



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110078632 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201910307976.6

C12P 13/00(2006.01)

(22)申请日 2019.04.17

(71)申请人 淮阴工学院

地址 223003 江苏省淮安市洪泽区东七街
三号高新技术产业园A12-2(淮阴工
学院技术转移中心洪泽分中心)

(72)发明人 黄燕鸽 游庆红 袁君 张世忠
许莹 李进 徐纬川

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 孙斌

(51) Int. Cl.

C07C 217/48(2006.01)

C07C 49/84(2006.01)

C07C 45/64(2006.01)

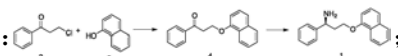
权利要求书1页 说明书4页
序列表2页

(54)发明名称

一种达泊西汀中间体的生物合成方法及其
中间体

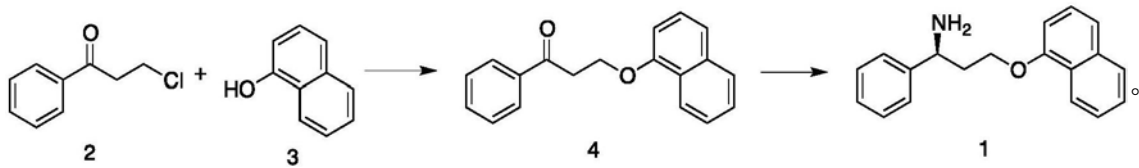
(57)摘要

本发明公开了一种达泊西汀中间体的生物
合成方法及其中间体,该方法由化合物(2)和化
合物(3)作为起始原料,经相转移催化取代反应
制得化合物(4),化合物(4)经生物酶转化反应最
终制得达泊西汀中间体化合物(1),其反应式如

下所示:;本发

明的达泊西汀中间体的生物合成方法具有合成路
线新颖,简单易行,成本较低,合成产率高,收率
高,产品纯度好、产品质量较好、原料廉价易得
以及适合于工业化生产等优点,同时所合成的达
泊西汀中间体为达泊西汀制备提供了新的中间
体原料。

1. 一种达泊西汀中间体的生物合成方法,其特征在于,由化合物(2)和化合物(3)作为起始原料,经相转移催化取代反应制得化合物(4),化合物(4)经生物酶转化反应最终制得达泊西汀中间体化合物(1),其反应式如下所示:



2. 根据权利要求1所述的达泊西汀中间体的生物合成方法,其特征在于,所述化合物(2)与化合物(3)的摩尔比为1:1~1.2。

3. 根据权利要求1所述的达泊西汀中间体的生物合成方法,其特征在于,所述化合物(2)与化合物(3)相转移催化取代反应的温度为0~50℃;反应溶剂选自四氢呋喃,乙醚,甲基叔丁基醚,二氯甲烷,甲苯,叔丁基醚,水和2-甲基四氢呋喃中的一种或者几种。

4. 根据权利要求1所述的达泊西汀中间体的生物合成方法,其特征在于,所述化合物(2)与化合物(3)相转移催化取代反应中所使用的催化剂选自苄基三乙基氯化铵、四丁基溴化铵、四丁基氯化铵、四丁基硫酸氢铵、三辛基甲基氯化铵、十二烷基三甲基氯化铵和十四烷基三甲基氯化铵中的一种或者几种;化合物(2)与催化剂的摩尔比为200:1~20。

5. 根据权利要求1所述的达泊西汀中间体的生物合成方法,其特征在于,所述化合物(4)经生物酶转化反应的生物酶为ABJ05767或者该酶的定向突变体,ABJ05767的氨基酸序列为SEQ ID NO.1所示,所述定向突变体为S152E,L161V,A194S和A201N中的一种或者几种。

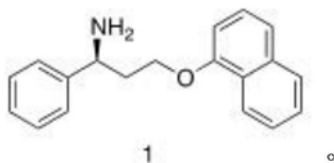
6. 根据权利要求5所述的达泊西汀中间体的生物合成方法,其特征在于,所述化合物(4)和生物酶在反应溶剂中的质量浓度比为1:1~75:1。

7. 根据权利要求1所述的达泊西汀中间体的生物合成方法,其特征在于,所述化合物(4)经生物酶转化反应中化合物(4)在反应溶剂中的质量浓度为2~150g/L。

8. 根据权利要求1所述的达泊西汀中间体的生物合成方法,其特征在于,所述化合物(4)经生物酶转化反应的反应溶剂选自水/二甲基亚砜、水/甲醇、水/乙醇、水/异丙醇、水/丙酮、水/二甲基亚砜/甲醇和水/二甲基亚砜/丙酮中的一种或者几种。

9. 根据权利要求1所述的达泊西汀中间体的生物合成方法,其特征在于,所述化合物(4)经生物酶转化反应中还包括氨源,其选自异丙胺、三乙胺、丙胺、乙胺和丁胺中的一种或者几种,氨源在反应溶剂浓度为0.25~1.25M。

10. 一种如权利要求1所述的达泊西汀中间体的生物合成方法所合成的达泊西汀中间体化合物(1),其结构式为:



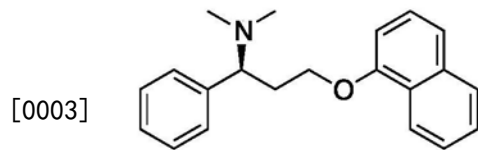
一种达泊西汀中间体的生物合成方法及其中间体

技术领域

[0001] 本发明属于药物合成技术领域,具体涉及一种达泊西汀中间体的生物合成方法及其中间体。

背景技术

[0002] 达泊西汀(通用名:(S)-Dapoxetine,商品名为:Priligy),化学名为:S-(+)-N,N-二甲基- α -[2-(萘氧基)乙基]苯甲胺。达泊西汀的分子量:305.413;CAS登记号:119356-77-3;结构式为式1所示:



式 1

[0004] 达泊西汀是目前唯一针对早泄(PE)研发的药物,也是唯一获得CFDA批准的早泄(PE)适应症的治疗药物。

[0005] 达泊西汀现已在全球近60个国家被批准用于早泄(PE)的治疗。基于涉及全世界范围内16000名以上男性的临床试验,证明达泊西汀能够显著改善早泄(PE)的所有指标,包括增强射精控制能力、提高性生活满意度以及延长阴道内射精潜伏时间(IELT),并且具有良好的耐受性。首次服用该药物,即可起效,在性生活开始前1-3小时服用即可,能够在体内迅速消除且副反应发生率低的特性使得达泊西汀是用于治疗早泄(PE)的理想药物。

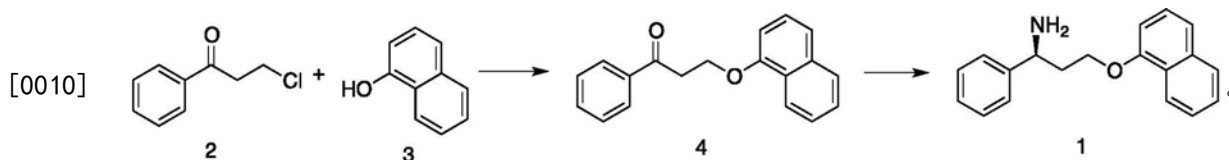
[0006] 现有专利文献:US19925135947;非专利文献:1:Tetrahedron Letters 53(2012)3680-3682;2:Synthetic Communications,42:3061-3067,2012;都介绍达泊西汀中间体的合成工艺,但是现有技术中,达泊西汀中间体的合成工艺,往往比较复杂,成本较高,而且还存在产品收率低和质量差的缺陷,无法适合工业化大生产。

发明内容

[0007] 发明目的:针对现有技术存在的问题,本发明提供一种达泊西汀中间体的生物合成方法,该合成方法简单易行,成本较低,收率较高,产品质量较好,适合大工业化生产,具有合成产率高、产品纯度好等优点。

[0008] 本发明还提供一种达泊西汀中间体化合物(1),该达泊西汀中间体化合物(1)为达泊西汀合成提供新的原料。

[0009] 技术方案:为了实现上述目的,如本发明所述一种达泊西汀中间体的生物合成方法,由化合物(2)和化合物(3)作为起始原料,经相转移催化取代反应制得化合物(4),化合物(4)经生物酶转化反应最终制得达泊西汀中间体化合物(1),其反应式如下所示:



[0011] 其中,所述化合物(2)与化合物(3)的摩尔比为1:1~1.2。

[0012] 作为优选,所述化合物(2)与化合物(3)相转移催化取代反应的温度为0~50℃;反应溶剂选自四氢呋喃,乙醚,甲基叔丁基醚,二氯甲烷,甲苯,叔丁基醚,水和2-甲基四氢呋喃中的一种或者几种。

[0013] 进一步地,所述化合物(2)与化合物(3)相转移催化取代反应中所使用的催化剂选自苄基三乙基氯化铵、四丁基溴化铵、四丁基氯化铵、四丁基硫酸氢铵、三辛基甲基氯化铵、十二烷基三甲基氯化铵和十四烷基三甲基氯化铵中的一种或者几种;化合物(2)与催化剂的摩尔比为200:1~20。

[0014] 其中,所述化合物(4)经生物酶转化反应的生物酶为ABJ05767或者该酶的定向突变体,ABJ05767的氨基酸序列为SEQ ID NO.1所示:

[0015] SEQ ID NO.1: MVYPNLDVSE MFAEREAQRS SMHARHLNEQ LVKVLKTIGY DVGFGKGGQGYLFDNRSGARY LDLLSGFGVF AIGRNHPVLR AALKGVLADAD LPNLVQLDVS TLAGILAERL LDYVPYLDKV FFSNSGAEAV EAAIKFARCA TGRSGIVHCR HSFHGLSYGA LSLTDDSNFR SGFEPLLPGC TGIPFNDLEA LEKALSSRQV AAFIVEPIQG KGVNVPSSDF LPGAAALCKR YGTLIIADEI QTGIGRTGRF LAIEHWNVEP DMVLLAKALS GGHVPVGA VL TRKAIFDKVF NRMDRAVVHG STFAKNLDM AAGIATLEVI KAERLVEAAA KRGAELRLAL TRLVPGYEML KEVRGKGLMI GVEFGPPQSL RLKASWTMLE TANKGLFCQL ITVPLFKDHK ILTQVSGHGS HTIKLLPSLT ITEDDCKWIE TSFDAVIGDS HKVPGAIWSL GKTLVDNAVR KSA;

[0016] 所述定向突变体为S152E,L161V,A194S和A201N中的一种或者几种;其中S152E的为母体ABJ05767的152位的S变成E,其他等同。本发明中化合物(4)经生物酶转化反应的生物酶可以采用ABJ05767或者该酶的定向突变体,最优选的是四个位置一起突变的突变体。

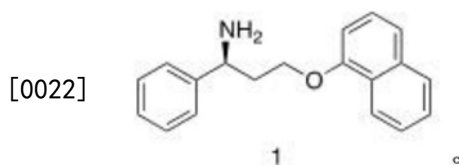
[0017] 作为优选,所述化合物(4)和生物酶在反应溶剂中的质量浓度比为1:1~75:1。

[0018] 进一步地,所述化合物(4)经生物酶转化反应中化合物(4)的在反应溶剂中的质量浓度为2-150g/L。

[0019] 作为优选,所述化合物(4)经生物酶转化反应的反应溶剂选自水/二甲基亚砜、水/甲醇、水/乙醇、水/异丙醇、水/丙酮、水/二甲基亚砜/甲醇和水/二甲基亚砜/丙酮中的一种或者几种。

[0020] 作为优选,所述化合物(4)经生物酶转化反应中还包括氨源,其选自异丙胺、三乙胺、丙胺、乙胺和丁胺中的一种或者几种,氨源在反应溶剂中的浓度为0.25-1.25M。

[0021] 本发明所述的达泊西汀中间体的生物合成方法所合成的达泊西汀中间体化合物(1),其结构式为:



[0023] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有如下优点:本发明提供了达泊西汀中间体合成方法,该方法相对于现有技术中达泊西汀中间体合成步骤多,合成工艺复杂等缺陷,具

有合成路线新颖,简单易行,成本较低,合成产率高,收率高,产品纯度高、产品质量较好、原料廉价易得以及适合于工业化生产等优点,同时所合成的达泊西汀中间体为达泊西汀制备提供了新的中间体原料。

具体实施方式

[0024] 下面结合实施例对本发明作更进一步的说明。

[0025] 本发明达泊西汀中间体HPLC的检测纯度的方法:

[0026] 试验仪器:Agilent 1100高效液相色谱仪(DAD检测器)。

[0027] 色谱条件:以OD-H(4.6×250mm,5μm)为色谱柱,流速:0.5ml/min。

[0028] 流动相A:异丙醇;流动相B:正庚烷

[0029] 按下表进行线性梯度洗脱:

[0030]

时间(分钟)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	1	99
30	5	95
50	25	75
60	45	55

[0031] 紫外检测波长:252nm。

[0032] 实施例1

[0033] 化合物(4)的制备

[0034] 在室温条件下,在20L反应釜中加入化合物(2) 1.69kg (10mol) 和化合物(3) 1.59kg (11mol) 于7L二氯甲烷和5L水中,加入催化剂四丁基溴化铵16g (0.05mol) 和苄基三乙基氯化铵12g (0.05mol), TLC监控反应完成后(42小时),将反应液分液,有机相用5%碳酸氢钠水溶液5L洗涤,将有机相在减压条件下(0.02mmHg)浓缩得化合物(4) 2.68kg (9.7mol),摩尔收率为97%,HPLC检测纯度:98.6%。

[0035] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ 8.14-7.94 (m, 2H), 7.71-7.24 (m, 9H), 7.01-6.59 (m, 1H), 4.13 (t, J=7.8Hz, 2H), 2.97 (t, J=7.8Hz, 2H) .

[0036] ESI+ [M+H] $^+$ = 277.

[0037] 化合物(1)的制备

[0038] 在25℃条件下,往反应釜中加入反应溶剂,然后加入氨源,用盐酸调节pH至8.0,再加入PLP和生物酶(S152E, L161V, A194S, A201N),缓慢搅拌至全部溶解,随后加入化合物(4)后反应16小时,反应结束后用盐酸调节pH至2.0,加入乙酸异丙酯萃取,留下水相,用氢氧化钠水溶液调节pH至12.0,加入乙酸异丙酯萃取,将乙酸异丙酯经减压浓缩得化合物(1)。

[0039] 反应溶剂为水和二甲亚砜,两者体积比为1:1。

[0040] 氨源为异丙胺和三乙胺,在反应溶剂浓度为0.5M,两者的摩尔比为1:1。

[0041] 化合物(4)在反应溶剂的质量浓度为120g/L。

[0042] 化合物(4)和生物酶(S152E, L161V, A194S, A201N, ABJ05767)的四个位置一起突变的质量浓度比为40:1。

[0043] 按前述方法检测所得中间体化合物(1),其质量收率为98%,HPLC检测纯度:

99.81%。

[0044] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8.34-8.10 (m, 1H), 7.88-7.72 (m, 1H), 7.64-7.07 (m, 9H), 6.87 (ddd, $J=7.3, 1.8, 0.4\text{Hz}$, 1H), 4.71-4.13 (m, 2H), 4.06-3.74 (m, 1H), 2.47-1.99 (m, 2H), 1.42 (s, 2H)。

[0045] ESI+ $[\text{M}+\text{H}]^+=278$ 。

[0046] 实施例2

[0047] 按照实施例1的合成方法,不同之处在于:化合物(4)的制备中化合物(2)和化合物(3)的摩尔比为1:1.2,反应温度为50℃,反应溶剂为甲苯和水(体积比1:1),化合物(2)与催化剂四丁基氯化铵的摩尔比为200:20;摩尔收率为95.2%。HPLC检测纯度:97.2%。

[0048] 化合物(1)的制备中反应溶剂为水/乙醇,氨源为丁胺,浓度为1.25M;化合物(4)的质量浓度为150g/L;化合物(4)和生物酶(S152E, L161V)的质量浓度比为75:1;其质量收率为95.5%,HPLC检测纯度:97.8%。

[0049] 实施例3

[0050] 按照实施例1的合成方法,不同之处在于:化合物(4)的制备中化合物(2)和化合物(3)的摩尔比为1:1,反应温度为0℃,反应溶剂为四氢呋喃,化合物(2)与催化剂苄基三乙基氯化铵的摩尔比为200:1;摩尔收率为92.1%。HPLC检测纯度:95.6%。

[0051] 化合物(1)的制备中反应溶剂为水/甲醇,氨源为丙胺,浓度为0.25M;化合物(4)的质量浓度为2g/L;化合物(4)和生物酶(ABJ05767)的质量浓度比为1:1;其质量收率为90.5%,HPLC检测纯度:94.8%。

[0052] 实施例4

[0053] 按照实施例1的合成方法,不同之处在于:化合物(4)的制备中化合物(2)和化合物(3)的摩尔比为1:1,反应温度为30℃,反应溶剂为乙醚,化合物(2)与催化剂十二烷基三甲基氯化铵的摩尔比为200:10;摩尔收率为96.4%。HPLC检测纯度:97.5%。

[0054] 化合物(1)的制备中反应溶剂为水/二甲基亚砜/甲醇(体积比体积比为1:1:1),氨源为乙胺,浓度为0.75M;化合物(4)的质量浓度为75g/L;化合物(4)和生物酶(A194S和A201N)的质量浓度比为50:1;其质量收率为97.0%,HPLC检测纯度:98.2%。

序列表

<110> 淮阴工学院

<120> 一种达泊西汀中间体的生物合成方法及其中间体

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 463

<212> PRT

<213> ABJ05767 (ABJ05767)

<400> 1

```

Met Val Tyr Pro Asn Leu Asp Val Ser Glu Met Phe Ala Glu Arg Glu
1           5           10           15
Ala Gln Arg Ser Ser Met His Ala Arg His Leu Asn Glu Gln Leu Val
           20           25           30
Lys Val Leu Lys Thr Ile Gly Tyr Asp Val Gly Phe Gln Lys Gly Gln
           35           40           45
Gly Gln Tyr Leu Phe Asp Arg Ser Gly Ala Arg Tyr Leu Asp Leu Leu
           50           55           60
Ser Gly Phe Gly Val Phe Ala Ile Gly Arg Asn His Pro Val Leu Arg
65           70           75           80
Ala Ala Leu Lys Gly Val Leu Asp Ala Asp Leu Pro Asn Leu Val Gln
           85           90           95
Leu Asp Val Ser Thr Leu Ala Gly Ile Leu Ala Glu Arg Leu Leu Asp
           100          105          110
Tyr Val Pro Tyr Leu Asp Lys Val Phe Phe Ser Asn Ser Gly Ala Glu
           115          120          125
Ala Val Glu Ala Ala Ile Lys Phe Ala Arg Cys Ala Thr Gly Arg Ser
           130          135          140
Gly Ile Val His Cys Arg His Ser Phe His Gly Leu Ser Tyr Gly Ala
145           150          155          160
Leu Ser Leu Thr Asp Asp Ser Asn Phe Arg Ser Gly Phe Glu Pro Leu
           165          170          175
Leu Pro Gly Cys Thr Gly Ile Pro Phe Asn Asp Leu Glu Ala Leu Glu
           180          185          190
Lys Ala Leu Ser Ser Arg Gln Val Ala Ala Phe Ile Val Glu Pro Ile
           195          200          205
Gln Gly Lys Gly Val Asn Val Pro Ser Asp Asp Phe Leu Pro Gly Ala
210           215          220

```

Ala Ala Leu Cys Lys Arg Tyr Gly Thr Leu Leu Ile Ala Asp Glu Ile			
225	230	235	240
Gln Thr Gly Ile Gly Arg Thr Gly Arg Phe Leu Ala Ile Glu His Trp			
	245	250	255
Asn Val Glu Pro Asp Met Val Leu Leu Ala Lys Ala Leu Ser Gly Gly			
	260	265	270
His Val Pro Val Gly Ala Val Leu Thr Arg Lys Ala Ile Phe Asp Lys			
	275	280	285
Val Phe Asn Arg Met Asp Arg Ala Val Val His Gly Ser Thr Phe Ala			
	290	295	300
Lys Asn Asp Leu Ala Met Ala Ala Gly Ile Ala Thr Leu Glu Val Ile			
305	310	315	320
Lys Ala Glu Arg Leu Val Glu Ala Ala Ala Lys Arg Gly Ala Glu Leu			
	325	330	335
Arg Leu Ala Leu Thr Arg Leu Val Pro Gly Tyr Glu Met Leu Lys Glu			
	340	345	350
Val Arg Gly Lys Gly Leu Met Ile Gly Val Glu Phe Gly Pro Pro Gln			
	355	360	365
Ser Leu Arg Leu Lys Ala Ser Trp Thr Met Leu Glu Thr Ala Asn Lys			
	370	375	380
Gly Leu Phe Cys Gln Leu Ile Thr Val Pro Leu Phe Lys Asp His Lys			
385	390	395	400
Ile Leu Thr Gln Val Ser Gly His Gly Ser His Thr Ile Lys Leu Leu			
	405	410	415
Pro Ser Leu Thr Ile Thr Glu Asp Asp Cys Lys Trp Ile Glu Thr Ser			
	420	425	430
Phe Asp Ala Val Ile Gly Asp Ser His Lys Val Pro Gly Ala Ile Trp			
	435	440	445
Ser Leu Gly Lys Thr Leu Val Asp Asn Ala Val Arg Lys Ser Ala			
450	455	460	