

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-12689

(P2014-12689A)

(43) 公開日 平成26年1月23日(2014.1.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07D 209/02 (2006.01)	C07D 209/02 CSP	4B065
A61P 3/10 (2006.01)	A61P 3/10 ZNA	4C086
A61K 31/403 (2006.01)	A61K 31/403	4C204
C07K 5/06 (2006.01)	C07K 5/06	4H045
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	

審査請求 有 請求項の数 12 O L 外国語出願 (全 153 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-168522 (P2013-168522)	(71) 出願人	391015708
(22) 出願日	平成25年8月14日 (2013. 8. 14)		ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン
(62) 分割の表示	特願2010-181559 (P2010-181559)		パニー
原出願日	平成15年12月4日 (2003. 12. 4)		BRISTOL-MYERS SQUIB
(31) 優先権主張番号	60/431, 814		B COMPANY
(32) 優先日	平成14年12月9日 (2002. 12. 9)		アメリカ合衆国ニューヨーク州 1015
(33) 優先権主張国	米国 (US)		4 ニューヨーク パーク アベニュー
			345
		(74) 代理人	100081422
			弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100084146
			弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジペプチジルペプチダーゼ I V インヒビターおよびその中間体を製造する方法および化合物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ジペプチジルペプチダーゼ I V のシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターの製造のための方法および化合物の提供。

【解決手段】 (S) - - アミノ - 3 - ヒドロキシトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}] デカン - 1 - 酢酸と (1 S , 3 S , 5 S) - 2 - アザピシクロ [3.1.0] ヘキサン - 3 - カルボキサミド酸塩のカップリングによる (1 S , 3 S , 5 S) - 2 - [(2 S) - 2 - アミノ - 2 - (3 - ヒドロキシトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}] デス - 1 - イル) - 1 - オキソエチル] - 2 - アザピシクロ [3.1.0] ヘキサン - 3 - カルボニトリル安息香酸塩の合成方法。本化合物はジペプチジルペプチダーゼ I V インヒビターとして有用である

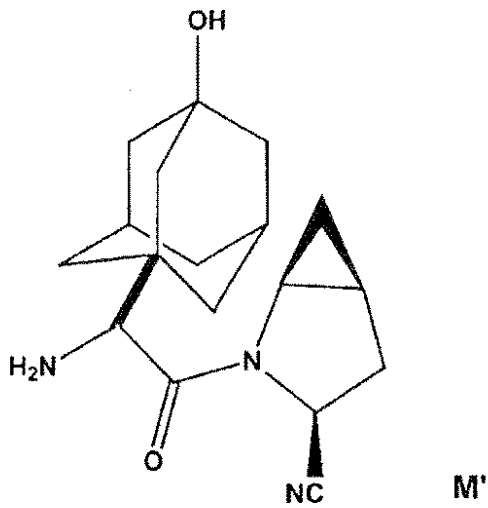
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

構造 M' :

【化 1】

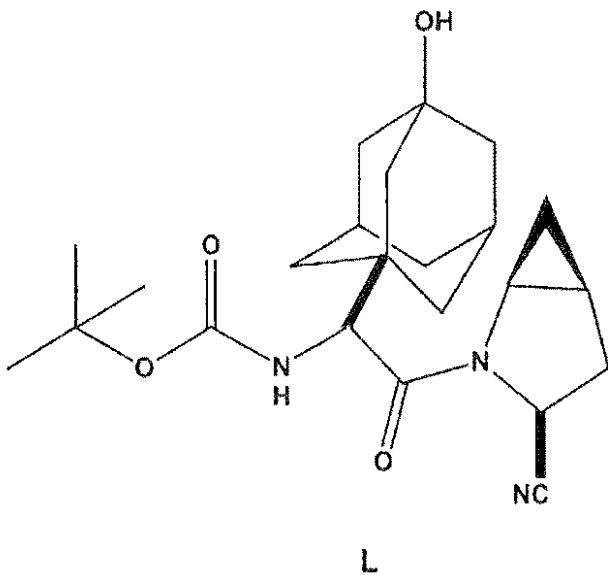


10

で示される遊離塩基化合物の製造方法であって、構造 L :

【化 2】

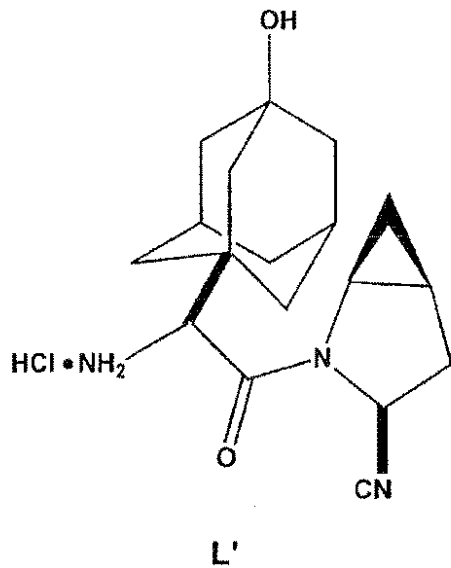
20



30

で示される保護化合物を用意し、該化合物 (L) を塩酸で処理して構造 L' :

【化3】



10

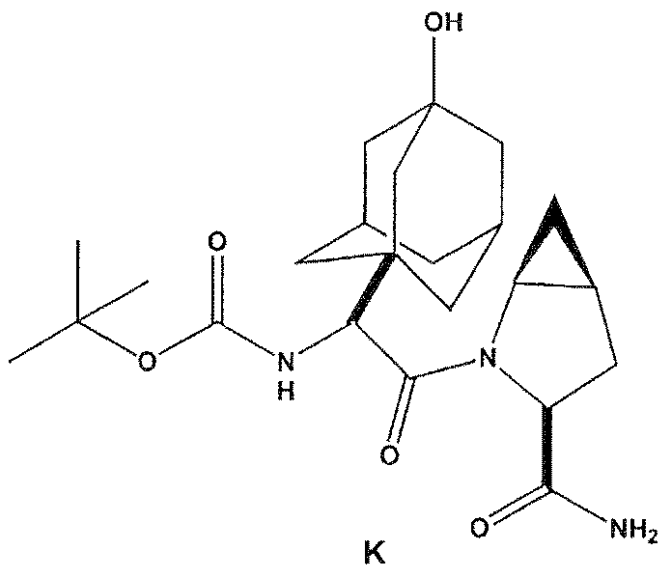
で示される対応の塩酸塩 (L') を生成し、ついで該化合物 (L') を水酸化ナトリウムで処理して遊離塩基化合物 (M') を生成する、ことを含む方法。

【請求項2】

20

該化合物 (L) が、構造：

【化4】



30

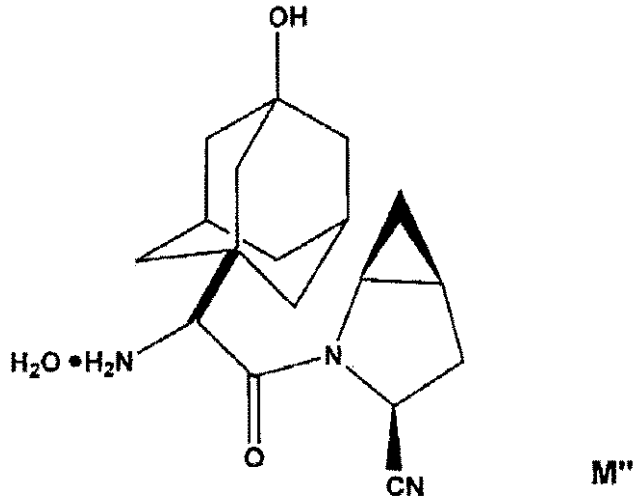
で示される中間体 (K) をピリジンおよび無水トリフルオロ酢酸の存在下で脱水し、ついで反応生成物を強塩基の存在下で加水分解して化合物 (L) を生成することによって製造される、請求項1に記載の方法。

40

【請求項3】

構造 M'' :

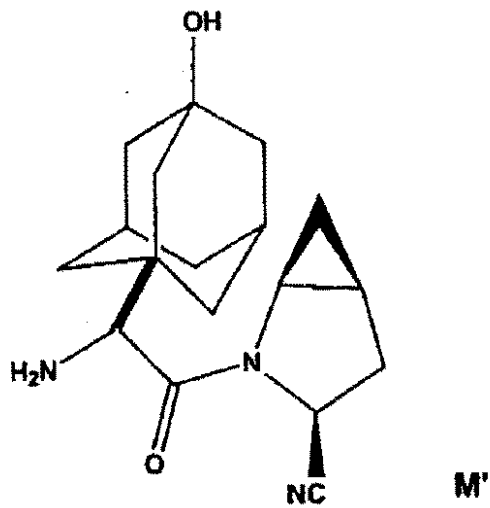
【化5】



10

で示される一水和物の製造方法であって、構造：

【化6】



20

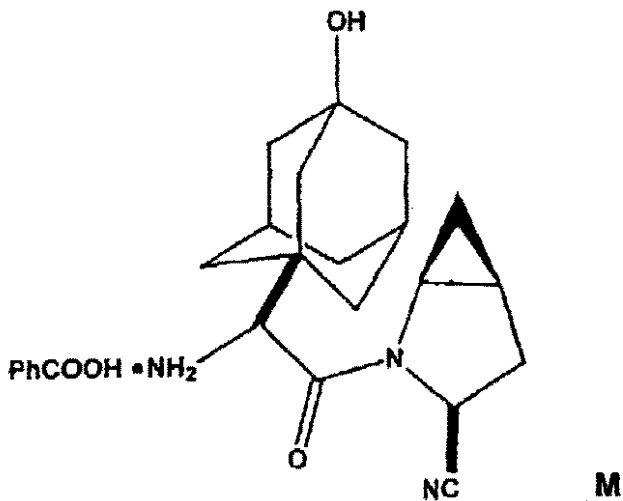
30

で示される遊離塩基を水で処理して一水和物 **M''** を生成する、ことを含む方法。

【請求項4】

下記構造：

【化7】



40

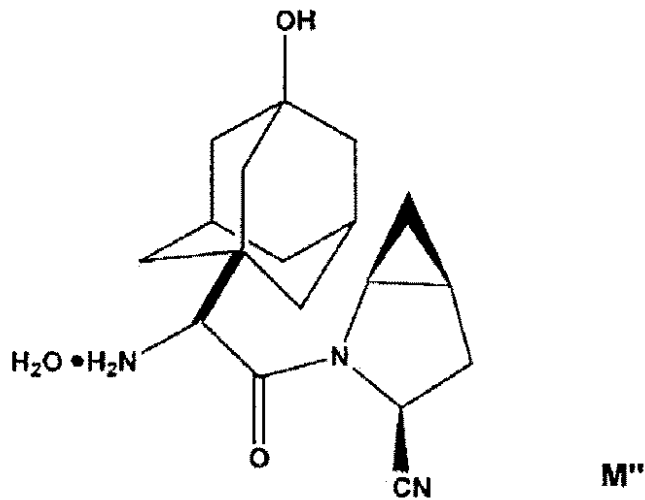
で示される化合物。

50

【請求項 5】

下記構造：

【化 8】



10

で示される化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本願は、2002年12月9日に出願された米国仮特許出願第60/431,814号の優先権を主張し、該出願を参照のため本明細書に引用する。

【0002】

本発明は、ジペプチジルペプチダーゼIVのシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターの製造のための方法および該方法に使用するための化合物を提供する。また、ジペプチジルペプチダーゼIVのシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターの製造に用いる中間体化合物である(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸の不斉還元的アミノ化の方法も提供される。さらなる中間体化合物およびその製造方法も提供される。本発明の化合物および方法によって製造されるジペプチジルペプチダーゼIVインヒビターは、糖尿病およびその合併症、高血糖症、X症候群、肥満、およびアテローム性動脈硬化症および関連疾患、並びに免疫調節疾患および慢性炎症性腸疾患の治療に有用である。

30

【背景技術】

【0003】

ジペプチジルペプチダーゼIVは、膜に結合した非古典的なセリンアミノペプチダーゼであり、腸、肝臓、肺、および腎臓を含む（これらに限られるものではない）様々な組織に存在している。この酵素はまた循環しているT-リンパ球にも存在しており、その場合はCD-26と呼ばれる。ジペプチジルペプチダーゼIVはインビボで内生のペプチドGLP-1(7-36)およびグルカゴンの代謝的開裂を担っており、他のペプチド、たとえばGHRH、NPY、GLP-2およびVIPに対してインビトロでタンパク質分解活性を示す。

40

【0004】

GLP-1(7-36)は、小腸でのプログルカゴンの翻訳後プロセシングの結果生じる29アミノ酸のペプチドである。このペプチドはインビボで複数の作用を有する。たとえば、GLP-1(7-36)は、インスリンの分泌を刺激し、グルカゴンの分泌を抑制する。このペプチドは満腹感(satiety)を促進し、胃の空白化(gastric emptying)を遅らせる。GLP-1(7-36)の連続注入による外部からの投与は糖尿病患者に有効であることが示されている。しかしながら、外部からのペプチドは連続して治療に用いるには余りにも速く分解されてしまう。

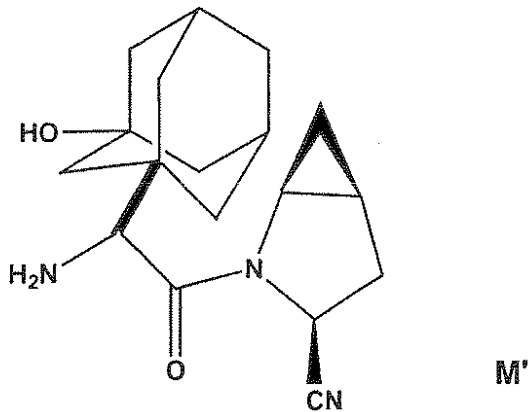
【0005】

GLP-1(7,36)の内生レベルを増強すべく、ジペプチジルペプチダーゼIVのインヒビタ

50

ーが開発されている。米国特許第号6,395,767号は、ジペプチジルペプチダーゼI Vのシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターを開示している。これらインヒビターを化学的に合成する方法は、米国特許第号6,395,767号並びに文献に開示されている。たとえば、Sagnardら、Tet-Lett. 1995 36: 3148-3152 ; Tverezovskyら、Tetrahedron 1997 53: 14773-14792 ; およびHanessianら、Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998 8: 2123-2128を参照。米国特許第6,395,767号に開示されている好ましいインヒビターは、遊離塩基の(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシ-トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキソエチル]-2-アザビシクロ-[3.1.0]ヘキサ-3-カルボニトリル(M')およびその水和物(M'')である。

【化1】



遊離の塩基 M'

【0006】

このジペプチジルペプチダーゼI Vインヒビターの製造に用いる中間体を製造すべく適合させた方法がEP 0 808 824 A2に開示されている。ImashiroおよびKuroda Tetrahedron Letters 2001 42: 1313-1315、Reetzら、Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18: 72、ReetzおよびHeimbach Chem. Ber. 1983 116: 3702-3707、Reetzら、Chem. Ber. 1983 116: 3708-3724も参照のこと。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、ジペプチジルペプチダーゼI Vのシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターの製造に用いる新規な製造方法および化合物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の目的は、ジペプチジルペプチダーゼI Vのシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターの製造において中間体として有用な化合物を提供することである。

【0009】

一つの態様において、本発明の中間体は、式I A :

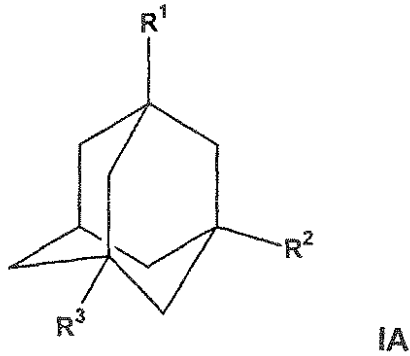
10

20

30

40

【化2】



10

(式中、

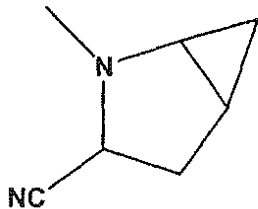
R¹は、HおよびOHよりなる群から選ばれる；

R²は、-C(=O)-COR⁴、-C(=O)NR⁵R⁶、-C(X)_n-COR⁴および-C-NR⁷R⁸COR⁴よりなる群から選ばれる、ここでXはハロゲン、nは1-2、R⁴はO-アルキル、NH₂およびOHよりなる群から選ばれる、およびR⁵、R⁶、R⁷およびR⁸は、それぞれ、HおよびCOOR⁹（式中、R⁹は置換されたまたは非置換のアルキル）；および

R³は、H、OHおよびR¹⁰よりなる群から選ばれる、ここで、R¹⁰は、NHR¹¹C(=O)R¹²、R¹¹はR¹³COOH、R¹²は、式：

20

【化3】



により示される基、

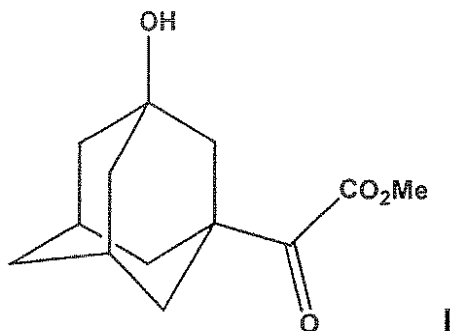
R¹³はアルキルまたはアリールである)で示される化合物を含む。

30

【0010】

ジペプチジルペプチダーゼIVのシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターの製造において中間体として有用な本発明の式IAで示される好ましい化合物の例としては、式I：

【化4】



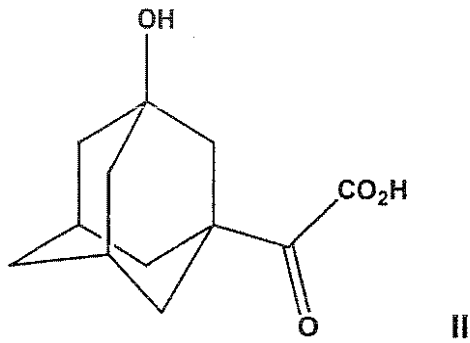
40

で示される3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル、

式II：

50

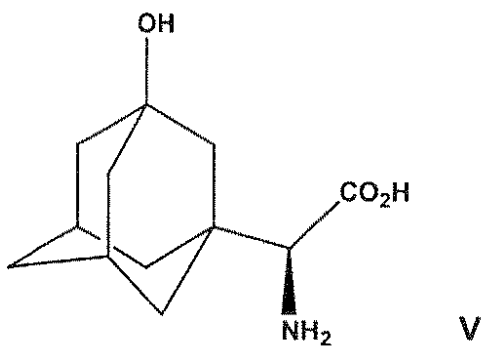
【化5】



10

で示される3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸、
式 V :

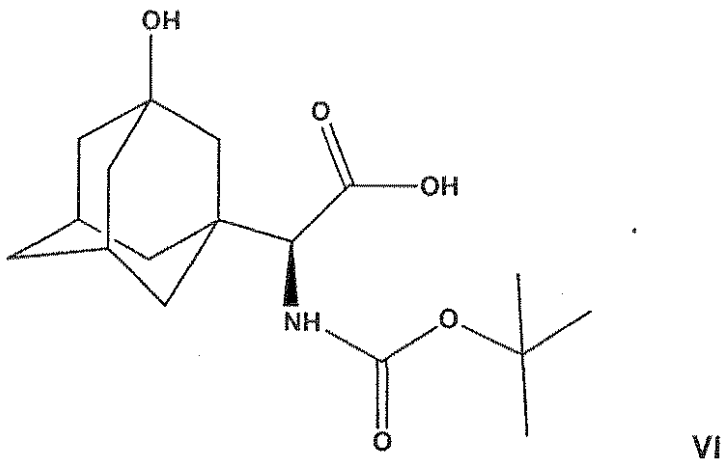
【化6】



20

で示される(__S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸、
式 V I :

【化7】

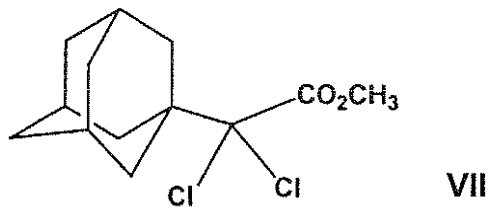


30

40

で示される(__S)-__[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシ
クロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸、
(またはそのDABCO塩 V I A)、
式 V I I :

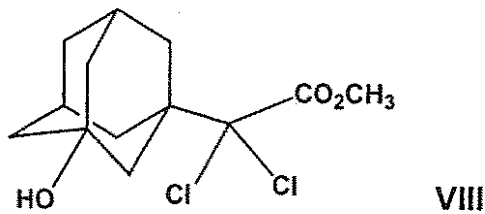
【化 8】



で示されるアダマンタン-1-イル-ジクロロ-酢酸メチルエステル、
式 VIII :

10

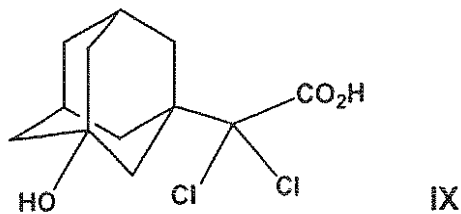
【化 9】



で示されるジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸メチルエステル、
および式 IX :

20

【化 10】



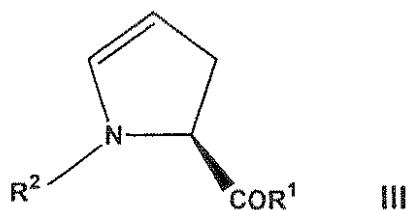
で示されるジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸が挙げられる。

30

【0011】

他の態様において、本発明の中間体は、式 III :

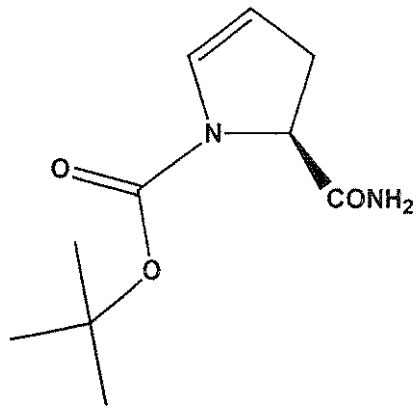
【化 11】



40

(式中、 R^1 は、 O -アルキル、 NH_2 および OH よりなる群から選ばれる、および
 R^2 は、 t -BOCおよびCBzよりなる群から選ばれる)で示される化合物4,5-ジヒドロ-1H-ピロ
ール-1,5-ジカルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル),5-エチルエステル、および式 IV :

【化 1 2】



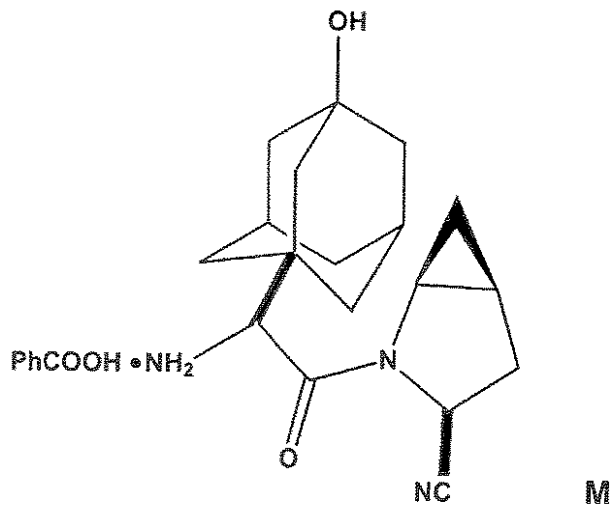
10

で示される (5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステルを含む。

【0012】

好ましい態様において、これら化合物は、式 M :

【化 1 3】

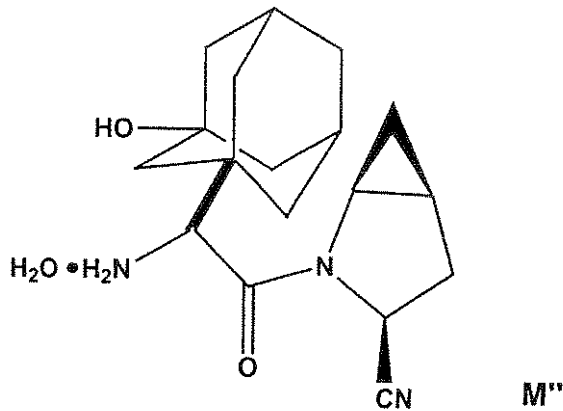


20

30

で示されるジペプチジルペプチダーゼIVインヒビターである(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキソエチル]-2-アザピシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル安息香酸塩(1:1)またはその遊離塩基である式 M' (上記)、およびその一水和物 M''

【化 1 4】



10

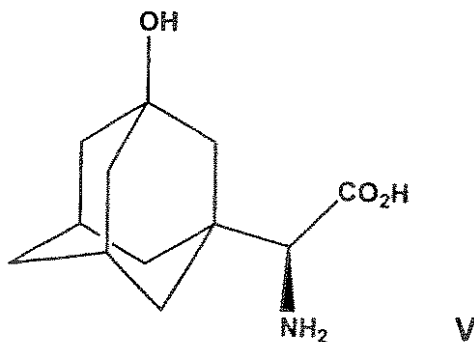
の製造における中間体として用いる。

【 0 0 1 3】

本発明の他の目的は、ジペプチジルペプチダーゼ I V のシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターの製造方法を提供することである。好ましい態様において、製造されるインヒビターは、それぞれ式 M および M' に示す (1S, 3S, 5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキソエチル]-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル安息香酸塩 (1:1) またはその対応遊離塩基である。これらインヒビターは、最終的に 2 つの断片、式 V :

20

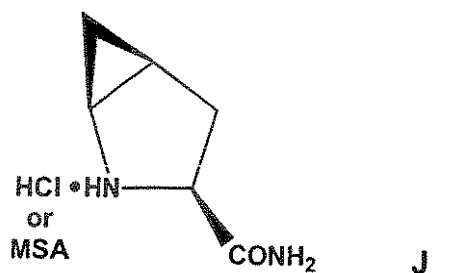
【化 1 5】



30

で示される (___S)-___-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸と式 J :

【化 1 6】



40

で示される (1S, 3S, 5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミド酸塩、たとえば塩酸塩またはメタンスルホン酸塩 (メシルまたは M S A 塩) とのカップリングによって生成される。

【 0 0 1 4】

出発物質として選択した中間体化合物に依存して、これら断片を製造およびカップリン

50

グするための種々の方法を本明細書に開示する。たとえば、本発明の一つの態様において、式 I I で示される3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸からシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターを製造する方法が提供される。本発明の他の態様において、式 V で示される(__S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸からシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターを製造する方法が提供される。本発明の他の態様において、式 V I で示される(__S)-__[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸からシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターを製造する方法が提供される。本発明のさらに他の態様において、式 I V で示される(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステルからシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターを製造する方法が提供される。

10

【0015】

本発明の他の目的は、シクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターの製造に有用な中間体の合成方法を提供することである。本発明の一つの態様において、3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式 I I)を不斉還元的アミノ化またはトランスアミノ化して(__S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式 V)とする方法が提供される。本発明の他の態様において、トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式 N)から(__S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式 V)を化学合成する方法が提供される。本発明の他の態様において、アダマンタン-1-イル-ジクロロ-酢酸メチルエステル(式 V I I)、ジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸メチルエステル(式 V I I I)、およびジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸(式 I X)から3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式 I I)を製造する方法が提供される。アダマンタン-1-イル-ジクロロ-酢酸メチルエステル(式 V I I)、ジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸メチルエステル(式 V I I I)、およびジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸(式 I X)を製造する方法もまた提供される。本発明の他の態様において、4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸,1-(1,1-ジメチルエチル),5-エチルエステル(式 I I I)から(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステル(式 I V)を製造する方法が提供される。この態様において、ついで(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステル(式 I V)を(1S,3S,5S)-3-アミノカルボニル)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式 H)の製造の中間体として用いることができる。

20

30

【0016】

本発明の他の目的は、3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式 I I)の不斉還元的アミノ化またはトランスアミノ化によって(S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式 V)を産生することのできる細胞株を提供することである。好ましい態様において、この細胞株はホルメートデヒドロゲナーゼおよびフェニルアラニンデヒドロゲナーゼを発現するプラスミドを含む細胞を包含する。最も好ましいのは、ATCC受託番号PTA-4520の細胞株である。

40

【0017】

(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキソエチル]-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル安息香酸塩(1:1)およびその対応遊離塩基およびその一水和物などのシクロプロピル融合ピロリジンベースの化合物は、糖尿病およびその合併症、高血糖症、X症候群、高インスリン血症、肥満、およびアテローム性動脈硬化症および関連疾患、並びに免疫調節疾患および慢性炎症性腸疾患の治療に有用なジペプチジルペプチダーゼ I V インヒビターである。本発明において、(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキソエチル]-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル安息香酸塩(1:1)およびその対応遊離塩基およびその一水和物などのシクロプロピル融合ピロリジンベースの化

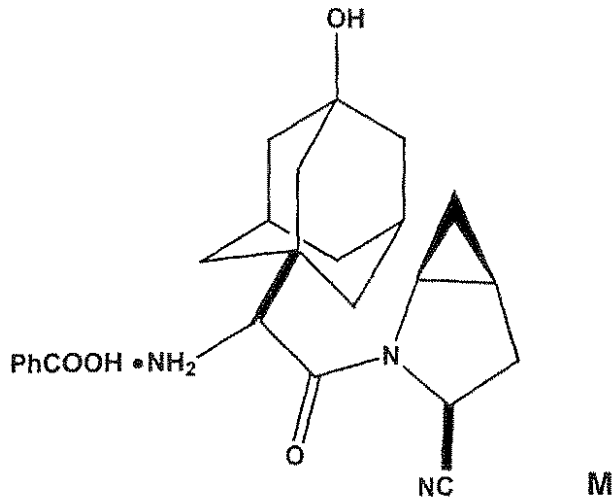
50

化合物の製造に用いるための新規な化合物および方法が提供される。

【0018】

ジペプチジルペプチダーゼIVインヒビターである(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキソエチル]-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル安息香酸塩(1:1)は下記式M:

【化17】

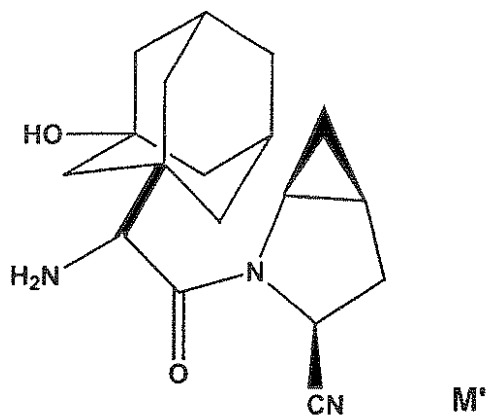


10

20

で示され、好ましくはその対応遊離塩基は下記式M':

【化18】



30

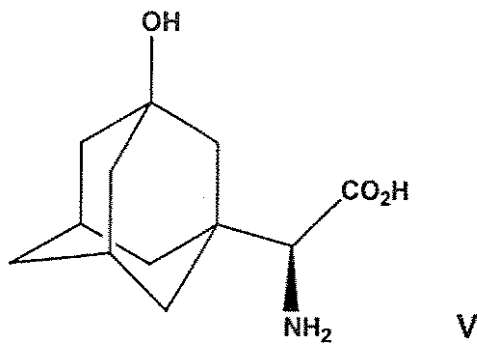
で示され、その一水和物は上記M''で示される。

【0019】

本発明において、2つの断片のアセンブリーによって(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキソエチル]-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル(式M')を製造する方法が提供される。これら断片は、式V:

40

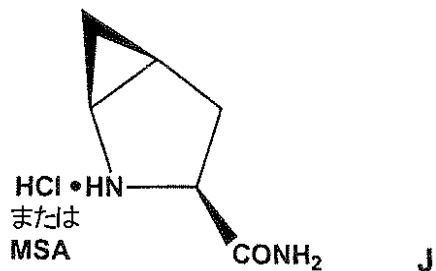
【化 1 9】



10

で示される (___S)-___-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸および式 J :

【化 2 0】



20

で示される (1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミドの塩酸塩や M S A 塩などの酸塩である。本発明はまた、これら断片の製造方法並びにこれら断片の製造に有用な中間体化合物をも提供する。

【 0 0 2 0】

本発明の一つの側面において、中間体化合物である3-ヒドロキシ-___-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式 I I)の還元的アミノ化またはトランスアミノ化によって断片(___S)-___-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式 V)を製造する方法が提供される。この方法の好ましい態様において、3-ヒドロキシ-___-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式 I I)がフェニルアラニンデヒドロゲナーゼやケト酸で活性な他のアミノ酸デヒドロゲナーゼを用いて酵素的に行う還元的アミノ化により(___S)-___-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式 V)に変換される。本発明において有用なフェニルアラニンデヒドロゲナーゼの例としては、これらに限られるものではないが、Sporosarcina種からのもの、またはThermoactinomyces intermediusなどのThermoactinomyces種からのフェニルアラニンデヒドロゲナーゼが挙げられる。還元的アミノ化は、大腸菌またはPichia pastorisにおいて発現されるThermoactinomyces intermedius、ATCC 33205のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼを用いて行うのが好ましい。フェニルアラニンデヒドロゲナーゼThermoactinomyces intermedius、ATCC 33205を発現する大腸菌およびPichia pastorisの組換え株の構築および増殖は、Hansonら(Enzyme and Microbial Technology 2000 26: 348-358)によって記載されている。メタノール上でのPichia pastorisの増殖はまた、ホルメートデヒドロゲナーゼの産生を含む(Hansonら、Enzyme and Microbial Technology 2000 26: 348-358)。

30

40

【 0 0 2 1】

Pichia pastoris(ATCC 20864)ホルメートデヒドロゲナーゼおよびThermoactinomyces intermedius(ATCC 33205)フェニルアラニンデヒドロゲナーゼ遺伝子の改変形を発現するプラスミドを含む大腸菌は、ブダペスト条約の規定のもと、国際寄託当局に寄託および受領されている。寄託は、2002年6月25日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(10801 University Boulevard in Manassas、バージニア、20110-2209)に対

50

して行った。ATCC受託番号はPTA-4520である。この細胞株への公的アクセスに対する全ての制限は、本件特許出願の権利化により非撤回的に除かれるであろう。寄託は、公的寄託機関において寄託の日から30年の期間または試料の最新の請求から5年間または特許の有効期間のいずれか遅い日まで維持されるであろう。上記細胞株は寄託の際には生存していた。もしも生存した試料が寄託機関によって分配することができない場合には、該寄託は交換されるであろう。

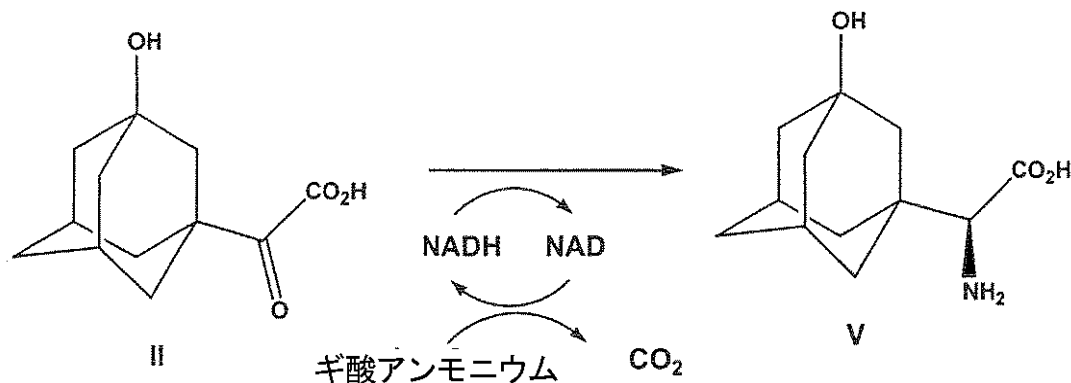
【0022】

(*S*)-*S*-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)への3-ヒドロキシ-*S*-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式II)の還元的アミノ化を下記スキームIに示す。

【0023】

スキームI

【化21】



【0024】

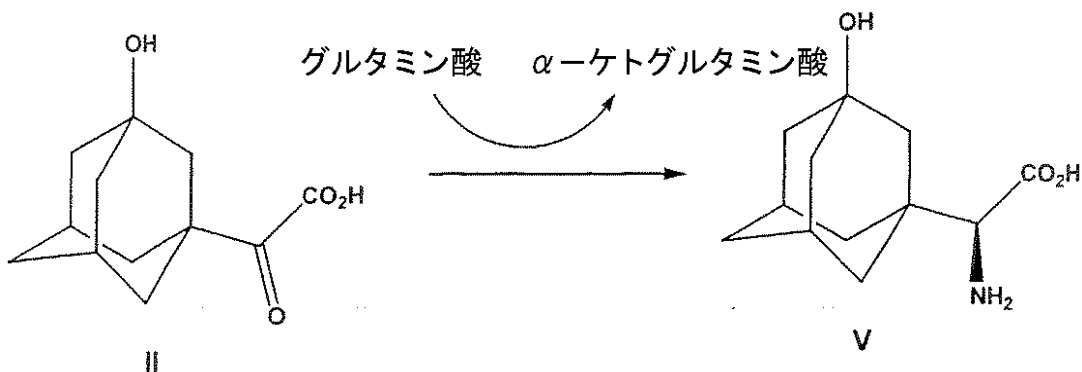
スキームIに示すように、この反応にはアンモニアおよび還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)が必要である。この反応で生成したニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)は、ホルメートデヒドロゲナーゼによるギ酸の二酸化炭素への酸化によってNADHにリサイクルされる。この反応からの(*S*)-*S*-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)の予測収率は80~100%であり、予測エナンチオマー過剰は99%を超える。本明細書の実施例1~10をも参照のこと。

【0025】

同変換はまたスキームIIに示すようにトランスアミナーゼを用いても行うことができる。

スキームII

【化22】



【0026】

スキームIIに示すように、この酵素的変換においてグルタミン酸はアミノドナーとし

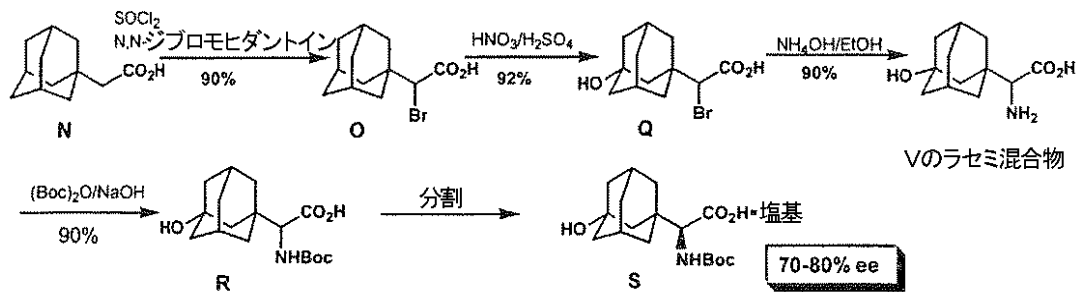
て作用する。この変換に用いるトランスアミナーゼの例は、本明細書の実施例 11 に示す分枝鎖トランスアミナーゼである。

【0027】

他の態様において、(S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)は化学的に合成される。(S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)の化学的合成法の例をスキームIIIに示す。

スキームIII

【化23】



10

【0028】

スキームIIIに示すように、(S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)のラセミ混合物は、まずトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸を-プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式O)に臭素化することによってトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式N)から化学的に合成される。この臭素化において、出発物質であるトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式N)を塩化チオニルに懸濁する。ついでジメチルホルムアミド(DMF)を加え、懸濁液を室温で1.5時間攪拌する。この反応の完了はガスクロマトグラフィーにより確認する。ついで、固体の無水N-ブロモコハク酸(NBS)を反応混合物に少しずつ加え、反応混合物を60℃に加熱する。反応液を3時間攪拌する間、温度を60~65℃に維持する。再び、反応の完了をガスクロマトグラフィーにより確認する。ついで、ヘプタンを反応混合物に加え、過剰の塩化チオニルを78~80℃で留去する。水を加えて反応を停止させ、ヘプタンをさらに加える。ついで、水性層を有機層から分離し、有機層を水洗する。洗浄後、水をさらにヘプタン層に加え、ヘプタンを留去する。ついで、テトラヒドロフラン(THF)を残りの水性層に加え、混合物を室温で数時間激しく攪拌する。この加水分解をスピードアップするため水をさらに加えてもよい。ついで、THFを留去し、2相(水および油)反応混合物とする。ついで、種晶(seeds)を加え、反応液を室温に達するようにすると、その間に-プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式O)が重い固体として生成する。懸濁液を攪拌可能にするため、水およびアセトニトリルを加える。数時間攪拌した後、-プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式O)を含む固体を濾去し、アセトニトリルで数回洗浄する。本明細書の実施例17をも参照のこと。

20

30

【0029】

ついで、-プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式O)をH₂SO₄およびHNO₃と反応させて-プロモ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式Q)を得る。さらに詳細には、-プロモ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式Q)は、まずエーレンマイヤーフラスコにH₂SO₄を充填することにより-プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式O)から調製される。ついで、このフラスコを氷浴で冷却し、フラスコに50%HNO₃を加える。ついで、固体の-プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式O)を混合物に少しずつ加えて温度を28℃未満に保持する。ついで、透明な溶液が得られるまで反応液を攪拌しながら60℃に加熱する。反応が完了したら室温に冷却し、保持する。ついで、水を加えて反応を停止させる。得られたスラリーを氷浴で冷却し、ついで濾過して-プロモ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-

40

50

酢酸（式 Q）を得る。本明細書の実施例 18 をも参照のこと。

【0030】

ついで、 α -ブromo-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式 Q）を水酸化アンモニウム、好ましくは30%水酸化アンモニウムに溶解し、反応混合物を好ましくは65℃に加熱する。ついで、反応混合物を濃縮固化する。ついでEtOHを加え、反応液を再び濃縮して(α -S)- α -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式 V）を含むラセミ混合物を得る。本明細書の実施例 19 をも参照のこと。

【0031】

ラセミ混合物から(α -S)- α -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式 V のラセミ混合物）を単離するため、テトラヒドロフラン中の無水 Boc および水酸化ナトリウムを用いた典型的な Boc 保護により混合物を処理して α -[[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-]3]ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（化合物 Q）を得る。ついで、 α -[[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-]3]ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（化合物 Q）を[1R,2S]-(-)-1,2-ジフェニルヒドロキシエチルアミン、1,7,7-トリメチルピシクロ[2.2.1]ヘプタン-2-アミンまたは S-(-)-1-1-(1-ナフチル)エチルアミンなどのキラルな塩基と混合し、混合物を蒸発乾固する。乾燥した混合物を溶媒に再懸濁し、再懸濁した混合物を数時間攪拌しながらシェーカーに入れる。室温に冷却すると(α -S)- α -[[[(ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-]3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（化合物 S）の結晶化が起こる。本明細書の実施例 20 をも参照のこと。

10

20

【0032】

Boc 基を除去すると(α -S)- α -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式 V）を生成する。

【0033】

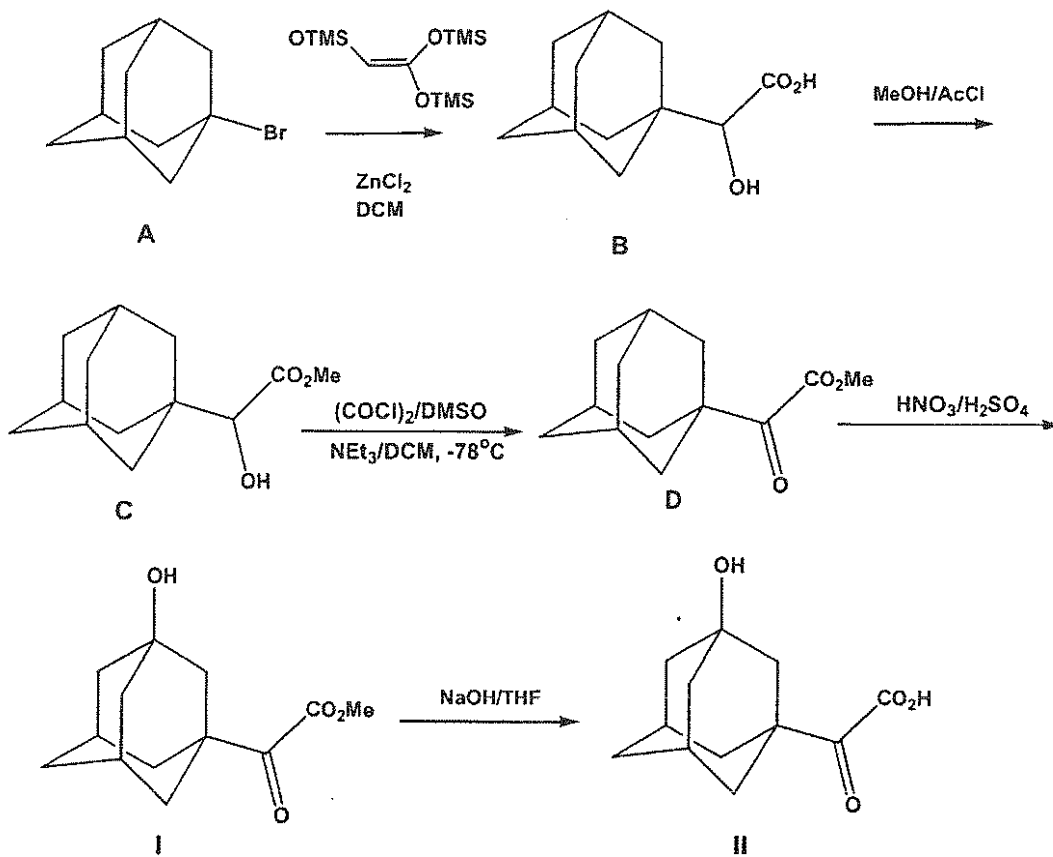
本発明の他の側面は、断片(α -S)- α -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式 V）の合成に用いる中間体化合物3-ヒドロキシ- α -オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式 II）の製造方法に関する。中間体化合物3-ヒドロキシ- α -オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式 II）は、スキーム IV に示す方法に従って製造することができる。

30

【0034】

スキーム IV

【化 2 4】



10

20

【 0 0 3 5】

スキーム I V に示すように、この方法ではアダマンチルブロマイド (式 A) を塩化亜鉛触媒でアルキル化して__-ヒドロキシトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式 B) を生成する。ついで、__-ヒドロキシトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式 B) をメタノール中の塩化アセチルを用いてエステル化して__-ヒドロキシトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル (式 C) を生成する。ついで、__-ヒドロキシトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル (式 C) をスワーン酸化により__-オキサトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル (式 D) に変換する。ついで、__-オキサトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル (式 D) をヒドロキシ化して 3 - ヒドロキシ-__-オキサトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル (式 I) を生成し、これを加水分解して 3 - ヒドロキシ-__-オキサトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式 II) を生成する。本明細書の実施例 2 1 ~ 2 5 をも参照のこと。

30

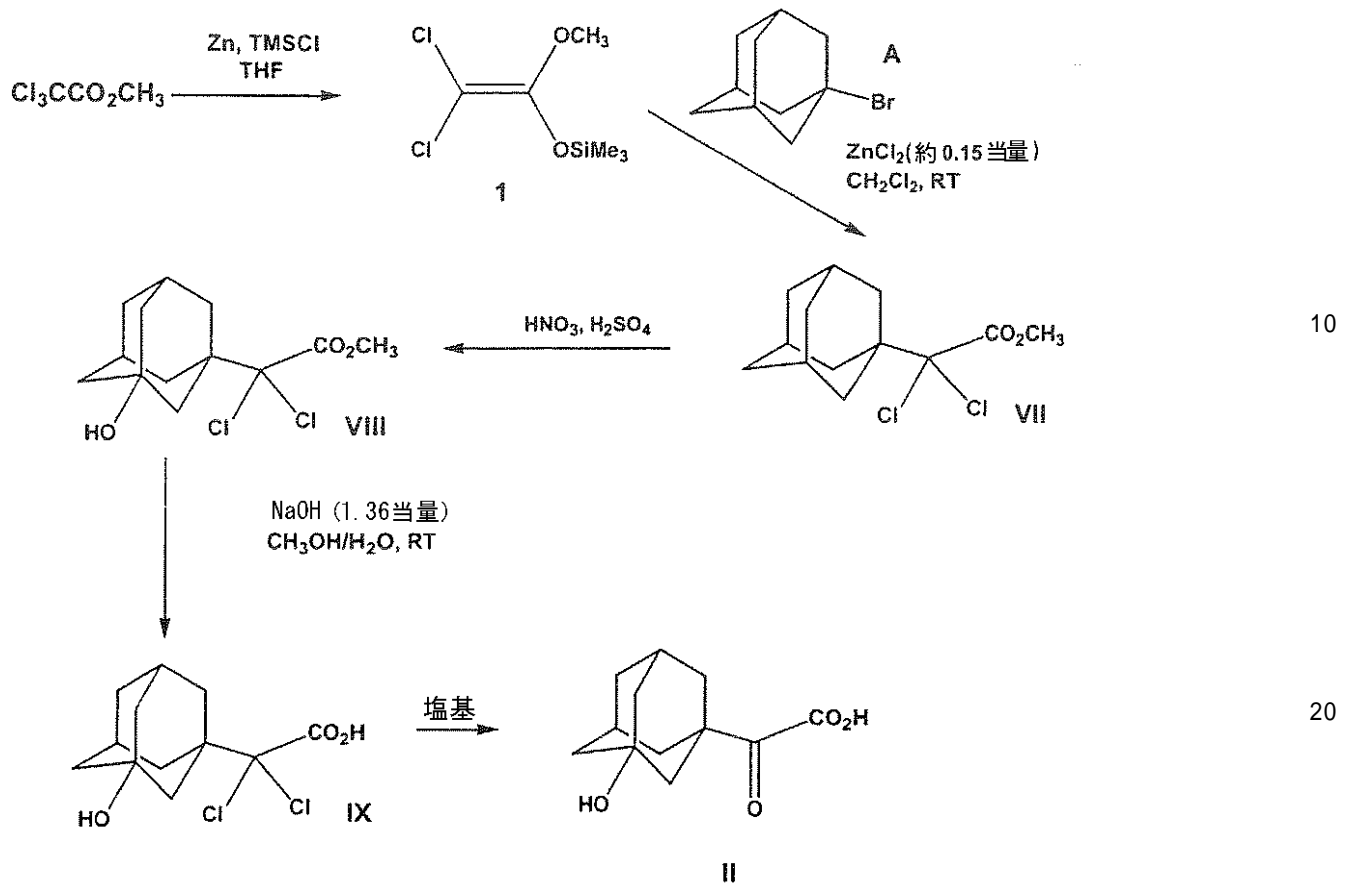
【 0 0 3 6】

別法として、中間体化合物である 3 - ヒドロキシ-__-オキサトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式 II) はまたスキーム V に示す方法に従って製造することができる。

40

スキーム V

【化 2 5】



【 0 0 3 7】

スキーム V に示すように、(2,2-ジクロロ-1-メトキシ-ビニルオキシ)-トリメチルシラン (**1**) を Kuroda ら (EP 08 08 824A3 ; Imashiro and Kuroda Tetrahedron Letters 2001 42: 1313-1315) の方法をわずかに改変することにより調製する。プロモアダマンタンを化合物 **1** で塩化亜鉛の影響下で処理すると (Reetz ら、Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18:72 , Reetz and Heimbach Chem. Ber. 1983 116: 3702-3707、Reetz ら、Chem. Ber. 1983 116: 3708-3724)、式 **VII** で示されるアダマンタン-1-イル-ジクロロ-酢酸メチルエステルが得られる。ついで、式 **VII** で示されるアダマンタン-1-イル-ジクロロ-酢酸メチルエステルを濃硫酸中の一酸化窒素でヒドロキシル化して式 **VIII** で示されるジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸メチルエステルを定量的収量で得る。式 **VIII** の化合物をメタノール中の水酸化ナトリウム水溶液で室温にて加水分解すると式 **IX** で示されるジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸が得られる。引き続きジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸 (式 **IX**) を弱塩基、好ましくは重炭酸ナトリウムで処理すると中間体化合物である 3 - ヒドロキシ-___-オキサトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式 **II**) のみが生成する。本明細書の実施例 26 ~ 29 をも参照のこと。

【 0 0 3 8】

スキーム V A

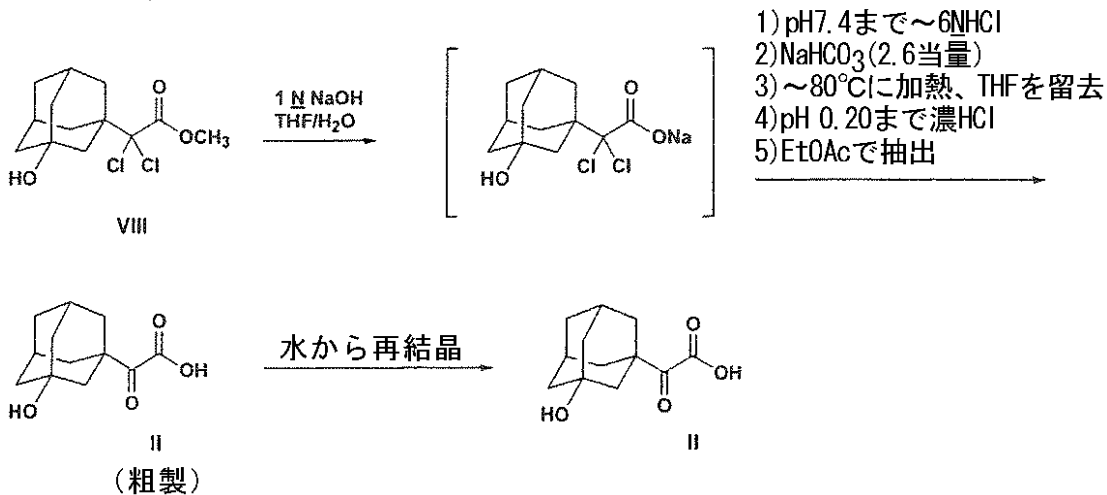
10

20

30

40

【化 2 6】



10

【0039】

スキーム V A に示すように、中間体化合物である 3 - ヒドロキシ - ___ - オキサトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}]デカン - 1 - 酢酸 (式 I I) は 1 ポット手順で調製できる。示すように、式 V I I の化合物をアルゴンなどの不活性雰囲気中、テトラヒドロフラン (または水酸化カリウムや水酸化リチウムなどの他の塩基) 中の水酸化ナトリウム水溶液で処理して対応のナトリウム塩を得る。このナトリウム塩を回収することなく、このナトリウム塩を含有する反応混合物を塩酸などの酸で処理して pH を約 0.50、好ましくは約 0.20 まで下げて対応のケト酸 I I を生成し、このものは水から再結晶させてケト酸 I I の結晶を生成させることができる。

20

【0040】

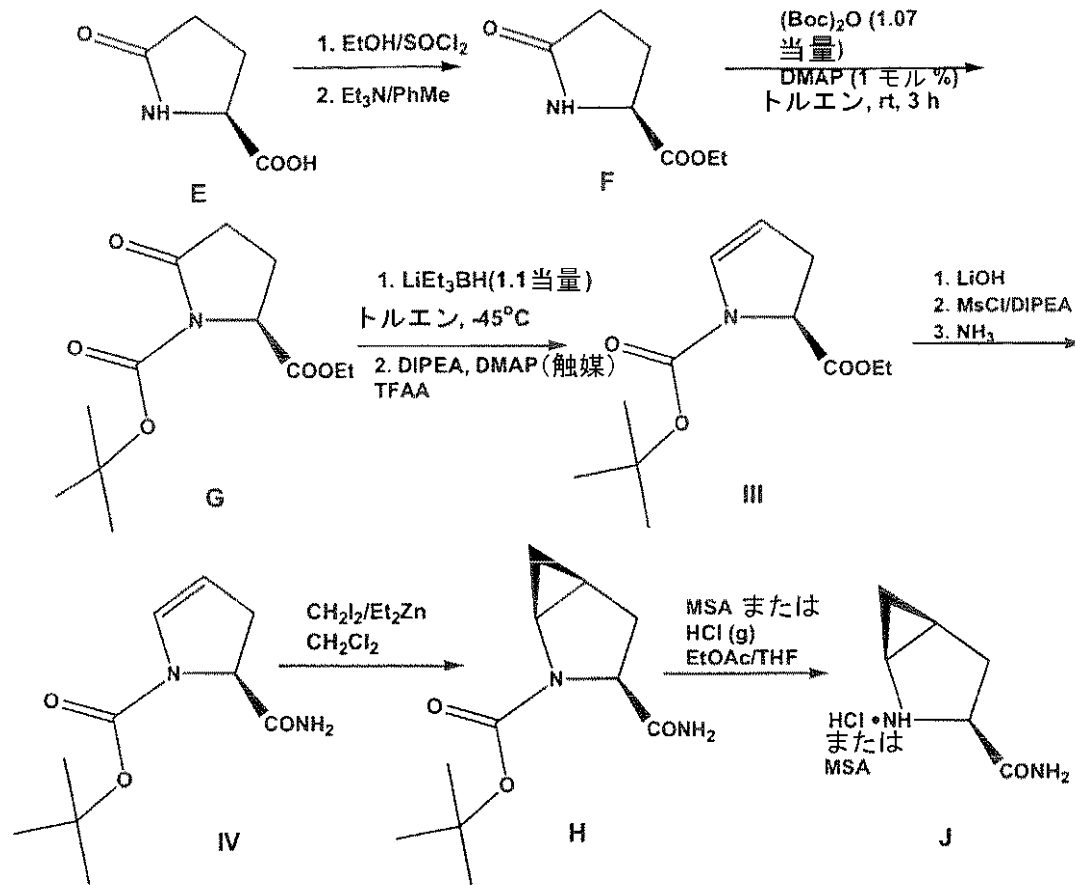
本発明の他の側面は、断片 (1S, 3S, 5S) - 2 - アザビシクロ [3.1.0]ヘキサン - 3 - カルボキサミド (式 J) の製造方法に関する。(1S, 3S, 5S) - 2 - [(2S) - 2 - アミノ - 2 - (3 - ヒドロキシトリシクロ [3.3.1.1^{3,7}]デス - 1 - イル) - 1 - オキシエチル] - 2 - アザビシクロ [3.1.0]ヘキサン - 3 - カルボニルの製造に用いるこの断片は、下記スキーム V I に示す方法に従って製造することができる。

30

【0041】

スキーム V I

【化27】



10

20

【0042】

スキーム V I に示すように、L-ピログルタミン酸 (式 E) をまずエステル化して L-ピログルタミン酸エチルエステル (式 F ; SQ 7539) を得る。ついで、この L-ピログルタミン酸エチルエステルを窒素原子上で BOC-保護して (5S)-2-オキソピロリジン-1,5-ジカルボン酸 1-(1,1-ジメチルエチル)-5-エチルエステル (式 G) を得る。ついで SuperHydride 還元および脱離を行って (5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸 1-(1,1-ジメチルエチル)-5-エチルエステル (式 III) を生成する。ついで BOC-DHP III を水酸化リチウムを用いた鹼化により加水分解して BOC-DHP を生成する。ついで、塩化メシルおよびその後のアンモニアを用いた混合無水物により BOC-DHP 上でアミドを生成させて (5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸 1-(1,1-ジメチルエチル) エステル (式 IV) を製造する。ついで、(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸 1-(1,1-ジメチルエチル) エステル (式 IV) を Simmons-Smith 反応によりシクロプロパン化して (1S,3S,5S)-3-アミノカルボニル)-2-アザピシクロ [3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸 1,1-ジメチルエチルエステル (式 H) を生成する。ついで、BOC を除去して、断片 (1S,3S,5S)-2-アザピシクロ [3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミド (式 J) の塩酸塩やメタンスルホン酸塩などの酸塩の生成という結果となる。実施例 29 ~ 35 をも参照のこと。

30

40

【0043】

スキーム V I にも示す本発明の他の側面は、Simmons-Smith 反応でのシクロプロパン化による (5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸 1-(1,1-ジメチルエチル) エステル (式 IV) の (1S,3S,5S)-3-アミノカルボニル)-2-アザピシクロ [3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸 1,1-ジメチルエチルエステル (式 H) への変換に関する。この反応では、(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸 1-(1,1-ジメチルエチル) エステルを第一のリアクター中で塩化メチレンに溶解する。第二のリアクターでは塩化メチレンを -30°C に冷却し、ジメトキシエタンおよびトルエン中のジエチル亜鉛の 30% 溶液を加え、ついで ジヨードメタンを加える。ついで、この混合物を第一のリア

50

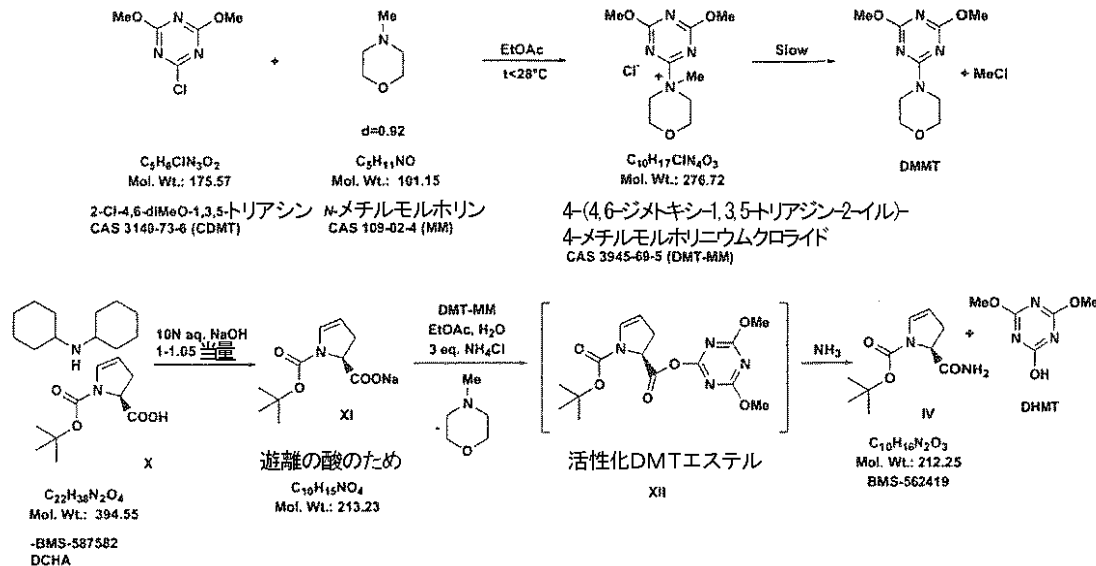
クターに加え、ついで飽和重炭酸塩溶液を加える。得られた反応混合物を沈殿が生成するまで攪拌する。ついで、沈殿を濾過し、洗浄し、塩化メチレンに2回またはそれ以上再懸濁する。ついで、濾液を水性相と有機相とに分離し、有機相を半飽和食塩水で洗浄する。溶媒を除去し、ヘプタンと交換してヘプタン中の(1S,3S,5S)-3-アミノカルボニル)-2-アザピシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式H)の粗製の生成物のスラリーを得る。

【0044】

別法として、(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステル(式IV)はスキームVIAに示すようにして調製できる。

スキームVIA

【化28】



【0045】

スキームVIAに示すように、4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステルのDCHA塩(X)を水酸化ナトリウムなどのアルカリ金属塩基で処理してナトリウム塩などの対応の塩を生成させる。

【0046】

4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステルのナトリウム塩(XI)もまた、対応のエチルエステルから該エチルエステル(好ましくはトルエン中の該エチルエステルの溶液)をエタノールおよび水酸化ナトリウムで処理することにより調製できる。

【0047】

ナトリウム塩XIの溶液を塩化アンモニウムやリン酸二水素ナトリウムなどの緩衝液で処理して溶液のpHを7未満、好ましくは約6~6.5とし、ナトリウム塩の緩衝溶液を4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロライド(DMT-MM)で処理して活性化DMT-エステル(XII)を生成し、これをアンモニアまたは硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムまたは水酸化アンモニウムなどの他の塩基で処理して(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステル(IV)を生成する。

【0048】

4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロライド(DMT-MM)は、スキームVIAに示すように、2-Cl-4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン(CDMT)およびN-メチルモルホリンを約0~約10の低下した温度にて反応させてDMT-MMを生成することによって調製できる。

【0049】

4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステルのDCHA

10

20

30

40

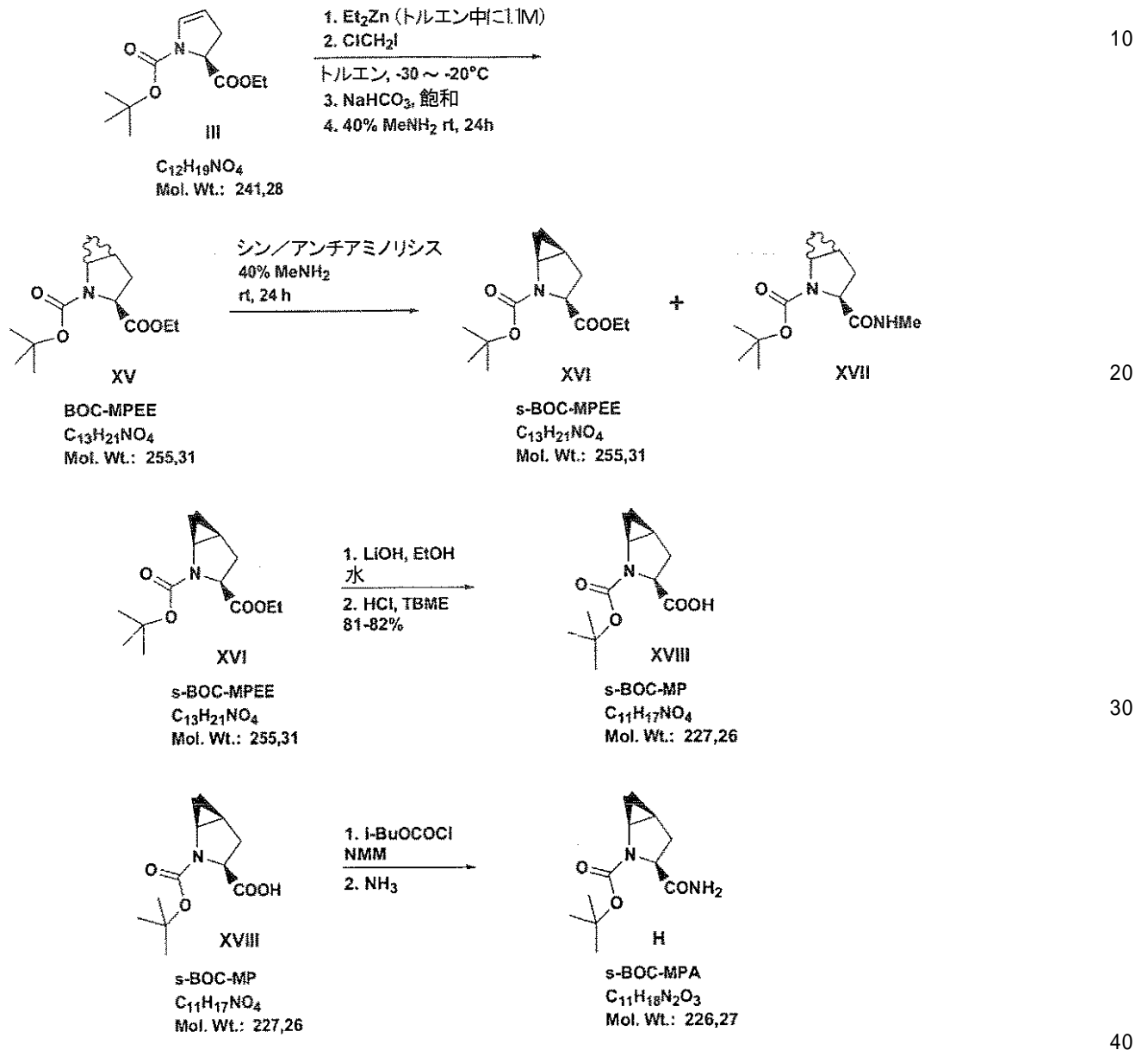
50

塩 (X) は、対応のナトリウム塩 (XI) から、前もって調製したDCHA塩 (X) の水溶液をメチルト-ブチルエーテル (MTBE) で処理し、反応混合物の pH を H_3PO_4 などの酸を用いて 2.5~3 に調節することで調製できる。有機層を分離し、食塩で洗浄して対応のナトリウム塩 (XI) を生成する。得られた反応混合物を冷却し、DCHA で処理して対応の DCHA 塩 (X) を生成する。

【 0 0 5 0 】

スキーム V I B

【 化 2 9 】



【 0 0 5 1 】

スキーム V I 中の化合物 H はまた、スキーム V I B に示すように、N-BOC 4,5-デヒドロプロリンエチルエステル (III) のシクロプロパン化により以下のようにして調製できる。

【 0 0 5 2 】

N-BOC 4,5-デヒドロプロリンエチルエステル (III) をトルエン、塩化メチレンまたはジクロロエタンなどの乾燥有機溶媒の存在下、約 $-30 \sim 0$ の範囲の低下した温度にてジエチル亜鉛で処理して N-BOC 4,5-メタノプロリンエチルエステル (XV) を得る。

【 0 0 5 3 】

得られた BOC 4,5-メタノプロリンエチルエステル (XV) (シン異性体とアンチ異性体

50

との混合物(8:1)をアルゴン雰囲気などの不活性雰囲気下でメチルアミン水溶液で処理することにより分離し、シン(S)-BOC-4,5-メタノプロリンエチルエステル(XV I)(XV IIから分離)を回収する。

【0054】

エタノールまたはトルエンやTHFなどの他の有機溶媒中のs-BOC-4,5-メタノプロリンエチルエステル(XV I)を、水酸化リチウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液または水酸化カリウム水溶液などの塩基で処理して対応のs-BOC-4,5-メタノプロリン遊離酸(XV III)を生成する。

【0055】

N-メチルモルホリンの存在下、約-8℃を超えないような低下した温度でTHFまたは塩化メチレン；クロロギ酸イソブチルまたは塩化メシルなどの有機溶媒に溶解した遊離酸(XV III)を処理し、ついで反応混合物をアンモニアで処理してs-BOC-メタノプロリンアミド(H)を生成することにより、遊離酸(XV III)を対応s-BOC-メタノプロリンアミド(H)に変換する。

10

【0056】

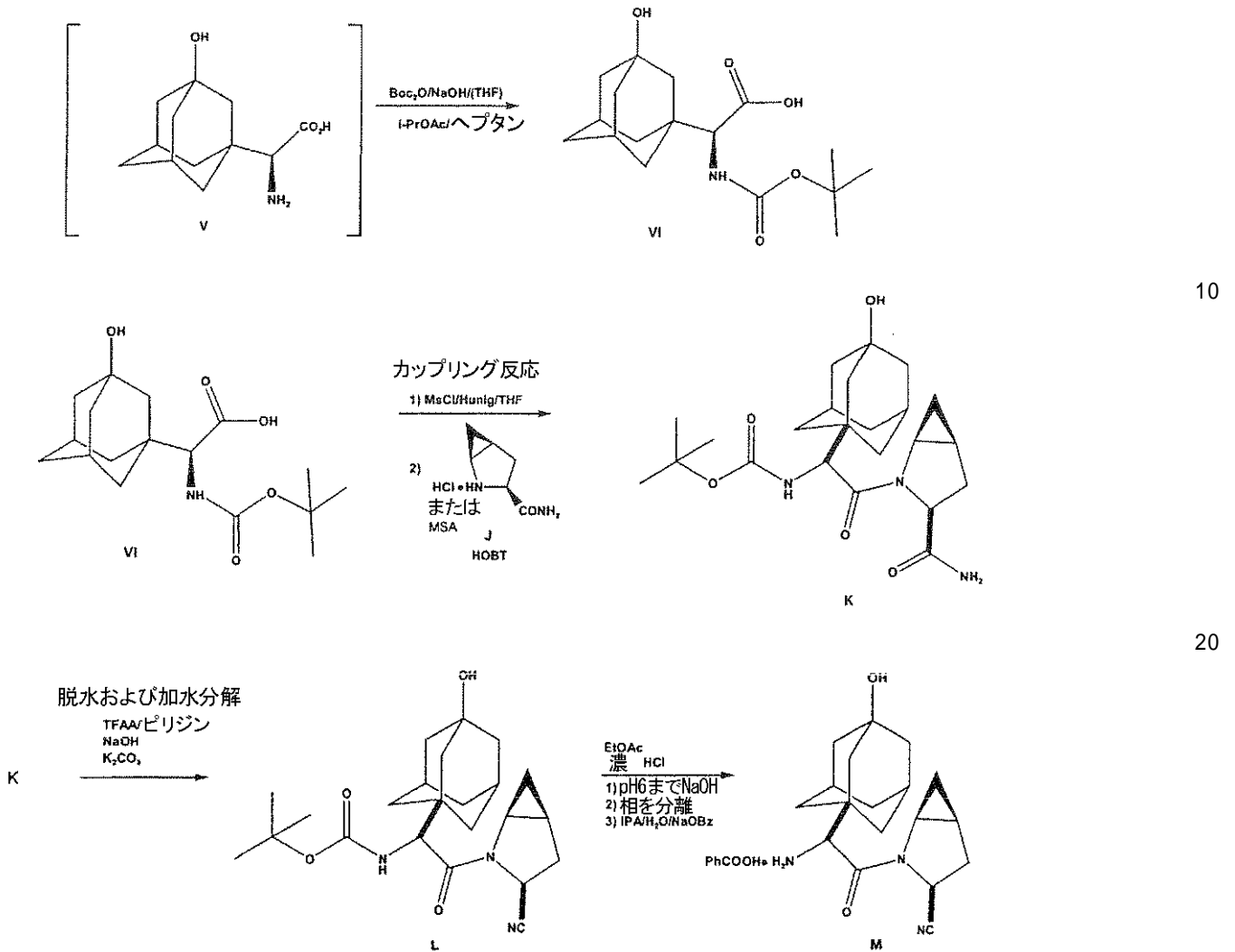
本発明の他の側面は、断片(—S)—アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)および断片(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミド(式J)をカップリングして(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキシエチル]-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル安息香酸塩(1:1)を生成するカップリング方法に関する。これら断片のカップリングを下記スキームVIIに示す。

20

【0057】

スキームVII

【化30】



【0058】

スキームVIIに示すように、断片(S)- -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)を水酸化ナトリウムなどの塩基の存在下、BOC₂Oで処理し、酢酸エチル(EtOAc)抽出により分離して(S)- [(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式VI)を分離することにより、断片(S)- -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)をまずBOC保護して(S)- [(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式VI)を生成する。別法として、酢酸エチルの代わりに酢酸イソプロピル/ヘプタンを用いて遊離の酸(VI)を結晶化することができる。他の態様において、実施例8Aに示すように、式Vの化合物を単離PDH/FDH酵素濃縮物を用いた生物変換から単離することなく用いる。

【0059】

テトラヒドロフラン(THF)などの適当な有機溶媒(約-10 ~ 約0の範囲の温度に冷却)中の式VIの化合物の溶液をメタンスルホニルクロライド(塩化メシル)、およびHunig塩基(ジイソプロピルエチルアミンまたはDIPEA)で処理して式VIの化合物の対応のメタンスルホン酸塩を生成する。

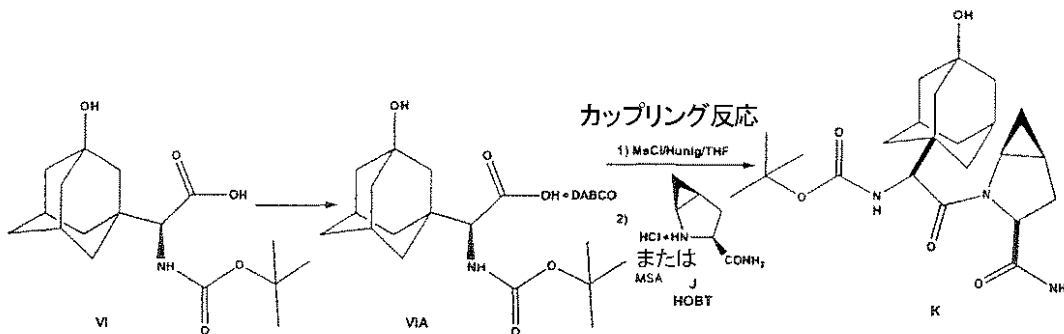
【0060】

ついで、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)または他の公知のカップリング剤の存在下、カップリング反応を用いて(S)- [(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式VI)メタンスルホン酸塩を(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミド(式J)にカップリン

グして3-(アミノカルボニル)-__S)-__(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-__-オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式K)を生成する。式Kの化合物をピリジンやトリエチルアミンなどの有機塩基および無水トリフルオロ酢酸で処理することにより脱水に供し、ついで約0 ~ 約10 に冷却し、水酸化ナトリウムまたはKOHやLiOHなどの他の強塩基を加えることにより加水分解に供して化合物(L)を生成する。ついで、3-シアノ-__S)-__(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-__-オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式L)を脱保護(および安息香酸ナトリウムで処理)してジペプチジルペプチダーゼI V インヒビターである(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキソエチル]-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル安息香酸塩(1:1)(式M)を生成する。本明細書の実施例37~39をも参照のこと。

10

【0061】
スキームVIIA
【化31】



20

【0062】
スキームVIIAに示すように、化合物(K)はまた以下のようにして化合物(VIA)(DABCO塩)から調製できる。

【0063】
式VIの酸を1,4-ジアザビシクロ[2,2,2]オクタン(DABCO)で処理して(__S)-__[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン塩(式VIA)を生成する。ついで、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)または他の公知のカップリング剤の存在下、カップリング反応(スキームVIIAに記載)を用いて(__S)-__[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン塩(式VIA)を(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミドHClまたはMSA塩(式J)にカップリングして3-(アミノカルボニル)-__S)-__(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-__-オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式K)を生成する。

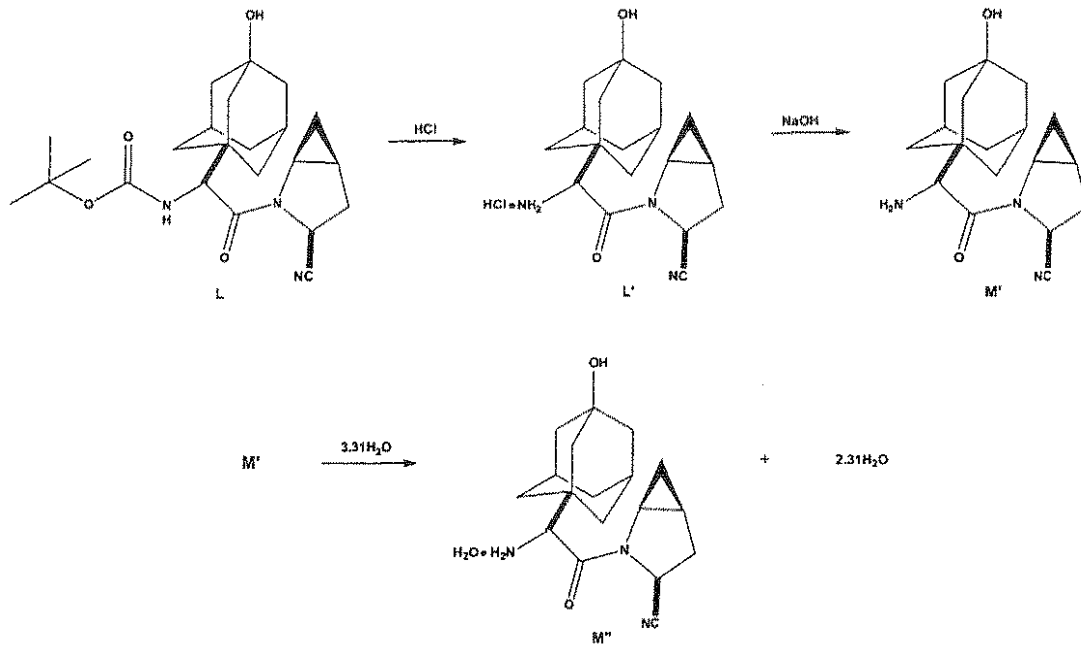
30

【0064】
スキームVIIに戻ると、化合物(L)をスキームVII Bに記載するように塩酸などの強酸で処理することにより脱保護できる。

40

【0065】
スキームVII B

【化32】



10

【0066】

20

スキームVII Bを参照すると、遊離塩基一水和物 (**M''**) をBOC-保護中間体 (**L**) から以下のようにして生成できる。

【0067】

BOC-保護中間体 (**L**) を、反応温度を約20~25 の範囲に保持しながら塩化メチレンおよびメタノールの存在下、濃塩酸で処理して塩酸塩 (**L'**) を生成する。塩酸塩 (**L'**) を水酸化ナトリウムまたは他の強塩基で処理して遊離塩基 (**M'**) を生成する。ついで、遊離塩基 (**M'**) を水で処理して遊離塩基一水和物 (**M''**) を生成する。

【0068】

本明細書の開示を読んだ当業者には理解されるであろうように、最終生成物ジペプチルペプチダーゼIVインヒビターである(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキシエチル]-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル安息香酸塩(1:1)(式M)またはその対応の遊離塩基 (**M'**) または遊離塩基一水和物 (**M''**) は、出発物質としてどの中間体を選択するかによって、スキームI、II、またはIIIおよびIV、V、VI、VIIおよびVII Aに示すすべての工程またはスキームI、II、またはIIIおよびIV、V、VI、VIIおよびVII Aのいずれかに示す一部の工程のみを用いて製造することができる。たとえば、本発明の技術を用い、当業者であれば出発物質として式IIの3-ヒドロキシ-__-オキサトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸、式Vの(__S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸、式VII Aの(__S)-__-[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン塩、または式IVの(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステルを用いて、シクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターである(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキシエチル]-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル安息香酸塩(1:1)(式M)またはその対応の遊離塩基 (**M'**) を常法により製造することができる。

30

40

【0069】

それゆえ、当業者であれば、単に(__S)-__-[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式VI)(またはそのDABCO塩(式VII A))を(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミド(式J)にカップリングして3-(アミノカルボニル)-__S)-__(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1

50

^{3,7}]デス-1-イル)-__-オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式K)を生成し、3-(アミノカルボニル)-__S)-__(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-__-オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式K)を脱水して3-シアノ-__S)-__(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-__-オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式L)を生成し、ついで3-シアノ-__S)-__(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-__-オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式L)を加水分解してジペプチジルペプチダーゼIVを生成することによって、ジペプチジルペプチダーゼIVのシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターを製造することができる。この方法において、出発物質は、断片である(__S)-__[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式VI)(またはそのDABCO塩(式VIA))および(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミド(式J)を含む。

10

【0070】

しかしながら、本発明の方法は、断片(__S)-__[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式VI)を中間体(__S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)からBOC保護により製造することをさらに含む。この態様において、この方法は、酵素的アミノ化またはトランスアミノ化により3-ヒドロキシ-__-オキサトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式II)を不斉還元することによって(__S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)を製造することをさらに含む(スキームIまたはIIを参照)。別法として、この方法は、スキームIIIに従ってトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式N)からの(__S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)の化学合成をさらに含む。

20

【0071】

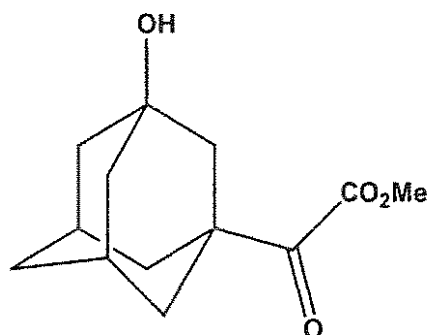
さらに、または別法として、この方法は、中間体(1S,3S,5S)-3-アミノカルボニル)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式H)からのBOCの除去により、断片(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミド(式J)を製造する工程をさらに含む。この態様において、この方法は、(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステル(式IV)の好ましくはSimmons-Smith反応によるシクロプロパン化によって(1S,3S,5S)-3-アミノカルボニル)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式H)を製造する工程をさらに含む。

30

【0072】

本発明の他の側面は、ジペプチジルペプチダーゼIVのシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターの製造における有用な中間体として本明細書において同定される新規な化合物に関する。ジペプチジルペプチダーゼIVのシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターの製造における中間体として有用な本発明の化合物としては、式I:

40

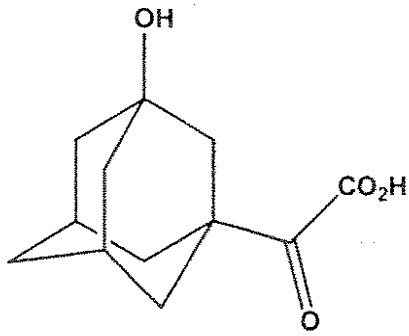


I

50

で示される3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル、式 I I :

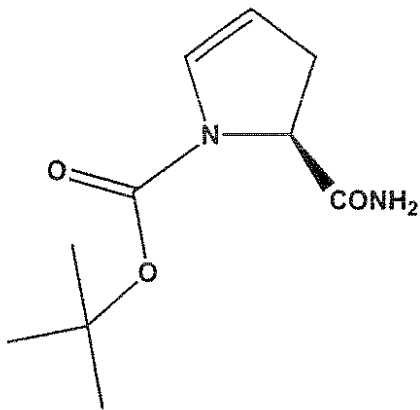
【化 3 4】



10

で示される3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸、式 I V :

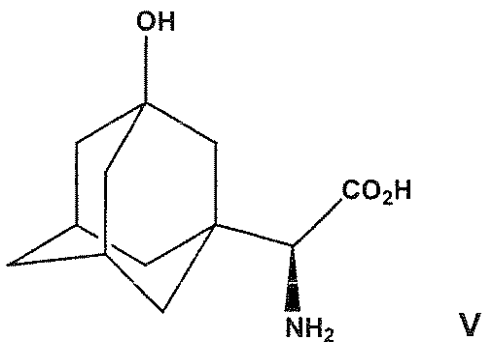
【化 3 5】



20

で示される(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステル、式 V :

【化 3 6】

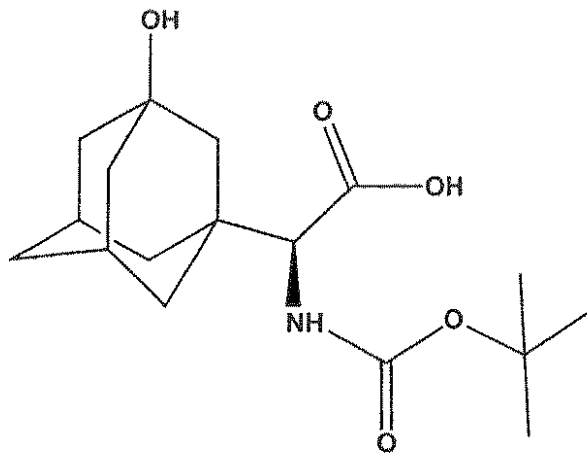


30

で示される(__S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸、式 V I :

40

【化 3 7】

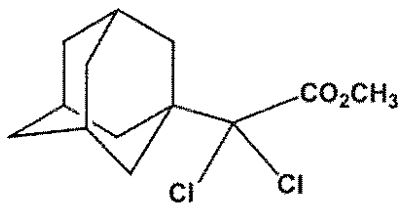


VI

10

で示される (S)-[[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸、(またはそのDABCO塩 V I A)、式 V I I :

【化 3 8】

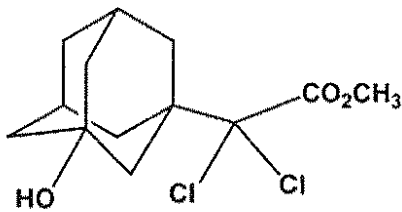


VII

20

で示される アダマンタン-1-イル-ジクロロ-酢酸メチルエステル、式 V I I I :

【化 3 9】

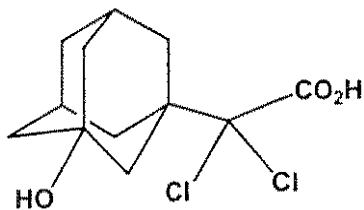


VIII

30

で示される ジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸メチルエステル、および式 I X :

【化 4 0】



IX

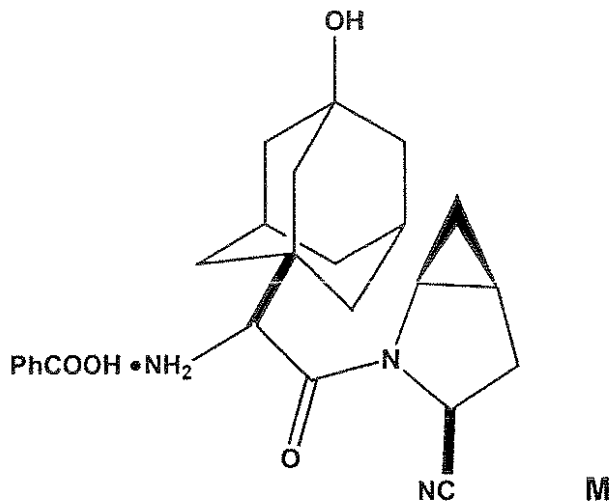
40

で示される ジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸が挙げられる。

【 0 0 7 3】

好ましい態様において、本明細書に示すように、これら化合物は、式 M :

【化 4 1】

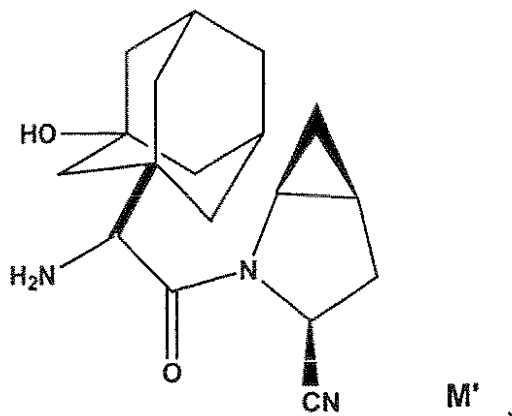


10

で示されるジペプチジルペプチダーゼI Vインヒビターである(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキソエチル]-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル安息香酸塩(1:1)および好ましくはそれぞれ式M'およびM''で示されるその対応の遊離塩基またはその一水和物M''

20

【化 4 2】



30

またはその一水和物M''(上記に記載)の製造における中間体として用いる。

【0074】

本発明の化合物および方法を用いて製造したジペプチジルペプチダーゼI Vインヒビターは、糖尿病およびその合併症、高血糖症、X症候群、高インスリン血症、肥満、およびアテローム性動脈硬化症および関連疾患、並びに免疫調節疾患および慢性炎症性腸疾患の治療に有用である。

【0075】

40

以下の実施例は本発明の好ましい態様を表す。

【0076】

実施例実施例 1

Thermoactinomyces intermediusからのフェニルアラニンデヒドロゲナーゼを発現し内生のホルメートデヒドロゲナーゼを産生する組換えPichia pastorisからの抽出物を用いた還元的アミノ化

Thermoactinomyces intermediusからのフェニルアラニンデヒドロゲナーゼを発現する組換えPichia pastoris凍結細胞(2.25kg)を、ギ酸アンモニウム(28.65g、0.454モル)を含む脱イオン水(6.75L)に加えた。解凍後、細胞をJanke and Kunkel Ultra-turrax T

50

25ホモジナイザーを用いて浮遊させ、濃NH₄OHでpH7に調節し、粉碎した氷で冷却して50mMギ酸アンモニウム中の25%w/v細胞浮遊液を得た。細胞をマイクロ流動床 (microfluidizer) に12000psiで2回通すことにより破碎し、細胞破碎物を20,000xgで4 にて遠心分離することにより除去した。アッセイA (実施例9) またはアッセイB (実施例10) によってそれぞれ決定されるように230998単位または124641単位のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼ活性を含み80080単位のホルメートデヒドロゲナーゼを含む上澄み液7024mlを、New Brunswick Scientific Bioflo IVバイオリアクターの16L容の容器に加えた。

【0077】

ギ酸アンモニウム (442.5g、7.017モル) および(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-オキソ-酢酸 (786.7g、3.510モル) を含む7024mlの溶液を調製した。この溶液のpHを276mlの濃水酸化アンモニウムを用いて8.0に調節した。ついで、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD; 9.834g、14.82ミリモル) およびジチオトレイトール (2.163g、14.027ミリモル) を加え、この溶液をPichia pastoris抽出物を含むバイオリアクターに加えた。溶液を40 に保持し、150rpmで攪拌した。反応開始後、それぞれ0、3および18時間で45、25および27mlの濃水酸化アンモニウムのアリコートを加えてpHを8.0に調節した。25時間後、この溶液にはHPLC分析 (実施例8、方法2参照) によって測定されるように818.9g (3.637モル、100%収率) の(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸が含まれていたが、検出可能なケト酸または該アミノ酸のR-エナンシオマーは含まれていなかった。

【0078】

(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸を、アンモニアを飛ばすための酵素的変換混合物の沸騰、ギ酸によるpH3への調節、沈殿したタンパク質を除去するための濾過、該アミノ酸のDowex 50 (H+) 樹脂への吸着、1.5Mアンモニアによる溶出、およびリッチ溶出液の濃縮からなる手順により単離して、(S)-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸を結晶性固体として得た。この単離手順を用いた最後の操作 (787gのケト酸の投入) は、804gの(S)-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸を94.3%の効力および3-ヒドロキシ-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸からの96.0%の収率で与えた。この手順により単離された(S)-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸のすべてのバッチは、(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキソエチル]-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル安息香酸塩までのその後の反応において、うまく扱うことができた。

【0079】

実施例2

組換えPichia pastorisからの加熱乾燥細胞を用いた還元的アミノ化

0.50Mギ酸アンモニウム、0.25M (3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-オキソ-酢酸、1.06mM NAD、1.00mMジチオトレイトール、およびアッセイAにより決定されるように32.7単位のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼおよび24.6単位のホルメートデヒドロゲナーゼを含む250mgの組換えPichia pastoris加熱乾燥細胞を最終容量4.0ml、pH8.0 (NH₄OHでpH調節) にて含有する溶液を調製した。Pichia pastoris加熱乾燥細胞の調製はHansonら (Enzyme and Microbial Technology 2000 26: 348-358) によって記載されている。この溶液を50ml容のエーレンマイヤーフラスコ中で40、100rpmにて4日間インキュベートし、ついでHPLCにより分析した。この溶液は45.02mg/ml (80%収率) の(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸を含んでいた。

【0080】

実施例3

組換えPichia pastorisからの湿潤細胞を用いた還元的アミノ化

0.415Mギ酸アンモニウム、0.208M (3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-オキソ-酢酸、0.88mM NAD、0.84mMジチオトレイトール、およびアッセイAにより決定されるように6.06単位のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼおよび12.8単位のホルメートデヒドロゲナー

ゼを含む12.5% w/vの*Pichia pastoris*湿潤細胞を最終容量3.0ml、pH 8.0 (NH₄OHでpH調節)にて含有する溶液を調製した。この溶液を50ml容のエーレンマイヤーフラスコ中で40、200rpmにて68時間インキュベートし、ついでHPLCにより分析した。この溶液は31.9 mg/ml (68%収率)の(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸を含んでいた。

【0081】

実施例 4

Thermoactinomyces intermediusからのフェニルアラニンデヒドロゲナーゼを発現する組換え大腸菌加熱乾燥細胞およびCandida boidiniiからのホルメートデヒドロゲナーゼを用いた還元的アミノ化

0.50Mギ酸アンモニウム、0.25M (3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-オキシ-酢酸、1.06mM NAD、1.00mMジチオトレイトール、2.55単位/ml (0.51単位/mg)の*Candida boidinii*からのホルメートデヒドロゲナーゼ (Boehringer Mannheim)、およびアッセイAにより決定されるように76単位のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼを含む250mgの組換え大腸菌加熱乾燥細胞を最終容量4.0ml、pH 8.0 (NH₄OHでpH調節)にて含有する溶液を調製した。この溶液を50ml容のエーレンマイヤーフラスコ中で40、100rpmにて4日間インキュベートし、ついでHPLCにより分析した。この溶液は7.69mg/ml (13.7%収率)の(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸を含んでいた。

【0082】

実施例 5

組換え大腸菌湿潤細胞およびCandida boidiniiからのホルメートデヒドロゲナーゼを用いた還元的アミノ化

0.415Mギ酸アンモニウム、0.208M (3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-オキシ-酢酸、0.88mM NAD、0.84mMジチオトレイトール、1単位/ml (0.51単位/mg)の*Candida boidinii*からのホルメートデヒドロゲナーゼ (Boehringer Mannheim)、およびアッセイAにより決定されるように97単位のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼを含む12.5%w/vの大腸菌湿潤細胞を最終容量3.0ml、pH 8.0 (NH₄OHでpH調節)にて含有する溶液を調製した。この溶液を50ml容のエーレンマイヤーフラスコ中で40、200rpmにて68時間インキュベートし、ついでHPLCにより分析した。この溶液は5.16mg/ml (11.0%収率)の(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸を含んでいた。

【0083】

実施例 6

Sporosarcina種からのフェニルアラニンデヒドロゲナーゼおよびCandida boidiniiからのホルメートデヒドロゲナーゼを用いた還元的アミノ化

0.15Mギ酸アンモニウム、0.05M (11.2mg/ml) (3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-オキシ-酢酸、1mM NAD、1mMジチオトレイトール、0.51単位/ml (0.51単位/mg)の*Candida boidinii*からのホルメートデヒドロゲナーゼ (Boehringer Mannheim) および1.01単位のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼ (14.5単位/mg; Sigma Chemical Co.)を最終容量1.0 ml、pH 8.5 (NH₄OHでpH調節)にて含有する溶液を調製した。この溶液を30にて20時間インキュベートし、ついでHPLCにより分析した。この溶液は0.31mg/ml (2.74%収率)の(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸を含んでいた。

【0084】

実施例 7

プラスミドpBMS2000-PPFDH-PDHmodの構築

発現ベクターpBMS2000-PPFDH-PDHmodの2工程構築を用いた。適合性の制限エンドヌクレアーゼ開裂部位とともに*P. pastoris*のFDH遺伝子の5'末端および3'末端を含むオリゴヌクレオチドプライマー:

5' TCGTCATGAAAAATCGTTCCTCGTTTTG 3' (5'末端; センス; 配列番号1)

BspHI

5' TACTGTTTTTCCAGCGTATTCCTAGGCT 3' (3'末端; アンチセンス; 配列番号2)

10

20

30

40

50

BamHI

を用い、*P. pastoris*のFDH遺伝子を発現ベクター-pBMS2000 (pBMS2000はS. W. Liuらの米国特許第6,068,991号 (2000年5月30日発行) に開示されている) にサブクローニングした。

【0085】

それぞれ1×TaqPlus反応緩衝液 (Stratagene、ラジヨラ、カリフォルニア)、0.2mMの各デオキシヌクレオチド三リン酸 (dATP、dCTP、dGTP、およびdTTP)、0.4nMの各オリゴヌクレオチド、2.5UのTaqPlus DNAポリメラーゼ (Stratagene)、および*P. pastoris*のFDH遺伝子を含む10pgのプラスミドDNAを含有する4つの100μlアリコートで*P. pastoris*のFDH遺伝子の高信頼性PCR増幅を行った。増幅条件は、自動伸長Perkin-Elmer Model 480サーモサイクラーを用い、94℃で4分間インキュベートした後、94℃で1分間；50℃で1分間；および72℃で1.5分間の25サイクルを含んでいた。

10

【0086】

このPCR反応混合物を等容量の1:1フェノール:クロロホルム (GibcoBRL、ゲイサーズバーグ、メリーランド) で抽出し、13,000×gで5分間遠心した。上部の水性相を取り、新たなマイクロ遠心管に入れた。0.1容量の3M酢酸ナトリウムおよび2容量の氷冷エタノールを加えてDNAを沈殿させた。13,000×gで5分間遠心分離後、液体を管から吸引し、ペレットを0.5mlの氷冷70%エタノールで洗浄した。液体を再び吸引し、ペレットを室温で30分間空気乾燥させた。

【0087】

増幅したDNAを各20単位のBspHIおよびBamHIで3時間、37℃にて全量50μlで消化した。これと平行してpBMS2000ベクター (2μg) をBspHIおよびBamHIで消化した。消化した試料を1.0%TAEアガロースゲル上で2時間、100vにて電気泳動した。FDH遺伝子 (1100-塩基対断片) および線状化ベクター (4700-塩基対断片) に対応するバンドを別々にゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen、チャッツワース、カリフォルニア) を用いて精製した。これら単離断片の濃度を低分子量ラダー (Invitrogen Corp.、カールスバード、カリフォルニア) に対する電気泳動により推定し、5:1 (挿入:ベクター) のモル比にて全量10μlで22℃にて2時間ライゲートした。15μlのdH₂Oおよび250μlの1-ブタノールを加えてDNAを沈殿させ、マイクロ遠心管中で13,000×gにて5分間ペレット化した。液体を吸引除去し、DNAをSpeedVac (Savant Instruments、ファーマーリングデール、ニューヨーク) で5分間、低加熱下で乾燥させた。ペレットを5μlのdH₂Oに再懸濁した。

20

30

【0088】

再懸濁したDNAをエレクトロポレーションにより0.04mlの大腸菌DH10Bコンピテント細胞 (Invitrogen) に25μFおよび250Vにて形質転換した。SOC培地を直ちにに加え (0.96ml ; SOC = 1リットル当たり0.5%酵母抽出物、2%トリプトン、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl₂、10mM MgSO₄、および20mMグルコース)、細胞をシェーカー中で1時間、37℃および225rpmにてインキュベートした。プラスミドDNAを含むコロニーを、50μg/mlの硫酸カナマイシン (Sigma Chemicals、セントルイス、ミズーリ) を含むLBアガープレートで選択した。所望の挿入を有するプラスミドは、RapidCycler (Idaho Technology、ソールトレイクシティー、ユタ) を用いたキャピラリー管でのコロニーPCRにより同定した。各反応混合物は、50mM Tris-HCl (pH 8.3)、4mM MgCl₂、0.25mg/mlのウシ血清アルブミン、2%スクロース400、0.1mMクレゾールレッド、0.4nMの各プライマー (配列番号1および配列番号2)、および2.5UのTaq DNAポリメラーゼ (Promega Corp.、マジソン、ウィスコンシン) を含んでいた。反応混合物を10μlのアリコートに分け、丸底マイクロタイタープレート of ウェルにピペティングした。カナマイシン耐性コロニーを使い捨てプラスチック播種針を用いて拾い、反応混合物に掻き混ぜて入れ、LB-カナマイシンアガーに移した。各反応混合物アリコートを30μl容キャピラリー管に入れ、管の両端をフレイムシールした。細胞を溶解し、94℃で30秒インキュベートしてDNAを変性し、RapidCycler (Idaho Technology、ソールトレイクシティー、ユタ) を用いて94℃で0秒間、40℃で0秒間、および72℃で60秒間の30サイクルを用いて増幅を行った。試料を1.0%TAEアガロースゲル上で2時間、

40

50

100vにて電気泳動した。17の試験した試料のうち7つの試料が1100塩基対で強いバンドを示した。このプラスミド（本明細書でpBMS2000-PPFDHと称する）を含む1つのコロニーをプラスミド構築における次の工程のために選択した。

【0089】

「PDHmod」は、(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-オキソ-酢酸の(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸への完全な変換に必要な最後の2つのアミノ酸およびカルボキシル末端のさらなる12アミノ酸の変化により刊行されたDNA配列（Takadaら、J. Biochem. 109, pp. 371-376 [1991]）とは異なっている改変した*Thermoactinomyces intermedius*フェニルアラニンデヒドロゲナーゼをいう。この変化をプラスミドpPDH9K/10（Donovanらの特許WO200004179（2000年1月27日発行）に詳細が記載されている）に導入し、ついでこのプラスミドを*P. pastoris* SMD1168（株ATCC 74408として寄託）に形質転換した。

【0090】

天然のPDH遺伝子の3'末端および対応アミノ酸は以下のとおりである：

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

【0091】

PDHmod遺伝子の3'末端および対応アミノ酸は以下のとおりである（変化したまたは新規なアミノ酸は強調してある）：

AAC AGC GCG GAG GGG TAC CTC GAG CCG CGG
Asn Ser Ala Glu Gly Tyr Leu Glu Pro Arg
CGG CCG CGA ATT AAT TCG CCT TAG（配列番号5）
Arg Pro Arg Ile Asn Ser Pro 停止

【0092】

適合性の制限エンドヌクレアーゼ開裂部位とともにPDHmod遺伝子の5'末端および3'末端を含むオリゴヌクレオチドプライマー：

GATGCTCATATGCGCGACGTGTTTGAATGATG（5'末端、センス；配列番号3）

NdeI

GATCCCGGGCTAAGGCGAATTAATAATTCG（3'末端、アンチセンス；配列番号4）

SmaI

を調製した。

【0093】

PCRによるPDHmodの増幅および精製のための反応条件は、ATCC 74408から調製した染色体DNAを反応のための鋳型として含めた他は*P. pastoris*のFDH遺伝子に用いたものと同であった。得られた断片を各20単位のNdeIおよびSmaIで25にて1時間、ついで37にて2時間、全容量50μlで消化した。これと平行して開始コドンにNdeI部位を有するpBMS2000ベクターのバージョン（2μg）を同一条件を用いてNdeIおよびSmaIで消化した。これら消化した試料を別々に1.0%TAEアガロースゲル上で2時間、100vにて電気泳動した。PDHmod遺伝子（1200-塩基対断片）および線状化ベクター（4700-塩基対断片）に対応するバンドをゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit（Qiagen）を用いて精製した。これら2つの断片のライゲーション、大腸菌の形質転換、およびPDHmod遺伝子を有する挿入（pBMS2000-PDHmodを形成）を含むコロニーのスクリーニングは上記と同様にして行った。

【0094】

pBMS2000-PPFDH-PDHmodの構築のため、pBMS2000-PDHmod（2μg）を50μLの反応液中、各10単位のHindIIIおよびSmaIで25にて1時間、ついで37にて1時間開裂させた。10単位のT4DNAポリメラーゼ（Invitrogen）および4つのすべてのデオキシリボヌクレオチド三リン酸の2.5mM混合物2μLを加え、試料を11にて20分間インキュベートした。反応液を1.0%TAEアガロースゲル上で2時間、100vにて電気泳動した。1800-塩基対断片を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit（Qiagen）を用いて単離した。この断片は、順にtacプロモ-

10

20

30

40

50

ター、groES遺伝子、およびPDHmod遺伝子（転写融合物として）を含んでいる。つぎに、pBMS2000-PPFDH（2 μg）を10単位の制限エンドヌクレアーゼSmaIで50 μL容量にて2時間、25 °Cで消化し、ついで0.4単位のエピアルカリホスファターゼ（United States Biochemicals、クリーブランド、オハイオ）で1時間、37 °Cにて処理した。プラスミドDNAを1.0%TAEアガロースゲル上で2時間、100vにて電気泳動し、単離し、QIAquickキットを用いて抽出した。これら2つの断片を6.5 : 1（挿入 : ベクター）のモル比で16 °Cにて4時間、10 μLの最終容量でライゲートした。1-ブタノール抽出および遠心分離後、DNAをエレクトロコンピテントDH10B細胞に形質転換した。カナマイシン耐性コロニーを、FDHについて記載したのと同様にして2つのPDHmod-特異的プライマーを用いてPDHmod遺伝子の存在についてスクリーニングした。第二ラウンドのPCRスクリーニングは、それぞれPPFDH遺伝子の5'末端およびPDHmodの3'末端に相同なプライマーを用いて行った。1400-塩基対断片の増幅を支持することのできた構築物のみが2つの遺伝子を正しい方向で有していた。一つのようなプラスミドが見出され、方向性がKpnIを用いた診断的制限消化によって確認された（この消化により5422塩基対および1826塩基対の予期された断片が得られた）。このプラスミドを「pBMS2000-PPFDH-PDHmod」と称した。

10

【0095】

実施例 8FDHおよびPDHmodの発現

pBMS2000-PPFDH-PDHmodを大腸菌JM110に形質転換した。シェークフラスコ研究においてJM110（pBMS2000-PPFDH-PDHmod）をMT5培地（2.0%Yeastamine、4.0%グリセリン、0.6%リン酸ナトリウム [二塩基性]、0.3%リン酸カリウム [一塩基性]、0.125%硫酸アンモニウム、0.0256%硫酸マグネシウム [七水和物；滅菌1M溶液からオートクレーブ後に添加]、および50 μg/mlの硫酸カナマイシン [濾過滅菌した50mg/ml溶液からオートクレーブ後に添加]）中、28 °C、250rpmで18時間増殖させた。600nmでの光学密度（OD₆₀₀）を記録し、0.35の開始OD₆₀₀を与えるに十分な細胞を新鮮なMT5/カナマイシン培地に加えた。OD₆₀₀が0.8~1.0となるまで、フラスコを250rpm、28 °Cにて振盪した。両遺伝子の発現を滅菌濾過した1Mイソプロピルチオ-Dガラクトピラノシド（IPTG）を最終濃度35 μMで加えることによって誘発し、発酵を24~48時間続けた。細胞を6,500 × gで5分間遠心分離することによってペレット化し、等容量の50mMギ酸アンモニウム（pH7.0）で1回洗浄し、再度ペレット化した。細胞を-20 °Cで貯蔵するか、または直ちに用いた。ペレットを50mMリン酸アンモニウム（pH7.0）中、10mL/g（湿細胞重量）にて再懸濁し、Fisher Scientific Model 50 Sonic Dismembrator（Fisher Scientific、ピッツバーグ、ペンシルベニア）、マイクロチップで動力設定15を用いて3 × 15秒間超音波処理した。細胞破砕物は、13,000 × gにて室温で5分間遠心分離することによりペレット化した。

20

30

【0096】

ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により発現を調べた。1 μLの細胞抽出物を5 μLの4X NuPAGE™ LDS緩衝液（Invitrogen）と混合し、蒸留水で19mLとした。試料を70 °Cで10分間加熱した。1mLの1Mジチオトレイトール溶液を混合物に加え、10 μLを10%NuPAGE™ Bis-Trisポリアクリルアミドミニゲルに適用した。電気泳動を200vで50~60分間行い、ゲルを0.1%（w/v）クーマシーブルー（Sigma）、40%（v/v）エタノール、および10%（v/v）酢酸からなる溶液で染色した。染色液に浸漬したゲルを沸騰が明らかとなるまでマイクロ波オーブンで加熱し、ついでオービタルシェーカーで40rpmにて15分間振盪した。ゲルを脱イオン水で十分に洗浄し、脱色溶液（GelClear™；Invitrogen）で覆った。この溶液を再び沸点ちょうどまで加熱し、少なくとも2時間穏やかに振盪した。インキュベートするとMr 43,000および40,000に2つの顕著なバンドが認められ、FDHおよびPDHmodのサブユニットの予期された分子量に対応していた。試料はまた、実施例10に記載するようにして試験したときにFDHおよびPDHの両活性を有していることがわかった。この組換え大腸菌株にSC16496の内部表示を与えた。

40

【0097】

SC16496を引き続き15-リットルおよび250-リットル容量で発酵させた。15-リットル発

50

酵の場合、1mLの凍結SC16496を入れた一つのバイアルを室温で解凍し、4-リットルフラスコ中の50 µg/mlのカナマイシンを含む1リットルのMT5培地に加えた。フラスコを28、250rpmにて24時間インキュベートし、Braun発酵曹中の13リットルのMT5培地（15Lの最終容量に基づいて成分をパッチ）に移した。それぞれ50 µg/mlおよび0.0246%の最終濃度を与えるのに十分な硫酸カナマイシンおよび硫酸マグネシウム七水和物を500mLの蒸留水に溶解し、0.2ミクロン酢酸セルロース濾過ユニットにより濾過滅菌した。この溶液をタンクに加え、直ちに播種した。最初のOD₆₀₀は約0.35であった。

【0098】

発酵作業パラメーターは以下のとおりであった：

16リットルの作業容量

温度：28

換気：1.0vvm

圧力：690mbar

攪拌：500rpm

必要に応じてNH₄OHを用いてpHを6.8に調節

フォーミング（foaming）は必要に応じてUCON（Dow Chemical Companyによって製造されたフルオロカーボン溶媒ブレンド）を添加して調節した。

【0099】

OD₆₀₀ 0.8~1.0（播種後約2時間）にて濾過滅菌したIPTG（500mLのdH₂Oに溶解）を無菌的に加えて最終濃度を35 µMとした。発酵をさらに48時間続けた時点でタンクの内容物を10に過冷した。細胞を遠心分離により回収し、0.1vol 50mMギ酸アンモニウム、pH7.0で1回濯いだ。細胞ペーストをプラスチック容器に入れ、必要なときまで-70で貯蔵した。

【0100】

250-Lタンクについては、播種物は以下のようにして調製した：1mLの凍結SC16496を解凍し、50 µg/mlのカナマイシンを含む300mLのMT5培地に加えた。フラスコを28、250rpmにて24時間増殖させた。OD₆₀₀を決定し、800D単位を与える細胞の適当な容量を除去し、250mLの新鮮なMT5培地に加えた。細胞をBraun発酵曹中の10LのMT5/カナマイシン培地に無菌的に加え（最初のOD₆₀₀ ~0.008）、上記の発酵作業パラメーター下で16時間増殖させた。ついで、培養液を適当な濃度のカナマイシンおよび硫酸マグネシウムを含む250LのMT5に移した。これら条件下でのSC16496の倍加時間が90分であることに基づき、250L中の10Lの播種物は0.30~0.35の開始OD₆₀₀を与えるはずである。誘発、増殖、回収、および貯蔵は、15-L発酵について記載したのと同様にして行った。

【0101】

実施例 8 A

単離したPDH/FDH酵素濃縮物を用いた3-ヒドロキシ- α -オキソトリシクロ-[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式II）からの(S)- α -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式V）を介した(S)- α -[[（1,1-ジメチルエトキシ）カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式VI）の短縮（telescoped）製造

【0102】

工程 1：PDH/FDH酵素濃縮物の単離

大腸菌JM110（pBMS2000-PPFDH-PDHmod）の発酵プロス（30リットル）を4000Lタンクから得、マイクロ流動床（MicrofluidicsモデルM-110Y、作動圧力12,000~20,000psi）に通し（1回）、プロスの温度を40未満に保ちながら細胞から活性を放出させた。マイクロ流動床プロスのPDH/FDH活性は、PDHについては321単位/mL、FDHについては81単位/mlであった。

【0103】

プロス全体を清澄化するため、4.5kgのCeliteを十分に攪拌したプロスに加えた。ついで、0.201リットルの30%水性ポリエチレンイミンを加え、30分間混合した。ついで、混合物を濾過プレス（Ertel Alsopモデル8-ESSC-10）を用いて濾過し、18リットルの濾液を得

10

20

30

40

50

た。濾過ケーキを12リットルの水で洗浄して容量を30リットルに戻した。この工程の収率は、PDHの97%の活性の回復であり、活性は31IU/ml、FDHの活性は8IU/mlであった。

【0104】

清澄化したブrossを100,000 MWC0フィルターカセット (Millipore Pellicon 2ユニット、ポリエーテルスルホン低タンパク質結合カセット、0.5m²濾過面積) により限外濾過した。ポンプの循環速度は400mL/分であった。清澄化した濾液を1.5リットルに濃縮し、PDH力価が567IU/mlでFDH力価が136IU/mlの酵素濃縮物を得た。浸透液をアッセイしたところ、活性は認められなかった。濃縮物中の全体の酵素活性回収は84%であった。

【0105】

工程2：還元的アミノ化

3-ヒドロキシ- β -オキソトリシクロ-[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式II) (1.00kg; 4.46モル) を20L容器に加え、ついで水 (5L) を加えた。混合物を攪拌し、10N NaOHでpHを調節してpH~8として溶液を得た。Darco KBBカーボン (100g) を加え、混合物を5分間攪拌し、ついで5 μ の濾紙を用いてブフナー漏斗で濾過した。濾紙を水洗し (2 \times 1L)、濾液および洗浄液をコンバインして透明な溶液を得た。

【0106】

攪拌しながらギ酸アンモニウム (0.562Kg; 8.92モル) を加え、10N NaOHを用いてpHを再び~7.5に調節した。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (2.65g) およびジチオトレイトール (1.54g) を加えた。固形分が溶解したときにPDH/FDH酵素濃縮物を加えた (1.03L; PDHを500,000IU)。10N NaOHを用いてpHを室温で~8.0に再調節した。

【0107】

ついで、混合物を~40 $^{\circ}$ Cに温め、水で全容量10Lまで希釈した。42時間攪拌する間、pHを7.7~8.3に保持した。得られた溶液は、0.955Kg (95.1%) の生成物 (S)- β -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式V) を含んでいた。

【0108】

工程3：BOC-保護

(S)- β -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式V) の溶液の一部 (477.5g; 2.12モル) にジカルボン酸ジ-tert-ブチル (1.022kg; 4.68モル) を加えた。この混合物を、10N NaOHを用いてpHスタット滴定器で10に調節し保持しながら周囲温度で攪拌した。反応はBoc₂Oの添加後4時間で完了し、このとき出発物質は1.0%未満しか残っていなかった。

【0109】

混合物のpHを35%H₂SO₄で~8に調節し、混合物にi-PrOAc (5.0L) を加えた。ついで、混合物のpHを35%H₂SO₄で2.0に調節し、このpHで5~10分間保持した。Dicalite (250g) を加え、混合物を~10分間攪拌し、ついでブフナー漏斗中の濾紙上のDicalite (250g) のパッドで濾過した。Dicaliteのパッドを2.5Lのi-PrOAcでさらに洗浄した。

【0110】

濾液を10N NaOHでpH8に調節した。1時間沈降させた後、界面を含む有機層を廃棄した。水性層にi-PrOAc (7.5L) を加えた。混合物を35%H₂SO₄でpH~2.0の酸性にし、ついで~40 $^{\circ}$ Cに加熱し、穏やかに攪拌しながら4時間保持した。層を分離し、有機抽出物を残した。界面を含む水性層をi-PrOAc (3.75L) で抽出し、40 $^{\circ}$ Cで2時間後に層を再び分離した。界面を含む水性層をi-PrOAc (3.75L) で再び抽出し、40 $^{\circ}$ Cで2時間後に層を分離した。

【0111】

コンバインした有機抽出物 (~15L) を蒸留により~4.5Lに濃縮した。ついで、この溶液にヘプタン (~10L) を10~15分間かけて加え、その間温度を~82-89 $^{\circ}$ Cに保持した。リアクタージャケットの温度を70 $^{\circ}$ Cに設定し、この温度に1時間保持した。冷却するとほとんどなく結晶化が生じた。ついで、リアクタージャケットの温度を40 $^{\circ}$ Cに設定し、この温度に30分間保持した。

【0112】

懸濁液を周囲温度に冷却し、ついでさらに0~5 $^{\circ}$ Cに冷却した。0~5 $^{\circ}$ Cで1時間攪拌した

10

20

30

40

50

後、生成物を濾過した。生成物をヘプタン（2.5L）で洗浄し、ついで40℃で真空乾燥して607.0g（88%収率）の(S)-[[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式VI）を得た。

【0113】

実施例 9

組換え大腸菌SC16496 JM110[pBMS2000-PPFDH-PDHmod]（ATCC受託番号PTA-4520）からの抽出物を用いた還元的アミノ化

組換え大腸菌の凍結細胞（25g）を脱イオン水（最終容量を100mlとするに充分であり、5mlの1Mギ酸アンモニウムを含有）に加えた。解凍後、細胞をJanke and Kunkel Ultra-turrax T8ホモジナイザーを用いて浮遊させ、ついで濃NH₄OHでpH7に調節し、破碎した氷で冷却して50mMギ酸アンモニウム中の25%w/v細胞浮遊液を得た。細胞を12000psiにてマイクロ流動床に2回通すことにより破碎し、細胞破碎物を20,000×g、4℃にて遠心分離により除去した。2456単位（アッセイA）または768単位（アッセイB）のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼおよび8801単位のホルメートデヒドロゲナーゼを含む266mlの上澄み液を1-L容器に加えた。

10

【0114】

ギ酸アンモニウム（16.74g、0.2654モル）および(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-オキソ-酢酸（29.76g、0.1327モル）を含む266mlの溶液を調製し、12.7mlの濃水酸化アンモニウムでpH8.0とした。NAD（372mg、0.561ミリモル）およびジチオトレイトール（81.8mg、0.530ミリモル）を加え、ついでこの溶液を大腸菌抽出物を入れた容器に加えた。容器を40rpmのシェーカー上、40℃に保持した。濃水酸化アンモニウムを定期的に加えてpH8.0に保持した。38時間後、HPLC分析によって測定されるように、溶液は31.5g（0.140モル、100%収率）の(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸を含んでおり、該アミノ酸のR-エナンチオマーは含んでいなかった。

20

【0115】

実施例 10

組換え大腸菌SC16496 JM110[pBMS2000-PPFDH-PDHmod]（ATCC Deposit PTA-4520）からの凍結乾燥細胞を用いた還元的アミノ化

溶液には10.0mlの最終容量にpH8.0（pHはNH₄OHで調節）にて、以下のものが含まれていた：0.50Mギ酸アンモニウム、0.237M（3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-オキソ-酢酸、1.00mM NAD、1.00mMジチオトレイトール、および975mgの凍結乾燥した組換え大腸菌。細胞を湿重量の26%まで乾燥させた。乾燥前に細胞は65.04単位/g（アッセイA）のフェニルアラニンデヒドロゲナーゼ、（またはアッセイCにより12.79単位/gのフェニルアラニンデヒドロゲナーゼ）、および133.32単位/gのホルメートデヒドロゲナーゼを含んでいた。この溶液を緊密に密封した50ml容エーレンマイヤーフラスコ中で40℃、100rpmにて3日間インキュベートし、ついでHPLCにより分析した。この溶液は49.06mg/ml（92.13.0%収率）の(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸を含んでいた。

30

【0116】

実施例 11

分枝鎖トランスアミナーゼを用いたトランスアミノ化

50mMリン酸カリウム緩衝液（pH8.0）中、1.0mlの最終容量に以下のものを含む溶液を調製した：0.10Mグルタミン酸ナトリウム、0.05M（3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-オキソ-酢酸（0.05M NaOHで中和）、0.1mMピリドキサルリン酸、および1mgの分枝鎖トランスアミナーゼ（Biocatalytics）。この溶液をマイクロ管で37℃にて68時間インキュベートした。この溶液は5.53mg/ml（49.2%収率）の(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸および7.05mg/mlの残留する(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-オキソ-酢酸を含んでいた。

40

【0117】

実施例 12

(S)-アミノ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸のエナンチオマー過剰および量の

50

HPLCアッセイ

試料を水で約2mg/mlの濃度に希釈し、沸騰水浴に1分間入れて反応を停止させ、タンパク質を沈殿させた。冷却後、試料を0.2ミクロンのナイロンフィルターでHPLCバイアル中に濾過した。2つの分離法を用いた。

【0118】

方法1:

カラム: Chiralpak WH 25 × 0.46cm (Daicel Industries, Ltd.)

移動相: 0.3mM CuSO₄

流速: 1ml/分

カラム温度: 50

検出: 240nmに設定したダイオードアレイ検出器 (DAD)

注入量: 10 μl

S-エナンシオマー ((__S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸) 保持時間: 79.9分

R-エナンシオマー 保持時間: 32.8分

【0119】

方法2:

カラム: Regis Davankov Ligand Exchange 15 × 0.46cm

移動相: 25%メタノール/75%6mM CuSO₄

流速: 1ml/分

カラム温度: 40

検出: 240nmに設定したDAD

注入量: 10 μl

S-エナンシオマー ((__S)-__-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸) 保持時間: 3.2分

R-エナンシオマー 保持時間: 11.2分

ケト酸 (3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸) 保持時間: 5.2分

【0120】

実施例13フェニルアラニンデヒドロゲナーゼアッセイA

フェニルアラニンデヒドロゲナーゼアッセイAは、1ml中に40 にて以下のものを含んでいた: 0.4mM NADH、5mMフェニルピルビン酸ナトリウム、HClでpH8.75に調節した0.75M NH₄OH。吸光度の低下を340nmでモニターした。酵素活性単位は、吸光度の変化速度に基づき、μモル/分として計算した。

【0121】

実施例14フェニルアラニンデヒドロゲナーゼアッセイB

フェニルアラニンデヒドロゲナーゼアッセイBは、1ml中に40 にて以下のものを含んでいた: 0.4mM NAD、10mM L-フェニルアラニン、1N NaOHでpH10.0に調節した0.1M K₂HPO₄。吸光度の増加を340nmでモニターした。酵素活性単位は、吸光度の変化速度に基づき、μモル/分として計算した。

【0122】

実施例15フェニルアラニンデヒドロゲナーゼアッセイC

フェニルアラニンデヒドロゲナーゼアッセイCは、1ml中に40 にて以下のものを含んでいた: 0.4mM NADH、50mM 3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (1当量のNaOH溶液に溶解)、HClでpH8.75に調節した0.75M NH₄OH。吸光度の低下を340nmでモニターした。酵素活性単位は、吸光度の変化速度に基づき、μモル/分として計算した。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 3 】

実施例 1 6

ホルメートデヒドロゲナーゼアッセイ

ホルメートデヒドロゲナーゼアッセイは、1ml中に40 にて以下のものを含んでいた：1 mM NAD、100mMギ酸アンモニウム、100mMリン酸カリウム緩衝液（pH8.0）。吸光度の増加を340nmでモニターした。酵素活性単位は、吸光度の変化速度に基づき、 μ モル/分として計算した。

【 0 1 2 4 】

実施例 1 7

-プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式O）へのトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式N）の臭素化

固体のトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式N）（288g；1.48モル）を冷却器を備えた3つ首丸底フラスコ中で塩化チオニル（465mL）に懸濁した。ジメチルホルムアミド（DMF；0.3mL）を加え、懸濁液を室温で1.5時間攪拌した。反応の完了をガスクロマトグラフィーによりチェックした。ついで、固体のNBS（307g）を反応混合物に少しずつ加え、反応混合物を60 に加熱した。反応混合物を3時間攪拌し、その間温度を60~65 に保持した。ガスクロマトグラフィーによるモニターを行って反応の完了を確実にした。ヘプタン（900mL）を反応混合物に加えた。過剰の塩化チオニルを78~80 で留去した。ついで、水を注意深く加えて（激しい反応）反応を停止させた（全量1050mL）。ついで、ヘプタン（500mL）および水（600mL）を加え、水性層を有機層から分離した。有機層をさらなる水（600mL）で洗浄し、水性層を再び有機層から分離した。さらなる水（150mL）を有機ヘプタン層に加え、ヘプタンを水性層から留去した。特に、70mLの水をヘプタン共蒸留した。ヘプタンを留去した後、テトラヒドロフラン（THF；1200mL）を水性層に加え、その結果得られた混合物を室温で16時間激しく攪拌してゆっくりと加水分解させた。ガスクロマトグラフィーによるモニタリングは若干の未反応の酸クロライドの存在を示した。ついで、さらなる水（150mL）を加えて加水分解のスピードを上げ、反応をガスクロマトグラフィーによりモニターして反応の完了を確実にした。ついでTHFを留去して二相（水および油）反応混合物を得た。ついで種晶を加え、反応液を静置して室温とし、重い固体を出現させた。懸濁液を室温にて2時間攪拌したときに攪拌できるようにするため、水（250mL）およびアセトニトリル（500mL）を加えた。ついで、固形分を濾去し、アセトニトリル（2×250mL）で洗浄した。この濾液には -プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式O）の最初の収穫；264gがAP95とともに室温での真空乾燥後の66%収率にて含まれていた。ついで、母液（113g残渣）を水およびアセトニトリル（250mL/250mL）で室温にて1~2時間、残渣粉碎した。ついで、反応液を濾過し、固形分を乾燥させて -プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式O）の第二の収穫；64gをAP90とともに16%収率にて得た。

【 0 1 2 5 】

実施例 1 8

-プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式O）からの -プロモ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式Q）の調製

エーレンマイヤーフラスコに315mlの95~98% H_2SO_4 を充填し、ついで氷浴で8 に冷却した。ついで、 HNO_3 （30mlの水に50mlの70% HNO_3 を加えることによって調製した50%を35ml）をフラスコに加え、その間混合物を氷浴で8 に保持した。ついで、温度が28 よりも低いままのように固形の -プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式O）（92g、0.338モル）を約30~60分かけて少しずつ混合物に加えた。ついで、透明な溶液が得られるまで60 に加熱しながら反応液を攪拌した。

【 0 1 2 6 】

反応の進行を薄層クロマトグラフィー（TLC）かまたは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）のいずれかでモニターした。TLCは、 $KMnO_4$ とともに酢酸エチル/メタノール/ヘキサンを9：1：10の比で用いたシリカゲルで行った。HPLCは、ODSカラム、C18 S-3 120A、4.6

10

20

30

40

50

×50mm、10%アセトニトリル/H₂Oから100%アセトニトリルへの7分間での線状勾配、および2.5ml/分の流速を用いて行った。検出波長は220nmであった。

【0127】

反応が完了したら、混合物を室温に冷却し、約16時間そのまま保持した。ついで、褐色のガスが発生しなくなるまで水(700mL)を加えて反応を停止させた。得られたスラリーを氷浴で約5℃に冷却し、ついで濾過した。固形の濾過物を200mLの水で洗浄し、空気乾燥して90gの 3-ブromo-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式Q)を薄黄色の固体として得た(92%収率)。

【0128】

実施例19

3-ブromo-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式Q)からの(S)-3-アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)の調製

3-ブromo-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式Q)(75g、0.278モル)を225mLの30%水酸化アンモニウム(4.08モル、14.6当量)に溶解した。ついで、反応混合物を65℃に16時間加熱した。ついで、反応混合物を回転蒸発(rotovap)で固体に濃縮した。この濃縮固体にEtOH(200mL)を加え、ついで再び回転蒸発で濃縮した。収量は、黄色の固体としての71gのヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)のキラルな混合物であった(90%)。

【0129】

実施例20

ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式V)の分割

実施例19のキラル混合物のBoc保護を、テトラヒドロフラン中のBoc無水物および水酸化ナトリウムを用いて行った。得られた化合物 [[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3]ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(化合物R)(EA中に0.25M、80μl、=6.52mg)をキラルな塩基([1R,2S]-(-)-1,2-ジフェニルヒドロキシエチルアミン)(0.25M、80μl)とバイアル中で混合し、混合物をSpeedVac中で蒸発乾固した。溶媒(200μl)を加えた。混合物を入れたバイアルを50℃に加熱したシェーカーに1.5時間置いた。ついで、(S)-[[ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(化合物S)の結晶化のために混合物を室温に冷却した。

【0130】

実施例21

ZnCl₂触媒したアダマンチルプロマイド(式A)カップリング

乾燥容器に7.5kgのアダマンチルプロマイドを充填した。ついで、塩化メチレン(22.5リットル)を室温にて加えて固形のアダマンチルプロマイドを溶解した。溶解は吸熱性であるので、次の工程の前に反応混合物の温度を20℃に戻した。ついで、反応混合物に塩化亜鉛(1.05kg)を入れ、20℃で約5分攪拌した。ついで、反応温度を20~25℃に保持しながら反応混合物にトリス(トリメチルシリルオキシ)-エチレン(15.3kg)を入れ、得られた混合物を2時間攪拌した。この混合の後にトリス(トリメチルシリルオキシ)-エチレン(5.10kg)を加えた。この添加の間、温度を30℃未満に保持した。反応液をさらに12~15時間、20~25℃に保持し、この時点で反応混合物を塩化メチレン(15リットル)で希釈し、0~5℃に冷却した。ついで、反応混合物を半飽和NH₄Cl溶液で、最初は滴下の仕方処理した。添加の間、温度を30℃未満に保持した。濃い懸濁液が得られた。この懸濁液に酢酸エチル(93.75リットル)を加えた。混合物を激しく15分間攪拌すると、有機相と水性相は分離した。有機層を貯蔵し、水性層を酢酸エチル(各洗浄で18.75リットル)で2回洗浄した。ついで、酢酸エチル洗浄液および有機層をコンバインし、水(37.5リットル)ついで水で半飽和した食塩水(37.5リットル)で洗浄した。有機層を再び分離し、蒸発させて結晶を生成させた。ついで、22.5リットルの最終容量でヘプタンへの溶媒交換を行った。ついで、得られた懸濁液を5~10℃に1時間冷却し、生成物の3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式B)を濾過により得た。3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.

10

20

30

40

50

1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式B)の収量は6.96kg(33.11モル、95%)であった。

【0131】

実施例21A

-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式B)のエステル化

まず不活性雰囲気をリアクター内に生成した。ついで、リアクターにメタノール(35.00リットル)、ついで__-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸(式B)(14.00kg)を入れて懸濁液を生成した。懸濁液を0~5 に冷却し、塩化アセチルを反応混合物の温度が5~10 に保持されるような仕方で加えた。塩化アセチルの添加完了後、反応混合物を20~25 に温め、20~25 で2時間攪拌した。ついで、反応混合物を真空下、40 で濃縮すると薄い油状物が得られた。この油状物を酢酸エチル(71.96リットル)に溶解し、室温に戻した。得られた混合物を水(各洗浄で28.78リットル)で2回洗浄し、各洗浄後に有機層と水性層とを分離した。有機層を貯蔵し、一方、水性層はコンバインして3N NaOH溶液でpH9.5に調節した。ついで、コンバインした水性層を酢酸エチル(各抽出に14.39リットル)で2回抽出した。各抽出後の有機層を分離し、貯蔵した有機層とコンバインした。ついで、これらコンバインした有機層を飽和重炭酸ナトリウム溶液(28.78リットル)ついで食塩水(43.18リットル)で洗浄した。ついで、すべての揮発成分を真空下、40 で除去し、静置する結晶化する無色から薄黄色の油状物が得られた。この油状物は、13.29kg(59.26モル、89%)の__-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル(式C)を含んでいた。

【0132】

実施例22

-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル(式C)のスワーン酸化

三つ首フラスコ(22リットル)は、メカニカルスターラー、温度プローブおよび添加漏斗を備えており、窒素ガスを一夜パージした。ついで、塩化オキザリル(500ml、5.73モル)を加え、ついでCH₂Cl₂(8リットル)を加えた。得られた溶液をアセトン/ドライアイス浴で-69 に冷却した。ついで、内部温度を-60 未満に保持しながら、ジメチルスルホキシド(DMSO; 700ml、9.86モル)の溶液を約30分かけてゆっくり加えた。温度を-60~-70 に保持しながら、溶液を20分間攪拌した。内部温度を-60 未満に保持しながら、CH₂Cl₂(1.7リットル)中の__-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル(式C)(990g、4.42モル)の溶液を約30分間かけてゆっくりと加えた。得られた溶液を30分間攪拌した。ついで、NEt₃(3リットル、21.5モル)を加えてトリエチルアミン塩酸塩の重いスラリーを生成した。反応混合物を室温に温め、水(1リットル)を加えてトリエチルアンモニウム塩(TEA塩)を溶解させた。ついで、反応混合物を丸底フラスコに移し、濃縮減量してジクロロメタン(DCM)およびNEt₃を除去した。EtOAc(12リットル)を加え、得られた水性層および有機層を分離した。有機層を水(各洗浄に2リットル)で3回洗浄し、ついで食塩水で洗浄した(2リットル)。ついで、有機相を無水Na₂SO₄で蒸発乾燥させて__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル(式D)のわずかに黄色の固体を得た。収率は約104%であった。

【0133】

実施例23

-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル(式D)の3-ヒドロキシ__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル(式I)へのヒドロキシル化

エーレンマイヤーフラスコに95~98%H₂SO₄(495ml)を充填し、氷浴で8 に冷却した。ついで、HNO₃(30mlの水に50mlの70%HNO₃を加えることによって調製した50%を47.5ml)をフラスコに加え、混合物を再び氷浴で8 に冷却した。28 未満の温度を保持すべく、固形の__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル(式D)(100g、0.45モル)を約30~60分かけて少しずつ混合物に加えた。氷浴で冷却しながら、反応混合物を攪拌した。反応の進行を薄層クロマトグラフィー(TLC)かまたは高速液体クロマトグ

10

20

30

40

50

ラフィー（HPLC）のいずれかでモニターした。TLCについては、シリカゲルを用い、溶媒はEtOAc/MeOH/ヘキサン（9/1/10）；KMnO₄であった。HPLCについては、4.6×50mm、C18、3ミクロン、120オングストロームカラムを、10%アセトニトリル/H₂Oから100%アセトニトリルへの7分間での線状勾配、および2.5ml/分の流速で用いた。モニター波長は220nmであった。反応が完了したら（約1時間）、冷水（1.5リットル）およびEtOAc（500ml）を加えて反応を停止させた。さらなる水およびEtOAc（各500ml）を加えて水性層と有機層との分離を助けた。ついで、水性層を3アリコート（各500ml）のEtOAcで抽出した。有機層をコンバインし、ついで減圧下で濃縮して3-ヒドロキシ-___-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル（式I）を含む130gの黄色の油状物を得た。

【0134】

10

実施例 2 4

3-ヒドロキシ-___-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式II）への3-ヒドロキシ-___-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸メチルエステル（式I）の加水分解

実施例 2 3 の黄色の油状物をテトラヒドロフラン（300ml）に溶解し、氷浴で5℃に冷却した。温度を30℃に保持しながら、1リットルの1N水酸化ナトリウムを溶液にゆっくりと加えてpHを約7に調節した。ついで、さらに500mlの1N NaOHを加えてpHを約14に調節した。ついで、氷浴で冷却しながら反応混合物を攪拌し、反応の進行を実施例 2 3 に記載のようにTLCまたはHPLCによりモニターした。約30分後に反応が完了したら、EtOAc（500ml）を加え、水性層と有機層とを分離した。水性層をさらに500mlのEtOAcで洗浄した。水性層を濃HClで酸性にした。溶液がpH7に達したときにEtOAc（500ml）を加え、ついでpHが0.7に達するまでさらに濃HClを加えた。添加した濃HClの全量は150mlであった。ついで、水性層をEtOAc（4×400ml）で抽出し、コンバインした有機層を400mlの水、ついで400mlの食塩水で洗浄した。ついで、洗浄した有機層をMgSO₄で乾燥させ、濃縮した。収量は薄黄色の固体が88gであった。この固体を100mlのEtOAcおよび300mlのヘプタンに30分間攪拌しながら溶解し、ついで濾過および空気乾燥すると85gの褐色の固体（85%；3-ヒドロキシ-___-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式II））が得られた。

20

【0135】

実施例 2 5

アダマンタン-1-イル-ジクロロ-酢酸メチルエステル（式VII）の調製

30

2-リットル容フラスコ（メカニカルスターラー、温度計、冷却器、圧均等化添加漏斗およびアルゴン導入口を備えている）に亜鉛末（78.0g、1.19モル）を入れ、ついで無水テトラヒドロフラン（400ml）を加えた。この混合物に1,2-ジブプロモエタン（2ml）を加えて亜鉛を活性化した。得られた混合物を穏やかな還流にて25分間加熱した。-55℃に冷却した後、反応温度を-55～-60℃に保持する速度にて（1時間必要）トリクロロ酢酸メチル（100.3g、0.565モル）およびクロロトリメチルシラン（80ml、0.648モル）の溶液を加えた。添加完了後、混合物を室温にて約90分攪拌した。得られた混合物をヘプタン（700ml）で希釈し、窒素雰囲気下、Celite 545パッドで濾過した。濾過ケーキをさらなるヘプタン（1×300ml、3×200ml）で洗浄した。ついで、濾液をロータリーエバポレーター（22～27℃の水浴で約10～15mmHg）上、減圧下で濃縮して粗製の（2,2-ジクロロ-1-メトキシ-ビニルオキシ）-トリメチルシランを濃厚な油状物（129.2g）として得た。定量的プロトンNMRは、この粗製物質が0.389モル（68.8%）の（2,2-ジクロロ-1-メトキシ-ビニルオキシ）-トリメチルシランを含むことを示した。

40

【0136】

アルゴン導入口を備えた1リットルフラスコに、粗製の（2,2-ジクロロ-1-メトキシ-ビニルオキシ）-トリメチルシラン（129.1g、約0.389モル）および無水ジクロロメタン（100ml）を入れた。得られた溶液に1-ブプロモアダマンタン（75.2g、0.349モル）および無水塩化亜鉛（6.56g、48ミリモル）を加えた。得られた混合物を室温で一夜攪拌した。得られた赤-褐色の混合物をヘプタン（600ml）および水（300ml）で希釈した。有機層を分離し、水（2×100ml）、1N重炭酸ナトリウム（3×150ml）、および水（2×200ml）で洗浄した。

50

得られた溶液をCelite 545のパッドで濾過し、濾液を減圧下で濃縮して無色の固体を得た。この物質を沸騰したメタノール(250ml)に溶解した。得られた溶液を1時間、室温に冷却した。約5 に2時間冷却した後、固体を濾過により回収し、冷メタノール：水(94：6；4×50ml)で洗浄してアダマンタン-1-イル-ジクロロ-酢酸メチルエステル(式VII)を無色固体として得た：75.0g(1-ブromoアダマンタンに基づいて77.3%)；mp 76.3。

【0137】

元素分析値： $C_{13}H_{18}Cl_2O_2$ ：

計算値：C, 56.33；H, 6.55；Cl, 25.58%

実測値：C, 56.49；H, 6.59；Cl, 25.72%

1H NMR (500.16MHz、 $CDCl_3$) 3.855 (s, 3H), 2.069 (br s, 3H), 1.866 (d, J=2.75 Hz, 6H), 1.683, 1.612 (AB q, J=12.1 Hz) ppm

^{13}C NMR (127.78 MHz、 $CDCl_3$) 166.130, 95.805, 53.969, 43.980, 36.842, 36.256, 28.309 ppm

【0138】

実施例 26

ジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸メチルエステル(式VIII)の調製

10N HNO_3 の調製：100mL容の容積測定フラスコに濃 HNO_3 (88.25g、~62.58mL、~1.0モル)を入れ、氷浴で冷却した。水(35mL)を加えた。混合の熱が分散した後、溶液を室温に温めた。ついで、フラスコに水をマークのところまで満たして10N HNO_3 を得た。

【0139】

250mL容の熱電対温度計を備えた三つ首フラスコに、濃 H_2SO_4 (103g、~56mL)を入れた。氷浴で0.4 に冷却した後、10N HNO_3 (5.68mL、56.8ミリモル)を~30分かけて加えた。この酸混合物の温度が~1.0 に下がったら氷浴を除いた。式VIIのアダマンタン-1-イル-ジクロロ-酢酸メチルエステル(15.0g、54.11ミリモル；乳鉢/乳棒で軽く砕いて大きな塊/結晶を破碎)を少しずつ(10分毎に1.25g；1時間50分の添加時間)加えた。~5時間後、反応混合物は透明で薄黄色の溶液であった。

【0140】

~24時間攪拌後、反応混合物は非常に薄い黄色の溶液であった。メカニカルスターラーおよび熱電対温度計を備えた四つ首フラスコ(1L)に、水(250mL)および尿素(8.0g、0.133モル、 HNO_3 に対して~2.34当量)を入れた。得られた溶液に酢酸エチル(230mL)を加えた。得られた2相混合物を氷浴で~1.0 に冷却した。上記の反応混合物を冷却したEtOAc/水/尿素混合物に~15分かけて加えた。さらに酢酸エチルおよび水(各~50mL)を用いて移すのを完了した。~45分間攪拌した後、氷浴を除き、混合物を攪拌して温めた。4.5時間後に(反応停止の開始から)、得られた混合物をさらなる酢酸エチル(~100mL)を用いて分別漏斗(1L)に移し、移すのを完了した。水性画分を除き、酢酸エチル(1×80mL)で抽出した。有機画分をコンバインし、水(2×90mL)、1N $NaHCO_3$ (4×90mL)、および食塩水で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥した後、溶媒を減圧下で除去して式VIIIのジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸メチルエステルを無色に近い固体として得た：15.67g(98.7%粗製収率)。この粗製の物質は、精製することなく式IXのジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸を調製するのに用いることができる。しかしながら、所望なら、この粗製の物質(15.65g)をメタノール(102mL)および水(85mL)から再結晶して綿毛状の固体(mp 114.8-115.0)を91%の収率で得ることができる。

【0141】

元素分析値： $C_{13}H_{18}Cl_2O_3$ ：

計算値：C, 53.25；H, 6.18；Cl, 24.18%

実測値：C, 53.24；H, 6.24；Cl, 24.31%

1H NMR (500.16MHz、 $CDCl_3$) 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, 4H), 1.529 (m, 3H) ppm

^{13}C NMR (127.78 MHz、 $CDCl_3$) 165.929, 94.281, 68.932, 54.150, 44.478, 44.529, 44

.020, 35.750, 34.759, 30.149 ppm

Lab HPLC:

YMC ODS-A S3 120オングストローム (4.6 × 50mm), =200nm, 2.5ml/分

溶媒: A = 水中の0.2% H_3PO_4

B = 水中の90% CH_3CN

【 0 1 4 2 】

勾配: 20% A から100% B へ10分かけて

保持時間	面積%	同定
2.06分	1.19	未知
4.54分	98.16	ジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸メチル エステル
5.09分	0.65	未知
8.35分		アダマンタン-1-イル-ジクロロ-酢酸メチルエステル

10

【 0 1 4 3 】

実施例 2 7

ジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸 (式 I X) の調製

500ml 容丸底フラスコにメタノール (200ml) および1N NaOH (194ml、194ミリモル、ジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸メチルエステル (式 VIII) の投入量に対して約1.36当量) を入れた。その結果得られた溶液を温度が<9 になるまで氷浴で冷却した。冷浴を除き、ジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸メチルエステル (式 VIII) (41.68g、142.1ミリモル) を加えた。その結果得られた懸濁液をアルゴン下、周囲温度にて攪拌した。さらに6時間攪拌した後、さらなるメタノール (10ml) を用いて容器壁を濯いだ。約17時間攪拌した後、反応混合物を濾過して少量の粒状物質を除去した。その結果得られた溶液をメカニカルスターラーを備えた2-リットル容の三つ首フラスコに移した。水 (900ml) を用いて反応混合物を希釈し、移すのを完了させた。その結果得られた溶液を濃HCl (38ml、約456ミリモル) を加えて酸性にした。白色の固体が速やかに生成した。混合物を約20分間穏やかに攪拌し、ついで氷浴に置いた。約90分間穏やかに攪拌した後、スターラーを停止し、混合物をさらに2時間氷浴に静置した。その結果得られた懸濁液を濾過し、濾過ケーキを氷冷水で洗浄した。濾過ケーキから空気を引くことにより固形分から水の大部分を除去した。ついで、この物質を真空下、周囲温度で22時間乾燥させてジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸 (式 I X) を無色粉末の固体として得た: 39.19g (98.7%収率); mp238 (分解)

20

30

【 0 1 4 4 】

元素分析値: $C_{12}H_{16}Cl_2O_3$:

計算値: C, 51.63; H, 5.77; Cl, 25.40%

実測値: C, 51.43; H, 5.74; Cl, 25.48%

Lab HPLC:

YMC ODS-A S3 120オングストローム (4.6 × 50mm), 200nm, 2.5ml/分

溶媒: A = 水中の0.2% H_3PO_4

B = 水中の90% CH_3CN

40

【 0 1 4 5 】

勾配: 20% A から100% B へ10分かけて

保持時間	面積%	同定
0.53分	0.95	未知
2.65分	97.27	ジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸
4.54分		ジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸メチル エステル

【 0 1 4 6 】

1H NMR (500.16MHz, CD_3OD) 2.258 (br s, 2 H), 1.858 (s, 6 H), 1.674, 1.615 (br A B q, J=1.54 Hz, 4 H), 1.588-1.526 (m, 2 H) ppm

50

^{13}C NMR (125.77MHz, CD_3OD) 167.957, 96.356, 69.322, 48.070, 45.360, 44.794, 37.050, 36.039, 31.631 ppm

【 0 1 4 7 】

実施例 2 8

3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式 I I) の調製

500ml 容の三つ首フラスコにジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸 (式 I X) (38.67g、138.5ミリモル) を入れた。この物質に水 (160ml) および 1N NaOH (138 ml、138ミリモル; 固体の NaHCO_3 を用いたときに生じることがあるフォーミングを避けるため、1N NaOH を用いてジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸のナトリウム塩を生成させた) を加えて濁った溶液を得た。この溶液に固体の NaHCO_3 (29.10g、346ミリモル、2.50当量) を加えた。 NaHCO_3 を添加後、反応混合物はジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸のナトリウム塩が溶液から生成するにつれて懸濁液となった。反応容器を還流冷却器/アルゴン導入に適合させ、約 80 °C に加熱した。約 6 時間加熱した後、混合物を室温に冷却した。反応混合物 (pH 7.22) に濃 HCl (32ml が必要) を加えることにより注意深く (CO_2 の発生) pH 0.15 の酸性にした。得られた混合物を酢酸エチル (4 × 300ml) で抽出した。酢酸エチルで抽出後の水性層 (pH 0.37) に濃 HCl (約 2ml) を加えることにより pH 0.18 まで pH を下げた。酢酸エチル画分をコンバインし、食塩水 (100ml) で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下で除去して 3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式 I I) を無色の顆粒状固体として得た: 30.77g (99%)。

10

20

【 0 1 4 8 】

元素分析値: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$:

計算値: C, 64.27; H, 7.19%

実測値: C, 64.30; H, 7.13%

^1H NMR (500.16MHz, D_2O) 2.288 (br s, 1.33 H), 2.227 (br s, 0.67 H), 1.819-1.575 (m, 12 H) ppm - 部分的に水和

^{13}C NMR (125.77MHz, D_2O) 207.704, 174.583, 169.608, 98.109, 69.618, 68.830, 47.538, 43.716, 43.251, 43.190, 42.907, 42.563, 36.073, 34.677, 34.232, 30.006, 29.865 ppm - 部分的に水和

Lab HPLC:

YMC ODS-A S3 120 オングストローム (4.6 × 50mm), $\lambda = 200\text{nm}$, 2.5ml / 分

30

【 0 1 4 9 】

溶媒: A = 水中の 0.2% H_3PO_4

B = 水中の 90% CH_3CN

勾配: 10% A から 60% B へ 10 分かけて

保持時間 面積% 同定

1.39分 100% 3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸

4.95分 ジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸

【 0 1 5 0 】

実施例 2 8 A

1 ポット手順を用いた 3-ヒドロキシ-__-オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式 I I) の調製

圧均等化添加漏斗およびアルゴン導入口を備えた 250-mL 容三つ首フラスコに、実施例 2 6 に記載の方法により調製したジクロロ-(3-ヒドロキシ-アダマンタン-1-イル)-酢酸メチルエステル (式 V III) (15g、51.16ミリモル) を入れ、ついでテトラヒドロフラン (30mL、不安定化) を加えた。数分攪拌した後、式 V III のメチルエステルの大部分は溶解して濁った溶液を生成した。この溶液に蒸留水 (30mL) を加えると、ゆるい (loose) 懸濁液が生成した。添加漏斗に 1N NaOH (69ml、69ミリモル、式 V III の化合物の投入量に対して ~1.35 当量) を入れた。NaOH を 70 分かけて滴下して加えてほぼ無色の溶液を得、これを周囲温度で攪拌した。

40

50

【 0 1 5 1 】

~16時間でのHPLC分析は、式VIIIの化合物の加水分解が完了したことを示した。この反応混合物はpHが13.24の透明な無色溶液であり、これに~6N HCl (2.8mL)を加えてpH7.40に調節した。固体のNaHCO₃ (11.2g、0.133モル、2.60当量)を加えて懸濁液を生成した。

【 0 1 5 2 】

4時間15分加熱した後のHPLC分析は、反応が完了したことを示す。5時間加熱した後、熱源を除き、反応混合物(透明で無色な溶液)を冷却した。室温に冷却した後、反応混合物を冷蔵庫(+4)で4日間貯蔵した。

【 0 1 5 3 】

冷所で4日間貯蔵した後、反応混合物は依然として透明で無色な溶液であり、HPLC分析は貯蔵による変化を殆ど(もしあったとしても)示さない。室温に温めた後、混合物(pH 7.77)に濃HCl(11mL必要、CO₂発生;pH~1.40にて無色の固体が沈殿し始めた)を注意深く加えてpH0.20の酸性にした。その結果得られた懸濁液をEtOAc(x4、全量~500mL;各EtOAc抽出後に水性画分についてHPLC分析を行った)で抽出した。1回目のEtOAc抽出後の水性層(pH0.38)に濃HCl(~1.6mL必要)を加えてpH0.18に調節した。2回目のEtOAc抽出後の水性層(pH0.37)に濃HCl(~0.8mL必要)を加えてpH0.17に調節した。水性層は、残りのEtOAc抽出(抽出#3、pH0.19;抽出#4、pH0.19)の後にさらなるpHは必要なかった。有機画分をコンバインした。乾燥(MgSO₄)後、溶媒を減圧下で除去して粗製の表題の式IIの化合物を無色に近い顆粒状の固体として得、これを真空(ポンプ)下で16時間乾燥させた:11.42g(99.53%収率);HPLC,100%(面積%)。

【 0 1 5 4 】

元素分析値:C₁₂H₁₆C₁₂O₃ [55465-020-31, TR46373]

計算値:C,64.27%;H,7.19%

実測値:C,64.19%;H,7.09%

【 0 1 5 5 】

粗製の式IIの化合物(5.0g)を蒸留水(19mL)中で~85に加熱しながら溶解し、ついで熱源から取り出し、冷却した。この物質は~53で結晶化し始めた。室温で~2時間静置した後、固形分を濾過により回収し、氷冷水で洗浄した。濾過ケーキに窒素を引くことにより水の大部分を除去した。この物質を真空下(ポンプ)で乾燥させて表題の式IIの化合物を大きな無色針状晶として得た:4.33g(86.6%収率);mp164.5~165.6(Mettler FP800システムにて);HPLC,100%(面積%)。

【 0 1 5 6 】

元素分析値:C₁₂H₁₆C₁₂O₃ [55465-023-15, TR46905]

計算値:C,64.27%;H,7.19%

実測値:C,64.42%;H,7.04%

【 0 1 5 7 】

実施例 2 9L-ピログルタミン酸エチルエステル(式F)を生成するL-ピログルタミン酸(式E)のエステル化

反応容器にエタノール(49.0リットル)を入れ、-5に冷却した。ついで、混合物の温度が0を超えないような仕方で反応容器に塩化チオニル(4.97kg)を入れた。塩化チオニルの添加完了後、混合物を再び-5に冷却し、添加の温度が0と-5との間に保持されるようにL-ピログルタミン酸(式E)を少しずつ加えた。酸添加後、反応混合物を20~25に加熱し、5時間攪拌した。ついで、反応混合物を最初の容量の約15%まで真空下(Tmax 45)で蒸発させた。ついで、残留する油状物をトルエン(49リットル)に溶解した。ついで、トルエン溶液を約10に冷却し、最大温度が20~25となるようにトリエチルアミン(8.45kg)をゆっくりと加えた。得られた懸濁液を30分間攪拌し、ついで濾過した。濾過ケーキをトルエン(約5リットル)で洗浄した。濾液を50、真空下で全量約10リットルまで減らした。シクロヘキサン(8リットル)を50でゆっくりと加え、その後に

10

20

30

40

50

約30 に冷却することによって結晶化を開始した。種晶生成後、混合物を20~25 に冷却し、シクロヘキサンの第二の8リットルを入れた。ついで、混合物を6~8 に冷却し、1時間攪拌し、生成した結晶を濾去した。この結晶をシクロヘキサン(各4リットル)で2回洗浄した。収量は、無色針状晶としての4.89kg(82%)のL-ピログルタミン酸エチルエステル(式F)であった。

【0158】

実施例30

L-ピログルタミン酸エチルエステル(式F)のBOC-保護

L-ピログルタミン酸エチルエステル(式F)(5.00kg)を室温にてトルエン(24.97リットル)に溶解した。ついで、この溶液に4-ジメチルアミノピリジン(0.19kg)を加えた。ついで、反応混合物に、反応混合物の温度が25 を超えないような仕方でトルエン(24.97リットル)に溶解した無水BOC(7.29kg)の溶液を入れた。完全に添加した後、反応混合物を25 で3時間攪拌した。ついで、反応混合物に半飽和NaHCO₃溶液(49.94リットル)を入れ、10分間激しく攪拌し、その後有機相と水性相とを分離した。分離した有機層を水(24.97リットル)で2回洗浄した。ついで、有機層を真空下、最高50 にて溶媒から蒸発させた。残留する無色からわずかに黄色がかった油状物は静置すると結晶化した。理論的収量は、8.18kg(31.81モル)の(5S)-2-オキソピロリジン-1,5-ジカルボン酸,1-(1,1-ジメチルエチル),5-エチルエステル(式G)であった。

【0159】

実施例31

SuperHydride還元および脱離

(5S)-2-オキソピロリジン-1,5-ジカルボン酸,1-(1,1-ジメチルエチル),5-エチルエステル(式G)(4.80kg)をトルエン(30.97リットル;Kfmax 0.01%水)に溶解し、-50 に冷却した。この溶液に反応温度が-45 を超えないようにしてSuperHydride(LiEt₃BH:THF中に1M;19.96リットル)を入れた。添加完了後、混合物を-45~-50 で30分間攪拌した。ついで、温度が-45 を超えないようにして反応混合物にN-エチルジイソプロピルアミン(DIPEA;14.47リットル)を加えた。ジメチルアミノピリジン(0.030kg)を固体として混合物に加えた。ついで、反応温度が-45 を超えないようにして反応混合物に無水トリフルオロ酢酸(TFAA)(4.70kg)を加えた。添加完了後、反応混合物を20~25 に1時間温め、この温度でさらに2時間保持した。ついで、反応混合物を0 に冷却し、反応温度が5 を超えないようにしてゆっくりと水(48.00リットル)を入れた。ついで、水性相と有機相を分離し、有機相を再び48リットルの水(0~5)で洗浄した。ついで、有機層を蒸発させ、40 で脱気した。黄色がかった油状物が4.5kg(18.66モル、100%)の4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸,1-(1-ジメチルエチル),5-エチルエステル(BOC-DHPEE)(式III)の収量で得られた。

【0160】

実施例32

BOC-DHPEE(式III)の加水分解

4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸,1-(1-ジメチルエチル),5-エチルエステル(BOC-DHPEE)(式III)(6.00kg)およびエタノール(24.00リットル)から調製した溶液を0~5 に冷却し、この温度で水(20.87リットル)中の水酸化リチウム水和物(2.09kg)の溶液でゆっくりと処理して濁った溶液を生成した。ついで、この濁った溶液を20~25 に温め、この温度で2時間攪拌した。ついで、反応混合物を最高温度40 、真空下で約10.5リットルまで蒸発させ、水(24.00リットル)およびt-ブチルメチルエーテル(TBMEまたはMTBE、24リットル)を入れ、10分間混合した。得られた有機相と水性相を分離し、水性相に再び24リットルのTBMEを入れた。ついで、この混合物を5~10 に冷却し、激しく攪拌しながらH₃PO₄ 85%-水(1:4)を用いてpHを2.3~2.3に調節した。このプロセスの間、安定のために温度を5~10 に保持した。得られた有機層と水性層を分離した。有機層を貯蔵し、水性層を再び前もって5~10 に冷却した24リットルのTBMEで抽出した。得られた有機層を貯蔵していた有機層とコンバインし、ジイソプロピルエチルアミン(

DIPEA) (4.82kg) を入れた。ついで、溶液を蒸発させ、最高温度30℃、真空下で脱気した。収量は7.84kg (22.88モル、92%) [N-BOCデヒドロプロリン*DIPEA (BOC-DHP)] であった。

【0161】

実施例 3 3

BOC-DHPのアミド生成

実施例 3 2 に記載の酸化によって合成したBOC-DHPは水を含んでいてよい。それゆえ、反応を行う前にトルエンとの共沸蒸留を適用した。しかしながら、試薬が過剰なため、原料の計算は水を除去する前のBOC-DHPの量に基づいた。共沸蒸留では、BOC-DHPをトルエンとともに約30%溶液まで希釈した。トルエンを真空下、40℃で除いた。ついで、処理したBOC-DHP (6.00kg) をTHF (48.0リットル) に溶解した。この溶液にDIPEA (2.26kg) を入れ、反応混合物を-20~-25℃に冷却した。ついで、塩化メシル (3.01kg) をゆっくりと加えた。この添加の間に塩酸DIPEAが沈殿した。ついで、得られた懸濁液を-20℃で2時間攪拌し、ついで表面下の気体導入口によりアンモニアで飽和させた。アンモニアを添加する間、反応液を0℃に加熱した。飽和後、反応混合物を20℃に加熱し、3時間攪拌した。攪拌後、反応混合物を濾過して塩酸塩を除去した。濾過ケーキを幾つかの部分のTHF (12リットル) で洗浄した。濾液を真空下、最高温度40℃で濃縮し、塩化メチレン (33.33リットル) に溶解した。この溶液を水 (26.66リットル) で洗浄した。得られた有機相と水性相を分離し、水性相を塩化メチレン (各20リットル) で2回抽出した。得られた有機層をコンバインし、真空濃縮および脱気して過剰のHunigs塩基を除去した。収量は3.35kg (15.77モル、90%) の(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステル (BOC-DHPA) (式IV) であった。

10

20

【0162】

実施例 3 4

(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステル (式IV) のシクロプロパン化

第一のリアクター (リアクター A) には塩化メチレン (18.0リットル) に溶解した (BOC-DHPA) (式IV) (4kg) を入れ、20℃に保持した。第二のリアクター (リアクター B) には塩化メチレン (18.00リットル) を入れ、-30℃に冷却した。ついで、リアクター B にジメトキシエタン (DME) (3.36kg)、ついでトルエン中のジエチル亜鉛 (15.36kg) の30%溶液を温度を-30~-25℃に保持しながら入れた。ついで、リアクター B にジヨードメタン (19.99kg) を反応温度を-30~-25℃に保持しながら入れた。ジヨードメタンの添加完了後、混合物を-30~-25℃で45分間攪拌した。ついで、この混合物を冷却パイプ (-20~-25℃) によりリアクター A に入れた。反応が完了するまでリアクター A の反応温度が22~24℃に保持されるように、入れるのは約5%の部分にてゆっくりと行った。反応完了後、リアクター A の混合物を5~10℃に冷却した。ついで、反応混合物に飽和重炭酸塩溶液 (21.6リットル) を反応温度が15℃を超えないようにしてゆっくりと入れた。この添加の後、反応混合物を少なくとも1時間攪拌すると、その間に沈殿が生成した。懸濁液を濾過した。得られた濾過ケーキを容器に戻し、塩化メチレン (14.4リットル) で30分間再スラリー化し、再度濾過した。この第二の濾過の後、濾過ケーキをさらなる塩化メチレン (7.2リットル) で洗浄した。ついで、濾液を有機相と水性相に分離し、有機相を半飽和食塩水 (21.6リットル) で洗浄した。ついで、溶媒を最高温度30℃にて真空除去し、ヘプタンと交換した。ヘプタン中の粗製の生成物のスラリーが得られた。溶媒交換後のこの懸濁液の最終容量は14.4リットルであった。粗製の生成物を濾過により単離した。濾過ケーキをヘプタン (2.9リットル) で洗浄し、ついで真空乾燥して一定の重量とした。粗収量は2.76kg (12.2モル、72%) (1S,3S,5S)-3-アミノカルボニル)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸1,1-ジメチルエチルエステル (式H) であった。精製するため、この粗製の物質を8倍量の酢酸ブチル/ヘプタンの1:1混合物中に20~22℃で4時間スラリー化した。この物質を濾過し、濾過ケーキを約1倍量のヘプタンで洗浄した。収量は2.11kg (9.33モル、55%) (1S,3S,5S)-3-アミノカルボニル)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン

30

40

50

酸1,1-ジメチルエチルエステル(式H)であった。

【0163】

実施例35

(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミド(式J)を生成する(1S,3S,5S)-3-アミノカルボニル)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式H)の脱保護

メカニカルスターラーおよび熱電対を備えた100ml容の2つ首フラスコに(1S,3S,5S)-3-アミノカルボニル)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式H)(5.0g、22.1ミリモル)およびTHF(20ml)を入れた。ついで、HCl(EtOAc中に2.5M、25ml、62.5ミリモル)を懸濁液に加えた。得られた溶液を室温にて18時間攪拌すると、その間に沈殿が観察された。反応の完了はHPLCによりモニターした。メチルトブチルエーテル(MTBE)(30ml)を懸濁液に加え、攪拌をさらに30分間続けた。ついで、懸濁液をN₂保護下に濾過して白色固体を得、これをMTBE(20ml)で洗浄した。この固体をオープン中、減圧下で48時間乾燥させて(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミドの塩酸塩(式J;3.6g、100%)を得た。

【0164】

実施例35A

(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステル(式IV)の他の製造法

A.4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)の変換

30mLの水、40mLのトルエンおよび10mLのMTBEの混合物中の10.4g(25.86ミリモル)の固体ジシクロヘキシルアミン(DCHA)塩の懸濁液に2.7mLの10N NaOH水溶液(27ミリモル)(過剰のNaOHは1.05当量またはそれ以下に限るべきである)を加えた。攪拌すると透明な層を有する二相混合物が得られ、すべての固体が溶解した相を分離した。4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)ナトリウム塩を含む有機相を4mLの水で抽出し、これを最初の水性相に加えた。HPLC定量は、水性相中に12.55%(w/w)の「遊離のオレフィン酸」含量すなわち96%の収率を与えた。

【0165】

B.DMT-MMの生成

室温の水浴に保持した70mLのEtOAc中の2-Cl-4,6-ジMeO-1,3,5-トリアゼン(CDMT)(6.2mg、35ミリモル;1.5当量)の溶液に4mL(36.38ミリモル)のN-メチルモルホリン(MM)をそのまま加えた。固体の4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロライド(DMT-MM)が沈殿し始めた。DMT-MMを含む懸濁液を室温で30分間攪拌すると、懸濁液は濃厚なペーストとなった。反応の間に温度は23 から28~29 に上昇した。ジ-MeO-Nモルホリノ-トリアゼン(DMMT)を生成する競合脱メチル反応を最小にするため、反応液の温度を低く保持した。

【0166】

C.4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)のナトリウム塩の(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)エステル(式IV)への変換

HPLC定量(V=25mL)により5g(23.5ミリモル)の遊離オレフィン酸に等価な工程Aのナトリウム塩の溶液に固体のNH₄Cl(3.75g、70ミリモル、3当量)を加えたところ、pHは14から8.9に下がった。この溶液に十分なNaH₂PO₄×H₂Oを加えてpHをpH=6.20に調節した。リン酸塩の量はDCHA塩をNa塩に変換するのに用いたNaOHの最初の過剰量によって変わってよいことに注意。ナトリウム塩の緩衝溶液は、上記工程Bで調製したDMT-MMへの懸濁液に処理した。

【0167】

二相混合物を室温で4時間攪拌すると、最初のエマルジョンは懸濁液となり、若干のDMHTが沈殿し始めた。HPLCにより反応は完了し、活性化DMT-エステルも酸もともにいずれの相にも認められなかった。

10

20

30

40

50

【0168】

当該反応条件下、DMT-MMとDMHTとの反応により12~15重量%の4,6-ジMeO-1,3,5-トリアゼンエーテル(DMT-エーテル)もまた生成する。懸濁液を濾過して4,6-ジMeO-1,3,5-トリアゼン(DMHT)を除去し、相を分離した。高純度の(rich)有機相を2N NaH₂PO₄ × H₂O水溶液(2 × 25mL)で、またはpH(水性) < 6まで(殆どのN-メチルモルホリンが有機相から除かれたことを意味する)洗浄した。相を分離し、高純度の有機相を25mLの食塩水で洗浄した。

【0169】

典型的に、表記化合物I Vの溶液収率は87~90%である；未反応の出発オレフィン1~0%。高純度の有機相を回転蒸発させ、新たなEtOAc(2 × 250mL)とともに共沸乾燥させた。この物質は部分的に結晶化した。混合物を8mLの熱EtOAcに溶解し、10mLのn-ヘプタンと混合した。固体が生成し始めた。懸濁液を50 で30分間攪拌し、さらに10mLのn-ヘプタンを加えた。加熱浴から取り出した後、懸濁液を室温にて30分間攪拌し、30分毎にさらに2回のヘプタン導入を行い、懸濁液を室温で一晩攪拌して結晶化を完了する。固体を濾過し、乾燥する。典型的な結晶化の収率は90%に近い；表記化合物I Vの効力は90%であり、DMT-エーテルが残りの10重量%を占める。

10

【0170】

生成した固体は表記化合物I VとDMT-エーテルとの真の共晶であり、DSCによるアミドの89.7 のmpに対して97.4 の単一のシャープなmpを与えた。この共晶形は結晶性が高く、溶液から容易に析出する。

20

【0171】

実施例35B4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)のジシクロヘキシルアミン塩の調製A. 4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)のナトリウム塩の調製

3容量のエタノールを4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)(約15wt%~25wt%)(1g/mL)のトルエン溶液に加えた。この溶液を0~5 に冷却した。温度を<5 に保持しながら(わずかに発熱反応)、この溶液にNaOH-水の5N溶液(2当量)をゆっくりと加えた。反応混合物を20~25 に温め、反応が完了するまで攪拌した。

30

【0172】

4容量の水を反応混合物に加え、反応混合物を真空下で蒸留して(浴温40)エタノールを除去した。残渣に0.5容量のトルエン(0.865g/mL)を加え、混合物を10分間攪拌した。水性層と有機層が生成した。ナトリウム塩を含む水性層を分離し、工程Bに用いた。

【0173】

B. 4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)のジシクロヘキシルアミン塩の調製

4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸1-(1,1-ジメチルエチル)のナトリウム塩の水溶液に1容量のMTBE(0.74g/mL)を加えた。この溶液に0.2容量のヘプタン(0.684g/mL)を加え、得られた溶液を0~5 に冷却した。温度を<5 に保持しながら(わずかに発熱反応)、この溶液に85%H₃PO₄(1g/mL)をゆっくりと加えてpHを~2.5-3とした。得られた層を分離し、生成物を含む有機層に1容量の75%食塩水を加えた。混合物を10分間攪拌し、得られた層を分離した。生成物は有機層に含まれていた。

40

【0174】

有機層を0~5 に冷却し、温度を<10 に保持しながらジシクロヘキシルアミン(0.91g/mL)をゆっくりと加えた。反応混合物を0~5 で3時間攪拌した。固形分を濾去し、0.5容量の1:1 MTBE/ヘプタンで洗浄した。得られたDCHA塩(1g/mL)を乾燥し、回収した。

【0175】

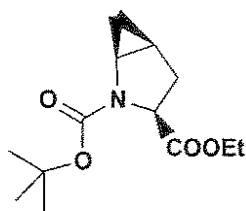
実施例35C(1S,3S,5S)-3-(アミノカルボニル)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸,1,1-

50

ジメチルエチル,エチルエステル(式H)(シン-N-BOC-4,5-メタノプロリンとも称する)
 の他の製造方法

A. (s)-BOC-4,5-メタノプロリンエチルエステルの調製

【化43】



10

【0176】

炎乾燥した三つ首フラスコ(マグネチックスターラー)に2.2gの4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸,1-(1,1-ジメチルエチル),5-エチルエステル(2.20g、9.12ミリモル、1当量)および22mlの乾燥トルエンを入れた。得られた溶液を-30 に冷却し、さらに16.58ml(18.24ミリモル)のジエチル亜鉛(トルエン中の1.1m溶液)を滴下して入れた。

【0177】

反応温度を-25 ~ -30 に保持しながら、2.2mlのトルエン中の2.66ml(6.43g、36.47ミリモル)のクロロヨードメタンの溶液を滴下して加えた。反応液を-20 に16時間保持した。ついで、22mlの半飽和重炭酸塩溶液で反応停止させ、室温に温めた。白色の沈殿が生成し、これをHyflow(濾過補助具)で濾去し、トルエン(約10ml)で洗浄した。有機層を二相濾液から分離し、水(各11ml)で2回洗浄した。有機層を蒸発乾固して黄色がかった油状物(2.33g)を得たが、これはN-BOC-メタノプロリンエチルエステル(シン-異性体とアンチ-異性体との混合物(8:1))であった。

20

【0178】

上記手順を用いて次の工程に使用するのに十分な大量の異性体の上記混合物を製造した。20~25 で、3.40kgのN-BOC-メタノプロリンエチルエステル(シン-異性体とアンチ-異性体との混合物)を5.17kg(66.59g/mol)の40.0%メチルアミン(水中の溶液)とともに窒素雰囲気下で激しく攪拌した。

【0179】

反応完了後、混合物を5.17 lの水および5.17 lのMTBEで希釈し、相分離が生じる前にさらに5分間攪拌した。有機層を5.17 lの水で洗浄した。得られた有機層を蒸発させて(真空、Tmax 40)一定重量とした。

30

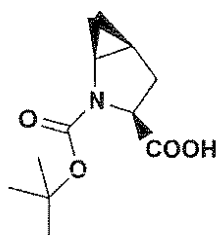
【0180】

2.52kgのシン-N-Boc-4,5-メタノプロリンエチルエステル(9.85モル、74%)の収量が得られた。

【0181】

B. s-Boc-4,5-メタノプロリンの調製

【化44】



40

【0182】

10.28 lのエタノール中の2.57kgのシン-N-Boc-4,5-メタノプロリンエチルエステル(s-BOC-MPEE)の溶液を調製する。この溶液に、20~28 にて5.07 lの水中の0.51kgの水酸化

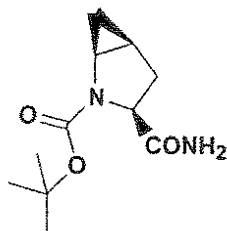
50

リチウム水和物からなる溶液を加える。反応を不活性ガス保護下（窒素）で行った。反応混合物を20～25（IPC）で14時間攪拌する。反応完了後、混合物を40（真空）で蒸発させた。得られた油状物を25.70 lの水および25.70 lのMTBEに取り、30分間攪拌した。有機相を分離し、水性層を12.85 lのMTBEで再び抽出する。水性相に25.70 lのMTBEを加え、混合物のpHを1N HCl（約12 l）を加えてpH2に調節する。有機層を分離し、水性相を12.85 lのMTBEで再抽出する。上記工程からのコンバインした有機層を蒸発乾固して1.88kgのシン-N-Boc-4,5-メタノプロリン（8.25モル%、82%）。

【0183】

C . (1S,3S,5S)-3-(アミノカルボニル)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸,1,1-ジメチルエチルエステルの調製

【化45】



【0184】

2.00kgのシン-N-Boc-4,5-メタノプロリンを40.00 lのTHFに溶解し、-15 に冷却する。この溶液に1.07kgのN-メチルモルホリン（P0）を加える。反応混合物に反応温度が-8 を超えないようにして1.32kgのクロロギ酸イソブチルを入れる。添加完了後、混合物を-10（P1、IPC 1）で30分間攪拌する。N-メチルモルホリン塩酸塩が反応混合物から沈殿する。

【0185】

反応混合物を-5 に温め、気体導入管によりアンモニア（0.79kg、理論値、5.00当量）をパージする。ついで、反応混合物を20～25 に温め、この温度で4時間（P2、IPC 2）攪拌する。反応混合物に40.00 lの飽和食塩水を加える。ついで、飽和重硫酸カリウム溶液を加えて混合物のpHをpH4～4.5に調節する。ついで、有機層を分離し、水性相を20.00 lのMTBEで再び抽出する。コンバインした有機層を蒸発乾固する。粗製の生成物を還流温度で8.00 lの酢酸ブチルに溶解する。生成物は約30 で沈殿する。結晶化が始まったら混合物を20.00 lのヘプタンでゆっくりと処理し、さらに2時間攪拌する。生成物を濾過により単離する。濾過ケーキを冷酢酸ブチル/ヘプタン（1：4）で2回に分けて洗浄し（各1.6 l）、各2.00 lのヘプタンで2回洗浄し、30～35（真空）で乾燥させて1.64kg（7.22モル、82%）のシン-N-Boc-4,5-メタノプロリンアミド（s-Boc-MPA）を得る。

【0186】

実施例 3 6

(S)- -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式 V）のBoc保護による(S)- [[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（VI）の調製

式 VI の酸

(S)- -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸（式 V）（469g、2.08ミリモル）を、温度プローブおよびpHプローブを備えた相分離器中、氷冷1N NaOH（5リットル、5モル、2.4当量）に溶解した。THF（2.5リットル）を溶液に加えた。ついで、固体のBoc20を加え、反応混合物を周囲温度で約1時間攪拌した。ついで、EtOAc（4リットル）を攪拌しながら加え、得られた有機層と水性層とを分離した。水性層のpHを濃HClで7に調節した。ついで、EtOAc（4リットル）を加え、さらなるHClを加えてpHを約1に下げた。添加した濃HClの全量は510mlであった。有機層と水性層とを再び分離し、水性層をEtOAc（3×3リットル）で抽出した。ついで、有機層をコンバインし、水（3リットル）および食塩水（3リットル）で洗浄した。ついで、洗浄した有機層をNa₂SO₄で乾燥し、回転

10

20

30

40

50

蒸発で室温にて濃縮乾固した。収量は542gの(S)-[[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (V I)であった。

【 0 1 8 7 】

実施例 3 7

3-アミノカルボニル-(S)--(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)--オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステル (式 K)を生成するカップリング反応

温度計、メカニカルスターラーおよび気体導入口を備えた2L容の三つ首フラスコに、(S)-[[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式 V I) (50g、153.8ミリモル)を入れた。THF (200ml)を加え、
 10 攪拌して透明な溶液を得た。この溶液をアセトン-ドライアイス-水浴で-6 に冷却した。ついで、メタンスルホニルクロライド (Mes-Cl) (13.1ml、169ミリモル、1.1当量)を一度に加え、ついでジイソプロピルエチルアミン (94ml、539ミリモル、1.1当量)を加えた。このジイソプロピルエチルアミンは約4分かけてゆっくりと加えて内部温度を8 未満に保持した。すべての酸が混合無水物に変換するまで、反応混合物を0 で攪拌した。ついで、(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミド塩酸塩 (32.5g、200ミリモル、1.1当量)およびヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) (1.04g、7.6ミリモル、0.05当量)を一度に加え、フラスコを冷浴から取り出した。反応混合物を室温で2時間攪拌し、ついで室温で一夜静置した。

【 0 1 8 8 】

実施例 3 8

(S)--アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸 (式 V)のBOC保護による(S)-[[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン塩 (式 V I A)の調製式 V I A (DABCO 塩)

1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン (DABCO) (15g ; 125.1ミリモル)を、300mlの酢酸イソプロピル中の約30g (135ミリモル)の実施例 3 6 の式 V I の酸の溶液に入れた。上記反応混合物に酢酸エチル (150mL)を入れた (酢酸エチル : 酢酸イソプロピルの容量比 (150mL/300mL))。反応混合物に式 V I A のDABCO塩 (200mg)を種晶として入れた。反応混合物を室温で激しく攪拌した。水 (5mL)を反応混合物にゆっくりと入れ、反応混合物を
 30 室温で激しく攪拌して15~20分後に結晶生成を引き起こした。反応混合物を室温で16時間攪拌し、反応生成物をプフナー漏斗で濾過した。固形分を室温にて酢酸エチルで洗浄し、50 で真空乾燥させて47g (79%)の式 V I A のDABCO塩を得た。

【 0 1 8 9 】

実施例 3 9

3-アミノカルボニル-(S)--(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)--オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステル (式 K)を生成するカップリング反応

温度計、メカニカルスターラーおよび気体導入口を備えた250L容の三つ首フラスコに、(S)-[[[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン塩 (式 V I A) (5g、11.44ミリモル)を入れた。THF (25ml)を加え、攪拌してスラリーを得た。このスラリーを氷-水浴で0 に冷却した。ついで、メタンスルホニルクロライド (Mes-Cl) (1.15ml、14.85ミリモル、1.3当量)を一度に加え、ついでジイソプロピルエチルアミン (94ml、40ミリモル、3.5当量)を加えた。このジイソプロピルエチルアミンは約4分かけてゆっくりと加えて内部温度を5 未満に保持した。すべての酸が混合無水物に変換するまで、反応混合物を0
 40 で10分間攪拌した。ついで、(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミド塩酸塩 (2.42g、14.9ミリモル、1.3当量)およびヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) (77mg、0.57ミリモル、0.05当量)を一度に加え、フラスコを冷浴から取り出した。反応混合物を室温で2時間攪拌し、ついで室温で一夜静置した。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 0 】

実施例 4 0

3-シアノ-(S)- (3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)- オキシ-(1S, 3S,5S)-2-アザピシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式L)を生成する脱水および加水分解

実施例 3 9 の反応混合物にピリジン(6当量、922ミリモル、74.6ml)を加え、反応混合物を冷浴で-8 に冷却した。ついで、温度を10 未満に保持しながら、無水トリフルオロ酢酸(TFAA)(4当量、616ミリモル、87ml)を6分かけてゆっくりと加えた。反応液を24 で0.5時間攪拌し、HPLC(30ml、0.5ml AcN、0.5ml H₂O)で実施例 3 7 の化合物(K)の消失についてチェックした。

【 0 1 9 1 】

ついで、反応液を冷浴で約-3 に冷却した、温度を10 未満に保持しながら、NaOH(5N、6当量、0.925モル、185ml)を反応液に10分かけて加えた(水性pH=9.9)。水性のK₂CO₃(319g、15当量、510mlのH₂Oに溶解)を5分かけて加えた(温度=8 、水性pH11.1)。反応液を7時間40分処理した。HPLC(30 μ l、0.5ml AcN、0.5ml H₂O)によって決定されるようにすべての中間体が後ろから 2 番目に加水分解されたときに反応は完了した。

【 0 1 9 2 】

ついでEtOAc(500ml)を反応混合物に加え、得られた水性層と有機層とを分離した。有機層を500mlの緩衝溶液(2M H₃PO₄、1M NaH₂PO₄)洗浄した。温度は15 から23 に上昇した；添加時間：5分、水性V=560ml、pH=4.5、HPLCにより32mgの生成物；有機V=1,080ml。有機層を第二の500ml緩衝溶液で洗浄した；水性V=780ml、pH=2.5、HPLCにより415mgの生成物；有機V=800ml、1.02v/v%ピリジン。有機層を300mlの食塩水で洗浄した；水性V=350ml、pH=1.8、HPLCにより20mgの生成物。有機層を130mlの飽和NaHCO₃溶液で洗浄した；水性V=176ml、pH=6.0、780mgの生成物。有機層を300mlの半飽和食塩水で洗浄した；水性V=330ml、pH=5.2、25mgの生成物；有機V=650ml、ピリジン0.045v/v%。5gのDarcoを有機層に加え、5分間攪拌し、50gのシリカで濾過し、4 x 25mlのEtOAcで洗浄、有機V=750ml、ピリジン0.04v/v%。

【 0 1 9 3 】

ついで、有機層を約133mlまで蒸留した。溶液が曇るまで有機層を1時間攪拌した。133mlのヘプタンを15分かけて加え、スラリーを一夜攪拌した。133mlのヘプタンを一夜かけて加えた。混合物をメカニカルスターラーで20分間激しく攪拌した。固形分を濾去し、濾過ケーキを50mlの5%EtOAc/ヘプタンで洗浄した；母液からの溶媒除去後に3.4gの生成物が8.86gの粗製生成物で認められた。乾燥生成物の結晶を真空下、50 で一夜加熱した。467gの生成物が得られた、~73%、96.6 AP。

【 0 1 9 4 】

実施例 4 1

(1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-アミノ-2-(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)-1-オキシエチル]-2-アザピシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボニトリル安息香酸塩(1:1)(式M)を生成する脱保護

3-シアノ-(S)- (3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)- オキシ-(1 S,3S,5S)-2-アザピシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステル(式L)(5.0g、12.04ミリモル)を、三つ首フラスコ(温度計、メカニカルスターラー、および気体導入口を備える)に入れた。EtOAc(約45~50ml)を加えて透明な溶液とした。濃HCl(3.00ml、37%w/w%、36.14ミリモル、3当量)を室温にて加え、固体が生成するまで反応混合物を攪拌した。ついで、水(30ml)を加え、混合物を1~2分間攪拌した。反応混合物を分別漏斗に移し、反応混合物の層を静置して明確な相分離に分離した。温度を25 未満に保持しながら、水性層を25%NaOHで約6の低pHに調節した。

【 0 1 9 5 】

ついで、水性層にイソプロピルアルコール(IPA；2~3ml)を加え、ついで安息香酸ナトリウム(6.5mlの水に2.6gの安息香酸ナトリウムを溶解することによって調製した安息

10

20

30

40

50

香酸ナトリウム溶液を0.65ml)を加えることによって、塩交換を行った。ついで、残りの安息香酸ナトリウム溶液を添加漏斗で滴下して加えた。得られた反応混合物を室温で16~24時間攪拌した。ついで、反応混合物中の固形分をプフナー漏斗で濾過し、AgNO₃を用いたCl⁻テストで固形分が陰性となるまで水で洗浄した。ついで、固形分をヘプタン(10ml)で洗浄して水を飛ばし、漏斗上で空気乾燥し、KF<5%まで真空オーブンで35℃にて乾燥させた。収率は79%、4.1gであった。

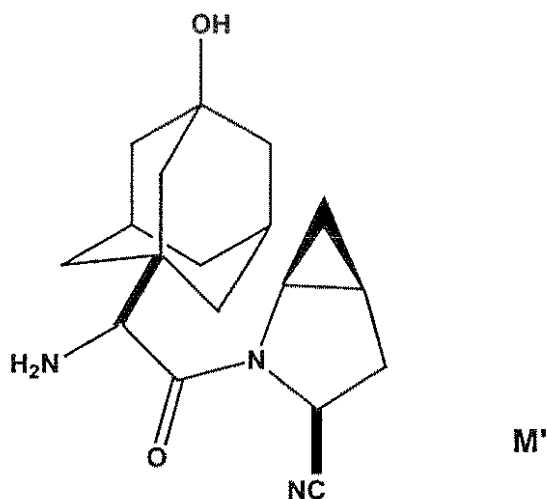
【0196】

実施例42

遊離塩基M'

【化46】

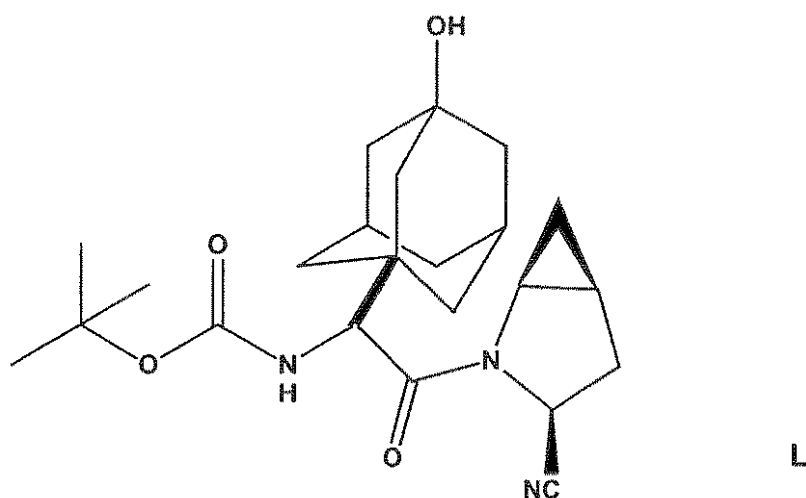
10



20

を生成する化合物(L)

【化47】



30

40

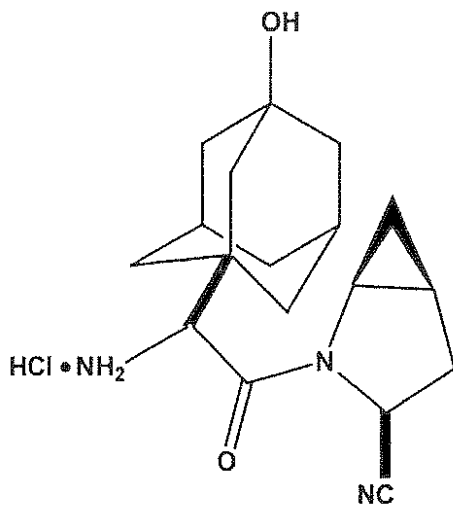
の脱保護

実施例40の化合物(L)(300g、0.723モル、効力90.6%)、塩化メチレン(3L)、メタノール(288ml、7.23モル)および濃(36%)塩酸(288ml、7.23モル)を三つ首の12L容フラスコ(メカニカルスターラー、温度プローブおよびN₂ガス導入口を備える)に入れた。反応は反応温度を約20~約25℃の範囲に保持しながら行った。反応混合物を18時間攪拌し、2相に分離し、上部の水性層を回収した。水性層に塩化メチレン(6L)および水(720ml)を加え、5N NaOH(~600ml)を滴下して加えてpHを9.0~10.5に調節した。

【0197】

式：

【化 4 8】



10

の塩酸塩（HPLCにより同定）（式 L'）を含む有機相を塩化メチレン（6L）および水（720 ml）で処理し、反応温度を20～25 に保持しながら5N水酸化ナトリウム溶液（～600ml）を滴下して加えてpHを9～10.5に調節した。NaCl（120g）を加え、混合物を20分間攪拌して相分離を生成した。有機層（6.2L）を回収し（～174gの化合物 M'を含有）、水性層（1.75L）は廃棄した（6.5gの化合物 M'を含有）。

20

【 0 1 9 8】

有機層を1%NH₄Cl食塩水溶液（450ml）で洗浄した（1%NH₄Cl食塩水溶液は1gのNH₄Cl、25gのNaClおよび74gのH₂Oを含んでいた）。得られた相分離から6.0Lの有機層を回収し（溶液中に～176gの化合物 M'を含んでいた）、1.4gの化合物 M'（～0.4%）を含む水性層（0.45L）は廃棄した。

【 0 1 9 9】

CH₂Cl₂を25 /50mmHgで蒸留しながら酢酸エチル（～4L）を有機層に加えた。最終容量が2.5Lに達したら蒸留を停止した。有機層をポリッシュ（polish）濾過して固形のNaClを除去し、～1Kg（1Lの酢酸エチル中に化合物 M'が～170g）GC分析：DCM<0.1%まで濃縮した。水（17ml）を滴下して加え、10分後に結晶化が始まった。17mlの水を加え、得られたスラリーを30分間攪拌し、濾過し、濾過ケーキを酢酸エチルで洗浄し、室温で乾燥させて18gの一水和物化合物 M''、収率81%を得た。

30

【配列表】

2014012689000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年9月11日(2013.9.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

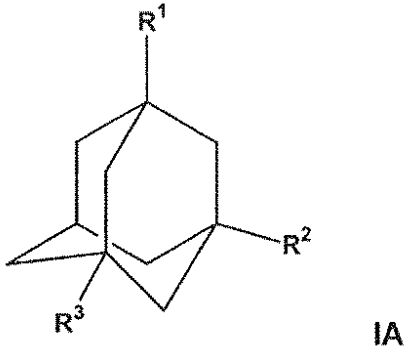
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I A :

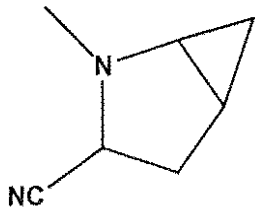
【化 1】



(式中、

R¹は、HおよびOHよりなる群から選ばれる；R²は、-C(=O)-COR⁴、-C(=O)NR⁵R⁶、-C(X)_n-COR⁴および-C-NR⁷R⁸COR⁴よりなる群から選ばれる、ここでXはハロゲン、nは1-2、R⁴はO-アルキル、NH₂およびOHよりなる群から選ばれる、およびR⁵、R⁶、R⁷およびR⁸は、それぞれ、HおよびCOOR⁹（式中、R⁹は置換されたまたは非置換のアルキル）；およびR³は、H、OHおよびR¹⁰よりなる群から選ばれる、ここで、R¹⁰は、NHR¹¹C(=O)R¹²、R¹¹はR¹³COOH、R¹²は、式：

【化 2】



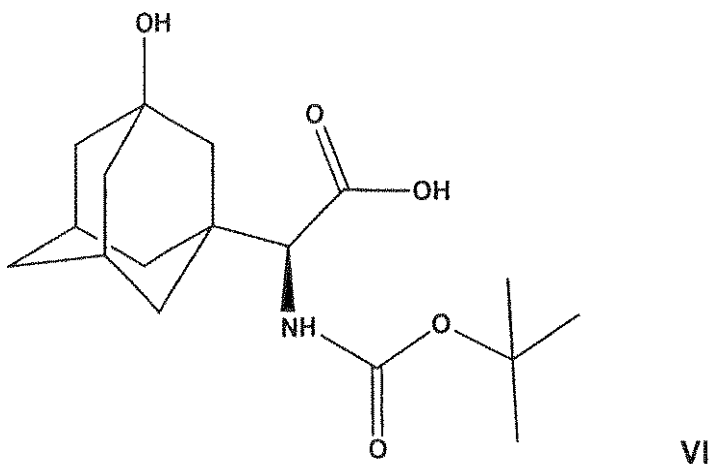
により示される基、

R¹³はアルキルまたはアリールである)の構造を含む化合物または薬理的に許容しうるその塩。

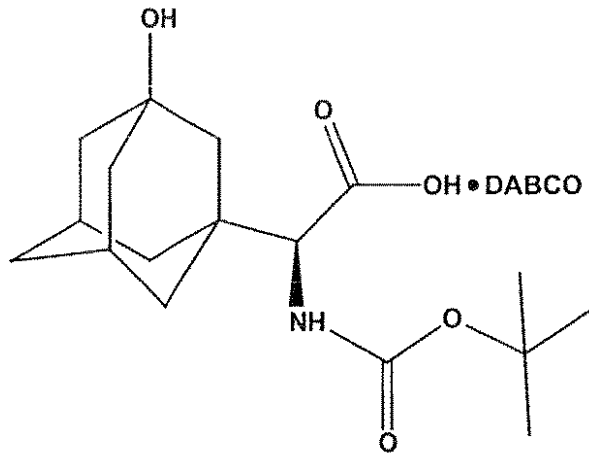
【請求項 2】

該構造が、式 V I :

【化 3】

またはそのDABCO塩である式 V I A :

【化 4】



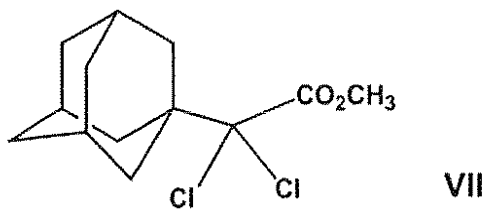
VIA

を含む、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

該構造が、式 VII :

【化 5】



を含む、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

ジペプチジルペプチダーゼ I V のシクロプロピル融合ピロリジンベースのインヒビターの製造方法であって、工程：

(a) (S)- [[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸またはその1,4-ジアザビシクロ[2.2.2]オクタン塩を(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミドにカップリングして3-(アミノカルボニル)- (S)- -(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)- -オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルを生成し、

(b) 3-(アミノカルボニル)- (S)- -(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)- -オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルを脱水して3-シアノ-(S)- -(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)- -オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルを生成し、ついで

(c) 3-シアノ-(S)- -(3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デス-1-イル)- -オキソ-(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-エタンカルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルを加水分解して該ジペプチジルペプチダーゼ I V インヒビターを生成することを含む方法。

【請求項 5】

工程 (a) の (S)- [[(1,1-ジメチルエトキシ)カルボニル]アミノ]-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸が、(S)- -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸をBOCで保護することにより製造される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

3-ヒドロキシ- -オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸をアミノ化またはトランスアミノ化により不斉還元して(S)- -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸を生成することをさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

(S)- -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸をトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸から化学合成することをさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項8】

工程(a)の(1S,3S,5S)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-3-カルボキサミドが、[1S-(1,3,5)]-3-アミノカルボニル)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸1,1-ジメチルエチルエステルからのBOC除去によって製造される、請求項4に記載の方法。

【請求項9】

[1S-(1,3,5)]-3-アミノカルボニル)-2-アザビシクロ[3.1.0]ヘキサン-2-カルボン酸1,1-ジメチルエチルエステルが、Simmons-Smith反応により(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1,1-ジメチルエステルのシクロプロパン化により製造される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

(5S)-5-アミノカルボニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-カルボン酸1,1-ジメチルエステルが、水酸化リチウムを用いた鹼化により4,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1,5-ジカルボン酸,1-(1,1-ジメチルエチル),5-エチルエステルを加水分解し、ついで混合無水物および塩化メシルを用いてアミドを生成することにより製造される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

(S)- -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸の製造方法であって、工程：

(a)トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸を -プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸に加水分解し、

(b) -プロモトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸をH₂SO₄およびHNO₃で処理して -プロモ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸を生成し、

(c) -プロモ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸を水酸化アンモニウムに溶解し、反応混合物を加熱し、

(d) 反応混合物を濃縮してキラルな混合物(S)- -アミノ-3ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸を生成し、ついで

(e) 該キラルな混合物から(S)- -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸を単離する

ことを含む、方法。

【請求項12】

3-ヒドロキシ- -オキソトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸xの不斉還元的アミノ化またはトランスアミノ化により (S)- -アミノ-3-ヒドロキシトリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン-1-酢酸を製造できる細胞株。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	9/99 (2006.01)	C 1 2 N	9/99

- (74)代理人 100156111
弁理士 山中 伸一郎
- (72)発明者 トルク・チ・ブ
アメリカ合衆国 0 7 0 6 9 ニュージャージー州ウォッチュング、リッジ・ロード 4 7 2 番
- (72)発明者 デイビッド・ビー・ブルゾースキー
アメリカ合衆国 0 8 8 5 4 イリノイ州アイランド・レイク、ロングエイカー・レイン 5 1 0 番
- (72)発明者 リタ・フォックス
アメリカ合衆国 0 8 5 4 0 ニュージャージー州プリンストン、ユニット 8、レイニアー・コート 1
1 6 番
- (72)発明者 ジョリー・デュエイン・ゴッドフリー・ジュニア
アメリカ合衆国 0 8 6 1 8 - 1 8 2 1 ニュージャージー州ユーイング、ウィックフォード・アベニ
ュー 1 6 番
- (72)発明者 ロナルド・エル・ハンソン
アメリカ合衆国 0 7 9 5 0 ニュージャージー州モリス・プレインズ、ホワイトウッド・ドライブ 5
4 番
- (72)発明者 セルゲイ・ヴェー・コロトウチン
アメリカ合衆国 0 7 2 0 4 ニュージャージー州ローゼル・パーク、ジェローム・ストリート 1 2 3
- ビー番
- (72)発明者 ジョン・エイ・マズロ・ジュニア
アメリカ合衆国 2 9 5 0 5 サウスカロライナ州フローレンス、ウエスト・ミルストーン・ロード 2
1 3 番
- (72)発明者 ラメシュ・エヌ・ペイテル
アメリカ合衆国 0 8 8 0 7 ニュージャージー州ブリッジウォーター、キャボット・ヒル・ロード 5
7 2 番
- (72)発明者 ワン・ジャンジ
アメリカ合衆国 0 8 8 1 0 ニュージャージー州デイトン、アスター・ウェイ 9 番
- (72)発明者 クォック・ウォン
アメリカ合衆国 0 8 6 4 8 ニュージャージー州ローレンスビル、プレンプルック・コート 1 6 番
- (72)発明者 ジュロン・ユ
アメリカ合衆国 0 8 8 1 0 ニュージャージー州デイトン、シーニック・ドライブ 1 5 番
- (72)発明者 ジェyson・ジュ
アメリカ合衆国 0 8 8 1 6 ニュージャージー州イースト・プランズウィック、エアーズ・コート 1
番
- (72)発明者 デイビッド・アール・マグニン
アメリカ合衆国 0 8 6 9 0 ニュージャージー州ハミルトン、コティッジ・コート 4 0 番
- (72)発明者 デイビッド・ジェイ・オージェリ
アメリカ合衆国 0 8 5 4 0 ニュージャージー州プリンストン、カーター・ロード 1 0 7 番
- (72)発明者 ローレンス・ジー・ハマン
アメリカ合衆国 0 8 0 0 3 ニュージャージー州チェリー・ヒル、イースト・ライディング・ドライ
ブ 2 4 番

F ターム(参考) 4B065 AA01Y AA26X AB01 AC14 BA01 CA16 CA44
4C086 AA01 AA02 AA03 BC10 MA01 MA04 NA14 ZC35
4C204 CB08 DB26 EB02 FB20 GB01

4H045 AA10 AA20 AA30 BA11 DA56 EA20 FA10

【外国語明細書】

METHODS AND COMPOUNDS FOR PRODUCING DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INHIBITORS AND INTERMEDIATES THEREOF

This application claims priority from U.S. Provisional Application 60/431,814 filed December 9, 2002 which is incorporated herein by reference.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention provides methods and compounds for use in methods for production of cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Also provided are methods for asymmetric reductive amination of the intermediate compound (S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid used in the production of cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Additional intermediate compounds and methods for their production are also provided. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors produced by the compounds and methods of the present invention are useful in the treatment of diabetes and complications thereof, hyperglycemia, Syndrome X, hyperinsulinemia, obesity, and atherosclerosis and related diseases, as well as immunomodulatory diseases and chronic inflammatory bowel disease.

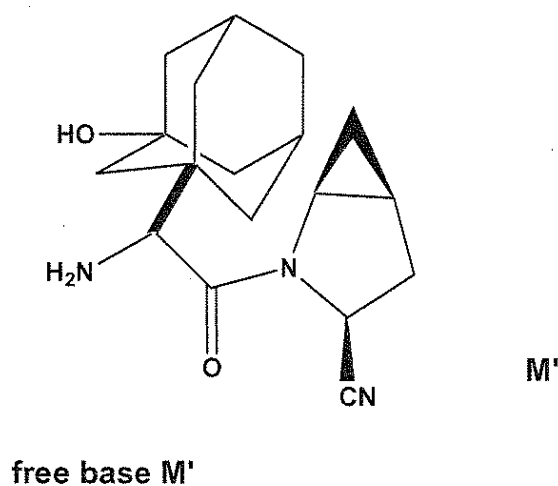
BACKGROUND OF THE INVENTION

Dipeptidyl peptidase IV is a membrane bound non-classical serine aminopeptidase which is located in a variety of tissues including, but not limited to, intestine, liver, lung, and kidney. This enzyme is also located on circulating T-lymphocytes wherein it is referred to as CD-26. Dipeptidyl peptidase IV is responsible for the metabolic cleavage of the endogenous peptides GLP-1(7-36) and glucagons *in vivo* and has demonstrated proteolytic activity against other peptides such as GHRH, NPY, GLP-2 and VIP *in vitro*.

GLP-1(7-36) is a 29 amino acid peptide derived from post-translational processing of proglucagon in the small intestine. This peptide has multiple actions *in vivo*. For example, GLP-1(7-36) stimulates insulin secretion and inhibits glucagon secretion. This peptide promotes satiety and slows gastric emptying. Exogenous administration of GLP-1(7-36) via continuous infusion has been shown to be

efficacious in diabetic patients. However, the exogenous peptide is degraded too rapidly for continual therapeutic use.

Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV have been developed to potentiate endogenous levels of GLP-1(7,36). U.S. Patent No. 6,395,767 discloses cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Methods for chemically synthesizing these inhibitors are disclosed in U.S. Patent No. 6,395,767 as well as in the literature. For example, see Sagnard et al. Tet-Lett. 1995 36:3148-3152; Tverezovsky et al. Tetrahedron 1997 53:14773-14792; and Hanessian et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998 8:2123-2128. A preferred inhibitor disclosed in U.S. Patent No. 6,395,767 is the free base, (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroxy-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo-[3.1.0]hexane-3-carbonitrile (M').



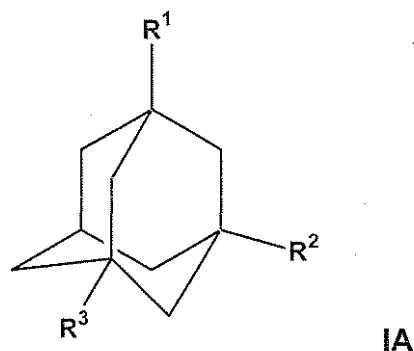
Methods adapted for preparing intermediates used in the production of this dipeptidyl peptidase IV inhibitor are disclosed in EP 0 808 824 A2. Also see, Imashiro and Kuroda Tetrahedron Letters 2001 42:1313-1315, Reetz et al. Chem. Int. Ed. Engl. 1979 18:72, Reetz and Heimbach Chem. Ber. 1983 116:3702-3707, Reetz et al. Chem. Ber. 1983 116:3708-3724.

The present invention provides new production methods and compounds for use in the production of cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV.

SUMMARY OF THE INVENTION

An object of the present invention is to provide compounds useful as intermediates in the production of cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV.

In one embodiment, intermediates of the present invention comprise a compound of Formula IA:



wherein

R^1 is selected from the group consisting of H and OH;

R^2 is selected from the group consisting of $-C(=O)-COR^4$, $-C(=O)NR^5R^6$, $-C(X)_n-COR^4$ and $-C-NR^7R^8COR^4$,

wherein

X is a halogen;

n is from 1-2

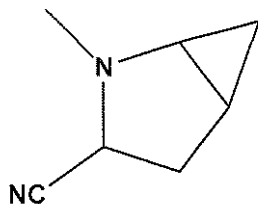
R^4 is selected from the group consisting of O-alkyl, NH_2 and OH; and

R^5 , R^6 , R^7 and R^8 are each selected from the group consisting of H and $COOR^9$, wherein R^9 is a substituted or unsubstituted alkyl; and

R^3 is selected from the group consisting of H, OH and R^{10} , wherein R^{10} is $NHR^{11}C(=O)R^{12}$,

R^{11} is $R^{13}COOH$,

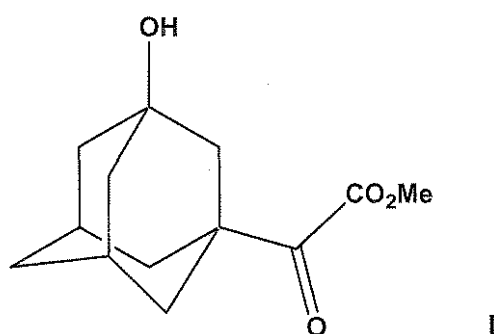
R^{12} is



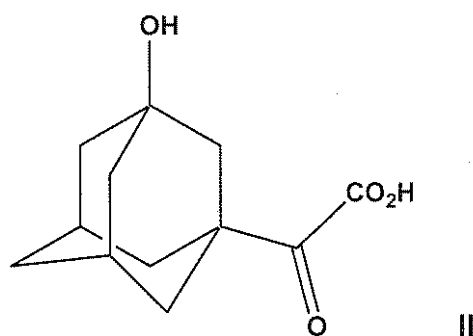
and R¹³ is an alkyl or aryl.

Exemplary preferred compounds of Formula IA of the present invention useful as intermediates in the production of cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV include:

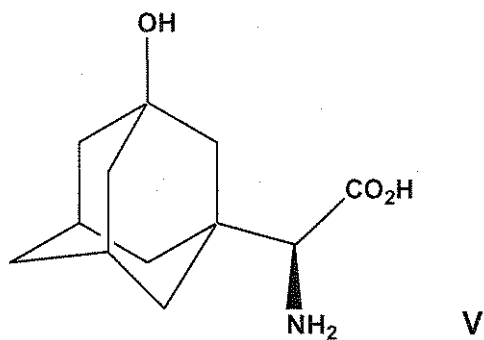
3-hydroxy- α -oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester as depicted in Formula I,



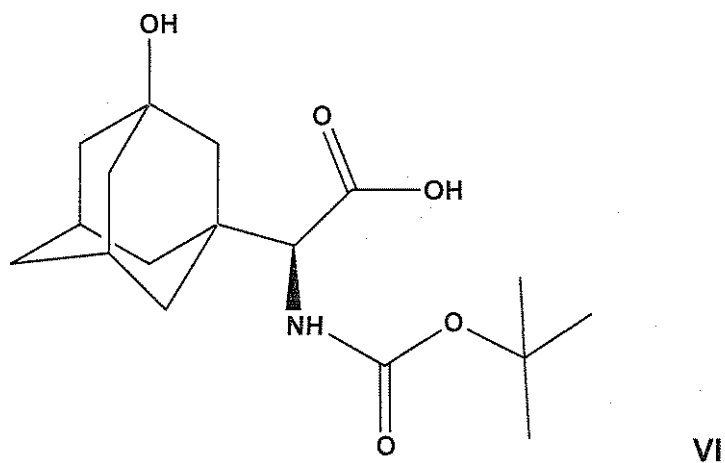
3-hydroxy- α -oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid as depicted in Formula II,



(*aS*)- α -amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid as depicted in Formula V,

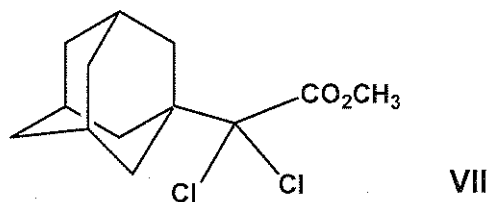


(aS)-a[[[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid as depicted in Formula VI,

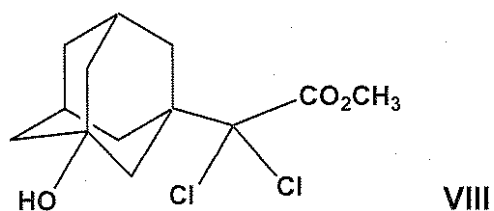


(or its DABCO salt VIA),

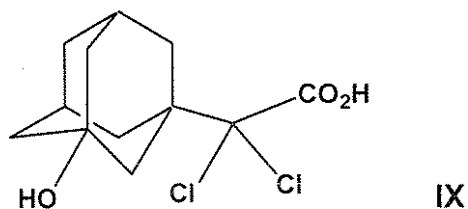
adamantan-1-yl-dichloro-acetic acid methyl ester as depicted in Formula VII,



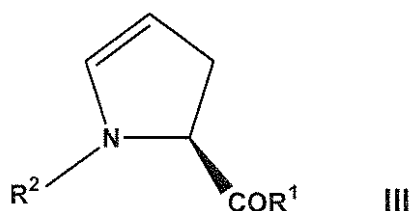
dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid methyl ester as depicted in Formula VIII, and



dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid as depicted in Formula IX



In another embodiment, intermediates of the present invention comprise the compounds 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl),5-ethyl ester as depicted in Formula III,

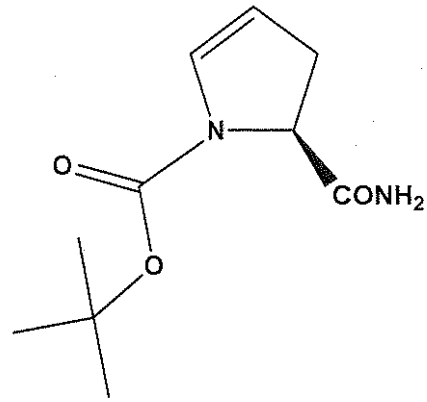


wherein

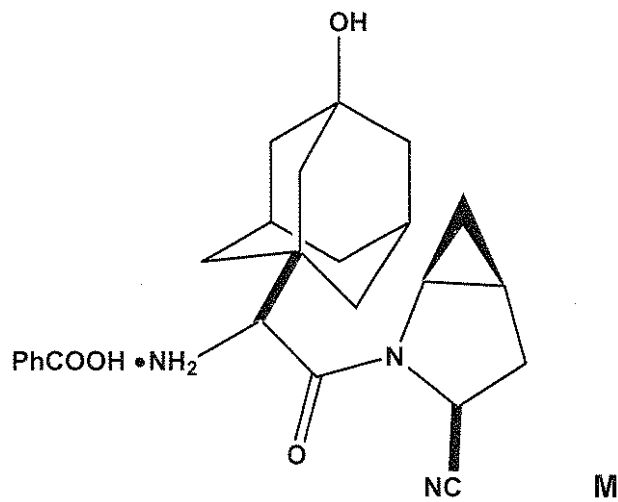
R^1 is selected from the group consisting of O-alkyl, NH_2 and OH, and

R^2 is selected from the group consisting of t-BOC and CBz;

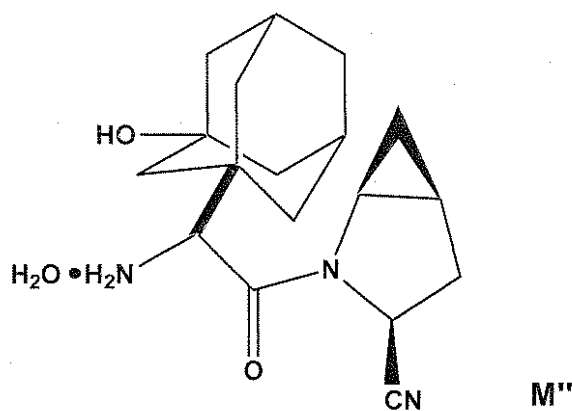
and (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester as depicted in Formula IV,



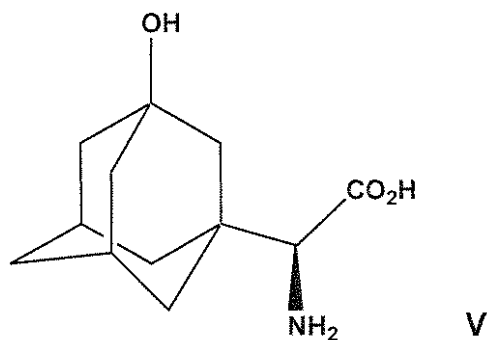
In a preferred embodiment, these compounds are used as intermediates in the production of the dipeptidyl peptidase IV inhibitors (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile, benzoate (1:1) as depicted in Formula M



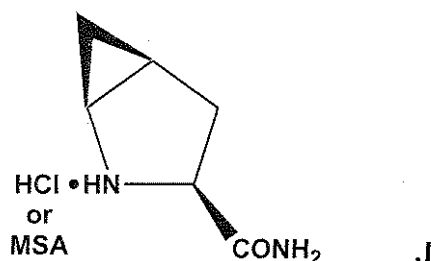
or its free base M' (set out above), and monohydrate M'' thereof



Another object of the present invention is to provide methods for production of cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. In a preferred embodiment, the inhibitors produced are (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile, benzoate (1:1) and its corresponding free base as depicted in Formulas M and M', respectively. These inhibitors are ultimately formed from the coupling of two fragments, (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid as depicted in Formula V,



and (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide acid salt such as the hydrochloride salt or the methanesulfonic acid salt (mesyl or MSA salt) as depicted in Formula J



Various methods are disclosed herein for production and coupling of these fragments depending upon the intermediate compounds selected as the starting materials. For example, in one embodiment of the present invention, a method is provided for production of the cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitor from 3-hydroxy- α -oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid as depicted in Formula II. In another embodiment of the present invention, a method is provided for production of the cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitor from (aS)- α -amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid of Formula V. In another embodiment of the present invention, a method is provided for production of the cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitor from (aS)- α -[[1-(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid of Formula VI. In yet another embodiment of the present invention, a method is provided for production of the cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitor from (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester of Formula IV.

Another object of the present invention is to provide methods for synthesis of intermediates useful in the production of cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitor. In one embodiment of the present invention, a method is provided for asymmetric reductive amination or transamination of 3-hydroxy- α -oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II) to (aS)- α -amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V). In another embodiment of the present invention, a method for chemical synthesis of (aS)- α -amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) from tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula N) is provided. In another embodiment of the present invention, methods are provided for production of 3-hydroxy- α -oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II) from adamantan-1-

yl-dichloro-acetic acid methyl ester (Formula VII), dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid methyl ester (Formula VIII), and dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid (Formula IX). Methods for production of adamantan-1-yl-dichloro-acetic acid methyl ester (Formula VII), dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid methyl ester (Formula VIII), and dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid (Formula IX) are also provided. In another embodiment of the present invention, a method is provided for production of (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester (Formula IV) from 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl),5-ethyl ester (Formula III). In this embodiment, (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester (Formula (IV) can then be used as an intermediate in the production of (1S,3S,5S)-3-aminocarbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula H) .

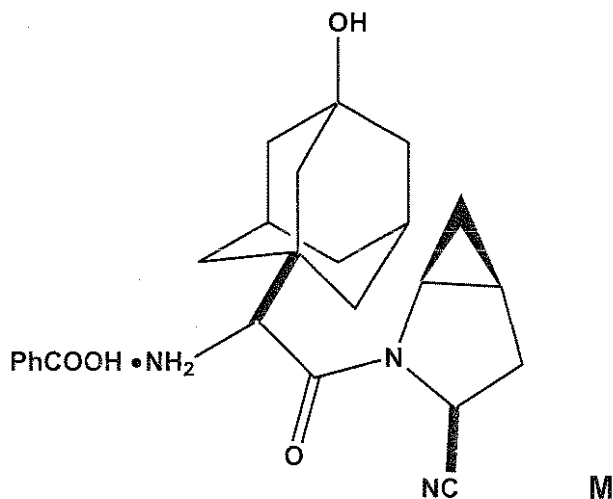
Another object of the present invention is to provide a cell line capable of producing (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) by asymmetric reductive amination or transamination of 3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II). In a preferred embodiment, the cell line comprises cells containing a plasmid expressing formate dehydrogenase and phenylalanine dehydrogenase. Most preferred is the cell line of ATCC Accession Number PTA-4520.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

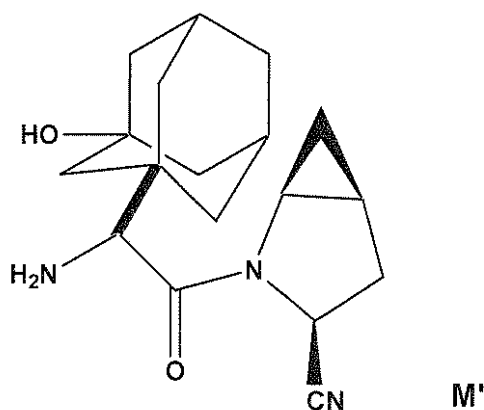
Cyclopropyl-fused pyrrolidine-based compounds such as (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile, benzoate (1:1) and its corresponding free base and monohydrate thereof are dipeptidyl peptidase IV inhibitors useful in the treatment of diabetes and complications thereof, hyperglycemia, Syndrome X, hyperinsulinemia, obesity, and atherosclerosis and related diseases, as well as immunomodulatory diseases and chronic inflammatory bowel disease. In the present invention, new compounds and methods are provided for use in production of cyclopropyl-fused pyrrolidine-based compounds such as (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-

hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile, benzoate (1:1) and its corresponding free base and monohydrate thereof.

The dipeptidyl peptidase IV inhibitors (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile, benzoate (1:1) is depicted below as Formula M.

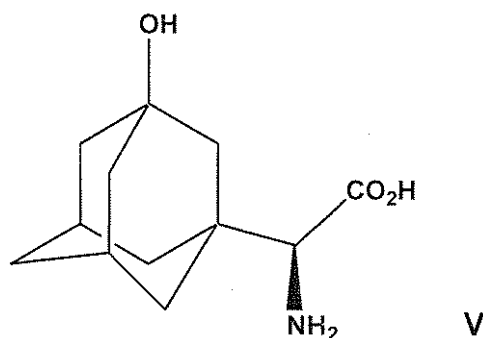


and preferably the corresponding free base Formula M' depicted below or its monohydrate M'' set out hereinbefore.

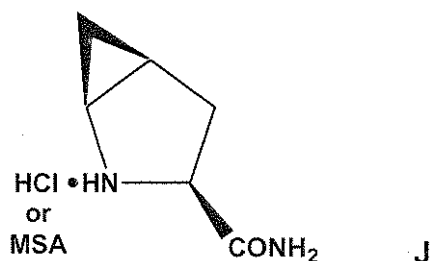


In the present invention, a method is provided for production of (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile (Formula M') by assembly of two fragments.

These fragments are (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid as depicted in Formula V,



and acid salts of (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide such as the hydrochloride salt or MSA salt as depicted in Formula J.



The present invention also provides methods for production of these fragments as well as intermediate compounds useful in the production of these fragments.

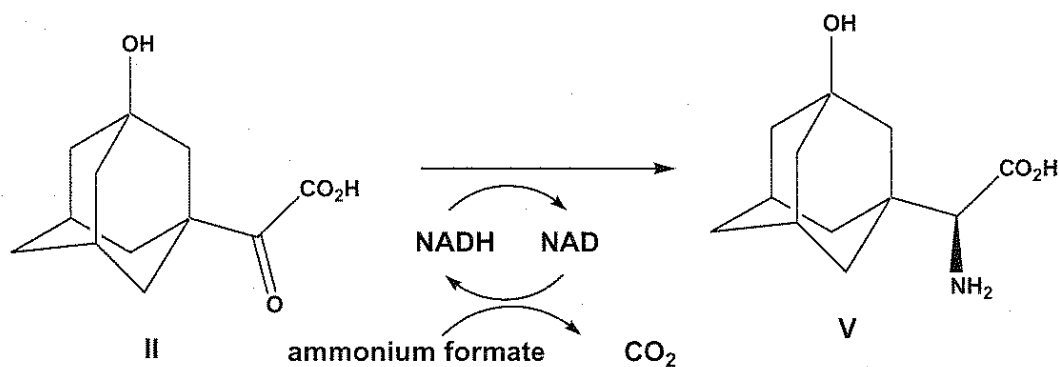
In one aspect of the present invention, methods are provided for production of the fragment (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) by reductive amination or transamination of the intermediate compound 3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II). In a preferred embodiment of this method, 3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II) is converted to (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) by reductive amination performed enzymatically using a phenylalanine dehydrogenase or other amino acid dehydrogenases active with ketoacids. Exemplary phenylalanine dehydrogenases useful in the present invention include, but are not limited to, those from *Sporosarcina* species or a phenylalanine

dehydrogenase from *Thermoactinomyces* species such as *Thermoactinomyces intermedius*. It is preferred that reductive amination be performed with the phenylalanine dehydrogenase of *Thermoactinomyces intermedius*, ATCC 33205, expressed in *Escherichia coli* or *Pichia pastoris*. Construction and growth of recombinant strains of *E. coli* and *Pichia pastoris* expressing phenylalanine dehydrogenase *Thermoactinomyces intermedius*, ATCC 33205, have been described by Hanson et al. (Enzyme and Microbial Technology 2000 26:348-358). Growth of *Pichia pastoris* on methanol also induces the production of formate dehydrogenase (Hanson et al. Enzyme and Microbial Technology 2000 26:348-358).

E. coli cells containing a plasmid expressing the *Pichia pastoris* (ATCC 20864) formate dehydrogenase and a modified version of the *Thermoactinomyces intermedius* (ATCC 33205) phenylalanine dehydrogenase gene were deposited and accepted by an International Depository Authority under the provisions of the Budapest Treaty. The deposit was made on June 25, 2002 to the American Type Culture Collection at 10801 University Boulevard in Manassas, Virginia 20110-2209. The ATCC Accession Number is PTA-4520. All restrictions upon public access to this cell line will be irrevocably removed upon granting of this patent application. The Deposit will be maintained in a public depository for a period of thirty years after the date of deposit or five years after the last request for a sample or for the enforceable life of the patent, whichever is longer. The above-referenced cell line was viable at the time of the deposit. The Deposit will be replaced if viable samples cannot be dispensed by the depository.

Reductive amination of 3-hydroxy- α -oxotricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II) to (aS)- α -amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) is depicted in the following Scheme I.

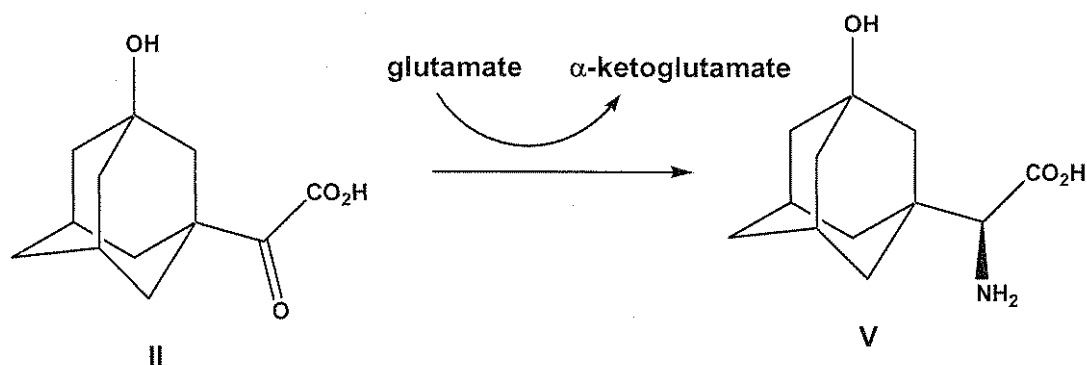
SCHEME I



As shown in Scheme I, this reaction requires ammonia and reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) produced during the reaction is recycled to NADH by the oxidation of formate to carbon dioxide by formate dehydrogenase. The expected yield of (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) from this reaction is 80 to 100% and the expected enantiomeric excess is greater than 99%. Also see Examples 1 through 10 herein.

The same conversion can also be accomplished using a transaminase as shown in Scheme II:

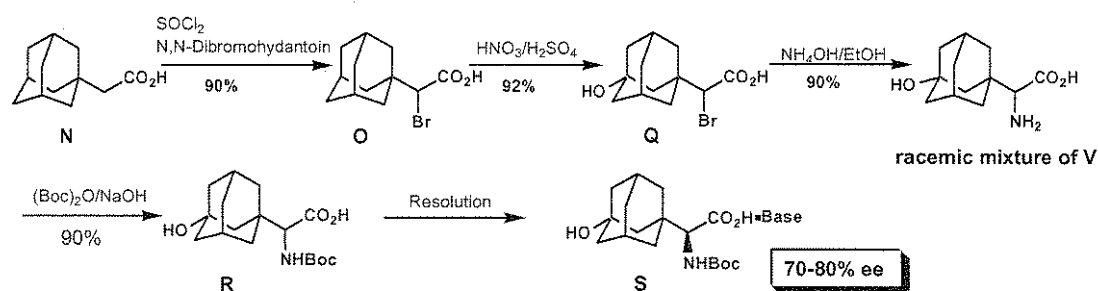
SCHEME II



As shown in Scheme II, in this enzymatic conversion glutamic acid serves as the amino donor. An exemplary transaminase for use in this conversion is the branched chain transaminase set forth in Example 11 herein.

In another embodiment, (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) is synthesized chemically. An exemplary method for chemical synthesis of (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) is depicted in Scheme III:

SCHEME III



As shown in Scheme III, a racemic mixture of (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) is chemically synthesized from tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula N) by first brominating tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid into α -bromotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula O). In this bromination, the starting material, tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula N) is suspended in thionyl chloride. Dimethyl formamide

(DMF) is then added and the suspension is stirred at room temperature for 1.5 hours. Completion of the reaction is verified by gas chromatography. Solid N-bromosuccinic anhydride (NBS) is then added portionwise to the reaction mixture and the reaction mixture is heated to 60°C. The temperature is maintained between 60 and 65°C while the reaction is stirred for 3 hours. Again, completion of the reaction is verified by gas chromatography. Heptane is then added to the reaction mixture and excess thionyl chloride is distilled off at 78-80°C. Water is added to quench the reaction and additional heptane is added. The aqueous layer is then separated from the organic layer and the organic layer is washed with water. After washing, additional water is added to the heptane layer and the heptane is distilled off. Tetrahydrofuran (THF) is then added to the remaining aqueous layer and the mixture is stirred vigorously at room temperature for multiple hours. Additional water can be added to speed up this hydrolysis. The THF is then distilled off, leaving a biphasic (water and oil) reaction mixture. Seeds are then added and the reaction is allowed to reach room temperature while α -bromotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula O) is produced as a heavy solid. Water and acetonitrile are added to keep the suspension stirrable. After stirring for several hours, the solid containing α -bromotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula O) is filtered off and washed several times with acetonitrile. See also Example 17 herein.

α -Bromotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula O) is then reacted with H₂SO₄ and HNO₃ to produce α -bromo-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula Q). More specifically, α -bromo-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula Q) is prepared from α -bromotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula O) by first charging an Erlenmeyer flask with H₂SO₄. The flask is then cooled in an ice bath and 50% HNO₃ is added to the flask. The solid α -bromotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula O) is then added to the mixture in portions which maintain the temperature under 28°C. The reaction is then heated to 60°C with stirring until a clear solution is obtained. When the reaction is complete, it is cooled to and maintained at room temperature. Water is then added to quench the reaction. The resulting slurry is

cooled in an ice bath and then filtered to obtain α -bromo-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula Q). See also Example 18 herein.

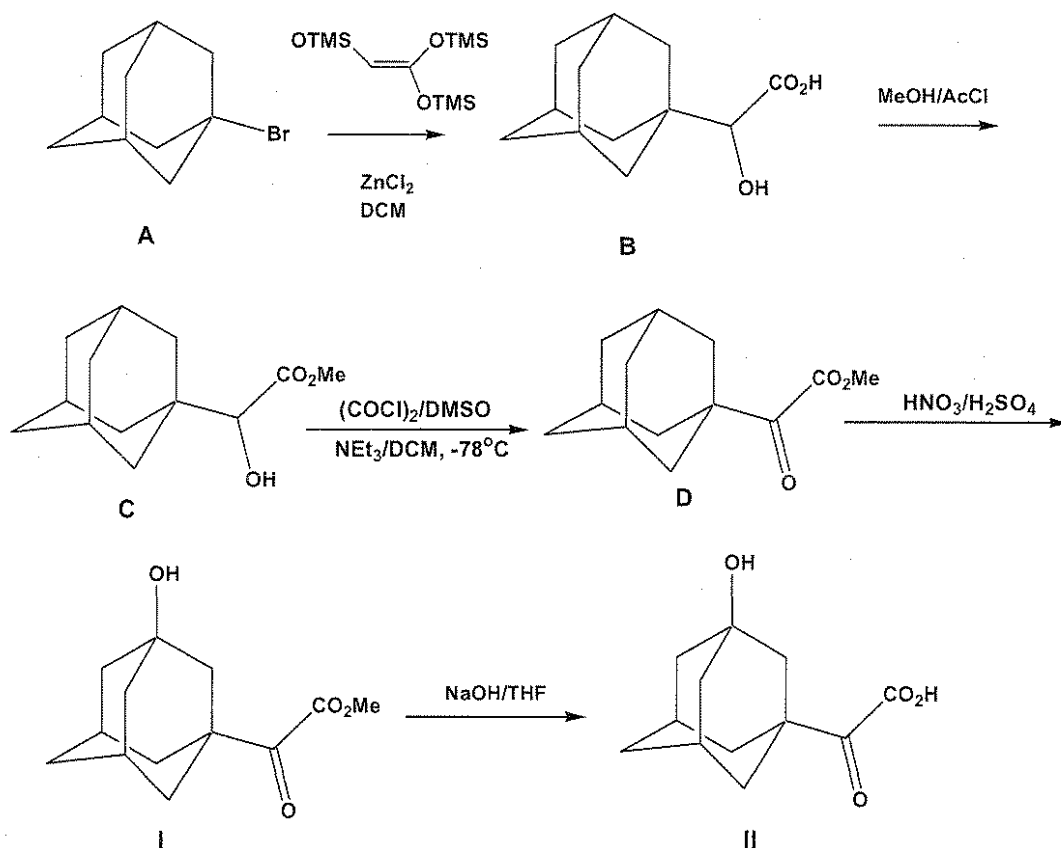
α -Bromo-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula Q) is then dissolved in ammonium hydroxide, preferably 30% ammonium hydroxide and the reaction mixture is heated preferably to 65°C. The reaction mixture is then concentrated to a solid. EtOH is then added and the reaction is again concentrated to yield a racemic mixture comprising (aS)- α -amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V). See also Example 19 herein.

To isolate (aS)- α -amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (racemic mixture of Formula V) from the racemic mixture, the mixture is treated by typical Boc protection using Boc anhydride and sodium hydroxide in tetrahydrofuran to yield α -[[[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-]3]hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Compound R). α -[[[(1,1-Dimethylethoxy)carbonyl]amino]-]3]hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Compound R) is then mixed with a chiral base such as [1R,2S]-(-)-1,2-diphenylhydroxy ethylamine, 1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptane-2-amine, or S-(-)-1-1(1-naphthyl)ethylamine and the mixture is evaporated to dryness. The dried mixture is resuspended in a solvent and the resuspended mixture is placed on a shaker with heating for several hours. Upon cooling to room temperature, crystallization of (aS)- α -[[[dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Compound S) occurs. See also Example 20 herein.

Removal of the Boc group yields (aS)- α -amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V).

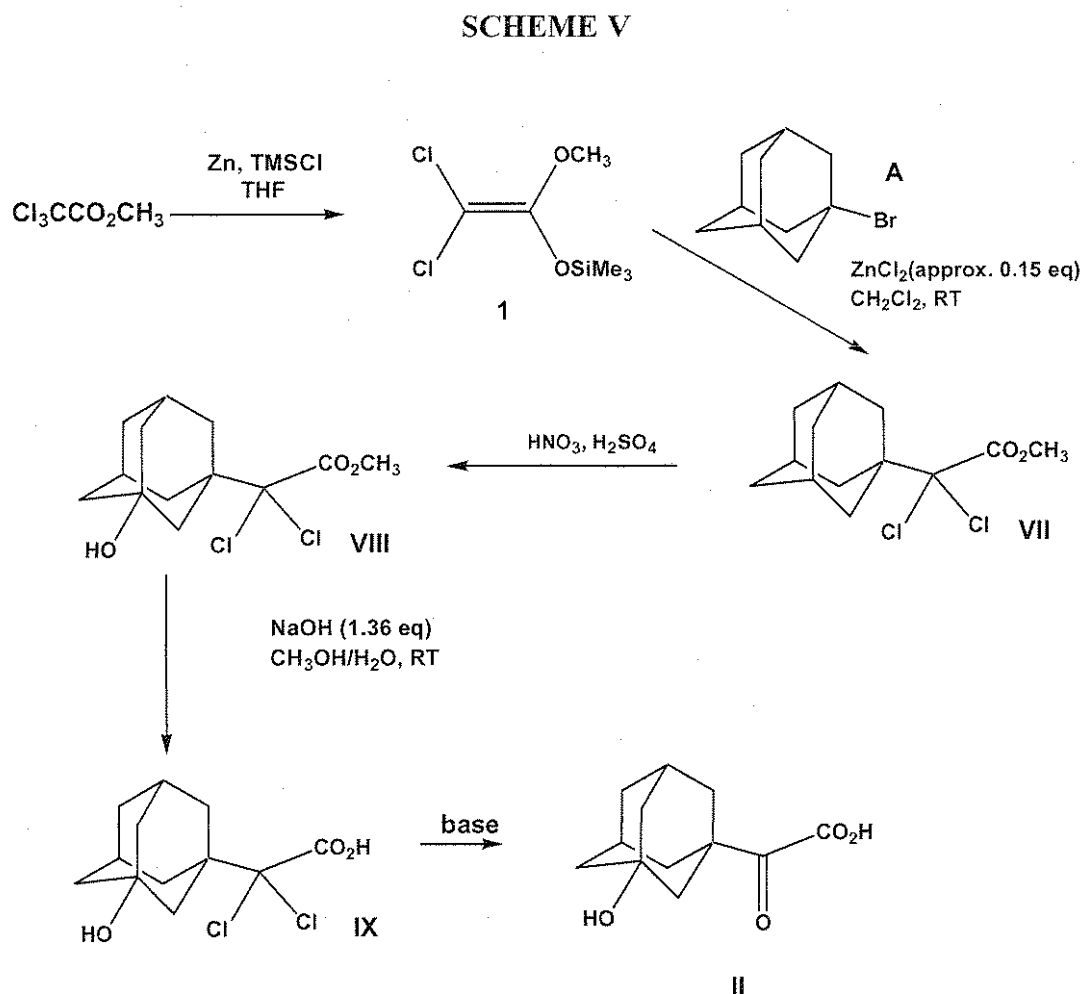
Another aspect of the present relates to methods for production of the intermediate compound 3-hydroxy- α -oxotricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II) used in the synthesis of the fragment (aS)- α -amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V). The intermediate compound 3-hydroxy- α -oxotricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II) can be produced in accordance with the method depicted in Scheme IV.

SCHEME IV



As shown in Scheme IV, in this method, adamantyl bromide (Formula A) is alkylated via zinc chloride catalysis to produce α -hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula B). α -Hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula B) is then esterified using acetyl chloride in methanol to produce α -hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula C). α -Hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula C) is then converted to α -oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula D) by Swern oxidation. α -Oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula D) is then hydroxylated to form 3-hydroxy- α -oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula I), which is then hydrolyzed to form 3-hydroxy- α -oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II). Also see Examples 21 through 25 herein.

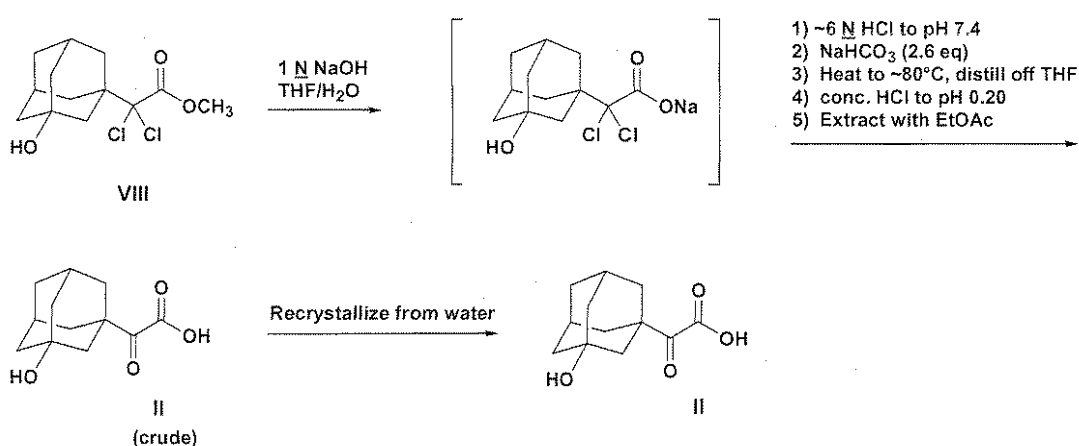
Alternatively, the intermediate compound 3-hydroxy- α -oxotricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II) can be produced in accordance with the method depicted in Scheme V.



As shown in Scheme V, (2,2-dichloro-1-methoxy-vinyloxy)-trimethylsilane **1** is prepared by minor modification of the method of Kuroda et al. (EP 08 08 824A3; Imashiro and Kuroda Tetrahedron Letters 2001 42:1313-1315). Treatment of bromoadamantane with **1** under the influence of zinc chloride (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) yields adamantan-1-yl-dichloro-acetic acid methyl ester of Formula VII. Adamantan-1-yl-dichloro-acetic acid methyl ester of Formula VII is then hydroxylated with nitric oxide in concentrated sulfuric acid to provide a quantitative yield of dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid

methyl ester of Formula VIII. Hydrolysis of Formula VIII with aqueous sodium hydroxide in methanol at room temperature yields dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid of Formula IX. Subsequent treatment of dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid (Formula IX) with a weak base, preferably sodium bicarbonate, at elevated temperature results in the exclusive formation of the intermediate compound 3-hydroxy-a-oxotricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II). Also see Examples 26 through 29.

SCHEME VA

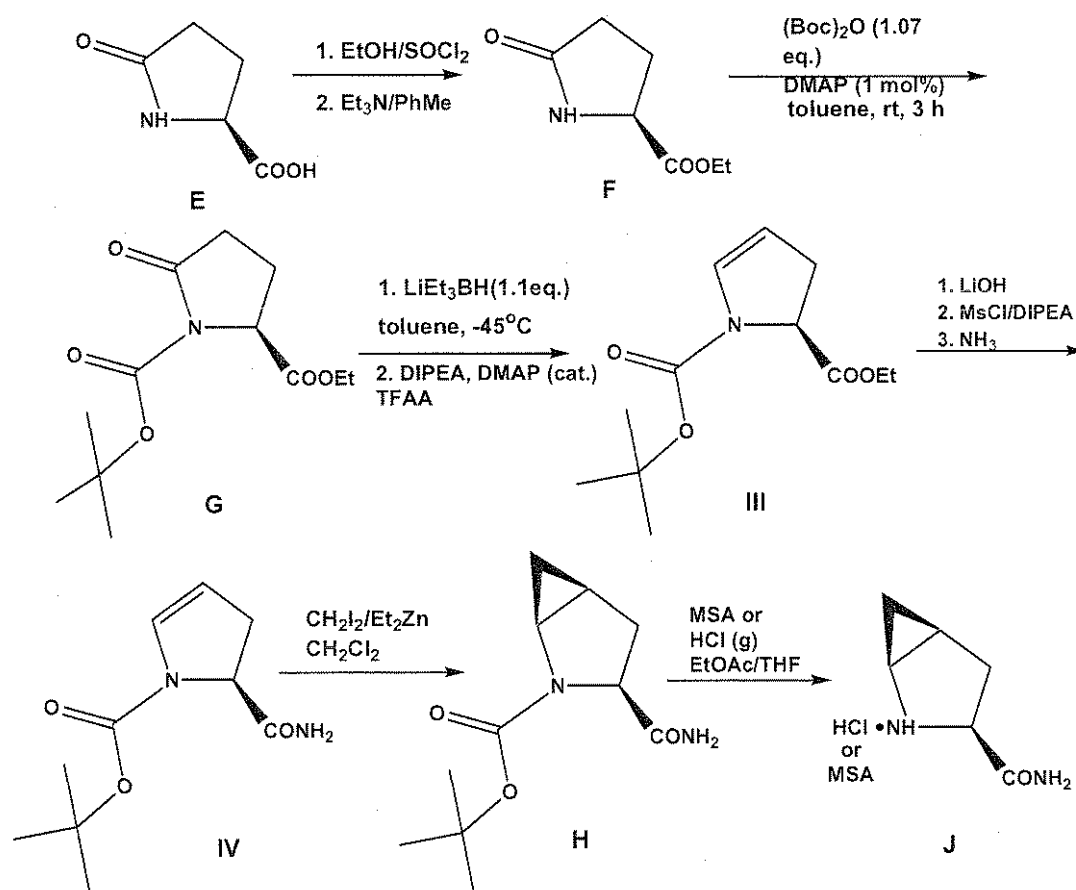


As shown in Scheme VA, the intermediate compound 3-hydroxy-a-oxotricyclo-[3.3.1.1.^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II) may be prepared in a one pot procedure. As seen, treatment of Formula VIII compound with aqueous sodium hydroxide in tetrahydrofuran (or other base such as potassium hydroxide or lithium hydroxide) in an inert atmosphere such as argon, yields the corresponding sodium salt. Without recovering the sodium salt, the reaction mixture containing the sodium salt is treated with an acid such as hydrochloric acid to lower pH to less than about 0.50 preferably about 0.20, to form the corresponding keto acid II, which may be recrystallized from water to form crystals of the keto acid II.

Another aspect of the present invention relates to a method for production of the fragment (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide (Formula J). This fragment used in the production of (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1.^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-

carbonitrile can be produced in accordance with the method depicted in Scheme VI shown below.

SCHEME VI



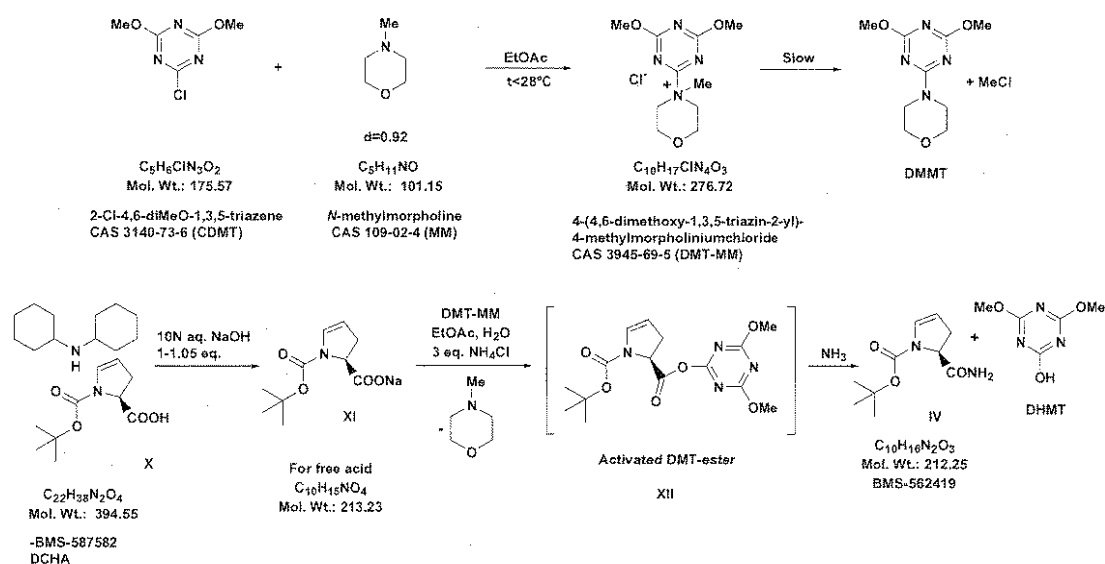
As shown in Scheme VI, L-pyrroglutamic acid (Formula E) is first esterified to produce the L-pyrroglutamic acid ethyl ester (Formula F; SQ 7539). This L-pyrroglutamic acid ethyl ester is then BOC-protected on the nitrogen to produce (5S)-2-oxopyrrolidine-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl),5-ethyl ester (Formula G). SuperHydride reduction and elimination is then performed to form 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl),5-ethyl ester (Formula III). The BOC-DHPEE III is then hydrolyzed by saponification with lithium hydroxide to form BOC-DHP. An amide is then formed on BOC-DHP via mixed anhydride using mesyl chloride followed by ammonia to produce (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester (Formula IV). (5S)-5-

aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester (Formula IV) is then cyclopropanated via the Simmons-Smith reaction to produce (1S,3S,5S)-3-aminocarbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula H). BOC is then removed resulting in formation of an acid salt such as the hydrochloride salt or the methanesulfonic acid salt of the fragment (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide (Formula J). Also see Examples 29 through Example 35.

Another aspect of the present invention also depicted in Scheme VI relates to the transformation of (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester (Formula IV) to (1S,3S,5S)-3-aminocarbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula H) by cyclopropanation in a Simmons-Smith Reaction. In this reaction, (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester is dissolved in methylene chloride in a first reactor. In a second reactor, methylene chloride is cooled to -30°C and dimethoxy ethane and a 30% solution of diethyl zinc in toluene are added followed by addition of diiodo methane. This mixture is then added to the first reactor followed by addition of saturated bicarbonate solution. The resulting reaction mixture is stirred until a precipitate formed. The precipitate is then filtered, washed and resuspended in methylene chloride two or more times. Filtrates are then separated into aqueous and organic phases and the organic phase is washed with half saturated brine. Solvent is removed and exchanged by heptane to obtain a slurry of crude product of (1S,3S,5S)-3-aminocarbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula H) in heptane.

Alternatively, (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)ester (Formula IV) may be prepared as shown in Scheme VIA.

SCHEME VIA



As shown in Scheme VIA, the DCHA salt of 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)ester X is treated with alkali metal base such as sodium hydroxide to form the corresponding salt, such as the sodium salt.

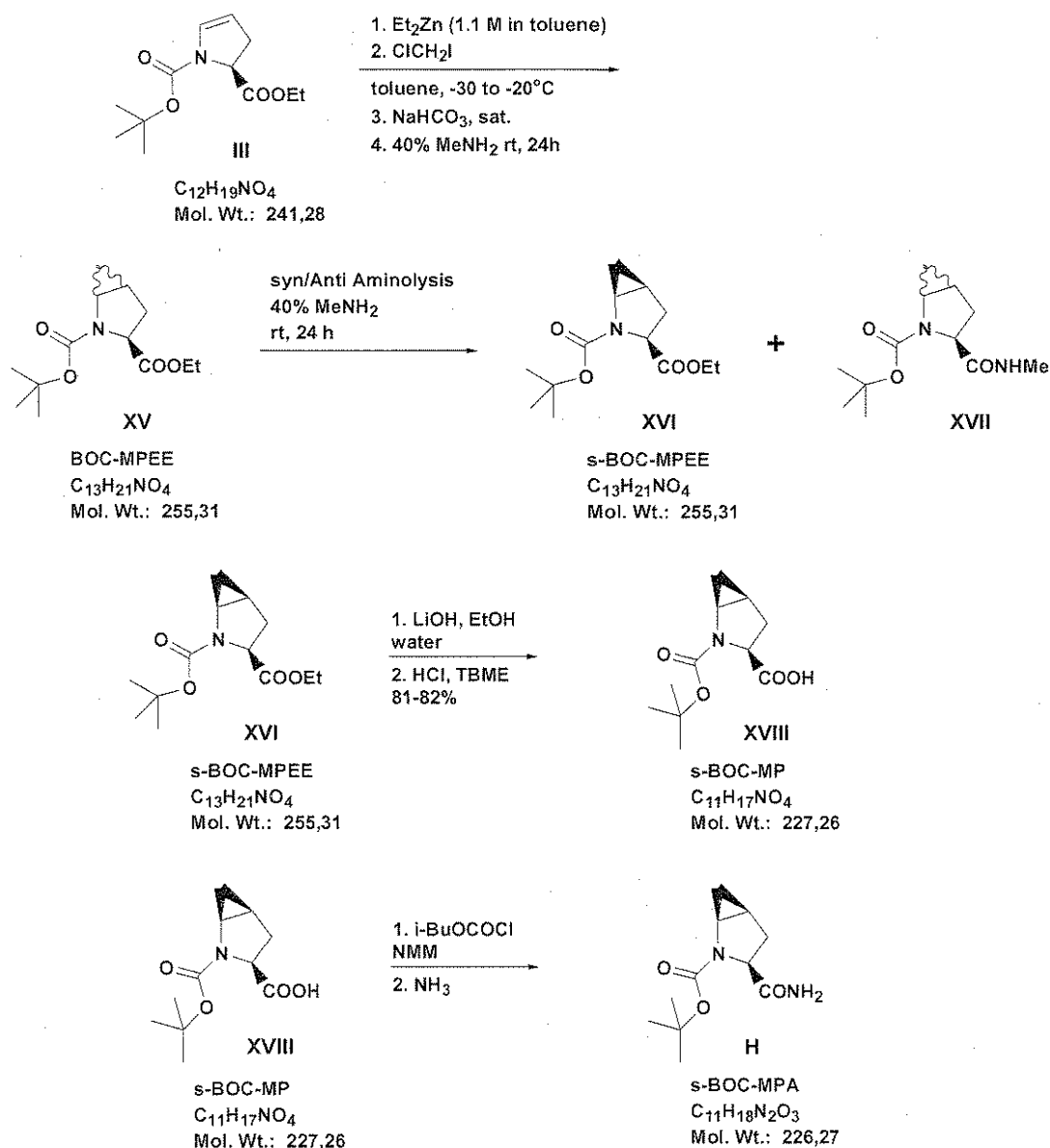
The sodium salt of 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)ester XI may also be prepared from the corresponding ethyl ester by treating the ethyl ester (preferably a solution of the ethyl ester in toluene) with ethanol and sodium hydroxide.

A solution of the sodium salt XI is treated with buffer such as ammonium chloride and sodium dihydrogen phosphate to lower pH of the solution below 7, preferably about 6 to 6.5, and the buffered solution of sodium salt is treated with 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM) to form the activated DMT-ester XII which is treated with ammonia or other base such as ammonium sulfate, ammonium chloride or ammonium hydroxide, to form (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid 1-(1,1-dimethylethyl)ester IV.

4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride (DTM-MM) may be prepared as shown in Scheme VIA by reacting 2-Cl-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT) and N-methylmorpholine at reduced temperatures ranging from about 0 to about 10°C to form DMT-MM.

The DCHA salt of 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)ester X may be prepared from the corresponding sodium salt XI by treating an aqueous solution of previously prepared DCHA salt X with methyl t-butyl ether (MTBE) adjusting pH of the reaction mixture to 2.5-3 employing an acid such as H_3PO_4 . The organic layer is separated and treated with brine to form the corresponding sodium salt XI. The resulting reaction mixture is cooled and treated with DCHA to form the corresponding DCHA salt X.

SCHEME VIB



Compound H Scheme VI may also be prepared as shown in Scheme VIB by cyclopropanation of N-BOC 4,5-dehydroproline ethyl ester III as follows.

N-BOC 4,5-dehydroproline ethyl ester III is treated with diethyl zinc and chloro iodomethane in the presence of dry organic solvent such as toluene, methylene chloride or dichloroethane at a reduced temperature ranging from about -30 to about 0°C to form N-BOC 4,5-methanoproline ethyl ester XV.

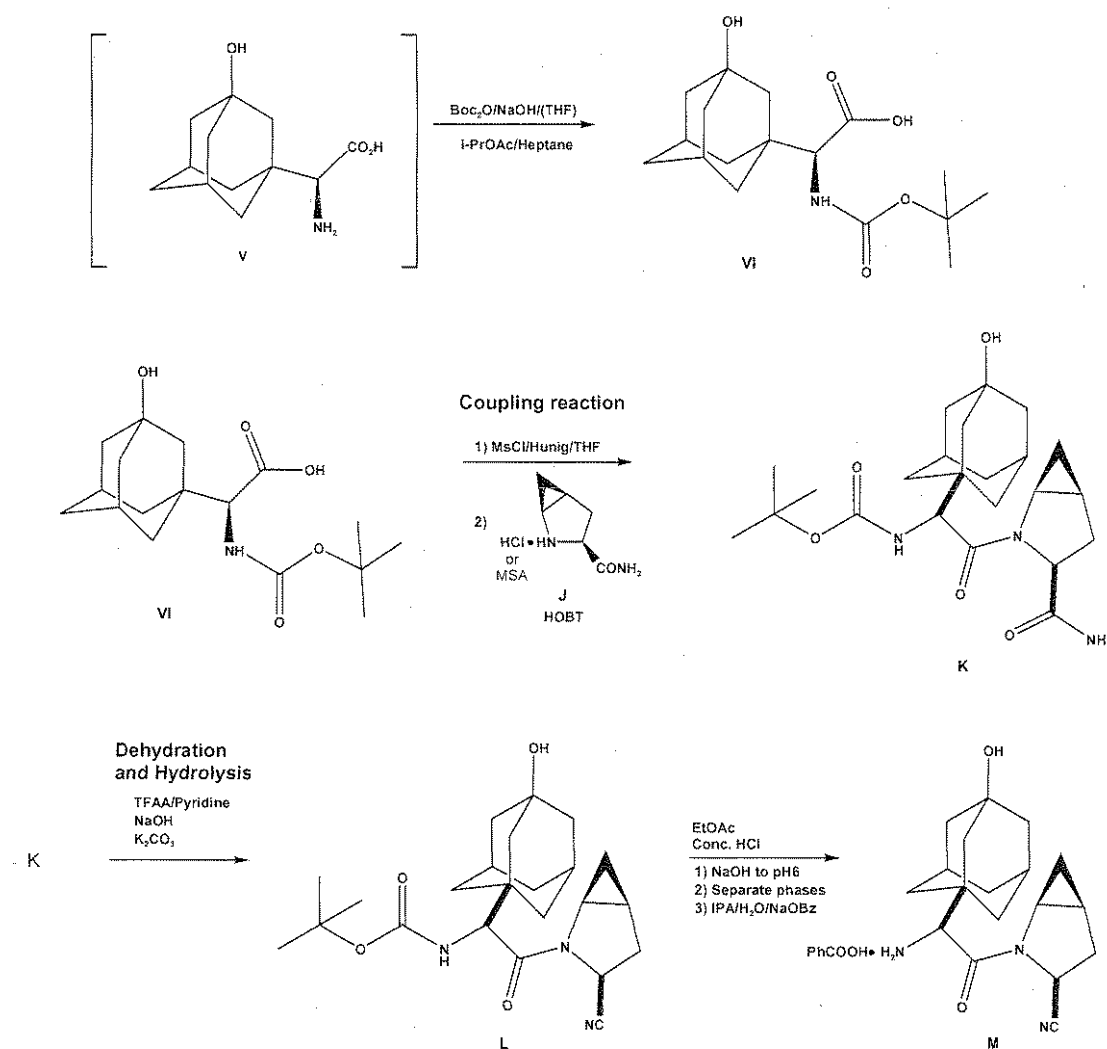
The resulting BOC 4,5-methanoproline ethyl ester XV (mixture of syn- and anti-isomers (8:1)) is separated by treating with aqueous methyl amine under an inert atmosphere such as a nitrogen atmosphere and syn (S)-BOC-4,5-methanoproline ethyl ester XVI (separated from XVII) is recovered.

The s-BOC-4,5-methanoproline ethyl ester XVI in ethanol or other organic solvent such as toluene or THF is treated with base such as aqueous lithium hydroxide, sodium hydroxide or potassium hydroxide to form the corresponding s-BOC-methanoproline free acid XVIII.

The free acid XVIII is converted to the corresponding s-BOC-methanoproline amide H by treating free acid XVIII dissolved in an organic solvent such as THF or methylene chloride; isobutyl chloroformate or mesyl chloride, in the presence of N-methyl morpholine, under reduced temperatures such as not to exceed about -8°C , and then treating the reaction mixture with ammonia to form the s-BOC-methanoproline amide H.

Another aspect of the present invention relates to a method for coupling the fragments (aS)- α -amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) and (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide (Formula J) to produce (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile, benzoate (1:1). Coupling of these fragments is depicted in Scheme VII below.

SCHEME VII

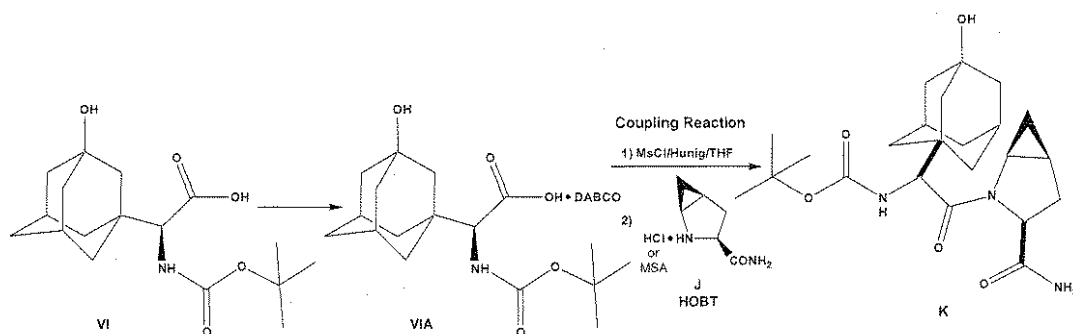


As shown in Scheme VII, the fragment (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) is first BOC protected to produce (aS)-a-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula VI) by treating V with Boc_2O in the presence of base such as sodium hydroxide and separated via ethyl acetate (EtOAc) extraction to separate out free acid VI. Alternatively, in place of ethyl acetate, isopropyl acetate/heptane may be employed to crystallize out free acid VI. In another embodiment, the compound of Formula V is used without isolation from a bioconversion using an isolated PDH/FDH enzyme concentrate as set out in Example 8A.

A solution of Formula VI compound in an appropriate organic solvent such as tetrahydrofuran (THF) (cooled to a temperature within the range from about -10 to about 0°C) is treated with methanesulfonyl chloride (Mesyl Cl), and Hunig base (diisopropylethylamine or DIPEA) to form the corresponding methanesulfonic acid salt of VI.

A coupling reaction is then used to couple (aS)-a-[[[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, (Formula VI) methanesulfonic acid salt to (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide (Formula J) in the presence of 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) or other known coupling agent to produce 3-(aminocarbonyl)-aS)-a-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-β-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-ethanecarbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula K). Formula K compound is subjected to dehydration by treating compound K with organic base such as pyridine or triethylamine and trifluoroacetic anhydride, and then subjecting the reaction to hydrolysis by cooling to from about 0 to about 10°C and adding sodium hydroxide or other strong base such as KOH or LiOH to form Compound L. 3-cyano-(aS)-a-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-β-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-ethanecarbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula L), which is then deprotected (and treated with sodium benzoate) to form the dipeptidyl peptidase IV inhibitor (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile, benzoate (1:1) (Formula M). Also see Examples 37 through 39 herein.

SCHEME VIIA

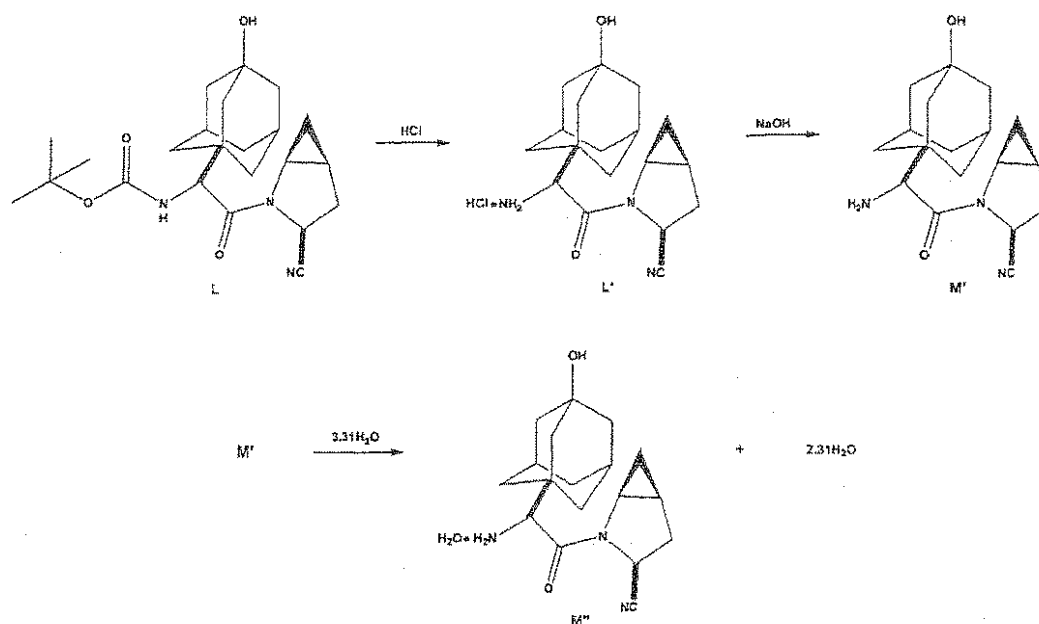


As shown in Scheme VIIA, compound K may also be prepared from the compound VIA (DABCO salt) as follows.

Formula VI acid is treated with 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane (DABCO) to form (aS)-a-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane salt (Formula VIA). A coupling reaction (as described in Scheme VIIA) is then used to couple (aS)-a-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane salt (Formula VIA) to (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide HCl or MSA salt (Formula J) in the presence of 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) or other known coupling agent to produce 3-(aminocarbonyl)-aS)-a-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-β-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-ethanecarbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula K).

Referring back to Scheme VII, compound L may be deprotected by treatment with strong acid such as hydrochloric acid as described with respect to Scheme VIIB.

SCHEME VIIB



Referring to Scheme VIIB, the free base monohydrate M'' may be formed from the BOC-protected intermediate L as follows.

BOC-protected intermediate L is treated with concentrated hydrochloric acid in the presence of methylene chloride and methanol while maintaining reaction temperature within the range from about 20 and 25°C, to form hydrochloride salt L'. Hydrochloride salt L' is treated with sodium hydroxide or other strong base to form the free base M'. Free base M' is then treated with water to form the free base monohydrate M''.

As will be understood by those of skill in the art upon reading this disclosure, the final product, the dipeptidyl peptidase IV inhibitor (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile, benzoate (1:1) (Formula M) or its corresponding free base M' or monohydrate M'' thereof can be produced using all the steps depicted in Schemes I, II, or III and IV, V, VI, VII and VIIA or only a portion of the steps depicted in any of Schemes I, II, or III and IV, V, VI, VII and VIIA depending upon which intermediate is selected as the starting material. For example, using the teachings of the present invention, one of skill in the art can routinely produce the cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitor (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-

hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile, benzoate (1:1) (Formula M) or the corresponding free base M' using 3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid of Formula II, (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid of Formula V, (aS)-a-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane salt of Formula VIA, or (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester of Formula IV as the starting material.

Thus, one of skill in the art can produce a cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitor of dipeptidyl peptidase IV simply by coupling (aS)-a-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, (Formula VI) (or its DABCO salt (Formula VIA)) to (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide (Formula J) to produce 3-(aminocarbonyl)-aS)-a-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-β-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-ethanecarbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula K); dehydrating 3-(aminocarbonyl)-aS)-a-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-β-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-ethanecarbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula K) to produce 3-cyano-(aS)-a-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-β-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-ethanecarbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula L); and hydrolyzing 3-cyano-(aS)-a-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-β-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-ethanecarbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula L) to form the dipeptidyl peptidase IV inhibitor. In this method, the starting materials comprise the fragments, (aS)-a-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, (Formula VI) (or its DABCO salt (Formula VIA)) and (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide (Formula J).

However, the method may further comprise steps for production of the fragment (aS)-a-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula VI) from the intermediate (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) via BOC protection. In this embodiment, the method may further comprise production of the (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) intermediate by

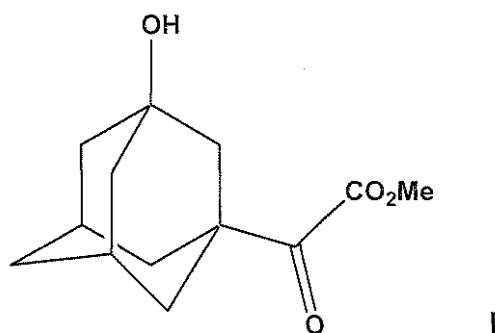
asymmetrically reducing 3-hydroxy- α -oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II) by enzymatic amination or transamination (see Scheme I or II).

Alternatively, the method may further comprise chemical synthesis of (α S- α -amino-3-hydroxy)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) from tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula N) in accordance with Scheme III.

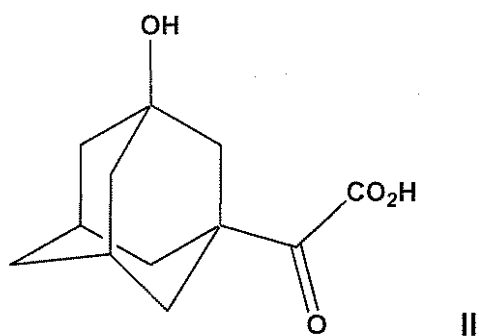
In addition, or alternatively, the method may further comprise steps for production of the fragment (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide (Formula J) by removal of BOC from the intermediate (1S,3S,5S)-3-aminocarbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula H). In this embodiment, the method may further comprise a step for production of (1S,3S,5S)-3-aminocarbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula H) by cyclopropanation, preferably via a Simmons-Smith reaction of (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester (Formula IV).

Another aspect of the present invention relates to new compounds identified herein as being useful intermediates in the production of cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. Compounds of the present invention useful as intermediates in the production of cyclopropyl-fused pyrrolidine-based inhibitors of dipeptidyl peptidase IV include:

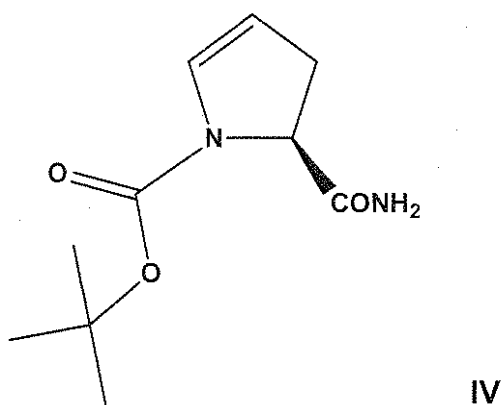
3-hydroxy- α -oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester as depicted in Formula I,



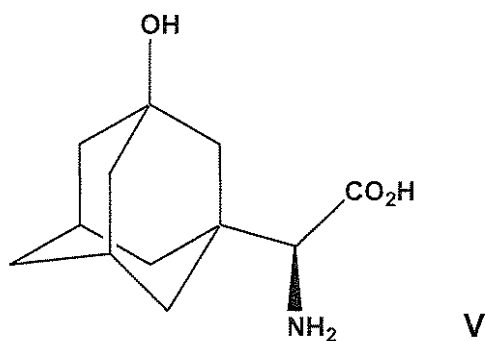
3-hydroxy- α -oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid as depicted in Formula II,



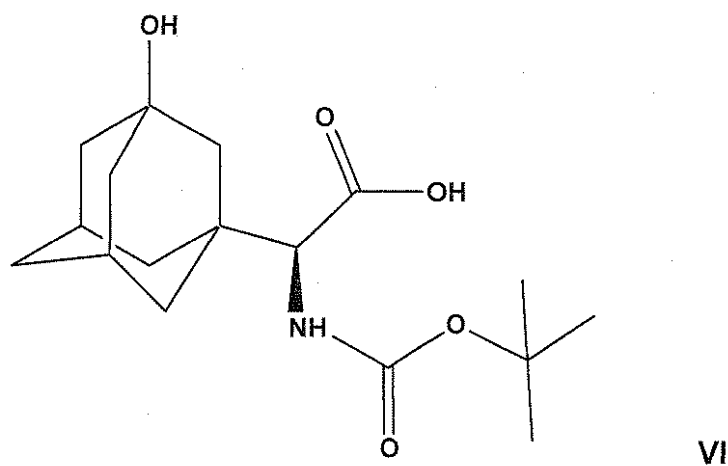
(5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester as depicted in Formula IV,



(aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid as depicted in Formula V,

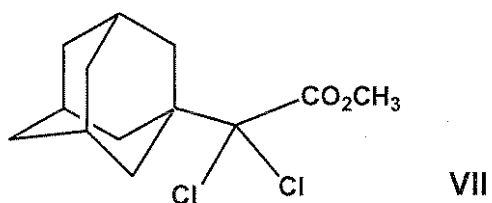


(aS)-a[[1-(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid as depicted in Formula VI,

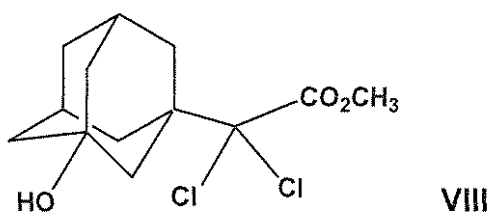


(or its DABCO salt VIA),

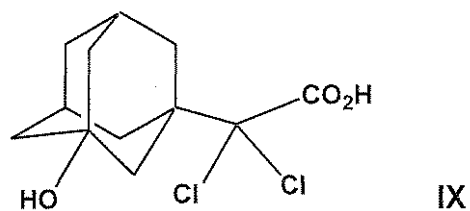
adamantan-1-yl-dichloro-acetic acid methyl ester as depicted in Formula VII,



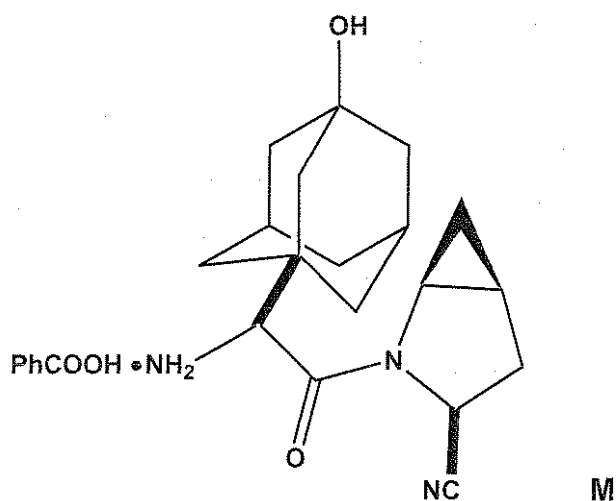
dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid methyl ester as depicted in Formula VIII, and



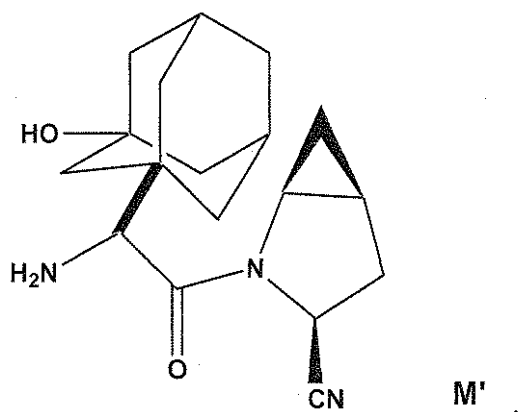
dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid as depicted in Formula IX.



In a preferred embodiment, as shown herein, these compounds are used as intermediates in the production of the dipeptidyl peptidase IV inhibitors (1*S*,3*S*,5*S*)-2-[(2*S*)-2-amino-2-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile, benzoate (1:1) as depicted in Formula M.



and preferably the corresponding free base or its monohydrate as depicted in Formulas M' and M'', respectively



or its monohydrate M'' (set out hereinbefore).

Dipeptidyl peptidase IV inhibition produced using the compounds and methods of the present invention are useful in the treatment of diabetes and complications thereof, hyperglycemia, Syndrome X, hyperinsulinemia, obesity, and atherosclerosis and related diseases as well as immunomodulatory diseases and chronic inflammatory bowel disease.

The following Examples represent preferred embodiments of the invention.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

Reductive amination using an extract from recombinant *Pichia pastoris* expressing phenylalanine dehydrogenase from *Thermoactinomyces intermedius* and producing an endogenous formate dehydrogenase

Recombinant *Pichia pastoris* frozen cells (2.25 kg) expressing phenylalanine dehydrogenase from *Thermoactinomyces intermedius* were added to deionized water (6.75L) containing ammonium formate (28.65 g, 0.454 moles). After thawing, the cells were suspended using a Janke and Kunkel Ultra-turrax T25 homogenizer, adjusted to pH 7 with concentrated NH_4OH and cooled with crushed ice to give a 25% w/v cell suspension in 50 mM ammonium formate. Cells were disrupted by 2 passages through a microfluidizer at 12000 psi and cell debris was removed by centrifugation at 20,000xg and 4°C. Supernatant, 7024 ml containing 230998 units or 124641 units of phenylalanine dehydrogenase activity as determined by Assay A (see Example 9) or Assay B (see Example 10), respectively, and 80080 units formate dehydrogenase were added to a 16 L vessel of a New Brunswick Scientific Bioflo IV bioreactor.

A 7024 ml solution was prepared containing ammonium formate (442.5 grams, 7.017 moles) and (3-hydroxy-adamantan-1-yl)-oxo-acetic acid (786.7 grams, 3.510 moles). The pH of this solution was adjusted to 8.0 with 276 ml concentrated ammonium hydroxide. Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD; 9.834 grams, 14.82 mmoles) and dithiothreitol (2.163 grams, 14.027 mmoles) were then added and the solution was added to the bioreactor containing the *Pichia pastoris* extract. The solution was maintained at 40°C and stirred at 150 rpm. Aliquots of concentrated ammonium hydroxide of 45, 25 and 27 ml were added at 0, 3 and 18 hours, respectively, after the start of the reaction to adjust the pH to 8.0. After 25 hours, the solution contained 818.9 grams (3.637 moles, 100% yield) (S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid as measured by HPLC analysis (see Example 8, Method 2) and no detectable keto acid or R-enantiomer of the amino acid.

(S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid was isolated via a procedure consisting of boiling the enzymatic transformation mixture to drive off

ammonia, adjusting to pH 3 with formic acid, filtration to remove precipitated proteins, sorption of the amino acid on Dowex 50 (H⁺) resin, elution with 1.5 M ammonia and concentration of the rich effluent to give (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid as a crystalline solid. The last run using this isolation procedure (787 grams ketoacid input) gave 804 grams of (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid with a potency of 94.3% and a yield of 96.0% from 3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid. All of the batches of (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid isolated by this procedure performed well in subsequent reactions en route to (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile, benzoate.

EXAMPLE 2

Reductive amination using heat-dried cells from recombinant *Pichia pastoris*

A solution was prepared containing in a final volume of 4.0 ml at pH 8.0 (pH adjusted with NH₄OH): 0.50 M ammonium formate, 0.25 M (3-hydroxy-adamantan-1-yl)-oxo-acetic acid, 1.06 mM NAD, 1.00 mM dithiothreitol, and 250 mg recombinant *Pichia pastoris* heat-dried cells containing 32.7 units, as determined by Assay A, phenylalanine dehydrogenase and 24.6 units formate dehydrogenase. Preparation of *Pichia pastoris* heat-dried cells has been described by Hanson et al. (Enzyme and Microbial Technology 2000 26:348-358). The solution was incubated in a 50 ml Erlenmeyer flask at 40°C, 100 rpm for 4 days, then analyzed by HPLC. The solution contained 45.02 mg/ml (80% yield) (S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid.

EXAMPLE 3

Reductive amination using wet cells from recombinant *Pichia pastoris*

A solution was prepared containing in a final volume of 3.0 ml at pH 8.0 (pH adjusted with NH₄OH): 0.415 M ammonium formate, 0.208 M (3-hydroxy-adamantan-1-yl)-oxo-acetic acid, 0.88 mM NAD, 0.84 mM dithiothreitol, and 12.5% w/v *Pichia pastoris* wet cells containing 6.06 units phenylalanine dehydrogenase, as determined by Assay A, and 12.8 units formate dehydrogenase.

The solution was incubated in a 50 ml Erlenmeyer flask at 40°C, 200 rpm for 68 hours, then analyzed by HPLC. The solution contained 31.9 mg/ml (68% yield) (S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid.

EXAMPLE 4

Reductive amination using recombinant *Escherichia coli* heat-dried cells expressing phenylalanine dehydrogenase from *Thermoactinomyces intermedius* and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*

A solution was prepared containing in a final volume of 4.0 ml at pH 8.0 (pH adjusted with NH₄OH): 0.50 M ammonium formate, 0.25 M (3-hydroxy-adamantan-1-yl)-oxo-acetic acid, 1.06 mM NAD, 1.00 mM dithiothreitol, 2.55 units/ml (0.51 units/mg) formate dehydrogenase from *Candida boidinii* (Boehringer Mannheim), and 250 mg recombinant *Escherichia coli* heat-dried cells containing 76 units, as determined by Assay A, phenylalanine dehydrogenase. The solution was incubated in a 50 ml Erlenmeyer flask at 40°C, 100 rpm for 4 days, then analyzed by HPLC. The solution contained 7.69 mg/ml (13.7% yield) (S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid.

EXAMPLE 5

Reductive amination using recombinant *Escherichia coli* wet cells and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*

A solution was prepared containing in a final volume of 3.0 ml at pH 8.0 (pH adjusted with NH₄OH): 0.415 M ammonium formate, 0.208 M (3-hydroxy-adamantan-1-yl)-oxo-acetic acid, 0.88 mM NAD, 0.84 mM dithiothreitol, 1 unit/ml (0.51 units/mg) formate dehydrogenase from *Candida boidinii* (Boehringer Mannheim), and 12.5% w/v *Escherichia coli* wet cell containing 97 units, as determined by Assay A, phenylalanine dehydrogenase. The solution was incubated in a 50 ml Erlenmeyer flask at 40°C, 200 rpm for 68 hours, then analyzed by HPLC. The solution contained 5.16 mg/ml (11.0% yield) (S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid.

EXAMPLE 6**Reductive amination using phenylalanine dehydrogenase from *Sporosarcina species* and formate dehydrogenase from *Candida boidinii***

A solution was prepared containing in a final volume of 1.0 ml at pH 8.5 (pH adjusted with NH₄OH: 0.15 M ammonium formate, 0.05M (11.2 mg/ml) (3-hydroxy-adamantan-1-yl)-oxo-acetic acid, 1 mM NAD, 1 mM dithiothreitol, 0.51 units/ml (0.51 units/mg) formate dehydrogenase from *Candida boidinii* (Boehringer Mannheim) and 1.01 units/ml phenylalanine dehydrogenase (14.5 units/mg; Sigma Chemical Co.) from *Sporosarcina species*. The solution was incubated at 30°C for 20 hours, then analyzed by HPLC. The solution contained 0.31 mg/ml (2.74% yield) (S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid.

EXAMPLE 7**Construction of plasmid pBMS2000-PPFDH-PDHmod**

A two-step construction of the expression vector pBMS2000-PPFDH-PDHmod was employed. The *P. pastoris* FDH gene was subcloned into expression vector pBMS2000 (pBMS2000 is disclosed in U.S. Patent No. 6,068,991, issued May 30, 2000 to S.W. Liu et al.) using oligonucleotide primers containing the 5' and 3' end of the *P. pastoris* FDH gene along with compatible restriction endonuclease cleavage sites:

5' TCGTCATGAAAATCGTTCTCGTTTTG 3' (5' end; sense;SEQ ID NO:1)

*Bsp*HI

5' TACTGTTTTTCCAGCGTATTCCTAGGCT 3' (3' end; anti-sense;SEQ ID NO:2)

*Bam*HI

High-fidelity PCR amplification of the *P. pastoris* FDH gene was carried out in four 100 µl aliquots, each containing 1 X TaqPlus reaction buffer (Stratagene, LaJolla, CA), 0.2 mM each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), 0.4 nM each oligonucleotide, 2.5 U TaqPlus DNA polymerase (Stratagene), and 10 pg plasmid DNA containing the cloned *P. pastoris* FDH gene. The amplification conditions included incubation at 94°C for 4 minutes, followed by 25 cycles of

incubation at 94°C for 1 minute; 50°C for 1 minute; and 72°C for 1.5 minutes, using a Perkin-Elmer Model 480 thermocycler with autoextension.

The PCR reaction mixture was extracted with an equal volume of 1:1 phenol:chloroform (GibcoBRL, Gaithersburg, MD), and centrifuged at 13,000 x g for 5 minutes. The upper aqueous phase was removed and placed in a new microcentrifuge tube. DNA was precipitated by addition of 0.1 volumes 3 M sodium acetate and 2 volumes ice-cold ethanol. After centrifugation at 13,000 x g for 5 minutes, liquid was aspirated from the tube, and the pellet washed with 0.5 ml ice-cold 70% ethanol. Liquid was aspirated again, and the pellet was allowed to air dry for 30 minutes at room temperature.

Amplified DNA was digested with 20 units each of *Bsp*HI and *Bam*HI for 3 hours at 37°C in a total volume of 50 µl. In parallel, the pBMS2000 vector (2 µg) was digested with *Bsp*HI and *Bam*HI. The digested samples were electrophoresed on a 1.0% TAE agarose gel for 2 hours at 100 v. The bands corresponding to the FDH gene (1100-base pair fragment) and linearized vector (4700-base pair fragment) which were separately excised from the gel and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, CA). The concentrations of the isolated fragments were estimated by electrophoresis against the low molecular weight mass ladder (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) and ligated in a 5:1 (insert:vector) molar ratio in a total volume of 10 µl at 22°C for 2 hours. DNA was precipitated by addition of 15 µl dH₂O and 250 µl 1-butanol, and pelleted at 13,000 x g in a microcentrifuge for 5 minutes. Liquid was removed by aspiration, and the DNA was dried in a SpeedVac (Savant Instruments, Farmingdale, NY) for 5 minutes under low heat. The pellet was resuspended in 5 µl dH₂O.

The resuspended DNA was transformed by electroporation into 0.04 ml *E. coli* DH10B competent cells (Invitrogen) at 25 µF and 250 Ω. SOC medium was immediately added (0.96 ml; SOC = 0.5% yeast extract, 2% tryptone, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, and 20 mM glucose per liter), and the cells incubated in a shaker for 1 hour at 37°C and 225 rpm. Colonies contain plasmid DNA were selected on LB agar plates containing 50 µg/ml kanamycin sulfate (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). Plasmids with the desired insert were identified by

colony PCR in capillary tubes using the RapidCycler (Idaho Technology, Salt Lake City, UT). Each reaction mixture contained 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 4 mM MgCl₂, 0.25 mg/ml bovine serum albumin, 2% sucrose 400, 0.1 mM cresol red, 0.4 nM each primer (SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2), and 2.5 U Taq DNA polymerase (Promega Corp., Madison, WI). The reaction mixture was divided into 10 µl aliquots, and pipetted into the wells of a round-bottom microtiter plate. A kanamycin-resistant colony was picked using a disposable plastic inoculation needle, swirled into the reaction mixture, and transferred to LB-kanamycin agar. Each reaction mixture aliquot was drawn into a 30 µl capillary tube, and the tube was flame-sealed at both ends. Cells were lysed and DNA denatured by incubation at 94°C for 30 seconds; amplification was performed using 30 cycles of incubation at 94°C for 0 seconds; 40°C for 0 seconds, and 72°C for 60 seconds using a RapidCycler Thermocycler (Idaho Technologies, Salt Lake City, UT). Samples were electrophoresed on a 1.0% TAE agarose gel for 2 hours at 100 v. Seven samples out of 17 tested showed a strong band at 1100 base pairs. One colony containing this plasmid (referred to herein as pBMS2000-PPFDH) was chosen for the next step in the plasmid construction.

“PDHmod” refers to a modified *Thermoactinomyces intermedius* phenylalanine dehydrogenase that differs from the published DNA sequence (Takada *et al.*, J. Biochem. 109, pp. 371-376 [1991]) by a change of the last two amino acids and an additional 12 amino acids at the carboxyl terminus that is required for complete conversion of (3-hydroxy-adamantan-1-yl)-oxo-acetic acid to (S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid. This change was introduced into plasmid pPDH9K/10 (described in detail by in patent WO 200004179, issued to Donovan *et al.*, January 27, 2000), which was subsequently transformed into *P. pastoris* SMD1168 (deposited as strain ATCC 74408).

3' end of native PDH gene and corresponding amino acids:

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

3' end of PDHmod gene and corresponding amino acids (changed or new amino acids in bold):

AAC	AGC	GCG	GAG	GGG	TAC	CTC	GAG	CCG	CGG
Asn	Ser	Ala	Glu	Gly	Tyr	Leu	Glu	Pro	Arg
CGG	CCG	CGA	ATT	AAT	TCG	CCT	TAG		
Arg	Pro	Arg	Ile	Asn	Ser	Pro	Stop		

Oligonucleotide primers containing the 5' and 3' end of the PDHmod gene along with compatible restriction endonuclease cleavage sites were prepared:

GATGCTCATATGCGCGACGTGTTTGAAATGATG (5' end, sense; SEQ ID NO:3)

NdeI

GATCCCGGGCTAAGGCGAATTAATAATTCG (3' end, anti-sense; SEQ ID NO:4)

SmaI

Reaction conditions for amplification and purification of the PDHmod by PCR were identical to that used for the *P. pastoris* FDH gene except chromosomal DNA prepared from ATCC 74408 was included as template for the reaction. The resulting fragment was digested with 20 units each of *NdeI* and *SmaI* for 1 hour at 25°C, followed by 2 hours at 37°C, in a total volume of 50 µl. In parallel, a version of the pBMS2000 vector with an *NdeI* site at the initiation codon (2 µg) was digested with *NdeI* and *SmaI* using identical conditions. The digested samples were separately electrophoresed on a 1.0% TAE agarose gel for 2 hours at 100 v. The bands corresponding to the PDHmod gene (1200-base pair fragment) and linearized vector (4700-base pair fragment) were excised from the gel and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Ligation of the two fragments, transformation of *E. coli*, and screening for colonies containing inserts with the PDHmod gene (forming pBMS2000-PDHmod) were performed as described *supra*.

For construction of pBMS2000-PPFDH-PDHmod, pBMS2000-PDHmod (2 µg) was cleaved with 10 U each *HindIII* and *SmaI* in a 50 µL reaction for 1 hour at 25°C, followed by 1 hour at 37°C. Ten units of T4 DNA polymerase (Invitrogen) and 2 µL of a 2.5 mM mixture of all four deoxyribonucleoside triphosphates were added and the sample incubated at 11°C for 20 minutes. The reaction was electrophoresed

on a 1.0% TAE agarose gel for 2 hours at 100 v. The 1800-base pair fragment was excised and isolated using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). This fragment contains, in order, the *tac* promoter, *groES* gene, and the PDHmod gene (as a transcriptional fusion). Next, pBMS2000-PPFDH (2 µg) was digested with 10 units restriction endonuclease *Sma*I in a 50 µL volume for 2 hours at 25°C, then treated with 0.4 U shrimp alkaline phosphatase (United States Biochemicals, Cleveland, OH) for 1 hour at 37°C. Plasmid DNA was electrophoresed for 2 hours at 100 v on a 1.0% TAE agarose gel, isolated, and extracted with the QIAquick kit. The two fragments were ligated in a 6.5:1 (insert:vector) molar ratio at 16°C for 4 hours in a 10 µL final volume. After 1-butanol extraction and centrifugation, the DNA was transformed into electrocompetent DH10B cells. Kanamycin-resistant colonies were screened for the presence of the PDHmod gene with the two PDHmod-specific primers as previously described for FDH. A second round of PCR screening was conducted by using DNA primers homologous to the 5' end of the PPFDH and 3' end of the PDHmod gene, respectively. Only those constructs able to support amplification of a 1400-base pair fragment possessed the two genes in the same orientation. One such plasmid was found and the orientation confirmed by diagnostic restriction digestion with *Kpn*I, which gave the expected fragments of 5422 and 1826 base pairs. This plasmid was designated "pBMS2000-PPFDH-PDHmod."

EXAMPLE 8

Expression of FDH and PDHmod

pBMS2000-PPFDH-PDHmod was transformed into *Escherichia coli* JM110. In shake-flasks studies, JM110(pBMS2000-PPFDH-PDHmod) was grown for 18 hours at 28°C, 250 rpm in MT5 medium (2.0% Yeastamine, 4.0% glycerol, 0.6% sodium phosphate [dibasic], 0.3% potassium phosphate [monobasic], 0.125% ammonium sulfate, 0.0256% magnesium sulfate [heptahydrate; added post-autoclaving from a sterile 1M solution], and 50 µg/ml kanamycin sulfate [added post-autoclaving from a filter-sterilized 50 mg/ml solution]). The optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was recorded and cells sufficient to give a starting OD₆₀₀ of 0.35 were added to fresh MT5/kanamycin medium. Flasks were shaken at 250 rpm, 28°C until the

OD₆₀₀ was 0.8-1.0. Expression of both genes was induced by addition of filter-sterilized 1M isopropylthio- β -D galactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 35 μ M and the fermentation continued for 24-48 hours. Cells were pelleted by centrifugation at 6,500 x g for 5 minutes, washed once with an equal volume of 50 mM ammonium formate pH 7.0, and repelleted. Cells were stored frozen at -20°C or used immediately. The pellet was resuspended in 50 mM ammonium phosphate, pH 7.0 at 10 mL/g wet cell weight and sonicated 3 x 15 seconds using a Fisher Scientific Model 50 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), power setting 15 with a microtip. Debris was pelleted by centrifugation at 13,000 x g for 5 minutes at room temperature.

Expression was examined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). One μ L of the cell extract was mixed with 5 μ L of 4X NuPAGE™ LDS buffer (Invitrogen) and brought up to 19 mL with distilled water. Samples were heated at 70°C for 10 minutes. One mL of a 1M dithiothreitol solution was added to the mixture and 10 μ L applied to a 10% NuPAGE™ Bis-Tris polyacrylamide mini-gel. Electrophoresis was carried out at 200 v for 50-60 minutes and the gel stained in a solution consisting of 0.1% (w/v) Coomassie Blue (Sigma), 40% (v/v) ethanol, and 10% (v/v) acetic acid. The gel, immersed in the stain, was heated in a microwave oven until boiling was evident, then shaken at 40 rpm on an orbital shaker for 15 minutes. The gel was washed thoroughly with deionized water and covered with destaining solution (GelClear™ ; Invitrogen). The solution was again heated just to the point of boiling and shaken gently for at least 2 hours. Two prominent bands at M_r 43,000 and 40,000 were seen upon induction, corresponding to the expected molecular weight of the subunits of FDH and PDHmod. Samples were also found to possess both FDH and PDH activities when tested as described in Example 10. This recombinant *E. coli* strain was given the internal designation of SC 16496.

SC 16496 was subsequently fermented at 15- and 250-liter volumes. For a 15-liter fermentation, one vial containing 1 mL of frozen SC 16496 was thawed at room temperature and added to 1 liter of MT5 medium containing 50 μ g/ml kanamycin in a 4-liter flask. The flask was incubated at 28°C , 250 rpm for 24 hours and transferred to

13 liters of MT5 medium (ingredients batched based on a final volume of 15 L) in a Braun fermentor. Kanamycin sulfate and magnesium sulfate heptahydrate sufficient to give a final concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ and 0.0246%, respectively, were dissolved in 500 mL distilled water and filter-sterilized through a 0.2 micron cellulose acetate filtration unit. The solution was added to the tank, followed immediately by the inoculum. The initial OD_{600} was ca. 0.35.

Fermentation operating parameters were as follows:

16 liter working volume

Temperature: 28°C

Aeration: 1.0 vvm

Pressure: 690 mbar

Agitation: 500 rpm

Control pH at 6.8 with NH_4OH as required

Foaming was controlled by addition of UCON (a fluorocarbon solvent blend produced by Dow Chemical Company) on demand.

At OD_{600} 0.8-1.0 (approximately two hours after inoculation), filter-sterilized IPTG (dissolved in 500 mL dH_2O) was added aseptically to give a final concentration of 35 μM . The fermentation continued for an additional 48 hours, whereupon the contents of the tank were subcooled to 10°C. Cells were collected by centrifugation and rinsed once with 0.1 vol 50 mM ammonium formate pH 7.0. The cell paste was placed into plastic containers and stored at -70°C until needed.

For 250-L tanks, the inoculum was prepared as follows: 1 mL of frozen SC 16496 was thawed and added to 300 mL MT5 medium with 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin. The flask was grown at 28°C, 250 rpm for 24 hours. The OD_{600} was determined and the appropriate volume of cells to give 80 OD units was removed and added to 250 mL fresh MT5 medium. The cells were aseptically added to 10 L of MT5/kanamycin medium in a Braun fermentor (initial $\text{OD}_{600} \sim 0.008$) and grown under the Fermentation Operating Parameters disclosed *supra* for 16 hours. The culture was then transferred to 250 L of MT5 containing the appropriate concentrations of kanamycin and magnesium sulfate. Based on the 90 minute doubling time of SC 16496 under these conditions, 10 L of inoculum in 250 L should give a starting OD_{600}

of 0.30-0.35. Induction, growth, harvesting, and storage were carried out as described for the 15-L fermentation.

EXAMPLE 8A

Telescoped production of (α S)- α -[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decane-1-acetic acid (Formula VI) from 3-hydroxy- α -oxotricyclo-[3.3.1.1^{3,7}] decane-1-acetic acid (Formula II) through (α S)- α -amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decane-1-acetic acid (Formula V) using an isolated PDH/FDH enzyme concentrate

Step 1: Isolation of PDH/FDH enzyme concentrate

Fermentation broth (30 liters) of *Escherichia coli* JM110(pBMS2000-PPFDH-PDHmod) was obtained from a 4000L tank fermentation and passed through a microfluidizer (Microfluidics model M-110Y, operating pressure 12,000-20,000 psi) (one pass) to release the activity from the cells keeping the temperature of the broth below 40°. The PDH/FDH activity of microfluidized broth was 32 IU/ML for PDH and 8 IU/ml for FDH.

To clarify the whole broth, 4.5kg of Celite was added to well-stirred broth. Then 0.201 liters of 30% aq. polyethyleneimine was added and mixed for 30 minutes. The mixture was then filtered using a filter press (Ertel Alsop model 8-ESSC-10) and 18 liters of filtrate was obtained. The filter cake was washed with 12 liters of water to bring the volume back to 30 liters. The step yield was 97% activity recovery of PDH with an activity of 31 IU/ml and a FDH activity of 8 IU/ml.

The clarified broth was ultrafiltered through a 100,000 MWCO filter cassette (Millipore Pellicon 2 unit, polyethersulfone low protein binding cassette, 0.5 m² filter area). The circulation rate of the pump was 400 mL/min. The clarified filtrate was concentrated to 1.5 liters and gave an enzyme concentrate with PDH titer of 567 IU/ml and FDH titer of 136 IU/ml. The permeate was assayed and no activity was found. The overall enzyme activity recovery in the concentrate was 84%.

Step 2: Reductive amination

3-Hydroxy- α -oxotricyclo-[3.3.1.1^{3,7}] decane-1-acetic acid (Formula II) (1.00 kg; 4.46mol) was added to a 20L vessel followed by water (5L). The mixture was stirred and the pH was adjusted to pH~8 with 10N NaOH to give a solution. Darco KBB carbon (100g) was added and the mixture was stirred for 5 minutes then filtered through a Buchner funnel with 5 μ filter paper. The filter was washed with water (2x1L) and the filtrates and washes were combined to give a clear solution.

With stirring, ammonium formate (0.562Kg; 8.92 mol) was added and the pH was re-adjusted to ~7.5 with 10N NaOH. Nicotinamide adenine dinucleotide (2.65g) and dithiothreitol (1.54g) were added. When the solids had dissolved, a PDH/FDH enzyme concentrate was added (1.03L; 500,000IU of PDH). The pH was re-adjusted to ~8.0 with 10N NaOH at ambient temperature.

The mixture was then warmed to ~40°C and diluted to a total volume of 10L with water. The pH was maintained at 7.7-8.3 while stirring over 42 hours. The resulting solution contained 0.955 Kg (95.1%) of the product (α S)- α -amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decane-1-acetic acid (Formula V).

Step 3: BOC-protection

Di-tert-butyl dicarbonate (1.022kg; 4.68mol) was added to a portion of the solution of (α S)- α -amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decane-1-acetic acid (Formula V) (477.5g; 2.12mol). This mixture was stirred at ambient temperature, with pH adjusted to and maintained at 10 with a pH stat titrator using 10N NaOH. The reaction was complete 4hrs after Boc₂O addition when there was less than 1.0% starting material remaining.

The pH of the mixture was adjusted to ~8 with 35% H₂SO₄ and i-PrOAc (5.0L) was added to the mixture. The pH of the mixture was then adjusted to 2.0 with 35% H₂SO₄ and maintained at this pH for 5-10 min. Dicalite (250g) was added; the mixture was stirred for ~10min, and then filtered through a pad of Dicalite (250g) on filter paper in a Buchner funnel. The Dicalite pad was further washed with 2.5L i-PrOAc.

The filtrate was adjusted to pH 8 with 10N NaOH. After settling for 1hr, the organic layer including interface was discarded. To the aqueous layer, i-PrOAc (7.5L) was added. The mixture was acidified with 35% H₂SO₄ to pH~2, and then heated to and maintained at ~40°C for 4 hours with mild stirring. The layers were separated and the organic extract was saved. The aqueous layer with interface was extracted with i-PrOAc (3.75L) and the layers were again separated after 2hrs at 40°C. The aqueous layer with interface was extracted again with i-PrOAc (3.75L) and the layers were separated after 2hrs at 40°C.

The combined organic extracts (~15L) were concentrated by distillation to ~4.5L. To this solution, heptane (~10L) was then added over 10-15min while the temperature was maintained at ~82-89°C. The reactor jacket temperature was set to 70°C and maintained at this temperature for 1hr. Crystallization occurred shortly after cooling. The reactor jacket temperature was then set at 40°C and maintained at this temperature for 30 min.

The suspension was cooled down to ambient temperature, and then further cooled to 0-5°C. After one hour of stirring at 0-5°C, the product was filtered. The product was washed with heptane (2.5L), then dried in *vacuo* at 40°C to give 607.0g (88% yield) of (α S)- α -[[1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decane-1-acetic acid (Formula VI).

EXAMPLE 9

Reductive amination using an extract from recombinant *Escherichia coli* SC16496 JM110[pBMS2000-PPFDH-PDHmod] (ATCC Deposit PTA-4520)

Recombinant *Escherichia coli* frozen cells (25 grams) were added to deionized water (sufficient to bring the final volume to 100 ml and containing 5 ml 1 M ammonium formate). After thawing, the cells were suspended using a Janke and Kunkel Ultra-turrax T8 homogenizer then adjusted to pH 7 with concentrated NH₄OH and cooled with crushed ice to give a 25% w/v cell suspension in 50 mM ammonium formate. Cells were disrupted by 2 passages through a microfluidizer at 12000 psi and cell debris was removed by centrifugation at 20,000xg and 4 °C. 266 ml supernatant

containing 2456 u (assay A) or 768 u (assay C) phenylalanine dehydrogenase and 8801 u formate dehydrogenase was added to a 1-L bottle.

A 266 ml solution was prepared containing ammonium formate (16.74 g, 0.2654 moles) and (3-hydroxy-adamantan-1-yl)-oxo-acetic acid (29.76 g, 0.1327 moles) and brought to pH 8.0 with 12.7 ml concentrated ammonium hydroxide. NAD (372 mg, 0.561 mmoles) and dithiothreitol (81.8 mg, 0.530 mmoles) were added, then the solution was added to the bottle containing the *Escherichia coli* extract. The bottle was maintained at 40° on a shaker at 40 rpm. Concentrated ammonium hydroxide was added periodically to maintain pH 8.0 After 38 hours, the solution contained 31.5 grams (0.140 moles, 100% yield) (S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid as measured by HPLC analysis and no R-enantiomer of the amino acid.

EXAMPLE 10

Reductive amination using freeze dried cells from recombinant *Escherichia coli* SC16496 JM110[pBMS2000-PPFDH-PDHmod] (ATCC Deposit PTA-4520)

The solution contained in a final volume of 10.0 ml at pH 8.0 (pH adjusted with NH₄OH): 0.50 M ammonium formate, 0.237 M (3-hydroxy-adamantan-1-yl)-oxo-acetic acid, 1.00 mM NAD, 1.00 mM dithiothreitol, and 975 mg freeze dried recombinant *Escherichia coli*. The cells were dried to 26% of the wet weight. Before drying the cells contained 65.04 units/g (assay A) phenylalanine dehydrogenase, (or 12.79 unit/g by assay C phenylalanine dehydrogenase), and 133.32 units/g formate dehydrogenase. The solution was incubated in a tightly sealed 50 ml Erlenmeyer flask at 40° C, 100 rpm for 3 days, then analyzed by HPLC. The solution contained 49.06 mg/ml (92.13.0% yield) (S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid.

EXAMPLE 11

Transamination using branched chain transaminase

A solution was prepared containing in a final volume of 1.0 ml in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0: 0.10 M sodium glutamate, 0.05 M (3-hydroxy-adamantan-1-yl)-oxo-acetic acid (neutralized with 0.05 M NaOH), 0.1 mM pyridoxal phosphate, and 1 mg branched chain transaminase (Biocatalytics). The solution was incubated in a microfuge tube at 37° for 68 hours, then analyzed by HPLC. The

solution contained 5.53 mg/ml (49.2% yield)(S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid and 7.05 mg/ml remaining (3-hydroxy-adamantan-1-yl)-oxo-acetic acid.

EXAMPLE 12

HPLC Assay of (S)-amino-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid Enantiomeric Excess and Amount

Samples were diluted with water to about 2 mg/ml concentration and placed in a boiling water bath for 1 minute to stop reactions and precipitate proteins. After cooling, the samples were filtered through 0.2 micron nylon filters into HPLC vials.

Two separation methods were used.

Method 1:

column: Chiralpak WH 25x0.46 cm (Daicel Industries, Ltd.).

mobile phase: 0.3 mM CuSO₄

flow rate: 1 ml/minute

column temperature: 50°C

detection: diode array detector (DAD) set at 240 nm

injection volume: 10 µl

S-enantiomer ((aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid)

retention time: 79.9 minutes

R-enantiomer retention time: 32.8 minutes

Method 2:

column: Regis Davankov Ligand Exchange 15x0.46 cm

mobile phase: 25% methanol/75% 6 mM CuSO₄

flow rate: 1 ml/minute

column temperature: 40°C

detection: DAD set at 240 nm

injection volume: 10 µl

S-enantiomer (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid)

retention time: 3.2 minutes

R-enantiomer retention time: 11.2 minutes

Ketoacid (3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid) retention time: 5.2 minutes

EXAMPLE 13

Phenylalanine dehydrogenase Assay A

Phenylalanine dehydrogenase assay A contained in 1 ml at 40°C: 0.4 mM NADH, 5 mM sodium phenylpyruvate, 0.75M NH₄OH adjusted to pH 8.75 with HCl. Absorbance decrease was monitored at 340 nm. Enzyme activity units were calculated as μmoles/minute based on the rates of absorbance change.

EXAMPLE 14

Phenylalanine dehydrogenase Assay B

Phenylalanine dehydrogenase assay B contained in 1 ml at 40°C: 1 mM NAD, 10 mM L-phenylalanine, 0.1 M K₂HPO₄ adjusted to pH 10.0 with 1 N NaOH. Absorbance increase was monitored at 340 nm. Enzyme activity units were calculated as μmoles/minute based on the rates of absorbance change.

EXAMPLE 15

Phenylalanine dehydrogenase Assay C

Phenylalanine dehydrogenase assay C contained in 1.0 mL at 40° C: 0.4 mM NADH, 50 mM 3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (dissolved in 1 equivalent NaOH solution), 0.75M NH₄OH adjusted to pH 8.75 with HCl. Absorbance decrease was monitored at 340 nm. Enzyme activity units were calculated as μmoles/minute based on the rates of absorbance change.

EXAMPLE 16

Formate dehydrogenase Assay

The formate dehydrogenase assay contained in 1.0 ml at 40°C: 1 mM NAD, 100 mM ammonium formate, 100 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0. Absorbance increase was monitored at 340 nm. Enzyme activity units were calculated as μmoles/minute based on the rates of absorbance change.

EXAMPLE 17**Bromination of tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula N) to
 α -bromotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula O)**

Solid tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula N) (288 grams; 1.48 mole) was suspended in thionyl chloride (465mL) in a 3-necked round bottomed flask, equipped with a condenser. Dimethylformamide (DMF;0.3 mL) was added and the suspension was stirred at room temperature for 1.5 hours. Completion of the reaction was checked by gas chromatography. Solid NBS (307 g) was then added portionwise to the reaction mixture and the reaction mixture was heated to 60°C. The reaction was stirred for 3 hours while maintaining the temperature at 60 to 65°C. Monitoring by gas chromatography was performed to ensure the completion of the reaction. Heptane (900mL) was added to the reaction mixture. Excess thionyl chloride was distilled off at 78-80°C. Water was then added cautiously (violent reaction) to quench the reaction (total volume 1050 mL). Heptane (500 mL) and water (600mL) were then added and the aqueous layer was separated from the organic layer. The organic layer was washed with additional water (600 mL) and the aqueous layer was again separated from the organic layer. Additional water (150 mL) was added to the organic heptane layer and the heptane was distilled off from the aqueous layer. Specifically, 70 mL of water co-distilled with heptane. After distilling off the heptane, tetrahydrofuran (THF;1200 mL) was added to the aqueous layer and the resulting mixture was stirred vigorously at room temperature for 16 hours for slow hydrolysis. Monitoring via gas chromatography indicated the presence of some unreacted acid chloride. Addition water (150 mL) was then added to speed up the hydrolysis and the reaction was monitored by gas chromatography to ensure completion. The THF was then distilled off yielding a biphasic (water and oil) reaction mixture. Seeds were then added and the reaction was allowed to reach room temperature so that a heavy solid comes out. Water (250 mL) and acetonitrile (500 mL) were added to keep the suspension stirrable as the suspension was stirred for 2 hours at room temperature. The solid was then filtered off and washed with acetonitrile (2X250 mL). This filtrate contained the first crop of α -bromotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula

O); 264 grams with AP 95 in 66% yield after drying *in vacuo* at room temperature. The mother liquor (113 gram residue) was then triturated the residue with water and acetonitrile (250 mL/250 mL) for 1-2 hours at room temperature. The reaction was then filter and the solid dried to obtain a second crop of α -bromotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula O); 64 grams with AP 90 in 16 % yield.

EXAMPLE 18

Preparation of α -bromo-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula Q) from α -bromotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula O)

An Erlen-Meyer flask was charged with 315 ml of 95-98% H₂SO₄ and then cooled to 8°C in an ice bath. HNO₃ (35 ml of 50% prepared by adding 50 ml of 70% HNO₃ to 30 ml of water) was then added to the flask while maintaining the mixture in an ice bath at 8°C. Solid α -bromotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula O) (92 grams, 0.338 moles) was then added to the mixture in portions over approximately 30 to 60 minutes so that the temperature stayed under 28°C. The reaction was then stirred while heating to 60°C until a clear solution was obtained.

Progress of the reaction was monitored by either thin layer chromatography (TLC) or high performance liquid chromatography (HPLC). TLC was performed with a silica gel using ethyl acetate/methanol/hexanes at a ration of 9:1:10 with KMnO₄. HPLC was performed using an ODS column, C18 S-3 120A, 4.6 X 50mm, a linear gradient of 10% acetonitrile/H₂O to 100% acetonitrile in 7 minutes, and a flowrate of 2.5 ml/minute. The detection wavelength was 220 nm.

When the reaction was complete, the mixture was cooled to room temperature and maintained there for approximately 16 hours. Water (700 mL) was then added to quench the reaction until no brown gases evolved. The resulting slurry was cooled in an ice bath to approximately 5°C and then filtered. The solid filtrate was washed with 200 mL of water and air dried to yield 90 grams of α -bromo-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula Q) as a light yellow solid (92% yield).

EXAMPLE 19**Preparation of (*aS*)- α -amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula (V)) from α -bromo-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula Q)**

α -Bromo-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula Q) (75 grams, 0.278 moles) was dissolved in 225 mL of 30% ammonium hydroxide (4.08 moles, 14.6 equivalents). The reaction mixture was then heated at 65°C for 16 hours. The reaction mixture was then concentrated on a rotovap to a solid. EtOH (200 mL) was added to the concentrated solid and then re-concentrated on rotovap. The yield was 71 grams of a chiral mixture of hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula (V)) as a yellow solid (90%).

EXAMPLE 20**Resolution of hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula (V))**

Boc protection of the chiral mixture of Example 19 was performed using Boc anhydride and sodium hydroxide in tetrahydrofuran. The resulting compound α -[[[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-]3]hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Compound R) (0.25M in EA, 80 μ l, =6.52mg) was mixed with chiral base ([1R,2S]-(-)-1,2-diphenylhydroxy ethylamine) (0.25M, 80 μ l) in a vial and the mixture was evaporated to dryness in the SpeedVac. Solvent (200 μ l) was added. The vial containing the mixture was placed on a shaker with heating at 50°C for 1.5 hours. The mixture was then cooled to room temperature for crystallization of (*aS*)- α -[[dimethylethoxy)carbonyl] amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Compound S).

EXAMPLE 21**ZnCl₂-catalyzed adamantyl bromide (Formula A) coupling**

A dry vessel was charged with 7.5 kg adamantyl bromide. Methylene chloride (22.5 liters) was then added at room temperature to dissolve the solid adamantane bromide. Dissolving is endothermic so before the next step, the temperature of the reaction mixture was allowed to return to 20°C. The reaction mixture was then

charged with zinc chloride (1.05 kg) and stirred for approximately 5 minutes at 20°C. The reaction mixture was then charged with tris(trimethylsiloxy)-ethylene (15.3 kg) while maintaining the reaction temperature between 20 to 25°C and the resulting mixture was stirred for 2 hours. Following this mixing, tris(trimethylsiloxy)-ethylene (5.10 kg) was added. During this addition, the temperature was maintained below 30°C. The reaction was maintained for another 12 to 15 hours at 20 to 25°C, at which time the reaction mixture was diluted with methylene chloride (15 liters) and cooled to 0 to 5°C. The reaction mixture was then treated, beginning in dropwise fashion, with half-saturated NH₄Cl solution. During addition, the temperature was kept below 30°C. A thick suspension was obtained. To this suspension was added ethyl acetate (93.75 liters). The mixture was stirred vigorously for 15 minutes and the organic and aqueous phases were split. The organic layer was stored and the aqueous layer was washed twice with ethyl acetate (18.75 liters in each wash). The ethyl acetate washes and organic layer were then combined and washed with water (37.5 liters) followed by water half saturated with brine (37.5 liters). The organic layer was separated again and evaporated to form crystals. A solvent exchange to heptane was then performed at a final volume of 22.5 liters. The resulting suspension was cooled to 5 to 10°C for 1 hour and the product a-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula B) was obtained via filtration. Yield of a-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula B) was 6.96 kg (33.11 mol, 95%).

EXAMPLE 21A

Esterification of a-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula B)

An inert atmosphere was first created in the reactor. The reactor was then charged with methanol (35.00 liters) followed by a-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula B) (14.00 kg) to form a suspension. The suspension was cooled to 0 to 5°C and acetyl chloride was added in a manner such that the temperature of the reaction mixture was kept between 5 and 10°C. After completion of the addition of acetyl chloride, the reaction mixture was warmed to 20 to 25°C and stirred for 2 hours at 20 to 25°C. The reaction mixture was then concentrated under vacuum at 40°C and a thin oil was obtained. The oil was dissolved in ethyl acetate

(71.96 liters) and brought to room temperature. The resulting mixture was washed twice in water (28.78 liters each wash) and the organic and aqueous layers were separated after each wash. The organic layer was stored while the aqueous layers were combined and adjusted to pH 9.5 with 3 N NaOH solution. The combined aqueous layers were then extracted twice with ethyl acetate (14.39 liters with each extraction). The organic layers following each extraction were separated and combined with the stored organic layer. These combined organic layers were then washed with saturated sodium bicarbonate solution (28.78 liters) followed by brine (43.18 liters). All volatiles were then removed under vacuum at 40°C and a colorless to slightly yellow oil which crystallized on standing was obtained. This oil contained 13.29 kg (59.26 mol, 89%) α -hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula C).

EXAMPLE 22

Swern Oxidation of α -hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula C)

A three-necked flask (22 liters) was equipped with a mechanical stirrer, temperature probe and an addition funnel and purged with nitrogen overnight. Oxalyl chloride (500 ml, 5.73 mol) was then added followed by CH₂Cl₂ (8 liters). The resulting solution was cooled to -69°C with an acetone/dry ice bath. A solution of dimethylsulfoxide (DMSO; 700 ml, 9.86 mol) was then slowly added over approximately 30 minutes while keeping the internal temperature below -60°C. The solution was stirred for 20 minutes while maintaining the temperature at -60 to -70°C. A solution of α -hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula C) (990 grams, 4.42 mol) in CH₂Cl₂ (1.7 liters) was then slowly added over approximately 30 minutes while keeping the internal temperature below -60°C. The resulting solution was stirred for 30 minutes. NEt₃ (3 liters, 21.5 mol) was then added to form a heavy slurry of triethylamine hydrochloride salt. The reaction mixture was warmed to room temperature and water (1 liter) was added to dissolve triethyl ammonium salt (TEA salt). The reaction mixture was then transferred to a round bottom flask, and concentrated down to remove dichloromethane (DCM) and NEt₃.

EtOAc (12 liters) was added and the resulting aqueous and organic layers were split. The organic layer was washed three times with water (2 liters each wash) followed by a brine wash (2 liters). The organic phase was then dried over anhydrous Na_2SO_4 with evaporation to produce a slight yellow solid of a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula D). Yield was approximately 104%.

EXAMPLE 23

Hydroxylation of a-Oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula D) to 3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula I)

An Erlenmeyer flask was charged with 95 to 98% H_2SO_4 (495 ml) and cooled in an ice bath to 8°C. HNO_3 (47.5 ml at 50% prepared by adding 50 ml of 70% HNO_3 to 30 ml of water) was then added to the flask and the mixture was again cooled to 8°C in the ice bath. Solid a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula D) (100 grams, 0.45 moles) was slowly added to the mixture in portions over 30 to 60 minutes to maintain a temperature less than 28°C. The reaction mixture was stirred while cooling in the ice bath. Progress of the reaction was monitored by either thin layer chromatography (TLC) or high performance liquid chromatography (HPLC). For TLC, a silica gel was used and the solvent was EtOAc/MeOH/Hexane (9/1/10); KMnO_4 . For HPLC, a 4.6 x 50 mm, C18, 3 micron, 120 angstrom column was used with a gradient of 10% acetonitrile/ H_2O to 100% acetonitrile in 7 minutes at a flow rate of 2.5 ml/minute. The monitoring wavelength was 200 nm. When the reaction was complete (after approximately 1 hour), the reaction was quenched by addition to cold water (1.5 liters) and EtOAc (500 ml). Additional water and EtOAc (500 ml each) were added to aid in separation of the aqueous and organic layers. The aqueous layer was then extracted with 3 aliquots, 500 ml each, of EtOAc. The organic layers were combined and washed with brine (400 ml). The washed organic layer was then concentrated under reduced pressure to 130 grams of a yellow oil residue containing 3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula I).

EXAMPLE 24**Hydrolysis of 3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, methyl ester (Formula I) to 3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II)**

The yellow oil residue of Example 23 was dissolved in tetrahydrofuran (300 ml) and cooled in a ice bath to 5 °C. One liter of 1 N sodium hydroxide was added slowly to the solution to adjust the pH to approximately 7 while maintaining the temperature below 30°C. An additional 500 ml of 1N NaOH was then added to adjust the pH to approximately 14. The reaction mixture was then stirred while cooling in an ice bath and the progress was monitored by TLC or HPLC as described in Example 23. When the reaction was complete after approximately 30 minutes, EtOAc (500 ml) was added and the aqueous and organic layers were separated. The aqueous layer was washed with another 500 ml of EtOAc. The aqueous layer was acidified with concentrated HCl. When the solution reached pH 7, EtOAc (500 ml) was added followed by more concentrated HCl until the pH reached 0.7. Total concentrated HCl added was 150 ml. The aqueous layer was then extracted with EtOAc (4 x 400 ml) and the combined organic layers were washed with 400 ml of water followed by 400 ml of brine. The washed organic layer was then dried with MgSO₄ and concentrated. Yield was 88 grams of a light yellow solid. Dissolution of this solid in 100 ml EtOAc and 300 ml heptane with stirring for 30 minutes followed by filtration and air drying yielded 85 grams of a tan solid (85% 3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II)).

EXAMPLE 25**Preparation of Adamantan-1-yl-dichloro-acetic acid methyl ester (Formula VII)**

A 2-liter three-necked flask equipped with a mechanical stirrer, thermometer, condenser, pressure equalizing addition funnel and an argon inlet was charged with zinc dust (78.0 g, 1.19 mol) followed by the addition of anhydrous tetrahydrofuran (400 ml). To this mixture was added 1,2-dibromoethane (2 ml) to activate the zinc. The resulting mixture was heated at a gentle reflux for 25 minutes. After cooling to -55°C, a solution of methyl trichloroacetate (100.3g, 0.565 mol) and chlorotrimethylsilane (80 ml, 0.648 mol) was added at a rate to maintain the reaction

temperature at -55 to -60°C (1 hour required). After the addition was complete, the mixture was allowed to stir at room temperature for approximately 90 minutes. The resulting mixture was diluted with heptane (700 ml) and filtered under nitrogen through a Celite 545 pad. The filtercake was washed with additional heptane (1 x 300 ml, 3 x 200 ml). The filtrate was then concentrated at reduced pressure on a rotary evaporator (approximately 10-15 mm Hg with a 22 - 27°C water bath) to give crude (2,2-dichloro-1-methoxy-vinyloxy)-trimethylsilane as a dense oil (129.2 g). Quantitative proton NMR indicates this crude material contains 0.389 mol (68.8%) of (2,2-dichloro-1-methoxy-vinyloxy)-trimethylsilane.

A 1 liter flask equipped with an argon inlet was charged with crude (2,2-dichloro-1-methoxy-vinyloxy)-trimethylsilane (129.1 g, approximately 0.389 mol) and anhydrous dichloromethane (100 ml). To the resulting solution was added 1-bromoadamantane (75.2 g, 0.349 mol) and anhydrous zinc chloride (6.56 g, 48 mmol). The resulting mixture was allowed to stir at room temperature overnight. The resulting red-brown mixture was diluted with heptane (600 ml) and water (300 ml). The organic layer was separated and washed with water (2 x 100 ml), 1 N sodium bicarbonate (3 x 150 ml), and water (2 x 200 ml). The resulting solution was filtered through a pad of Celite 545 and filtrate was concentrated at reduced pressure to give a colorless solid. This material was dissolved in boiling methanol (250 ml). The resulting solution was allowed to cool to room temperature for 1 hour. After cooling to approximately 5°C for 2 hours, the solid was collected by filtration and washed with cold methanol:water (94:6; 4 x 50 ml) to give adamantan-1-yl-dichloro-acetic acid methyl ester (Formula VII) as a colorless solid: 75.0 grams (77.3% based on 1-bromoadamantane); mp 76.3°C .

Elemental analysis: C₁₃H₁₈Cl₂O₂:

Calculated: C, 56.33; H, 6.55; Cl, 25.58%

Found: C, 56.49; H, 6.59; Cl, 25.72%

¹H NMR (500.16 MHz, CDCl₃) 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) ppm

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

EXAMPLE 26

Preparation of Dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid methyl ester (Formula VIII)

Preparation of 10 N HNO₃: A 100 mL volumetric flask was charged with conc. HNO₃ (88.25 g, ~62.58 mL, ~1.0 mole) and cooled in an ice bath. Water (35 mL) was added. After the heat of mixing had dissipated, the solution was allowed to warm to room temperature. The flask was then made up to the mark with water to give 10 N HNO₃

A 250 mL three-necked flask equipped with a thermocouple thermometer was charged with conc. H₂SO₄ (103 g, ~56 mL). After cooling to 0.4° C in an ice bath, 10 N HNO₃ (5.68 mL, 56.8 mmol) was added over ~30 minutes. When the temperature of this acid mixture was lowered to ~1.0°C, the cold bath was removed. Adamantan-1-yl-dichloro-acetic methyl ester of formula VII (15.0 g, 54.11 mmol; ground lightly in mortar/pestle to break up large chunks/crystals) was added portionwise (1.25 g every 10 minutes; 1hr 50 minute addition time). After ~5 hours the reaction mixture was a clear, pale yellow solution.

After stirring for ~24 hours the reaction mixture was a very pale yellow solution. A four-necked Morton flask (1 L) equipped with a mechanical stirrer and thermocouple thermometer was charged with water (250 mL) and urea (8.0 g, 0.133 mole, ~2.34 equivalents relative to HNO₃). To the resulting solution was added ethyl acetate (230 mL). Resulting biphasic mixture was cooled to ~1.0°C in an ice bath. The reaction mixture from above was added, over ~15 minutes, to the cold EtOAc/water/urea mixture. The transfer was completed using additional ethyl acetate

and water (~50 mL of each). After stirring for ~45 minutes, the cold bath was removed and the mixture was allowed to warm with stirring. After stirring for 4.5 hours (from start of quench), the resulting mixture was transferred to a separatory funnel (1 L) using additional ethyl acetate (~100 mL) to complete the transfer. The aqueous fraction was removed and extracted with ethyl acetate (1 x 80 mL). The organic fractions were combined and washed with water (2 x 90 mL), 1 N NaHCO₃ (4 x 90 mL), and brine. After drying over anhydrous magnesium sulfate, the solvent was removed at reduced pressure to give dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid methyl ester of Formula VIII as a nearly colorless solid: 15.67 g (98.7% crude yield). This crude material can be used to prepare dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic of Formula IX without purification. If desired, however, the crude material (15.65 g) can be recrystallized from methanol (102 mL) and water (85 mL) to afford a fluffy cotton-like solid (mp 114.8-115.0°C) with 91% recovery.

Elemental analysis: C₁₃H₁₈Cl₂O₃:

Calculated: C, 53.25; H, 6.18; Cl, 24.18%

Found: C, 53.24; H, 6.24; Cl, 24.31%

¹H NMR (500.16 MHz, CDCl₃) δ 3.857 (s, 3H), 2.298 (br m, 2 H), 1.824 (s, 2 H), 1.793 (d, 4 H, =2.75 Hz), 1.682, 1.629 (br AB q, 4 H), 1.529 (m, 3 H) ppm

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

Lab HPLC:

YMC ODS-A S3 120 Å (4.6 x 50 mm), λ=200 nm, 2.5 ml/minute

Solvents: A = 0.2% H₃PO₄ in water

B = 90% CH₃CN in water

Gradient: 20% A to 100% B over 10 minutes

Retention Time	Area %	Identity
2.06 minutes	1.19	unknown
4.54 minutes	98.16	dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid methyl ester
5.09 minutes	0.65	unknown
8.35 minutes		adamantan-1-yl-dichloro-acetic methyl ester

EXAMPLE 27

Preparation of Dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid (Formula IX)

A 500 ml round-bottomed flask was charged with methanol (200 ml) and 1 N NaOH (194 ml, 194 mmol, approximately 1.36 equivalents relative to input dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid methyl ester (Formula VIII)). The resulting solution was cooled in an ice bath until the temperature was $<9^{\circ}\text{C}$. The cold bath was removed and dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid methyl ester (Formula VIII)(41.68 g, 142.1 mmol) was added. The resulting suspension was allowed to stir at ambient temperature under argon. After stirring for approximately 6 hours, an additional portion of methanol (10 ml) was used to rinse down the vessel walls. After stirring for approximately 17 hours, the reaction mixture was filtered to remove a small amount of particulate material. The resulting solution was transferred to a 2-liter three-necked flask equipped with a mechanical stirrer. Water (900 ml) was used to dilute the reaction mixture and to complete the transfer. The resulting solution was acidified by the addition of concentrated HCl (38 ml, approximately 456 mmol). A white solid quickly formed. The mixture was gently stirred for approximately 20 minutes and then placed in an ice bath. After gently stirring for approximately 90 minutes, the stirrer was stopped and the mixture was allowed to stand in the ice bath for an additional 2 hours. The resulting suspension was filtered and the filtercake was washed with ice cold water. The bulk of the water was removed from the solid by pulling air through the filtercake. The material was then dried under vacuum at ambient temperature for 22 hours to give dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid (Formula IX) as a colorless powdery solid: 39.19 grams (98.7% yield); mp 238°C (dec).

Elemental analysis: C₁₂H₁₆Cl₂O₃:

Calculated: C, 51.63; H, 5.77; Cl, 25.40%

Found: C, 51.43; H, 5.74; Cl, 25.48%

Lab HPLC:

YMC ODS-A S3 120 Å (4.6 x 50 mm), λ 200 nm, 2.5 ml/minute

Solvents A = 0.2% H₃PO₄ in water

B = 90% CH₃CN in water

Gradient: 20% A to 100% B over 10 minutes

Retention Time	Area %	Identity
0.53 minutes	0.95	unknown
2.65 minutes	97.27	dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid
4.54 minutes		dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid methyl ester
¹ H NMR (500.16 MHz, CD ₃ OD) δ		2.258 (br s, 2 H), 1.858 (s, 6 H), 1.674, 1.615 (br AB q, J=1 1.54 Hz, 4 H), 1.588-1.526 (m, 2 H) ppm
¹³ H NMR (125.77 MHz, CD ₃ OD)δ		167.957, 96.356, 69.322, 48.070, 45.360, 44.794, 37.050, 36.039, 31.631 ppm

EXAMPLE 28

Preparation of 3-Hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II)

A 500 ml three-necked flask was charged with dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid (Formula IX) (38.67 g, 138.5 mmol). To this material was added water (160 ml) and 1 N NaOH (138 ml, 138 mmol; 1 N NaOH was used to generate the sodium salt of dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid to avoid foaming problems which would occur with solid NaHCO₃) to give a hazy solution. To this solution was added solid NaHCO₃ (29.10 grams, 346 mmol, 2.50 equivalents). After the NaHCO₃ was added the reaction mixture became a suspension as the sodium salt of dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid was forced from solution. The reaction vessel was fitted with a reflux condenser/argon inlet and heated to

approximately 80°C. After heating for approximately 6 hours the mixture was allowed to cool to room temperature. The reaction mixture (pH 7.22) was carefully acidified (CO₂ evolution) to pH 0.15 by the addition of concentrated HCl (32 ml required). The resulting mixture was extracted with ethyl acetate (4 x 300 ml). The aqueous layer (pH 0.37) after the first extraction with ethyl acetate was lowered to pH 0.18 by the addition of concentrated HCl (approximately 2 ml). The ethyl acetate fractions were combined and washed with brine (100 ml). After drying over anhydrous magnesium sulfate, the solvent was removed at reduced pressure to give 3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II) as a colorless granular solid: 30.77 gram (99%).

Elemental analysis: C₁₂H₁₆O₄:

Calculated: C, 64.27; H, 7.19%

Found: 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) ppm - partial hydrate

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 ppm - partial hydrate

Lab HPLC:

YMC ODS-A S3 120 Å (4.6 x 50 mm), λ = 200 nm, 2.5 ml/minute

Solvents: A = 0.2% H₃PO₄ in water

B = 90% CH₃CN in water

Gradient: 10% A to 60% B over 10 minutes

Retention Time	Area %	Identity
1.39 minutes	100%	3-hydroxy-a-oxotricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decane-1-acetic acid
4.95 minutes		dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)-acetic acid

EXAMPLE 28A**Preparation of 3-Hydroxy-oxotricyclo-[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula II) employing a one pot procedure**

A 250-mL three-necked flask equipped with a pressure equating addition funnel and argon inlet was charged with dichloro-(3-hydroxy-adamantan-1-yl)acetic acid methyl ester (Formula VIII), prepared as described in Example 26 (15g, 51.16 mmol) followed by the addition of tetrahydrofuran (30 mL, instabilized). After stirring for several minutes, the bulk of the Formula VIII methyl ester dissolved to give a hazy solution. To this solution was added distilled water (30 mL) and a loose suspension formed. The addition funnel was charged with 1N NaOH (69 ml, 69 mmol, ~ 1.35 eq relative to Formula VIII compound input). NaOH was added dropwise over 70 minutes to give a nearly colorless solution which was allowed to stir at ambient temperature.

HPLC analysis at ~ 16 hours showed the hydrolysis of the Formula VIII compound complete. The reaction mixture, a clear colorless solution with a pH of 13.24, was adjusted to pH 7.40 by the addition of ~ 6NHCl (2.8 mL). Solid NaHCO₃ (11.2 g, 0.133 mol., 2.60 eq) was added to form a suspension.

HPLC analysis after heating for 4 hr 15 min shows the reaction to be complete. After heating for 5 hours, the heat source was removed and the reaction mixture (clear, colorless solution) was allowed to cool. After cooling to room temperature, the reaction mixture was stored in a refrigerator (+4°C) for 4 days.

After storage in the cold for 4 days the reaction mixture was still a clear colorless solution and HPLC analysis shows little, if any, change upon storage. After warming to room temperature, the mixture (pH 7.77) was acidified to pH 0.20 by the careful addition of conc. HCl (11 mL required, CO₂ evolution; at pH ~1.40 a colorless solid began to precipitate). The resulting suspension was extracted with EtOAc (x 4, ~500 mL total volume; HPLC analysis performed on aqueous fraction after each EtOAc extraction). The aqueous layer (pH 0.38) after the 1st EtOAc extraction was adjusted to pH 0.18 by the addition of conc. HCl (~1.6 mL required). The aqueous layer (pH 0.37) after the 2nd EtOAc extraction was adjusted to pH 0.17 by the addition of conc. HCl (~0.8 mL required). The aqueous layer required no

additional pH adjustment after the remaining EtOAc extractions (extraction #3, pH 0.19; extraction #4, pH 0.19). The organic fractions were combined. After drying (MgSO_4), the solvent was removed at reduced pressure to give crude title Formula II compound as a nearly colorless, granular solid which was dried under vacuum (pump) for 16 hours: 11.42 g (99.53% yield); HPLC, 100% (area %).

Elemental analysis: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_3$ [55465-020-31, TR46373]

Calculated: C, 64.27%; H, 7.19%

Found: C, 64.19%; H, 7.09%

Crude Formula II compound (5.0 g) was dissolved with heating to $\sim 85^\circ\text{C}$ in distilled water (19 mL), then removed from the heat source and allowed to cool. At $\sim 53^\circ\text{C}$, the material began to crystallize. After standing at room temperature for ~ 2 hours, the solid was collected by filtration and washed with ice cold water. The bulk of the water was removed by pulling nitrogen through the filtercake. The material was then dried under vacuum (pump) for 17 hours to give title Formula II compound as large, colorless needles: 4.33 g (86.6% recovery); mp $164.5\text{-}165.6^\circ\text{C}$ (on Mettler FP800 system); HPLC, 100% (area %).

Elemental analysis: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_3$ [55465-023-15, TR46905]

Calculated: C, 64.27%; H, 7.19%

Found: C, 64.42%; H, 7.04%

EXAMPLE 29

Esterification of L-pyroglutamic acid (Formula E) to form L-pyroglutamic acid ethyl ester (Formula F)

A reaction vessel was charged with ethanol (49.0 liters) and cooled to -5°C . The reaction vessel was then charged with thionyl chloride (4.97 kg) in a manner so that the temperature of the mixture did not exceed 0°C . After complete addition of the thionyl chloride, the mixture was cooled again to -5°C and L-pyroglutamic acid (Formula E) was added portionwise so that the temperature was maintained between 0

and -5°C during the addition. Following addition of the acid, the reaction mixture was heated to 20 to 25°C and stirred for 5 hours. The reaction mixture was then evaporated under vacuum (T max 45°C) to approximately 15% of its original volume. The remaining oil was then dissolved in toluene (49 liters). The toluene solution was then cooled to approximately 10°C and triethyl amine (8.45 kg) was added slowly so that the maximum temperature was between 20 and 25°C. The resulting suspension was stirred for 30 minutes and then filtered. The filter cake was washed with toluene (about 5 liters). The filtrate was reduced at 50°C under vacuum to a total volume of about 10 liters. Crystallization was initiated by slow addition of cyclohexane (8 liters) at 50°C and subsequent cooling to approximately 30°C. After seed formation the mixture was cooled to 20 to 25°C and charged with a second 8 liter portion of cyclohexane. The mixture was then cooled to 6 to 8°C, stirred for one hour, and the resulting crystals were filtered off. The crystals were washed twice with cyclohexane (4 liters each wash). The yield was 4.89 kg (82%) L-pyroglutamic acid ethyl ester (Formula F) as colorless needles.

EXAMPLE 30

BOC-Protection of L-Pyroglutamic acid ethyl ester (Formula F)

The L-pyroglutamic acid ethyl ester (Formula F)(5.00 kg) was dissolved at room temperature in toluene (24.97 liters). 4-Dimethylaminopyridine (0.19 kg) was then added to the solution. The reaction mixture was then charged with a solution of BOC-anhydride (7.29 kg) dissolved in toluene (24.97 liters) in a manner so that the reaction temperature did not exceed 25°C. After complete addition, the reaction temperature was stirred for three hours at 25°C. The reaction mixture was then charged with half saturated NaHCO₃-solution (49.94 liters) and stirred vigorously for 10 minutes before separating the organic and aqueous phases. The separated organic layer was washed twice with water (24.97 liters each). The organic layer was then evaporated from solvent under vacuum at a maximum of 50°C. The remaining colorless to slight yellowish oil crystallized on standing. The theoretical yield was 8.18 kg, (31.81 mol) of the (5S)-2-oxopyrrolidine-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl), 5-ethyl ester (Formula G).

EXAMPLE 31**SuperHydride Reduction and Elimination**

The (5S)-2-oxopyrrolidine-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl),5-ethyl ester (Formula G)(4.80 kg) was dissolved in toluene (30.97 liters; Kf max 0.01% water) and cooled to -50°C. This solution was charged with SuperHydride (LiEt₃BH 1 M in THF; 19.96 liters) in a manner so that the reaction temperature did not exceed -45°C. After complete addition, the mixture was stirred at -45 to -50°C for 30 minutes. N-ethyldiisopropylamine (DIPEA; 14.47 liters) was then added to the reaction mixture in a manner so that the temperature did not exceed -45°C. Dimethylaminopyridine (0.030 kg) was added as a solid to the mixture. The reaction mixture was then charged with trifluoroacetic anhydride (TFAA) (4.70 kg) in a manner so that the reaction temperature did not exceed -45°C. After complete addition, the reaction mixture was warmed to 20 to 25°C within one hour and kept for an additional 2 hours at this temperature. The reaction mixture was then cooled to 0°C and slowly charged with water (48.00 liters) so that the reaction temperature did not exceed 5°C. Aqueous and organic phases were then separated and the organic phase was again washed with 48 liters of water (0 to 5°C). The organic later was then evaporated and degassed at 40°C. A yellowish oil was obtained with a yield of 4.5 kg (18.66 mol, 100%) of the 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1-dimethylethyl), 5-ethyl ester (BOC-DHPEE)(Formula III).

EXAMPLE 32**Hydrolysis of BOC-DHPEE (Formula III)**

A solution prepared from 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl),5-ethyl ester (BOC-DHPEE)(Formula III)(6.00 kg) and ethanol (24.00 liters) was cooled to 0 to 5°C and slowly treated at this temperature with a solution of lithium hydroxide hydrate (2.09 kg) in water (20.87 liters) to produce a turbid solution. This turbid solution was then warmed to 20 to 25°C and stirred for 2 hours at this temperature. The reaction mixture was then evaporated to a volume of approximately 10.5 liters at a maximum temperature of 40°C under vacuum and

charged with water (24.00 liters) and t-butylmethyl ether (TBME or MTBE), (24 liters) and mixed for 10 minutes. The resulting organic and aqueous phases were separated and the aqueous phase was charged again with 24 liters of TBME. This mixture was then cooled to 5 to 10°C, and the pH was adjusted to 2.3 to 2.3 using H₃PO₄ 85%-water (1:4) while being vigorously stirred. The temperature was maintained during this process at 5 to 10°C for stability. The resulting organic and aqueous layers were separated. The organic layer was stored and the aqueous layer was again extracted with 24 liters of pre-cooled TBME at 5 to 10°C. The resulting organic layer was combined with the stored organic layer and charged with diisopropylethylamine (DIPEA) (4.82 kg). The solution was then evaporated and degassed at a maximum temperature of 30°C under vacuum. The yield was 7.84 kg (22.88 mol, 92%) [N-BOC dehydroproline * DIPEA (BOC-DHP)].

EXAMPLE 33

Amide formation on BOC-DHP

BOC-DHP, synthesized by saponification as described in Example 32 may contain water. Therefore an azeotropic distillation with toluene was applied prior to running the reaction. However, due to the excess of reagents, calculation of raw materials was based on the amount of BOC-DHP prior to removing any water. For azeotropic distillation, BOC-DHP was diluted with toluene to an approximate 30% solution. Toluene was removed under vacuum at 40°C. Treated BOC-DHP (6.00 kg) was then dissolved in THF (48.0 liters). The solution was charged with DIPEA (2.26 kg) and the reaction mixture was cooled to -20 to -25°C. Mesyl chloride (3.01 kg) was then added slowly. During this addition, DIPEA hydrochloride precipitates. The resulting suspension was then stirred for 2 hours at -20°C followed by saturation with ammonia via a sub-surface gas inlet. While adding the ammonia, the reaction was heated to 0°C. After saturation, the reaction mixture was heated to 20°C and stirred for 3 hours. Following stirring, the reaction mixture was filtered to remove hydrochloride. The filter cake was washed with THF (12 liters) in several portions. The filtrate was concentrated under vacuum at a maximum temperature of 40°C and then dissolved in methylene chloride (33.33 liters). The solution was washed with

water (26.66 liters). The resulting organic and aqueous phases were separated and the aqueous phase was extracted twice with methylene chloride (20 liters each). The resulting organic layers were combined and concentrated under vacuum and degassed to remove any excess Hünigs base. The yield was 3.35 kg (15.77 mol, 90%) of (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester (BOC-DHPA)(Formula IV).

EXAMPLE 34

Cyclopropanation of (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) ester (Formula IV)

A first reactor, Reactor A, was charged with BOC-DHPA (Formula IV)(4 kg) dissolved in methylene chloride (18.0 liters) and maintained at 20°C. A second reactor, Reactor B, was charged with methylene chloride (18.00 liters) and cooled to -30°C. Reactor B was then charged with dimethoxy ethane (DME) (3.36 kg), followed by a 30% solution of diethyl zinc (15.36 kg) in toluene, while maintaining the temperature between -30 and -25°C. Reactor B was then charged with diiodo methane (19.99 kg) while maintaining the reaction temperature between -30 and -25°C. After complete addition of the diiodo methane, the mixture was stirred for 45 minutes at -30 to -25°C. This mixture was then charged to Reactor A via a cooled pipe (-20 to -25°C). Charging was performed slowly in portions of approximately 5% so that the reaction temperature of Reactor A was maintained between 22 and 24°C until the reaction was completed. Following completion of the reaction, the mixture of Reactor A was cooled to 5 to 10°C. The reaction mixture was then slowly charged with saturated bicarbonate solution (21.6 liters) in a manner so that the reaction temperature did not exceed 15°C. Following this addition, the reaction mixture was stirred for at least one hour while a precipitate formed. The suspension was filtered. The resulting filter cake was transferred back to the vessel, slurried again with methylene chloride (14.4 liters) for 30 minutes; and re-filtered. Following this second filtration, the filter cake was washed with addition methylene chloride (7.2 liters). The filtrates were then separated into aqueous and organic phases and the organic phase was washed with half saturated brine (21.6 liters). Solvent was then removed

by vacuum at a maximum temperature of 30°C and exchanged by heptane. A slurry of crude product in heptane was obtained. Final volume of the suspension after solvent exchange was 14.4 liters. The crude product was isolated by filtration. The filtercake was washed with heptane (2.9 liters) and then dried under vacuum to a constant weight. The crude yield was 2.76 kg (12.2 mol, 72%) (1S,3S,5S)-3-aminocarbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula H). To purify, the crude material is slurried in 8-fold amount of a 1:1 mixture of butyl acetate/heptane at 20 to 22°C for 4 hours. The material was filtered and the filtercake was washed with an approximate 1-fold amount of heptane. The yield was 2.11 kg (9.33 mol, 55%) (1S,3S,5S)-3-aminocarbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula H).

EXAMPLE 35

Deprotection of (1S,3S,5S)-3-(aminocarbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula H) to form (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide (Formula J)

A 100 ml, 2 necked flask equipped with a mechanical stirrer and a thermocouple was charged with (1S,3S,5S)-3-aminocarbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula H) (5.0 grams, 22.1 mmol) and THF (20 ml). HCl (2.5 M in EtOAc, 25 ml, 62.5 mmol) was then added to the suspension. The resulting solution was stirred at room temperature for 18 hours during which time precipitation was observed. Completion of the reaction was monitored by HPLC. Methyl t-butyl ether (MTBE) (30 ml) was added to the suspension and stirring was continued for an additional 30 minutes. The suspension was then filtered under N₂ protection to produce a white solid that was washed with MTBE (20 ml). The solid was dried in an oven under reduced pressure for 48 hours to afford the hydrochloride salt of (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide (Formula J; 3.6 grams, 100%).

EXAMPLE 35A**Alternative preparation of (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)ester (Formula IV)****A. Conversion of 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)**

To a suspension of 10.4 g (25.86 mmol) of solid dicyclohexylamine (DCHA) salt in a mixture of 30 mL water, 40 mL of toluene and 10 mL MTBE were added 2.7 mL of 10N aq. NaOH (27 mmol) (excess of NaOH should be limited to 1.05 eq. or less). Upon stirring a biphasic mixture with clear layers resulted and all the solid dissolved. Phases were split. The spent organic containing the 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) sodium salt was extracted with 4 mL water which was added to the initial aqueous phase. HPLC quantitation gave 12.55% (w/w) of "free olefin-acid" content in the aqueous or 96% recovery.

B. Generation of DMT-MM

To a solution of 2-Cl-4,6-diMeO-1,3,5-triazene (CDMT) (6.2 mg, 35 mmol; 1.5 eq.) in 70 mL of EtOAc kept in a room temperature water bath were added 4 mL (36.38 mmol) of neat N-methylmorpholine (MM). Solid 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM) started to precipitate out. The suspension containing DMT-MM was stirred for 30 min at room temperature at which time it became a thick paste. The temperature rose from 23 to 28-29°C during the reaction. The temperature of the reaction is kept down to minimize competing demethylation to form di-MeO-N morpholino-triazene (DMMT).

C. Conversion of the sodium salt of -4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) into (5S)-5-aminocarbonyl-4,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)ester IV

To a solution of sodium salt of Part A sodium salt equivalent to 5 g (23.5 mmol) of free olefin-acid by HPLC quantitation (V=25 mL) was added solid NH₄Cl (3.75 g, 70 mmol, 3 eq.) at which time pH dropped from 14 to 8.9. To this solution were added enough NaH₂PO₄·xH₂O to adjust pH to pH=6.20. Note: The amount of

phosphate may vary depending on the initial excess of NaOH used to convert the DCHA salt into Na-salt. The buffered solution of sodium salt was run into a suspension to DMT-MM prepared as above in Part B.

The biphasic mixture was stirred at rt. for 4 h at which time the initial emulsion became a suspension and some DMHT precipitated out. By HPLC the reaction was complete and neither activated DMT-ester nor acid were apparent in either phase.

Under the reaction conditions 12-15% by weight of 4,6-diMeO-1,3,5-triazene ether (DMT-ether) is also formed through a reaction of DMT-MM and DMHT. The suspension was filtered to remove 4,6-diMeO-1,3,5-triazene (DMHT) and the phases were split. The rich organic phase was washed with 2N aqueous $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2x25 mL) or until pH (aq.) < 6 which implied that most N-methylmorpholine was removed from the organic. The phases were split and the rich organic was washed with 25 mL of brine.

Typically solution yield of the title compound IV is 87-90%; unreacted starting olefin-acid at 1-0%. The rich organic was rotoevaporated and azeotropically dried with fresh EtOAc (2x250 mL). The material partially crystallized. The mixture was dissolved in 8 mL of hot EtOAc and mixed with 10 mL of n-heptane. A solid started to come out. The suspension was stirred at 50°C for 30 min and additional 10 mL of n-heptane were added. The suspension was stirred for 30 min at room temperature after having been removed from the heating bath and every 30 min two additional heptane charges are made and the suspension is stirred overnight at room temperature to complete crystallization. The solid is filtered and dried. Typical crystallization yield is close to 90%; the potency of the title compound IV is 90% and the DMT-ether accounts for the remaining 10% by weight.

The solid formed was found to be a true co-crystal of title compound IV and DMT-ether which gave a single sharp mp of 97.4°C compared to amide's mp of 89.7°C by DSC. The co-crystal form is more crystalline and more readily comes out of solution.

EXAMPLE 35B**Preparation of dicyclohexylamine salt of 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)****A. Preparation of the sodium salt of 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)**

3 Volumes of ethanol were added to a toluene solution of 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl) (about 15 wt % to 25 wt %) (1g/mL). The solution was cooled to 0-5°C. To the solution was added slowly a 5N solution of NaOH-water (2 eqs) while maintaining temperature <5°C (slightly exothermic). The reaction mixture was warmed to 20-25°C and stirred until the reaction was completed.

4 Volumes of water were added to the reaction mixture and the reaction mixture was distilled under vacuum (bath temp. 40°C) to remove ethanol. To the residue was added 0.5 volume of toluene (0.865g/mL) and the mixture was stirred for 10 minutes. Aqueous and organic layers formed. The aqueous layer containing the sodium salt was separated and used in Part B.

B. Preparation of dicyclohexylamine salt of 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)

1 Volume of MTBE (0.74g/mL) was added to an aqueous solution of 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl)-sodium salt. 0.2 Volume of heptane (0.684g/mL) was added to the above solution and the resulting solution was cooled to 0-5°C. To the solution was added slowly 85% H₃PO₄ (1g/mL) to bring the pH to ~ 2.5-3 while maintaining temperature <5°C (slightly exothermic). The resulting layers were separated and to the organic layer containing the product was added 1 volume of 75% brine. The mixture was stirred for 10 minutes and the resulting layers were separated. The product was contained in the organic layer.

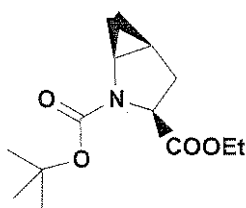
The organic solution was cooled to 0-5°C and dicyclohexylamine (0.91g/mL) was added slowly (slightly exothermic) while maintaining temperature <10°C. The reaction mixture was stirred at 0-5°C for 3 hours. The solids were filtered out and

washed with 0.5 volume of 1:1 MTBE/heptane. The resulting DCHA salt (1g/mL) was dried and recovered.

EXAMPLE 35C

Alternative preparation of (1S,3S,5S)-3-(aminocarbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylic acid, 1,1-dimethylethyl, ethyl ester (Formula H) (also referred to as syn-N-BOC-4,5-methanoproline)

A. Preparation of (s)-BOC-4,5-methanoproline ethyl ester



A flame-dried 3-necked flash (magnetic stirring) was charged with 2.2 g of 4,5-dihydro-1H-pyrrole-1,5-dicarboxylic acid, 1-(1,1-dimethylethyl),5-ethyl ester (2.20 g, 9.12 mmole, 1 eq) and 22 ml of dry toluene. The resulting solution was cooled to -30° and charged further dropwise with 16.58 ml (18.24 mmole) of diethyl zinc (1.1M solution in toluene).

A solution of 2.66 ml (6.43 g, 36.47 mmole) of chloro iodomethane in 2.2 ml toluene was added dropwise while keeping the reaction temperature between -25°C and -30°C . The reaction was kept at -20°C for 16 hr. The reaction was then quenched with 22 ml of half-saturated bicarbonate solution and warmed to room temperature. A white precipitate formed which was filtered off over Hyflow (filter aid) and washed with toluene (ca 10 ml). The organic layer was separated from the biphasic filtrate and washed twice with water (11 ml each time). The organic layer was evaporated to dryness to give a yellowish oil (2.33 g) which was N-BOC-methanoproline ethyl ester (mixture of syn- and anti-(8:1) isomers).

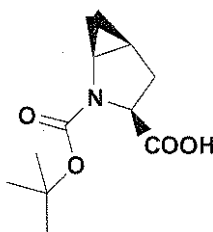
The above procedure was used to make large quantities of the above mixture of isomers sufficient for use in the next step. At $20-25^{\circ}\text{C}$, 3.40 kg of the N-BOC 4,5-

methanoproline ethyl ester (mixture of syn- and anti-isomers) were vigorously stirred with 5.17 kg (66.59 gmol) 40.0% methyl amine (solution in water) under a nitrogen atmosphere.

After complete reaction, the mixture was diluted with 5.17 l water and 5.17 l MTBE and stirred for another 5 minutes before phase-split occurred. The organic layer was washed with 5.17 l water. The resulting organic layer was evaporated (vacuum, Tmax 40°C) to constant weight.

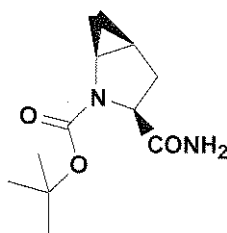
A yield of 2.52 kg syn-N-Boc-4,5-methanoproline ethyl ester (9.85 mol, 74%) was obtained.

B. Preparation of s-BOC-4,5-methanoproline



A solution of 2.57 kg syn-N-BOC 4,5-methanoproline ethylester (s-BOC-MPEE) in 10.28 l ethanol is prepared. To this solution is added at 20-28°C a solution made of 0.51 kg lithium hydroxide hydrate in 5.07 l water. The reaction was performed under inert gas protection (nitrogen). The reaction mixture is stirred for 14 h at 20-25°C (IPC). After complete reaction, the mixture evaporated at 40°C (vacuum). The resulting oil was taken into 25.70 l water and 25.70 l MTBE and stirred for 30 min. The organic phase separated and the aqueous layer is again extracted with 12.85 l MTBE. To the aqueous phase are added 25.70 l MTBE and the pH of the mixture is adjusted to pH 2 by addition of 1 N HCl (ca. 12 l). The organic layer separated and the aqueous phase was re-extracted with 12.85 l MTBE. The combined organic layers from the previous step are evaporated to dryness to yield 1.88 kg syn-N-BOC 4,5-methanoproline (8.25 mol %, 82%).

C. Preparation of (1S,3S,5S)-3-(aminocarbonyl)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-carboxylic acid, 1,1-dimethylethyl ester



2.00 kg syn-N-BOC-4,5-methanoproline are dissolved in 40.00 l THF and cooled to -15°C . To this mixture is added 1.07 kg N-Methyl morpholine (P0). To the reaction mixture is charged 1.32 kg Isobutyl chloroformate in a way that the reaction temperature does not exceed -8°C . After complete addition the mixture is stirred for 30 min at -10°C (P1, IPC 1). N-Methyl morpholine hydrochloride precipitates from the reaction mixture.

The reaction mixture is warmed to -5°C and then purged via a gas inlet tube with ammonia (0.79 kg, theor. 5.00 eq.). Then the reaction mixture is warmed to $20-25^{\circ}\text{C}$ and stirred at this temperature for 4 h (P2, IPC 2). To the reaction mixture is added 40.00 l sat. brine. Then the pH of the mixture is adjusted to pH 4 to 4.5 by addition of sat.potassium bisulfate solution. Then the organic layer is separated and the aqueous phase is again extracted with 20.00 l MTBE. The combined organic layers are evaporated to dryness. The crude product is dissolved in 8.00 l butyl acetate at reflux temperature. Product precipitates at ca. 30°C . On start of crystallization the mixture is slowly treated with 20.00 l heptane and further stirred for another 2 h. The product is isolated by filtration. The filter cake is washed with two portions of cold butyl acetate/heptane (1:4), 1.6 l each, and twice with 2.00 l heptane, each and dried at $30-35^{\circ}\text{C}$ (vacuum) to yield 1.64 kg (7.22 mol, 82%) syn-N-BOC 4,5-methanoproline amide (s-BOC-MPA).

EXAMPLE 36

BOC Protection of (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decane-1-acetic acid (Formula V) to form (aS)-a-[(1,1-dimethylethoxy) carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, (VI)

Formula VI Acid

(aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula V) (469 grams, 2.08 moles) was dissolved in ice cold 1 N NaOH (5 liters, 5 moles, 2.4 equivalents) in a phase splitter equipped with a temperature probe and a pH probe. THF (2.5 liters) was added to the solution. Solid Boc₂O was then added and the reaction mixture was stirred at ambient temperature for approximately 1 hour. EtOAc (4 liters) was then added with stirring and the resulting organic and aqueous layers were separated. The pH of the aqueous layer was adjusted to 7 with concentrated HCl. EtOAc (4 liters) was then added and additional HCl was added to lower the pH to approximately 1. The total volume of concentrated HCl added was 510 ml. The organic and aqueous layers were again separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 3 liters). The organic layers were then combined and washed with water (3 liters) and brine (3 liters). The washed organic layer was then dried with Na₂SO₄ and concentrated on a rotovap at room temperature until dryness. The yield was 542 grams of (aS)-a-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula VI).

EXAMPLE 37

Coupling Reaction to produce 3-aminocarbonyl-(aS)-a-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-β-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-ethanecarbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula K)

A 2 L three-necked flask equipped with a thermometer, a mechanical stirrer and a gas inlet was charged with (aS)-a-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid (Formula VI) (50 grams, 153.8 mmol). THF (200 ml) was added and stirred to produce a clear solution. The solution was cooled to -6°C in an acetone-dry ice-water bath. Methanesulfonyl chloride (Mes-Cl)(13.1 ml, 169 mmol, 1.1 equivalents) was then added as a single portion followed

by diisopropylethylamine (94 ml, 539 mmol, 1.1 equivalents). The diisopropylethylamine was added slowly over a period of about 4 minutes to keep the internal temperature below 8°C. The reaction mixture was stirred at 0°C until all acid was converted to mixed anhydride. (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide hydrochloride salt (32.5 grams, 200 mmol, 1.1 equivalents) and hydroxybenzotriazole (HOBT) (1.04 grams, 7.6 mmol, 0.05 equivalents) were then added in a single portion and the flask was removed from the cooling bath. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hours and then left overnight at room temperature.

EXAMPLE 38

BOC Protection of (aS)-a-amino-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decane-1-acetic acid (Formula V) to form (aS)-a[[[(1,1-dimethylethoxy) carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane salt (Formula VIA)

Formula VIA (DABCO Salt)

1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) (15g; 125.1 mmole) was charged into a solution of ca. 30g (135 mmole) of Example 36 Formula VI acid in 300 ml of isopropyl acetate. Ethyl acetate (150 mL) was charged into the above reaction mixture (volume ratio of ethyl acetate: isopropyl acetate (150 mL/300 mL)). The reaction mixture was seeded with Formula VIA DABCO salt (200 mg). The reaction mixture was stirred vigorously at room temperature. Water (5 mL) was slowly charged to the reaction mixture and the reaction mixture stirred vigorously at room temperature to induce crystal formation after 15-20 minutes. The reaction mixture was stirred for 16 hours at room temperature and the reaction product was filtered in a Buchner funnel. The solids were washed with ethyl acetate at room temperature and dried at 50°C in vacuo to give 47g (79%) of the Formula VIA DABCO salt.

EXAMPLE 39**Coupling Reaction to produce 3-aminocarbonyl-(aS)-a-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-β-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-ethanecarbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula K)**

A 250 L three-necked flask equipped with a thermometer, a mechanical stirrer and a gas inlet was charged with (aS)-a-[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-acetic acid, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane salt (Formula VIA) (5 grams, 11.44 mmol) prepared in Example 38. THF (25 ml) was added and stirred to produce a slurry. The slurry was cooled to 0°C in an ice-water bath. Methanesulfonyl chloride (Mes-Cl) (1.15 ml, 14.85 mmol, 1.3 equivalents) was then added as a single portion followed by diisopropylethylamine (94 ml, 40 mmol, 3.5 equivalents). The diisopropylethylamine was added slowly over a period of about 4 minutes to keep the internal temperature below 5°C. The reaction mixture was stirred at 0°C for 10 minutes until all acid was converted to mixed anhydride. (1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carboxamide hydrochloride salt (2.42 grams, 14.9 mmol, 1.3 equivalents) and hydroxybenzotriazole (HOBT) (77 mg, 0.57 mmol, 0.05 equivalents) were then added in a single portion and the flask was removed from the cooling bath. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hours and then left overnight at room temperature.

EXAMPLE 40**Dehydration and Hydrolysis to Produce 3-cyano-(aS)-a-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-β-oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-ethanecarbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula L)**

Pyridine (6 equivalents, 922 mmol, 74.6 ml) was added to the reaction mixture of Example 39 and the reaction mixture was cooled in a cooling bath to -8°C. Trifluoroacetic anhydride (TFAA) (4 equivalents, 616 mmol, 87 ml) was then added slowly over 6 minutes while keeping the temperature below 10°C. The reaction was stirred at 24°C for 0.5 h and checked via HPLC (30 ml, 0.5 ml AcN, 0.5 ml H₂O) for the disappearance of Example 37 Compound K.

The reaction was then cooled in a cooling bath to approximately -3°C. NaOH (5 N, 6 equivalents, 0.925 mol, 185 ml) was added to the reaction over 10 minutes

(aqueous pH = 9.9) while maintaining the reaction temperature below 10°C. Aqueous K₂CO₃ (319 grams, 15 equivalents, dissolved in 510 ml H₂O) was added over 5 minutes (temperature = 8°C, aq. pH 11.1). The reaction was allowed to run for 7 hours 40 minutes. The reaction was complete when all intermediates were hydrolyzed to penultimate as determined via HPLC (30 µl, 0.5 ml AcN, 0.5 ml H₂O).

EtOAc (500 ml) was then added to the reaction mixture and the resulting aqueous and organic layers were separated. The organic layer was washed with 500 ml buffer solution (2M H₃PO₄, 1M NaH₂PO₄). The temperature rose to 23°C from 15°C; addition time: 5 min., aq. V = 560 ml pH = 4.5, 32 mg product by HPLC; org V = 1,080 ml. The organic was washed with a second 500 ml buffer solution; aq. V = 780 ml, pH = 2.5, 415 mg product by HPLC; organic V = 800 ml, 1.02 v/v% pyridine. The organic was washed with 300 ml brine; aq. V = 350 ml, pH = 1.8, 20 mg produced by HPLC. The organic was washed with 130 ml sat. NaHCO₃ solution; aq. V = 176 ml, pH = 6.0, 780 mg product. The organic was washed with 300 ml half sat. brine; aq. V = 330 ml, pH = 5.2, 25 mg product; organic V = 650 ml, pyridine 0.045 v/v%. 5 g Darco was added to the organic and stirred for 5 min, filtered through 50 g silica, washed with 4 x 25 ml EtOAc, organic V = 750 ml, pyridine 0.04 v/v%.

The organic layer was then distilled to approximately 133 ml. The organic was stirred for 1 hour until the solution turned cloudy. 133 ml heptane was added over 15 min. and the slurry stirred overnight. 133 ml heptane was added overnight. The mixture was stirred violently for 20 minutes with mechanical stirring. The solids were filtered off and the cake was washed with 50 ml 5% EtOAc/heptane; 3.4 g product was found in 8.86 g crude after removal of solvents from the mother liquor. Dry product crystals were heated at 50°C under vacuum overnight. 467 g product was obtained ~73%, 96.6 AP.

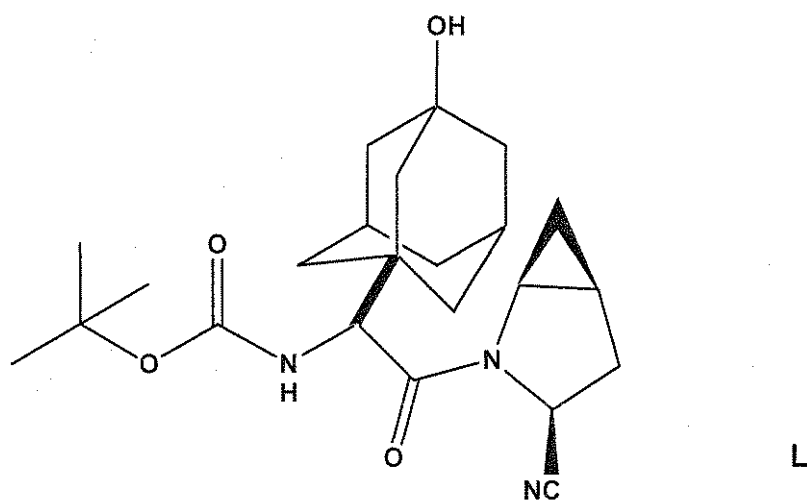
EXAMPLE 41**Deprotection to produce (1S,3S,5S)-2-[(2S)-2-amino-2-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)-1-oxoethyl]-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-3-carbonitrile, benzoate (1:1)(Formula M)**

3-cyano-(aS)-a-(3-hydroxytricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-yl)- β -oxo-(1S,3S,5S)-2-azabicyclo[3.1.0]hexane-2-ethanecarbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester (Formula L)(5.0 grams, 12.04 mmoles) was charged to a three-necked flask equipped with a thermometer, a mechanical stirrer, and a gas inlet. EtOAc, approximately 45 to 50 ml, was added to achieve a clear solution. Concentrated HCl (3.00 ml, 37% w/w%, 36.14 mmoles, 3 equivalents) was added at room temperature and the reaction mixture was stirred until a solid was produced. Water (30 ml) was then added and the mixture was stirred for 1 to 2 minutes. This reaction mixture was transferred to a separatory funnel and the layers of the reaction mixture were allowed to separate into a clean phase split. The aqueous layer was adjusted to a lower pH of approximately 6 with 25% NaOH while maintaining the temperature below 25°C.

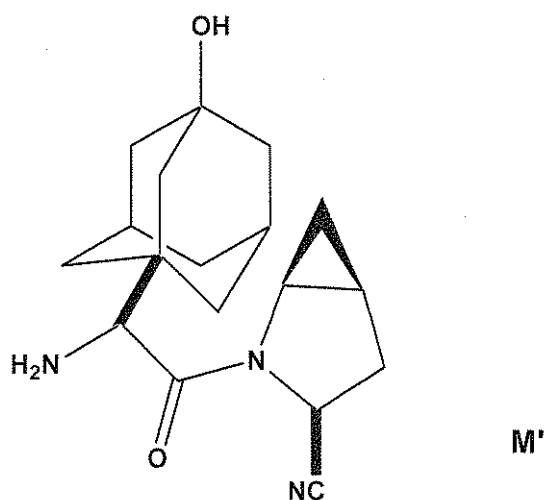
Salt exchange was then performed by addition of isopropyl alcohol (IPA; 2 to 3 ml) to the aqueous layer followed by addition of sodium benzoate (0.65 ml of a sodium benzoate solution prepared by dissolving 2.6 grams for sodium benzoate in 6.5 ml of water). The remaining sodium benzoate solution was then added in dropwise fashion via an addition funnel. The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 16 to 24 hours. Solids in the reaction mixture were then filtered on a Buchner funnel and washed with water until the solid gave a negative test for Cl⁻ with AgNO₃. The solids were then washed with heptane (10 ml) to drive off the water, air dried on the funnel, and dried in a vacuum oven at 35°C until KF \leq 5%. Yield was 79%, 4.1 grams.

EXAMPLE 42

Deprotection of L



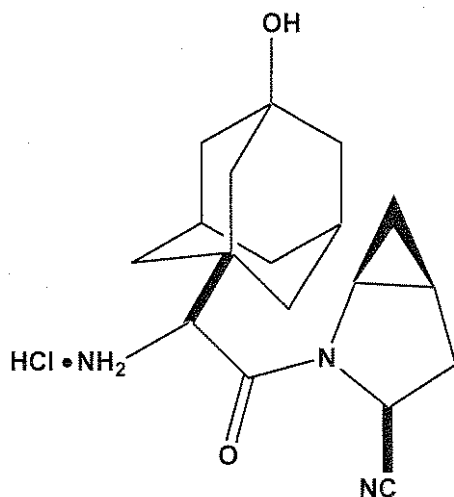
to produce free base M'



Example 40 compound (L) (300g, 0.723 mol, potency of 90.6%), methylene chloride (3L), methanol (288 ml, 7.23 mol) and concentrated (36%) hydrochloric acid (288 ml, 7.23 mol) were charged to a 3-neck 12 L flask equipped with mechanical stirrer, temperature probe and N₂ gas inlet. Reaction occurred while maintaining reaction temperature within the range from about 20 to about 25 °C. The reaction mixture was stirred for 18 hours, split into 2 phases and the top aqueous layer was

collected. To the aqueous layer was added methylene chloride (6L), and water (720 ml), and 5N NaOH (~600 ml) was added dropwise to adjust pH to 9.0 ~ 10.5.

The organic phase containing the hydrochloric salt



(identified by HPLC) (Formula L') was treated with methylene chloride (6L) and water (720 ml), and 5N sodium hydroxide solution (~ 600 ml) was added dropwise while maintaining reaction temperature between 20 and 25°C to adjust pH between 9 and 10.5. NaCl (120g) was added and the mixture agitated for 20 min. to form a phase split. The organic layer (6.2L) was collected (contained ~ 174g of compound M') and the aqueous layer (1.75L) was discarded (contained 6.5g compound M').

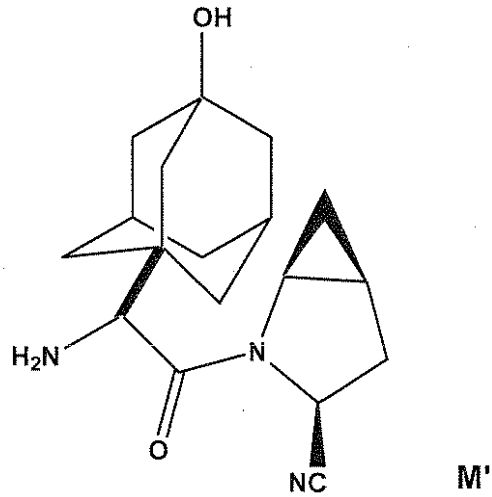
The organic layer was washed with 1% NH₄Cl brine solution (450 ml). (1% NH₄Cl brine solution contained 1g NH₄Cl, 25g NaCl and 74g H₂O). From the resulting phase split 6.0L organic layer was recovered (contained ~ 176g compound M' in solution) and the aqueous layer (0.45L) containing 1.4g compound M' (~ 0.4%) was discarded.

Ethyl acetate (~ 4L) was added to the organic layer while CH₂Cl₂ was distilled off at 25°C/50 mm Hg. Distillation was discontinued when a final volume of 2.5L was reached. The organic layer was polish filtered to remove solid NaCl and was concentrated to ~ 1 Kg (~ 170g of compound M' in 1L ethyl acetate) GC analysis: DCM < 0.1%. Water (17 ml) was added dropwise and after 10 min. crystallization began. 17 ml of water was added and the resulting slurry was agitated for 30 min,

filtered, the cake washed with ethyl acetate and dried at room temperature under vacuum to give 186g of monohydrate compound M', yield 81%.

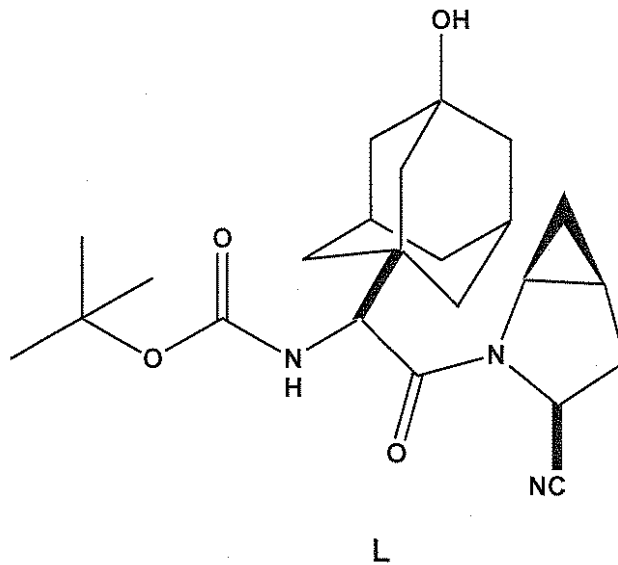
WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for preparing a free base compound of the structure M'

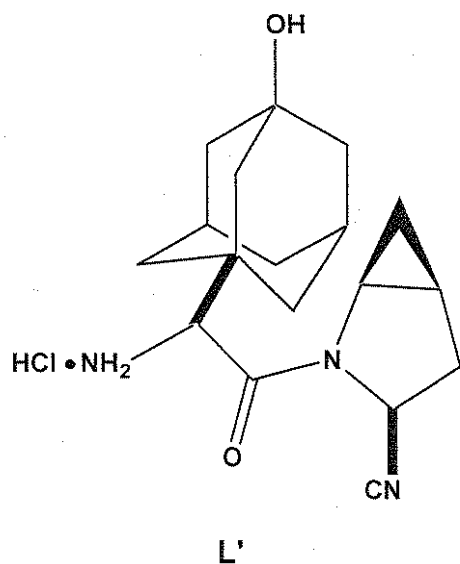


which comprises

providing a protected compound of the structure L

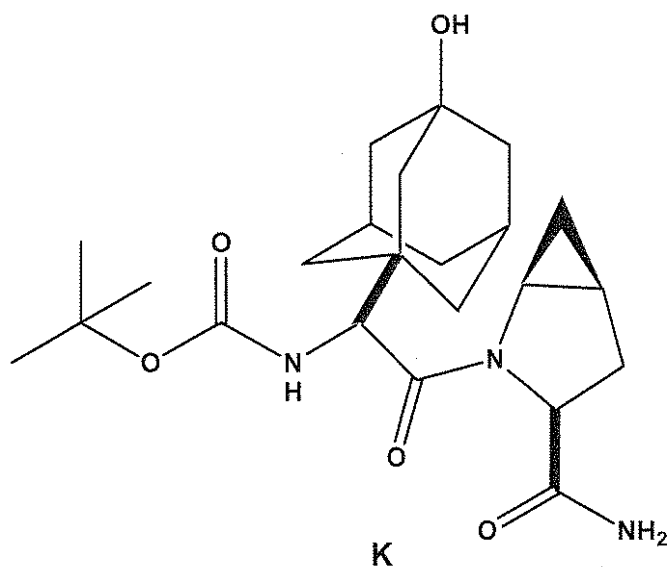


treating compound L with hydrochloric acid to form the corresponding hydrochloric acid salt L'



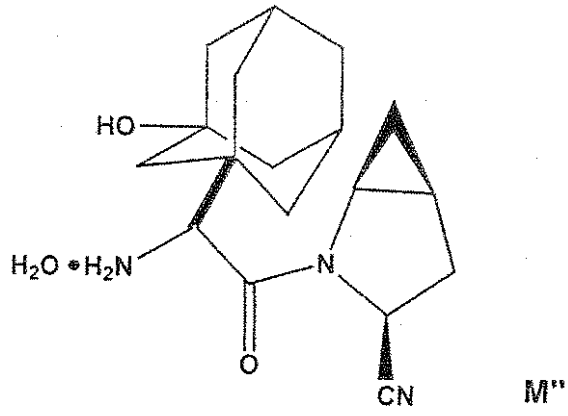
and treating compound L' with sodium hydroxide to form the free base compound M'.

2. The method as defined in Claim 1 wherein compound L is formed by dehydrating intermediate K

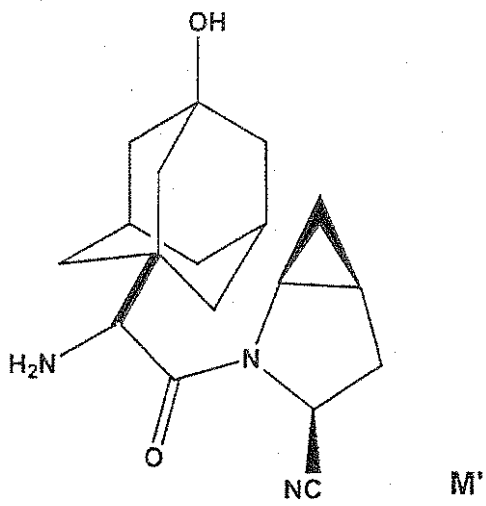


in the presence of pyridine and trifluoroacetic anhydride, and then hydrolyzing the reaction product in the presence of strong base to form compound L.

3. A method for preparing a monohydrate of the structure M''

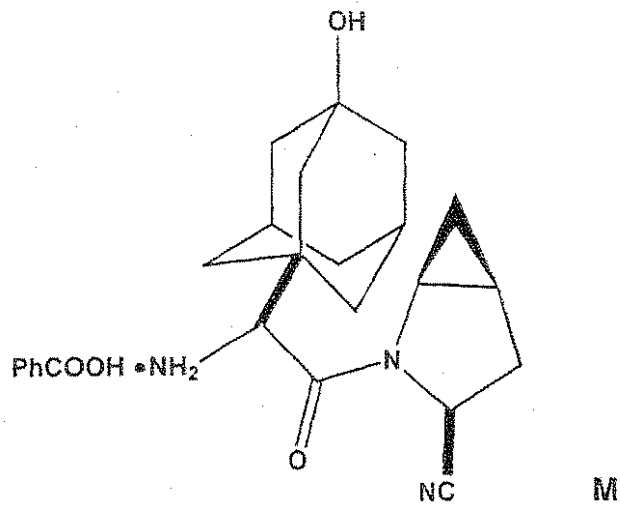


which comprises treating a free base of the structure

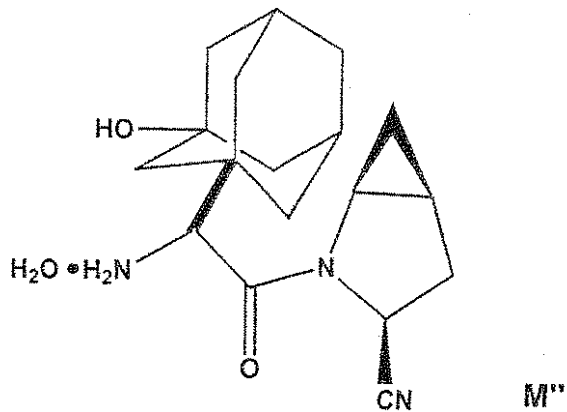


with water to form the monohydrate M'' .

4. A compound having the following structure



5. A compound having the following structure



ABSTRACT

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.

【配列表】

[2014012689000002.app](#)