

200914419

(此處由本局於收
文時黏貼條碼)

附件 2

842597-1

發明專利分割說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：

97142662

C07D 209/52 (2006.01)

※申請日期：92 年 12 月 09 日

※IPC 分類：

C07D 207/18 (2006.01)

原申請案號：92134725

專利證書號碼：

一、發明名稱：

(中) 用以製造二肽基肽酶 I V 抑制劑之方法與化合物及其中間體

(英) Methods and compounds for producing dipeptidyl peptidase IV inhibitors and intermediates thereof

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓 名：(中) 必治妥施貴寶公司

(英) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

代表人：(中) 1. 史蒂芬 戴維斯

(英) 1. DAVIS, STEPHEN B.

地 址：(中) 美國新澤西州·普林斯頓·勞倫斯維勒／普林斯頓路

(英) Lawrenceville-Princeton Road, Princeton, NJ 08543-4000,
U.S.A.

國籍：(中英) 美國 U.S.A.

三、發明人：(共 15 人)

1. 姓 名：(中) 楚西 福

(英) VU, TRUC CHI

國 籍：(中) 美國

(英) U.S.A.

2. 姓 名：(中) 大衛 布雷佐斯基

(英) BRZOWSKI, DAVID

國 籍：(中) 美國

(英) U.S.A.

3. 姓 名：(中) 利塔 福克斯

(英) FOX, RITA T.

國 籍：(中) 美國

(英) U.S.A.

4.姓 名：(中) 喬里 小賈德福瑞
(英) GODFREY, JR., JOLLIE D.
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

5.姓 名：(中) 羅諾德 哈森
(英) HANSON, RONALD L.
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

6.姓 名：(中) 瑟吉 克勞塔欽
(英) KOLOTUCHIN, SERGEI V.
國 籍：(中) 俄羅斯
(英) RUSSIA

7.姓 名：(中) 約翰 小梅祿諾
(英) MAZZULLO, JR., JOHN A.
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

8.姓 名：(中) 雷姆希 佩脫爾
(英) PATEL, RAMESH N.
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

9.姓 名：(中) 王建基
(英) WANG, JIANJI
國 籍：(中) 大陸地區
(英) CHINA

10.姓 名：(中) 王國容
(英) WONG, KWOK
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

11.姓 名：(中) 俞菊榮
(英) YU, JURONG
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

12.姓 名：(中) 朱景生
(英) ZHU, JASON
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

13.姓 名：(中) 大衛 麥格林

國 籍：(英) MAGNIN, DAVID R.
(中) 美國
(英) U.S.A.

14. 姓 名：(中) 大衛 歐格瑞
(英) AUGERI, DAVID J.
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

15. 姓 名：(中) 羅倫斯 哈門
(英) HAMANN, LAWRENCE G.
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 ; 2002/12/09 ; 60/431,814 ☒ 有主張優先權

國 籍：(英) MAGNIN, DAVID R.
(中) 美國
(英) U.S.A.

14. 姓 名：(中) 大衛 歐格瑞
(英) AUGERI, DAVID J.
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

15. 姓 名：(中) 羅倫斯 哈門
(英) HAMANN, LAWRENCE G.
國 籍：(中) 美國
(英) U.S.A.

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 美國 ; 2002/12/09 ; 60/431,814 ☒ 有主張優先權

九、發明說明

本申請案申稱美國暫時申請案 60/431,814(申請日期 2002 年 12 月 9 日)之優先權，該申請案全文在此併入參考文獻。

【發明所屬之技術領域】

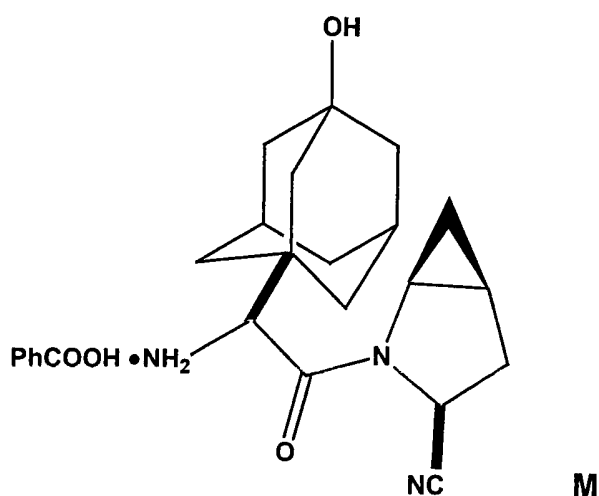
本發明提供用於製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的二肽基肽酶 IV 抑制劑之方法與化合物。亦提供用以非對稱式還原胺化中間化合物(S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸之方法，該中間化合物係用於製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的二肽基肽酶 IV 抑制劑。亦提供用以製造彼之其它中間化合物以及方法。本發明化合物以及方法製作之二肽基肽酶 IV 抑制劑是用於治療糖尿病以及其併發症、高血糖症、X 症候群、高血胰島素症、肥胖、以及粥樣硬化以及相關的疾病、以及免疫性調節疾病以及慢性的炎性腸病。

【先前技術】

二肽基肽酶 IV 是膜結合的非典型絲胺酸胺基肽酶，其係位於各種組織，包括(但非限於)：小腸、肝、肺、及腎。此酵素亦位於循環的 T-淋巴細胞，稱為 CD-26。二肽基肽酶 IV 負責在活體內代謝切割內在的肽類 GLP-1(7-36)及胰高血糖素，及在體外有對抗其它肽類例如：GHRH、NPY、GLP-2 及 VIP 之蛋白質水解活性。

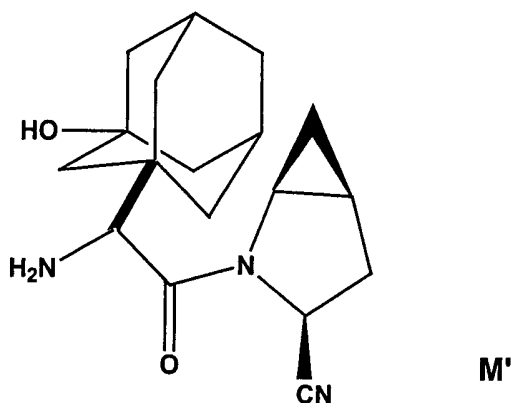
GLP-1(7-36)是具有 29 個胺基酸之肽，源自前升糖素在小腸中之後-轉譯的加工。此肽在活體內有多種作用。例如，GLP-1(7-36)刺激胰島素分泌以及抑制升糖素分泌。此肽可促進飽足感以及減緩胃部之排空。經由持續靜脈點滴外生性投用 GLP-1(7-36)經過已展示可有效治療糖尿病的病患。然而此外生性肽因為降解太快速而不適用於持續的治療。

已發展出二肽基肽酶 IV 抑制劑加強 GLP-1(7-36)內在的含量。美國專利第 6,395,767 號揭示以環丙基稠合吡咯啉為主結構的二肽基肽酶 IV 抑制劑。化學合成此類抑制劑之方法已揭示於美國專利第 6,395,767 號以及相關的文獻。例如參閱 Sagnard et al. *Tet-Lett.* 1995 36:3148-3152; Tverezovsky et al. *Tetrahedron* 1997 53:14773-14792; 以及 Hanessian et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998 8:2123-2128。較佳的抑制劑已揭示於美國專利第 6,395,767 號



為自由鹼、(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基-三環

[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-腈(M')。



自由鹼 M'

用以製備用於製造二肽基肽酶 IV 抑制劑中間體之方法已揭示於 EP 0 808 824 A2。亦可參閱 Imashiro and Kuroda Tetrahedron Letters 200142:1313-1315, Reetz et al. Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18:72, Reetz 以及 Heimbach Chem. Ber. 1983 116:3702-3707, Reetz et al. Chem. Ber. 1983 116:3708-3724。

【發明內容】

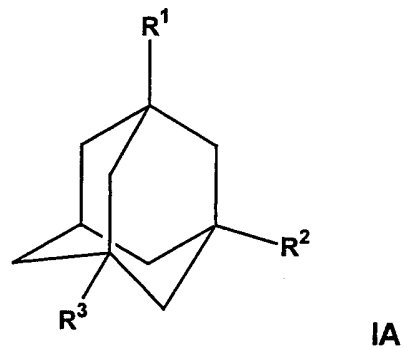
本發明提供用於製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的二肽基肽酶 IV 抑制劑之新方法與化合物。

本發明概要

本發明之目標是提供製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的二肽基肽酶 IV 抑制劑之適用的中間體化合物。

具體實施例之一中，本發明中間體包含式 IA 化合物

:



其中

R^1 係選自：H 以及 OH；

R^2 係選自： $-C(=O)-COR^4$ 、 $-C(=O)NR^5R^6$ 、 $-C(X)_nCOR^4$ 以及 $-C-NR^7R^8COR^4$ ，

其中

X 為鹵素；

N 為 1-2

R^4 係選自：O-烷基、 NH_2 以及 OH；以及

R^5 、 R^6 、 R^7 以及 R^8 係各自選自：H 以及 $COOR^9$

，其中 R^9 為經取代的或未經取代的烷基；以及

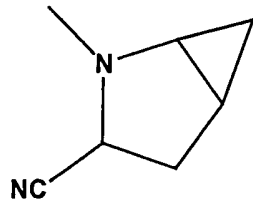
及

R^3 係選自：H、OH 以及 R^{10} ，其中 R^{10} 是

$NHR^{11}C(=O)R^{12}$ ，

R^{11} 是 $R^{13}COOH$ ，

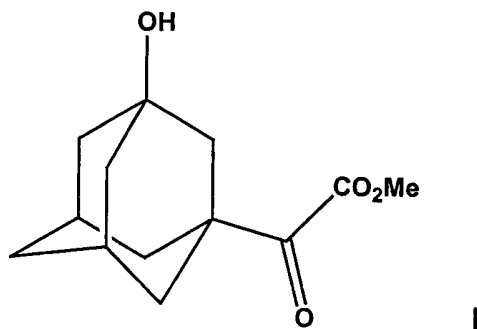
R^{12} 為



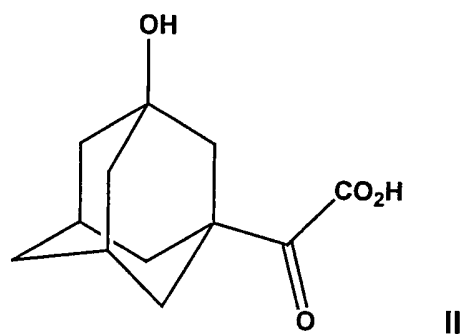
以及 R^{13} 是烷基或芳基。

適於作為中間體製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的二肽基肽酶 IV 抑制劑之本發明之化合物式 IA 的較佳範例包括：

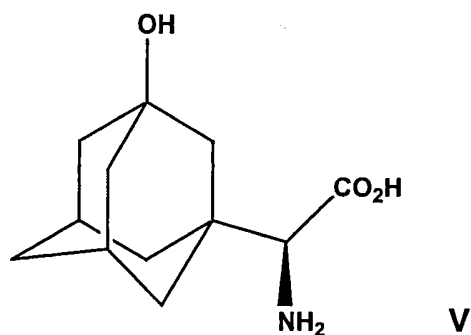
3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸甲酯，如式 I，



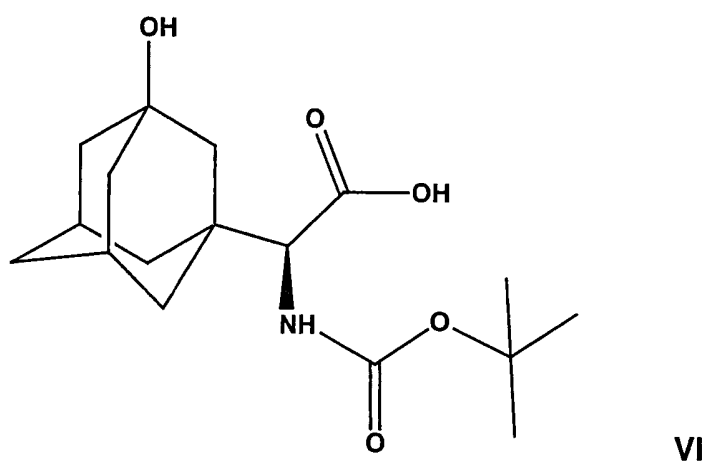
3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，如式 II



(*<aS*)-*<a*-胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，
如式 V，

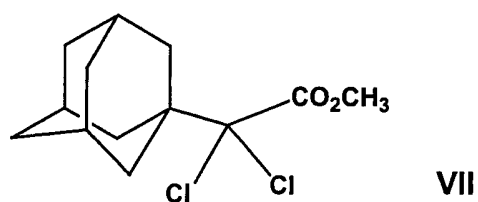


(*<aS*)-*<a*[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環
[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，如式 VI，

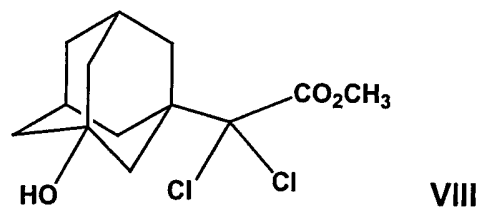


(或其 DABCO 鹽 VIA)，

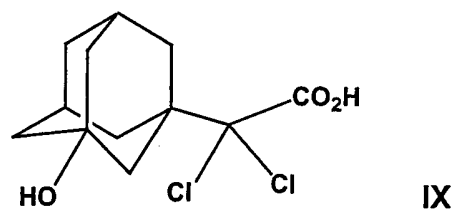
金剛烷-1-基-二氯-乙酸甲酯，如式 VII，



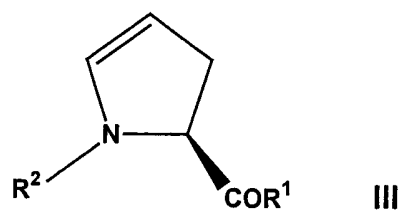
二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸甲酯，如式 VIII，以
及



二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基-乙酸，如式 IX



另一具體實施例中，本發明中間體包含 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)，5-乙酯化合物，如式 III，

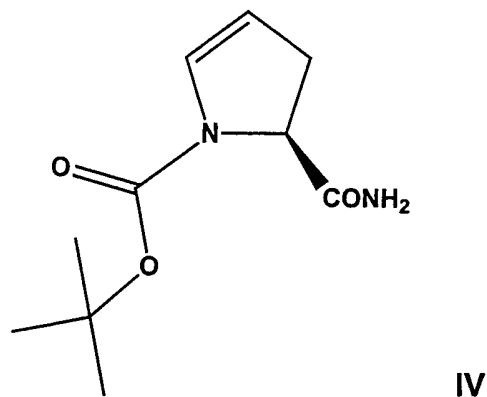


其中

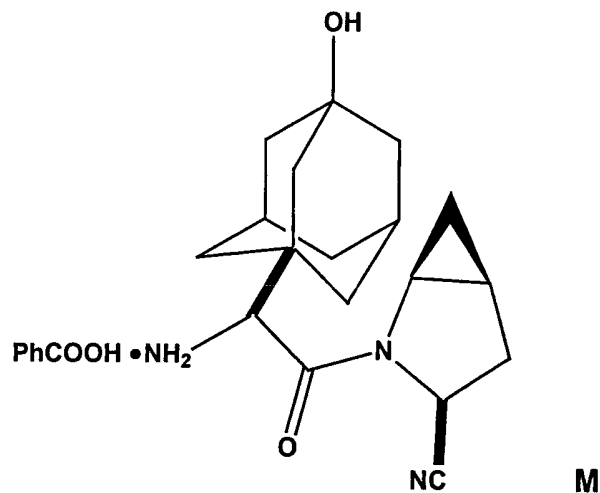
R^1 係選自：O-烷基、 NH_2 以及 OH，和

R^2 係選自：T-BOC 以及 CBz；

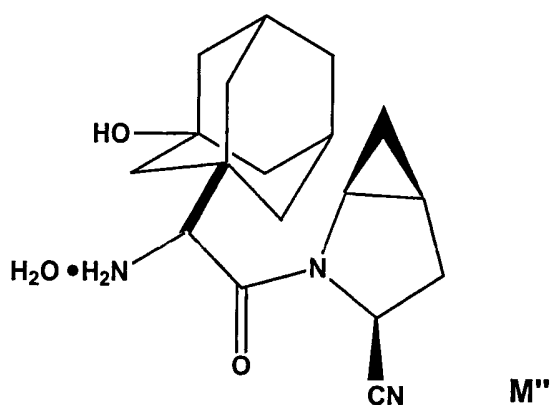
和 (5S)-5-胺羧基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯，如式 IV，



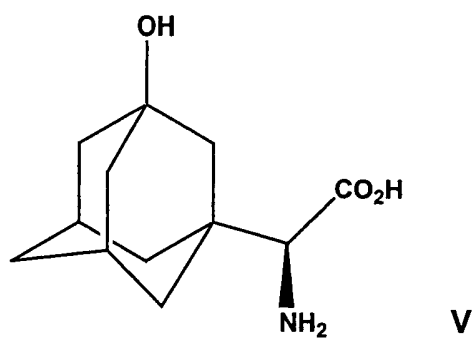
較佳的具體實施例中，製造二肽基肽酶 IV 抑制劑 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-腈，苯甲酸鹽 (1:1)之中間體，如式 M



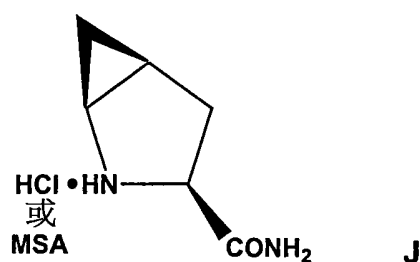
或其自由鹽基 M'(設定如上)，以及其單水合物 M''



本發明之另一目標是提供製造以環丙基稠合吡咯啉爲主結構的二肽基肽酶 IV 抑制劑之方法。較佳的具體實施例中，抑制劑爲 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環 [3.1.0]己烷-3-腈，苯甲酸鹽 (1:1) 以及它對應的自由鹽基，分別地如式 M 以及 M'。最後係將二段 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，如式 V



以及 (1S,3S,5S)-2-吡雙環 [3.1.0]己烷-3-羧醯胺酸式鹽，例如氯化氫鹽或甲磺酸鹽 (甲磺醯基或 MSA 鹽)，如式 J，偶合而形成此抑制劑。



揭示在此用於製造以及偶合此類片段的各種不同方法，係取決於選擇的起始材中間化合物。例如本發明具體實施例之一中，提供從 3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，如式 II，製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的抑制劑之方法。本發明另一具體實施例之一中，提供從 (α S)- α -胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，如式 V，製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的抑制劑之方法。本發明另一具體實施例之一中，提供從 (α S)- α [(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，如式 VI，製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的抑制劑之方法。本發明尚有之另一具體實施例中，提供從 (5S)-5-胺羰基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯，如式 IV，製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的抑制劑之方法。

本發明之另一目標是提供製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的二肽基肽酶 IV 抑制劑之適用的中間體化合物之合成方法。本發明具體實施例之一中，提供之方法可將 3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)非對稱式還原胺化或胺基轉移成為 (α S)- α -胺基-3-羥基三環

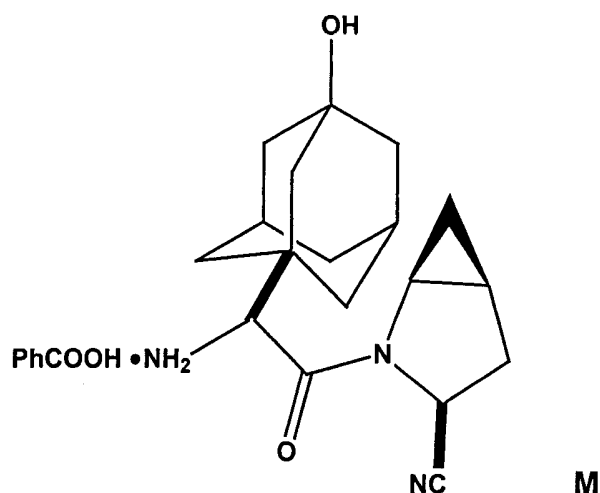
[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)。本發明另一具體實施例中，提供從三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 N)化學合成(<aS)-<a-胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)之方法。本發明另一具體實施例中，提供從金剛烷-1-基-二氯-乙酸甲酯(式 VII)、二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸甲酯(式 VIII)、以及二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸(式 IX)用以製造 3-羥基-<a-酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)之方法。亦提供用以製造金剛烷-1-基-二氯-乙酸甲酯(式 VII)、二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸甲酯(式 VIII)、以及二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸(式 IX)之方法。本發明另一具體實施例中，提供用以從 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸、1-(1,1-二甲基乙基)-5-乙基酯(式 III)製造(5S)-5-胺羧基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯(式 IV)之方法。此具體實施例中，(5S)-5-胺羧基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯(式 IV)其後可作為中間物，以製造[1S-(1<a,3<b,5<a)-3-胺羧基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸，1,1-二甲基乙基酯(式 H)。

本發明另一目標是提供能經由非對稱式還原胺化或胺基轉移 3-羥基-<a-酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)製造(<aS)-<a-胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)之細胞株。較佳的具體實施例中，此細胞株包含內含表現甲酸去氫酶和苯丙胺酸去氫酶質體之細胞。最佳之細胞株是 ATCC 寄存編號 PTA-4520 細胞株。

發明之詳細描述

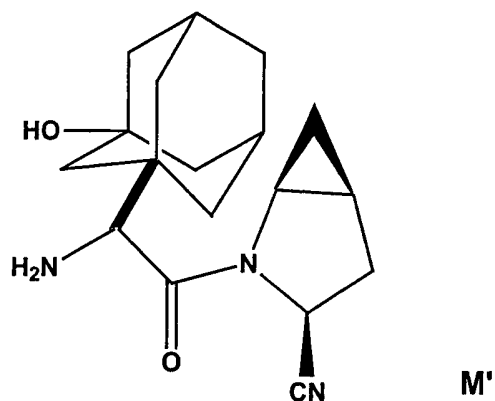
以環丙基稠合吡咯啉為主結構的化合物例如 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-腈，苯甲酸鹽 (1:1) 以及它對應的自由鹽基以及其單水合物是二肽基肽酶 IV 抑制劑，可用於治療糖尿病以及其併發症、高血糖症、X 症候群、高血胰島素症、肥胖、以及粥樣硬化以及相關的疾病、及免疫調節的疾病以及慢性的炎性腸病。本發明中，提供用以應用於製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的化合物，例如 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-腈，苯甲酸鹽 (1:1) 以及它對應的自由鹽基以及其單水合物之新化合物以及方法。

二肽基肽酶 IV 抑制劑 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-腈，苯甲酸鹽 (1:1) 描述於以下之式 M。

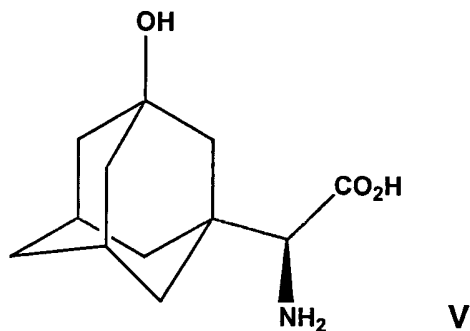


以及較佳之對應的自由鹽基式 M' 描述低下或其單水合物

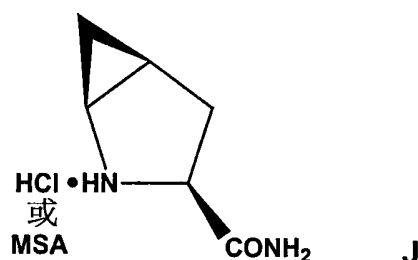
M"如前述。



本發明中，經由組合二個片段提供用以製造 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-腈(式 M')之方法。此類片段是 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，描述於式 V，



以及 (1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-羧醯胺酸式鹽例如 氯化氫鹽或 MSA 鹽，如式 J。



本發明亦提供用以製造此類片段之方法以及用於製造此類片段之中間化合物。

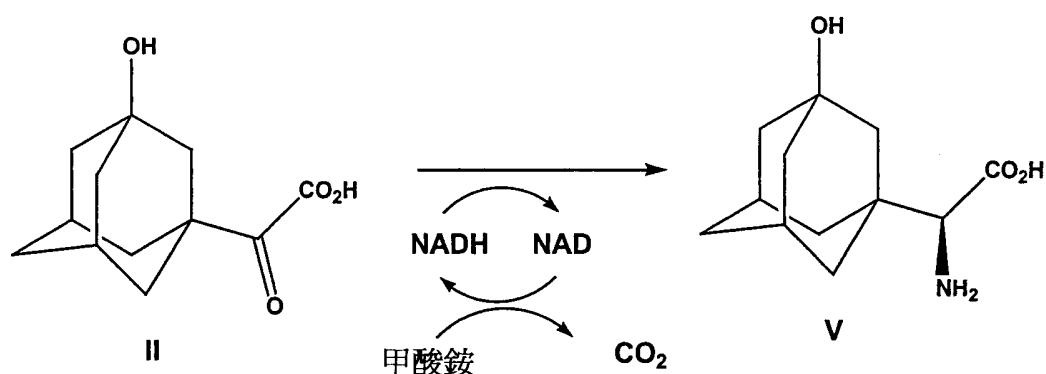
本發明特色之一中，提供能經由非對稱式還原胺化或胺基轉移 3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 I1)製造(α S)- α -胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)片段之方法。此方法的較佳具體實施例中，將 3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)使用苯丙胺酸去氫酶或酮基酸活化的其它胺基酸去氫酶進行酵素地還原胺化作用轉換成(α S)- α -胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)。本發明中使用的苯丙胺酸去氫酶範例包括(但非限於)：芽孢八疊球菌屬或熱放線菌屬例如中間高溫放線菌屬之苯丙胺酸去氫酶。較佳者，還原胺化作用是使用表現於大腸桿菌或巴斯德畢赤酵母的中間高溫放線菌屬 ATCC 33205 之苯丙胺酸去氫酶進行。構築以及生長表現中間高溫放線菌屬(ATCC 33205)苯丙胺酸去氫酶之大腸桿菌以及巴斯德畢赤酵母重組品系，已描述於 Hanson 等人(Enzyme and Microbial Technology 2000 26:348-358)。巴斯德畢赤酵母生長於甲醇亦可誘發甲酸去氫酶之製造(Hanson et al. Enzyme and Microbial Technology 2000

26:348-358)。

內含表現巴斯德畢赤酵母(ATCC 20864)甲酸去氫酶質體以及中間高溫放線菌屬(ATCC 33205)苯丙胺酸去氫酶基因經修飾之版本的大腸桿菌依據布達佩斯條約被存放於國際確認的培養物保藏單位(International Depository Authority)。於2002年6月25日儲放於10801 University Boulevard in Manassas, Virginia 20110-2209之美國模式培養物保藏所。ATCC寄存編號為PTA-4520。所有使用該細胞株之限制將隨本專利申請案之通過而解除。此儲存物將於儲存之日起維持於公共的儲藏所30年，或最後一次要求使用此樣本之後這五年，或此專利執行之期限(視三者之一中何者較久)。上述之參考細胞株在儲存時間是活的細胞株。若儲藏所不能分發活的樣品則將換個儲藏所保存。

還原胺化 3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)至(α S)- α -胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)將描述於下列之方案 I。

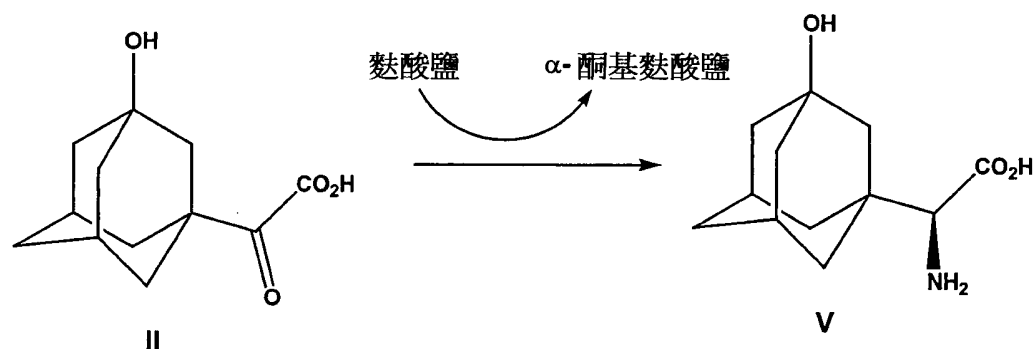
方案 I



如方案 I，此反應需要氨水以及還原的菸醯胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)。於反應期間產生之菸醯胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 經甲酸去氫酶氧化甲酸酯形成二氧化碳再生成 NADH。此反應中 (<aS)-<a-氨基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) 之預期產率為 80 至 100% 以及預期之過量鏡像異構物大於 99%。亦可參閱本文之實施例 1 至 10。

相同之轉化轉變亦可使用轉胺酶完成，如方案 II：

方案 II

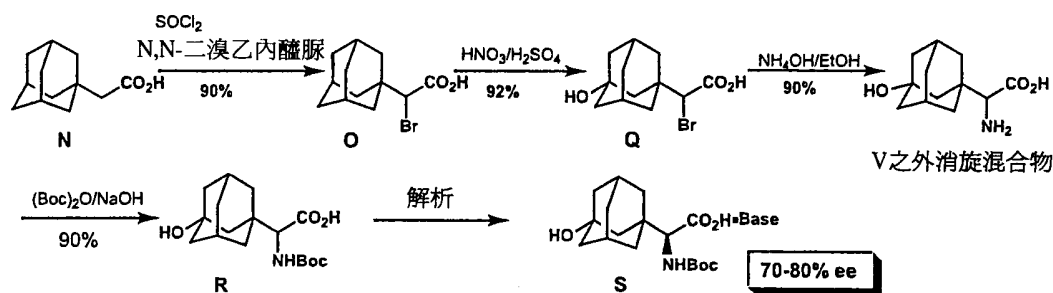


如方案 II，此酵素轉化的麩胺酸係作為氨基供體。應

用於這個轉化的範例轉胺酶是本文實施例 11 之支鏈轉胺酶。

另一具體實施例中，係化學合成 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)。化學合成 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)之範例方法描述於方案 III：

方案 III



如方案 III，三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 N)先經溴化成 α -溴三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 O)而自三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸以化學方法合成為 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)之外消旋混合物。此溴化反應中之起始材料三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 N)係懸浮於亞硫酰氯中。然後加入二甲基甲酰胺(DMF)，懸浮液在室溫下攪拌 1.5 小時。用氣相層析法証實反應已完成。然後逐份加入固體 N-溴琥珀酐(NBS)至反應混合物中以及將反應混合物加熱至 60℃。溫度維持在 60 至及 65℃ 之間，將此反應攪拌 3 小時。再一次，用氣相層析法証實反應已完成。然後加入庚烷至反應混合物中，在 78-80℃ 下蒸餾以去除過量的亞硫酰氯。加水以中止反應並再

添加庚烷。然後從有機層中分離水層，有機層用水清洗。清洗之後在庚烷層中再添加水，並蒸餾以去除庚烷。然後在殘留的水層中加入四氫呋喃(THF)，在室溫下將混合物激烈地攪拌數小時。可再添加水以加速水解。然後蒸餾去除 THF，留下兩相的(水及油)反應混合物。然後加入種子，待反應之溫度達到室溫，產生 α -溴三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 O)之沈重的固體。加入水及乙腈以保持懸浮液有攪拌力。攪拌數小時之後，濾除內含 α -溴三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 O)之固態以及用乙腈清洗數次。亦可參閱本文之實施例 17。

然後將 α -溴三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 O)H₂SO₄ 以及 HNO₃ 反應產生 α -溴-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 Q)。更明確的說，從 α -溴三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 O)製備 α -溴-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 Q)是先在 Erlen-Meyer 燒瓶中加入 H₂SO₄。然後在冰浴中冷卻燒瓶以及在燒瓶中加入 50% HNO₃。然後溫度保持在 28℃ 下，在混合物中份化的加入 α -溴三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 O)固體。然後將反應攪拌加熱至 60℃ 直到得到澄清溶液為止。當反應完全後冷卻至室溫並在室溫下維持。然後加入水終止反應。產生的泥漿於冰浴中冷卻，然後過濾取得 α -溴-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 Q)。亦可參閱本文之實施例 18。

然後將 α -溴-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 Q)溶於氫氧化銨，較佳者，30%氫氧化銨以及將反應混合物

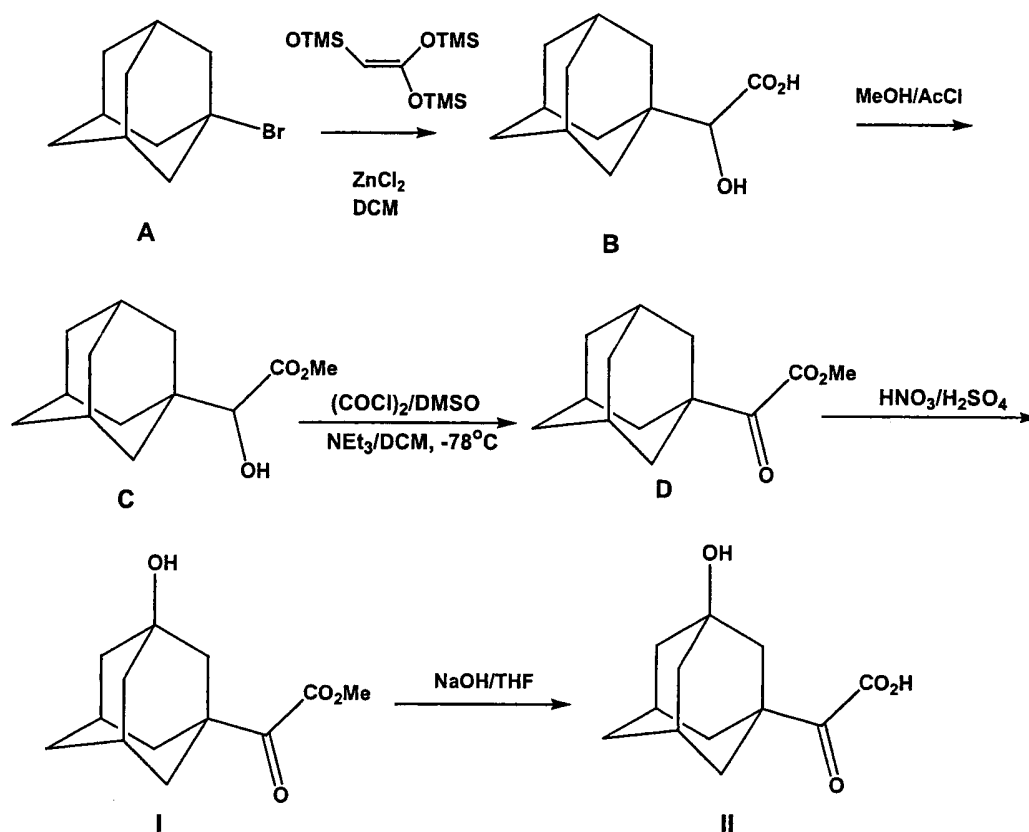
加熱(較佳者)至 65°C。然後濃縮反應混合物至固體。然後加入 EtOH，再一次濃縮反應至產生包含 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)之外消旋混合物。亦可參閱本文之實施例 19。

從外消旋混合物純化 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V 之外消旋混合物)，混合物使用 Boc 酸酐以及氫氧化鈉之四氫呋喃處理進行典型的 Boc 保護作用產生 α-[[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-]3]羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(化合物 R)。然後將 α-[[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-]3]羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(化合物 R)與對掌性的鹼例如 [1R,2S]-(-)-1,2-二苯基羥基乙胺、1,7,7-三甲基雙環 [2.2.1]庚烷-2-胺、或 S-(-)-1-1(1-萘基)乙胺混合，並將混合物揮發乾燥。將乾燥的混合物再懸浮於溶劑以及將再懸浮的混合物置於混合器加熱數個小時。冷卻至室溫，發生 (aS)-α-[[[(二甲基乙氧基)羰基]胺基]-]3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(化合物 S)結晶。亦可參閱本文之實施例 20。

去除 Boc 基團產生 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)。

本發明之另一特色係關於製造用於這合成 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)片段之中間化合物 3-羥基-<a-酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)的方法。中間化合物 3-羥基-<a-酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)可依據描述於方案 IV 之方法製作。

方案 IV

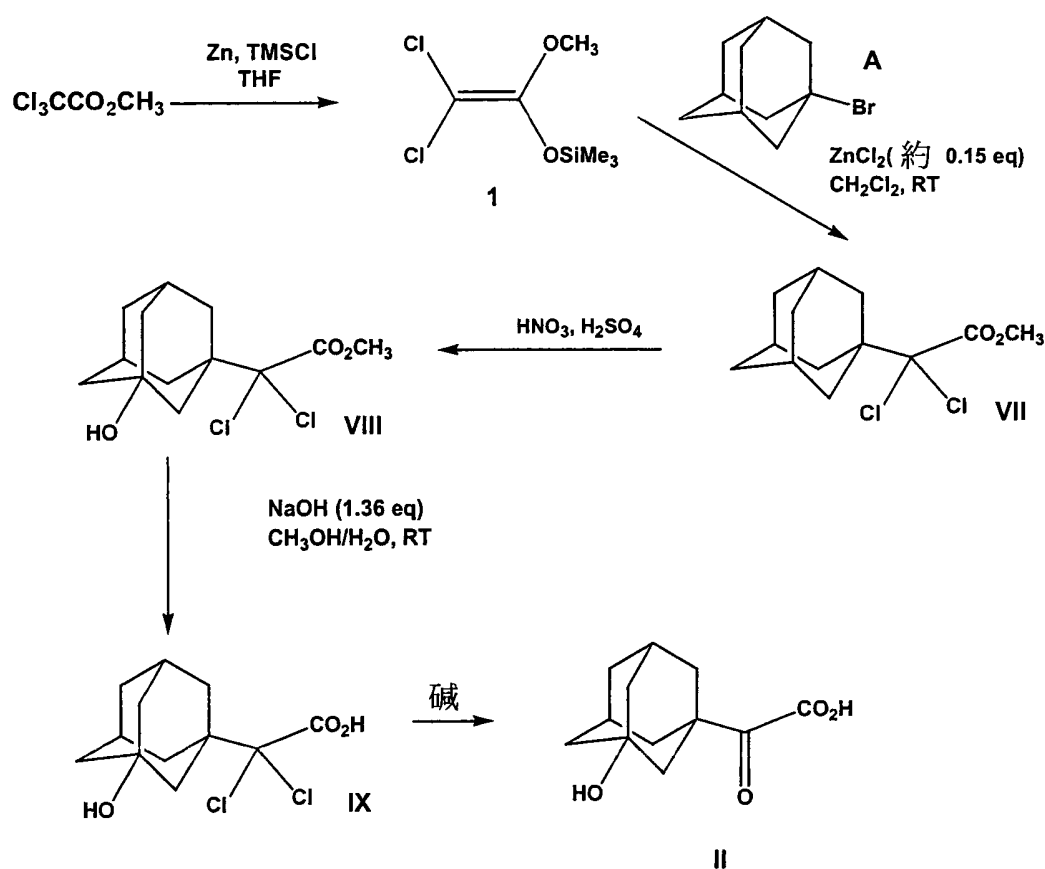


如方案 IV，此方法中金剛烷基溴化物(式 A)經由氯化鋅催化烷基化產生 α -羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 B)。然後 α -羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 B)使用乙酰氯之甲醇酯化產生 α -羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸甲基酯(式 C)。然後將 α -羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸甲基酯(式 C)經 Swern 氧化反應轉換成 α -酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸甲基酯(式 D)。然後將 α -酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸甲基酯(式 D)羥基化以形成 3-羥基- α -酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸甲基酯(式 T)，然後水解形成 3-羥基- α -酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)

。亦可參閱本文之實施例 21 至 25。

此外，中間化合物 3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)可依據描述於方案 V 之方法製作。

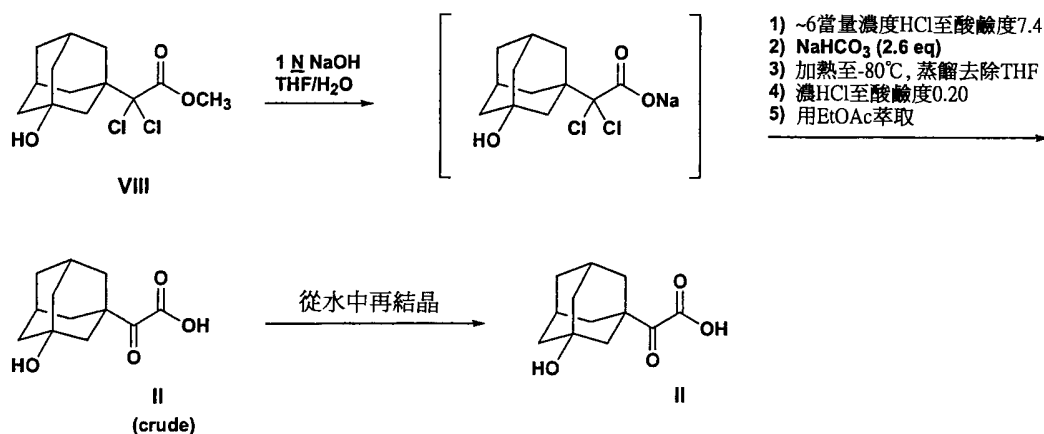
方案 V



如方案 V，(2,2-二氯-1-甲氧基-乙烯基氧基)-三甲基矽烷 1 係製備自稍微修飾之 Kuroda 等人之方法 (EP 08 08 824A3 ; Imashiro and Kuroda Tetrahedron Letters 200142:1313-1315)。1 在氯化鋅的作用之下用溴金剛烷處理 (Reetz 等人之 Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18:72, Reetz and Heimbach Chem. Ber. 1983 116:3702-3707, Reetz 等人之 Chem. Ber. 1983 116:3708-3724) 產生金剛烷-1-基-二

氯-乙酸甲基酯式 VII。然後式 VII 之金剛烷-1-基-二氯-乙酸甲基酯用一氧化氮之濃硫酸羥基化定量的產生二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸甲基酯式 VIII。式 VIII 用氫氧化鈉之甲醇水溶液在室溫下水解產生二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸式 IX。接著將二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸(式 IX)用弱鹼(較佳者碳酸氫鈉)在升高的溫度下處理導致只產生中間化合物 3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)。亦可參閱本文之實施例 26 至 29。

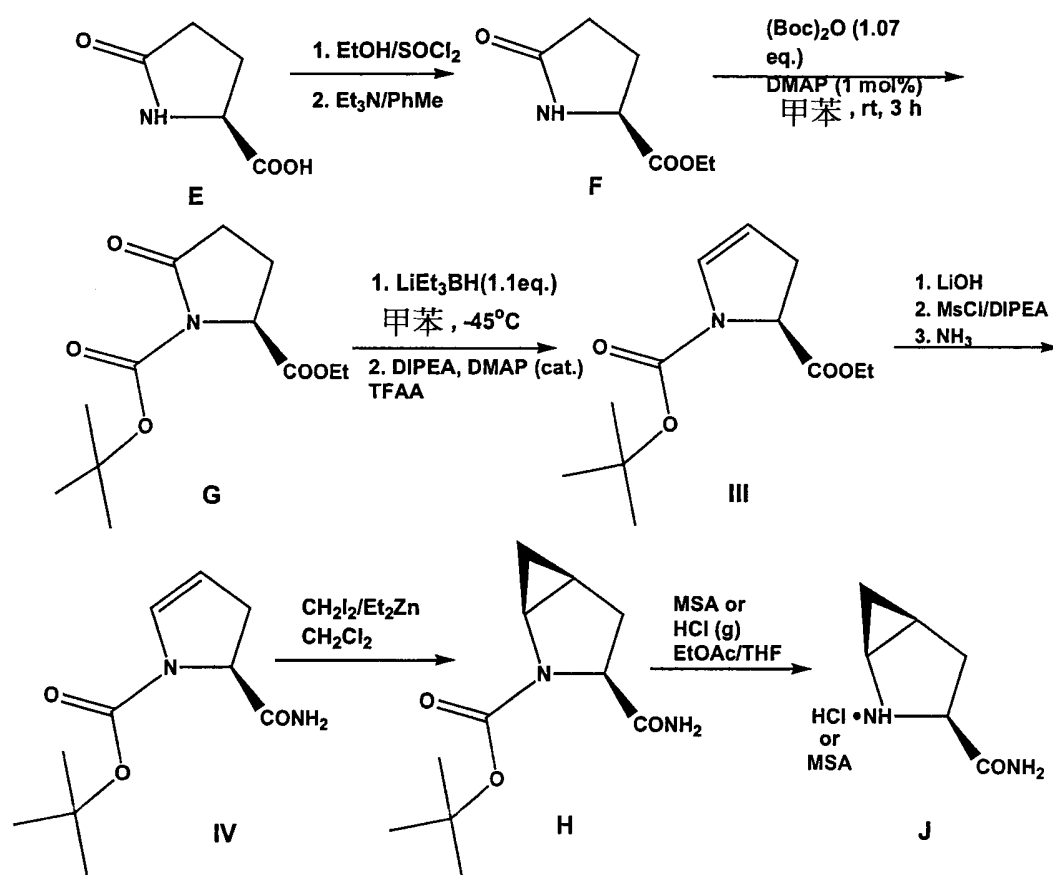
方案 VA



如方案 VA，中間化合物 3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)可用一鍋式製程製備。式 VIII 化合物和氫氧化鈉水溶液於四氫呋喃(或其它鹼例如氫氧化鉀或氫氧化鋰)、惰性環境，例如氬處理下可產生對應的鈉鹽。不必回收鈉鹽，內含鈉鹽之反應混合物用酸例如鹽酸(酸鹼度少於約 0.50 較佳者約 0.20)處理可以形成對應的酮酸 II，其可用水再結晶以形成酮酸 II 結晶。

本發明另一個特色係關於用以製造片段 (1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-羧醯胺(式 J)之方法。此種用於製造 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-腈之片段可依據描述如下之方案 VI 方法製作。

方案 VI



如方案 VI，先酯化 L-焦麩胺酸(式 E)產生 L-焦麩胺酸乙基酯(式 F；SQ 7539)。然後將 L-焦麩胺酸乙基酯在氮上用 BOC 保護產生 (5S)-2-酮基吡咯啉-1,5-二羧酸 1-(1,1-二甲基乙基),5-乙基酯(式 G)。然後進行超氫化物之

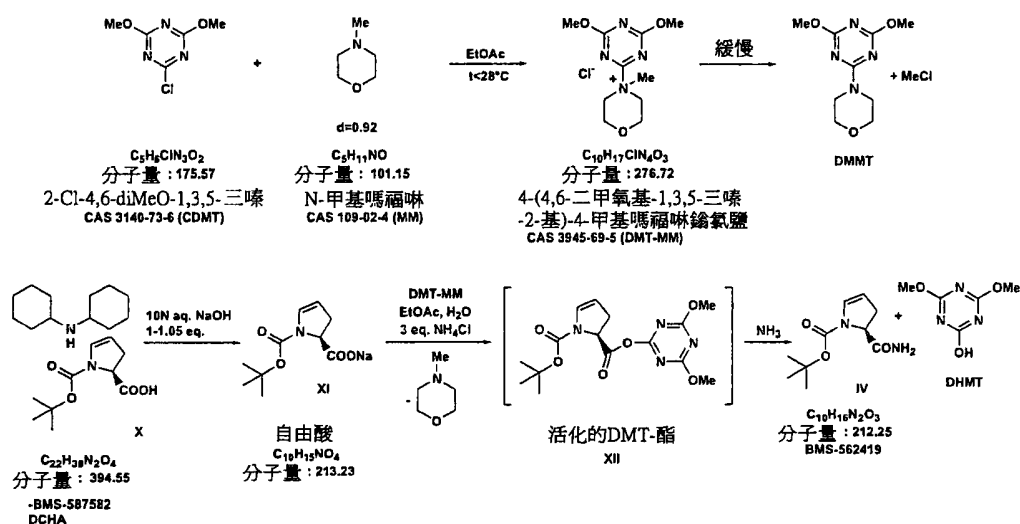
還原以及除去反應以形成 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)-5-乙基酯(式 III)。然後將 BOC-DHPEE III 用氫氧化鋰處理經皂化作用水解以形成 BOC-DHP。然後將 BOC-DHP 經由混合的酸酐形成醯胺，其係依序使用甲磺醯基氯化物、氨水產生(5S)-5-胺羧基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯(式 IV)。然後將(5S)-5-胺羧基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯(式 IV)經由 Simmons-Smith 反應環丙烷化而製成[1S-(1<a,3<b,5<a)-3-胺羧基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸 1,1-二甲基乙基酯(式 H)。然後移除 BOC，以形成(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-羧醯胺片段(式 J)之酸式鹽，例如氯化氫鹽或甲磺酸鹽。亦可參閱本文之實施例 29 至 35。

本發明的另一個特色亦描述於方案 VI，其係關於將(5S)-5-胺羧基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯(式 IV)經由 Simmons-Smith 反應環丙烷化轉型至[1S-(1<a,3<b,5<a)-3-胺羧基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸，1,1-二甲基乙基酯(式 H)。此反應係將(5S)-5-胺羧基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯溶於內含二氯甲烷之第一反應器。在第二反應器中，將二氯甲烷冷卻至 -30℃，並添加二甲氧基乙烷和 30%二乙基鋅於甲苯溶液、再添加二碘甲烷。然後將混合物加入第一反應器中，接著添加飽和重碳酸鹽溶液。攪拌所產生的反應混合物直到形成沉澱。然後過濾沉澱物，清洗以及再懸浮於二氯甲烷兩次或多次。然後分離濾液之水相及有機相，有機相

用半飽和之鹽水清洗。移除溶劑並經庚烷交換而取得 [1S-(1<a,3<b,5<a)]-3-胺羰基)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸，1,1-二甲基乙基酯(式 H)粗產物之庚烷泥漿。

此外，(5S)-5-胺羰基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯(式 IV)可經由方案 VIA 製備。

方案 VIA



如方案 VIA 所示，4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯 X 之 DCHA 鹽係用鹼金屬鹽基，例如氫氧化鈉處理以形成對應的鹽，例如鈉鹽。

4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯 XI 鈉鹽亦可以對應的乙基酯經乙基酯(較佳者，乙基酯之甲苯溶液)和乙醇及氫氧化鈉處理而製備。

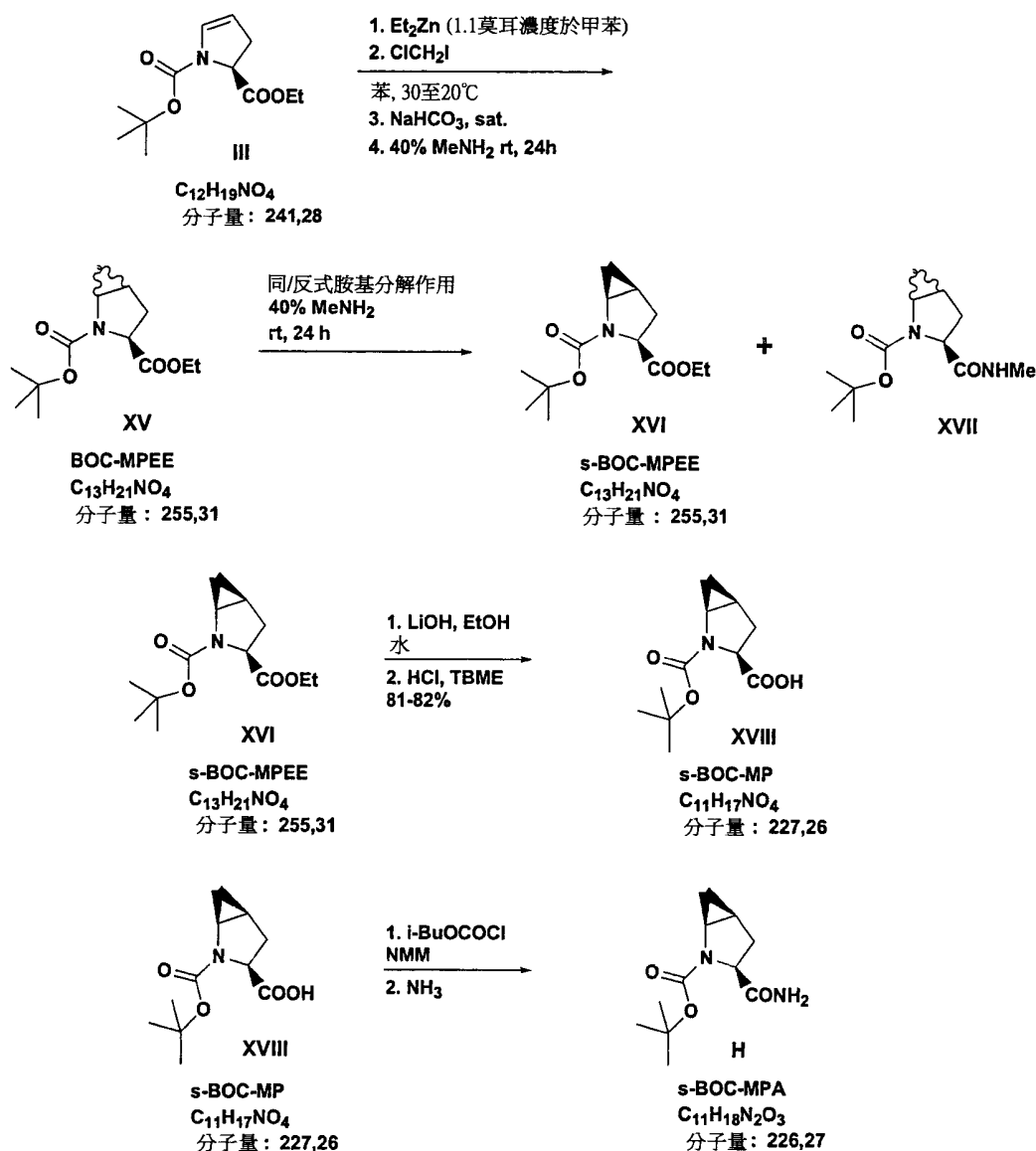
鈉鹽 XI 溶液用緩衝劑，例如氯化銨和磷酸二氫鈉處理以降低溶液酸鹼度至低於 7，較佳者約 6 至 6.5，並將此鈉鹽緩衝溶液用 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基嗎福啉鎘氯鹽(DMT-MM)處理以形成活化的 DMT-酯 XII

，彼用氨水或其它鹽基例如硫酸銨、氯化銨或氫氧化銨處理以形成(5S)-5-胺羰基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯 IV。

4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基-嗎福啉鎘氫鹽(DTM-MM)之製備如方案 VIA，其係在較低溫度約 0 至約 10°C 下使 2-Cl-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪(CDMT)以及 N-甲基嗎福啉反應以形成 DMM-MM。

4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯 X 之 DCHA 鹽可製備自對應的鈉鹽 XI，其係將先前製備的 DCHA 鹽 X 水溶液用甲基第三丁基醚(MTBE)處理，使用酸例如 H_3PO_4 調整反應混合物之酸鹼度至 2.5-3。分離有機層並用濃鹽水處理以形成對應的鈉鹽 XI。冷卻產生的反應混合物以及用 DCHA 處理以形成對應的 DCHA 鹽 X。

方案 VIB



將 N-BOC 4,5-去氫脯胺酸乙基酯 III 經過環丙烷化亦可製備成方案 VI 之化合物 H，如方案 VIB。

N-BOC 4,5-去氫脯胺酸乙基酯 III 用二乙基鋅以及氯碘甲烷在乾燥有機溶劑例如甲苯、二氯甲烷或二氯乙烷存在下、較低溫度介於約 -30 至約 0°C 下處理以形成 N-BOC 4,5-甲橋脯胺酸乙基酯 XV。

將所產生的 BOC 4,5-甲橋脯胺酸乙基酯 XV(同-以及

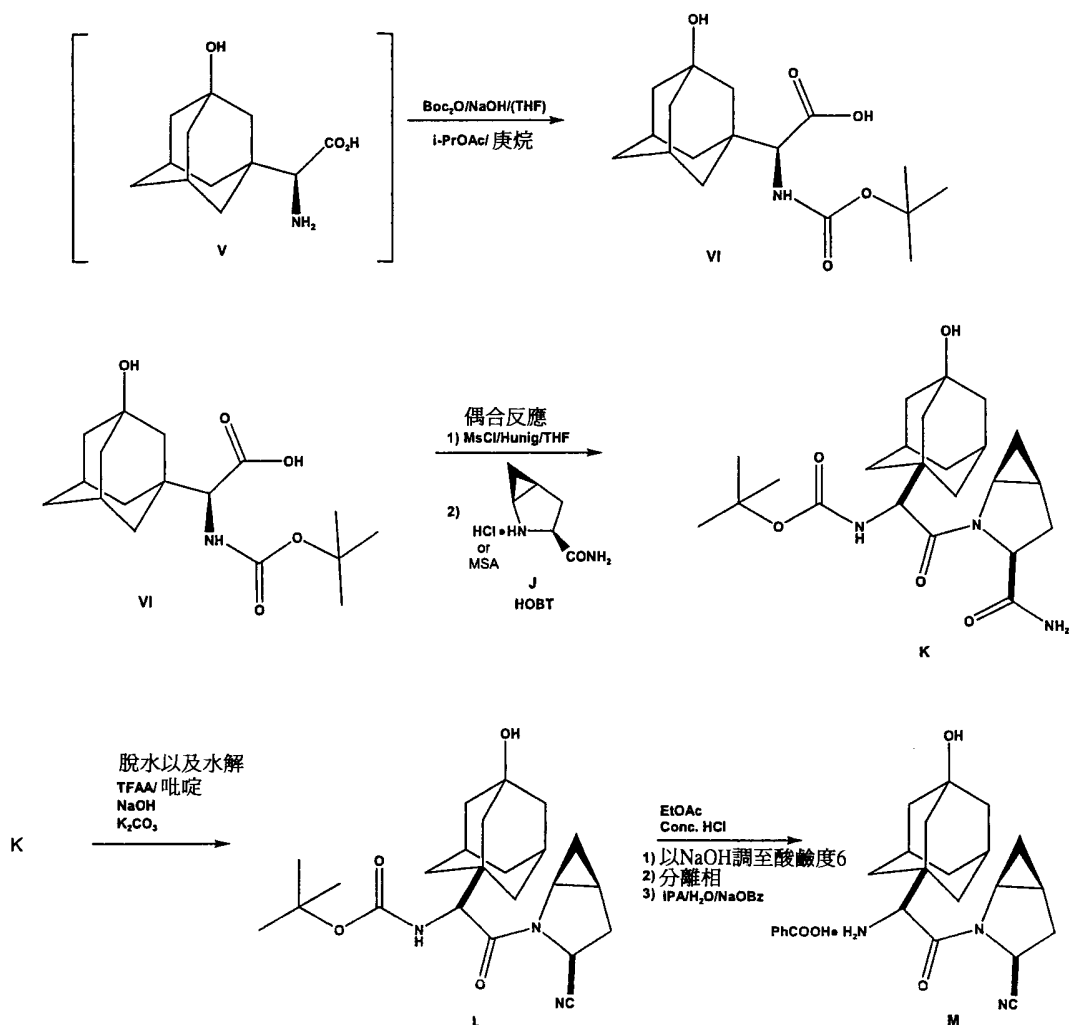
反-同分異構混合物(8:1))用甲基胺水溶液、在惰性環境例如氮氣下分離並回收 *syn*(S)-BOC-4,5-甲烷脯胺酸乙基酯 XVI(分離自 XVII)。

在乙醇或其它有機溶劑例如甲苯或 THF 中之 *s*-BOC-4,5-甲橋脯胺酸乙基酯 XVI 係用鹼例如氫氧化鋰、氫氧化鈉或氫氧化鉀水溶液處理以形成對應的 *s*-BOC-甲橋脯胺酸自由酸 XVIII。

此自由酸 XVIII 溶於有機溶劑例如 THF 或二氯甲烷；異丁基氯甲酸酯或甲磺醯基氯，在 *N*-甲基嗎福啉存在下、較低溫度例如不超過約 -8℃ 下，轉換成對應的 *s*-BOC-甲橋脯胺酸醯胺，然後反應混合物用氨水處理以形成 *s*-BOC-甲橋脯胺酸醯胺 H。

本發明另一個特色係關於將片段 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) 以及 (1S,3S,5S)-2-吡雙環 [3.1.0] 己烷-3-羧醯胺 (式 J) 偶合而製成 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環 [3.1.0] 己烷-3-腈苯甲酸鹽 (1:1) 之方法。此類片段之偶合方法描述於以下方案 VII。

方案 VII



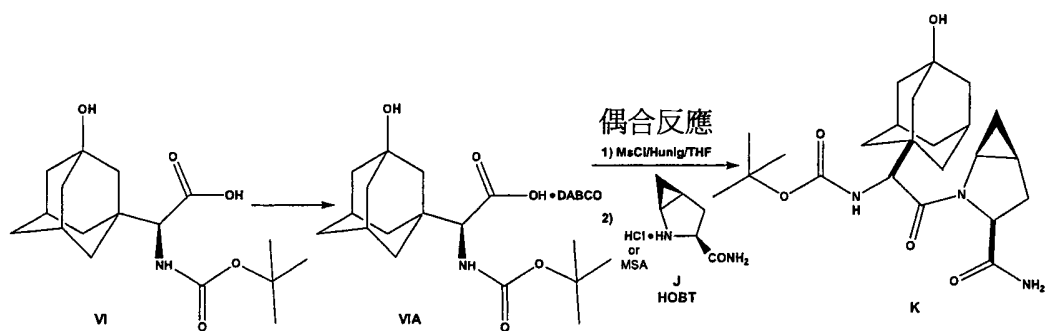
如方案 VII，此片段 (<aS)-<a- 胺基 -3- 羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 V) 先經 BOC 保護 (V 和 BOC_2O 在鹼，例如氫氧化鈉存在下處理並經由乙酸乙酯 (EtOAc) 萃取和分離分開自由酸 VI) 而產生 (<aS)-<a[[(1,1-二甲基乙氧基) 羰基] 胺基]-3- 羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷 -1- 乙酸 (式 VI)。此外，可使用乙酸異丙酯 / 庚烷代替乙酸乙酯結晶去除自由酸 VI。另一個具體實施例中，則直接使用一種經分離的 PDH/FDH 酵素濃縮物之生物轉化反應產物，式 V 化合物 (如實施例 8A) 而無須分離。

將式 VI 化合物的適當有機溶劑，例如四氫呋喃溶液 (THF)(冷卻至溫度介於約 -10 至約 0℃)用甲磺醯基氯(甲磺醯基 Cl)、以及 Hunig 鹼(二異丙基乙胺或 DIPEA)處理以形成對應的甲磺酸鹽 VI。

然後在 1-羥基苯並三唑(HOBT)或其它已知的偶聯劑存在下以偶合反應連接(<aS)-<a[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 VI)甲磺酸鹽與(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-羧醯胺(式 J)，產生3-(胺羰基)-<aS)-<a-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-<b-酮基-(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-乙烷胺基甲酸，1,1-二甲基乙基酯(式 K)。化合物 K 用有機鹼例如吡啶或三乙胺以及三氟乙酸酐脫水，然後將反應冷卻至約 0 至約 10℃再添加氫氧化鈉或其它強鹼，例如 KOH 或 LiOH 水解以形成化合物 L。

然後將 3-氰基-(<aS)-<a-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-<b-酮基-(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-乙烷胺基甲酸，1,1-二甲基乙基酯(式 L)去除保護基(用苯(甲)酸鈉處理)以形成二肽基肽酶 IV 抑制劑(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-腈，苯甲酸鹽(1:1)(式 M)。亦可參閱本文之實施例 37 至 39。

方案 VIIA

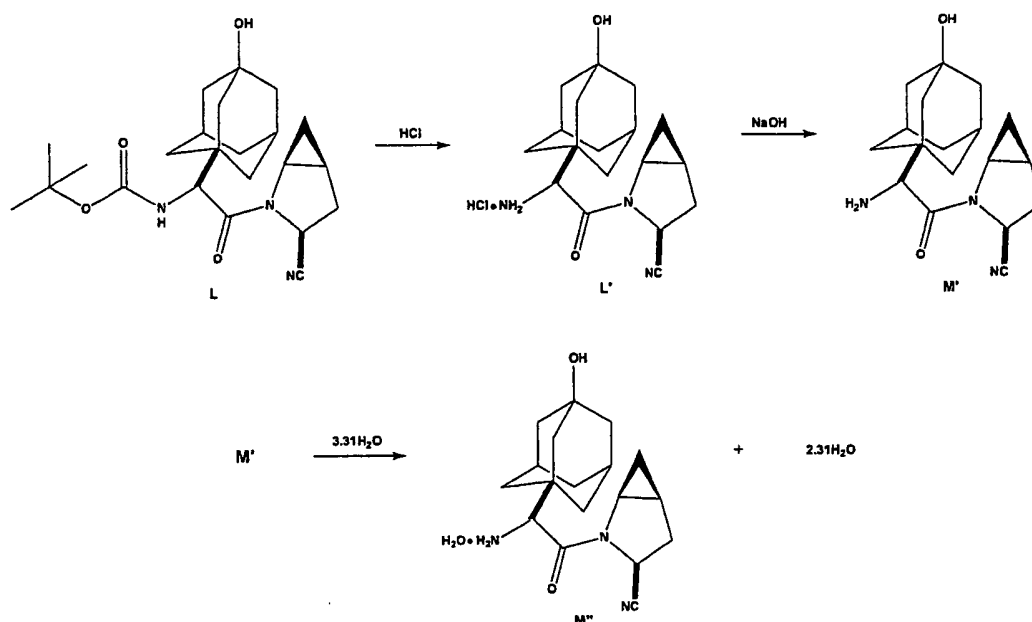


如方案 VIIA，亦可從化合物 VIA(DABCO 鹽)製備化合物 K。

式 VI 酸用 1,4-二吡雙環[2,2,2]辛烷(DABCO)處理以形成(<aS)-<a[[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羟基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，1,4-二吡雙環[2.2.2]辛烷鹽(式 VIA)。然後用偶合反應(描述於方案 VIIA)在 1-羟基苯並三唑(HOBT)或其它已知的偶聯劑存在下連接(<aS)-<a[[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羟基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，1,4-二吡雙環[2.2.2]辛烷鹽(式 VIA)與(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-羧酰胺 HCl 或 MSA 鹽(式 J)產生 3-(胺羰基)-<aS)-<a-(3-羟基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-<b-酮基-(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-乙烷胺基甲酸，1,1-二甲基乙基酯(式 K)。

方案 VII 中，化合物 L 可用強酸例如鹽酸去除保護基，如描述於方案 VIIB。

方案 VIIB



方案 VIIB 中，以下之經 BOC-保護的中間物 L 可形成自由鹼單水合物 M''。

將經 BOC-保護的中間物 L 用濃鹽酸在二氯甲烷以及甲醇存在下反應、溫度維持在約 20 至 25℃ 之內處理，以形成氯化氫鹽 L'。

將氯化氫鹽 L' 用氫氧化鈉或其它強鹼處理，形成自由鹼 M'。然後自由鹼 M' 用水處理，形成自由鹼單水合物 M''。

熟悉此技藝的專業人士在閱讀數本揭示後，可視所選用的起始材料中間物使用所有描述於方案 I、II 或 III 以及 IV、V、VI、VII 以及 VIIA 步驟或僅使用描述於方案 I、II 或 III 以及 IV、V、VI、VII 以及 VIIA 之部分步驟製作此終產物，二肽基肽酶 IV 抑制劑 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-

吡雙環[3.1.0]己烷-3-腈，苯甲酸鹽(1:1)(式 M)或其對應的自由鹼 M'或單水合物 M"。例如使用本發明教示，熟悉此技藝的專業人士可使用起始材料 3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)、(α S)- α -胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)、(α S)- α [(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，1,4-二吡雙環[2.2.2]辛烷鹽(式 VIA)、或(5S)-5-胺羰基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯(式 IV)，例行製造以吡咯啉為主結構、環丙基-稠合的抑制劑(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-腈，苯甲酸鹽(1:1)(式 M)或對應的自由鹼 M'。

因此，在製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的抑制劑二肽基肽酶 IV 時，熟悉此技藝的專業人士可簡單地將(α S)- α [(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 VI)(或其 DABCO 鹽(式 VIA))與(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-羧醯胺(式 J)偶合而產生 3-(胺羰基)- α S)- α -(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)- β -酮基-(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-乙烷胺基甲酸，1,1-二甲基乙基酯(式 K)；將 3-(胺羰基)- α S)- α -(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)- β -酮基-(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-乙烷胺基甲酸，1,1-二甲基乙基酯(式 K)脫水產生 3-氰基-(α S)- α -(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)- β -酮基-(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-乙烷胺

基甲酸，1,1-二甲基乙基酯(式 L)；並水解 3-氰基-(<aS)-<a-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-<b-酮基-(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-乙烷胺基甲酸，1,1-二甲基乙基酯(式 L)，而形成二肽基肽酶 IV 抑制劑。此方法中，起始材料包含片段(<aS)-<a[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 VI)(或其 DABCO 鹽(式 VIA))以及(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-羧醯胺(式 J)。

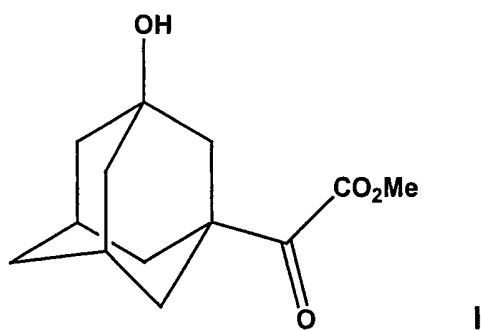
然而，此方法可進一步包含用以中間物(<aS)-<a-胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)經由 BOC 保護以製造片段(<aS)-<a[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 VI)之步驟。此具體實施例中，此方法可進一步的包含用酵素式氨基化或胺基轉移作用(參閱方案 I 或 II)以非對稱式還原 3-羥基-<a-酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)而製成(<aS)-<a-胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)中間物。此外，此方法可進一步的包含以三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 N)依據方案 III 化學方法合成(<aS)-<a-胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)。

此外，此方法可進一步的包含從中間物[1S-(1<a,3<b,5<a)-3-胺羰基]-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸，1,1-二甲基乙基酯(式 H)去除 BOC 用以製造片段(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-羧醯胺(式 J)之步驟。此具體實施例中，此方法可進一步的包含，較佳者，經由

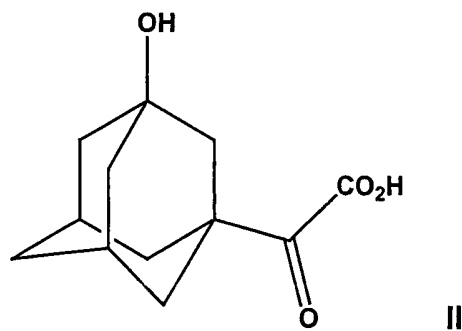
Simmons-Smith 反應環丙烷化 (5S)-5-胺羰基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯(式 IV)，而製造 [1S-(1<a,3<b,5<a]-3-胺羰基)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸，1,1-二甲基乙基酯(式 H)之步驟。

本發明之另一個特色係關於確認製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的二肽基肽酶 IV 抑制劑適用的中間體之新化合物。本發明之化合物可作為中間物製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的二肽基肽酶 IV 抑制劑，其係包括：

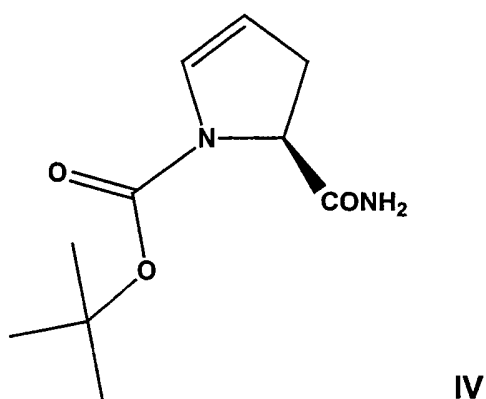
3-羥基-<a-酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，甲基酯，如式 I



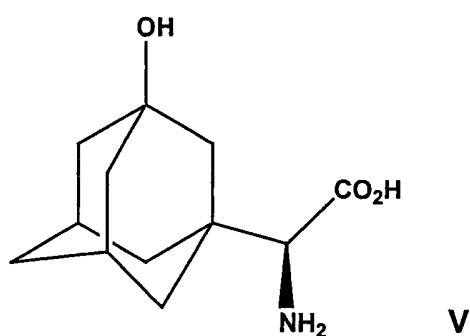
3-羥基-<a-酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，如式 II



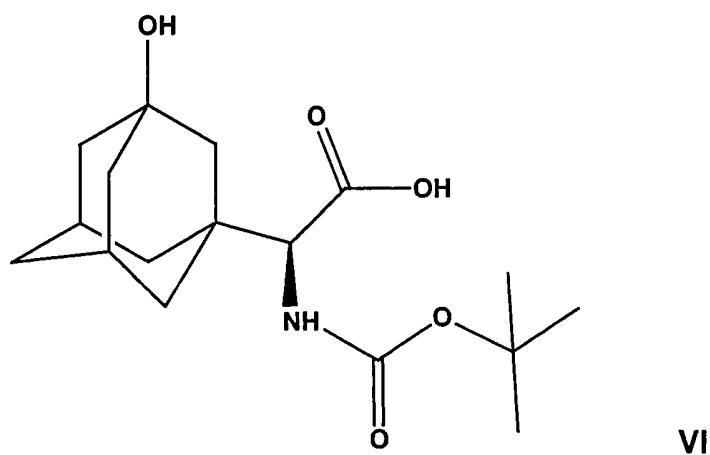
(5S)-5-胺羰基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯，如式 IV



(*aS*)-*a*-胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，如式 V

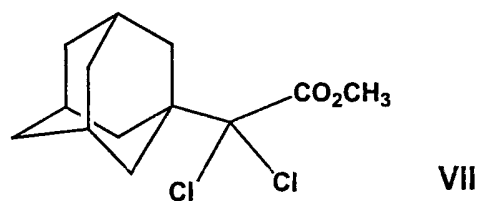


(*aS*)-*a*[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，如式 VI

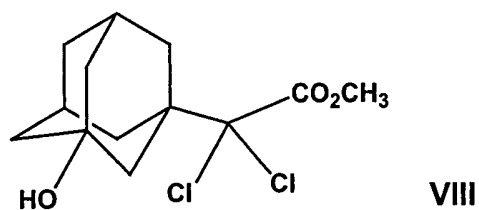


(或其 DABCO 鹽 VIA),

金剛烷-1-基-二氯-乙酸甲基酯，如式 VII

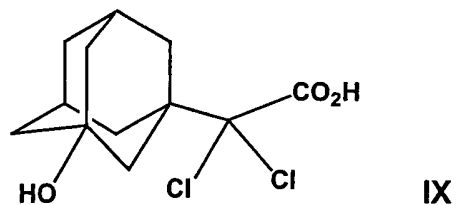


二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸甲基酯，如式 VIII

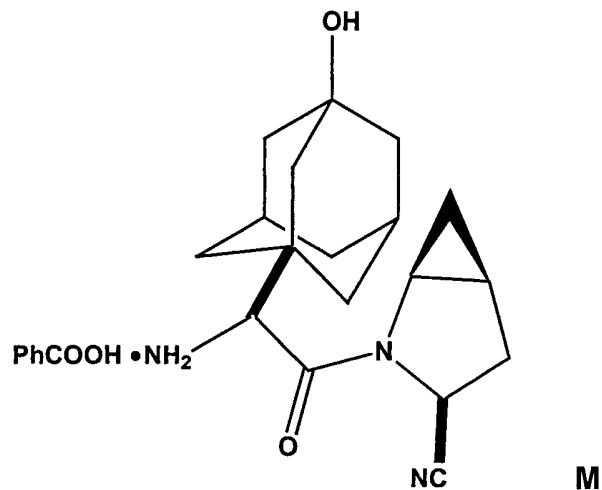


和

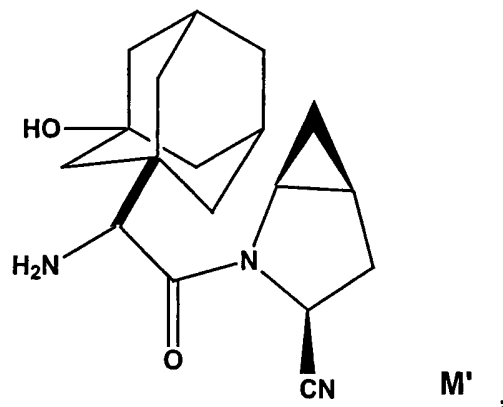
二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸，如式 IX



較佳的具體實施例中(展示於此)，製造二肽基肽酶 IV 抑制劑 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡嗪雙環[3.1.0]己烷-3-腈，苯甲酸鹽(1:1)之中間體，如式 M。



以及較佳之對應的自由鹼或其單水合物，分別如式 M' 以及 M"，



或其單水合物 M"(如前述)。

本發明化合物以及方法製作之二肽基肽酶 IV 抑制劑是用於治療糖尿病以及其併發症、高血糖症、X 症候群、高血胰島素症、肥胖、以及粥樣硬化以及相關的疾病、以及免疫調節的疾病以及慢性的炎性腸病。

下列實施例為本發明的較佳具體實施例。

【實施方式】

實施例

實施例 1

使用表現中間高溫放線菌屬苯丙胺酸去氫酶之重組巴斯德畢赤酵母之萃取物和產生之內在的甲酸去氫酶進行還原胺化作用

於表現中間高溫放線菌苯丙胺酸去氫酶之重組巴斯德畢赤酵母冷凍細胞(2.25 公斤)中加入內含甲酸銨(28.65 克，0.454 莫耳)之去離子水(6.75 升)。解凍之後，使用 Janke 以及 Kunkel 微升 tra-turrax T25 勻漿器懸浮細胞，酸鹼度用濃 NH_4OH 調至 7，用碎冰冷卻以生成有 25%w/v 細胞懸浮液之 50 毫莫耳濃度甲酸銨。在 12000 psi 下通過微型的流體器兩次以打破細胞以及用 20,000xg 在 4℃ 下離心移除細胞碎片。將 7024 毫升上清液，分別為內含 230998 單位或 124641 單位之苯丙胺酸去氫酶活性，經分析 A(參閱 實施例 9)或分析 B(參閱 實施例 10)測定、以及 80080 單位甲酸去氫酶，加入 16 升容器之 New Brunswick Scientific BiofloIV 生物反應器。

製備內含甲酸銨(442.5 克，7.017 莫耳)以及(3-羥基-金剛烷-1-基)-酮基-乙酸(786.7 克，3.510 莫耳)之 7024 毫升溶液。溶液之酸鹼度用 276 毫升濃氫氧化銨調至 8.0。然後加入菸醯胺腺嘌呤二核苷酸(NAD；9.834 克，14.82 毫莫耳)以及二硫蘇糖醇(2.163 克，14.027 毫莫耳)，將溶液加入內含巴斯德畢赤酵母萃取物之生物反應器中。溶液

維持於 40℃ 以及在 150 rpm 下攪拌。在 0、3 以及 18 小時分別加入等量樣本之濃氫氧化銨 45、25 以及 27 毫升，之後調整酸鹼度至 8.0 起動反應。25 小時之後，內含 818.9 克 (3.637 莫耳，100% 產率) (S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸之溶液用 HPLC 分析 (參閱實施例 8，方法 2) 測定以及無可偵測的酮酸或胺基酸之 R-鏡像異構物。

經由煮沸酵素的轉型混合物蒸餾出氨水之步驟分離 (S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸，用甲酸調整至酸鹼度 3、過濾去除沉澱蛋白質、用 Dowex 50(H+) 樹脂吸附胺基酸，以 1.5 莫耳濃度氨水溶析以及濃縮流出物以生成 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸之結晶固體。最後使用此分離步驟 (輸入 787 克酮基酸) 產生 804 克 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸，產率為 94.3%，而對 3-羥基-<a-酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸而言產率為 96.0%。此步驟分離的所有 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸批次物於次一反應中反應良好形成 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環 [3.1.0] 己烷-3-腓，苯甲酸鹽。

實施例 2

使用重組巴斯德畢赤酵母之加熱-乾燥細胞進行還原胺化作用

製備溶液：最終體積 4.0 毫升酸鹼度 8.0 (用 NH₄OH

調整酸鹼度)其中內含：0.50 莫耳濃度甲酸銨、0.25 莫耳濃度(3-羥基-金剛烷-1-基)-酮基-乙酸、1.06 毫莫耳濃度 NAD、1.00 毫莫耳濃度二硫蘇糖醇、以及 250 毫克重組巴斯德畢赤酵母之加熱-乾燥細胞，內含 32.7 單位苯丙胺酸去氫酶(由分析 A 測定)以及 24.6 單位甲酸去氫酶。巴斯德畢赤酵母加熱-乾燥細胞之製備已描述於 Hanson 等人 (Enzyme and Microbial Technology 2000 26:348-358)。將此溶液於 50 毫升愛倫美爾式燒瓶中、40℃、100 rpm 下反應 4 天、然後用 HPLC 分析。此溶液內含 45.02 毫克/毫升(80%產率)(S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸。

實施例 3

使用重組巴斯德畢赤酵母之溼細胞進行還原胺化作用

製備溶液：最終體積 3.0 毫升酸鹼度 8.0(用 NH_4OH 調整酸鹼度)其中內含：0.415 莫耳濃度甲酸銨、0.208 莫耳濃度(3-羥基-金剛烷-1-基)-酮基-乙酸、0.88 毫莫耳濃度 NAD、0.84 毫莫耳濃度二硫蘇糖醇、以及 12.5%w/v 巴斯德畢赤酵母之溼細胞，內含 6.06 單位苯丙胺酸去氫酶(由分析 A 測定)以及 12.8 單位甲酸去氫酶。將此溶液於 50 毫升愛倫美爾式燒瓶中、40℃、200 rpm 下反應 68 小時、然後用 HPLC 分析。此溶液內含 31.9 毫克/毫升(68%產率)(S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸。

實施例 4

使用表現來自中間高溫放線菌屬苯丙胺酸去氫酶和博衣丁假絲酵母甲酸去氫酶之重組大腸桿菌加熱-乾燥細胞進行還原胺化作用

製備溶液：最終體積 4.0 毫升酸鹼度 8.0(用 NH_4OH 調整酸鹼度)其中內含：0.50 莫耳濃度甲酸鉍、0.25 莫耳濃度(3-羥基-金剛烷-1-基)-酮基-乙酸、1.06 毫莫耳濃度 NAD、1.00 毫莫耳濃度二硫蘇糖醇、2.55 單位/毫升(0.51 單位/毫克)之博衣丁假絲酵母甲酸去氫酶(Boehringer Mannheim)、以及 250 毫克內含 76 單位苯丙胺酸去氫酶(由分析 A 測定)之重組大腸桿菌加熱-乾燥細胞。將此溶液於 50 毫升愛倫美爾式燒瓶中、 40°C 、100 rpm 下反應 4 天、然後用 HPLC 分析。此溶液內含 7.69 毫克/毫升(13.7% 產率)(S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸。

實施例 5

使用重組大腸桿菌溼細胞以及博衣丁假絲酵母之甲酸酯去氫酶進行還原胺化作用

製備溶液：最終體積 3.0 毫升酸鹼度 8.0(用 NH_4OH 調整酸鹼度)其中內含：0.415 莫耳濃度甲酸鉍、0.208 莫耳濃度(3-羥基-金剛烷-1-基)-酮基-乙酸、0.88 毫莫耳濃度 NAD、0.84 毫莫耳濃度二硫蘇糖醇、1 單位/毫升(0.51 單位/毫克)之博衣丁假絲酵母甲酸去氫酶(Boehringer Mannheim)、12.5% w/v 內含 97 單位苯丙胺酸去氫酶(由分析 A 測定)之大腸桿菌溼細胞。將此溶液於 50 毫升 愛倫

美爾式燒瓶中、40℃、200 rpm 下反應 68 小時、然後用 HPLC 分析。此溶液內含 5.16 毫克/毫升(11.0%產率)(S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸。

實施例 6

使用芽胞八疊球菌屬苯丙胺酸去氫酶和博衣丁假絲酵母甲酸去氫酶進行還原胺化作用

製備溶液：最終體積 1.0 毫升酸鹼度 8.5(用 NH_4OH 調整酸鹼度)其中內含：0.15 莫耳濃度甲酸銨、0.05 莫耳濃度(11.2 毫克/毫升)(3-羥基-金剛烷-1-基)-酮基-乙酸、1 毫莫耳濃度 NAD、1 毫莫耳濃度二硫蘇糖醇、0.51 單位/毫升(0.51 單位/毫克)博衣丁假絲酵母甲酸去氫酶(Boehringer Mannheim)以及 1.01 單位/毫升芽胞八疊球菌屬苯丙胺酸去氫酶(14.5 單位/毫克；Sigma Chemical Co.)。將此溶液在 30℃ 下反應 20 小時、然後用 HPLC 分析。此溶液內含 0.31 毫克/毫升(2.74%產率)(S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸。

實施例 7

構築質體 pBMS2000-PPFDH-PDHmod

使用兩個步驟構築表現載體 pBMS2000-PPFDH-PDHmod。巴斯德畢赤酵母 FDH 基因是使用內含 5'以及 3'端巴斯德畢赤酵母 FDH 基因連同相容的限制內核酸酶切割位點之寡核苷酸引子被次選殖入表現載體

pBMS2000(pBMS2000 揭示於美國專利第 6,068,991 號，頒佈日期 2000 年 5 月 30 日，頒給 S.W. Liu 等人)，該寡核苷酸引子為：

5' TCGTCATGAAAATCGTTCTCGTTTTG 3'(5'端；正股；
序列確認號碼：1)BspHI

5' TACTGTTTTTCCAGCGTATTCCTAGGCT 3'(5'端；反股
；序列確認號碼：2)BamHI

將經 PCR 放大之高-保真性巴斯德畢赤酵母 FDH 基因分成四份 100 微升等量樣本，各自內含 1 X TagPlus 反應緩衝溶液 (Stratagene, LaJolla, CA)、0.2 毫莫耳濃度之各脫氧核苷酸三磷酸鹽 (dATP、dCTP、dGTP、以及 dTTP)、0.4 毫微莫耳濃度之各寡核苷酸、2.5 U TagPlus 脫氧核糖核酸聚合酶 (Stratagene)、以及 10 pg 內含選殖的巴斯德畢赤酵母 FDH 基因之質體脫氧核糖核酸。放大條件包括在 94℃ 下反應 4 分鐘、接著 25 週期之反應：94℃ 下 1 分鐘；50℃ 下 1 分鐘；以及 72℃ 下 1.5 分鐘，使用具有自動延伸反應之 Perkin-Elmer Model 480 熱循環器。

PCR 反應混合物用相等體積 1:1 酚：氯仿 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) 萃取，以及在 13,000 x g 下離心 5 分鐘。移除上層水相以及置於新的微型離心管。添加 0.1 體積 3 莫耳濃度乙酸鈉以及 2 體積冰冷的乙醇沉澱脫氧核糖核酸。於 13,000 x g 下離心 5 分鐘之後，從試管吸出液體，以及用 0.5 毫升冰冷的 70%乙醇清洗沉澱物。再一次吸出液體，以及將沉澱物在室溫下空氣乾燥 30 分鐘。

放大的脫氧核糖核酸在總體積 50 微升、37℃ 下用 20 單位之各 BspHI 以及 BamHI 水解 3 小時。同時將 pBMS2000 載體(2 微克)用 BspHI 以及 BamHI 水解。水解樣品用 1.0%TAE 瓊脂糖凝膠於 100 v 下電泳 2 小時。從凝膠中分別切出 FDH 基因對應的條帶(1100-鹼基對片段)以及線性化載體(4700-鹼基對片段)以及使用 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen, Chatsworth, CA)純化。分離片段的濃度是用相對於低分子量階梯之電泳(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)估計並以 5:1(插入體:載體)莫耳比、總體積 10 微升在 22℃ 下進行連結反應 2 小時。添加 15 微升 dH₂O 和 250 微升 1-丁醇沉澱脫氧核糖核酸，以及在 13,000 x g 下、以微量離心機離心 5 分鐘。抽吸移除液體，以 speedVac(Savant Instruments, Farmingdale, NY)在低溫下乾燥脫氧核糖核酸 5 分鐘。將沉澱物再懸浮於 5 微升 dH₂O。

將再懸浮之脫氧核糖核酸在 25μF 以及 250Ω 下經電穿孔轉形到 0.04 毫升大腸桿菌 DH10B 勝任細胞(Invitrogen)。立刻添加入 SOC 培養液(0.96 毫升；SOC = 0.5%酵母菌抽出物、2%胰蛋白酶、10 毫莫耳濃度 NaCl、2.5 毫莫耳濃度 KCl、10 毫莫耳濃度毫克 Cl₂、10 毫莫耳濃度 MgSO₄、以及 20 毫莫耳濃度葡萄糖/公升)，以及將細胞於振盪儀中在 37℃ 以及 225 rpm 下反應 1 小時。用內含 50 微克/毫升硫酸康黴素(Sigma Chemicals, St. Louis, MO)之 LB 瓊脂平皿選擇含有質體脫氧核糖核酸之菌落。用菌落

PCR 於毛細管中使用 RapidCycler(Idaho Technology, Salt Lake City, UT)確認具有所要求的插入體之質體，各反應混合物內含 50 毫莫耳濃度 Tris-HCl(酸鹼度 8.3)、4 毫莫耳濃度 $MgCl_2$ 、0.25 毫克/毫升牛血清白蛋白、2%蔗糖 400、0.1 毫莫耳濃度甲酚紅、0.4 毫微米各引子(序列確認號碼：1 以及序列確認號碼：2)、以及 2.5 U Taq 脫氧核糖核酸聚合酶(Promega Corp., Madison, WI)。將反應混合物分成 10 微升之等量樣本，以吸量管將其移到圓底微量滴定盤孔中。使用用完即丟棄的塑膠防疫注射針挑選抗卡那黴素菌落，置入反應混合物，並轉移至 LB-康黴素瓊脂。將各分裝之反應混合物移至 30 微升毛細管，將管子兩端用火焰密封。水解細胞以及將脫氧核糖核酸在 94℃ 下反應 30 秒變性；使用 RapidCycler Thermocycler(Idaho Technologies, Salt Lake City, UT)以 94℃ 反應 0 秒；40℃ 反應 0 秒，以及 72℃ 反應 60 秒之 30 個週期進行放大。樣品用 1.0%TAE 瓊脂糖凝膠於 100v 下電泳 2 小時。17 個測試樣品中有七個樣品在 1100 鹼基對下顯示強電泳帶。選擇內含此質體的一個菌落(本文稱之為 pBMS2000-PPFDH)進行構築質體之下一步驟。

"PDHmod"意指經修飾之中間熱放射狀菌苯丙胺酸去氫酶，彼與發表的脫氧核糖核酸序列(Takada et al., J. Biochem. 109, pp.371-376[1991])不同在改變了用以完全的轉化(3-羥基-金剛烷-1-基)-酮基-乙酸至(S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸之羧端最後二個胺基酸以及額外的

12 個胺基酸。將此改變引入質體 pPDH9K/10(詳細描述於 WO 專利 200004179, 頒佈給 Donovan 等人, 2000 年 1 月 27 日), 接著轉形到巴斯德畢赤酵母 SMD1168(儲存編號 ATCC 74408)。

天然 PDH 基因的 3'端以及對應的胺基酸：

AAC	AGC	GCA	AGG	AGG	TAA
Asn	Ser	Ala	Arg	Arg	Stop

PDHmod 基因的 3'端以及對應的胺基酸(改變的或新的胺基酸係用粗體表示)：

AAC	AGC	GG	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		
Arg	Pro	Arg	Ile	Asn	Ser	Pro	Stop		

製備內含 PDHmod 基因 5'以及 3'端與相容限制內核酶切割位點之寡核苷酸引子：

GATGCTCATATGCGCGACGTGTTTGAAATGATG (5'端正股；序列確認號碼：3)

CATCCCGGGCTAAGGCGAATTAATAATTCG (3'端反義股；序列確認號碼：4)

除了從 ATCC 74408 製備染色體脫氧核糖核酸作為反應模版之外，PCR 放大以及純化 PDHmod 之反應條件與放大以及純化巴斯德畢赤酵母 FDH 基因之反應條件相同。產生的片段在總體積 50 微升、25℃ 下用 20 單位之各 NdeI

以及 SmaI 水解 1 小時，接著在 37℃ 下水解 2 小時。同時將在起始密碼子具有 NdeI 位點之 pBMS2000 載體(2 微克)使用相同之條件以 NdeI 以及 SmaI 水解。水解樣品分別用 1.0%TAE 瓊脂糖凝膠於 100 v 下電泳 2 小時。從凝膠中分別切出 PDHmod 基因對應的條帶(1200-鹼基對片段)以及線性化載體(4700-鹼基對片段)以及使用 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)純化。接合此二片段，轉型大腸桿菌，以及用上述之方法篩檢內含插入體和 PDHmod 基因(形成 pBMS2000-PDHmod)之菌落。

爲了構築 pBMS2000-PPFDH-PDHmod，將 pBMS2000-PDHmod(2 微克)用 10U 之各 Hind III 以及 SmaI 分解，反應體積爲 50 微升在 25℃ 下水解 1 小時，接著在 37℃ 下水解 1 小時。加入十單位之 T4 脫氧核糖核酸聚合酶(Invitrogen)和 2 微升 2.5 毫莫耳濃度之所有四種去氧核糖核苷三磷酸混合物，樣品在 11℃ 下反應 20 分鐘。反應樣品用 1.0%TAE 瓊脂糖凝膠於 100 v 下電泳 2 小時。切出 1800- 鹼基對片段以及用 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen)分離。此片段依序含有 tac 促動子、groES 基因、以及 PDHmod 基因(爲轉錄的融合片段)。接著將 pBMS2000-PPFDH(2 微克)用 10 單位限制內核酸酶 SmaI 在 50 μ L 體積、25℃ 下水解 2 小時，然後用 0.4 U 蝦鹼性磷酸酶(United States Biochemicals, Cleveland, OH)在 37℃ 下處理 1 小時。質體脫氧核糖核酸在 1.0%TAE 瓊脂糖凝膠中 100 v 下電泳 2 小時，用 QIAquick 組套分離、以

及萃取。在 6.5:1(插入體:質體)莫耳比、16℃、最終體積 10 微升下聯結這二片段 4 小時。用 1-丁醇萃取以及離心之後，將 DNA 轉形的到電處理後勝任的 DH10B 細胞。用二個 PDHmod-專一性引子篩選 卡那黴素-抵抗菌落中存在 PDHmod 基因之菌落(其方法如同之前描述於 FDH)。分別使用同源於 PPFDH5'端以及 PDHmod 基因 3'端之 DNA 引子進行第二次 PCR 篩檢。僅具有二個相同方向基因的構築體能放大出 1400-鹼基對之片段。發現一個該類質體，其方向經 KpnI 限制水解檢驗証實，其產生之預期片段為 5422 以及 1826 鹼基對。該質體稱為 "pBMS2000-PPFDH-PDHmod"。

實施例 8

表現 FDH 以及 PDHmod

將 pBMS2000-PPFDH-PDHmod 轉的到大腸桿菌 JM110。於搖動-燒瓶研究中將 JM 110(pBMS2000-PPFDH-PDHmod)生長 18 小時，其條件為 28℃、250 rpm 之 MT5 培養液(2.0%酵母菌胺、4.0%甘油、0.6%磷酸鈉[二鹼]、0.3%磷酸鉀[單鹼]、0.125%硫酸銨、0.0256%硫酸鎂[七水合物；經高壓蒸汽滅菌法後以無菌的 1 莫耳濃度溶液之形式加入]、以及 50 微克/毫升康黴素硫酸鹽[經高壓蒸汽滅菌法後以無菌的過濾滅菌之 50 毫克/毫升溶液之形式加入])。紀錄 600 毫微米下之光密度(OD600)，以及加入足以使起始 OD600 為 0.35 之細胞到新鮮的 MT5/康黴素培養液

中。在 250 rpm、28℃ 下燒搖動瓶直到 OD600 是 0.8-1.0。添加過濾滅菌之 1M 異丙基硫-β-D-嘔喃半乳糖苷 (IPTG) 至最終濃度 35 微莫耳濃度誘發此二基因的表現以及持續的發酵 24-48 小時。細胞在 6,500 x g 下離心 5 分鐘，用相等體積之 50 毫莫耳濃度甲酸銨酸鹼度 7.0 清洗一次，以及再沉澱。將細胞冷凍儲存於 -20℃ 或立即使用。將沉澱物再懸浮於 50 毫莫耳濃度磷酸銨(酸鹼度 7.0)濃度為 10 毫升/克溼細胞重量，以及使用 Fisher Scientific Model 50 Sonic Dismembrator(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)，如 15 以微管頭超音波振盪的 3 x 15 秒。在室溫、13,000 x g 下離心沉澱碎片。

用十二基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 檢查表現程度。將一微升之細胞萃取物與 5 微升之 4X NuPAGE™ LDS 緩衝溶液 (Invitrogen) 混合以及加入蒸餾水至 19 毫升。將樣品在 70℃ 下加熱 10 分鐘。混合物中加入一毫升之 1M 二硫蘇糖醇溶液，以及將 10 微升溶液施用至 10% NuPAGE™ Bis-Tris 聚丙烯醯胺微凝膠。在 200 v 下進行電泳 50-60 分鐘，凝膠用 0.1% Coomassie Blue (Sigma)、40% (v/v) 乙醇、以及 10% (v/v) 之溶液染色酸。將浸入染色之凝膠微波加熱至沸騰，然後在 40 rpm 之軌道振盪器下搖動 15 分鐘。用去離子水徹底清洗凝膠以及覆蓋上去染色溶液 (GelClear™; Invitrogen)。再一次加熱溶液至正好沸騰，並溫和地搖動至少 2 小時。誘發後可見到在上 Mr 43,000 以及 40,000 有二個顯著的條帶，對應

至 FDH 以及 PDHmod 次單體預期之分子量。當以描述於實施例 10 之方式測試，樣品亦發現擁有 FDH 以及 PDH 之活性。此重組大腸桿菌菌株指定的內部命名是 SC 16496。

接著將 SC 16496 在 15-以及 250-公升體積下發酵。在 15-公升發酵時，將一小管內含 1 毫升冷凍之 SC 16496 在室溫下解凍以及添加到 1 公升內含 50 微克/毫升康黴素 MT5 培養液之 4-公升燒瓶中。此燒瓶在 28℃、250 rpm 下反應 24 小時以及轉移至 13 公升 MT5 培養液(成分批次是以最終體積 15 公升為計)之 Braun 發酵罐。將最終濃度分別為 50 微克/毫升以及 0.0246%之康黴素硫酸鹽以及硫酸鎂七水合物溶於 500 毫升蒸餾水以及經由 0.2 微米乙酸纖維素過濾單位過濾滅菌。接種後立刻將溶液添加入反應槽中。起始 OD₆₀₀ 是計算值的 0.35。

發酵作業之參數如下：

16 公升工作體積

溫度：28℃

通氣：1.0 vvm

壓力：690 mbar

攪拌：500 rpm

視須要用 NH₄OH 控制酸鹼度使之為 6.8

視需求添加 UCON(一種氟碳化合物溶劑混合物，產自 Dow Chemical Company)控制泡沫之生成。

在 OD₆₀₀ 0.8-1.0 下(大約接種之後二小時)，在無菌下加入過濾滅菌之 IPTG(溶於 500 毫升 dH₂O)以生成最終濃

度 35 微莫耳濃度。發酵持續作用額外的 48 小時，將發酵槽內含物次冷卻至 10℃。離心收集細胞以及用 0.1 倍體積之 50 毫莫耳濃度甲酸銨酸鹼度 7.0 洗滌一次。將細胞糊狀物置於塑膠容器以及儲存在 -70℃ 直到須要為止。

於 250-L 發酵槽發酵時，接種物之製備如下：將 1 毫升冷凍之 SC 16496 解凍以及添加入 300 毫升 MT5 培養液和 50 微克/毫升卡那黴素中。

將燒瓶生長於 28℃、250 rpm 下 24 小時。測定 OD₆₀₀ 以及移除適當體積 80 OD 單位的細胞，以及添加入 250 毫升新鮮的 MT5 培養液。將細胞在無菌下添加入內含 10L MT5/康黴素培養液之 Braun 發酵罐(起始 OD₆₀₀ 約 0.008)中以及在揭示於上之發酵作業參數生長 16 小時。然後將菌種培養轉移至內含適當濃度康黴素和硫酸鎂的 250 升 MT5 中。基於 SC 16496 在此條件下倍增時間為 90 分鐘，10L 接種物在 250L 下之起始 OD₆₀₀ 應為 0.30-0.35。誘發、生長、收穫、及儲藏之進行如描述於 15-L 之發酵反應。

實施例 8A

使用分離的 PDH/FDH 酵素濃縮物從 3-羥基- α -酮基三環 [3.3.1.1^{3'}]癸烷-1-乙酸(式 II)經由(α S)- α -胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3',7'}]癸烷-1-乙酸(式 V)套管式的製造(α S)- α -[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3',7'}]癸烷-1-乙酸(式 VI)

步驟 1：分離 PDH/FDH 酵素濃縮物

將得自 4000L 發酵槽之大腸桿菌 JM110(pBMS2000-PPFDH-PDHmod)發酵液體培養基(30 公升)通過微型的流體器(Microfluidics model M-110Y，操作壓力 12,000-20,000 psi)(通過一次)以從細胞釋放出活性(液體培養基溫度保持低於 40℃)。微型流化之液體培養基其 PDH 活性是 32 IU/毫升以及 FDH 活性是 8 IU/毫升。

爲了澄清全部液體培養基，在攪拌良好之液體培養基中加入 4.5 公斤寅式鹽。然後添加 0.201 公升 30%aq.聚乙炔亞胺並混合 30 分鐘。然後使用壓濾器(Ertel Alsop 型號 8-ESSC-10)過濾混合物，得到 18 公升過濾物。用 12 公升水清洗濾餅，將體積調回 30 公升。此步驟回收 97%之 PDH，其活性爲 31IU/毫升以及 FDH 之活性爲 8 IU/毫升。

澄清的液體培養基用 100,000 MWCO 濾膜濾器盒(Millipore Pellicon 2 單位，聚醚砜蛋白質結合盒，0.5 m²過濾區域)進行超過濾。泵之循環速率是 400 毫升/分鐘。將澄清的濾液濃縮至 1.5 公升以及濃縮酵素 PDH 之值效價爲 567 IU/毫升以及 FDH 之值效價爲 136 IU/毫升。測定透過物並無發現活性。濃縮物中所有酵素活性的回收率是 84%。

步驟 2：還原胺化作用

依序在容器中加入 3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)(1.00 公斤；4.46 莫耳)及水(5 公升)。攪

拌混合物以及將酸鹼度用 NaOH 調至酸鹼度 8 以生成溶液。加入 Darco KBB 碳(100 克)，攪拌混合物 5 分鐘，然後經由平底漏斗和 5 μ 濾紙過濾。濾膜用水(2x1 L)清洗，合併以及濾液以及清洗液以生成澄清溶液。

在攪拌下添加入甲酸鉍(0.562 公斤；8.92 莫耳)，酸鹼度用 NaOH 再調至 -7.5。加入菸醯胺腺嘌呤二核苷酸(2.65 克)以及二硫蘇糖醇(1.54 克)。當固體溶解後，加入 PDH/FDH 酵素濃縮物(1.03 公升；500,000IU 之 PDH)。在周圍溫度下用 NaOH 將酸鹼度再重新調至 -8.0。

然後將混合物加熱至 -40℃ 以及用水稀釋至總體積 10 升。酸鹼度維持在 7.7-8.3，攪拌 42 小時。生成的溶液內含 0.955 公斤(95.1%)之產物(α S)- α -胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)。

步驟 3：BOC-保護

加入二-第三丁基二碳酸鹽(1.022 公斤；4.68 莫耳)至部分的(α S)- α -胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 V)(477.5 克；2.12 莫耳)溶液。混合物在周圍溫度下攪拌，其酸鹼度用 pH 滴定裝置以 10 當量濃度 NaOH 將 pH 值調至 10 並維持。加入 Boc₂O 之後 4 小時反應完成，起始材料殘留少於 1.0%。

將混合物酸鹼度用 35%H₂SO₄ 調至 -8 以及在混合物中加入異-PrOAc(5.0 公升)。然後將混合物酸鹼度用 35%H₂SO₄ 調至 2.0 以及維持此酸鹼度 5-10 分鐘。混合物

中加入寅氏鹽 (250 公克)，攪拌 10 分鐘，然後經由寅氏鹽墊 (250g) 之濾紙於布赫勒爾漏斗過濾。寅氏鹽墊可進一步的用 2.5L 異-PrOAc 清洗。

過濾物用 10 當量濃度 NaOH 調至酸鹼度 8。沈降 1 小時之後，丟棄有機層及介面。水層中加入異-PrOAc (7.5 公升)。混合物用 35% H₂SO₄ 酸化至酸鹼度約 2，然後在輕微的攪拌下加熱以及維持約 40°C 4 小時。分層後保留有機的萃取物。水層和介面用異-PrOAc (3.75 公升) 萃取以及於 40°C 下 2 小時之後再次分層。水層和介面用異-PrOAc (3.75 公升) 萃取以及於 40°C 下 2 小時之後再次分層。

將合併的有機萃取液 (-15 公升) 蒸餾濃縮至約 4.5 公升。然後在此溶液中溫度維持在約 82-89°C、於 10-15 分鐘內加入庚烷 (約 10 公升)。反應器套溫是如 70°C 以及維持在此溫度下 1 小時。冷卻之後不久發生結晶作用。然後將反應器套溫是如 40°C 以及維持在此溫度下 30 分鐘。

將懸浮液冷卻至周圍溫度，然後進一步的冷卻至 0-5°C。在 0-5°C 下攪拌一小時之後，過濾產物。用庚烷 (2.5 公升) 清洗產物，然後在 40°C 真空中乾燥以生成 607.0 克之 (88 產率) (αS)-α-[[(1,1-二甲基乙氧基) 羰基] 胺基]-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 VI)。

實施例 9

使用重組大腸桿菌 SC16496 JM110[pBMS2000-PPFDH-PDHmod] (ATCC 存儲編號 PTA-4520) 抽出物進行還原胺化

作用

將重組大腸桿菌冷凍細胞(25 克)加入去離子水(足以使最終體積為 100 毫升以及內含 5 毫升 1 莫耳濃度甲酸銨)。解凍之後，使用 Janke 以及 Kunkel 微升 tra-turrax T8 勻漿器懸浮細胞，酸鹼度用濃 NH_4OH 調至 7，以及用碎冰冷卻以生成 25%w/v 細胞懸浮液之 50 毫莫耳濃度甲酸銨。在 12000 psi 下通過微型的流體器兩次以打破細胞以及用 20,000xg 在 4℃ 下離心移除細胞碎片。將 266 毫升內含 2456 u(分析 A)或 768 u(分析 C)苯丙胺酸去氫酶以及 8801 u 甲酸去氫酶之上清液添加入 1-L 的瓶中。

製備之 266 毫升溶液內含甲酸銨(16.74 克，0.2654 莫耳)以及(3-羥基-金剛烷-1-基)-酮基-乙酸(29.76 克，0.1327 莫耳)以及用 12.7 毫升濃氫氧化銨調至酸鹼度 8.0。加入 NAD(372 毫克，0.561 毫莫耳)以及二硫蘇糖醇(81.8 毫克，0.530 毫莫耳)，然後將溶液加入內含大腸桿菌萃取物之瓶子中。將瓶子維持在 40℃ 下、之 40 rpm 振盪器中。週期性地加入濃氫氧化銨保持酸鹼度 8.0。38 小時之後，內含 31.5 克(0.140 莫耳，100%產率)(S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸之溶液用 HPLC 分析測定以及無可偵測的胺基酸之 R-鏡像異構物。

實施例 10

使用重組大腸桿菌 SC16496 JM110[pBMS2000-PPFDH-PDHmod](ATCC 存儲編號 PTA-4520)冷凍乾燥細胞進行還

原胺化作用

溶液內含最終體積 10.0 毫升、酸鹼度 8.0(用 NH_4OH 調整酸鹼度)：0.50 莫耳濃度甲酸鉍、0.237 莫耳濃度(3-羥基-金剛烷-1-基)-酮基-乙酸、1.00 毫莫耳濃度 NAD、1.00 毫莫耳濃度二硫蘇糖醇、以及 975 毫克冷凍乾燥重組大腸桿菌。將細胞乾燥至濕重之 26%。在乾燥之前細胞內含 65.04 單位/克(分析 A)苯丙胺酸去氫酶、(或 12.79 單位/克苯丙胺酸去氫酶，分析 C)、以及 133.32 單位/克甲酸去氫酶。將此溶液於 50 毫升緊密封的愛倫美爾式燒瓶中、 40°C 、100 rpm 下反應 3 天、然後用 HPLC 分析。此溶液內含 49.06 毫克/毫升(92.13.0%產率)(S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸。

實施例 11

使用支鏈轉胺酶進行胺基轉移作用

製備溶液，其中最終體積為 1.0 毫升內含 50 毫莫耳濃度磷酸鉀緩衝溶液，酸鹼度 8.0：0.10 莫耳濃度谷氨酸鈉、0.05 莫耳濃度(3-羥基-金剛烷-1-基)-酮基-乙酸(用 0.05 莫耳濃度 NaOH 中和)、0.1 毫莫耳濃度吡多醛磷酸鹽，以及 1 毫克支鏈轉胺酶(Biocatalytics)。將此溶液置於微離心管中，在 37°C 下反應 68 小時、然後用 HPLC 分析。此溶液內含 5.53 毫克/毫升(49.2%產率)(S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸和 7.05 毫克/毫升殘留的(3-羥基-金剛烷-1-基)-酮基-乙酸。

實施例 12

以 HPLC 分析 (S)-胺基-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸之過量的鏡像異構物以及含量

將樣品用水稀釋至約 2 毫克/毫升濃度並置於煮沸水浴 1 分鐘以停止反應及沉澱蛋白質。冷卻之後將樣品用 0.2 微米尼龍濾膜過濾 HPLC 管形瓶。

使用二種分離方法。

方法 1：

管柱：Chiralpak WH 25x0.46 公分 (Daicel Industries, Ltd.)。

流動相：0.3 毫莫耳濃度 CuSO_4 。

流速：1 毫升/分鐘

管柱溫度：50℃。

檢測：二極管排列檢測器 (DAD) 如 240 毫微米。

注射 體積：10 微升

S-鏡像異構物 ((*S*)-*S*-胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸) 滯留時間：79.9 分鐘

R-鏡像異構物 滯留時間：32.8 分鐘

方法 2：

管柱：Regis Davankov Ligand Exchange 15x 0.46 公分

流動相：25% 甲醇 / 75% 6 毫莫耳濃度 CuSO_4

流速：1 毫升 / 分鐘

管柱溫度：40℃

檢測：DAD 如 240 毫微米

注射體積：10 微升

S-鏡像異構物 ((α S)- α -胺基-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-

1-乙酸)滯留時間：3.2 分鐘

R-鏡像異構物滯留時間：11.2 分鐘

酮基酸(3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸)滯留
時間：5.2 分鐘

實施例 13

苯丙胺酸去氫酶分析 A

苯丙胺酸去氫酶分析 A 於 40℃ 下、1 毫升體積中進行，其中內含：0.4 毫莫耳濃度 NADH、5 毫莫耳濃度苯基丙酮酸鈉、0.75 莫耳濃度 NH₄OH 酸鹼度用 HCl 調至 8.75。於 340 毫微米下監測吸光度之減少。酵素活性單位是微莫耳 / 分鐘，其計算是基於吸光度改變之速率。

實施例 14

苯丙胺酸去氫酶分析 B

苯丙胺酸去氫酶分析 B 於 40℃ 下、1 毫升體積中進行，其中內含：1 毫莫耳濃度 NAD、10 毫莫耳濃度 L-苯丙胺酸、0.1 莫耳濃度 K₂HPO₄ 酸鹼度用 1 當量 NaOH 調至 10.0。於 340 毫微米下監測吸光度之增加。酵素活性單位

是微莫耳/分鐘，其計算是基於吸光度改變之速率。

實施例 15

苯丙胺酸去氫酶分析 C

苯丙胺酸去氫酶分析 C 於 40℃ 下、1 毫升體積中進行，其中內含：0.4 毫莫耳濃度 NADH、50 毫莫耳濃度 3-羥基- α -酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (溶於 1 當量的 NaOH 溶液)、0.75 毫莫耳濃度 NH₄OH 酸鹼度用 HCl 調至 8.75。於 340 毫微米下監測吸光度之減少。酵素活性單位是微莫耳/分鐘，其計算是基於吸光度改變之速率。

實施例 16

甲酸去氫酶分析

甲酸去氫酶分析於 40℃ 下、1 毫升體積中進行，其中內含：1 毫莫耳濃度 NAD、100 毫莫耳濃度甲酸銨、100 毫莫耳濃度磷酸鉀緩衝溶液，酸鹼度 8.0。於 340 毫微米下監測吸光度之增加。酵素活性單位是微莫耳/分鐘，其計算是基於吸光度改變之速率。

實施例 17

將三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 N) 溴化成 α -溴三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 O)

將固態三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 N) (288 克；1.48 莫耳) 懸浮於亞硫醯氯 (465 毫升) 置於 3-頸圓底燒瓶中

，裝上冷凝器。然後加入二甲基甲醯胺(DMF；0.3 毫升) ，將懸浮液在室溫下攪拌 1.5 小時。用氣相層析法檢察反應是否完成。然後逐份加入固體 NBS 至反應混合物中以及將反應混合物加熱至 60℃。將反應物攪拌 3 小時並將溫度維持在 60 至 65℃。用氣相層析法進行監測以確保反應完成。在反應混合物中加入庚烷(900 毫升)。在 78-80℃ 下蒸餾去除過量的亞硫醯氯。然後小心地加入水(猛烈反應)以結束反應(總體積 1050 毫升)。然後加入庚烷(500 毫升)以及水(600 毫升)，分離水層和有機層。用額外的水(600 毫升)清洗有機層，再一次分離水層和有機層。在有機的庚烷層中再添加水(150 毫升)以及蒸餾去除水層中之庚烷。特別地，有 70 毫公升水和庚烷共同被蒸餾去除。蒸餾去除庚烷之後，在水層中加入四氫呋喃(THF；1200 毫升)，產生的混合物在室溫下激烈地攪拌 16 小時以緩慢的水解。經由氣相層析法監測指出存在一些未反應的酸性氯化物。然後加入水(150 毫升)加速水解，用氣相層析法監測以確保反應完成。然後蒸餾去除 THF，產生雙相的(水及油)反應混合物。然後加入種子，將反應溫度升至室溫產生沈重的固體。加入水(250 毫升)以及乙腈(500 毫升)使懸浮液保持被攪拌的能力，在室溫下攪拌 2 小時。然後濾除固體，用乙腈(2X250 毫升)清洗。此過濾物內含第一作物之 α -溴三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 O)；在室溫、真空下乾燥之後產物為 264 克，AP95、66%產率。然後在室溫下母液(113 克殘餘物)和水以及乙腈(250 毫升/250 毫升)研

碎殘餘物 1-2 小時。然後過濾反應物乾燥固體取得第二作物之 α -溴三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸 (式 O)；64 克，AP 90，16%產率。

實施例 18

從 α -溴三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸 (式 O)製備 α -溴-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸 (式 Q)

於 Erlen-Meyer 燒瓶中裝入 315 毫升 95-98%之 H_2SO_4 ，然後在冰浴中冷卻至 8°C 。然後在燒瓶中加入 HNO_3 (50%，35 毫升，其製備是加入 50 毫升 70% HNO_3 至 30 毫公升水中)，混合物在冰浴中維持於 8°C 下。然後在混合物中於大約 30 至 60 分鐘內份化的加入固體 α -溴三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸 (式 O) (92 克，0.338 莫耳)，而使溫度維持在 28°C 下。然後將反應攪拌加熱至 60°C 直到得到澄清的溶液。

用薄層色層分析 (TLC)或高效能液相色譜法 (HPLC)監測反應進展。TLC 是用矽膠進行，使用內含 KMnO_4 之乙酸乙酯/甲醇/己烷=9:1:10 溶析。進行 HPLC 是使用 ODS 管柱，C18 S-3 120A，4.6 X 50 毫米，7 分鐘內 10%乙腈/ H_2O 至 100%乙腈的直線梯度，流速 2.5 毫升/分鐘。檢測波長是 220 毫微米。

當反應完成後，混合物冷卻至室溫以及維持於此溫度下大約 16 小時。然後加入水 (700 毫升)結束反應直到無棕色氣體產生為止。在冰浴中冷卻產生的泥漿至大約 5°C ，

然後過濾。固體過濾物用 200 毫公升水清洗以及用空氣乾燥產生 90 克之 α -溴-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 Q)的淡黃色固體(92%產率)。

實施例 19

從 α -溴-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 Q)製備 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式(V))

將 α -溴-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 Q)(75 克, 0.278 莫耳)溶於 225 毫升 30%氫氧化銨(4.08 莫耳, 14.6 當量)。然後將反應混合物在 65℃下加熱 16 小時。然後用旋轉蒸發器將反應混合物濃縮至固體。在濃縮固體中加入 EtOH(200 毫升), 然後再用旋轉蒸發器重新濃縮。產量是 71 克對掌性的混合物羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式(V))之黃色固體(90%)。

實施例 20

解析羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式(V))

對實施例 19 的對掌性混合物進行 Boc 保護作用其進行是使用 Boc 酸酐以及氫氧化鈉之四氫呋喃。將產生的化合物 α -[[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-]3]羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(化合物 R)(溶於 0.25M 之 EA, 80 微升=6.52 毫克)在管形瓶中與對掌性的鹼([1R,2S]-(-)-1,2-二苯基羥基乙胺)(0.25 莫耳濃度, 80 微升)混合, 將混合物用 SpeedVac 揮發乾燥。加入溶劑(200 微升)。將內含

混合物之小管置於振盪儀，在 50℃ 下加熱 1.5 小時。然後將混合物冷卻至室溫，產生 (α S)- α -[[二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(化合物 S)結晶。

實施例 21

ZnCl₂-催化金剛烷基溴(式 A)之偶合反應

在乾燥容器中加入 7.5 公斤之金剛烷基溴。然後在室溫下加入二氯甲烷(22.5 公升)以溶解固體之金剛烷基溴。此溶解為吸熱反應，因此在進行下一步驟之前將反應混合物溫度迴歸 20℃。然後在反應混合物中加入氯化鋅(1.05 公斤)以及在 20℃ 下攪拌大約 5 分鐘。然後在反應混合物中加入三(三甲基矽烷氧基)-乙烯(15.3 公斤)，維持反應溫度在 20 至 25℃ 之間，將產生的混合物攪拌 2 小時。攪拌之後加入三(三甲基矽烷氧基)-乙烯(5.10 公斤)。加入期間將溫度維持在低於 30℃。在 20 至 25℃ 下維持反應 12 至 15 小時，然後將反應混合物用二氯甲烷(15 公升)稀釋以及冷卻至 0 至 5℃。然後在反應混合物中逐滴加入半飽和的 NH₄Cl 溶液。加入期間將溫度維持在低於 30℃。得到濃稠的懸浮液。在懸浮液中加入乙酸乙酯(93.75 公升)。混合物激烈地攪拌 15 分鐘以及分開有機和水相。儲存有機層以及將水層用乙酸乙酯清洗兩次(各次清洗為 18.75 公升)。然後合併乙酸乙酯清洗液以及有機層，依續以水(37.5 公升)、水半飽和的濃鹽水(37.5 公升)清洗。再一次分離有

機層以及揮發以形成結晶。然後將溶劑交換成庚烷，最終體積為 22.5 公升。將產生的懸浮液冷卻 5 至 10℃，為期 1 小時以及經由過濾得到產物 <a-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 B)。<a-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 B)之產率是 6.96 公斤(33.11 莫耳，95%)。

實施例 21A

<a-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 B)之酯化作用

先在反應器中創造出惰性環境。然後在反應器中依續加入甲醇(35.00 公升)、<a-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 B)(14.00 公斤)以形成懸浮液。將懸浮液冷卻至 0 至 5℃以及以反應混合物之溫度保持在 5 至 10℃的方式加入乙醯氯。完成添加乙醯氯之後，將反應混合物加熱至 20 至 25℃以及在 20 至 25℃下攪拌 2 小時。在真空、40℃下濃縮反應混合物得到稀薄的油狀物。將油狀物溶於乙酸乙酯(71.96 公升)以及回溫至室溫。產生的混合物用水清洗兩次(各次用 28.78 公升清洗)，在各清洗之後分離有機層和水層。儲存有機層，合併水層以及酸鹼度用 3 當量 NaOH 溶液調至 9.5。然後將合併的水層用乙酸乙酯萃取兩次(各用 14.39 公升萃取)。各萃取後分離有機層以及合併儲存之有機層。然後將合併之有機層依續用飽和的碳酸氫鈉溶液(28.78 公升)、濃鹽水(43.18 公升)清洗。然後在真空、40℃下移除所有的揮發物以及得到無色至淡黃色油狀物，靜置後可產生結晶。比油狀物內含 13.29 公斤(59.26

莫耳，89%)<a-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，甲基酯(式 C)。

實施例 22

<a-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，甲基酯(式 C)之 Swern 氧化反應

將裝有機械攪拌器、溫度探頭以及添加漏斗之三頸燒瓶(22 公升)用氮氣沖洗過夜。然後加入草醯氯(500 毫升，5.73 莫耳)，接著加入 CH₂Cl₂(8 公升)。生成的溶液用丙酮/乾冰浴冷卻至 -69℃。然後在大約 30 分鐘之內緩慢的加入二甲基亞砜(DMSO；700 毫升，9.86 莫耳)溶液而保持內部的溫度低於 -60℃。將溶液攪拌 20 分鐘並將溫度維持在 -60 至 -70℃ 之間。然後在大約 30 分鐘內緩慢的加入 <a-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，甲基酯(式 C)(990 克，4.42 莫耳)之 CH₂Cl₂(1.7 公升)溶液，而保持內部的溫度低於 -60℃。將生成的溶液攪拌 30 分鐘。然後加入 NEt₃(3 公升，21.5 莫耳)形成沈重的三乙胺氯化氫鹽泥漿。將反應混合物加熱至室溫以及加入水(1 公升)溶解三乙基銨鹽(TEA 鹽)。然後將反應混合物轉移至圓底燒瓶，以及濃縮去除二氯甲烷(DCM)以及 NEt₃。加入 EtOAc(12 公升)以及分離產生的水層及有機層。有機層用水清洗三次(各次清洗為 2 公升)接著用濃鹽水洗滌(2 公升)。有機相然後用無水的 Na₂SO₄ 乾燥，蒸發產生淡黃色固體之 <a-酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，甲基酯(式 D)。產率大約是 104%

實施例 23

羥基化 <α-酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，甲基酯(式 D) 產生 3-羥基-<α-酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，甲基酯 (式 I)

在愛倫美爾(式)燒瓶中裝入 95 至 98% H₂SO₄ (495 毫升) 以及在冰浴中冷卻至 8°C。然後在燒瓶中加入 HNO₃ (50%，47.5 毫升，其製備是加入 50 毫升 70% HNO₃ 至 30 毫公升水中)，混合物再一次在冰浴中冷卻至 8°C。混合物中緩慢的在 30 至 60 分鐘之內份化的加入固體 <α-酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，甲基酯(式 D) (100 克，0.45 莫耳)，保持溫度低於 28°C。在冰浴冷卻下攪拌反應混合物。用薄層色層分析 (TLC) 或高效能液相色譜法 (HPLC) 監測反應進展。TLC 係使用矽膠以及 EtOAc/MeOH/己烷 (9/1/10) 溶劑；KMnO₄。HPLC 係使用 4.6 x 50 毫米、C18、3 微米、120 埃之管柱和 7 分鐘內 10% 乙腈/H₂O 至 100% 乙腈之梯度，流速為 2.5 毫升/分鐘。監測波長是 200 毫微米。當反應完全時(大約 1 小時之後)，加入冷水 (1.5 公升) 以及 EtOAc (500 毫升) 終止反應。再添加水以及 EtOAc (各 500 毫升) 輔助分離水層及有機層。然後用 3 等量樣本 (各 500 毫升) 之 EtOAc 萃取水層。合併有機層以及用濃鹽水 (400 毫升) 清洗。然後將清洗過的有機層以減壓濃縮成 130 克黃色油狀物殘餘物，其中內含 3-羥基-<α-酮基三環

[3.3.1.1^{3,7} 癸烷-1-乙酸，甲基酯(式 I)。

實施例 24

水解 3-羥基-<a-酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸，甲基酯(式 I)產生 3-羥基-<a-酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)

將實施例 23 之黃色油狀殘餘物溶於四氫呋喃(300 毫升)以及在冰浴中冷卻至 5 °C。溶液中緩慢的加入一公升之 1 當量氫氧化鈉，調整酸鹼度至大約 7 而維持溫度低於 30°C。然後再添加 500 毫升 1 當量濃度 NaOH 調整酸鹼度至大約 14。然後在冰浴冷卻下攪拌反應混合物，及這用 TLC 或 HPLC 監測反應進展，如描述於實施例 23。大約 30 分鐘之後當反應完全時，加入 EtOAc(500 毫升)以及分開水層及有機層。另外用 500 毫升 EtOAc 清洗水層。水層用濃 HCl 酸化。當溶液達成酸鹼度 7，加入 EtOAc(500 毫升)及更濃的 HCl 直到酸鹼度達成 0.7。總共加入濃 HCl 是 150 毫升。然後水層用 EtOAc 萃取(4 x 400 毫升)以及合併的有機層是依序用和 400 毫公升水、400 毫升濃鹽水清洗。然後清洗過的有機層是用 MgSO₄ 乾燥以及濃縮。產生 88 克淡黃色固體。將此固體溶解於 100 毫升 EtOAc 以及 300 毫升庚烷，攪拌 30 分鐘，接著過濾以及風乾產生 85 克棕褐色固體(85%3-羥基-<a-酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II))。

實施例 25

製備金剛烷-1-基-二氯-乙酸甲基酯(式 VII)

將裝有機械攪拌器，溫度計，冷凝器、等壓加成漏斗和氬入口之 2-公升三頸燒瓶裝入鋅粉(78.0 克，1.19 莫耳)接著添加無水的四氫呋喃(400 毫升)。在混合物中添加入 1,2-二溴乙烷以活化鋅。產生的混合物溫和加熱回流 25 分鐘。冷卻至 -55°C 之後，以保持反應溫度在 -55 至 -60°C 之速率(須要 1 小時)加入甲基三氯乙酸鹽(100.3 克，0.565 莫耳)和氯三甲基矽烷(80 毫升，0.648 莫耳)。加入完全之後，混合物在室溫下攪拌大約 90 分鐘。產生的混合物用庚烷(700 毫升)稀釋以及在氮氣下經由寅式鹽 545 墊過濾。濾餅用額外的庚烷(1 x 300 毫升，3 x 200 毫升)清洗。然後在減壓下用旋轉蒸發器濃縮濾液(大約 10-15 毫米水銀汞柱、 $22-27^{\circ}\text{C}$ 水浴)以生成粗糙的(2,2-二氯-1-甲氧基-乙烯基氧基)-三甲基矽烷之濃稠油狀物(129.2 克)。定量的質子 NMR 指出粗糙的材料含有 0.389 莫耳(68.8%)(2,2-二氯-1-甲氧基-乙烯基氧基)-三甲基矽烷。

在裝有氬入口之 1 公升燒瓶中裝入粗糙的(2,2-二氯-1-甲氧基-乙烯基氧基)-三甲基矽烷(129.1 克，大約 0.389 莫耳)以及無水的二氯甲烷(100 毫升)。在生成的溶液中加入 1-溴金剛烷(75.2 克，0.349 莫耳)以及無水的氯化鋅(6.56 克，48 毫莫耳)。生成的混合物在室溫下攪拌過夜。產生的紅棕色混合物用庚烷(600 毫升)以及水(300 毫升)稀釋。分離有機層以及用水(2 x 100 毫升)、1 當量碳酸氫鈉

(3 x 150 毫升)、以及水(2 x 200 毫升)清洗。生成的溶液用寅式鹽 545 墊過濾以及在減壓下濃縮濾液以生成無色的固體。將此材料溶於沸騰之甲醇(250 毫升)。將生成的溶液冷卻至室溫為期 1 小時。冷卻至大約 5°C 於 2 小時之後，過濾收集固體以及用冷卻的甲醇:水(94:6; 4 x 50 毫升)清洗以生成金剛烷-1-基-二氯-乙酸甲基酯(式 VII)之無色的固體: 75.0 克(77.3%基於 1-溴金剛烷); mp 76.3°C。

元素分析: $C_{13}H_{18}Cl_2O_2$:

計算值: C, 56.33; H, 6.55; Cl, 25.58%

實際值: C, 56.49; H, 6.59; Cl, 25.72%

1H NMR(500.16 MHz, $CDCl_3$) δ 3.855(s, 3H), 2.069(br s, 3 H), 1.866(d, J=2.75 Hz, 6 H), 1.683, 1.612(AB q, J=12.1 Hz)百萬份之一

^{13}C NMR(127.78 MHz, $CDCl_3$) δ : 166.130, 95.805, 53.969, 43.980, 36.842, 36.256, 28.309 百萬份之一

實施例 26

製備二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸甲基酯(式 VIII)

製備 10 當量 HNO_3 : 在 100 毫升容量瓶中加入濃 HNO_3 (88.25 克, 約 62.58 毫升, 約 1.0 莫耳)以及在冰浴中冷卻。加入水(35 毫升)。熱混合物分散之後, 將溶液回溫至室溫。燒瓶中加入水以生成 10 當量濃度 HNO_3 。

在裝有熱電偶溫度計之 250 毫升三頸燒瓶中加入濃 H_2SO_4 (103 克, 約 56 毫升)。在冰浴中冷卻至 0.4°C 之後,

約在 30 分鐘之內加入 10 當量 HNO_3 (5.68 毫升，56.8 毫莫耳)。當酸混合物之溫度降低至 -1.0°C 時移除冰浴。逐份加入金剛烷-1-基-二氯-乙酸甲基酯式 VII (15.0 克，54.11 毫莫耳；用鉢/杵輕輕的研磨打碎大的結塊/結晶)(每 10 分鐘 1.25 克；加入時間為一小時 50 分鐘)。約 5 小時之後反應混合物變成澄清、淡黃色的溶液。

攪拌約 24 小時之後反應混合物變成非常淡黃色的溶液。將裝有機械攪拌器以及熱電偶溫度計之四頸 Morton 燒瓶 (1 公升) 裝入水 (250 毫升) 以及尿素 (8.0 克，0.133 莫耳，相對於 HNO_3 約 2.34 當量)。在生成的溶液中加入乙酸乙酯 (230 毫升)。將產生的雙相的混合物用冰浴冷卻至約 1.0°C 。將上述之反應混合物在約 15 分鐘之內加入冰冷的 EtOAc/水/尿素混合物中。使用額外的乙酸乙酯和水 (各約 50 毫升) 完成轉送。攪拌約 45 分鐘之後，移除冰浴，將混合物攪拌回溫。攪拌 4.5 小時之後 (從終止反應時起算)，將產生的混合物轉移至分液漏斗 (1 公升)，使用額外的乙酸乙酯 (約 100 毫升) 完成此移轉。移除水層，用乙酸乙酯萃取 (1 x 80 毫升)。合併有機的分層以及用水 (2 x 90 毫升)、1 當量 NaHCO_3 (4 x 90 毫升)、及濃鹽水清洗。以無水的硫酸鎂乾燥之後，在減壓下移除溶劑以生成二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸甲基酯式 VIII 之幾乎無色的固體：15.67 克 (98.7% 粗產率)。此粗材料可用以製備二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸式 IX 而不須純化。然而視需要此粗材料 (15.65 克) 可從甲醇 (102 毫升) 以及水 (85 毫升)

中再結晶得到絨毛棉花狀的固體 (mp 114.8-115.0 °C) , 回收率 91% 。

元素分析 : $C_{13}H_{18}Cl_2O_3$:

計算 : C, 53.25 ; H, 6.18 ; Cl, 24.18%

實際值 : C, 53.24 ; H, 6.24 ; Cl, 24.31%

1H NMR(500.16 MHz, $CDCl_3$) δ 3.857(s, 3H), 2.298(br m, 2H), 1.824(s, 2H), 1.793(d, 4H, $J=2.75$ Hz), 1.682, 1.629(br AB q, 4 H), 1.529(m, 3 H) 百萬份之一

^{13}C NMR(127.78 MHz, $CDCl_3$) δ 165.929, 94.281, 68.932, 54.150, 44.478, 44.529, 44.020, 35.750, 34.759, 30.149 百萬份之一

Lab HPLC:

YMC ODS-A S3 120 埃 (4.6 x 50 毫米), $\lambda=200$ 毫微米 , 2.5 毫升 / 分鐘

溶劑 : A = 0.2% H_3PO_4 水溶液

B = 90% CH_3CN 水溶液

梯度 : 在 10 分鐘之內從 20%A 至 100%B

滯留時間	面積 %	特性
2.06 分鐘	1.19	未知的
4.54 分鐘	98.16	二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸甲 基酯
5.09 分鐘	0.65	未知的
8.35 分鐘		金剛烷-1-基-二氯-乙酸甲基酯

實施例 27

製備二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸(式 IX)

於 500 毫升圓底燒瓶中加入甲醇(200 毫升)以及 1 當量 NaOH(194 毫升, 194 毫莫耳, 相對於輸入之二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸甲基酯(式 VIII)大約 1.36 當量)。在冰浴中冷卻生成的溶液直到溫度 <9℃。移除冰浴以及加入二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸甲基酯(式 VIII)(41.68 克, 142.1 毫莫耳)。生成的懸浮液在氬氣、周圍溫度下攪拌過夜。大約攪拌 6 小時之後, 用額外的一份甲醇(10 毫升)清沖管壁。大約攪拌 17 小時之後, 過濾反應混合物去除小量的微粒材料。將生成的溶液轉移至裝有機械攪拌器之 2-公升的三頸燒瓶。使用水(900 毫升)稀釋反應混合物以及完成移轉。添加濃縮 HCl(38 毫升, 大約 456 毫莫耳)酸化生成的溶液。迅速地形成白色固體。溫和地攪拌混合物大約 20 分鐘, 然後置於冰浴。溫和地攪拌大約 90 分鐘之後, 停止攪拌器, 將混合物靜置於冰浴額外的 2 小

時。過濾產生的懸浮液，用冰水清洗濾餅。送入空氣通過濾餅，從固體經移除大容積的水。然後在真空、周圍溫度下乾燥材料 22 小時以生成二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸(式 IX)之無色的粉狀固體：39.19 克(98.7%產率)；mp 238°C (dec)。

元素分析：C₁₂H₁₆Cl₂O₃:

計算：C, 51.63；H, 5.77；Cl, 25.40%

實際值：C, 51.43；H, 5.74；Cl, 25.48%

Lab HPLC:

YMC ODS-A S3 120 埃(4.6 x 50 毫米)，λ 200 毫微米，
2.5 毫升/分鐘

溶劑 A = 0.2% H₃PO₄ 水溶液

B = 90% CH₃CN 水溶液

梯度：10 分鐘內從 20%A 至 100%B

滯留時間	面積 %	特性
0.53 分鐘	0.95	未知的
2.65 分鐘	97.27	二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸
4.54 分鐘		二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸甲基酯

¹H NMR(500.16 MHz, CD₃OD)δ 2.258(br s, 2 H), 1.858(s, 6 H), 1.674, 1.615(br AB q, J=11.54 Hz, 4 H), 1.588-1.526(m, 2 H)百萬份之一

¹³C NMR(125.77 MHz, CD₃OD)δ 167.957, 96.356, 69.322, 48.070, 45.360,

44.794, 37.050, 36.039, 31.631 百萬份之

—

實施例 28

製備 3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)

在 500 毫升之三頸燒瓶中裝入二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸(式 IX)(38.67 克, 138.5 毫莫耳)。在此材料中加入水(160 毫升)以及 1 當量 NaOH(138 毫升, 138 毫莫耳; 使用 1 當量 NaOH 產生二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸鈉鹽以避免固態 NaHCO₃ 發生之起泡沫問題)以生成霧狀的溶液。

在此溶液中加入固體 NaHCO₃(29.10 克, 346 毫莫耳, 2.50 當量)。加入 NaHCO₃ 之後反應混合物強制性的從溶液變成二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)-乙酸鈉鹽之懸浮液。

將反應容器是裝配上回流冷凝器/氬入口以及加熱至大約 80°C。加熱大約 6 小時之後, 將混合物冷卻至室溫。添加濃縮 HCl(32 須要毫升)小心的將反應混合物(酸鹼度 7.22)酸化至(產生 CO₂)酸鹼度 0.15。產生的混合物用乙酸乙酯萃取(4 x 300 毫升)。將第一次用乙酸乙酯萃取之後的水層(酸鹼度 0.37)中添加濃縮 HCl(大約 2 毫升)使其酸鹼度降低至 0.18。合併乙酸乙酯分層以及用濃鹽水(100 毫升)清洗。無水的硫酸鎂乾燥之後, 減壓移除溶劑以生成 3-羥基- α -酮基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸(式 II)之無色的顆粒狀的固體: 30.77 克(99%)。

元素分析：C₁₂H₁₆O₄：

計算：C, 64.27；H, 7.19%

實際值：C, 64.30；H, 7.13%

¹H NMR(500.16 MHz, D₂O)δ 2.288(br s, 1.33 H), 2.227(br s, 0.67 H),

1.819-1.575(m, 12 H)百萬份之一 - 局

部的水合物

¹³C NMR(125.77 MHz, 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 百萬份之一 -

局部的水合物

Lab HPLC:

YMC ODS-A S3 120 埃 (4.6 x 50 毫米), λ = 200 毫微米,

2.5 毫升/分鐘

溶劑：A = 0.2% H₃PO₄ 水溶液

B = 90% CH₃CN 水溶液

梯度：10 分鐘內從 10%A 至 60%B

滯留時間 面積% 特性

1.39 分鐘 100% 3-羥基 - < α - 酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷 -
1-乙酸

4.95 分鐘 二氫 -(3-羥基 - 金剛烷 - 1-基) - 乙酸

實施例 28A

使用一鍋式製程式製備 3-羥基 - < α - 酮基三環 [3.3.1.1^{3,7}]

癸烷-1-乙酸(式 II)

於裝有等壓加入漏斗和氬入口之 250-毫升三頸燒瓶中加入二氯-(3-羥基-金剛烷-1-基)乙酸甲基酯(式 VIII)，製備如描述於實施例 26(15 克，51.16 毫莫耳)接著添加四氫呋喃(30 毫升，不穩定)。攪拌數分鐘之後，溶解式 VIII 甲基酯團塊以生成霧狀的溶液。溶液中加入蒸餾水(30 毫升)以形成鬆散的懸浮液。從加入漏斗中加入 1 當量濃度 NaOH(69 毫升，69 毫莫耳，相對於輸入的式 VIII 化合物約 1.35 當量)。在 70 分鐘之內逐滴加入 NaOH 以生成幾乎無色的溶液，然後在周圍溫度下攪拌。

約 16 小時後進行 HPLC 分析顯示式 VIII 化合物之水解已完全。添加約 6N HCl(2.8 毫升)，使反應混合物(澄清的無色溶液，酸鹼度 13.24)之酸鹼度調至 7.40。加入固體 NaHCO₃(11.2 克，0.133 莫耳，2.60 eq)形成懸浮液。

加熱 4 小時 15 分鐘之後，HPLC 分析顯示反應完全。加熱 5 小時之後，移除熱源，冷卻反應混合物(澄清無色的溶液)。冷卻至室溫之後，將反應混合物儲存於冰箱(+4 °C)4 天。

儲藏於儲藏庫 4 天之後，反應混合物仍是澄清無色的溶液，HPLC 分析顯示儲藏時無(若有的話只是少許)改變。回溫至室溫之後，小心的添加濃 HCl(須要 11 毫升，產生 CO₂，在酸鹼度約 1.40 時無色的固體產生沉澱)將混合物(酸鹼度 7.77)酸化至酸鹼度 0.20。產生的懸浮液用 EtOAc 萃取(x 4，總體積約 500 毫升；各 EtOAc 萃取之後

水溶性部分進行 HPLC 分析)。1st EtOAc 萃取之後水層(酸鹼度 0.38)，添加濃 HCl(須要約 1.6 毫升)調至酸鹼度 0.18。2nd EtOAc 萃取之後水層(酸鹼度 0.37)，添加濃 HCl(須要約 0.8 毫升)調至酸鹼度 0.17。以後的 EtOAc 萃取(萃取 #3，酸鹼度 0.19；萃取 #4，酸鹼度 0.19)之後水層無須額外的調整酸鹼度。合併有機的分層。乾燥(MgSO₄)之後，減壓移除溶劑，在真空(泵)下乾燥 16 小時以生成粗糙的標題化合物式 II，其為幾乎無色的顆粒狀固體：11.42 克(99.53%產率)；HPLC，100%(面積%)。

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

計算：C, 64.27%；H, 7.19%

實際值：C, 64.19%；H, 7.09%

在蒸餾水(19 毫升)中加熱至約 85°C 溶解粗糙的式 II 化合物(5.0 克)，然後移除熱源以及使其冷卻。在約 53°C 下材料開始結晶。放置在室溫下約 2 小時之後，過濾收集固體以及用冰水清洗。送入氮氣通過濾餅，從固體經移除大容積的水。然後在真空泵下乾燥材料 17 小時以生成標題式 II 化合物之大量無色的針狀物：4.33 克(86.6%回收率)；mp 164.5-165.6°C (Mettler FP800 系統)；HPLC，100%(面積%)。

元素分析：C₁₂H₁₆Cl₂O₃[55465-023-15, TR46905]

計算：C, 64.27%；H, 7.19%

實際值：C, 64.42%；H, 7.04%

實施例 29

酯化 L-焦麩胺酸(式 E)以形成 L-焦麩胺酸乙基酯(式 F)

於反應容器中加入乙醇(49.0 公升)以及冷卻至 -5°C 。然後於反應容器中以不使混合物溫度超過 0°C 之方式加入亞硫醯氯(4.97 公斤)。完全的加入亞硫醯氯之後，混合物再一次冷卻至 -5°C 以及逐份加入 L-焦麩胺酸(式 E)而使溫度維持在介於 0 至 -5°C 之間。在添加酸之後將反應混合物加熱至 20 至 25°C 以及攪拌 5 小時。然後在真空下($T_{\text{max}} 45^{\circ}\text{C}$)揮發反應混合物至大約 15% 它的原本的體積。然後將殘留的油溶於甲苯(49 公升)。然後將甲苯溶液冷卻至大約 10°C 以及緩慢的加入三乙基胺(8.45 公斤)，最高溫度介於 20 至 25°C 之間。將產生的懸浮液攪拌 30 分鐘，然後過濾。用甲苯(約 5 公升)清洗濾餅。在 50°C 、真空下將濾液降低至總體積約 10 公升。在 50°C 下緩慢添加環己烷(8 公升)開始結晶以及後續的冷卻至大約 30°C 。種子形成之後將混合物冷卻至 20 至 25°C 以及加入第二個 8 公升的環己烷部分。然後將此混合物冷卻至 6 至 8°C ，攪拌一小時，以及過濾產生的結晶。結晶用環己烷清洗兩次(各用 4 公升清洗)。產生 4.89 公斤(82%)L-焦麩胺酸乙基酯(式 F)之無色的針狀物。

實施例 30

用 BOC-保護 L-焦麩胺酸乙基酯(式 F)

在室溫下將 L-焦麩胺酸乙基酯(式 F)(5.00 公斤)溶解

於甲苯 (24.97 公升)。然後在溶液中加入 4-二甲基氨基氮雜苯 (0.19 公斤)。然後在反應混合物中以不使反應溫度超過 25℃ 之方式加入 BOC-酸酐 (7.29 公斤) 之甲苯 (24.97 公升) 溶液。完全的加入之後，在反應溫度 25℃ 下攪拌三小時。然後於反應混合物中加入半飽和的 NaHCO_3 溶液 (49.94 公升) 以及在分離有機相和水相之前激烈地攪拌 10 分鐘。分離的有機層用水清洗兩次 (各 24.97 公升)。然後在真空、最高 50℃ 下揮發有機層的溶劑。殘留的無色至淡黃色油狀物在靜置下結晶。理論產量是 8.18 公斤 (31.81 莫耳) 之 (5S)-2-酮基吡咯啉-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)，5-乙基酯 (式 G)。

實施例 31

超氫化物之還原及除去

將 (5S)-2-酮基吡咯啉-1,5-二羧酸、1-(1,1-二甲基乙基)，5-乙基酯 (式 G) (4.80 公斤) 溶於甲苯 (30.97 公升；Kf max 0.01% 水) 以及冷卻至 -50℃。於溶液中以不使反應溫度超過 -45℃ 之方式加入超氫化物 (1 莫耳 LiEt_3BH 之 THF；19.96 公升)。完全的加入之後，混合物在 -45 至 -50℃ 下攪拌 30 分鐘。然後在反應混合物中以不使溫度超過 -45℃ 之方式加入 N-乙基二異丙胺 (DIPEA；14.47 公升)。於混合物中加入二甲基氨基氮雜苯 (0.030 公斤) 固體。然後於反應混合物中以不使混合物溫度超過 -45℃ 之方式加入三氟乙酸酐 (TFAA) (4.70 公斤)。完全的加入之後，將反應

混合物在一小時之內加熱至 20 至 25℃ 以及保持此溫度額外的 2 小時。然後將反應混合物冷卻至 0℃ 以及緩慢的加入水(48.00 公升)而使反應溫度不超過 5℃。然後分離水相及有機相，有機相再一次用 48 公公升水清洗(0 至 5℃)。然後揮發有機相以及在 40℃ 下脫除氣體。得到微黃的油狀物，產率為 4.5 公斤(18.66 莫耳，100%)之 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1-二甲基乙基)，5-乙基酯(BOC-DHPEE)(式 III)。

實施例 32

水解 BOC-DHPEE(式 III)

將從 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基),5-乙基酯(BOC-DHPEE)(式 III)(6.00 公斤)以及乙醇(24.00 公升)製備的溶液冷卻至 0 至 5℃ 以及在此溫度下緩慢的用氫氧化鋰水合物(2.09 公斤)之水(20.87 公升)溶液處理產生渾濁的溶液。然後將此渾濁的溶液加熱至 20 至 25℃ 以及在此溫度下攪拌 2 小時。然後在最高溫度 40℃、真空下揮發反應混合物至體積大約 10.5 公升，加入水(24.00 公升)以及第三丁基甲醚(TBME 或 MTBE)(24 公升)，以及混合 10 分鐘。分離有機相和水相，在水相中再一次的加入 24 公升 TMBE。然後將混合物冷卻至 5 至 10℃，以及將酸鹼度用 H_3PO_4 85%-水(1:4)激烈地攪拌調至 2.3 至 2.3。操作過程中維持溫度在至 10℃ 之間，以保持其穩定性。分離有機層和水層。儲存有機層，水層在 5 至 10℃ 下再一

次用 24 公升預先冷卻的 TBME 萃取。產生的有機層和儲存的有機層是合併以及加入二異丙基乙胺(DIPEA)(4.82 公斤)。然後將此溶液揮發以及在最高溫度 30℃、真空下脫除氣體。產生 7.84 公斤(22.88 莫耳, 92%)[N-BOC 去氫脯胺酸 * DIPEA(BOC-DHP)]。

實施例 33

將 BOC-DHP 形成鹽胺

如描述於實施例的 32 皂化作用合成之 BOC-DHP 可含有水。因此在運轉此反應之前可用施用甲苯共沸蒸餾。然而, 由於試劑過量, 因此計算原料是基於 BOC-DHP 在去除任何水之前的用量。共沸蒸餾時將 BOC-DHP 用甲苯稀釋至差不多 30%的溶液。在真空、40℃下移除甲苯。然後將處理的 BOC-DHP(6.00 公斤)溶於 THF(48.0 公升)。於溶液中加入 DIPEA(2.26 公斤)以及將反應混合物冷卻至 -20 至 -25℃。然後緩慢的加入甲磺鹽基氯(3.01 公斤)。加入期間, 產生鹽酸 DIPEA 沉澱物。然後將產生的懸浮液在 -20℃下攪拌 2 小時, 接著經由表面下氣體入口送入飽和氨水。添加入氨水時將反應加熱至 0℃。飽和之後將反應混合物加熱至 20℃以及攪拌 3 小時。攪拌後將反應混合物過濾去除氯化氫。將濾餅用數個部份之 THF(12 公升)清洗。在真空、最高溫度 40℃下濃縮濾液, 然後溶於二氯甲烷(33.33 公升)。溶液用水清洗(26.66 公升)。分離有機相和水相, 將水相用二氯甲烷萃取兩次(各 20 公升)。合併有機

相，在真空下濃縮以及脫除氣體以去除任何過量的 Hiinigs 鹼。產量是 3.35 公斤 (15.77 莫耳，90%) 之 (5S)-5-胺羰基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯 (BOC-DHPA)(式 N)。

實施例 34

(5S)-5-胺羰基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯(式 IV)之三元環合環反應。

於第一反應器(反應器 A)中裝入 BOC-DHPA(式 N)(4 公斤)，溶於二氯甲烷(18.0 公升)以及維持於 20℃。於第二反應器(反應器 B)中裝入二氯甲烷(18.00 公升)，冷卻至 -30℃。然後於反應器 B 中依序裝入二甲氧基乙烷(DME)(3.36 公斤)、30%二乙基鋅(15.36 公斤)之甲苯溶液，而維持溫度介於 -30 至 -25℃ 之間。然後於反應器 B 中裝入二碘甲烷(19.99 公斤)而維持溫度介於 -30 至 -25℃ 之間。完全的加入二碘甲烷之後，混合物在 -30 至 -25℃ 下攪拌 45 分鐘。然後將此混合物經由冷卻管(-20 至 -25℃)加入反應器 A。緩慢的進行加入，每部份大約 5%而使反應器 A 之反應溫度維持於 22 至 24℃ 之間直到反應完成為止。反應完成後，將反應器 A 之混合物冷卻至 5 至 10℃。然後於反應混合物中以不使反應溫度超過 15℃ 之方式緩慢的加入飽和的重碳酸鹽溶液(21.6 公升)。加入之後，攪拌反應混合物至少一個小時而形成沉澱。過濾懸浮液。將產生的濾餅轉回容器，再一次與二氯甲烷(14.4 公升)攪拌 30 分

鐘；以及再過濾。第二次過濾之後，用二氯甲烷(7.2 公升)清洗濾餅。然後分離濾液之水相以及有機相，有機相用半飽和之鹽水清洗(21.6 升)。然後在真空、最高溫度 30℃ 下移除溶劑以及與庚烷交換。得到內含粗產物之庚烷泥漿。溶劑交換之後懸浮液之最終體積是 14.4 公升。過濾分離粗產物。濾餅用庚烷清洗(2.9 公升)以及然後在真空下乾燥至衡重。粗產物的產量是 2.76 公斤(12.2 莫耳，72%)[1S-(1<a,3<b,5<a)-3-胺羰基)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸，1,1-二甲基乙基酯(式 H)。純化時是將粗材料於 8 倍 1:1 乙酸丁酯/庚烷混合物、20 至 22℃ 下淤漿化 4 小時。過濾材料，用差不多 1-倍量的庚烷清洗濾餅。產量是 2.11 公斤(9.33 莫耳，55%)[1S-(1<a,3<b,5<a)-3-胺羰基)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸，1,1-二甲基乙基酯(式 H)。

實施例 35

去保護 [1S-(1<a,3<b,5<a)]-3-(胺羰基)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸，1,1-二甲基乙基酯(式 H)以形成 (1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-羧醯胺(式 J)

於裝有機械攪拌器以及熱電偶之 100 毫升雙頸燒瓶中加入 [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-胺羰基)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸，1,1-二甲基乙基酯(式 H)(5.0 克，22.1 毫莫耳)以及 THF(20 毫升)。然後於懸浮液中加入 HCl(2.5 莫耳之 EtOAc，25 毫升，62.5 毫莫耳)。生成的溶液在室溫下攪拌 18 小時，在此期間可觀察到沉澱。反應完成係以 HPLC

監測。於懸浮液中加入甲基第三丁基醚(MTBE)(30 毫升)，繼續攪拌額外的 30 分鐘。然後在 N₂ 保護下過濾懸浮液產生白色固體，用 MTBE 清洗(20 毫升)。在烤爐、減壓下乾燥固體 48 小時得到 (1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-羧醯胺之氯化氫鹽(式 J；3.6 克，100%)。

實施例 35A

(5S)-5-胺羧基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯(式 IV)之備用製備法。

A. 轉化 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)

將 2.7 毫升 10 當量濃度 aq.NaOH(27 毫莫耳)(過量的 NaOH 應限制於 1.05 當量或更低)加入 10.4 克(25.86 毫莫耳)固體二環己胺(DCHA)鹽之 30 毫公升水、40 毫升甲苯以及 10 毫升 MTBE 混合物之懸浮液中。攪拌清楚分層的雙相混合物以及分離所有的固態溶解相。內含 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)鈉鹽之用盡的有機相用 4 毫公升水萃取，並將比加入起始水相。HPLC 定量得知水溶液含 12.55%(w/w)"自由烯烴酸"或回收率 96%。

B. 產生 DMT-MM

於保持室溫之水浴的 2-Cl-4,6-二 MeO-1,3,5-三嗪(CDMT)(6.2 毫克，35 毫莫耳；1.5 當量)之 70 毫升

EtOAc 溶液中，加入 4 毫升 (36.38 毫莫耳) 之純淨的 N-甲基嗎福啉 (MN)。固體 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基嗎福啉正離子氯化物 (DMT-MM) 開始沉澱。將內含 DMT-MM 之懸浮液在室溫下攪拌 30 分鐘，在此時間變成濃稠糊狀物。反應期間溫度從 23℃ 上升至 28-29℃。保持低反應溫度以極小化競爭之脫甲基化形成二-MeO-N-嗎福啉-三嗪 (DMMT)。

C. 轉化 -4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)鈉鹽形成 (5S)-5-胺羰基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯 IV

於部份 A 之鈉鹽溶液中 (鈉鹽等量於 5 克 (23.5 毫莫耳) 之自由烯烴-酸，HPLC 定量) (V=25 毫升) 加入固體 NH_4Cl (3.75 克，70 毫莫耳，3 當量)，此時酸鹼度從 14 下降至 8.9。於溶液中加入足夠的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 調整酸鹼度至酸鹼度 = 6.20。註：磷酸鹽用量之變化取決於將 DCHA 鹽轉換成 Na-鹽之起始過量的 NaOH。鈉鹽的緩衝溶液如製備上述之部份 B 般，將 DMT-MM 懸浮。

雙相的混合物在 RT 下攪拌 4 小時，此時起始之乳化物變成懸浮液以及有一些 DMHT 沉澱出來。經 HPLC 檢驗顯示反應完全以及各相中已無活化的 DMT-酯及酸。

在反應條件下，經由 DMT-MM 與 DMHT 之反應亦形成 12-15% 以重量計之 4,6-二 MeO-1,3,5-三嗪 醚 (DMT-醚)。過濾懸浮液去除 4,6-二 MeO-1,3,5-三嗪 (DMHT) 以及分

開兩相。濃稠的有機相用 2 當量濃度 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2x25 毫升)水溶液清洗或直到酸鹼度(aq.)<6，表示大多數的 N-甲基嗎福啉已從有機相中移除。分離相，濃稠的有機相用 25 毫升濃鹽水清洗。

通常溶液產生 87-90%之標題化合物 IV；未反應的起始烯烴酸約 1-0%。旋轉揮發濃稠的有機相以及與新鮮的 EtOAc(2x250 毫升)共沸乾燥。材料局部地結晶。將混合物溶於 8 毫升熱 EtOAc 以及和 10 毫升 n-庚烷混合。開始出現固體。在 50℃ 下攪拌懸浮液 30 分鐘以及再添加 10 毫升 n-庚烷。移除加熱浴在室溫下攪拌懸浮液 30 分鐘以及每 30 分鐘加入二次額外的庚烷以及將懸浮液在室溫下攪拌過夜至完全結晶。過濾以及乾燥固體。典型的結晶產率接近 90%；標題化合物 IV 之效能是 90%以及這 DMT-醚殘留之重量比為 10%。

形成之固體是標題化合物 IV 以及 DMT-醚的共晶體，DSC 分析相較於醯胺之 mp 為 89.7℃，得到單一清晰的 mp 97.4℃。共結晶形式更易結晶以及更易溶解於溶液。

實施例 35B

製備 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)之二環己胺鹽

A. 製備 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)之鈉鹽

於 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙

基)之甲苯 溶液(約 15 重量%至 25 重量%)(1 克/毫升)中加入 3 倍體積之乙醇。將溶液冷卻至 0-5℃。溶液中緩慢的加入 5 當量濃度 NaOH-水溶液(2 eqs)而維持溫度<5℃(稍微地放熱)。將反應混合物加熱至 20-25℃ 以及攪拌直到反應完成。

反應混合物中加入 4 倍體積的水以及在真空下蒸餾(水浴溫度 40℃)反應混合物去除乙醇。殘餘物中加入 0.5 倍體積之甲苯(0.865g/毫升)以及將混合物攪拌 10 分鐘。形成水層及有機層。分離內含鈉鹽之水層以及用於部份 B。

B. 製備 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)-二環己胺鹽

於 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)-鈉鹽之水溶液中加入 1 倍體積之 MTBE(0.74 克/毫升)。於上述溶液中加入 0.2 倍體積之庚烷(0.684 克/毫升)以及將生成的溶液冷卻至 0-5℃。緩慢的加入 85% H_3PO_4 (1g/毫升)溶液使酸鹼度到達約 2.5-3 而維持溫度<5℃(稍微地放熱)。分離產生的分層後將內含產物的有機層中加入 1 倍體積之 75%濃鹽水。將混合物攪拌 10 分鐘使產物分層。產物內含於有機層。

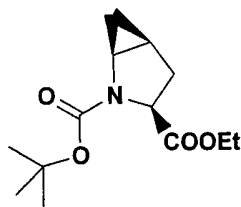
將有機的溶液冷卻至 0-5℃ 以及緩慢的加入二環己胺(0.91 克/毫升)(緩慢的放熱)而維持溫度<10℃。然後將反應混合物在 0-5℃ 下攪拌 3 小時。過濾固體用 0.5 倍體積

之 1:1MTBE/庚烷清洗。乾燥產生的 DCHA 鹽(1 克/毫升)以及回收。

實施例 35C

另行製備 [1S-(1<a,3<b,5<a)]-3-(胺羰基)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸，1,1-二甲基乙基，乙基酯(式 H)(亦稱為同-N-BOC-4,5-甲橋脯胺酸)

A. 製備 (s)-BOC-4,5-甲橋脯胺酸乙基酯



在火焰-乾燥之 3-頸燒瓶中加入 2.2 克之 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)，5-乙基酯(2.20 克，9.12 毫莫耳，1 eq)以及 22 毫升無水甲苯。將生成的溶液冷卻至 -30℃ 以及進一步的逐滴加入 16.58 毫升(18.24 毫莫耳)之二乙基鋅(1.1 莫耳之甲苯溶液)。

逐滴加入 2.66 毫升(6.43 克，36.47 毫莫耳)氯碘甲烷之 2.2 毫升甲苯溶液而保持反應溫度介於 -25℃ 至 -30℃ 之間。將反應保持於 -20℃ 16 小時。然後用 22 毫升半-飽和的重碳酸鹽溶液這終止反應以及加熱至室溫。形成白色沉澱，用 Hyflow(助濾器)濾除以及用甲苯(約 10 毫升)清洗。從雙相的濾液分離有機層以及用水清洗兩次(各 11 毫升)。將有機層揮發乾燥以生成微黃的油狀物(2.33 克)，其為 N-BOC-甲橋脯胺酸乙基酯(混合正-以及反-(8:1)同分異構

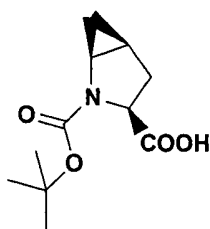
物)。

使用上述步驟製造足以應用於下一步驟之大量上述同分異構物混合物。在 20-25℃、氮氣下，激烈地攪拌 3.40 公斤 N-BOC 4,5-甲橋脯胺酸乙基酯(正-以及反-同分異構物混合物)和 5.17 公斤(66.59 克莫耳)40.0%甲基胺(水溶液)。

反應完全之後，混合物用 5.17 公升水以及 5.17 公升 MTBE 稀釋以及在分相發生之前另行攪拌 5 分鐘。有機層用 5.17 公升水清洗。揮發產生的有機層(真空，T_{max} 40℃)至衡重。

產生 2.52 公斤正-N-Boc-4,5-甲橋脯胺酸乙基酯(9.85 莫耳，74%)。

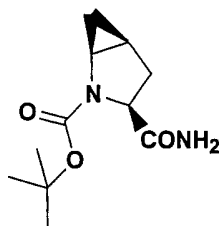
B. 製備 s-BOC-4,5-甲橋脯胺酸



製備 2.57 公斤正-N-BOC 4,5-甲橋脯胺酸乙基酯(s-BOC-MPEE)之 10.28 升乙醇溶液。在 20-28℃下加入此溶液製作 0.51 公斤氫氧化鋰水合物之 5.07 公升水溶液。在惰性氣體保護(氮)下進行反應。在 20-25℃下(IPC)攪拌反應混合物 14 小時。反應完全之後，將混合物在 40℃下(真空)揮發。將產生的油加入 25.70 公升水以及 25.70 公升

MTBE 以及攪拌 30 分鐘。分離有機相以及水層再一次用 12.85 公升 MTBE 萃取。水相中加入 25.70 公升 MTBE 以及添加 1 當量 HCl(ca. 12 公升)，將混合物酸鹼度調至 2。分離有機層以及水層再一次用 12.85 公升 MTBE 萃取。從前一步驟合併有機層，揮發乾燥產生 1.88 公斤正-N-BOC 4,5-甲橋脯胺酸(8.25 莫耳%，82%)。

C. 製備 [15-(1<a,3<b,5<a)]-3-(胺羰基)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸，1,1-二甲基乙基酯



將 2.00 公斤正-N-BOC-4,5-甲橋脯胺酸溶於 40.00 公升 THF 以及冷卻至 -15℃。混合物中添加 1.07 公斤 N-甲基嗎福啉(P0)。於反應混合物中加入 1.32 公斤異丁基氯甲酸酯，使反應溫度不超過 -8℃。完全加入之後，混合物在 -10℃ 下攪拌 30 分鐘(P1、IPC 1)。從反應混合物中沉澱 N-甲基嗎福啉氯化氫。

將反應混合物加熱至 -5℃ 以及然後經由氣體入口通入氨水(0.79 公斤，5.00 當量)。然後將反應混合物加熱至 20-25℃ 以及在此溫度下攪拌 4 小時(P2，IPC 2)。反應混合物中加入 40.00 公升飽和濃鹽水。然後添加飽和硫酸氫鉀溶液將混合物酸鹼度調至酸鹼度 4 至 4.5。分離有機層

以及水層再一次用 20.00 公升 MTBE 萃取。將合併的有機層揮發至乾燥。將粗產物在回流溫度下溶於 8.00 公升乙酸丁酯。在 30℃ 下沉澱出產物。起始結晶後將混合物用 20.00 公升庚烷緩慢的處理以及進一步的攪拌 2 小時。過濾分離粗產物。濾餅用二份冷卻的乙酸丁酯/庚烷 (1:4) 清洗 (各 1.6 公升)，以及用 2.00 公升庚烷清洗兩次，以及在 30-35℃ 下乾燥產生 1.64 公斤 (7.22 莫耳，82%) 正-N-BOC 4,5-甲橋脯胺酸醯胺 (s-BOC-MPA)。

實施例 36

以 BOC 保護 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) 以形成 (<aS)-<a[[(1,1-二甲基乙氧基) 羰基] 胺基]-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸, (VI) 式 VI 酸

於裝有溫度探頭以及酸鹼度探頭之相分離器中將 (<aS)-<a-胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}] 癸烷-1-乙酸 (式 V) (469 克，2.08 莫耳) 溶於冰冷的 1 當量 NaOH (5 公升，5 莫耳，2.4 當量)。溶液中加入 THF (2.5 公升)。然後加入固體 BOC₂O 以及反應混合物在周圍溫度下攪拌大約 1 小時。攪拌加入 EtOAc (4 公升) 以及分離產生的水層及有機層。水層之酸鹼度用濃 HCl 調至 7。然後加入 EtOAc (4 公升) 以及再添加 HCl 降低酸鹼度至大約 1。加入之濃 HCl 總體積是 510 毫升。再一次分離有機層和水層以及水層是用 EtOAc 萃取 (3 x 3 公升)。然後合併有機層以及用水 (3 公升) 以及濃鹽水 (3 公升) 清洗。然後將清洗的有機層用

Na₂SO₄ 乾燥以及在室溫下用旋轉蒸發濃縮直到乾燥。產生 542 克 (<aS)-<a[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸 (式 VI)。

實施例 37

偶合反應製造 3-胺羰基-(<aS)-<a-(3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-<b-酮基-(1S,3S,5S)-2-吡雙環 [3.1.0]己烷-2-乙烷胺基甲酸, 1,1-二甲基乙基酯 (式 K)

於裝有溫度計、機械攪拌器以及氣體入口之 2 升三頸燒瓶中加入 (<aS)-<a[[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸 (式 VI) (50 克, 153.8 毫莫耳)。加入 THF (200 毫升) 以及攪拌至產生澄清溶液。溶液在丙酮乾冰浴中冷卻至 -6℃。然後加入單一部分的甲磺醯基氯化物 (Mes-Cl) (13.1 毫升, 169 毫莫耳, 1.1 當量)、跟從加入二異丙基乙胺 (94 毫升, 539 毫莫耳, 1.1 當量)。於約 4 分鐘期間內保持這內部的溫度低於 8℃ 緩慢的加入二異丙基乙胺。反應混合物在 0℃ 下攪拌直到所有的酸轉換成混合的酸酐。然後加入單一部分的 (1S,3S,5S)-2-吡雙環 [3.1.0]己烷-3-羧醯胺 氯化氫鹽 (32.5 克, 200 毫莫耳, 1.1 當量) 以及羥基苯並三唑 (HOBT) (1.04 克, 7.6 毫莫耳, 0.05 當量) 以及將燒瓶自冷卻水浴中移除。反應混合物在室溫下攪拌 2 小時, 然後在室溫下靜置過夜。

實施例 38

以 BOC 保護 (α S)- α -胺基-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸 (式 V) 以形成 (α S)- α -[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸, (VI) 式 VI 酸, 1,4-二吡雙環 [2.2.2]辛烷鹽 (式 VIA)
式 VIA (DABCO 鹽)

將 1,4-二吡雙環 [2.2.2]辛烷 (DABCO) (15 克; 125.1 毫莫耳) 加到約 30 克 (135 毫莫耳) 實施例 36 式 VI 酸之 300 毫升的乙酸異丙酯溶液中。將乙酸乙酯 (150 毫升) 加到上述反應混合物中 (體積比例為乙酸乙酯: 乙酸異丙酯 (150 毫升/300 毫升))。反應混合物中種入式 VIA DABCO 鹽 (200 毫克)。反應混合物在室溫下激烈地攪拌。反應混合物中緩慢的加入水 (5 毫升) 以及將反應混合物在室溫下激烈地攪拌 15-20 分鐘之後誘發結晶形成。反應混合物在室溫下攪拌 16 小時以及將反應產物用布赫勒爾漏斗過濾。固體用乙酸乙酯在室溫下清洗以及在真空、50℃ 下乾燥以生成 47 克 (79%) 式 VIA DABCO 鹽。

實施例 39

偶合反應製造 3-胺羰基-(α S)- α -(3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)- β -酮基-(1S,3S,5S)-2-吡雙環 [3.1.0]己烷-2-乙烷胺基甲酸, 1,1-二甲基乙基酯 (式 K)

於裝有溫度計、機械攪拌器以及氣體入口之 250 升三頸燒瓶中加入 (α S)- α -[(1,1-二甲基乙氧基)羰基]胺基]-3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-乙酸 (式 VIA) (5 克, 11.44 毫

莫耳，製備於實施例 38)。加入 THF(25 毫升)以及攪拌至產生泥漿。泥漿在冰浴中冷卻至 0℃。然後加入單一部分的甲磺醯基氯化物(Mes-Cl)(11.5 毫升，14.85 毫莫耳，1.3 當量)、跟從加入二異丙基乙胺(94 毫升，40 毫莫耳，3.5 當量)。於約 4 分鐘期間內保持這內部的溫度低於 5℃緩慢的加入二異丙基乙胺。

反應混合物在 0℃下攪拌 10 分鐘直到所有的酸轉換成混合的酸酐。然後加入單一部分的(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-3-羧醯胺氯化氫鹽(2.42 克，14.9 毫莫耳，1.3 當量)以及羥基苯並三唑(HOBT)(77 毫克，0.57 毫莫耳，0.05 當量)以及將燒瓶自冷卻水浴中移除。反應混合物在室溫下攪拌 2 小時以及然後在室溫下靜置過夜。

實施例 40

脫水以及水解反應製造 3-氰基-(<aS)-<a-(3-羥基三環[3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-<b-酮基-(1S,3S,5S)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-乙烷胺基甲酸，1,1-二甲基乙基酯(式 L)

將吡啶(6 當量，922 毫莫耳，74.6 毫升)加入實施例 39 之反應混合物中以及將反應混合物用冷卻水浴冷卻至 -8℃。然後在 6 分鐘內添緩慢的加入三氟乙酸酐(TFAA)(4 當量，616 毫莫耳，87 毫升)而保持溫度低於 10℃。反應在 24℃下攪拌 0.5 小時以及經由 HPLC 檢查(30 毫升，0.5 毫升 AcN，0.5 毫升 H₂O)實施例 37 化合物 K 之消失。

然後用冷卻水浴冷卻反應至大約 -3℃。反應在 10 分

鐘之內加入 NaOH (5 N, 6 當量, 0.925 莫耳, 185 毫升) (水溶液酸鹼度 = 9.9) 而維持反應溫度低於 10°C 。在 5 分鐘之內加入 K_2CO_3 (319 克, 15 當量, 溶於 510 毫升 H_2O) (溫度 = 8°C , aq. 酸鹼度 11.1) 水溶液。反應進行 7 小時 40 分鐘。經由 HPLC 檢驗 (30 微升, 0.5 毫升 AcN, 0.5 毫升 H_2O) 所有中間體水解後反應完全。

然後在反應混合物中加入 EtOAc (500 毫升) 以及分開水層及有機層。有機層用 500 毫升緩衝溶液清洗 (2 莫耳濃度 H_3PO_4 , 1 莫耳濃度 NaH_2PO_4)。將溫度從 15°C 升至 23°C ; 加入時間 : 5 分鐘, aq. V = 560 毫升, 酸鹼度 = 4.5, 32 毫克產物 (經 HPLC 檢驗); org V = 1,080 毫升。有機相用第二次 500 毫升緩衝溶液清洗; aq. V = 780 毫升, 酸鹼度 = 2.5, 415 毫克產物 (經 HPLC 檢驗); 有機的 V = 800 毫升, 1.02 v/v% 吡啶。有機相用 300 毫升濃鹽水清洗; aq. V = 350 毫升, 酸鹼度 = 1.8, 20 毫克產物 (經 HPLC 檢驗)。有機相用 130 毫升飽和 NaHCO_3 溶液清洗; aq. V = 176 毫升, 酸鹼度 = 6.0, 780 毫克產物。有機相用 300 毫升半飽和濃鹽水清洗; aq. V = 330 毫升, 酸鹼度 = 5.2, 25 毫克產物; 有機的 V = 650 毫升, 0.045 v/v% 吡啶。有機相中加入 5 克 Darco 並攪拌 5 分鐘, 經由 50 克矽土過濾, 4 x 25 毫升 EtOAc 清洗, 有機的 V = 750 毫升, 吡啶 0.04 v/v%。

蒸餾有機層至大約 133 毫升。攪拌有機層 1 小時直到溶液轉變成多雲狀。在 15 分鐘之內加入 133 毫升庚烷以

及將泥漿攪拌過夜。加入 133 毫升庚烷過夜。用機械性的攪拌猛烈的攪拌混合物 20 分鐘。過濾固體以及將濾餅用 50 毫升 5%EtOAc/庚烷清洗；母液去除溶劑之後在 8.86 克粗糙產物中發現 3.4 克產物。將乾燥產物加熱至 50℃、在真空下過夜結晶。得到 467 克產物，約 73%，96.6AP。

實施例 41

去保護產生 (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-胺基-2-(3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)-1-酮基乙基]-2-吡雙環 [3.1.0]己烷-3-腓，苯甲酸鹽 (1:1)(式 M)。

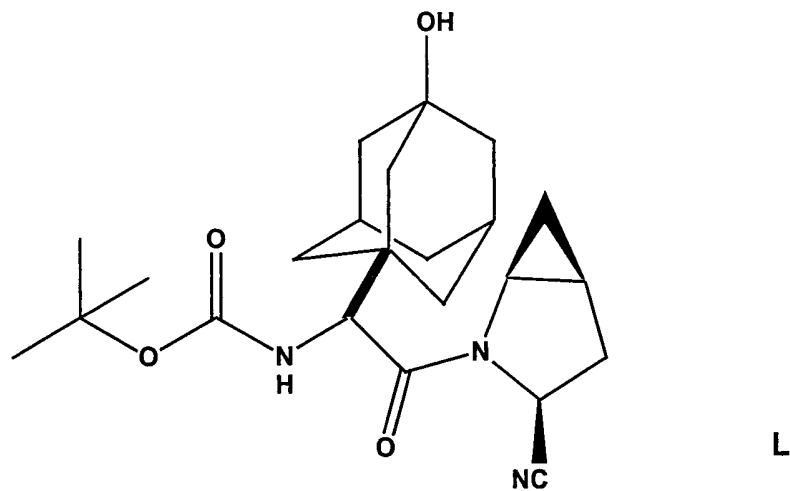
將 3-氰基-(α S)- α -(3-羥基三環 [3.3.1.1^{3,7}]癸烷-1-基)- β -酮基-(1S,3S,5S)-2-吡雙環 [3.1.0]己烷-2-乙烷胺基甲酸，1,1-二甲基乙基酯(式 L)(5.0 克，12.04 毫莫耳)加入裝有溫度計、機械攪拌器、以及氣體入口之三頸燒瓶。加入 EtOAc(大約 45 至 50 毫升)達成澄清溶液。在室溫下加入濃 HCl(3.00 毫升，37%w/w%，36.14 毫莫耳，3 當量)以及將反應混合物攪拌直到固體產生。然後加入水(30 毫升)以及將混合物攪拌 1 至 2 分鐘。將反應混合物轉移至分液漏斗以及容許反應混合物分層。將水層用 25%NaOH 調至較低的酸鹼度大約 6 而維持溫度低於 25℃。

然後添加異丙醇(IPA；2 至 3 毫升)，接著添加苯(甲)酸鈉(0.65 毫升苯(甲)酸鈉溶液，其製備係溶解 2.6 克苯(甲)酸鈉於 6.5 毫公升水)至水層進行鹽交換。然後經由添加漏斗逐滴加入剩餘之苯(甲)酸鈉溶液。產生的反應混合

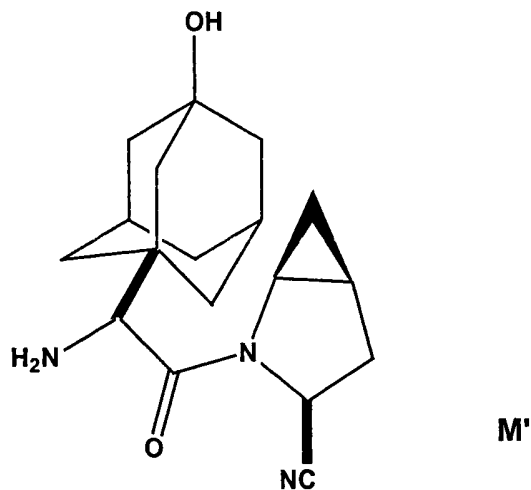
物在室溫下攪拌 16 至 24 小時。然後用平底漏斗過濾反應混合物固體，用水清洗直到固體用 AgNO_3 產生 Cl^- 之陰性測驗。然後用庚烷 (10 毫升) 清洗固體趕走水，在漏斗上空氣乾燥，在 35°C 、真空乾燥箱中乾燥直到 $\text{KF} < 5\%$ 。產生 79%，4.1 克。

實施例 42

去保護 L

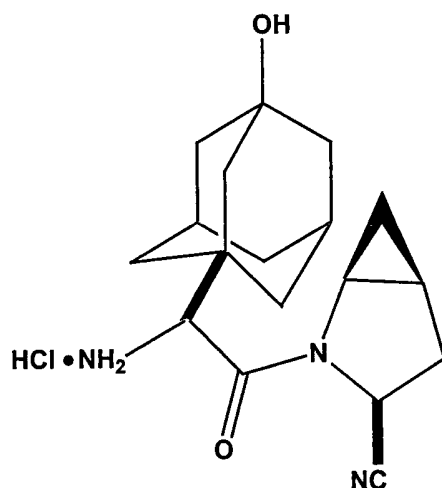


以產生自由鹼 M'



將實施例 40 化合物(L)(300 公克, 0.723 莫耳, 效能 90.6%)、二氯甲烷(3 公升)、甲醇(288 毫升, 7.23 莫耳)以及濃(36%)鹽酸(288 毫升, 7.23 莫耳)加入裝有機械攪拌器、溫度探頭以及 N₂ 氣體入口之 3-頸 12 公升燒瓶。發生反應而維持反應溫度在介於約 20 至約 25℃ 之內。攪拌反應混合物 18 小時, 分成 2 相以及收集頂端水層。水層中加入二氯甲烷(6 公升)、及水(720 毫升)、以及逐滴加入 5 當量濃度 NaOH(-P600 毫升)調整酸鹼度至 9.0-10.5。

內含氯化氫鹽(經 HPLC 確認)



之有機相(式 L')用二氯甲烷(6 公升)以及水(720 毫升)處理, 以及逐滴加入 5 當量濃度氫氧化鈉溶液而維持反應溫度介於 20 至 25℃ 之間調整酸鹼度至介於 9 至 10.5 之間。加入 NaCl(120 克)以及將混合物攪拌 20 分鐘以形成分相。收集有機層(6.2 公升)(內含 - 174 克化合物 M')以及丟棄水層(1.75 公升)(內含 6.5 克化合物 M')。

有機層用 1%NH₄Cl 濃鹽水溶液清洗(450 毫升)。(1 當量濃度 NH₄Cl 濃鹽水內含 1 克 NH₄Cl, 25 克 NaCl 以及 74

克 H_2O)。從分相中回收 6.0 公升有機層(內含 - 176 克化合物 M' 之溶液)以及丟棄內含 1.4 克化合物 M' (-0.4%)之水層(0.45 公升)。

有機層中加入乙酸乙酯(-4 公升)而在 25°C /50 毫米水銀汞柱下蒸餾去除 CH_2Cl_2 。最終體積達成 2.5 公升時停止蒸餾。過濾有機層去除固體 NaCl 以及濃縮至 -1 公斤(-170 克化合物 M' 之 1 公升乙酸乙酯)，GC 分析： $\text{DCM}<0.1\%$ 。逐滴加入水(17 毫升)以及 10 分鐘之後開始結晶。加入 17 毫公升水以及將產生的泥漿攪拌 30 分鐘、過濾，將濾餅用乙酸乙酯清洗以及在室溫、真空下乾燥以生成 186 克單水合物化合物 M'' ，產率 81%。

序列表

<110> Bristol-Myers Squibb 公司

<120> 用以製造二肽基肽酶 IV 抑制劑以及其中間物之方法
與化合物

<130> LA0084

<160> 4

<170> PatentIn 版本 3.1

<210> 1

<211> 26

<212> 脫氧核糖核酸

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

tcgtcatgaa aatcgttctc gttttg

<210> 2

<211> 28

<212> 脫氧核糖核酸

<213> 人工的序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

tactgttttt ccagcgtatt cctaggct

200914419

<210> 3
<211> 33
<212> 脫氧核糖核酸
<213> 人工的序列

<220>
<223> 合成的

<400> 3
gatgctcata tgcgcgacgt gtttgaaatg atg

<210> 4
<211> 30
<212> 脫氧核糖核酸
<213> 人工的序列

<220>
<223> 合成的

<400> 4
gatcccgggc taaggcgaat taataattcg

五、中文發明摘要

發明之名稱：用以製造二肽基肽酶 IV 抑制劑之方法與化合物及其中間體

本發明提供用於製造以環丙基稠合吡咯啉為主結構的二肽基肽酶 IV 抑制劑之方法與化合物。

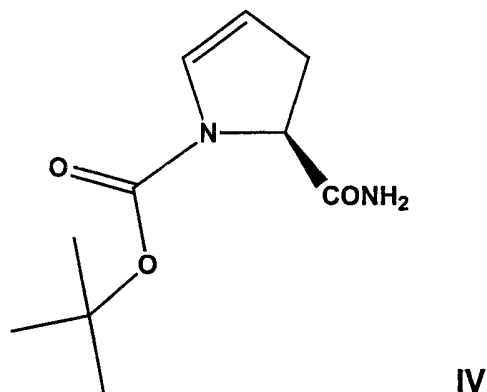
六、英文發明摘要

發明之名稱： METHODS AND COMPOUNDS FOR
PRODUCING DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV
INHIBITORS AND INTERMEDIATES
THEREOF

Methods and compounds for production of cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV are provided.

十、申請專利範圍

1. 一種化合物，包含構造式 IV，



2. 一種用以製備 (5S)-5-胺羰基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯 (IV) (如申請專利範圍第 9 項定義) 之方法，其係包含

提供 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯之鹼金屬鹽，以及

將此酸鹼度低於 7 之鹼金屬鹽溶液和 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基嗎福啉正離子氯化物以及和鹼反應以形成 (5S)-5-胺羰基-4,5-二氫-1H-吡咯-1-羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯 (IV)。

3. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中鹼金屬鹽是用氨水(鹼)處理。

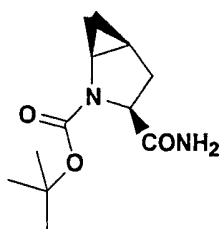
4. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中鹼金屬鹽之形成係將 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯二環己胺鹽和鹼金屬鹼反應以形成對應的鹼金屬鹽。

5. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中鹼酸，1-

(1,1-金屬鹽之形成係提供 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯乙基酯 XI，並將此乙基酯和乙醇、氫氧化鈉反應。

6. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中二環己胺鹽之製備係將 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)酯之乙醇與甲苯溶液和氫氧化鈉反應以形成對應的鈉鹽，以及將此鈉鹽和第三丁基甲醚以及庚烷反應以形成鈉鹽溶液，降低鈉鹽溶液之酸鹼度至約 2.5 至 3 而維持溫度 $<5^{\circ}\text{C}$ ，分離產生的有機層，以及將有機層和二環己胺反應以形成對應的二環己胺鹽。

7. 一種製備 [1S-(1<a,3<b,5<a)]-3-(胺羰基)-2-吡雙環 [3.1.0]己烷-2-羧酸，1-二甲基乙基酯之方法，其構造為



其係包含

在約 -30°C 至約 0°C 之溫度將 4,5-二氫-1H-吡咯-1,5-二羧酸，1-(1,1-二甲基乙基)，5-乙基酯溶液與二乙基鋅以及氯碘甲烷反應及以形成 N-BOC-甲橋脯胺酸乙基酯正-及反-同分異構物之混合物，將上述同分異構物混合物和甲基胺水溶液反應以分離正-N-BOC-4,5-甲橋脯胺酸乙基酯異構體，

將正-異構體和強鹼反應產生正-N-BOC-4,5-甲橋脯胺

酸，以及將正-N-BOC-4,5-甲橋脯胺酸和 N-甲基嗎福啉以及異丁基氯甲酸酯、濃鹽水以及氨水反應以形成 [1S-(1<a,3<b,5<a)-3-(胺羰基)-2-吡雙環[3.1.0]己烷-2-羧酸, 1,1-二甲基乙基乙基酯。

七、 指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：第() 圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

