



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103215320 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201310089304. 5

C12N 9/04(2006. 01)

(22) 申请日 2005. 04. 13

C07C 271/22(2006. 01)

(30) 优先权数据

C07C 269/04(2006. 01)

60/561, 986 2004. 04. 14 US

C12R 1/19(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

(56) 对比文件

200580019512. 1 2005. 04. 13

WO 2004/052850 A2, 2004. 06. 24, 说明书实施例 1, 实施例 8A, 说明书第 13-14 页.

(73) 专利权人 阿斯利康(瑞典)有限公司

WO 00/04179 A1, 2000. 01. 27, 全文.

地址 瑞典南泰利耶

审查员 苗荻

(72) 发明人 迈克尔. 波利蒂诺 马修. M. 卡丁

保罗. M. 斯科尼兹尼 贾森. G. 陈

(74) 专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事

务所(特殊普通合伙) 11484

代理人 张永新

(51) Int. Cl.

C12P 13/04(2006. 01)

权利要求书2页 说明书40页

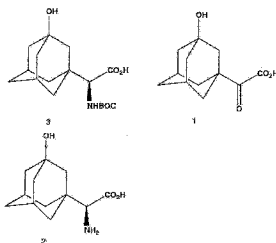
(54) 发明名称

制备二肽基肽酶 IV 抑制剂的方法及用于该制备方法的中间体

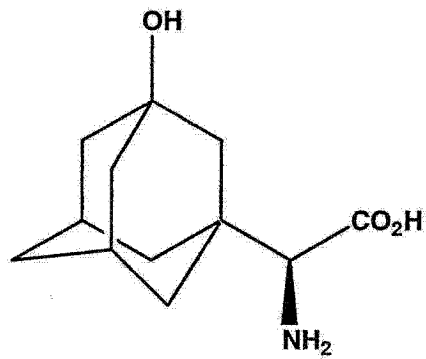
(57) 摘要

本发明涉及制备二肽基肽酶 IV 抑制剂的方法及用于该制备方法的中间体, 具体的涉及提供一种制备二肽基肽酶 IV 的基于环丙基稠合的吡咯烷的抑制剂的方法, 其采用具有结构 3 的经 BOC- 保护的胺, 该经 BOC- 保护的胺如下制备: 使用甲酸铵、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、二硫苏糖醇及部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶的酶浓缩物 (PDH/FDH) 处理结构 1 的酸, 使该酸进行还原胺化反应, 且在不离析的情况下使用二碳酸二叔丁酯处理所生成的结构 2 的胺, 以形成经 BOC- 保

护的胺。



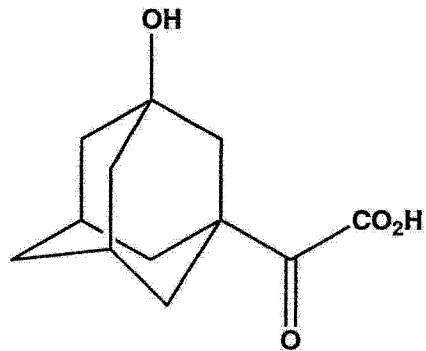
1. 一种制备式 2 结构的胺的方法，



式 2

其包括

a. 使用甲酸铵、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、二硫苏糖醇及部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶 (PDH/FDH) 处理式 1 结构的酮酸的水溶液 ; 及



式 1

b. 使用氢氧化钠调节反应混合物的 pH 以形成基本上不含有不希望的过量铵离子的所需的胺 ;

其中所述部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶 (PDH/FDH) 是通过包括如下的方法制备的 :

A. 制备能够产生苯丙氨酸脱氢酶及甲酸脱氢酶的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的发酵培养液 ;

B. 在 8000 至 30,000psi 范围内的压力下对该培养液进行微流体化, 同时保持该培养液的温度在 4 至 30°C 的范围内, 以从所得的细胞中释放出活性且形成含有苯丙氨酸脱氢酶及甲酸脱氢酶的微流体化培养液 ;

C. 经由使用絮凝剂处理该培养液以凝结细胞碎屑并除去 DNA 和不需要的蛋白质而澄清该培养液 ;

D. 过滤该澄清的培养液 ; 及

E. 浓缩该培养液以得到具有对于苯丙氨酸脱氢酶为至少 400IU/ 毫升和对于甲酸脱氢酶为至少 20IU/ 毫升的苯丙氨酸脱氢酶及甲酸脱氢酶活性的部分纯化的酶浓缩物。

2. 权利要求 1 的方法, 其中进行调节反应混合物的 pH 的步骤以将反应混合物的 pH 维

持在 7.0 至 8.6。

3. 权利要求 1 的方法,其中进行调节反应混合物的 pH 的步骤以将反应混合物的 pH 维持在 8.0 ± 0.2 。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中以这样的量添加甲酸铵,以提供 1.9:1 至 2.5:1 的范围内的甲酸铵:式 1 酸的摩尔比例。

5. 权利要求 4 的方法,其中以这样的量添加烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,以提供 500:1 至 1500:1 的范围内的 NAD:式 1 酸的摩尔比例。

6. 权利要求 1 的方法,其中将该式 1 结构的酮酸、甲酸铵、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、二硫苏糖醇及部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶/甲酸脱氢酶的水溶液加热到 35 至 40°C 的温度且将其 pH 维持在 7.8 至 8.2 的范围内达 24 至 48 小时,以制备该胺。

7. 权利要求 1 的方法,其中在 12,000 至 20,000psi 范围内的压力下对该培养液进行微流体化。

8. 权利要求 1 的方法,其中该苯丙氨酸脱氢酶得自芽孢八叠球菌属 (*Sporosarcina*) 或热放线菌属 (*Thermoactinomyces*)。

9. 权利要求 1 的方法,其中该苯丙氨酸脱氢酶得自中间型嗜热放线菌 (*Thermoactinomyces intermedius*)。

10. 权利要求 1 的方法,其中该苯丙氨酸脱氢酶得自中间型嗜热放线菌 ATCC 33205,其在大肠杆菌或巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中表达。

11. 权利要求 1 的方法,其中该苯丙氨酸脱氢酶是在大肠杆菌中表达的中间型嗜热放线菌 ATCC 33205 的苯丙氨酸脱氢酶,且该甲酸脱氢酶是在大肠杆菌中表达的巴斯德毕赤酵母 ATCC 20864 的甲酸脱氢酶。

12. 权利要求 1 的方法,其中该澄清的培养液是经超滤的。

制备二肽基肽酶 IV 抑制剂的方法及用于该制备方法的中间体

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 04 月 13 日,申请号为 200580019512.1(国际申请号为 PCT/US2005/012615),名称为“制备二肽基肽酶 IV 抑制剂的方法及用于该制备方法的中间体”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本申请要求 2004 年 4 月 14 日提交的美国临时申请 No. 60/561,986 的优先权,其全部公开内容通过引用并入本文。

[0003] 本发明涉及一种制备 $(\alpha S)-\alpha-((1,1\text{-二甲基乙氧基})羰基)-\text{氨基})-3\text{-羟基三环}(3.3.1.1^{3,7})\text{癸烷}-1\text{-乙酸}$ 的方法,该酸可用作中间体以制备二肽基肽酶 (dipeptidyl peptidase) IV 的基于环丙基稠合的吡咯烷的抑制剂,该抑制剂可用来治疗糖尿病和其并发症、高糖血症、症候群 X、高胰岛素血症、肥胖症及动脉粥样硬化和相关疾病,以及免疫调制性疾病与慢性炎症肠病。

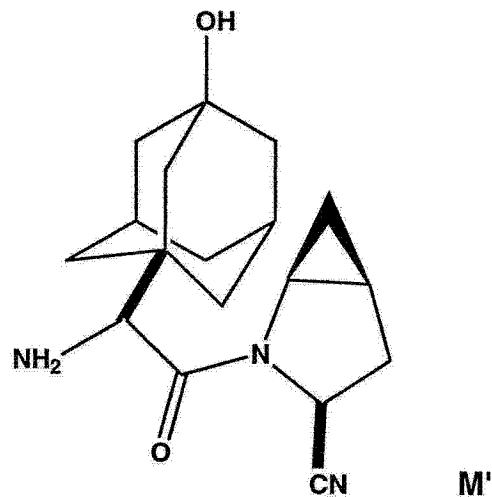
背景技术

[0004] 二肽基肽酶 IV 为经膜结合的非经典丝氨酸氨基肽酶,其存在于多种组织之中,包括,但不限于,肠、肝、肺和肾之中。此酶也位于循环 T-淋巴细胞之上,在其中称为 CD-26。二肽基肽酶 IV 负责内源性肽酶 GLP-1(7-36) 和胰高血糖素的活体内 (in vivo) 代谢性切断且对其它肽类例如 GHRH、NPY、GLP-2 和 VIP 展现出体外蛋白水解活性。

[0005] GLP-1(7-36) 为一种衍生自胰高血糖素在小肠内的后转译处理的 29 个氨基酸肽酶。此肽酶在活体内具有多种作用。例如, GLP-1(7-36) 可刺激胰岛素分泌及抑制胰高血糖素分泌。此肽酶可促进饱食及减缓胃排空。通过连续注射从外面投予 GLP-1(7-36) 业经证明对糖尿病患者有效用。不过,外源肽对于连续治疗用途而言降解太快速。

[0006] 二肽基肽酶 IV 抑制剂业经开发出以加强 GLP-1(7,36) 的内源含量。给 Hamann et al. 的美国专利第 6,395,767 号公开了二肽基肽酶 IV 的基于环丙基稠合的吡咯烷的抑制剂。化学合成这些抑制剂所用方法公开于美国专利第 6,395,767 号及文献中。例如,可参阅 Sagnard et al. Tet-Lett. 1995 36 :3148-3152 ;Tverezovsky et al. Tetrahedron 1997 53 :14773-14792 ;及 Hanessian et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998 8 :2123-2128。在美国专利第 6,395,767 号中公开的一优选抑制剂为 $(1S, 3S, 5S)-2-((2S)-2\text{-氨基}-2-(3\text{-羟基三环}(3.3.1.1^{3,7})\text{癸}-1\text{-基})-1\text{-酮基乙基})-2\text{-氮杂双环}(3.1.0)\text{己烷}-3\text{-甲腈}((1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2\text{-amino}-2-(3\text{-hydroxytricyclo}[3.3.1.1^{3,7}]\text{dec}-1\text{-yl})-1\text{-oxoethyl}]-2\text{-azabicyclo}[3.1.0]\text{hexane}-3\text{-carbonitrile})$, 如式 M' 所示,

[0007]



[0008] 以及 (1S, 3S, 5S)-2-((2S)-2-氨基-2-(3-羟基-三环(3.3.1.1^{3,7})癸-1-基)-1-酮基乙基)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲腈的相应的一水合物(M^{''})。

[0009] 适于用来制备此二肽基肽酶 IV 抑制剂的生产中所用中间体的方法公开在 EP0808824A2 中。也可参阅, Imashiro and Kuroda Tetrahedron Letters 2001 42: 1313-1315, Reetz et al. Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18:72; Reetz and Heimbach Chem. Ber. 1983 116:3702-3707; Reetz et al. Chem. Ber. 1983 116:3708-3724。

[0010] 本发明提供新的制造方法和化合物用以制备二肽基肽酶 IV 的基于环丙基耦合的吡咯烷的抑制剂。

[0011] Hamann 等人的美国专利第 6, 395, 767 号描述 (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-乙酸的合成方法, 该化合物是用于制备其游离碱 M['] 或其盐的中间体, 该方法包括从金刚烷羧酸的八个合成步骤。

[0012] 2003 年 11 月 18 日提交的美国申请 No. 10/716, 012 (代理人档号 LA84NP) 揭示一种制备 (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-乙酸的方法, 其是利用 3-羟基-α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸作为起始物且其中使用酶还原胺化来制备且离析 (α S)-α -氨基-3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸; 其在另一步骤中转化为所需产物。

[0013] 该酶还原胺化步骤包括在甲酸铵、DTT 和 NAD 的存在下使用多种形式的酶苯丙氨酸脱氢酶 (PDH), 组合以酶—甲酸脱氢酶 (FDH), 并使用氢氧化铵来调节 pH。在含有过量的铵离子的情况中, 可能在后续下游处理之前需要除去氨以避免对 BOC 基导入的可能干扰。

[0014] 产生 PDH 及 / 或 FDH 酶的细胞从发酵培养液中离析出来, 且贮存到要使用为止。在使用之前, 将细胞微流体化以将酶与细胞碎屑从细胞中释放出, 在酶准备用于还原胺化之前, 必须将细胞碎屑除去。

发明内容

[0015] 根据本发明, 提供一种制备部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶及 / 或甲酸脱氢酶 (PDH / FDH) 浓缩物的方法, 其包括下列步骤:

[0016] a. 制备能够产生苯丙氨酸脱氢酶及 / 或甲酸脱氢酶的微生物的发酵培养液;

[0017] b. 对该培养液施予微流体化以从所得的细胞中释放出活性且形成含有 PDH 及 / 或

FDH 活性的微流体化的培养液；

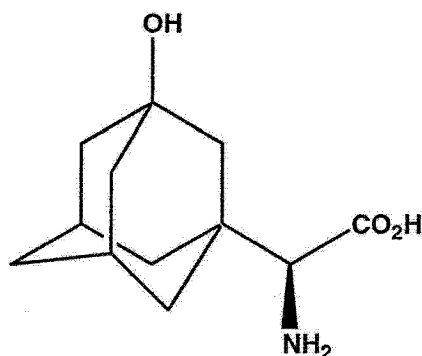
[0018] c. 经由使用絮凝剂处理该培养液以凝结细胞碎屑并除去 DNA 和不希望的蛋白质而澄清该培养液；

[0019] d. 过滤该澄清的培养液；及

[0020] e. 浓缩该培养液以得到具有对于 PDH 为至少约 400IU/ 毫升和对于 FDH 为至少约 20IU/ 毫升的 PDH/FDH 活性的部分纯化的酶浓缩物。

[0021] 此外, 根据本发明, 提供一种制备结构 2 的胺的方法

[0022]

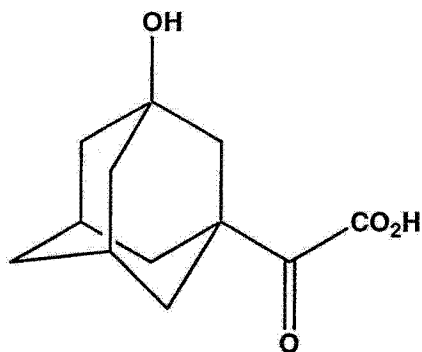


[0023] 式 2

[0024] 其包括下列步骤：

[0025] a. 使用最多约 2 摩尔当量的甲酸铵、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、二硫苏糖醇及部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶 (PDH/FDH) 处理结构 1 酮酸的水溶液；及

[0026]

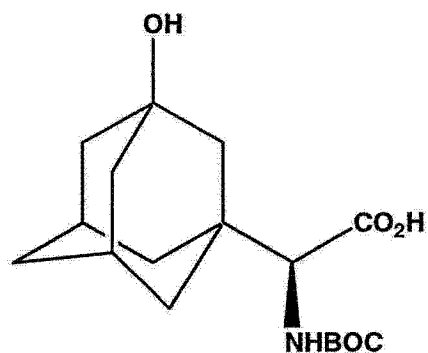


[0027] 式 1

[0028] b. 使用氢氧化钠维持反应的 pH 在约 7.0 至约 8.6, 优选在 8.0+/-0.2 以形成基本上不含有不希望的过量铵离子的所需的胺。

[0029] 根据本发明, 还提供一种制备结构 3 的经 BOC- 保护的胺的方法

[0030]

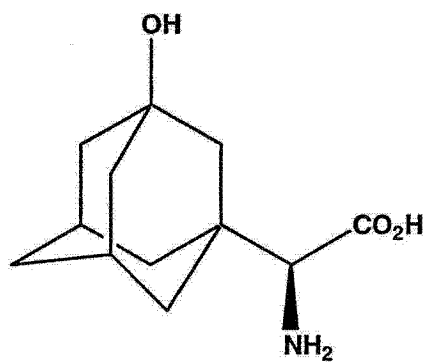


[0031] 式 3

[0032] 其包括下列步骤

[0033] a. 提供下述结构的氨基酸 (α S)- α -氨基-3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸的水溶液

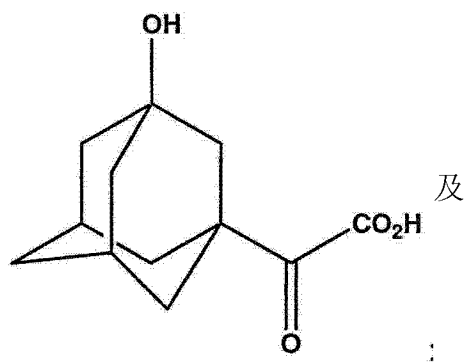
[0034]



[0035] 式 2

[0036] (是在上述酮酸 1 的还原胺化中采用部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶而制备的)

[0037]

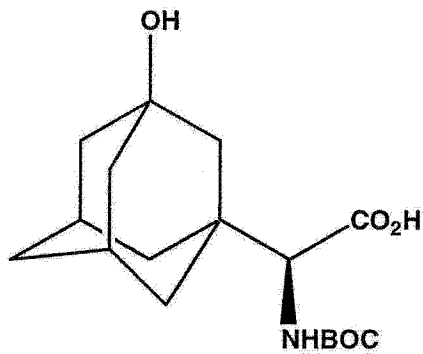


[0038] 式 1

[0039] b. 使用二碳酸二叔丁酯处理上述水溶液以形成该经 BOC-保护的胺。

[0040] 在本发明另一实施方式中,提供一种制备结构 3 的经 BOC-保护的胺的方法

[0041]

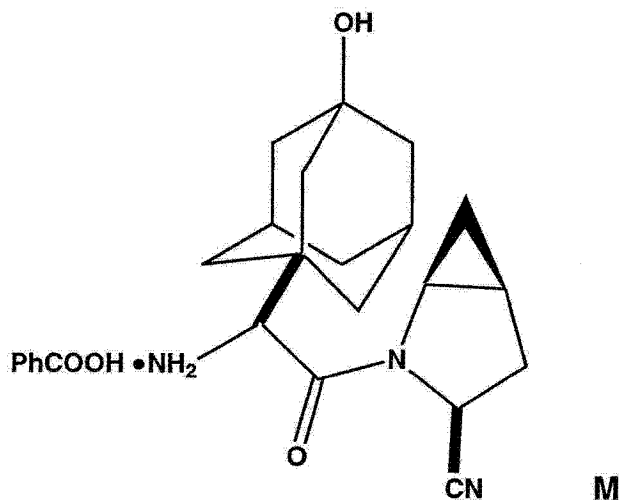


[0053] 式 3

[0054] 本发明方法是经由采用部分纯化的酶且使用氢氧化钠而非氢氧化铵来调节 pH 而提供明显改良的处理程序, 不需要离析中间体, 因而减短处理时间且促成经晶产物的离析。此外, 本发明方法提供部分纯化的 PDH/FDH 酶的制备, 其使用的反应条件允许存在在下游处理中不会干扰引入 BOC 基的最少量的铵离子。再者, 在式 1 酸的还原胺化中使用部分纯化的 PDH/FDH 酶浓缩物可免除在生物转化反应之后, 对上述式 2 氨基酸中间体的树脂柱离析的需要。反应物流足够纯净 (不含细胞碎屑且具有减少的蛋白质含量) 可直接继续进行 BOC 反应, 及所得的所需 BOC- 保护的中间体的萃取和结晶。

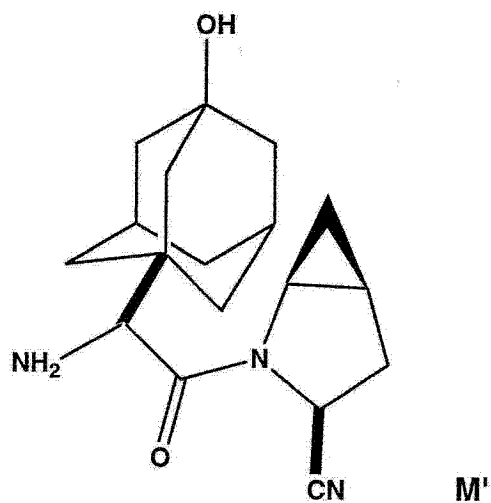
[0055] 在一优选实施方式中, 在本发明制造如式 M 所示的二肽基肽酶 IV 抑制剂 (1S, 3S, 5S)-2-((2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7}))癸-1-基)-1-酮基乙基)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲腈, 苯甲酸盐 (1:1),

[0056]



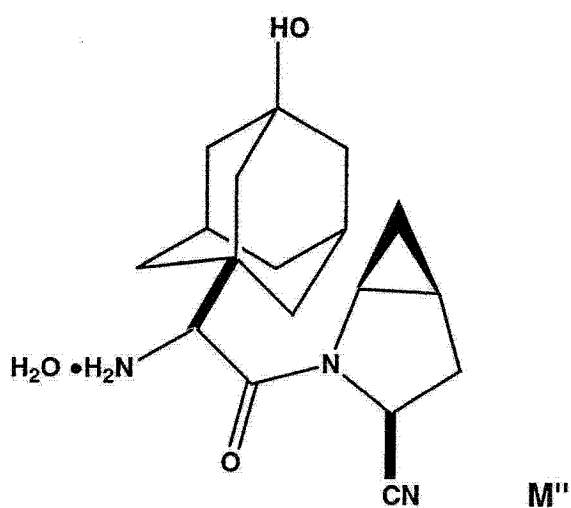
[0057] 或其游离碱 M',

[0058]



[0059] 及其一水合物 M''

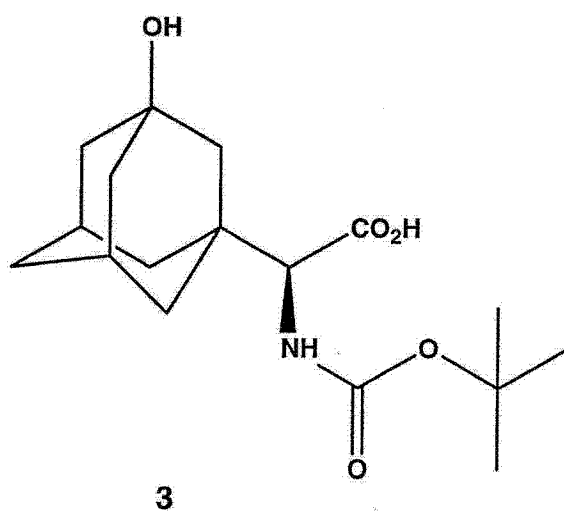
[0060]



[0061] 的方法中使用经 BOC- 保护的化合物 3 作为中间体。

[0062] 这些抑制剂最终是由两片断偶合而形成, 亦即式 3 中所示的经 BOC- 保护的 (α S)-α -氨基 -3- 羟基三环 (3. 3. 1. 1^{3,7}) 癸烷 -1- 乙酸

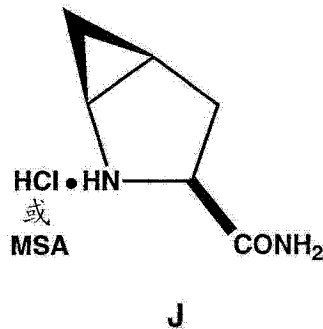
[0063]



[0064] (采用根据本发明制备的部分纯化的 PDH/FDH 酶制备), 及式 J 中所示的

(1S, 3S, 5S)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲酰胺酸盐例如盐酸盐或甲磺酸盐(甲磺酰(mesy1)或MSA盐)

[0065]



[0066] 基于环丙基稠合的吡咯烷的化合物例如(1S, 3S, 5S)-2-((2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸-1-基)-1-酮基乙基)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲腈, 苯甲酸盐(1:1)和其相应的游离碱和一水合物都是二肽基肽酶IV抑制剂, 可用来治疗糖尿病和其并发症、高糖血症、症候群X、高胰岛素血症、肥胖症、及动脉粥样硬化和相关疾病, 以及免疫调制性疾病和慢性炎性肠病。在本发明中, 在基于环丙基稠合的吡咯烷的化合物例如(1S, 3S, 5S)-2-((2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸-1-基)-1-酮基乙基)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲腈, 苯甲酸盐(1:1)及其相应的游离碱和一水合物的制造中采用经BOC-保护的化合物(采用本发明部分纯化的PDH/FDH酶通过还原胺化方法制备的)。

[0067] 本发明还涉及如下方面:

[0068] 1. 一种制备部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶及/或甲酸脱氢酶(PDH/FDH)酶浓缩物的方法, 其包括:

[0069] a. 制备能够产生苯丙氨酸脱氢酶及/或甲酸脱氢酶的微生物的发酵培养液;

[0070] b. 对该培养液进行微流体化以从所得的细胞中释放出活性且形成含有PDH及/或FDH酶的微流体化培养液;

[0071] c. 经由使用絮凝剂处理该培养液以凝结细胞碎屑并除去DNA和不需要的蛋白质而澄清该培养液;

[0072] d. 过滤该澄清的培养液;及

[0073] e. 浓缩该培养液以得到具有对于PDH为至少约400IU/毫升和对于FDH为至少约20IU/毫升的PDH/FDH活性的部分纯化的酶浓缩物。

[0074] 2. 项1的方法, 其中在约12,000至约20,000psi的压力下对该培养液进行微流体化。

[0075] 3. 项1的方法, 其中在保持该培养液的温度低于约25°C的同时对该培养液进行微流体化。

[0076] 4. 项3的方法, 其中该培养液的温度保持低于约25°C。

[0077] 5. 项1的方法, 其中该苯丙氨酸脱氢酶得自芽孢八迭球菌属(Sporosarcina)或热放线菌属(Thermoactinomyces)。

[0078] 6. 项1的方法, 其中该苯丙氨酸脱氢酶得自中间型嗜热放线菌属(Thermoactinomyces intermedius)。

[0079] 7. 项1的方法, 其中该苯丙氨酸脱氢酶得自中间型嗜热放线菌属ATCC33205, 其在

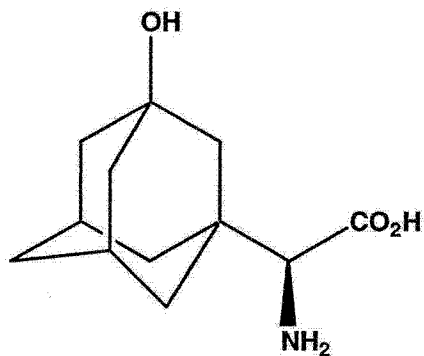
大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或巴斯德毕氏酵母 (*Pichia pastoris*) 中表达。

[0080] 8. 项 1 的方法, 其中该微生物为大肠杆菌 JM110 (pBMS2000-PPDFDH-PDH-mod)。

[0081] 9. 项 1 的方法, 其中该澄清的培养液是经超滤的。

[0082] 10. 一种制备结构 2 的胺的方法,

[0083]

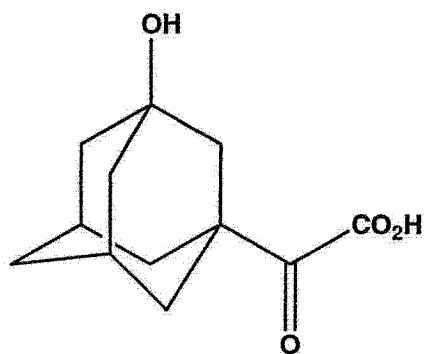


[0084] 式 2

[0085] 其包括

[0086] a. 使用甲酸铵、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、二硫苏糖醇及部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶 (PDH/FDH) 处理结构 1 的酮酸的水溶液; 及

[0087]



[0088] 式 1

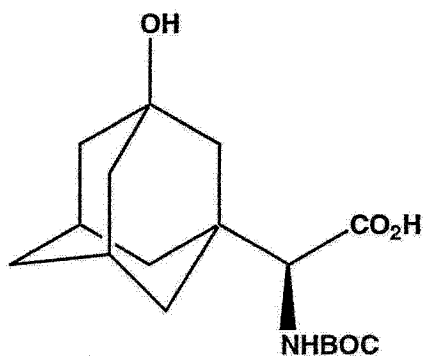
[0089] b. 使用氢氧化钠调节反应混合物的 pH 以形成基本上不含有不希望的过量铵离子的所需的胺。

[0090] 11. 项 10 的方法, 其中该部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶及 / 或甲酸脱氢酶是由项 1 的方法所制备。

[0091] 12. 项 10 的方法, 其中将该 3-羟基- α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸、甲酸铵、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、二硫苏糖醇及部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶的水溶液加热到约 35 至约 40°C 的温度且将其 pH 维持在约 7.8 至约 8.2 的范围内达约 24 至约 48 小时, 以制备该胺。

[0092] 13. 一种制备结构 3 的经 BOC-保护的胺的方法

[0093]

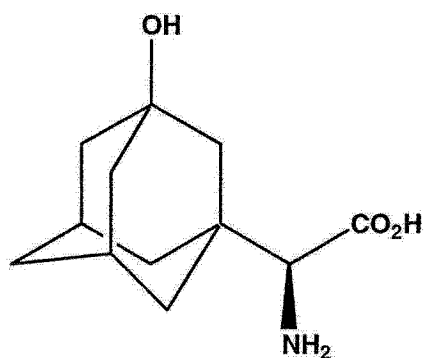


[0094] 式 3

[0095] 其包括

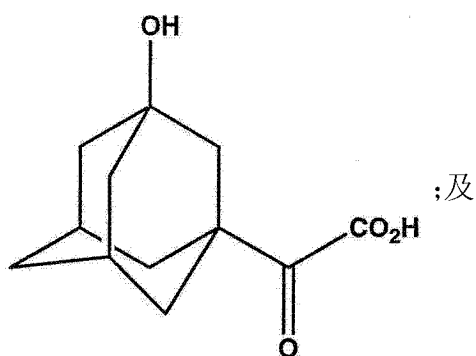
[0096] a. 提供下述结构的氨基酸 (α S)- α -氨基-3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸的水溶液

[0097]



[0098] 其是在项 12 所述的酮酸的还原胺化中使用部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶而制备的,

[0099]



;及

[0100] b. 使用二碳酸二叔丁酯处理上述水溶液以形成该经 BOC-保护的胺。

[0101] 14. 项 13 的方法,其中该 (α S)- α -氨基-3-羟基-三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸的水溶液和二碳酸二叔丁酯的混合物的 pH 维持在约 8.5 至约 12.5 的范围内。

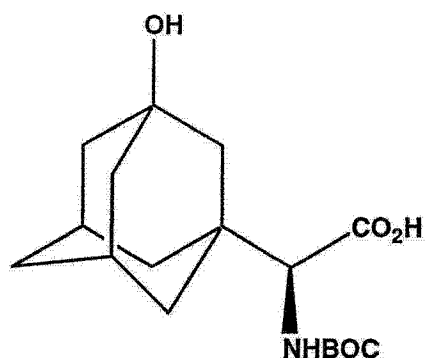
[0102] 15. 项 13 的方法,其进一步包括从该反应混合物中离析该经 BOC-保护的胺且对该经 BOC-保护的胺进行结晶的步骤。

[0103] 16. 一种通过项 1 的方法所制备的部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶。

[0104] 17. 一种部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶,其特征在于具有 PDH 和 FDH 活性。

[0105] 18. 一种制备结构 3 的经 BOC- 保护的胺的方法

[0106]



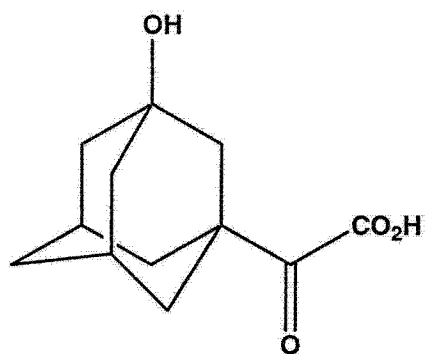
[0107] 式 3

[0108] 其包括

[0109] a. 制备部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶的酶浓缩物 ; 及

[0110] b. 使用甲酸铵、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、二硫苏糖醇及该部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶的酶浓缩物 (PDH/FDH) 处理结构 1 的酮酸的水溶液 ;

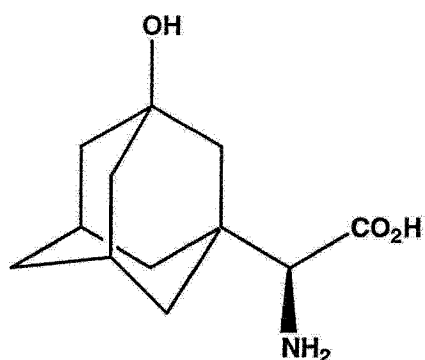
[0111]



[0112] 式 1

[0113] c. 使用氢氧化钠调节反应混合物的 pH 以形成基本上不含有不希望的大量铵离子的所需的胺 ; 及

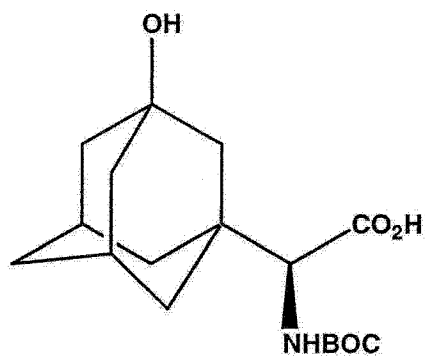
[0114]



[0115] 式 2

[0116] d. 在不离析该氨基酸中间体的情况下, 使用二碳酸二叔丁酯处理上述水溶液以生成以下结构的经 BOC- 保护的胺

[0117]



[0118] 式 3

[0119] 19. 项 18 的方法, 其中该部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶 / 甲酸脱氢酶经由下列步骤制备:

[0120] a. 制备能够产生苯丙氨酸脱氢酶和 / 或甲酸脱氢酶的微生物的发酵培养液;

[0121] b. 对该培养液进行微流体化以从所得的细胞中释放出活性且形成具有 PDH 及 / 或 FDH 活性的微流体化的培养液;

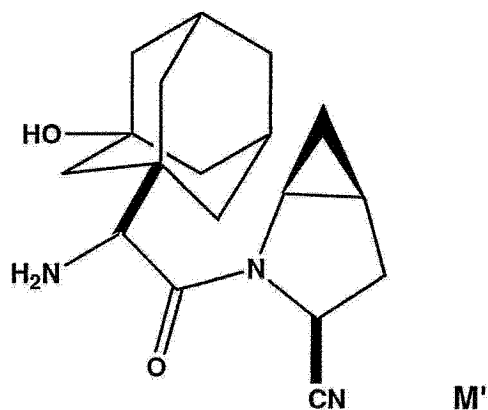
[0122] c. 经由使用絮凝剂处理该培养液以凝结细胞碎屑而澄清该培养液;

[0123] d. 过滤该澄清的培养液; 及

[0124] e. 浓缩该培养液以得到具有对于 PDH 为至少约 400IU/ 毫升和对于 FDH 为至少约 20IU/ 毫升的 PDH/FDH 活性的经纯化的酶浓缩物。

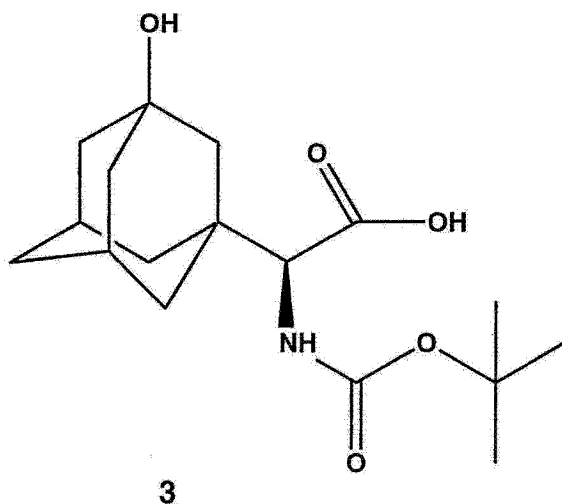
[0125] 20. 一种形成下述结构的游离碱化合物的方法,

[0126]



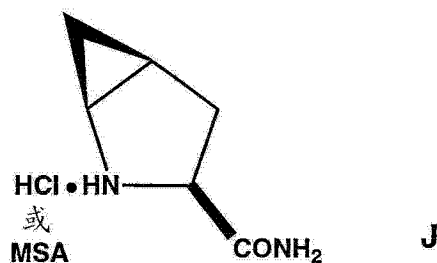
[0127] 该方法包括提供经项 13 的方法所制备的结构 3 的经 BOC 保护的化合物,

[0128]

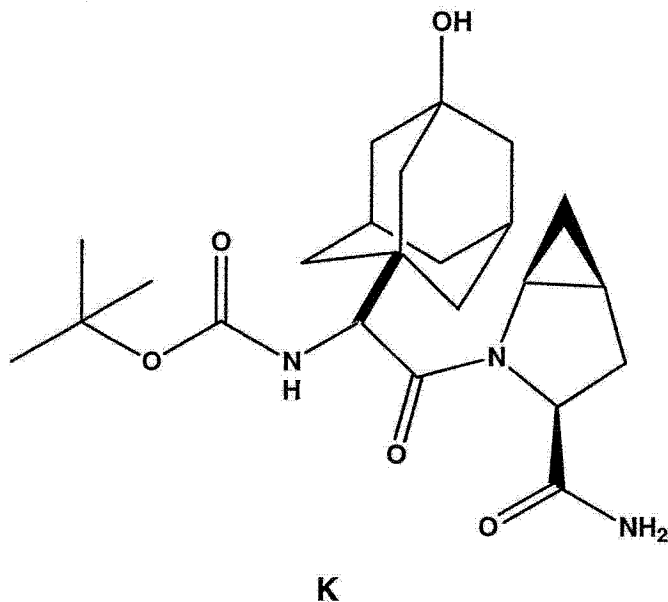


[0129] 使用甲磺酰氯、Hunig 碱、结构 J 的化合物及 1-羟基苯并三唑 (HOBT) 处理该经 BOC 保护的化合物以生成下述结构 K 的经 BOC 保护的中间体化合物

[0130]

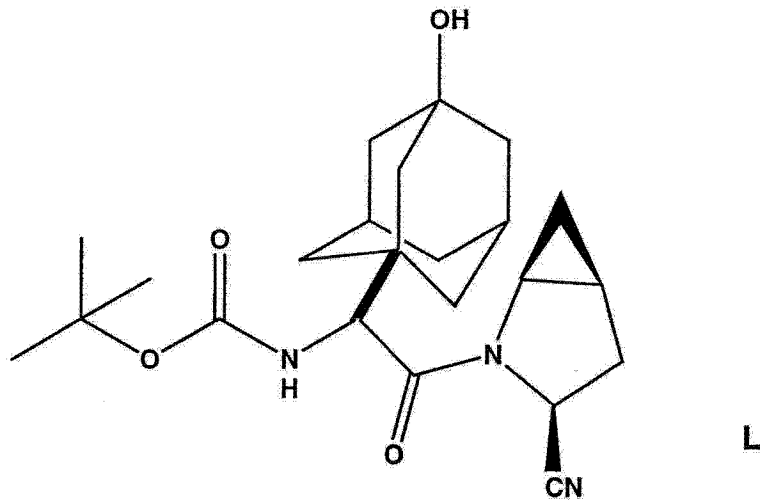


[0131]

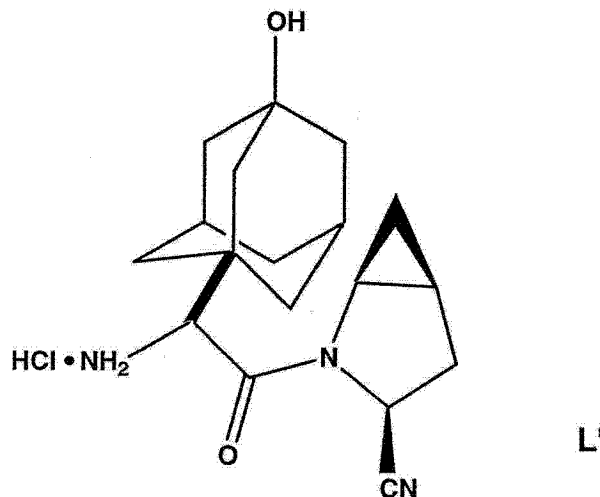


[0132] 在吡啶和三氟乙酸酐的存在下使该中间体 K 脱水,并随后在强碱的存在下水解所得的反应产物以生成化合物 L

[0133]



[0134] 使用盐酸处理化合物 L 以生成相应的盐酸盐 L' ;及
[0135]



[0136] 使用盐酸和氢氧化钠处理该化合物 L' 以生成游离碱化合物 M'。

具体实施方式

[0137] 在制备本发明的部分纯化 PDH/FDH 酶浓缩物的过程中,发酵表现 PDH 及 / 或 FDH 活性的微生物。将培养液保持在约 4℃ 至 30℃, 优选约 8℃ 至约 15℃, 更优选低于 40℃ 范围内的温度的同时,使发酵培养液通过在 8000 至约 30,000psi, 优选从约 12,000 至约 20,000psi 范围内的压力下操作的微流化器。整个培养液可优选地经由在培养液中添加过滤助剂例如硅藻土 (例如 Grefco Minerals, Inc. 的注册商标 **Dicalite®**和 World Minerals, Inc. 的注册商标 **Celite®**)和絮凝剂例如聚乙烯亚胺水溶液或其它絮凝方式例如加热,以除去 DNA 和其它高分子蛋白质,而予以澄清。然后使用压滤器过滤该混合物且收取滤液。用水洗滤饼且将洗水回收并加到滤液中,全部滤液称为澄清培养液。

[0138] 将该澄清培养液通过 100,000MWC0 (分子量截断)膜超滤,以除去较低分子量 (低于 100,000) 的杂质。

[0139] 将澄清滤液浓缩以提供酶浓缩物,其具有约 400 至约 1000IU/毫升,优选约 500 至约 600IU/毫升的 PDH 效价 (titer),及 20 至约 200IU/毫升,优选约 75 至约 150IU/毫升的

FDH 效价。

[0140] 在浓缩物中的整体酶活性回收率为约 65 至约 95%，优选约 75 至约 90%。

[0141] 本文中使用的术语“部分纯化”的 PDH/FDH 酶是指已经除去至少一部分 DNA 和其它高分子量蛋白质与较低分子量杂质的 PDH/FDH 酶。

[0142] 在实施 3-羟基- α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式 1 酸)的还原胺化中,制备式 1 酸的含水混合物且使用强碱金属碱例如碱金属氢氧化物,优选 NaOH,将混合物的 pH 调节到从约 7.0 至约 8.6,优选从约 7.8 至约 8.2,以形成式 1 酸的溶液。可加入碳(例如, Darco KB) 且过滤混合物,并将滤液和洗液混合而得透明溶液。

[0143] 在该溶液中加入甲酸铵,其量为可提供约 1.9 :1 至约 2.5 :1,优选约 2 :1 的甲酸铵 :式 1 酸摩尔比例。采用强碱金属碱,例如碱金属氢氧化物,优选 NaOH,将所得混合物的 pH 调节到约 7.0 至约 8.6,优选约 7.8 至约 8.2 的范围内。

[0144] 加入烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD),和,任选的还原剂例如二硫苏糖醇或 β -巯基乙醇,优选二硫苏糖醇,采用约 500 :1 至约 1500 :1,优选约 900 :1 至约 1200 :1 范围内的 NAD :式 1 酸的摩尔比。在固体都溶解之后,加入部分纯化的 PDH/FDH 酶浓缩物(约 400 至约 600IU PDH/克式 1 酸)。使用强碱例如 NaOH 将 pH 再次调节到约 7.0 至约 8.6,优选约 7.7 至约 8.2 的范围内。

[0145] 将该混合物加热到约 25 至 45°C,优选约 37 至约 40°C 范围内的温度且用水稀释,并用上述碱金属碱,优选 NaOH,将 pH 保持在约 7.0 至约 8.6,优选约 7.8 至约 8.2 达一段期间,以实现式 1 酸的还原胺化而形成(α S)- α -3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式 2 胺)。

[0146] 式 2 胺的 BOC-保护是在不离析式 2 胺下进行的,因该胺 2 不含细胞碎屑。在至少一部分式 2 胺溶液中加入二碳酸二叔丁酯,采用约 2 :1 至约 2.5 :1,优选约 2.0 :1 至约 2.2 :1 的二碳酸二叔丁酯 :式 2 胺的摩尔比例。反应混合物的 pH 使用强碱如上述 NaOH 调节到约 8.5 至约 12.5,优选约 9.5 至约 10.5。

[0147] 将所得 BOC-保护的化合物(式 3)萃取,回收且结晶,形成 BOC-保护的式 3 胺。

[0148] 从上文可看出,在本发明一方面中,提供经由将中间体化合物 3-羟基- α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式 1)还原胺化而制造片断(α S)- α -氨基-3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式 2)的方法。在此方法的优选实施方式中,通过使用上述本发明的部分纯化的苯丙氨酸脱氢酶/甲酸脱氢酶的酶浓缩物以酶促方式实施还原胺化,而将 3-羟基- α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式 1)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 2)。可用于本发明中的示例性苯丙氨酸脱氢酶包括,但不限于,来自芽孢八迭球菌属(Sporosarcina)的那些或来自热放线菌属(Thermoactinomyces)例如中间型嗜热放线菌属(Thermoactinomyces intermedius)的苯丙氨酸脱氢酶。优选,该还原胺化是使用在大肠杆菌(Escherichia coli)或巴斯德毕赤氏酵母(Pichia pastoris)中表达的中间型嗜热放线菌属 ATCC33205 的苯丙氨酸脱氢酶实施的。表达苯丙氨酸脱氢酶中间型嗜热放线菌属 ATCC 33205 的大肠杆菌和巴斯德毕赤酵母的结构和生长已经经由 Hanson 等人描述过(Enzyme and Microbial Technology 2000 26 :348-358)。巴斯德毕赤酵母在甲醇上的生长也会诱导甲酸脱氢酶的产生(Hanson et al.Enzyme and Microbial Technology 2000 26 :348-358)。

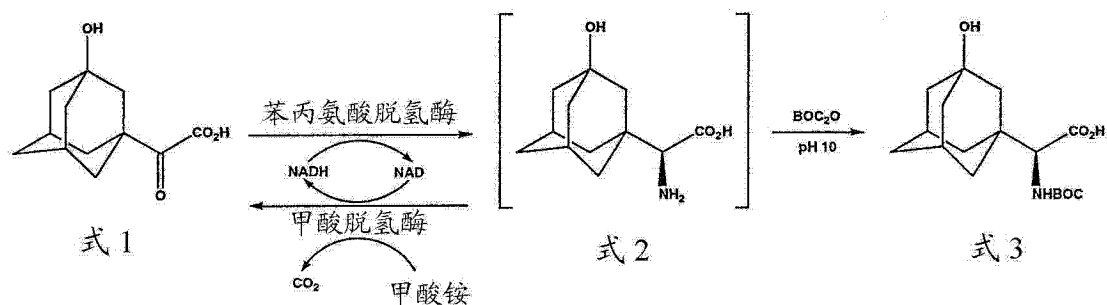
[0149] 根据布达佩斯条约,含有表达巴斯德毕赤酵母 (ATCC20864) 甲酸脱氢酶和修饰型的中间型嗜热放线菌属 (ATCC33205) 苯丙氨酸脱氢酶基因的质体的大肠杆菌细胞由国际保藏机构保藏和接收。该保藏是在 2002 年 6 月 25 日提交至美国典型培养物保藏中心(位于 10801 University Boulevard in Manassas, Virginia 20110-2209)。ATCC 保藏号为 PTA-4520。在此专利申请获得授权后,对于此细胞系的公开获得的所有限制都将不能撤回地取消。该保藏物在公共保藏机构保藏自保藏日起 30 年或最后要求取得样品后 5 年或专利有效期,视较长者而定。上述细胞系在寄存时间都是活的。若保藏机构不能分发出活的样品,会更换保藏物。

[0150] 最优选含有表达巴斯德毕赤氏酵母 (ATCC 20864) 甲酸脱氢酶的质体 pBMS-2000-PPFDH-PDH mod. 的大肠杆菌 JM110 的苯丙氨酸氢化酶及改性形式的中间型嗜热放线菌属 (ATCC33205) 苯丙氨酸脱氢酶。

[0151] 3-羟基- α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式1)变成(α S)- α -氨基-3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式2)的还原胺化示于下面的反应方案1之中:

[0152] 反应方案 I

[0153]

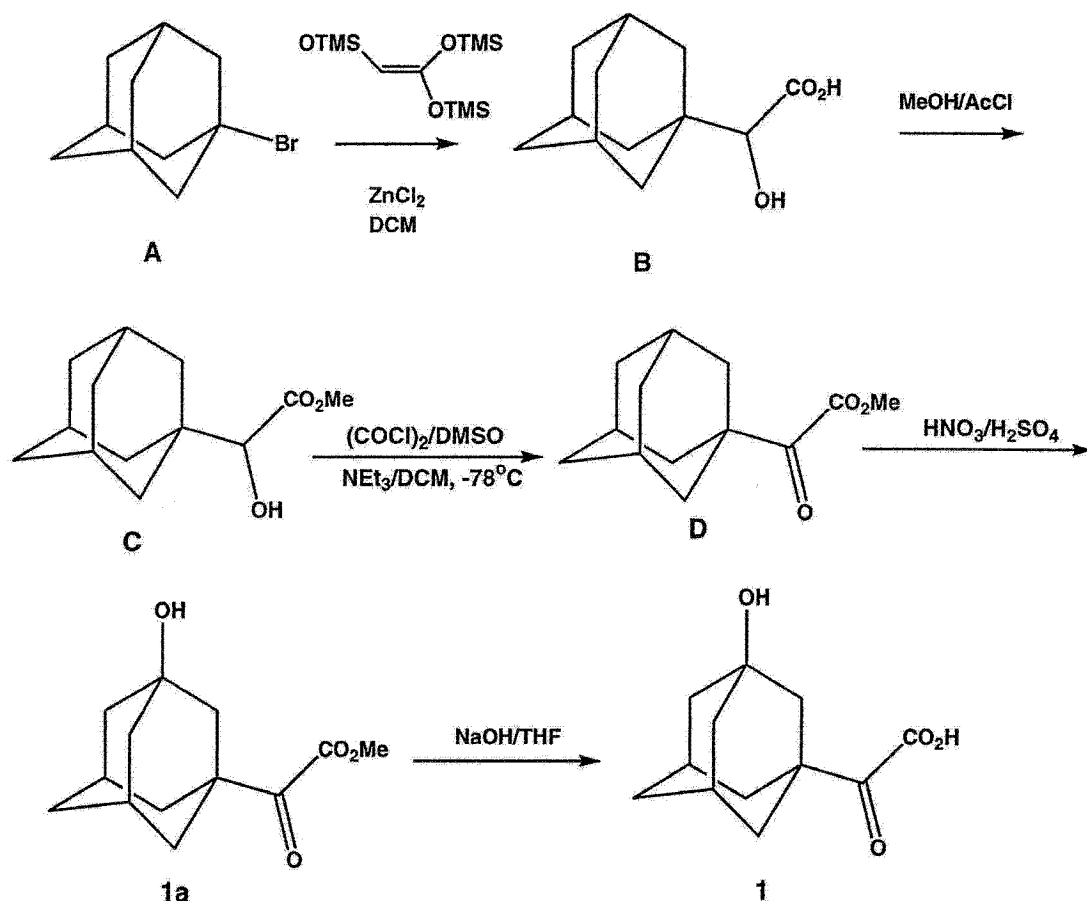


[0154] 如方案 I 中所示,此反应需氨和还原烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)。在反应中产生的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 经由甲酸脱氢酶将甲酸盐(酯)氧化变成二氧化碳,从而再循环成 NADH。来自此反应的(α S)- α -氨基-3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式2)的预期产率为 80 至 100% 且预期的对映异构性过量大于 99%。也可参阅本文的实施例 1 至 7。

[0155] 中间体化合物 3-羟基- α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式1)可根据反应方案 II 中所示方法制成:

[0156] 反应方案 II

[0157]

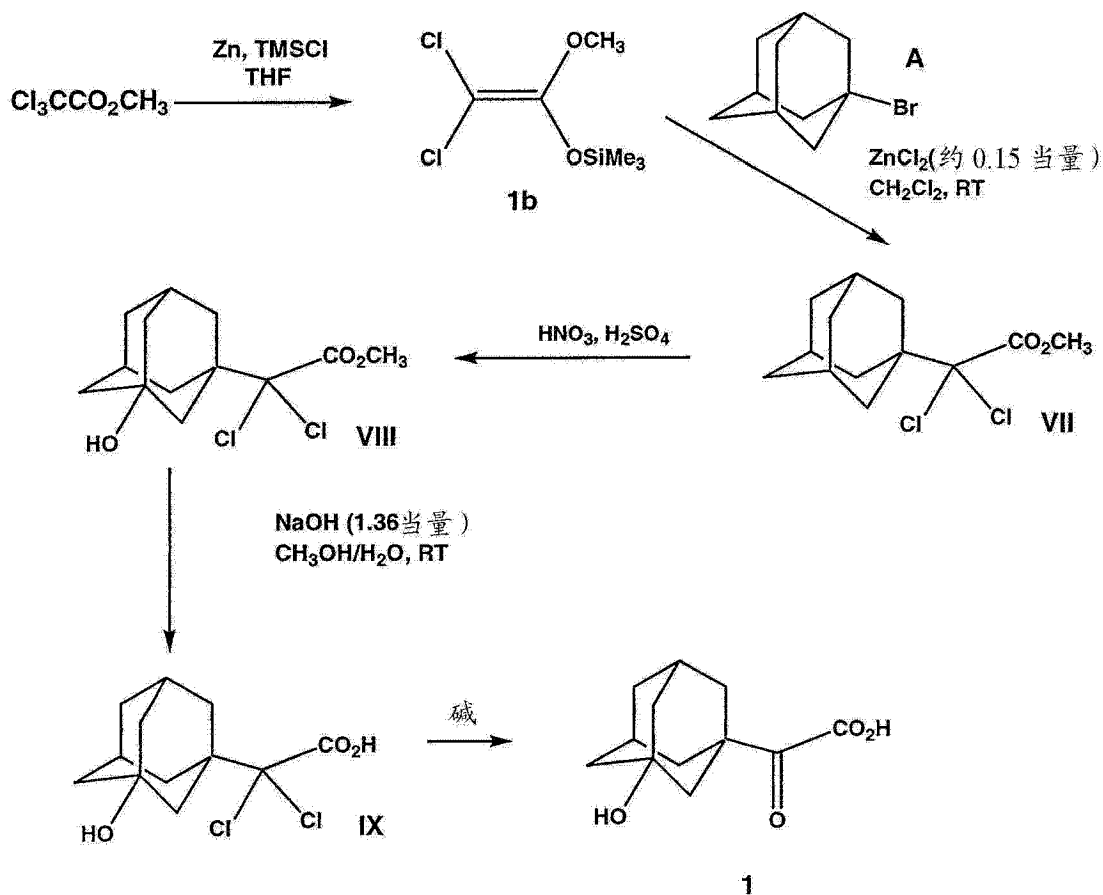


[0158] 如反应方案 II 中所示,在此方法中,是将金刚烷基溴(式 A)通过氯化锌催化作用予以烷基化以产生 α -羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式 B)。然后使用甲醇中的乙酰氯将 α -羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式 B)酯化以产生 α -羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸,甲酯(式 C)。然后经由 Swern 氧化将 α -羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸,甲酯(式 C)转化成 α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸,甲酯(式 D)。之后将 α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸,甲酯(式 D)羟基化以形成 3-羟基- α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸,甲酯(式 1a),其再经水解形成 3-羟基- α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式 1)。

[0159] 或者,可根据反应方案 III 所示方法制造中间体化合物 3-羟基- α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式 1)。

[0160] 反应方案 III

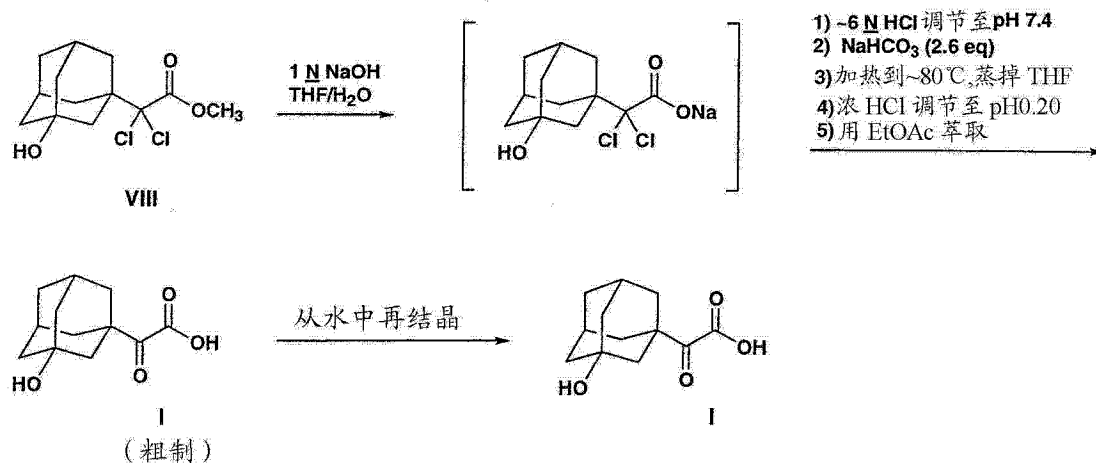
[0161]



[0162] 如方案 III 中所示, (2,2-二氯-1-甲氧基-1-乙烯氧基)-三甲基硅烷 **1b** 是以 Kuroda 等人的方法小幅改进制备的 (EP0808824A3; Imashiro and Kuroda Tetrahedron Letters 2001 42:1313-1315)。用 **1b** 在氯化锌影响下处理溴代金刚烷 (Reetz et al. Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18:72; Reetz and Heimbach Chem. Ber. 1983 116:3702-3707; Reetz et al. Chem. Ber. 1983 116:3708-3724) 产生式 VII 的金刚烷-1-基-二氯-乙酸甲酯。然后用氧化氮 (nitric oxide) 在浓硫酸中将式 VII 金刚烷-1-基-二氯-乙酸甲酯予以羟基化, 提供定量产率的式 VIII 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸甲酯。用氢氧化钠的甲醇水溶液在室温下将式 VIII 化合物水解产生式 IX 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸。随后用弱碱, 优选碳酸氢钠, 在高温下处理二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸 (式 IX) 导致全部形成中间体化合物 3-羟基- α -酮基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸 (式 I)。

[0163] 反应方案 IIIA

[0164]

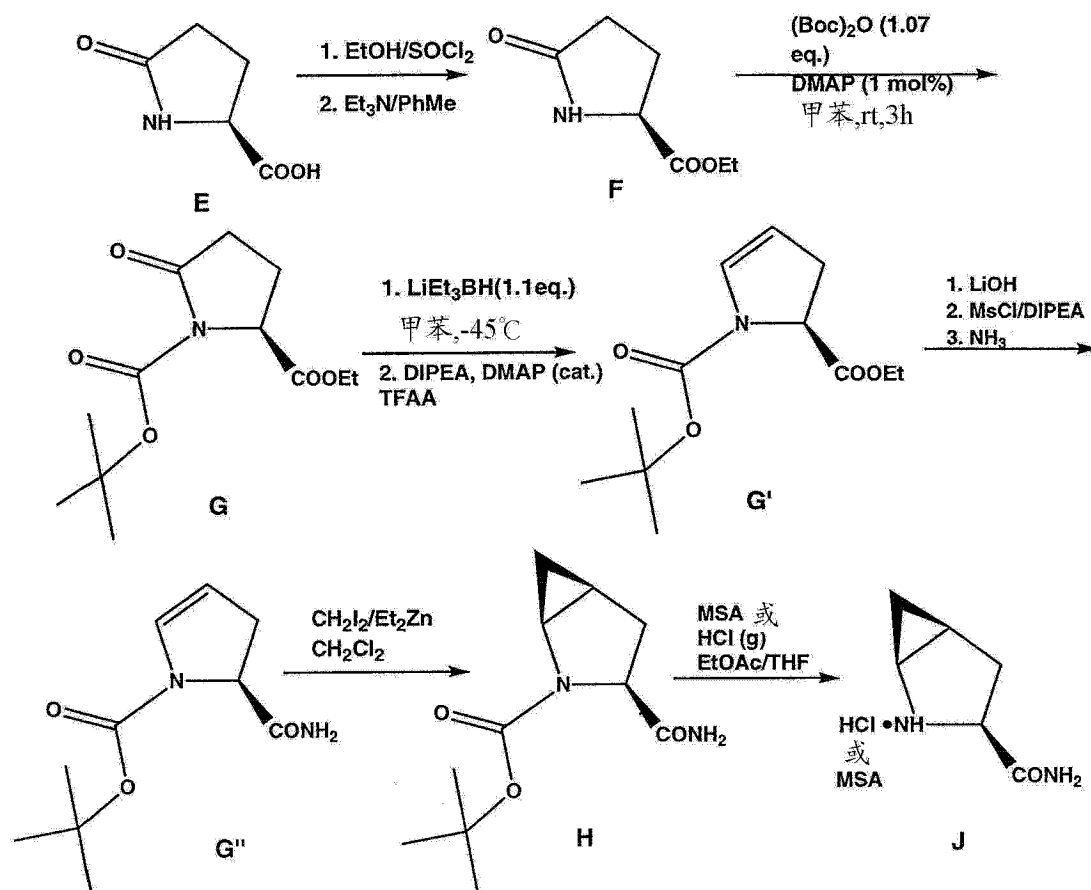


[0165] 如方案 IIIA 中所示,可用一釜法 (one pot procedure) 制备中间体化合物 3-羟基- α -酮基三环(3.3.1.^{3,7})癸烷-1-乙酸(式 I)。可以看到,用四氢呋喃中的氢氧化钠水溶液(或其它的碱,例如氢氧化钾或氢氧化锂)在惰性气氛例如氩气中处理式 VIII 化合物,得到相应的钠盐。在没有回收该钠盐的情况下,用酸例如盐酸处理含该钠盐的反应混合物以降低 pH 至低于约 0.50, 优选约 0.20, 以形成相应的酮酸 II, 其可从水中再结晶, 形成酮酸 I 的晶体。

[0166] 在 (1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环(3.3.1.^{3,7})癸-1-基)-1-酮基乙基]-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲腈的制造中所用的片断 (1S, 3S, 5S)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲酰胺(式 J) 可根据下面所示方案 IV 中的方法制备。

[0167] 反应方案 IV

[0168]



[0169] 如方案 IV 中所示, 首先将 L-焦谷氨酸 (式 E) 酯化产生 L-焦谷氨酸乙酯 (式 F; SQ7539)。然后将此 L-焦谷氨酸乙酯在氮上进行 BOC-保护, 产生 (5S)-2-酮基吡咯烷-1,5-二甲酸,1-(1,1-二甲基乙基),5-乙基酯 (式 G)。然后实施三乙基氢化硼锂 (superhydride) 还原和消去反应而形成 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二甲酸,1-(1,1-二甲基乙基),5-乙基酯 (式 G')。然后用氢氧化锂皂化水解 BOC-DHPEE III 形成 BOC-DHP。之后使用甲磺酰氯接着使用氨通过混合酸酐在 BOC-DHP 上形成酰胺, 而制成 (5S)-5-氨基羰基-4,5-二氢-1H-吡咯-1-甲酸,1-(1,1-二甲基乙基) 酯 (式 G'')。然后通过 Simmons-Smith 反应将 (5S)-5-氨基羰基-4,5-二氢-1H-吡咯-1-甲酸,1-(1,1-二甲基乙基) 酯 (式 G'') 环丙烷化, 产生 (1S-(1 α ,3 β ,5 α)-3-氨基羰基)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-2-甲酸,1,1-二甲基乙基酯 (式 H)。之后除去 BOC, 导致片断 (1S,3S,5S)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲酰胺的酸式盐例如盐酸盐或甲磺酸盐 (式 J) 的形成。

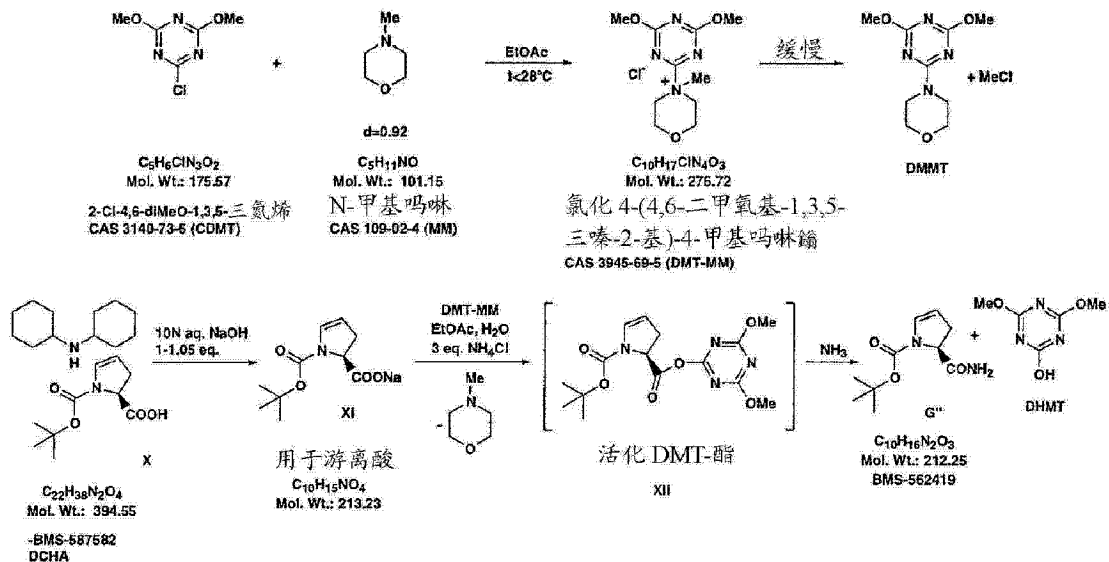
[0170] 如方案 IV 中所看到的, (5S)-5-氨基羰基-4,5-二氢-1H-吡咯-1-甲酸,1-(1,1-二甲基乙基) 酯 (式 G'') 变成 (1S-(1 α ,3 β ,5 α)-3-氨基羰基)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-2-甲酸,1,1-二甲基乙基酯 (式 H) 的转换是经由在 Simmons-Smith 反应中的环丙烷化而实现的。在此反应中, 将 (5S)-5-氨基羰基-4,5-二氢-1H-吡咯-1-甲酸,1-(1,1-二甲基乙基) 酯溶解在第一反应器内的二氯甲烷中。在第二反应器内, 将二氯甲烷冷却到 -30°C , 加入二甲氧基乙烷和 30% 二乙基锌 / 甲苯溶液, 接着加入二碘甲烷。然后将此混合物加到第一反应器内接着添加饱和碳酸氢盐溶液。搅拌所得反应混合物直到形成沉淀物为止。然后, 过滤出沉淀物, 洗涤及再悬浮在二氯甲烷中二或更多次。将滤液分离成水相和有机相且用半饱和盐水洗涤有机相。除去溶剂且以庚烷交换而得粗产物 (

1S-(1 α , 3 β , 5 α)-3-氨基羰基)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-2-甲酸, 1,1-二甲基乙基酯(式 H) 在庚烷中的浆液。

[0171] 另外, (5S)-5-氨基羰基-4,5-二氢-1H-吡咯-1-甲酸, 1-(1,1-二甲基乙基)酯(式 G'') 也可以按方案 IVA 中所示予以制备。

[0172] 反应方案 IVA

[0173]



[0174] 如方案 IVA 中所示者, 用碱金属碱例如氢氧化钠处理 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二甲酸, 1-(1,1-二甲基乙基)酯 X 的 DCHA 盐以形成相应的盐, 例如钠盐。

[0175] 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二甲酸, 1-(1,1-二甲基乙基)酯 XI 的钠盐也可以从相应的乙基酯经由用乙醇和氢氧化钠处理该乙基酯(优选乙基酯的甲苯溶液)而制备。

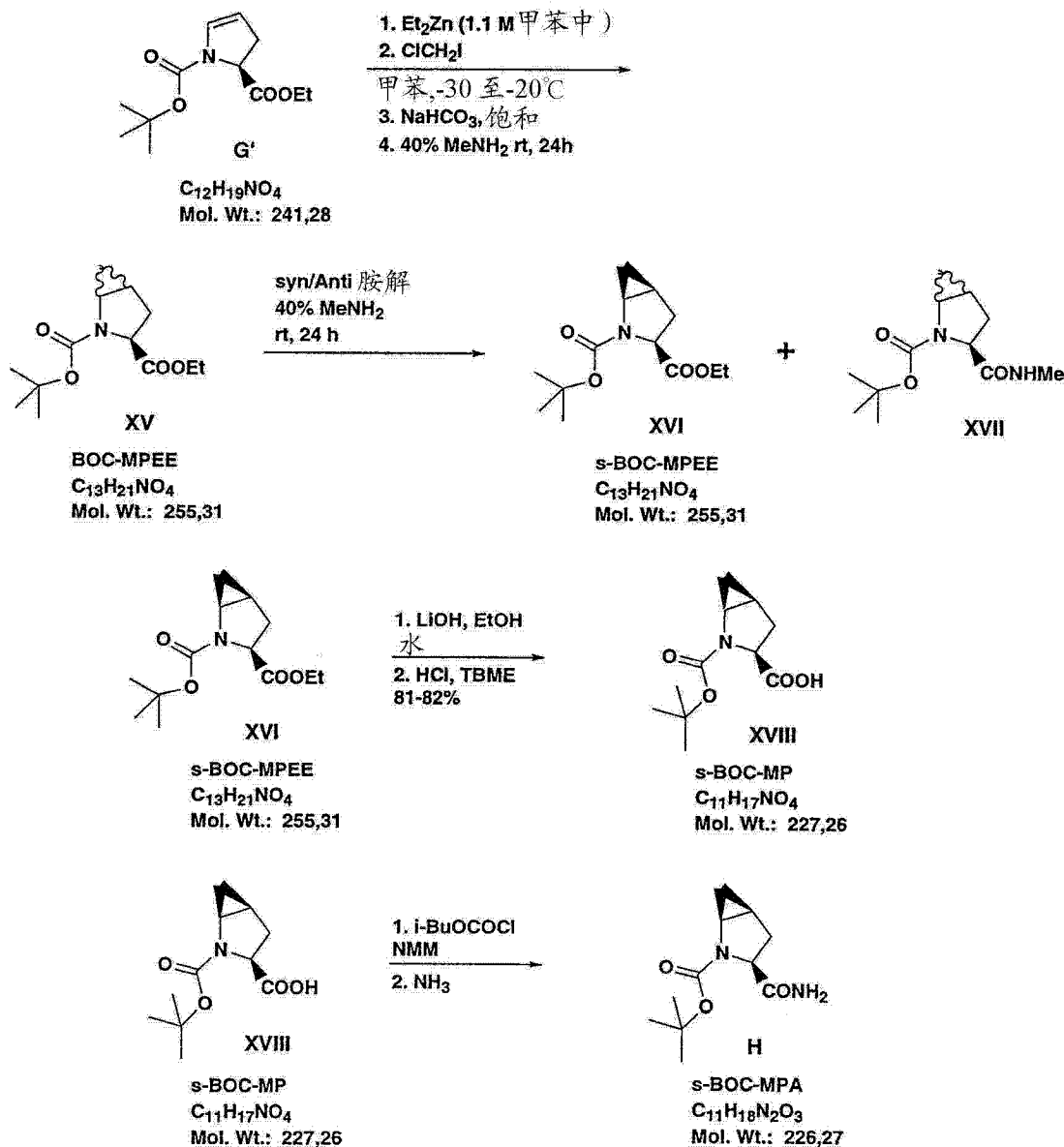
[0176] 用缓冲液例如氯化铵和磷酸二氢钠处理钠盐 XI 溶液以降低溶液的 pH 到低于 7, 优选约 6 至 6.5, 且用氯化 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉鎓 (DMT-MM) 处理钠盐缓冲溶液而形成活化 DMT-酯 XII, 使用氨或其它碱例如硫酸铵、氯化铵或氢氧化铵予以处理, 形成 (5S)-5-氨基羰基-4,5-二氢-1H-吡咯-1-甲酸 1-(1,1-二甲基乙基)酯 G''。

[0177] 氯化 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基-吗啉鎓 (DTM-MM) 可按反应方案 VIA 中所示经由使 2-Cl-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪 (CDMT) 和 N-甲基吗啉鎓在从约 0 至约 10°C 的低温下反应形成 DMT-MM 而制备。

[0178] 4,5-二氢-1H-吡咯-1,5-二甲酸, 1-(1,1-二甲基乙基)酯 X 的 DCHA 盐可由相应的钠盐 XI 经由用甲基叔丁基醚 (MTBE) 处理先前制备的 DCHA 盐 X 的水溶液, 采用酸例如 H_3PO_4 调整反应混合物的 pH 到 2.5-3 而制备成。分离有机层且用盐水处理, 形成相应的钠盐 XI。将所得反应混合物冷却且用 DCHA 处理而形成相应的 DCHA 盐 X。

[0179] 反应方案 IVB

[0180]



[0181] 方案 IVA 的化合物 H 也可以按方案 IVB 中所示经由将 N-BOC-4, 5- 脱氢辅氨酸乙酯 G' 按下述予以环丙烷化而制备成。

[0182] 使用二乙基锌和氯碘甲烷在无水有机溶剂例如甲苯, 二氯甲烷或二氯乙烷存在下, 在约 -30 至约 0°C 的低温下处理 N-BOC-4, 5- 脱氢辅氨酸乙酯 G' 而形成 N-BOC-4, 5- 桥亚甲基辅氨酸乙酯 (N-BOC-4, 5-methanoproline ethyl ester) XV。

[0183] 经由使用甲胺水溶液在惰性气氛例如氮气气氛下处理, 分离所得 BOC-4, 5- 桥亚甲基辅氨酸乙酯 XV (顺-和反-异构物的混合物 (8:1)) 且回收顺 (S)-BOC-4, 5- 桥亚甲基辅氨酸乙酯 XVI (从 XVII 分离出)。

[0184] 使用碱例如氢氧化锂、氢氧化钠或氢氧化钾水溶液处理乙醇或其它有机溶剂例如甲苯或 THF 中的 s-BOC-4, 5- 桥亚甲基辅氨酸乙酯 XVI, 形成相应的 s-BOC- 桥亚甲基辅氨酸游离酸 XVIII。

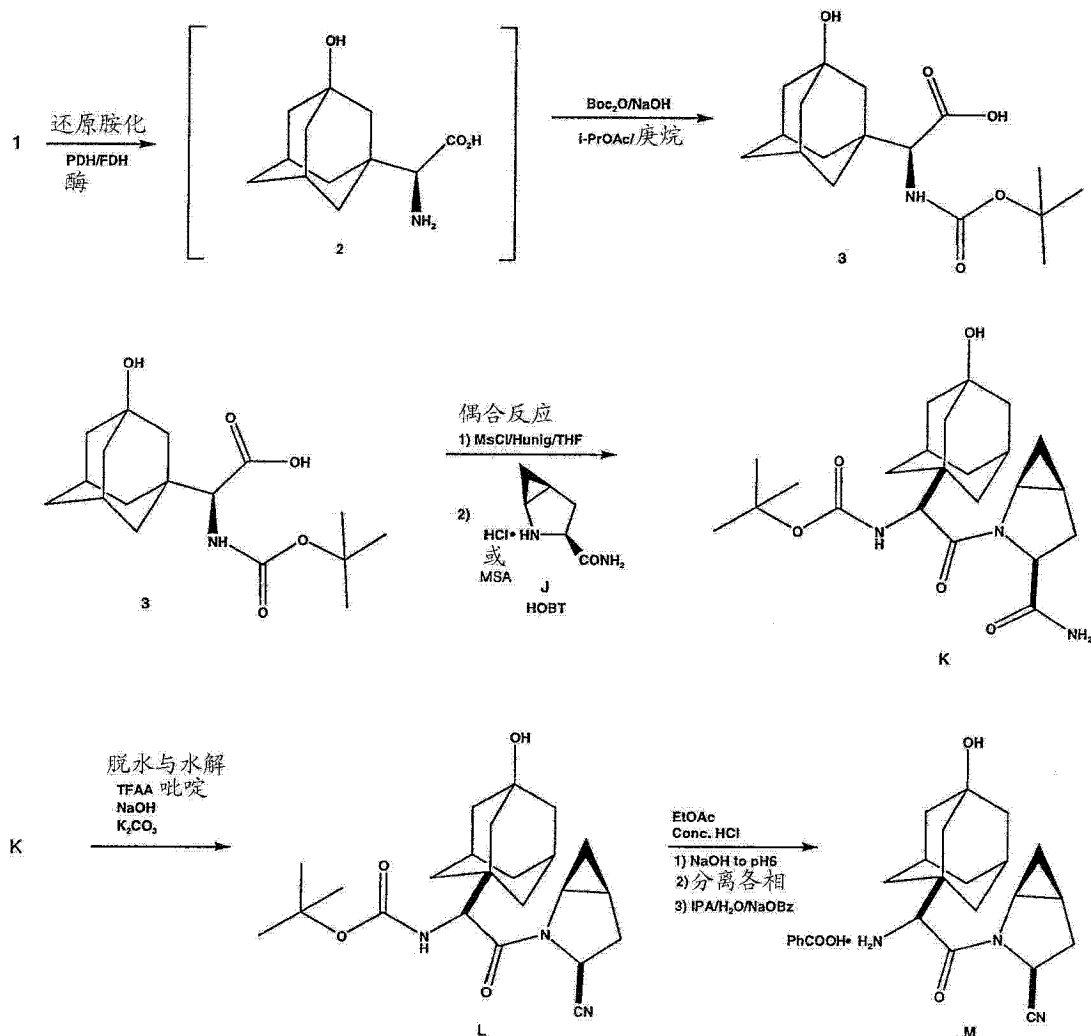
[0185] 经由用氯甲酸异丁酯或甲磺酰氯, 在 N- 甲基吗啉存在下, 在低温例如不超过约 -8°C 下处理溶解在有机溶剂例如 THF 或二氯甲烷中的游离酸 XVIII, 然后用氨处理反应混合物形成 s-BOC- 桥亚甲基辅氨酸酰胺 H 而将游离酸 XVIII 转化成相应的 s-BOC- 桥亚甲

基辅氨酸酰胺 H。

[0186] 本发明另一方面涉及一种将片断 (α S)-α-氨基-3-羟基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸 (式 3) 与 (1S, 3S, 5S)-2-氮杂双环 (3.1.0) 己烷-3-甲酰胺 (式 J) 偶合制成 (1S, 3S, 5S)-2-((2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-基)-1-酮基乙基)-2-氮杂双环 (3.1.0) 己烷-3-甲腈, 苯甲酸酯 (1:1) 的方法。这些片断的偶合示于下面的方案 V 之中:

[0187] 反应方案 V

[0188]



[0189] 从使用离析 (部分纯化) PDH/FDH 酶浓缩物按实施例 3 所述的生物转化, 不进行离析即使用式 2 化合物。

[0190] 如方案 V 中所示, 先将片断 (α S)-α-氨基-3-羟基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸 (式 2) 经由用 Boc_2O 在碱例如氢氧化钠存在下处理 2 予以 BOC 保护而产生 (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 3), 且通过乙酸异丙酯萃取分离, 再用乙酸异丙酯/庚烷结晶以离析出游离酸 3 (参看实施例 3, 步骤 3)。或者可通过乙酸乙酯 (EtOAc) 萃取分离出游离酸 3 (参阅实施例 8M)。

[0191] 对式 3 化合物在恰当有机溶剂例如四氢呋喃 (THF) 中的溶液 (冷却到在从约 -10 至约 0°C 范围内的温度) 使用甲磺酰氯 (Mesyl Cl), 和 Hunig 碱 (二异丙基乙基胺或 DIPEA)

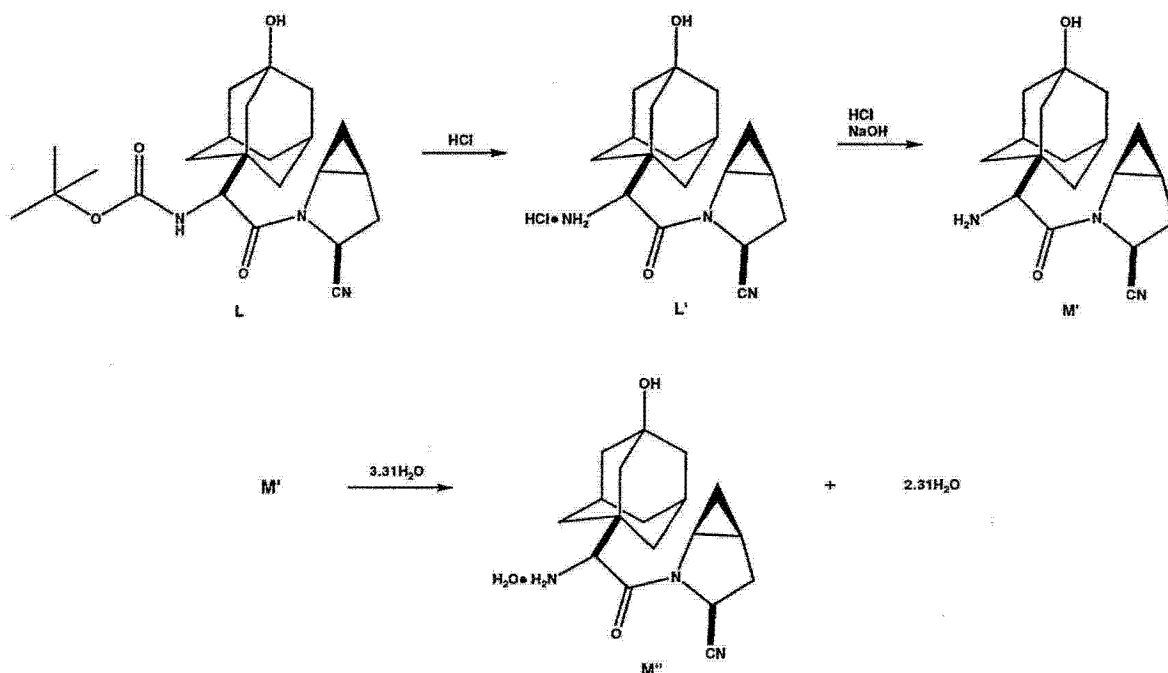
处理,形成相应的 VI 的甲磺酸盐。

[0192] 然后使用偶合反应将 (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3)甲磺酸盐在1-羟基苯并三唑(HOBT)或其它的已知偶合剂的存在下偶合到(1S,3S,5S)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲酰胺(式J)而制成3-(氨基羰基)-(α S)- α -(3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})-癸-1-基)- β -酮基-(1S,3S,5S)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-乙烷氨基甲酸,1,1-二甲基乙基酯(式K)。使用有机碱例如吡啶或三乙胺和三氟乙酸酐处理化合物K而使式K化合物脱水,然后通过冷却到约0至约10℃且添加氢氧化钠或其它强碱例如KOH或LiOH进行水解反应,形成化合物L。然后将3-氰基-(α S)- α -(3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})-癸-1-基)- β -酮基-(1S,3S,5S)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-2-乙烷氨基甲酸,1,1-二甲基乙基酯(式L)脱保护基(用苯甲酸钠处理)而形成二肽基肽酶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-酮基乙基)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲脞,苯甲酸酯(1:1)(式M)。

[0193] 回到方案V,化合物L可经由用强酸例如盐酸按方案VIA所述进行处理而脱保护基。

[0194] 反应方案VIA

[0195]



[0196] 参看方案VIA,游离碱单水合物M''可自BOC-保护的中间体L形成如下。

[0197] 在二氯甲烷和甲醇存在中,将反应温度保持在约20至25℃范围内,使用浓盐酸处理BOC-保护的中间体L而形成盐酸盐L'。使用盐酸,然后用氢氧化钠或其它强碱处理该盐酸盐L',以形成游离碱M'。用水处理游离碱M'即形成游离碱单水合物M''。

[0198] 使用本发明化合物和方法制成的二肽基肽酶IV抑制剂可用来治疗糖尿病和其并发症、高糖血症、症候群X、高胰岛素血症、肥胖症、及动脉粥样硬化与相关疾病以及免疫调制性疾病和慢性炎性肠病。

[0199] 下面的实施例代表本发明的优选实施方式。

[0200] 实施例 1

[0201] 质体 pBMS2000-PPFDH-PDHmod 的构建

[0202] 采用表达载体 pBMS2000-PPFDH-PDHmod 的两步骤构建法。使用含有具有相容性限制内切核酸酶切断部位的巴斯德毕赤酵母 FDH 基因的 5' 和 3' 端的寡核苷酸引物：

[0203] 5' TCGTCATGAAAATCGTTCTCGTTTTG3' (5' 端 ; 有义 ; SEQ ID NO:1)

[0204] BspHI

[0205] 5' TACTGTTTTTCCAGCGTATTCCTAGGCT3' (3' 端 ; 反义 ; SEQ ID NO:2)

[0206] BamHI

[0207] 将巴斯德毕赤酵母 FDH 基因亚克隆到表达载体 pBMS2000 中 (pBMS2000 公开在 2000 年 5 月 30 日授权的 S. W. Liu 等人的美国专利第 6,068,991 号中)。巴斯德毕赤酵母 FDH 基因的高精确度 PCR 扩增在四等份 100 微升液体中进行, 每一份液体含有 1X TaqPlus 反应缓冲液 (Stratagene, LaJolla, CA), 各 0.2mM 的脱氧核苷酸三磷酸 (dATP, dCTP, dGTP, 和 dTTP), 各 0.4nM 的寡核苷酸, 2.5U TaqPlus DNA 聚合酶 (Stratagene), 和 10pg 含克隆的巴斯德毕赤酵母 FDH 基因的质体 DNA。扩增条件包括使用有自动延伸装置 (autoextension) 的 Perkin-Elmer Model 480 热循环器, 在 94°C 下温育 4 分钟, 接着为 25 个温育循环: 在 94°C 温育 4 分钟; 在 50°C 下温育 1 分钟; 和 72°C 下温育 1.5 分钟; 。

[0208] PCR 反应混合物是用等体积的 1:1 苯酚:氯仿 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) 萃取, 且以 13,000×g 离心 5 分钟。除去上层水相且置于一新的微型离心管内。经由添加 0.1 体积的 3M 乙酸钠和 2 体积的冰冷乙醇沉淀出 DNA。在以 13,000×g 离心 5 分钟之后, 从管中抽取出液体, 且用 0.5 毫升的冰冷 70% 乙醇洗涤球粒 (pellet)。再抽取出液体, 且使球粒在室温下空气干燥 30 分钟。

[0209] 使用各 20 单位的 BspHI 和 BamHI 在 37°C 下在 50 微升的总体积中消化经扩增的 DNA 3 小时。同时, 使用 BspHI 和 BamHI 消化 pBMS2000 载体 (2 微克)。将消化过的样品在 1.0%TAE 琼脂糖凝胶上在 100 伏电压下电泳 2 小时。将对应于 FDH 基因 (1100- 碱基对片断) 和线形化载体 (4700- 碱基对片断) 的带 (band) 从凝胶分别切下且使用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) 予以纯化。离析出的片断所具浓度是相对于低分子量质量梯 (mass ladder) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) 以电泳估测且在 10 微升总体积中以 5:1 (插体:载体) 摩尔比例在 22°C 下连接 (ligate) 所述离析片断 2 小时。经由添加 15 微升 dH₂O 和 250 微升 1- 丁醇沉淀出 DNA, 且在微型离心机中以 13,000×g 粒化 5 分钟。抽吸出液体, 且在 SpeedVac (Savant Instruments, Farmingdale, NY) 内在低热下将 DNA 干燥 5 分钟。将球粒再悬浮在 5 微升 dH₂O 内。

[0210] 将再悬浮的 DNA 在 25 μF 和 250 Ω 下通过电穿孔转化到 0.04 毫升大肠杆菌 DH10B 感受态细胞 (Invitrogen) 内。立即加入 SOC 培养基 (0.96 毫升; SOC=0.5% 酵母萃取物, 2% 胰蛋白酶 (tryptone), 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 和 20mM 葡萄糖, 每升), 且将细胞在摇动器中于 37°C 和 225rpm 下培育 1 小时。在含有 50 微克 / 毫升硫酸卡那霉素 (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 的 LB 琼脂板上选择含有质体 DNA 的菌落。具有所需插体的质体是经由使用 RapidCycler (Idaho Technology, Salt Lake City, UT) 在毛细管内的菌落 PCR 而鉴定出的。每一反应混合物含有 50mM Tris-HCl (pH8.3), 4mM MgCl₂,

0.25 毫克 / 毫升牛血清白蛋白, 2% 蔗糖 400, 0.1mM 甲酚红, 各 0.4nM 的引物 (SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2), 与 2.5U Taq DNA 聚合酶 (Promega Corp., Madison, WI)。将反应混合物分成 10 微升等份液体, 并吸移到圆底微滴板的洞内。使用可弃置式塑料接种针擷取抗卡那霉素菌落; 回转到反应混合物内, 且转移到 LB- 卡那霉素琼脂上。将每一反应混物等份抽取到 30 微升毛细管内, 且将该管的两端用火焰封合。将细胞溶解并在 94°C 下温育 30 秒使 DNA 变性; 且经由使用 Rapid Cycler 热循环器 (Idaho Technologies, Salt Lake City, UT) 在 94°C 下温育 0 秒钟; 在 40°C 下温育 0 秒钟, 及在 72°C 温育 60 秒钟的 30 个循环实施扩增。将样品在 1.0%TAE 琼脂糖凝胶上在 100 伏电压下电泳 2 小时。17 个试验样中有七个样品显示出在 1100 碱基对的强带。选出含有此质体 (本文中称为 pBMS2000-PPFDH) 的一个菌落用于质体构建的下一步骤中。

[0211] "PDHmod" 指的是改性的中间型嗜热放线菌属苯丙氨酸脱氢酶, 其与公开的 DNA 序列 (Takada et al., J. Biochem. 109, pp. 371-376 (1991)) 不同处在于羧基端最后两个氨基酸的改变且将 (3-羟基-金刚烷-1-基)-酮基-乙酸完全转化成 (S)-氨基-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸所需的额外的 12 个氨基酸。此改变被引入到质体 pPDH9K/10 内 (在 2000 年 1 月 27 日授权的 Donovan 等人的专利 W0200004179 中有详细说明), 其随后转化至巴斯德毕赤酵母 SMD1168 (以菌株 ATCC74408 保藏) 之内。

[0212] 天然 PDH 基因的 3' 端和对应的氨基酸:

[0213] AAC AGC GCA AGG AGG TAA

[0214] Asn Ser Ala Arg Arg 中止

[0215] PDHmod 基因的 3' 端和对应的氨基酸 (以黑体字表示有改变或新的氨基酸):

[0216] AAC AGC GCG GAG GGG TAC CTC GAG CCG CGG

[0217] Asn Ser Ala Glu Gly Tyr Leu Glu Pro Arg

[0218] CGG CCG CGA ATT AAT TCG CCT TAG

[0219] Arg Pro Arg Ile Asn Ser Pro 中止

[0220] 制备出含有具有相容性限制内切核酸酶切断部位的 PDHmod 基因的 5' 和 3' 端的寡核苷酸引物:

[0221] GATGCTCATATGCGCGACGTGTTTGAAATGATG (5' 端, 有义; SEQ ID NO:3)

[0222] NdeI

[0223] GATCCCGGGCTAAGGCGAATTAATAATTCG (3' 端, 反义; SEQ ID NO:4)

[0224] SmaI

[0225] PDHmod 通过 PCR 的扩增和纯化用的反应条件, 除了包括自 ATCC74408 制备的染色体 DNA 作为反应模板之外, 都与用于巴斯德毕赤酵母 FDH 基因所用者相同。所得片断是在 50 微升总体积中用各 20 单位的 NdeI 和 SmaI 在 25°C 下消化一小时, 接着在 37°C 下消化 2 小时。同时, 对于在起始密码子处具有 NdeI 位点的形式的 pBMS2000 载体 (2 微克) 用 NdeI 和 SmaI 以相同的条件予以消化。经消化过的样品分别在 1.0%TAE 琼脂糖凝胶上在 100 伏电压下电泳 2 小时。从凝胶切下对应于 PDHmod 基因 (1200- 碱基对片断) 和线形化的载体 (4700- 碱基对片断) 的带且使用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) 予以纯化。按上文所述实施两片断的连接, 大肠杆菌的转化及含有带 PDHmod 基因的插体的菌落的筛选 (形成 pBMS2000-PDHmod)。

[0226] 对于 pBMS2000-PPFDH-PDHmod 的构建,是将 pBMS2000-PDHmod (2 微克) 使用各 10U 的 HindIII 和 SmaI 在 50 微升体积中在 25°C 下切 (cleave) 1 小时,接着在 37°C 下切 1 小时。加入 10 单位的 T4DNA 聚合酶 (Invitrogen) 和 2 微升所有四种脱氧核糖核苷三磷酸的 2.5mM 混合物,且在 11°C 下将样品温育 20 分钟。将反应物在 1.0%TAE 琼脂糖凝胶上在 100 伏电压下电泳 2 小时。切取 1800- 碱基对片断且使用 QIAquick Gel Extraction Kit(Qiagen) 离析。此片断含有依序的 tac 启动子, groES 基因, 和 PDHmod 基因 (呈转录融合形式)。接着,使用 10 单位限制核酸内切酶 SmaI 在 50 微升体积中在 25°C 下消化 pBMS2000-PPFDH(2 微克) 2 小时,再用 0.4U 的虾碱性磷酸酶 (shrimp alkaline phosphatase) (United States Biochemicals, Cleveland, OH) 在 37°C 下处理 1 小时。将质体 DNA 在 1.0%TAE 琼脂糖凝胶上在 100 伏电压下电泳 2 小时,离析,且用 QIAquick 试剂盒萃取。将两片断以 6.5:1 (插体:载体) 摩尔比例在 10 微升最终体积中在 16°C 下连接 4 小时。在 1- 丁醇萃取和离心之后,将 DNA 转化到电感受态 (electrocompetent) DH10B 细胞内。按前文对 FDH 所述,筛选抗卡那霉素菌落,使用两个 PDHmod- 特异性引物找出 PDHmod 基因。使用分别与 PPFDH 的 5' - 端和 PDHmod 基因的 3' 端同源的 DNA 引物进行第二轮的 PCR 筛选。只有能支持 1400- 碱基对片断的扩增的这些构成物才拥有相同取向的两基因。找到一个此种质体且用 KpnI 经由诊断性限制消化得到预期的 5422 碱基对和 1826 碱基对片断,而确定其取向。此质体经命名为 "pBMS2000-PPFDH-PDHmod"。

[0227] 实施例 2

[0228] FDH 和 PDHmod 的表达

[0229] 将 pBMS2000-PPFDH-PDHmod 转化到大肠杆菌 JM110 中。在摇瓶研究中,在 MT5 培养基 (2.0% 酵母蛋白水解产物 (Yeastamine), 4.0% 甘油, 0.6% 磷酸钠 (二碱价), 0.3% 磷酸钾 (一碱价), 0.125% 硫酸铵, 0.0256% 硫酸镁 (七水合物; 在压热处理后从无菌 1M 溶液加入), 和 50 微克 / 毫升硫酸卡那霉素 (在压热处理后自过滤灭菌的 50 毫克 / 毫升溶液添加)) 中在 28°C, 250rpm 下使 JM110 (pBMS2000-PPFDH-PDHmod) 生长 18 小时。记录在 600 纳米下的光密度 (OD_{600}) 且在新鲜 MT5/ 卡那霉素培养基中加入足以得到起始 OD_{600} 为 0.35 的细胞。在 28°C, 250rpm 下摇动烧瓶直到 OD_{600} 为 0.8-1.0。两基因的表达是经由添加经过滤灭菌的 1M 异丙基硫代- β -D 吡喃半乳糖苷 (IPTG) 到 35 μ M 最终浓度予以诱发且继续发酵 24-48 小时。以 6,500 \times g 离心 5 分钟使细胞粒化,用等体积的 50mM 甲酸铵 (pH7.0) 洗涤一次,且再粒化。将细胞于 -20°C 下冷冻贮存或立即使用。将球粒再悬浮于 50mM 磷酸铵, pH7.0, 浓度为 10 毫升 / 克湿细胞重量且使用 Fisher Scientific Model50Sonic Dismembrator (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 超音波处理 3 \times 15 秒钟,用微尖头将功率设定为 15。在室温下以 13,000 \times g 离心 5 分钟将碎屑粒化。

[0230] 以十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检验表达结果。将一微升的细胞萃取液与 5 微升 4X NuPAGE™LDS 缓冲液 (Invitrogen) 混合且用蒸馏水调到 19 毫升。在 70°C 下加热样品 10 分钟。在混合物中加入 1 毫升的 1M 二硫苏糖醇溶液且取 10 微升加到 10%NuPAGE™Bis-Tris 聚丙烯酰胺微型凝胶上。以 200 伏电压进行电泳 50-60 分钟且在由 0.1%(w/v) Coomassie Blue (Sigma), 40%(v/v) 乙醇, 和 10%(v/v) 乙酸所构成的溶液中着色凝胶。将浸过染色液的凝胶置于微波烤箱内加热直到明显沸腾为止,然后在轨道摇动器上以 40rpm 摇动 15 分钟。用去离子水彻底清洗该凝胶,再用脱色溶液 (GelClear™;

Invitrogen) 予以覆盖。再度加热该溶液恰好达到沸点并温和摇动至少 2 小时。在诱导后在 Mr43,000 和 40,000 看到两明显带,对应于 FDH 和 PDHmod 亚单位的预期分子量。在按实施例 4、6 和 7 中所述试验时,也测得样品拥有 FDH 和 PDH 两种活性。此重组大肠杆菌菌株被给予 SC16496 的内部命名。

[0231] 随后以 15 和 250 升体积将 SC16496 发酵。对于 15-升发酵,将装有 1 毫升冷冻 SC16496 的管瓶在室温下解冻并加到装在 4-升烧瓶内含 50 微克/毫升卡那霉素的 1 升 MT5 培养基中,将该烧瓶置于 28°C,以 250rpm 温育 24 小时后,转移到装在一 Braun 发酵器内的 13 升 MT5 培养基内(各成分是以 15 升的最终体积为基准调配)。分别将足以得到 50 微克/毫升和 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 500 毫升蒸馏水中且通过 0.2 微米纤维素乙酸酯过滤单元过滤灭菌。将溶液加到槽内,接着立即加入菌种。起始 OD₆₀₀ 为约 0.35。

[0232] 发酵操作参数如下:

[0233] 16 升操作体积

[0234] 温度:28°C

[0235] 通气:1.0vvm

[0236] 压力:690 毫巴

[0237] 搅动:500rpm

[0238] 视需要用 NH₄OH 控制 pH 在 6.8

[0239] 在需要时经由添加 UCON(由 Dow Chemical Company 制造的氟碳化合物溶剂共混物)控制发泡。

[0240] 在 OD₆₀₀0.8-1.0(接种后约二小时),无菌地加入经过滤灭菌的 IPTG(溶解在 500 毫升 dH₂O 中)至 35 μM 的最后浓度。继续发酵 48 小时,其后将槽的内容物冷却到 10°C。离心收集细胞且用 0.1 体积的 50mM 甲酸铵(pH7.0)清洗一次。将细胞糊置于塑料容器内且贮存在 -70°C 到使用为止。

[0241] 对于 250-升槽,按下述准备菌种:将 1 毫升的冷冻 SC16496 解冻且加到有 50 微克/毫升卡那霉素的 300 毫升 MT5 培养基中。在 28°C,250rpm 下培养该烧瓶 24 小时。测定 OD₆₀₀且取出可得 800D 单位的恰当体积的细胞并加到 250 毫升新鲜的 MT5 培养基中。将细胞无菌地添加到装在 Braun 发酵器中的 10 升 MT5/卡那霉素培养基中(起始 OD₆₀₀约 0.008)且在前文揭示的发酵操作参数下生长 16 小时。然后将培养液转移到 250 升含恰当浓度的卡那霉素和硫酸镁的 MT5 中。根据在这些条件下 SC16496 的 90 分钟双倍化时间,250 升中的 10 升菌种应该得到 0.30-0.35 的初始 OD₆₀₀。按照对 15-升发酵所述进行诱导、生长、收获与贮存。

[0242] 实施例 3

[0243] 使用离析出(部分纯化)的 PDH/FDH 酶浓缩物从 3-羟基- α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式 1)通过(α S)- α -氨基-3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式 2)显微制备(telescoped preparation)(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 3)

[0244] 步骤 1:PDH/FDH 酶浓缩物的离析

[0245] 从 4000 升-槽发酵(使用类似于实施例 2 的程序制备)得到大肠杆菌

JM110 (pBMS2000-PPFDH-PDHmod) 的发酵培养液 (30 升) 且通过微流化器 (Microfluidics model M-110Y, 操作压力 12,000-20,000psi) (通过一次), 在保持培养液温度低于 40°C 的条件下从细胞释出活性。微流化培养液的 PDH/FDH 活性对于 PDH 为 32IU/毫升及对于 FDH 为 8IU/毫升。

[0246] 为了澄清整个培养液, 在充分搅拌的培养液中加入 4.5 千克的硅藻土。然后加入 0.201 升的 30% 聚乙烯亚胺水溶液且混合 30 分钟。之后, 使用压滤器 (Ertel Alsop model 18-ESSC-10) 过滤该混合物, 得 18 升的滤液。用 12 升的水洗涤滤饼使体积回到 30 升。该步骤产率为 97%PDH 活性回收率, PDH 活性为 31IU/毫升, 且 FDH 活性为 8IU/毫升。

[0247] 将澄清化的培养液通过 100,000MWC0 过滤盒 (filter cassette) (Millipore Pellicon2 单元, 聚醚砜低蛋白结合盒 (binding cassette), 0.5 平方米过滤面积) 超滤。泵的循环速率为 400 毫升/分。将澄清化滤液浓缩到 1.5 升且得到有 567IU/毫升的 PDH 效价和 136IU/毫升的 FDH 效价的酶浓缩物。检测渗透物, 没有测得活性。在浓缩物中的整体酶活性回收率为 84%。

[0248] 步骤 2: 还原胺化

[0249] 在 20 升容器内加入 3-羟基- α -酮基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸 (式 1) (1.00 千克; 4.46 摩尔) 接着加入水 (5 升)。搅拌混合物且用 10N NaOH 将 pH 调到 pH ~ 8 而得溶液。加入 Darco KBB 碳 (100 克) 且搅拌混合物 5 分钟后, 经装有 5 μ 滤纸的 Buchner 漏斗过滤。用水 (2 \times 1 升) 洗涤滤器且合并滤液和洗液而得透明溶液。

[0250] 在搅拌下, 加入甲酸铵 (0.562 千克; 8.92 摩尔) 且用 10N NaOH 将 pH 调到 ~ 7.5。加入烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (2.65 克) 和二硫苏糖醇 (1.54 克)。在固体都溶解时, 加入 PDH/FDH 酶浓缩物 (1.03 升; 500,000IU 的 PDH)。在环境温度下用 10N NaOH 将 pH 再调到 ~ 8.0。

[0251] 然后将混合物热到 ~ 40°C 且用水稀释到 10 升的总体积。将 pH 保持在 7.7-8.3, 同时搅拌 42 小时。所得溶液含有 0.955 千克 (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 2)。

[0252] 步骤 3: BOC-保护

[0253] 在一部分 (α S)- α -氨基-3-羟基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸 (式 2) (477.5 克; 2.12 摩尔) 溶液中加入二碳酸二叔丁酯 (1.022 千克; 4.68 摩尔)。在环境温度下搅拌此混合物, 使用 10N NaOH 以 pH 恒滴定器 (stat titrator) 将 pH 调整且维持在 10。在 Boc₂O 添加 4 小时后, 残留起始物低于 1.0% 时, 反应即告完全。

[0254] 使用 35% H₂SO₄ 将混合物的 pH 调整到 ~ 8 且在混合物中加入 i-PrOAc (5.0 升)。然后用 35% H₂SO₄ 将混合物的 pH 调到 2.0 且维持在此 pH 下 5-10 分钟。加入 Dicalite (250 克); 搅拌混合物 ~ 10 分钟, 然后经过 Buchner 漏斗内的滤纸上的 Dicalite (250 克) 垫过滤。再用 2.5 升 i-PrOAc 洗 Dicalite 垫。

[0255] 用 10N NaOH 将滤液调到 pH8。在沉降 1 小时后, 丢弃包括界面的有机层。在水层中, 加入 i-PrOAc (7.5 升)。用 35% H₂SO₄ 将混合物酸化到 pH ~ 2, 然后在温和搅拌下, 加热且维持在 ~ 40°C。分开液层且保留有机萃取物。用 i-PrOAc (3.75 升) 萃取带界面的水层且在 40°C 下保持 2 小时后再分离液层。再用 i-PrOAc (3.75 升) 萃取带界面的水层, 且在 40°C 下保持 2 小时后分离液层。

[0256] 将合并的有机萃取液 (~ 15 升) 蒸馏浓缩到 ~ 4.5 升。在此溶液中, 在 10-15 分钟期间添加庚烷 (~ 10 升) 同时将温度维持在 ~ 82-89°C。将反应器夹套温度调设到 70°C 且在此温度下维持 1 小时。在冷却后不久就发生结晶。然后将反应器夹套温度调定在 40°C 且在此温度维持 30 分钟。

[0257] 将悬浮液冷却到环境温度, 且接着进一步冷却到 0-5°C。在 0-5°C 下搅拌一小时之后, 滤出产物。用庚烷 (2.5 升) 洗产物, 然后在 40°C 真空中干燥而得 607.0 克 (88% 产率) 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 3)。

[0258] 实施例 4

[0259] 苯丙氨酸脱氧酶被化验物 A

[0260] 苯丙氨酸脱氢酶被化验物 A 在 40°C 下 1 毫升内包含: 0.4mM NADH, 5mM 苯基丙酮酸钠, 0.75M NH₄OH, 用 HCl 调到 pH8.75。在 340 纳米监测到吸光度减低。根据吸光度的变化速率将酶活性单位计算为微摩尔 / 分。

[0261] 实施例 5

[0262] 苯丙氨酸脱氢酶被化验物 B

[0263] 苯丙氨酸脱氢酶被化验物 B 在 40°C 下 1 毫升内包含: 1mM NAD, 10mM L-苯丙氨酸, 0.1M K₂HPO₄, 用 1N NaOH 调到 pH10.0。在 340 纳米监测到吸光度增加。根据吸光度的变化速率将酶活性位计算成微摩尔 / 分。

[0264] 实施例 6

[0265] 苯丙氨酸脱氢酶被化验物 C

[0266] 苯丙氨酸脱氢酶被化验物 C 在 40°C 下 1.0 毫升内包含: 0.4mM NADH, 50mM 3-羟基- α -酮基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(溶解在 1 当量 NaOH 溶液内), 0.75M NH₄OH, 用 HCl 调整到 pH8.75。在 340 纳米监测大到吸光度增加。根据吸光度的变化速率将酶活性单位计算为微摩尔 / 分。

[0267] 实施例 7

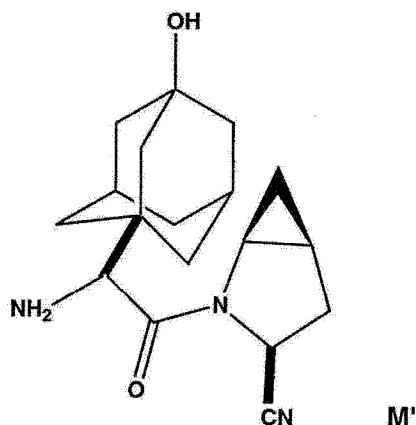
[0268] 甲酸脱氢酶被化验物

[0269] 甲酸脱氢酶被化验物是在 40°C 下 1.0 毫升内包含: 1mM NAD, 100mM 甲酸铵, 100mM 磷酸钾缓冲液, pH8.0。在 340 纳米监测吸光度增加。根据吸光度变化速率将酶活性单位计算为微摩尔 / 分。

[0270] 实施例 8

[0271] 制备:

[0272]



[0273] A. $ZnCl_2$ -催化的金刚烷基溴 (式 A) 偶合

[0274] 在干燥容器内装入 7.5 千克金刚烷基溴。然后在室温下加入二氯甲烷 (22.5 升) 以溶解固体金刚烷基溴。该溶解是吸热性的,所以在下一步骤之前,将反应混合物的温度回到 20°C。然后在反应混合物中加入氯化锌 (1.05 千克) 且在 20°C 下搅拌约 5 分钟。之后在反应混合物中加入三-(三甲基甲硅烷氧基)-乙烯 (15.3 千克),同时将反应温度维持在 20 至 25°C 之间且搅拌所得混合物 2 小时。混合后,加入三-(三甲基甲硅烷氧基)-乙烯 (5.10 千克)。在此添加之中,温度都保持在 30°C 以下。在 20 至 25°C 下再保持反应 12 至 15 小时,此时,用二氯甲烷 (15 升) 稀释反应混合物且冷却到 0 至 5°C。然后,用半饱和的 NH_4Cl 溶液,开始以逐滴方式,处理反应混合物。在添加之中,将温度保持在 30°C 以下,得到浓稠悬浮液。在此悬浮液中加入乙酸乙酯 (93.75 升)。激烈搅拌混合物 15 分钟且分开有机相与水相。贮存有机层且用乙酸乙酯萃洗水层二次 (每次洗涤用 18.75 升)。然后将乙酸乙酯洗液与有机层合并且用水 (37.5 升) 接着用半饱和盐水 (37.5 升) 萃洗。再度分出有机层且蒸发形成晶体。之后,实施溶剂交换至庚烷,最终体积为 22.5 升。将所得悬浮液冷却到 5 至 10°C 一小时且经由过滤得到产物 α -羟基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸 (式 B)。 α -羟基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸 (式 B) 的产率为 6.96 千克 (33.11 摩尔,95%)。

[0275] B. α -羟基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸 (式 B) 酯化形成式 C 酯

[0276] 首先在反应器内制造惰性气氛。然后在反应器内加入甲醇 (35.00 升) 接着加入 α -羟基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸 (式 B) (14.00 千克) 以形成悬浮液。将悬浮液冷却到 0 至 5°C 且加入乙酰氯,其方式为使得反应混合物的温度保持在介于 5 与 10°C 之间。在乙酰氯的添加完毕之后,将反应混合物加热到 20 至 25°C 且在 20 至 25°C 下搅拌 2 小时。然后在 40°C 真空下浓缩反应混合物且得到稀油状物。将该油溶于乙酸乙酯 (71.96 升) 中且调到室温。将所得混合物用水萃洗二次 (每次萃洗用 28.78 升) 且在每次萃洗后分离有机层与水层。保存有机层同时将水层合并且用 3N NaOH 溶液调到 pH9.5。然后用乙酸乙酯萃取合并水层两次 (每次萃取用 14.39 升)。每次萃取后都分出有机层且与保存的有机层合并。然后用饱和碳酸氢钠溶液 (28.78 升) 接着用盐水 (43.18 升) 萃洗合并的有机层。之后在 40°C 真空下除去所有挥发物且得到静置下会结晶的无色至稍微黄色的油状物。此油状物含有 13.29 千克 (59.26 摩尔,89%) 的 α -羟基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸,甲酯 (式 C)。

[0277] C. α -羟基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸,甲酯 (式 C) 经 Swern 氧化形成 α -酮

基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷 -1- 乙酸, 甲酯 (式 D)

[0278] 在三颈烧瓶 (22 升) 上装配机械搅拌器, 温度探针与加液漏斗, 且用氮气冲涤整夜。然后加入草酰氯 (500 毫升, 5.73 摩尔), 接着加入 CH₂Cl₂ (8 升)。将所得溶液用丙酮 / 干冰浴冷却到 -69°C。然后在约 30 分钟期间, 将内部温度保持低于 -60°C 的同时, 慢慢加入二甲亚砜溶液 (DMSO; 700 毫升, 9.86 摩尔)。在维持温度在 -60 至 -70°C 之下搅拌该溶液 20 分钟。然后在约 30 分钟期间, 将内部温度保持低于 -60°C 之下慢慢加入 α-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) / CH₂Cl₂ (1.7 升) 溶液。搅拌所得溶液 30 分钟。然加入 NEt₃ (3 升, 21.5 摩尔) 形成三乙胺盐酸盐浓浆液。将反应混合物加热到室温并加入水 (1 升) 以溶解三乙胺盐 (TEA 盐)。然后将反应混合物转移到圆底烧瓶, 且浓缩除去二氯甲烷 (DCM) 和 NEt₃。加入 EtOAc (12 升) 并分开所得水层与有机层。用水萃洗有机层三次 (每次 2 升) 接着用盐水萃洗 (2 升)。然后以无水 Na₂SO₄ 干燥有机相, 蒸发, 产生微黄色固体 α-酮基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷 -1- 乙酸, 甲酯 (式 D)。产率为约 104%。

[0279] D. α-酮基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷 -1- 乙酸, 甲酯 (式 D) 羟基化成为 3-羟基 - α-酮基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷 -1- 乙酸, 甲酯 (式 1a)

[0280] 在 Erlenmeyer 烧瓶中加入 95 至 98% H₂SO₄ (495 毫升) 且在冰浴中冷却到 8°C。然后在烧瓶中加入 HNO₃ (47.5 毫升, 50%, 经由将 50 毫升的 70% HNO₃ 加到 30 毫升水中而制备成) 且将混合物再于冰浴中冷却到 8°C。在 30 至 60 分钟期间将固体 α-酮基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷 -1- 乙酸, 甲酯 (式 D) (100 克, 0.45 摩尔) 按份慢慢地加到混合物中以维持低于 28°C 的温度。在冰浴中冷却之下搅拌反应混合物。以薄层色谱法 (TLC) 或高效液相色谱法 (HPLC) 监测反应的进展。对于 TLC, 是使用硅胶且溶剂为 EtOAc/MeOH/己烷 (9/1/10); KMnO₄。对于 HPLC, 使用 4.6 × 50 毫米, C18, 3 微米, 120 埃 (angstrom) 管柱, 7 分钟内 10% 乙腈 / H₂O 至 100% 乙腈的梯度, 流速为 2.5 毫升 / 分。监测波长为 200 纳米。当反应完成 (约 1 小时后) 之时, 经由添加到冷水 (1.5 升) 和 EtOAc (500 毫升) 中止反应。加入额外的水和 EtOAc (各 500 毫升) 以帮助水层与有机层的分离。然后用三份各 500 毫升的 EtOAc 萃取水层。合并有机层且用盐水 (400 毫升) 萃洗。然后减压浓缩洗过的有机层, 得到 130 克黄色油状剩余物, 其中含有 3-羟基 - α-酮基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷 -1- 乙酸, 甲酯 (式 1a)。

[0281] E. 3-羟基 - α-酮基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷 -1- 乙酸, 甲酯 (式 1a) 水解成 3-羟基 - α-酮基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷 -1- 乙酸 (式 1)

[0282] 将上面 D 部分的黄色油状剩余物溶解在四氢呋喃 (300 毫升) 中且在冰浴中冷却到 5°C。在该溶液中慢慢加入 1 升的 1N 氢氧化钠以调节 pH 到约 7, 同时维持温度低于 30°C。然后加入额外的 500 毫升 1N NaOH 以调节 pH 到约 14。之后在冰浴中冷却之下, 搅拌反应混合物且如实施例 23 中所述以 TLC 或 HPLC 监测反应进展。当约 30 分钟后反应完毕时, 加入 EtOAc (500 毫升) 且分离水层与有机层。用另一份 500 毫升的 EtOAc 萃洗水层。用浓 HCl 将水层酸化。当溶液到达 pH7 时, 加入 EtOAc (500 毫升) 接着加入更多的浓 HCl 直到 pH 达 0.7 为止。所加入的浓 HCl 总量为 150 毫升。然后用 EtOAc (4 × 400 毫升) 萃取水层且将合并的有机层用 400 毫升的水接着用 400 毫升的盐水予以萃洗。之后, 将萃洗过的有机层用 MgSO₄ 干燥且浓缩。产量为 88 克淡黄色固体。将此固体溶解在 100 毫升 EtOAc 和 300 毫升

庚烷中,搅拌 30 分钟,接着过滤且空气干燥而得 85 克褐色固体 (85% 的 3-羟基- α -酮基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸 (式 1)。

[0283] E'. 采用一釜法制备 3-羟基- α -酮基三环 (3.3.1.1^{3,7}) 癸烷-1-乙酸 (式 1)

[0284] 1. 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸甲酯 (式 VIII) 的制备

[0285] 10N HNO₃ 的制备:在 100 毫升容量瓶中加入浓 HNO₃ (88.25 克, ~ 62.58 毫升, ~ 1.0 摩尔) 且在冰浴中冷却。加入水 (35 毫升)。在散去混合热之后,将溶液加热到室温。然后用水将量瓶添补到标记线而得 10N HNO₃。

[0286] 在装有热电偶温度计的 250 毫升三颈烧瓶中加入浓 H₂SO₄ (103 克, ~ 56 毫升)。在冰浴中冷却到 0.4°C 之后,在 ~ 30 分钟期间加入 10N HNO₃ (5.68 毫升, 56.8 毫摩尔)。在此酸混合物的温度降低到 ~ 1.0°C 时,移开冷浴。将金刚烷-1-基-二氯-乙酸甲酯 (式 VII, 15.0 克, 54.11 毫摩尔;在研钵/杵中稍微研磨,以使大块/晶体破碎) 按份加入 (每 10 分钟 1.25 克;1 小时 50 分钟的添加时间)。在 ~ 5 小时后,反应混合物为透明,淡黄色溶液。

[0287] 在搅拌 ~ 24 小时后,反应混合物成为很淡的黄色溶液。在装有机械搅拌器和热电偶温度计的四颈 Morton 烧瓶 (1 升) 中加入水 (250 毫升) 和尿素 (8.0 克, 0.133 摩尔, 相对于 HNO₃ 为 ~ 2.34 当量)。在所得溶液中加入乙酸乙酯 (230 毫升)。将所得双相混合物在冰浴中冷却到 ~ 1.0°C。将上面所得反应混合物在 ~ 15 分钟期间加到冷的 EtOAc/水/尿素混合物中。该转移是使用额外的乙酸乙酯和水 (各 ~ 50 毫升) 完成的。在搅拌 ~ 45 分钟后,移开冷浴且使混合物搅拌升温。在搅拌 4.5 小时 (自终止开始) 之后,使用额外的乙酸乙酯 (~ 100 毫升) 将所得混合物转移到分液漏斗 (1 升), 完成该转移。除去水性部分且用乙酸乙酯萃取 (1×80 毫升)。合并各有机部分且用水 (2×90 毫升), 1N NaHCO₃ (4×90 毫升) 和盐水萃洗。在无水硫酸镁上干燥之后,减压除去溶剂而得式 VIII 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸甲酯,为几乎无色的固体:15.67 克 (98.7% 粗产率)。此粗制物可不必纯化即用来制备式 IX 二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)-乙酸。不过,若需要时,可用甲醇 (102 毫升) 和水 (85 毫升) 将粗制物 (15.65 克) 重结晶而得棉絮状固体 (熔点 114.8-115.0°C), 回收率为 91%。

[0288] 元素分析: C₁₃H₁₈Cl₂O₃:

[0289] 计算值: C, 53.25; H, 6.18; Cl, 24.18%

[0290] 实测值: C, 53.24; H, 6.24; Cl, 24.31%

[0291] ¹H NMR (500.16MHz, CDCl₃) 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

[0292] ¹³C NMR (127.78MHz, CDCl₃) δ 165.929, 94.281, 68.932, 54.150, 44.478, 44.529, 44.020, 35.750, 34.759, 30.149 ppm

[0293] 实验室 HPLC:

[0294] YMC ODS-A S3120 Å_i (4.6×50 毫米), λ =200 纳米, 2.5 毫升/分

[0295] 溶剂: A=0.2% H₃PO₄, 水中

[0296] B=90% CH₃CN, 水中

[0297] 梯度: 20%A 至 100%B, 10 分钟期间

[0298]

滞留时间	面积%	鉴定
2.06 分	1.19	未知
4.54 分	98.16	二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)乙酸甲酯
5.09 分	0.65	未知
8.35 分		金刚烷-1-基-二氯-乙酸甲酯

[0299] 2,3-羟基- α -酮基三环(3,3,1,1^{3,7})癸烷-1-乙酸的制备

[0300] 在装有压力均衡加液漏斗和氩气入口的 250-毫升三颈烧瓶中加入按上面步骤 1 制备的二氯-(3-羟基-金刚烷-1-基)乙酸甲酯(式 VIII)(15 克, 51.16 毫摩尔), 接着加入四氢呋喃(30 毫升, 经不稳定化(instabilized))。在搅拌数分钟之后, 式 III 甲酯溶解而得浑浊溶液。在此溶液中加入蒸馏水(30 毫升), 形成疏松悬浮液。在加液漏斗中加入 1N NaOH(69 毫升, 69 毫摩尔, 相对于输入的式 VIII 化合物为 ~ 1.35 当量)。在 70 分钟期间滴加 NaOH 而得几乎无色的溶液, 在室温下予以搅拌。

[0301] ~ 16 小时的 HPLC 分析显示式 VIII 化合物的水解已完成。将反应混合物(pH 值为 13.24 的透明无色溶液)经由添加 ~ 6 N HCl(2.8 毫升)调节到 pH7.40。加入固体 NaHCO₃(11.2 克, 0.133 摩尔, 2.60 当量)而形成悬浮液。

[0302] 在加热 4 小时 15 分钟后, HPLC 分析显示反应完成。在加热 5 小时之后, 移开热源且使反应混合物(透明, 无色溶液)冷却。在冷却到室温后, 在冷藏器(+4 $^{\circ}$ C)中贮存反应混合物 4 天。

[0303] 在冷藏 4 天之后, 反应混合物仍为透明无色溶液且 HPLC 分析显示, 若有变化, 贮存时的变化也很小。在加热到室温后, 小心添加浓 HCl(需 11 毫升, 放出 CO₂; 在 pH ~ 1.40 下, 有无色固体开始沉淀)将混合物(pH7.77)酸化到 pH0.20。用 EtOAc(x4, ~ 500 毫升总体积; 在每次 EtOAc 萃取后对水相级分实施 HPLC 分析)萃取所得悬浮液。将第一次 EtOAc 萃取后的水层(pH0.38)经由添加浓 HCl(需 ~ 1.6 毫升)调节到 pH0.18。将第二次 EtOAc 萃取后的水层(pH0.37)经由添加浓 HCl(需 ~ 0.8 mL)调节到 pH0.17。在其余 EtOAc 萃取后的水层不需加以 pH 调整(萃取 #3, pH0.19; 萃取 #4, pH0.19)。将有机级分合并。在干燥(MgSO₄)后, 减压除去溶剂而得粗制称为式 II 的化合物, 为几乎无色, 粒状固体, 将其在真空(泵)下干燥 16 小时: 11.42 克(99.53% 产率); HPLC, 100%(面积%)。

[0304] 元素分析: C₁₂H₁₆Cl₂O₃ (55465-020-31, TR46373)

[0305] 计算值: C, 64.27%; H, 7.19%

[0306] 实测值: C, 64.19%; H, 7.09%

[0307] 将粗制的式 1a 化合物(5.0 克)在蒸馏水(19 毫升)中加热到 $\sim 85^{\circ}$ C 予以溶解后, 移开热源且使其冷却。在 $\sim 53^{\circ}$ C 下, 该物质开始结晶。在静置于室温下 ~ 2 小时之后, 过滤收集固体且用冰水洗涤。经由使氮气通过滤饼除去大部分水分。然后在真空(泵)下干燥该物质 17 小时而得大尺寸无色针状式 1a 化合物: 4.33 克(86.6% 回收率); 熔点 164.5-165.6 $^{\circ}$ C (在 Mettler FP800 系统上测定); HPLC, 100%(面积%)。

[0308] 元素分析: C₁₂H₁₆Cl₂O₃ (55465-023-15, TR46905)

[0309] 计算值: C, 64.27%; H, 7.19%

[0310] 实测值: C, 64.42%; H, 7.04%

[0311] F. L-焦谷氨酸(式E)酯化形成L-焦谷氨酸乙酯(式F)

[0312] 在反应容器内加入乙醇(49.0升)且冷却到 -5°C 。然后在反应容器内加入亚硫酸氯(4.97千克),其方式为使得混合物的温度不超过 0°C 。在亚硫酸氯添加完毕之后,将混合物再冷却到 -5°C 且将L-焦谷氨酸(式E)按份添加使得在添加中温度保持在 0 与 -5°C 之间。添加酸之后,将反应混合物加热到 20 至 25°C 且搅拌5小时。然后在真空($T_{\text{max}}45^{\circ}\text{C}$)下将反应混合物蒸发到其原体积的约15%。然后将剩下的油状物溶解在甲苯(49升)之中。接着将甲苯溶液冷却到约 10°C 且慢慢加入三乙胺(8.45千克)使得最高温度为介于 20 与 25°C 之间。搅拌所得悬浮液30分钟后予以过滤。用甲苯(约5升)洗滤饼。将滤液在 50°C 真空下缩减到约10升的总体积。经由在 50°C 下慢慢添加环己烷(8升)且随后冷却到约 30°C 而引发结晶。在晶种形成之后,将混合物冷却到 20 至 25°C 且加入第二份的8升环己烷。然后将混合物冷却到 6 至 8°C ,搅拌一小时,且滤出所得晶体。用环己烷洗晶体二次(每次洗涤用4升)。产量为4.89千克(82%)无色针状L-焦谷氨酸乙酯(式F)。

[0313] G. L-焦谷氨酸乙酯的BOC-保护(式G)

[0314] 将L-焦谷氨酸乙酯(式F)(5.00千克)在室温下溶解于甲苯(24.97升)之中。然后在溶液中加入4-二甲氨基吡啶(0.19千克)。之后,在反应混合物中加入BOC-酸酐(7.29千克)溶解在甲苯(24.97升)中的溶液,其方式为使得反应温度不超过 25°C 。在完全添加之后,在 25°C 下搅拌反应混合物三小时。然后在反应混合物中加入半饱和的 NaHCO_3 -溶液(49.94升)且激烈搅拌10分钟,再分离有机相与水相。用水萃洗分出的有机层二次(每次24.97升)。然后在 50°C 的最大温度和真空下从溶剂蒸发掉有机层。剩下的无色至微黄色油状物于静置下结晶。理论产量为8.18千克(31.81摩尔)的(5S)-2-酮基吡咯烷-1,5-二羧酸,1-(1,1-二甲基乙基),5-乙基酯(式G)。

[0315] H. 三乙基氢化硼锂还原和消去反应

[0316] 将(5S)-2-酮基吡咯烷-1,5-二羧酸,1-(1,1-二甲基乙基),5-乙基酯(式G)(4.80千克)溶解在甲苯中(30.97升; $K_{\text{fmax}}0.01\%$ 水)且冷却到 -50°C 。在此溶液中加入三乙基氢化硼锂(LiEt_3BH ,1M,THF中;19.96升),其方式为使得反应温度不超过 -45°C 。在完全添加后,在 -45 至 -50°C 下搅拌混合物30分钟。然后在反应混合物中添加N-乙基二异丙胺(DIPEA;14.47升),其方式为使得温度不超过 -45°C 。将二甲氨基吡啶(0.030千克)以固体形式加到混合物内。之后,在反应混合物中加入三氟乙酸酐(TFAA)(4.70千克),其方式为使得反应温度不超过 -45°C 。在完全添加后,将反应混合物在一小时内加热到 20 至 25°C 且在此温度下保持2小时。之后,将反应混合物冷却到 0°C 且慢慢地加入水(48.00升)使反应温度不超过 5°C 。然后分离水相与有机相,且再用48升的水(0 至 5°C)萃洗有机相。之后,将有机相在 40°C 蒸发且除气。得到黄色油状物,产量为4.5千克(18.66摩尔,100%)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(BOC-DHPEE)(式G')。

[0317] I. BOC-DHPEE(式G')的水解

[0318] 将自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G')(6.00千克)和乙醇(24.00升)制备成的溶液冷却到 0 至 5°C 且在此温度下用氢氧化锂水合物(2.09千克)/(水20.87升)溶液予以缓慢处理而产生浑浊溶液。之后将此浑浊溶液加热到 20 至 25°C 且在此温度下搅拌2小时。然后在 40°C 最高温度和真

空下将反应混合物蒸发到约 10.5 升的体积且加入水 (24.00 升) 和叔丁基甲基醚 (TBME 或 MTBE) (24 升), 并混合 10 分钟。分离所得有机相与水相且在水相中再加入 24 升的 TBME。然后将此混合物冷却到 5 至 10°C, 且在激烈搅拌下, 用 H₃PO₄85%-水 (1:4) 将 pH 调到 2.3。在此过程中, 将温度维持在 5 至 10°C 以使其稳定。分离所得有机层与水层。将有机层储存且再用 24 升预冷却到 5 至 10°C 的 TBME 萃取水层。将所得有机层与储存有机层合并且加入二异丙基乙胺 (DIPEA) (4.82 千克)。然后将该溶液在 30°C 最高温度和真空下蒸发且除气。产量为 7.84 千克 (22.88 摩尔, 92%) (N-BOC-脱氢辅氨酸 *DIPEA (BOC-DHP))。

[0319] J. BOC-DHP 上形成酰胺

[0320] 按 I 部分中所述皂化合成的 BOC-DHP 可能含有水。所以在进行反应之前, 用甲苯进行共沸蒸馏。不过, 由于过量的试剂, 在除去任何水之前, 原料的计算是以 BOC-DHP 的量为基准。对于共沸蒸馏, 用甲苯稀释 BOC-DHP 到约 30% 的溶液。在 40°C 真空下除去甲苯。然后将处理过的 BOC-DHP (6.00 千克) 溶解在 THF (48.0 升) 中。在该溶液中加入 DIPEA (2.26 千克) 且将反应混合物冷却到 -20 至 -25°C。然后, 慢慢加入甲磺酰氯 (3.01 千克)。在此添加过程中, DIPEA 盐酸盐沉淀。然后在 -20°C 下搅拌所得悬浮液 2 小时, 接着通过表面下气体入口使用氨予以饱和。在添加氨的同时, 将反应物加热到 0°C。在饱和后, 将反应混合物加热到 20°C 且搅拌 3 小时。在搅拌之后, 过滤反应混合物以除去盐酸盐。用 THF (12 升) 分份洗滤饼。将滤液在最高温度 40°C 和真空下浓缩, 然后溶解在二氯甲烷 (33.33 升) 中。用水 (26.66 升) 萃洗该溶液。分离所得有机相与水相且用二氯甲烷萃取水相二次 (每次 20 升)。合并所得有机层且在真空下浓缩及除气以除去任何过剩的 Hünigs 碱。产量为 3.35 千克 (15.77 摩尔, 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 G'')。

[0321] K. (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 G'') 的环丙烷化

[0322] 在第一反应器 (反应器 A) 中加入溶解在二氯甲烷 (18.0 升) 中的 BOC-DHPA (式 IV) (4 千克) 并保持于 20°C。在第二反应器 (反应器 B) 中加入二氯甲烷 (18.00 升) 且冷却到 -30°C。然后在反应器 B 中加入二甲氧基乙烷 (DME) (3.36 千克), 接着加入 30% 二乙基锌 (15.36 千克)/甲苯溶液, 同时维持温度在 -30 与 -25°C 之间。然后在反应器 B 中加入二碘甲烷 (19.99 千克) 同时维持温度在 -30 与 -25°C 之间。在二碘甲烷完全添加后, 在 -30 至 -25°C 下搅拌混合物 45 分钟。然后通过冷却管 (-20 至 -25°C) 将此混合物送入反应器 A 中。该送料是以约 5% 的份数慢慢进行使得反应器 A 的反应温度维持在 22 与 24°C 之间直到反应完全为止。在反应完成之后, 将反应器 A 的混合物冷却到 5 至 10°C。然后在反应混合物中慢慢地加入饱和碳酸氢盐溶液 (21.6 升), 其方式为使得反应温度不超过 15°C。在此添加之后, 搅拌反应混合物至少一小时, 同时有沉淀物形成。过滤悬浮液。将所得滤饼转移回到容器中, 再与二氯甲烷 (14.4 升) 搅和 30 分钟调浆, 且再过滤。在此第二次过滤之后, 用额外的二氯甲烷 (7.2 升) 洗滤饼。然后将滤液分成水相与有机相且用半饱和盐水 (21.6 升) 萃洗有机相。然后在 30°C 最高温度和真空下除去溶剂且用庚烷交换。得到粗产物在庚烷中的浆液。在溶剂交换后, 悬浮液的最后体积为 14.4 升。过滤离析出粗产物。用庚烷 (2.9 升) 洗滤饼后, 真空干燥到恒重。粗产量为 2.76 千克 (12.2 摩尔, 72%) 的 (1S-(1 α , 3 β , 5 α))-3-氨基羰基)-2-氮杂双环 (3.1.0) 己烷-2-羧酸, 1,1-二甲基乙基

酯(式H)。为了纯化,将粗制物在20至22℃下在8倍量的1:1乙酸丁酯/庚烷混合物中调浆4小时。过滤该物质且用约1倍量的庚烷洗滤饼。产量为2.11千克(9.33摩尔,55%)(1S-(1 α ,3 β ,5 α)-3-氨基羰基)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-2-羧酸,1,1-二甲基乙基酯(式H)。

[0323] L. (1S-(1 α ,3 β ,5 α)-3-氨基羰基)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-2-羧酸,1,1-二甲基乙基酯(式H)脱保护基形成(1S,3S,5S)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲酰胺(式J)

[0324] 在装有机械搅拌器和热电偶的100毫升2颈烧瓶中加入(1S-(1 α ,3 β ,5 α)-3-氨基羰基)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-2-羧酸,1,1-二甲基乙基酯(式H)(5.0克,22.1毫摩尔)和THF(20毫升)。然后在该悬浮液中加入HCl(2.5M,EtOAc中,25毫升,62.5毫摩尔)。在室温下搅拌所得溶液18小时,在该时间内,观察到沉淀。以HPLC监测反应的完成。在悬浮液中加入甲基叔丁基醚(MTBE)且继续再搅拌30分钟。然后在N₂保护下过滤该悬浮液而产生白色固体,用MTBE(20毫升)予以洗涤。在烘箱内减压下干燥该固体48小时而得(1S,3S,5S)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲酰胺盐酸盐(式J;3.6克,100%)。

[0325] M. (α S)- α -氨基-3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式2)经BOC保护形成(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3酸

[0326] 优选的制备游离酸(式3)的方法描述在实施例3中。或者,可以使用下面的方法来制造该游离酸:

[0327] 将(α S)- α -氨基-3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸烷-1-乙酸(式2)(469克,2.08摩尔)溶解在冰冷的1N NaOH(5升,5摩尔,2.4当量)中,其是在装有温度探针和pH探针的相分离器内进行。在该溶液中加入THF(2.5升)。然后加入固体Boc₂O且在环境温度下搅拌反应混合物约一小时。之后,搅拌下加入EtOAc(4升)并分离所得有机层与水层。用浓HCl将水层的pH调到7。然后加入EtOAc(4升)且加入额外的HCl以降低pH至约1。加入的浓HCl总体积为510毫升。再分离有机层与水层且用EtOAc萃取水层(3 \times 3升)。然后合并有机层且用水(3升)与盐水(3升)萃洗。然后将萃洗过的有机层用Na₂SO₄干燥且在室温下以rotovap浓缩到干。产量为542克的(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3)。

[0328] N. 偶合反应产生3-氰基-(α S)- α -(3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸-1-基)- β -酮基-(1S,3S,5S)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-2-乙烷氨基甲酸,1,1-二甲基乙基酯(式K)

[0329] 在装有温度计,机械搅拌器和气体入口的2升三颈烧瓶中加入(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3)(50克,153.8毫摩尔)。加入THF(200毫升)且搅拌产生透明溶液。将该溶液置于丙酮-干冰-水浴中冷却到-6℃。然后将甲磺酰氯(Mes-Cl)(13.1毫升,169毫摩尔,1.1当量)以单份形式加入接着加入二异丙基乙胺(94毫升,539毫摩尔,1.1当量)。该二异丙基乙胺是在约4分钟期间慢地加入以保持内部温度低于8℃。在0℃下搅拌反应混合物直到所有酸都转化成混合酸酐为止。然后将(1S,3S,5S)-2-氮杂双环(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)以单份形式加入且从冷却浴中取出烧瓶。在室温下搅拌反应混合物2小时后,静置在室温下过夜。

[0330] O. 脱水和水解制成 3-氰基-(α S)- α -(3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸-1-基)- β -酮基-(1S, 3S, 5S)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-2-乙烷氨基甲酸, 1,1-二甲基乙基酯(式L)

[0331] 在 N 部分的反应混合物中加入吡啶(6 当量, 922 毫摩尔, 74.6 毫升)且在冷却浴中将反应混合物冷却到 -8°C 。然后在 6 分钟期间将温度保持低于 10°C 的同时加入三氟乙酸酐(TFAA)(4 当量, 616 毫摩尔, 87 毫升)。在 24°C 下搅拌反应 0.5 小时, 且经由 HPLC(30 毫升, 0.5 毫升 AcN, 0.5 毫升 H_2O) 检查 N 部分化合物 K 的消失。

[0332] 然后在冷却浴中将反应冷却到约 -3°C 。在 10 分钟期间, 在反应中加入 NaOH(5N, 6 当量, 0.925 摩尔, 185 毫升)(水相 pH=9.9), 同时将反应温度保持低于 10°C 。在 5 分钟期间加入 K_2CO_3 水溶液(319 克, 15 当量, 溶于 510 毫升 H_2O 中)(温度 $=8^{\circ}\text{C}$, 水相 pH11.1)。使反应运行 7 小时 40 分钟。当通过 HPLC(30 微升, 0.5 毫升 AcN, 0.5 毫升 H_2O) 测定出所有中间体都在最后水解(hydrolyze to penultimate)时, 反应即完成。

[0333] 然后在反应混合物中加入 EtOAc(500 毫升)且分离所得水层与有机层。用 500 毫升缓冲溶液(2M H_3PO_4 , 1M NaH_2PO_4) 萃洗有机层。将温度从 15°C 提升到 23°C ; 添加时间: 5 分钟; 水层体积 = 560 毫升, pH=4.5, HPLC 得到 32 毫克产物; 有机层体积 = 1,080 毫升。用第二份 500 毫升缓冲溶液萃洗有机层; 水层体积 = 780 毫升, pH=2.5, HPLC 得到 415 毫克产物; 有机层体积 = 800 毫升, 1.02v/v% 吡啶。用 300 毫升盐水萃洗有机层; 水层体积 = 350 毫升, pH=1.8, HPLC 得到 20 毫克产物。用 130 毫升饱和 NaHCO_3 溶液萃洗有机层; 水层体积 = 176 毫升, pH=6.0, 780 毫克产物。用 300 半饱和盐水萃洗有机层; 水层体积 = 330 毫升, pH=5.2, 25 毫克产物; 有机层体积 = 650 毫升, 吡啶 0.045v/v%。在有机层中加入 5 克 Darco 且搅拌 5 分钟, 经 50 克二氧化硅过滤, 用 4×25 毫升 EtOAc 洗涤, 有机层体积 = 750 毫升, 吡啶 0.04v/v%。

[0334] 然后将有机层蒸馏到约 133 毫升。搅拌有机层一小时到溶液变浊为止。在 15 分钟期间加入 133 毫升庚烷, 且搅拌浆液过夜。加入 133 毫升庚烷过夜。在机械搅拌下将混合物激烈搅拌 20 分钟。滤出固体且用 50 毫升 5%EtOAc/庚烷洗滤饼; 在从母液除去溶剂后, 在 8.86 克粗产物中测得 3.4 克产物。在 50°C 真空下加热干产物晶体过夜。得到 467 克产物, $\sim 73\%$, 96.6AP。

[0335] P. 脱保护制成 (1S, 3S, 5S)-2-((2S)-2-氨基-2-(3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸-1-基)-1-酮基乙基)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-3-甲腈, 苯甲酸盐(1:1)(式M)

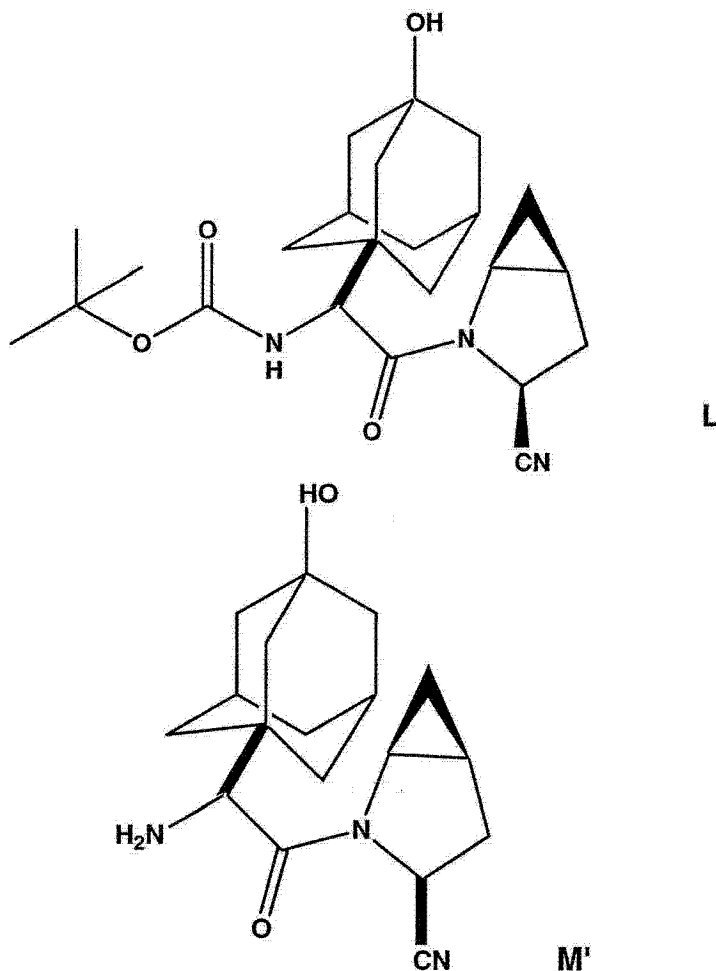
[0336] 在装有温度计, 机械搅拌器和气体入口的三颈烧瓶中加入 3-氰基-(α S)- α -(3-羟基三环(3.3.1.1^{3,7})癸-1-基)- β -酮基-(1S, 3S, 5S)-2-氮杂双环(3.1.0)己烷-2-乙烷氨基甲酸, 1,1-二甲基乙基酯(式L)(5.0 克, 12.04 毫摩尔)。加入约 45 至 50 毫升 EtOAc 以得到透明溶液。在室温下加入浓 HCl(3.00 毫升, 37%w/w%, 36.14 毫摩尔, 3 当量)且搅拌反应混合物到产生固体为止。之后加入水(30 毫升)且搅拌混合物 1 至 2 分钟。将此反应混合物转移到一分液漏斗且使反应混合物各层分离成净相。在维持温度低于 25°C 之下用 25%NaOH 将水层调到约 6 的较低 pH。

[0337] 然后在水层中加入异丙醇(IPA; 2至3毫升)接着添加苯甲酸钠(0.65 毫升苯甲酸钠溶液, 经由将 2.6 克苯甲酸钠溶解在 6.5 毫升水中制备成)以进行盐交换。剩余苯甲酸钠溶液是通过加液漏斗逐滴加入。在室温下搅拌所得反应混合物 16 至 24 小时。在 Buchner

漏斗上过滤反应混合物中的固体并用水洗,直至固体产生用 AgNO_3 试验对 Cl^- 的试验结果为阴性为止。然后用庚烷 (10 毫升) 洗固体以除去水,在漏斗上空气干燥,且在 35°C 真空箱中干燥到 $\text{KF} \leq 5\%$ 。产率为 79%,4.1 克。

[0338] Q. 将 L 脱保护基产生游离碱 M'

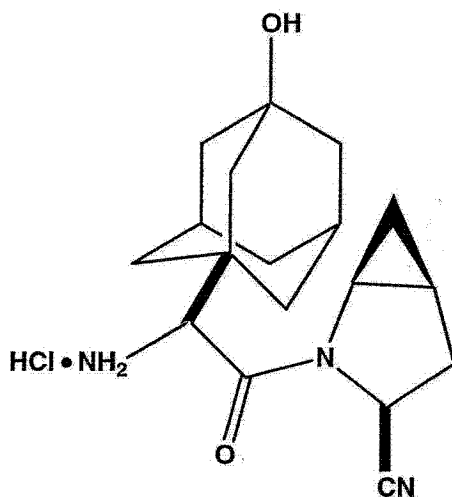
[0339]



[0340] 在装有机械搅拌器,温度探针和 N_2 气体入口的 12 升 3 颈烧瓶中加入 0 部分化合物 (L) (300 克,0.723 摩尔,90.6% 效力),二氯甲烷 (3 升),甲醇 (288 毫升,7.23 摩尔) 和浓 (36%) 盐酸 (288 毫升,7.23 摩尔)。在将反应温度保持在从约 20 至约 25°C 范围内之下发生反应。搅拌反应混合物 18 小时,分成二相且收集顶部水层。在水层中加入二氯甲烷 (6 升),与水 (720 毫升),且滴加 5N NaOH (~ 600 毫升) 以调节 pH 到 $9.0 \sim 10.5$ 。

[0341] 对含盐酸盐 (HPLC 鉴定) (式 L')

[0342]



[0343] 的有机相,用二氯甲烷(6升)和水(720毫升)处理,且在保持反应温度介于20与25℃之间滴加5N氢氧化钠溶液(~600毫升)以调节pH在介于9与10.5之间。加入NaCl(120克)且搅动混合物20分钟以形成相分离。收集有机层(6.2升)(含~174克化合物M')且弃去水层(1.75升)(含6.5克化合物M')。

[0344] 用1%NH₄Cl盐水溶液(450毫升)(1%NH₄Cl盐水溶液含1克NH₄Cl,25克NaCl和74克H₂O)萃洗有机层。从所得相分离物中回收6.0升的有机层(溶液中含~176克化合物M')且将水层(0.45升)(含1.4克化合物M'(~0.4%))弃去。

[0345] 在有机层中加入乙酸乙酯(~4升),同时在25℃/50mmHg蒸掉CH₂Cl₂。当到达2.5升最后体积时停止蒸馏。将有机层精细过滤(polish filter)以除去固体NaCl并浓缩到~1千克(在1升乙酸乙酯中~170克化合物M')。GC分析:DCM<0.1%。滴加水(17毫升)且在10分钟后开始结晶。加入17毫升水且搅动所得浆液30分钟,过滤,用乙酸乙酯洗滤饼且在室温和真空下干燥而得186克化合物M',产率81%。