(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0172742
(43) 공개일자 2024년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 17/16 (2006.01) *C07F 9/40* (2006.01)
C07F 9/6558 (2006.01) *C12P 17/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 17/16 (2013.01)
C07F 9/4006 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7033855
(22) 출원일자(국제) 2023년03월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월10일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/056138
(87) 국제공개번호 WO 2023/174810
국제공개일자 2023년09월21일
(30) 우선권주장
PCT/EP2022/056471 2022년03월14일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
비아트리스 아시아 퍼시픽 피티이 리미티드
싱가포르 068864 싱가포르 쉔튼 웨이 2 에스지엑스 센터 1 넘버18-01
(72) 발명자
아벨레 슈테판
스위스 4123 알슈빌 헤겐하이머마트벡 91 이도르시아 파마슈티컬스 리미티드 씨/오
브라운 가레스
영국 비티41 2유에이 앤트림 부쉬 메이너 스티플로드 37
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 15 항

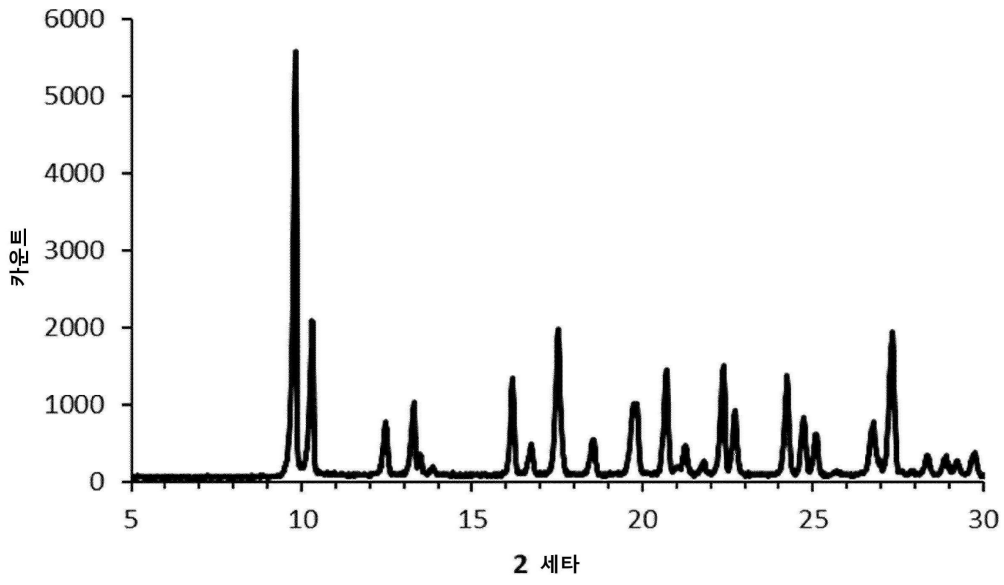
(54) 발명의 명칭 **(R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산또는 이의 포스포네이트 유도체의 합성 방법**

(57) 요 약

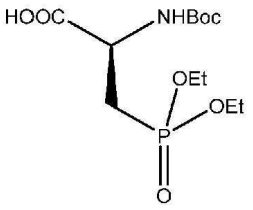
본 발명은 (*R*)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산 ("COMPOUND (당해 화합물)"), 이의 포스포네이트 유도체, 또는 임의의 전술한 것의 염의 합성 방법; COMPOUND (당해 화합물) 의 결정질 형태, 및 4-((*R*)-2-{[6-((*S*)-3-메톡시-피롤리딘-1-일)-2-페닐-피리미딘-4-카르보닐]-아미노}-3-포스포노-프로피오닐)-

(뒷면에 계속)

대 표 도



피페라진-1-카르복실산 부틸 에스테르 (또한 셀라토그렐이라고도 알려짐), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 제조에 있어서의 COMPOUND (당해 화합물) (특히 결정질 형태의 COMPOUND (당해 화합물)), 또는 이의 포스포네이트 유도체 또는 염의 용도에 관한 것이다.



COMPOUND (당해 화합물)

(52) CPC특허분류
C07F 9/65583 (2013.01)
C12P 17/10 (2013.01)

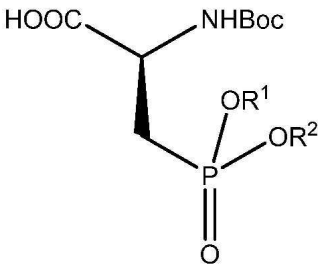
(72) 발명자
맥킨타이어 피터
영국 비티8 7디에이 벨파스트 오차드 라이즈 4
믹스 스테판
영국 비티6 9에프피 벨파스트 오몬드 크레센트 8

명 세 서

청구범위

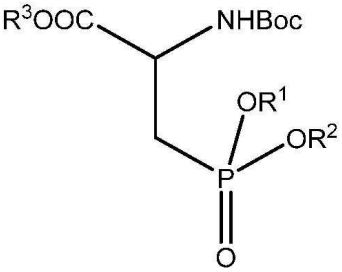
청구항 1

화학식 (I) 의 화합물, 또는 이의 염의 제조 방법으로서:



화학식 (I)

화학식 (II) 의 화합물을



화학식 (II)

(식에서

R^1 및 R^2 는 서로 독립적으로 (C_{1-4})알킬을 나타내고;

R^3 은 메틸, 에틸 또는 n-프로필을 나타냄);

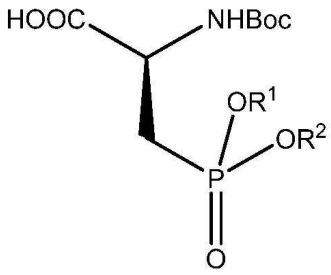
히드롤라아제와 반응시켜 적어도 70% 의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖는 화학식 (I) 의 화합물을 수득하는 단계를 포함하는 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 히드롤라아제가 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, 프로테아제 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 및 DSM-D3 으로부터 선택되는 제조 방법.

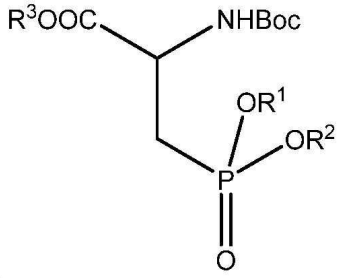
청구항 3

화학식 (I) 의 화합물, 또는 이의 염의 제조 방법으로서:



화학식 (I)

화학식 (II) 의 화합물을



화학식 (II)

(식에서

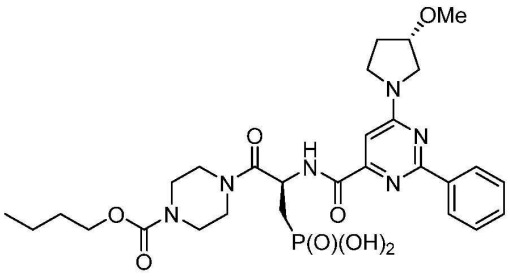
R^1 및 R^2 는 서로 독립적으로 (C_{1-4})알킬을 나타내고;

R^3 은 메틸, 에틸 또는 n-프로필을 나타냄);

히드롤라아제와 (여기서, 히드롤라아제는 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, 프로테아제 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 및 DSM-D3 으로부터 선택됨) 반응시키는 단계를 포함하는 제조 방법.

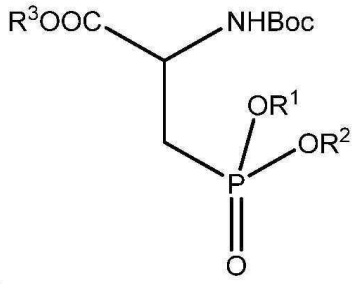
청구항 4

셀라토그렐의 제조 방법으로서:



셀라토그렐

화학식 (II) 의 화합물을



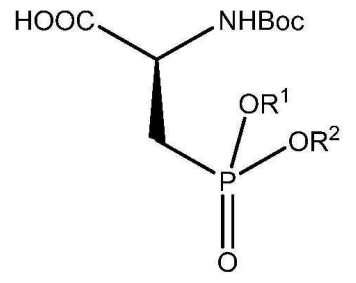
화학식 (II)

(식에서

R^1 및 R^2 는 서로 독립적으로 (C_{1-4})알킬을 나타내고;

R^3 은 메틸, 에틸 또는 n-프로필을 나타냄);

히드롤라아제와 반응시켜 적어도 70% 의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖는 화학식 (I) 의 화합물 또는 이의 염을 제공하는 단계를 포함하는 제조 방법:



화학식 (I).

청구항 5

제 1 항, 제 3 항 또는 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 히드롤라아제가 AH018, AH022, AH023, AH027, AH034, AH044, AH047, 및 프로테아제 M 으로부터 선택되는 제조 방법.

청구항 6

제 1 항, 제 3 항 또는 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 히드롤라아제가 프로테아제 M 인 제조 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 96% 의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖는 화학식 (I) 의 화합물을 제공하는 제조 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, R^1 및 R^2 둘 모두가 에틸을 나타내는 제조 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, R^3 이 메틸 또는 에틸을 나타내는 제조 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 반응 (효소적 분할) 이 물과 MTBE, DMSO, 톨루엔 및 이의 임의

의 혼합물로부터 선택되는 유기 용매의 혼합물 중에서 수행되는 제조 방법.

청구항 11

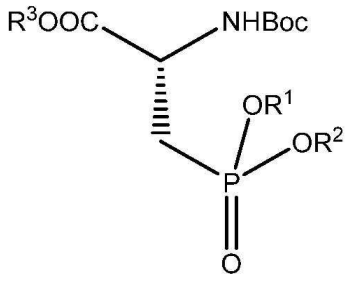
제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 반응 (효소적 분할) 이 5.0 과 8.0 사이의 pH 값에서 수행되는 제조 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 반응 (효소적 분할) 이 0.2% 와 10% 사이의 효소 부하량으로 수행되는 제조 방법.

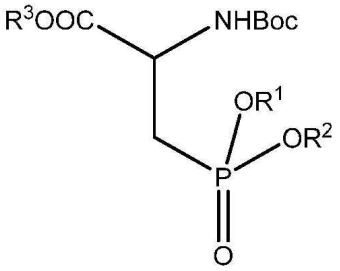
청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 (V) 의 화합물을:



화학식 (V)

염기와 반응시켜 화학식 (II) 의 화합물을 제공하는 단계를 추가로 포함하고:



화학식 (II)

(식에서

R^1 및 R^2 는 서로 독립적으로 (C_{1-4})알킬을 나타내고;

R^3 은 메틸, 에틸 또는 n-프로필을 나타냄);

여기서, 화학식 (V) 의 화합물은 적어도 80% 의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖고, 화학식 (II) 의 화합물은 10% 미만의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖는 제조 방법.

청구항 14

하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산의 결정질 형태: 9.8°, 10.3° 및 17.5°.

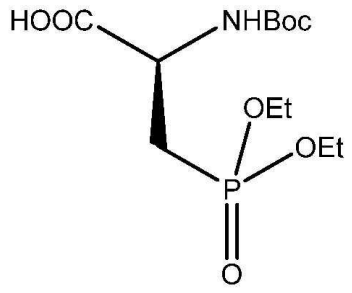
청구항 15

제 14 항에 있어서, DSC 에 의해 측정된 바와 같은 약 180℃ 에서의 흡열 피크를 특징으로 하는, (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산의 결정질 형태.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 (*R*)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산 (이하, "COMPOUND (당해 화합물)" 이라고도 함), 이의 포스포네이트 유도체, 또는 임의의 전술한 것의 염의 합성 방법; COMPOUND (당해 화합물) 의 결정질 형태, 및 4-((R)-2-{[6-((S)-3-메톡시-피롤리딘-1-일)-2-페닐-피리미딘-4-카르보닐]-아미노}-3-포스포노-프로피오닐)-피페라진-1-카르복실산 부틸 에스테르 (또한 셀라토그렐이라고도 알려짐), 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 제조에 있어서의 COMPOUND (당해 화합물) (특히 결정질 형태의 COMPOUND (당해 화합물)) 또는 이의 포스포네이트 유도체 또는 염의 용도에 관한 것이다.



[0002]

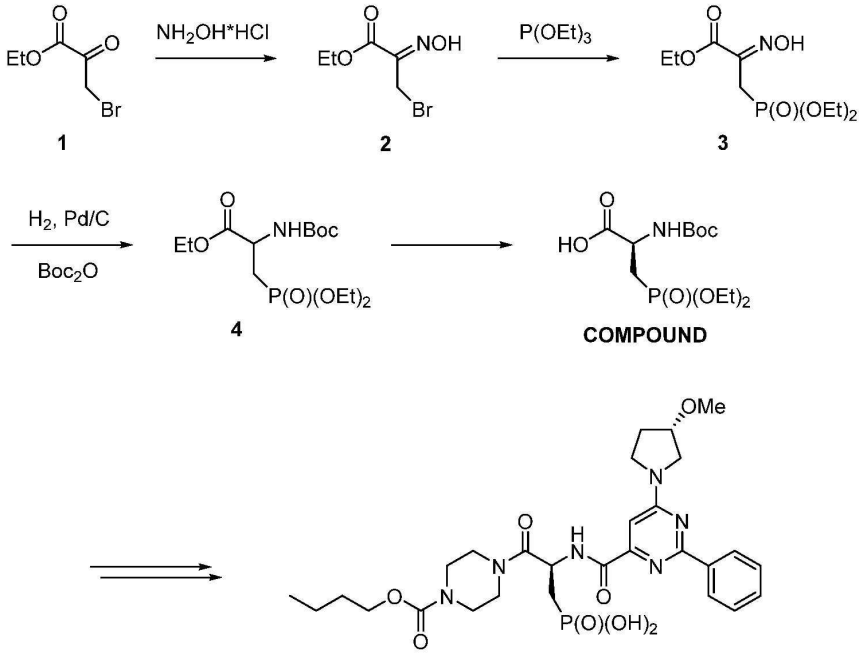
[0003] COMPOUND (당해 화합물)

배 경 기 술

[0004] COMPOUND (당해 화합물) 로부터 셀라토그렐의 제조는 WO 2009/069100 및 Caroff E et al., *J. Med. Chem.* (2015), **58**, 9133-9153 에 기재되어 있다. 셀라토그렐의 의학적 용도가 WO 2018/167139; Baldoni D et al., *Clin Drug Investig* (2014), **34**(11), 807-818; Storey R F et al., *European Heart Journal*, ehz807, doi:10.1093/eurheartj/ehz807; 및 Sinnaeve P R et al, *J Am Coll Cardiol* (2020), **75** (20), 2588-97 (doi.org/10.1016/j.jacc.2020.03.059) 에 기재되어 있다. 최근 급성 심근 경색의 병력이 있는 대상자에서 급성 심근 경색의 치료 및 모든 원인 사망의 예방을 위한 자가-투여된 피하 셀라토그렐의 효능 및 안전성을 평가하기 위해, 셀라토그렐을 다중-센터, 이중-맹검, 무작위, 위약-대조, 병렬-군 연구에서 조사하였다 (ClinicalTrials.gov 식별자: NCT04957719).

[0005] 예를 들어, COMPOUND (당해 화합물) 은 상업적으로 입수가능한 메틸 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-요오도프로파노에이트 (Boc-3-요오도-L-Ala-OMe) 로부터 출발하여 트리에틸포스파이트와의 반응 및 후속적으로 물과 THF의 혼합물 중의 LiOH와의 비누화에 의해 제조될 수 있다 (WO 2009/069100 및 Caroff E et al., *J. Med. Chem.* (2015), **58**, 9133-9153). 이 공정은 고가의 출발 물질 Boc-3-요오도-L-Ala-OMe 를 사용하는 단점과 아르부조프 반응 조건 하에서, 특히 대규모 합성에서 라세미화되는 경향을 갖는다. 대안적으로, 라세미 혼합물로서의 COMPOUND (당해 화합물) 는 그의 거울상이성질체와 함께 하기 반응식 1 에 나타낸 절차에 따라 제조될 수 있다: 화합물 **2** 는 에틸 3-브로모-2-옥소프로파노에이트와 히드록실아민 히드로클로라이드의 반응에 의해 제조될 수 있다. 화합물 **2** 와 트리에틸포스파이트의 반응에 의해 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)-프로파노에이트 (화합물 **3**) 가 수득될 수 있고, 이는 촉매로서 Pd/C 의 존재 하에 수소화 및 Boc_2O 에 의한 아미노기의 보호에 의해 화합물 **4** 로 변환될 수 있다. COMPOUND (당해 화합물) 및 그의 거울상이성질체의 라세미 혼합물은 약 20℃ 의 온도에서 물과 톨루엔의 혼합물 중에서 LiOH 로 비누화하여 화합물 **4** 로부터 수득될 수 있다 (Stefan Abele, presentation at 250th ACS national meeting, August 17, 2015, Boston; Stefan Abele, presentation at Swiss Industrial Chemistry Symposium October 28, 2016, Basel). 에스테르 (화합물 **4**) 의 단계에서 키랄 컬럼 크로마토그래피 또는 모의 이동층 크로마토그래피에 의한 거울상이성질체의 분리가 가능하더라도, 화합물 **5** (예를 들어, 4-[2-tert-부톡시카르보닐아미노-3-(디에톡시-포스포릴)-프로피오닐]-피페라진-1-카르복실산 부틸 에스테르) 의 합성에서의 최종 산 (COMPOUND (당해 화합물) 의 라세미체) 또는 나중의 중간체가 가능할 수 있고, 거울상이성질체의 그러한 분리는 제한된 스케일능 및 처리량 및 대량의 용매에 대한 필요성의 단점을 갖는다.

[0006] 반응식 1: COMPOUND (당해 화합물) 의 합성



5 (셀라토그렐)

[0007]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 놀랍게도, COMPOUND (당해 화합물) 는 히드롤라아제를 사용한 효소적 분할에 의해 우수한 수율 및 높은 거울상이성질체 순도로 대규모로 수득될 수 있음을 발견하였다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1 은 COMPOUND (당해 화합물) 의 결정질 형태 (I) 의 X-선 분말 회절 다이아그램을 보여주며, X-선 분말 회절 다이아그램은 실험 부분에 기재된 XRPD 방법으로 측정되었고, Cu Kα 방사선에 대해 보여진다. X-선 회절 다이어그램은 하기 백분율의, 다이어그램에서의 가장 강렬한 피크와 비교되는, 상대 강도 (상대 피크 강도를 괄호 안에 제시함) 를 갖는 명시된 굴절각 2세타에서의 피크를 나타낸다 (10% 초과의 상대 강도를 갖는 3-30° 2세타 범위로부터의 선택된 피크가 보고됨): 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%), 및 27.3° (33%).

도 1 의 X-선 회절 다이어그램에서 굴절각 2세타 (2Θ) 는 수평축 상에 플로팅되고, 카운트는 수직축 상에 플로팅된다.

의심의 여지를 없애기 위해, 상기-열거된 피크는 도 1 에 제시된 X-선 분말 회절의 실험적 결과를 기재한 것이다. 위의 피크 목록과 대조적으로, 본 발명의 COMPOUND (당해 화합물) 의 각각의 결정질 형태를 완전하고 분명하게 특성분석하기 위해서는 오직 특징적 피크의 선택만 요구된다고 이해된다.

도 2 는 실시예 4 로부터 수득한 25℃ 에서의 COMPOUND (당해 화합물) 의 결정질 형태 (I) 의 중량측정 증기 수착 (gravimetric vapour sorption) (GVS) 다이어그램을 나타낸다.

도 2 의 중량측정 증기 수착 다이어그램에서 상대 습도 (% RH) 는 수평 축 상에 플롯팅되고, 질량 변화 (% dm) 는 수직 축 상에 플롯팅된다.

도 3 은 COMPOUND (당해 화합물) 의 결정질 형태 (I) 의 시차 주사 열량계 (DSC) 써모그램을 보여준다. 도 3 의 DSC 써모그램에서 온도 (℃) 는 수평축 상에 플롯팅되고, 열 유량 (mW) 은 수직축 상에 플롯팅된다.

도 4 는 에틸-3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 결정질 형태 (A) 의 X-선 분말 회절

다이아그램을 보여주며, X-선 분말 회절 다이아그램은 실험 부분에 기재된 XRPD 방법으로 측정되었고, Cu Kα 방사선에 대해 보여진다. X-선 회절 다이어그램은 하기 백분율의, 다이어그램에서의 가장 강렬한 피크와 비교되는, 상대 강도 (상대 피크 강도를 괄호 안에 제시함) 를 갖는 명시된 굴절각 2세타에서의 피크를 나타낸다 (8% 초과의 상대 강도를 갖는 3° -40° 2세타 범위로부터의 선택된 피크가 보고됨): 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%), 및 34.3° (49%).

도 5 는 에틸-3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 결정질 형태 (B) 의 X-선 분말 회절 다이아그램을 보여주며, X-선 분말 회절 다이아그램은 실험 부분에 기재된 XRPD 방법으로 측정되었고, Cu Kα 방사선에 대해 보여진다. X-선 회절 다이어그램은 하기 백분율의, 다이어그램에서의 가장 강렬한 피크와 비교되는, 상대 강도 (상대 피크 강도를 괄호 안에 제시함) 를 갖는 명시된 굴절각 2세타에서의 피크를 나타낸다 (10% 초과의 상대 강도를 갖는 3° -40° 2세타 범위로부터의 선택된 피크가 보고됨): 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%), 및 36.9° (30%).

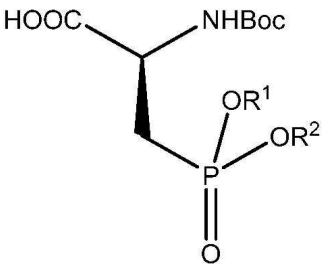
도 4 및 도 5 의 X-선 회절 다이어그램에서 굴절각 2세타 (2Θ) 는 수평축 상에 플로팅되고, 카운트는 수직축 상에 플로팅된다.

의심의 여지를 피하기 위해, 위에 열거된 피크는 각각 도 4 및 5 에 제시된 X-선 분말 회절의 실험 결과를 기술한다. 상기에 열거된 피크에 반해, 본 발명의 각각의 결정질 형태의 에틸-3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트를 완전히 및 분명하게 특징화하기 위해서는, 단지 특징적인 피크의 선택만이 요구된다고 이해된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 이하에서는 본 발명을 설명하고 본 발명의 다양한 구현예를 제시한다.

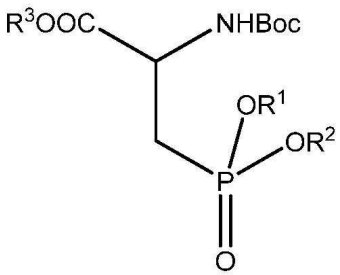
[0011] 1) 제 1 구현예에서, 본 발명은 화학식 (I) 의 화합물, 또는 이의 염의 제조 방법으로서:



[0012]

[0013] 화학식 (I)

[0014] 화학식 (II) 의 화합물을



[0015]

[0016] 화학식 (II)

[0017] (식에서

[0018] R^1 및 R^2 는 서로 독립적으로 (C_{1-4})알킬 (특히 에틸) 을 나타내고;

[0019] R^3 은 메틸, 에틸 또는 n-프로필 (특히 에틸) 을 나타냄);

[0020] 히드롤라아제와 반응시켜 적어도 70% 의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖는 화학식 (I) 의 화합물을 수득하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0021] 본원에서 제공되는 정의는 다르게 명백히 제시된 정의가 더 넓은 또는 더 좁은 정의를 제공하지 않는 한, 상세한 설명 및 청구범위 전체에 동일하게 적용되는 것으로 의도된다. 용어의 정의 또는 바람직한 정의는, 본원에서 정의하는 바와 같은 임의의 또는 모든 다른 용어의 임의의 정의 또는 바람직한 정의와 독립적으로 (및 조합하여) 각각의 용어를 정의하고, 대체할 수 있다는 것은 충분히 이해된다.

[0022] "제 1 화합물의 양이 제 2 화합물의 양에 대해 "X" 당량인" 의 문맥에서 사용되는 용어 "당량" 은, 주어진 혼합물이 (동일한 단위로 주어진) 제 2 화합물의 양에 대해 (분자의 수와 관련된 임의의 단위로) 제 1 화합물의 양의 "X" 배를 함유하는 것을 의미한다.

[0023] 온도와 관련하여 사용되지 않는 한, 본 출원에서 수치 값 "X" 앞에 위치한 용어 "약" 은 X - X 의 10% 내지 X + X 의 10% 로 확장되는 간격, 특히 X - X 의 5% 내지 X + X 의 5% 로 확장되는 간격, 특히 X - X 의 2% 내지 X + X 의 2% 로 확장되는 간격을 지칭한다. 온도의 특별한 경우에, 본 출원에서 온도 "Y" 앞에 위치한 용어 "약" 은 온도 Y - 10℃ 내지 Y + 10℃ 로 확장되는 간격, 특히 Y - 5℃ 내지 Y + 5℃ 로 확장되는 간격, 특히 Y - 3℃ 내지 Y + 3℃ 로 확장되는 간격을 지칭한다. 실온은 약 25℃ 의 온도를 의미한다.

[0024] 단어 "사이" 또는 "내지" 가 수치 범위를 기재하는데 사용되는 경우, 지시된 범위의 종말점이 범위에 명확하게 포함된다고 이해된다. 예를 들어: 온도 범위가 40℃ 와 80℃ 사이 (또는 40℃ 내지 80℃) 인 것으로 기재된다면, 이는 종말점 40℃ 및 80℃ 가 범위에 포함된다는 것을 의미하고; 또는 변수가 1 과 4 사이 (또는 1 내지 4) 의 정수인 것으로서 정의된다면, 이는 변수가 정수 1, 2, 3 또는 4 라는 것을 의미한다.

[0025] 표현 % w/w 는 고려된 조성물의 총 중량에 비한 중량 백분율을 지칭한다. 마찬가지로, 표현 v/v 는 총 부피에 대한 하나의 성분의 부피에 의한 비율을 지칭한다 (그리고 %v/v 는 백분율로 각각의 비율을 지칭한다).

[0026] 단독으로 또는 조합으로 사용되는 용어 "알킬" 은 1 내지 4 개의 탄소 원자를 함유하는 선형 또는 분지형 포화 탄화수소 사슬을 지칭한다. 용어 "C_{x-y}-알킬" (x 및 y 각각은 정수임) 은 x 내지 y 개의 탄소 원자를 함유하는 상기에서 정의된 바와 같은 알킬 기를 지칭한다. 예를 들어, (C_{1-4})알킬 기는 1 내지 4 개의 탄소 원자를 함유한다. (C_{1-4})알킬 기의 예는 메틸, 에틸, *n*-프로필, *이*소-프로필, *n*-부틸, *이*소-부틸, *sec.*-부틸 및 *tert.*-부틸이다. "R^1" 이 "(C_{1-4})알킬" 기를 나타내는 경우, 용어 "(C_{1-4})알킬" 은 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필, n-부틸, 이소-부틸, sec-부틸, 및 tert-부틸, 바람직하게 메틸, 에틸, 및 n-프로필, 가장 바람직하게는 에틸을 의미한다. "R^2" 가 "(C_{1-4})알킬" 기를 나타내는 경우, 용어 "(C_{1-4})알킬" 은 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필, n-부틸, 이소-부틸, sec-부틸, 및 tert-부틸, 바람직하게 메틸, 에틸, 및 n-프로필, 가장 바람직하게는 에틸을 의미한다.

[0027] 화학식 (II) 의 화합물과 반응하여 소정의 거울상이성질체 과량의 화학식 (I) 의 화합물을 제공하는 "히드롤라아제" 에 대한 임의의 언급은 또한 히드롤라아제가 화학식 (II) 의 화합물과의 반응에서 소정의 거울상이성질체 과량의 화학식 (I) 의 화합물을 제공하기에 적합하다는 것을 의미한다.

[0028] 의심의 여지를 없애기 위해, 적어도 70% 의 화학식 (I) 의 화합물의 거울상이성질체 과량 (ee) 은 주어진 혼합물 또는 생성물에서 화학식 (I) 의 화합물과 그의 거울상이성질체 사이의 비가 85:15 이상임을 의미하고; 따라서, 적어도 96% 의 화학식 (I) 의 화합물의 거울상이성질체 과량 (ee) 은 주어진 혼합물 또는 생성물에서 화학식 (I) 의 화합물과 그의 거울상이성질체 사이의 비가 98:2 이상임을 의미한다.

[0029] 화학식 (II) 의 화합물은 65:35 와 35:65 사이의 비, 특히 55:45 와 45:55 사이의 비, 특히 52:48 과 48:52 사이의 비의 각각의 (S)-거울상이성질체 및 각각의 (R)-거울상이성질체의 임의의 혼합물을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. (S)-거울상이성질체 및 (R)-거울상이성질체를 1:1 비로 함유하는 라세미 혼합물이 가장 바람직하다.

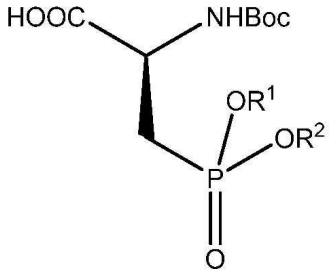
[0030] "화학식 (I) 의 화합물 또는 이의 염" 의 문맥에서 사용되는 용어 "염" 은, 카르복실산 작용기의 양성자가 화학식 (I) 의 화합물의 염을 형성하기에 적합한 양이온으로 대체된 화학식 (I) 의 화합물을 지칭한다. 적합한 양이온은 특히 110 g/mol 미만의 중량을 갖는 양이온이고, 특히 30 g/mol 이하의 중량을 갖는 금속 양이온이다.

화학식 (I) 의 화합물의 알칼리 금속 및 알칼리 토금속 염; 특히 화학식 (I) 의 화합물의 나트륨 및 칼륨 염 및 특히 나트륨 염이 바람직하다.

[0031] 2) 추가의 구현예는 히드롤라아제가 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, 프로테아제 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 및 DSM-D3 으로부터 선택되는 제 1) 구현예에 따른 방법에 관한 것이다.

[0032] 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, AH059, AH06 AH061, AH062, CL055, 및 CL067 은 상업적으로 입수가능한 효소이고 Almac 으로부터 입수할 수 있고; 프로테아제 M 은 상업적으로 입수가능하고 Amano Enzyme (특히, Amano Enzyme Manufacturing, Suqian City, Jiangsu Province, China) 로부터 입수할 수 있고; EU62 는 상업적으로 입수가능하고 Eucodis Bioscience 로부터 입수할 수 있고; DSM-A1, DSM-A2, DSM-A3, DSM-A6, DSM-B1, DSM-B2, DSM-B3, DSM-B6, DSM-C1, DSM-C2, DSM-C3, DSM-D2, 및 DSM-D3 은 상업적으로 입수가능한 효소이고 DSM Innosyn / Innosyn 으로부터 입수할 수 있다. 모든 효소는 또한 Almac 을 통해 얻을 수 있다.

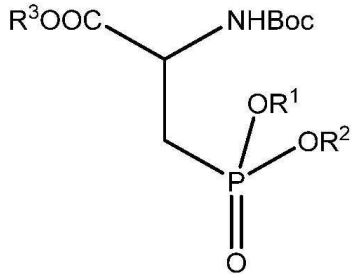
[0033] 3) 또다른 구현예에서, 본 발명은 화학식 (I) 의 화합물, 또는 이의 염의 제조 방법으로서:



[0034]

[0035] 화학식 (I)

[0036] 화학식 (II) 의 화합물을



[0037]

[0038] 화학식 (II)

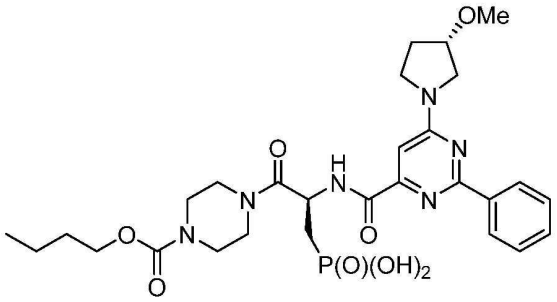
[0039] (식에서

[0040] R^1 및 R^2 는 서로 독립적으로 (C_{1-4})알킬 (특히 에틸) 을 나타내고;

[0041] R^3 은 메틸, 에틸 또는 n-프로필 (특히 에틸) 을 나타냄);

[0042] 히드롤라아제와 (여기서, 히드롤라아제는 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, 프로테아제 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 및 DSM-D3 으로부터 선택된다) 반응시키는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

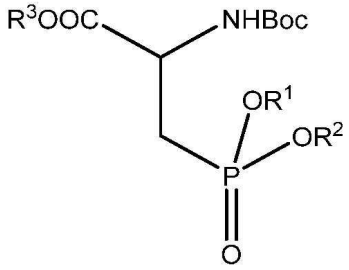
[0043] 4) 또다른 구현예에서, 본 발명은 셀라토그렐의 제조 방법으로서:



[0044]

[0045] 셀라토그렐

[0046] 화학식 (II) 의 화합물을



[0047]

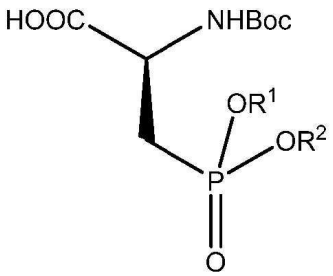
[0048] 화학식 (II)

[0049] (식에서

[0050] R^1 및 R^2 는 서로 독립적으로 (C_{1-4})알킬 (특히 에틸) 을 나타내고;

[0051] R^3 은 메틸, 에틸 또는 n-프로필 (특히 에틸) 을 나타냄);

[0052] 히드롤라아제와 반응시켜 적어도 70% 의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖는 화학식 (I) 의 화합물 또는 이의 염을 제공하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다:



[0053]

[0054] 화학식 (I)

[0055] 5) 추가의 구현예는 히드롤라아제가 AH012, AH016, AH017, AH018, AH022, AH023, AH025, AH027, AH028, AH032, AH034, AH035, AH036, AH041, AH042, AH044, AH047, AH048, AH051, AH052, AH055, AH059, AH061, 및 프로테아제 M 으로부터 선택되는, 구현예 1), 3) 또는 4) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0056] 6) 추가의 구현예는 히드롤라아제가 AH017, AH018, AH022, AH023, AH025, AH027, AH032, AH034, AH044, AH047, AH059, AH061, 및 프로테아제 M 으로부터 선택되는, 구현예 1), 3) 또는 4) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0057] 7) 추가의 구현예는 히드롤라아제가 AH018, AH022, AH023, AH027, AH034, AH044, AH047, 및 프로테아제 M 으로부터 선택되는, 구현예 1), 3) 또는 4) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0058] 8) 추가의 구현예는 히드롤라아제가 AH018, AH023, AH034, 및 프로테아제 M 으로부터 선택되는, 구현예 1), 3) 또는 4) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0059] 9) 추가의 구현예는 히드롤라아제가 프로테아제 M 으로부터 선택되는 구현예 1), 3) 또는 4) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0060] 프로테아제 M (특히 프로테아제 M-SD) 은 Amano Enzyme (특히 Amano Enzyme Manufacturing, Suqian City, Jiangsu Province, China) 로부터 상업적으로 입수가능하고, 발효를 통해 아스페르길루스 오리자에 (Aspergillus oryzae) 로부터 수득되고, 높은 프로테아제 및 펩티다제 활성을 갖는다. 프로테아제 M-SD 는 분무 건조된 프로테아제 M 을 지칭한다.

[0061] 10) 추가의 구현예는 적어도 85% 의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖는 화학식 (I) 의 화합물을 제공하는, 구현예 1) 내지 9) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0062] 11) 추가의 구현예는 적어도 96% 의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖는 화학식 (I) 의 화합물을 제공하는, 구현예 1) 내지 9) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0063] 12) 추가의 구현예는 적어도 99% 의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖는 화학식 (I) 의 화합물을 제공하는, 구현예 1) 내지 9) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0064] 13) 추가의 구현예는 R^1 및 R^2 가 서로 독립적으로 메틸, 에틸 또는 n-프로필 (특히 메틸 또는 에틸) 을 나타내는, 구현예 1) 내지 12) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0065] 14) 추가의 구현예는 R^1 및 R^2 가 메틸 및 에틸로부터 선택되는 동일한 알킬기를 나타내는, 구현예 1) 내지 12) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0066] 15) 추가의 구현예는 R^1 및 R^2 둘 모두가 에틸을 나타내는, 구현예 1) 내지 12) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0067] 16) 추가의 구현예는 R^3 이 메틸 또는 에틸을 나타내는, 구현예 1) 내지 15) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0068] 17) 추가의 구현예는 R^3 이 에틸을 나타내는, 구현예 1) 내지 15) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0069] 18) 추가의 구현예는 반응 (효소적 분할) 이 수용액에서 수행되는, 구현예 1) 내지 17) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0070] 효소적 분할은 유일한 용매로서 물 (특히 정제수 중에서) 중에서 또는 물과 적합한 유기 용매 (특히 MTBE, DMSO 또는 톨루엔) 의 용매 혼합물 중에서 수행될 수 있다. 유기 용매의 첨가는 용액의 점도를 감소시키는 유리한 효과를 갖는다.

[0071] 19) 추가의 구현예는 반응 (효소적 분할) 이 물과 MTBE, DMSO, 톨루엔 및 이의 임의의 혼합물로부터 선택되는 유기 용매의 혼합물 중에서 수행되는, 구현예 1) 내지 17) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0072] 20) 추가의 구현예는 반응 (효소적 분할) 이 물과 MTBE, DMSO 및 톨루엔으로부터 선택되는 유기 용매의 혼합물 중에서 수행되는, 구현예 1) 내지 17) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0073] 21) 추가의 구현예는 반응 (효소적 분할) 이 물과 MTBE 의 혼합물 중에서 수행되는, 구현예 1) 내지 17) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0074] 22) 추가의 구현예는 유기 용매의 양이 0 %v/v 와 20 %v/v 사이인, 구현예 18) 내지 21) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0075] 유기 용매의 양의 하한은 0 %v/v, 3 %v/v 및 5 %v/v 이고, 상한은 20 %v/v, 15 %v/v 및 10 %v/v 이다. 각각의 하한은 각각의 상한과 조합될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 하한 및 상한의 모든 조합이 본 명세서에서 구체적으로 개시될 것이다. 유기 용매의 양은 5%v/v 와 15%v/v 사이인 것이 바람직하다.

[0076] 23) 추가의 구현예는 반응 (효소적 분할) 이 5.2 와 8.4 사이의 25℃ 에서의 물 중 pKa 값을 갖는 완충제의 존

재하에서 수행되는, 구현예 18) 내지 22) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0077] 완충제의 pKa 값의 하한은 5.2, 5.5 및 6.2 이고, 상한은 8.4, 7.9 및 7.4 이다. 각각의 하한은 각각의 상한과 조합될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 하한 및 상한의 모든 조합이 본 명세서에서 구체적으로 개시될 것이다. 바람직하게는, 완충제는 포스페이트 완충제 및 카보네이트 완충제로부터 선택된다. 포스페이트 완충제가 특히 바람직하다.

[0078] 24) 추가의 구현예는 반응 (효소적 분할) 이 5.0 과 8.0 사이의 pH 값에서 수행되는, 구현예 18) 내지 23) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0079] pKa 값의 하한은 5.0, 6.0, 6.5 및 6.7 이고, 상한은 8.0, 7.4, 7.0 및 6.9 이다. 각각의 하한은 각각의 상한과 조합될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 하한 및 상한의 모든 조합이 본 명세서에서 구체적으로 개시될 것이다. 바람직하게는 pH 값은 6.5 와 7.0 사이, 특히 6.7 과 6.9 사이이다.

[0080] 25) 추가의 구현예는 염기의 첨가에 의한 반응 (효소적 분할) 동안 용액의 pH 값이 ± 0.2 (바람직하게는 0.1) 의 범위로 유지되는, 구현예 18) 내지 24) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0081] 염기는 반응 혼합물에 순차적으로 또는 연속적으로 첨가될 수 있다. 바람직하게는 염기는 수용액으로서, 특히 탄산칼륨의 수용액으로서 첨가된다. 용액의 pH 값이 6.6 과 7.0 사이 (가장 바람직하게는 6.7 과 6.9 사이) 의 범위에 있는 것이 바람직하다.

[0082] 26) 추가의 구현예는 반응 (효소적 분할) 이 10 ℃ 과 60 ℃ 사이의 온도에서 수행되는, 구현예 1) 내지 25) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0083] 반응 온도의 하한은 10 ℃, 15 ℃, 20 ℃, 및 25 ℃ 이고, 상한은 60 ℃, 40 ℃, 33 ℃, 및 30 ℃ 이다. 각각의 하한은 각각의 상한과 조합될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 하한 및 상한의 모든 조합이 본 명세서에서 구체적으로 개시될 것이다. 바람직하게는 반응 온도는 20 ℃ 와 33 ℃ 사이, 특히 25 ℃ 과 30 ℃ 사이이다.

[0084] 27) 추가의 구현예는 반응 (효소적 분할) 이 0.05% 와 100% 사이의 효소 부하량으로 수행되는, 구현예 1) 내지 26) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0085] 용어 "효소 부하량" 은 효소의 양 및 기질의 사용량, 즉 화학식 (II) 의 화합물의 사용량의 중량 비를 지칭한다. 예를 들어, 1% 의 효소 부하량은 1 g 의 화학식 (II) 의 화합물 당 10 mg 효소가 반응에 사용됨을 의미한다. 효소 부하량의 하한은 0.05%, 0.2%, 0.5% 및 0.8% 이고, 상한은 100%, 20%, 10% 및 2% 이다. 각각의 하한은 각각의 상한과 조합될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 하한 및 상한의 모든 조합이 본 명세서에서 구체적으로 개시될 것이다. 바람직하게는 효소 부하량은 0.2% 와 10% 사이, 특히 0.5% 와 2.0% 사이이다.

[0086] 28) 추가의 구현예는 반응 (효소적 분할) 이 반응 혼합물 중의 물 리터 (L) 당 5.0 g 과 물 리터 (L) 당 300 g 사이의 기질 부하량으로 수행되는, 구현예 1) 내지 27) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0087] 용어 "기질 부하량" 은 반응 혼합물 중 리터 단위의 물 부피 당, 사용된 그램 량의 기질, 즉 사용된 그램 량의 화학식 (II) 의 화합물을 지칭한다. 의심의 여지를 없애기 위해, 반응 초기에 물의 부피만 고려하되, 반응 과정 동안 pH 값을 일정하게 유지하기 위해 염기와 함께 첨가하는 물의 부피는 고려하지 않는다. 기질 부하량의 하한은 물 L 당 5.0 g 기질, 물 L 당 20 g 기질, 및 물 L 당 100 g 기질이고, 상한은 물 L 당 300 g 기질, 물 L 당 220 g 기질, 및 물 L 당 150 g 기질이다. 각각의 하한은 각각의 상한과 조합될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 하한 및 상한의 모든 조합이 본 명세서에서 구체적으로 개시될 것이다. 바람직하게는, 기질 부하량은 물 L 당 20 g 기질과 물 L 당 220 g 기질 사이이다.

[0088] 29) 추가의 구현예는 2가 금속 양이온의 염 (특히, 2가 금속 양이온의 클로라이드 염) 이 반응 혼합물에 첨가되는, 구현예 1) 내지 28) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0089] 2가 금속 양이온의 바람직한 염은 $ZnCl_2$, $FeCl_2$, $MnSO_4$, $CoCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, 및 $NiCl_2$ (특히 $ZnCl_2$, $FeCl_2$, 및 $MnSO_4$) 이다. 염은 0.5 mM 과 5.0 mM 사이 (특히 1.0 mM 과 3.0 mM 사이) 의 농도로 사용될 수 있다.

[0090] 30) 추가의 구현예는 반응 (효소적 분할) 의 반응 시간이 5 시간과 36 시간 사이인, 구현예 1) 내지 29) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0091] 용어 "반응 시간" 은, 예를 들어, 반응 혼합물을 유기 용매로 추출함으로써 워크업 절차를 시작할 때까지 반응 혼합물에 마지막 시약을 첨가하는 것 사이의 시간을 지칭한다. 반응 시간의 하한은 5 시간, 10 시간 및 18 시간이고, 상한은 36 시간, 28 시간 및 24 시간이다. 각각의 하한은 각각의 상한과 조합될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 하한 및 상한의 모든 조합이 본 명세서에서 구체적으로 개시될 것이다.

[0092] 31) 추가의 구현예는 반응 (효소적 분할) 의 반응 시간이 10 시간과 28 시간 사이인, 구현예 30) 에 따른 방법에 관한 것이다.

[0093] 32) 추가의 구현예는 pH 값을 7.4 와 9.0 사이 (특히 7.5 과 8.5 사이, 특히 7.6 과 8.0 사이) 로 조정하기 위한 염기의 수용액 (특히 탄산칼륨 수용액) 의 첨가; 유기 용매 (특히 MTBE) 의 첨가; 유기 및 수성 층의 분리; pH 값을 1.0 과 4.0 사이 (특히 1.2 와 2.0 사이, 특히 1.4 와 1.6 사이) 로 조정하기 위한 수성 층에 대한 산 (특히 염산) 의 수용액의 첨가; 및 침전된 화학식 (I) 의 화합물의 단리를 포함하는 방법에 의한 반응 혼합물의 워크업을 포함하는, 구현예 1) 내지 31) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0094] 33) 추가의 구현예는 2-프로판올로부터 화학식 (I) 의 화합물을 재결정화하는 추가 단계를 포함하는, 구현예 1) 내지 32) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0095] (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)-프로판산은 메탄올, 에탄올, 2-프로판올 또는 이들의 임의의 혼합물로부터 선택된 용매로부터 재결정화될 수 있다. 재결정화 용액은 최대 20%w/w 의 물을 함유할 수 있다. 바람직하게는 재결정화 용액은 5%w/w 미만의 물을 함유한다. 물의 존재가 더 낮은 수율을 초래하기 때문에, 재결정화에서의 물 함량은 가능한 한 낮은 것이 바람직하다. 재결정화는 단백질 (효소) 함량을 감소시키는 이점이 있다.

[0096] 용어 "메탄올, 에탄올, 2-프로판올 또는 이들의 임의의 혼합물로부터 선택된 용매" 는 용매가 메탄올, 에탄올, 2-프로판올, 또는 메탄올, 에탄올 및 2-프로판올 중 2 개 또는 3 개의 혼합물인 것을 의미한다. 용매가 혼합물인 경우, 용매는 메탄올, 에탄올 및 2-프로판올 중 2 개의 혼합물인 것이 바람직하다.

[0097] 34) 추가의 구현예는 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)-프로판산을 결정질 형태 (I) 로 제공하는, 구현예 1) 내지 33) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

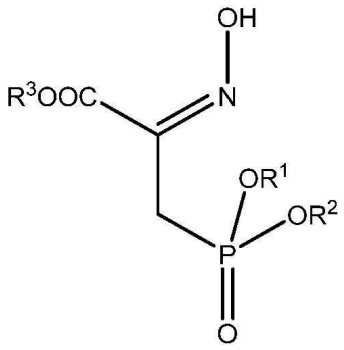
[0098] 35) 추가의 구현예는 결정질 형태 (I) 의 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산은 하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, 구현예 34) 에 따른 방법에 관한 것이다. 9.8°, 10.3° 및 17.5°.

[0099] 36) 추가의 구현예는 결정질 형태 (I) 의 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산은 하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, 구현예 34) 에 따른 방법에 관한 것이다. 9.8°, 10.3°, 16.2°, 17.5°, 및 27.3°.

[0100] 37) 추가의 구현예는 결정질 형태 (I) 의 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산은 하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, 구현예 34) 에 따른 방법에 관한 것이다. 9.8°, 10.3°, 12.5°, 16.2°, 17.5°, 20.7°, 22.4°, 24.2°, 24.7°, 및 27.3°.

[0101] 38) 추가의 구현예는 결정질 형태 (I) 의 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산은 도 2 에 도시된 바와 같은 중량측정 수분 수착 프로파일 (수착 사이클) 을 본질적으로 나타내는 것을 특징으로 하고, 여기서 중량측정 수분 수착 프로파일은 25℃ 에서 측정되는, 구현예 34) 내지 37) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

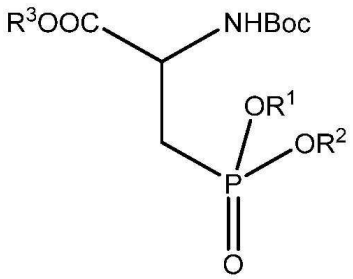
[0102] 39) 추가의 구현예는 화학식 (III) 의 화합물을



[0103]

[0104] 화학식 (III)

[0105] 챠콜 상의 팔라듐 및 Boc_2O 의 존재 하에 수소와 반응시켜 화학식 (II) 의 화합물을 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 구현예 1) 내지 38) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다:



[0106]

[0107] 화학식 (II)

[0108] (식에서

[0109] R^1 및 R^2 는 서로 독립적으로 (C_{1-4})알킬 (특히 에틸) 을 나타내고;

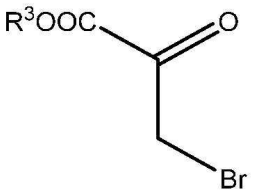
[0110] R^3 은 메틸, 에틸 또는 n-프로필 (특히 에틸) 을 나타냄).

[0111] 40) 추가의 구현예는 R^1, R^2 및 R^3 이 에틸을 나타내는, 구현예 39) 에 따른 방법에 관한 것이다.

[0112] 41) 추가의 구현예는 메탄올, 에탄올 및 2-프로판올 (특히 에탄올) 로부터 선택되는 용매 중에서 수행되는, 구현예 39) 또는 40) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0113] 42) 추가의 구현예는 수소화가 50 ℃ 와 70 ℃ 사이 (특히 55 ℃ 와 65 ℃ 사이) 의 온도에서 수행되는, 구현예 39) 내지 41) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

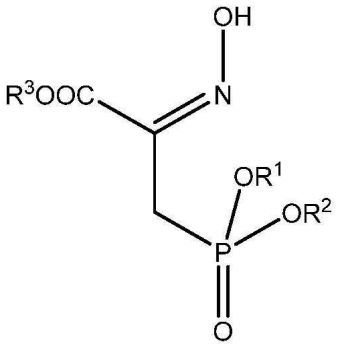
[0114] 43) 추가의 구현예는 화학식 (IV) 의 화합물을:



[0115]

[0116] 화학식 (IV)

[0117] 순차적으로 히드록실아민 히드로클로라이드 및 트리알킬포스파이트 (특히 트리에틸포스파이트) 와 반응시켜 화학식 (III) 의 화합물을 수득하는 단계를 추가로 포함하는, 구현예 1) 내지 42) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다:



[0118]

[0119] 화학식 (III)

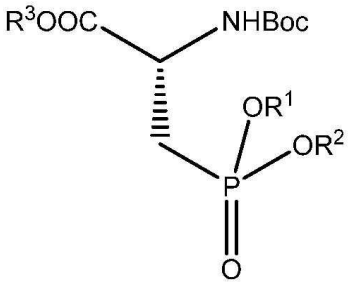
[0120] (식에서

[0121] R^1 및 R^2 는 서로 독립적으로 (C_{1-4})알킬 (특히 에틸) 을 나타내고;

[0122] R^3 은 메틸, 에틸 또는 n-프로필 (특히 에틸) 을 나타냄).

[0123] 44) 추가의 구현예는 R^1, R^2 및 R^3 이 에틸을 나타내는, 구현예 43) 에 따른 방법에 관한 것이다.

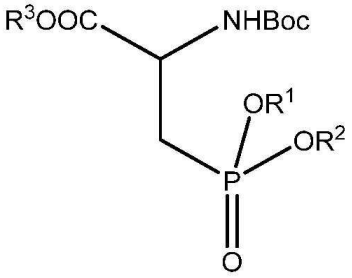
[0124] 45) 추가의 구현예는 화학식 (V) 의 화합물을:



[0125]

[0126] 화학식 (V)

[0127] 염기 (특히 NaOEt) 와 반응시켜 화학식 (II) 의 화합물을 제공하는 단계를 추가로 포함하고:



[0128]

[0129] 화학식 (II)

[0130] (식에서

[0131] R^1 및 R^2 는 서로 독립적으로 (C_{1-4})알킬 (특히 에틸) 을 나타내고;

[0132] R^3 은 메틸, 에틸 또는 n-프로필 (특히 에틸) 을 나타냄);

[0133] 여기서, 화학식 (V) 의 화합물은 적어도 80% 의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖고, 화학식 (II) 의 화합물은 10% 미만 (및 특히 2% 이하) 의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖는, 구현예 1) 내지 44) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0134] 본 명세서에, 특히 구현예 1) 내지 31) 에 개시된 화학식 (II) 의 화합물의 효소적 분할은 화학식 (I) 의 화합물 (특히 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산과 화학식 (V) 의 화합물 (특히 에틸 (S)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트) 의 혼합물에서 (미정제 반응 혼합물의 워크업 전에) 생성된다. 산 및 에스테르의 미정제 혼합물은 추출; 하나의 성분의 침전 또는 크로마토그래피와 같은 임의의 적합한 방법에 의해 분리될 수 있다. 특히, 산 및 에스테르의 미정제 혼합물은 7.4 초과의 pH 값을 갖는 수성 층 (산 함유) 과 유기 층(에스테르 함유) 사이의 분할에 의해 분리될 수 있다.

분할/추출을 위한 바람직한 유기 용매는 에테르 및 특히 MTBE 이다. 에스테르 (특히 에틸 (S)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)-프로파노에이트) 는 추출로부터 유기 용매의 제거에 의해 단리될 수 있고, 염기와 함께 재순환 절차에서 사용되어 효소적 분할에서 다시 사용될 수 있는 화학식 (II) 의 라세미 화합물 (특히 에틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트) 을 제공할 수 있다.

[0135] 46) 추가의 구현예는 화학식 (V) 의 화합물의 거울상이성질체 과량 (ee) 이 적어도 90% (특히 적어도 96%) 인, 구현예 45) 에 따른 방법에 관한 것이다.

[0136] 47) 추가의 구현예는 4% 미만 (특히 2% 이하) 의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 갖는 화학식 (II) 의 화합물을 제공하는, 구현예 45) 또는 46) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0137] 48) 추가의 구현예는 R^1 및 R^2 가 서로 독립적으로 메틸, 에틸 또는 n-프로필 (특히 메틸 또는 에틸) 을 나타내는, 구현예 45) 내지 47) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0138] 49) 추가의 구현예는 R^1 및 R^2 가 메틸 및 에틸로부터 선택되는 동일한 알킬기를 나타내는, 구현예 45) 내지 47) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0139] 50) 추가의 구현예는 R^1 및 R^2 둘 모두가 에틸을 나타내는, 구현예 45) 내지 47) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0140] 51) 추가의 구현예는 R^3 이 메틸 또는 에틸을 나타내는, 구현예 45) 내지 50) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0141] 52) 추가의 구현예는 R^3 이 에틸을 나타내는, 구현예 45) 내지 50) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0142] 53) 추가의 구현예는 반응 (라세미화) 이 디에틸에테르, MTBE, THF 또는 2-메틸-테트라히드로푸란으로부터 선택되는 용매 중에서 수행되는, 구현예 45) 내지 52) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0143] 54) 추가의 구현예는 반응 (라세미화) 이 MTBE 에서 수행되는, 구현예 45) 내지 52) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0144] 55) 추가의 구현예는 염기가 나트륨 에톡시드 (NaOEt) 및 칼륨 tert-부톡시드 (KOtBu) (특히 나트륨 에톡시드) 로부터 선택되는, 구현예 45) 내지 54) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0145] 56) 추가의 구현예는 염기 에탄올 중의 나트륨 에톡시드 (NaOEt) 의 용액인, 구현예 45) 내지 54) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0146] 57) 추가의 구현예는 염기의 양이 화학식 (V) 의 화합물의 양에 대해 0.1 eq 와 1.0 eq 사이 (특히 0.4 eq 와 0.8 eq 사이, 특히 0.5 eq 와 0.7 eq 사이) 인, 구현예 55) 내지 56) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0147] 58) 추가의 구현예는 반응 (라세미화) 이 0 ℃ 와 30 ℃ 사이 (특히 0 ℃ 와 10 ℃ 사이, 특히 0 ℃ 와 5 ℃ 사이) 의 반응 온도에서 수행되는, 구현예 45) 내지 57) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0148] 59) 추가의 구현예는 반응 (라세미화) 의 반응 혼합물 중의 물 함량이 ≤ 0.5 %v/v (특히 ≤ 0.2 %v/v, 특히 ≤ 0.1 %v/v) 인, 구현예 45) 내지 58) 중 어느 하나에 따른 방법에 관한 것이다.

[0149] 60) 본 발명의 또다른 구현예는 하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산의 결정질 형태 (결정질 형태 (I)) 에 관한

것이다: 9.8°, 10.3° 및 17.5°.

[0150] 구현예 60)에 따른 결정질 형태가 유리 형태 (즉, 비-염 형태)의 COMPOUND (당해 화합물)를 포함하는 것으로 이해된다. 게다가, 상기 결정질 형태는 비-배위된 및/또는 배위된 용매 (특히 비-배위된 및/또는 배위된 물 (coordinated water))를 포함할 수 있다. 배위 용매 (특히 배위된 물)는 본원에서 결정질 용매화물 (특히 결정질 수화물)에 대한 용어로서 사용된다. 의심을 피하기 위해, 이 출원에서 용어 "결정질 수화물"은 화학량론적 및 비-화학량론적 수화물 (특히 화학량론적 수화물)을 망라한다. 마찬가지로, 비-배위 용매는 본원에서 물리흡착된 또는 물리적으로 포착된 용매에 대한 용어로서 사용된다 (정의는 하기에 따름 Polymorphism in the Pharmaceutical Industry (Ed. R. Hilfiker, VCH, 2006), Chapter 8: U.J. Griesser: The Importance of Solvates).

[0151] 61) 본 발명의 또다른 구현예는 하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, 구현예 60)에 따른 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산의 결정질 형태 (결정질 형태 (I))에 관한 것이다: 9.8°, 10.3°, 16.2°, 17.5°, 및 27.3°.

[0152] 62) 본 발명의 또다른 구현예는 하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, 구현예 60)에 따른 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산의 결정질 형태 (결정질 형태 (I))에 관한 것이다: 9.8°, 10.3°, 12.5°, 16.2°, 17.5°, 20.7°, 22.4°, 24.2°, 24.7°, 및 27.3°.

[0153] 63) 본 발명의 또다른 구현예는 도 1 에 명시된 바와 같은 X-선 분말 회절 패턴을 본질적으로 보여주는, 구현예 60) 내지 62) 중 어느 하나에 따른 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산의 결정질 형태 (결정질 형태 (I))에 관한 것이다.

[0154] 64) 본 발명의 또다른 구현예는 DSC (특히 180℃ ± 1℃ 에서, 특히 180℃ 에서)에 의해 측정된 바와 같은 약 180℃ 에서의 흡열 피크를 특징으로 하는, 구현예 60) 내지 63) 중 어느 하나에 따른 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산의 결정질 형태 (결정질 형태 (I))에 관한 것이다.

[0155] 65) 본 발명의 또다른 구현예는 도 2 에 명시된 바와 같은 중량측정 수분 수착 프로파일 선 분말 회절 패턴을 본질적으로 보여주고, 중량측정 수분 수착 프로파일이 25℃ 에서 측정되는, 구현예 60) 내지 64) 중 어느 하나에 따른 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산의 결정질 형태 (결정질 형태 (I))에 관한 것이다.

[0156] 66) 본 발명의 또다른 구현예는 하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 결정질 형태 (결정질 형태 (A))에 관한 것이다: 10.2°, 11.3° 및 22.7°.

[0157] 구현예 66)에 따른 결정질 형태가 자유 형태 (비-염 형태)의 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트를 포함하는 것으로 이해된다. 게다가, 상기 결정질 형태는 비-배위된 및/또는 배위된 용매 (특히 비-배위된 및/또는 배위된 물 (coordinated water))를 포함할 수 있다. 배위 용매 (특히 배위된 물)는 본원에서 결정질 용매화물 (특히 결정질 수화물)에 대한 용어로서 사용된다. 의심을 피하기 위해, 이 출원에서 용어 "결정질 수화물"은 화학량론적 및 비-화학량론적 수화물 (특히 화학량론적 수화물)을 망라한다. 마찬가지로, 비-배위 용매는 본원에서 물리흡착된 또는 물리적으로 포착된 용매에 대한 용어로서 사용된다 (정의는 하기에 따름 Polymorphism in the Pharmaceutical Industry (Ed. R. Hilfiker, VCH, 2006), Chapter 8: U.J. Griesser: The Importance of Solvates).

[0158] 67) 본 발명의 또다른 구현예는 하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, 구현예 66)에 따른 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 결정질 형태 (결정질 형태 (A))에 관한 것이다: 10.2°, 11.3°, 13.2°, 22.7°, 및 22.9°.

[0159] 68) 본 발명의 또다른 구현예는 하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, 구현예 66)에 따른 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 결정질 형태 (결정질 형태 (A))에 관한 것이다: 10.2°, 11.3°, 13.2°, 13.8°, 15.2°, 20.5°, 22.7°, 22.9°, 25.3°, 및 26.6°.

[0160] 69) 본 발명의 또다른 구현예는 도 4 에 명시된 바와 같은 X-선 분말 회절 패턴을 본질적으로 보여주는, 구현예 66) 내지 68) 중 어느 하나에 따른 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 결정질 형태 (결정질 형태 (A))에 관한 것이다:

[0161] 70) 본 발명의 또다른 구현예는 하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 결정질 형태 (결정질 형태 (B)) 에 관한 것이다: 10.9°, 19.5° 및 27.2°.

[0162] 구현예 70) 에 따른 결정질 형태가 자유 형태 (비-염 형태) 의 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트를 포함하는 것으로 이해된다. 게다가, 상기 결정질 형태는 비-배위된 및/또는 배위된 용매 (특히 비-배위된 및/또는 배위된 물 (coordinated water)) 를 포함할 수 있다. 배위 용매 (특히 배위된 물) 는 본원에서 결정질 용매화물 (특히 결정질 수화물) 에 대한 용어로서 사용된다. 의심을 피하기 위해, 이 출원에서 용어 "결정질 수화물" 은 화학량론적 및 비-화학량론적 수화물 (특히 화학량론적 수화물) 을 망라한다. 마찬가지로, 비-배위 용매는 본원에서 물리흡착된 또는 물리적으로 포착된 용매에 대한 용어로서 사용된다 (정의는 하기에 따름 Polymorphism in the Pharmaceutical Industry (Ed. R. Hilfiker, VCH, 2006), Chapter 8: U.J. Griesser: The Importance of Solvates).

[0163] 71) 본 발명의 또다른 구현예는 하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, 구현예 70) 에 따른 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 결정질 형태 (결정질 형태 (B)) 에 관한 것이다: 10.9°, 18.2°, 19.5°, 27.2°, 및 29.5°.

[0164] 72) 본 발명의 또다른 구현예는 하기 굴절각 2Θ 에서 X-선 분말 회절도에서의 피크의 존재를 특징으로 하는, 구현예 70) 에 따른 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 결정질 형태 (결정질 형태 (B)) 에 관한 것이다: 10.9°, 18.2°, 19.5°, 19.8°, 25.3°, 27.2°, 29.5°, 33.0°, 34.7°, 및 36.9°.

[0165] 73) 본 발명의 또다른 구현예는 도 5 에 명시된 바와 같은 X-선 분말 회절 패턴을 본질적으로 보여주는, 구현예 70) 내지 72) 중 어느 하나에 따른 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 결정질 형태 (결정질 형태 (B)) 에 관한 것이다.

[0166] 의심의 여지를 피하기 위해, 상기 구현예 중 하나가 "X-선 분말 회절도에서 하기 굴절각 2Θ 에서의 피크" 를 나타낼 때마다, 상기 X-선 분말 회절 다이아그램은 조합된 Cu Kα1 및 Kα2 방사선을 사용하여 Kα2 스트리핑 없이 수득되고; 본원에 제공되는 2Θ 값의 정확도는 +/- 0.1-0.2° 범위에 있다고 이해될 것이다. 특히, 본 발명의 구현예 및 청구범위에서 피크에 대해 굴절각 2세타 (2Θ) 를 명시할 때, 제시된 2Θ 값은 상기 값 - 0.2° 내지 상기 값 + 0.2° (2Θ +/- 0.2°); 바람직하게는 상기 값 - 0.1° 내지 상기 값 + 0.1° (2Θ +/- 0.1°) 의 간격으로 이해될 것이다.

[0167] 예를 들어 X-선 분말 회절도에서 피크의 존재를 정의할 때, 통상의 접근법은 이를 S/N 비 (S = 신호, N = 잡음) 의 면에서 수행하는 것이다. 이 정의에 따르면, 피크가 X-선 분말 회절 다이어그램 내에 존재해야 한다고 진술한 경우에, X-선 분말 회절 다이어그램 내 피크가 x (x는 1 보다 큰 수치임) 보다 큰, 대개 2 보다 큰, 특히 3 보다 큰 S/N 비 (S = 신호, N = 노이즈) 를 가짐으로써 정의된다는 것이 이해된다.

[0168] 본 맥락에서 결정질 형태가 본질적으로 각각 도 1, 4 또는 5 에 도시된 바와 같은 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다는 언급에서, 용어 "본질적으로" 는 적어도 상기 도면에 도시된 다이어그램의 주요 피크, 즉 다이어그램에서 가장 강한 피크에 비해 20% 초과, 특히 10% 초과의 상대 강도를 갖는 것이 존재해야 한다는 것을 의미한다.
하지만, X-선 분말 회절의 당업자는 X-선 분말 회절 다이어그램 중의 상대 강도가 바람직한 배향 효과 (orientation effect) 로 인한 강한 강도 변동에 적용될 수 있다는 것을 인지하고 있다.

[0169] **본원에서 사용된 약어 및 용어**

[0170] 약어:

[0171] 명세서 및 실시예 전체에 걸쳐 하기의 약어가 사용된다:

[0172] Ac 아세틸

[0173] AcCN 아세토니트릴

[0174] AcOH 아세트산

[0175] (L-)Ala (L-)알라닌

[0176] aq 수성

[0177] Boc tert.-부틸옥시카르보닐

[0178] DSC 시차 주사 열량측정

[0179] ee 거울상이성질체 과량

[0180] eq. 당량(들)

[0181] Et 에틸

[0182] EtOH 에탄올

[0183] GVS 중량측정 증기 수착

[0184] h 시간(들)

[0185] HPLC 고성능 액체 크로마토그래피

[0186] IPA 2-프로판올

[0187] JT 자켓 온도

[0188] M 몰농도 (molarity)/몰 농도

[0189] Me 메틸

[0190] min 분(들)

[0191] MTBE 메틸-tert-부틸 에테르

[0192] NaOEt 나트륨 에톡시드

[0193] PDA 포토다이오드-어레이 검출기

[0194] RBF 둥근 바닥 플라스크

[0195] rpm 분 당 회전수

[0196] rt 체류 시간

[0197] RT 실온

[0198] THF 테트라히드로푸란

[0199] TFA 트리플루오로아세트산

[0200] vol 1 vol 은 1 kg 기준 출발 물질 당 1 L 용매를 의미한다

[0201] % a/a 면적비로 측정된 백분율 (%)

[0202] **실험 부분**

[0203] X-선 분말 회절 분석 (XRPD)

[0204] X-선 분말 회절 패턴은 반사 모드 (커플링된 2 개의 Theta/Theta) 에서 작동된 Lynxeye 검출기가 장착된 Bruker D8 Advance X-선 회절계로 수집하였다. 전형적으로, Cu X-선 튜브를 40kV/40mA 에서 실행시켰다. 단계 크기 0.02° (2Θ) 및 단계 시간 0.04 sec 를 주사 범위 2Θ 에서 3 - 50° 에 걸쳐 단계 당 적용하였다. 발산 슬릿은 고정된 샘플 조명 (가변 슬릿 크기) 으로 설정하고, 산란방지 슬릿은 0.3° 로 설정하였다. 0.5 mm 의 깊이를 갖는 규소 단일 결정 샘플 홀더에 분말을 약간 압축하고, 측정 동안 샘플을 그의 고유 면에서 회전시켰다. 회절 데이터는 Cu Kα (λ = 1.5418 Å) 방사선을 사용하여 보고된다. 본원에 주어진 바와 같은 2Θ 값의 정확도는 +/- 0.1-0.2° 의 범위에 있는데, 이는 일반적으로 종래 기록된 X-선 분말 회절 패턴에 대한 경우와 같다.

[0205] 시차 주사 열량측정 (DSC)

[0206] DSC 데이터를, 34 개 위치 오토-샘플러가 장착된 Mettler Toledo STARe System (DSC3 모듈, 세라믹 센서 및 STAR 소프트웨어 version 16.00b 을 가진 측정 셀) 에서 수집하였다. 기구를 인증된 인듐을 사용하여 에너지 및 온도에 대해 교정하였다. 전형적으로, 자동 관통된 알루미늄 팬에 있는 1 내지 5 mg 의 각각의 샘플

을 10℃ min^{-1} 에서 가열했으며, 달리 명시되지 않는 한 -20℃ 에서 250℃ 까지 가열하였다. 20 mL min^{-1} 에서의 질소 퍼지를 샘플에 걸쳐 유지하였다. 피크 온도가 용융점에 대해서 기록된다.

[0207] 중량측정 증기 수착 (Gravimetric vapour sorption) (GVS) 분석

[0208] 25℃ 에서의 스테핑 모드 (stepping mode) 로 작동하는 멀티 샘플 기구 SPS-100n (ProUmid GmbH, Ulm, Germany) 상에서, 측정을 수행하였다. 샘플을 단계 당 24 시간의 최대 평형 시간을 가진 사전-정의된 습도 프로그램 (40-0-95-40% RH, 5% DRH 의 단계) 을 시작하기 전, 40% RH 에서 평형을 이루도록 하였다. 약 20 내지 30 mg 의 각각의 샘플을 사용하였다. European Pharmacopeia Technical Guide (1999, page 86), 예를 들어 수분 수착성이 아님: 질량 증가가 2% 질량/질량 미만임; 약간 수분 수착성: 질량 증가가 2% 질량/질량 미만 내지 0.2% 질량/질량 이상임; 수분 수착성: 질량 증가가 15% 질량/질량 미만 내지 2% 질량/질량 이상임) 에 따라 수분 수착성 분류를 수행하였다. 제 1 흡착 스캔에서 40% 상대 습도와 80% 상대 습도 간의 질량 변화가 간주된다.

[0209] 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC):

[0210] HPLC (방법 1):

[0211] HPLC 시스템: Agilent 1260 시리즈 시스템

[0212] 흐름: 1.0 mL/분

[0213] 컬럼 온도: 30℃

[0214] 오토샘플러 온도: RT

[0215] 주입 부피: 5 μL

[0216] 컬럼: Zorbax SB-Aq, 150 x 4.6 mm, 3.5 μm

[0217] 검출 파장 (UV): 210 nm

[0218] 용매 A: 10 mM aq. K_2HPO_4 용액 (85% 인산으로 pH 7.0 으로 조정됨)

[0219] 용매 B: AcCN

[0220] 구배:

[0221]

시간 (분)	% 용매 A	% 용매 B
0.0	90	10
20.0	30	70
20.1	90	10
25.0	90	10

[0222] HPLC (방법 2):

[0223] HPLC 시스템: Agilent 1260 시리즈 시스템

[0224] 흐름: 1.0 mL/분

[0225] 컬럼 온도: 30℃

[0226] 오토샘플러 온도: RT

[0227] 주입 부피: 5 μL

[0228] 컬럼: Zorbax SB-Aq, 150 x 4.6 mm, 3.5 μm

[0229] 검출 파장 (UV): 210 nm

[0230] 용매 A: 10 mM aq. K_2HPO_4 용액 (85% 인산으로 pH 7.0 으로 조정됨)

[0231] 용매 B: AcCN

[0232] 구배:

시간 (분)	% 용매 A	% 용매 B
0.0	90	10
20.0	30	70
25.0	30	70
25.1	90	10
33.0	90	10

[0233]

[0234] HPLC (방법 3):

[0235] HPLC 시스템: Agilent 1260 시리즈 시스템

[0236] 흐름: 1.0 mL/분

[0237] 컬럼 온도: 40℃

[0238] 오토샘플러 온도: RT

[0239] 주입 부피: 5 μL

[0240] 컬럼: Atlantis T3, 150 x 4.6 mm, 3 μm

[0241] 검출 파장 (UV): 215 nm

[0242] 용매 A: H_3PO_4 의 수용액 (1% v/v)

[0243] 용매 B: AcCN

[0244] 구배:

시간 (분)	% 용매 A	% 용매 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

[0245]

[0246] 키랄 SFC:

[0247] 키랄 HPLC (방법 1):

[0248] HPLC 시스템: Agilent 1260 시리즈 시스템

[0249] 흐름: 0.9 mL/분

[0250] 컬럼 온도: 27℃

[0251] 오토샘플러 온도: RT

[0252] 주입 부피: 20 μL

[0253] 컬럼: Chiralpak IC-3, 250 x 4.6 mm, 3 μm

[0254] 검출 파장 (UV): 215 nm

[0255] 실행 시간 45 min

[0256] 이동상 0.05%TFA-AcCN/0.05%TFA-H_2O = 30/70

[0257] 키랄 HPLC (방법 2):

[0258] 흐름: 1 mL/분

[0259] 컬럼 온도: 35℃

[0260] 샘플 온도: 35℃

[0261] 주입 부피: 30 μL

[0262] 컬럼: Chiralpak IC, 250 x 4.6 mm, 5 μm

[0263] 검출 파장 (UV): 220 nm

[0264] 실행 시간 40 min

[0265] 이동상 헵탄 중 20% EtOH (+ 0.1% TFA)

[0266] 키랄 HPLC (방법 3):

[0267] 흐름: 1 mL/분

[0268] 컬럼 온도: 25℃

[0269] 샘플 온도: 25℃

[0270] 주입 부피: 30 μL

[0271] 컬럼: Chiralpak IC-3, 250 x 4.6 mm, 5 μm

[0272] 검출 파장 (PDA): 215 nm

[0273] 실행 시간 32 min

[0274] 이동상 70: 30 물 (0.05% TFA) : CH_3CN (0.05% TFA)

[0275] **실시예 1:**

[0276] 메틸 3-브로모-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 합성:

[0277] 히드록실아민 히드로클로라이드 (81.4 kg) 및 물 (460 kg) 을 반응기에 충전하고, 에틸 3-브로모-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 종자 (69.0 g) 를 첨가하였다. 혼합물을 20 내지 25℃ 에서 0.5 시간 동안 교반하고, 에틸 3-브로모-2-옥소프로파노에이트 (230 kg, 1.0 eq.) 를 20 내지 25℃ 에서 1 시간에 걸쳐 첨가하였다. 반응 혼합물을 2 내지 3 시간 동안 교반하고, 톨루엔 (905 kg) 을 첨가하고, 혼합물을 20 내지 25℃ 에서 4 내지 5 시간 동안 교반하였다. 층을 분리하고, 유기층에 물 (368 kg) 을 첨가하고, 혼합물을 20 내지 25℃ 에서 0.5 시간 동안 교반하고, 층을 분리하였다. 유기층을 45 내지 50℃ (재킷 온도) 에서 1.0 내지 2.0 vol. 로 농축시키고 45 내지 50℃ (내부 온도) 로 가온하였다. 에틸 3-브로모-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 종자 (138 g) 를 첨가하고, 혼합물을 45 내지 50 ℃ 에서 0.5 시간 동안 교반하고, n-헵탄 (840 kg) 을 2 내지 4 시간 내에 45 내지 50 ℃ 에서 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 6 내지 8시간 내에 0 내지 5℃ 로 냉각하고, 0 내지 5℃ 에서 4 내지 5 시간 동안 교반하고, 원심분리하였다. 고체를 n-헵탄 (88.4 kg) 으로 세척하고, 30 내지 35℃ 에서 24 시간 동안 진공 하에 건조시켜 생성물 (136 kg) 을 수득하였다.

[0278] **실시예 2:**

[0279] 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 합성:

[0280] 트리에틸포스파이트 (129 kg, 1.2 eq.) 및 n-헵탄 (223 kg) 을 반응기에 충전하고 내부 온도를 70 내지 75℃ 로 조절하였다. 에틸 3-브로모-2-(히드록시이미노)프로파노에이트 (136 kg, 1.0 eq.) 를 이소프로필 아세테이트 (285 kg) 에 20 내지 25℃ 에서 용해시킨 후, 용액을 70 내지 75℃ 에서 2 내지 4 시간 동안 천천히 반응물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 70 내지 75℃ 에서 10 내지 12시간 동안 교반하고, 20 내지 25℃ 로 냉각시켰다. 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트의 종자 (81.3 g) 를 혼합물에 20 내지 25 ℃ 에서 첨가하고, 혼합물을 1 내지 2 시간 동안 교반하고, n-헵탄 (461 kg) 을 1 내지 2 시간 내에 20 내지 25 ℃ 에서 첨가하였다. 혼합물을 0 내지 5℃ 로 냉각하고, 2 내지 3 시간 동안 교반하고, 원심분리하였다.

수득된 고체를 n-헵탄 (184 kg) 으로 세척하고, 20 내지 25 ℃ (JT) 에서 24 시간 동안 진공 하에 건조시켜 생성물 (150 kg) 을 수득하였다. 용매의 정확한 양, 결정화 공정 및 시딩 동안의 온도 프로파일에 따라, 생성물은 결정질 형태 (A) 또는 결정질 형태 (B) 로 수득된다.

[0281] 표 1: 결정질 형태 (A) 의 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)-프로파노에이트에 대한 특성화 데이터

기술	데이터 요약	참고사항
XRPD	결정질	도 4 및 도 5 참고
순도, HPLC (방법 1)	99.6% rt = 8.3 min	

[0282]

[0283] **실시예 3:**

[0284] 에틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로파노에이트의 합성:

[0285] 에틸 3-(디에톡시포스포릴)-2-(히드록시이미노)프로파노에이트 (105 kg, 1.0 eq.), EtOH (158 kg) 및 THF (116 kg, 1.2 eq.) 중 90% Boc_2O 를 2000 L 오토클레이브에 충전하였다. 20% Pd/C (2.62 kg) 및 EtOH (131 kg) 의 혼합물을 용기에서 제조하고, 오토클레이브에 첨가하였다. 용기를 EtOH (105 kg) 로 세척하고, EtOH 를 오토클레이브에 첨가하였다. 오토클레이브 내 압력을 50 내지 100 mbar 로 감소시키고, 질소로 0.2 MPa 로 증가시키고, 과정을 3 회 반복하였다. 오토클레이브 내의 압력을 50 로 100 mbar 로 감소시켰다. 이어서, 오토클레이브 내의 압력을 수소로 0.2 MPa 로 증가시키고, 0.02 MPa 로 감소시키고, 과정을 3 회 반복하였다. 혼합물을 오토클레이브를 0.5 내지 1.0 시간 내에 0.4 내지 0.5 MPa 로 가압하면서 55 내지 65℃ 로 가온하였다. 오토클레이브를 1.4 내지 1.5 MPa 로 가압하고, 혼합물을 55 내지 65℃ 에서 1.0 시간 동안 교반하였다. 수소 공급을 중단하고, 혼합물을 20 내지 25℃ 로 냉각하였다. 오토클레이브 내의 압력을 0.02 MPa 로 감소시켰다. 오토클레이브 내 압력을 질소로 0.2 MPa 로 증가시키고, 0.02 MPa 로 감소시키고, 과정을 3 회 반복하였다. 오토클레이브 내 압력을 수소로 0.2 MPa 로 증가시키고, 0.02 MPa 로 감소시키고, 과정을 3 회 반복하였다. 혼합물을 오토클레이브를 0.5 내지 1.0 시간 내에 0.4 내지 0.5 MPa 로 가압하면서 55 내지 65℃ 로 가온하였다. 오토클레이브를 1.4 내지 1.5 MPa 로 가압하고, 혼합물을 55 내지 65℃ 에서 6.0 시간 동안 교반하였다. 수소 공급을 중단하고, 혼합물을 20 내지 25℃ 로 냉각하였다. 오토클레이브 내의 압력을 0.02 MPa 로 감소시켰다. 오토클레이브 내 압력을 질소로 0.2 MPa 로 증가시키고, 0.02 MPa 로 감소시키고, 과정을 3 회 반복하였다. 오토클레이브 내 압력을 수소로 0.2 MPa 로 증가시키고, 0.02 MPa 로 감소시키고, 과정을 3 회 반복하였다. 혼합물을 오토클레이브를 0.5 내지 1.0 시간 내에 0.4 내지 0.5 MPa 로 가압하면서 55 내지 65℃ 로 가온하였다. 오토클레이브를 1.4 내지 1.5 MPa 로 가압하고, 혼합물을 55 내지 65℃ 에서 4.0 시간 동안 교반하였다. 수소 공급을 중단하고, 혼합물을 20 내지 25℃ 로 냉각하였다. 오토클레이브 내의 압력을 0.02 MPa 로 감소시키고, 질소로 0.2 MPa 로 증가시키고, 과정을 3 회 반복하였다. 압력을 방출시키고, 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였다. 케이크를 EtOH (105 kg) 로 세척하고, 용액을 45 내지 55℃ (재킷 온도) 에서 농축 건조시켰다. 잔류물에 MTBE (210 kg) 를 첨가하고, 혼합물을 45 - 55 ℃ (재킷 온도) 에서 농축 건조시키고, 공정을 2 회 반복하였다. 잔류물을 MTBE (68.3 kg) 에 용해시키고, 용액을 20 내지 30 ℃ 에서 0.5 시간 동안 교반하였다. MTBE 중 에틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로파노에이트의 용액을 다음 단계에 사용하였다.

[0286] HPLC (방법 2): rt = 13.6 min

[0287] **실시예 4:**

[0288] (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로파노산의 합성:

[0289] 3000 L 반응기에, KH_2PO_4 (19.4 kg) 를 물 (1403 kg) 에 25 내지 30 ℃ 에서 용해하였다. K_2CO_3 수용액 (20%) 을 25 내지 30℃ 에서 혼합물에 첨가하여 pH 값을 6.7 내지 6.9 로 조절하였다. 별도의 용기에서, 에

틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트 (281 kg) 를 25 내지 30 ℃ 에서 MTBE (135 kg) 에 용해시키고, 반응기에 첨가하였다. 용기를 MTBE (30.9 kg) 로 세척하고, 세척액을 반응 혼합물에 첨가하였다. 프로테아제 M-SD (3.1 kg, 분무 건조된 형태의 프로테아제 M, Amano) 를 물 (31.0 kg) 에 용해시키고, 25 내지 30 ℃ 에서 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 25 내지 30℃ 에서 24 내지 36 시간 동안 교반하고, K_2CO_3 수용액 (20%) 을 첨가하여 pH 값을 6.7 내지 6.9 로 유지하였다. 이어서, K_2CO_3 수용액 (20%) 을 혼합물에 첨가하여 pH 를 7.6 내지 8.0 으로 조정하였다. MTBE (1044 kg) 및 셀라이트 (6.2 kg) 를 25 내지 30 ℃ 에서 혼합물에 첨가하고 혼합물을 0.5 시간 동안 교반하였다. 수득된 현탁액을 여과하고, 필터 케이크를 MTBE (64.5 kg) 및 물 (84.2 kg) 로 세척하였다. 층을 분리하고, 유기 층 (잔여 에스테르를 함유함) 을 따로 두었다. 수성층을 MTBE (각각 1044 kg 및 519 kg) 로 2 회 추출하고 10 내지 20 ℃ 로 냉각하고 수성 HCl (18.2%) 을 적가하여 pH 를 1.4 내지 1.6 으로 조절하여 산성화하였다. 수득된 현탁액을 1 내지 2 시간 동안 -2 내지 +2 ℃ 로 냉각시키고, 0.5 시간 동안 추가로 교반하고, 원심분리하였다. 수득된 고체에 물 (421 kg) 을 첨가하고, 현탁액을 0 내지 10 ℃ 에서 0.5 내지 1.0 시간 동안 교반하였다. 원심분리 후, 습윤 고체를 냉수 (211 kg) 로 세척하고, 70 내지 75 ℃ 에서 2-프로판올 (IPA) (842 kg) 에 용해시켰다. 수득된 현탁액을 여과하고, 반응기를 고온 IPA (421 kg) 로 세척하고, 수합한 여과액을 40 내지 50℃ 에서 약 2 vol. 로 농축시켰다. 여과액을 70 내지 75℃ 로 가온하고 0.5 시간 동안 교반하고, 2 내지 3 시간 동안 -10 내지 -15℃ 로 냉각하고, 1 시간 동안 교반하였다. 수득된 현탁액을 원심분리하여 흰색 고체를 얻고, 이를 35 내지 40 ℃ (JT) 에서 24 시간 동안 진공 건조하고, 질소 분위기 하에서 20 내지 30 ℃ 로 냉각하여 결정질 형태 (I) 의 생성물 (105 kg) 을 얻었다.

[0290] 표 2: 결정질 형태 (I) 의 (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로판산에 대한 특성화 데이터

기술	데이터 요약	참고사항
XRPD	결정질	도 1 참고
1H-NMR (400MHz, 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)	
순도, HPLC (방법 3)	99.5% rt = 17.9 min	
키랄 순도, 키랄 HPLC (방법 1)	99.9 % rt = 5.3 min ((S)-이성질체: rt = 6.3 min)	
GVS, 25°C 에서	흡습성 아님	도 2 참고
DSC	융점: T = 180 ± 2 °C	도 3 참고

[0291]

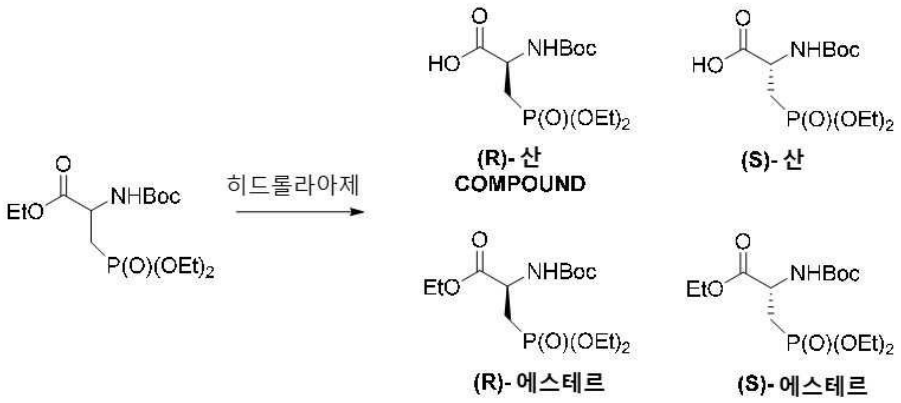
[0292] **실시예 5:**

[0293] 에틸 (S)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트 (실시예 4 로부터의 부산물) 의 라세미화 ("재순환"):

[0294] MTBE 중 에틸 (S)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트 (출발 물질 및 MTBE 의 총 중량: 570 kg) 의 용액을 반응기에 충전하고, 40 내지 50℃ 에서 진공 하에 1.0 내지 1.5 vol. 로 농축시켰다. MTBE (1381 kg) 를 첨가하고 40 내지 50 ℃ 에서 1.0 내지 1.5 vol. 로 진공 농축시켰다. MTBE (1381 kg) 를 다시 첨가하고 진공에서 40 내지 50 ℃ 에서 1.0 내지 1.5 vol. 로 농축하였다. 혼합물에 MTBE (262 kg) 를 첨가하고 0 내지 5 ℃ 에서 15 분 동안 교반하였다. EtOH (146 kg) 중 NaOEt 의 20% 용액을 0 내지 5℃ 에서 1 내지 2 시간 내에 적가하고 용액을 0 내지 5℃ 에서 추가로 0.5 내지 1 시간 동안 교반하였다. AcOH (30.4 kg) 를 천천히 첨가하고, 혼합물을 0.5 시간 동안 교반하고, MTBE (829 kg) 및 포화 수성 $NaHCO_3$ (829 kg) 을 10 내지 20 ℃ 에서 첨가하고, 혼합물을 0.5 시간 동안 교반하였다. 층을 분리하

고, 유기층을 건조상태로 농축하고, 잔류물을 MTBE (140 kg) 에 용해시켜 실시예 4 에 따른 효소 라세미 분해에 사용될 수 있는 MTBE 중 에틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트 (201 kg 미정제 생성물) 의 용액을 수득하였다.

[0295] **실시예 6:** 효소 스크리닝



[0296]

[0297] 193 개의 히드롤라아제 효소를 하기 절차에 따라 스크리닝하였다:

[0298] 각각의 효소 (10 mg 의 동결건조된 효소 분말 또는 30 μL 액체 효소 또는 10 mg 고정화된 효소) 를 포스페이트 완충액 (500 μL, 0.1 M, pH 7.0) 에 용해시키고, MTBE (37.5 μL) 중 에틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트 (10 mg) 의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 25℃ 에서 20 시간 동안 210 rpm 으로 진탕하고, 수성 HCl (60 μL, 2 M) 을 사용하여 pH 1-2 로 조정하고, MTBE (3 x 0.7 mL) 로 추출하였다. 용액을 진공에서 농축시키고, 잔류물을 EtOH (0.8 mL) 에 녹이고, 여과하고, 키랄 HPLC (방법 2) 에 의해 분석하였다; 체류 시간: (R)-산: rt = 9.1 min; (S)-산: rt = 23.8 min; (R)-에스테르: rt = 13.7 min; (S)-에스테르: rt = 29.8 min.

[0299] 표 3: 효소 스크리닝 결과 (데이터는 80% 이상의 산의 거울상이성질체 과량 (ee) 을 생성하는 실험에 대해 주어짐); 주어진 양은 키랄 HPLC (방법 2) 를 기준으로 %a/a 이다:

공급처	효소	코드	(R)-산 [%a/a]	(R)-에스테르 [%a/a]	(S)-산 [%a/a]	(S)-에스테르 [%a/a]
Almac	미생물 히드롤라아제	AH002	8.8	37.9	0.7	52.6
Almac	미생물 히드롤라아제	AH008	25.4	15.6	0.3	58.6
Almac	미생물 히드롤라아제	AH012	39.1	0.9	1.3	58.7
Almac	미생물 히드롤라아제	AH016	19.8	20.9	0.2	59.0
Almac	미생물 히드롤라아제	AH017	39.0	0.1	3.6	57.3
Almac	미생물 히드롤라아제	AH018	35.7	2.2	0.5	61.6
Almac	미생물 히드롤라아제	AH019	39.0	0.1	1.1	59.7
Almac	미생물 히드롤라아제	AH022	38.2	0.3	0.8	60.7
Almac	미생물 히드롤라아제	AH023	45.0	1.4	1.7	51.9
Almac	미생물 히드롤라아제	AH025	38.0	0.6	0.9	60.4
Almac	미생물 히드롤라아제	AH027	37.5	1.5	0.9	60.2
Almac	미생물 히드롤라아제	AH028	34.2	0.7	0.2	65.0
Almac	미생물 히드롤라아제	AH032	36.4	0.1	0.4	63.1

[0300]

Almac	미생물 히드롤라아제	AH034	43.9	0.5	0.4	55.2
Almac	미생물 히드롤라아제	AH035	33.1	8.8	0.5	57.6
Almac	미생물 히드롤라아제	AH036	34.6	9.1	0.5	55.8
Almac	미생물 히드롤라아제	AH037	8.9	39.3	0.3	51.5
Almac	미생물 히드롤라아제	AH041	42.4	0.7	1.7	55.2
Almac	미생물 히드롤라아제	AH042	21.2	20.4	0.5	57.9
Almac	미생물 히드롤라아제	AH044	41.6	0.1	1.2	57.1
Almac	미생물 히드롤라아제	AH045	26.8	12.1	1.2	59.9
Almac	미생물 히드롤라아제	AH047	40.3	0.5	1.3	58.0
Almac	미생물 히드롤라아제	AH048	28.5	16.8	0.5	54.2
Almac	미생물 히드롤라아제	AH051	34.7	9.6	0.8	54.8
Almac	미생물 히드롤라아제	AH052	17.1	26.7	0.2	55.9
Almac	미생물 히드롤라아제	AH055	37.2	0.7	0.9	61.3
Almac	미생물 히드롤라아제	AH056	20.5	21.3	1.2	57
Almac	미생물 히드롤라아제	AH057	44.6	0.1	3.2	52.1
Almac	미생물	AH059	38.8	0.0	0.8	60.4

[0301]

	히드롤라아제					
Almac	미생물 히드롤라아제	AH060	9	38.3	0.3	52.3
Almac	미생물 히드롤라아제	AH061	39.1	0.1	0.9	60
Almac	미생물 히드롤라아제	AH062	42	0.9	2.5	54.5
Almac	미생물 히드롤라아제	CL055	41.1	1	1.2	56.7
Almac	미생물 히드롤라아제	CL067	40.8	0.5	0.7	58.1
Amano	아스페르길루스 오리자에로부터의 프로테아제	프로테아제 M	38.2	1.1	1.6	59.1
Eucodis	미생물 히드롤라아제	EU62	30.8	8.3	0.6	60.2
DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-A1	41.1	0.1	4.6	54
DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-A2	19.5	24.7	1.1	54.7
DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-A3	35.5	4.8	0.6	59.1
DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-A6	33.2	7.5	1.1	58.1
DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-B1	38.9	1.2	0.8	59

[0302]

DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-B2	39.1	0.7	0.9	59.3
DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-B3	29.7	11.3	1.3	57.7
DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-B6	9.8	37.7	1	51.5
DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-C1	33.6	6.9	0.4	59.2
DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-C2	28	11.7	1.17	59.1
DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-C3	39.1	0.14	1.08	59.7
DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-D2	9.7	35.7	0.4	54.2
DSM Innosyn	돼지 간 에스테라제 변이체	DSM-D3	14.2	29.4	0.1	56.3

[0303]

[0304] **실시예 7:** 효소 부하량 및 공용매의 사용의 최적화

[0305] 조건 A:

[0306] 각각의 효소 (5 mg 의 동결건조된 효소 분말) 를 포스페이트 완충액 (250 μL, 0.1 M, pH 7.0) 에 용해시키고, MTBE (12.5 μL) 중 에틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트 (5 mg) 의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 30℃ 에서 20 시간 동안 250 rpm 으로 진탕시키고, 후처리 조건에 따라 추가로 처리하였다.

[0307] 조건 B:

[0308] 포스페이트 완충액 (119 μL, 0.1 M, pH 7.0) 중의 각각의 효소 (0.5 mg) 의 스톡 용액을 포스페이트 완충액 (119 μL, 0.1 M, pH 7.0) 으로 용해시키고, MTBE (12.5 μL) 중 에틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트 (5 mg) 의 용액을 첨가하였다. 혼합물을 30℃ 에서 20 시간 동안 250 rpm 으로 진탕시키고, 후처리 조건에 따라 추가로 처리하였다.

[0309] 조건 C:

[0310] 포스페이트 완충액 (119 μL, 0.1 M, pH 7.0) 중의 각각의 효소 (0.5 mg) 의 스톡 용액을 포스페이트 완충액 (131 μL, 0.1 M, pH 7.0) 중의 에틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트 (5 mg) 의 용액으로 처리하였다. 혼합물을 30℃ 에서 20 시간 동안 250 rpm 으로 진탕시키고, 후처리 조건에 따라 추가로 처리하였다.

[0311] 조건 D:

[0312] 포스페이트 완충액 (0.1 M, pH 7.0) 및 MTBE (5% 총 부피) 중 에틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트 (25 mg/mL 용매) 및 각각의 효소 (에스테르에 대해 1 중량%) 의 용액을 30℃ 에

서 18 시간 동안 250 rpm 에서 진탕하고 워크업 조건에 따라 추가로 처리하였다.

[0313] 조건 E:

[0314] 포스페이트 완충액 (0.1 M, pH 7.0) 및 MTBE (5% 총 부피) 중 에틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트 (100 mg/mL 용매) 및 각각의 효소 (에스테르에 대해 1 중량%) 의 용액을 30℃ 에서 18 시간 동안 250 rpm 에서 진탕하고 워크업 조건에 따라 추가로 처리하였다.

[0315] 워크업 조건:

[0316] 각각의 바이알에 MTBE (1 mL), 이어서 수성 HCl (20 µL, 2 M) 을 첨가하였다. 혼합물을 25℃ 에서 200 rpm 으로 30 분 동안 진탕시킨 후 원심분리하여 별개의 층을 수득하였다. 유기 층의 일부 (0.8 mL) 를 제거하고, $MgSO_4$ 피펫을 통해 깨끗한 에펜도르프 바이알 내로 건조시켰다. 그 다음 MTBE 를 Genevac 회전 진공 펌프에서 제거하고, EtOH (200 µL) 에 녹이고, 키랄 HPLC (방법 2) 에 의해 분석하였다; 체류 시간: (R)-산: rt = 9.1 min; (S)-산: rt = 23.8 min; (R)-에스테르: rt = 13.7 min; (S)-에스테르: rt = 29.8 min.

[0317] 표 4: 조건 A (100% 효소, 5% MTBE) 하에서의 실험에 대한 효소 스크리닝 결과; 주어진 양은 키랄 HPLC 에 기반한 %a/a 이다 (방법 2); 주어진 코드에 대한 공급처 및 효소 특이성은 표 3 에 포함된다:

코드	(R)-산 [%a/a]	(R)-에스테르 [%a/a]	(S)-산 [%a/a]	(S)-에스테르 [%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
프로테아제 M	39.1	0.9	3.2	56.8

[0318] (R)-산, (S)-산, (R)-에스테르 및 (S)-에스테르: 실시예 6 참고

[0319] 표 5: 조건 B (10% 효소, 5% MTBE) 하에서의 실험에 대한 효소 스크리닝 결과; 주어진 양은 키랄 HPLC 에 기반한 %a/a 이다 (방법 2); 주어진 코드에 대한 공급자 및 효소 특이성은 표 3 에 포함된다:

코드	(R)-산 [%a/a]	(R)-에스테르 [%a/a]	(S)-산 [%a/a]	(S)-에스테르 [%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
프로테아제 M	37.0	0.1	0.4	62.6

(R)-산, (S)-산, (R)-에스테르 및 (S)-에스테르: 실시예 6 참고

[0320]

[0321] 표 6: 조건 C (10% 효소, MTBE 없음) 하에서의 실험에 대한 효소 스크리닝 결과; 주어진 양은 키랄 HPLC 에 기반한 %a/a 이다 (방법 2); 주어진 코드에 대한 공급자 및 효소 특이성은 표 3 에 포함된다:

코드	(R)-산 [%a/a]	(R)-에스테르 [%a/a]	(S)-산 [%a/a]	(S)-에스테르 [%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
프로테아제 M	36.7	0.0	0.7	62.6

(R)-산, (S)-산, (R)-에스테르 및 (S)-에스테르: 실시예 6 참고

[0322]

[0323] 표 7: 조건 D (25 mg/mL 기질, 1% 효소, 5% MTBE) 하에서의 실험에 대한 효소 스크리닝 결과; 주어진 양은 키랄 HPLC 에 기반한 %a/a 이다 (방법 2); 주어진 코드에 대한 공급자 및 효소 특이성은 표 3 에 포함된다:

코드	(R)-산 [%a/a]	(R)-에스테르 [%a/a]	(S)-산 [%a/a]	(S)-에스테르 [%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
프로테아제 M	35.5	0.4	0.24	63.9

(R)-산, (S)-산, (R)-에스테르 및 (S)-에스테르: 실시예 6 참고

[0324]

[0325] 표 8: 조건 E (100 mg/mL 기질, 1% 효소, 5% MTBE) 하에서의 실험에 대한 효소 스크리닝 결과; 주어진 양은 키

랄 HPLC 에 기반한 %a/a 이다 (방법 2); 주어진 코드에 대한 공급자 및 효소 특이성은 표 3 에 포함된다:

코드	(R)-산 [%a/a]	(R)-에스테르 [%a/a]	(S)-산 [%a/a]	(S)-에스테르 [%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
프로테아제 M	19.2	24.3	0.06	56.4

(R)-산, (S)-산, (R)-에스테르 및 (S)-에스테르: 실시예 6 참고

[0326]

[0327] **실시예 8:** (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로파노산 (1 g 스케일) 의 합성:

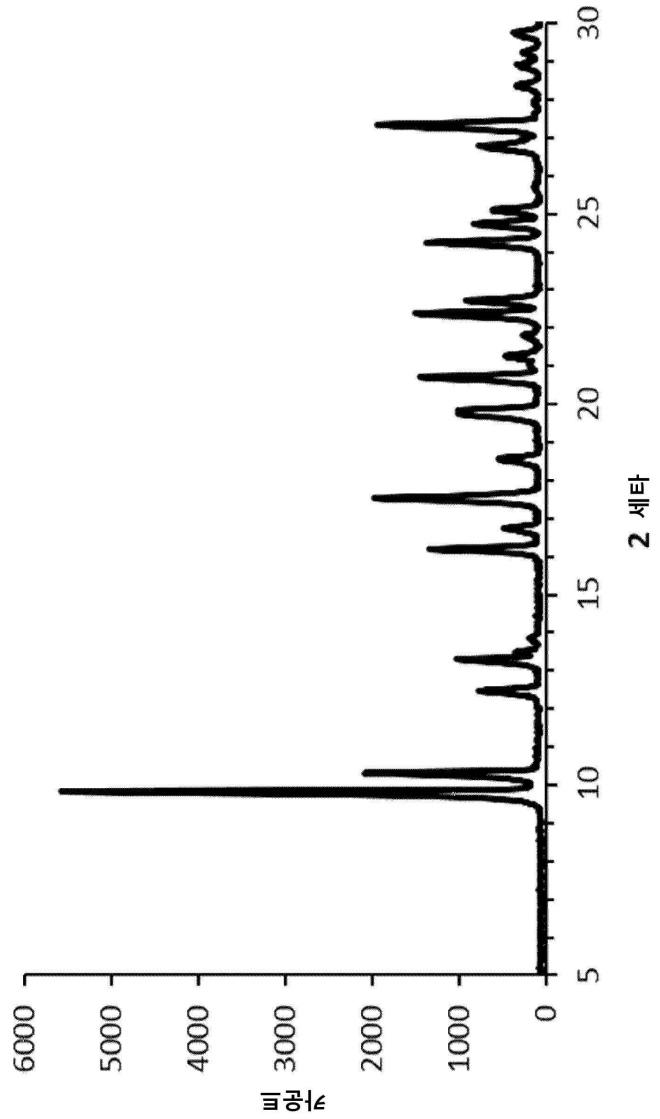
[0328] 50 mL 3-목 RBF 에 MTBE (라인 세척으로서 0.5 mL + 0.1 mL MTBE) 중 에틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시-포스포릴)프로파노에이트 (1 g, 2.83 mmol) 를 첨가하였다. 이 용액에 포스페이트 완충액 (0.1 M, pH 7.0, 9 mL) 을 첨가하고, 2상 혼합물을 교반 하에 30℃ 로 가열하였다. 이 2상 용액에 Amano 로부터의 프로테아제 M (0.5 mL 포스페이트 완충제 중 10 mg) 을 첨가하고, 용액을 18 시간 동안 교반하였다. 반응 pH 를 20 % K_2CO_3 (aq) 을 첨가하여 pH 6.8 과 7.0 사이로 유지하였다. 반응물을 pH 8.0 으로 조정하였고 MTBE (2 x 10 mL) 로 추출하였다. 수성 부분을 반응 용기에 재충전하고, 2M HCl 을 사용하여 pH 1.5 로 조정하였고, 이 시점에서 급속한 침전이 발생하였다. 현탁액을 빙수 배스에서 0 ℃ 로 냉각시키고, 이 온도에서 30 min 동안 교반하였다. 현탁액을 여과하고, 0.1 M 포스페이트 완충액 (pH 1.5, 2 mL) 및 0.1 M HCl (4 mL) 로 연속적으로 세척하고, 1 시간에 걸쳐 건조시켰다. (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산을 99% ee 로 백색 고체 (420 mg, 45.6%) 로서 수득하였다 (키랄 HPLC (방법 3); 체류 시간: (R)-산: rt = 5.7; (S)-산: rt = 6.6 min; (R)-에스테르: rt = 25.3 min; (S)-에스테르: rt = 28.1 min.

[0329] **실시예 9:** (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로파노산의 합성:

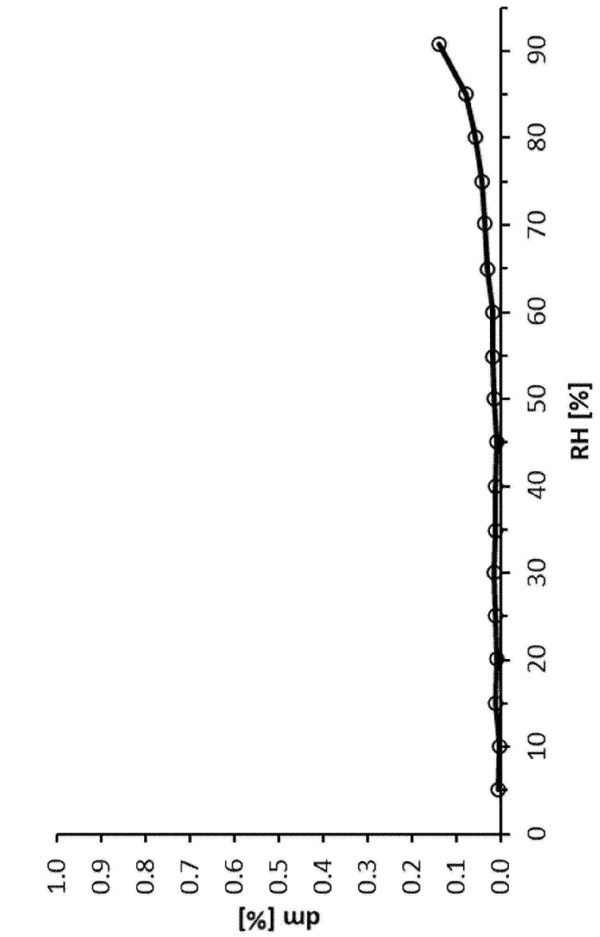
[0330] 물 (3.6 L; 6.6 vol) 을 10 L 반응기에 첨가하고 격렬하게 교반하였다. 제1인산칼륨 (49.0 g; 360 mmol) 을 첨가하고, 반응기 내용물의 pH 를 20% (w/v) 탄산칼륨 수용액을 사용하여 pH 6.8 (± 0.2) 로 조정하였다. 에틸 2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로파노에이트 (1.55 mmol) 를 1 L 유리병에 담긴 MTBE (360 mL) 에 용해하고 반응기에 첨가하였다. 유리병을 MTBE (90 mL) 로 세척하고, 용액을 반응기에 첨가하였다. Amano 로부터의 프로테아제 M (6.0 g) 을 100 mL 병 내의 정제수 (55 mL) 에 용해시키고, 단일 부분으로 반응기에 첨가하였다. 병을 정제수 (27.5 mL) 로 세척하고, 용액을 반응기에 첨가하였다. 반응 혼합물을 28±2℃ 에서 8 시간 동안 교반하고, 20% (w/v) 탄산칼륨 수용액을 첨가하여 pH 6.8 로 유지하였다. 외부 가열을 끄고, 혼합물을 추가 15 시간 동안 교반하였다. pH 를 20% (w/v) 탄산칼륨 수용액으로 7.8 ± 0.2 로 조정하였다. 셀라이트 (12.0 g) 및 MTBE (4.1 L) 를 반응기에 충전하고, 반응기 내용물을 10 분 후에 부흐너 깔때기를 통해 여과하였다. 2상 혼합물을 반응기에 재충전하고 층을 최소 5 분 동안 분리시켰다. 유기 층 (잔류 에스테르 함유) 을 25 L HDPE 드럼에 저장하고, 수성 층을 반응기에 재충전하였다. MTBE (4.1 L) 를 첨가하고, 혼합물을 5 분 동안 교반하고, 층을 분리하고, 수성층을 배출하였다. 유기층을 이전의 유기층과 조합하였다. 수성층을 반응기에 재충전하고, MTBE (2.05 L) 를 첨가하고, 혼합물을 5 분 동안 교반하고, 층을 분리하고, 수성층을 배출하였다. 유기층을 이전의 유기층과 조합하였다. 수성층을 반응기에 재충전하고, 18.5% 수성 HCl 의 적가를 통해 pH 1.5 로 조정하였다. 반응기 내용물을 3 ℃ ± 2℃ 로 냉각하고 30 분 동안 부드럽게 교반하고 뷔흐너 깔때기를 통해 여과했다. 여과 케이크를 냉각된 수성 HCl 용액 (0.1 M, 820 mL) 으로 세척하고, 깔때기 상에서 1 시간 동안 건조시켰다. 케이크를 50℃ 에서 진공 하에 일정 중량으로 추가로 건조시켜, (R)-2-((tert-부톡시카르보닐)아미노)-3-(디에톡시포스포릴)프로판산을 46% 수율, 98% 순도 (NMR) 및 99.9% ee (키랄 HPLC (방법 3)) 로 수득하였다.

도면

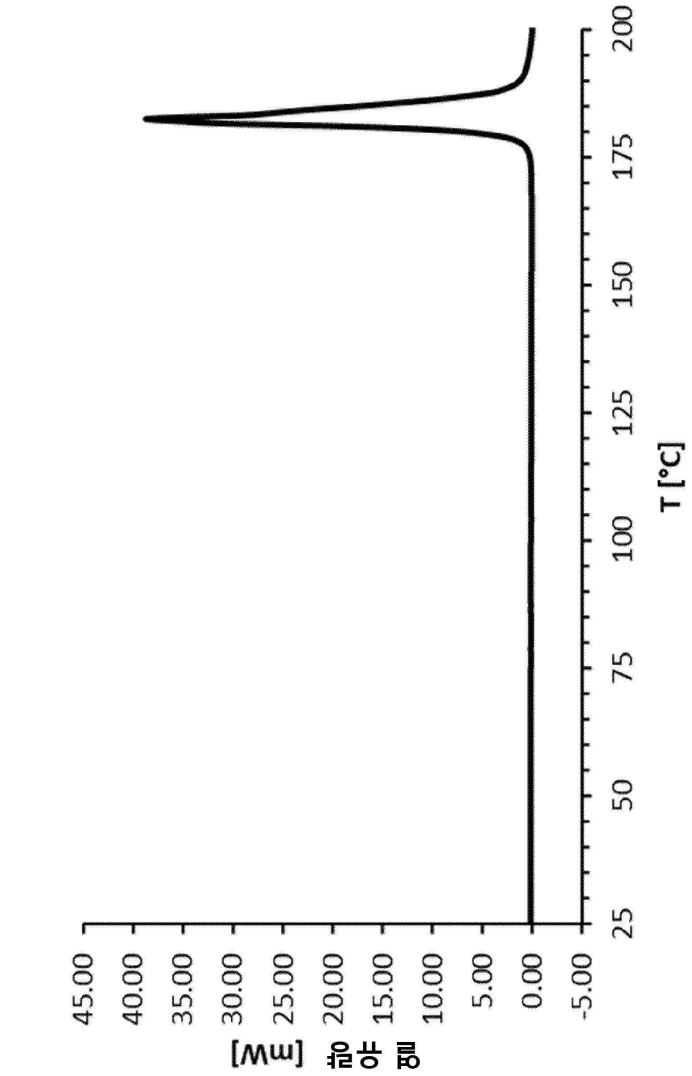
도면1



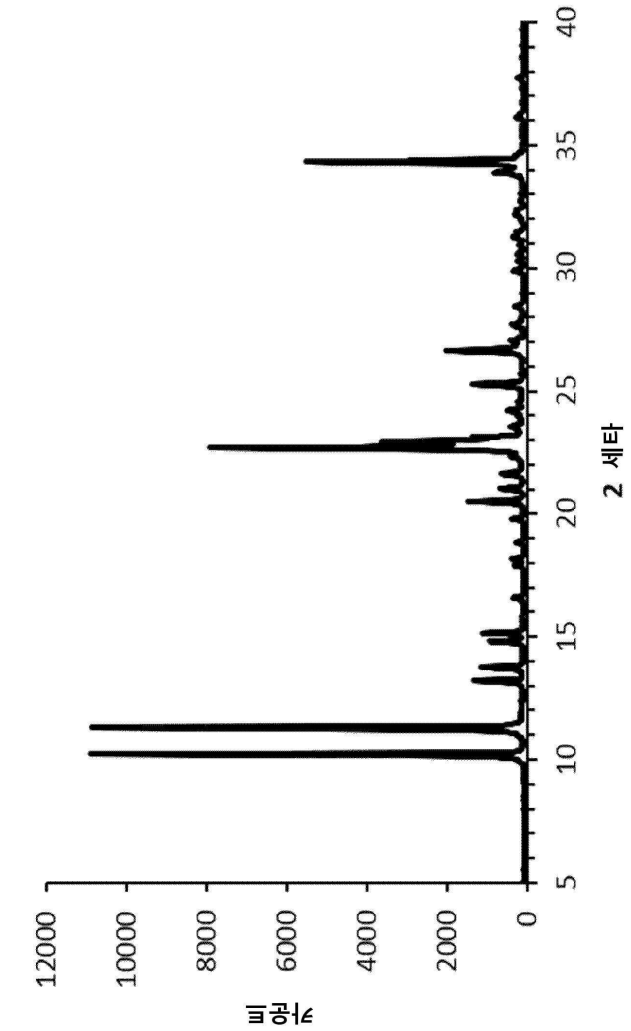
도면2



도면3


45.00
40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
-5.00
열 유량 [mW]
25
50
75
100
125
150
175
200
T [°C]

도면4



도면5

