



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102070451 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201010260709. 7 *C07C 229/28*(2006. 01)
(22) 申请日 2003. 12. 04 *C07C 271/22*(2006. 01)
(30) 优先权数据 *C07C 69/675*(2006. 01)
60/431814 2002. 12. 09 US *C07C 59/115*(2006. 01)
(62) 分案原申请数据 *C12P 13/04*(2006. 01)
200380109631. 7 2003. 12. 04 *C07C 227/32*(2006. 01)
(83) 生物保藏信息 *C07C 51/09*(2006. 01)
PTA-4520 2002. 06. 28 *C07D 207/22*(2006. 01)
(73) 专利权人 阿斯利康(瑞典)有限公司 *C07D 209/52*(2006. 01)
地址 瑞典南泰利耶
(72) 发明人 T·C·伍 D·B·布尔佐佐夫斯基
R·福克斯 J·D·小戈德弗里
R·L·汉森 S·V·科洛塔钦
J·A·小马祖洛 R·N·帕特尔
J·王 K·王 J·于 J·朱
D·R·马尼安 D·J·奥格里
L·G·哈曼
(56) 对比文件
US 6395767 B2, 2002. 05. 28, 第 1-94 栏。
审查员 张鑫松
(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
司 72001
代理人 权陆军 刘健
(51) Int. Cl.
C07C 69/716(2006. 01)
C07C 59/215(2006. 01)

权利要求书1页 说明书52页
序列表3页

(54) 发明名称
用于生产二肽基肽酶 IV 抑制剂和它的中间体的方法和化合物

(57) 摘要
提供了用于生产基于环丙基-耦合的吡咯烷的二肽基肽酶 IV 抑制剂的方法和化合物。

1. 一种用于生产 3-羟基- α -氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸的方法,包括在存在有机溶剂的条件下用碱金属碱处理二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸烷基酯,以便形成含有相应的碱金属盐的反应混合物,用酸处理所述反应混合物,以便形成相应的 3-羟基- α -氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸产物。

2. 权利要求 1 所限定的方法,其中所述产物的形成是通过单罐方法完成的。

3. 权利要求 1 所限定的方法,其中所述碱金属碱是氢氧化钠,而所述酸是盐酸。

4. 权利要求 1 至 3 中任一项中所限定的方法,其中所述二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸烷基酯是通过包含用硝酸和硫酸处理二氯-(金刚烷-1-基)-乙酸烷基酯的方法制备的。

5. 权利要求 4 所限定的方法,其中所述二氯-(金刚烷-1-基)-乙酸烷基酯是通过在氯化锌存在下用((2,2-二氯-1-甲氧基乙烯基)氧基)三甲基硅烷处理溴化金刚烷来进行的。

用于生产二肽基肽酶 IV 抑制剂和它的中间体的方法和化合物

[0001] 本申请是国际申请日为 2003 年 12 月 4 日的国际申请 PCT/US2003/038558 进入中国、申请号为 200380109631.7 的题为“用于生产二肽基肽酶 IV 抑制剂和它的中间体的方法和化合物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求于 2002 年 12 月 9 日提交的美国临时申请 60/431,814 的优先权,该申请被收作本文参考。

技术领域

[0003] 本发明提供了用于生产基于环丙基-稠合的吡咯烷的二肽基肽酶 IV 抑制剂的方法中的方法和化合物。还提供了用于不对称还原性氨基化中间体化合物(S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸的方法,该中间体化合物被用于生产基于环丙基-稠合的吡咯烷的二肽基肽酶 IV 抑制剂。还提供了其他中间体化合物以及它们的生产方法。通过本发明的化合物和方法生产的二肽基肽酶 IV 抑制剂可用于治疗糖尿病及其并发症,高血糖症, X 综合征,高胰岛素血症,肥胖和动脉粥样硬化和相关的疾病,以及免疫调节疾病和慢性炎症性肠疾病。

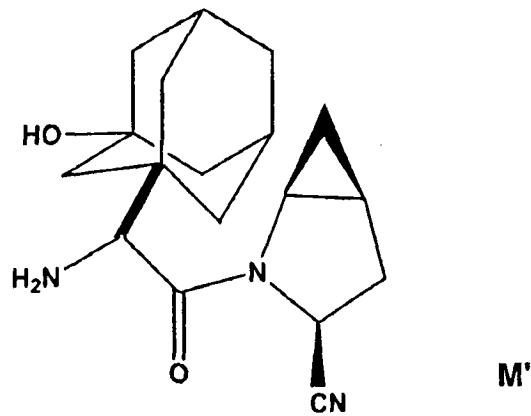
背景技术

[0004] 二肽基肽酶 IV 是膜结合的非经典丝氨酸氨肽酶,它定位于多种组织中,包括,但不局限于,肠,肝脏,肺和肾脏。这种酶还定位于循环的 T-淋巴细胞上,在这里,它被称作 CD-26。二肽基肽酶 IV 负责内源肽 GLP-1(7-36) 和胰高血糖素的体内代谢切割,并且还在体外表现出针对诸如 GHRH, NPY, GLP-2 和 VIP 的其他肽的蛋白水解活性。

[0005] GLP-1(7-36) 是在小肠中通过对胰高血糖素原进行翻译后加工产生的、具有 29 个氨基酸的肽。这种肽具有多种体内作用。例如, GLP-1(7-36) 能刺激胰岛素分泌,并且抑制胰高血糖素分泌。这种肽能刺激饱腹感,并且延缓胃排空。通过连续输注外源施用的 GLP-1(7-36) 业已被证实对糖尿病患者是有效的。不过,对于连续治疗用途来说,所述外源肽降解的太快了。

[0006] 业已开发出了二肽基肽酶 IV 的抑制剂,以便提高 GLP-1(7,36) 的内源水平。美国专利号 6,395,767 公开了基于环丙基-稠合的吡咯烷的二肽基肽酶 IV 抑制剂。用于化学合成所述抑制剂的方法公开于美国专利号 6,395,767 以及相关文献中。例如,参见 Sagnard 等 Tet-Lett. 1995 36:3148-3152; Tverezovsky 等 Tetrahedron 1997 53:14773-14792; 和 Hanessian 等 Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998 8:2123-2128。公开于美国专利号 6,395,767 中的优选抑制剂是游离碱 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羟基-三环[3.3.1.1^{3,7}]癸-1-基)-1-氧代乙基]-2-氮杂二环-[3.1.0]己烷-3-腈(M')

[0007]



游离碱 M'。

[0008] 适合用于制备用来生产这种二肽基肽酶 IV 抑制剂的方法公开于 EP 0 808 824 A2 中。还可参见 Imashiro 和 Kuroda, Tetrahedron Letters 2001 42 :1313-1315, Reetz 等 Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18 :72, Reetz 和 Heimbach, Chem. Ber. 1983 116 : 3702-3707, Reetz 等 Chem. Ber. 1983 116 :3708-3724。

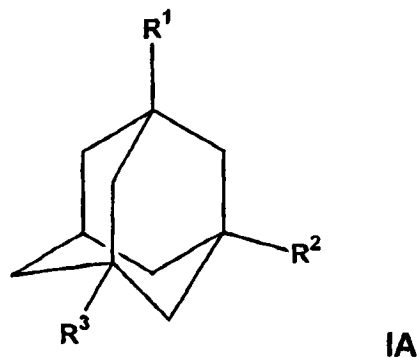
[0009] 本发明提供了用于生产基于环丙基 - 稠合的吡咯烷的二肽基肽酶 IV 抑制剂的新生产方法和化合物。

发明内容

[0010] 本发明的一个目的是提供可用作生产基于环丙基 - 稠合的吡咯烷的二肽基肽酶 IV 抑制剂的中间体的化合物。

[0011] 在一种实施方案中, 本发明的中间体包括具有式 IA 的化合物:

[0012]



[0013] 其中

[0014] R¹选自 H 和 OH;

[0015] R²选自 -C(=O)-COR⁴, -C(=O)NR⁵R⁶, -C(X)_n-COR⁴和 -C-NR⁷R⁸COR⁴,

[0016] 其中

[0017] X 是卤素;

[0018] n 是 1-2

[0019] R⁴选自 :O- 烷基, NH₂和 OH ;和

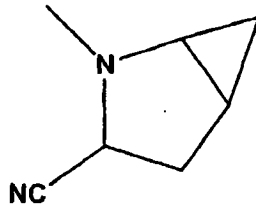
[0020] R⁵, R⁶, R⁷和 R⁸分别选自 :H 和 COOR⁹, 其中, R⁹是取代过的或未取代过的烷基 ;和

[0021] R³选自 :H, OH 和 R¹⁰, 其中, R¹⁰是 NHR¹¹C(=O)R¹²,

[0022] R^{11} 是 $R^{13}COOH$,

[0023] R^{12} 是

[0024]

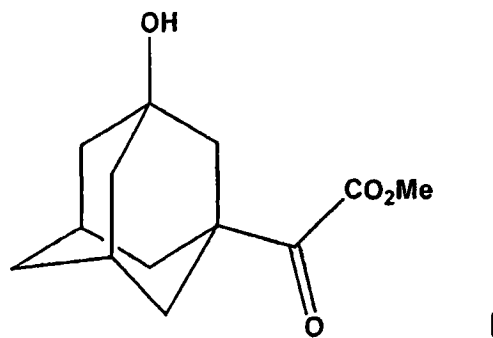


[0025] 且 R^{13} 是烷基或芳基。

[0026] 可用作生产基于环丙基-稠合的吡咯烷的二肽基肽酶 IV 抑制剂的中间体的本发明式 IA 的示例性优选化合物包括：

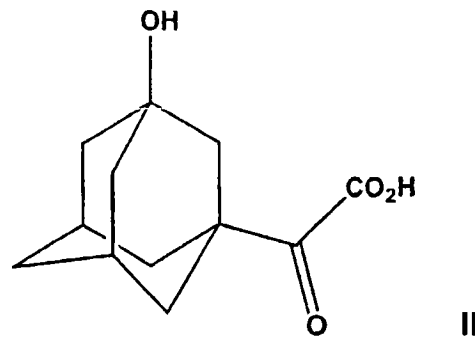
[0027] 3-羟基- α -氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸甲酯如式 I 所示，

[0028]



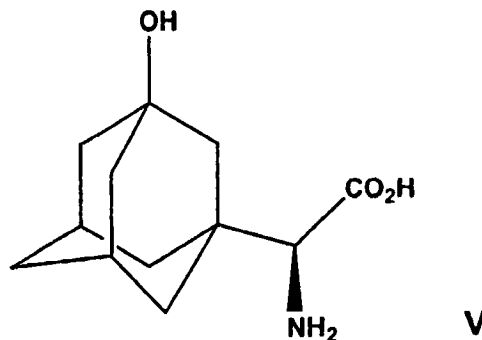
[0029] 3-羟基- α -氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸, 如式 II 所示，

[0030]



[0031] (α S)- α -氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸, 如式 V 所示，

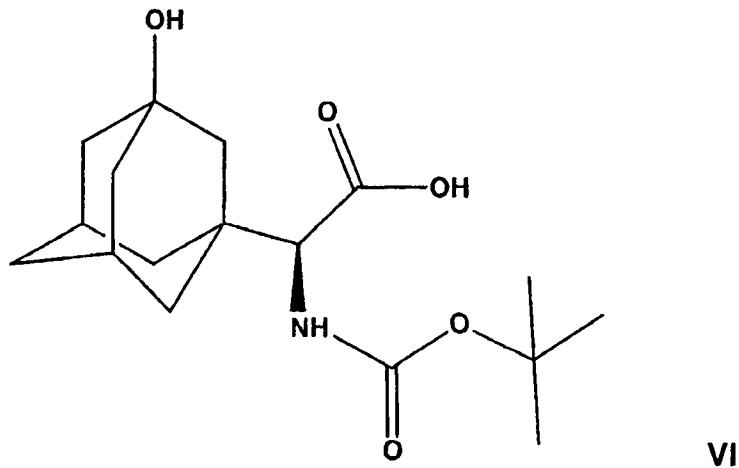
[0032]



[0033] (α S)- α [[(1,1-二甲氧基) 羰基] 氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸

烷-1-乙酸,如式 VI 所示,

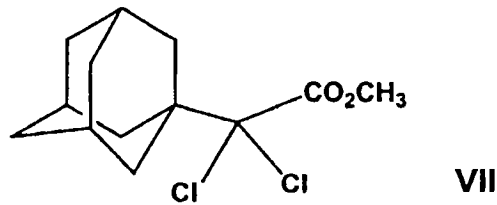
[0034]



[0035] (或它的 DABCO 盐 VIA),

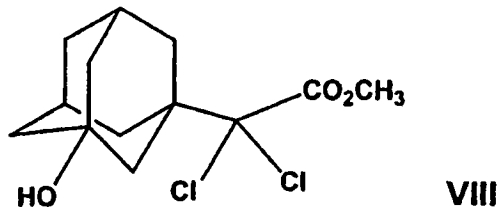
[0036] 金刚烷-1-基-二氯-乙酸甲酯,如式 VII 所示,

[0037]



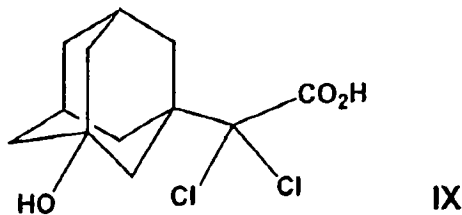
[0038] 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸甲酯,如式 VIII 所示,和

[0039]



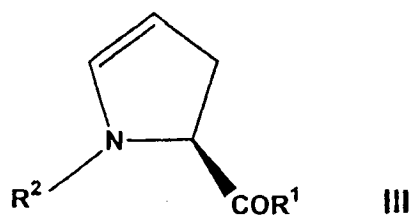
[0040] 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸,如式 IX 所示

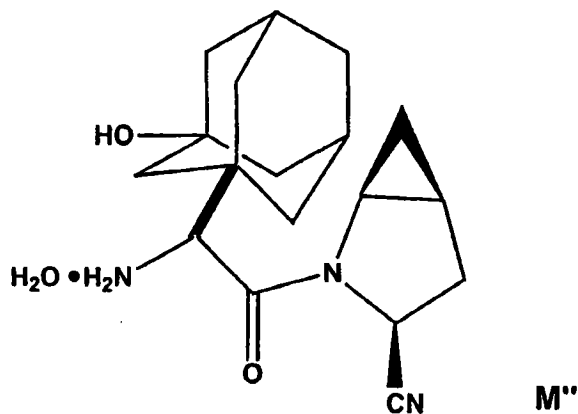
[0041]



[0042] 在另一种实施方案中,本发明的中间体包括化合物 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二羧酸 [1-(1,1-二甲基乙基),5-乙基] 酯,如式 III 所示,

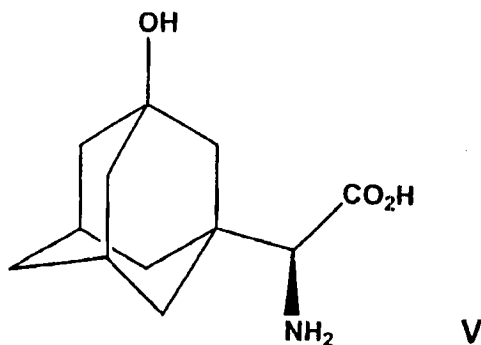
[0043]





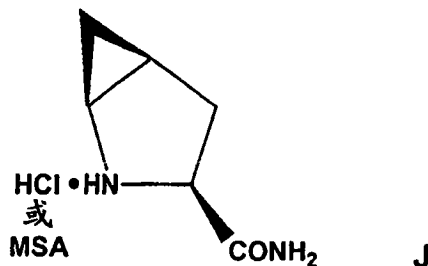
[0053] 本发明的另一个目的是提供用于生产基于环丙基-稠合的吡咯烷的二肽基肽酶 IV 抑制剂的方法。在优选实施方案中,所生产的抑制剂是 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基)-1-氧代乙基]-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-腈苯甲酸盐 (1 : 1) 及其相应的游离碱,分别如式 M 和 M' 所示。所述抑制剂最终是通过偶联两种片段形成的,即,如式 V 所示的 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸,

[0054]



[0055] 和 (1S,3S,5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-甲酰胺酸式盐,如盐酸盐或甲磺酸盐 (甲磺酰或 MSA 盐),如在式 J 中所示出的

[0056]



[0057] 本文公开了根据被选择用作原材料的中间体化合物生产并且偶联所述片段的各种方法。例如,在本发明的一种实施方案中,提供了用如式 II 所示的 3-羟基-< a-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸生产基于环丙基-稠合的吡咯烷的抑制剂的方法。在本发明的另一种实施方案中提供了用具有式 V 的 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸生产基于环丙基-稠合的吡咯烷的抑制剂的方法。在本发明的另一种实施方案中,提供了用具有式 VI 的 (< aS)-< a-[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]-3-羟

基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸生产基于环丙基 - 稠合的吡咯烷的抑制剂的方法。在本发明的另一种实施方案中, 提供了用具有式 IV 的 (5S)-5- 氨基羰基 -4,5- 二氢 -1H- 吡咯 -1- 羧酸 1-(1,1- 二甲基乙基) 酯生产基于环丙基 - 稠合的吡咯烷的抑制剂的方法。

[0058] 本发明的另一个目的是提供用于合成可用于生产基于环丙基 - 稠合的吡咯烷的抑制剂的中间体的方法。在本发明的一种实施方案中, 提供了对 3- 羟基 - < a- 氧代三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 II) 进行不对称还原性氨基化作用或转氨基作用, 以便形成 (< aS)- < a- 氨基 -3- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 V) 的方法。在本发明的另一种实施方案中, 提供了用三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 N) 化学合成 (< aS)- < a- 氨基 -3- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 V) 的方法。在本发明的另一种实施方案中, 提供了用金刚烷 -1- 基 - 二氯 - 乙酸甲酯 (式 VII), 二氯 - (3- 羟基 - 金刚烷 -1- 基) - 乙酸甲酯 (式 VIII) 和二氯 - (3- 羟基 - 金刚烷 -1- 基) - 乙酸 (式 IX) 生产 3- 羟基 - < a- 氧代三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 II) 的方法。还提供了用于生产金刚烷 -1- 基 - 二氯 - 乙酸甲酯 (式 VII), 二氯 - (3- 羟基 - 金刚烷 -1- 基) - 乙酸甲酯 (式 VIII) 和二氯 - (3- 羟基 - 金刚烷 -1- 基) - 乙酸 (式 IX) 的方法。在本发明的另一种实施方案中, 提供了用 4,5- 二氢 -1H- 吡咯 -1,5- 二羧酸 [1-(1,1- 二甲基乙基), 5- 乙基] 酯 (式 III) 生产 (5S)-5- 氨基羰基 -4,5- 二氢 -1H- 吡咯 -1- 羧酸 1-(1,1- 二甲基乙基) 酯 (式 IV) 的方法。在本实施方案中, 随后可以将 (5S)-5- 氨基羰基 -4,5- 二氢 -1H- 吡咯 -1- 羧酸 1-(1,1- 二甲基乙基) 酯 (式 IV) 用作生产 [1S-(1 < a, 3 < b, 5 < a)-3- 氨基羰基]-2- 氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷 -2- 羧酸 1,1- 二甲基乙酯 (式 H) 的中间体。

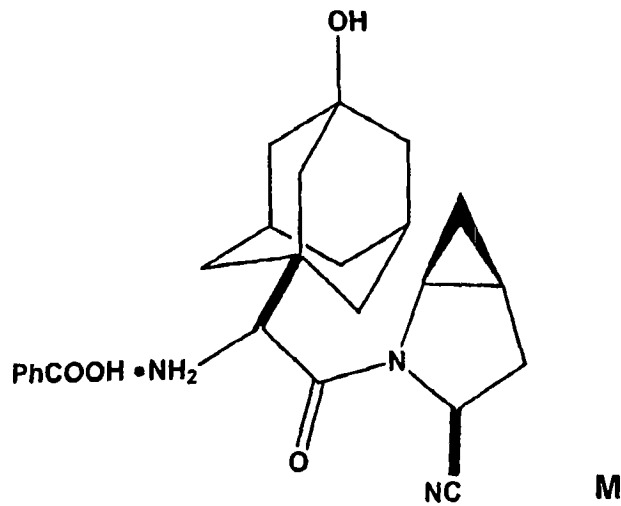
[0059] 本发明的另一个目的是提供一种细胞系, 所述细胞系能够通过 3- 羟基 - < a- 氧代三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 II) 进行不对称还原性氨基化作用或转氨基作用生产 (< aS)- < a- 氨基 -3- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 V)。在优选实施方案中, 所述细胞系包括含有能表达甲酸脱氢酶和苯丙氨酸脱氢酶的质粒的细胞。最优选的细胞系是 ATCC 保藏号为 PTA-4520 的细胞系。

具体实施方式

[0060] 基于环丙基 - 稠合的吡咯烷的化合物, 如 (1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2- 氨基 -2-(3- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸 -1- 基)-1- 氧代乙基]-2- 氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷 -3- 腈苯甲酸盐 (1 : 1) 及其相应的游离碱和它的一水合物是二肽基肽酶 IV 抑制剂, 可用于治疗糖尿病及其并发症, 高血糖症, X 综合征, 高胰岛素血症, 肥胖和动脉粥样硬化和相关的疾病, 以及免疫调节疾病和慢性炎症肠疾病。在本发明中, 提供了用于生产基于环丙基 - 稠合的吡咯烷的化合物的新化合物和方法, 所述基于环丙基 - 稠合的吡咯烷的化合物如 (1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2- 氨基 -2-(3- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸 -1- 基)-1- 氧代乙基]-2- 氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷 -3- 腈苯甲酸盐 (1 : 1) 及其相应的游离碱和它的一水合物。

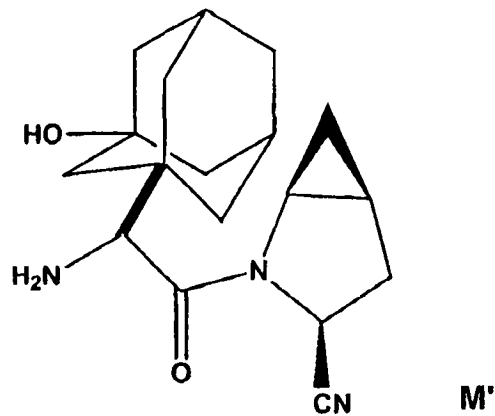
[0061] 所述二肽基肽酶 IV 抑制剂 (1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2- 氨基 -2-(3- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸 -1- 基)-1- 氧代乙基]-2- 氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷 -3- 腈苯甲酸盐 (1 : 1), 如式 M 所示

[0062]



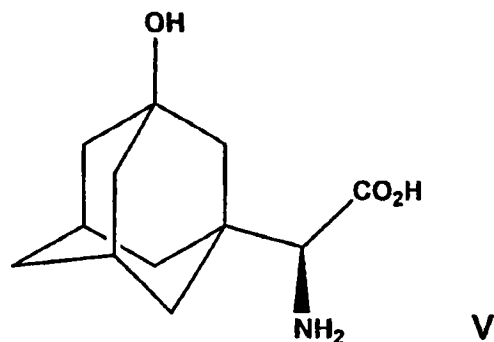
[0063] 并且优选下面所示出的相应的游离碱式 M' 或前面所述的它的一水合物 M'' 。

[0064]



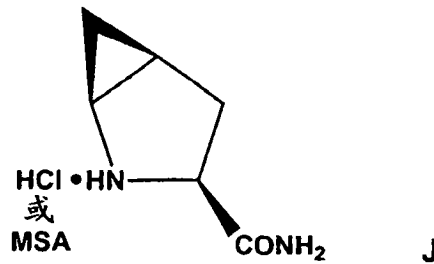
[0065] 在本发明中, 提供了通过组装两个片段来生产 (1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸-1-基)-1-氧代乙基]-2-氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷-3-腈 (式 M') 的方法。所述片段是在式 V 中示出的 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸,

[0066]



[0067] 以及 (1S, 3S, 5S)-2-氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷-3-甲酰胺的酸式盐, 如在式 J 中所示出的盐酸盐或 MSA 盐

[0068]



[0069] 本发明还提供了用于生产所述片段的方法,以及可用于生产所述片段的中间体化合物。

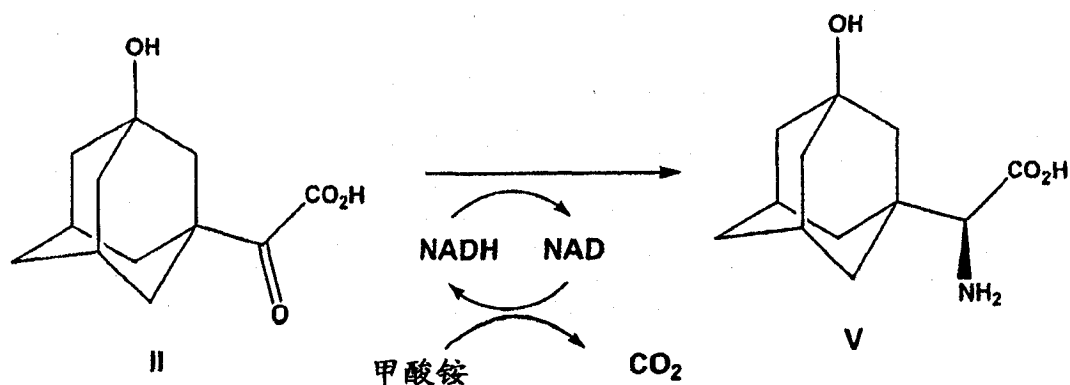
[0070] 在本发明的一个方面,通过对中间体化合物 3-羟基- α -氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 II) 进行还原性氨基化作用或转氨基作用,生产片段 (α S)- α -氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) 的方法。在该方法的优选实施方案中,通过还原性氨基化作用将 3-羟基- α -氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 II) 转化成 (α S)- α -氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V),这是通过用对酮酸有活性的苯丙氨酸脱氢酶或其他氨基酸脱氢酶通过酶促方式进行的。可用于本发明的示例性的苯丙氨酸脱氢酶包括,但不局限于,来自芽孢八叠球菌属 (*Sporosarcina*) 物种的苯丙氨酸脱氢酶或来自诸如中间型高温放线菌 (*Thermoactinomyces intermedius*) 的高温放线菌属 (*Thermoactinomyces*) 物种的苯丙氨酸脱氢酶。还原性氨基化作用优选是用于在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*) 中表达的中间型高温放线菌 ATCC 33205 的苯丙氨酸脱氢酶进行的。能表达中间型高温放线菌 ATCC 33205 苯丙氨酸脱氢酶的大肠杆菌和巴斯德毕赤氏酵母的重组菌株的构建和生长业已由 Hanson 等公开 (*Enzyme and Microbial Technology* 2000 26 :348-358)。在甲醇上生长巴斯德毕赤氏酵母还可以诱导甲酸脱氢酶的产生 (Hanson 等 *Enzyme and Microbial Technology* 2000 26 :348-358)。

[0071] 包括能表达巴斯德毕赤氏酵母 (ATCC 20864) 甲酸脱氢酶和修饰形式的中间型高温放线菌 (ATCC 33205) 苯丙氨酸脱氢酶基因的大肠杆菌细胞,按照布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 的规定由国际保藏机构 (International Depository Authority) 进行了保藏和承认。保藏是于 2002 年 6 月 28 日在美国典型培养物保藏中心进行的,该保藏中心的地址是 10801 University Boulevard in Manassas, Virginia 20110-2209。ATCC 保藏号为 PTA-4520,分类命名为含有质粒的大肠杆菌 JM110 (*Escherichia coli* containing a plasmid:JM110)。在本专利申请授权之后,对公众获得该细胞系的所有限制都将被不可撤回地去除。该保藏物从保藏日期开始计算,将在公共保藏机构保存 30 年时间,或者在最后要求样品之后再保存 5 年时间或者为专利可实施的期限,取三者最长的时间。上述细胞系在保存时是活的。如果所述保藏机构不能分配活的样品的话,可以更换所述保藏物。

[0072] 在下面的方案 I 中示出了将 3-羟基- α -氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 II) 转化成 (α S)- α -氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) 的还原性氨基化作用。

[0073] 方案 I

[0074]

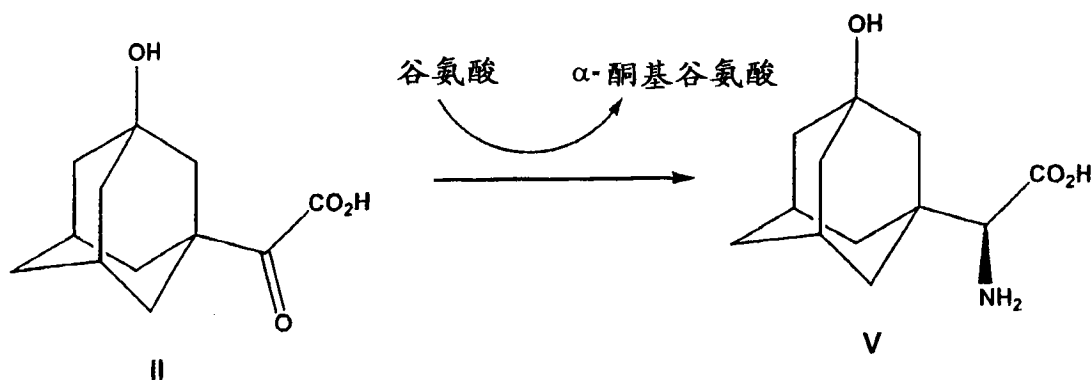


[0075] 如方案 I 所示,该反应需要氨和还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)。在该反应中产生的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 被再循环成 NADH,这通过由甲酸脱氢酶将甲酸氧化成二氧化碳来实现。来自该反应的 (*s*)-*s*-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) 的预期收率为 80-100%,并且预期的对映体过量超过 99%。还可参见本文的实施例 1 至 10。

[0076] 相同的转化还可以通过使用转氨酶实现,正如在下面的方案 II 中所示出的:

[0077]

方案 II

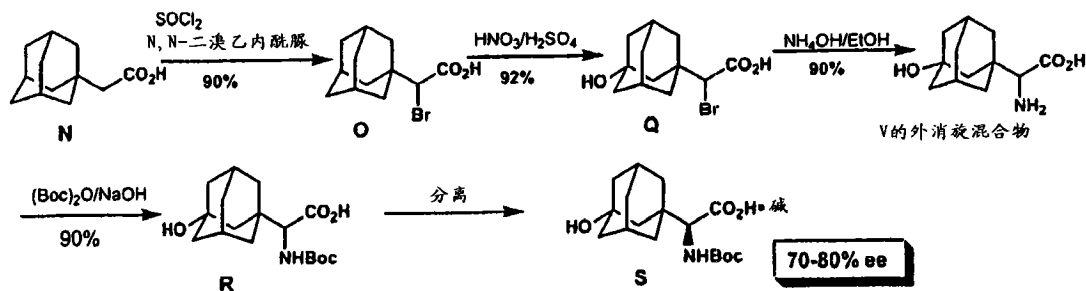


[0078] 如方案 II 所示,在这种酶促转化作用中,谷氨酸起着氨基供体的作用。用于该转化的示例性的转氨酶是如本文的实施例 11 所述的支链转氨酶。

[0079] 在另一种实施方案中, (*s*)-*s*-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) 是化学合成的。用于化学合成 (*s*)-*s*-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) 的示例性方法如下面的方案 III 所示:

[0080] 方案 III

[0081]



[0082] 如方案 III 所示, (*s*)-*s*-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸

(式 V) 的外消旋混合物是用三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 N) 化学合成的,这通过首先将三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸溴化成 α -溴代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 O) 来实现。在该溴化反应中,将原材料三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 N) 悬浮在亚硫酸氯中。然后添加二甲基甲酰胺 (DMF),并且在室温下搅拌该悬浮液 1.5 小时。通过气相层析证实所述反应的完成。然后将固体 N-溴代琥珀酰 (NBS) 逐份地添加到所述反应混合物中,并且将所述反应混合物加热到 60°C。将温度保持在 60-65°C,同时搅拌反应物 3 小时。同样通过气相层析证实反应的完成。然后将庚烷添加到所述反应混合物中,并且在 78-80°C 下蒸馏掉多余的亚硫酸氯。添加水终止该反应,并且添加额外的庚烷。然后使水层与所述有机层分离,并且用水洗涤所述有机层。在洗涤之后,将额外的水添加到所述庚烷层中,并且将庚烷蒸馏掉,然后将四氢呋喃 (THF) 添加到剩余的水层中,并且在室温下剧烈搅拌该混合物若干小时。可以添加额外的水,以便加速这一水解过程。然后将 THF 蒸馏掉,剩下双相 (水和油) 反应混合物。然后添加晶种 (Seed),并且让反应物达到室温,同时以粗粒 (heavy solid) 形式产生了 α -溴代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 O)。添加水和乙腈,以便保持该悬浮液可以搅动。在搅拌若干小时之后,将含有 α -溴代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 O) 的固体过滤掉,并且用乙腈洗涤若干次。也参见本文的实施例 17。

[0083] 然后让 α -溴代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 O) 与 H₂SO₄ 和 HNO₃ 起反应,以便产生 α -溴代-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 Q)。更具体地讲, α -溴代-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 Q) 是用 α -溴代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 O) 制备的,这通过首先用 H₂SO₄ 填充锥形瓶来实现。然后在冰浴中冷却所述烧瓶,并且将 50% HNO₃ 添加到所述烧瓶中。然后将固体 α -溴代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 O) 逐份添加到该混合物中,将温度保持在 28°C 以下。然后将反应混合物加热到 60°C,同时搅拌,直到获得清澈溶液。在反应完成时,将它冷却到室温并且保持在室温下。然后添加水,以便终止反应。在冰浴中冷却所得到的浆,然后过滤,以便获得 α -溴代-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 Q)。还可参见本文的实施例 18。

[0084] 然后将 α -溴代-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 Q) 溶解在氢氧化铵中,优选 30% 氢氧化铵,并且优选将所述反应混合物加热到 65°C。然后将所述反应混合物浓缩成固体。然后添加 EtOH,并且再次浓缩反应混合物,以便产生含有 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) 的外消旋混合物。还可参见本文的实施例 19。

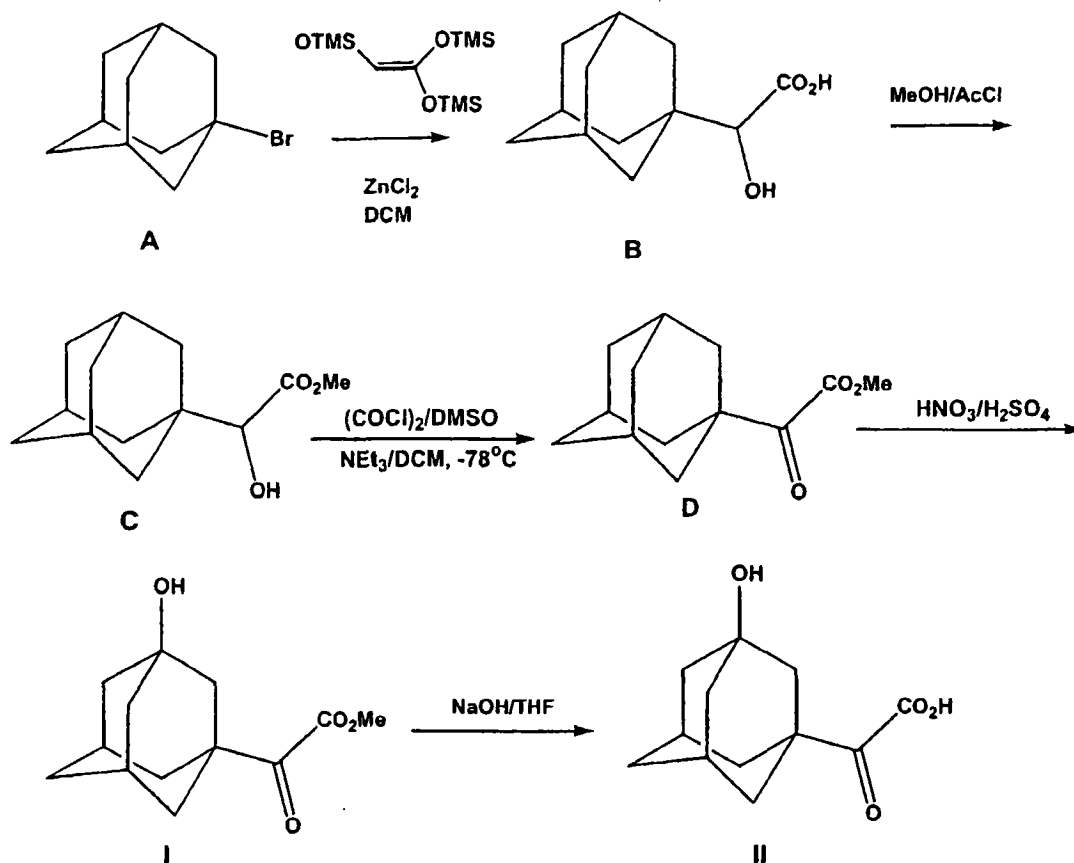
[0085] 为了从所述外消旋混合物中分离 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V 的外消旋混合物),通过一般的 Boc 保护,用 Boc 酐和氢氧化钠在四氢呋喃中处理该混合物,以便产生 α -[[(1,1-二甲基乙氧基) 羰基] 氨基]-3] 羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (化合物 R)。然后将 α -[[(1,1-二甲基乙氧基) 羰基] 氨基]-3] 羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (化合物 R) 与诸如 [1R,2S]-(-)-1,2-二苯基羟基乙胺、1,7,7-三甲基二环 [2.2.1] 庚烷-2-胺或 S-(-)-1-1(1-萘基) 乙胺的手性碱混合,并且将混合物蒸发至干燥。将干燥的混合物重新悬浮在溶剂中,并且将重新悬浮的混合物放置在摇床上加热若干小时。在冷却到室温之后,发生了 (α S)- α -[[二甲基乙氧基] 羰基] 氨基)-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (化合物 S) 的结晶。还可参见本文的实施例 20。

[0086] 除掉 Boc 基团,得到了 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V)。

[0087] 本发明的另一方面涉及用于生产中间体化合物 3-羟基-< a-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 II) 的方法,该化合物被用于合成片段 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V)。所述中间体化合物 3-羟基-< a-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 II) 可以按照在方案 IV 中所示的方法生产。

[0088]

方案 IV

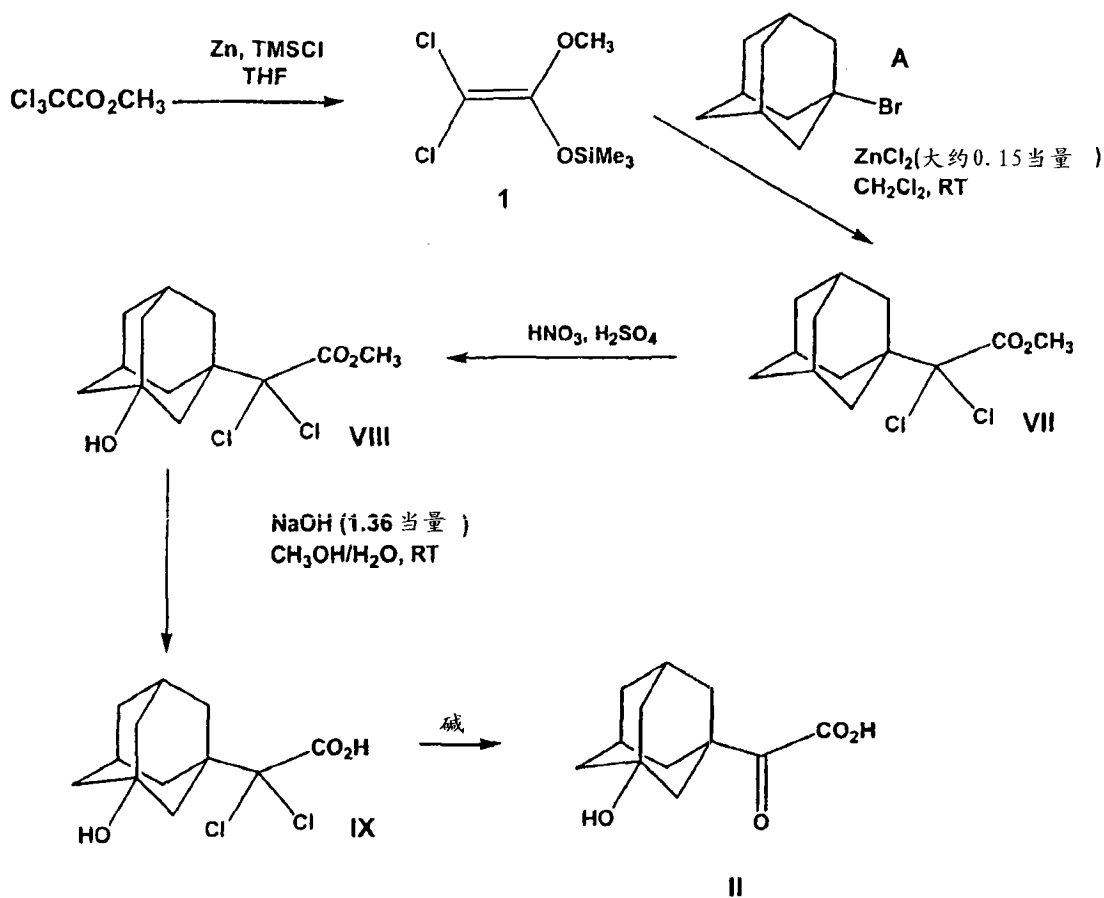


[0089] 如方案 IV 所示,在该方法中,通过氯化锌催化将溴化金刚烷 (式 A) 烷基化,以便产生 (< aS)-< a-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 B)。然后用乙酰氯在甲醇中酯化 (< aS)-< a-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 B),以便产生 (< aS)-< a-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸甲酯 (式 C)。然后通过 Swern 氧化作用将 (< aS)-< a-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸甲酯 (式 C) 转化成 (< aS)-< a-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸甲酯 (式 D)。然后对 (< aS)-< a-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸甲酯 (式 D) 进行羟基化,以便形成 3-羟基-< a-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸甲酯 (式 I),然后对它进行水解,以便形成 3-羟基-< a-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 II)。还可参见本文的实施例 21 至 25。

[0090] 另外,中间体化合物 3-羟基-< a-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 II) 可以按照下面的方案 V 所示方法生产。

[0091]

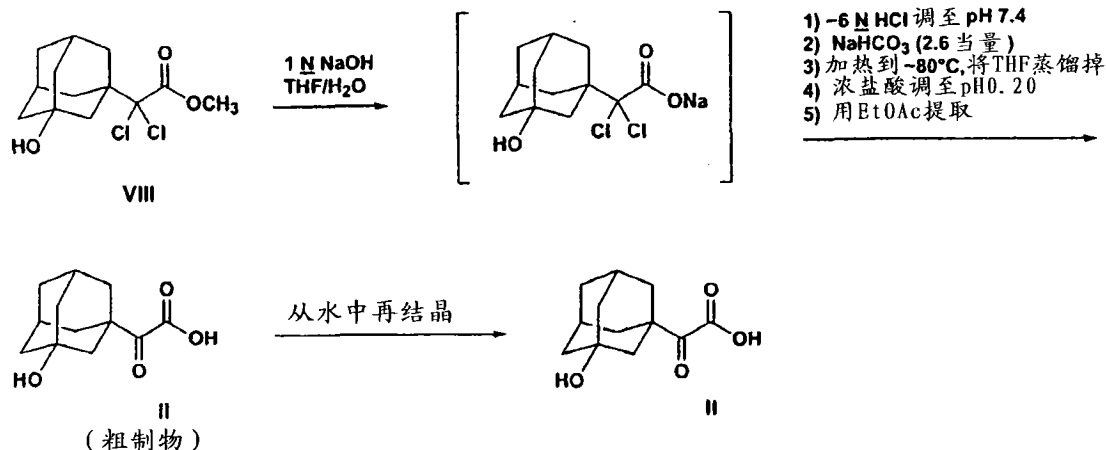
方案 V



[0092] 如方案 V 所示, (2,2-二氯-1-甲氧基-乙烯氧基)-三甲基硅烷 1 是通过对 Kuroda 等的方法进行小的改进制备的 (EP 08 08 824A3 ; Imashiro 和 Kuroda, Tetrahedron Letters 2001 42 :1313-1315)。在氯化锌的影响下,用 1 处理溴代金刚烷 (Reetz 等 Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18 :72, Reetz 和 Heimbach, Chem. Ber. 1983 116 :3702-3707, Reetz 等 Chem. Ber. 1983 116 :3708-3724), 得到了具有式 VII 的金刚烷-1-基-二氯-乙酸甲酯。然后在浓硫酸中用氧化氮对具有式 VII 的金刚烷-1-基-二氯-乙酸甲酯进行羟基化, 以便提供定量产量的具有式 VIII 的二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸甲酯。在室温下, 在甲醇中用含水氢氧化钠水解式 VIII, 以便产生具有式 IX 的二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸。然后用弱碱, 优选碳酸氢钠在较高温度下处理二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸 (式 IX), 专一地导致中间体化合物 3-羟基- α -氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 II) 的形成。还可参见本文的实施例 26 至 29。

[0093]

方案 VA

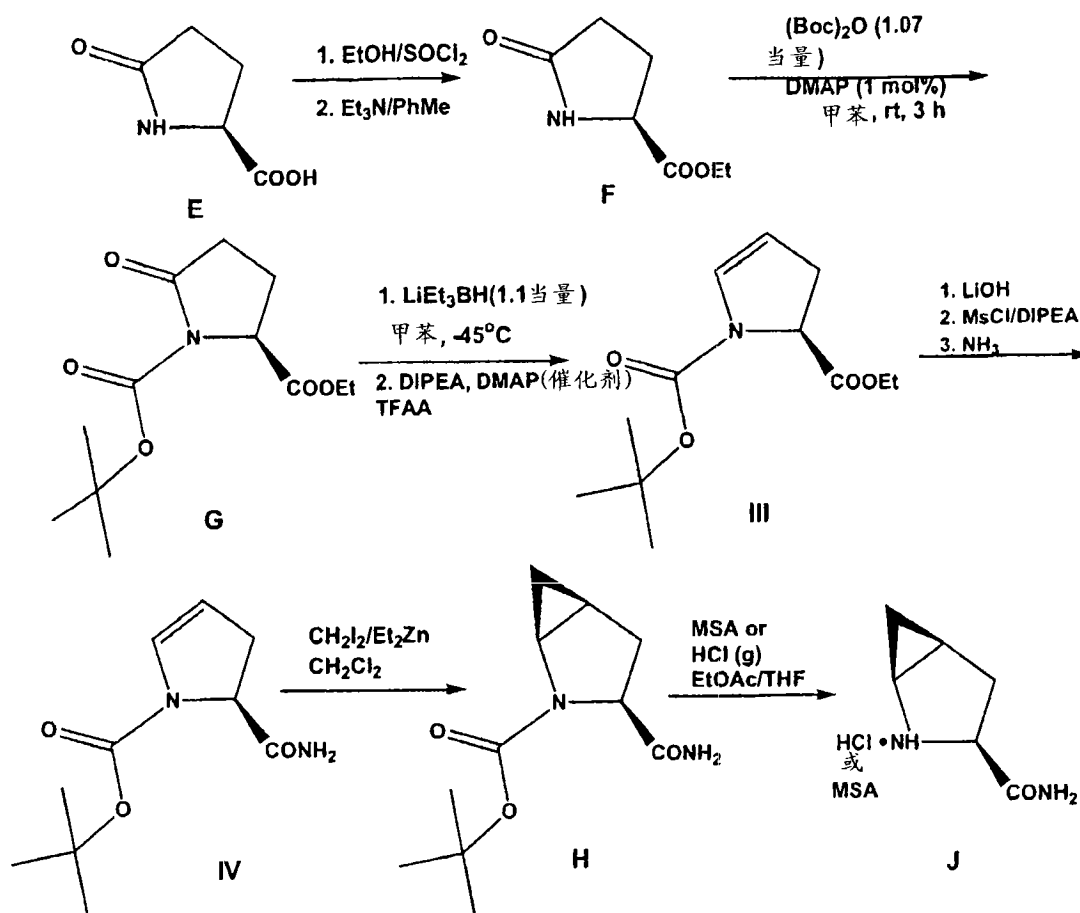


[0094] 如方案 VA 所示, 中间体化合物 3-羟基- α -氧代三环-[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II) 可以用单罐(one pot)的方法制备。如所示的, 在诸如氩气的惰性气氛中, 在四氢呋喃中用含水氢氧化钠(或诸如氢氧化钾或氢氧化锂的其他碱)处理式 VIII 化合物, 得到相应的钠盐。在不回收钠盐的情况下, 用诸如盐酸的酸处理含有钠盐的所述反应混合物, 以便将 pH 降低到低于大约 0.50, 优选大约 0.20, 以便形成相应的酮酸 II, 它能够从水中再结晶, 以便形成酮酸 II 的晶体。

[0095] 本发明的另一方面涉及用于生产片段 (1S, 3S, 5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-甲酰胺(式 J) 的方法。该片段被用于生产 (1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基)-1-氧代乙基]-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-腈, 它可以按照下面的方案 VI 中所示出的方法生产。

[0096]

方案 VI



[0097] 如方案 VI 所示,首先酯化 L- 焦谷氨酸 (式 E),以便产生 L- 焦谷氨酸乙酯 (式 F; SQ 7539)。然后在氮上对该 L- 焦谷氨酸乙酯进行 BOC- 保护,以便产生 (5S)-2- 氧代吡咯烷-1,5- 二羧酸 [1-(1,1- 二甲基乙基),5- 乙基] 酯 (式 G)。然后进行 SuperHydride 还原和消除,以便形成 4,5- 二氢-1H- 吡咯-1,5- 二羧酸 [1-(1,1- 二甲基乙基),5- 乙基] 酯 (式 III)。然后通过用氢氧化锂皂化水解 BOC-DHPEE III,以便形成 BOC-DHP。然后使用甲磺酰氯随后再使用氨通过混合的酐在 BOC-DHP 上形成了酰胺,以便产生 (5S)-5- 氨基羰基-4,5- 二氢-1H- 吡咯-1- 羧酸 1-(1,1- 二甲基乙基) 酯 (式 IV)。然后通过 Simmons-Smith 反应将 (5S)-5- 氨基羰基-4,5- 二氢-1H- 吡咯-1- 羧酸 1-(1,1- 二甲基乙基) 酯 (式 IV) 环丙烷化,以便产生 [1S-(1 < a, 3 < b, 5 < a)-3- 氨基羰基]-2- 氮杂二环 [3.1.0] 己烷-2- 羧酸 1,1- 二甲基乙酯 (式 H)。然后除掉 BOC,导致了酸式盐的形成,如片段 (1S,3S,5S)-2- 氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3- 甲酰胺 (式 J) 的盐酸盐或甲磺酸盐。还可参见本文的实施例 29 至 35。

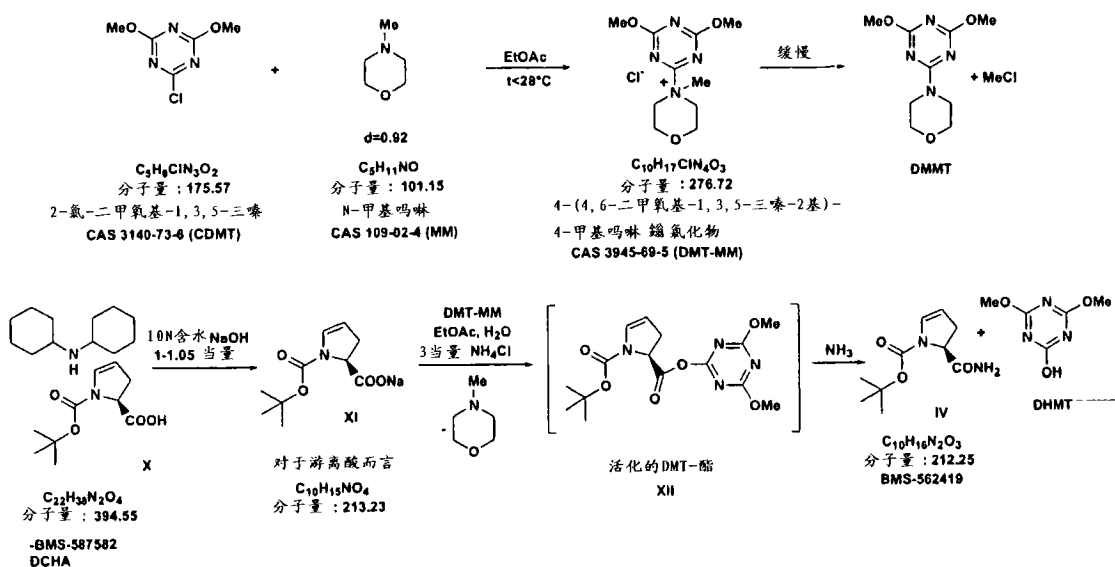
[0098] 本发明的另一方面还在方案 VI 中示出,该方案涉及在 Simmons-Smith 反应中通过环丙烷化将 (5S)-5- 氨基羰基-4,5- 二氢-1H- 吡咯-1- 羧酸 1-(1,1- 二甲基乙基) 酯 (式 IV) 转化成 [1S-(1 < a, 3 < b, 5 < a)-3- 氨基羰基]-2- 氮杂二环 [3.1.0] 己烷-2- 羧酸 1,1- 二甲基乙酯 (式 H)。在该反应中,将 (5S)-5- 氨基羰基-4,5- 二氢-1H- 吡咯-1- 羧

酸 1-(1,1-二甲基乙基)酯在第一个反应器中溶解于二氯甲烷中。在第二个反应器中,将二氯甲烷冷却到 -30°C , 并且添加二甲氧基乙烷和存在于甲苯中的 30% 的二乙基锌溶液, 然后添加二碘甲烷。然后将该混合物添加到第一个反应器中, 然后添加饱和的碳酸氢盐溶液中。搅拌所得到的反应混合物, 直到形成沉淀。然后对所述沉淀进行过滤, 洗涤, 并且重新悬浮在二氯甲烷中两次或两次以上。然后将滤液分离成水相和有机相, 并且用半饱和的盐水洗涤所述有机相。除去溶剂, 并且通过庚烷进行交换, 以便获得存在于庚烷中的浆状粗制产物 [1S-(1 < a, 3 < b, 5 < a)-3-氨基羰基]-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷 -2-羧酸 1,1-二甲基乙酯 (式 H)。

[0099] 另外, 可以按照方案 VIA 制备 (5S)-5-氨基羰基 -4,5-二氢 -1H-吡咯 -1-羧酸 1-(1,1-二甲基乙基)酯 (式 IV)。

[0100]

方案 VIA



[0101] 如方案 VIA 所示, 用诸如氢氧化钠的碱金属碱处理 4,5-二氢 -1H-吡咯 -1,5-二羧酸 1-(1,1-二甲基乙基)酯 X 的 DCHA 盐, 以便形成相应的盐, 如钠盐。

[0102] 4,5-二氢 -1H-吡咯 -1,5-二羧酸 1-(1,1-二甲基乙基)酯 XI 的钠盐还可以用相应的乙酯制备, 这通过用乙醇和氢氧化钠处理所述乙酯 (优选存在于甲苯中的所述乙酯的溶液) 来实现。

[0103] 用诸如氯化铵和磷酸二氢钠的缓冲液处理钠盐 XI 的溶液, 以便将该溶液的 pH 降低到低于 7, 优选大约 6-6.5, 并且用 4-(4,6-二甲氧基 -1,3,5-三嗪 -2-基) -4-甲基吗啉 鎓氯化物 (DMT-MM) 处理所述缓冲的钠盐溶液, 以便形成活化的 DMT-酯 XII, 所述活化的 DMT-酯 XII 用氨或其他碱, 如硫酸铵, 氯化铵或氢氧化铵进行处理, 以便形成 (5S)-5-氨基羰基 -4,5-二氢 -1H-吡咯 -1-羧酸 1-(1,1-二甲基乙基)酯 IV。

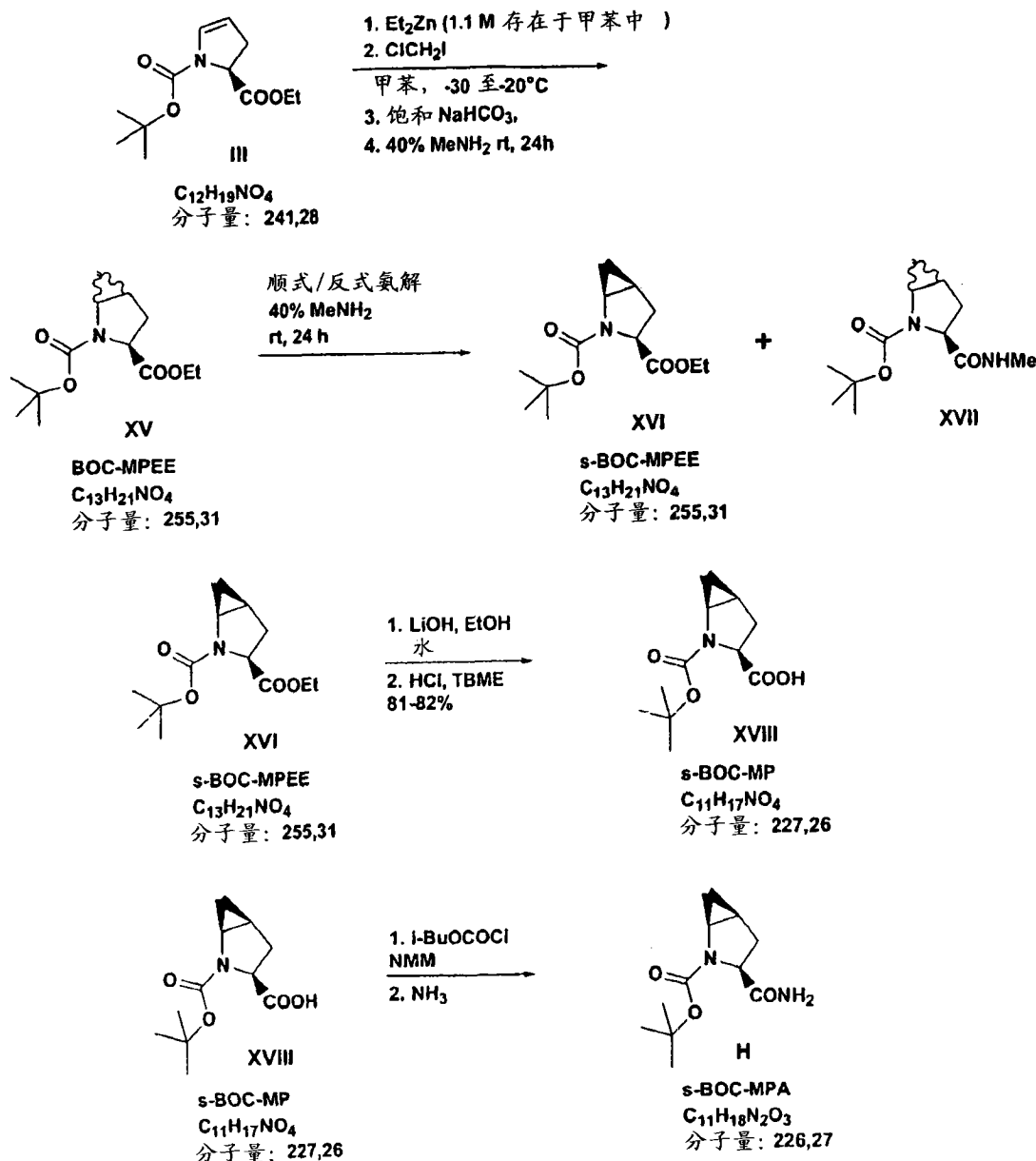
[0104] 可以按方案 VIA 所示制备 4-(4,6-二甲氧基 -1,3,5-三嗪 -2-基) -4-甲基 -吗啉 鎓氯化物 (DMT-MM), 这通过让 2-氯 -4,6-二甲氧基 -1,3,5-三嗪 (CDMT) 与 N-甲基吗啉在大约 0 至大约 10°C 的对比温度 (reduced temperature) 下起反应, 以便形成 DMT-MM。

[0105] 4,5-二氢 -1H-吡咯 -1,5-二羧酸 1-(1,1-二甲基乙基)酯 X 的 DCHA 盐可以用

相应的钠盐 XI 制备,这通过用甲基叔丁酯 (MTBE) 处理前面制备的 DCHA 盐 X 的水溶液来实现,其中用诸如 H_3PO_4 的酸将所述反应混合物的 pH 调节到 2.5-3。分离所述有机层,并且用盐水处理,以便形成相应的钠盐 XI。冷却所得到的反应混合物,并且用 DCHA 处理,以便形成相应的 DCHA 盐 X。

[0106] 方案 VIB

[0107]



[0108] 方案 VI 的化合物 H 还可以按照方案 VIB 所示制备,这通过按以下方法对 N-BOC 4,5-脱氢脯氨酸乙酯 III 进行环丙烷化来实现。

[0109] 在大约 -30 至大约 $0^\circ C$ 的对比温度下,在存在诸如甲苯,二氯甲烷或二氯乙烷的无水有机溶剂的条件下,用二乙基锌和氯碘甲烷处理 N-BOC 4,5-脱氢脯氨酸乙酯 III,以便形成 N-BOC 4,5-亚甲基脯氨酸乙酯 XV。

[0110] 通过在诸如氮气的气氛中用含水甲胺处理,分离所得到的 BOC 4,5-亚甲基脯氨酸乙酯 XV (顺式和反式同分异构体 (8 : 1) 的混合物),并且回收顺 (S)-BOC-4,5-亚甲基脯氨酸乙酯 XVI (与 XVII 分离)。

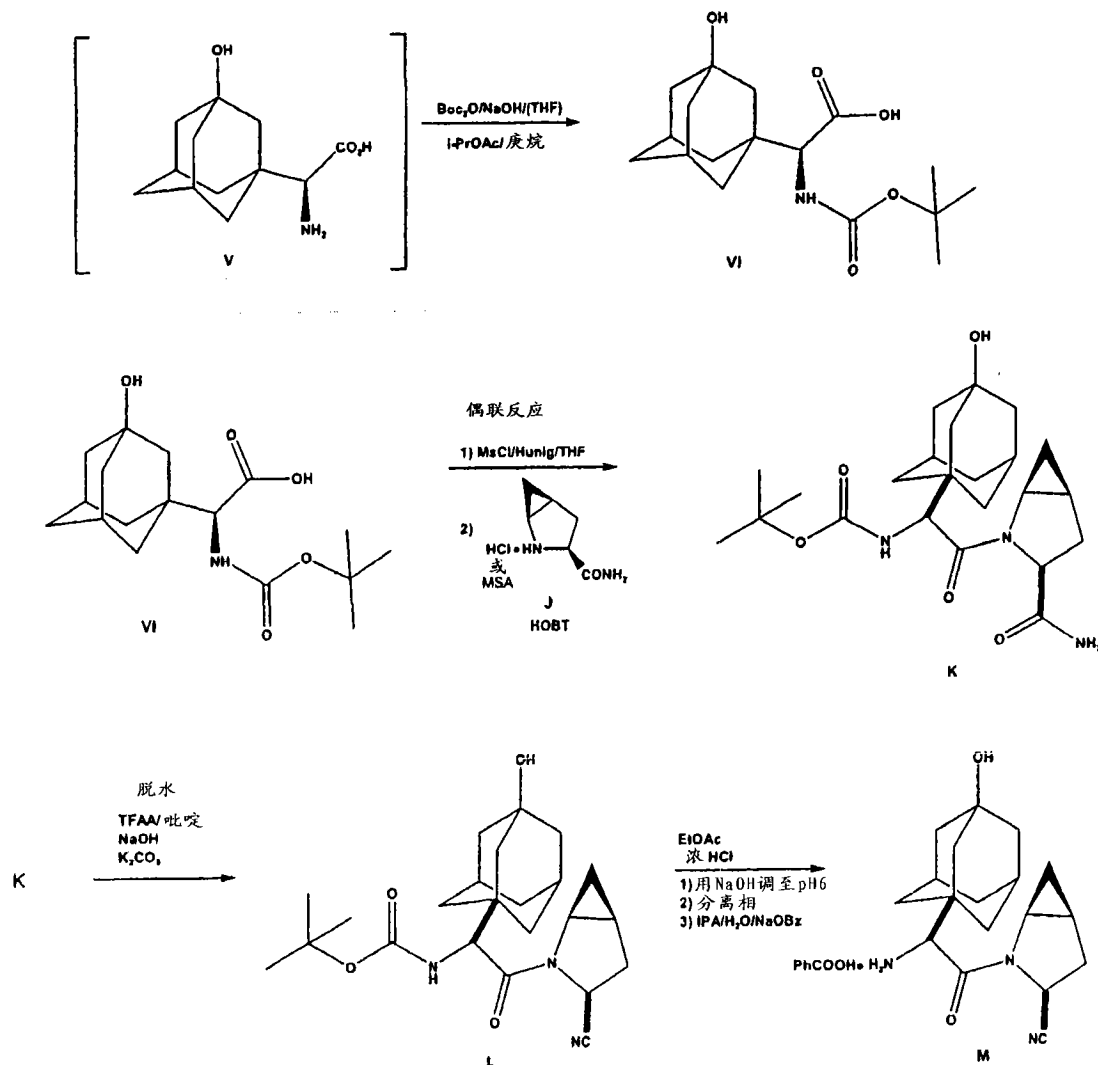
[0111] 在乙醇或其他有机溶剂,如甲苯或 THF 中,用诸如含水氢氧化锂,氢氧化钠或氢氧化钾的碱处理 s-BOC-4,5-亚甲基脯氨酸乙酯 XVI,以便形成相应的 s-BOC-亚甲基脯氨酸游离酸 XVIII。

[0112] 通过如下方法将游离酸 XVIII 转化成相应的 s-BOC-亚甲基脯氨酸酰胺 H,即在存在 N-甲基吗啉的条件下,在诸如不超过约 -8°C 的对比温度下,处理溶解在诸如 THF 或二氯甲烷;氯甲酸异丁酯或甲磺酰氯的有机溶剂中的游离酸 XVIII,然后用氨处理所述反应混合物,以便形成 s-BOC-亚甲基脯氨酸酰胺 H。

[0113] 本发明的另一方面涉及用于偶联片段 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) 和 (1S,3S,5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-甲酰胺 (式 J),以便产生 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基)-1-氧代乙基]-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-腈苯甲酸盐 (1 : 1) 的方法。所述片段的偶联如下面的方案 VII 所示。

[0114] 方案 VII

[0115]



[0116] 如方案 VII 所示,首先用 BOC 保护片段 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V),以便产生 (< aS)-< a-[[(1,1-二甲基乙氧基) 羰基] 氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 VI),这通过在存在诸如氢氧化钠的碱的条件下用

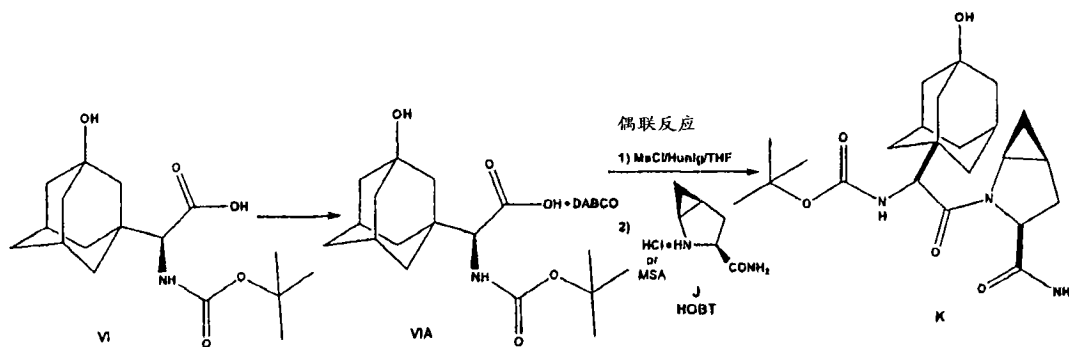
BOC₂O 处理 V, 并且通过乙酸乙酯 (EtOAc) 提取分离, 以便分离出游离酸 VI 来实现。另外, 作为乙酸乙酯的替代, 还可以将乙酸异丙酯 / 庚烷用于使游离酸 VI 结晶。在另一种实施方案中, 使用了具有式 V 的化合物, 而不用从生物转化中分离, 其中使用如实施例 8A 中所述的分离的 PDH/FDH 酶浓缩物。

[0117] 用甲磺酰氯 (甲磺酰 Cl) 和 Hunig 碱 (二异丙基乙胺或 DIPEA) 处理存在于诸如四氢呋喃 (THF) 的合适的有机溶剂中的式 VI 化合物的溶液 (冷却到大约 -10 至大约 0°C), 以便形成相应的 VI 的甲磺酸盐。

[0118] 在存在 1-羟基苯并三唑 (HOBt) 或其他已知偶联剂条件下, 通过偶联反应将 (< aS)-< a[[(1,1-二甲基乙氧基) 羰基] 氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 VI) 甲磺酸盐偶联在 (1S,3S,5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-甲酰胺 (式 J) 上, 以便产生 3-(氨基羰基)-< aS)-< a-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基)-< b-氧代-(1S,3S,5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-2-乙烷氨基甲酸 1,1-二甲基乙酯 (式 K)。通过用诸如吡啶或三乙胺和三氟乙酸酐的有机碱处理化合物 K, 对式 K 化合物进行脱水, 然后通过冷却到大约 0 至大约 10°C 对该反应物进行水解, 并且添加氢氧化钠或诸如 KOH 或 LiOH 的其他强碱, 以便形成化合物 L。然后对 3-氰基-(< aS)-< a-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基)-< b-氧代-(1S,3S,5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-2-乙烷氨基甲酸 1,1-二甲基乙酯 (式 L) 进行脱保护 (并且用苯甲酸钠处理), 以便形成二肽基肽酶 IV 抑制剂 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基)-1-氧代乙基]-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-腈苯甲酸盐 (1 : 1) (式 M)。还可参见本文的实施例 37 至 39。

[0119]

方案 VIIA



[0120] 如方案 VIIA 所示, 可以按以下方法用化合物 VIA (DABCO 盐) 制备化合物 K。

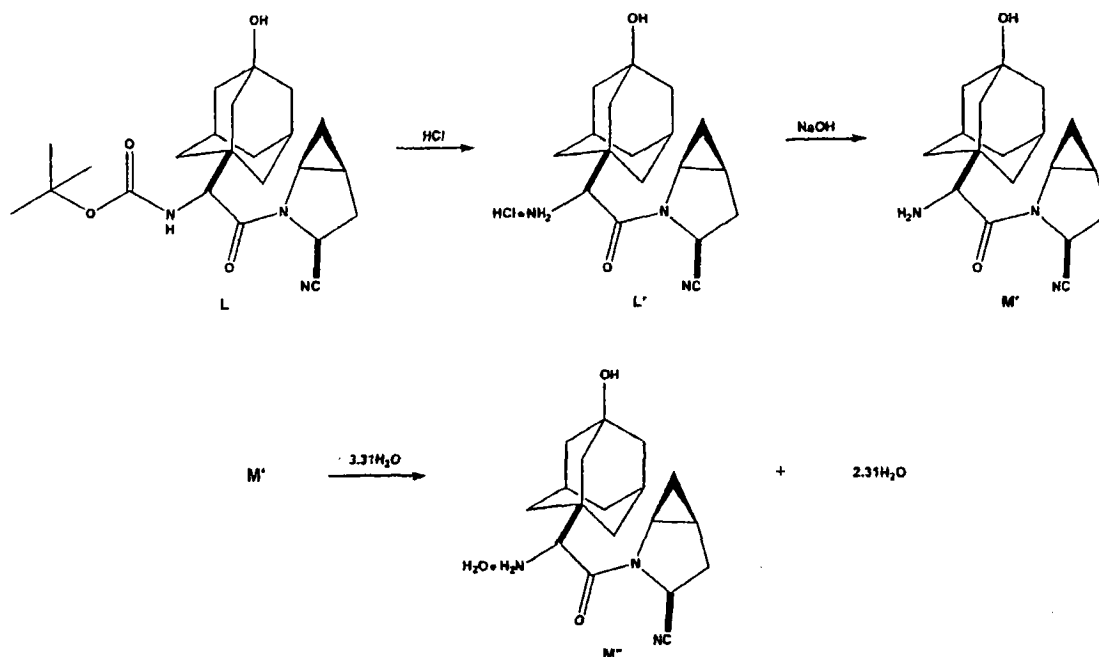
[0121] 用 1,4-二氮杂二环 [2,2,2] 辛烷 (DABCO) 处理式 VI 酸, 以便形成 (< aS)-< a[[(1,1-二甲基乙氧基) 羰基] 氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 1,4-二氮杂二环 [2.2.2] 辛烷盐 (式 VIA)。在存在 1-羟基苯并三唑 (HOBt) 或其他已知偶联剂条件下通过偶联反应 (参见方案 VIIA) 将 (< aS)-< a[[(1,1-二甲基乙氧基) 羰基] 氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 1,4-二氮杂二环 [2.2.2] 辛烷盐 (式 VIA) 偶联在 (1S,3S,5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-甲酰胺 HCl 或 MSA 盐 (式 J) 上, 以便产生 3-(氨基羰基)-< aS)-< a-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基)-< b-氧代-(1S,3S,5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-2-乙烷氨基甲酸 1,1-二甲基乙酯 (式 K)。

[0122] 再参见方案 VII, 可以通过用诸如盐酸的强酸处理对化合物 L 进行脱保护, 正如方

案 VIIB 所描述的。

[0123]

方案 VIIB



[0124] 参见方案 VIIB, 可以按以下方法用 BOC-保护的中间体 L 生产游离碱一水合物 M'' 。

[0125] 在存在二氯甲烷和甲醇的条件下用浓盐酸处理 BOC-保护的中间体 L, 同时将反应温度保持在大约 20–25°C 范围内, 以便形成盐酸盐 L' 。用氢氧化钠或其他强碱处理盐酸盐 L' , 以便形成游离碱 M' 。然后用水处理游离碱 M' , 以便形成游离碱一水合物 M'' 。

[0126] 本领域技术人员在阅读本公开内容之后可以理解, 终产物二肽基肽酶 I V 抑制剂 (1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基)-1-氧代乙基]-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-腈苯甲酸盐 (1 : 1) (式 M) 或它的相应的游离碱 M' 或它的一水合物 M'' 可以使用在方案 I, II 或 III 和 IV, V, VI, VII 和 VIIA 中所示出的所有步骤或只是在方案 I, II 或 III 和 IV, V, VI, VII 和 VIIA 的任意一个中所示出的一部分步骤生产, 这取决于哪一种中间体被选择用作原材料。例如, 采用本发明的教导, 本领域技术人员可以用具有式 II 的 3-羟基- α -氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸, 具有式 V 的 (α S)- α -氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸, 具有式 VIA 的 (α S)- α [[1,1-二甲基乙氧基]羰基]氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 1,4-二氮杂二环 [2.2.2] 辛烷盐或具有式 IV 的 (5S)-5-氨基羰基-4,5-二氢-1H-吡咯-1-羧酸 1-(1,1-二甲基乙基) 酯作为原材料, 按常规方法生产基于环丙基-稠合的吡咯烷的抑制剂 (1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基)-1-氧代乙基]-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-腈苯甲酸盐 (1 : 1) (式 M) 或相应的游离碱 M' 。

[0127] 因此, 本领域技术人员可以生产基于环丙基-稠合的吡咯烷的二肽基肽酶 IV 抑制剂, 这只需要将 (α S)- α [[1,1-二甲基乙氧基]羰基]氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 VI) (或它的 DABCO 盐 (式 VIA)) 偶联在 (1S, 3S, 5S)-2-氮杂二环

[3. 1. 0] 己烷-3-甲酰胺(式 J)上,以便产生 3-(氨基羰基)-< aS)-< a-(3-羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸-1-基)-< b-氧代-(1S, 3S, 5S)-2-氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷-2-乙烷氨基甲酸 1,1-二甲基乙酯(式 K);使 3-(氨基羰基)-< aS)-< a-(3-羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸-1-基)-< b-氧代-(1S, 3S, 5S)-2-氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷-2-乙烷氨基甲酸 1,1-二甲基乙酯(式 K)脱水,以便产生 3-氰基-(< aS)-< a-(3-羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸-1-基)-< b-氧代-(1S, 3S, 5S)-2-氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷-2-乙烷氨基甲酸 1,1-二甲基乙酯(式 L);并且水解 3-氰基-(< aS)-< a-(3-羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸-1-基)-< b-氧代-(1S, 3S, 5S)-2-氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷-2-乙烷氨基甲酸 1,1-二甲基乙酯(式 L),以便形成二肽基肽酶 IV 抑制剂。在该方法中,所述原材料包括片段 (< aS)-< a[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]-3-羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 VI)(或它的 DABCO 盐(式 VIA)) 和 (1S, 3S, 5S)-2-氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷-3-甲酰胺(式 J)。

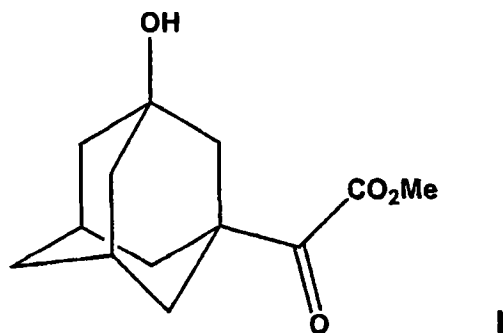
[0128] 不过,所述方法还可以包括通过 BOC 保护用中间体 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 V) 生产片段 (< aS)-< a[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]-3-羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 VI) 的步骤。在本实施方案中,所述方法还包括通过酶促氨基化作用或转氨基作用(参见方案 I 或 II) 不对称地还原 3-羟基-< a-氧代三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 II) 生产 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 V) 中间体。另外,所述方法还包括按照方案 III 用三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 N) 化学合成 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 V)。

[0129] 作为补充或替代,所述方法还包括通过从中间体 [1S-(1< a, 3< b, 5< a)-3-氨基羰基]-2-氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷-2-羧酸 1,1-二甲基乙酯(式 H) 上除去 BOC 生产片段 (1S, 3S, 5S)-2-氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷-3-甲酰胺(式 J) 的步骤。在本实施方案中,所述方法还包括对 (5S)-5-氨基羰基-4,5-二氢-1H-吡咯-1-羧酸 1-(1,1-二甲基乙基)酯(式 IV) 进行环丙烷化,优选通过 Simmons-Smith 反应,以便生产 [1S-(1< a, 3< b, 5< a)-3-氨基羰基]-2-氮杂二环 [3. 1. 0] 己烷-2-羧酸 1,1-二甲基乙酯(式 H) 的步骤。

[0130] 本发明的另一方面涉及在这里被鉴定为生产基于环丙基-稠合的吡咯烷的二肽基肽酶 IV 抑制剂的有用中间体的新型化合物的化合物。可用作生产基于环丙基-稠合的吡咯烷的二肽基肽酶 IV 抑制剂的中间体的本发明的化合物包括:

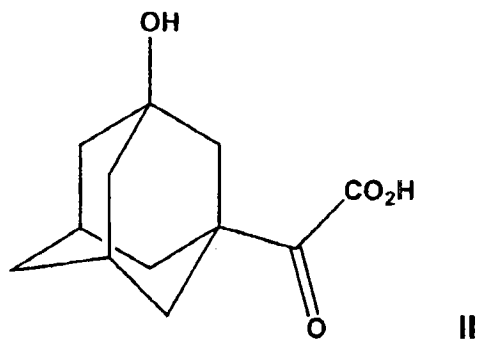
[0131] 3-羟基-< a-氧代三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸甲酯,如式 I 所示,

[0132]



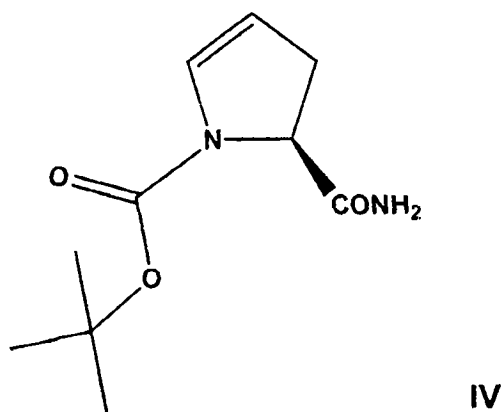
[0133] 3-羟基-< a-氧代三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸,如式 II 所示,

[0134]



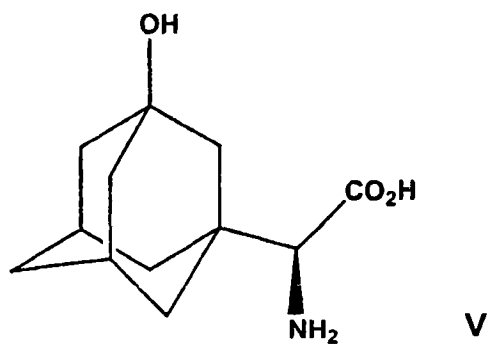
[0135] (5S)-5-氨基羧基-4,5-二氢-1H-吡咯-1-羧酸 1-(1,1-二甲基乙基)酯, 如式 IV 所示,

[0136]



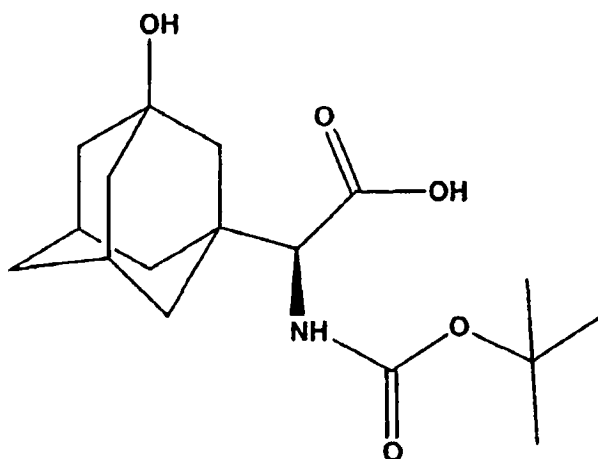
[0137] (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸, 如式 V 所示,

[0138]



[0139] (< aS)-< a[[(1,1-二甲基乙氧基) 羰基] 氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸, 如式 VI 所示,

[0140]

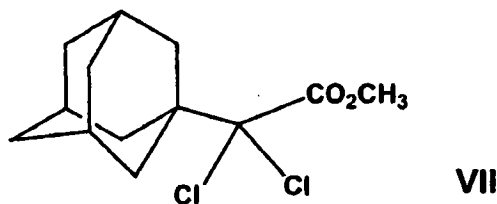


VI

[0141] (或它的 DABCO 盐 VIA),

[0142] 金刚烷-1-基-二氯-乙酸甲酯, 如式 VII 所示,

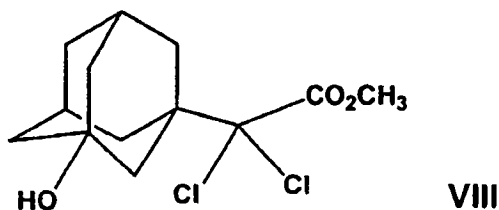
[0143]



VII

[0144] 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸甲酯, 如式 VIII 所示, 和

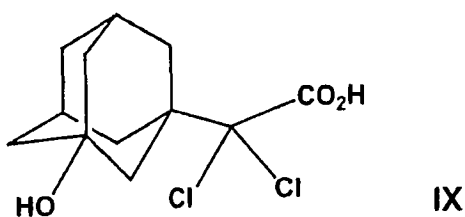
[0145]



VIII

[0146] 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸, 如式 IX 所示。

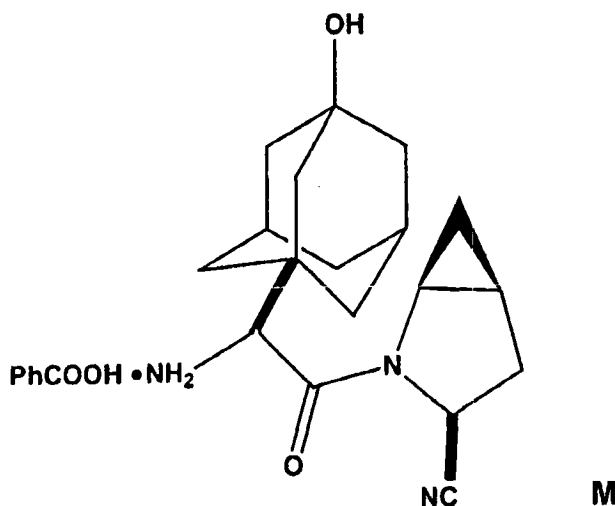
[0147]



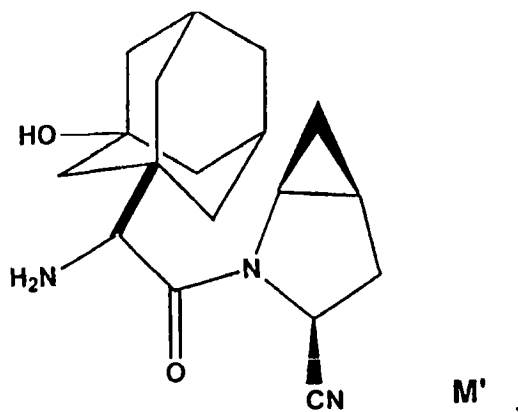
IX

[0148] 在优选实施方案中, 正如本文所显示的, 所述化合物用作中间体, 以用于生产二肽基肽酶 IV 抑制剂 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基)-1-氧代乙基]-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-腈苯甲酸盐 (1 : 1), 如式 M 所示

[0149]



[0150] 并且优选分别如式 M' 和 M'' 所示的相应的游离碱或它的一水合物，
[0151]



[0152] 或它的一水合物 M'' (在上文中描述)。

[0153] 用本发明的化合物和方法产生的二肽基肽酶 IV 的抑制作用可用于治疗糖尿病及其并发症,高血糖症, X 综合征,高胰岛素血症,肥胖和动脉粥样硬化和相关的疾病,以及免疫调节疾病和慢性炎症性疾病。

[0154] 以下实施例表示本发明的优选实施方案。

[0155] 实施例

[0156] 实施例 1

[0157] 用来自能表达来自中间型高温放线菌的苯丙氨酸脱氢酶

[0158] 并且产生内源甲酸脱氢酶的重组巴斯德毕赤氏酵母的

[0159] 提取物进行还原性氨基化作用。

[0160] 将来自能表达来自中间型高温放线菌的苯丙氨酸脱氢酶的重组巴斯德毕赤氏酵母冷冻细胞 (2.25kg) 添加到含有甲酸铵 (28.65g, 0.454 摩尔) 的去离子水 (6.75L) 中。在解冻之后,用 Janke and Kunkel Ultra-turrax T25 匀浆器悬浮所述细胞,用浓 NH_4OH 将 pH 调节到 7,并且用碎冰冷却,以便得到存在于 50mM 甲酸铵中的 25% w/v 细胞悬浮液。通过让细胞以 12000 磅 / 英寸²(psi) 通过微型流化床装置 (microfluidizer) 2 次来破碎细胞,并且通过在 4°C 下以 20,000 × g 离心除掉细胞碎片。将 7024ml 含有分别通过测定 A (参见实施例 9) 或测定 B (参见实施例 10) 确定为 230998 单位或 124641 单位的苯丙氨酸脱氢酶活性,和 80080 单位的甲酸脱氢酶的上清液添加到 New Brunswick Scientific Bioflo IV

生物反应器的 16L 容器中。

[0161] 制备含有甲酸铵 (442.5 克, 7.017 摩尔) 和 (3-羟基-金刚烷-1-基)-氧代-乙酸 (786.7 克, 3.510 摩尔) 的 7024ml 溶液。用 276ml 浓氢氧化铵将该溶液的 pH 调节到 8.0。然后添加烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD; 9.834 克, 14.82 毫摩尔) 和二硫苏糖醇 (2.163 克, 14.027 毫摩尔), 并且将该溶液添加到装有巴斯德毕赤氏酵母提取物的生物反应器中。将该溶液保持在 40°C 下, 并且以 150rpm 的速度搅拌。将 45, 25 和 27ml 的浓氢氧化铵的等分试样分别在反应开始之后 0, 3 和 18 小时添加进去, 以便将 pH 调节到 8.0。在 25 小时之后, 通过 HPLC 分析 (参见实施例 8, 方法 2) 测量该溶液含有 818.9 克 (3.637 摩尔, 100% 收率) (S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸, 并且没有可检测到的酮酸或氨基酸的 R-对映体。

[0162] 通过由以下步骤组成的方法分离了 (S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸: 煮沸所述酶促转化混合物, 以便排除氨, 用甲酸将 pH 调节到 3, 过滤以除去沉淀的蛋白, 将氨基酸吸附在 Dowex 50(H+) 树脂上, 用 1.5M 氨洗脱, 并且浓缩富流出物, 以便得到结晶固体形式的 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸。用该分离方法进行的最后处理 (787 克酮酸输入量), 用 3-羟基-< a-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸得到了 804 克 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸, 效力为 94.3%, 收率为 96.0%。通过该方法分离的所有批次的 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸在随后的产生 (1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基)-1-氧代乙基]-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-腈苯甲酸盐的反应中表现良好。

[0163] 实施例 2

[0164] 用来自重组巴斯德毕赤氏酵母的加热干燥的细胞

[0165] 进行还原性氨基化作用

[0166] 在 pH 8.0 制备在 4.0ml 的最终体积中含有以下成分的溶液 (用 NH₄OH 调节 pH): 0.50M 甲酸铵, 0.25M (3-羟基-金刚烷-1-基)-氧代-乙酸, 1.06mM NAD, 1.00mM 二硫苏糖醇和 250mg 重组巴斯德毕赤氏酵母加热干燥的细胞, 所述细胞含有通过测定 A 确定为 32.7 单位的苯丙氨酸脱氢酶和 24.6 单位的甲酸脱氢酶。巴斯德毕赤氏酵母加热干燥的细胞的制备业已由 Hanson 等描述 (Enzyme and Microbial Technology 2000 26:348-358)。该溶液在 50ml 锥形瓶中, 在 40°C 下, 以 100rpm 的速度温育 4 天, 然后通过 HPLC 进行分析。该溶液含有 45.02mg/ml (80% 收率) (S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸。

[0167] 实施例 3

[0168] 使用来自重组巴斯德毕赤氏酵母的湿细胞进行还原性氨基化作用

[0169] 在 pH 8.0 制备在 3.0ml 的最终体积中含有以下成分的溶液 (用 NH₄OH 调节 pH): 0.415M 甲酸铵, 0.208M (3-羟基-金刚烷-1-基)-氧代-乙酸, 0.88mM NAD, 0.84mM 二硫苏糖醇和 12.5% w/v 巴斯德毕赤氏酵母湿细胞, 所述细胞含有通过测定 A 确定为 6.06 单位的苯丙氨酸脱氢酶和 12.8 单位的甲酸脱氢酶。该溶液在 50ml 锥形瓶中, 在 40°C 下, 以 200rpm 的速度温育 68 小时, 然后通过 HPLC 进行分析。该溶液含有 31.9mg/ml (68% 收率) (S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸。

[0170] 实施例 4 用能表达来自中间型高温放线菌的苯丙氨酸脱氢酶的重组大肠杆菌加

热干燥的细胞和来自傅伊丁氏假丝酵母 (*Candida boidinii*) 的甲酸

[0171] 脱氢酶,进行还原性氨基化作用

[0172] 在 pH 8.0 制备在 4.0ml 的最终体积中含有以下成分的溶液 (用 NH_4OH 调节 pH) : 0.50M 甲酸铵,0.25M(3-羟基-金刚烷-1-基)-氧代-乙酸,1.06mM NAD,1.00mM 二硫苏糖醇,2.55 单位/ml (0.51 单位/mg) 来自傅伊丁氏假丝酵母的甲酸脱氢酶 (Boehringer Mannheim) 和 250mg 重组大肠杆菌加热干燥的细胞,所述细胞含有通过测定 A 确定为 76 单位的苯丙氨酸脱氢酶。该溶液在 50ml 锥形瓶中,在 40°C 下,以 100rpm 的速度温育 4 天,然后通过 HPLC 进行分析。该溶液含有 7.69mg/ml (13.7% 收率) (S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸。

[0173] 实施例 5

[0174] 用重组大肠杆菌湿细胞和来自傅伊丁氏假丝酵母的甲酸脱氢酶

[0175] 进行还原性氨基化作用

[0176] 在 pH 8.0 制备在 3.0ml 的最终体积中含有以下成分的溶液 (用 NH_4OH 调节 pH) : 0.415M 甲酸铵,0.208M(3-羟基-金刚烷-1-基)-氧代-乙酸,0.88mM NAD,0.84mM 二硫苏糖醇,1 单位/ml (0.51 单位/mg) 来自傅伊丁氏假丝酵母的甲酸脱氢酶 (Boehringer Mannheim) 和 12.5% w/v 大肠杆菌湿细胞,所述细胞含有通过测定 A 确定为 97 单位的苯丙氨酸脱氢酶。该溶液在 50ml 锥形瓶中,在 40°C 下,以 200rpm 的速度温育 68 小时,然后通过 HPLC 进行分析。该溶液含有 5.16mg/ml (11.0% 收率) (S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸。

[0177] 实施例 6

[0178] 用来自芽孢八叠球菌属物种的苯丙氨酸脱氢酶和来自傅伊丁氏假丝酵

[0179] 母的甲酸脱氢酶进行还原性氨基化作用

[0180] 在 pH 8.5 制备在 1.0ml 的最终体积中含有以下成分的溶液 (用 NH_4OH 调节 pH) : 0.15M 甲酸铵,0.05M(11.2mg/ml) (3-羟基-金刚烷-1-基)-氧代-乙酸,1mM NAD,1mM 二硫苏糖醇,0.51 单位/ml (0.51 单位/mg) 来自傅伊丁氏假丝酵母的甲酸脱氢酶 (Boehringer Mannheim) 和 1.01 单位/ml 来自芽孢八叠球菌属物种的苯丙氨酸脱氢酶 (14.5 单位/mg ; Sigma Chemical Co.)。将该溶液在 30°C 下温育 20 小时,然后通过 HPLC 进行分析。该溶液含有 0.31mg/ml (2.74% 收率) (S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸。

[0181] 实施例 7

[0182] 构建质粒 pBMS2000-PPFDH-PDHmod

[0183] 采用了表达载体 pBMS2000-PPFDH-PDHmod 的两个步骤的构建。将巴斯德毕赤氏酵母 FDH 基因亚克隆到表达载体 pBMS2000 (pBMS2000 公开于美国专利号 6,068,991 中,该专利于 2000 年 5 月 30 日授予 S. W. Liu 等),其中使用包括巴斯德毕赤氏酵母 FDH 基因的 5' 和 3' 末端以及相容性限制性内切核酸酶切割位点的寡核苷酸引物:

[0184] 5' TCGTCATGAAAATCGTTCTCGTTTTG 3' (5' 末端;有义;SEQ ID NO :1)

[0185] BspHI

[0186] 5' TACTGTTTTTCCAGCGTATTCCTAGGCT 3' (3' 末端;反义;SEQ ID NO :2)

[0187] BamHI

[0188] 在四个 100 μ l 等分试样中,进行巴斯德毕赤氏酵母 FDH 基因的高保真度 PCR 扩

增,其各自含有 1×TaqPlus 反应缓冲液 (Stratagene, LaJolla, CA),各 0.2mM 的脱氧核苷三磷酸 (dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP),各 0.4nM 的寡核苷酸,2.5U TaqPlus DNA 聚合酶 (Stratagene) 和 10pg 含有克隆的巴斯德毕赤氏酵母 FDH 基因的质粒 DNA。扩增条件包括在 94℃ 下温育 4 分钟,然后进行 25 轮温育:94℃ 1 分钟,50℃ 1 分钟和 72℃ 1.5 分钟,使用能进行自动延伸的 Perkin-Elmer Model 480 热循环仪。

[0189] 用等体积的 1 : 1 酚 : 氯仿 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) 提取所述 PCR 反应混合物,并且以 13,000×g 的速度离心 5 分钟。获取上部水相,并且放入新的微量离心管中。通过添加 0.1 体积的 3M 乙酸钠和 2 体积的冰冷的乙醇使 DNA 沉淀。以 13,000×g 的速度离心 5 分钟,然后将液体从试管中吸出,并且用 0.5ml 冰冷的 70% 乙醇洗涤沉淀物。再次吸出液体,并且在室温下让沉淀物风干 30 分钟。

[0190] 在 37℃ 下,在 50 μl 的总体积中用 BspHI 和 BamHI 各 20 个单位消化扩增的 DNA,同时,用 BspHI 和 BamHI 消化 pBMS2000 载体 (2 μg)。在 1.0% TAE 琼脂糖凝胶上于 100v 将消化过的样品电泳 2 小时。将相当于 FDH 基因 (1100- 碱基对片段) 和线性化的载体 (4700- 碱基对片段) 的带分别从凝胶上切下,并且用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) 纯化。相对于低分子量质量梯 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) 由电泳来估计分离的片段的浓度,并且在 22℃ 下,在 10 μl 的总体积中以 5 : 1 (插入片段 : 载体) 的摩尔比连接 2 小时。通过添加 15 μl dH₂O 和 250 μl 1- 丁醇使 DNA 沉淀,并且以 13,000×g 的速度在微量离心机中沉淀 5 分钟。通过吸液排除液体,并且在低热条件下在 SpeedVac (Savant Instruments, Farmingdale, NY) 中使所述 DNA 干燥 5 分钟。将沉淀物重新悬浮在 5 μl dH₂O 中

[0191] 通过电穿孔将重新悬浮的 DNA 转化入 0.04ml 大肠杆菌 DH10B 感受态细胞 (Invitrogen) 中,条件为 25 μF 和 250 Ω。马上添加 SOC 培养基 (0.96ml ;SOC = 在每一升体积中含有 0.5% 酵母提取物,2% 胰化蛋白胨,10mM NaCl,2.5mM KCl,10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄ 和 20mM 葡萄糖),并在 37℃ 下,以 225rpm 的速度在摇床上温育所述细胞 1 小时。在含有 50 μg/ml 硫酸卡那霉素 (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 的 LB 琼脂平板上选择含有质粒 DNA 的菌落。通过菌落 PCR 鉴定具有需要的插入片段的质粒,其中使用 RapidCycler (Idaho Technology, Salt Lake City, UT) 在毛细管中进行。每一种反应混合物含有 50mM Tris-HCl (pH 8.3),4mM MgCl₂,0.25mg/ml 牛血清清蛋白,2% 蔗糖 400,0.1mM 甲酚红,各 0.4nM 的引物 (SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2),以及 2.5U Taq DNA 聚合酶 (Promega Corp., Madison, WI)。将所述反应混合物分成 10 μl 的等分试样,并且用移液管转入圆底微量滴定板的孔中。使用一次性塑料接种针挑取卡那霉素抗性菌落,并且搅拌到所述反应混合物中,并且转移到 LB- 卡那霉素琼脂上。将每一等分试样的反应混合物吸入 30 μl 的毛细管中,并且在两端对所述毛细管进行火焰密封。裂解细胞,并且通过在 94℃ 下温育 30 秒使 DNA 变性;通过 30 轮温育进行扩增,即在 94℃ 0 秒,40 °C 0 秒和 72℃ 60 秒,使用 RapidCycler 热循环仪 (Idaho Technologies, Salt Lake City, UT)。在 1.0% TAE 琼脂糖凝胶上,于 100v 对样品进行电泳 2 小时。在 17 个检测样品中有 7 个样品表现出 1100 碱基对的强的带。选择一个包含该质粒 (本文称作 pBMS2000-PPFDH) 的菌落用于质粒构建的下一个步骤。

[0192] “PDHmod” 表示修饰过的中间型高温放线菌苯丙氨酸脱氢酶,它与公开的 DNA 序

列 (Takada 等, J. Biochem. 109, pp. 371-376 [1991]) 的差别在于, 最后两个氨基酸的改变, 并且在羧基末端增加了额外 12 个氨基酸, 这些氨基酸是将 (3-羟基-金刚烷-1-基)-氧代-乙酸完全转化成 (S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸所需要的。将这种变化导入质粒 pPDH9K/10 (详细描述于专利 WO 200004179 中, 于 2000 年 1 月 27 日授予 Donovan 等), 随后将它转化入巴斯德毕赤氏酵母 SMD1168 (作为菌株 ATCC 74408 保藏)。

[0193] 天然 PDH 基因的 3' 末端和相应的氨基酸:

[0194] AAC AGC GCA AGG AGG TAA (SEQ ID NO:5)

[0195] Asn Ser Ala Arg Arg 终止 (SEQ ID NO:6)

[0196] PDHmod 基因的 3' 末端和相应的氨基酸 (改变了的或新的氨基酸用粗体表示):

[0197]

AAC AGC GCG **GAG GGG TAC CTC GAG CCG CGG**

Asn Ser Ala Glu Gly Tyr Leu Glu Pro Arg

CGG CCG CGA ATT AAT TCG CCT TAG (SEQ ID NO:7)

Arg Pro Arg Ile Asn Ser Pro 终止 (SEQ ID NO:8)

[0198] 制备了包括 PDHmod 基因的 5' 和 3' 末端同时具有相容性限制性内切核酸酶切割位点的寡核苷酸引物:

[0199] GATGCTCATATGCGCGACGTGTTTCAAATGATG (5' 末端, 有义; SEQ ID NO:3)

[0200] NdeI

[0201] GATCCCGGGCTAAGGCGAATTAATAATTCG (3' 末端, 反义; SEQ ID NO:4)

[0202] SmaI

[0203] 通过 PCR 扩增和纯化 PDHmod 的反应条件与用于巴斯德毕赤氏酵母 FDH 基因的条件相同, 所不同的是, 包括用 ATCC 74408 制备的染色体 DNA 作为该反应的模板。在 25°C 下用 NdeI 和 SmaI 各 20 个单位消化所得到的片段 1 小时, 然后在 37°C 下, 在 50 μ l 的总体积中消化 2 小时。同时, 使用相同的条件, 用 NdeI 和 SmaI 消化在起始密码子上具有 NdeI 位点的一种形式的 pBMS2000 载体 (2 μ g)。消化过的样品分别在 1.0% TAE 琼脂糖凝胶上, 于 100v 电泳 2 小时。将相当于 PDHmod 基因 (1200- 碱基对片段) 和线性化的载体 (4700- 碱基对片段) 的带从凝胶上切下, 并且用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) 纯化。按照上文所述方法连接两个片段, 转化大肠杆菌, 并且筛选包括具有 PDHmod 基因的插入片段的菌落 (形成 pBMS2000-PDHmod)。

[0204] 为了构建 pBMS2000-PPFDH-PDHmod, 用 HindIII 和 SmaI 各 10U 在 50 μ l 的反应物中, 在 25°C 下切割 pBMS2000-PDHmod (2 μ g) 1 小时, 然后在 37°C 下切割 1 小时。添加 10 单位的 T4DNA 聚合酶 (Invitrogen) 和 2 μ l 的所有四种脱氧核苷三磷酸的 2.5mM 混合物, 并且在 11°C 下将所述样品温育 20 分钟。在 1.0% TAE 琼脂糖凝胶上于 100v 将所述反应物电泳 2 小时。切下 1800- 碱基对的片段, 并且用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) 分离。该片段依次包括 tac 启动子, groES 基因和 PDHmod 基因 (作为转录融合体)。然后, 在 25°C 下, 用 10 单位限制性内切核酸酶 SmaI 在 50 μ l 体积中消化 pBMS2000-PPFDH (2 μ g) 2 小时, 然后在 37°C 下用 0.4U 虾碱性磷酸酶 (United States Biochemicals, Cleveland,

OH) 处理 1 小时。于 100v 在 1.0% TAE 琼脂糖凝胶上将质粒 DNA 电泳 2 小时, 分离, 并且用 QIAquick 试剂盒提取。以 6.5 : 1 (插入片段 : 载体) 摩尔比在 16°C 下, 在 10 μ L 的最终体积中连接这两个片段 4 小时。在用 1-丁醇提取并且离心之后, 将 DNA 转化入电感受态 (electrocompetent) DH10B 细胞。用前面对 FDH 所描述的两种 PDHmod- 特异性引物筛选卡那霉素 - 抗性菌落中 PDHmod 基因的存在。第二轮 PCR 筛选是通过使用分别与 PPFDH 的 5' 末端和 PDHmod 基因的 3' 末端同源的 DNA 引物进行的。只有那些能够支持 1400- 碱基对片段扩增的构建体具有相同方向的上述两个基因。发现了一种这样的质粒, 并且通过用 KpnI 进行诊断性限制酶切消化证实了它的方向, 由此得到了 5422 和 1826 碱基对的预期的片段。该质粒被命名为 “pBMS2000-PPFDH-PDHmod”。

[0205] 实施例 8

[0206] FDH 和 PDHmod 的表达

[0207] 将 pBMS2000-PPFDH-PDHmod 转化入大肠杆菌 JM110。在摇瓶研究中, 在 28°C 下, 以 250rpm 的速度, 在 MT5 培养基 (2.0% Yeastamine, 4.0% 甘油, 0.6% 磷酸钠 [二价], 0.3% 磷酸钾 [一价], 0.125% 硫酸铵, 0.0256% 硫酸镁 [七水合物; 在高压灭菌之后从无菌 1M 溶液中添加] 和 50 μ g/ml 硫酸卡那霉素 [在高压灭菌之后从过滤灭菌的 50mg/ml 溶液中添加]) 中使 JM110 (pBMS2000-PPFDH-PDHmod) 生长 18 小时。记录了在 600nm 下的光密度 (OD_{600}), 并且将足以提供 0.35 的起始 OD_{600} 的细胞添加到新的 MT5/ 卡那霉素培养基中。在 28°C 下以 250rpm 的速度振荡烧瓶, 直到 OD_{600} 为 0.8-1.0。通过添加过滤灭菌的 1M 异丙基硫代- β -D 吡喃半乳糖苷 (IPTG) 到 35 μ M 的最终浓度来诱导两个基因的表达, 并且持续发酵 24-48 小时。通过以 6,500 \times g 的速度离心 5 分钟使细胞沉淀, 用等体积的 50mM 甲酸铵 pH 7.0 洗涤一次, 并且再次沉淀。细胞在 -20°C 保藏或马上使用。将沉淀物以 10mL/g 湿细胞重量重新悬浮在 50mM 磷酸铵, pH 7.0 中, 并且用功率设定为 15 且具有微型头 (microtip) 的 Fisher Scientific Model 50 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 进行超声波处理 3 \times 15 秒。通过在室温下以 13,000 \times g 的速度离心 5 分钟使碎片沉淀。

[0208] 通过十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检查表达。将 1 μ L 细胞提取物与 5 μ L 的 4 \times NuPAGE™ LDS 缓冲液 (Invitrogen) 混合, 并且用蒸馏水将体积调节到 19mL。在 70°C 将样品加热 10 分钟。将 1mL 的 1M 二硫苏糖醇溶液添加到该混合物, 并且将 10 μ L 加样到 10% NuPAGE™ Bis-Tris 聚丙烯酰胺微型凝胶上。在 200v 电泳 50-60 分钟, 并且在由 0.1% (w/v) 考马斯蓝 (Sigma), 40% (v/v) 乙醇和 10% (v/v) 乙酸组成的溶液中对所述凝胶染色。在微波炉中对浸泡在染色剂中的凝胶进行加热, 直到沸腾, 然后以 40rpm 在定轨摇床上振荡 15 分钟。用去离子水充分洗涤所述凝胶, 并且用脱色液 (GelClear™; Invitrogen) 覆盖。再次将该溶液加热到正好达到沸点, 并且轻柔振荡至少 2 小时。在诱导后观察到了 M_r 43,000 和 40,000 的两个显著的带, 相当于 FDH 和 PDHmod 的亚基的预期分子量。在按照实施例 10 所述方法检测时, 发现上述样品同时具有 FDH 和 PDH 活性。为这种重组大肠杆菌菌株确定的内部名称为 SC 16496。

[0209] 然后在 15 和 250 升体积中对 SC 16496 进行发酵。对于 15 升发酵来说, 在室温对装有 1mL 冷冻 SC 16496 的一个小瓶进行解冻, 并且添加到在 4 升的烧瓶中装有 1 升含有 50g/ml 卡那霉素的 MT5 培养基中。在 28°C 下, 以 250rpm 的速度温育烧瓶 24 小时, 并且转移到 Braun 发酵罐的 13 升的 MT5 培养基中 (成分计量是根据 15L 的最终体积确定的)。将

分别足以提供 50 μ g/ml 和 0.0246% 的最终浓度的硫酸卡那霉素和硫酸镁七水合物溶解在 500mL 蒸馏水中,并且通过 0.2 微米乙酸纤维素过滤装置进行过滤灭菌。将该溶液添加到罐中,然后马上接种。起始 OD₆₀₀ 为 0.35。

[0210] 发酵工作参数如下:

[0211] 16 升工作体积

[0212] 温度:28°C

[0213] 通气:1.0vvm

[0214] 压力:690 毫巴

[0215] 搅拌:500rpm

[0216] 根据需要用 NH₄OH 将 pH 控制在 6.8

[0217] 根据需要,通过添加 UCON(由 Dow Chemical Company 生产的碳氟化合物溶剂掺合物)控制发泡。

[0218] 在 OD₆₀₀ 0.8-1.0 的条件下(在接种之后大约 2 小时),在无菌条件下添加过滤灭菌的 IPTG(溶解在 500mL dH₂O 中),使最终浓度为 35 μ M。让发酵再继续 48 小时,然后将罐的内容物低温冷却到 10°C。通过离心收集细胞,并且用 0.1 体积的 50mM 甲酸铵 pH 7.0 漂洗 1 次。将细胞糊放入塑料容器中,并且在 -70°C 下保存待用。

[0219] 对于 250-L 罐来说,按以下方法制备接种物:对 1mL 的冷冻 SC16496 进行解冻,并且添加到含有 50 μ g/ml 卡那霉素的 300mL MT5 培养基中。让所述烧瓶在 28°C 下和 250rpm 的速度下生长 24 小时。测定 OD₆₀₀,并且取出能提供 800D 单位的合适体积的细胞,并且添加到 250mL 新鲜的 MT5 培养基中。在无菌条件下将所述细胞添加到装在 Braun 发酵罐中的 10L 的 MT5/卡那霉素培养基中(起始 OD₆₀₀ 大约 0.008),在上文所公开的发酵工作参数条件下生长 16 小时。然后将培养物转移到含有合适浓度的卡那霉素和硫酸镁的 250L 的 MT5 中。根据 SC 16496 在上述条件下的 90 分钟的倍增时间,250L 体积中的 10L 接种物提供的起始 OD₆₀₀ 应为 0.30-0.35。诱导,生长,收获和保存是按照对 15-L 发酵所描述的方法进行的。

[0220] 实施例 8A

[0221] 使用分离的 PDH/FDH 酶浓缩物,由 3-羟基- α -氧代三环-[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II),通过 (α S)- α -氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V) 并缩生产 (α S)- α -[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 VI)

[0222] 步骤 1:分离 PDH/FDH 酶浓缩物

[0223] 大肠杆菌 JM110 (pBMS2000-PPFDH-PDHmod) 的发酵培养液 (30 升) 是从 4000L 罐发酵中获得的,并且通过微型流化床装置 (Microfluidics modelM-110Y,工作压力为 12,000-20,000 磅/英寸²) (通过一次),以便从所述细胞中释放所述活性,其中将培养液的温度保持在低于 40°C。微流化培养液的 PDH/FDH 活性对于 PDH 来说为 32IU/ML,对于 FDH 来说为 8IU/ml。

[0224] 为了使整个培养液澄清,将 4.5kg 的 Celite 添加到充分搅拌的培养液中。然后添加 0.201 升的 30% 含水聚乙烯亚胺,并且混合 30 分钟。然后用压滤机 (Ertel Alsop model 8-ESSC-10) 对该混合物进行过滤,并且获得了 18 升的滤液。用 12 升的水洗涤滤饼,以便

将体积重新调节到 30 升。该步骤得到了 PDH 的 97% 的活性回收, PDH 活性为 31IU/ml, FDH 的活性为 8IU/ml。

[0225] 通过 100,000MWC0 过筛盒 (Millipore Pellicon 2unit, 聚醚砜低蛋白结合盒, 0.5m²过滤面积) 对澄清的培养液进行超滤。泵的循环速度为 400ml/分钟。将澄清的滤液浓缩到 1.5 升, 并且得到的酶浓缩物的 PDH 效价为 567IU/ml, FDH 效价为 136IU/ml。对渗透液进行了测定, 并且没有发现活性。该浓缩物的总体酶活性回收率为 84%。

[0226] 步骤 2: 还原性氨基化作用

[0227] 将 3-羟基- α -氧代三环-[3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 II (1.00kg ; 4.46 摩尔)) 添加到 20L 容器中, 然后添加水 (5L)。搅拌该混合物, 并且用 10N NaOH 将 pH 调节到 pH ~ 8, 以便得到溶液。添加 Darco KBB 碳 (100g), 并且搅拌该混合物 5 分钟, 然后通过装有 5 μ 滤纸的布氏漏斗过滤。用水洗涤滤纸 (2 \times 1L), 并且合并滤液和洗涤液, 以便得到清澈溶液。

[0228] 在搅拌条件下添加甲酸铵 (0.562Kg ; 8.92 摩尔), 并且用 10N NaOH 将 pH 再次调节到大约 7.5。添加烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (2.65g) 和二硫苏糖醇 (1.54g)。在固体溶解之后, 添加 PDH/FDH 酶浓缩物 (1.03L ; 500,000IU 的 PDH)。在环境温度下用 10N NaOH 将 pH 再次调节到大约 8.0。

[0229] 然后将该混合物加热到大约 40 $^{\circ}$ C, 并且用水稀释到 10L 的总体积。将 pH 保持在 7.7-8.3, 同时搅拌 42 小时。所得到的溶液含有 0.955Kg (95.1%) 的产物 (α S)- α -氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V)。

[0230] 步骤 3: BOC-保护

[0231] 将重碳酸二-叔丁酯 (1.022kg ; 4.68 摩尔) 添加到 (α S)- α -氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) (477.5g ; 2.12 摩尔) 的一部分溶液中。在环境温度下搅拌该混合物, 用 10N NaOH 通过 pH 静滴定器 (stat titrator) 将 pH 调节到并保持在 10。在添加 Boc₂O 之后 4 小时完成所述反应, 此时只剩下不到 1.0% 的原材料。

[0232] 用 35% H₂SO₄ 将该混合物的 pH 调节到大约 8, 并且将 i-PrOAc (5.0L) 添加到该混合物中。然后用 35% H₂SO₄ 将该混合物的 pH 调节到 2.0, 并且保持在该 pH 下 5-10 分钟。添加 Dicalite (250g); 搅拌该混合物 大约 10 分钟, 然后通过放置在布氏漏斗中的滤纸上的 Dicalite (250g) 垫过滤, 用 2.5L i-PrOAc 进一步洗涤所述 Dicalite 垫。

[0233] 用 10N NaOH 将滤液调节到 pH 8。在静置 1 小时之后, 弃掉包括界面在内的有机层。向水层中添加 i-PrOAc (7.5L)。用 35% H₂SO₄ 将该混合物酸化到 pH 大约 2, 并且然后加热到大约 40 $^{\circ}$ C 并且在柔和搅拌中维持在大约 40 $^{\circ}$ C 4 小时。分离不同的层, 并且保留有机提取物。包括界面在内的水层用 i-PrOAc (3.75L) 提取, 并且在 40 $^{\circ}$ C 下经过 2 小时之后再次分离不同的层。再次用 i-PrOAc (3.75L) 提取具有界面的水层, 并且在 40 $^{\circ}$ C 下经过 2 小时之后分离不同的层。

[0234] 通过蒸馏将合并的有机提取物 (大约 15L) 浓缩到大约 4.5L。然后用 10-15 分钟时间向该溶液中添加庚烷 (大约 10L), 同时将温度保持在大约 82-89。将反应器夹套温度设定为 70 $^{\circ}$ C, 并且在该温度保持 1 小时。在冷却之后不久就发生结晶。然后将反应器夹套温度设定为 40 $^{\circ}$ C, 并且在该温度下保持 30 分钟。

[0235] 将悬浮液冷却到环境温度, 然后进一步冷却到 0-5 $^{\circ}$ C。在 0-5 $^{\circ}$ C 下搅拌 1 小时

之后,对产物进行过滤。用庚烷(2.5L)洗涤产物,然后在40℃下在真空中干燥,以得到607.0g(88%收率)的(α S)- α -[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]-3-羟基三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式VI)。

[0236] 实施例9

[0237] 用来自重组大肠杆菌 SC16496 JM110 [pBMS2000-PPFDH-PDHmod] (ATCC

[0238] 保藏 PTA-4520) 的提取物进行还原性氨基化作用

[0239] 将重组大肠杆菌冷冻细胞(25克)添加到去离子水中(足以使总体积达到100ml,并且含有5ml 1M 甲酸铵)。在解冻之后,用 Janke and Kunkel Ultra-turrax T8 匀浆器悬浮细胞,并且用浓 NH₄OH 调节到 pH 7,并且用碎冰冷却,以得到存在于 50mM 甲酸铵中的 25% w/v 的细胞悬浮液。通过于 12000 磅/英寸² 从微型流化床装置中通过两次破坏细胞,并且通过在 4℃ 下以 20,000×g 的速度离心除去细胞碎片。将含有 2456u(测定 A) 或 768u(测定 C) 苯丙氨酸脱氢酶和 8801u 甲酸脱氢酶的 266ml 上清液添加到 1-L 瓶子中。

[0240] 制备了含有甲酸铵(16.74g,0.2654 摩尔)和(3-羟基-金刚烷-1-基)-氧代-乙酸(29.76g,0.1327 摩尔)的 266ml 的溶液,并且用 12.7ml 浓氢氧化铵调节到 pH 8.0。添加 NAD(372mg,0.561 毫摩尔)和二硫苏糖醇(81.8mg,0.530 毫摩尔),然后将该溶液添加到装有大肠杆菌提取物的瓶子中。该瓶子保持在 40℃,在摇床上以 40rpm 的速度振荡。定期添加浓氢氧化铵,以便保持 pH 8.0。在 38 小时之后,通过 HPLC 分析测定,该溶液含有 31.5 克(0.140 摩尔,100%收率)(S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸,并且不含氨基酸的 R-对映体。

[0241] 实施例 10

[0242] 用来自重组大肠杆菌 SC16496 JM110 [pBMS2000-PPFDH-PDHmod] (ATCC

[0243] 保藏 PTA-4520) 的冷冻干燥的细胞进行还原性氨基化作用

[0244] 该溶液在 pH 8.0 的 10.0ml 的最终体积中含有(用 NH₄OH 调节 pH):0.50M 甲酸铵,0.237M(3-羟基-金刚烷-1-基)-氧代-乙酸,1.00mMNAD,1.00mM 二硫苏糖醇和 975mg 冷冻干燥的重组大肠杆菌。将所述细胞干燥到湿重的 26%。在干燥之前,所述细胞含有 65.04 单位/g(测定 A) 苯丙氨酸脱氢酶,(或通过测定 C 测定的 12.79 单位/g 苯丙氨酸脱氢酶),和 133.32 单位/g 甲酸脱氢酶。在 40℃ 下,在密封的 50ml 锥形瓶中,以 100rpm 的速度温育所述溶液 3 天,然后通过 HPLC 进行分析。该溶液含有 49.06mg/ml(92.13.0%收率)(S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸。

[0245] 实施例 11

[0246] 使用支链转氨酶的转氨基作用

[0247] 在 50mM 磷酸钾缓冲液, pH 8.0 中制备在 1.0ml 的最终体积中含有以下成分溶液:0.10M 谷氨酸钠,0.05M(3-羟基-金刚烷-1-基)-氧代-乙酸(用 0.05M NaOH 中和),0.1mM 磷酸吡哆醛和 1mg 支链转氨酶(Biocatalytics)。在 37℃ 下在微量离心管中温育该溶液 68 小时,然后通过 HPLC 进行分析。该溶液含有 5.53mg/ml(49.2%收率)(S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸和 7.05mg/ml 残余的(3-羟基-金刚烷-1-基)-氧代-乙酸。

[0248] 实施例 12

[0249] (S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸对映体过量和总量

- [0250] 的 HPLC 测定
- [0251] 用水将样品稀释到大约 2mg/ml 的浓度,并且放入沸水浴中 1 分钟,以便终止反应,并且使蛋白沉淀。在冷却之后,通过 0.2 微米的尼龙滤器将所述样品过滤到 HPLC 小瓶中。
- [0252] 使用了两种分离方法。
- [0253] 方法 1:
- [0254] 柱:Chiralpak WH 25×0.46cm(Daicel Industries, Ltd.)。
- [0255] 流动相:0.3mM CuSO₄
- [0256] 流速:1ml/分钟
- [0257] 柱温度:50℃
- [0258] 检测:二极管阵列检测器(DAD)设定为 240nm
- [0259] 注射体积:10 μ l
- [0260] S-对映体((< aS)- < a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸)保留时间:79.9 分钟
- [0261] R-对映体保留时间:32.8 分钟
- [0262] 方法 2:
- [0263] 柱:Regis Davankov Ligand Exchange 15×0.46cm
- [0264] 流动相:25%甲醇/75% 6mM CuSO₄
- [0265] 流速:1ml/分钟
- [0266] 柱温度:40℃
- [0267] 检测:DAD 设定为 240nm
- [0268] 注射体积:10 μ l
- [0269] S-对映体(< aS)- < a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸)保留时间:3.2 分钟
- [0270] R-对映体保留时间:11.2 分钟
- [0271] 酮酸(3-羟基- < a-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸)保留时间:5.2 分钟
- [0272] 实施例 13
- [0273] 苯丙氨酸脱氢酶测定 A
- [0274] 在 40℃进行的苯丙氨酸脱氢酶测定 A 在 1ml 中含有:0.4mM NADH,5mM 苯丙酮酸钠,0.75M NH₄OH,用 HCl 调节到 pH 8.75。在 340nm 下监控吸收度的减弱。根据吸收度改变速度,以微摩尔/分钟计算酶活性单位。
- [0275] 实施例 14
- [0276] 苯丙氨酸脱氢酶测定 B
- [0277] 在 40℃进行的苯丙氨酸脱氢酶测定 B 在 1ml 中含有:1mM NAD,10mM L-苯丙氨酸,0.1M K₂HPO₄,用 1N NaOH 调节到 pH 10.0。在 340nm 下监控吸收度的提高。根据吸收度改变速度,以微摩尔/分钟计算酶活性单位。
- [0278] 实施例 15
- [0279] 苯丙氨酸脱氢酶测定 C
- [0280] 在 40℃进行的苯丙氨酸脱氢酶测定 C 在 1.0mL 中含有:0.4mM NADH,50mM 3-羟基- < a-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(溶解在 1 当量 NaOH 溶液中),0.75M NH₄OH,

用 HCl 调节到 pH 8.75。在 340nm 下监控吸收度的降低。根据吸收度改变速度,以微摩尔/分钟计算酶活性单位。

[0281] 实施例 16

[0282] 甲酸脱氢酶测定

[0283] 在 40°C 进行的甲酸脱氢酶测定在 1.0ml 中含有:1mM NAD,100mM 甲酸铵,100mM 磷酸钾缓冲液,pH 8.0。在 340nm 下监控吸收度的增加。根据吸收度改变速度,以微摩尔/分钟计算酶活性单位。

[0284] 实施例 17

[0285] 将三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 N)溴化成 α -溴代三环 [3.3.1.1^{3,7}]

[0286] 癸烷-1-乙酸(式 O)

[0287] 将固体三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 N)(288g;1.48 摩尔)悬浮在三颈圆底烧瓶中的亚硫酸氯(465mL)中,该烧瓶装冷凝器。添加二甲基甲酰胺(DMF;0.3mL),并且在室温搅拌该悬浮液 1.5 小时。通过气相层析检查反应的完成。然后将固体 NBS(307g)逐份地添加到所述反应混合物中,并且将所述反应混合物加热到 60°C。搅拌该反应物 3 小时,同时将温度保持在 60-65°C。通过气相层析进行监控,以便确保反应的完成。将庚烷(900mL)添加到所述反应混合物中。在 78-80°C 下将多余的亚硫酸氯蒸馏掉。然后小心地添加水(剧烈反应),以便终止所述反应(总体积 1050mL)。然后添加庚烷(500mL)和水(600mL),并且从所述有机层中分离水层。用额外的水(600mL)洗涤所述有机层并且再次将水层与有机层分离。将额外的水(150mL)添加到所述有机庚烷层中,并且将庚烷从所述水层中蒸馏掉。具体地讲,使 70mL 的水与庚烷共馏。在蒸馏掉庚烷之后,将四氢呋喃(THF;1200mL)添加到水层中,并且在室温下剧烈搅拌所得到的混合物 16 小时,以便缓慢水解。通过气相层析进行的监控表明了某些未反应的酰基氯的存在。然后添加额外的水(150mL),以便加速水解,并且通过气相层析监控反应,以便确保反应的完成。然后将 THF 蒸馏掉,得到了双相(水和油)反应混合物。然后添加晶种,并且让反应物达到室温,以便出现粗粒。添加水(250mL)和乙腈(500mL),以便保持所述悬浮液可以搅拌,因为该悬浮液是在室温下搅拌 2 小时的。然后将固体过滤掉,并且用乙腈(2×250mL)洗涤。该滤液含有第一批 α -溴代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 O);在室温下真空干燥之后得到 264 克,AP 95,收率为 66%。然后在室温下用水和乙腈(250mL/250mL)研磨母液(113 克残余物)1-2 小时。然后过滤反应物,并且使固体干燥,以便获得第二批 α -溴代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 O);64 克,AP 90,收率为 16%。

[0288] 实施例 18

[0289] 用 α -溴代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 O)制备 α -溴代-3-羟基

[0290] 三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 Q)

[0291] 在锥形瓶装入 315ml 的 95-98% H₂SO₄,然后在冰浴中冷却到 8°C。然后添加 HNO₃(35ml 的 50% 的溶液,通过将 50ml 的 70% HNO₃添加到 30ml 的水中制备)烧瓶中,同时在冰浴中将所述混合物保持在 8°C。然后用大约 30-60 分钟时间将固体 α -溴代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 O)(92 克,0.338 摩尔)逐份地添加到所述混合物中,以便将温度保持在 28°C 以下。然后搅拌所述反应物,同时加热到 60°C,直到获得清澈溶液。

[0292] 通过薄层层析(TLC)或高效液相层析(HPLC)监控反应过程。用硅胶进行 TLC,其

中使用比例为 9 : 1 : 10 的乙酸乙酯 / 甲醇 / 己烷, 具有 KMnO_4 。用 ODS 柱, C18 S-3 120A, 4.6×50mm 进行 HPLC, 使用在 7 分钟时间内 10% 乙腈 / H_2O 至 100% 乙腈的线性梯度, 并且流速为 2.5ml / 分钟。检测波长为 220nm。

[0293] 在反应完成时, 将混合物冷却到室温, 并且在该温度下保持大约 16 小时。然后添加水 (700mL), 以便终止所述反应, 直到不再产生棕色气体。所得到的浆在冰浴中冷却到大约 5°C, 然后过滤。用 200mL 水洗涤固体滤过物, 并且风干, 以便得到 90 克的 α -溴代-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 Q) 浅黄色固体 (92% 收率)。

[0294] 实施例 19

[0295] 用 α -溴代-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 Q) 制备 (< aS)

[0296] - < a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V)

[0297] 将 α -溴代-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 Q) (75 克, 0.278 摩尔) 溶解在 225mL 的 30% 氢氧化铵 (4.08 摩尔, 14.6 当量) 中。然后在 65°C 下加热所述反应混合物 16 小时。然后在旋转蒸发器 (rotovap) 上将所述反应混合物浓缩成固体。将 EtOH (200mL) 添加到所述浓缩的固体中, 然后再次在旋转蒸发器上浓缩。得到了 71 克的羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) 的手性混合物黄色固体 (90%)。

[0298] 实施例 20

[0299] 羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) 的分离

[0300] 实施例 19 的手性混合物的 Boc 保护是用 Boc 酐和氢氧化钠在四氢呋喃中进行的。将所得到的化合物 α -[[(1,1-二甲基乙氧基) 羰基] 氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (化合物 R) (0.25M 存在于 EA 中, 80 μ l, = 6.52mg) 与手性碱 ([1R, 2S]-(-)-1,2-二苯基羟基乙胺) (0.25M, 80 μ l) 在小瓶中混合, 并且在 SpeedVac 中将所述混合物蒸发至干燥。添加溶剂 (200 μ l)。将装有所述混合物的小瓶放置在摇床上, 于 50°C 加热 1.5 小时。然后将所述混合物冷却到室温, 以便使 (α S)- α -[[二甲基乙氧基] 羰基] 氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (化合物 S) 结晶。

[0301] 实施例 21

[0302] ZnCl_2 -催化的溴化金刚烷 (式 A) 偶联

[0303] 用 7.5kg 溴化金刚烷填充干燥的容器。然后在室温下添加二氯甲烷 (22.5 升), 以便溶解固体溴化金刚烷。溶解是吸热反应, 因此在下一个步骤之前, 让所述反应混合物的温度恢复到 20°C。然后在所述反应混合物中添加氯化锌 (1.05kg), 并在 20°C 下搅拌大约 5 分钟。然后向所述反应混合物中添加三 (三甲基甲硅烷氧基)-乙烯 (15.3kg), 同时将反应温度保持在 20-25°C, 并且将所得到的混合物搅拌 2 小时。在该混合之后, 添加三 (三甲基甲硅烷氧基)-乙烯 (5.10kg)。在该添加期间, 将温度保持在低于 30°C。在 20-25°C 下将所述反应再维持 12-15 小时, 此时, 用二氯甲烷 (15 升) 稀释所述反应混合物, 并且冷却到 0-5°C。然后使用半饱和的 NH_4Cl 溶液处理所述反应混合物, 开始于逐滴的方式。在添加期间, 将温度保持在低于 30°C。获得了浓的悬浮液。向该悬浮液中添加乙酸乙酯 (93.75 升)。剧烈搅拌该混合物 15 分钟, 并且分离有机相和水相。保存所述有机层, 并且用乙酸乙酯洗涤水层 (每一次洗涤使用 18.75 升)。然后合并所述乙酸乙酯洗涤液和有机层, 并且用水 (37.5 升) 洗涤, 然后用由盐水半饱和的水 (37.5 升) 洗涤。再次分离所述有机层, 并且蒸发, 以便形成结晶。然后将溶剂交换成庚烷, 最终体积为 22.5 升。将所得到的悬浮液冷却

到 5-10°C, 保持 1 小时, 并且通过过滤获得了产物 < a- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 B)。 < a- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 B) 的产量为 6. 96kg (33. 11mol, 95%)。

[0304] 实施例 21A

[0305] < a- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 B) 的酯化

[0306] 首先在反应器中形成了惰性气氛, 然后用甲醇 (35. 00 升) 填充所述反应器, 接着用 < a- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 B) (14. 00 kg) 填充, 以便形成悬浮液。将该悬浮液冷却到 0-5°C, 并且以一定方式添加乙酰氯, 从而将所述反应混合物的温度保持在 5-10°C。在完成添加乙酰氯之后, 将所述反应混合物加热到 20-25°C 并且在 20-25°C 下搅拌 2 小时。然后在 40°C 下在真空中浓缩所述反应混合物, 并且获得了稀油。将所述油溶解在乙酸乙酯 (71. 96 升) 中, 并且使温度达到室温。用水洗涤所得到的混合物两次 (每次洗涤使用 28. 78 升), 并且在每次洗涤之后分离有机层和水层。保存所述有机层, 同时合并所述水层, 并且用 3N NaOH 溶液调节到 pH 9. 5。然后用乙酸乙酯提取合并的水层两次 (每次提取使用 14. 39 升)。在每一次提取之后, 分离所述有机层, 并且与保存的有机层合并。然后用饱和的碳酸氢钠溶液 (28. 78 升) 洗涤所述合并的有机层, 随后用盐水 (43. 18 升) 洗涤。在 40°C 下, 在真空条件下去除所有挥发性物质, 并且获得了无色至浅黄色的油状物, 其在静置时可结晶。这种油状物包括 13. 29kg (59. 26mol, 89%) < a- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸甲酯 (式 C)。

[0307] 实施例 22

[0308] < a- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸甲酯 (式 C)

[0309] 的 Swern 氧化作用

[0310] 用氮气清洗三颈烧瓶 (22 升) 过夜, 该烧瓶装有机械搅拌器, 温度探头和附加漏斗。然后添加草酰氯 (500ml, 5. 73 摩尔), 接着添加 CH₂Cl₂ (8 升)。用丙酮 / 干冰浴将所得到的溶液冷却到 -69°C。然后用大约 30 分钟时间缓慢添加二甲亚砜 (DMSO ; 700ml, 9. 86 摩尔) 溶液, 同时保持内部温度低于 -60°C。搅拌该溶液 20 分钟, 同时将温度保持在 -60 至 -70°C。然后用大约 30 分钟时间缓慢添加存在于 CH₂Cl₂ (1. 7 升) 中的 < a- 羟基三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸甲酯 (式 C) (990 克, 4. 42 摩尔) 溶液, 同时保持内部温度低于 -60°C。搅拌所得到的溶液 30 分钟。然后添加 NEt₃ (3 升, 21. 5 摩尔), 以便形成三乙胺盐酸盐的重浆。将所述反应混合物加热到室温, 并且添加水 (1 升), 以便溶解三乙基铵盐 (TEA 盐)。然后将所述反应混合物转移到圆底烧瓶中, 并浓缩, 以便去除二氯甲烷 (DCM) 和 NEt₃。添加 EtOAc (12 升), 并且分离所得到的水层和有机层。用水洗涤所述有机层三次 (每次洗涤使用 2 升), 然后用盐水洗涤 (2 升)。然后在无水 Na₂SO₄ 上通过蒸发干燥所述有机相, 以便产生 < a- 氧代三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸甲酯 (式 D) 浅黄色固体。收率为大约 104%。

[0311] 实施例 23

[0312] 将 < a- 氧代三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸甲酯 (式 D) 羟基化成 3- 羟基

[0313] - < a- 氧代三环 [3. 3. 1. 1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸甲酯 (式 I)

[0314] 用 95-98% 的 H₂SO₄ (495ml) 填充锥形瓶, 并且在冰浴中冷却到 8°C。然后将 HNO₃ (47. 5ml, 浓度为 50%, 通过将 50ml 的 70% HNO₃ 添加到 30ml 水中制备) 添加到所述烧瓶中, 并且再次在冰浴中将该混合物冷却到 8°C。用 30-60 分钟时间将固体 < a- 氧代三环

[3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸甲酯(式D)(100克,0.45摩尔)逐份地添加到所述混合物中,以保持温度低于28°C。搅拌所述反应混合物,同时在冰浴中冷却。通过薄层层析(TLC)或高效液相层析(HPLC)监控反应过程。对于TLC来说,使用硅胶,并且溶剂是EtOAc/MeOH/己烷(9/1/10);KMnO₄。对于HPLC来说,使用4.6×50mm,C18,3微米,120埃柱,使用在7分钟内10%乙腈/H₂O至100%乙腈的梯度,流速为2.5ml/分钟。监控波长为200nm。当所述反应完成(大约1小时之后)时,通过添加冷水(1.5升)和EtOAc(500ml)终止所述反应。添加额外的水和EtOAc(各500ml),以便帮助水层和有机层的分离。然后用3等分试样的各500ml的EtOAc提取所述水层。合并所述有机层,并且用盐水(400ml)洗涤。然后在对比压(reduced pressure)下将洗涤过的有机层浓缩成130克的黄色油状残余物,它含有3-羟基- α -氧代三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸甲酯(式I)。

[0315] 实施例 24

[0316] 将3-羟基- α -氧代三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸甲酯(式I)水解成

[0317] 3-羟基- α -氧代三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式II)

[0318] 将实施例23中的黄色油状残余物溶解在四氢呋喃(300ml)中,并且在冰浴中冷却到5°C。将一升的1N氢氧化钠缓慢添加到该溶液中,以便将pH调节到大约7,同时保持温度低于30°C。然后再添加500ml的1N NaOH,以便将pH调节到大约14。然后搅拌所述反应混合物,同时在冰浴中冷却,并且通过实施例23中所描述的TLC或HPLC监控反应过程。在大约30分钟之后反应完成时,添加EtOAc(500ml),并且分离水层和有机层。用另外500ml EtOAc洗涤水层。用浓HCl酸化所述水层。当所述溶液达到pH 7时,添加EtOAc(500ml),然后添加浓度更高的HCl,直到pH达到0.7。所添加的浓HCl总计为150ml。然后用EtOAc提取所述水层(4×400ml),并且用400ml水洗涤合并的有机层,然后用400ml盐水洗涤。然后用MgSO₄干燥洗涤过的有机层,并且浓缩。产物为88g的浅黄色固体。将该固体溶解在100ml EtOAc和300ml庚烷中,搅拌30分钟,然后过滤,并且风干,得到了85克的褐色固体(85% 3-羟基- α -氧代三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式II))。

[0319] 实施例 25

[0320] 金刚烷-1-基-二氯-乙酸甲酯(式VII)的制备

[0321] 用锌粉(78.0g,1.19摩尔)填充2-升三颈烧瓶,该烧瓶装有机械搅拌器,温度计,冷凝器,压力均匀的附加漏斗和氩气的入口,然后添加无水四氢呋喃(400ml)。向该混合物中添加1,2-二溴乙烷(2ml),以便激活锌。在柔和回流的条件下加热所得到的混合物25分钟。在冷却到-55°C之后,添加三氯乙酸甲酯(100.3g,0.565摩尔)和三甲基氯硅烷(80ml,0.648摩尔)的溶液,添加速度为将反应温度保持在-55至-60°C(需要1小时)。在添加完成之后,在室温下搅拌所述混合物大约90分钟。用庚烷(700ml)稀释所得到的混合物,并且在氮气条件下通过Celite 545垫过滤。用额外的庚烷(1×300ml,3×200ml)洗涤滤饼。然后在对比压下在旋转蒸发器上浓缩滤液(大约10-15mm Hg,使用22-27°C的水浴),以得到浓油状粗制产物(2,2-二氯-1-甲氧基-乙烯氧基)-三甲基硅烷(129.2g)。定量质子NMR发现该粗制材料包括0.389mol(68.8%)的(2,2-二氯-1-甲氧基-乙烯氧基)-三甲基硅烷。

[0322] 用粗制产物(2,2-二氯-1-甲氧基-乙烯氧基)-三甲基硅烷(129.1g,大约0.389摩尔)和无水二氯甲烷(100ml)填充装有氩气入口的1升烧瓶。向所得到的溶液中添加

1- 溴代金刚烷 (75.2g, 0.349 摩尔) 和无水氯化锌 (6.56g, 48 毫摩尔)。在室温下搅拌所得到的混合物过夜。用庚烷 (600ml) 和水 (300ml) 稀释所得到的棕红色混合物。分离所述有机层, 并且用水 (2×100ml), 1N 碳酸氢钠 (3×150ml) 和水 (2×200ml) 洗涤。所得到的溶液通过 Celite 545 垫过滤, 并且在对比压下浓缩滤液, 以便得到无色固体。将该材料溶解在煮沸的甲醇 (250ml) 中。用 1 小时时间让所得到的溶液冷却到室温。在冷却到大约 5°C 保持 2 小时之后, 通过过滤收集固体, 并且用冰冷的甲醇: 水 (94 : 6 ; 4×50ml) 洗涤, 以便得到金刚烷 -1- 基 - 二氯 - 乙酸甲酯 (式 VII) 的无色固体 : 75.0 克 (77.3%, 基于 1- 溴代金刚烷) ; 熔点 (mp) 76.3°C。

[0323] 元素分析 :C₁₃H₁₈Cl₂O₂:

[0324] 计算结果 :C, 56.33 ; H, 6.55 ; Cl, 25.58%

[0325] 测定结果 :C, 56.49 ; H, 6.59 ; Cl, 25.72%

[0326] ¹H NMR (500.16MHz, CDCl₃) δ 3.855 (s, 3H), 2.069 (br s, 3H), 1.866 (d, J = 2.75Hz, 6H), 1.683, 1.612 (AB q, J = 12.1Hz) ppm

[0327] ¹³C NMR (127.78MHz, CDCl₃) δ 166.130, 95.805, 53.969, 43.980, 36.842, 36.256, 28.309ppm

[0328] 实施例 26

[0329] 二氯 - (3- 羟基 - 金刚烷 -1- 基) - 乙酸甲酯 (式 VIII) 的制备

[0330] 制备 10N HNO₃: 用浓 HNO₃ (88.25g, 大约 62.58mL, 大约 1.0 摩尔) 填充 100mL 容量瓶, 并且在冰浴中冷却。添加水 (35mL)。在混合的热量消散之后, 让该溶液加温到室温。然后用水补足到所述烧瓶刻度线, 以便得到 10N HNO₃。

[0331] 用浓 H₂SO₄ (103g, 大约 56mL) 填充 250mL 三颈烧瓶, 该烧瓶装有热电偶温度计。在冰浴中冷却到 0.4°C 之后, 用大约 30 分钟时间添加 10N HNO₃ (5.68mL, 56.8 毫摩尔)。当该酸性混合物的温度降低到大约 1.0°C 时, 取消所述冷水浴。逐份地 (每 10 分钟 1.25g ; 1 小时 50 分钟的添加时间) 添加具有式 VII 的金刚烷 -1- 基 - 二氯 - 乙酸甲酯 (15.0g, 54.11 毫摩尔 ; 用研钵 / 研杵轻轻地研磨, 以便将大的团块 / 晶体破碎)。经过约 5 小时之后, 所述反应混合物是清澈的浅黄色溶液。

[0332] 在搅拌大约 24 小时之后, 所述反应混合物是非常浅的黄色溶液。用水 (250mL) 和尿素 (8.0g, 0.133 摩尔, 相对于 HNO₃ 为大约 2.34 当量) 填充到四颈 Morton 烧瓶 (1L) 中, 该烧瓶装有机械搅拌器和热电偶温度计。向所得到的溶液添加乙酸乙酯 (230mL)。在冰浴中将所得到的双相混合物冷却到大约 1.0°C。用大约 15 分钟时间将来自上面所述的反应混合物添加到冰冷的 EtOAc / 水 / 尿素混合物中。所述转移是使用额外的乙酸乙酯和水完成的 (各自大约 50mL)。在搅拌大约 45 分钟之后, 取消所述冷水浴, 并且通过搅拌使所述混合物加温。在搅拌 4.5 小时之后 (从终止开始计算), 将所得到的混合物使用额外的乙酸乙酯 (大约 100mL) 转移到分液漏斗 (1L) 中以完成所述转移。取出含水级分, 并且用乙酸乙酯提取 (1×80mL)。合并有机级分, 并且用水 (2×90mL), 1N NaHCO₃ (4×90mL) 和盐水洗涤。在无水硫酸镁上干燥, 然后在对比压下除去溶剂, 以便得到具有式 VIII 的二氯 - (3- 羟基 - 金刚烷 -1- 基) - 乙酸甲酯的几乎无色固体 : 15.67g (98.7%, 粗制产物收率)。可以将该粗制材料用于制备具有式 IX 的二氯 - (3- 羟基 - 金刚烷 -1- 基) - 乙酸, 而无需进行纯化。不过, 如果需要的话, 可以从甲醇 (102mL) 和水 (85mL) 中再结晶所述粗制材料 (15.65g), 以便提

供棉絮状固体 (熔点 114.8-115.0°C), 回收率为 91%。

[0333] 元素分析 : $C_{13}H_{18}Cl_2O_3$:

[0334] 计算结果 :C, 53.25 ;H, 6.18 ;Cl, 24.18%

[0335] 测定结果 :C, 53.24 ;H, 6.24 ;Cl, 24.31%

[0336] 1H NMR (500.16MHz, $CDCl_3$) δ 3.857 (s, 3H), 2.298 (br m, 2H), 1.824 (s, 2H), 1.793 (d, 4H, = 2.75Hz), 1.682, 1.629 (br AB q, 4H), 1.529 (m, 3H) ppm

[0337] ^{13}C NMR (127.78MHz, $CDCl_3$) δ 165.929, 94.281, 68.932, 54.150, 44.478, 44.529, 44.020, 35.750, 34.759, 30.149 ppm

[0338] 实验室 HPLC :

[0339] YMC ODS-A S 3120 Å (4.6x50mm), λ = 200nm, 2.5ml/分钟

[0340] 溶剂 :A = 0.2% H_3PO_4 , 溶解在水中

[0341] B = 90% CH_3CN , 溶解在水中

[0342] 梯度 :10 分钟时间内 20% A 至 100% B

[0343] 保留时间 面积% 同一性

[0344] 2.06 分钟 1.19 未知

[0345] 4.54 分钟 98.16 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙

[0346] 酸甲酯

[0347] 5.09 分钟 0.65 未知

[0348] 8.35 分钟 金刚烷-1-基-二氯-乙酸甲酯

[0349] 实施例 27

[0350] 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸 (式 IX) 的制备

[0351] 用甲醇 (200ml) 和 1N NaOH (194ml, 194 毫摩尔, 相对于输入的二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸甲酯 (式 VIII) 来说大约 1.36 当量) 填充 500ml 圆底烧瓶。将所得到的溶液在冰浴中冷却, 直到温度 $< 9^\circ C$ 。解除冷水浴, 并且添加二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸甲酯 (式 VIII) (41.68g, 142.1 毫摩尔)。在氮气中, 在环境温度下搅拌所得到的悬浮液。在搅拌大约 6 小时之后, 用额外部分的甲醇 (10ml) 漂洗所述容器壁。在搅拌大约 17 小时之后, 对所述反应混合物进行过滤, 以便除掉少量的颗粒状材料。将所得到的溶液转移到 2-升三颈烧瓶中, 该烧瓶装有机械搅拌器。用水 (900ml) 稀释所述反应混合物, 并且完成所述转移。通过添加浓 HCl (38ml, 大约 456 毫摩尔) 酸化所得到的溶液。很快形成了白色固体。轻柔地搅拌所述混合物大约 20 分钟, 然后放入冰浴中。在柔和搅拌大约 90 分钟之后, 停止搅拌器, 并且将所述混合物在冰浴中再静置 2 小时。对所得到的悬浮液进行过滤, 并且用冰冷的水洗涤滤饼。通过使空气经过所述滤饼抽吸使大量的水从所述固体中排出。然后在环境温度下, 在真空中干燥所述材料 22 小时, 以便得到二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸 (式 IX) 的无色粉末状固体 :39.19 克 (98.7% 收率); 熔点 $238^\circ C$ (dec)。

[0352] 元素分析 : $C_{12}H_{16}Cl_2O_3$:

[0353] 计算结果 :C, 51.63 ;H, 5.77 ;Cl, 25.40%

[0354] 测定结果 :C, 51.43 ;H, 5.74 ;Cl, 25.48%

[0355] 实验室 HPLC :

[0356] YMC ODS-A S3 120 Å (4.6x50mm), λ 200nm, 2.5ml/分钟

- [0357] 溶剂 A = 0.2% H₃PO₄, 溶解在水中
- [0358] B = 90% CH₃CN, 溶解在水中
- [0359] 梯度: 10 分钟时间内 20% A 至 100% B
- [0360] 保留时间 面积% 同一性
- [0361] 0.53 分钟 0.95 未知
- [0362] 2.65 分钟 97.27 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙
- [0363] 酸
- [0364] 4.54 分钟 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙
- [0365] 酸甲酯
- [0366] ¹H NMR(500.16MHz, CD₃OD) δ 2.258(br s, 2H), 1.858(s, 6H), 1.674, 1.615(br AB q, J = 11.54Hz, 4H), 1.588-1.526(m, 2H) ppm
- [0367] ¹³C NMR(125.77MHz, CD₃OD) δ 167.957, 96.356, 69.322, 48.070, 45.360, 44.794, 37.050, 36.039, 31.631 ppm
- [0368] 实施例 28
- [0369] 3-羟基-α-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 II) 的制备
- [0370] 用二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸(式 IX)(38.67g, 138.5 毫摩尔) 填充 500ml 三颈烧瓶。向该材料中添加水(160ml) 和 1N NaOH(138ml, 138 毫摩尔; 用 1N NaOH 制备二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸的钠盐, 以避免使用固体 NaHCO₃ 时可能发生的起泡问题), 以便得到浑浊的溶液。向该溶液中添加固体 NaHCO₃(29.10 克, 346 毫摩尔, 2.50 当量)。在添 NaHCO₃ 之后, 所述反应混合物成为悬浮液, 因为二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸的钠盐被强制从所述溶液中析出。所述反应容器装有回流冷凝器/ 氩气入口, 并且加热到大约 80°C。在加热大约 6 小时之后, 让所述混合物冷却到室温。通过添加浓 HCl(需要 32ml) 将所述反应混合物(pH 7.22) 小心地酸化(CO₂ 放出) 到 pH 0.15。用乙酸乙酯(4x300ml) 提取所得到的混合物。在用乙酸乙酯进行第一次提取之后, 通过添加浓 HCl(大约 2ml) 将水层(pH 0.37) 降低到 pH 0.18。合并乙酸乙酯级分, 并且用盐水(100ml) 洗涤。在无水硫酸镁上干燥, 然后在对比压下除去溶剂, 以便得到 3-羟基-α-氧代三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 II) 的无色颗粒状固体: 30.77 克(99%)。
- [0371] 元素分析: C₁₂H₁₆O₄:
- [0372] 计算结果: C, 64.27%; H, 7.19%
- [0373] 测定结果: C, 64.30%; H, 7.13%
- [0374] ¹H NMR(500.16MHz, D₂O) δ 2.288(br s, 1.33H), 2.227(br s, 0.67H), 1.819-1.575(m, 12H) ppm- 部分水合物
- [0375] ¹³C NMR(125.77MHz, D₂O) δ 207.704, 174.583, 169.608, 98.109, 69.618, 68.830, 47.538, 43.716, 43.251, 43.190, 42.907, 42.563, 36.073, 34.677, 34.232, 30.006, 29.865 ppm- 部分水合物
- [0376] 实验室 HPLC:
- [0377] YMC ODS-A S 3120 Å (4.6×50mm), λ = 200nm, 2.5ml/分钟
- [0378] 溶剂: A = 0.2% H₃PO₄, 溶解在水中
- [0379] B = 90% CH₃CN, 溶解在水中

[0380] 梯度 :10 分钟时间内 10% A 到 60% B

[0381] 保留时间 面积% 同一性

[0382] 1.39 分钟 100% 3-羟基- α -氧代三环 [3.3.1.^{1,3,7}] 癸烷-1-

[0383] 乙酸

[0384] 4.95 分钟 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸

[0385] 实施例 28A

[0386] 采用单罐的方法制备 3-羟基- α -氧代三环-[3.3.1.^{1,3,7}] 癸烷-1-乙酸

[0387] (式 II)

[0388] 用按实施例 26 所述方法制备的二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)乙酸甲酯(式 VIII)(15g, 51.16 毫摩尔)填充 250-mL 三颈烧瓶, 该烧瓶装有压力相等的附加漏斗和氩气入口, 然后添加四氢呋喃(30mL, 去稳定化的)。在搅拌若干分钟之后, 溶解大部分式 VIII 甲酯, 以便得到浑浊溶液。向该溶液中添加蒸馏水(30mL), 并且形成了疏松的悬浮液。用 1N NaOH(69mL, 69 毫摩尔, 相对于式 VIII 化合物输入来说为大约 1.35 当量)填充到所述附加漏斗中。用 70 分钟时间滴加 NaOH, 以便得到几乎无色的溶液, 在室温下搅拌该溶液。

[0389] 在大约 16 小时时进行的 HPLC 分析证实了式 VIII 化合物水解的完成。通过添加大约 6N HCl(2.8mL) 将 pH 为 13.24 的所述反应混合物的清澈无色溶液调节到 pH 7.40。添加固体 NaHCO₃(11.2g, 0.133mol., 2.60 当量), 以便形成悬浮液。

[0390] 在加热 4 小时 15 分钟之后进行的 HPLC 分析显示该反应完成了。在加热 5 小时之后, 去掉热源, 并且让所述反应混合物(清澈的无色溶液)冷却。在冷却到室温之后, 将所述反应混合物在冰箱(+4°C)保存 4 天。

[0391] 在冰冷条件下保存 4 天之后, 所述反应混合物仍然是清澈的无色溶液, 并且 HPLC 分析显示在保存时几乎没有改变(如果有的话)。在加温到室温之后, 通过小心添加浓 HCl(需要 11mL, CO₂放出; 当 pH 大约为 1.40 时, 无色固体开始沉淀)将所述混合物(pH 7.77)酸化到 pH 0.20。用 EtOAc(x4, 大约 500mL 总体积; 在每一次 EtOAc 提取之后对含水级分进行 HPLC 分析)提取所得到的悬浮液。在第一次 EtOAc 提取之后, 通过添加浓 HCl(需要大约 1.6mL)将水层(pH 0.38)调节到 pH 0.18。在第二次 EtOAc 提取之后, 通过添加浓 HCl(需要大约 0.8mL)将水层(pH 0.37)调节到 pH 0.17。在剩余的 EtOAc 提取(第三次提取, pH 0.19; 第四次提取, pH 0.19)之后, 所述水层不需要额外的 pH 调节。合并有机级分。在干燥(MgSO₄)之后, 在对比压下除去溶剂, 以便得到粗制的标题式 II 化合物的几乎无色的颗粒状固体, 在真空条件下(真空泵)将它干燥 16 小时: 11.42g(99.53% 收率); HPLC, 100% (面积%)。

[0392] 元素分析 :C₁₂H₁₆Cl₂O₃[55465-020-31, TR46373]

[0393] 计算结果 :C, 64.27% ;H, 7.19%

[0394] 测定结果 :C, 64.19% ;H, 7.09%

[0395] 通过加热到大约 85°C 将粗制式 II 化合物(5.0g)溶解在蒸馏水(19mL)中, 然后从所述热源中取出, 并且使其冷却。在大约 53°C 下, 所述材料开始结晶。在室温下放置大约 2 小时后, 通过过滤收集所述固体, 并且用冰冷的水洗涤。通过所述滤饼抽吸氮气来排除大部分水。然后在真空条件(泵)下干燥所述材料 17 小时, 以便得到标题式 II 化合物的大的无色针状物: 4.33g(回收率为 86.6%); 熔点 164.5-165.6°C (在 Mettler FP800 系统

上);HPLC,100%(面积%)。

[0396] 元素分析 : $C_{12}H_{16}Cl_2O_3$ [55465-023-15, TR46905]

[0397] 计算结果 :C,64.27%;H,7.19%

[0398] 测定结果 :C,64.42%;H,7.04%

[0399] 实施例 29

[0400] 对 L-焦谷氨酸(式 E)进行酯化,以便形成 L-焦谷氨酸乙酯(式 F)

[0401] 用乙醇(49.0升)填充反应容器,并且冷却到 -5°C 。以一定方式用亚硫酸氯(4.97kg)填充所述反应容器,以便该混合物的温度不会超过 0°C 。在完成添加亚硫酸氯之后,再次让所述混合物冷却到 -5°C ,并且逐份地添加 L-焦谷氨酸(式 E),以便在添加期间将温度保持在 0 至 -5°C 。在添加所述酸之后,将所述反应混合物加热到 $20-25^{\circ}\text{C}$,并且搅拌 5 小时。然后在真空条件下将所述反应混合物蒸发($T_{\text{max}} 45^{\circ}\text{C}$),直到其原始体积的大约 15%。然后将剩余的油状物溶解在甲苯(49 升)中。然后将所述甲苯溶液冷却到大约 10°C ,并且缓慢添加三乙胺(8.45kg),以便最高温度在 $20-25^{\circ}\text{C}$ 。搅拌所得到的悬浮液 30 分钟,然后过滤。用甲苯(大约 5 升)洗涤滤饼。在 50°C 下,在真空条件下使滤液的体积缩小到总体积为大约 10 升。通过在 50°C 下缓慢添加环己烷(8 升)启动结晶,并且随后冷却到大约 30°C 。在晶种形成之后,让该混合物冷却到 $20-25^{\circ}\text{C}$,并且填充第二个 8 升部分的环己烷。然后将该混合物冷却到 $6-8^{\circ}\text{C}$,搅拌 1 小时,并且将所得到的晶体滤出。用环己烷洗涤所述晶体 2 次(每次洗涤使用 4 升)。所得到的产物是 4.89kg(82%)L-焦谷氨酸乙酯(式 F)的无色针状物。

[0402] 实施例 30

[0403] L-焦谷氨酸乙酯(式 F)的 BOC-保护

[0404] 在室温下将 L-焦谷氨酸乙酯(式 F)(5.00kg)溶解在甲苯(24.97升)中。然后将 4-二甲基氨基吡啶(0.19kg)添加到所述溶液中。以一定方式用溶解在甲苯(24.97升)中的 BOC-酐(7.29kg)的溶液填充所述反应混合物,以便反应温度不超过 25°C 。在完成添加之后,在 25°C 下搅拌反应混合物 3 小时。然后用半饱和的 NaHCO_3 -溶液(49.94升)填充所述反应混合物,并且剧烈搅拌 10 分钟,然后分离有机相和水相。分离的有机层用水洗涤两次(每次用 24.97 升)。然后在真空条件下,在 50°C 下的最高温度下将有机层从溶剂中蒸发出来。剩余的无色至浅黄色油状物在静置时结晶。理论产量为 8.18kg(31.81 摩尔)的(5S)-2-氧代吡咯烷-1,5-二羧酸[1-(1,1-二甲基乙基),5-乙基]酯(式 G)。

[0405] 实施例 31

[0406] SuperHydride 还原和消除

[0407] 将(5S)-2-氧代吡咯烷-1,5-二羧酸[1-(1,1-二甲基乙基),5-乙基]酯(式 G)(4.80kg)溶解在甲苯(30.97升;Kf max 0.01%水)中,并且冷却到 -50°C 。以一定方式使用 SuperHydride(存在于 THF 中的 LiEt_3BH 1M;19.96 升)填充该溶液,以便反应温度不超过 -45°C 。在完成添加之后,在 -45 至 -50°C 下搅拌该混合物 30 分钟。然后以一定方式将 N-乙基二异丙胺(DIPEA;14.47 升)添加到所述反应混合物中,以使得温度不超过 -45°C 。将固体形式的二甲基氨基吡啶(0.030kg)添加到所述混合物中。然后以一定方式使用三氟乙酸酐(TFAA)(4.70kg)填充所述反应混合物,以使反应温度不超过 -45°C 。在完成添加之后,用 1 小时时间让所述反应混合物加温到 $20-25^{\circ}\text{C}$,并且在该温度下再保持 2 小时。然后让所

述反应混合物冷却到 0°C, 并且缓慢填充水 (48.00 升) 以便反应温度不超过 5°C。然后分离水相和有机相, 并且用 48 升水 (0-5°C) 再次洗涤有机相。随后蒸发有机层, 并且在 40°C 下脱气。获得了黄色油状物, 产量为 4.5kg (18.66mol, 100%) 的 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二羧酸 [1-(1-二甲基乙基),5-乙基] 酯 (BOC-DHPEE) (式 III)。

[0408] 实施例 32

[0409] BOC-DHPEE (式 III) 的水解

[0410] 将用 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二羧酸 [1-(1,1-二甲基乙基),5-乙基] 酯 (BOC-DHPEE) (式 III) (6.00kg) 和乙醇 (24.00 升) 制备的溶液冷却到 0-5°C, 并且在该温度下用存在于水 (20.87 升) 中的氢氧化锂水合物 (2.09kg) 的溶液缓慢处理, 以便产生浑浊的溶液。然后将该浑浊溶液加温到 20-25°C, 并且在该温度下搅拌 2 小时。在 40°C 的最高温度下, 在真空下将所述反应混合物蒸发到大约 10.5 升的体积, 并且用水 (24.00 升) 和叔丁基甲醚 (TBME 或 MTBE) (24 升) 填充, 并且混合 10 分钟。分离所得到的有机相和水相, 并且用 24 升 TBME 再次填充水相。然后将混合物冷却到 5-10°C, 并且用 H₃PO₄ 85% - 水 (1 : 4) 将 pH 调节到 2.3-2.3, 同时剧烈搅拌。在该过程中, 将温度保持在 5-10°C 以保持其稳定性。分离所得到的有机层和水层。保存所述有机层, 并且用 24 升预先在 5-10°C 冷却的 TBME 再次提取水层。将所得到的有机层与保存的有机层合并, 并且用二异丙基乙胺 (DIPEA) (4.82kg) 填充。在 30°C 的最高温度下, 在真空条件下蒸发所述溶液并且脱气。产量为 7.84kg (22.88 摩尔, 92%) [N-BOC 脱氢脯氨酸 *DIPEA (BOC-DHP)]。

[0411] 实施例 33

[0412] 在 BOC-DHP 上形成酰胺

[0413] 通过按照实施例 32 所述皂化合成的 BOC-DHP 可能含有水。因此, 在进行反应之前, 用甲苯进行共沸蒸馏。不过, 由于试剂过量, 对原材料的计算是以除去任何水之前的 BOC-DHP 量为基础的。为了进行共沸蒸馏, 用甲苯将 BOC-DHP 稀释成大约 30% 的溶液。在 40°C 下在真空中除去甲苯。然后将处理的 BOC-DHP (6.00kg) 溶解在 THF (48.0 升) 中。用 DIPEA (2.26kg) 填充该溶液, 并且将所述反应混合物冷却到 -20 至 -25°C。然后缓慢添加甲磺酰氯 (3.01kg)。在该添加过程中, DIPEA 氢氯化物沉淀。然后在 -20°C 下搅拌所得到的悬浮液 2 小时, 然后通过表面下气体入口用氨饱和。在添加氨的同时, 将反应物加热到 0°C。在饱和之后, 将所述反应混合物加热到 20°C, 并且搅拌 3 小时。在搅拌之后, 对所述反应混合物进行过滤, 以便除去氢氯化物。用 THF (12 升) 分若干部分洗涤滤饼。将所得到的滤液在真空条件下, 在 40°C 的最高温度下浓缩, 并且溶解在二氯甲烷 (33.33 升) 中。用水 (26.66 升) 洗涤所述溶液。分离所得到的有机相和水相, 并且用二氯甲烷提取水相 2 次 (每次 20 升)。合并所得到的有机层, 并且在真空条件下浓缩, 并且脱气, 以便除去任何多余的 Hunig s 碱。产量为 3.35kg (15.77mol, 90%) 的 (5S)-5-氨基羰基-4,5-二氢-1H-吡咯-1-羧酸 1-(1,1-二甲基乙基) 酯 (BOC-DHPA) (式 IV)。

[0414] 实施例 34

[0415] (5S)-5-氨基羰基-4,5-二氢-1H-吡咯-1-羧酸 1-(1,1-二甲基乙

[0416] 基) 酯 (式 IV) 的环丙烷化

[0417] 用溶解在二氯甲烷 (18.0 升) 中的 BOC-DHPA (式 IV) (4kg) 填充第一个反应器, 反应器 A, 并且保持在 20°C。用二氯甲烷 (18.00 升) 填充第二个反应器, 反应器 B, 并且冷

却到 -30°C 。然后用二甲氧基乙烷 (DME) (3.36kg) 填充反应器 B, 然后用存在于甲苯中的 30% 的二乙基锌 (15.36kg) 溶液填充, 同时将温度保持在 -30 至 -25°C 。然后用二碘甲烷 (19.99kg) 填充反应器 B, 同时将反应温度保持在 -30 和 -25°C 。在完成二碘甲烷添加之后, 在 -30 至 -25°C 下搅拌该混合物 45 分钟。然后通过冷却管 (-20 至 -25°C) 将该混合物填充到反应器 A 中。填充是以大约 5% 的部分缓慢进行的, 以便反应器 A 的反应温度保持在 $22-24^{\circ}\text{C}$, 直到反应完成。在反应完成之后, 将反应器 A 的反应物冷却到 $5-10^{\circ}\text{C}$ 。然后用饱和的碳酸氢盐溶液 (21.6 升) 以一定方式缓慢填充所述反应混合物, 以便反应温度不超过 15°C 。在这一添加过程之后, 搅拌所述反应混合物至少 1 小时, 同时形成沉淀物。对所述悬浮液进行过滤。将所得到的滤饼重新转移到所述容器中, 再次用二氯甲烷 (14.4 升) 制成浆 30 分钟, 然后再次过滤。在第二次过滤之后, 通过添加二氯甲烷 (7.2 升) 洗涤所述滤饼。然后将所述滤液分离成水相和有机相, 并且用半饱和的盐水 (21.6 升) 洗涤所述有机相。然后在最高 30°C 的温度下通过真空除去溶剂, 并且通过庚烷进行交换。获得了存在于庚烷中的粗制产物的浆。在溶剂交换之后的悬浮液的最终体积为 14.4 升。通过过滤分离粗制产物。用庚烷 (2.9 升) 洗涤所述滤饼, 并且在真空条件下干燥到恒定重量。粗制产物的产量为 2.76kg (12.2mol, 72%) [1S-(1 < a, 3 < b, 5 < a)-3-氨基羰基]-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷 -2-羧酸 1,1-二甲基乙酯 (式 H)。为了纯化, 在 $20-22^{\circ}\text{C}$ 下, 将所述粗制材料在 8 倍用量的 1 : 1 的乙酸丁酯 / 庚烷的混合物中制成浆 4 小时。过滤所述材料, 并且用合适的 1 倍量的庚烷洗涤所述滤饼。产量为 2.11kg (9.33mol, 55%) [1S-(1 < a, 3 < b, 5 < a)-3-氨基羰基]-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷 -2-羧酸 1,1-二甲基乙酯 (式 H)。

[0418] 实施例 35

[0419] 对 [1S-(1 < a, 3 < b, 5 < a)]-3-(氨基羰基)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷

[0420] -2-羧酸 1,1-二甲基乙酯 (式 H) 脱保护, 以便形成 (1S, 3S, 5S)

[0421] -2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷 -3-甲酰胺 (式 J)

[0422] 用 [1S-(1 < a, 3 < b, 5 < a)-3-氨基羰基]-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷 -2-羧酸 1,1-二甲基乙酯 (式 H) (5.0 克, 22.1 毫摩尔) 和 THF (20ml) 填充 100ml 的 2 颈烧瓶, 该烧瓶装有机械搅拌器和热电偶。然后将 HCl (2.5M, 存在于 EtOAc 中, 25ml, 62.5 毫摩尔) 添加到所述悬浮液中。在室温下搅拌所得到的溶液 18 小时, 在此期间, 观察到了沉淀。通过 HPLC 监控反应的完成。将甲基叔丁醚 (MTBE) (30ml) 添加到该悬浮液中, 并且再继续搅拌 30 分钟。然后在 N_2 保护下过滤所述悬浮液, 以便产生白色固体, 所述固体用 MTBE (20ml) 洗涤。在对比压条件下, 在烘箱中干燥所述固体 48 小时, 以便提供 (1S, 3S, 5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷 -3-甲酰胺 (式 J; 3.6 克, 100%) 的盐酸盐。

[0423] 实施例 35A

[0424] (5S)-5-氨基羰基 -4,5-二氢 -1H-吡咯 -1-羧酸 1-(1,1-二甲基乙

[0425] 基) 酯 (式 IV) 的其他制备方法

[0426] A. 4,5-二氢 -1H-吡咯 -1,5-二羧酸 1-(1,1-二甲基乙基) 的转化

[0427] 向 10.4g (25.86 毫摩尔) 固体二环己基胺 (DCHA) 盐在 30mL 水, 40mL 甲苯和 10mL MTBE 的混合物中制备的悬浮液中添加 2.7mL 的 10N 含水 NaOH (27 毫摩尔) (过量的 NaOH 应当限制为 1.05 当量或更少)。在搅拌时, 产生了具有清澈的层的双相混合物, 并且分离所有固体溶解的相。用 4mL 水提取含有 4,5-二氢 -1H-吡咯 -1,5-二羧酸 1-(1,1-二甲基乙

基) 钠盐的废弃的有机相, 将所述水添加到最初的水相中。HPLC 定量得到了 12.55% (w/w) 的在水相中的“游离烯烃-酸”含量或 96% 的回收率。

[0428] B. DMT-MM 的制备

[0429] 将 4mL (36.38 毫摩尔) 的纯 N-甲基吗啉 (MM) 添加到保持在室温水浴中的溶解在 70mL EtOAc 中的 2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪 (CDMT) (6.2mg, 35 毫摩尔; 1.5 当量) 的溶液中。固体 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉 鎓氯化物 (DMT-MM) 开始沉淀出来。在室温下搅拌含有 DMT-MM 的悬浮液 30 分钟, 此时它变成稠的糊状物。在反应期间, 温度从 23°C 上升到 28-29°C。保持所述反应的温度较低, 以便使竞争性脱甲基化最小化, 以便形成二甲氧基-N 甲基吗啉-三嗪 (DMMT)。

[0430] C. 将 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二羧酸 1-(1,1-二甲基乙基) 的钠盐转化成 (5S)-5-氨基羧基-4,5-二氢-1H-吡咯-1-羧酸 1-(1,1-二甲基乙基) 酯 IV

[0431] 向通过 HPLC 定量 ($V = 25\text{mL}$) 相当于 5g (23.5 毫摩尔) 游离烯烃酸的 A 部分钠盐的钠盐溶液中添加固体 NH_4Cl (3.75g, 70 毫摩尔, 3 当量), 此时 pH 从 14 降低到 8.9。向该溶液中添加足够的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 以便将 pH 调节到 $\text{pH} = 6.20$ 。注意: 磷酸的用量可以根据用于将 DCHA 盐转化成钠盐的最初过量的 NaOH 而改变。将缓冲过的钠盐溶液添加到按上面的 B 部分制备的 DMT-MM 悬浮液中。

[0432] 在室温下搅拌所述双相混合物 4 小时, 此时, 最初的乳状液成为悬浮液, 并且某些 DMHT 沉淀出来。通过 HPLC 分析证实, 所述反应完成了, 并且在任何相中既没有出现活化的 DMT-酯, 又没有出现酸。

[0433] 在所述反应条件下, 通过 DMT-MM 和 DMHT 反应, 还形成了重量百分比为 12-15% 的 4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪醚 (DMT-醚)。对该悬浮液进行过滤, 以便除掉 4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪 (DMHT), 并且分离不同的相。用 2N 含水的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ($2 \times 25\text{mL}$) 洗涤富有机相, 或直到 pH (含水的 (aq.)) < 6 , 这意味着大部分 N-甲基吗啉被从所述有机相中除掉。分离所述相, 并且用 25mL 盐水洗涤所述富有机相。

[0434] 标题化合物 IV 的一般的溶液收率为 87-90%; 未反应的起始烯烃-酸为 1-0%。对所述富有机相进行旋转蒸发并且用新鲜的 EtOAc ($2 \times 250\text{mL}$) 进行共沸干燥。所述材料是部分结晶的。将所述混合物溶解在 8mL 的热 EtOAc 中, 并且与 10mL 的正庚烷混合。固体开始形成。在 50°C 下搅拌所述悬浮液 30 分钟, 并且添加另外 10mL 的正庚烷。在从加热的水浴中取出之后, 在室温下搅拌所述悬浮液 30 分钟, 并且每 30 分钟 2 次填充额外的庚烷, 并且在室温下搅拌所述悬浮液过夜, 以便完成结晶。将所述固体过滤并且干燥。一般的结晶收率接近 90%; 标题化合物 IV 的效力为 90%, 并且 DMT-醚占重量的其余 10%。

[0435] 发现形成的固体是标题化合物 IV 和 DMT-醚的真共晶体 (true co-crystal), 通过 DSC 测定它们能产生单一的尖锐的 97.4°C 的熔点, 与酰胺的 89.7°C 的熔点形成对比。所述共晶体形式更具有晶态并且更方便地从溶液中结晶出来。

[0436] 实施例 35B

[0437] 制备 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二羧酸 1-(1,1-二甲基乙基) 的二环

[0438] 己基胺盐

[0439] A. 制备 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二羧酸 1-(1,1-二甲基乙基) 的钠盐

[0440] 将 3 倍体积的乙醇添加到 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二羧酸 1-(1,1-二甲基乙

基)(大约 15wt% -25wt%)(1g/mL) 的甲苯溶液中。将该溶液冷却到 0-5°C。缓慢向该溶液中添加 5N NaOH-水溶液(2 当量),同时保持温度 < 5°C(轻度放热)。将所述反应混合物加温到 20-25°C,并且搅拌直到反应完成。

[0441] 将 4 倍体积的水添加到所述反应混合物中,并且在真空条件下蒸馏所述反应混合物(水浴温度为 40°C),以便除掉乙醇。向所述残余物中添加 0.5 倍体积的甲苯(0.865g/mL),并且搅拌所述混合物 10 分钟。形成了水层和有机层。分离包括钠盐的水层,并且用于 B 部分。

[0442] B. 制备 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二羧酸 1-(1,1-二甲基乙基)的二环己基胺盐

[0443] 将 1 倍体积的 MTBE(0.74g/mL) 添加到 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二羧酸 1-(1,1-二甲基乙基)-钠盐的水溶液中。将 0.2 倍体积的庚烷(0.684g/mL) 添加到上述溶液中,并且将所得到的溶液冷却到 0-5°C。将 85% H₃PO₄(1g/mL) 缓慢添加到所述溶液中,使 pH 为大约 2.5-3,同时保持温度 < 5°C(轻度放热的)。分离所得到的层,并且向包括所述产物的有机层中添加 1 倍体积的 75% 的盐水。搅拌该混合物 10 分钟,并且分离所得到的层。所述产物包含在所述有机层中。

[0444] 将所述有机溶液冷却到 0-5°C,并且缓慢添加二环己基胺(0.91g/mL)(轻度放热)同时保持温度 < 10°C。在 0-5°C 下,搅拌所述反应混合物 3 小时。将所述固体过滤出来,并且用 0.5 倍体积的 1 : 1 MTBE/庚烷洗涤。干燥并且回收所得到的 DCHA 盐(1g/mL)。

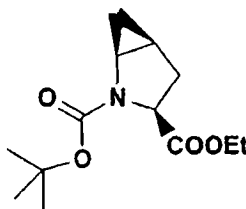
[0445] 实施例 35C

[0446] [1S-(1 < a, 3 < b, 5 < a)]-3-(氨基羰基)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-2-羧酸 [1,1-二甲基乙基,乙基] 酯(式 H)(又被称为顺-N-BOC-4,5-

[0447] 亚甲基脯氨酸)的其他制备方法

[0448] A. 制备 (s)-BOC-4,5-亚甲基脯氨酸乙酯

[0449]



[0450] 用 2.2g 的 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二羧酸 [1-(1,1-二甲基乙基),5-乙基] 酯(2.20g,9.12 毫摩尔,1 当量)和 22ml 的无水甲苯装入火焰干燥的 3 颈烧瓶中(磁力搅拌)。将所得到的溶液冷却到 -30°C,并且进一步滴加 16.58ml(18.24 毫摩尔)的二乙基锌(存在于甲苯中的 1.1m 溶液)。

[0451] 滴加存在于 2.2ml 甲苯中的 2.66ml(6.43g,36.47 毫摩尔)的氯碘甲烷溶液,同时将反应温度保持在 -25°C 至 -30°C。将反应物保持在 -20°C 下 16 小时。然后用 22ml 的半饱和的碳酸氢盐溶液终止所述反应,并且加温到室温。形成了白色沉淀物,用 Hyflow(过滤器辅助装置)过滤掉所述沉淀,并且用甲苯(大约 10ml)洗涤。将所述有机层与所述双相滤液分离,并且用水洗涤两次(每次使用 11ml)。将所述有机层蒸发到干燥,以便得到微黄色油状物(2.33g),它是 N-BOC-亚甲基脯氨酸乙酯(顺式-和反式-(8 : 1) 同分异构体的混合物)。

[0452] 用上述方法制备大量上述同分异构体的混合物,这些混合物足以在下一个步骤中

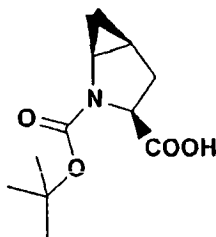
使用。在 20-25℃下,将 3.40kg 的 N-BOC 4,5-亚甲基脯氨酸乙酯(顺式-和反式-同分异构体的混合物)与 5.17kg(66.59gmol)40.0%甲胺(水溶液)一起在氮气中剧烈搅拌。

[0453] 在完成反应之后,用 5.17 升水和 5.17 升 MTBE 稀释所述混合物,并且再搅拌 5 分钟,然后进行相分离。用 5.17 升水洗涤所述有机层。将所得到的有机层蒸发(真空, Tmax 40℃)到恒定重量。

[0454] 获得了 2.52kg 产量的顺-N-Boc-4,5-亚甲基脯氨酸乙酯(9.85mol,74%)。

[0455] B. 制备 s-BOC-4,5-亚甲基脯氨酸

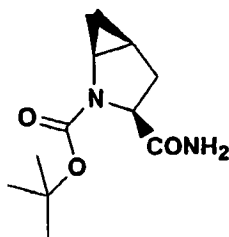
[0456]



[0457] 制备存在于 10.28 升乙醇中的 2.57kg 顺-N-Boc 4,5-亚甲基脯氨酸乙酯(s-Boc-MPEE)的溶液。在 20-28℃向该溶液中添加用 5.07 升水中的 0.51kg 氢氧化锂水合物制备的溶液。反应是在惰性气体保护(氮气)下进行的,在 20-25℃下搅拌所述反应混合物 14 小时(IPC)。在完成反应之后,在 40℃下蒸发所述混合物(真空)。将所得到的油状物加入 25.70 升水和 25.70 升 MTBE 中,并且搅拌 30 分钟。分离有机相,并且用 12.85 升 MTBE 再次提取水层,向水相中添加 25.70 升 MTBE,并且通过添加 1N HCl(大约 12 升)将所述混合物的 pH 调节到 pH 2。分离有机层,并且用 12.85 升 MTBE 再次提取水相。将来自前面步骤的合并的有机层蒸发至干燥,以便得到 1.88kg 顺-N-Boc 4,5-亚甲基脯氨酸(8.25mol,82%)。

[0458] C. 制备 [1S-(1 < a,3 < b,5 < a)]-3-(氨基羰基)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-2-羧酸 1,1-二甲基乙酯

[0459]



[0460] 将 2.00kg 顺-N-Boc-4,5-亚甲基脯氨酸溶解在 40.00 升 THF 中,并且冷却到 -15℃。向该混合物中添加 1.07kg N-甲基吗啉(P0)。以一定方式向所述反应混合物中填充 1.32kg 氯甲酸异丁酯,以使反应温度不超过 -8℃。在完成添加之后,在 -10℃下搅拌所述混合物 30 分钟(P1, IPC1)。N-甲基吗啉氢氯化物从所述反应混合物中沉淀出来。

[0461] 将所述反应混合物加温到 -5℃,然后通过气体入口管用氨(0.79kg,理论值 5.00 当量)进行清洗。然后将所述反应混合物加温到 20-25℃,并且在该温度下搅拌 4 小时(P2, IPC 2)。向所述反应混合物中添加 40.00 升饱和盐水。然后通过添加饱和硫酸氢钾溶液将所述混合物的 pH 调节到 pH 4-4.5。然后分离有机层,并且再次用 20.00 升 MTBE 提取水相。将合并的有机层蒸发至干燥。在回流温度下将粗制产物溶解在 8.00 升乙酸丁酯中。产物

在大约 30°C 下沉淀。在结晶开始时,用 20.00 升庚烷缓慢处理所述混合物,并且再继续搅拌 2 小时。通过过滤分离所述产物。用两部分冰冷的乙酸丁酯/庚烷(1:4)洗涤所述滤饼,每次使用 1.6 升,并且分别用 2.00 升庚烷洗涤 2 次,并且在 30-35°C(真空)下干燥,以便得到 1.64kg(7.22mol,82%)顺-N-BOC 4,5-亚甲基脯氨酸酰胺(s-BOC-MPA)。

[0462] 实施例 36

[0463] BOC 保护 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 V),

[0464] 以便形成 (< aS)-< a[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]-3-羟基三

[0465] 环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(VI)

[0466] 式 VI 酸

[0467] 将 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 V)(469 克,2.08 摩尔)溶解在相分离器(phase splitter)中的 1N NaOH(5 升,5 摩尔,2.4 当量)中,该分离器装有温度探头和 pH 探头。将 THF(2.5 升)添加到该溶液中。然后添加固体 Boc₂O,并且在环境温度下将所述反应混合物搅拌约 1 小时。然后添加 EtOAc(4 升),同时搅拌,并且分离所得到的有机层和水层。用浓 HCl 将水层的 pH 调节到 7。然后添加 EtOAc(4 升),并且添加额外的 HCl,以便将 pH 降低到大约 1。所添加的浓 HCl 的总体积为 510ml。再次分离有机层和水层,并且用 EtOAc(3×3 升)提取水层。然后合并所述有机层,并用水(3 升)和盐水(3 升)洗涤。然后用 Na₂SO₄干燥洗涤过的有机层,并且在室温下在旋转蒸发器上浓缩直到干燥。产量为 542 克的 (< aS)-< a[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 K)。

[0468] 实施例 37

[0469] 偶联反应,以便产生 3-氨基羰基-(< aS)-< a-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}

[0470]] 癸-1-基)-< b-氧代-(1S,3S,5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-2-乙

[0471] 烷氨基甲酸 1,1-二甲基乙酯(式 K)

[0472] 用 (< aS)-< a[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 VI)(50 克,153.8 毫摩尔)填充 2L 三颈烧瓶,该烧瓶装有温度计,机械搅拌器和气体入口。添加 THF(200ml)并且搅拌,以便产生清澈的溶液。在丙酮-干冰-水浴中将该溶液冷却到 -6°C。然后作为一个部分添加甲磺酰氯(Mes-Cl)(13.1ml,169 毫摩尔,1.1 当量),然后添加二异丙基乙胺(94ml,539 毫摩尔,1.1 当量)。用大约 4 分钟时间缓慢添加二异丙基乙胺,以便将内部温度保持在低于 8°C。在 0°C 下搅拌所述反应混合物,直到所有酸被转化成混合的酐。然后作为一个部分添加 (1S,3S,5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-甲酰胺盐酸盐(32.5 克,200 毫摩尔,1.1 当量)和羟基苯并三唑(HOBT)(1.04 克,7.6 毫摩尔,0.05 当量),并且将烧瓶中从冷水浴中取出。在室温下搅拌所述反应混合物 2 小时,然后在室温下放置过夜。

[0473] 实施例 38

[0474] BOC 保护 (< aS)-< a-氨基-3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸(式 V),

[0475] 以便形成 (< aS)-< a[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]氨基]-3-羟基三

[0476] 环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 1,4-二氮杂二环 [2.2.2] 辛烷盐(式 VIA)

[0477] 式 VIA(DABCO 盐)

[0478] 将 1,4-二氮杂二环 [2.2.2] 辛烷(DABCO)(15g;125.1 毫摩尔)填充到由大

约 30g(135 毫摩尔) 的实施例 36 的式 VI 酸溶解在 300ml 的乙酸异丙酯中构成的溶液中。将乙酸乙酯 (150mL) 填充到上述反应混合物中 (乙酸乙酯: 乙酸异丙酯的体积比为 (150mL/300mL))。用式 VIA DABCO 盐 (200mg) 接种所述反应混合物。在室温下剧烈搅拌所述反应混合物。将水 (5mL) 缓慢填充到所述反应混合物中, 并且在室温下剧烈搅拌所述反应混合物, 以便在 15-20 分钟之后诱导晶体形成。在室温下搅拌所述反应混合物 16 小时, 并且用布氏漏斗过滤反应产物。在室温下用乙酸乙酯洗涤所述固体, 并且在 50°C 下在真空中干燥, 以便得到 47g(79%) 的式 VIA DABCO 盐。

[0479] 实施例 39

[0480] 偶联反应, 以便产生 3-氨基羰基-($\leq aS$)- $\leq a$ -(3-羟基三环 [3.3.1. $1^{3,7}$

[0481]] 癸-1-基)- $\leq b$ -氧代-(1S,3S,5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-2-乙

[0482] 烷氨基甲酸 1,1-二甲基乙酯 (式 K)

[0483] 用按照实施例 38 所述制备的 ($\leq aS$)- $\leq a$ [[(1,1-二甲基乙氧基) 羰基] 氨基]-3-羟基三环 [3.3.1. $1^{3,7}$] 癸烷-1-乙酸 1,4-二氮杂二环 [2.2.2] 辛烷盐 (式 VIA) (5 克, 11.44 毫摩尔) 填充 250L 三颈烧瓶, 该烧瓶装有温度计, 机械搅拌器和气体入口。添加 THF (25ml) 并且搅拌, 以便产生浆。在冰水浴中将所述浆冷却到 0°C。然后作为一个部分添加甲磺酰氯 (Mes-Cl) (1.15ml, 14.85 毫摩尔, 1.3 当量), 然后添加二异丙基乙胺 (94ml, 40 毫摩尔, 3.5 当量)。用大约 4 分钟时间缓慢添加二异丙基乙胺, 以便保持内部温度低于 5°C。在 0°C 下搅拌所述反应混合物 10 分钟, 直到所有的酸被转化成混合的酐。然后作为一个部分添加 (1S,3S,5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-甲酰胺盐酸盐 (2.42 克, 14.9 毫摩尔, 1.3 当量) 和羟基苯并三唑 (HOBT) (77mg, 0.57 毫摩尔, 0.05 当量), 并且将烧瓶从冷水浴中取出。在室温下搅拌所述反应混合物 2 小时, 并且在室温下放置过夜。

[0484] 实施例 40

[0485] 脱水和水解, 以便产生 3-氰基-($\leq aS$)- $\leq a$ -(3-羟基三环 [3.3.1. $1^{3,7}$

[0486] 癸-1-基]- $\leq b$ -氧代-(1S,3S,5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-2-乙烷

[0487] 氨基甲酸 1,1-二甲基乙酯 (式 L)

[0488] 将吡啶 (6 当量, 922 毫摩尔, 74.6ml) 添加到实施例 39 的反应混合物中, 并且在冷水浴中将所述反应混合物冷却到 -8°C。然后用 6 分钟时间缓慢添加三氟乙酸酐 (TFAA) (4 当量, 616 毫摩尔, 87ml), 同时保持温度低于 10°C。在 24°C 下搅拌该反应物 0.5 小时, 并且通过 HPLC (30ml, 0.5ml AcN, 0.5ml H₂O) 检查实施例 37 的化合物 K 的消失。

[0489] 然后在冷水浴中将所述反应物冷却到大约 -3°C。用 10 分钟时间将 NaOH (5N, 6 当量, 0.925mol, 185ml) 添加到所述反应物中 (含水, pH = 9.9), 同时保持反应温度低于 10°C。用 5 分钟时间添加 K₂CO₃ 水溶液 (319 克, 15 当量, 溶解在 510ml H₂O 中) (温度 = 8°C, 含水的 pH 11.1)。让所述反应进行 7 小时 40 分钟。当通过 HPLC (30 μ l, 0.5ml AcN, 0.5ml H₂O) 测定所有中间体被水解成倒数第二种时反应就完成了。

[0490] 然后将 EtOAc (500ml) 添加到所述反应混合物中, 并且分离所得到的水层和有机层。用 500ml 缓冲溶液 (2M H₃PO₄, 1M NaH₂PO₄) 洗涤所述有机层。温度从 15°C 上升到 23°C; 添加时间: 5 分钟, 水层 V = 560ml, pH = 4.5, 通过 HPLC 分析得到了 32mg 产物; 有机层 V = 1080ml。用另外 500ml 缓冲液洗涤所述有机层; 水层 V = 780ml, pH = 2.5, 通过 HPLC 分析得到了 415mg 产物; 有机层 V = 800ml, 1.02v/v% 吡啶。用 300ml 盐水洗涤有机层; 水层

V = 350ml, pH = 1.8, 通过 HPLC 分析得到了 20mg 产物。用 130ml 饱和 NaHCO₃ 溶液洗涤有机层; 水层 V = 176ml, pH = 6.0, 780mg 产物。用 300ml 半饱和盐水洗涤有机层; 水层 V = 330ml, pH = 5.2, 25mg 产物; 有机层 V = 650ml, 吡啶 0.045v/v%。将 5g Darco 添加到有机层中, 并且搅拌 5 分钟, 通过 50g 硅石过滤, 用 4x25ml EtOAc 洗涤, 有机层 V = 750ml, 吡啶 0.04v/v%。

[0491] 然后将所述有机层蒸馏到大约 133ml。将所述有机层搅拌 1 小时, 直到溶液变浑浊。用 15 分钟时间添加 133ml 庚烷, 并且搅拌所述浆过夜。添加 133ml 庚烷过夜。通过机械搅拌剧烈搅拌所述混合物 20 分钟。将固体过滤掉, 并且用 50ml 5% EtOAc/ 庚烷洗涤滤饼; 在从母液中除去溶剂之后, 在 8.86g 粗制产物中得到了 3.4g 产物。在 50°C 下, 在真空条件下干燥产物晶体过夜。获得了 467g 产物, 大约 73%, 96.6AP。

[0492] 实施例 41

[0493] 脱保护, 以便产生 (1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羟基三

[0494] 环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基]-1-氧代乙基)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-3-腈

[0495] 苯甲酸盐 (1 : 1) (式 M)

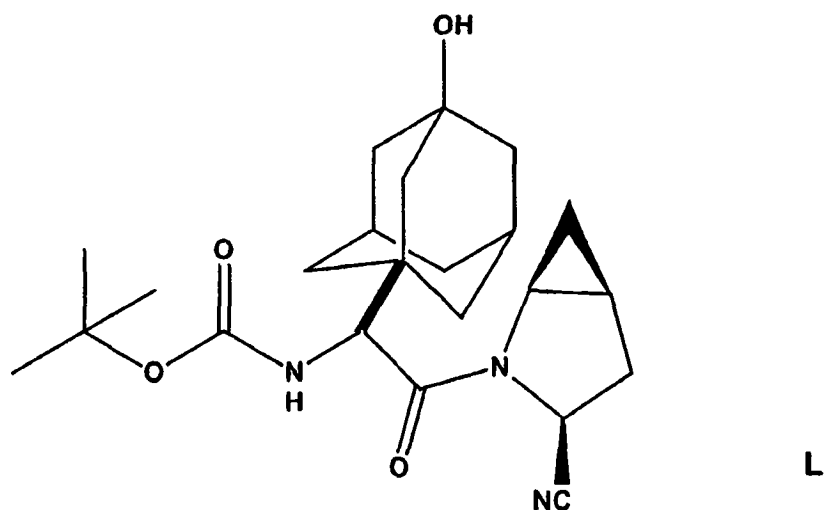
[0496] 将 3-氰基-(*a*S)-*a*-(3-羟基三环 [3.3.1.1^{3,7}] 癸-1-基)-*b*-氧代-(1S, 3S, 5S)-2-氮杂二环 [3.1.0] 己烷-2-乙烷氨基甲酸 1,1-二甲基乙酯 (式 L) (5.0 克, 12.04 毫摩尔) 填充到三颈烧瓶中, 该烧瓶装有温度计, 机械搅拌器和气体入口。添加大约 45-50ml EtOAc, 以便获得清澈溶液。在室温下添加浓 HCl (3.00ml, 37% w/w%, 36.14 毫摩尔, 3 当量), 并且搅拌所述反应混合物, 直到产生固体。然后添加水 (30ml), 并且搅拌该混合物 1-2 分钟。将该反应混合物转移到分液漏斗上, 并且让所述反应混合物的各个层分离成明确的相分离物。用 25% NaOH 将水层调节到大约 6 的较低 pH, 同时保持温度低于 25°C。

[0497] 通过以下方法进行盐交换: 将异丙醇 (IPA; 2-3ml) 添加到水层中, 然后添加苯甲酸钠 (0.65ml 的苯甲酸钠溶液, 通过将 2.6 克苯甲酸钠溶解在 6.5ml 水中制备)。然后通过附加漏斗以滴加方式添加剩余的苯甲酸钠溶液。在室温下搅拌所得到的反应混合物 16-24 小时。然后在布氏漏斗上过滤所述反应混合物中的固体, 并且用水洗涤, 直到固体在用 AgNO₃ 测试时对 Cl⁻ 呈阴性。然后用庚烷 (10ml) 洗涤所述固体, 以便排除水, 在漏斗上风干, 并且在真空烘箱中在 35°C 下干燥, 直到 KF ≤ 5%。收率为 79%, 4.1 克。

[0498] 实施例 42

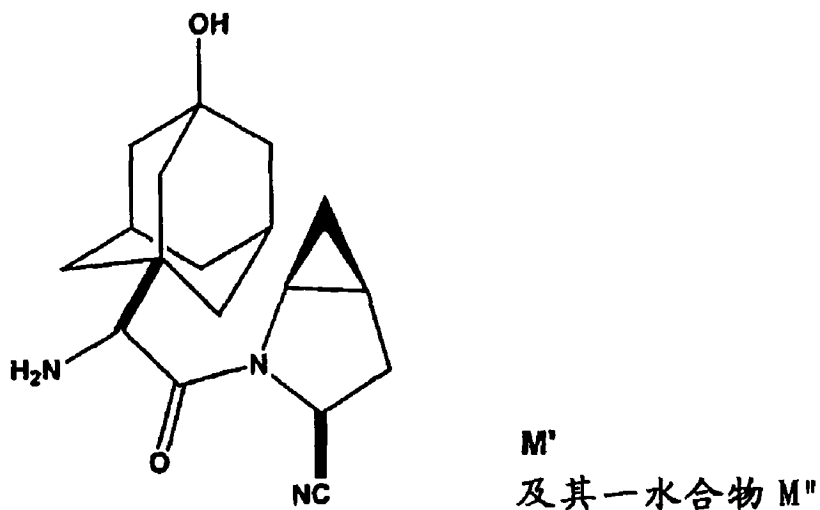
[0499] L 的脱保护

[0500]



[0501] 以便产生游离碱 M'

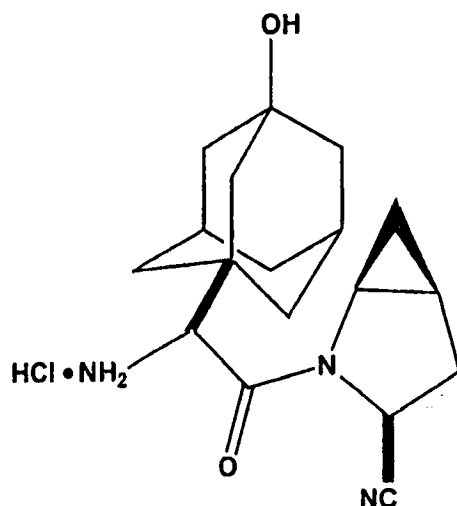
[0502]



[0503] 将实施例 40 的化合物 (L) (300g, 0.723mol, 效力为 90.6%), 二氯甲烷 (3L), 甲醇 (288ml, 7.23 摩尔) 和浓 (36%) 盐酸 (288ml, 7.23 摩尔) 填充到 3 颈 12L 烧瓶中, 该烧瓶装有机械搅拌器, 温度探头和 N₂ 气体入口。进行反应, 同时将反应温度保持在大约 20 至大约 25°C 范围内。搅拌所述反应混合物 18 小时, 分离成两相, 并且收集上部水层。向水层中添加二氯甲烷 (6L) 和水 (720ml), 并且滴加 5N NaOH (大约 600ml), 以便将 pH 调节到 9.0-10.5。

[0504] 有机相含有盐酸盐

[0505]



[0506] (通过 HPLC 鉴定)(式 L')，用二氯甲烷 (6L) 和水 (720ml) 处理，并且滴加 5N 氢氧化钠溶液 (大约 600ml)，同时将反应温度保持在 20-25℃，以便将 pH 调节到 9-10.5。添加 NaCl (120g)，并且搅拌所述混合物 20 分钟，以便产生相分离物。收集所述有机层 (6.2L) (含有大约 174g 的化合物 M')，并且弃掉水层 (1.75L) (含有 6.5g 化合物 M')。

[0507] 用 1% NH₄Cl 盐水溶液 (450ml) 洗涤所述有机层。(1% NH₄Cl 盐水溶液含有 1g NH₄Cl, 25g NaCl 和 74g H₂O)。从所得到的相分离物中回收了 6.0L 有机层 (在溶液中含有大约 176g 化合物 M')，并且弃掉含有 1.4g 化合物 M' (~0.4%) 的水层 (0.45L)。

[0508] 将乙酸乙酯 (大约 4L) 添加到所述有机层中，同时在 25℃ /50mmHg 条件下将 CH₂Cl₂ 蒸馏掉。当达到 2.5L 的最终体积时终止蒸馏。对所述有机层进行精炼过滤，以便除掉固体 NaCl，并且浓缩到大约 1Kg (大约 170g 化合物 M' 存在于 1L 乙酸乙酯中)。GC 分析 :DCM < 0.1%。滴加水 (17ml)，并且在 10 分钟之后开始结晶。添加 17ml 水，并且搅拌所得到的浆 30 分钟，过滤，用乙酸乙酯洗涤滤饼，并且在室温下，在真空条件下干燥，以便得到 186g 的一水合物化合物 M''，收率为 81%。

[0001]

序列表

<110> Bristol-Myers Squibb Company

<120> 用于生产二肽基肽酶 IV 抑制剂和它的中间体的方法和化合物

<130> LA0084 PCT

<140> PCT/03/38558

<141> 2003-12-04

<150> US 60/431,814

<151> 2002-12-09

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 1

tcgtcatgaa aatcggtctc gttttg

26

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

<400> 2

tactgttttt ccagcgatt cctaggt

28

<210> 3

<211> 33

[0002]

<212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <400> 3
 gatgctcata tgcgcgacgt gtttgaaatg atg 33

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成的寡核苷酸

 <400> 4
 gatcccgge taaggagaat taataattcg 30

<210> 5
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 中间型高温放线菌

 <400> 5
 aacagcga gaggtaa 18

<210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 中间型高温放线菌

 <400> 6

Asn Ser Ala Arg Arg
 1 5

<210> 7
 <211> 54

[0003]

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 修饰的中间型高温放线菌苯丙氨酸脱氢酶

<400> 7

aacagcgcgg aggggtacct cgagccgcgg cggccgcgaa ttaattcgcc ttag

54

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 修饰的中间型高温放线菌苯丙氨酸脱氢酶

<400> 8

Asn Ser Ala Glu Gly Tyr Leu Glu Pro Arg Arg Pro Arg Ile Asn Ser

1

5

10

15

Pro