

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4051082号
(P4051082)

(45) 発行日 平成20年2月20日 (2008. 2. 20)

(24) 登録日 平成19年12月7日 (2007. 12. 7)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P 41/00 (2006. 01)

C 1 2 P 41/00 H

C 1 2 P 13/00 (2006. 01)

C 1 2 P 41/00 J

C 1 2 P 13/00

請求項の数 13 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2007-507859 (P2007-507859)	(73) 特許権者	397067152
(86) (22) 出願日	平成17年4月1日 (2005. 4. 1)		ファイザー・プロダクツ・インク
(65) 公表番号	特表2007-532125 (P2007-532125A)		アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市
(43) 公表日	平成19年11月15日 (2007. 11. 15)		イースタン・ポイント・ロード
(86) 国際出願番号	PCT/IB2005/000873	(74) 代理人	100091731
(87) 国際公開番号	W02005/100580		弁理士 高木 千嘉
(87) 国際公開日	平成17年10月27日 (2005. 10. 27)	(74) 代理人	100127926
審査請求日	平成18年12月26日 (2006. 12. 26)		弁理士 結田 純次
(31) 優先権主張番号	60/562, 133	(74) 代理人	100105290
(32) 優先日	平成16年4月14日 (2004. 4. 14)		弁理士 三輪 昭次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	マイクル・ポール・バーンズ
早期審査対象出願			アメリカ合衆国コネティカット州0634
			O. グロトン, イースタンポイントロード
			. ファイザー・グローバル・リサーチ・ア
			ンド・ディヴェロップメント
			最終頁に続く

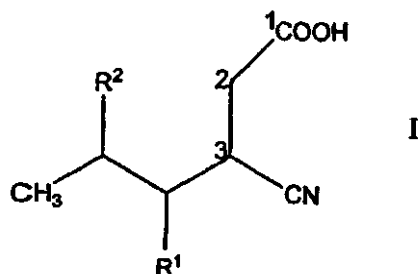
(54) 【発明の名称】 脂肪族ジニトリルのシアノカルボン酸への立体選択性生物変換

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I :

【化 1】



[式中、C 3 が (S) 立体配置を有し；

R¹が、水素、(C₁—C₆) アルキルまたはフェニルであり；そして

R²が、(C₁—C₈) アルキル、(C₂—C₈) アルケニル、(C₃—C₈) シクロアルキル、—O (C₁—C₆) アルキル、—CH₂—CH₂—O— (C₁—C₆) アルキル、(C₁—C₆) アルキル—OH、—フェニル— (C₁—C₆) アルキル—OH、—フェニル—O— (C₁—C₆) アルキル、フェニルまたは置換フェニルであり、

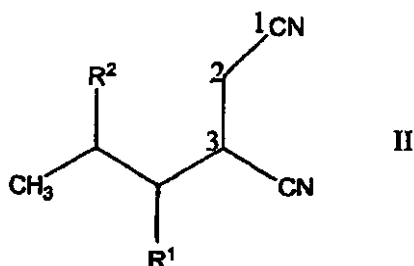
但し、R²がメチルである場合、R¹は水素、(C₁—C₆) アルキルまたはフェニルであ

る]

の化合物の製造方法であって、

(a) 式 I I :

【化 2】



10

の化合物を反応媒体中でニトリラーゼ活性を有する酵素触媒と接触させ；そして

(b) 反応媒体から式 I の化合物の (3 S) 異性体を回収し；そして場合によって、式 I I の化合物の未変化の (3 R) 異性体を回収する工程を包含する、上記方法。

【請求項 2】

工程 (b) で回収した式 I I の化合物の未変化の (3 R) 異性体を、有機溶媒の存在下、塩基と共に (3 R) 異性体を加熱することによって、式 I I の化合物のラセミ化合物にラセミ化する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

工程 (b) で回収した未変化の (3 R) 異性体からラセミ化されたラセミ化合物を使用して、工程 (a) を繰り返す、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

酵素触媒が、アラビドプシス・サリアナ由来のニトリラーゼからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

反応媒体が、蒸留水または約 5.0 ～ 約 10.0 の範囲の pH に緩衝化されている水からなる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

30

式 I の化合物が (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルヘキサン酸であり、式 I I の化合物がラセミ化合物の 2 - イソブチル - サクシノニトリルであり、そして工程 (b) で回収した未変化の 異性体が (R) - 2 - イソブチルサクシノニトリルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

溶媒中で塩基と共に加熱することによって、工程 (b) で回収した未変化の (R) - 2 - イソブチル - サクシノニトリルを、ラセミ化合物の 2 - イソブチル - サクシノニトリルにラセミ化する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

工程 (b) で回収した未変化の (R) - 2 - イソブチル - サクシノニトリルからラセミ化されたラセミ化合物の 2 - イソブチル - サクシノニトリルを使用して、工程 (a) を繰り返す、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 9】

(a) 2 - イソブチル - サクシノニトリルを反応媒体中でニトリラーゼ活性を有する酵素触媒と接触させ；

(b) 反応媒体から (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルヘキサン酸を回収し；

(c) (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルヘキサン酸を酸性塩に変換し；そして

(d) 酸性塩を水素化し、(S) - 3 - (アミノメチル) - 5 - メチルヘキサン酸 (プレガバリン) を形成させる

工程を包含する、(S) - 3 - (アミノメチル) - 5 - メチルヘキサン酸 (プレガバリン

50

) の製造方法。

【請求項 10】

未変化の (R) - 2 - イソブチル - サクシノニトリルを、工程 (a) の反応媒体から回収する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

有機溶媒の存在下、塩基と共に加熱することによって、工程 (a) の未変化の (R) - 2 - イソブチル - サクシノニトリルをラセミ化し、ラセミ化合物の 2 - イソブチル - サクシノニトリルを形成し、そしてこのラセミ化合物の 2 - イソブチル - サクシノニトリルを使用して、工程 (a) を繰り返す、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

酵素触媒が、全微生物細胞、透過性微生物細胞、微生物細胞の抽出物、部分的精製酵素、精製酵素または支持体上に固定化された酵素触媒の形態のニトリラーゼである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

酵素触媒が、アラビドプシス・サリアナ由来のニトリラーゼからなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、選択された脂肪族ジニトリルを対応するシアノカルボン酸に位置選択性および立体選択性変換するための新規な生体触媒方法に関する。より具体的に、本発明は、2 - イソブチル - サクシノニトリルの (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルヘキサン酸への変換方法を提供し、これは (S) - 3 - (アミノメチル) - 5 - メチルヘキサン酸 (プレガバリン) の合成の有用な中間体である。プレガバリンは、特定の大脳疾患を治療するのに、例えば、発作性疾患、疼痛および精神異常の治療および予防に有用であり得る。プレガバリンは、大脳機能を改善するのに効果的であるので、これはまた老人患者の治療にも有用である。

【背景技術】

【0002】

有機ニトリルの対応するカルボン酸およびアミドへの酵素加水分解は、広範囲の有用な化合物に重要な代替の合成方法を提供する。典型的に、高感度な官能基を含む化合物と不適合な状態になる高い反応温度において、強酸または強塩基の触媒を使用して、ニトリルの対応するカルボン酸およびアミドへの慣用的な化学的加水分解が行われる。さらに、乏しい選択性の化学的加水分解は、大量の無機塩と共に、好ましくない副産物を生じ得る。対照的に、高い化学選択性、位置選択性および立体選択性の可能性を与える穏やかな条件下 (中性 pH、30℃)、酵素的ニトリル加水分解が起こる。付加的な有利点として、副産物の無機塩の形成が回避される。

【0003】

ニトリル変換酵素の最も良く知られた産業上の利用は、ロドコッカス・ロドクラウス J 1 由来のニトリルヒドラターゼを使用するアクリルアミドの製造 (T. Nagasawa et al., Tibtech., 1992, vol. 10, 402-408) およびニコチンアミドの製造 (T. Nagasawa et al., Appl. Environ. Microbiol., 1998, vol. 54, 1766-1769) がある。最近のいくつかの論評 (L. Martinkova et al., Current Organic Chemistry, 2003, vol. 7, 1279-1295 および D. Cowan et al., Extremophiles, 1998, vol. 2, 207-216) は、ニトリル変換酵素の生化学および産業上の利用可能性を記載する。

【0004】

酵素的ニトリル加水分解は、ニトリルを対応するカルボン酸に変換するニトリラーゼおよびニトリルを対応するアミドに変換するニトリルヒドラターゼによって触媒される。ア

10

20

30

40

50

ミドを対応するカルボン酸に加水分解するアミダーゼは、ニトリルをカルボン酸に変換するためにニトリルヒドラターゼと組合せて使用され得る。

【0005】

対応するニトリルからカルボン酸を製造するためのニトリラーゼ酵素の使用は、WO 02/072856に開示されている。架橋によるポリマーマトリクスへの酵素の取り込みは、改良された物理的完全性 (physical integrity) および生化学的完全性 (biochemical integrity) を有する触媒を提供した。

【0006】

生体触媒を用いる脂肪族 α , ω -ジニトリルからの ω -ニトリルカルボン酸の位置選択性製造は、米国特許番号第5,814,508号に開示されている。例えば、ニトリラーゼ活性を有する触媒を使用して、2-メチルグルタロニトリルを4-シアノペンタン酸に変換した。

【0007】

K. Yamamoto, et al. J. Ferment. Bioengineering, 1992, vol. 73, 125-129は、トランス1,4-ジシアノシクロヘキサンをトランス-4-シアノシクロヘキサンカルボン酸に変換するためのニトリルヒドラターゼ活性およびアミダーゼ活性の両方を有する微生物細胞の使用を記載する。

【0008】

シアノ置換カルボン酸へのジニトリルの位置選択性生体触媒変換は、脂肪族ニトリラーゼ活性またはニトリルヒドラターゼ活性とアミダーゼ活性との組合せを有する微生物細胞を使用する、一連の脂肪族 α , ω -ジニトリル化合物について報告されている (J. E. Gavan et al. J. Org. Chem., 1998, vol. 63, 4792-4801)。

【0009】

ニトリルの立体選択性酵素変換は、一方のエナンチオマーで富化されたキラルカルボン酸およびアミドの製造について記載されている (M Wieser et al., Chapter in Stereoselective Biocatalysis, Marcel Dekker Inc.: New York, 2000, 461-486)。アルカリゲネス・フェカーリスATCC 8750由来の立体選択性ニトリラーゼ酵素を使用して、ラセミ化合物のマンデロニトリルから(R)-マンデル酸を製造する (K. Yamamoto et al., Appl. Environ. Microbiol., 1991, vol. 57, 3028-3032)。ロドコッカス・ロドクラウスNCIM B 11216由来のニトリラーゼは、2-メチルヘキサニトリルのラセミ混合物中で、(-)-2-メチルヘキサニトリルを未反応のまま残し、(+)-2-メチルヘキサニトリルを優先的に加水分解する (M. Gradley et al. Biotechnology Lett., 1994, vol. 16, 41-46)。米国特許番号第5,593,871号は、立体選択性ニトリルヒドラターゼを含む微生物を使用するニトリルから一方のエナンチオマーで富化された2-アルカン酸アミドの製造方法を開示した。立体選択性ニトリルヒドラターゼおよび立体選択性アミダーゼを含むRhodococcus属AJ270を使用して、ラセミ化合物の α -アリールおよび α -アルキル置換グリシンニトリルから、鏡像的に純粋な α -アミノ酸およびアミドを製造した (M.-C. Wang et al., J. Org. Chem., 2002, vol. 67, 6542)。前述の参考文献は、その全体が本明細書中に加入される。

【0010】

ラセミ化合物のプレガバリンの治療価値、特に抗痙攣薬としてのその効果は、(S)-エナンチオマーに主に原因があることが見出されている。費用効果的なプレガバリン薬物療法を提供する目的のために、(S)-エナンチマー富化化合物への多数の合成経路が研究されている。例えば、適切なシアノ置換オレフィンの不斉水素化、続くシアノ基の対応するアミンへの還元により、(S)-エナンチオマーで実質的に富化されたプレガバリンを提供する (米国特許出願公開番号2003/0212290号)。

10

20

30

40

50

【0011】

純粋な化学方法によるプレガバリン、その誘導体およびアナログの合成は、米国特許番号第6,642,398号；同第6,635,673号；および同第6,046,353号に開示されている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

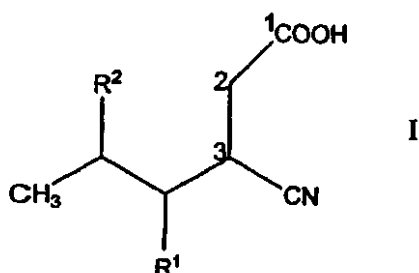
【0012】

本発明の方法において、脂肪族ジニトリルのシアノカルボン酸への位置選択性および立体選択性生体触媒変換は、ニトリラーゼ活性を有する酵素触媒を使用して達成される。

【0013】

本発明は、式 I :

【化1】



の化合物の (S) -エナンチオマーの新規な製造方法に関し、ここで C3 は (S) 立体配置を有し；

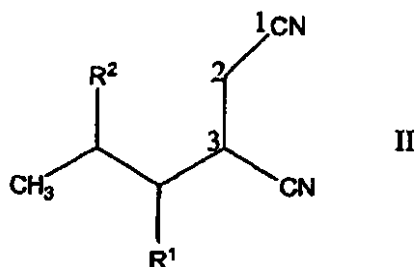
R^1 が、水素、 (C_1-C_6) アルキルまたはフェニルであり；そして

R^2 が、 (C_1-C_8) アルキル、 (C_2-C_8) アルケニル、 (C_3-C_8) シクロアルキル、 $-O(C_1-C_6)$ アルキル、 $-CH_2-CH_2-O-(C_1-C_6)$ アルキル、 (C_1-C_6) アルキル-OH、 $-フェニル-(C_1-C_6)$ アルキル-OH、 $-フェニル-O-(C_1-C_6)$ アルキル、フェニルまたは置換フェニルであり（但し、 R^2 がメチルである場合、 R^1 は水素、 (C_1-C_6) アルキルまたはフェニルである）；

以下の工程：

(1a) 式 I I :

【化2】



の化合物を反応媒体中でニトリラーゼ活性を有する酵素触媒と接触させ；そして

(1b) 反応媒体から式 I の化合物の (S) -異性体を回収し；そして場合によって、化合物 I I の 未変化の (R) -異性体を回収する工程を包含する。

【0014】

式 I の化合物は、プレガバリンのような薬学的活性を有する化合物を合成するのに有用である。

【0015】

本発明の好ましい実施形態において、 R^1 および R^2 が独立して水素または $C_1 \sim C_3$ アルキルである。

【0016】

本発明の好ましい実施形態において、式 I I の化合物は、3 R 異性体および 3 S 異性体を含むラセミ混合物である。

【0017】

本発明の好ましい実施形態は、ラセミ化合物の 2-イソブチル-サクシノニトリル (R^1 が H であり、かつ R^2 がメチルである、式 I I の化合物) を (S)-3-シアノ-5-メチルヘキサン酸 (R^1 が H であり、かつ R^2 がメチルである、式 I の化合物) に変換する方法であり、

以下の工程：

(2a) ラセミ化合物の 2-イソブチル-サクシノニトリルを反応媒体中でニトリラーゼ活性を有する酵素触媒と接触させ；そして

(2b) 水性混合物から (S)-3-シアノ-5-メチルヘキサン酸を回収し；そして場合によって、未変化の (R)-2-イソブチルサクシノニトリルを回収する工程を包含する。

【0018】

反応媒体が水媒体であることが好ましい。

【0019】

本発明の好ましい実施形態において、回収した化合物 I I の未変化の (R)-異性体は、有機溶媒の存在下、弱塩基と共に加熱することによって実質的にラセミ化される。好ましい塩基は 1, 8-ジアザビシクロ [5. 4. 0] ウンデカ-7-エンであり、そして好ましい溶媒はトルエンである。場合によって、得られた I I のラセミ化合物は、工程 (1a) または (2a) にて上で規定された方法のいずれかにおいて再利用され得る。

【0020】

本発明の 1 つの実施形態において、酵素触媒は、全微生物細胞、微生物細胞の抽出物、部分的精製酵素、精製酵素または支持体上に固定化された酵素触媒の形態である。

【0021】

本発明の別の実施形態において、酵素触媒は部分的精製酵素である。部分的精製酵素の例としては、N I T-101、N I T-102、N I T-103 (B i o C a t a l y t i c s I n c . , P a s a d e n a , C A) およびアラビドプシス・サリアナ由来のニトリラーゼ (J u e l i c h F i n e C h e m i c a l s , J u e l i c h , G e r m a n y) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0022】

本発明の好ましい実施形態において、ニトリラーゼ酵素触媒は、支持体上に固定化される。固定化されたニトリラーゼ酵素触媒の例としては、N I T-102 C 2 (B i o C a t a l y t i c s I n c . , P a s a d e n a , C A)、E u p e r g i t 上に固定化された N I T-102 (R o h m G m b H & C o . K G , D a r m s t a d t , G e r m a n y) および E u p e r g i t 上に固定化されたアラビドプシス・サリアナ由来のニトリラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、固定化されたニトリラーゼ酵素触媒は、N I T-102 C 2 である。

【0023】

別の実施形態において、反応媒体は、蒸留水または緩衝用水からなる。緩衝用水は、約 5.0 ~ 約 10.0 の範囲の pH に緩衝化されることが好ましく、約 6.0 ~ 約 8.0 の範囲の pH に緩衝化されることが最も好ましい。

【0024】

本発明はまた、(S)-3-(アミノメチル)-5-メチルヘキサン酸 (プレガバリン) の製造方法に関し、

以下の工程：

(a) ラセミ化合物の 2-イソブチル-サクシノニトリルを反応媒体中でニトリラーゼ活性を有する酵素触媒と接触させ；

(b) 反応媒体から (S)-3-シアノ-5-メチルヘキサン酸を回収し；

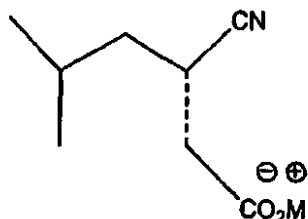
(c) (S)-3-シアノ-5-メチルヘキサン酸を酸性塩に変換し；そして

(d) 酸性塩を水素化し、(S) - 3 - (アミノメチル) - 5 - メチルヘキサン酸 (プレガバリン) を形成させる工程を包含する。

【0025】

好ましくは、酸性塩は、式：

【化3】



10

を有し、

ここでMはNa、K、Li、NH₄、NH₂R⁶R⁷、NH₃R¹またはNH(R⁶)₂R⁷であり、ここでR⁶およびR⁷は互いに独立して(C₁-C₆)アルキルである。

【0026】

便宜上、明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において利用される特定の用語は、ここに集められる。他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

20

【0027】

用語「アルキル」は、1～8個の炭素原子の直鎖基または分枝鎖基であり、メチル、エチル、プロピル、ブチル、i s o - ブチルおよびt e r t - ブチルが挙げられるが、これらに限定されない。

【0028】

本明細書中で使用される場合、用語「シクロアルキル」とは、3～7個の環炭素原子を含む環状炭化水素から誘導される部分を包含し、直鎖または分枝鎖のアルキル部分で置換された環状炭化水素部分が挙げられる。

【0029】

本明細書中で使用される場合、用語「アルコキシ」とは、「アルキル-O-」を意味し、「アルキル」は上で定義される。

30

【0030】

用語「アルケニル」とは、1つまたはそれ以上の炭素-炭素二重結合（これは、鎖に沿って任意の安定な点に生じ得る）を含む、直鎖または分枝鎖のいずれかの立体配置の炭化水素鎖（例えば、エテニルおよびプロペニル）を包含することが意図される。アルケニル基は、典型的に2～約12個の炭素原子、より典型的に2～約8個の炭素原子を有する。

【0031】

本明細書中で使用される場合、用語「ラセミ化合物」とは、一対のエナンチオマーの等モル混合物を意味する。合成が立体中心の発生をもたらす場合、通常、ラセミ化合物が形成される。本明細書中で使用される場合、用語「ラセミ混合物」とは、ラセミ化合物を意味する。

40

【0032】

本明細書中で使用される場合、用語「エナンチオマー」とは、互いの鏡像と分子レベルで重ね合わせることができる化合物をいう。エナンチオマーは、(R)立体配置または(S)立体配置のいずれかで存在し得る。

【0033】

本明細書中で使用される場合、用語「立体選択的合成」とは、単一の立体異性体または2つまたはそれ以上の可能な立体異性体の中からの異性体のエナンチオマー富化混合物の形成をもたらす化学反応をいう。

50

【0034】

本明細書中で使用される場合、用語「位置選択的」とは、2つまたはそれ以上の可能な原子または原子グループの中からの単一の原子または原子グループで起こる反応をいう。ジニトリルの位置選択的加水分解は、単一のニトリル基のカルボキシル基への変換をもたらす。

【0035】

「℃」とは、摂氏温度を意味する。

【0036】

本明細書中で使用される場合、用語「酵素触媒」とは、ニトリラーゼ活性またはニトリルヒドラターゼ活性とアミダーゼ活性との組合せのいずれかによって特徴付けられる触媒を意味する。触媒は、全微生物細胞、透過性微生物細胞、微生物細胞の抽出物の1つまたはそれ以上の細胞成分、部分的精製酵素または精製酵素の形態であり得る。

10

【0037】

本明細書中で使用される場合、用語「エナンチオマー過剰率」とは、割合として表されるエナンチオマー混合物中の優性なエナンチオマーのモル比率をいう。

【0038】

用語「水性反応混合物」とは、主として水媒体中の基質と酵素触媒との混合物を意味する。

【0039】

用語「ニトリラーゼ活性」とは、ニトリル基をカルボン酸基に変換する酵素活性を意味する。

20

【0040】

本明細書中で使用される場合、用語「ニトリルヒドラターゼ活性」とは、ニトリル基をアミド基に変換する酵素活性を意味する。

【0041】

用語「アミダーゼ活性」とは、アミド基をカルボン酸基に変換する酵素活性を意味する。

【0042】

ATCCは、10801 University Boulevard, Manassas, Va., 20110-2209, U. S. Aに位置するAmerican Type Culture Collectionである。BioCatalytics Inc. は、129 N. Hill Avenue, Suite 103, Pasadena, CA, 91106, U. S. Aに位置する。Juelich Fine Chemicals GmbHは、Rudolf-Schulten-Strasse 5, D-52428 Juelich, Germanyに位置する。

30

【0043】

本発明は、式IIのジニトリルから式Iの脂肪族シアノカルボン酸を製造するための酵素方法を提供する。当該分野で一般的に使用される任意の適切な方法を使用して、ジニトリル(II)出発物質を製造し得る。

【0044】

スキーム1は、化学酵素方法が2-イソブチルーサクシノニトリル(V)の(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサン酸(VI)への変換に使用される本発明の特定の実施形態を言及する。化合物VIは、スキーム2に説明されるようなプレガバリン(VII)の合成における中間体として使用され得る。スキーム1の工程3は、副産物の(R)-異性体(Va)のラセミ化および続く工程2での再利用を描く。

40

【0045】

スキーム1の工程1において、ラセミ化合物の2-イソブチルーサクシノニトリル(V)は、イソバレルアルデヒド(III)をエチルシアノアセテート(IV)と共に凝縮し、次いでKCNを添加することによって形成される。ラセミ化合物は、VのC3炭素原子で作られ立体的中心から生じる。

50

【0046】

スキーム1の工程2は、(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサン酸(VI)およびVの未変化の(R)-異性体を生産するジニトリルVのラセミ化合物の位置選択的加水分解および立体選択的加水分解を描く。

【0047】

2-イソブチル-サクシニトリル(V)の(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサン酸VIへの加水分解を触媒するニトリラーゼは、位置選択性および立体選択性の両方である。位置選択性は、C1炭素原子のみでシアノ基のカルボキシル基への変換に基づく。Vの(S)-エナンチオマーは優先的に変換に関与し、(R)-エナンチオマーは基本的に未変化のままであるという点で、反応は立体選択的である。

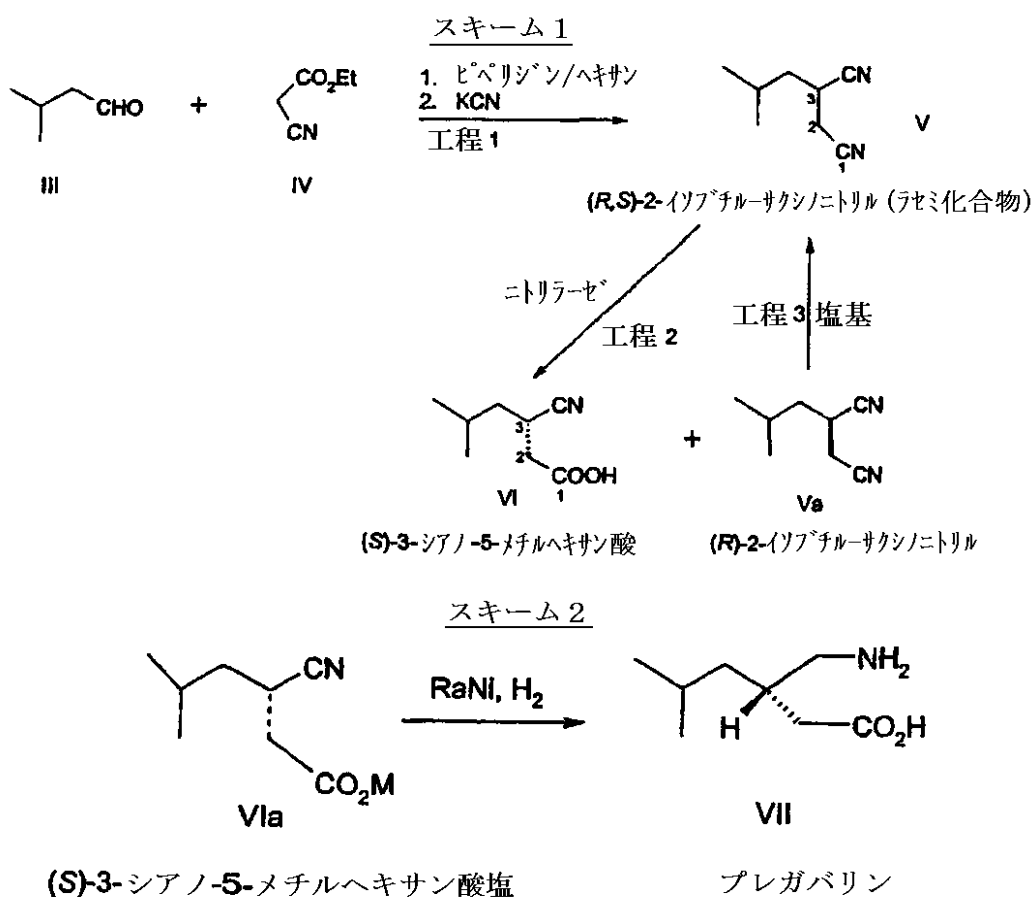
10

【0048】

スキーム2に説明されるように、S-シアノ酸VIの酸性塩VIaは、続く工程において水素化され、(S)-3-(アミノメチル)-5-メチルヘキサン酸(プレガバリン)を得る。水素化触媒(好ましくは、ラネーニッケル)の存在下、反応を行う。受容可能な酸性塩は式VIaの化合物を含み、ここでMはNa、K、Li、NH₄、NH₂R⁶R⁷、NH₃R⁶またはNH(R⁶)₂R⁷であり、ここでR⁶およびR⁷は互いに独立して(C₁-C₆)アルキルである。

【0049】

【化4】



20

30

40

【0050】

ラセミ化合物Vの(S)-シアノ酸VIへの位置選択的および立体選択的変換において、スキーム1に描かれるように、ニトリラーゼ酵素は、(S)-エナンチオマーと主に反応する。従って、反応混合物は、変換の進行に伴ない(R)-エナンチオマーVaに次第に富化される。

【0051】

本発明の別の目的は、未変化の(R)-ジニトリルVaを再利用するか、または再使用

50

することによって経済的浪費を回避することである。従って、本発明は、(R)ージニトリルをラセミ化し(工程3、スキーム1)、次いでスキーム1の工程2によって再利用する方法を提供する。

【0052】

ニトリラーゼ活性またはニトリルヒドラターゼ活性とアミダーゼ活性との組合せを有する本発明の種々の酵素は、富化単離技術(enrichment isolation technique)(この方法は、富化ニトリルを含む媒体中で成長する微生物の能力に基づいて、微生物を最初に選択する)のようなスクリーニングプロトコルによって見出され得る。富化分離方法は、典型的に、富化ニトリルで補われた炭素制限媒体または窒素制限媒体の使用を包含し、この媒体は所望の生物変換のためのニトリル基質または構造的に類似するニトリル化合物であり得る。ニトリラーゼ活性を有する微生物は、富化ニトリルを含む媒体中で成長するそれらの能力に基づいて最初に選択され得る。Gavaganら(Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) vol. 52, 654-659)は、土壌からグラム陰性細菌Acidovorax facilis 72W(ATCC 55746)を単離するために、唯一の窒素源として2-エチルサクシノニトリルを使用する富化技術を使用した。アシドボラックス・ファシリス(Acidovorax facilis) 72W(ATCC 55746)は、2-メチルグルタロニトリルの4-シアノペンタン酸への選択性変換に有用であることが示された。富化技術をまた使用して、3-シアノピリジンのニコチン酸への変換を触媒する好熱性細菌バチルス・パリダスDac521を単離した(Almatawah and Cowan, Enzyme Microb. Technol. (1999) vol. 25; 718-724)。微生物細胞の懸濁物をニトリル化合物と接触させ、そして高速液体クロマトグラフィー、ガス液体クロマトグラフィーまたは液体クロマトグラフィー質量分析(LCMS)のような分析手法を用いて対応するカルボン酸の存在について試験することによって、富化技術によって単離された微生物をニトリル加水分解活性について試験し得る。アシドボラックス・ファシリス72W(ATCC 55746)のニトリル加水分解活性を試験するための技術は、米国特許番号第5,814,508号に報告される。

【0053】

ニトリラーゼ活性またはニトリルヒドラターゼ活性とアミダーゼ活性を有する微生物が単離されると、酵素工学を利用して、酵素の種々の態様を改良し得る。これらの改良は本発明に有用であり得、そして改良とは、向上した選択性、酵素の触媒効果、高温および広範なpHに対する安定性ならびに酵素が水性緩衝液と有機溶媒との混合物を含む反応媒体中で作用できるようにすることを包含する。

【0054】

向上した収率、スループットおよび特定の生物変換方法に適している製品品質を有することに加えて、ニトリラーゼ活性またはニトリルヒドラターゼ活性とアミダーゼ活性を有する酵素触媒を製造するために本発明において使用され得る種々の技術としては、部位特異的突然変異誘発法を含む合理的設計法およびランダム変異導入法またはDNAシャッフリング技術を利用する指向進化技術のような酵素工学技術が挙げられるが、これらに限定されない。

【0055】

式IIの化合物の式Iの化合物への変換のための適切な酵素触媒は、全微生物細胞、透過性微生物細胞、微生物細胞の抽出物、部分的精製酵素または精製酵素の形態であり、そしてこのような触媒は支持体上に固定化され得る。

【0056】

この方法は、蒸留水または反応の開始pHを5.0~10.0との間、好ましくは6.0~8.0との間に維持する緩衝化水溶液中で2-イソブチルサクシノニトリルを酵素触媒と接触させることによって単相中で行われ得る。適切な緩衝化剤としては、リン酸カリウムおよび酢酸カルシウムが挙げられる。反応が進むにつれて、ジニトリルの対応するニトリル官能基からのカルボン酸のアンモニウム塩の形成に起因して、反応混合物のpHは

変わり得る。反応は、pHコントロールを含まずに行われ得るか、または適切な酸または塩基が、所望のpHを維持するために反応の間に添加され得る。しかし、上で表されるように、酵素工学および指向進化のような技術を使用して広範なpHにわたって効果的に作用する酵素触媒を製造することが可能である。

【0057】

この方法は、二相からなる反応混合物中で行われ得る：酵素および溶解された2-イソブチルーサクシノニトリルを最初に含む水相および主にラセミ化合物の2-イソブチルーサクシノニトリルからなる有機相。二相反応混合物は、2-イソブチルーサクシノニトリルを酵素および緩衝剤の水溶液に添加することによって製造され、添加される2-イソブチルーサクシノニトリルの量は水溶解限度を超える。50mMのリン酸カリウム（30℃、pH7.5）中の2-イソブチルーサクシノニトリルの水溶解限度は、約0.06Mである。反応の間、（S）-3-シアノ-5-メチルヘキサン酸アンモニウム塩が形成され、そして水相の濃度が増大するが、有機相は容量が減り、そして（R）-2-イソブチルーサクシノニトリルで富化されるようになる。あるいは、この方法はまた、三相からなる反応混合物中で行われ得る：溶解された2-イソブチルーサクシノニトリルを最初に含む水相、主にラセミ化合物の2-イソブチルーサクシノニトリルからなる有機相および不溶性支持体上に固定化された酵素からなる固体相。三相反応混合物は、固定化されていない酵素に代わって不溶性支持体上に固定化された酵素が使用されることを除いて、二相反応混合物に記載される手順によって製造される。

【0058】

場合によって、酵素は、ポリマーマトリクスまたは不溶性支持体に固定化され得る。固定化酵素触媒は繰り返し、連続的な方法に使用され得、そして固定化されていない酵素触媒よりも酵素的プロセスの生成物から容易に分離され得る。アルギン酸カルシウムもしくはポリアクリルアミドのようなポリマーマトリクスまたはセライトのような不溶性支持体に酵素を固定化する方法は、当業者に周知である。バッチ処理または連続的な方法に繰り返し使用され得るので、不溶性支持体上に固定化されたニトリラーゼ酵素であるNIT-102 C2（BioCatalytics Inc., Pasadena, CA）は、IIのIIIへの変換に特に有用である。反応に使用されるNIT-102 C2の濃度は、所望の反応速度を得るために選択され、そして触媒の比活性および基質濃度に依存する。典型的に、NIT-102 C2は、反応体積1mLあたり約0.001g～0.3g（湿重量）の範囲で使用され、反応体積1mLあたり0.01g～0.15g（湿重量）の範囲であることが好ましい。

【0059】

さらに、微生物細胞から製造され、そしてNIT-101、NIT-102、NIT-103（BioCatalytics Inc., Pasadena, CA）およびアラビドプシス・サリアナ由来のニトリラーゼ（Juelich Fine Chemicals, Juelich, Germany）のように表されたいくつかの凍結乾燥溶解物はまた、IIのIIIへの変換に有用である。水性反応混合物中でNIT-101、NIT-102、NIT-103およびA. サリアナニトリラーゼをIと接触させることにより、IIの形成をもたらす。NIT-101、NIT-102、NIT-103およびアラビドプシス・サリアナ由来のニトリラーゼを使用する反応は、反応体積1mLあたり0.001～0.04g（乾燥量）の範囲の触媒濃度を使用する二相反応混合物中で行われ得、反応体積1mLあたり0.002～0.02g（乾燥量）の範囲であることが好ましい。

【0060】

加水分解反応の温度は、反応速度および酵素触媒活性の安定性の両方を最適化するように選択される。反応温度は、懸濁物の凝固点のすぐ上（約0℃）～60℃の範囲であり得、5℃～35℃の反応温度であることが好ましい。

【0061】

式Iの化合物の（3S）異性体の回収および式IIの化合物の未変化の（3R）異性体の回収は、当業者に周知の適切な分離、単離および精製技術を使用して行われ得る。

【0062】

好ましい回収方法において、式 I の化合物の未変化の (3R) 異性体は、酢酸エチルのような有機溶媒を用いる抽出によって塩基性水性反応混合物から分離される。式 I の化合物の (3S) 異性体の酸性塩は、水層に選択的に溶解され、そして次いで酸性化および酢酸エチルのような有機溶媒での抽出によって単離される。

【0063】

式 I の化合物を使用して、てんかん、けいれん、不安、疼痛および神経変性障害（アルツハイマー病、ハンチントン病およびパーキンソン病を含む）のような障害の治療に有用なプレガバリンのような化合物を合成し得る。

【0064】

式 I の特定の化合物の例としては、以下の化合物が挙げられる：

- (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルーオクタン酸；
- (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルーヘプタン酸；
- (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルーヘキサン酸；
- (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルーノナン酸；
- (S) - 3 - シアノ - 5 - エトキシ - ヘキサン酸；
- (S) - 3 - シアノ - 5 - シクロヘキシル - ヘキサン酸；および
- (S) - 3 - シアノ - 5 - トリフルオロメチルーヘキサン酸。

【実施例】

【0065】

実施例 1

2 - イソブチルーサクシノニトリルの製造

シアノ酢酸エチル (733 g、6.48 mol)、イソバレルアルデヒド (613.9 g、7.13 mol)、ピペリジン (5.5 g、0.065 mol) およびヘキサン (0.5 L) の混合物を、連続的に脱水しながら環流状態下に置いた。水がそれ以上回収されなくなったら、混合物を冷却し、そして真空中で蒸留し、溶媒を除去した。イソプロパノール (1 L) を残りの油状物に添加し、次いでシアン化カリウム (422 g、6.48 mol) の水溶液 (2 L) を添加した。シアン化カリウム溶液の添加の間、反応混合物を 35℃以下に維持し、次いで 4 時間約 35℃にしておいた。95℃の温度に達するまで反応混合物を大気圧下蒸留し、次いでこの温度にて 5 時間還流させた。反応混合物を冷却し、水 (0.5 L) で希釈し、そしてメチル tert - ブチルエーテル (MTBE) (1 L) で抽出した。MTBE 抽出物を水 (0.5 L) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして真空中で濃縮し、油状物として 2 - イソブチルーサクシノニトリル (873.4 g) を得た。2 - イソブチルーサクシノニトリルの精製サンプルを減圧蒸留 (0.275 mmHg にて 90℃) によって得ることができる。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) : δ 0.93 - 0.99 (m, 6H), 1.43 - 1.50 (m, 1H), 1.71 - 1.78 (m, 1H), 1.81 - 1.91 (m, 1H), 2.69 (d, 2H, $J = 6.5 \text{ Hz}$), 2.90 - 2.97 (m, 1H)。

【0066】

実施例 2

NIT-101、NIT-102、NIT-103 およびアラビドプシス・サリアニトリラーゼを用いる 2 - イソブチルーサクシノニトリルからの (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルーヘキサン酸の製造

3 つの 8 mL のねじ口ガラス製バイアルを、2 - イソブチルーサクシノニトリル (20 mg)、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (1 mL) (pH 7.5、2 mM ジチオスレイトール (DTT)) および NIT-101、NIT-102 もしくは NIT-103 (Biocatalytics Inc., Pasadena, CA) から選択されたニトリラーゼ酵素 (10 mg) の各々で満たした。1 つの 8 mL のねじ口ガラス製バイアルを、2 - イソブチルーサクシノニトリル (20 mg) および 100 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) および 2 mM DTT (Juelich Fine Chemicals, J

10

20

30

40

50

uelich, Germany)を含む50mMリン酸緩衝液(pH7.8)中のアラビドプシス・サリアナニトリラーゼの溶液(1mL)で満たした。4つの反応混合物を電磁攪拌バーで15時間30℃にて攪拌し、次いで酢酸エチル(2×6mL)で個々に抽出した。酢酸エチル抽出物を取り出した後、水性部分を4NHCl(0.15mL)で処理し、そして酢酸エチル(3×6mL)で抽出した。酸性化した水性部分の酢酸エチル抽出物を真空で濃縮し、NIT-101、NIT-102、NIT-103およびA. サリアナニトリラーゼで行った反応について、(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサン酸((S)-CMHA)をそれぞれ、7.8mg(34.2%収率)、8.8mg(38.6%収率)、8.1mg(35.5%収率)および4.0mg(17.5%収率)で得た。各反応系からの(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサン酸のサンプルを過剰な(トリメチルシリル)ジアゾメタンで処理し、それらのメチルエステル誘導体を得、そしてChiral dexTMG-TAカラム(30M×0.25mmID、125ミクロンのフィルム厚)のガスクロマトグラフィー(GC)によって分析し、エナンチオマー純度を測定した。NIT-101、NIT-102、NIT-103およびA. サリアナニトリラーゼの反応生成物のエナンチオマー純度は、それぞれ96.3%、91.1%、95.5%および98.5%のe.e.であった(e.e.とは「エナンチオマー過剰率」を意味する)。

10

【0067】

実施例3

NIT-102を用いる2-イソブチル-サクシノニトリルからの(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサン酸の製造

20

30℃に維持した125mLのジャケット付き反応容器を、2-イソブチル-サクシノニトリル(3.33g)、NIT-102(0.5g)および5mMDTTおよび1mMEDTAを含む50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)(反応緩衝液)(122mL)で満たした。12.5時間攪拌した後、生成混合物を酢酸エチル(4×50mL)で抽出した。酢酸エチル抽出物を取り出し、そして水性部分を4MHClでpH2.5に調整し、そして酢酸エチル(3×50mL)で抽出した。酸性化した水性部分の酢酸エチル抽出物を合わせ、無水MgSO₄で乾燥させ、濾過し、そして真空で濃縮し、(S)-CMHA(1.56g、41.1%)を得た。反応生成物のサンプルを、(トリメチルシリル)ジアゾメタンで処理し、そして実施例2に記載されるようにGCによって分析し、98.5%e.e.のエナンチオマー純度を示した。

30

¹HNMR(CDC1₃, 400MHz): δ0.93-0.97(m, 6H), 1.30-1.37(m, 1H), 1.61-1.68(m, 1H), 1.82-1.89(m, 1H), 2.57-2.63(m, 1H), 2.72-2.78(m, 1H), 2.98-3.06(m, 1H)。

【0068】

実施例4

NIT-102 C2を用いる2-イソブチル-サクシノニトリルからのカリウム(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサノエートの製造

30℃に維持した2つの125mLのジャケット付き反応容器を、各々2-イソブチル-サクシノニトリル(6.81g)、NIT-102 C2(1.07g)および反応緩衝液(118.2mL)で満たした。24時間攪拌した後、生成混合物をデカントし、反応容器中に酵素触媒を残した。反応緩衝液(20mL)を各反応容器に添加し、約2分間攪拌し、次いでデカントし、そして生成混合物に添加した。2-イソブチル-サクシノニトリル(6.81g)および反応緩衝液(118.2mL)を各反応容器に添加し、そして反応混合物を24時間攪拌することによって、反応を繰り返した。各容器中の4つの反応(全部で8バッチの反応系)が完了した後、生成混合物を合わせ、そしてMTBE(3×500mL)で抽出した。MTBE抽出物を取り出し、そして水性部分をリン酸でpH2.1に調整し、そしてMTBE(2×500mL)で抽出した。酸性化した水性部分のMTBE抽出物を真空で濃縮し、油状物を残し、これを水(100mL)およびKOH(8.5g)で処理した。得られた溶液を真空で濃縮し、カリウム(S)-3-シアノ-5-メ

40

50

チルヘキサノエート (24.2 g、31.3%) を得た。メチル (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルヘキサノエートをカリウム (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルヘキサノエートから製造し、そしてキラルGCによって分析し、99.1% e.e. のエナンチオマー純度を示した。

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 400 MHz): δ 0.75 - 0.78 (m, 6H), 1.18 - 1.25 (m, 1H), 1.43 - 1.50 (m, 1H), 1.53 - 1.68 (m, 1H), 2.28 - 2.38 (d, 2H, $J = 6.5 \text{ Hz}$), 2.86 - 2.93 (m, 1H)。

【0069】

実施例 5

窒素雰囲気下での NIT-102 C2 を用いる 2 - イソブチル - サクシノニトリルからの (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルヘキサノ酸の製造

30°C に維持した 125 mL のジャケット付き反応容器を、2 - イソブチル - サクシノニトリル (6.53 g)、NIT-102 C2 (2.61 g) および反応緩衝液 (120 g) で満たし、そして窒素でパージした。得られた混合物を 24 時間攪拌し、次いで 250 mL のガラス製ボトルにデカントし、反応容器中に触媒を残した。使用した触媒を含む反応容器を 2 - イソブチル - サクシノニトリル (6.53 g) および反応緩衝液 (120 g) で再び満たし、窒素でパージし、そして反応混合物を 24 時間攪拌することによって反応を繰り返した。反応サンプル (0.1 mL) を水: メタノール: トリフルオロ酢酸 (60:40:0.09、v/v/v) (0.4 mL) と混合し、そして 30°C に維持した SymmetryTM C8 カラム (150 × 3.9 mm) の HPLC によって分析した。カラムを水: メタノール: トリフルオロ酢酸 (60:40:0.09、v/v/v) で溶出し、そして検出を屈折率検出器を用いて行った。

【0070】

全体で 50 バッチ反応系を、触媒を再利用して行った。連続した 2 バッチ反応系からの生成混合物を合わせ、そして酢酸エチル (2 × 150 mL) で抽出した。次いで、水性部分を 4 M HCl で pH 2 に調節し、そして酢酸エチル (2 × 150 mL) で抽出した。酸性化した水性部分の酢酸エチル抽出物を合わせ、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして真空中で濃縮し、(S) - CMHA を得た。全体で 160.8 g (43.2% 収率) の (S) - CMHA を 50 バッチ反応系から得た。反応系 1、26 および 50 の初速度は、それぞれ 14.8、17.4 および 15.1 mM の (S) - CMHA/h であった。バッチ反応系 39 ~ 50 から単離した (S) - CMHA のメチルエステル誘導体のキラル GC 分析は、平均 99.0% e.e. のエナンチオマー純度を示した。

【0071】

実施例 6

周囲大気下での NIT-102 C2 を用いる 2 - イソブチル - サクシノニトリルからの (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルヘキサノ酸の製造

反応系を窒素雰囲気下に代わって周囲大気下で行ったことを除いて、NIT-102 C2 を使用する 2 - イソブチル - サクシノニトリルの (S) - CMHA への変換についての一連のバッチ反応系を、実施例 5 に記載されるように行った。反応サンプルを実施例 5 に記載されるように HPLC によって分析した。

触媒を再利用して周囲大気下、全体で 50 バッチ反応系を行った。4 時間で得られる反応サンプルから決定される反応初速度は、それぞれ反応系 1、26 および 50 について 14.2、13.2 および 9.3 mM の (S) - CMHA/h であった。

【0072】

実施例 7

tert - ブチルアンモニウム (S) - 3 - シアノ - 5 - メチルヘキサノエートの製造
2 - イソブチル - サクシノニトリルの (S) - CMHA への変換からの生成混合物 (実施例 6、反応系 37 ~ 44) を合わせ、そして酢酸エチル (2 × 250 mL) で抽出した。酢酸エチル抽出物を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして真空中で濃縮し、油状物 (32.5 g、62.2% 収率) を得、これは主に (R) - 2 - イソブチル - サクシ

ノニトリルであった。水性部分を4MHClでpH2に調節し、そして酢酸エチル(2×250mL)で抽出した。酢酸エチル抽出物を470mLの体積まで濃縮し、次いでtert-ブチルアミン(15.9mL、151.5mmol)を滴下する間攪拌した。形成された白色結晶塩を濾過によって回収し、そして一晩空気乾燥させ、tert-ブチルアンモニウム(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサノエート(30.0g)を得た。メチル(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサノエートをtert-ブチルアンモニウム(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサノエートから製造し、そしてキラルGCによって分析すると、99.5% e.e. のエナンチオマー純度を示した。

¹HNMR(CDCl₃, 400MHz): δ 0.90-0.94(m, 6H), 1.26-1.32(m, 10H), 1.54-1.61(m, 1H), 1.78-1.88(m, 1H), 2.30-2.35(m, 1H), 2.43-2.50(m, 1H), 2.96-3.04(m, 1H)。

【0073】

実施例8

カリウム(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサノエートからの(S)-3-アミノメチル-5-メチルヘキサノ酸の製造

カリウム(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサノエート(20g、103.5mmol)、水(50mL)、45%KOH(12g)、イソプロパノール(12g)およびラネーニッケルの混合物を、50psiの水素下、パー振とう器中で一晩振とうさせた。混合物を濾過し、約50℃まで加熱し、酢酸(6.5mL)で処理し、そして室温にて一晩攪拌した。次いで、混合物を45%KOHでpH7をやや上回るように調節し、そして真空中で濃縮し、ほとんどのイソプロパノールを除去した。イソプロパノール(20mL)を混合物に添加し、次いで酢酸で酸性化し、室温にて一晩攪拌し、そして濾過し、白色の結晶性固体として(S)-3-アミノメチル-5-メチルヘキサノ酸(4.3g)を得た。Marfey試薬(Na-(2,4-ジニトロ-5-フルオロフェニル)-L-アラニンアミド)を使用して(S)-3-アミノメチル-5-メチルヘキサノ酸の誘導体を製造し、そしてアセトニトリル:1%トリエチルアミン(pH3)(38:62、v/v)で溶出するBDS Hypersil C18カラム(250×4.6mm、5μ)のHPLCによって分析すると、エナンチオマー純度が100% e.e. であることが決定された。

【0074】

実施例9

tert-ブチルアンモニウム(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサノエートからの(S)-3-アミノメチル-5-メチルヘキサノ酸の製造

tert-ブチルアンモニウム(S)-3-シアノ-5-メチルヘキサノエート(26g、113.9mmol)、水(48.8mL)、エタノール(35.8mL)、KOH(7.2g、91%フレーク)およびSponge NickelTM(A-7000、16.3g(可湿)、Activated Metals & Chemicals, Inc., Sevierville, TN)の混合物を、50psiの水素下、パー振とう器中で一晩振とうさせた。混合物を濾過し(セライト)、そしてケーキを水(10mL)およびエタノール(5mL)で洗浄した。酢酸(9.4mL)を濾液に添加し、そして得られた混合物を4℃にて一晩攪拌した。生成物を濾過し、イソプロピルアルコール(10mL)でリンスし、そして真空中で乾燥させ、白色固体(11.1g、61%)を得た。この物質の一部(10.0g)をイソプロピルアルコールと水との1:1の混合物から結晶化させ、100% e.e. で(S)-3-アミノメチル-5-メチルヘキサノ酸(8.8g)を得た。

【0075】

実施例10

DBUを使用する(R)-2-イソブチル-サクシノニトリルのラセミ化

(R)-2-イソブチル-サクシノニトリルのラセミ化を、NIT-102C₂を用いてラセミ化合物の2-イソブチル-サクシノニトリルの生物変換から回収した物質で

10

20

30

40

50

行った。(R)-2-イソブチル-サクシノニトリル(1.36 g、10 mmol、69% ee)、トルエン(5 mL)および1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン(DBU、0.076 g、5 mmol)の混合物を2時間還流させた。水(10 mL)を反応系に添加し、そして得られた混合物を酢酸エチル(2×10 mL)で抽出した。合わせた有機抽出物を連続して5% HCl(20 mL)および飽和塩化ナトリウム水溶液(20 mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして真空中で濃縮し、ラセミ化合物の2-イソブチル-サクシノニトリル(1.14 g、84%)を得た。エナンチオマー純度をChiral dexTMG-TAカラム(30 M×0.25 mm ID、125 ミクロンフィルム厚)を使用するGCによって決定した。

【0076】

10

実施例11

Amberlite^(R)IRA-400を使用する(R)-2-イソブチル-サクシノニトリルのラセミ化

Amberlite^(R)IRA-400樹脂(湿重量1 g、Rohm&Haas, Philadelphia, PA)を、5% NaOH(10 mL)と共に10分間攪拌し、そして洗浄物が中性になるまで水で洗浄した。エタノール(25 mL)および(R)-2-イソブチル-サクシノニトリル(69% ee)を樹脂に添加し、そして得られた混合物を2時間還流させた。反応混合物を濾過し、そして真空中で濃縮した。残留物を酢酸エチル(25 mL)に取り出し、そして水(3×100 mL)で洗浄した。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、濾過し、そして真空中で濃縮し、ラセミ化合物の2-イソブチル-サクシノニトリル(0.81 g、81%)を得た。

20

フロントページの続き

- (72)発明者 ジャスティン・ケイン・ウィーヴァー
アメリカ合衆国ミシガン州49001, カラマズー, ヘンリエッタストリート301, ファイザー
・グローバル・リサーチ・アンド・ディヴェロップメント
- (72)発明者 ジョン・ウィン・ウォン
アメリカ合衆国コネティカット州06340, グロトン, イースタンポイントロード, ファイザー
・グローバル・リサーチ・アンド・ディヴェロップメント

審査官 内藤 伸一

- (56)参考文献 特開2006-527595 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 13/00

C12P 41/00

CA(STN)

BIOSIS(STN)

REGISTRY(STN)

WPIDS(STN)