



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110088079 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201780078296.0

Y·杨 H·金

(22)申请日 2017.12.20

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

(66)本国优先权数据

11247

PCT/CN2016/111674 2016.12.23 CN

代理人 张朔 黄革生

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2019.06.18

C07C 227/06(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C12P 13/04(2006.01)

PCT/IB2017/058203 2017.12.20

C07C 229/36(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/116203 EN 2018.06.28

(71)申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 F·K·克伦贝克-莱尼克

T·卡普菲尔 K·劳门 T·鲁赫

T·施拉玛 J·库 Y·李 W·彭

权利要求书7页 说明书44页

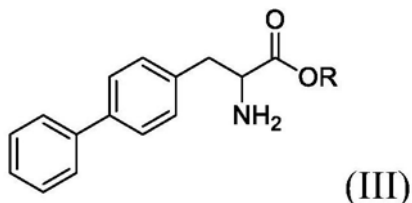
(54)发明名称

用于早期沙卡布曲中间体的新方法

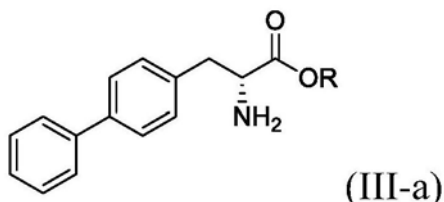
(57)摘要

本发明涉及用于生产有用的中间体的新的对映选择性方法,这些中间体用于制造NEP抑制剂或其前药、特别是包含 γ -氨基- δ -联苯基- α -甲基链烷酸或酸酯骨架的NEP抑制剂。

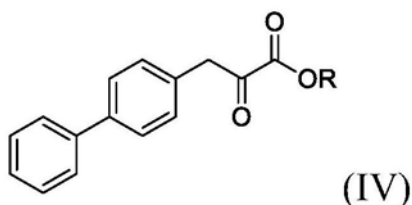
1. 一种制备具有式 (III) 的化合物或其盐



优选具有式 (III-a) 的化合物或其盐的方法



其中在两个式中R是氢或羧基保护基团，
所述方法包括将具有式 (IV) 的化合物或其盐，



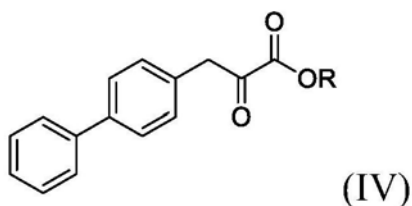
其中R是氢或羧基保护基团，

通过在胺供体存在下使其与(R)-选择性 ω -转氨酶接触而转化为具有式 (III) 的化合物，其中具有式 (IV) 的化合物向具有式 (III) 的化合物优选向具有式 (III-a) 的化合物的转化率大于50%。

2. 根据权利要求1所述的方法，其中所述胺供体是选自由以下组成的组的非手性胺供体：非手性C₁-C₇-烷基胺、非手性C₃-C₈-环烷基胺、非手性C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基胺、非手性C₁-C₇-烷基二胺、非手性氨基-C₁-C₇-链烷酸和非手性C₆-C₁₀-芳基-二(C₁-C₇-烷基胺)。

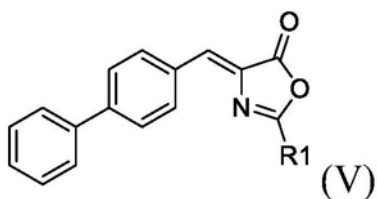
3. 根据权利要求2所述的方法，其中所述非手性胺供体是异丙胺(2-氨基丙烷)。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法，其中具有式 (IV) 的化合物或其盐，

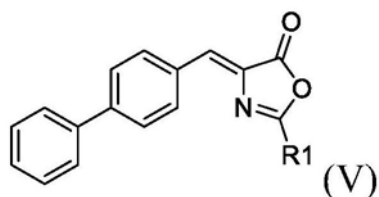


其中R是氢或羧基保护基团，

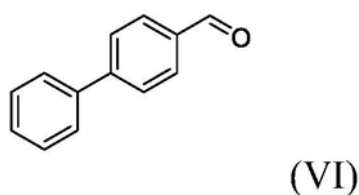
是通过包括以下的方法获得：在酸性或碱性条件下水解具有式 (V) 的化合物，



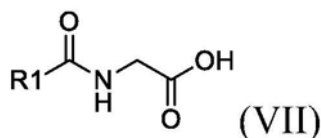
其中R1是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基，
以得到具有式 (IV) 的化合物，其中R是氢，并任选地引入羧基保护基团R。
5. 根据权利要求6所述的方法，其中具有式 (V) 的化合物



其中R1是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基，
是通过包括以下的方法获得：具有式 (VI) 的化合物



与具有式 (VII) 的化合物或其盐反应

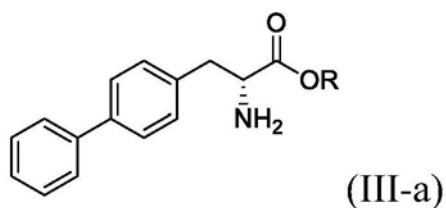


其中R1是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基。

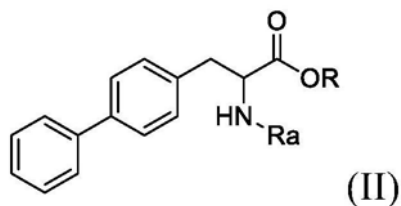
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法，其中获得的具有式 (III) 的化合物或其盐



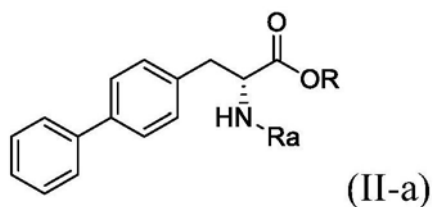
优选具有式 (III-a) 的化合物或其盐



其中在两个式中R是氢或羧基保护基团，
通过包括引入氮保护基团Ra的方法被转化为具有式 (II) 的化合物或其盐

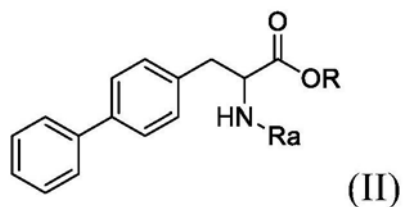


优选具有式 (II-a) 的化合物或其盐

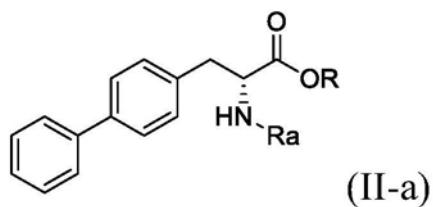


其中在两个式中R是氢或羧基保护基团,并且Ra是氮保护基团。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中获得的具有式(II)的化合物或其盐

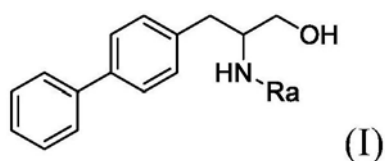


优选具有式(II-a)的化合物或其盐

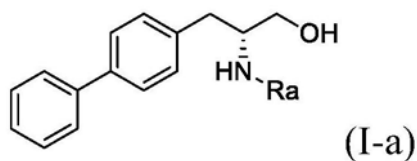


其中在两个式中R是氢或羧基保护基团,并且Ra是氮保护基团,

通过包括在还原剂存在下还原具有式(II)的化合物的方法被转化为具有式(I)的化合物或其盐

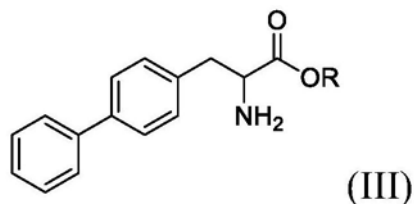


优选具有式(I-a)的化合物或其盐

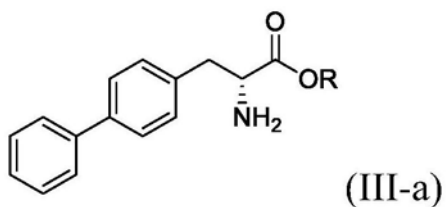


其中在两个式中Ra是氮保护基团。

8. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中获得的具有式(III)的化合物或其盐

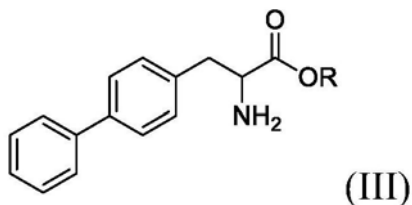


优选具有式(III-a)的化合物或其盐

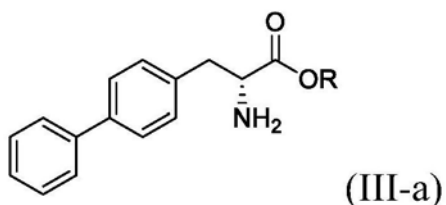


其中在两个式中R是氢，

首先通过如下方法被转化为具有式 (III) 的化合物或其盐



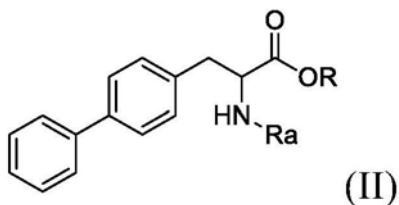
优选具有式 (III-a) 的化合物或其盐



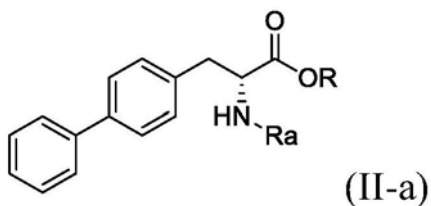
其中在两个式中R是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基，

所述方法包括与醇R-OH反应，其中R是C₁-C₇-烷基，C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基，

然后将其通过包括引入氮保护基团Ra的方法转化为具有式 (II) 的化合物或其盐

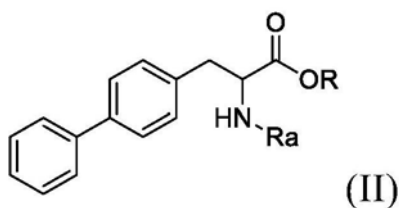


优选具有式 (II-a) 的化合物或其盐

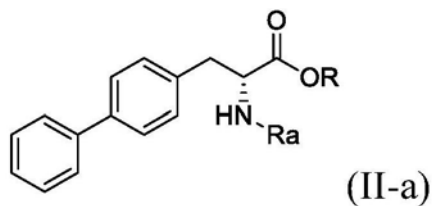


其中在两个式中R是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基，并且Ra是氮保护基团。

9. 根据权利要求8所述的方法，其中获得的具有式 (II) 的化合物或其盐

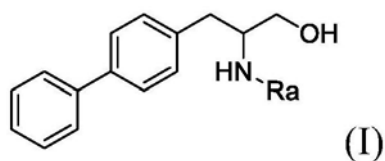


优选具有式 (II-a) 的化合物或其盐

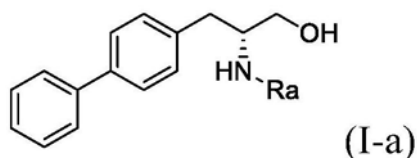


其中在两个式中R是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基,并且Ra是氮保护基团,

通过包括在还原剂存在下还原具有式 (II) 的化合物的方法被转化为具有式 (I) 的化合物或其盐

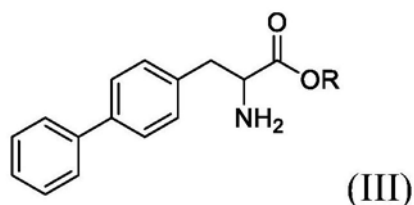


优选具有式 (I-a) 的化合物或其盐

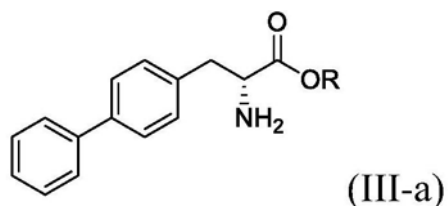


其中在两个式中Ra是氮保护基团。

10. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中获得的具有式 (III) 的化合物或其盐

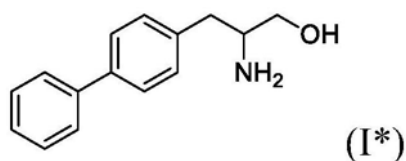


优选具有式 (III-a) 的化合物或其盐

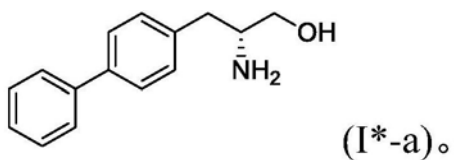


其中在两个式中R是氢或羧基保护基团,

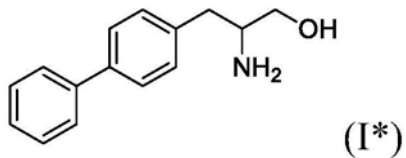
通过包括在还原剂存在下还原具有式 (III) 的化合物的方法被转化为具有式 (I*) 的化合物或其盐



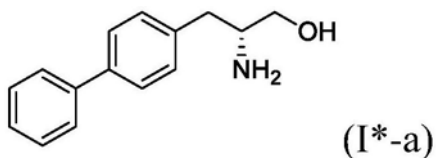
优选具有式 (I*-a) 的化合物或其盐



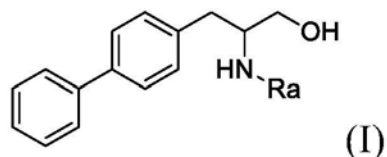
11. 根据权利要求10所述的方法, 其中获得的具有式 (I*) 的化合物或其盐



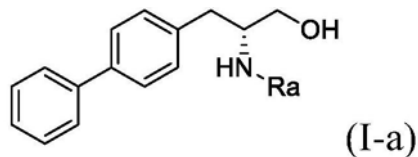
优选具有式 (I*-a) 的化合物或其盐



通过包括引入氮保护基团的方法被转化为具有式 (I) 的化合物或其盐

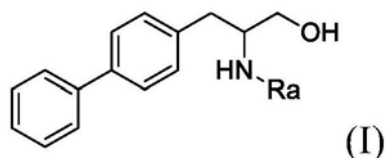


优选具有式 (I-a) 的化合物或其盐

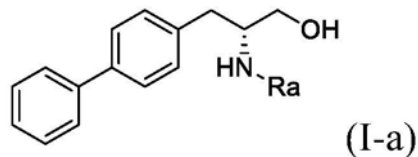


其中在两个式中Ra是氮保护基团。

12. 根据权利要求7、9或11所述的方法, 其中获得的具有式 (I) 的化合物或其盐,

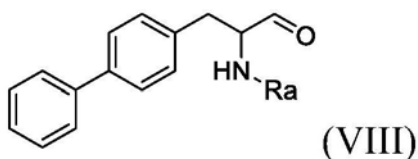


优选具有式 (I-a) 的化合物或其盐

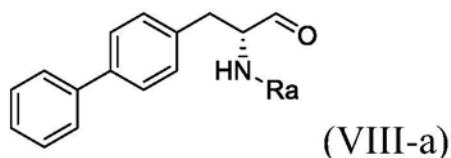


其中在两个式中Ra是氮保护基团,

通过包括TEMPO介导的氧化反应或用戴斯-马丁过碘烷氧化的方法反应, 以获得具有式 (VIII) 的化合物或其盐,

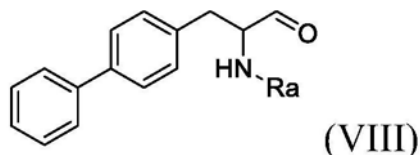


优选具有式 (VIII-a) 的化合物或其盐

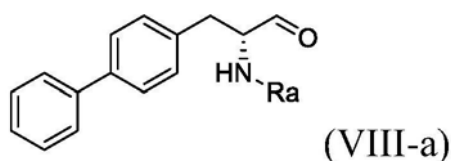


其中在两个式中Ra是氢或氮保护基团。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其中获得的具有式 (VIII) 的化合物或其盐,



优选具有式 (VIII-a) 的化合物或其盐



进一步反应以制备N-(3-羧基-1-氧代丙基)-(4S)-(对-苯基苯基甲基)-4-氨基-(2R)-甲基丁酸乙基酯或其盐。

14. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法, 其中Ra在各式中是氮保护基团, 其存在时选自C₁-C₆-烷基, 所述C₁-C₆-烷基未被取代或被以下各项单-、二-或三-取代: 三-C₁-C₆-烷基甲硅烷基C₁-C₇-烷氧基、C₆-C₁₀-芳基、或杂环基团, 所述杂环基团是具有5至14个环原子和1至4个独立地选自N、O、S、S(O)或S(O)₂的杂原子的单环、二环或三环系统, 其中芳基环或杂环基未被取代或被一个、两个或三个选自由以下组成的组的残基取代: C₁-C₇-烷基、羟基、C₁-C₇-烷氧基、C₂-C₈-烷酰基-氧基、卤素、硝基、氰基和CF₃;

C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₂-烷氧基羰基; C₁-C₁₀-烯氧基羰基; C₁-C₆-烷基羰基; C₆-C₁₀-芳基羰基; C₁-C₆-烷氧基羰基; C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₆-烷氧基羰基; 烯丙基; 肉桂基; 磺酰基; 次磺酰基; 琥珀酰亚胺基和甲硅烷基,

其中各个甲硅烷基是SiR₁₁R₁₂R₁₃基团, 其中R₁₁、R₁₂和R₁₃彼此独立地是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或苯基-C₁-C₄-烷基。

15. 根据权利要求13所述的方法, 其中作为氮保护基团的Ra是C₁-C₇-烷氧基羰基, 优选叔丁氧基羰基。

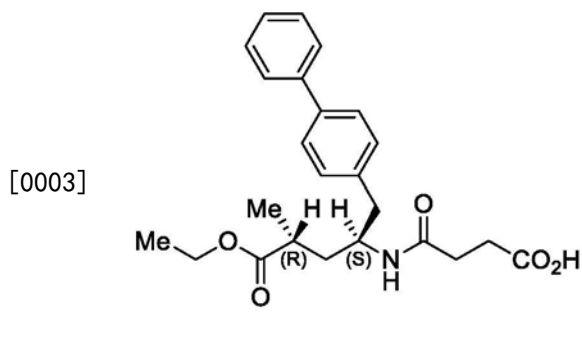
用于早期沙卡布曲中间体的新方法

技术领域

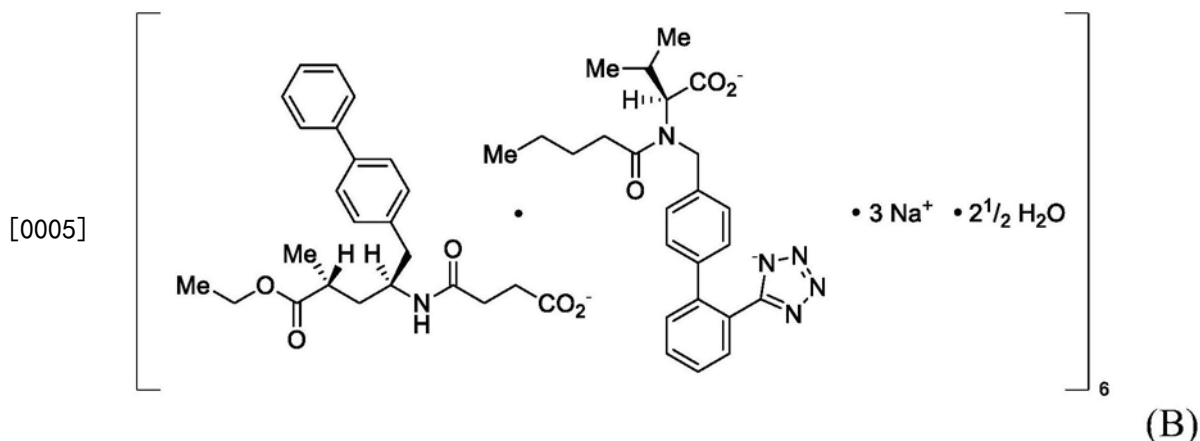
[0001] 本发明涉及用于中间体的新化学合成途径,这些中间体用于制备脑啡肽酶 (NEP) 抑制剂以及它们的前药、特别用于NEP抑制剂前药沙卡布曲 (sacubitril)。

背景技术

[0002] NEP抑制剂前药沙卡布曲 (N-(3-羧基-1-氧代丙基)-(4S)-(对-苯基苯基甲基)-4-氨基-(2R)-甲基丁酸乙基酯;IUPAC名称4-{[(1S,3R)-1-([1,1'-联苯基]-4-基甲基)-4-乙氧基-3-甲基-4-氧代丁基]氨基}-4-氧代丁酸,也称为AHU377) 是通过下式 (A) 表示的



[0004] 沙卡布曲与缬沙坦 (已知的血管紧张素受体阻断剂 (ARB)) 一起形成被称为LCZ696的钠盐水合物络合物,该钠盐水合物络合物包含对应地以1:1:3:2.5的摩尔比 (在固态晶体的不对称晶胞中的比率是6:6:18:15) 的阴离子形式的沙卡布曲和缬沙坦、钠阳离子和水分子 (WO 2007/056546),并且其示意性地以式 (B) 存在。



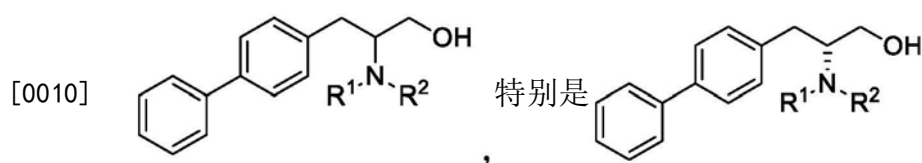
[0006] 所述复合物亦指下列化学名称:三钠[3-((1S,3R)-1-联苯基-4-基甲基-3-乙氧基羰基-1-丁基氨基甲酰基) 丙酸酯-(S)-3'-甲基-2'-(戊酰基{2''-(四唑-5-基酯) 联苯基-4'-基甲基}氨基) 丁酸酯]半五水合物或十八钠六(4-{[(1S,3R)-1-([1,1'-联苯基]-4-基甲基)-4-乙氧基-3-甲基-4-氧代丁基]氨基}-4-氧代丁酸酯) 六 (N-戊酰基-N-{[2'-(1H-四唑-1-基(id)-5-基) [1,1'-联苯基]-4-基]甲基}-L-缬氨酸) 一水 (1/15) (IUPAC命名法)。

[0007] LCZ696作为血管紧张素受体脑啡肽酶抑制剂 (ARNI) 并且因此特别适用于高血压或慢性心力衰竭的治疗。它的效用已经通过临床试验,例如在具有里程碑意义的PARADIGM-

HF试验中得到证实。同时,2015年7月7日,FDA批准了LCZ696上市。

[0008] 制备NEP抑制剂以及它们的前药、特别是沙卡布曲及其前体的化学合成途径先前已经例如在以下文件中描述:Ksander等人,J.Med.Chem.[药物化学杂志]1995,38,1689-1700;在美国专利号5,217,996中以及在国际专利申请WO 2007/083774、WO 2007/083776、WO 2008/031567、WO 2008/083967、WO 2008/120567WO 2009/090251、WO 2010/081410、WO 2011/035569、WO 2011/088797、WO 2012/025501、WO 2012/025502、WO 2013/026773、WO 2014/032627、WO 2015/024991、和WO 2015/037460中以及在中国专利申请CN101362708、CN102260177、CN103483201、CN104557600、CN104725256、CN104725279、CN105017082、CN105061263、CN105085322、CN105152980、CN105168205、CN105198775、CN105237560、CN105330569、CN105481622、CN105566194、CN105601524和CN105884656中。

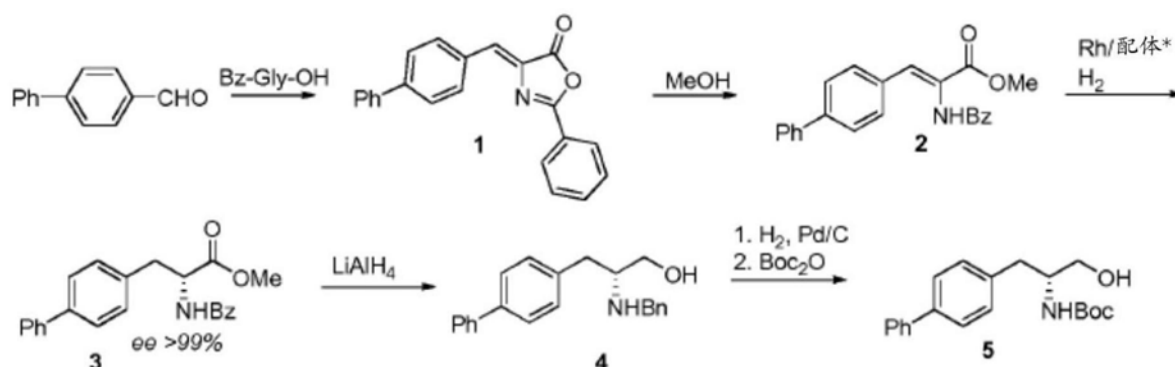
[0009] 特别地,CN101362708、WO 2013/026773、WO 2014/032627、WO 2015/024991和CN105884656涉及新颖的合成方法以提供前体化合物



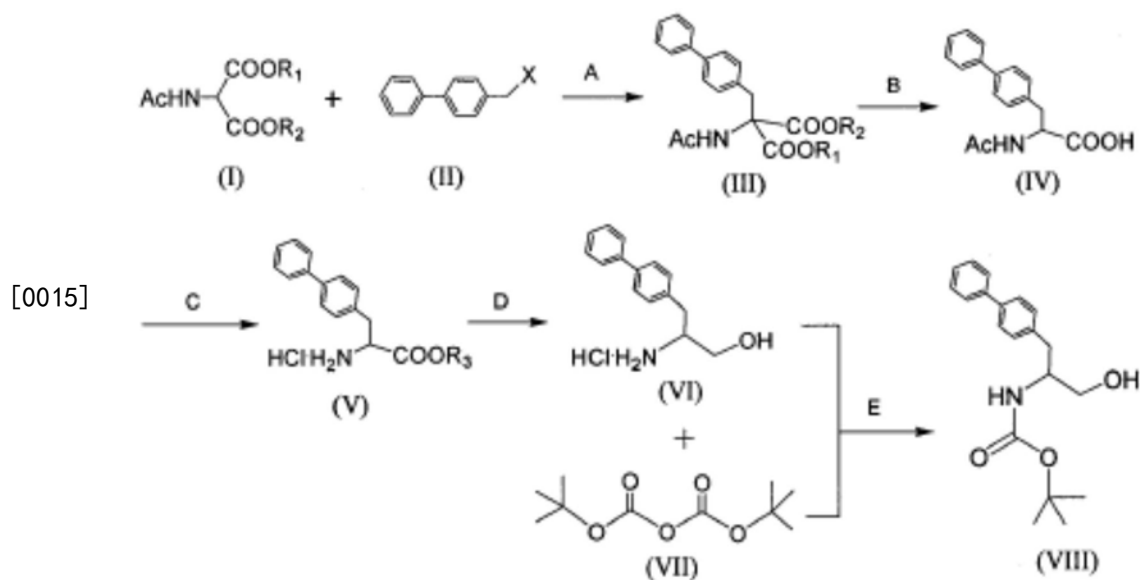
[0011] 其中R1和R2彼此独立地是氢或氮保护基团。

[0012] 在以下方案中描绘了在WO 2013/026773中披露的方法

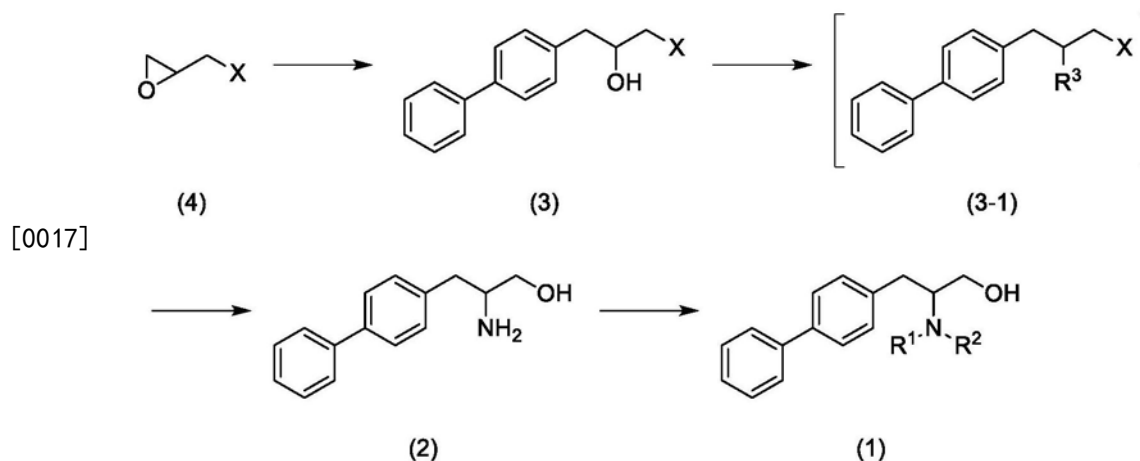
[0013]



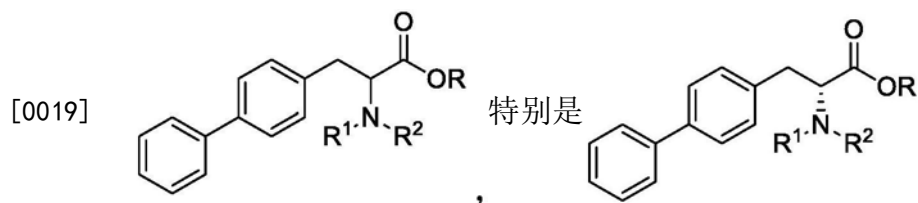
[0014] 在以下方案中描绘了在CN101362708中披露的方法



[0016] 在以下方案中描绘了在W0 2014/032627中披露的方法

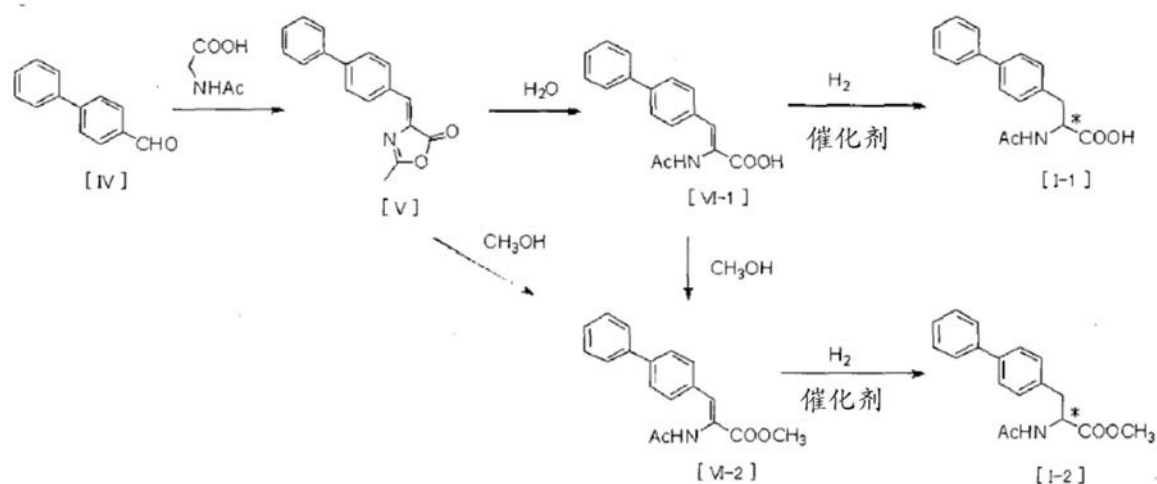


[0018] 另外,W0 2015/037460披露了获得较早中间体的方法,即

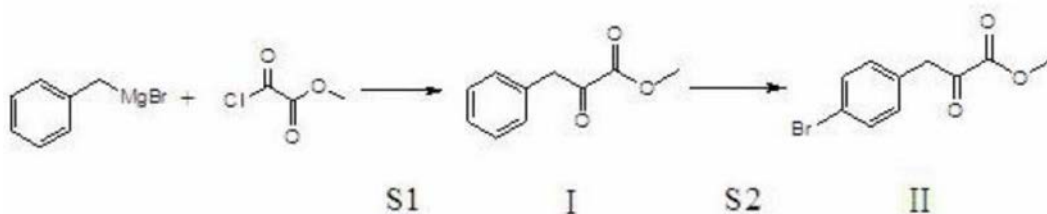


[0020] 其是通过以下方法:

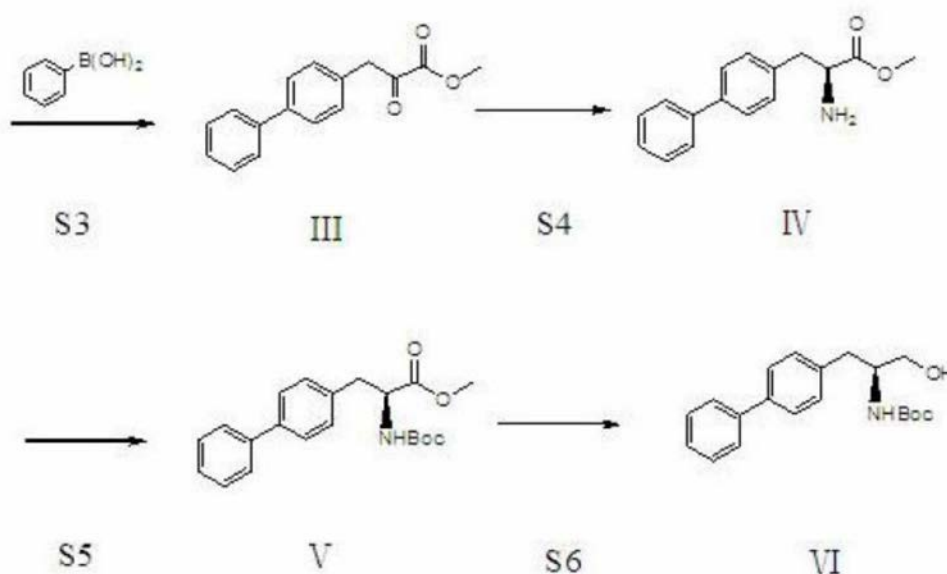
[0021]



[0022] 在以下方案中描绘了在CN105884656中披露的方法



[0023]



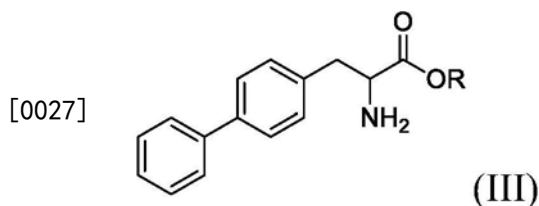
[0024] 然而,这些方法仍然具有缺点,如潜在危险的反应物或使用昂贵的催化剂和/或有限的立体选择性。因此,仍然对设计化学方法以提供获得用于合成沙卡布曲的所述起始材料的廉价方式存在需求,这些方法适用于在经济和环境上有利的条件下进行工业规模生产并且提供此类以高化学纯度并且具有高立体化学选择性的药物物质前体。

发明内容

[0025] 本发明涉及制备下面所示的具有式 (III) 的化合物,特别是具有式 (III-a) 的化合

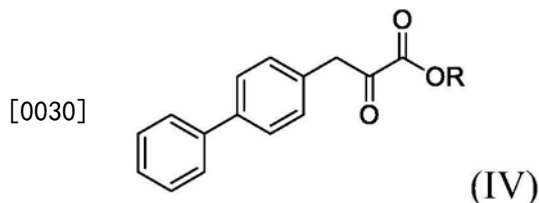
物的新方法,包括制备浸提物的方法步骤以及导致制造沙卡布曲的其他方法步骤。

[0026] 因此,在第一方面,本发明涉及制备具有式 (III) 的化合物或其盐的方法



[0028] 其中R是氢或羧基保护基团,

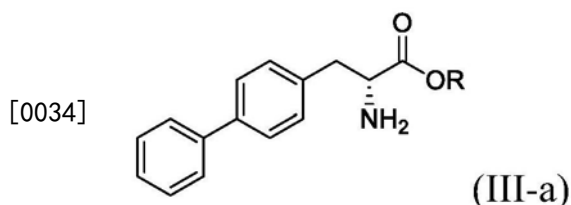
[0029] 该方法包括将具有式 (IV) 的化合物或其盐,



[0031] 其中R是氢或羧基保护基团,

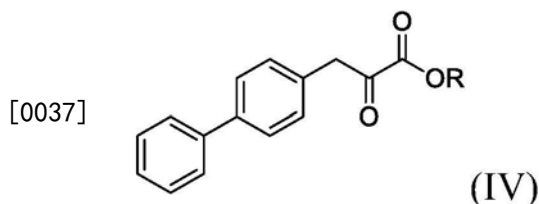
[0032] 通过在非手性胺供体存在下使其与 ω -转氨酶接触而转化为具有式 (III) 的化合物,其中具有式 (IV) 的化合物向具有式 (III) 的化合物的转化率大于50%。

[0033] 在其一个实施例中,本发明涉及制备具有式 (III-a) 的化合物或其盐的方法



[0035] 其中R是氢或羧基保护基团,

[0036] 该方法包括将具有式 (IV) 的化合物或其盐,



[0038] 其中R是氢或羧基保护基团,

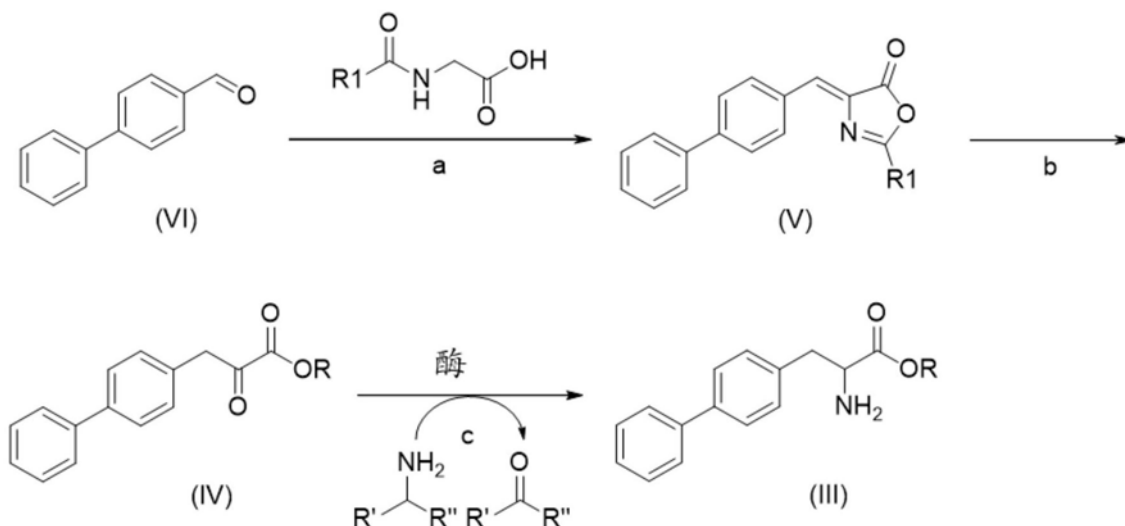
[0039] 通过在具有通式R' R''CH-NH₂的胺供体(优选非手性胺供体)和辅酶存在下使其与(R)-选择性 ω -转氨酶接触而转化为具有式 (III-a) 的化合物,其中具有式 (IV) 的化合物向具有式 (III-a) 的化合物的转化率大于50%。

[0040] 进一步的实施例涉及该反应步骤的特定反应条件以及制备具有式 (IV) 的起始化合物和/或进一步使获得的具有式 (III) 和 (III-a) 的化合物反应的各自相关方法步骤,最后获得NEP抑制剂化合物沙卡布曲。

[0041] 包括关键方法步骤c(分别涉及具有式 (IV) 的化合物向具有式 (III) 的化合物和具有式 (III-a) 的化合物的转氨酶)的反应顺序描述于以下方案1和方案中1-a,分别为:

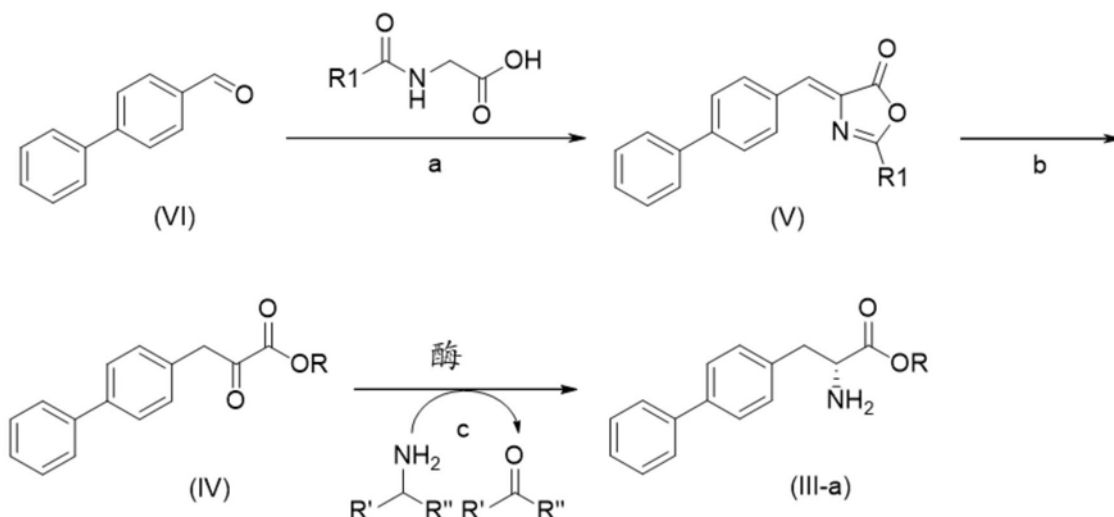
[0042] 方案1:

[0043]



[0044] 方案1-a

[0045]

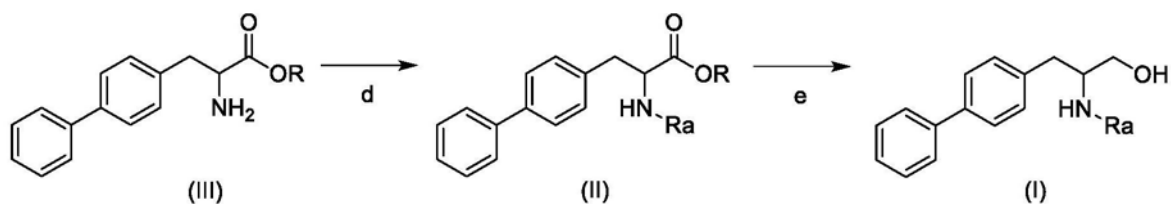


[0046] 其中,在方案1和方案1-a中, R^1 是任选地取代的 C_1 - C_7 -烷基、 C_6 - C_{10} -芳基或 C_6 - C_{10} -芳基- C_1 - C_7 -烷基,并且R是氢或羧基保护基团。

[0047] 然后,分别通过以下方案2、2*和2**以及方案2-a、2*-a和2**-a中描述的可替代的反应顺序,将具有式(III)的化合物和具有(III-a)的化合物分别转化为具有式(I)的化合物和具有(I-a)的化合物:

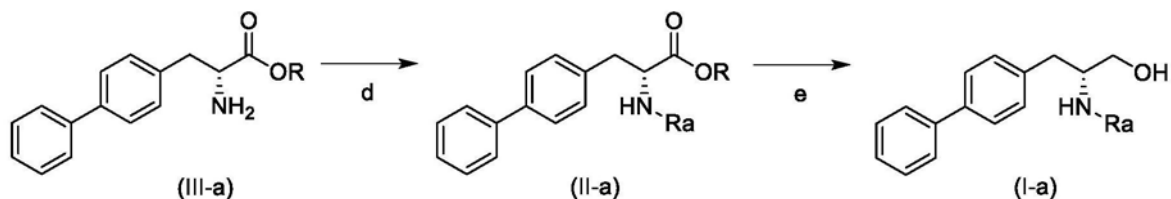
[0048] 方案2

[0049]



[0050] 方案2-a

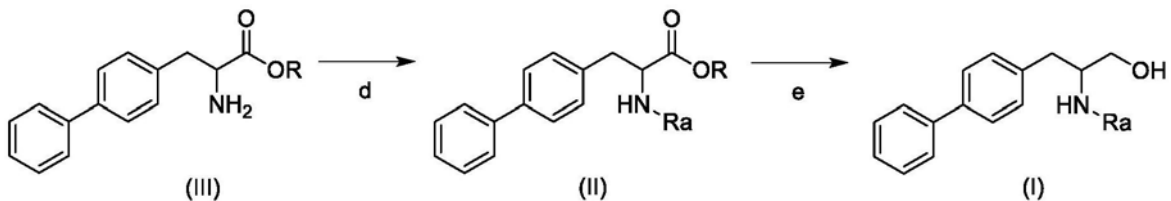
[0051]



[0052] 其中,在方案2和方案2-a中,R是氢或羧基保护基团,Ra是氮保护基团。

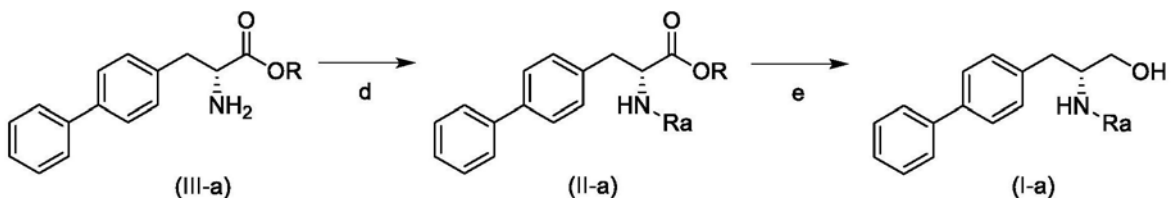
[0053] 方案2*

[0054]



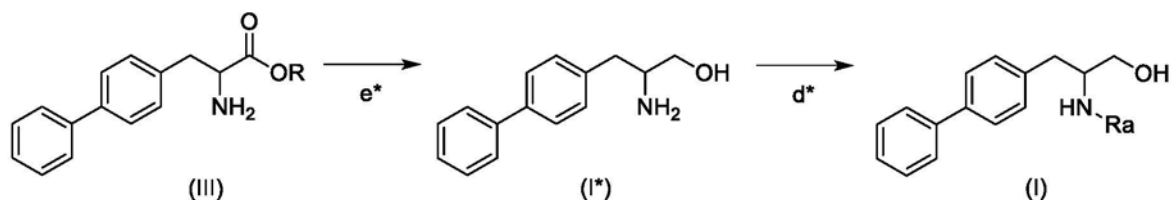
[0055] 方案2*-a

[0056]

[0057] 其中,在方案2*和方案2*-a中,R是任选地取代的C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基,并且Ra是氮保护基团。

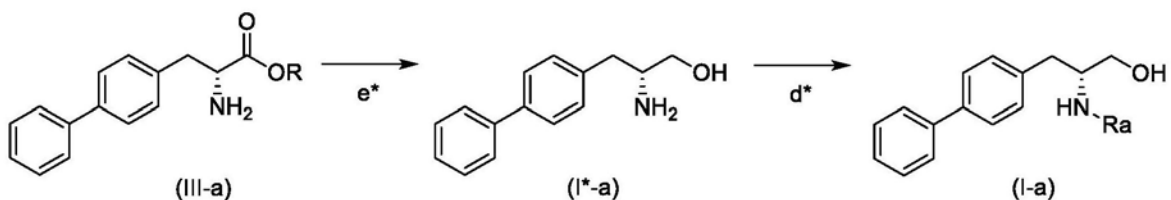
[0058] 方案2**:

[0059]



[0060] 方案2**-a:

[0061]

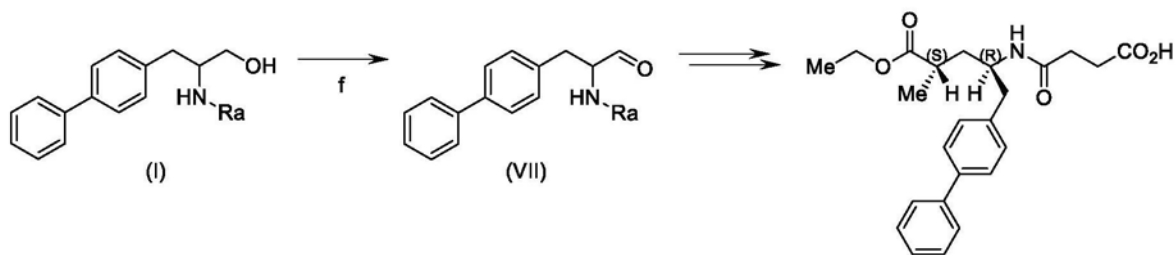


[0062] 其中,在方案2**和方案2**-a中,R是氢或羧基保护基团,并且Ra是氮保护基团。

[0063] 然后可以分别通过如方案3和方案3-a所示的已知的反应步骤将获得的具有式(I)的化合物和具有(I-a)的化合物转化为NEP抑制剂化合物沙卡布曲:

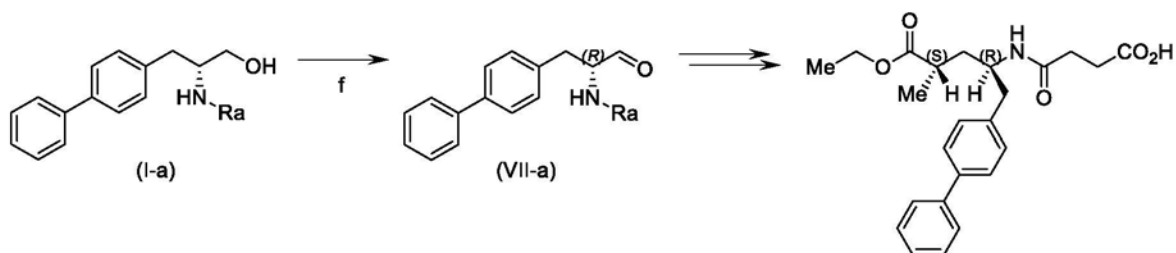
[0064] 方案3:

[0065]



[0066] 方案3-a:

[0067]

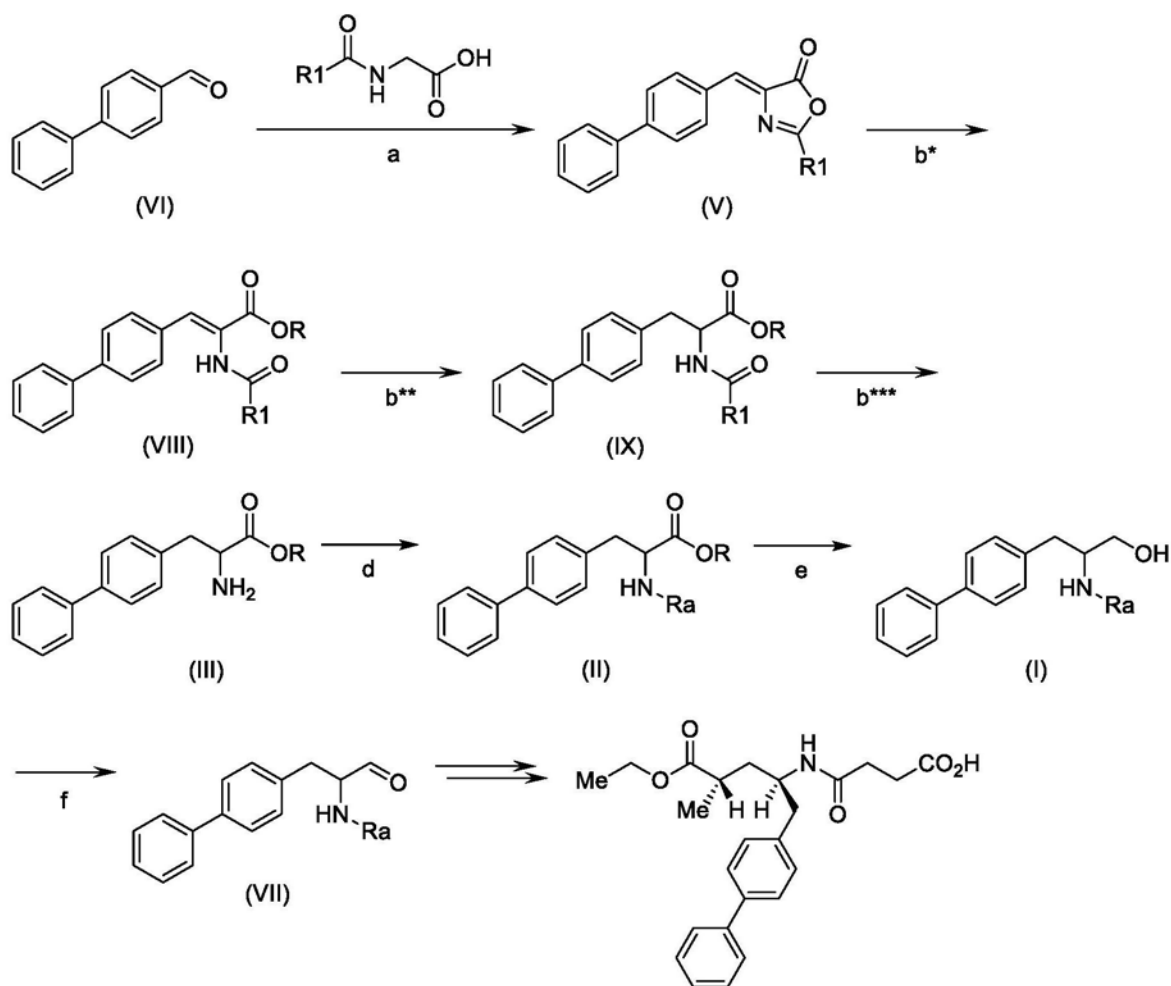


[0068] 其中,在方案3和方案3-a中,Ra是氮保护基团。

[0069] 此外,在第二方面,本发明涉及根据以下方案4和方案4-a的方法:

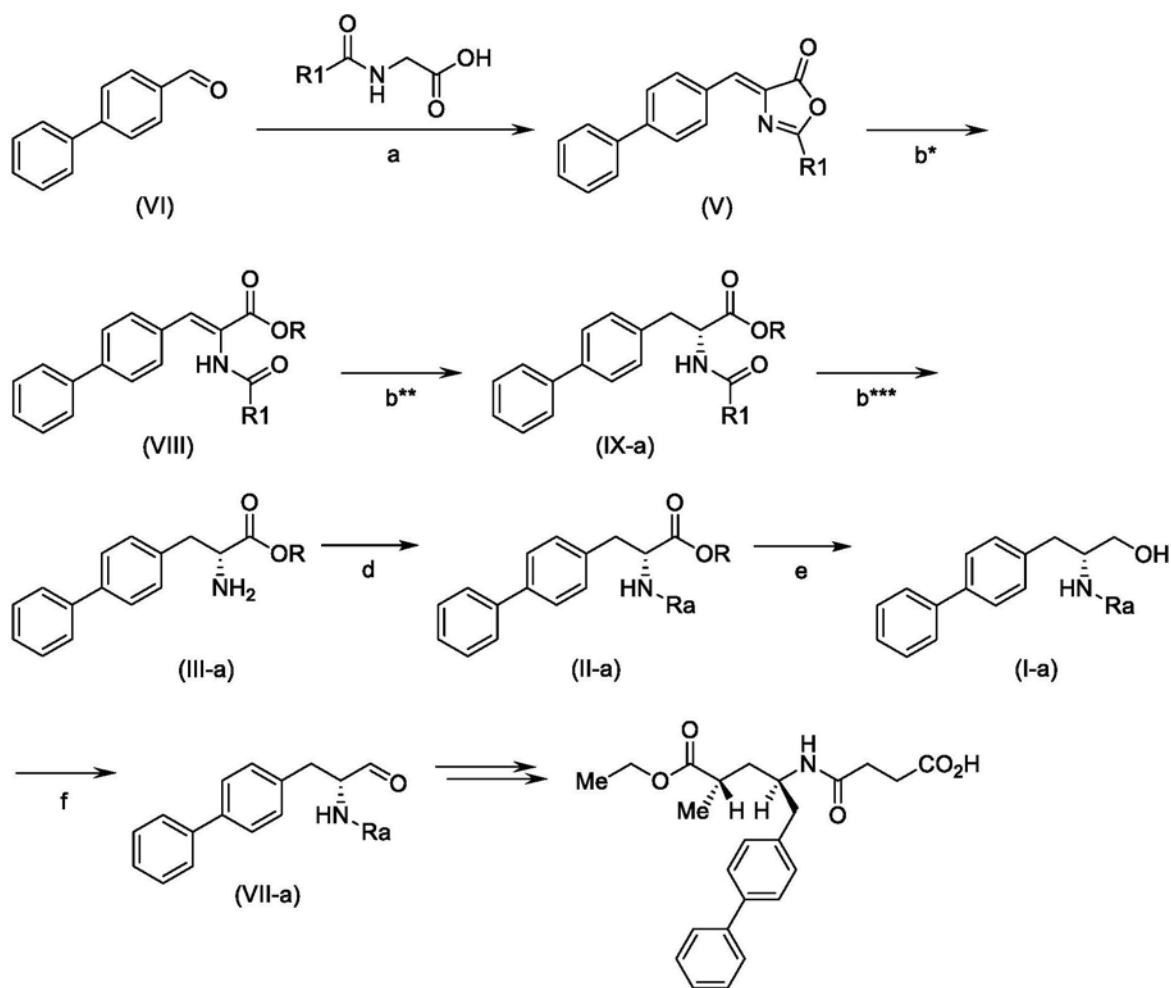
[0070] 方案4

[0071]



[0072] 方案4-a

[0073]



[0074] 其中在两种方案中,取代基具有以下含义:其中,R是氢或羧基保护基团,R1是任选地取代的C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基,并且Ra是氮保护基团。

[0075] 在以下还更详细地给出的其上述方面中,本发明提供了以下优点:所述新合成路线适用于工业规模加工,对经济和环境有利。作为用于合成沙卡布曲所希望的中间体的具有式(III)的化合物可以以高产率和高立体选择性来生产。

具体实施方式

[0076] 通用术语:

[0077] 上文和下文使用的通用定义,除非不同定义,否则具有以下含义,其中可以独立地对各个本发明实施例通过更具体的定义替换一种或多种或所有表述或符号,并且产生更优选实施例。

[0078] 在复数形式用于化合物、起始材料、中间体、盐、药物制剂、疾病、障碍等的情况下,这旨在意指一个/种(优选的)或多个/种单一化合物、盐、药物制剂、疾病、障碍等,在使用单数或不定冠词(“a”、“an”)的情况下,这并不旨在排除复数,但优选仅意指“一个/种”。

[0079] 手性化合物

[0080] 术语“手性的”是指在其镜像配偶体上具有非重叠性特性的分子,而术语“非手性

的”是指在其镜像配偶体上是可重叠的分子。

[0081] 在本申请的式中,在C-sp³上的术语“”表示共价键,其中没有定义该键的立体化学。这意指,在C-sp³上的术语“”包括各自手性中心的(S)构型以及(R)构型。此外,混合物,例如对映异构体的混合物如消旋体也由本发明所涵盖。特别优选的是具有式(1)或(2)的化合物的单一的立体异构体、特别是具有式(1-a)和(1-b)的具体的立体异构体。

[0082] 在本申请的式中,在C-sp²上的术语“”表示共价键,其中没有定义该键的立体化学或几何学。这意指在C-sp²上的术语“”包括各自双键的(Z)构型以及(E)构型。此外,混合物,例如双键异构体的混合物也由本发明所涵盖。

[0083] 在本申请的式中,在C-sp³上的术语“”指示绝对的立体化学,(R)或者(S)。

[0084] 在本申请的式中,在C-sp³上的术语“”指示绝对的立体化学,(R)或者(S)。

[0085] 在本申请的式中,术语“”指示C-sp³-C-sp³键或C-sp²-C-sp²键。

[0086] 本发明的化合物可以具有一个或多个不对称中心。如本文具体地指示了优选的绝对构型。然而,任何可能的纯的对映异构体、纯的非对映异构体、或其混合物,例如对映异构体的混合物如消旋体由本发明所涵盖。

[0087] 具有立构中心但没有指示具体构型的化合物被认为是具有相应构型的化合物的混合物(例如R,R;R,S;S,R和SS),或纯的对映异构体/非对映异构体。

[0088] 其中提及的立体异构的、尤其是对映异构体的纯度是指化合物的所有非对映异构体加在一起(100%)。它是通过手性色谱(实例包括HPLC、uPLC和GC)或NMR(其中添加手性实体和或金属)测定的。

[0089] 如本文定义的术语“基本上光学纯的”化合物是指通过根据本发明的方法获得的化合物,其中该化合物具有至少70%(ee=对映异构体过量)、更优选至少90%(ee)并且最优选至少95%(ee)或更多,如100%(ee)的光学纯度。

[0090] 前药

[0091] 如本文使用的术语“前药”表示特别是在体内被转化为母体化合物的化合物,例如,通过在血液中水解,例如如在以下文件中所描述的:T.Higuchi和V.Stella,“Pro-drugs as Novel Delivery Systems[作为新颖的递送系统的前药]”,volume 14 of the ACS Symposium Series[ACS专题论文集系列的第14卷];Edward B.Roche,编辑,“Bioreversible Carriers in Drug Design[药物设计中的生物可逆性载体]”,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press[美国药学协会和培格曼出版社],1987;H Bundgaard,编辑,“Design of Prodrugs[前药的设计]”,Elsevier[爱思唯尔],1985;Judkins等人,Synthetic Communications[合成通讯]1996,26,4351-4367,以及“The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action[药物设计和药物作用的有机化学]”,第二版,R.B.Silverman(具体地第8章,第497-557页),Elsevier Academic Press[爱思唯尔学术出版社],2004。

[0092] 因此,前药包括具有被转化成其可逆衍生物的官能团的药物。典型地,此类前药通过水解转化为活性药物。作为实例,可以提及以下项:

- | | 官能团 | 可逆衍生物 |
|--------|---|------------------------|
| | 羧酸 | 酯, 包括例如烷基酯 |
| [0093] | 醇 | 酯, 包括例如硫酸酯和磷酸酯以及羧酸酯 |
| | 胺 | 酰胺、氨基甲酸酯、亚胺、烯胺, |
| | 羰基 (醛、酮) | 亚胺、肟、缩醛/缩酮、烯醇酯、噁唑烷和噻唑烷 |
| [0094] | 前药还包括通过氧化或还原反应可转化为活性药物的化合物。作为实例可以提及: | |
| [0095] | 氧化活化 | |
| [0096] | • N-和O-脱烷基化 | |
| [0097] | • 氧化脱氨基 | |
| [0098] | • N-氧化 | |
| [0099] | • 环氧化 | |
| [0100] | 还原活化 | |
| [0101] | • 偶氮还原 | |
| [0102] | • 亚砷还原 | |
| [0103] | • 二硫键还原 | |
| [0104] | • 生物还原烷基化 | |
| [0105] | • 硝基还原 | |
| [0106] | NEP抑制剂 | |
| [0107] | 术语“NEP抑制剂”描述了抑制酶中性肽链内切酶 (NEP, EC 3.4.24.11) 的活性的化合物。 | |
| [0108] | 在本发明中, 术语“NEP-抑制剂”或“NEP-抑制剂前药”涉及物质本身或涉及其盐, 优选其药学上可接受的盐。实例是钠盐、钾盐、镁盐、钙盐或铵盐。优选钙盐。 | |
| [0109] | 任选地可以进一步使NEP抑制剂前药N-(3-羧基-1-氧代丙基)-(4S)-对-苯基苯基甲基)-4-氨基-(2R)-甲基丁酸乙酯在体外或体内反应以获得活性NEP抑制剂N-(3-羧基-1-氧代丙基)-(4S)-对-苯基苯基甲基)-4-氨基-(2R)-甲基丁酸。 | |
| [0110] | 转氨酶 | |
| [0111] | 在本发明的上下文中, 转氨酶是依赖于吡哆醛-磷酸的酶, 其催化氨基 (NH ₂) 从伯胺转移至受体分子的羰基 (C=O)。转氨酶分类为E.C.2.6.1.X。在本发明特别优选的实施例中, 转氨酶是(R)-或(S)-选择性转氨酶, 在优选的实施例中特别是ω-转氨酶, 特别是(R)-选择性ω-转氨酶。 | |
| [0112] | 在本发明的上下文中, ω-转氨酶是优选具有分类代码E.C.2.6.1.18的酶。这些氨基转氨酶的特征在于它们主要使用胺作为底物。这些酶的进一步特征在于表现出ω-转氨酶催化反应的平衡常数大于1。 | |
| [0113] | 还在术语转氨酶特别是ω-转氨酶, 含有转氨酶特别是ω-转氨酶的生物例如微生物或细胞的提取物, 或含转氨酶特别是ω-转氨酶的活细胞或死细胞或微生物本身的情境下理解本发明。这种微生物或细胞或提取物或转氨酶可以固定或非固定形式使用。 | |

[0114] 转氨酶特别是 ω -转氨酶,也可以是重组产生的天然存在的(野生型)或遗传修饰的转氨酶,特别是 ω -转氨酶,其部分或完全由包含在上述鉴定的生物之一中或与其等同物中的核酸序列或其衍生物编码。

[0115] 可以使用和/或优化以根据本发明使用的 ω -转氨酶的最新概述描述于例如Koszelewski等人,Trends in Biotechnology[生物技术趋势]2010,28,324-332,和Malik等人,Appl.Microbiol.Biotechnol.[应用微生物学与生物技术]2012,94,1163-1171。这种转氨酶可以例如获得自微生物例如青紫色素杆菌、河流孤菌、反硝化产碱菌、克雷伯氏杆菌、苏云金芽孢杆菌等。

[0116] 在一个实施例中,本发明中使用的 ω -转氨酶是从克迪科思公司(Codexis Inc.)以参考号ATA-013、ATA-015、ATA-016、ATA-25、ATA-032、ATA-033、ATA-036、ATA-301、ATA-303、ATA-412、ATA-415、ATA-417和ATA-436获得(Codex®ATA筛选试剂盒的一部分或进一步遗传修饰的 ω -转氨酶变体,也来自克迪科思公司)。例如,这种遗传修饰的 ω -转氨酶描述在美国专利号9,889,380和8,293,507和9,133,445,EP专利号EP2401366和PCT申请WO 2010/099501中。

[0117] 辅酶

[0118] 转氨酶需要辅酶吡哆醛-5'-磷酸(PLP)。“吡哆醛-磷酸”、“PLP”、“吡哆醛-5'-磷酸”、“PYP”和“P5P”在本文中可互换使用,是指在转氨酶反应中充当辅酶的化合物。

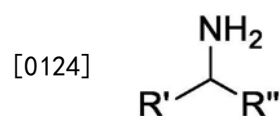
[0119] 在一些实施例中,磷酸吡哆醛由结构1-(4'-甲酰基-3'-羟基-2'-甲基-5'-吡啶基)甲氧基磷酸定义,CAS号[54-47-7],吡哆醛-5'-磷酸可以通过吡哆醇(也称为维生素B6)的磷酸化和氧化在体内产生。在使用转氨酶的转氨反应中,氨基供体的胺基转移至辅酶以产生酮副产物,而吡哆醛-5'-磷酸转化为磷酸吡哆胺。吡哆醛-5'-磷酸通过与不同的酮化合物(氨基受体)反应而再生。从磷酸吡哆胺到氨基受体的胺基转移产生手性胺并再生辅酶。

[0120] 在一些实施例中,吡哆醛-5'-磷酸可以被维生素B6家族的其他成员替代,包括吡哆醇(PN)、吡哆醛(PL)、吡哆胺(PM)和它们的磷酸化对应物,磷酸吡哆醇(PNP)和磷酸吡哆胺(PMP)。

[0121] 胺供体

[0122] 在本发明的上下文中,胺供体是能够使用转氨酶特别是 ω -转氨酶向胺受体提供氨基的分子。在一个特别优选的实施例中,胺供体是胺或氨基酸。

[0123] 在一些实施例中,氨基供体是以下通式的分子,



[0125] 其中R'和R''中的每一个独立地被取代时是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,其是未被取代的或被一个或多个酶促非抑制基团取代。R'可以与R''在结构或手性上相同或不同。在一些实施例中,R'和R''一起可以形成未被取代的、取代的或与其他环稠合的环。可以使用的典型氨基供体包括手性和非手性氨基酸,以及手性和非手性胺。可以使用的氨基供体包括,例如但不限于,异丙胺(2-氨基丙烷)、 β -丙氨酸、丙氨酸、特别是D,L-丙氨酸、L-丙氨酸或D-丙氨酸、 α -甲基苄胺(α -MBA)、谷氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、3-氨基丁酸、2-

氨基丁烷、 γ -氨基丁酸和其任何一种的盐,例如氯化物。在其优选实施例中,异丙胺(2-氨基丙烷)是胺供体。

[0126] 在这样的实施例中,所获得的酮产物是丙酮、苯丙酮酸或其盐、丙酮酸或其盐、乙醛酸或其盐、苯乙酮、2-酮戊二酸、3-氧代丁酸、2-丁酮、3-氧代吡咯烷(3-OP)、3-吡啶基甲基酮(3-PMK)、3-氧代丁酸乙酯(3-OBEE)、3-氧代戊酸甲酯(3-OPME)、N-1-Boc-3-氧代哌啶酮和N-1-Boc-3-氧代吡咯烷(B30P)或其任何一种的盐,例如氯化物。在其优选的实施例中,获得的酮产物是丙酮。

[0127] 酶促反应条件:

[0128] “合适的反应条件”是指转氨酶催化的反应溶液中的那些条件(例如,酶加载量、底物加载量、辅因子加载量、温度、pH、缓冲液、共溶剂等的范围),在这些条件下所选择的转氨酶能够将底物化合物转化为产物化合物(例如,将具有式(IV)的化合物,优选具有式(Iv-a)的化合物转化为具有式(III)的化合物,优选具有式(III-a)的化合物)。示例性的“合适的反应条件”在本披露中提供并通过实例说明。

[0129] “加载量”,例如“化合物加载量”或“酶加载量”或“辅因子加载量”是指反应开始时反应混合物中组分的浓度或量。

[0130] 在转氨酶催化的反应过程中,“底物”是指被酶作用的化合物或分子。例如,本文披露的方法中转氨酶的示例性底物是化合物(IV)。

[0131] 在转氨酶催化的反应过程中,“产物”是指由酶的作用产生的化合物或分子。例如,本文披露的方法中转氨酶的示例性产物是化合物(III)。

[0132] 在本发明的上下文中,转氨酶反应是对映选择性的,即产生的所需对映异构体超过不需要的对映异构体。在一些实施例中,所需对映异构体以至少70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的对映异构体过量(ee)形成。

[0133] 在本发明中,优选氨基受体以大于50%,或至少60%、70%、80%、90%、95%、99%特别是100%的转化率转化为所需的手性胺化合物。

[0134] 取代基定义

[0135] 烷基被定义为作为直链或支链的(一次或多次(如果需要且可能))碳链的基团或基团的一部分,并且尤其是 C_1 - C_7 -烷基、优选 C_1 - C_6 -烷基、更优选 C_1 - C_4 -烷基。

[0136] 术语“ C_1 - C_7 -”、“ C_1 - C_6 -”和“ C_1 - C_4 -”分别定义了分别具有高达且包括最大7个、尤其高达且包括最大6个和4个碳原子的部分,所述部分是支链的(一次或多次)或直链的并且通过末端或非末端碳结合。

[0137] 环烷基是例如 C_3 - C_7 -环烷基并且是例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基。优选环戊基和环己基。

[0138] 烷氧基是,例如, C_1 - C_7 -烷氧基以及是,例如,甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基并且还包括相应的戊氧基、己氧基、庚氧基基团。优选 C_1 - C_4 -烷氧基。

[0139] 烷酰基是,例如, C_2 - C_8 -烷酰基以及是,例如,乙酰基[-C(=O)Me]、丙酰基、丁酰基、异丁酰基或新戊酰基。优选 C_2 - C_5 -烷酰基,特别是乙酰基。

[0140] 卤素(halo)或卤素(halogen)优选地是氟、氯、溴或碘,最优选地是氯、溴或碘。

[0141] 卤代烷基是,例如,卤代- C_1 - C_7 -烷基并且特别是卤代- C_1 - C_4 -烷基,例如三氟甲基、

1,1,2-三氟-2-氯乙基或氯甲基。优选卤代-C₁-C₇-烷基是三氟甲基。

[0142] 烯基可以是含有双键并且包含优选2至12个碳原子(尤其优选的是2至10个碳原子)的直链或支链烷基。特别优选地是线性的C₂-C₇-烯基,更优选地是C₂-C₄-烯基。烷基的一些实例是乙基,以及丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、十八烷基和二十烷基的异构体,其中的每个都含有双键。特别优选的是烯丙基。

[0143] 亚烷基是衍生自C₁-C₇-烷基的二价基团并且尤其是C₂-C₇-亚烷基或C₂-C₇-亚烷基,并且任选地可以被一个或多个例如高达三个氧、NR₁₄(其中R₁₄是烷基)或硫打断,这些亚烷基各自可以是未取代的或被一个或多个独立地选自例如C₁-C₇-烷基、C₁-C₇-烷氧基-C₁-C₇-烷基或C₁-C₇-烷氧基的取代基取代。

[0144] 亚烯基是衍生自C₂-C₇-烯基的二价基团并且可以被一个或多个例如高达三个氧、NR₁₄(其中R₁₄是烷基)或硫打断,并且是未取代的或被一个或多个例如高达三个取代基(优选独立地选自上述用于亚烷基的取代基)取代。

[0145] 作为基团或基团一部分的芳基是例如C₆-₁₀-芳基,并且优选是单环或多环的、尤其是具有6至10个碳原子的单环、二环或三环芳基部分,如苯基、萘基或茚基优选苯基,并且其可以是未取代的或被一个或多个独立地选自例如C₁-C₇-烷基、C₁-C₇-烷氧基-C₁-C₇-烷基或C₁-C₇-烷氧基的取代基取代。

[0146] 术语芳基烷基是指芳基-C₁-C₇-烷基,其中芳基是如本文定义的并且例如是苄基。

[0147] 术语羧基是指-CO₂H。

[0148] 芳氧基是指芳基-O-,其中芳基是如以上定义的。

[0149] 未经取代的或经取代的杂环基是单环或多环的,优选单环、二环或三环的,最优选单环的、不饱和的、部分饱和的、饱和的或芳香族的环系统,该环系统具有优选3至14个(更优选5至14个)环原子并且具有一个或多个、优选一至四个独立地选自氮、氧、硫、S(=O)-或S-(=O)₂的杂原子,并且是未取代的或被一个或多个例如高达三个优选独立地选自自由以下组成的组的取代基取代:卤素、C₁-C₇-烷基、卤代-C₁-C₇-烷基、C₁-C₇-烷氧基、卤代-C₁-C₇-烷氧基(如三氟甲氧基)和C₁-C₇-烷氧基-C₁-C₇-烷氧基。当杂环基是芳香族的环系统时,其还被称为杂芳基。杂环基优选是咪唑基、吡唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、吡啶基、吡喃基、二氮烷基(diazionyl)、噁嗪基、噻嗪基、二噁英基、二噻英基(dithiinylyl)、氮杂环庚基、氧杂环庚基、硫杂环庚基、吡啶基、异吡啶基、喹啉基、异喹啉基、苯并氮杂卓基、咪唑基、咪唑烷基、吡唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基(isoxazolinidyl)、噻唑烷基、二氧戊环基、二硫戊环基、呋喃基、噁二唑基、噻二唑基、二噻唑基、四唑基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、氧代硫代吗啉基、二氧代硫代吗啉基、二噁烷基、二噻烷基、氮杂环庚基、氧杂环庚基、硫杂环庚基、或其苯并-稠合的变体。

[0150] 在杂环基烷基中,杂环基优选是如刚才所定义的并且附接到如对于烷基所定义的烷基上。实例是咪唑基甲基、吡啶基甲基或哌啶基甲基。

[0151] 乙酰基是-C(=O)C₁-C₇-烷基,优选-C(=O)Me。

[0152] 磺酰基是(未取代的或取代的)C₁-C₇-烷基磺酰基,如甲基磺酰基,(未取代的或取代的)苯基-或萘基-C₁-C₇-烷基磺酰基,如苯基甲烷磺酰基,或(未取代的或取代的)苯基-或萘基-磺酰基;其中如果存在多于一个取代基,例如一至三个取代基,则取代基独立地选自

氰基、卤素、卤代-C₁-C₇-烷基、卤代-C₁-C₇-烷基氧基-和C₁-C₇-烷基氧基。尤其优选的是C₁-C₇-烷基磺酰基,如甲基磺酰基,和(苯基-或萘基)-C₁-C₇-烷基磺酰基,如苯基甲烷磺酰基。

[0153] 次磺酰基是(未经取代的或经取代的)C₆₋₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基次磺酰基或(未经取代的或经取代的)C₆₋₁₀-芳基次磺酰基,其中如果存在多于一个取代基,例如一至四个取代基,则取代基独立地选自:硝基、卤素、卤代-C₁-C₇-烷基和C₁-C₇-烷基氧基。

[0154] 酰亚胺是指(未经取代的或经取代的)官能团,其由两个结合至氮的酰基基团组成,优选地衍生自二羧酸的环基团。特别优选的是衍生自琥珀酸的琥珀酰亚胺基或衍生自邻苯二甲酸的邻苯二甲酰亚胺基。酰亚胺基可以被一个或多个独立地选自例如C₁-C₇-烷基、C₁-C₇-烷基氧基-C₁-C₇-烷基、C₁-C₇-烷基氧基或卤素的取代基取代。

[0155] 叠氮化物是指基团-N=N⁺=N⁻。

[0156] 如本文所使用的甲硅烷基是指根据式-SiR₁₁R₁₂R₁₃的基团,其中R₁₁、R₁₂和R₁₃彼此独立地是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或苯基-C₁-C₄-烷基。R₁₁、R₁₂和R₁₃的优选实施例是甲基、乙基、异丙基、叔丁基、苯基或苯基-C₁₋₄-烷基。

[0157] 盐

[0158] 盐特别是药学上可接受的盐或通常是在本文提及的任何中间体的盐,除非因为技术人员容易理解的化学原因而被排除的盐。它们可以在存在成盐基团如碱性或酸性基团的情况下形成,它们至少部分可以在例如从4至10的pH范围内的水溶液中以解离的形式存在,或者可以特别以固体、特别是结晶形式被分离。

[0159] 优选与来自具有碱性氮原子(例如亚氨基或氨基)的本文提及的化合物或任一种中间体的有机或无机酸形成此类盐,例如作为酸加成盐,特别是药学上可接受的盐。适合的无机酸是例如氢卤酸,如盐酸、硫酸、或磷酸。合适的有机酸是例如羧酸、膦酸、磺酸或氨基磺酸(例如乙酸,丙酸,乳酸,富马酸,琥珀酸,柠檬酸,氨基酸如谷氨酸或天冬氨酸,马来酸,羟基马来酸,甲基马来酸,苯甲酸,甲磺酸或乙磺酸,乙烷-1,2-二磺酸,苯磺酸,2-萘磺酸,1,5-萘-二磺酸,N-环己基氨基磺酸,N-甲基-、N-乙基-或N-丙基-氨基磺酸)、或其他有机质子酸(如抗坏血酸)。

[0160] 在带负电荷的基团如羧基或磺酸基存在下,还可以与碱、或杂环碱(例如N-乙基-哌啶或N,N'-二甲基哌嗪)形成盐,例如金属盐或铵盐,如碱金属盐或碱土金属盐,例如钠盐、钾盐、镁盐或钙盐,或与氨或合适的有机胺(如叔单胺,例如三乙胺或三(2-羟乙基)胺)的铵盐。

[0161] 当同一分子中存在碱性基团和酸性基团时,本文提及的任一种中间体还可以形成内盐。

[0162] 对于本文提及的任一种中间体的分离或纯化目的,还有可能使用药学上不可接受的盐,例如苦味酸盐或高氯酸盐。

[0163] 鉴于在呈游离形式与呈它们的盐(包括例如在化合物或其盐的纯化或鉴定中可以被用作中间体的那些盐)的形式的化合物和中间体之间的密切关系,在适当和有利的情况下以及如果没有另外明确提及,对上文和下文中“化合物”、“起始材料”和“中间体”的任何提及应被理解为也是指其一种或多种盐或者相应的游离化合物、中间体或起始材料以及其一种或多种盐的混合物,其中各自旨在也包括这些中的任何一种或多种的任何溶剂化物或盐。不同晶型可以是可获得的并且然后也被包括。

[0164] 氮保护基团

[0165] 术语“氮保护基团”(例如本披露中的Ra)包括能够可逆地保护氮官能度的任何基团,优选胺和/或酰胺官能度。优选地,该氮保护基团是胺保护基团和/或酰胺保护基团。合适的氮保护基团是例如在肽化学中常规使用的并且例如在以下标准参考著作的相关章节中进行描述:如J.F.W.McOmie,“Protective Groups in Organic Chemistry[有机化学中的保护基团]”,Plenum出版社(Plenum Press),伦敦和纽约,1973;P.G.M.Wuts和T.W.Greene,“Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis[有机合成中的格林保护基团]”,第四版,威利出版社(Wiley),新泽西州,2007;和“The Peptides[肽]”;第3卷(编辑:E.Gross和J.Meienhofer),学术出版社(Academic Press),伦敦和纽约,1981;以及“Methoden der organischen Chemie”(Methods of Organic Chemistry[有机化学方法]),Houben Weyl,第四版,第15/I卷,格奥尔格蒂梅出版社(Georg Thieme Verlag),斯图加特(Stuttgart),1974。

[0166] 优选的氮保护基团通常包括:未取代的或取代的C₁-C₆-烷基、优选C₁-C₄-烷基、更优选C₁-C₂-烷基、最优选C₁-烷基,未取代的或取代的C₂₋₄-烯基,其中C₁-C₆-烷基和C₂₋₄-烯基各自任选地被三烷基甲硅烷基-C₁-C₇-烷氧基(例如三甲基甲硅烷基乙氧基)、环烷基、芳基(优选苯基)、或杂环基团(优选吡咯烷基)单取代、二取代或三取代,其中环烷基、芳环或杂环基团是未取代的或被一个或多个例如两个或三个残基取代,该残基例如选自由以下各项组成的组:C₁-C₇-烷基、羟基、C₁-C₇-烷氧基、C₂-C₈-烷酰基-氧基、卤素、硝基、氰基、和CF₃;芳基-C₁-C₂-烷氧基羰基(优选苯基-C₁-C₂-烷氧基羰基例如苄氧基羰基);C₁₋₁₀-烯氧基羰基;C₁₋₆-烷基羰基(例如乙酰基或新戊酰基);C₆₋₁₀-芳基羰基(例如苯甲酰基);C₁₋₆-烷氧基羰基(例如叔丁氧基羰基);C₆₋₁₀-芳基-C₁₋₆-烷氧基羰基;烯丙基或肉桂基;磺酰基或次磺酰基;琥珀酰亚胺基,经取代的甲硅烷基,例如三芳基甲硅烷基或三烷基甲硅烷基(例如三乙基甲硅烷基)。

[0167] 优选的氮保护基团的实例是乙酰基、苯甲酰基、苄基、苄基、二苯甲基、三苯甲基、苄氧基羰基(Cbz)、9-苄基甲基氧基羰基(Fmoc)、苄氧基甲基(BOM)、新戊酰基-氧基-甲基(POM)、三氯乙氧基羰基(Troc)、1-金刚烷基氧基羰基(Adoc)、烯丙基、烯丙基氧基羰基、三甲基甲硅烷基、叔丁基-二甲基甲硅烷基(TBDMS)、三乙基甲硅烷基(TES)、三异丙基甲硅烷基(TIPS)、三甲基甲硅烷基乙氧基甲基(SEM)、叔丁氧基羰基(Boc)、叔丁基、1-甲基-1,1-二甲基苄基、(苯基)甲基、吡啶基(pyrridinyl)以及新戊酰基。最优选的氮保护基团是乙酰基、苄基、苄氧基羰基(Cbz)、三乙基甲硅烷基(TES)、三甲基甲硅烷基乙氧基甲基(SEM)、叔丁氧基羰基(Boc)、吡咯烷基甲基以及新戊酰基。

[0168] 更优选的氮保护基团的实例是新戊酰基、吡咯烷基甲基、叔丁氧基羰基、苄基和甲硅烷基,特别是根据式SiR₁₁R₁₂R₁₃基团的甲硅烷基,其中R₁₁、R₁₂和R₁₃彼此独立地是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或苯基-C₁-C₄-烷基。R₁₁、R₁₂和R₁₃的优选实例是甲基、乙基、异丙基、叔丁基和苯基。

[0169] 最优选的氮保护基团的实例是叔丁氧基羰基(Boc)、苯甲酰基、苯乙烯基、1-丁烯基、苄基、对-甲氧基苄基(PMB)以及吡咯烷基甲基,特别是新戊酰基和叔丁氧基羰基(Boc)。

[0170] 在一个实施例中,术语氮保护基团是指选自由以下组成的组的基团:

[0171] C₁-C₆-烷基,其是未取代的或被三-C₁-C₆-烷基甲硅烷基C₁-C₇-烷氧基单取代、二取

代、或三取代;C₆-C₁₀-芳基;或杂环基团,其是具有5至14个环原子以及1至4个独立地选自N、O、S、S(O)或S(O)₂的杂原子的单环、二环或三环的环系统;其中该芳环或该杂环基团是未取代的或被一个、两个或三个残基取代,该残基选自由以下各项组成的组:C₁-C₇-烷基、羟基、C₁-C₇-烷氧基、C₂-C₈-烷酰基-氧基、卤素、硝基、氰基、和CF₃;

[0172] C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₂-烷氧基羰基;C₁-C₁₀-烯氧基羰基;C₁-C₆-烷基羰基;C₆-C₁₀-芳基羰基;C₁-C₆-烷氧基羰基;C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₆-烷氧基羰基;烯丙基;肉桂基;磺酰基;次磺酰基;琥珀酰亚胺基,以及甲硅烷基,其中各个甲硅烷基是SiR₁₁R₁₂R₁₃基团,其中R₁₁、R₁₂和R₁₃彼此独立地是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或苯基-C₁-C₄-烷基。

[0173] 通常,在本申请中,术语“氮保护基团”包括能够可逆地保护氨基官能度的任何基团。

[0174] 如果实施例要求去除如以上定义的氮保护基团,则通常可以通过使用已知的方法(例如如在以上引用的参考文献中描述的)来进行该去除。优选地,通过使用酸性或碱性条件去除如上文定义的氮保护基团。酸性条件的实例是盐酸、三氟乙酸、硫酸。碱性条件的实例是氢氧化锂、乙醇钠。可以使用亲核体如硼氢化钠。在N-苄基作为氨基保护基团的情况下,可以通过氢化或通过使用一些合适的氧化剂(例如硝酸铈铵(CAN)或2,3-二氯-5,6-二氰基-对-苯醌(DDQ))将该保护基团去除。

[0175] 羧基保护基团

[0176] 羧基保护基团(例如本公开中的R)可以是本领域已知的任何基团,尤其是C₁-C₆-烷基,例如乙基、甲基、烯丙基或叔丁基,或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₆-烷基,例如苄基或甲硅烷基SiR₁₁R₁₂R₁₃,其中R₁₁、R₁₂和R₁₃各自独立地是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或苯基-C₁-C₄-烷基。R₁₁、R₁₂和R₁₃的优选实施例是甲基、乙基、异丙基、叔丁基、苯基或苯基-C₁-C₄-烷基。羧基保护基团本身,它们的引入反应和它们的除去反应描述于例如以下中:标准参考文献例如J.F.W.McOmie,“Protective Groups in Organic Chemistry[有机化学中的保护基团]”,Plenum出版社(Plenum Press),伦敦和纽约1973,T.W.Greene,“Protective Groups in Organic Synthesis[有机合成中的保护基团]”,第三版,威利出版社(Wiley),纽约1999,“The Peptides[肽]”,第3卷(编辑:E.Gross和J.Meienhofer),学术出版社(Academic Press),伦敦和纽约1981,“Methoden der organischen Chemie”(Methods of organic chemistry)[有机化学方法],Houben Weyl,第4版,第15/I卷,格奥尔格蒂梅出版社(Georg Thieme Verlag),斯图加特(Stuttgart)1974,H.-D.Jakubke和H.Jescheit,“Aminosäuren,Peptide,Proteine”(Amino acids,peptides,proteins)[氨基酸,肽,蛋白质],Verlag Chemie,Weinheim,Deerfield Beach,和Basel 1982,以及Jochen Lehmann,“Chemie der Kohlenhydrate:Monosaccharide und Derivate”(Chemistry of carbohydrates:monosaccharides and derivatives)[碳水化合物的化学:单糖和衍生物],格奥尔格蒂梅出版社(Georg Thieme Verlag),斯图加特(Stuttgart)1974。

[0177] 例如,C₁-C₆-烷基例如乙基保护基团R*或Ra可以通过水解除去,例如,在碱(例如碱金属氢氧化物,例如氢氧化锂)存在下,在适当的溶剂(例如环状醚,如四氢呋喃)和水存在下,在0℃至50℃(例如10℃至30℃)的温度范围。

[0178] 通常,这意味着无论术语“保护基团”用于本说明书中的任何部分,只有在保护基团接下来被去除以遵循产物时,则它按照原样使用-如果该保护基团仍然存在,则该保护基

团将成为取代基。因此,烷基,例如乙基,如果被去除,则就是一个保护基团,如果保留下来,它就成为一个永久部分。

[0179] 在提及保护基团时,它们的特点是,与保留在分子中的基团相比,它们在接下来的反应步骤中被切割;所以烷基,例如乙基,作为保护基团,基于这个功能,区别于留在反应产物中的烷基,例如乙基。

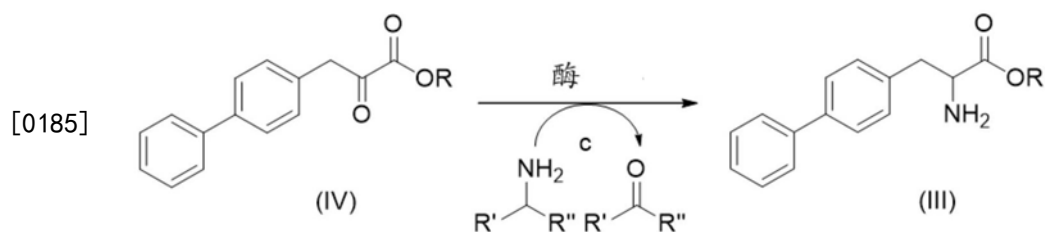
[0180] 实施例

[0181] 必要时,以下部分更详细地描述了如以上方案1至4陈列的或如在权利要求书中所描绘的单独的方法步骤。

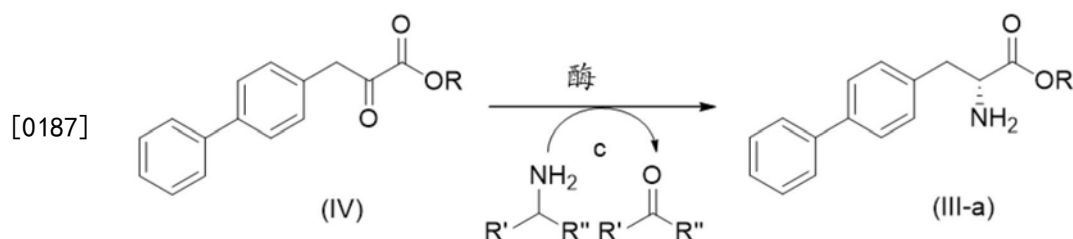
[0182] 根据方案1和方案1-a-步骤c的反应

[0183] 在本发明的第一方面,所有实施例必须总是分别包括方案1和方案1-a的方法步骤c:

[0184] 方案1-步骤c

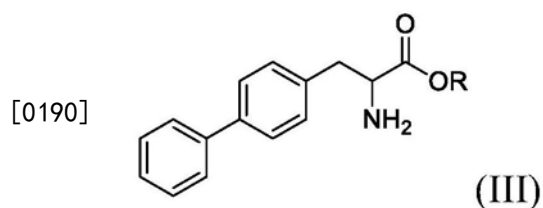


[0186] 方案1-a-步骤c

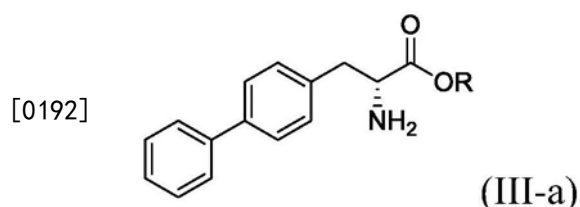


[0188] 其中在方案1和方案1-a中,R是氢或羧基保护基团。

[0189] 因此,在这方面,本发明涉及制备具有式 (III) 的化合物或其盐

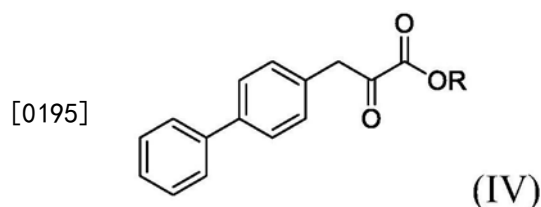


[0191] 优选具有式 (III-a) 的化合物或其盐的方法



[0193] 其中在两个式中R是氢或羧基保护基团,

[0194] 该方法包括将具有式 (IV) 的化合物或其盐,



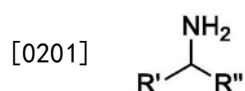
[0196] 其中R是氢或羧基保护基团，

[0197] 通过在胺供体存在下使其与(R)-选择性 ω -转氨酶接触而转化为具有式(III)的化合物，其中具有式(IV)的化合物向具有式(III)的化合物优选向具有式(III-a)的化合物的转化率大于50%。

[0198] 在一个实施例中，反应在辅酶存在下进行。

[0199] 在其一个实施例中，R是氢或C₁-C₆-烷基，例如乙基。特别地，R是氢。

[0200] 在一个实施例中，胺供体具有下式



[0202] 其中R'和R''中的每一个独立地被取代时是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基，其是未被取代的或被一个或多个酶促非抑制基团取代。R'可以与R''在结构或手性上相同或不同。在一些实施例中，R'和R''可一起形成环。

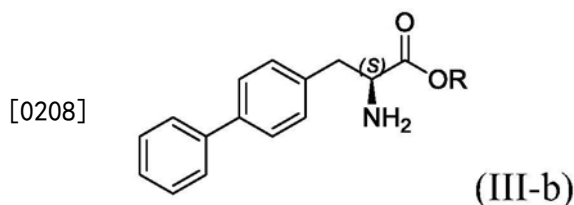
[0203] 在其一个实施例中，胺供体是非手性胺供体。特别地，非手性胺供体选自下组，该组由以下组成：非手性C₁-C₇-烷基胺、非手性C₃-C₈-环烷基胺、非手性C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基胺、非手性C₁-C₇-烷基二胺、非手性氨基-C₁-C₇-链烷酸和非手性C₆-C₁₀-芳基-二(C₁-C₇-烷基胺)。在具体实施例中，非手性胺供体是异丙胺(2-氨基丙烷)，其也可以替代地作为其合适的盐使用。

[0204] 在一个实施例中，使用的辅酶是吡哆醛-5'-磷酸。

[0205] 在一个实施例中，转氨反应在以下条件下产生：在(R)-选择性 ω -转氨酶(其选自ATA-013、ATA-015、ATA-016、ATA-025、ATA-032、ATA-033、ATA-036、ATA-301、ATA-303、ATA-412、ATA-415、ATA-417或ATA-436，从克迪科思公司，雷德伍德城，加利福尼亚州，美国商购)、胺供体(例如异丙胺(可替代地作为合适的盐使用)以及辅酶(优选吡哆醛5'-磷酸(PLP))的存在下，在合适的溶剂中(例如水性磷酸氢二钾缓冲液)，优选地在pH 7至10，例如在pH 8至9(可通过调节pH值来实现，例如通过添加异丙胺)，优选地在从20℃至60℃(例如在20℃至50℃)的温度范围。

[0206] 从具有式(IV)的化合物向具有式(III)的化合物优选向具有式(III-a)的化合物的转化率大于55%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、或至少约99%、或甚至100%。

[0207] 在一些实施例中，转氨酶能够以超过相应的具有式(III-b)的化合物的大于80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更高对映异构体过量将具有式(IV)的底物化合物(特别是化合物3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-氧代丙酸)分别转化为具有式(III)和(III-a)的产物化合物，特别是化合物(R)-3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-氨基丙酸



[0209] 其中R选自氢和羧基保护基团,例如,在合适的反应条件下,C₁-C₆-烷基,优选氢。

[0210] 在一个实施例中,转氨酶反应在选自ATA-013、ATA-015、ATA-016、ATA-025、ATA-032、ATA-033、ATA-036、ATA-301、ATA-303、ATA-412、ATA-415、ATA-417或ATA-436的(R)-选择性 ω -转氨酶的存在下发生并且实现从具有式(IV)的化合物向具有式(III)的化合物优选向具有式(III-a)的化合物的转化率大于90%并且以超过相应的具有式(III-b)的化合物的大于85%或更高的对映异构体过量产生具有式(III-a)的产物化合物,特别是化合物(R)-3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-氨基丙酸。

[0211] 在一些实施例中,在合适的反应条件下本披露中使用的转氨酶能够在对底物的存在具有增加的耐受性的情况下将化合物(IV)转化为化合物(III-a)。因此,在一些实施例中,转氨酶能够在底物加载浓度为至少约1g/L、约5g/L、约10g/L、约20g/L、约30g/L、约40g/L、约50g/L、约70g/L、约80g/L或更高的情况下分别将底物化合物(IV)转化为产物化合物(III-a)。这种底物加载仍然在约120小时或更短、约96小时或更短、约72小时或更短、约48小时或更短、约36小时或更短、或约24小时或更短、约18小时或更短、或甚至12小时或更短的反应时间内实现至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%或100%的转化百分比。

[0212] 可以相对于转氨酶的浓度或量、底物、辅因子、缓冲液、共溶剂、pH和/或包括温度和反应时间的条件来确定实现这种转化率的合适反应条件,如下文和实例中进一步描述。

[0213] 使用转氨酶的详细方法

[0214] 对于前述方法,优选使用能从克迪科思公司以参考号ATA-013、ATA-015、ATA-016、ATA-25、ATA-032、ATA-033、ATA-036、ATA-301、ATA-303、ATA-412、ATA-415、ATA-417和ATA-436(Codex®ATA筛选试剂盒的一部分或进一步遗传修饰的 ω -转氨酶变体,也来自克迪科思公司)获得的 ω -转氨酶。例如,这种遗传修饰的 ω -转氨酶描述在美国专利号9,889,380和8,293,507和9,133,445,EP专利号EP2401366和PCT申请W0 2010/099501中。

[0215] 在本文的实施例中和在实例中说明,可以在该方法中使用的各种范围的合适反应条件,包括但不限于氨基供体、pH、温度、缓冲液、溶剂系统、底物加载量、酶(转氨酶)加载量、辅因子加载量、压力和反应时间的范围。考虑到本文通过常规实验提供的指导,可以容易地优化用于实施要求保护的转氨酶方法的其它合适反应条件,所述常规实验包括但不限于在浓度,pH,温度、溶剂条件的实验反应条件下使转氨酶和底物化合物接触并且检测产物化合物。

[0216] 在本发明的一个实施例中,转氨酶使用异丙胺(在本文中也称为“IPM”)作为胺供体。合适的反应条件包括胺供体,特别是IPM,其以至少约0.1M至约3.0M,0.2M至约2.5M,约0.5M至约2M或约1M至约2M的浓度存在。在一些实施例中,氨基供体以约0.1M、0.2M、0.3M、0.4M、0.5M、0.6M、0.7M、0.8M、1.0M、1.5M、2.0M、2.5M或3.0M的浓度存在。可以使用更高浓度的胺供体例如IPM将平衡转向胺产物形成。

[0217] 合适的反应条件通常还包括辅因子。在一个实施例中，辅因子是吡哆醛-5'-磷酸。在一些实施例中，辅因子PLP天然存在于细胞提取物中并且不需要补充。在其他实施例中，合适的反应条件包括添加到酶反应混合物中的辅因子，例如，当使用部分纯化的或纯化的转氨酶时。合适的反应条件可包括存在辅因子优选PLP，其浓度为约0.1g/L至约10g/L、约0.2g/L至约5g/L、约0.5g/L至约2.5g/L。在一些实施例中，反应条件包括约0.1g/L或更低、0.2g/L或更低、0.5g/L或更低、1g/L或更低、2.5g/L或更低、5g/L或更低、或10g/L或更低的PLP浓度。在一些实施例中，辅因子可以在反应开始时添加和/或在反应过程中添加另外的辅因子。

[0218] 考虑到例如所需产物化合物的量，底物浓度对酶活性的影响，酶在反应条件下的稳定性，以及底物转化为产物的百分比，反应混合物中具有式(IV)的底物化合物的浓度可以变化。在一些实施例中，合适的反应条件包括至少约0.5g/L至约100g/L、1g/L至约90g/L、5g/L至约80g/L、约10至约70g/L、20g/L至约60g/L或约30g/L至约50g/L的底物化合物加载量。在一些实施例中，合适的反应条件包括至少约0.5g/L、至少约1g/L、至少约5g/L、至少约10g/L、至少约15g/L、至少约20g/L、至少约30g/L、至少约50g/L、至少约75g/L、或至少约80g/L的底物化合物负载量。

[0219] 合适的反应条件包括约0.01g/L至约50g/L；约0.05g/L至约50g/L；约0.1g/L至约40g/L；约1g/L至约40g/L；约2g/L至约40g/L；约5g/L至约40g/L；约5g/L至约30g/L；约0.1g/L至约10g/L；约0.5g/L至约10g/L；约1g/L至约10g/L；约0.1g/L至约5g/L；约0.5g/L至约5g/L；或约0.1g/L至约2g/L的转氨酶浓度。在一些实施例中，转氨酶浓度为约0.01g/L、0.05g/L、0.1g/L、0.2g/L、0.5g/L、1g/L、2g/L、5g/L、10g/L、15g/L、20g/L、25g/L、30g/L、35g/L、40g/L或50g/L。

[0220] 在转氨反应过程中，反应混合物的pH可能会发生变化。可以将反应混合物的pH维持在所需的pH或所需的pH范围内。这可以通过在反应过程之前和/或期间添加酸或碱来完成。可替代地，可以通过使用缓冲液来控制pH。在一些实施例中，合适的反应条件包括溶液pH，pH为约6至约12，pH为约7至约11，pH为约7至约9，pH为约8至约10，pH为约7至约9，或pH为约8至约9。在一些实施例中，反应条件包括约6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10.0、10.5、11、11.5或12的溶液pH。

[0221] 因此，在一些实施例中，反应条件包括缓冲液。保持所需pH范围的合适缓冲液是本领域已知的，并且包括例如但不限于，硼酸盐、碳酸盐、磷酸盐、三乙醇胺缓冲液等。在一些实施例中，缓冲液是硼酸盐。在该方法的一些实施例中，合适的反应条件包括磷酸盐缓冲液，其中磷酸盐浓度为约0.001M至约0.4M，0.01M至约0.2M，0.05M至约0.1M，或约0.05M至约0.1M。在一些实施例中，反应条件包括约0.01M、0.02M、0.03M、0.04M、0.05M、0.07M、0.08M、0.09M、0.1M、0.12M、0.14M、0.16M、0.18M、0.2M、0.3或0.4M的磷酸盐浓度。在一些实施例中，反应条件包括水作为合适的溶剂，不存在缓冲液。

[0222] 在转氨方法的实施例中，可以将合适的温度用于反应条件，例如，考虑在较高温度下反应速率的增加和反应时间期间酶的活性。因此，在一些实施例中，合适的反应条件包括约10℃至约70℃、约10℃至约65℃、约15℃至约60℃、约20℃至约60℃、约20℃至约55℃、约30℃至约55℃、或约40℃至约50℃的温度。在一些实施例中，合适的反应条件包括约10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃或70℃的温度。在一些实施

例中,酶促反应期间的温度可以在整个反应过程中保持在一定温度。在一些实施例中,酶促反应期间的温度可在反应过程中以一定温度谱调节。

[0223] 本披露的方法通常在溶剂中进行。合适的溶剂包括水、水性缓冲溶液、有机溶剂、聚合物溶剂和/或共溶剂系统,其通常包含水性溶剂、有机溶剂和/或聚合物溶剂。含水溶剂(水或水性共溶剂系统)可以是pH缓冲的或无缓冲的。在一些实施例中,转氨酶方法通常在水性共溶剂系统中进行,所述水性共溶剂系统包含有机溶剂(例如,乙醇、异丙醇(IPA)、二甲基亚砜(DMSO)、乙酸乙酯、乙酸丁酯、1-辛醇、庚烷、辛烷、甲基叔丁基醚(MTBE)、甲苯等),离子或极性溶剂(例如,1-乙基-4-甲基咪唑鎓四氟硼酸盐、1-丁基-3-甲基咪唑鎓四氟硼酸盐、1-丁基-3-甲基咪唑鎓六氟磷酸盐、甘油、聚乙二醇等)。在一些实施例中,共溶剂可以是极性溶剂,例如多元醇、二甲基亚砜、DMSO或低级醇。水性共溶剂系统的非水性共溶剂组分可与水性组分混溶,提供单一液相,或可与水性组分部分混溶或不混溶,提供两个液相。示例性的水性共溶剂系统可包含水和一种或多种选自有机溶剂、极性溶剂和多元醇溶剂的共溶剂。通常,选择水性共溶剂系统的共溶剂组分,使得它在反应条件下不会不利地使转氨酶失活。通过利用酶活性测定法(例如本文所述的酶活性测定法)在候选溶剂系统中用确定的目标底物测量特定转氨酶的酶活性,可以容易地鉴定合适的共溶剂系统。

[0224] 在该方法的一些实施例中,合适的反应条件包括水性共溶剂,其中共溶剂包含多元醇溶剂,特别是二醇。合适的多元醇溶剂的实例包括,例如但不限于,聚乙二醇、聚乙二醇甲醚、二乙二醇二甲醚、三乙二醇二甲醚和聚丙二醇。在一些实施例中,水性共溶剂包含聚乙二醇,其可以不同的分子量获得。特别有用的是较低分子量的二醇,例如PEG200至PEG600。因此,在一些实施例中,水性共溶剂包含约1%至约40%v/v;约1%至约40%v/v;约2%至约40%v/v;约5%至约40%v/v;2%至约30%v/v;5%至约30%v/v;1至约20%v/v;约2%至约20%v/v;约5%至约20%v/v;约1%至约10%v/v;约2%至约10%v/v的PEG200。在一些实施例中,合适的反应条件包括含有约1%、2%、5%、10%、15%、20%;25%;30%;35%;35%或约40%v/v的PEG200的水性共溶剂。优选不使用共溶剂。

[0225] 在该方法的一些实施例中,合适的反应条件包括水性共溶剂,其中共溶剂包含约1%至约80%(v/v)、约1至约70%(v/v)、约2%至约60%(v/v)、约5%至约40%(v/v)、10%至约40%(v/v)、10%至约30%(v/v)、或约10%至约20%(v/v)的DMSO。在该方法的一些实施例中,合适的反应条件包括含有至少约1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、或80%(v/v)的DMSO的水性共溶剂。

[0226] 在一些实施例中,反应混合物还可含有表面活性剂。

[0227] 在转氨反应中使用的反应物的量通常根据所需产物的量而变化,并伴随使用的转氨酶底物的量而变化。本领域普通技术人员将容易理解如何改变这些量以使它们适应所需的生产率水平和生产规模。

[0228] 在一些实施例中,反应物的添加顺序并不重要。反应物可以同时添加到溶剂(例如,单相溶剂,双相水性共溶剂系统等)中,或者可替代地,一些反应物可以单独添加,并且一些反应物可以在不同的时间点一起添加。例如,可以首先将辅因子、转氨酶和转氨酶底物加入溶剂中。

[0229] 固体反应物(例如,酶、盐等)可以各种不同的形式提供给反应,包括粉末(例如,冻干的、喷雾干燥的等)、溶液、乳液、悬浮液等。可以使用本领域普通技术人员已知的方法和

设备容易地冻干或喷雾干燥反应物。例如,可以将蛋白质溶液以小等分试样在-80℃冷冻,然后添加到预冷冻干室中,然后施加真空。

[0230] 为了在使用水性共溶剂系统时提高混合效率,可以首先添加转氨酶和辅因子并将其混合到水相中。然后可以添加有机相并混合,然后添加转氨酶底物。或者,转氨酶底物可以在加入水相之前在有机相中预混合。

[0231] 通常允许转氨反应进行直至酮底物向胺产物的进一步转化不随反应时间显著变化,例如,正在被转化的底物少于10%,或正在被转化的底物少于5%。在一些实施例中,使反应进行直至底物酮完全或接近完全转化为产物胺。可以使用已知方法通过检测底物和/或产物来监测底物向产物的转化。合适的方法包括气相色谱,HPLC等。在反应混合物中产生的手性胺产物的转化率通常大于约50%,也可以大于约60%,也可以大于约70%,也可以大于约80%,也可以大于90%,并且通常大于约97%。

[0232] 通常,在合适的反应条件下,转氨反应将进行约120小时或更短,约96小时或更短,约72小时或更短,约48小时或更短,约36小时或更短,约24小时或更短,约18小时或更短,或约12小时或更短的反应时间。

[0233] 在一些实施例中,在合适的反应条件下使用转氨酶制备具有式(III)的化合物和具有(III-a)的化合物的方法分别在约48小时或更短,约36小时或更短,约24小时或更短,约18小时或更短,或甚至更短的时间内使得至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的酮底物(例如,具有式(IV)的化合物)分别转化为胺产物化合物(例如具有式(III)的化合物和具有(III-a)的化合物)。

[0234] 在另一个实施例中,合适的反应条件包括向反应溶液中加载的初始底物,然后使其与转氨酶接触。该反应溶液进一步补充有额外的化合物底物,随时间以至少约1g/L/h,至少约2g/L/h,至少约4g/L/h、至少约6g/L/h或更高的速率连续添加。因此,根据这些合适的反应条件,将转氨酶加入到具有至少约20g/L、30g/L或40g/L的初始底物加载量的溶液中。然后添加转氨酶,然后以约2g/L/h、4g/L/h或6g/L/h的速率向溶液中连续添加另外的底物,直至达到至少约30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、100g/L、150g/L、200g/L或更高的最终底物加载量。因此,在该方法的一些实施例中,合适的反应条件包括将转氨酶添加至具有至少约20g/L、30g/L或40g/L的初始底物加载量的溶液中,然后以约2g/L/h、4g/L/h或6g/L/h的速率向溶液中添加另外的底物直至达到30g/L、40g/L、50g/L、60g/L、70g/L、100g/L或更高的最终底物加载量。该底物补充反应条件允许实现更高的底物加载量,同时保持酮底物向胺产物的至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的高转化率。在该方法的一些实施例中,添加的另外的底物是在包含异丙胺或乙酸异丙胺的溶液中,浓度为至少约0.5M、至少约1.0M、至少约2.5M、至少约5.0M、至少约7.5M、至少约10.0M。

[0235] 在该方法的一些实施例中,转氨反应可包括以下合适的反应条件:(a)底物加载量约5g/L至100g/L;(b)约0.1g/L至50g/L的转氨酶;(c)约0.1M至4M的异丙胺(IPM);(d)约0.1g/L至10g/L的磷酸吡哆醛(PLP)辅因子;(e)pH值约6至10;和(f)温度约30至60℃。

[0236] 在该方法的一些实施例中,转氨反应可包括以下合适的反应条件:(a)底物加载量约10g/L至约80g/L;(b)约0.5g/L至25g/L的转氨酶;(c)约0.1M至2M的异丙胺(IPM);(d)约0.1g/L至1g/L的磷酸吡哆醛(PLP)辅因子;(e)pH值约8至10;(f)温度约40至55℃,和(g)反应时间18小时至36小时。

[0237] 在该方法的一些实施例中,转氨反应可包括以下合适的反应条件:(a)底物加载量约25g/L至约80g/L;(b)约0.5g/L至10g/L的转氨酶;(c)约0.1M至2M的异丙胺(IPM);(d)约0.1g/L至1g/L的磷酸吡哆醛(PLP)辅因子;(e)约0.005M至约0.1M的硼酸盐(或相当的)缓冲液;(f)pH值约8至10;和(g)温度约40℃至55℃。

[0238] 在一些实施例中,进行另外的反应组分或另外的技术以补充反应条件。这些可以包括采取措施来稳定或防止酶的失活,减少产物抑制,或将反应平衡转变为产物形成。

[0239] 因此,在制备胺(例如手性胺)的方法的一些实施例中,可以加入额外量的氨基受体(直至饱和)和/或可以从反应混合物中连续除去形成的氨基受体(酮)。例如,可以使用溶剂桥或两相共溶剂系统将胺产物移动到萃取溶液中,从而减少胺产物的抑制并且也将平衡转向产物形成(参见例如Yun和Kim,Biosci.Biotechnol.Biochem.[生物科学、生物技术、生物化学]2008,72,3030-3033)。

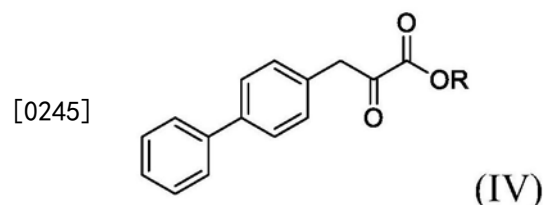
[0240] 在一些实施例中,当氨基供体的选择产生具有高于水的蒸气压的羰基副产物(例如,低沸点副产物,例如挥发性有机羰基化合物)时,羰基副产物可以通过用非反应性气体喷射反应溶液或通过施加真空以降低反应压力并除去气相中存在的羰基副产物来除去。非反应性气体是不与反应组分反应的任何气体。各种非反应性气体包括氮气和稀有气体(例如惰性气体)。在一些实施例中,非反应性气体是氮气。在一些实施例中,该方法中使用的氨基供体是异丙胺(IPM),其在氨基转移至氨基受体后形成羰基副产物丙酮。可以通过用氮气喷射或对反应溶液施加真空并通过丙酮阱(例如冷凝器或其他冷阱)从气相中除去丙酮来除去丙酮。

[0241] 在除去羰基副产物的上述方法的一些实施例中,可以在转氨反应期间添加相应的氨基供体以补充氨基供体和/或维持反应的pH。补充氨基供体也使平衡向产物形成移动,从而增加底物向产物的转化。因此,在其中氨基供体是异丙胺并且原位除去丙酮产物的一些实施例中,可以向溶液中添加异丙胺以补充在除去丙酮期间损失的氨基供体。

[0242] 在进一步的实施例中,任何上述用于将底物化合物转化为产物化合物的方法可以进一步包括选自以下的一个或多个步骤:产物化合物的萃取;分离;纯化;和结晶。从由上述公开的方法产生的生物催化反应混合物中萃取、分离、纯化和/或结晶产物胺的方法、技术和方案是普通技术人员已知的和/或通过常规实验获得的。

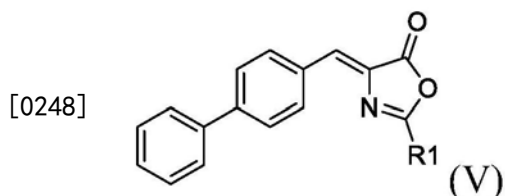
[0243] 根据方案1和方案1-a-步骤a和b的反应

[0244] 在本发明的第一方面,分别在方案1和方案1-a的强制性方法步骤c之前是反应步骤b和a。因此,在另一个实施例中,转氨酶反应的起始原料,即具有式(IV)的化合物或其盐,



[0246] 其中R是氢或羧基保护基团,

[0247] 是通过包括以下的方法获得:在酸性或碱性条件下水解具有式(V)的化合物,

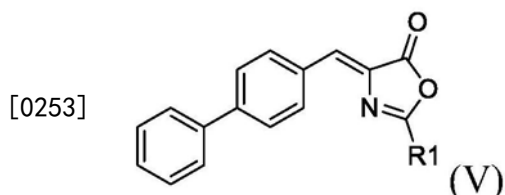


[0249] 其中R1是任选地取代的C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基,以得到其中R为氢的具有式(IV)的化合物,和任选地引入羧基保护基团R。然后在所述方法步骤之后进行上述转氨酶反应,分别得到具有式(III)的化合物和具有式(III-a)的化合物。

[0250] 在其一个实施例中,R1是甲基、苄基或苯基。

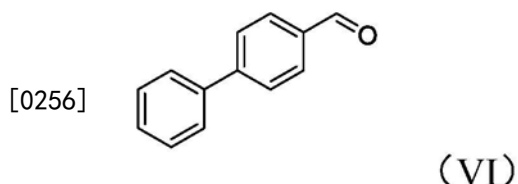
[0251] 适当的反应条件在本领域中是众所周知的。该反应优选在以下条件中进行:在水性无机酸(例如,氢卤酸,如盐酸,或硫酸)存在下,在适当的溶剂或溶剂混合物(例如,羧酸,如乙酸和/或水)中,在50℃至反应混合物的回流温度范围内的优选温度(例如从70℃到100℃)下,或在水性无机碱(例如,碱金属氢氧化物,如氢氧化钠)存在下,在适当的溶剂或溶剂混合物(例如水)中,在50℃至反应混合物的回流温度范围内的优选温度(例如从70℃到100℃)下。

[0252] 在本发明的进一步实施例中,

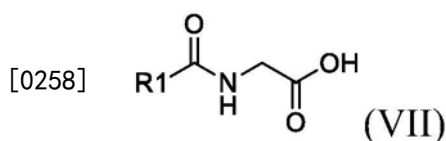


[0254] 其中R1是任选地取代的C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基,

[0255] 可以通过包括以下的方法获得:使具有式(VI)的化合物



[0257] 与具有式(VII)的化合物或其盐反应



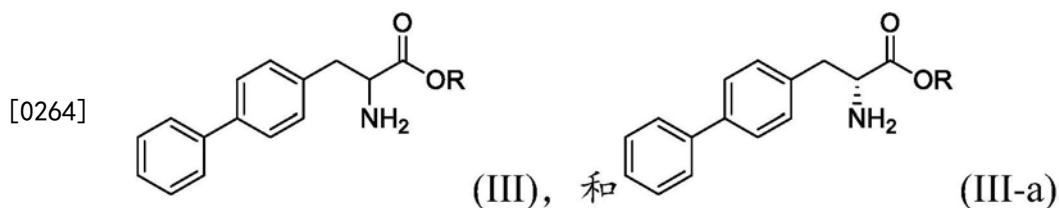
[0259] 其中R1是任选地取代的C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基。

[0260] 适当的反应条件是本领域公知的(例如厄伦美厄(Erlenmeyer)二内酯合成)。该反应优选在以下条件中进行:在活化剂(如乙酸酐)存在下,任选地在合适的溶剂(例如甲苯或醚,如四氢呋喃)中,和无机碱(例如碱金属乙酸盐,如乙酸钠),在50℃至反应混合物的回流温度范围内的优选温度(例如从70℃到100℃)下。

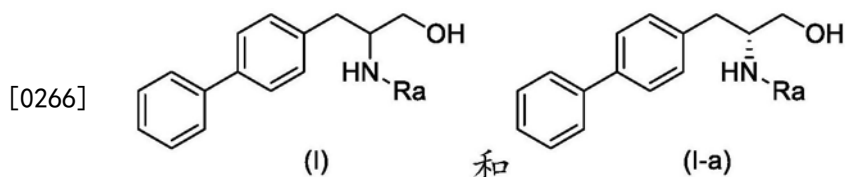
[0261] 制备具有式(IV)的化合物的替代方法描述于US4721726、US4447644、Tetrahedron [四面体]2012,68,3708-3716,Org.Biomol.Chem.[有机生物分子学与化学]2004,2,1864-1871、或WO 2011/035569(步骤a)。

[0262] 根据方案2和方案2-a, 方案2*和方案2*-a以及方案2**和方案2**-a的反应:

[0263] 在本发明的第一方面中, 分别由转氨酶反应得到的为具有式 (III) 的化合物和具有 (III-a) 的化合物,

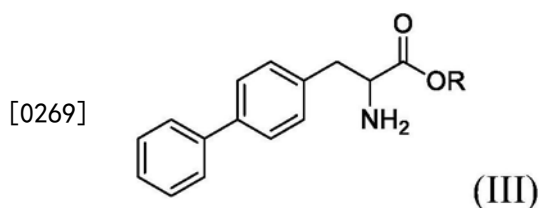


[0265] 其中R是氢或羧基保护基团, 然后通过如方案2和方案2-a, 方案2*和方案2*-a以及方案2**和方案2**-a中任一项所示的反应顺序在后续步骤中分别转化为具有式 (I) 的化合物和具有 (I-a) 的化合物或其盐

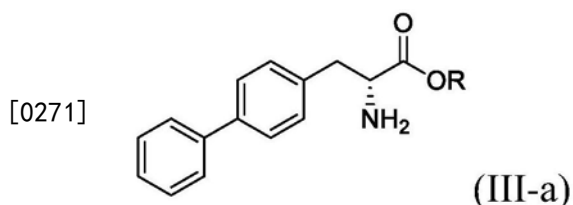


[0267] 其中Ra是氮保护基团。

[0268] 在其第一实施例中, 根据方案2和方案2-a, 步骤d, 获得的具有式 (III) 的化合物或其盐

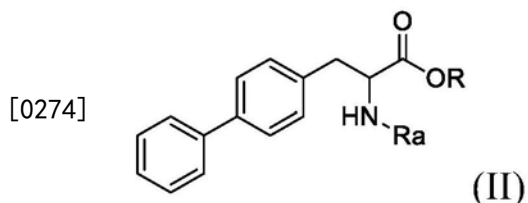


[0270] 优选具有式 (III-a) 的化合物或其盐

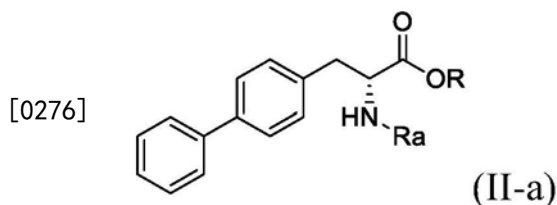


[0272] 其中在两个式中R是氢或羧基保护基团,

[0273] 通过包括引入氮保护基团Ra的方法被转化为具有式 (II) 的化合物或其盐



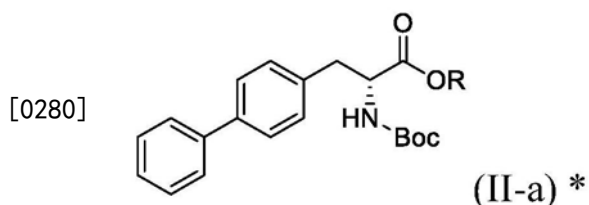
[0275] 优选具有式 (II-a) 的化合物或其盐



[0277] 其中在两个式中R是氢或羧基保护基团,并且Ra是氮保护基团。

[0278] 在其一个实施例中,R是氢。

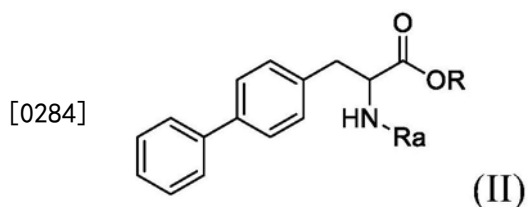
[0279] 在一个实施例中,具有式 (II-a) 的化合物是具有式 (II-a)*的化合物



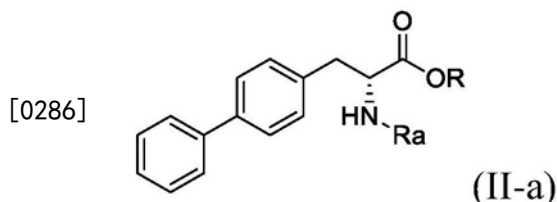
[0281] 其中R是氢或羧基保护基团,优选氢,它是通过具有式 (III-a) 的化合物与二-叔丁基二碳酸酯反应得到。

[0282] 在其一个实施例中,反应可以在常规条件下进行,并使用本领域已知的引入氨基保护基团 (例如酸酐,比如为了引入优选的叔丁氧基羰基 (Boc)) 的试剂,优选地,该反应使用二-叔丁基二碳酸酯 (Boc酸酐) 作为试剂并且在以下条件中进行:在碱 (如无机碱例如碱金属氢氧化物,如氢氧化钠) 的存在下,在适当的溶剂或溶剂混合物 (例如有机溶剂如四氢呋喃和水的混合物) 中,例如在环境温度下,例如20℃至40℃;或者用有机碱 (例如三乙胺),在适当的溶剂或溶剂混合物 (例如醇,例如甲醇,醚,例如四氢呋喃或1,4-二噁烷,或二氯甲烷) 中,在例如从-20℃至反应混合物的回流温度范围内的温度下,例如从0℃到30℃。

[0283] 在其进一步的实施例中,根据方案2和方案2-a,步骤e,现在获得的具有式 (II) 的化合物或其盐

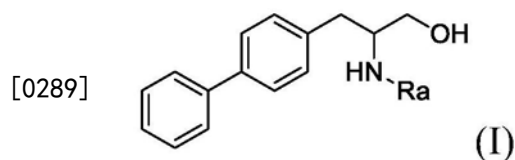


[0285] 优选具有式 (II-a) 的化合物或其盐

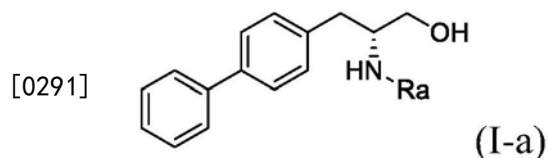


[0287] 其中在两个式中R是氢或羧基保护基团,并且Ra是氮保护基团,

[0288] 通过包括在还原剂存在下还原具有式 (II) 的化合物的方法被转化为具有式 (I) 的化合物或其盐



[0290] 优选具有式 (I-a) 的化合物或其盐

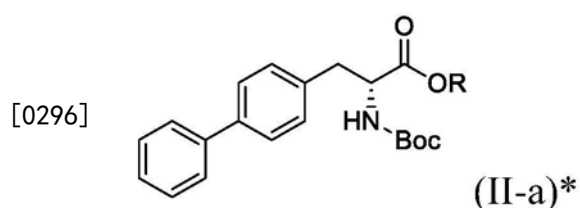


[0292] 其中在两个式中Ra是氮保护基团。

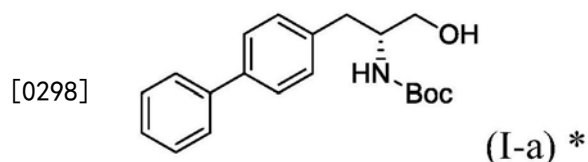
[0293] 在一个实施例中,当分别在具有式 (II) 的化合物和具有 (II-a) 的化合物中R是氢时,即反应是游离羧基的还原时,在有机碱(例如胺碱,例如N-甲基吗啉)存在下使用活化剂(例如酰氯,例如新戊酰氯或氯甲酸酯,例如氯甲酸异丁酯),然后使用络合氢化物,例如碱金属硼氢化物,例如硼氢化钠,或碱金属氢化铝,如氢化铝锂。反应优选在常规溶剂或溶剂混合物(例如,醚,如四氢呋喃,或醚如四氢呋喃和水的混合物)中,在适当的温度下(例如在-40℃至40℃的范围内,例如,从-20℃到25℃)进行。可替代地,二异丁基氢化铝、硼烷,Red-Al(双(2-甲氧基乙氧基)-氢化铝钠)或四氢硼酸钠与碘的组合可以在合适的溶剂(例如醚,例如四氢呋喃)中在低温下(例如,在-100℃至0℃的范围内,例如,在-78℃)使用。

[0294] 在可替代的实施例中,当分别在具有式 (II) 的化合物和具有式 (II-a) 的化合物中R是羧基保护基团时,即反应是酯化羧基的还原时,使用络合氢化物,例如碱金属硼氢化物,例如硼氢化钠,硼氢化锂,硼氢化钾,或碱金属氢化铝,如氢化铝锂,或硼烷或硼烷络合物,或烷基铝氢化物,如DIBAL。反应优选在常规溶剂或溶剂混合物(例如,醚,如四氢呋喃,或醚如四氢呋喃和醇如甲醇的混合物)中,任选地在添加剂(例如碱金属卤化物,例如氯化锂)存在下,在适当的温度下(例如在-20℃至40℃的范围内,例如,从0℃到25℃)进行。在R是烷基或芳基的情况下,还可以通过在适当的金属催化剂如Pd/C存在下氢化来实现还原。

[0295] 在优选的实施例中,具有式 (II-a)*的化合物

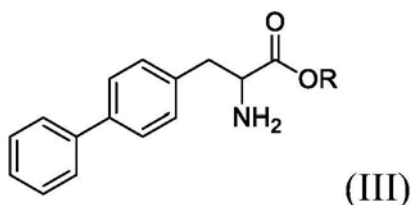


[0297] 其中R是氢,通过在N-甲基吗啉存在下与氯甲酸异丁酯反应活化,然后用硼氢化钠还原,得到具有式 (I-a)*的化合物



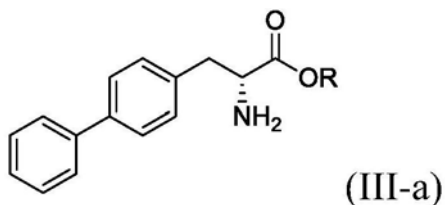
[0299] 在其第二实施例中,根据方案2*和方案2*-a,步骤d,获得的具有式 (III) 的化合物或其盐

[0300]



[0301] 优选具有式 (III-a) 的化合物或其盐

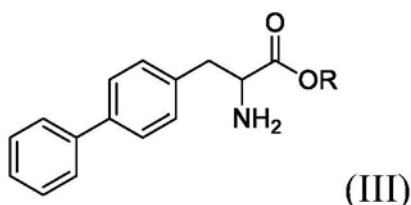
[0302]



[0303] 其中在两个式中R是氢，

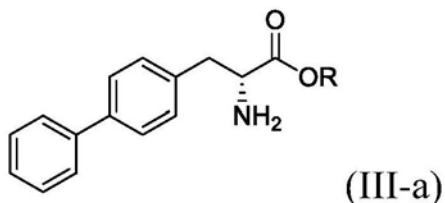
[0304] 首先通过包括与醇R-OH反应的方法(其中R是任选地取代的C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基(酯化反应))被转化为具有式(III)的化合物或其盐

[0305]



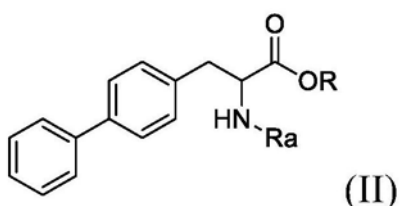
[0306] 优选具有式 (III-a) 的化合物或其盐

[0307]

[0308] 其中在两个式中R是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基，

[0309] 然后将其通过包括引入氮保护基团Ra的方法转化为具有式(II)的化合物或其盐

[0310]



[0311] 优选具有式 (II-a) 的化合物或其盐

[0312]

[0313] 其中在两个式中R是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基，并且Ra是氮保护基团。

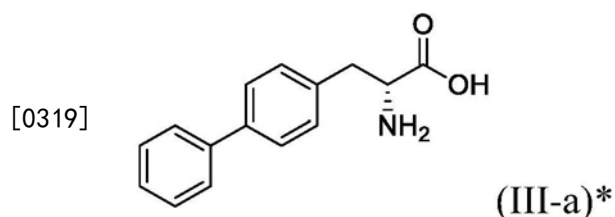
[0314] 在一个实施例中，酯化反应使用甲醇，因此R是甲基。

[0315] 在另一个实施例中,氮保护基团是叔丁氧基羰基(Boc)基团,因此,第二反应步骤使用二叔丁基二碳酸酯。

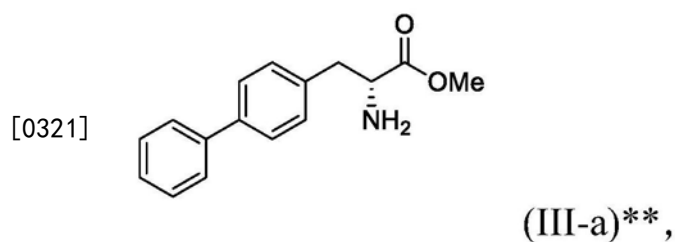
[0316] 在一个实施例中,酯化反应可以在常规条件下进行,所述常规条件使用所需的醇R-OH(其中R是任选地取代的C₁-C₇-烷基,C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基,优选未取代的C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基,优选C₁-C₇-烷基,例如甲基、乙基、苄乙基或苄基,更优选甲基),存在活化剂,例如在进行实际的酯化反应之前将游离羧酸转化为酰卤或酸酐的试剂。用于形成酰卤的合适试剂例如选自亚硫酰氯、亚硫酰溴、PCl₃、PCl₅、草酰氯、Me₂C=C(Cl)NMe₂、PhCOCl、PBr₃、PBr₅、Ph₃PBr₂、草酰溴或Me₂C=C(Br)NMe₂。反应优选在常规溶剂中进行,例如如上定义的相应的醇R-OH,优选甲醇或乙醇,并且在适当的温度下,例如在0至100℃的范围内,例如,从10℃到90℃。

[0317] 在另一个实施例中,第二步,即分别将氮保护基团引入具有式(III)的化合物和具有式(III-a)的化合物中(其中R是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基)可以如上所述进行:反应可以在常规条件下进行,并使用本领域已知的引入氨基保护基团(例如酸酐,比如为了引入优选的叔丁氧基羰基(Boc))的试剂,优选地,该反应使用二-叔丁基二碳酸酯(Boc酸酐)作为试剂并且在以下条件中进行:在碱(如无机碱例如碱金属氢氧化物,如氢氧化钠)的存在下,在适当的溶剂或溶剂混合物(例如有机溶剂如四氢呋喃或四氢呋喃和水的混合物)中,例如在环境温度下,例如20℃至40℃;或者用有机碱(例如三乙胺),在适当的溶剂或溶剂混合物(例如甲苯、醇,例如甲醇、醚,例如四氢呋喃或1,4-二噁烷,或二氯甲烷)中,在例如从-20℃至反应混合物的回流温度范围内的温度下,例如从0℃到30℃。

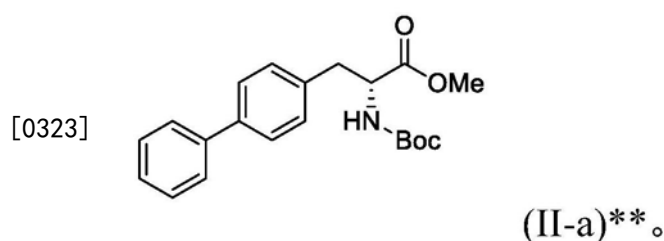
[0318] 在其优选的实施例中,获得的化合物具有式(III-a)*或其盐



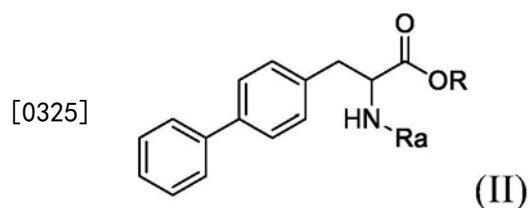
[0320] 首先通过包括与甲醇反应的方法将其转化为具有式(III-a)**化合物或其盐



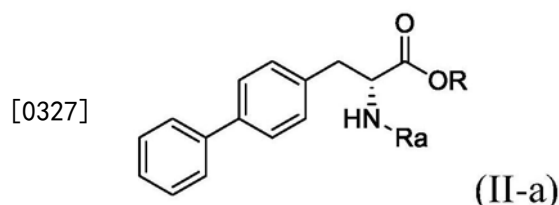
[0322] 并且然后通过具有式(III-a)**化合物与二-叔丁基二碳酸酯反应转化为具有式(II-a)**的化合物或其盐



[0324] 在其进一步的实施例中,根据方案2*和方案2*-a,步骤e,现在获得的具有式(II)的化合物或其盐

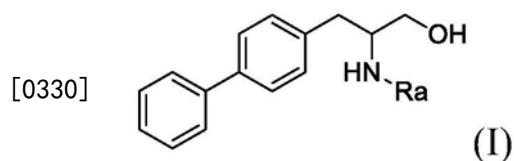


[0326] 优选具有式(II-a)的化合物或其盐

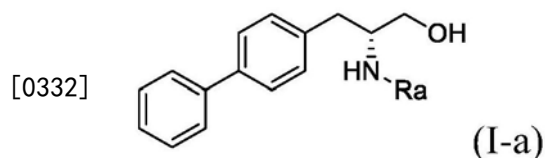


[0328] 其中在两个式中R是任选地取代的C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基,优选未取代的C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基,并且Ra是氮保护基团,

[0329] 通过包括在还原剂存在下分别还原具有式(II)的化合物和具有式(II-a)的化合物的方法被转化为具有式(I)的化合物或其盐



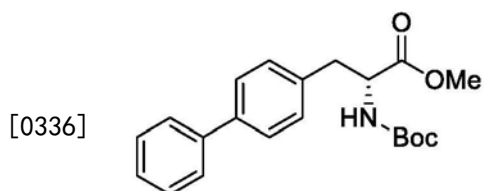
[0331] 优选具有式(I-a)的化合物或其盐



[0333] 其中在两个式中Ra是氮保护基团。

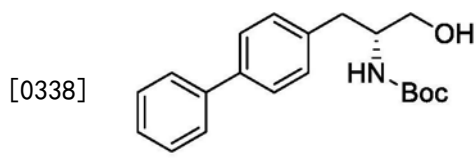
[0334] 在其一个实施例中,酯化的羧基的还原是使用络合氢化物进行的,例如碱金属硼氢化物,例如硼氢化钠,硼氢化锂,硼氢化钾,或碱金属氢化铝,如氢化铝锂,或硼烷或硼烷络合物,或烷基铝氢化物,如DIBAL。反应优选在常规溶剂或溶剂混合物(例如,醚,如四氢呋喃或甲基-四氢呋喃,或醚如四氢呋喃和醇如乙醇的混合物)中,任选地在添加剂(例如碱金属卤化物,例如氯化锂)存在下,在适当的温度下(例如在-20℃至40℃的范围内,例如,从0℃到25℃)进行。可替代地,还可以通过在适当的金属催化剂如Pd/C存在下氢化来实现还原。

[0335] 在优选的实施例中,具有式(II-a)**化合物



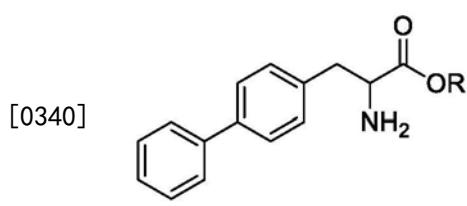
(II-a)**

[0337] 通过使用硼氢化钠进行还原来获得具有式 (I-a)* 的化合物



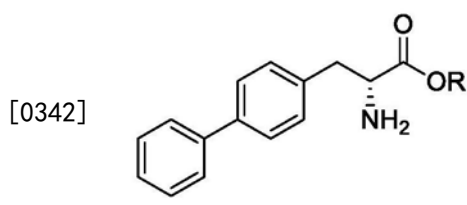
(I-a)*

[0339] 在其第三实施例中, 根据方案2**和方案2**-a, 步骤e*, 获得的具有式 (III) 的化合物或其盐



(III)

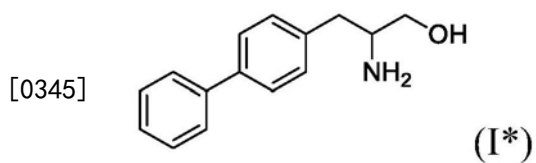
[0341] 优选具有式 (III-a) 的化合物或其盐



(III-a)

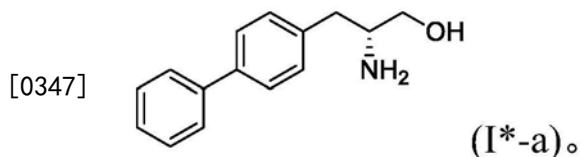
[0343] 其中在两个式中R是氢或羧基保护基团,

[0344] 通过包括在还原剂存在下还原具有式 (III) 的化合物的方法被转化为具有式 (I*) 的化合物或其盐



(I*)

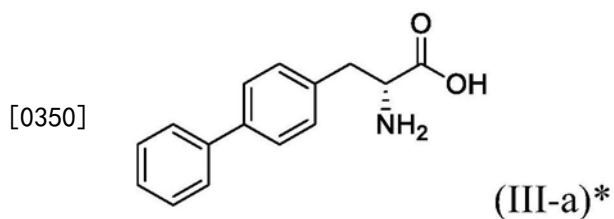
[0346] 优选具有式 (I*-a) 的化合物或其盐



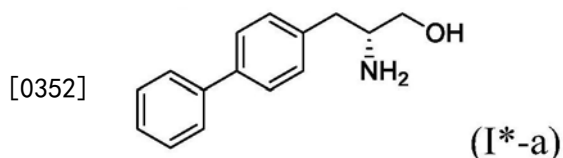
(I*-a)。

[0348] 在一个实施例中, 如上所述针对根据方案2和方案2-a, 步骤e的还原反应进行还原。

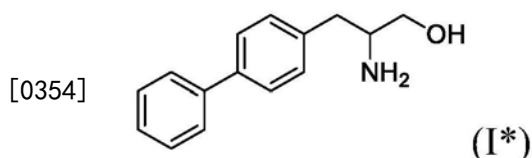
[0349] 在其优选实施例中, 具有式 (III-a)* 化合物



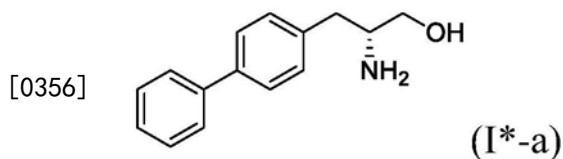
[0351] 通过在N-甲基吗啉存在下与氯甲酸异丁酯反应活化,然后用硼氢化钠还原,以得到具有式 (I*-a) 的化合物



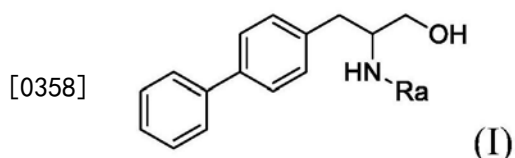
[0353] 在其进一步的实施例中,根据方案2**和方案2**-a,步骤d*,现在获得的具有式 (I*) 的化合物或其盐



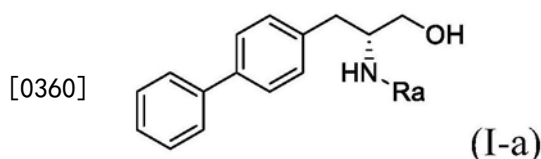
[0355] 优选具有式 (I*-a) 的化合物或其盐



[0357] 通过包括引入氮保护基团Ra的方法被转化为具有式 (I) 的化合物或其盐

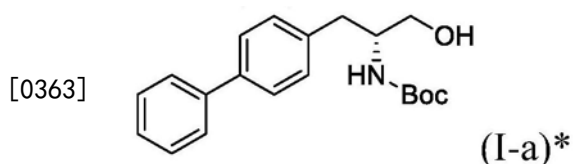


[0359] 优选具有式 (I-a) 的化合物或其盐



[0361] 其中在两个式中Ra是氮保护基团。

[0362] 在一个实施例中,具有式 (I-a) 的化合物是具有式 (I-a)* 的化合物

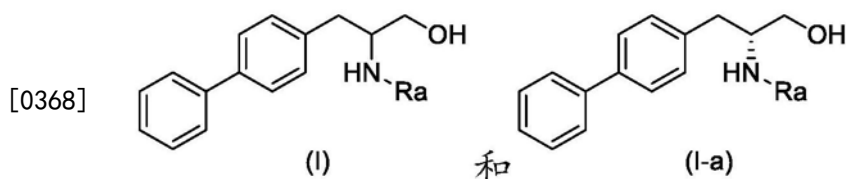


[0364] 其是通过具有式 (I*-a) 的化合物与二-叔丁基二碳酸酯反应得到。

[0365] 在一个实施例中,如上所述针对该反应根据方案2和方案2-a,步骤d进行氮保护基团Ra的引入。

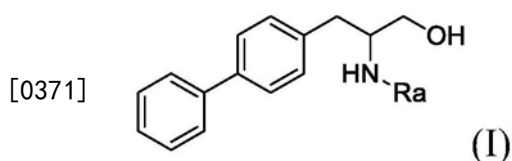
[0366] 根据方案3和方案3-a的反应:

[0367] 在本发明的第一方面中,分别由转氨酶反应和方案2和方案2-a,方案2*和方案2*-a以及方案2**和方案2**-a所示的反应步骤得到的具有式(I)的化合物和具有式(I-a)的化合物

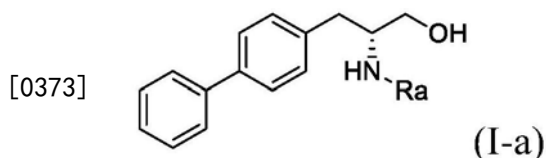


[0369] 其中Ra是氮保护基团,然后分别可以转化为具有式(VII)的化合物和具有式(VII-a)的化合物或其盐,然后通过方案3和方案3-a中所示的反应顺序进一步转化为NEP抑制剂前药沙卡布曲。

[0370] 因此,在其一个实施例中,获得的具有式(I)的化合物或其盐,

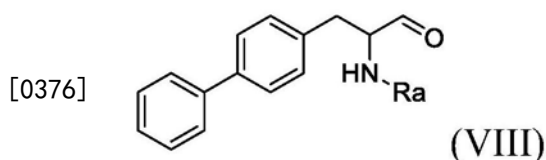


[0372] 优选具有式(I-a)的化合物或其盐

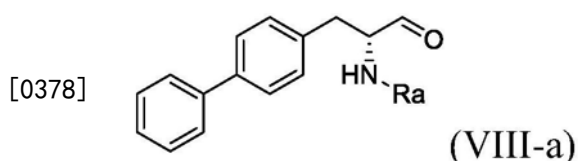


[0374] 其中在两个式中Ra是氮保护基团,

[0375] 通过包括TEMPO介导的氧化反应或用戴斯-马丁过碘烷氧化的方法反应,以获得具有式(VIII)的化合物或其盐,



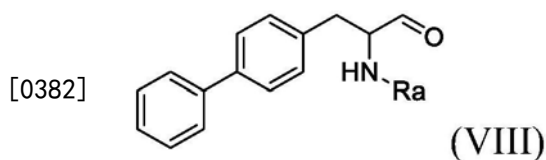
[0377] 优选具有式(VIII-a)的化合物或其盐



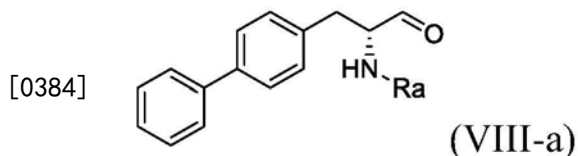
[0379] 其中在两个式中Ra是氢或氮保护基团。

[0380] 具有式(I)的化合物、更具体地具有式(I-a)的化合物到对应的醛的此种反应是通过使用TEMPO介导的氧化(参见例如WO 2008/031567或WO 2014/032627,第24-25页)或使用替代的反应条件如用戴斯-马丁过碘烷氧化(参见例如WO 2008/136561)来进行的。

[0381] 在其进一步的实施例中,获得的具有式(VIII)的化合物或其盐,



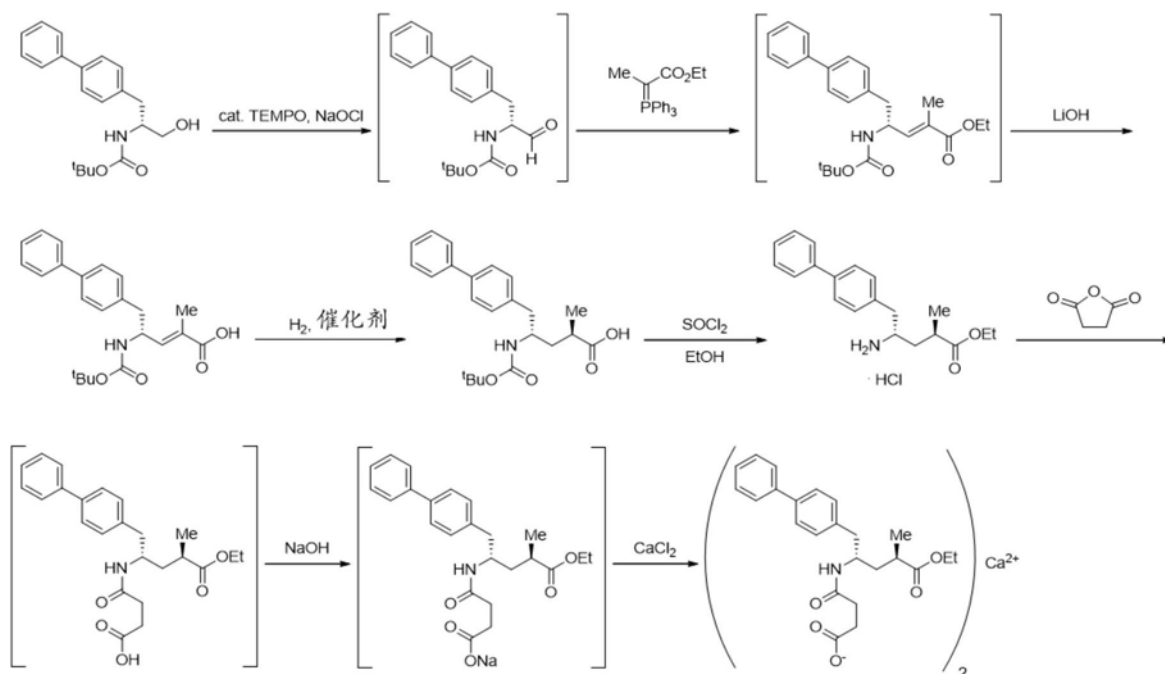
[0383] 优选具有式 (VIII-a) 的化合物或其盐



[0385] 进一步反应以制备N-(3-羧基-1-氧代丙基)-(4S)-(对-苯基苯基甲基)-4-氨基-(2R)-甲基丁酸乙基酯或其盐。

[0386] 优选地,所述反应包括以下步骤或与其类似的步骤(还参见W0 2008/031567或W0 2014/032627,第24-25页):

[0387]



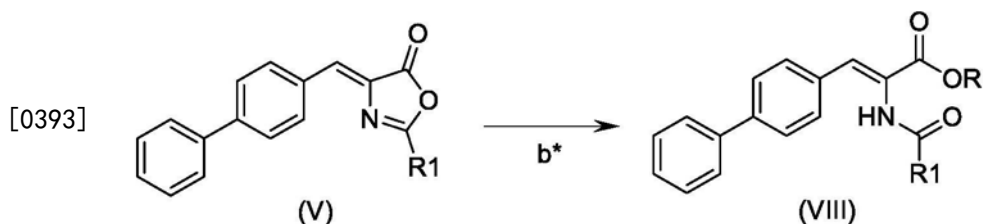
[0388] 在前述TEMPO氧化之后,然后使具有式 (VIII-a) 的醛与乙氧基羰基亚乙基-三苯基膦烷经受维蒂希(Wittig)反应,以产生 (R)-5-联苯基-4-基-4-叔丁氧基羰基氨基-2-甲基戊-2-烯酸乙基酯。然后将酯或在酯的皂化之后将对应的游离酸 (R)-5-联苯基-4-基-4-叔丁氧基羰基氨基-2-甲基戊-2-烯酸在催化剂的存在下进行氢化,同时优选产生具有高选择性的优选的非对映异构体。氮官能度的脱保护,即Boc基团的去除(如果需要,重新引入乙酯基团并且随后与琥珀酸酐偶联)递送了所希望的NEP抑制剂前药化合物或其盐。任选地,可以将酯皂化成游离酸,提供NEP抑制剂药物化合物。

[0389] 根据方案4和方案4-a的反应:

[0390] 在第二方面,本发明涉及根据方案4和方案4-a的方法:

[0391] 方案4和方案4-a中的反应步骤a分别与方案1和方案1-a中的反应步骤a相同,如上文更详细地描述。

[0392] 反应步骤b*

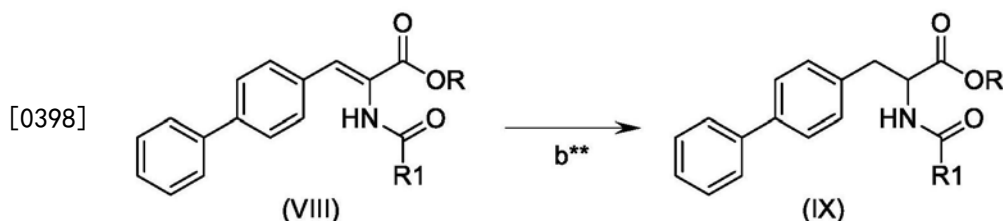


[0394] 其中R1是任选地取代的C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基,并且R是氢或羧基保护基团,

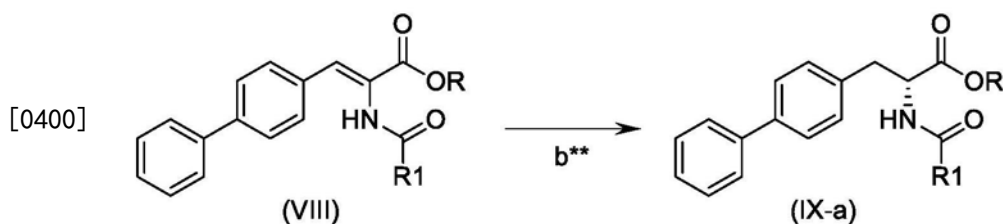
[0395] 是开环反应,其中根据本领域熟知的方法以及例如一般描述于W0 2004/002977 (第17页,方案2)、W0 2011/035569 (用于与水反应,第4-5页)和W0 2013/026773 (方案1,第二步)中的方法(将其通过引用并入本文),具有式(V)的化合物用水或醇R-OH处理得到具有式(VIII)的化合物。

[0396] 如果R是氢或需要另外的取代基,则可以根据上文所述的长线引入羧基保护基团。

[0397] 反应步骤b**



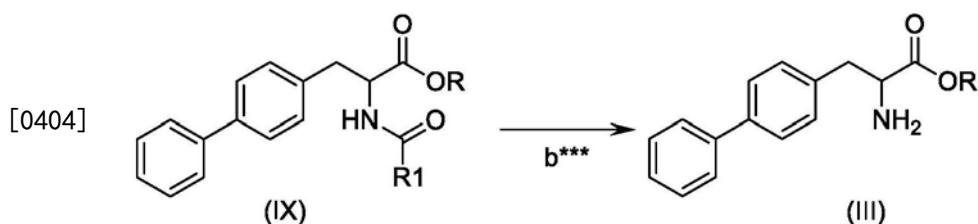
[0399] 优选地



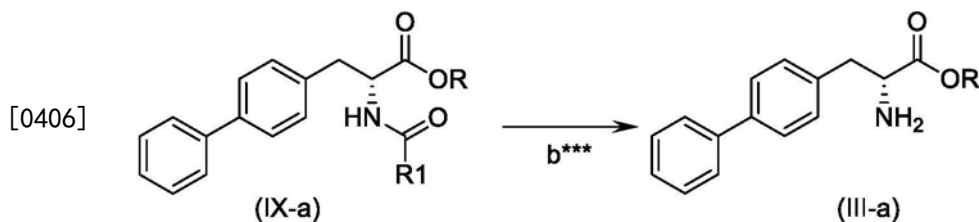
[0401] 其中R1是任选地取代的C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基,并且R是氢或羧基保护基团,

[0402] 是还原反应,其中根据本领域熟知的方法以及例如描述于Adv.Synth.Catal.[合成与催化进展]2003,345,308-323、W0 02/04466、W0 2009/090251 (章节B.3.3或C.2)、W0 2011/035569 (步骤b)和W0 2013/026773 (在催化剂存在下使用不对称氢化)中的方法(将其通过引用并入本文),具有式(VIII)的化合物被还原以分别产生具有式(IX)的化合物和具有式(IX-a)的化合物。

[0403] 反应步骤b***



[0405] 优选地



[0407] 其中R1是任选地取代的C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₇-烷基,并且R是氢或羧基保护基团,优选C₁-C₇烷基,

[0408] 包括然后根据本领域熟知的方法以及例如描述于Adv.Synth.Catal.[合成与催化进展]2003,345,308-323和CN101362708A中方法(将其通过引用并入本文)除去化合物(IX)的酰基以产生化合物(III)的游离氨基。

[0409] 该反应优选在以下条件中进行:在水性无机酸(例如,氢卤酸,如盐酸)存在下,在适当的溶剂或溶剂混合物(例如醇如甲醇,或醚如1,4-二噁烷,或羧酸如乙酸,和/或水)中,在0℃至反应混合物的回流温度范围内的优选温度(例如从20℃到100℃)下;或有机酸(例如,磺酸如甲磺酸),在适当的溶剂(例如醇如甲醇)中,在50℃至反应混合物的回流温度范围内的优选温度(例如从60℃到70℃)下。

[0410] 方案4和方案4-a中的反应步骤d(即将氮保护基团Ra引入具有式(III)的化合物中以产生具有式(II)的化合物)分别与如上面更详细地描述并且无论如何在本领域中是公知的方案2和方案2-a中的反应步骤d相同。

[0411] 方案4和方案4-a中的反应步骤e(即具有式(II)的化合物中的羧基还原为具有式(I)的受保护的氨基醇化合物)分别与如上面更详细地描述的方案2和方案2-a中的反应步骤e相同。在W0 2008/138561(第36页)(将其通过引用并入本文)中也描述了类似的反应。

[0412] 方案4和方案4-a中的反应步骤f和随后的步骤(即将具有式(I)的受保护的氨基醇化合物氧化成相应的具有式(VII)的醛并随后转化为NEP抑制剂前药沙卡布曲)分别与如上面更详细地描述并且无论如何在本领域中是公知的方案3和方案3-a中所述的反应顺序相同。

[0413] 其他实施例:

[0414] 在根据方案1至4-a的任何上述方法中,在一个实施例中,R1是选自以下项的氮保护基团:C₁-C₆-烷基,其是未取代的或被三-C₁-C₆-烷基甲硅烷基C₁-C₇-烷氧基单取代、二取代、或三取代;C₆-C₁₀-芳基;或杂环基团,其是具有5至14个环原子以及1至4个独立地选自N、O、S、S(O)或S(O)₂的杂原子的单环、二环或三环的环系统;其中该芳环或该杂环基团是未取代的或被一个、两个或三个残基取代,该残基选自由以下各项组成的组:C₁-C₇-烷基、羟基、C₁-C₇-烷氧基、C₂-C₈-烷酰基-氧基、卤素、硝基、氰基、和CF₃;

[0415] C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₂-烷氧基羰基;C₁-C₁₀-烯氧基羰基;C₁-C₆-烷基羰基;C₆-C₁₀-芳基羰基;C₁-C₆-烷氧基羰基;C₆-C₁₀-芳基-C₁-C₆-烷氧基羰基;烯丙基;肉桂基;磺酰基;次磺酰基;琥珀酰亚胺基和甲硅烷基,

[0416] 其中各个甲硅烷基是SiR₁₁R₁₂R₁₃基团,其中R₁₁、R₁₂和R₁₃彼此独立地是C₁-C₇-烷基、C₆-C₁₀-芳基或苯基-C₁-C₄-烷基。

[0417] 在其优选的实施例中,R1是C₁-C₇-烷氧基羰基,尤其是叔丁氧基羰基(Boc)。

[0418] 在任何上述反应方案中,可以通过使用用于从对映异构体混合物(如消旋体)中拆

分对映异构体的常规方法、例如通过从溶液或乳液中选择结晶(例如通过非对映异构体的盐)或手性色谱法将任何所获得的在携带氨基的碳原子处没有描述具体构型的手性化合物(I)、(II)、(III)、(VII)和(IX)拆分为对应的具有式(I-a)、(II-a)、(III-a)、(VII-a)或(IX-a)的纯对映异构体。此类方法在本领域是熟知的。

[0419] 实例

[0420] 以下实例说明了本发明而不限其范围。

[0421] 使用的缩略语:

[0422] Aq.、aq. 水性的

[0423] Ac 乙酰基

[0424] Bu 丁基

[0425] CDI N,N-羰基二咪唑

[0426] Et 乙基

[0427] h 小时

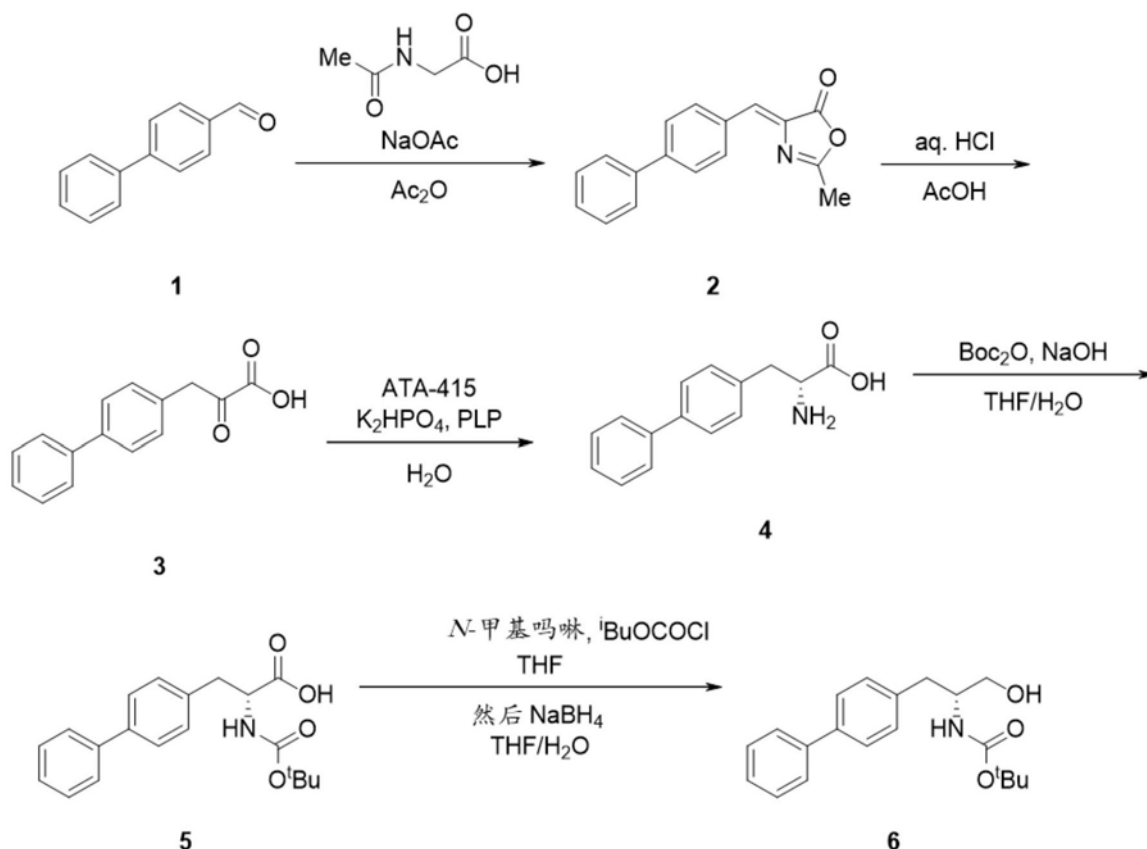
[0428] Me 甲基

[0429] min 分钟

[0430] Ph 苯基

[0431] 概述I

[0432]



[0433] 实例1: (Z)-4-([1,1'-联苯基]-4-基亚甲基)-2-甲基噁唑-5(4H)-酮2的制造

[0434] 将联苯基-4-甲醛1(例如西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich),目录号B34680,CAS号3218-36-8)(25.1g,135.0mmol)、N-乙酰基甘氨酸(16.2g,138.3mmol)和无水乙酸钠

(11.1g, 135.3mmol) 在乙酸酐 (250mL) 中的悬浮液加热至 110℃-120℃ 并在该温度下搅拌 10 小时。将反应混合物冷却至 5℃, 并且滤出沉淀的固体, 用冷的二异丙醚洗涤, 并且在 50℃ 下真空干燥, 得到产物 2, 为黄橙色固体 (36.5g, 定量)。获得的粗产物无需进一步纯化即可用于下一步骤。

[0435] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) : δ ppm 2.42 (s, 3H), 7.28 (s, 1H), 7.37-7.45 (m, 2H), 7.47-7.54 (m, 2H), 7.73-7.79 (m, 2H), 7.83 (m, 2H), 8.28 (m, 2H) ppm。

[0436] 实例 2: 3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-氧代丙酸 3 的制造

[0437] 将 (Z)-4-([1,1'-联苯基]-4-基亚甲基)-2-甲基噁唑-5(4H)-酮 2 (20.0g, 75.96mmol) 在乙酸 (60mL) 和 37% HCl 水溶液 (140mL) 中的悬浮液加热至 80℃-100℃ 并在该温度下搅拌 10 小时。将反应混合物冷却至室温, 然后添加水 (200mL)。滤出沉淀的固体, 用冷水洗涤并在 50℃ 下真空干燥, 得到呈橙色固体的产物 3 (9.83g, 53.9% 收率)。

[0438] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) : δ 6.45 (s, 1H), 7.33-7.40 (m, 1H), 7.46 (m, 2H), 7.64-7.73 (m, 4H), 7.85 (m, 2H), 9.34 (s, 1H), 13.23 (br. s, 1H) ppm; MS (ES-API) : 正模式 258.1 [$\text{M} + \text{NH}_4$] $^+$; MS (ES-API) : 负模式 239.2 [$\text{M} - \text{H}$] $^-$ 。

[0439] 实例 3: (R)-3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-氨基丙酸 4

[0440] 变体 a)

[0441] 将异丙胺盐酸盐 (19.95g, 208.8mmol) 溶于 67mM K_2HPO_4 水溶液 (210mL; pH 9.39) 中, 然后添加吡哆醛 5'-磷酸 (PLP) (54mg)。通过添加异丙胺将 pH 值调节至 pH 9。将 3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-氧代丙酸 3 (1.00g, 4.167mmol) 悬浮于 200mL 该缓冲溶液中, 并在 40℃ 和 180rpm 下振荡 5 分钟。添加转氨酶 ATA-415 (34mg; 可从克迪科思公司, 雷德伍德城, 加利福尼亚州, 美国商购), 并将反应混合物在室温下振荡 18 小时。将混合物离心, 将固体重悬于水 (5mL) 中并过滤。将得到的白色固体真空干燥, 得到呈相应异丙基氯化铵盐的产物 4 (1.13g, 90% 收率)。

[0442] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) : δ 3.18 (d, 2H), 4.21 (br. t, 1H), 7.34-7.41 (m, 3H), 7.44-7.51 (m, 2H), 7.61-7.70 (m, 4H), 8.46 (br. s, 3H), 13.41-14.37 (m, 1H) ppm (以盐酸盐形式测定); 对映异构体纯度 (HPLC) : >99。

[0443] 变体 b)

[0444] 将异丙胺盐酸盐 (19.95g, 208.8mmol) 溶于 67mM K_2HPO_4 水溶液 (105mL; pH 9.39) 中, 然后添加吡哆醛 5'-磷酸 (PLP) (27mg)。通过添加异丙胺将 pH 值调节至 pH 9, 得到缓冲溶液 A。将 3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-氧代丙酸 3 (80mg, 0.333mmol) 悬浮于 2mL 缓冲溶液 A 中并在 40℃ 下振荡 10 分钟。通过添加异丙胺将 pH 值调节至 pH 8.15。将异丙胺盐酸盐 (4.75g, 49.70mmol) 和吡哆醛 5'-磷酸 (PLP) (6.25mg) 溶于 0.1M 三乙胺缓冲液 (25mL; pH 7.0) 中, 得到缓冲溶液 B。将转氨酶 ATA-032 (6.4mg; 可从克迪科思公司商购) 溶于缓冲溶液 B (640 μL) 中, 在 30℃ 下振荡 5 分钟并离心。添加转氨酶 ATA-032 (100 μL) 溶液, 并将反应混合物在 40℃ 和 180rpm 下振荡 17 小时。通过 HPLC 分析反应混合物表明 100% 转化率和 >99% ee。

[0445] 物理数据见变体 a)

[0446] 变体 c)

[0447] 将 98% 硫酸 (45.0g, 450mmol, 0.54 当量) 缓慢加入水 (300g) 中, 然后添加 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (47.5g, 208mmol, 0.25 当量) 和化合物 3 (200g, 832mmol, 1.00 当量)。向得到的悬浮液中

添加70%异丙胺水溶液(147.6g, 1748mmol, 2.10当量)。加热至45℃后,将pH调节至pH 8.8-8.9,然后添加吐温(Tween) 20(30.0g)的水(70.0g)溶液。添加PLP-水合物(1.68g, 6.80mmol, 0.008当量),然后调节至pH 8.5-8.6。添加ATA-032(2.00g)在pH 8缓冲溶液(40mL,由K₂HPO₄·3H₂O和水制备)中的悬浮液,并将反应混合物在41℃下搅拌18小时。添加1M硫酸水溶液(1270g),并且随后将反应混合物加热至95℃并在该温度下保持10小时。冷却至25℃后,滤出固体,并且将滤饼用水(1400mL), 1%K₂HPO₄·3H₂O水溶液(1400mL)和2-丁酮(320g)的混合物以及2-丁酮(640g)洗涤,然后干燥,得到化合物4。

[0448] 物理数据见变体a)

[0449] 实例4: (R)-3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-丙酸5的制造

[0450] 在室温下向(R)-3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-氨基丙酸4(0.9g, 2.996mmol; 作为相应的异丙基氯化铵盐)在四氢呋喃(9mL)和水(9mL)中的悬浮液中添加Boc酸酐(0.91g, 4.103mmol)在四氢呋喃(2mL)中的溶液,然后添加氢氧化钠(335mg, 8.206mmol)在水(2mL)中的溶液。将得到的澄清溶液在室温下搅拌18小时,然后添加10%HCl水溶液以将pH值调节至pH 4。真空除去有机溶剂,并且将含水残余物用乙酸乙酯萃取。将合并的有机层用MgSO₄干燥,过滤并真空浓缩,得到呈米色固体的产物5(1.28g, 定量)。

[0451] ¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆): δ1.32(s, 9H), 2.87(dd, 1H), 3.06(dd, 1H), 4.13(ddd, 1H), 7.15(d, 1H), 7.31-7.39(m, 3H), 7.45(m, 2H), 7.58(m, 2H), 7.64(m, 2H), 12.63(br. s, 1H)。

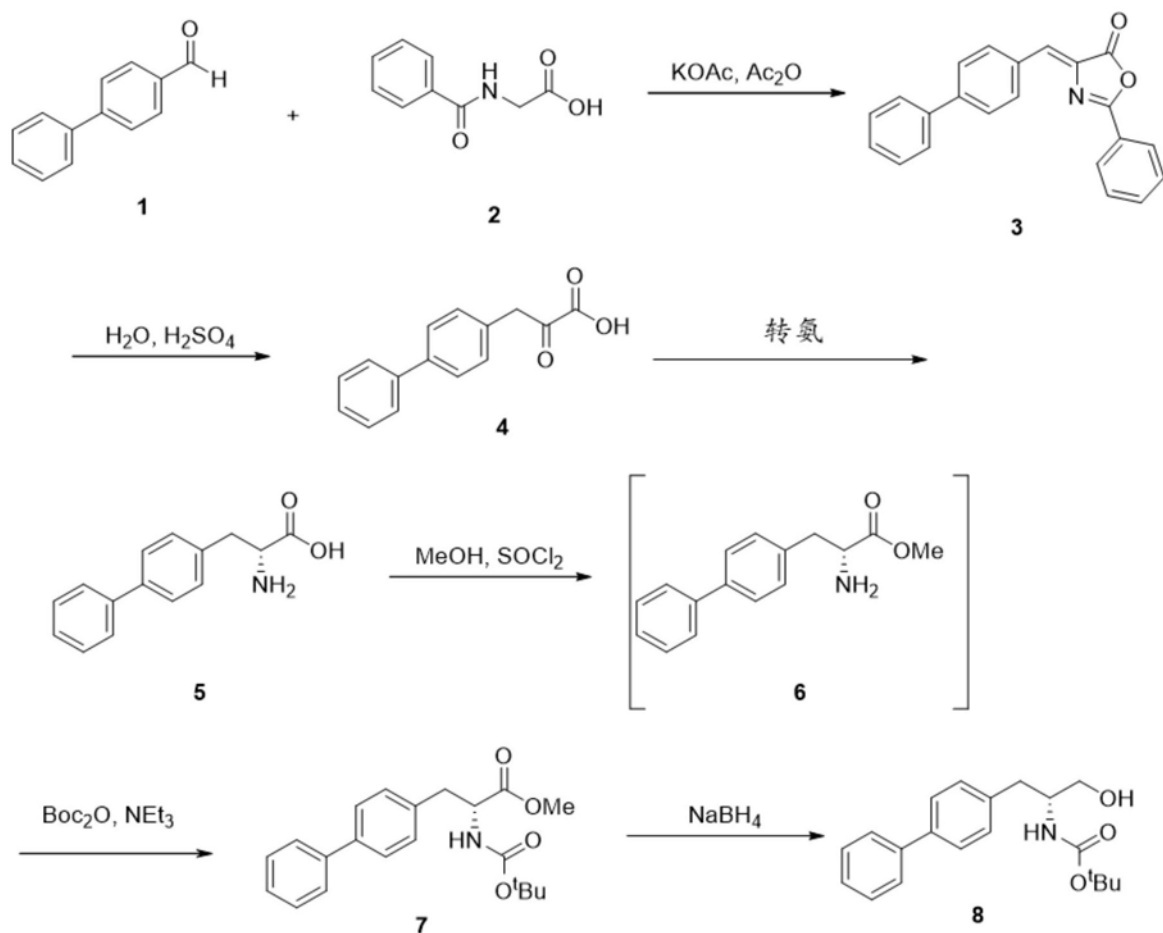
[0452] 实例5: (R)-叔丁基(1-([1,1'-联苯基]-4-基)-3-羟基丙烷-2-基)氨基甲酸酯6的制造

[0453] 在-15℃下,向(R)-3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-丙酸5(1.28g, 相当于2.996mmol)在四氢呋喃(8mL)中的溶液中添加氯甲酸异丁酯(539mg, 3.749mmol),然后添加N-甲基吗啉(402mg, 3.937mmol)。形成沉淀,在-15℃下搅拌30分钟后,滤出沉淀物,然后用THF洗涤滤饼。在0℃下,将滤液经1小时添加到硼氢化钠(296mg, 7.499mmol)在水(4mL)中的溶液中。将反应混合物在0℃下搅拌1小时,然后添加水(15mL),并将反应混合物用乙酸乙酯萃取。将合并的有机层用MgSO₄干燥,过滤并真空浓缩,得到粗产物。通过色谱法(硅胶,庚烷/乙酸乙酯)纯化,得到呈白色固体的产物6(0.74g, 两步收率75%)。

[0454] ¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆): δ1.32(s, 9H), 2.60(dd, 1H), 2.86(dd, 1H), 3.24-3.31(m, 1H), 3.33-3.42(m, 1H), 3.52-3.70(m, 1H), 4.72(t, 1H), 6.56-6.71(m, 1H), 7.28(m, 2H), 7.30-7.38(m, 1H), 7.44(m, 2H), 7.56(m, 2H), 7.60-7.66(m, 2H); MS(ES-API): 正离子模式 350.3[M+Na]⁺。

[0455] 概述II

[0456]



[0457] 实例6: (Z)-4-([1,1'-联苯基]-4-基亚甲基)-2-苄基噁唑-5(4H)-酮3的合成:

[0458] 将[1,1'-联苯基]-4-甲醛1 (90.0g, 493.9mmol, 1.0当量)、2-苯甲酰氨基乙酸2 (106.2g, 592.7mmol, 1.2当量)、乙酸钾 (19.4g, 197.7mmol, 0.4当量) 和甲苯 (720mL) 加入反应器中。将反应混合物加热至55℃-65℃, 然后经1小时添加乙酸酐 (32.6mL, 345.8mmol, 0.6当量), 导致形成白色悬浮液。搅拌2小时后, 将反应混合物经1小时冷却至45℃-55℃。添加晶种, 将反应混合物再搅拌1小时。经2小时添加更多的乙酸酐 (107.2mL, 113.6mmol, 2.4当量), 然后再搅拌6小时。随后经2.5小时将反应混合物冷却至15℃-25℃, 并且滤出固体。将滤饼用甲苯 (90mL, 两次) 洗涤, 然后干燥, 得到化合物3。

[0459] 实例7: 3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-氧代丙酸4的合成:

[0460] 将化合物3、68%硫酸水溶液 (803mL, 8.85mol, 18.0当量, 基于化合物1) 和乙酸 (576mL) 加入反应器中。将反应混合物加热至95℃-105℃并再搅拌10小时。随后经5小时将反应混合物冷却至约25℃。经2小时添加甲基叔丁基醚 (778mL), 并将反应混合物再搅拌3小时。滤出固体, 并且将滤饼用水 (500mL), 0.2%磷酸氢二钾水溶液 (300mL) 和水 (300mL) 洗涤, 然后干燥, 得到化合物4。

[0461] 实例8: (R)-3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-氨基丙酸5的合成:

[0462] 将98%硫酸 (45.0g, 450mmol, 0.54当量) 缓慢加入水 (300g) 中, 然后添加K₂HPO₄·3H₂O (47.5g, 208mmol, 0.25当量) 和化合物4 (200g, 832mmol, 1.00当量)。向得到的悬浮液中添加70%异丙胺水溶液 (147.6g, 1748mmol, 2.10当量)。加热至45℃后, 将pH调节至pH 8.8-

8.9,然后添加吐温20 (30.0g)的水 (70.0g)溶液。添加PLP一水合物 (1.68g,6.80mmol,0.008当量),然后调节至pH 8.5-8.6。添加ATA-032 (2.00g)在pH 8缓冲溶液 (40mL,由 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 和水制备)中的悬浮液,并将反应混合物在41℃下搅拌18小时。添加1M硫酸水溶液 (1270g),并且随后将反应混合物加热至95℃并在该温度下保持10小时。冷却至25℃后,滤出固体,并且将滤饼用水 (1400mL),1% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 水溶液 (1400mL)和2-丁酮 (320g)的混合物以及2-丁酮 (640g)洗涤,然后干燥,得到化合物5。

[0463] 实例9: (R)-3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸甲基酯7的合成:

[0464] 将化合物5 (20.00g,82.9mmol,1.0当量)和甲醇 (160mL)加入反应器中。将所得悬浮液加热至50℃,然后在30分钟内滴加亚硫酰氯 (12.82g,107.7mmol,1.3当量)。在50℃-55℃下继续搅拌10小时,然后在50℃下添加三乙胺 (29.36g,290.1mmol,3.5当量),接着添加甲苯 (100mL)。通过在50℃下蒸馏在真空下除去甲醇。将反应混合物冷却至20℃,然后添加Boc酸酐 (19.9g,91.2mmol,1.1当量),并将反应在20℃下进一步搅拌2小时。通过添加10%NaCl水溶液 (100mL)淬灭反应,并分离各相。将有机层用10%NaCl水溶液 (50mL)洗涤,然后部分浓缩并在50℃下用庚烷级分 (120mL)稀释。将反应混合物经5小时冷却至10℃,并且滤出形成的固体,用庚烷级分 (20mL)洗涤并干燥,得到化合物7。

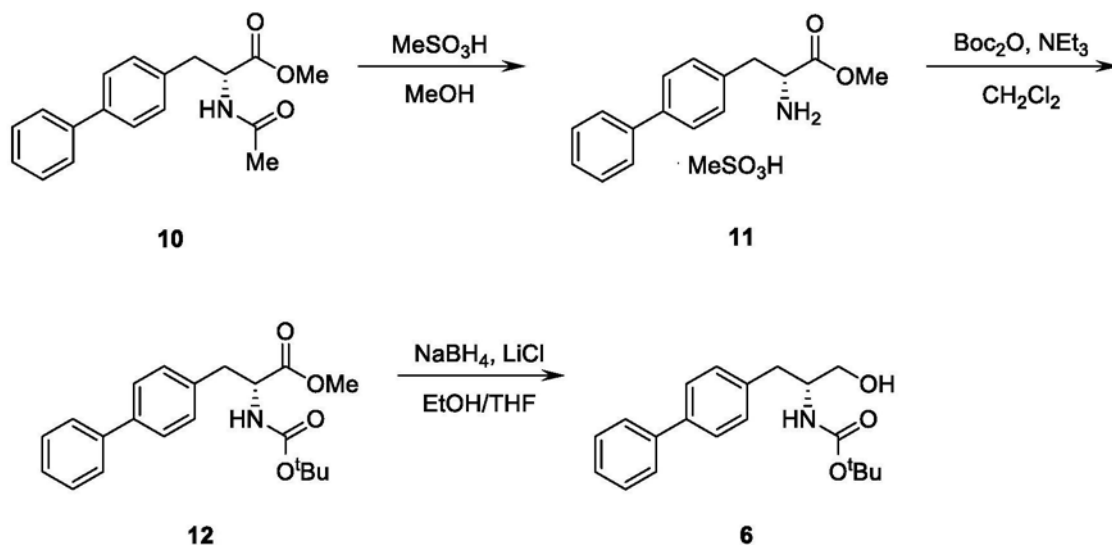
[0465] 1H -NMR (400MHz,DMSO- d_6): δ 1.32 (s,9H),2.89 (dd,1H),3.04 (dd,1H),3.63 (s,3H),4.21 (ddd,1H),7.29-7.38 (m,4H),7.41-7.47 (m,2H),7.55-7.61 (m,2H),7.61-7.67 (m,2H);MS (ES-API):正离子模式356.4[M+H] $^+$ 。

[0466] 实例10: (R)-叔丁基 (1-([1,1'-联苯基]-4-基)-3-羟基丙烷-2-基)-氨基甲酸酯8的合成:

[0467] 向化合物7 (1.00g,2.81mmol,1.00当量)在甲基-THF (5.0mL)中的在0℃的溶液中添加在0-5℃的硼氢化钠 (319mg,8.43mmol,3.00当量)以提供白色悬浮液。缓慢添加甲醇 (0.7mL,17.3mmol,6.15当量),导致气体逸出。将反应混合物缓慢升温至20℃-25℃,然后在该温度下搅拌直至完全转化。将反应混合物冷却至0℃,然后缓慢添加40%柠檬酸水溶液 (6.0mL),导致剧烈的气体逸出。分离各相,并且将有机相用水 (3.0mL)洗涤。将溶剂变为甲苯 (5.0mL),然后添加庚烷级分 (5.0mL)以沉淀化合物8。滤出产物,用庚烷级分洗涤并干燥,得到化合物8。

[0468] 概述III

[0469]



[0470] 实例11: (R)-甲基3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-氨基丙酸甲磺酸酯11的制造

[0471] 在40℃下将(R)-甲基3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-乙酰胺基丙酸酯10 (0.190g, 0.639mmol) 在甲醇(1.2mL)中的悬浮液用甲磺酸(0.070g, 1.078mmol)处理。将反应混合物加热至回流并在该温度下保持21小时。冷却至50℃后,添加异丙醇和庚烷1:1(10mL)的混合物,导致形成白色沉淀。将反应混合物进一步冷却至0℃,滤出固体并用异丙醇和庚烷1:1的冷混合物洗涤。在50℃真空干燥,得到呈灰色固体的产物11(0.150g, 67%收率)。

[0472] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ 2.30 (d, 4H), 3.14 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 4.39 (t, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.38 (m, 1H), 7.44-7.52 (m, 2H), 7.63-7.71 (m, 4H), 8.41 (br. s, 3H); MS (ES-API): 正离子模式256.2[M+H] $^+$ 。

[0473] 实例12: (R)-甲基3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸酯12的制造

[0474] 在室温下向(R)-甲基3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-氨基丙酸磺酸酯11(0.136g, 0.378mmol)在二氯甲烷(2mL)中的悬浮液中添加三乙胺(0.054mL, 0.395mmol), 然后是Boc酸酐(0.093mL, 0.401mmol)。将反应混合物在30℃下加热4.5h。添加饱和氯化铵水溶液(5mL)和乙酸乙酯(5mL)后,分离各相。将水相用乙酸乙酯萃取,并且将合并的有机层用 Na_2SO_4 干燥,过滤并真空浓缩,得到产物12(0.148g, 定量),为米色固体。

[0475] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ 1.32 (s, 9H), 2.85-2.93 (m, 1H), 3.00-3.08 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 4.16-4.25 (m, 1H), 7.27-7.38 (m, 4H), 7.40-7.49 (m, 2H), 7.58 (m, 2H), 7.62-7.68 (m, 2H); MS (ES-API): 正离子模式356.3[M+H] $^+$ 。

[0476] 实例8: (R)-叔丁基(1-([1,1'-联苯基]-4-基)-3-羟基丙烷-2-基)氨基甲酸酯6的制造

[0477] 在室温下,向(R)-甲基3-([1,1'-联苯基]-4-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸酯12(0.140g, mmol)在乙醇和四氢呋喃1:1的混合物(2mL)中的溶液中添加氯化锂水合物(0.183g, mmol), 然后添加硼氢化钠(0.109g, mmol)。将反应混合物在25℃下加热27h。将反应混合物用乙醇和四氢呋喃1:1的混合物稀释,滤出固体并用乙醇和四氢呋喃1:1的混合物洗涤。将澄清的滤液真空浓缩,得到产物6(0.080g, 两步收率67%)。

[0478] 对于分析数据,参见从以上化合物5制备化合物6。