世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 **C12P 41/00**	**A1**	(11) 国際公開番号	**WO98/20152**
		(43) 国際公開日	1998年5月14日(14.05.98)

(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04009

(22) 国際出願日 1997年11月4日(04.11.97)

(30) 優先権データ
特願平8/292934 1996年11月5日(05.11.96) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
三菱レイヨン株式会社
(MITSUBISHI RAYON CO., LTD.)[JP/JP]
〒104 東京都中央区京橋二丁目3番19号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
佐藤栄治(SATO, Eiji)[JP/JP]
榎本兼彦(ENOMOTO, Kanehiko)[JP/JP]
〒739-06 広島県大竹市御幸町20番1号
三菱レイヨン株式会社 中央技術研究所内 Hiroshima, (JP)
(74) 代理人
弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.)
〒105 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号
虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 CN, IL, NO, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

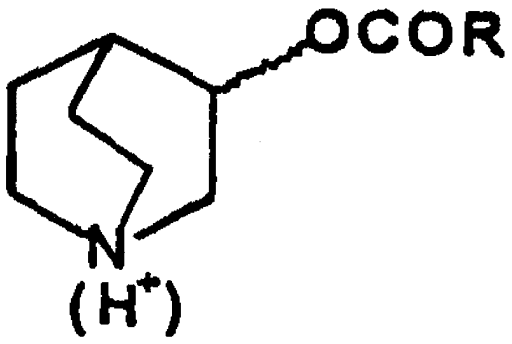
添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: PROCESS FOR PRODUCING OPTICALLY ACTIVE 3-QUINUCLIDINOL DERIVATIVES

(54)発明の名称 光学活性3－キヌクリジノール誘導体の製造法

(57) Abstract

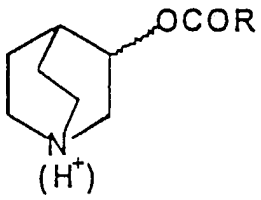
A process for producing optically active quinuclidinol derivatives characterized by treating racemic 3-quinuclidinol esters represented by general formula (I) (wherein R represents linear or branched alkyl; and (H^+) means an optional formation of a salt with a mineral or organic acid) with cells of microorganisms belonging to the genus *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Candida* or *Pseudomonas* and capable of asymmetrically hydrolyzing the ester bond, liquid cultures of the microbial cells, treated microbial cells, enzymes produced by these microorganisms, or enzymes of swine or bovine origin. This process makes it possible to easily produce optically active 3-quinuclidinol derivatives which are valuable intermediates in synthesizing drugs, etc.



(I)

（５７）要約

本発明は、一般式（Ｉ）：



（Ｉ）

（式中、Ｒは直鎖または分岐のアルキル基を表し、（H^+）は鉱酸あるいは有機酸と塩を形成した状態であっても良いことを表す）で示されるラセミ体３－キヌクリジノールエステルに、アスペルギルス（Aspergillus)属、リゾプス（Rhizopus）属、キャンジダ（Candida)属およびシュードモナス（Pseudomonas)属に属し、該エステル結合を不斉加水分解する能力を有する微生物菌体、菌体培養液、菌体処理物、これら微生物により生産される酵素、ブタまたはウシ由来の酵素を作用させることを特徴とする光学活性３－キヌクリジノール誘導体の製造方法に関する。

本発明によれば、医薬品などの重要な合成中間体である光学活性３－キヌクリジノール誘導体の簡便な製造方法が提供される。

ＰＣＴに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたＰＣＴ加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルキナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴー共和国
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサオ
GR ギリシャ
HU ハインガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギス
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュージーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオーネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴー
TJ タジキスタン
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダッド・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィェトナム
YU ユーゴースラヴィア
ZW ジンバブエ

明　細　書

光学活性３－キヌクリジノール誘導体の製造法

技術分野

本発明は医薬、農薬等の原料あるいは中間体として非常に有用な化合物である光学活性３－キヌクリジノール誘導体の製造方法に関するものである。

背景技術

ラセミ体３－キヌクリジノール誘導体はZhur. Obshchi. Khim., 30, 163-71 (1960)、Helv. 40, 2107-85 (1957)、J. Am. Chem. Soc. 74, 2215-8 (1952) 等に広く合成法が知られている。

一方、光学活性３－キヌクリジノール誘導体の合成方法としては、Acta. Pharm. Suec., 16, 281-3 (1979)、米国特許3,997,543 、Life sic. 21, 1293-1302 (1977)、米国特許5,215,918 等に記載の方法が知られている。

Acta. Pharm. Suec., 16, 281-3 (1979)に記載される方法は、光学活性酒石酸を分割剤とする優先晶析法により光学活性３－キヌクリジノール誘導体に導く方法であり、光学純度を上げるためには数回以上再結晶を繰り返す等の煩多な操作を必要とするものである。

また、米国特許3,997,543 、Life sic. 21, 1293-1302 (1977)および米国特許5,215,918 に記載される方法は、３－キヌクリジノールの低級脂肪酸エステルを酵素により不斉加水分解して光学活性３－キヌクリジノール誘導体を得る方法を報告している。しかし、これらの方法で使用されている酵素は、米国特許3,997,543 、Life sic. 21, 1293-1302 (1977)ではブチリルコリンエステラーゼのみ、また米国特許5,215,918 ではバチルス属により生産される特定の酵素（subtilisin）のみであり、いずれもその種類が限定されており、一般的な方法とは言い難い。その他一般的な酵素を用いた光学活性３－キヌクリジノール誘導体製造法についてはまだ知られていない。

したがって、本発明により提供されるような光学活性３－キヌクリジノール誘

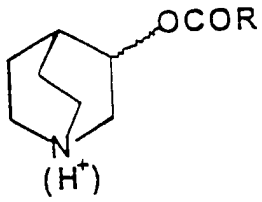
導体の有用な合成方法が望まれていた。

発明の開示

従って、本発明の目的は、光学活性医薬品や光学活性農薬などの有効な中間体原料である光学活性３－キヌクリジノール誘導体の簡便な製造方法を提供することにある。

本発明者らは光学活性３－キヌクリジノール誘導体の合成方法について鋭意研究を重ねた結果、３－キヌクリジノールのラセミ体エステルを光学選択的に加水分解する活性のある選ばれた酵素および微生物を見い出し、本発明を完成した。

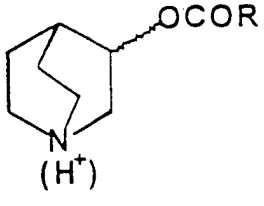
即ち、本発明は、下記の一般式（Ｉ）：



（Ｉ）

（式中、Ｒは直鎖または分岐のアルキル基を表し、（H^+）は鉱酸あるいは有機酸と塩を形成した状態であっても良いことを表す）で示されるラセミ体３－キヌクリジノールエステルに、アスペルギルス（Aspergillus)属、リゾプス（Rhizopus）属、キャンジダ（Candida)属およびシュードモナス（Pseudomonas)属に属し、該エステル結合を不斉加水分解する能力を有する微生物菌体、菌体培養液、菌体処理物、これらの微生物により生産される酵素、ブタまたはウシ由来の酵素を作用させることを特徴とする光学活性３－キヌクリジノールまたはその塩の製造方法である。

本発明はまた、下記の一般式（Ｉ）：



（Ｉ）

（式中、Ｒは直鎖または分岐のアルキル基を表し、（H^+）は鉱酸あるいは有機酸と塩を形成した状態であっても良いことを表す）で示されるラセミ体３－キヌクリジノールエステルに、アスペルギルス（Aspergillus)属、リゾプス（Rhizopus）属、キャンジダ（Candida)属およびシュードモナス（Pseudomonas)属に属し、該エステル結合を不斉加水分解する能力を有する微生物菌体、菌体培養液、菌体処理物、これらの微生物により生産される酵素、ブタまたはウシ由来の酵素を作用させることを特徴とする光学活性３－キヌクリジノールエステルまたはその塩の製造方法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の方法の原料である一般式（Ｉ）で示される３－キヌクリジノールのラセミ体エステルにおいて、Ｒの直鎖または分岐アルキル基としては炭素数１から10のアルキル基であれば、特に限定されないが、具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、 tert-ブチル、バレル、イソバレル、ピバル、ヘキシル、ペンチル、オクチル、デシルなどを例示できる。また、特に好ましくは上記例示中の炭素数１から５のアルキル基である。さらに、これらに置換あるいは無置換のフェニル基を有していてもかまわない。その置換基としてはアルキル基、アシル基、ハロゲン基、水酸基などを例示できる。

また、３－キヌクリジノールのラセミ体エステルの窒素原子の部分は、一般式（Ｉ）に示すように意図的に有機酸あるいは鉱酸等の塩を形成させたものであっても構わない。具体的には鉱酸塩として塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩等が例示できる。有機酸塩としては酢酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩、フマル酸、マロン酸、シュウ酸等の脂肪族有機酸塩、安息香酸等の芳香族有機酸塩等が例示できる。

本発明の具体的な方法を以下に示す。

原料となるラセミ体３－キヌクリジノールエステルは前述のように公知の方法により容易に合成することができる。すなわち、イソニコチン酸エステル、ブロモ酢酸エステル等を原料にラセミ体３－キヌクリジノールを合成し（J. Am. Chem. Soc. 74, 2215-8 (1952)）、これに有機酸クロライドあるいは有機酸無水物等を常法に従い反応させることで合成可能である。

本発明において使用する一般式（Ｉ）で示されるラセミ体３－キヌクリジノールエステルのエステル結合を不斉加水分解し、光学活性３－キヌクリジノールおよび／またはその対掌体エステルを製造する能力を有する酵素を生産するアスペルギルス（Aspergillus)属、リゾプス（Rhizopus）属、キャンジダ（Candida)属、シュードモナス（Pseudomonas)属の微生物は特に限定されないが、具体的には、アスペルギルス・オリゼ（Aspergillus oryzae）、アスペルギルス・メレウス（Aspergillus melleus)、アスペルギルス・ソジャエ（Aspergillus sojae)、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger)、アスペルギルス・サイトイ（Aspergillus saitoi）、キャンジダ・アンタルクチカ(Candida antarctica)、シュードモナスsp. MR2301株 FERM BP4870が例示できる。

また、本発明において使用する不斉加水分解する能力を有するアスペルギルス（Aspergillus)属、リゾプス（Rhizopus）属、キャンジダ（Candida)属、シュードモナス（Pseudomonas)属の微生物により生産される酵素としては、各種リパーゼ、プロテアーゼおよびエステラーゼ等が使用できる。このような酵素の中で市販されているものとしては、天野製薬リパーゼA6（Aspergillus 属由来）、天野製薬リパーゼAP4（Aspergillus属由来）、天野製薬リパーゼAP6（Aspergillus属由来）、SIGMA アシラーゼⅠ(Aspergillus melleus由来）、SIGMA プロテアーゼ TypeII（Aspergillus oryzae 由来）、SIGMA プロテアーゼタイプXIII（Aspergillus saitoi由来）、SIGMA プロテアーゼ（ニューラーゼ）タイプXVIII（Rhizopus 属由来）、SIGMA プロテアーゼタイプXIX（Aspergillus sojae由来）、SIGMA プロテアーゼタイプXXIII（Aspergillus oryzae 由来）、Fluka リパーゼ（Candida antarctica由来）、ナガセ生化学工業デナチームAP（Aspergillus oryzae 由来）、ナガセ生化学工業デナプシン10P（Aspergillus niger由来）、NOVO Flavourzyme MG（Aspergillus oryzae 由来）等が例示できる。

さらに、本発明において使用する不斉加水分解する能力を有するブタまたはウシ由来の酵素は特に限定されないが、各種のリパーゼ、プロテアーゼおよびエステラーゼ等が使用できる。このようなブタまたはウシ由来の酵素としてはSIGMA プロテアーゼタイプⅠ（牛膵臓由来）、SIGMA アシラーゼⅠ（豚腎臓由来）、SIGMA トリプシン（タイプII）（豚膵臓由来）等が例示できる。

本発明の製造法において上記エステル加水分解酵素を反応に供するに際しては、該酵素が活性を示す限りその使用形態は特に限定されず、精製された酵素はもちろんのこと、酵素を安定化させるため等に加えられる添加剤を含んだ形のまま使用しても構わない。また、上記のようなエステル加水分解酵素生産能を有する微生物を反応に供する場合には、培養して得られる培養液をそのまま、または、培養物から遠心分離等の集菌操作によって得られる菌体もしくはその処理物を用いることができる。菌体外に酵素が産生される場合は遠心分離等の除菌操作した後の培養液をそのまま用いることもできるが、硫安処理等の濃縮精製操作を実施することがより有効である。菌体処理物としてはアセトン、トルエン等で処理した菌体、凍結乾燥菌体、菌体破砕物、菌体を破砕した無細胞抽出物、これらから酵素を抽出した粗酵素液等が挙げられる。さらにこれら酵素あるいは微生物を適当な担体に固定化して用いることができ、これにより反応を行った後に回収再利用することも容易になる。例えば、固定化は架橋したアクリルアミドゲルなどに包括したり、イオン交換樹脂、ケーソー土などの固体担体に物理的、化学的に固定化することができる。

本発明で用いる微生物由来の酵素はそれらを生産する微生物を培養することによって得られるが、微生物の培養は、液体培地でも固体培地でも行うことができる。培地としては、微生物が通常資化しうる炭素源、窒素源、ビタミン、ミネラルなどの成分を適宜配合したものが用いられる。微生物の加水分解能を向上させるため、培地に誘導剤等を少量添加することも可能である。培養は、微生物が生育可能である温度、pHで行われるが、使用する菌株の最適培養条件で行うことが好ましい。微生物の生育を促進させるため、通気撹拌を行う場合もある。

ラセミ体３－キヌクリジノールエステルを光学選択的に加水分解するには、反応溶媒に基質となるラセミ体３－キヌクリジノールエステルを溶解、もしくは懸濁し、触媒となる酵素、微生物、菌体培養液または菌体処理物を加えて反応温度、必要により反応液のpHを制御しながら３－キヌクリジノールエステルの半量程度が加水分解されるまで反応を続ける。場合によっては初期の段階で反応を中止させたり、あるいは過剰に反応させることもある。

反応の基質濃度は0．１～70重量％の間で特に制限はないが、基質となるラセミ

体３－キヌクリジノールエステルの溶解度、生産性などを考慮すると５～50重量％で実施するのが好ましい。基質は、そのままあるいは基質を溶解する有機溶媒に溶解して添加することもできる。

また、前述のように３－キヌクリジノール誘導体の窒素原子の部分は有機酸あるいは鉱酸等の塩を形成させたものであっても構わない。

反応時間は、通常１時間～１週間、好ましくは１～72時間で反応が終了する条件を選択することが好ましい。

反応pHは用いる微生物酵素の至適pHに依存するが、一般的にはpH４～11の範囲で、特に６～9.５で実施すると化学的加水分解反応による光学純度の低下を抑えることができるので好ましい。反応が進行するに従い、生成したカルボン酸により反応液のpHが低下してくるが、この場合は適当な中和剤、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等で最適pHに維持することにより反応の進行が促進される場合が多い。反応温度は５～70℃が好ましいが、10～60℃がより好ましい。

反応溶媒は通常イオン交換水、緩衝液等の水性媒体を使用するが、有機溶媒を含んだ系でも反応させることができる。例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、イソブタノール、ｔｅｒｔ－ブタノール、ｔｅｒｔ－アミルアルコール等のアルコール類、ジエチルエーテル、イソプロピルエーテル、ジオキサン等のエーテル類、アセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン等のケトン類、ヘキサン、オクタン、ベンゼン、トルエン等の芳香属および炭化水素系溶媒等の有機溶媒を適宜使用できる。これら有機溶媒を水に溶解する範囲以上に加え、２相系で反応させることも可能である。

有機溶媒を反応系に存在させることで、選択率、変換率、収率等が促進される場合も多い。

尚、以上のような基質濃度、反応温度、反応溶媒、反応時間、酵素濃度およびその他の反応条件はその条件における反応収率、光学収率などを考慮して目的とする光学特異性化合物が最も多く採取できる条件を適宜選択することが望ましい。

上記の反応により、ラセミ体３－キヌクリジノールエステルから、エステル結合が不斉加水分解された光学活性３－キヌクリジノールと、それと対掌体の関係にある加水分解されていない光学活性３－キヌクリジノールエステル（未反応対

掌体エステル）を含む反応液が得られる。

得られた反応液からの光学活性３－キヌクリジノールまたは光学活性３－キヌクリジノールエステル（未反応対掌体エステル）の単離には、蒸留、抽出、カラム分離、再結晶等の公知の分離方法を用いることができる。

光学活性３－キヌクリジノールエステル（未反応対掌体エステル）は、例えば、触媒として使用した酵素あるいは微生物を遠心分離、ろ過などの操作により除去してから、pHを調整後、ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチルなどの溶剤で抽出することにより得ることができる。

一方、加水分解された光学活性３－キヌクリジノールは、例えば、抽出残液を濃縮あるいはさらにベンゼン、トルエン、アセトン等を溶媒に再結晶させることにより得ることが可能である。

光学活性３－キヌクリジノールとその対掌体エステルを分離するに先立ち、反応溶媒に含まれる有機溶媒の量や種類によっては、蒸留等により反応溶媒の一部または全部を除去してもよく、この後に場合によっては適当な有機溶媒を加えてもよい。

得られた光学活性３－キヌクリジノールエステル（未反応対掌体エステル）は通常の方法で加水分解することにより光学活性を維持したまま３－キヌクリジノールにすることができる。また、光学活性３－キヌクリジノールは通常の方法でエステル化することにより光学活性を保持したまま３－キヌクリジノールエステルにすることができる。従って、任意の立体配置の光学活性３－キヌクリジノール誘導体を取得できる。

これら光学活性３－キヌクリジノール誘導体には３級アミンが存在し、常法によりアミン塩を形成させることができる。

発明を実施するための最良の方法

次に参考例および代表的な実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を何ら制限するものではない。

〔参考例１〕　ラセミ体３－キヌクリジノールエステルの合成

１）３－キヌクリジニルアセテート酢酸塩の合成

10ｇの３－キヌクリジノール（東京化成工業株式会社製）に、8.1ｇの無水酢酸をゆっくりと滴下し、室温で20時間攪拌し３－キヌクリジニルアセテート酢酸塩を合成した。

２）３－キヌクリジニルブチレート酪酸塩の合成

10ｇの３－キヌクリジノールに、12.5ｇの無水酪酸をゆっくりと滴下し、室温で20時間攪拌し３－キヌクリジニルブチレート酪酸塩を合成した。

〔実施例１〕

３－キヌクリジニルブチレート酪酸塩10.0ｇを50mMリン酸緩衝液（pH７）150ml に溶解させ、これにナガセ生化学工業デナチームAP 5.0ｇを加え、0.5N NaOHでpH 7.0にコントロールしながら30℃で反応を開始させた。アルカリがおよそ理論量添加されたところで反応を中止し、ヘキサンを加え、攪拌しながら炭酸ナトリウムを添加して水層のpHをアルカリ側にして分液した。ヘキサン層を濃縮し（R)３－キヌクリジニルブチレート2.5ｇを得た。比旋光度［α］$^{24}_{D}$＝＋34(neat)

得られた（R)３－キヌクリジニルブチレートを水－NaOHで加水分解させた後、トルエンで再結晶し、（R)３－キヌクリジノールを得た。比旋光度［α］$^{24}_{D}$＝－45（1N HCl）

また、得られた（R)３－キヌクリジニルブチレートを５倍容のメタノールに溶解させ、３倍モル等量の濃塩酸を加え、５時間リフラックスさせた。反応液を濃縮乾固し、定量的に（R)３－キヌクリジノール塩酸塩を得た。

一方、酵素反応により加水分解された（S)３－キヌクリジノールについては水および酵素を除去後、同様にトルエンで再結晶させ回収した。比旋光度［α］$^{24}_{D}$＝＋37（1N HCl）

〔実施例２〕

３－キヌクリジニルブチレート酪酸塩を500mM リン酸緩衝液（pH７）に５重量％になるように溶解させ、これに第１表に示す酵素を１～５重量％の範囲で適宜加え、30℃で20時間反応させた。ガスクロマトグラフィー（カラム:CP-Chirasil DEX CB 0.25mm×25M, クロムバック社製）により３－キヌクリジノールの濃度および光学純度を求めた。結果を第１表にまとめて示す。

第１表

3-キヌクリジニルブチレート酪酸塩の不斉加水分解の結果

酵　　素	3-キヌクリジノール濃度	3-キヌクリジノール光学純度
SIGMA Acylase I : Aspergillus melleus	1.0重量%	(s) 体100%ee
SIGMA Protease Type I : Bovine Pancreas	1.1重量%	(s) 体55%ee
SIGMA Protease Type II : Aspergillus oryzae	1.1重量%	(s) 体80%ee
SIGMA Protease (Newlase) Type XVIII : Rhizopus species	0.8重量%	(s) 体100%ee
SIGMA Protease Type XIX : Aspergillus sojae	0.9重量%	(s) 体80%ee
SIGMA Protease Type XXII : Aspergillus oryzae	1.6重量%	(s) 体29%ee
SIGMA Trypsin Type II : Porcine Pancreas	1.5重量%	(s) 体30%ee
Fluka Lipase : Candida antarctica	1.6重量%	(s) 体22%ee
NOVO Flavourzyme MG : Aspergillus oryzae	1.1重量%	(s) 体70%ee

〔実施例３〕

３－キヌクリジニルアセテート酢酸塩を500mM リン酸緩衝液（pH７）に５重量％になるように溶解させ、これに第２表に示す酵素を１～５重量％の範囲で適宜加え、30℃で20時間反応させた。ガスクロマトグラフィー（カラム:CP-Chirasil DEX CB 0.25mm×25M, クロムバック社製）により３－キヌクリジノールの濃度

および光学純度を求めた。結果を第2表にまとめて示す。

第2表

3-キヌクリジニルアセテート酢酸塩の不斉加水分解の結果

酵素	3-キヌクリジノール濃度	3-キヌクリジノール光学純度
天野製薬 リパーゼA6	2.1重量%	(s)体16%ee
天野製薬 リパーゼAP4	1.8重量%	(s)体23%ee
天野製薬 リパーゼAP6	2.5重量%	(s)体13%ee
SIGMA Acylase I : Porcine Kidney	0.9重量%	(s)体75%ee
SIGMA Protease Type II : Aspergillus oryzae	0.5重量%	(s)体100%ee
SIGMA Protease Type XIII : Aspergillus saioti	0.8重量%	(s)体51%ee
SIGMA Protease Type XXIII : Aspergillus oryzae	0.9重量%	(s)体75%ee
ナガセ生化学工業 デナチームAP : Aspergillus oryzae	0.7重量%	(s)体65%ee
ナガセ生化学工業 デナプシン10P : Aspergillus niger	0.7重量%	(s)体50%ee

〔実施例4〕

シュードモナスsp. MR2301株 FERM BP4870を0.1重量%ラクトアミドを含むLB培地（1重量%ポリペプトン、0.5重量%酵母エキス、0.5重量% NaCl）50m

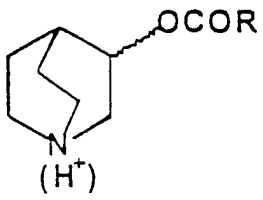
l に植菌し、30℃、48時間振盪培養した。培養終了後、培養液を遠心分離し、得られた菌体の全量をイオン交換水で洗浄したのち、500mM リン酸緩衝液（pH 7.0）50mlに懸濁した。この菌体懸濁液にラセミ体３－キヌクリジニルアセテート酢酸塩2.５ｇを添加し、30℃で20時間反応させた。ガスクロマトグラフィー（カラム:CP-Chirasil DEX CB, クロムバック社製）により反応液を分析したところ、濃度１．３重量％、光学純度（S)体31％eeの３－キヌクリジノールが確認された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、医薬品などの重要な合成中間体である光学活性３－キヌクリジノール誘導体の簡便な製造方法が提供される。

請 求 の 範 囲

1．一般式（Ｉ）：



（Ｉ）

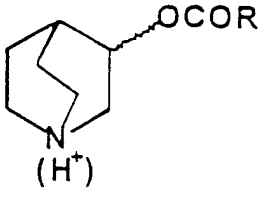
（式中、Ｒは直鎖または分岐の炭素数１から１０のアルキル基を表し、（H^+）は鉱酸あるいは有機酸と塩を形成した状態であっても良いことを表す）で示されるラセミ体３－キヌクリジノールエステルに、アスペルギルス（Aspergillus)属、リゾプス（Rhizopus）属、キャンジダ（Candida)属、またはシュードモナス（Pseudomonas)属に属し、該エステル結合を不斉加水分解する能力を有する微生物菌体、菌体培養液、菌体処理物、または該微生物により生産される酵素を作用させることを特徴とする光学活性３－キヌクリジノールまたはその塩の製造方法。

2．アスペルギルス（Aspergillus)属に属する微生物が、アスペルギルス・オリゼ（Aspergillus oryzae）、アスペルギルス・メレウス（Aspergillus melleus）、アスペルギルス・ソジャエ（Aspergillus sojae)、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger)、またはアスペルギルス・サイトイ（Aspergillus saitoi）である、請求項１記載の方法。

3．キャンジダ（Candida)属に属する微生物が、キャンジダ・アンタルクチカ(Candida antarctica)である、請求項１記載の方法。

4．シュードモナス（Pseudomonas)属に属する微生物が、シュードモナスsp. MR 2301株 FERM BP4870である請求項１記載の方法。

5．一般式（Ｉ）：

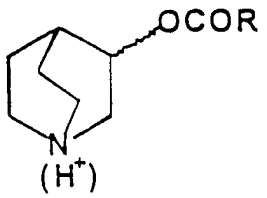


（Ｉ）

（式中、Ｒは直鎖または分岐の炭素数１から１０のアルキル基を表し、（H^+）は鉱酸あるいは有機酸と塩を形成した状態であっても良いことを表す）で示されるラセミ体３－キヌクリジノールエステルに、該エステル結合を不斉加水分解する能力を有するブタまたはウシ由来の酵素を作用させることを特徴とする光学活性３－キヌクリジノールまたはその塩の製造方法。

６．ブタまたはウシ由来の酵素が、プロテアーゼ、アシラーゼまたはトリプシンである、請求項５記載の方法。

７．一般式（Ｉ）：



（Ｉ）

（式中、Ｒは直鎖または分岐の炭素数１から１０のアルキル基を表し、（H^+）は鉱酸あるいは有機酸と塩を形成した状態であっても良いことを表す）で示されるラセミ体３－キヌクリジノールエステルに、アスペルギルス（Aspergillus)属、リゾプス（Rhizopus）属、キャンジダ（Candida)属、またはシュードモナス（Pseudomonas)属に属し、該エステル結合を不斉加水分解する能力を有する微生物菌体、菌体培養液、菌体処理物、または該微生物により生産される酵素を作用させることを特徴とする光学活性３－キヌクリジノールエステルまたはその塩の製造方法。

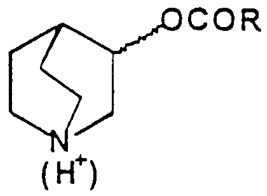
８．アスペルギルス（Aspergillus)属に属する微生物が、アスペルギルス・オリゼ（Aspergillus oryzae）、アスペルギルス・メレウス（Aspergillus melleus）、アスペルギルス・ソジャエ（Aspergillus sojae)、アスペルギルス・ニガー（Aspergillus niger)、またはアスペルギルス・サイトイ（Aspergillus saitoi）である、請求項７記載の方法。

９．キャンジダ（Candida)属に属する微生物が、キャンジダ・アンタルクチカ(Candida antarctica)である、請求項７記載の方法。

10．シュードモナス（Pseudomonas)属に属する微生物が、シュードモナスsp. MR

2301株 FERM BP4870である請求項７記載の方法。

11. 一般式（Ｉ）：



（Ｉ）

（式中、Ｒは直鎖または分岐の炭素数１から１０のアルキル基を表し、（H^+）は鉱酸あるいは有機酸と塩を形成した状態であっても良いことを表す）で示されるラセミ体３－キヌクリジノールエステルに、該エステル結合を不斉加水分解する能力を有するウシまたはブタ由来の酵素を作用させることを特徴とする光学活性３－キヌクリジノールエステルまたはその塩の製造方法。

12. ウシまたはブタ由来の酵素が、プロテアーゼ、アシラーゼまたはトリプシンである、請求項11記載の方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP97/04009

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int. Cl^6 C12P41/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int. Cl^6 C12P41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY(STN), CA(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Arch. Pharm., Vol. 315, No. 7, (1982), G. Lambrecht; "Struktur-und Konformations-Wirkungs-Beziehungen heterocyclischer Acetylcholonanaloga, 14. Mitt.", p. 646-651	1 - 12
A	Life Sciences, Vol. 21, No. 9, (1977), M. Rehavi et al.; "Enzymatic resolution and cholinergic properties of (±)3-quinuclidinol derivatives", p. 1293-1302	1 - 12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
January 20, 1998 (20. 01. 98)	February 3, 1998 (03. 02. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９７／０４００９

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl^{6}　Ｃ１２Ｐ４１／００

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl^{6}　Ｃ１２Ｐ４１／００

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

ＲＥＧＩＳＴＲＹ(ＳＴＮ),ＣＡ(ＳＴＮ)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
A	Arch. Pharm., Vol. 315, No. 7, (1982), G. Lambrecht; "Struktur-und Konformations-Wirkungs-Beziehungen heterocyclischer Acetylcholonanaloga, 14. Mitt.", p. 646-651	1－12
A	Life Sciences, Vol. 21, No. 9, (1977), M. Rehavi et al.; "Enzymatic resolution and cholinergic properties of (±)3-quinuclidinol derivatives", p. 1293-1302	1－12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２０．０１．９８	03.02.98

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	植野　浩志　印	４Ｂ	９４５２
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４９		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９２年７月）