

(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2004-261086

(P2004-261086A)

(43) 公開日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 41/00	C 1 2 P 41/00	4 B O 6 4
C 0 7 D 211/60	C O 7 D 211/60	4 C O 5 4

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2003-55011 (P2003-55011)	(71) 出願人	802000031 財団法人北九州産業学術推進機構 福岡県北九州市若松区ひびきの2番1号
(22) 出願日	平成15年2月28日(2003.2.28)	(74) 代理人	100095603 弁理士 榎本 一郎
		(72) 発明者	西野 憲和 福岡県北九州市若松区島田1-6-6
		(72) 発明者	原中 沙織理 福岡県嘉穂郡桂川町大字豆田2-9
		(72) 発明者	森口 充暲 大分県大分市大字旦野原700
		(72) 発明者	左右田 健次 大阪府吹田市山手町3-3-35
		Fターム(参考)	4B064 AE03 CA21 CB30 CD13 CD27 CE09 CE15 DA01 DA20 4C054 AA02 CC01 DD32 EE01 FF01

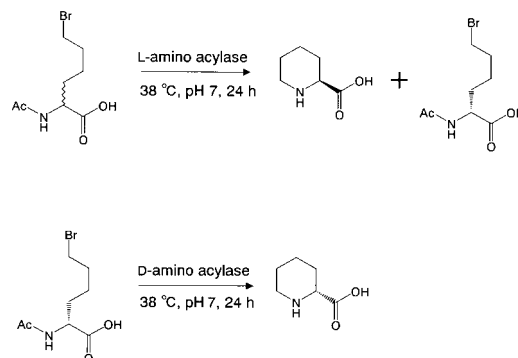
(54) 【発明の名称】 ピペコリン酸の製造方法

(57) 【要約】

【目的】高純度に光学分割されたピペコリン酸を安価に供給することができるピペコリン酸の製造方法を提供する。

【解決手段】ハロゲン基を側鎖末端に有するアミノ酸誘導体のラセミ体溶液にアミノアシラーゼを添加する調整工程と、前記アミノ酸誘導体の分子内環化反応条件に前記溶液を保持させ前記アミノアシラーゼのエナンチオマー特異的作用により光学活性ピペコリン酸を生成させる生成工程と、前記溶液から前記光学活性ピペコリン酸を溶媒抽出する抽出工程と、を順次実行して光学活性なピペコリン酸を製造する。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】

【請求項1】

ハロゲン基を側鎖末端に有するアミノ酸誘導体のラセミ体溶液にアミノアシラーゼを添加する調整工程と、前記アミノ酸誘導体の分子内環化反応条件に前記ラセミ体溶液を保持させ前記アミノアシラーゼのエナンチオマー特異的作用により光学活性ピペコリン酸を生成させる生成工程と、前記ラセミ体溶液から前記光学活性ピペコリン酸を溶媒抽出する抽出工程と、を備えたことを特徴とするピペコリン酸の製造方法。

【請求項2】

前記分子内環化反応条件が、前記ラセミ体溶液におけるpH6~9、温度が20~50、保持時間が10~30時間であることを特徴とする請求項1に記載の光学活性なピペコリン酸の製造方法。 10

【請求項3】

前記アミノ酸誘導体がDL-N-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサン酸、DL-N-アセチル-2-アミノ-6-クロロヘキサン酸、DL-N-アセチル-2-アミノ-6-ヨードヘキサン酸、DL-N-アセチル-2-アミノ-6-メタンсульフォキシヘキサン酸、DL-N-アセチル-2-アミノ-6-トシルオキシヘキサン酸のいずれか1のラセミ体であって、前記アミノアシラーゼがアスペルギルス・ジーナス(Aspergillus genus)L-アミノアシラーゼ又はアルカリジーナスキシロースオキシダンス(Alcaligenes xylosoxydans)D-アミノアシラーゼであることを特徴とする請求項1又は2に記載のピペコリン酸の製造方法。 20

【請求項4】

前記抽出工程によりL-ピペコリン酸が抽出除去された残溶液からD-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサン酸を回収する工程と、前記回収されたD-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサン酸にアルカリジーナスキシロースオキシダンス(Alcaligenes xylosoxydans)D-アミノアシラーゼを添加し、そのD-エナンチオマー特異的作用により脱アセチル化させ、分子内環化させてD-ピペコリン酸を生成する工程とを備えたことを特徴とする請求項1乃至3の内いずれか1項に記載のピペコリン酸の製造方法。

【請求項5】

前記抽出工程によりD-ピペコリン酸が抽出除去された残溶液からL-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサン酸を回収する工程と、前記回収されたL-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサン酸にアスペルギルス・ジーナス(Aspergillus genus)L-アミノアシラーゼを添加し、そのL-エナンチオマー特異的作用により脱アセチル化させ、分子内環化させてL-ピペコリン酸を生成する工程とを備えたことを特徴とする請求項1乃至3の内いずれか1項に記載のピペコリン酸の製造方法。 30

【請求項6】

前記DL-N-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサン酸が、アセタミドマロン酸ジエチルと1,4-ジブromoブタンを反応させてアセタミド-4-ブromoブチルマロン酸ジエチルを生成させる工程と、前記アセタミド-4-ブromoブチルマロン酸を半ケン化して加熱脱炭酸しDL-N-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサン酸エチルを得る工程と、前記工程で得られたDL-N-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサン酸エチルをケン化、結晶化させる工程とを順次実行して製造されたものであることを特徴とする請求項3乃至5の内いずれか1項に記載のピペコリン酸の製造方法。 40

【請求項7】

ベンジルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基などの脱着時に前記ハロゲン基を保護して温和な条件により脱着可能なウレタン型の保護基がアミノ基に結合され側鎖末端にハロゲン基を備えたアミノ酸誘導体の溶液を前記保護基の脱着条件に保持して、この脱着に伴う前記アミノ酸誘導体の分子内環化反応によってピペコリン酸を生成させることを特徴とするピペコリン酸の製造方法。

【請求項8】

前記脱着条件が、室温下におけるパラジウム炭を触媒とする水素添加反応条件又は、塩化水素含有ジオキサン溶液又は酢酸エチル中での脱着反応条件であることを特徴とする請求項7に記載のピペコリン酸の製造方法。

【請求項9】

前記アミノ酸誘導体が(1) N-保護-L-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸や(2) N-保護-D-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸であって、

(1) 前記N-保護-L-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸が、N-ベンジルオキシカルボニル-アミノマロン酸ジエチル、N-t-ブトキシカルボニル-アミノマロン酸ジエチル等の保護基を有するアミノマロン酸誘導体と1,4-ジブロモブタンを反応させてN-保護-アミノ-4-ブロモブチルマロン酸ジエチルを生成せしめた後、氷冷下で希薄強アルカリ水を添加して半ケン化し、次いで加熱脱炭酸して得られるDL-N-保護-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸エチルをタンパク質分解酵素またはエステラーゼの加水分解作用によって作成されたものであり、

(2) 前記N-保護-D-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸が、前記N-保護-L-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸の作成後の溶液から回収されたN-保護-D-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸エチルを氷冷下で希薄強アルカリ水を添加してケン化して作成されたものであることを特徴とする請求項7又は8に記載のピペコリン酸の製造方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

20

【発明の属する技術分野】

本発明はL-ピペコリン酸およびD-ピペコリン酸を低原価で量産できるピペコリン酸の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

光学活性ピペコリン酸は、図1に示すように天然に存在する種々の有用な生理活性物質の構成要素として含まれ、また合成医薬品の原料としても重要な化合物である。天然物質の構成成分としてはFK506(免疫抑制剤)、Rapamycin(免疫抑制剤)、やTrapoxin A(HDAC阻害剤)が、合成医薬品ではVX710(抗がん剤)やBupivacaine(局部麻酔剤)が挙げられる。また、L-ピペコリン酸を含む天然物にCyl-2(非特許文献1)、及びSandramycin(非特許文献2)がある。

30

さらに、人工的に設計され、薬理活性を有するため有用である化合物中にもL-ピペコリン酸が構成要素として導入されている。例えば、VX710(非特許文献3)およびL-365,209(非特許文献4)が挙げられる。

D-ピペコリン酸を含む天然物には例えば、Trapoxin A(非特許文献5)とApicidin(非特許文献6)とが挙げられる。

これらの構造を元に新規様々な薬理活性を有する医薬品の開発および製造を行なおうとする時、分子構造の組み立て上、L-ピペコリン酸またはD-ピペコリン酸が必要であるが、特殊な環状イミノ酸であるピペコリン酸を完全な光学活性体で安価に入手する事が困難であり、創薬上のネックになっていた。そこで過去20年以上に渡って、主として天然物の生理活性と構造との相関解明のために、必要とされる光学活性ピペコリン酸の合成および製造が数々試みられてきた。

40

【0003】

(1) 例えば、ピペコリン酸の製造方法として(非特許文献7)には、L-またはD-リシン、或いはその他のアミノ酸からの誘導法が、また、(非特許文献8)には酵素を用いた方法として、リパーゼ、アミダゼ、または酪酸ピニル存在下でアシラーゼを用いる方法が記載されている。

(2) (特許文献1)や(非特許文献9)には、比較的安価なDL-ピペコリン酸に対して酒石酸、キラルなパラジウム複核錯体、またはO-フェニル乳酸を反応させ、分別

50

沈殿による光学分割法が開示されており、ここでは、DL-ピペコリン酸を混合物媒体中で光学活性フェノキシプロピオン酸と反応させ、得られた難溶性ジアステレオマー塩を水に溶解又は懸濁し、これに当量又は過剰の酸を加えて複分解して光学的に純粋なD-ピペコリン酸又はL-ピペコリン酸を製造する方法が記載されている。

(3)(非特許文献10)には、不斉触媒を用いたり、不斉点を導入したりするなどの不斉合成法が試みられており、(非特許文献11)には、ハロゲン化アルキルに対するアミン類の分子内SN2反応を用いてピペリジン環を形成する方法が記載されている。

(4)(非特許文献12)には、L-リシンを原料として2種の酵素(lysine 6-aminotransferase および L-1-piperidine 6-carboxylate reductase)を応用した方法が提案されている 10

【0004】

【非特許文献1】

(Hirota, A., Suzuki, A., Aizawa, K., and Tamura, S. (1973). Structure of Cyl-2, a novel cyclotetrapeptide from *Cylindrocapsa scoparium*. *Arg. Biol. Chem.* 37, 955-956)、Rapamycin (Vezina, C., Kudelski, A., and Sehgal, S. N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic 20 c. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.* 28, 721-726)、FK506 (Tanaka, H., Kuroda, A., Marusawa, H., Hatanaka, H., Kino, T., Goto, T., and Hashimoto, M. (1987). Structure of FK506: a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 5031-5033)

【非特許文献2】

(Boger, D. L., Chen, J. H., and Saionz, K. W. (1996). (-)-Sandramycin: Total synthesis and characterization of DNA binding properties. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 1629-1644) 30

【非特許文献3】

(Germann, U. A., Shlyakhter, D., Mason, V. S., Zelle, R. E., Duffy, J. P., Galullo, V., Armistead, D. M., Saunders, J. O., Boger, J., and Harding, M. W. (1997). 40 Cellular and biochemical characterization of VX-710 as a chemosensitizer: Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in vitro. *Anticancer Drugs* 8, 125-140)、Bupivacaine (Adger, B., Dyer, U., Hutton, G., and Woods, M. (1996). Stereospecific synthesis of the anaesthetic levobupivacaine. *Tetrahedron Lett.* 37, 6399-6402)、

【非特許文献4】

(Pettibone, D. J., Clineschmidt, B. V., Anderson, P. S., Freidinger, R. M., Lundell, G. F., Koupal, L. R., Schwartz, C. D., Williamson, J. M., Goetz, M. A., Hensens, O. D., Liesch, J. M., and Springer, J. P. (1989). A structurally unique, potent, and selective oxytocin antagonist derived from *Streptomyces silvensis*. *Endocrinology* 125, 217-222)

【非特許文献5】

10

(Itagaki, H., Nagashima, K., Sugita, K., Yoshida, H., Kawamura, Y., Yasuda, Y., Matsumoto, K., Ishii, K., Uotani, N., Nakai, H., Terui, A., and Yoshimatsu, S. (1990). Isolation and structural elucidation of new cyclotetrapeptides, Trapoxins A and B, having detransformation activities as antitumor agents. *J. Antibiotics* 43, 1524-1532)

【非特許文献6】

20

(Darkin-Rattray, S. J., Gurnett, A. M., Myers, R. W., Dulski, P. M., Crumley, T. M., Allocco, J. J., Cannova, C., Meinke, P. T., Colletti, S. L., Bednarek, M. A., Singh, S. B., Goetz, M. A., Dombrowski, A. W., Polishook, J. D., and Schmatz, D. M. (1996). Apicidin: A novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. USA* 93, 13143-13147, Singh, S. B., Zink, D. L., Liesch, J. M., Mosley, R. T., Dombrowski, A. W., Bills, G. F., Darkin-Rattray, S. J., Schmatz, D. M., and Goetz, M. A. (2002). Structure and chemistry of apicidins, a class of novel cyclic tetrapeptides without a terminal α -keto epoxide as inhibitors of histone deacetylase with potent antiprotozoal activities. *J. Org. Chem.* 67, 815-825)

30

【非特許文献7】

40

(Fujii, T. and Miyoshi, M. (1975). A novel synthesis of L-pipecolic acid. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 48, 1341-1342; Kisfaludy, L., and Korenczki, F. (1982). One-step synthesis of L-piperidine-2-carboxylic acid. *Synthesis* 9, 163; Ohtani, B., Tsuru, S., Nishimoto, S., and Kagiya, T. (1990). Photocatalytic one-step syntheses of cyclic imino acids by aqueous semiconductor suspensions. *J. Org. Chem.* 55, 555

50

1 - 5553)。

【非特許文献8】

(Ng - Youn - Chen, M. C., Serreqi, A. N., Huang, Q. L., and Kazlauskas, R. J. (1994). Kinetic resolution of pipecolic acid using partially-purified lipase from *Aspergillus niger*. *J. Org. Chem.* 59, 2075 - 2081; Eichhorn, E., Roduit, J., Shaw, N., Heinzmann, K., and Kiener, A. (1997). Preparation of (S)-piperazine-2-carboxylic acid, (R)-piperazine-2-carboxylic acid, and (S)-piperidine-2-carboxylic acid by kinetic resolution of the corresponding racemic carboxamides with stereoselective amidases in whole bacterial cells. *Tetrahedron: Asymmetry* 8, 2533 - 2536; Sanchez-Sancho, F. and Herradon, B. (1998). Short syntheses of (S)-pipecolic acid, (R)-coniine, and (S)-d-coniceine using biocatalytically-generated chiral building blocks. *Tetrahedron: Asymmetry* 9, 1951 - 1965)

【非特許文献9】

(Portoghese, P. S., Pazdernik, T. L., Kuhn, W. L., Hite, G., Shafi'ee, A. (1968) Stereochemical studies on medicinal agents. V. Synthesis, configuration, and pharmacological activity of pipradrol enantiomers. *J. Med. Chem.* 11, 12 - 15; Hardtmann, G. E., Houlihan, W. J., and Giger, R. K. A. (1988). Trifluoromethyl substituted tetracyclic quinazolin-ones having tranquilizing activity. US patent 4760065; Hochless, D. C. R., Mayadunne, R. C., and Wild, S. B. (1995). Convenient resolution of (\pm)-piperidine-2-carboxylic acid ((\pm)-pipecolic acid) by separation of palladium(II) diastereomers containing orthometallated (S)-(-)-1-[1-(Dimethylamino)ethyl]naphthalene. *Tetrahedron: Asymmetry* 6, 3031 - 3037)

【非特許文献10】

(Berrien, J. F., Royer, J., Husson, H. P. (1994). Asymmetric synthesis. 32. A new access to enantiomerically pure (S)-(-)-pipecolic acid and 2- or 6-alkylated derivatives. *J. Org. Chem.* 59, 3769 - 3774; Foti, C., J. and Comins, D. L. (1995). Synthesis and reactions of α -(trifluoromethanesulfonyloxy)enecarbamates prepared

from N-acyllactams. *J. Org. Chem.* 60, 2656-2657; Agami, C., Kadoury-Puchot, C., and Kizirian, J. C. (2000). A new enantioselective synthesis of (2S)-pipecolic acid. *Synth. Commun.* 30, 2565-2572; Ginesta, X., Pericas, M. A., Riera, A. (2002). Straightforward entry to the pipecolic acid nucleus. Enantioselective synthesis of baikiaian. *Tetrahedron Lett.* 43, 779-782).

10

【非特許文献11】

(Fernandez-Garcia, C., and McKervey, M. A. (1995). A short enantioselective synthesis of pipecolic acid. *Tetrahedron: Asymmetry* 6, 2905-2906; Myers, A. G., Gleason, J. L., Yoon, T., and Kung, D. W. (1997). Highly practical methodology for the synthesis of D- and L-amino acids, N-protected amino acids, and N-methyl-amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 656-673; Nazabadioko, S., Perez, R. J., Brieva, R., and Gotor, V. (1998). Chemoenzymatic synthesis of (S)-2-cyanopiperidine, a key intermediate in the route to (S)-pipecolic acid and 2-substituted piperidine alkaloids. *Tetrahedron: Asymmetry* 9, 1597-1604).

20

【非特許文献12】

(Agematsu, H., and Fujii, T. (2002). Production of L-pipecolic acid by recombinant *Escherichia coli* at an industrial scale. *Bio Industry* 19, 40-47).

30

【0005】

【特許文献1】

特開2000-178253号公報

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、前記の従来技術では以下のような課題があった。

(a) 非特許文献7に記載のリシンなどのアミノ酸からの誘導法は、-位および
-位のアミノ基の選択反応を必要とし、アミノ基の官能基変換の際に水酸化等の副反応が多く起こるため低収率、低純度であり、試薬の使用に危険が伴うなど操作上の問題があり、安価な供給が困難であるという課題があった。

40

(b) 非特許文献8に記載のリパーゼ、アミダゼ、または酪酸ビニル存在下でアシラーゼを用いる方法では、ジアステレオマー選択性が不十分であるの理由で実用的な製造法となるに到らず、酵素の立体特異性の応用面で効率化を図る点で不十分であるという課題があった。

(c) 特許文献1や非特許文献9などに記載の分別沈殿法では、DL-ピペコリン酸を原料として光学分割するので、光学異性体を別途準備し、使用後それを回収する必要がある点で非効率的であるという課題があった。

(d) 非特許文献10に記載の不斉合成法は、不斉点を導入する試薬そのものが高価で

50

あり、規模も実験室レベルであるため量産性に欠け実用的ではなく 工業的な適用が困難であるという課題があった。

(e) 非特許文献 11 に記載のアミン類の分子内 S N 2 反応を用いてピペリジン環を形成する方法では、ピペリジン環のものに限定されるため直接ピペコリン酸に到らず低収率であり、また、酵素による光学分割法ではないため 不要のジアステレオマーも副生してしまい高純度のものが得られ難いという課題があった。

(f) 非特許文献 12 の L - リシンを原料として 2 種の酵素を適用した方法は、L - 体の立体特異性を持った酵素を用いるため、また、D - 体の立体特異性を有する同様酵素が開発されていないために D - ピペコリン酸の製造には適用できないという課題があった。

10

【0007】

本発明は前記従来課題を解決するためになされたもので、高純度に光学分割されたピペコリン酸を高収率で安価に供給することができるピペコリン酸の製造方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

請求項 1 に記載のピペコリン酸の製造方法は、ハロゲン基を側鎖末端に有するアミノ酸誘導体のラセミ体溶液にアミノアシラーゼを添加する調整工程と、前記アミノ酸誘導体の分子内環化反応条件に前記溶液を保持させ前記アミノアシラーゼのエナンチオマー特異的作用により光学活性ピペコリン酸を生成させる生成工程と、前記溶液から前記光学活性ピペコリン酸を溶媒抽出する抽出工程と、を備えて構成されている。

20

これによって、高純度に光学分割されたピペコリン酸を高収率で安価に製造することができる。すなわち、ハロゲン基を側鎖末端に有するアミノ酸誘導体に光学活性なアミノアシラーゼを作用させることによって、アミノ酸誘導体をエナンチオマー特異的に加水分解させ、その直後に起こる分子内環化反応によって光学活性ピペコリン酸を効率的に生成させることができる。

【0009】

ここで、アミノ酸誘導体としては、DL - N - アセチル - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサ酸などのアミノアシラーゼによるエナンチオマー特異的加水分解作用により分子内環化してピペコリン酸を生成可能なラセミ体やラセミ体を光学分割されたものが適用できる。ハロゲン基は、アミノ酸誘導体の分子内環化反応を誘発して脱離するするためのもので、臭素、塩素、ヨウ素などのハロゲン元素の他、アルキルまたはアリルスルホン酸エステルを適用することができる。なお、アミノ酸誘導体の側鎖末端とは、アミノ酸誘導体における - 炭素から伸長した原子団の末端をいう。

30

アミノアシラーゼは微生物などから抽出され、アミノ酸誘導体のアミド結合を加水分解させる酵素であり、アスペルギルスジナス (*Aspergillus genus*) L - アミノアシラーゼ、アルカリジナスキシロースオキシダナス (*Alcaligenes xylosoxydans*) D - アミノアシラーゼなどが含まれる。

分子内環化反応は、図 3 に例示されるようにアミノ酸誘導体を自己環化させて特殊なイミノ酸を生成させる反応である。アミノ酸誘導体を所定の分子内環化反応条件に保持してアミノアシラーゼの作用で加水分解させることにより自己環化させることができる。すなわち、アミノアシラーゼの酵素的エナンチオマー特異的加水分解およびこの加水分解に伴う分子内環化反応によって光学活性なピペコリン酸 (L - ピペコリン酸および D - ピペコリン酸) を製造できる。

40

【0010】

請求項 2 に記載のピペコリン酸の製造方法は、請求項 1 に記載の発明において、前記分子内環化反応条件が、前記ラセミ体溶液における pH 6 ~ 9、温度が 20 ~ 50、保持時間が 10 ~ 30 時間であるように構成されている。

これによって、アミノアシラーゼによるエナンチオマー特異的加水分解およびこれに伴う分子内環化反応を適正に維持させることができ、高純度の光学活性ピペコリン酸をさらに

50

高収率で得ることができる。

ここで、ラセミ体溶液における pH が 6 より低くなると、特異的加水分解の反応速度などが低下する傾向が現れ、逆に pH が 9 を超えるとアミノアシラーゼが変性して光学活性なピペコリン酸を有効に得ることができなくなる傾向が現れるので好ましくない。

ラセミ体溶液における温度が 20 より低くなると、反応速度などが極端に低下する傾向が現れ、逆に温度が 50 を超えるとアミノアシラーゼが変性して光学活性なピペコリン酸を有効に得ることができなくなる傾向が現れるので好ましくない。

溶液における分子内環化反応の保持時間が 10 時間より短くなると、特異的加水分解の反応速度などが低下する傾向が現れ、逆に保持時間が 30 時間より長くなるとアミノアシラーゼが変性して光学活性なピペコリン酸を有効に得ることができなくなる傾向が現れるので好ましくない。

10

【0011】

請求項 3 に記載のピペコリン酸の製造方法は、請求項 1 又は 2 に記載の発明において、前記アミノ酸誘導体が DL-N-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサ酸、DL-N-アセチル-2-アミノ-6-クロロヘキサ酸、DL-N-アセチル-2-アミノ-6-ヨードヘキサ酸、DL-N-アセチル-2-アミノ-6-メタンスルフォキシヘキサ酸、DL-N-アセチル-2-アミノ-6-トシルオキシヘキサ酸のいずれか 1 のラセミ体であって、前記アミノアシラーゼがアスペルギルス・ジーナス (*Aspergillus genus*) L-アミノアシラーゼ又はアルカリジーナスキシロースオキシダンス (*Alcaligenes xylosoxydans*) D-アミノアシラーゼであるように構成されている。

20

これによって、光学活性なピペコリン酸を高収率で得ることができ、酵素を用いる光学分割によって得られるアミノ酸誘導体を中間体として、簡便かつ好収率で D-および L-ピペコリン酸を製造することができる。

ここで、L-アミノアシラーゼとしては、前記以外に (*Aspergillus genus*, *Thermococcus eitoralis*) 及びアシラーゼ I (ブタスイ臓、*Aspergillus melleus*) を用いることもできる。

【0012】

請求項 4 に記載のピペコリン酸の製造方法は、請求項 1 乃至 3 の内いずれか 1 項に記載の発明において、前記抽出工程により L-ピペコリン酸が抽出除去された残溶液から D-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサ酸を回収する工程と、前記回収された D-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサ酸にアルカリジーナスキシロースオキシダンス (*Alcaligenes xylosoxydans*) D-アミノアシラーゼを添加し、その D-エナンチオマー特異的作用により脱アセチル化させ、分子内環化させて D-ピペコリン酸を生成する工程とを備えて構成されている。

30

これによって、L-ピペコリン酸を抽出した残溶液を有効に用いて、付加価値の高い D-ピペコリン酸を無駄なく生成でき、生産性に優れたピペコリン酸製造システムを構成することができ、特殊なイミノ酸である光学活性なピペコリン酸の供給不足に対応して両光学異性体の供給を容易化して医療開発研究などを押し進めることができる。

【0013】

請求項 5 に記載のピペコリン酸の製造方法は、請求項 1 乃至 3 の内いずれか 1 項に記載の発明において、前記抽出工程により D-ピペコリン酸が抽出除去された残溶液から L-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサ酸を回収する工程と、前記回収された L-アセチル-2-アミノ-6-ブromoヘキサ酸にアスペルギルス・ジーナス (*Aspergillus genus*) L-アミノアシラーゼを添加し、その L-エナンチオマー特異的作用により脱アセチル化させ、分子内環化させて L-ピペコリン酸を生成する工程とを備えて構成されている。

40

これによって、D-ピペコリン酸を抽出した残溶液を有効に用いて、付加価値の高い L-ピペコリン酸を無駄なく生成でき、生産性に優れたピペコリン酸製造システムを実現できる。

50

【0014】

請求項6に記載のピペコリン酸の製造方法は、請求項3乃至5の内いずれか1項に記載の発明において、前記DL-N-アセチル-2-アミノ-6-プロモヘキサン酸が、アセタミドマロン酸ジエチルと1,4-ジプロモブタンを反応させてアセタミド-4-プロモブチルマロン酸ジエチルを生成させる工程と、前記アセタミド-4-プロモブチルマロン酸を半ケン化して加熱脱炭酸しDL-N-アセチル-2-アミノ-6-プロモヘキサン酸エチルを得る工程と、前記DL-N-アセチル-2-アミノ-6-プロモヘキサン酸エチルをケン化、結晶化させる工程とを順次実行して製造されるように構成されている。

これによって、比較的安価で入手しやすいアセタミドマロン酸ジエチルを出発原料として、ピペコリン酸製造のため中間体となるDL-N-アセチル-2-アミノ-6-プロモヘキサン酸を制御しやすい容易な工程で効率的に製造することができ、生産性に優れた製造システムを構築できる。

ここで、半ケン化の条件は、アセタミド-4-プロモブチルマロン酸に氷冷下、1当量強のアルカリを添加する条件であり、加熱脱炭酸の条件はトルエンまたは酢酸エチル溶液を添加して加熱還流させる条件である。

【0015】

請求項7に記載のピペコリン酸の製造方法は、t-ベンジルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基などの脱着時に前記ハロゲン基を保護して温和な条件により脱着可能なウレタン型の保護基がアミノ基に結合され側鎖末端にハロゲン基を備えたアミノ酸誘導体の溶液を前記保護基の脱着条件に保持して、この脱着に伴う前記アミノ酸誘導体の分子内環化反応によってピペコリン酸を生成させることのように構成されている。

これによって、保護基の脱着や加水分解に伴う分子内環化反応によってピペコリン酸を有効に生成することができる。すなわち、図4に例示されるようにアミノ酸誘導体の保護基（アミノ基を修飾するt-ブトキシカルボニル基の部分）を所定の条件下で加水分解させ、これに続く分子内環化反応によってピペコリン酸を効率的に生成させるものである。こうして、L-ピペコリン酸およびD-ピペコリン酸並びにそれらの誘導体を個別に、安価に供給することができる。

保護基はジプロモブタンとの反応時におけるアミノ酸誘導体のアミノ基を保護するために導入される官能基であって、また分子内環化反応直前までアミノ基のプロモ結合炭素との反応を抑えるための保護基であり、ベンジルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基などが用いられる。

【0016】

請求項8に記載のピペコリン酸の製造方法は、請求項7に記載の発明において、前記保護基の脱着条件が、室温下におけるパラジウム炭を触媒とする水素添加反応条件又は、塩化水素含有ジオキサン溶液又は酢酸エチル溶液中での脱着反応条件であるように構成される。

これによって、光学活性のピペコリン酸を得るために必要な脱着条件を適正に保持させることができ、100%近い高純度のピペコリン酸を80~90%の高収率で得ることができ、保護基を有するアミノ酸誘導体を用いて、工業的な規模でのピペコリン酸の製造を可能にする。

ここで、塩化水素の濃度は2モル濃度でアミノ酸誘導体に対し約10当量用いられる。

【0017】

請求項9に記載のピペコリン酸の製造方法は、請求項7又は8に記載の発明において、前記アミノ酸誘導体が(1)N-保護-L-2-アミノ-6-プロモヘキサン酸や(2)N-保護-D-2-アミノ-6-プロモヘキサン酸であって、(1)前記N-保護-L-2-アミノ-6-プロモヘキサン酸が、N-ベンジルオキシカルボニル-アミノマロン酸ジエチル、N-t-ブトキシカルボニル-アミノマロン酸ジエチル等の保護基を有するアミノマロン酸誘導体と1,4-ジプロモブタンを反応させてN-保護-アミノ-4-プロモブチルマロン酸ジエチルを生成せしめた後、氷冷下で希薄強アルカリ水を添加して

10

20

30

40

50

半ケン化し、次いで加熱脱炭酸して得られる DL-N-保護-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸エチルをタンパク質分解酵素またはエステラーゼの加水分解作用によって生成されたものであり、

(2) 前記 N-保護-D-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸が、前記 N-保護-L-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸の生成後の溶液から回収された N-保護-D-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸エチルを氷冷下で希薄強アルカリ水を添加してケン化して生成されるように構成されている

これによって、光学活性ピペコリン酸 (D-ピペコリン酸、L-ピペコリン酸) 製造の際に (1) N-保護-L-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸や (2) N-保護-D-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸を中間原料として、効率的な生産システムを構成することができ、医薬品原料となるような光学活性ピペコリン酸を低原価で量産することができる。

ここで、温和な条件とは、アミノ酸誘導体の反応保持温度が 0 以下であるような条件をいい、これによって半ケン化及びケン化の程度などを制御することができる。

タンパク質分解酵素としては、エステル分解作用を有するキモトリプシン、ズブチリシン、アルカリプロテアーゼなどや、立体特異性が厳密であるエステラーゼなどが好適に用いられる。

希薄強アルカリ水としては、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等の約 0.1 N 溶液が用いられる。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明者らは、L-ピペコリン酸および D-ピペコリン酸を構成要素として含有する生理活性天然物をリードとする抗がん剤の開発ならびに特殊人工アミノ酸の開発中に、偶然ピペコリン酸を生成する副反応を発見した。この反応を利用すれば新規に L-ピペコリン酸および D-ピペコリン酸並びにそれら誘導体を簡便に製造することができるのではないかと考え、上記課題を解決するため鋭意研究を行なった結果、図 3 に示すようにハロゲン基を側鎖末端に有するラセミのアミノ酸誘導体がアスペルギルスジーンナス (*Aspergillus genus*) L-アミノアシラーゼ及び、アルカリジーンナスキシロースオキシダンス (*Alcaligenes xylosoxydans*) D-アミノアシラーゼの作用により、定量的に L-ピペコリン酸および D-ピペコリン酸を生成することを確認した。また、アミノ基をウレタン型等の保護基で保護し、側鎖末端にハロゲン基、アルキルスルホキシ基を有するラセミ体の 2-アミノヘキサン酸エステルを、ズブチリシン、キモトリプシン、酸性プロテアーゼ (*Aspergillus niger*)、中性プロテアーゼ (*Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*) 又はアルカリプロテアーゼ (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus melleus*, *Bacillus licheniformis*) 等のプロテアーゼで処理した後に、保護基の除去と同時に L-ピペコリン酸および D-ピペコリン酸が生成することを確認した。本発明者らはこの酵素的エナンチオマー特異的加水分解および自動環化反応を L-ピペコリン酸および D-ピペコリン酸の簡便な製造法に利用できることを見出して本発明を完成させた。

すなわち本発明は、以下の L-ピペコリン酸および D-ピペコリン酸の製造方法を包含するものである。

[1] アセタミドマロン酸ジエチルより N-アセチル-DL-2-アミノ-6-ハロゲノヘキサン酸を原料として調製する方法。

[2] ラセミ体中の L-体に *Aspergillus genus* L-アミノアシラーゼを、D-体に *Alcaligenes xylosoxydans* D-アミノアシラーゼを作用させて、L-ピペコリン酸および D-ピペコリン酸を生成せしめる方法。

[3] N-アシル-DL-2-アミノ-6-ハロゲノヘキサン酸エステルにプロテアーゼを作用させた後、アシル基を除去すると同時に L-ピペコリン酸を生成させる方法。

[4] 回収した D-N-アシル-2-アミノ-6-ハロゲノヘキサン酸エステルより

10

20

30

40

50

、脱保護によってD - ピペコリン酸またはその誘導体を生成せしめる方法。

【0019】

すなわち、本実施の形態の概要は以下のとおりである。

アセタミドマロン酸ジエチルと1, 4 - ジブロモブタンを定法で反応させ、温和な条件下でケン化反応を2回行い、得られるN - アセチル - DL - 2 - アミノ - 6 - ヘキサン酸をL - アミノアシラーゼによって処理すれば、酵素特異的光学分割によって生成したL - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸は、反応溶液中で直ちにL - ピペコリン酸に変わる。続いて定量的に回収するN - アセチル - D - 2 - アミノ - 6 - ヘキサン酸に更にD - アミノアシラーゼを作用させ、同様にD - ピペコリン酸を得る事ができる。

【0020】

一方、図4に示すように、N - t - ブトキシカルボニル - アミノマロン酸ジエチルのように脱着可能な保護基を用いる場合、同様に1, 4 - ジブロモブタンと反応させ、N - t - ブトキシカルボニル - 2 - アミノ - 4 - ブロモブチルマロン酸ジエチルを得、上記と同様に半ケン化、脱炭酸のステップを経て得られるN - t - ブトキシカルボニル - DL - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸エチルをズブチリシン等のタンパク質分解酵素またはエステラーゼによって処理すると、エチルエステルの酵素的、立体特異的加水分解によってN - t - ブトキシカルボニル - L - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸と、酵素作用を受けないN - t - ブトキシカルボニル - D - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸エチルとが得られる。両者は容易に分離可能である。N - t - ブトキシカルボニル - D - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸エチルを、更にエタノール中で氷冷下ケン化を行ない、定量的にN - t - ブトキシカルボニル - D - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸に変換する。N - t - ブトキシカルボニル - L - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸を酸処理し、次いで中和すると生成したL - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸は自動的に分子内環化反応を起こして、L - ピペコリン酸を生成する。同様にしてD - ピペコリン酸を得る。

【0021】

ベンジルオキシカルボニル基をアミノマロン酸ジエチルのアシル保護基として用いる場合、N - ベンジルオキシカルボニル - L - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸をメタノール中でパラジウム等の触媒存在下、接触還元すれば、生成したL - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸は自動的に分子内環化反応により、L - ピペコリン酸を生成する。N - ベンジルオキシカルボニル - D - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸からは同様にD - ピペコリン酸が得られる。t - ブトキシカルボニル基以外の、ベンジルオキシカルボニル基等温和に脱着可能な保護基も用い得る。また、エチルエステル以外のエステルも用い得る。

【0022】

本実施の形態において、2 - アミノ - 6 - ハロゲノヘキサン酸のアミノ保護基として、アセチル基以外にその他の置換アシル基およびウレタン型のアシル基を含む。同等の作用が得られるからである。L - アミノアシラーゼおよびD - アミノアシラーゼのエナンチオマー特異的（光学特異性、立体特異性）加水分解活性が充分であればよい。エステラーゼ活性を示す酵素はエナンチオマー特異的（光学特異性、立体特異性）加水分解活性が充分であれば、その対象エステルの種類と本来の酵素反応の特異性を問わない。

【0023】

以上のように本実施の形態のピペコリン酸の製造方法は、DL - N - アセチル - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸に *Aspergillus* genus L - アミノアシラーゼを作用させ、酵素による光学分割に続いて速やかに分子内環化反応を起こさせるL - ピペコリン酸を生成させる。また、この反応から回収されるD - N - アセチル - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸を更に *Alcaligenes xylosoxydans* D - アミノアシラーゼで処理すると、同様にD - ピペコリン酸が得られる。このように側鎖にブロモアルキル基を有するラセミ体アミノ酸の酵素分割を利用して、L - およびD - ピペコリン酸を高純度、高収率で合成できる優れた生産システムを構築できる。

【0024】

以下、実施例により図面を用いてさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に制限

10

20

30

40

50

されるものではない。

(実施例1)

図2にN-アセチル-DL-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸の合成の概要を示す。

(1)アセタミド-4-ブロモブチルマロン酸ジエチルの合成

300 ml ナスフラスコ中で脱水エタノール(100 ml)に金属ナトリウム(2.19 g, 95 mmol)を加え30分間攪拌後、アセタミドマロン酸ジエチル(21.08 g, 100 mmol)を加え30分間加熱(120)下攪拌した。そこに1,4-ジブロモブタン(59 ml, 500 mmol)を加えて5時間の還流を行った。放冷後、酢酸(0.29 ml, 5 mmol)を加え、エタノールと1,4-ジブロモブタンをそれぞれ留去した。酢酸エチル(300 ml)で目的物を抽出した後、シリカゲルクロマトグラフィー(4.7 cm x 17 cm, 酢酸エチル/ヘキサン=1:1)で精製した。溶媒を留去してアセタミド-4-ブロモブチルマロン酸ジエチルの白色結晶を得た。収量: 26.2 g、収率: 73%、Rf値: 0.82 (CHCl₃ / MeOH = 9:1)。

(2)アセトアミド-4-ブロモブチルマロン酸モノエチルの合成

アセトアミド-4-ブロモブチルマロン酸ジエチル(26.2 g, 74.4 mmol)をエタノール(80 ml)に溶解し、氷冷下で2N水酸化ナトリウム水溶液(40 ml)を30分毎に5回に分けて加えた。3時間後、反応溶液を濃縮しエーテルおよび4%炭酸水素ナトリウム水溶液と振った。4%炭酸水素ナトリウム水溶液をクエン酸で中和、酸性とした後、析出油状物を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去してアセトアミド-4-ブロモブチルマロン酸モノエチルの白色結晶を得た。収量: 20.4 g、収率: 85%、Rf値: 0.64 (CHCl₃ / MeOH / AcOH = 90:10:2)。

(3)N-アセチル-DL-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸エチルの合成

アセトアミド-4-ブロモブチルマロン酸モノエチル(20.4 g, 63.1 mmol)を酢酸エチル(100 ml)に溶解し、トルエンや酢酸エチル中で3時間加熱還流し脱炭酸を行った。溶液を濃縮し、エーテルに溶解させ4%炭酸水素ナトリウム水溶液、及び飽和食塩水で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去してN-アセチル-DL-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸エチルの油状物を得た。収量: 17.0 g、収率: 97%、Rf値: 0.62 (CHCl₃ / MeOH = 9:1)。

(4)N-アセチル-DL-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸の合成

N-アセチル-DL-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸エチル(17.0 g, 60.9 mmol)をエタノール(50 ml)に溶解し、氷冷下で2N水酸化ナトリウム水溶液(25 ml)を30分毎に5回に分けて加えた。3時間後、溶液を濃縮しエーテルおよび4%炭酸水素ナトリウム水溶液と振った。4%炭酸水素ナトリウム水溶液をクエン酸で中和し、酸性とした後、目的物を酢酸エチルに抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去してN-アセチル-DL-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸の白色結晶を得た。収量: 12.5 g、収率: 81%、Rf値: 0.54 (CHCl₃ / MeOH / AcOH = 90:10:2)。

【0025】

(実施例2)

次に、L-アミノアシラーゼによるL-ピペコリン酸の合成、N-アセチル-D-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸の回収、およびD-アミノアシラーゼによるD-ピペコリン酸の合成について説明する。

図3はその合成などの概要を示す図である。

(1)N-アセチル-DL-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸(10.3 g, 4 50

1.0 mmol) を 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液 (約 200 ml) に溶解し、pH を 7.0 に調整した。この溶液に $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (48 mg) および *Aspergillus* genus L-アミノアシラーゼ (東京化成, 2.0 g) を加え 38 で 24 時間反応させた。反応溶液を濃縮し 1 N 塩酸を加えて pH 3 とした後、N-アセチル-D-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸を酢酸エチルで抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去して N-アセチル-D-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸を白色結晶として得た。収量 : 4.59 g、収率 : 89%、Rf 値 : 0.52 ($\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{AcOH} = 90 : 10 : 2$)、Rt : 13.38 min [B : 0% - 100% 30 min, (A : 100% $\text{AcCN} / \text{H}_2\text{O} / 0.1\% \text{TFA}$, B : 100% $\text{AcCN} / 0.1\% \text{TFA}$) YMC-Pack ODS-A 150 x 4.6 mm, $l = 220 \text{ nm}$]。 10

(2) また、N-アセチル-D-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸の抽出後の水溶液を水酸化ナトリウムで pH 7 に調整した後、溶液陽イオン交換樹脂 (Amberlite IR-120, 200 ml) カラムに投じ、1 M アンモニア水溶液で溶出した。溶出液を濃縮乾固して L-ピペコリン酸を白色結晶として得た。収量 : 1.84 g、収率 : 80%、 $[\alpha]_D^{20} : -26.3$ (c 1.0, H_2O)、FABHRMS : $[\text{M} + \text{H}]^+$ (130.0842), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}$ (130.0868)。

(3) N-アセチル-D-2-アミノ-6-ブロモヘキサン酸 (3.5 g, 14 mmol) を 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液 (約 7 ml) に溶解し、pH を 7.0 に調整した。この溶液に *Alcaligenes xylosoxydans* D-アミノアシラーゼ (45 mg / 45 ml) を加え 38 で 3 日間反応させた。反応溶液を濃縮後、陽イオン交換樹脂 (Amberlite IR-120, 200 ml) カラムに投じ、1 M アンモニア水溶液で溶出した。溶出液を濃縮乾固して D-ピペコリン酸を白色結晶として得た。収量 : 1.55 g、収率 : 85%、 $[\alpha]_D^{20} : +26.3$ (c 1.0, H_2O)、FABHRMS : $[\text{M} + \text{H}]^+$ (130.0877), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}$ (130.0868)。 20

【0026】 30

(実施例 3)

次に、N-アシル-DL-2-アミノ-6-ハロゲノヘキサン酸エステルの合成とプロテアーゼ作用および脱アシル基による L-ピペコリン酸の合成について説明する。

(1) N-t-プトキシカルボニル-2-アミノ-4-ブロモブチルマロン酸ジエチルの合成

300 ml ナスフラスコ中で脱水 エタノール (100 ml) に金属ナトリウム (2.3 g, 100 mmol) を加え 30 分間攪拌後、N-t-プトキシカルボニル-2-アミノマロン酸ジエチル (27.6 g, 100 mmol) を加え 30 分間加熱攪拌した。そこに 1, 4-ジブロモブタン (60 ml, 500 mmol) を加えて 5 時間の還流を行った。放冷後、クエン酸を加え中和、NaBr をろ過後、エタノールと 1, 4-ジブロモブタンをそれぞれ留去した。酢酸エチル (300 ml) で目的物を抽出、溶媒を留去し N-t-プトキシカルボニル-2-アミノ-4-ブロモブチルマロン酸ジエチルの油状物を得た。収量 : 37.0 g、収率 : 92%、Rf 値 : 0.90 ($\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} = 9 : 1$)。 40

(2) N-t-プトキシカルボニル-2-アミノ-4-ブロモブチルマロン酸モノエチルの合成

N-t-プトキシカルボニル-2-アミノ-4-ブロモブチルマロン酸ジエチル (37.0 g, 92 mmol) をエタノール (100 ml) に溶解し、氷冷下で 2 N 水酸化ナトリウム水溶液 (46 ml) を 30 分毎に 5 回に分け 50

て加えた。3 時間後、反応溶液を濃縮しエーテルおよび 4 % 炭酸水素ナトリウム水溶液と振った。4 % 炭酸水素ナトリウム水溶液をクエン酸で中和、酸性とした後、析出油状物を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去して N - t - ブトキシカルボニル - 2 - アミノ - 4 - ブロモブチルマロン酸モノエチルの白色結晶を得た。収量 : 27.5 g、収率 : 80 %、Rf 値 : 0.68 (CHCl₃ / MeOH / AcOH = 90 : 10 : 2)。

(3) N - t - ブトキシカルボニル - DL - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸エチルの合成

N - t - ブトキシカルボニル - 2 - アミノ - 4 - ブロモブチルマロン酸モノエチル (27.5 g, 73 mmol) をトルエン (150 ml) に溶解し、3 時間加熱還流した。溶液を濃縮して、シリカゲルクロマトグラフィー (4.7 cm x 18 cm, 酢酸エチル / ヘキサン = 1 : 8) で精製した。溶媒を留去して N - t - ブトキシカルボニル - DL - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸エチルの油状物を得た。収量 : 19.3 g、収率 : 85 %、Rf 値 : 0.70 (CHCl₃ / MeOH = 9 : 1)。

(4) N - t - ブトキシカルボニル - L - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸の合成

図 4 にその合成方法の概要を示す。

N - t - ブトキシカルボニル - DL - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸エチル (19.3 g, 58.6 mmol) を DMF (50 ml)、H₂O (150 ml) に溶解し、1 M NH₃ aq で pH を 8.0 に調整し、subtilisin (60 mg) を加え 37 で 12 時間反応させた。エーテルおよび 4 % 炭酸水素ナトリウム水溶液と振り無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去して N - t - ブトキシカルボニル - L - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸及び N - t - ブトキシカルボニル - D - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸エチルを得た。その後 4 % 炭酸水素ナトリウム水溶液をクエン酸で酸性とした後、析出油状物を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去して N - t - ブトキシカルボニル - L - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸を油状で得た。収量 : 8.0 g、収率 : 89 %、Rf 値 : 0.55 (CHCl₃ / MeOH / AcOH = 90 : 10 : 2)。

(5) L - ピペコリン酸の合成

N - t - ブトキシカルボニル - L - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸 (1.24 g, 4.0 mmol) を室温で 2 時間、2 M HCl / ジオキサン (20 ml, 10 当量) (溶媒) で処理し、次いで溶媒を留去した後、DMF (10 ml) に溶解し氷冷下でトリエチルアミン (8 mmol, 1.1 ml) を加えて pH を 8.0 に調整し 5 時間反応させた。塩をろ過後、反応液を酢酸で中和、濃縮してアセトンを加え L - ピペコリン酸の白色結晶として得た。収量 : 494 mg、収率 : 95 %。

【0027】

(実施例 4)

N - アシル - D - 2 - アミノ - 6 - ハロゲンヘキサン酸の合成と脱アシル基による D - ピペコリン酸の合成

(1) N - t - ブトキシカルボニル - D - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸の合成

N - t - ブトキシカルボニル - D - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸エチル (4.63 g, 13.6 mmol) をエタノール (20 ml) に溶解し、氷冷下で 2 N 水酸化ナトリウム水溶液 (7 ml) を 30 分毎に 5 回に分けて加えた。3 時間後、反応溶液を濃縮しエーテルおよび 4 % 炭酸水素ナトリウム水溶液と振った。4 % 炭酸水素ナトリウム水溶液をクエン酸で酸性とした後、析出油状物を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去して N - t - ブトキシカルボニル - D - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸を油

10

20

30

40

50

状で得た。収量 : 4.33 g、収率 : 100%、Rf値 : 0.55 (CHCl₃ / MeOH / AcOH = 90 : 10 : 2)。

(2) D-ピペコリン酸の合成

N-t-ブトキシカルボニル-D-2-アミノ-6-プロモヘキサン酸 (4.33 g, 14.0 mmol) を室温で2時間、2M HCl / ジオキサン (20 ml, 10当量) (溶媒) で処理した後、溶媒を留去し、次いで、DMF (15 ml) に溶解し氷冷下でトリエチルアミン (28 mmol, 3.92 ml) を加えてpHを8.0に調整し5時間反応させた。塩をろ過後、反応液を酢酸で中和、濃縮してアセトンを加えD-ピペコリン酸の白色結晶として得た。収量 : 1.71 mg、収率 : 94%

10

【0028】

【発明の効果】

請求項1に記載のピペコリン酸の製造方法によれば、高純度に光学分割されたピペコリン酸を高収率で低原価で製造することができる。

【0029】

請求項2に記載のピペコリン酸の製造方法によれば、請求項1記載の効果に加えて、高純度の光学活性ピペコリン酸を高収率で得ることができ生産性に優れる。

【0030】

請求項3に記載のピペコリン酸の製造方法によれば、請求項1又は2に記載の効果に加えて、光学活性なピペコリン酸を高収率で得ることができ、高い生産性で低原価でD-およびL-ピペコリン酸を量産することができる。

20

【0031】

請求項4に記載のピペコリン酸の製造方法によれば、請求項1乃至3の内いずれか1項に記載の効果に加えて、L-ピペコリン酸を抽出した残溶液を有効に用いて、付加価値の高いD-ピペコリン酸を無駄なく生成でき、生産性に優れたピペコリン酸製造システムを構成することができ、特殊なイミノ酸である光学活性なピペコリン酸の供給不足に対応して両光学異性体の供給を容易化して医療開発研究などを押し進めることができる。

【0032】

請求項5に記載のピペコリン酸の製造方法によれば、請求項1乃至3の内いずれか1項に記載の効果に加えて、D-ピペコリン酸を抽出した残溶液を有効に用いて、付加価値の高いL-ピペコリン酸を無駄なく生成でき、生産性に優れたピペコリン酸製造システムを実現できる。

30

【0033】

請求項6に記載のピペコリン酸の製造方法によれば、請求項3乃至5に記載の効果に加えて、比較的安価で入手しやすいアセタミドマロン酸ジエチルを出発原料として、ピペコリン酸製造のため中間体となるDL-N-アセチル-2-アミノ-6-プロモヘキサン酸を制御しやすい容易な工程で効率的に製造することができ、生産性や経済性に優れた製造システムを構築できる。

【0034】

請求項7に記載のピペコリン酸の製造方法によれば、保護基の脱着に伴う分子内環化反応によってピペコリン酸を有効に生成することができる。すなわち、アミノ酸誘導体の保護基を所定の条件下で脱着させ、これに続く分子内環化反応によってピペコリン酸を効率的に生成でき、L-ピペコリン酸およびD-ピペコリン酸並びにそれらの誘導体を個別かつ、安価に製造できる。

40

【0035】

請求項8に記載のピペコリン酸の製造方法によれば、請求項7記載の効果に加えて、光学活性のピペコリン酸を得るために必要な脱着条件や加水分解条件を適正に保持させることができ、高純度のピペコリン酸を高収率で得ることができ、保護基を有するアミノ酸誘導体を用いて、工業的な規模でのピペコリン酸製造を可能にする。

【0036】

50

請求項 9 に記載のピペコリン酸の製造方法によれば、請求項 7 又は 8 に記載の効果に加えて、光学活性ピペコリン酸 (D - ピペコリン酸、 L - ピペコリン酸) 製造の際に (1) N - 保護 - L - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸や (2) N - 保護 - D - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸を中間原料として、効率的な生産システムを構成することができ、医薬品原料となるような光学活性ピペコリン酸を安価に提供できる。

【図面の簡単な説明】

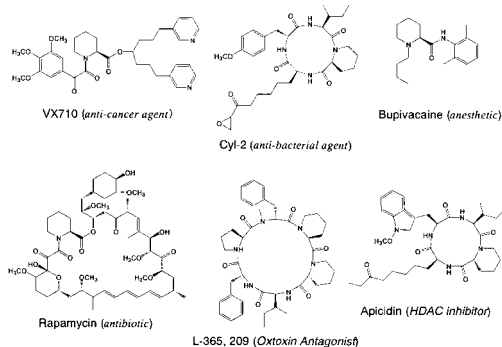
【図 1】 L - または D - ピペコリン酸を含む生理活性天然物および医薬品の例

【図 2】 N - アセチル - D L - 2 - アミノ - 6 - ブロモヘキサン酸の合成のフローチャート

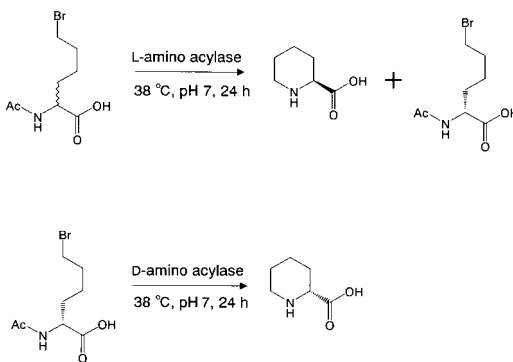
【図 3】 L - アミノアシラーゼの作用による L - ピペコリン酸の合成反応および D - アミノアシラーゼの作用による D - ピペコリン酸の合成反応のフローチャート

【図 4】脱着可能保護基を用いる場合のプロテアーゼ作用を含む L - および D - ピペコリン酸の合成法のフローチャート

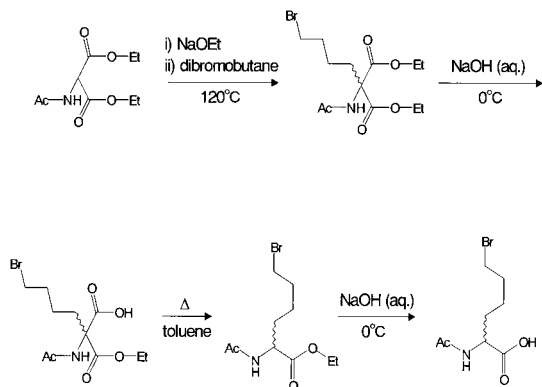
【図 1】



【図 3】



【図 2】



【図 4】

