至7.6至8.0。在25至30℃下將MTBE (1044 kg)及矽藻土(6.2 kg)添加至該混合物並將該混合物攪拌0.5 hr。將獲得之懸浮液過濾，並用MTBE (64.5 kg)及水(84.2 kg)清洗濾餅。將層分離，並將有機層(含有剩餘之酯)擱置一邊。水層用MTBE (分別1044 kg及519 kg)萃取兩次，冷卻至10至20℃並藉由滴加HCl水溶液(18.2%)將pH調整至1.4至1.6，使得呈

酸性。於1至2 h內將獲得之懸浮液冷卻至-2至+2℃，再攪拌0.5 h並離心。將水(421 kg)添加至獲得之固體並在0至10℃下將該懸浮液攪拌0.5至1.0 h。在離心後，用冷水(211 kg)清洗濕固體並在70至75℃下溶解於2-丙醇(IPA) (842 kg)中。將獲得之懸浮液過濾，用熱IPA (421 kg)清洗該反應器並在40至50℃下將組合之濾液濃縮至約2體積。使該濾液升溫至70至75℃，攪拌0.5 h，於2至3 h內冷卻至-10至-15℃，並攪拌1 h。將獲得之懸浮液離心以獲得白色固體，在真空中在35至40℃ (JT)下將該固體乾燥24 h並在氮氣氛下冷卻至20至30℃以產生呈結晶形式(I)之產物(105 kg)。

【0137】 表2：呈結晶形式(I)之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)丙酸之表徵資料

技術	資料總結	備註
XRPD	結晶	參見圖1
1H-NMR (400 MHz，d^6-DMSO)	δ = 12.7 (s, 1H), 7.07 (d, J = 8 Hz, 1H), 4.18 (m, 1H), 3.97 (m, 4H), 2.19 (dd, J1 = 16 Hz, J2 = 8 Hz, 2H), 1.38 (m, 9H), 1.22 (t, J = 8 Hz, 6H)	
純度，HPLC (方法3)	99.5% rt = 17.9 min	
對掌性純度，對掌性HPLC (方法1)	99.9% rt = 5.3 min ((S)-異構體：rt = 6.3 min)	
在25℃下之GVS	不吸濕	參見圖2
DSC	熔點：T = 180 ± 2℃	參見圖3

【0138】

實例5：

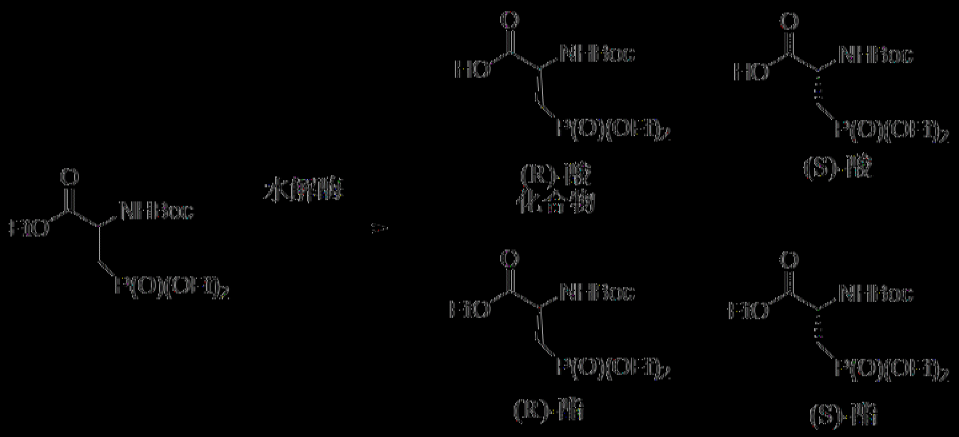
(S)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)丙酸乙酯(來自實例4之副產物)之外消旋化(「循環」)：

【0139】 將(S)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)丙酸乙酯(大約276 kg粗起始材料)於MTBE (起始材料及MTBE之總重量：570 kg)中之溶液裝入反應器中並在40至50℃下在真空中濃縮至1.0至1.5體積。添加MTBE (1381 kg)並在40至50℃下在真空中濃縮至1.0至1.5體

積。再次添加MTBE (1381 kg)並在40至50℃下在真空中濃縮至1.0至1.5體積。將MTBE (262 kg)添加至該混合物並在0至5℃下攪拌15 min。在0至5℃下於1至2 h內滴加NaOEt於EtOH (146 kg)中之20%溶液並在0至5℃下將該溶液再攪拌0.5至1 h。緩慢添加AcOH (30.4 kg)，將該混合物攪拌0.5 h，在10至20℃下添加MTBE (829 kg)及飽和$NaHCO_3$水溶液(829 kg)，並將該混合物攪拌0.5 h。將相分離，將有機相濃縮至乾燥並將殘餘物溶解於MTBE (140 kg)中以獲得2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸乙酯(201 kg粗產物)於MTBE中之溶液，其可用於根據實例4之酶促外消旋拆分中。

[0140]

實例6：酶篩選



根據下列程序篩選193種水解酶：

[0141] 將各別酶(10 mg凍乾酶粉末或30 μL液體酶或10 mg固定化酶)溶解於磷酸鹽緩衝液(500 μL，0.1 M，pH 7.0)中並添加2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸乙酯(10 mg)於MTBE (37.5 μL)中之溶液。在25℃下以210 rpm將該混合物振盪20 h，用HCl水溶液(60 μL，2 M)調整至pH 1至2並用MTBE (3 x 0.7 mL)萃取。在真空中濃縮該

溶液並將殘餘物溶解於EtOH (0.8 mL)中，過濾並藉由對掌性HPLC (方法2)分析；滯留時間：(R)-酸：rt = 9.1 min；(S)-酸：rt = 23.8 min；(R)-酯：rt = 13.7 min；(S)-酯：rt = 29.8 min。

【0142】 表3：酶篩選結果(針對導致酸之對映體過量(ee)至少80%之實驗給定資料)；給定量係基於對掌性HPLC (方法2)之%a/a：

供應商	酶	編碼	(R)-酸 [%a/a]	(R)-酯 [%a/a]	(S)-酸 [%a/a]	(S)-酯 [%a/a]
Almac	微生物水解酶	AH002	8.8	37.9	0.7	52.6
Almac	微生物水解酶	AH008	25.4	15.6	0.3	58.6
Almac	微生物水解酶	AH012	39.1	0.9	1.3	58.7
Almac	微生物水解酶	AH016	19.8	20.9	0.2	59.0
Almac	微生物水解酶	AH017	39.0	0.1	3.6	57.3
Almac	微生物水解酶	AH018	35.7	2.2	0.5	61.6
Almac	微生物水解酶	AH019	39.0	0.1	1.1	59.7
Almac	微生物水解酶	AH022	38.2	0.3	0.8	60.7
Almac	微生物水解酶	AH023	45.0	1.4	1.7	51.9
Almac	微生物水解酶	AH025	38.0	0.6	0.9	60.4
Almac	微生物水解酶	AH027	37.5	1.5	0.9	60.2
Almac	微生物水解酶	AH028	34.2	0.7	0.2	65.0
Almac	微生物水解酶	AH032	36.4	0.1	0.4	63.1
Almac	微生物水解酶	AH034	43.9	0.5	0.4	55.2
Almac	微生物水解酶	AH035	33.1	8.8	0.5	57.6
Almac	微生物水解酶	AH036	34.6	9.1	0.5	55.8
Almac	微生物水解酶	AH037	8.9	39.3	0.3	51.5
Almac	微生物水解酶	AH041	42.4	0.7	1.7	55.2
Almac	微生物水解酶	AH042	21.2	20.4	0.5	57.9

Almac	微生物水解酶	AH044	41.6	0.1	1.2	57.1
Almac	微生物水解酶	AH045	26.8	12.1	1.2	59.9
Almac	微生物水解酶	AH047	40.3	0.5	1.3	58.0
Almac	微生物水解酶	AH048	28.5	16.8	0.5	54.2
Almac	微生物水解酶	AH051	34.7	9.6	0.8	54.8
Almac	微生物水解酶	AH052	17.1	26.7	0.2	55.9
Almac	微生物水解酶	AH055	37.2	0.7	0.9	61.3
Almac	微生物水解酶	AH056	20.5	21.3	1.2	57
Almac	微生物水解酶	AH057	44.6	0.1	3.2	52.1
Almac	微生物水解酶	AH059	38.8	0.0	0.8	60.4
Almac	微生物水解酶	AH060	9	38.3	0.3	52.3
Almac	微生物水解酶	AH061	39.1	0.1	0.9	60
Almac	微生物水解酶	AH062	42	0.9	2.5	54.5
Almac	微生物水解酶	CL055	41.1	1	1.2	56.7
Almac	微生物水解酶	CL067	40.8	0.5	0.7	58.1
Amano	來自米麴黴菌之蛋白酶	蛋白酶M	38.2	1.1	1.6	59.1
Eucodis	微生物水解酶	EU62	30.8	8.3	0.6	60.2
DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-A1	41.1	0.1	4.6	54
DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-A2	19.5	24.7	1.1	54.7
DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-A3	35.5	4.8	0.6	59.1
DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-A6	33.2	7.5	1.1	58.1
DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-B1	38.9	1.2	0.8	59
DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-B2	39.1	0.7	0.9	59.3
DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-B3	29.7	11.3	1.3	57.7
DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-B6	9.8	37.7	1	51.5

DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-C1	33.6	6.9	0.4	59.2
DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-C2	28	11.7	1.17	59.1
DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-C3	39.1	0.14	1.08	59.7
DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-D2	9.7	35.7	0.4	54.2
DSM Innosyn	豬肝酯酶變體	DSM-D3	14.2	29.4	0.1	56.3

【0143】

實例7：酶負載之最佳化及共溶劑之用途

條件A：

【0144】 將各別酶(5 mg凍乾酶粉末)溶解於磷酸鹽緩衝液(250 μL，0.1 M，pH 7.0)中並添加2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)丙酸乙酯(5 mg)於MTBE (12.5 μL)中之溶液。在30℃下以250 rpm將該混合物振盪20 h並根據後處理條件進一步處理。

【0145】

條件B：

用磷酸鹽緩衝液(119 μL，0.1 M，pH 7.0)稀釋各別酶(0.5 mg)於磷酸鹽緩衝液(119 μL，0.1 M，pH 7.0)中之儲備溶液並添加2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)丙酸乙酯(5 mg)於MTBE (12.5 μL)中之溶液。在30℃下以250 rpm將該混合物振盪20 h並根據後處理條件進一步處理。

【0146】

條件C：

用2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)丙酸乙酯(5 mg)於磷酸鹽緩衝液(131 μL，0.1 M，pH 7.0)中之溶液處理各別酶(0.5 mg)於磷酸鹽緩衝液(119 μL，0.1 M，pH 7.0)中之儲備溶液。在30℃下以250 rpm

將該混合物振盪20 h並根據後處理條件進一步處理。

【0147】

條件D：

在30℃下以250 rpm將2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)丙酸乙酯(25 mg/mL溶劑)及各別酶(相對於酯每重量1%)於磷酸鹽緩衝液(0.1 M，pH 7.0)及MTBE (5%總體積)中之溶液振盪18 h並根據後處理條件進一步處理。

【0148】

條件E：

在30℃下以250 rpm將2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)丙酸乙酯(100 mg/mL溶劑)及各別酶(相對於酯每重量1%)於磷酸鹽緩衝液(0.1 M，pH 7.0)及MTBE (5%總體積)中之溶液振盪18 h並根據後處理條件進一步處理。

【0149】

後處理條件：

向各小瓶添加MTBE (1 mL)，接著添加HCl水溶液(20 μL，2 M)。在25℃下以200 rpm將該混合物振盪30分鐘，然後離心以獲得不同層。移除一部分有機層(0.8 mL)並通過$MgSO_4$移液管乾燥至乾淨之埃彭多夫(Eppendorf)小瓶內。然後於Genevac旋轉真空泵中移除該MTBE，溶解於EtOH (200 μL)中並藉由對掌性HPLC (方法2)分析；滯留時間：(R)-酸：rt = 9.1 min；(S)-酸：rt = 23.8 min；(R)-酯：rt = 13.7 min；(S)-酯：rt = 29.8 min。

【0150】 表4：在條件A (100%酶，5% MTBE)下之實驗之酶篩選結

果；給定量係基於對掌性HPLC (方法2)之%a/a；表3中含有給定編碼之供應商及酶詳情：

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

(R)-酸、(S)-酸、(R)-酯及(S)-酯：參見實例6

【0151】 表5：在條件B (10%酶，5% MTBE)下之實驗之酶篩選結果；給定量係基於對掌性HPLC (方法2)之%a/a；表3中含有給定編碼之供應商及酶詳情：

編碼	(R)-酸 [%a/a]	(R)-酯 [%a/a]	(S)-酸 [%a/a]	(S)-酯 [%a/a]
AH012	1.9	47.1	0.2	50.8
AH016	5.6	42.4	0.3	51.8
AH017	12.6	32.5	0.4	54.6
AH018	36.8	0.6	0.7	61.9
AH022	36.4	0.2	0.9	62.5
AH023	31.8	3.3	0.2	64.7
AH025	29.9	10.6	1.0	58.5
AH027	34.2	3.3	0.3	62.1
AH028	8.9	37.9	0.5	52.8
AH032	2.4	45.2	0.4	52.0
AH034	35.7	1.0	0.3	62.9
AH035	4.3	43.0	0.3	52.4
AH036	1.3	46.5	0.5	51.7
AH041	37.8	0.0	2.1	60.1

AH042	3.9	40.0	1.7	54.4
AH044	35.8	1.6	0.3	62.3
AH047	35.9	1.2	0.5	62.4
AH048	1.8	47.6	0.2	50.3
AH051	39.3	0.2	4.5	55.9
AH052	0.2	49.6	0.3	49.8
AH055	35.8	1.3	0.3	62.6
AH059	38.2	0.0	6.7	55.1
AH061	34.8	0.7	0.3	64.3
蛋白酶M	37.0	0.1	0.4	62.6

(R)-酸、(S)-酸、(R)-酯及(S)-酯：參見實例6

【0152】 表6：在條件C (10%酶，無MTBE)下之實驗之酶篩選結果；給定量係基於對掌性HPLC (方法2)之%a/a；表3中含有給定編碼之供應商及酶詳情：

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

(R)-酸、(S)-酸、(R)-酯及(S)-酯：參見實例6

【0153】 表7：在條件D (25 mg/mL受質，1%酶，5% MTBE)下之實驗之酶篩選結果；給定量係基於對掌性HPLC (方法2)之%a/a；表3中含有給定編碼之供應商及酶詳情：

編碼	(R)-酸	(R)-酯	(S)-酸	(S)-酯

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

(R)-酸、(S)-酸、(R)-酯及(S)-酯：參見實例6

【0154】 表8：在條件E (100 mg/mL受質，1%酶，5% MTBE)下之實驗之酶篩選結果；給定量係基於對掌性HPLC (方法2)之%a/a；表3中含有給定編碼之供應商及酶詳情：

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

(R)-酸、(S)-酸、(R)-酯及(S)-酯：參見實例6

【0155】

實例8：(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之合成(1 g規模)：

向50 mL 3頸RBF添加於MTBE (0.5 mL + 0.1 mL MTBE作為管路清洗)中之2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基-磷醯基)丙酸乙酯(1 g，2.83 mmol)。向此溶液添加磷酸鹽緩衝液(0.1 M，pH 7.0，9 mL)並在攪拌下將雙相混合物加熱至30℃。向此雙相溶液添加來自Amano之蛋白酶M (10 mg於0.5 mL磷酸鹽緩衝液中)並將該溶液攪拌18小時。以添加20% K_2CO_3 (水性)將反應pH維持在pH 6.8至7.0之間。將該反應調整至pH 8.0並用MTBE (2 x 10 mL)萃取。將水性部分重新裝入反應容器中並用2M

HCl調整至pH 1.5，此時發生快速沈澱。於冰-水浴中將懸浮液冷卻至0℃並在此溫度下攪拌30分鐘。將該懸浮液過濾，用0.1 M磷酸鹽緩衝液(pH 1.5，2 mL)及0.1 M HCl (4 mL)循序清洗，並於1小時內乾燥。以99% ee (對掌性HPLC (方法3)獲得呈白色固體(420 mg，45.6%)之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸；滯留時間：(R)-酸：rt = 5.7；(S)-酸：rt = 6.6 min；(R)-酯：rt = 25.3 min；(S)-酯：rt = 28.1 min。

【0156】

實例9：(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之合成：

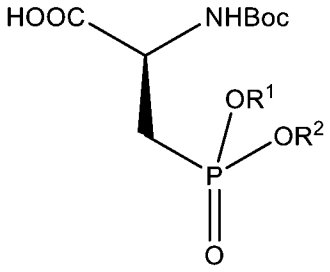
將水(3.6 L；6.6體積)添加至10 L反應器並劇烈攪動。添加磷酸二氫鉀(49.0 g；360 mmol)並用20% (w/v)碳酸鉀水溶液將反應器內容物之pH調整至pH 6.8 (± 0.2)。在1 L玻璃瓶中將2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸乙酯(1.55 mmol)溶解於MTBE (360 mL)中並添加至該反應器。用MTBE (90 mL)清洗該玻璃瓶並將該溶液添加至該反應器。在100 mL瓶中將來自Amano之蛋白酶M (6.0 g)溶解於純化水(55 mL)中並一次性添加至該反應器。用純化水(27.5 mL)清洗該瓶並將該溶液添加至反應器。在28 ± 2℃下將該反應混合物攪拌8小時並藉由添加20% (w/v)碳酸鉀水溶液維持在pH 6.8。關閉外部加熱並將該混合物再攪拌15小時。用20% (w/v)碳酸鉀水溶液將該pH調整至7.8 ± 0.2。將矽藻土(12.0 g)及MTBE (4.1 L)裝入該反應器中並在10 min後使該反應器內容物濾過布氏漏斗。將雙相混合物重新裝入該反應器中並容許分離層最少5 min。將有機層(含有剩餘之酯)儲存於25 L HDPE桶中並將水層重新裝入反應器中。添加MTBE (4.1 L)，將該混合物攪動5 min，分離該等層並排出該水層。

將該有機層與先前有機層組合。將該水層重新裝入反應器中，添加MTBE (2.05 L)，將該混合物攪動5 min，分離該等層並排出該水層。將該有機層與先前有機層組合。將該水層重新裝入該反應器中並經由滴加18.5% HCl水溶液調整至pH 1.5。將反應器內容物冷卻至3℃ ± 2℃，輕輕攪拌30 min並濾過布氏漏斗。用冰冷HCl水溶液(0.1 M，820 mL)清洗濾餅並於漏斗上乾燥1小時。於真空中在50℃下將該濾餅進一步乾燥至恆定重量以得到46%產率，98%純度(NMR)及99.9% ee (對掌性HPLC (方法3))的(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸。

【發明申請專利範圍】

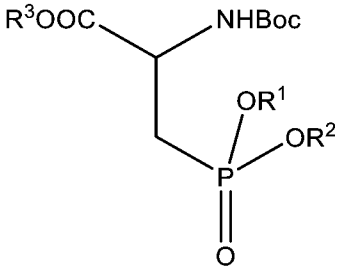
【請求項1】

一種製造式(I)化合物或其鹽之方法，



式(I)

該方法包括使式(II)化合物



式(II)

其中

R^1及R^2彼此獨立地表示(C_{1-4})烷基；及

R^3表示甲基、乙基或正丙基；

與水解酶反應以產生對映體過量(ee)至少70%之式(I)化合物之步驟。

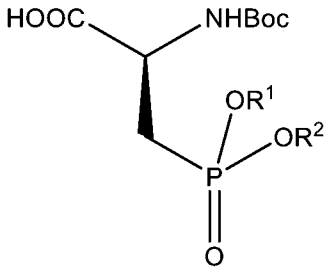
【請求項2】

如請求項1之方法，其中該水解酶係選自AH002、AH008、AH012、AH016、AH017、AH018、AH019、AH022、AH023、AH025、AH027、AH028、AH032、AH034、AH035、AH036、AH037、AH041、AH042、AH044、AH045、AH047、AH048、AH051、AH052、AH055、AH056、AH057、AH059、AH060、AH061、

AH062、CL055、CL067、蛋白酶M、EU62、DSM-A1、DSM-A2、DSM-A3、DSM-A6、DSM-B1、DSM-B2、DSM-B3、DSM-B6、DSM-C1、DSM-C2、DSM-C3、DSM-D2及DSM-D3。

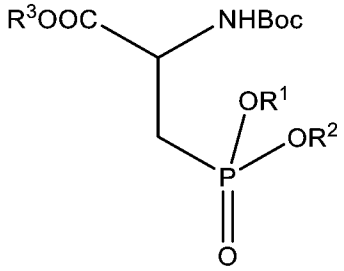
【請求項3】

一種製造式(I)化合物或其鹽之方法，



式(I)

該方法包括使式(II)化合物



式(II)

其中

R^1及R^2彼此獨立地表示(C_{1-4})烷基；及

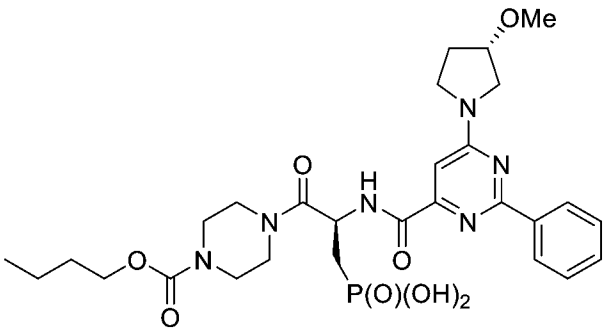
R^3表示甲基、乙基或正丙基；

與水解酶反應之步驟，其中該水解酶係選自AH002、AH008、AH012、AH016、AH017、AH018、AH019、AH022、AH023、AH025、AH027、AH028、AH032、AH034、AH035、AH036、AH037、AH041、AH042、AH044、AH045、AH047、AH048、AH051、AH052、AH055、AH056、AH057、AH059、AH060、

AH061、AH062、CL055、CL067、蛋白酶M、EU62、DSM-A1、DSM-A2、DSM-A3、DSM-A6、DSM-B1、DSM-B2、DSM-B3、DSM-B6、DSM-C1、DSM-C2、DSM-C3、DSM-D2及DSM-D3。

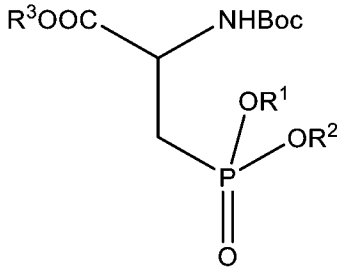
【請求項4】

一種製造塞拉格雷(selatogrel)之方法，



塞拉格雷

其中該方法包括使式(II)化合物



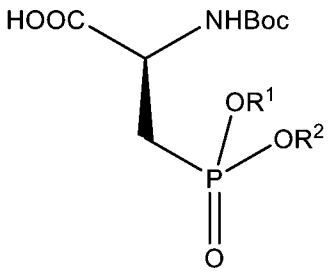
式(II)

其中

R^1及R^2彼此獨立地表示(C_{1-4})烷基；及

R^3表示甲基、乙基或正丙基；

與水解酶反應以產生對映體過量(ee)至少70%之式(I)化合物或其鹽之步驟



式(I)。

【請求項5】

如請求項1、3或4中任一項之方法，其中該水解酶係選自AH018、AH022、AH023、AH027、AH034、AH044、AH047及蛋白酶M。

【請求項6】

如請求項1、3或4中任一項之方法，其中該水解酶係蛋白酶M。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之方法，其中該方法產生對映體過量(ee)至少96%之式(I)化合物。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之方法，其中R^1及R^2均表示乙基。

【請求項9】

如請求項1至8中任一項之方法，其中R^3表示甲基或乙基。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之方法，其中該反應(酵素解析法)係於水與選自MTBE、DMSO、甲苯及其任何混合物之有機溶劑之混合物中進行。

【請求項11】

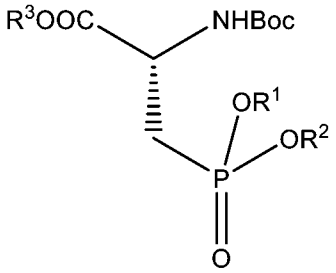
如請求項1至10中任一項之方法，其中該反應(酵素解析法)係在介於5.0與8.0之間的pH值下進行。

【請求項12】

如請求項1至11中任一項之方法，其中該反應(酵素解析法)係以介於0.2%與10%之間的酶載量進行。

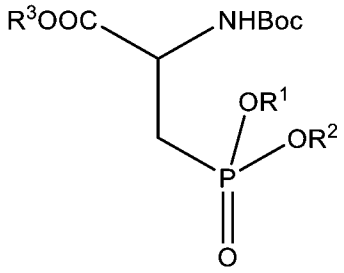
【請求項13】

如請求項1至12中任一項之方法，其中該方法進一步包括使式(V)化合物



式(V)

與鹼反應以產生式(II)化合物之步驟



式(II)

其中

R^1及R^2彼此獨立地表示(C_{1-4})烷基；及

R^3表示甲基、乙基或正丙基；

且其中該式(V)化合物具有至少80%之對映體過量(ee)及該式(II)化合物具有小於10%之對映體過量(ee)。

【請求項14】

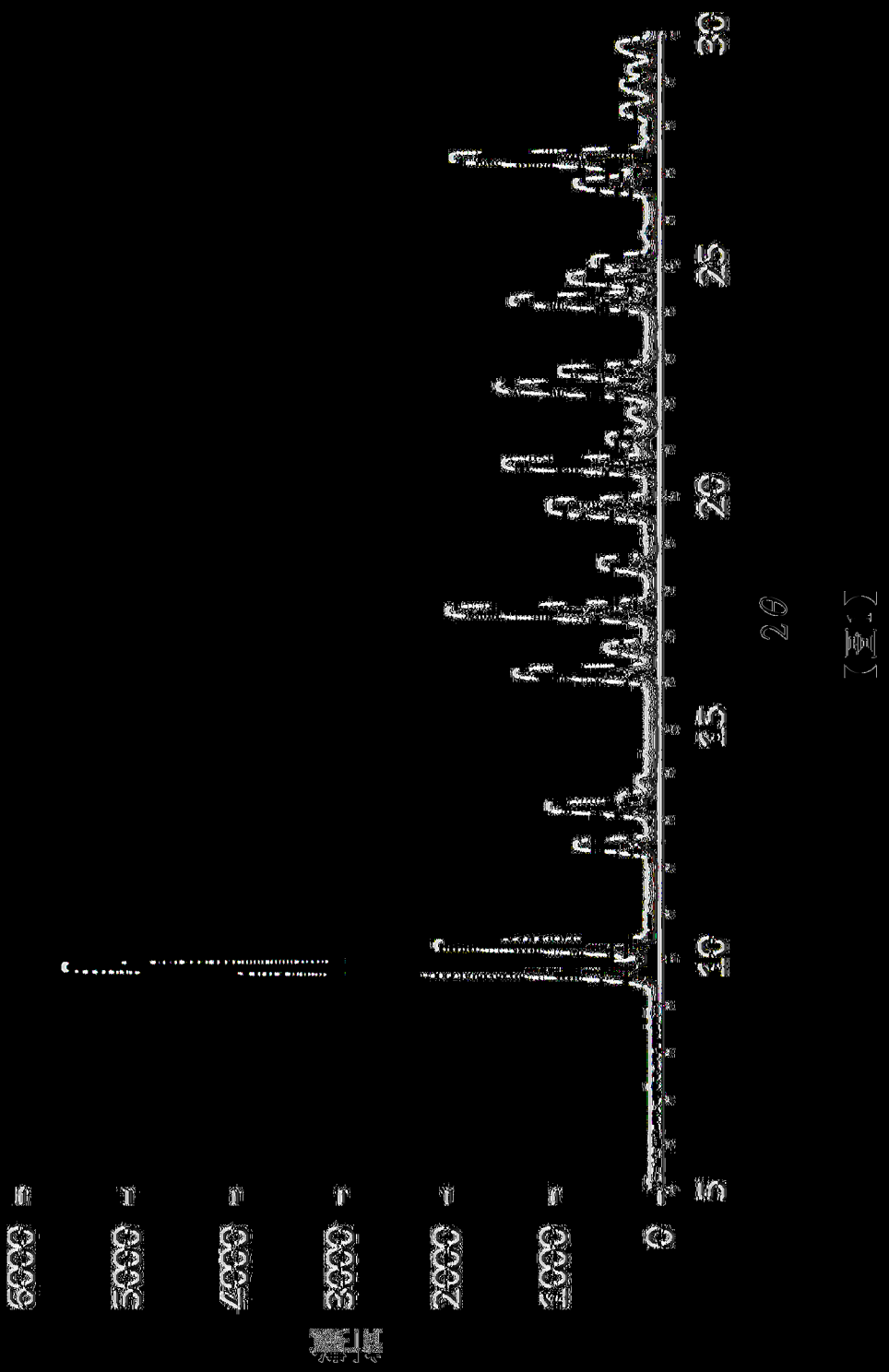
一種(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之結晶形式，其特徵為在X射線粉末繞射圖中的波峰出現在下列折射角2θ：

9.8°、10.3°及17.5°。

【請求項15】

如請求項14之(R)-2-((第三丁氧基羰基)胺基)-3-(二乙氧基磷醯基)丙酸之結晶形式，其特徵為藉由DSC量測的於約180℃之吸熱峰。

(發明圖式)



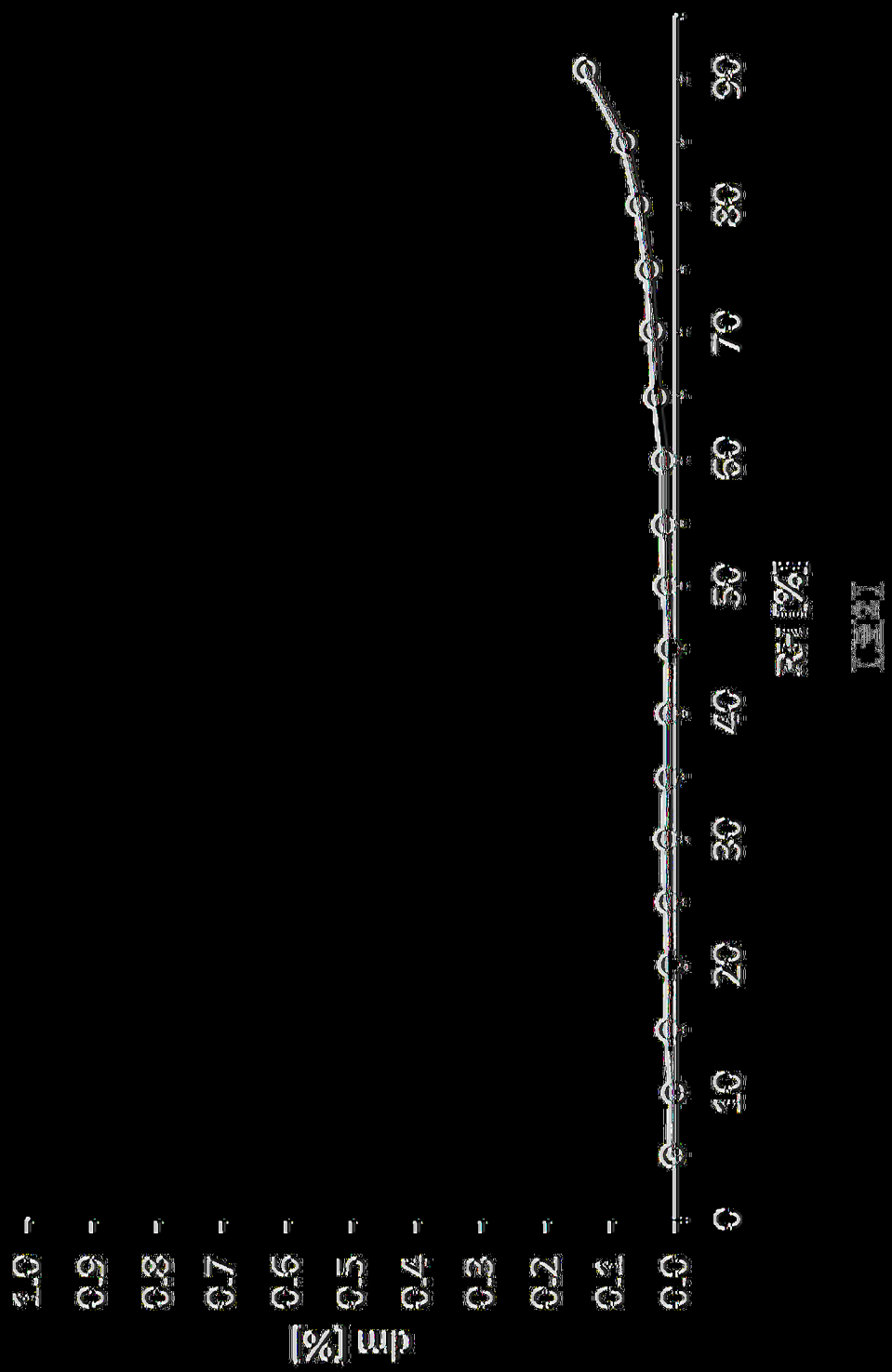

dm [%]
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
相對濕度 [%]

圖 5

熱流[mW]
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
25
50
75
100
125
150
175
200
溫度[°C]

圖5

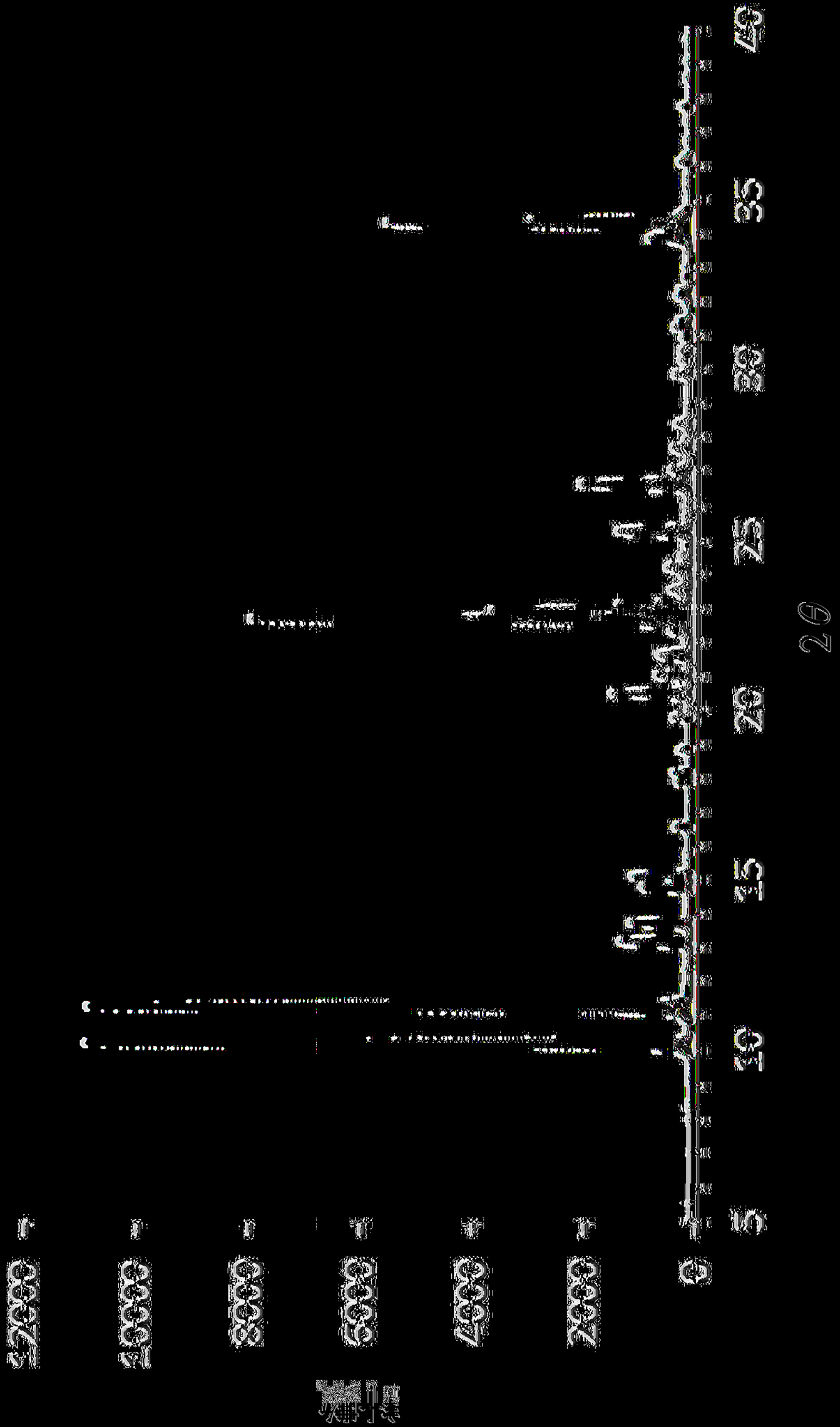


圖4

7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
時間 [s]
圖 2