

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4083586号
(P4083586)

(45) 発行日 平成20年4月30日 (2008. 4. 30)

(24) 登録日 平成20年2月22日 (2008. 2. 22)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 P 19/26 (2006. 01) C 1 2 P 19/26
C O 7 C 233/18 (2006. 01) C O 7 C 233/18
C O 7 B 61/00 (2006. 01) C O 7 B 61/00 3 0 0
 C O 7 M 7:00

請求項の数 22 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2002-573746 (P2002-573746)	(73) 特許権者	398075600
(86) (22) 出願日	平成14年3月19日 (2002. 3. 19)		ロンザ アーゲー
(65) 公表番号	特表2004-532016 (P2004-532016A)		スイス国、シーエイチー4052 パーゼ
(43) 公表日	平成16年10月21日 (2004. 10. 21)		ル、ミュンヘンシュタイナーシュトラッセ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/003019		38
(87) 国際公開番号	W02002/074737	(74) 代理人	100058479
(87) 国際公開日	平成14年9月26日 (2002. 9. 26)		弁理士 鈴江 武彦
審査請求日	平成16年11月25日 (2004. 11. 25)	(74) 代理人	100091351
(31) 優先権主張番号	01106794.9		弁理士 河野 哲
(32) 優先日	平成13年3月19日 (2001. 3. 19)	(74) 代理人	100088683
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 中村 誠
		(74) 代理人	100108855
			弁理士 蔵田 昌俊
		(74) 代理人	100109830
			弁理士 福原 淑弘

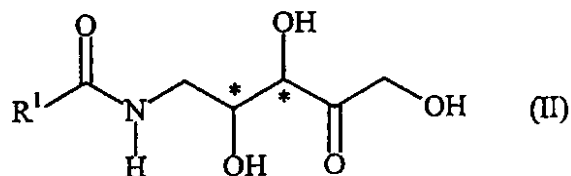
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3, 4-ジオール類を製造する方法

(57) 【特許請求の範囲】

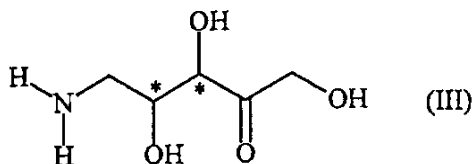
【請求項 1】

a) 次式のN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースのN-保護基を除去して、
 【化 1】



(ここで、R¹は、H、置換もしくは非置換のC₁₋₄-アルキル、置換もしくは非置換のC₂₋₄-アルケニル、またはOR²であり、R²は非置換のC₁₋₄-アルキルである)
 次式の5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロース を得る工程と、

【化 2】



b) 5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロース (III) を接触水素添加して、次式の対応する (2R)-および／または (2S)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールを得る工程と

【化 3】

10



を具備する方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースが、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-D-キシロースまたはN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-L-キシロースであることを特徴とする方法。

20

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法であって、前記N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースが、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-D-キシロースであることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 の何れか1項に記載の方法であって、前記N-保護基はアルカリ性条件下において除去されることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法であって、前記N-保護基は5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースに関して1～2モル当量の水酸化アルカリを用いて除去されることを特徴とする方法。

30

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 の何れか1項に記載の方法であって、前記水素添加触媒はパラジウム触媒であることを特徴とする方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法であって、前記水素添加に使用される触媒の量は、0.5～20% (触媒の重量/5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースの重量)であることを特徴とする方法。

【請求項 8】

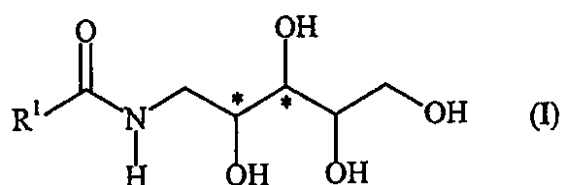
請求項 1 ～ 7 の何れか1項に記載の方法であって、前記N-保護基の除去および前記接触水素添加は同じ処理工程で行われることを特徴とする方法。

40

【請求項 9】

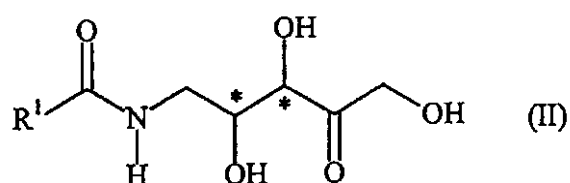
a) 次式のN-保護されたアミノテトラオールまたはその塩

【化 4】



(ここで、 R^1 はH、置換もしくは非置換の C_{1-4} -アルキル、置換もしくは非置換の C_{2-4} -アルケニル、または OR^2 であり、 R^2 は非置換の C_{1-4} -アルキルである)
を、微生物もしくはその細胞フリーの抽出物を使用して酸化し、対応する次式のN-保護された 5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースを得る工程と、

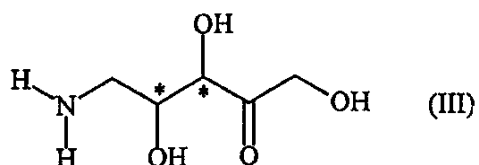
【化 5】



(ここで、 R^1 は上記で定義した通りである)

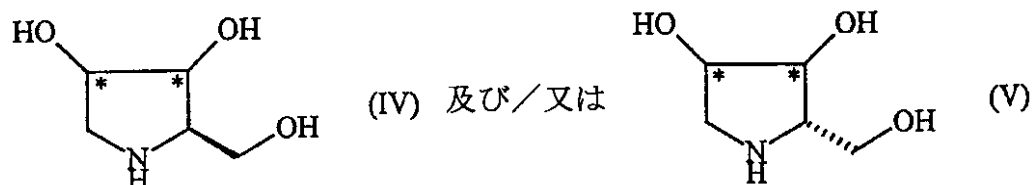
b) 前記N-保護された 5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロース (II)のN-保護基を除去して、対応する次式の 5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースを得る工程と、

【化 6】



c) 前記5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロース (III)を触媒的に水素添加することにより、対応する次式の (2R)-および/または(2S)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールを得る工程と

【化 7】



を具備する方法。

【請求項 10】

請求項 1～9 の何れか1項に記載の方法であって、 R^1 は置換もしくは非置換の C_{1-4} -アルキルまたはHであることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の方法であって、 R^1 は C_{1-2} -アルキルまたはHであることを特徴とする方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載の方法であって、R¹はHであることを特徴とする方法。

【請求項 1 3】

請求項 9 に記載の方法であって、前記N-保護されたアミノテトラオールが、N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトールまたはN-保護された1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトールであることを特徴とする方法。

【請求項 1 4】

請求項 9 ～ 1 3 の何れか 1 項に記載の方法であって、前記微生物はグルコノバクター属またはアセトバクター属に属することを特徴とする方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載の方法であって、前記微生物はグルコノバクター・オキシダンス種に属することを特徴とする方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 4 または 1 5 に記載の方法であって、前記微生物は、グルコノバクター・オキシダンスsspサブオキシダンスDSM 2003 (DSM 14076)、グルコノバクター・オキシダンスsspサブオキシダンスDSM 2343およびグルコノバクター・オキシダンスsspサブオキシダンスDSM 50049 (ATCC 621) の株からなる群から選択されることを特徴とする方法。

【請求項 1 7】

請求項 9 ～ 1 6 の何れか 1 項に記載の方法であって、前記酸化は、前記N-保護されたアミノテトラオールの濃度が50～250 g/Lにおいて行われることを特徴とする方法。

【請求項 1 8】

請求項 9 ～ 1 7 の何れか 1 項に記載の方法であって、前記酸化はpH4.3～6.0且つ10～50℃で行われることを特徴とする方法。

【請求項 1 9】

請求項 9 ～ 1 8 の何れか 1 項に記載の方法であって、前記N-保護基はアルカリ性条件下において除去されることを特徴とする方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載の方法であって、前記N-保護基はN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースに関して1～2モル当量の水酸化アルカリを用いて除去される方法。

【請求項 2 1】

請求項 9 ～ 2 0 の何れか 1 項に記載の方法であって、前記水素添加触媒はパラジウム触媒であり、且つ前記水素添加に使用される触媒の量は、0.5～10%（触媒の重量／5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースの重量）であることを特徴とする方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 ～ 2 1 の何れか 1 項に記載の方法であって、前記N-保護基の除去および前記接触水素添加は同じ処理工程で行われることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0001】

本発明は、2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオール類の製造方法、N-ホルミル-5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースの製造方法、並びに化合物N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトールおよび N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトールに関する。

【0002】

ポリヒドロキシル化ピロリジンは、グルコキシダーゼ阻害剤類を構成する。(2R,3R,4R)-2ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールは、10 μM未満のID₅₀値で、幾つかのαおよびグルコキシダーゼ類およびマンノキシダーゼ類を阻害する (Hung et al. J Org. Chem. 1991,56,3849-3855)。そのエナンチオマーである(2S,3S,4S)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールは、酵母のαグルコキシダーゼを阻害することが示された (Fleet et al. Tetrahedron Lett. 1985,26,3127-3130)。

10

20

30

40

50

【0003】

Fleet et al. (Tetrahedron Lett. 1985,26,3127-3130) は、D-キシロースからの、(2R,3R,4R)-および(2S,3S,4S)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールの製造を記載している。両者の合成の欠点は、非常に多くの工程を含むこと、および全体の収率が低いことである。

【0004】

Hung et al. (J Org. Chem. 1991,56,3849-3855) は、3-アジド-プロペニル-ベンゼンからの(2R,3R,4R)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールの製造を記載している。3-アジド-プロペニル-ベンゼンのオゾン分解の後、得られたアジド-アセトアルデヒドとリン酸ジヒドロキシアセトンとの酵素触媒アルドール縮合に続く脱リン酸化によって、5-アジド-5-デオキシ-D-キシロースが得られ、これをパラジウムの存在下で水素添加することにより、(2R,3R,4R)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールが得られる。この合成の欠点は、水素添加が多量の触媒を用いて行われることである。

【0005】

EP 0 624 652 A1は、2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオール類、およびそのN-置換誘導体類の製造を記載している。2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールは、グルコノバクター属またはコリネバクテリウム属の微生物を使用したN-ベンジル-1-アミノ-1-デオキシ-アラビニトールの微生物的酸化と、その後のパラジウムを触媒に用いた水素添加によって製造される。N-ベンジル-1-アミノ-1-デオキシ-アラビニトールは、アラビノースおよびベンジルアミンから調製すればよい。この2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールの製造の欠点は、微生物的酸化が低収量でしか酸化生成物を与えず、また接触水素添加が多量の触媒を用いて行われることである。

【0006】

本発明の目的は、2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオール類を製造するための経済的な方法を提供することである。本発明のもう一つの目的は、N-ホルミル-5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロース類を製造するための経済的方法を提供すること、および新規なN-アシル化された1-アミノ-1-デオキシ-アラビニトール類を提供することである。

【0007】

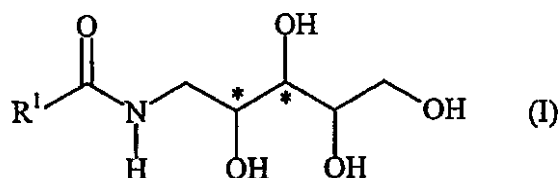
これらの目的は、請求項1、12および17に従う方法、および請求項22および23に従う化合物によって達成される。

【0008】

2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオール類を製造するための本発明の方法は、

a) 次式のN-保護されたアミノテトラオールまたはその塩

【化12】



(ここで、 R^1 はH、置換もしくは非置換の C_{1-4} -アルキル、置換もしくは非置換の C_{2-4} -アルケニル、または OR^2 であり、 R^2 は非置換の C_{1-4} -アルキルである)を、微生物もしくはその細胞フリーの抽出物を使用して酸化し、対応する次式のN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースを得る工程と、

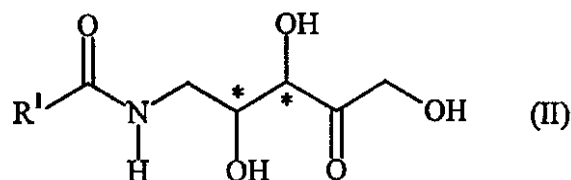
10

20

30

40

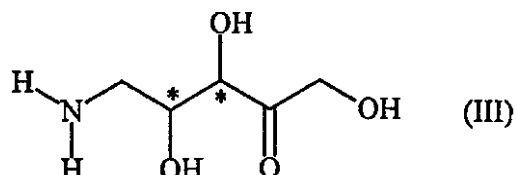
【化 1 3】



(ここで、R¹は上記で定義した通りである)

b) 前記N-保護された 5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロース (II) のN-保護基を除去して
、 対応する次式の 5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースを得る工程と、

【化 1 4】



c) 前記5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロース (III) を触媒的に水素添加することにより
、 対応する次式の (2R)-および/または(2S)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールを得る工程と

【化 1 5】



を具備する。

【0009】

式I、II、III、IVおよびVにおける星印は、定義されたコンフィギュレーションのキラル炭素原子を示している。

【0010】

N-保護されたアミノテトラオール類は、N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトール類、N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトール類、N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-D-リビトール類、N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-L-リビトール類、N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-D-キシリトール類、N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-L-キシリトール類、N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-D-リキシトール類(lyxitols)、およびN-保護された1-アミノ-1-デオキシ-L-リキシトール類からなる群から選ばれる。

【0011】

好ましいN-保護されたアミノテトラオール類は、N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトール類、およびN-保護された1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトール類である。

【0012】

より好ましいN-保護されたアミノテトラオール類は、N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトール類である。

【0013】

30

50

N-保護されたアミノテトラオール類の塩は、例えば、N-保護されたアミノテトラオール類をHClのような強い鉱酸で処理することにより形成された塩である。

【0014】

N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-L-リビトールおよびN-保護された1-アミノ-1-デオキシ-D-リキシトールに対応するN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースは、N-保護された5-アミノ-5-デオキシD-リブロースである。N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-D-リビトールおよびN-保護された1-アミノ-1-デオキシ-L-リキシトールに対応するN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースは、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-L-リブロースである。N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトールおよびN-保護された1-アミノ-1-デオキシ-L-キシリトールに対応するN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースは、L-キシルロースである。N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-D-キシリトールおよびN-保護された1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトールに対応するN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースは、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロースである。

10

【0015】

N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-D-リブロースに対応する5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースは、5-アミノ-5-デオキシ-D-リブロースである。従って、5-アミノ-5-デオキシ-L-リブロースは、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-L-リブロースに対応し、5-アミノ-5-デオキシ-L-キシルロースは、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-L-キシルロースに対応し、また5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロースは、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロースに対応する。

20

【0016】

5-アミノ5-デオキシ-D-リブロースに対応する(2R)-および/または(2S)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールは、(2R,3S,4R)-および/または(2S,3S,4R)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールである。従って、(2R,3R,4S)-および/または(2S,3R,4S)-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールは、5-アミノ-5-デオキシ-L-リブロースに対応し、(2R,3S,4)-および/または(2S,3S,4S)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールは、5-アミノ-5-デオキシ-L-キシルロースに対応し、また(2R,3R,4R)-および/または(2S,3R,4R)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールは、5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロースに対応する。

30

【0017】

C₁₋₄-アルキルは分岐もしくは非分岐であってよく、また少なくとも一つのヒドロキシル基および/またはハロゲン原子で置換されてもよい。ハロゲン原子はフッ素、塩素、臭素またはヨウ素であってよい。

【0018】

非置換のC₁₋₄-アルキルの例は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、およびtert-ブチルである。R¹が非置換 C₁₋₄-アルキルである場合の対応するN-保護基は、アセチル、プロパノイル、ブタノイル、イソブタノイル、ペンタノイル、イソペンタノイルおよび2,2-ジメチルプロパノイル (ピバロイル)である。R¹がOR₂で且つR₂が非置換C₁₋₄-アルキルである場合の対応するN-保護基は、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、イソブトキシカルボニル、およびtert-ブトキシカルボニルである。置換C₁₋₄-アルキルの例は、クロロメチル、ジクロロメチル、トリクロロメチル、フルオロメチル、ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、ヒドロキシメチル、および1-ヒドロキシ-エチルである。R¹が置換C₁₋₄-アルキルである場合の対応するN-保護基は、クロロアセチル、ジクロロアセチル、トリクロロアセチル、フルオロアセチル、ジフルオロアセチル、トリフルオロアセチル、ヒドロキシアセチル、および2-ヒドロキシ-プロパノイルである。

40

【0019】

C₂₋₄-アルケニルは分岐鎖でも非分岐鎖でもよく、また少なくとも一つのヒドロキシル基および/またはハロゲン原子で置換されてもよい。ハロゲン原子はフッ素、塩素、臭素

50

またはヨウ素であってよい。非置換 C_{2-4} -アルケニルの例は、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-1-プロペニル、1-ブテニル、2-ブテニルおよび3-ブテニルである。 R^1 が非置換 C_{2-4} -アルケニルである場合の対応するN-保護基は、アクリロイル、クロトノイル、3-ブテノイル、2-メチル-3-ブテノイル、3-メチル-2-ブテノイル、2-ペンテノイル、3-ペンテノイルおよび4-ペンテノイルである。置換 C_{2-4} -アルケニルの例は、1-クロロエテニルおよび2-クロロエテニルである。 R^1 が置換 C_{2-4} -アルケニルである場合の対応するN-保護基は、2-クロロアクリロイルおよび3-クロロアクリロイルである。

【0020】

R^1 がHである場合、対応するN-保護基はホルミルである。

10

【0021】

好ましくは、 R^1 はH、または置換もしくは非置換の C_{1-2} アルキルである。より好ましくは、 R^1 はHである。

【0022】

ホルミル保護基は、水性媒質中における高溶解度のN-保護されたアミノテトラオールを与える利点を有している。従って、生体酸化は、高濃度のN-ホルミルアミノテトラオールにおいて生体酸化を行い、高収量のN-ホルミル-5アミノ-5-デオキシ-ペンツロースを得ることができる。N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトールの生体酸化においては、200 g/LまでのN-ホルミル-5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロースの収量を達成することができる。

20

【0023】

N-保護されたアミノテトラオール類は、対応するアミノテトラオールから、当業者に知られた方法によって調製することができる。N-ホルミル-アミノテトラオール類 (R^1 はH) は、対応するアミノテトラオールから、該アミノテトラオールと蟻酸メチル、蟻酸エチルまたは蟻酸ブチルのような蟻酸アルキルとの反応、蟻酸フェニルのような蟻酸アリールとの反応、酢酸蟻酸無水物のような蟻酸およびもう一つのカルボン酸の混合酸無水物との反応、または蟻酸との反応によって調製すればよい。N-アシル-アミノテトラオール類 (R^1 は置換もしくは非置換の C_{1-4} -アルキルまたは置換もしくは非置換の C_{2-4} -アルケニル) は、アミノテトラオールと適切な塩化アシルカルボン酸アルキルエステル、カルボン酸アリールエステル、カルボン酸無水物またはカルボン酸との反応によって調製すればよい。N-アセチルアミノテトラオール類は、対応するアミノテトラオールから、例えば塩化アセチル、酢酸無水物または酢酸との反応によって調製することができる。N-アルコキシカルボニル-アミノテトラオール類 (R^1 は OR^2 、 R^2 は置換 C_{1-4} -アルキルである) は、対応するアミノテトラオールを、適切なクロロ蟻酸アルキル、アジド蟻酸アルキルまたは適切なジカルボン酸ジアルキルと反応させることによって調製すればよい。N-tert-ブトキシカルボニル-アミノテトラオール類は、対応するアミノテトラオールを、例えばジカルボン酸ジ-tert-ブチルト反応させることによって調製すればよい。

30

【0024】

アミノテトラオールは、D-アラビノース、L-アラビノース、D-キシロース、L-キシロース、D-リボース、L-リボース、D-リキソースおよびL-リキソースのような対応のペントースから、当業者に既知の方法によって調製すればよい。このペントースを、一級もしくは二級アミンと、またはヒドロキシルアミンと反応させて、対応するイミンまたはオキシムにし、これを触媒的に水素添加してアミノテトラオールを得ることができる。アラビノースの適切なエナンチオマーを還元条件下でベンジルアミンと反応させ、得られた対応するN-ベンジル1-アミノ-1-デオキシ-アラビニトールを触媒的に水素添加することによって、1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトールはD-アラビノースから、また1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトールはL-アラビニトールから調製すればよい。

40

【0025】

生体酸化工程は、N-保護されたアミノテトラオール類のC-4におけるヒドロキシル基をケト基に酸化できる何れかの微生物を用いて行うことができる。この微生物はバクテリア

50

または真菌である。適切なバクテリアはグルコノバクター属、アセトバクターまたはコリネバクテリウムの菌である。適切な真菌類は、メチュニコビア (Metschnikowia) 属、カンジダ属、またはサッカロマイセス属のものである。

【0026】

好ましい微生物は、グルコノバクター属またはアセトバクター属のバクテリアである。より好ましい微生物は、グルコノバクター・オキシダンス種のものである。グルコノバクター・オキシダンス種の者である。グルコノバクター・オキシダンス種のバクテリアは、亜種グルコノバクター・オキシダンスssp.サブオキシダンス（以前はアセトバクター・サブオキシダンスまたはアセトモナス・サブオキシダンスとして知られていた）、およびグルコノバクター・オキシダンスssp.オキシダンス（以前はアセトモナスオキシダンスとして知られていた）とも呼ばれる。

10

【0027】

最も好ましい微生物は、DSM 2003 (DSM 14076)、DSM 2343およびDSM 50049 (ATCC 621) で指定されたグルコノバクターオキシダンスssp.サブオキシダンスからなる一群の株から選択される。

【0028】

これらの株は、ドイツ細胞培養体および微生物寄託センター (Deutsche Sammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen GmbH (DSMZ); Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany) から得ることができる。グルコノバクター・オキシダンスssp.サブオキシダンスDSM 2003株は、DSM 14076の名称で、ブダペスト条約の下に、2001年2月23日にDSMZに寄託された。

20

【0029】

また、寄託番号DSM 2003 (DSM 14076)、DSM 2343およびDSM 50049 (ATCC 621) のバクテリア株であるグルコノバクター・オキシダンスssp.サブオキシダンスは、グルコノバクター・オキシダンスssp.サブオキシダンス種に属するその変異体を意味し、N-保護されたアミノテトラオールのC-4におけるヒドロキシル基をケト基に酸化することができる。このような変異体は、上記バクテリア株の誘導された突然変異または自然突然変異の後、得られた変異体を単離し、ついでその単離された変異体を、N-保護されたアミノテトラオールのC-4におけるヒドロキシル基をケト基に酸化する能力についてスクリーニングすることにより得ることができる。変異の例は、ゲノムのDNA切片の一つまたは複数の塩基の置換、挿入もしくは欠失、または逆位である。自然変異は、DNA複製におけるエラー起因して天然に生じる変異である。誘導された変異は、放射線（紫外線照射、X線またはガンマ線）、変異性化学物質（メタンスルホン酸エチル、亜硝酸塩、またはプロモウラシル）、またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような当業者に既知の方法によって得ることができる。

30

【0030】

これらの微生物は、大豆ペプトンおよび酵母エキスのような炭素源、窒素源およびエネルギー源として働く栄養素、およびN-保護されたアミノテトラオールのC-4ヒドロキシル基のケト基への酸化を触媒する酵素活性インデューサを含有する、適切な培地上で増殖させることができる。酵素活性の適切なインデューサは、D-マンニトール、L-マンニトール、D-ソルビトール、L-ソルビトール、ガラクトール、エリスリトール、D-トレイトールおよびL-トレイトールのような糖アルコール類である。好ましいインデューサは、D-ソルビトールおよびL-ソルビトールである。より好ましいインデューサはD-ソルビトールである。

40

【0031】

微生物の増殖は、pH5.0~8.0、好ましくはpH5.5~7.0、および 20~35℃、好ましくは28~32℃において行われる。

【0032】

好ましくは、この増殖は好氣的条件下で行われる。予備培養体はガス透過性の蓋を有するフラスコ内で増殖させればよく、また発酵は発酵装置、または例えば空気または酸素を

50

供給しながら攪拌される容器内で行ってもよい。発酵は、周囲圧力（約1バール）または3バール以下の過剰圧力において行えばよい。より好ましくは、増殖は空気を供給することによって、発酵プロセス内の酸素量を60%（大気圧での $P_{O_2}/P_{O_2 \text{ sat.}}$ ）以上、最も好ましくは70%以上に維持しながら行う。

【0033】

増殖の後、微生物は、例えば濾過または遠心分離によって回収することができる。

【0034】

N-保護された1-アミノ-1-デオキシ-ペンツロースへのN-保護されたアミノテトラオール
の生体酸化は、微生物またはその細胞抽出物を用いて行われる。この微生物は、固定化さ
れた休止細胞のような休止細胞として、または増殖中の細胞として用いればよい。その細
胞抽出物とは、当業者に既知の微生物細胞破壊法または自己溶菌によって得られる粗製の
細胞抽出物を意味する。微生物細胞破壊法の例は、超音波法またはフレンチプレス法であ
る。好ましくは、生体酸化は微生物を用いて、好ましくは微生物の休止細胞を用いて行わ
れる。

10

【0035】

好ましくは、N-保護されたアミノテトラオールの濃度は、50~250 g/L、より好ましく
は100~250 g/L、最も好ましくは150~250 g/Lである。

【0036】

好ましくは、生体酸化はpH4.3~6.0、より好ましくはpH4.5~5.5で、且つ10~50℃、よ
り好ましくは10~20℃で行われる。

20

【0037】

生体酸化は、バッチプロセス、流加プロセス(fed-batch)として行ってもよく、または
連続プロセスとして行ってもよい。

【0038】

生体酸化は、通常は12~84時間、好ましくは12~36時間行われる。

【0039】

生体酸化の後、細胞は、例えば濾過または遠心分離によって除去される。こうして得ら
れた溶液は次の工程で直接用いてもよく、または、次の工程で用いる前にN-保護された5-
アミノ-5-デオキシ-D-キシルロースを該溶液から単離してもよい。

【0040】

30

N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースのN-保護基の除去は、中性、アルカリ
性または酸性の条件下での化水分解によって、またはアシラーゼのような酵素を使用する
ことによって行われる。

【0041】

好ましくは、N-保護基はアルカリ性条件下で除去される。適切な塩基の例は、水酸化アル
カリ金属、水酸化アルカリ土類金属、水酸化アンモニウム、水酸化ジアルキルアンモニ
ウム、水酸化トリアルキルアンモニウム、水酸化テトラアルキルアンモニウム、炭酸アル
カリ金属または炭酸アルカリ土類金属である。水酸化アルカリ金属の例は、水酸化ナトリ
ウム、水酸化カリウムおよび水酸化リチウムである。水酸化アルカリ土類金属の例は、水
酸化カルシウムおよび水酸化バリウムである。水酸化ジアルキルアンモニウムの一例は、
水酸化ジイソプロピルアンモニウムである。水酸化トリアルキルアンモニウムの一例は、
水酸化トリエチルアンモニウムである。水酸化テトラアルキルアンモニウムの一例は、水
酸化テトラブチルアンモニウムである。炭酸アルカリ金属の例は、炭酸ナトリウム、炭酸
カリウムおよび炭酸リチウムである。炭酸アルカリ土類金属の例は、炭酸カルシウムおよ
び炭酸バリウムである。

40

【0042】

より好ましくは、N-保護基は、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースに関し
て1~2モル当量の水酸化アルカリを用いて除去される。

【0043】

最も好ましくは、N-保護基は、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースに関し

50

て1~2モル当量の水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウムを用いて除去される。

【0044】

還元剤としての適切な水素添加触媒には、ニッケル、またはパラジウム、ロジウムもしくはプラチナのような貴金属が含まれる。水素添加触媒の例は、ラネーニッケル、パラジウム-炭素、パラジウム-硫酸バリウム、パラジウム-炭酸カルシウム、プラチナ-炭素、ロジウム-炭素、およびロジウム-酸化アルミニウムである。この触媒の貴金属は、1~20% (w/w)、好ましくは4~10% (w/w) である。好ましくは、水素添加触媒はパラジウム触媒であり、更に好ましくは、水素添加触媒はパラジウム-炭素である。

【0045】

水素添加に使用する触媒の量は、0.1~100% (触媒の重量/5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースの重量)、好ましくは0.5~20%、より好ましくは0.5~10%である。

10

【0046】

水素添加に使用する溶媒は、水、またはメタノール、エタノール、プロパノールもしくはイソプロパノールのような水混和性アルコール、または水と水混和性アルコールの混合物であり、より好ましくは水である。

【0047】

水素添加は、0~120℃、好ましくは15~40℃、より好ましくは20~30℃の温度、および0.5~100バール、好ましくは2~10バール、より好ましくは4~6バールの水素圧力で行うことができる。

【0048】

20

水素添加の反応時間は、通常は1~50時間、好ましくは5~40時間、より好ましくは10~30時間である。

【0049】

水素添加によって、通常は、(2R)-または(2S)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールが高いジアステレオマー過剰 (d.e.)、好ましくは>80% d.e.、より好ましくは>90% d.e. で与えられる。

【0050】

水素添加の後、触媒は例えば濾過により除去することができる。生成物である2-ヒドロキシメチル-ピロリドン、イオン交換クロマトグラフィーによって精製することができる。

30

【0051】

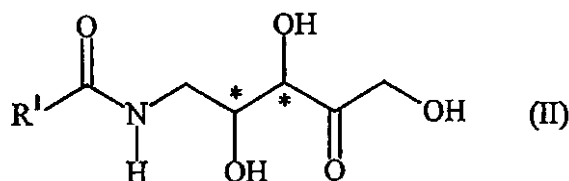
N-保護基の除去および接触水素添加は、別々の処理工程で行うこともでき、または同じ処理工程で行うこともできる。好ましくは、N-保護基の除去および接触水素添加は同じ処理工程で行われる。

【0052】

また、本発明の一部は、2-ヒドロキシメチル-3,4ジオールの調製方法であって：

a) 次式のN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースのN-保護基を除去して、

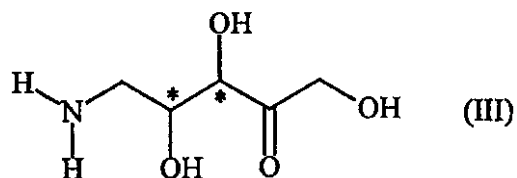
【化16】



40

次式の5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースを得る工程と、

【化 1 7】



b) 5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロース(III) を接触水素添加して、次式の対応する (2R)-および／または(2S)-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールを得ること

【化 1 8】

10



を具備する。

【0053】

適切なN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースは、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロース、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-L-キシルロース、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-D-リブロース、およびN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-L-リブロースである。好ましいN-保護された5-アミノ-5-デオキシペンツロースは、N-保護された5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロース、およびN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-L-キシルロースである。より好ましいN-保護された5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロースは、5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロースである。

20

【0054】

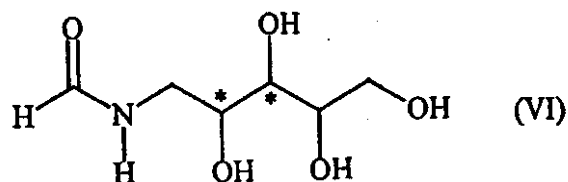
N-保護されたアミノテトラオール(I)からの2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールの調製について与えられた全ての定義は、適切なときは、このプロセスに対してもそのまま適用される。

30

【0055】

本発明のもう一つの目的は、次式のN-ホルミル-アミノテトラオールまたはその塩

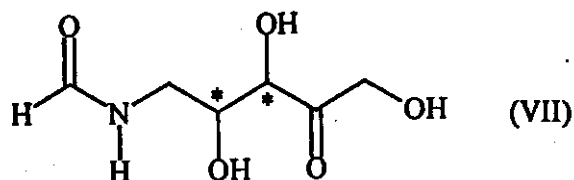
【化 1 9】



を、微生物またはその細胞フリーの抽出物で酸化して、対応する次式のN-ホルミル-5-アミノ-5-デオキシ-ペンツロース

40

【化 2 0】



を得る工程を具備した方法である。

50

【0056】

適切なN-ホルミル-アミノテトラオールは、N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトール、N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトール、N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-D-リビトール、N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-L-リビトール、N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-D-キシリトール、N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-L-キシリトール、N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-D-リキシトール、およびN-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-L-リキシトールからなる群から選択される。

【0057】

好ましいN-ホルミル アミノテトラオールは、N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトール、およびN-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトールである。より好ましいN-保護されたアミノテトラオールは、N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトールである。

10

【0058】

N- 保護されたアミノテトラオール(I)からの2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールの調製について与えられた全ての定義は、適切なときは、この方法にもそのまま適用される。

【0059】

化合物N-ホルミル-1-デオキシ-1-アミノ-D-アラビニトール、およびN-ホルミル-1-デオキシ-1-アミノ-L-アラビニトールもまた、本発明の一部である。

20

【実施例】

【0060】

実施例 1

N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトールの調製

1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトール (50.0 g, 330 mmol) を、メタノール (1300 mL) 中に35℃まで加温することにより溶解した。20℃に冷却した後、蟻酸メチル (43.6 g, 725 mmol) を添加し、機械的攪拌機および加熱冷却システムを備えた二重壁フラスコ内において、この溶液を約20℃で攪拌した。2時間後に白色の固体が沈殿した。全体で3時間の反応時間の後、混合物を攪拌しながら0℃で1時間冷却した。仕上げるために、得られた白色懸濁液を濾過し、冷メタノールで2回 (各35 mL) 洗浄した。この沈殿を40℃および25 mbarで乾燥して、N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビチノールを得た (82%)。

30

【0061】

実施例 2

N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトールの調製

出発物質として1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトールを用い、N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビチノールを得た点を除き、実施例 1 に記載したようにしてホルミル化を行った。

【0062】

実施例 3

バイオマスの調製

酵母エキス (3 g/L)、D-ソルビトール (60 g/L) および大豆ペプトン (5 g/L) を脱イオン水中に溶解し、NaOHでpHを6.3±0.3に調節することにより、培地 A を調製した。培地 A を三つのエルレンマイヤーフラスコ (各100 mL) の中に配置し、滅菌し (121℃、20分、1 bar)、グルコノバクター・オキシダンス ssp. サブオキシダンス DSM 2003 (DSM 14076) を接種した (各1 mL)。この予備培養物を、30℃および200 rpmで24時間インキュベートした。培地 A (11.5 L) を30 Lの発酵装置の中に配置し、滅菌し (121℃、30分、1 bar)、予備培養物 (200 mL) を接種した。発酵は、空気を供給することによって発酵プロセス中の酸素量を70%以上 (大気圧での $P_{O_2}/P_{O_{2, sat.}}$) に維持しながら、28℃およびpH6.3で行われた。約13時間後、発酵プロセスを冷却し、4℃で濾過した。MgSO₄水溶液 (20 mM) を用いて超遠心により細胞を洗浄し、濃縮した。濃縮した細胞懸濁液を、MgSO₄水溶液 (20 mM) を用いてOD_{650nm} 200まで希釈し、4℃で保存した。

40

50

【0063】

実施例4

N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトールの生体酸化

N-ホルミル-1-デオキシ-1-アミノ-D-アラビニトール (20 g, 111 mmol) を、水 (100 mL) の中に溶解した。実施例3に記載したようにして調製したグルコノバクター・オキシダンスssp.サブオキシダンスDSM 2003 (DSM 14076) を添加し、pHを5.0に調節した。この生体酸化は、15℃およびpH5において震盪しながら行った。24時間後、TLCによって測定したところ、出発物質は殆ど定量的に N-ホルミル-5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロースに変換された。細胞を遠心分離によって除去し、得られた溶液は水素添加を行うまで保存した。

10

【0064】

実施例5

N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトールの生体酸化

出発物質としてN-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトールを使用した点を除き、実施例4に記載したのと同様にして生体酸化を行った。N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-L-アラビニトールは、N-ホルミル-5-アミノ-5-デオキシ-L-キシルロースに変換された。

【0065】

実施例6

N-ホルミル-5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロースの接触水素添加

20

実施例4に記載したようにして得たN-ホルミル-5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロース (100 g, 111 mmol)、KOH (1 M, 111 mL, 111 mmol) および Pd/C (4%で53.4 %の水 (Degussa-Huls), 1.0 g) の水溶液を、加熱冷却システムを備えたハステロイ (Hastelloy) の1 Lオートクレーブ中で脱イオン水 (50 mL) の中に混合した。この反応混合物を窒素 (5 bar) で3回パージし、次いでH₂ (5 bar) で3回パージした。反応容器は、H₂ (5 bar) で加圧した。23℃で20時間攪拌した後、反応混合物をN₂で3回パージした。セライト (Celit; 登録商標) 上で濾過した後、茶色の溶液 (183 g) を得た。この溶液をイオン交換樹脂カラム (直径3cm、高さ20cm、Dowex (登録商標) 50Wx8H、100-200メッシュ) で精製した。この樹脂は、HCl水溶液 (7%) で活性化し、次いでpH3~4まで水で洗浄した。生成物をロードした後、カラムを水で5回パージし (各回毎に168 mL)、次いでNH₃水溶液 (5%, 114 mL) で溶出し、終了時点において水 (283 mL) で洗浄した。画分を回収し、TLCでチェックした (溶媒系: ジクロロメタン/水/アンモニア水溶液 (25%) = 17/3/2、検出: KMnO₄/Na₂CO₃ = 1/1)。Rf [(2R,3R,4R)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオール]=0.2-0.4、Rf [(N-ホルミル-5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロース)=0.83]。同一の画分をプールして水を除去した後、高圧キャピラリー電気泳動 (HPCE) で測定したときのジアステレオマー過剰が94.4%の、(2R,3R,4R)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールが得られた (N-ホルミル-1-アミノ-1-デオキシ-D-アラビニトールから出発して72%)。

30

【0066】

実施例7

N-ホルミル-5-アミノ-5-デオキシ-L-キシルロースの水素添加

40

水素添加は、N-ホルミル-5アミノ-5-デオキシ-L-キシルロースを出発物質として用いた以外は、実施例6に記載したのと同様に行った。(2S,3S,4S)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールが得られた。

【0067】

実施例8

接触水素添加に先立つN-ホルミル保護基の除去

実施例に記載したようにして得られたN-ホルミル-5-アミノ-5-デオキシ-D-キシルロース (100 g, 111 mmol)、KOH (1 M, 111 mL, 111 mmol) および脱イオン水 (50 mL) の水溶液を、加熱冷却システムを備えたハステロイ (Hastelloy) の1 Lオートクレーブ中におい

50

て、約23℃で1時間攪拌した。Pd/C（4%で53.4 %の水（Degussa-Huls），1.0 g）を添加し、実施例6に記載した能登同様にして水素添加を行った。(2R,3R,4R)-2-ヒドロキシメチル-ピロリジン-3,4-ジオールが得られた。

フロントページの続き

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(72)発明者 ケンプフェン、ウルリッヒ

スイス国、シーエイチー 3 9 0 0 ブリグ、テルメルベーク 1 4

(72)発明者 ウルバン、エバ・マリア

スイス国、シーエイチー 3 9 1 2 テルメン、イム・フェルト 1 5 アー

(72)発明者 ジェッセン、クラウス・ウルリッヒ

デンマーク国、デーコー 3 5 5 0 スランゲルupp、モエリーンゲン 2 0

(72)発明者 ク라우セン、マーチン

スイス国、シーエイチー 3 9 0 0 ブリグ、テルメルベーク 3 4

審査官 内藤 伸一

(56)参考文献 特開平 0 6 - 0 3 8 7 8 0 (J P, A)

Canadian Journal of Chemistry (1962), 40, 503-10

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12P 19/26

C07C 233/18

C07D 207/12

CA(STN)

REGISTRY(STN)

WPIDS(STN)