

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4880604号
(P4880604)

(45) 発行日 平成24年2月22日(2012.2.22)

(24) 登録日 平成23年12月9日(2011.12.9)

(51) Int.Cl. F 1
C 1 2 P 17/16 (2006.01)
C 1 2 R 1/72 (2006.01)
 C 1 2 P 17/16
 C 1 2 P 17/16
 C 1 2 R 1:72

請求項の数 14 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2007-529349 (P2007-529349)	(73) 特許権者	501245322
(86) (22) 出願日	平成17年7月26日 (2005.7.26)		ポリ・インドウストリア・キミカ・ソチエ
(65) 公表番号	特表2008-511309 (P2008-511309A)		タ・ベル・アチオニ
(43) 公表日	平成20年4月17日 (2008.4.17)		イタリア・アイー20089 ミラノ ク
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/053629		インティ デ スタンピ ヴィア ヴォル
(87) 国際公開番号	W02006/024582		トゥルノ 48
(87) 国際公開日	平成18年3月9日 (2006.3.9)	(74) 代理人	100077481
審査請求日	平成20年6月24日 (2008.6.24)		弁理士 谷 義一
(31) 優先権主張番号	M12004A001703	(74) 代理人	100088915
(32) 優先日	平成16年9月3日 (2004.9.3)		弁理士 阿部 和夫
(33) 優先権主張国	イタリア (IT)	(72) 発明者	パリド グリセンティ
			イタリア アイー20141 ミラノ ビ
			アレ ダ セルメナーテ 58

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酵素エステル交換反応によるミコフェノール酸モフェチルの調製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミコフェノール酸モフェチル (MMF) の調製方法であって、
 ミコフェノール酸 (MPA) と低分子量脂肪族アルコールとのエステルは、カンジダ・アンタークチカ・リパーゼの存在下において N- (2-ヒドロキシエチル) モルホリンでエステル交換され、

前記低分子量脂肪族アルコールは、C₁~C₄アルキルアルコールまたはそのハロゲン化誘導体であり、

前記エステル交換反応は、非プロトン性極性有機溶媒中で行われることを特徴とする調製方法。

【請求項 2】

前記 C₁~C₄アルキルアルコールまたはそのハロゲン化誘導体は、メタノール、エタノール、イソプロパノール、2, 2, 2-トリフルオロエタノール、2, 2, 2-トリクロロエタノール、n-プロパノール、または n-ブタノールから選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記非プロトン性極性有機溶媒は、log P が 0.5 未満であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記非プロトン性極性有機溶媒は、THF およびジオキサンから選択されることを特徴

とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記エステル交換反応は、いずれの界面活性剤もなしで行われることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記リパーゼの量は、基質 1 mmol 当たり 50 ～ 150 mgであることを特徴とする請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記基質の濃度は、0.1 ～ 0.3 Mであることを特徴とする請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記MPAエステルと前記N-(2-ヒドロキシエチル)モルホリンのモル比は、0.2 ～ 0.4であることを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記エステル交換反応は、攪拌下で15～45℃の温度で行われることを特徴とする請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記MPAエステル化反応は、カンジダ・アンタークチカ・リパーゼの存在下で、溶媒として対応するアルコールを使用して行われることを特徴とする請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記リパーゼの量は、MPA 1 mmol 当たり 20 ～ 60 mgであることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記MPAの濃度は、0.05 ～ 0.2 Mであることを特徴とする請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記エステル化反応は、攪拌下で15～45℃の温度で行われることを特徴とする請求項 10 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記エステル化反応は、界面活性剤なしで行われることを特徴とする請求項 10 ～ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

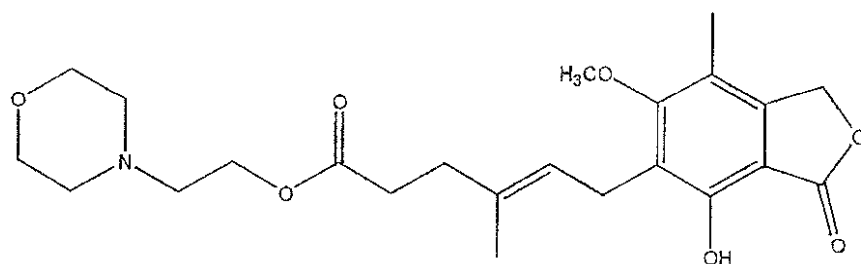
【背景技術】

【0001】

ミコフェノール酸モフェチル (MMF；登録番号128794-94-5)、すなわち、ミコフェノール酸 (MPA；登録番号24280-93-1) とN-(2-ヒドロキシエチル)モルホリン (登録番号622-40-2) とのエステルは、腎移植を受けた患者の治療に現在使用されている免疫抑制薬である。

【0002】

【化1】



10

20

30

40

50

【0003】

経口投与後、MMFはMPAについて加水分解され、これはイノシンーリン酸脱水素酵素の強力な阻害剤なので、実際の免疫抑制剤になる（例えば、非特許文献1参照）。

【0004】

MMFは、特許文献1に初めて記載された（1987年：この特許は、特許文献2に相当する）。この特許では、MMFの調製は、MPAをN-（2-ヒドロキシエチル）モルホリンでエステル化する従来の方法によって説明されている。これらの方法は、MPAの塩化アシルを用いて、または例えばジシクロヘキシルカルボジイミドなどの縮合剤を使用することによって、MPAとN-（2-ヒドロキシエチル）モルホリンの間の縮合を実現する。しかし、これらの合成法には、分子上にカルボキシル基の他にフェノール性ヒドロキシルおよびラクトン官能基が同時に存在するために、所望の生成物とは別に、一連の副次的なMPA重縮合生成物を生じるという欠点がある。

10

【0005】

この問題を克服するために、MMFを調製する代替方法が最近開発されている。いくつかの方法は、生体触媒法を使用して、酵素触媒作用によってMPAとN-（2-ヒドロキシエチル）モルホリンを反応させるMMFの調製について報告している（例えば、特許文献3および特許文献4参照）。最近市販品として容易に入手することができる多くの加水分解酵素、例えば、リパーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼなどが、有機溶媒中で実験条件（水分量、pH、温度、界面活性剤および水補足剤の存在）を正確に制御して使用すると、非天然基質の加水分解を行うだけでなく、エステルの合成を触媒することができることが知られている（例えば、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4参照）。

20

【0006】

しかし、これらの酵素法も完全に満足できるものではない。というのは、エステル化反応中に生成され、反応媒体に含まれる水の存在は、反応の進行レベルにかなり影響を及ぼすものであり、一方、反応媒体での界面活性剤の使用は、粗反応生成物からMMFを精製する後続操作を複雑にする恐れがあるからである。さらに、使用する有機溶媒のタイプは、反応速度および酵素の触媒効率に強い影響を及ぼす可能性があり、したがって、いくつかのケースでは、重要な工業的製造においてその適用に許容されうる反応の進行レベルを得るために反応時間が長くなる。

30

【0007】

【特許文献1】米国特許第4,753,935号明細書

【特許文献2】欧州特許第028713号明細書

【特許文献3】国際公開第00/34503号パンフレット（2000年）

【特許文献4】国際公開第03/042393号パンフレット（2003年）

【非特許文献1】B.J.Bornes, A.E.Eakin, R.A.Izydore and I.H.Hall Biochemical Pharmacology, 62, (2001), p.91-100

【非特許文献2】Klibanov A.M. CHEMTECH, 1986, 16, 354

【非特許文献3】Schopineau J., McCafferty F.D., Therisod M., Klibanov A.M. Biotechnology and Bioeng. 1988, 31, 208

【非特許文献4】Therisod M., Klibanov A.M. Journal of Chemical American Society, 1987, 109, 3977

40

【非特許文献5】E.Santaniello, P.Ferraboschi and P.Grisenti. Enzyme Microb. Technology, 1993, vol 15, p.367-382

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

したがって、酵素を使用することによって、界面活性剤を加えず、pH条件および反応媒体中の水の存在を正確に制御することなく操作してMMFの調製を行うことができる適切な実験条件を見つけることが不可能であるかどうか確認することに決定した。リパーゼによって触媒される酵素エステル交換反応の有機化学における多数の応用例が文献に記載

50

されているので、この手法がMMFの調製にもうまく適用されるかどうか確認することに決定した（例えば、非特許文献5参照）。これを行うために、単純なアルコールとのMPAエステル化反応と、続くN-（2-ヒドロキシエチル）モルホリンとのエステル交換反応のどちらも行う最も適切な加水分解酵素を特定する必要がある。本発明者らは、驚くべきことに、MPAと様々な脂肪族アルコールとの酵素エステル化に関する様々な反応条件を研究し、酵素触媒として様々なリパーゼ（トリアシルグリセロール・リパーゼ（EC 3.1.1.3））を使用することによって、カンジダ・アンタラクチカ（*Candida antarctica*）リパーゼ（CAL B、Novozym 435）が触媒する、MPAと低分子量脂肪族アルコール、例えばエタノールやメタノールなどとのエステル化が、30～40時間に対応するエチルまたはメチルエステルを定量的に生じることを確認した。唯一の反応溶媒と同じ脂肪族アルコール（すなわち、メタノールまたはエタノール）を使用するこの方法は、反応環境中で生じる水の形成に大きな影響を受けず、界面活性剤の使用を必要としない。

10

【0009】

さらに、反応溶媒としてイソプロパノール、2, 2, 2-トリフルオロエタノール、2, 2, 2-トリクロロエタノール、n-プロパノールおよびn-ブタノールを使用してみたが、本発明者らが使用した実験条件下のCAL Bは、メタノールおよびエタノールの使用と同じように、対応するMPAエステルを得ることができた。

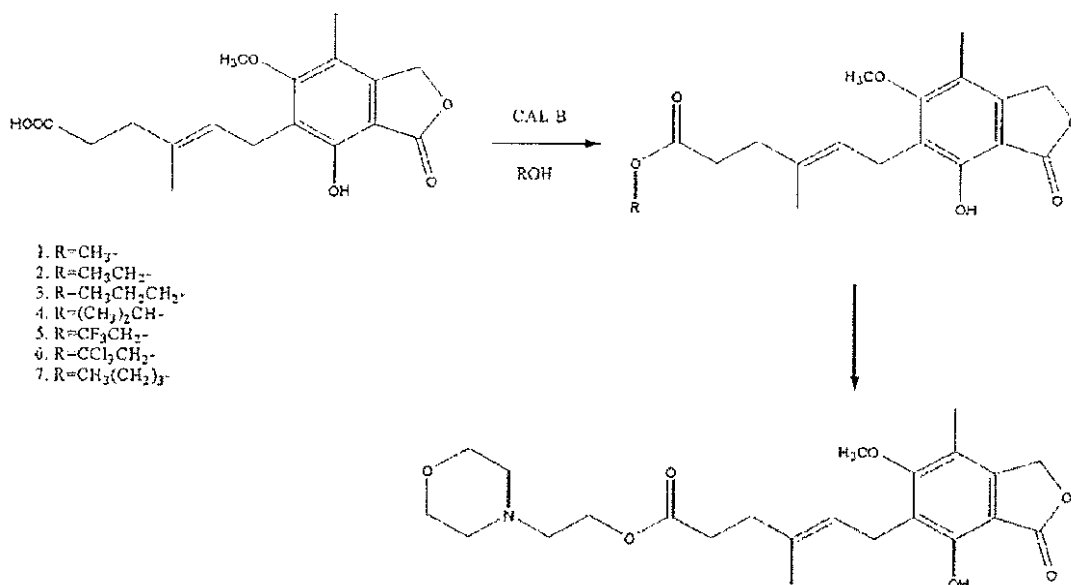
【0010】

さらにCAL Bが触媒する、テトラヒドロフラン（THF）中でのこれらのMPAエステルとN-（2-ヒドロキシエチル）モルホリンとの後続のエステル交換反応は、界面活性剤を使用することなく、かつ無水環境で行うことなく、定量的にMMFを生じることができることが明らかとなった（化2）。

20

【0011】

【化2】



30

40

【0012】

同じ実験条件下で、シュドモナス・セパシア（*Pseudomonas cepacia*）リパーゼ（PCL）やカンジダ・ルゴサ（*Candida rugosa*）リパーゼ（CRL）などその他のリパーゼは、対応するメチルまたはエチルエステルを生じることができず、あるいはN-（2-ヒドロキシエチル）モルホリンとのエステル交換反応を触媒できないことが明らかになったことから、MPAとCAL Bの間の特異性は一層驚くべきものであることに留意されたい。

【0013】

50

文献で周知の、非天然基質に対するエステル化およびエステル交換反応を触媒することができるこれらのリパーゼは、本発明者らが使用した実験条件下では明らかにMPAをその活性部位に受容させることができない。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

このMPAエステル化反応は、酵素としてCAL Bを、溶媒として適切なアルコール、好ましくはC₁～C₄アルキルアルコールまたはそのハロゲン化誘導体を使用する典型的な方法で行われる。使用する酵素の好ましい量は、MPA 1 mmol 当たり 20～60 mg、好ましくは 53 mg である。MPAの濃度は、0.05～0.2 モル濃度 (M)、好ましくは 0.1 M である。反応は、攪拌しながら 15～45℃、好ましくは 30℃の温度で 30～40 時間の間行われる。この反応は、酵素をろ過で除去し、ろ液を減圧下で濃縮することによって終了される。

10

【0015】

MPAエステルとN-(2-ヒドロキシエチル)モルホリンとのエステル交換反応は、酵素としてCAL B、および非プロトン性極性有機溶媒、好ましくはlog Pが0.5未満のもの、さらに好ましくはTHFまたは1,4-ジオキサンを使用する典型的な方法で行われる。

【0016】

使用する酵素の好ましい量は、基質 1 mmol 当たり 50～150 mg、好ましくは 107 mg である。基質の濃度は、0.1～0.3 M、好ましくは 0.25 M である。MPAエステルとN-(2-ヒドロキシエチル)モルホリンのモル比は、0.2～0.4、好ましくは 0.3 である。反応は、攪拌しながら 15～45℃、好ましくは 25～30℃の温度で 24～36 時間の間行われ、次いで、酵素をろ過で除去し、ろ液を減圧下で濃縮することによって終了される。あるいは、MPAエステル化反応、および後続のN-(2-ヒドロキシエチル)モルホリンとのエステル交換反応を、「新鮮な」酵素の使用に比べて見たところ酵素活性がいずれも低下していない同じ酵素を再使用して行うことができる。

20

【0017】

さらに、前述の実験条件下でのCAL Bを、エステル化反応とエステル交換反応のどちらにおいても触媒活性がたいして低下することなくより多くの使用サイクルで使うことができる。

30

【実施例1】

【0018】

ミコフェノール酸エチルエステル(2)の調製

MPA 1.01 g (3.15 mmol) を無水エタノール 37.5 ml 中に 30℃の温度で攪拌しながら溶解させ、次いで、170 mg のCAL Bを添加する。反応混合物を、激しく攪拌しながら 30℃の温度で 40 時間維持し、次いで反応を終了させる。酵素をろ過で除去し、ろ液を減圧下で濃縮して、オイル状残渣を得る。このオイル状残渣をジクロロメタン (20 ml) に溶解し、得られた有機溶液を、飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (15 ml)、次いで水の順で洗浄する。次いで、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、減圧下で濃縮して、ミコフェノール酸エチルエステル(2) (1.042 g、2.99 mmol、収率 95%) を得、これをさらに精製することなく次の合成ステップで直接使用する。

40

【0019】

元素分析: C₁₉H₂₄O₆として理論値: C = 65.50、H = 6.94、O = 27.55; 実測値: C = 65.42、H = 6.90、O = 27.44

質量スペクトル (分析フラグメント): 349 (m+1)、348 (分子イオン)、303 (m-45)

¹H-NMR (500 MHz) CDCl₃: 1.16 (t, 3H, CH₃-CH₂-), 1.76 (s, 3H, CH₃-C=), 2.15 (s, 3H, CH₃-Ar), 2.26 (m, 2H, CH₂-C=), 2.35 (m, 2H, CH₂CO), 3.35 (d, 2H, CH₂Ar), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.04 (q, 2H, CH₃-CH₂O), 5.16 (s, 2H, ArCH₂O), 5.20 (t, 1H, CH=)。

50

【0020】

また、以下のMPAエステルも類似した方法で調製した：メチルエステル、2, 2, 2-トリフルオロエチルエステル、2, 2, 2-トリフルオロエチルエステル、プロピルエステル、i-プロピルエステル、n-ブチルエステル。

【0021】

メチルエステル (1)

元素分析： $C_{18}H_{22}O_6$ として理論値： $C=64.66$ 、 $H=6.63$ 、 $O=28.71$ ；実測値： $C=64.59$ 、 $H=6.54$ 、 $O=28.65$

質量スペクトル（分析フラグメント）： $335 (m+1)$ 、 334 （分子イオン）、 $303 (m-31)$

10

n-プロピルエステル (3)

元素分析： $C_{20}H_{26}O_6$ として理論値： $C=66.28$ 、 $H=7.23$ 、 $O=26.49$ ；実測値： $C=66.18$ 、 $H=7.15$ 、 $O=26.37$

質量スペクトル（分析フラグメント）： $363 (m+1)$ 、 362 （分子イオン）、 $319 (m-43)$

イソプロピルエステル (4)

元素分析： $C_{20}H_{26}O_6$ として理論値： $C=66.28$ 、 $H=7.23$ 、 $O=26.49$ ；実測値： $C=66.20$ 、 $H=7.17$ 、 $O=26.40$

質量スペクトル（分析フラグメント）： $363 (m+1)$ 、 362 （分子イオン）、 $319 (m-43)$

20

2, 2, 2-トリフルオロエチルエステル (5)

元素分析： $C_{19}H_{21}F_3O_6$ として理論値： $C=56.72$ 、 $H=5.26$ 、 $F=14.17$ 、 $O=23.86$ ；実測値： $C=56.63$ 、 $H=5.18$ 、 $F=14.11$ 、 $O=23.80$

質量スペクトル（分析フラグメント）： $403 (m+1)$ 、 402 （分子イオン）、 $303 (m-99)$

2, 2, 2-トリクロロエチルエステル (6)

元素分析： $C_{19}H_{21}Cl_3O_6$ として理論値： $C=50.52$ 、 $H=4.69$ 、 $Cl=23.54$ 、 $O=21.25$ ；実測値： $C=50.43$ 、 $H=4.65$ 、 $Cl=23.45$ 、 $O=21.14$

30

質量スペクトル（分析フラグメント）： $458 (m+6)$ 、 $456 (m+4)$ 、 $454 (m+2)$ 、 452 （分子イオン）、 $303 (m-149)$

n-ブチルエステル (7)

元素分析： $C_{21}H_{28}O_6$ として理論値： $C=67.00$ 、 $H=7.50$ 、 $O=25.50$ ；実測値： $C=66.92$ 、 $H=7.42$ 、 $O=25.40$

質量スペクトル（分析フラグメント）： $377 (m+1)$ 、 376 （分子イオン）、 $303 (m-73)$

【実施例2】

【0022】

ミコフェノール酸エチルエステルのエステル交換反応によるMMFの調製

40

ミコフェノール酸エチルエステル 195 mg (0.56 mmol) を無水THF (2 ml) 中に $25 \sim 30^\circ\text{C}$ の温度で攪拌しながら溶解する。次いで、CAL B 60 mg およびN-(2-ヒドロキシエチル) モルホリン 0.23 ml (249 mg 、 1.9 mmol) を添加する。反応混合物を、激しく攪拌しながら $25 \sim 30^\circ\text{C}$ の温度で 3.5 時間維持する。この期間の後、反応を終了させる。酵素をろ過で除去し、ろ液を減圧下で濃縮して、オイル状残渣を得る。このオイル状残渣をジクロロメタン (20 ml) に溶解し、得られた有機溶液を、飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (15 ml)、次いで水の順で洗浄する。次いで、有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、減圧下で濃縮して、MMF 206 mg (0.45 mmol 、収率 82%) を得る。分析目的用に、この生成物を、シリカゲル ($p/p=1/100$) でのクロマトグラフィーによって、ジクロロメタン/メタノール=

50

96/4 (体積/体積) で溶出させて精製し、精製されたMMF (143 mg) を回収する。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) CDCl_3 : 1.80 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=}$), 2.18 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ar}$), 2.20-2.45 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-N}$ および $\text{CH}_2\text{-C=}$), 2.48 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.60 (m, 2H, CH_2CO), 3.40 (d, 2H, CH_2Ar), 3.78 (m, 4H, CH_2O), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 4.20 (t, 2H, CH_2O), 5.15-5.30 (m, 3H, CH_2O および CH=)。

【0023】

また、以下のMPAエステルからもエステル交換反応を行うことによって、類似した方法でMMFを調製した：メチルエステル、2, 2, 2-トリフルオロエチルエステル、2, 2, 2-トリクロロエチルエステル、n-プロピルエステル、i-プロピルエステル、n-ブチルエステル。

フロントページの続き

(72)発明者 パオロ プレスティレオ

イタリア アイー 20154 ミラノ ビア セニシオ 57

審査官 小川 明日香

(56)参考文献 国際公開第00/034503 (WO, A1)

特開平08-217783 (JP, A)

Enzyme and Microbial Technology, 2003年, Vol.32, p.312-320

Enzyme and Microbial Technology, 2003年, Vol.33, p.952-957

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 17/16

C12R 1/72

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)