

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號： 96142555

C12P<sup>23/00</sup> (2006.01)

※申請日期： 96.11.09

※IPC 分類： ~~C07C; C12N~~

A61K<sup>3/122</sup> (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

製備(4S)-3,4-二羥基-2,6,6-三甲基環己-2-烯酮及其衍生物之方法

METHOD FOR PREPARING (4S)-3,4-DIHYDROXY-2,6,6-TRIMETHYLCYCLOHEX-2-ENONE AND DERIVATIVES THEREOF

## 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

德商巴地斯顏料化工廠

BASF AKTIENGESELLSCHAFT

代表人：(中文/英文)

1. 希奈克

CIMNIAK

2. 瓦隆

WALLON

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國勞域沙芬市

67056 LUDWIGSHAFEN, GERMANY

國籍：(中文/英文)

德國 GERMANY

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 邁可 布魯爾  
BREUER, MICHAEL
2. 漢斯喬齊 恩斯特  
ERNST, HANSGEORG
3. 本那德 霍爾  
HAUER, BERNHARD

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY
2. 德國 GERMANY
3. 德國 GERMANY

#### 四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2006年11月10日；06123814.3

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

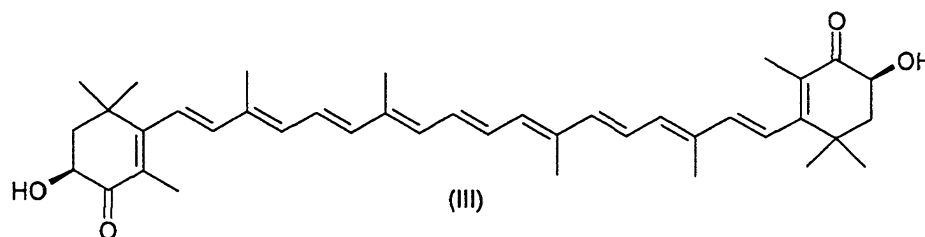
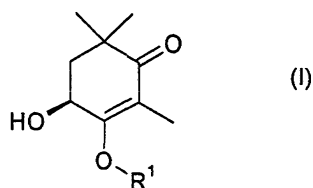
不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於製備式(I)之光學活性(4S)-4-羥基-2,6,6-三甲基環己-2-烯-1-酮衍生物之方法及製備式(III)之(3S,3'S)-蝦紅素之方法，後者方法包含首先提及之方法。



### 【先前技術】

由於蝦紅素(3,3'-二羥基-β,β'-胡蘿蔔素-4,4'-二酮)在位置3及3'存在兩個對掌性中心，因此其可以如下構型異構體形式存在：(3S,3'S)、(3R,3'R)、(3S,3'R)及(3R,3'S)。最後提及之兩種構型異構體相同且表示內消旋體(Carotenoids Handbook, 2004, Main List第405號)。

所有三種形式均可見於天然來源中(Carotenoids Handbook, 2004, Main List第404號、第405號、第406號)。以外消旋前驅體起始之總化學合成產生(3S,3'S)-蝦紅素、內消旋-蝦紅素及(3R,3'R)-蝦紅素之1:2:1混合物(The EFSA Journal, 2005, 291, 12, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 2004, 100, 437, Helvetica Chimica Acta, 1981, 64, 2436)。

然而，(3S,3'S)構型異構體尤其重要。其由綠藻(雨生紅球藻(*Haematococcus pluvialis*))以對映純形式生物合成(*J. Applied Phycology*, 1992, 4, 165; *Phytochemistry*, 1981, 20, 2561)。

將來自綠藻之(S,S)-蝦紅素用作膳食增補劑對於人類健康具有有益作用(*J. Nat. Prod.*, 2006, 69, 443)。其另外適合於完全阻斷羅非考昔(rofecoxib; Vioxx)之有害促氧化效應(*J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2006, 47增刊1, S. 7)。

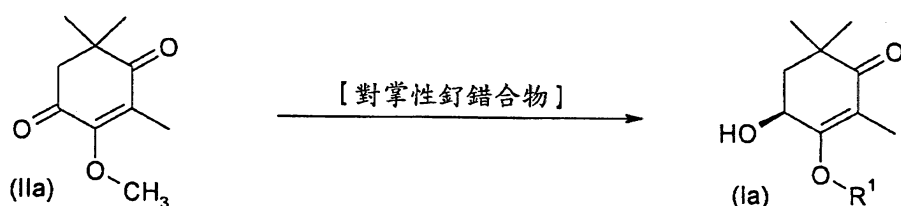
然而，鑒於綠藻中(S,S)-蝦紅素之低濃度(*J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 3371)，該活性物質之可用性極其有限。此外，該活性物質係以單脂肪酸酯與二脂肪酸酯加游離蝦紅素之混合物存在於海藻中，導致分離及純化相當複雜(尤其參見*Phytochemistry*, 20, 11, 2561 (1981); *J. Applied Phycology*, 4, 2, 165 (1992))。為能夠以較大量及高純度提供(S,S)-蝦紅素，選用總化學合成技術。

(S,S)-蝦紅素之各種合成法已描述於文獻中。一種策略係由以下組成：使用非對映異構體鹽(*Helvetica Chimica Acta*, 1981, 64, 2447)或非對映異構體酯(*Helvetica Chimica Acta*, 1981, 64, 2419)將外消旋前驅體拆分成光學對映體。亦已報導外消旋前驅體之微生物外消旋體拆分。該等方法之特定缺陷在於將生成(R,R)-蝦紅素之對映異構體無法利用且僅可用極為複雜之技術使其再循環。

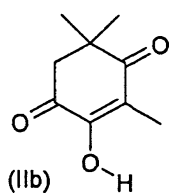
另一種合成策略係由以下組成：藉由微生物或酶促方法獲得對映純之合成基本組份(*Helvetica Chimica Acta*, 1978,

61, 2609, Helvetica Chimica Acta, 1981, 64, 2405)。由於該等基本組份之氧化態過低，因此必需以多階段合成將其轉化為(S,S)-蝦紅素前驅體。

WO 2006/039685 首次在流程 II 中描述酮基異佛爾酮(ketoisophorone)之兩階段對映選擇性氫化以得到對映純 C9 二醇，基於 Helv. Chim. Acta, 1978, 61, 2609 中所述之方法，在將對映純 C9 二醇之羥基再氧化後，以多階段合成法自其獲得(S,S)-蝦紅素前驅體。WO 2006/039685 進一步描述式(IIa)之 C9 烯醇醚之對映選擇性催化轉移氫化作用以得到式(Ia)之相應對映純醇。



所述氫化催化劑為具有對掌性配位體之金屬，較佳為具有光學活性胺作為配位體之鈦催化劑。此方法之一種缺陷在於使用式(IIb)之工業級中間物的經 O 保護衍生物，



因此需要額外之合成研究。此外，所需光學活性催化劑成本極高，以致其在工業方法中之使用因經濟方面之考量而受阻。

亦已描述用酵母生物催化還原式(IIb)之 C<sub>9</sub> 烯醇。然而，

在此情況下，獲得僅65%之對映異構體超量，導致此方法無濟於工業方法(Helv.Chim.Acta, 1981, 64, 2447)。

原則上已知脫氫酶適用作製備光學活性羥基化合物之生物催化劑。其為具有優良特徵之生物催化劑，已用於許多工業方法中(Angew. Chem. Int. 編, 2004, 43, 788, Tetrahedron, 2004, 60, 633, Chiral catalysis-asymmetric hydrogenation supplement to Chemistry Today, 2004, 22, 26, Current Opinion in Chemical Biology, 2004, 8, 120, Organic Process Research & Development, 2002, 6, 558, Tetrahedron: Asymmetry, 2003, 14, 2659, Chiral catalysis-asymmetric hydrogenation supplement to Chemistry Today, 2004, 22, 43)。

WO 2005/108590描述一種藉由酶促還原相應酮來製備某些光學活性烷醇之方法，該等烷醇諸如(1S)-3-甲基胺基-1-(2-噻吩基)丙-1-醇或(1S)-3-氯-1-(2-噻吩基)丙-1-醇。所用酶可用於還原具有不同結構之酮的程度未作論述。

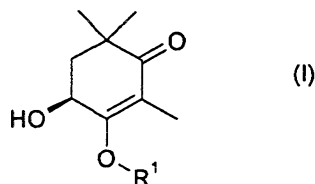
所述將兩個對掌性中心引入用於合成S,S'-蝦紅素之前驅體中之一者的方法為複雜且多階段的任務或不經濟的任務，以致該等方法似乎幾乎不適於以工業規模實施。

### 【發明內容】

本發明之一目標為研發一種以工業上可利用之起始物質起始製備用於合成(S,S')-蝦紅素之光學活性中間物(若可能，對映純形式)的簡單而經濟有效之方法，該方法可毫不困難地整合至"外消旋"蝦紅素之現有工業總合成法中

(Carotenoids 第 2 卷，1996, 259; Pure and Applied Chemistry, 2002, 74, 2213)。

該目標可藉由一種製備式 (I) 之光學活性 (4S)-4-羥基-2,6,6-三甲基環己-2-烯-1-酮衍生物之方法達成：

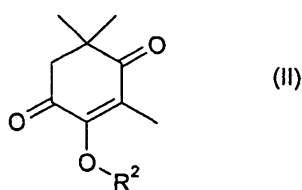


其中：

$R^1$  為氫、 $C_1-C_{10}$  烷基、 $C_7-C_{14}$  芳基烷基、鹼金屬  $M^1$  或鹼土金屬片段  $M^2_{1/2}$  或  $(M^2)^+X^-$ ，其中  $M^1$  為 Li、Na、K、Rb 或 Cs 且  $M^2$  為 Mg、Ca、Sr 或 Ba 且  $X^-$  為單價陰離子；

該方法包含以下反應步驟：

其中在還原等效物之存在下，將選自氧化還原酶類別之酶 (E) 培育於包含式 (II) 之三甲基環己-2-烯-1,4-二酮衍生物之培養基中：



其中  $R^2$  與  $R^1$  相同或不同且為氫、 $C_1-C_{10}$  烷基、 $C_7-C_{14}$  芳基烷基、鹼金屬  $M^1$  或鹼土金屬片段  $M^2_{1/2}$  或  $(M^2)^+X^-$ ，其中  $M^1$  為 Li、Na、K、Rb 或 Cs 且  $M^2$  為 Mg、Ca、Sr 或 Ba，且  $X^-$  為單價陰離子；

其中式 (II) 化合物經酶促還原為式 (I) 化合物，且反應過程期間所消耗之還原等效物又藉由藉助於酶 (E) 或另一種酶

(E<sup>2</sup>)使還原劑(RM)轉化為相應氧化產物(OP)而再生，且視情況將該氧化產物(OP)至少部分地自反應培養基或自反應平衡中移除，且分離所形成之產物(I)。

本發明之方法為製備式(I)化合物，其中R<sup>1</sup>為氫、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基(諸如甲基、乙基、正丙基、異丙基或正己基)、C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub>芳基烷基(諸如苄基)、鹼金屬M<sup>1</sup>或鹼土金屬片段M<sup>2</sup><sub>1/2</sub>或(M<sup>2</sup>)<sup>+</sup>X<sup>-</sup>，其中M<sup>1</sup>為Li、Na、K、Rb或Cs，較佳為Na或K、尤其為Na，且M<sup>2</sup>為Mg、Ca、Sr或Ba，尤其為Mg，且X<sup>-</sup>為單價陰離子，諸如鹵離子、乙酸根或磷酸二氫根。R<sup>1</sup>較佳為氫、甲基、Na或K，尤其較佳為氫、甲基或Na，尤其為氫或鈉。

在本發明之方法中反應之式(II)起始化合物中，基團R<sup>2</sup>與R<sup>1</sup>相同或不同且為氫、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基(諸如甲基、乙基、正丙基、異丙基或正己基)、C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub>芳基烷基(諸如苄基)、鹼金屬M<sup>1</sup>或鹼土金屬片段M<sup>2</sup><sub>1/2</sub>或(M<sup>2</sup>)<sup>+</sup>X<sup>-</sup>，其中M<sup>1</sup>為Li、Na、K、Rb或Cs，較佳為Na或K，尤其為Na，且M<sup>2</sup>為Mg、Ca、Sr或Ba，尤其為Mg，且X<sup>-</sup>為單價陰離子，諸如鹵離子、乙酸根或磷酸二氫根。R<sup>1</sup>較佳為氫、甲基、Na或K，尤其較佳為氫、甲基或Na，尤其為氫或鈉。

氧化還原酶類別之酶(E)(尤其意謂具有脫氫酶活性、適用於本發明之酶)尤其為醛酮還原酶超家族中之醛酮還原酶家族中之酶(K.M.Bohren, B.Bullock, B.Wermuth及K.H.Gabbay J.Biol. Chem. 1989, 264, 9547-9551)及短鏈醇脫氫酶/還原酶(SDR)之酶。後者酶群組例如詳述於

H.Jörnvall, B.Persson, M. Krook, S.Atrian, R.Gonzalez-Duarte, J.Jeffery及D.Ghosh, *Biochemistry*, 1995, 34, 第6003-6013頁, 或 U.Oppermann, C.Filling, M.Hult, N.Shafqat, X.Q.Wu, M.Lindh, J.Shafqat, E.Nordling, Y.Kallberg, B.Persson及H.Jornvall, *Chemico-Biological Interactions*, 2003, 143, 第247-253頁。

在所提及之該等酶類別中, 醇脫氫酶(尤其短鏈醇脫氫酶)尤其適用。醇脫氫酶中較佳之酶尤其為以NADH或NADPH作為還原等效物將式(II)化合物還原為式(I)化合物之彼等酶。

本發明方法之尤其合適實施例由具有多肽序列之酶(E)組成, 該多肽序列:

- (i) 為SEQ ID NO: 2; 或
- (ii) 其中與SEQ ID NO: 2相比, 至多25%之胺基酸殘基因缺失、插入、取代或其組合而改變, 且仍具有SEQ ID NO: 2之至少50%的酶活性。

具有氧化還原酶活性(尤其脫氫酶活性)之包含如SEQ ID NO: 2中所示之胺基酸序列的合適酶(E)以及特定揭示之具有氧化還原酶活性(尤其脫氫酶活性)之同樣可用於本發明方法中之酶(E)的"功能等效物"或類似物詳述於WO 2005/108590第11至16頁中, 該專利以引用的方式併入本文中。

適用於本發明方法中之具有氧化還原酶活性(尤其脫氫酶活性)之酶(E)可由以下各屬之微生物來製備: 固氮弧菌

屬 (*Azoarcus*)、紅環菌屬 (*Azonexus*、*Azospira*、*Azovibrio*)、脫氯單胞菌屬 (*Dechloromonas*)、鐵桿菌屬 (*Ferribacterium*)、嗜氫菌屬 (*Petrobacter*)、丙酸桿菌屬 (*Propionivibrio*)、四瓣藻屬 (*Quadricoccus*)、紅環菌屬 (*Rhodocyclus*)、史特拉桿菌屬 (*Sterolibacterium*)、陶厄氏菌屬 (*Thauera*)及動膠菌屬 (*Zoogloea*)。

尤其適佳用於本發明方法中之具有氧化還原酶活性(尤其脫氫酶活性)的酶(E)係選自來自固氮弧菌屬之微生物(尤其來自固氮弧菌屬細菌EbN1)之酶。

依據其胺基酸序列，短鏈醇脫氫酶/還原酶(SDR)可包括獲自固氮弧菌屬EbN1之苯基乙醇脫氫酶。該等酶之群組詳述於例如 H.Jörnvall, B.Persson, M.Krook, S.Atrian, R.Gonzalez-Duarte, J.Jeffery及D.Ghosh之 "Biochemistry" , 1995, 34 , 第 6003-6013 頁或 U.Oppermann, C.Filling, M.Hult, N.Shafqat, X.Q.Wu, M.Lindh, J.Shafqat, E.Nordling, Y.Kallberg, B.Persson及H.Jornvall之 "Chemico-Biological Interactions" , 2003, 143 , 第 247-253 頁中。SDR群組中之個別代表的胺基酸序列彼此間可廣泛不同。儘管如此，仍已知SDR群組中高度保留某些胺基酸或胺基酸區域。SDR之重要保留區域描述於 C.Filling, K.D.Berndt, J.Benach, S.Knapp, T.Prozorovski, E.Nordling, R.Ladenstein, H.Jornvall 及 U.Oppermann, Journal of Biological Chemistry, 2002, 277 , 第 25677-25684 頁中。

固氮弧菌屬物種之實例為厭氧固氮弧菌 (*Azoarcus*

*anaerobius*)、*Azoarcus buckelii*、*Azoarcus communis*、*Azoarcus evansii*、*Azoarcus indigens*、*Azoarcus toluclasticus*、*Azoarcus tolulyticus*、*Azoarcus toluvořans*、固氮弧菌屬、固氮弧菌屬 22Lin、固氮弧菌屬 BH72、固氮弧菌屬 CC-11、固氮弧菌屬 CIB、固氮弧菌屬 CR23、固氮弧菌屬 EB1、固氮弧菌屬 EbN1、固氮弧菌屬 FL05、固氮弧菌屬 HA、固氮弧菌屬 HxN1、固氮弧菌屬 mXyN1、固氮弧菌屬 PbN1、固氮弧菌屬 PH002、固氮弧菌屬 T 及固氮弧菌屬 ToN1。

以獲自固氮弧菌屬細菌 EbN1 之脫氫酶尤其適佳用作本發明方法中之酶(E)。

本發明之方法較佳在酶(E)(其中該酶係由如 SEQ ID NO: 1 中所示之核酸序列或其功能等效物編碼)之存在下進行。

可用於編碼可用於本發明方法中之具有脫氫酶活性之酶(E)的核酸序列詳述於 WO 2005/108590 中第 16 至 22 頁中，該專利以引用的方式併入本文中。

在該方法之一尤其較佳實施例中，該具有脫氫酶活性之酶係選自包含如 SEQ ID NO: 2 中所示之胺基酸序列或自其衍生之序列的酶，其中至多 25%、較佳至多 20%、尤其較佳至多 15%、尤其至多 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1% 之胺基酸殘基已因缺失、取代、插入或缺失、取代與插入之組合而改變，其中與 SEQ ID NO: 2 相比已改變之多肽序列仍具有 SEQ ID NO: 2 之至少 50%、較佳至少 65%、尤其較佳 80%、尤其 90% 以上的酶活性。就

此而言，SEQ ID NO:2之酶活性旨在意謂使式(II)之酮、尤其其中 $R^1=H$ 或 $Na$ 的式(II)之酮對映選擇性地還原為具有通式(I)之(S)醇的能力。

本發明之方法經由添加還原等效物、尤其NADH或NADPH作為氫化物來源而進行。由於NADH及NADPH為極其昂貴之化合物，因此該等還原等效物一般僅以催化量使用。原則上可用於使反應中所消耗之還原等效物再生的還原劑(RM)為無機或有機化合物(諸如亞磷酸鹽或醇)，或為電化學方法，諸如在陰極處還原。較佳用於本發明方法中之還原劑(RM)為包含至少一個一級醇或二級醇官能性 $CH(OH)$ 之有機化合物，諸如異丙醇、2-丁醇、2-戊醇、2-己醇、3-己醇或還原糖，諸如葡萄糖，尤其為異丙醇或葡萄糖。還原劑(RM)藉助於酶(E)或另一種酶( $E^2$ )而轉化為氧化產物(OP)，該氧化產物(OP)係經至少部分地自反應培養基或自反應平衡中移除。若還原劑(RM)包含二級醇，則其亦常稱為犧牲醇且相應地形成作為犧牲酮之氧化產物(OP)。

在本發明之一較佳實施例中，所添加之犧牲醇不僅用於使所消耗之還原等效物再生，而且用作共溶劑。可能在液體單相、兩相或多相系統中進行操作，單相通常由水及/或水可混溶性溶劑組成。

以所用每莫耳式(II)之三甲基環己-2-烯-1,4-二酮衍生物計，較佳以0.001至100 mmol、尤其較佳以0.01至1 mmol還原等效物之量使用還原等效物。

本發明之方法中所形成之氧化產物(OP)可至少部分地自反應培養基或自反應平衡中移除。在二級醇(諸如異丙醇)作為還原劑(RM)之情況下，可能將所形成之所謂犧牲酮(在異丙醇作為犧牲醇之情況下為丙酮)以各種方式(例如經由選擇性膜或藉由萃取或蒸餾方法)移除。較佳採用蒸餾法來移除酮，諸如丙酮。在藉由蒸餾移除酮中，通常亦存在移除部分犧牲醇，且在有些情況下，亦存在移除部分水相。該等蒸餾損耗一般藉由隨後計量補充犧牲醇及(若適當)水來補償。蒸餾速率以反應體積計通常在0.02 %/min至2 %/min之範圍內，較佳在0.05 %/min至1 %/min之範圍內。反應器之夾套溫度在反應內部溫度以上5-70克耳文(kelvin)之間，較佳10-40克耳文之間。

在不揮發性氧化產物(OP)之情況下，如在將葡萄糖氧化為葡萄糖酸之情況下，後者藉由環化為葡萄糖酸內酯而自還原劑(RM)與氧化劑(OM)之間的反應平衡中移除。儘管可能藉由亦催化式(II)化合物還原為式(I)化合物之相同酶(E)進行多種犧牲醇之氧化作用，但仍必需添加二級酶(E<sup>2</sup>)(例如葡萄糖脫氫酶)用以葡萄糖之氧化作用。

在揮發性氧化產物之情況下，蒸餾在1-500毫巴(mbar)、較佳10-200毫巴之壓力範圍下進行尤其適宜。

本發明方法之一較佳實施例為在微生物之存在下進行式(II)化合物轉化為式(I)化合物，該微生物係選自以下菌科：腸桿菌科(Enterobacteriaceae)、假單胞菌科(Pseudomonadaceae)、根瘤菌科(Rhizobiaceae)、乳桿菌科

(Lactobacillaceae)、鏈黴菌科(Streptomycetaceae)、紅球菌科(Rhodococcaceae)、紅環菌科(Rhodocyclaceae)及諾卡氏菌科(Nocardiaceae)。該微生物尤其可為經核酸構築體轉移之重組微生物，該核酸構築體編碼具有氧化還原酶活性、較佳脫氫酶活性、尤其如上定義之醇脫氫酶活性的酶。

在調控核酸序列之遺傳控制下包含編碼可用於本發明方法中之蛋白(亦即酶(E))之核酸序列的表現構築體及包含該等表現構築體中之至少一者的相應載體詳述於WO 2005/108590第22至25頁中，該專利以引用的方式併入本文中。

經合適載體或構築體轉化且可用於產生可用於本發明方法中之多肽(亦即酶(E))的重組微生物詳述於WO 2005/108590第25至27頁，該專利以引用的方式併入本文中。

與本發明方法中之酶(E)功能一致之多肽或其具有生物學活性之功能片段的重組製備方法(其中培養產生多肽之微生物，若適當誘導多肽之表現且將其自培養物中分離)詳述於WO 2005/108590第27至29頁中，該專利以引用的方式併入本文中。多肽亦可藉由所述方法以工業規模生產。

根據本發明使用之具有氧化還原酶活性、尤其脫氫酶活性的酶(E)可作為游離酶或固定化酶(E)而用於本發明之方法中。

本發明方法之較佳實施例包含下述步驟中之至少a)、b)

及 d)：

- a) 自天然來源中分離或重組產生可產生具有脫氫酶活性之酶的微生物；
- b) 繁殖該微生物；
- c) 若適當自微生物中分離具有脫氫酶活性之酶，或製備包含該酶之蛋白溶離份；及
- d) 將來自階段 b) 之微生物或來自階段 c) 之酶轉移至包含式 I 化合物之培養基中。

本發明之方法有利地在 0°C 與 95°C 之間，較佳在 10°C 與 85°C 之間，尤其較佳在 15°C 與 75°C 之間的溫度下進行。

本發明方法中之 pH 值有利地保持在 pH 4 與 pH 12 之間，較佳保持在 pH 4.5 與 pH 9 之間，尤其較佳保持在 pH 5 與 pH 8 之間。

在本發明之方法中，對映純或對掌性產物或光學活性醇意謂展示對映異構體富集之對映異構體。本發明之方法較佳達成至少 70% 對映異構體超量 (ee)、較佳最少 80% 對映異構體超量、尤其較佳最少 90% 對映異構體超量、極其較佳最少 98% 對映異構體超量之對映純度。

本發明之方法可能使用包含合適核酸、核酸構築體或載體之生長中之細胞。亦可使用休眠細胞或瓦解之細胞。瓦解之細胞意謂例如因經例如溶劑處理而變成可通透之細胞或因酶處理、機械處理(例如 French Press 或超音波)或另一方法處理而破裂之細胞。以此方式所獲得之粗萃取物有利地適用於本發明之方法。經純化或經部分純化之酶(E)亦

可用於該方法。可有利地用於該反應之固定化微生物或酶同樣合適。

若本發明之方法使用游離生物體或酶，則其在萃取之前宜例如藉由過濾或離心而移除。

以本發明方法所製備之式(I)化合物(例如(3S)-3,4-二羥基-2,6,6-三甲基環己-2-烯酮)可有利地藉由萃取或沈澱而自反應水溶液中分離。初始時有利地將產物溶液過濾以移除不溶解之生物物質，較佳經由添加諸如寅氏鹽(Celite)之助濾劑。隨後將產物(其中 $R_1$ =烷基)藉由經不可與水混溶之有機溶劑萃取而移除。合適溶劑之實例為甲苯或其他環烴或開鏈烴、氯化烴(諸如二氯甲烷)、乙酸乙酯或乙酸丁酯及醚(諸如MTBE或二異丙醚)。

式I化合物(其中 $R^1$ =H或鹼金屬或鹼土金屬)原則上可如Helv.Chim.Acta 64, 2436, 1981中所述自反應混合物中分離。初始時將產物溶液調整為1至3之pH值，較佳為pH 1。較佳以諸如鹽酸或硫酸之無機酸進行酸化，尤其較佳以硫酸進行酸化。在此情況下，可移除產物沈澱物。然而，酸性產物溶液較佳經有機溶劑萃取數次。適用於此之溶劑為氯化烴(尤其為二氯甲烷)、醚(諸如MTBE或二異丙醚)及乙酸乙酯。此萃取可分批進行或連續進行。產物萃取可藉由在酸化之前濃縮水相或藉由“鹽析”來促進；然而該等操作對於自反應溶液中移除產物而言並非必需的。

以用於該反應之式(II)之受質(諸如，其中 $R^2$ =Na)計，在該等處理方法中可能以60%至>95%之產率、較佳80%至

95%之產率分離本發明方法之式(I)產物。該產物具有>98%之對映異構體超量的高對映純度。若需要，則可如Helv. Chim. Acta 64, 2436, 1981中所揭示藉由結晶來純化，但較佳如Helv. Chim. Acta 64, 2447, 1981中所揭示無需進一步純化操作即用於S,S-蝦紅素之進一步合成。

本發明之方法可分批操作、半分批操作或連續操作。

可如Biotechnology第3卷，第2版，Rehm等人編，(1993)，尤其第II章中所述，有利地在生物反應器中進行本發明之方法。

本發明進一步係關於製備式(III)之(3S,3'S)-蝦紅素之方法，該方法包含上述製備式(I)之光學活性(4S)-4-羥基-2,6,6-三甲基環己-2-烯-1-酮衍生物作為(3S,3'S)-蝦紅素之總合成中之一個反應步驟的方法。製備式(II)之起始化合物之合成步驟與藉由複數個階段將式(I)之對映純化合物轉化為式(III)之(3S,3'S)-蝦紅素之合成步驟原則上由文獻中已知。式(I)之光學純化合物(其中R<sup>1</sup>為氫且藉由(R<sup>2</sup>)之對映選擇性還原作用(其中R<sup>2</sup>較佳為Na)所獲得)轉化為(3S,3'S)-蝦紅素可如文獻(WO 2006/039685; Helv.Chim.Acta, 1981, 64, 2447; 如上, 1981,64,2405)中之各種描述發生，而不發生外消旋作用。

該等方法對應於工業蝦紅素之合成(Carotenoids, 第2卷, 1996, 259; Pure and Appl. Chem., 2002, 74, 2213)且提供工業上及經濟上有利之(3S,3'S)-蝦紅素合成途徑。

本發明亦係關於具有多肽序列之酶(E)用於製備式(I)化

合物之用途，該多肽序列：

- (i) 為 SEQ ID NO: 2；或
- (ii) 其中與 SEQ ID NO: 2 相比，至多 25% 之胺基酸殘基因缺失、插入、取代或其組合而改變，且仍具有 SEQ ID NO: 2 之至少 50% 的酶活性。上述酶較佳在用於製備 (3S,3'S)-蝦紅素之方法中用於製備式 (I) 化合物，其中式 (I) 化合物係在其他反應步驟中轉化為式 (III) 之 (3S,3'S)-蝦紅素。

本發明方法之優勢在於式 (I) 化合物係在該等化合物之優良產率下以高對映純度獲得。

### 【實施方式】

本發明藉由以下實例闡明，但該等實例不限制本發明。

實例

定義：

化合物 1：2-羥基-3,5,5-三甲基環己-2-烯-1,4-二酮(其中 R<sup>2</sup> 等於氫之式 (II))

化合物 1a：3,5,5-三甲基-1,4-二側氧基環己-2-烯-2-醇鈉(其中 R<sup>2</sup> 等於鈉之式 (II))

化合物 1b：2-甲氧基-3,5,5-三甲基環己-2-烯-1,4-二酮(其中 R<sup>2</sup> 等於甲基之式 (II))

化合物 2：(4S)-3,4-二羥基-2,6,6-三甲基環己-2-烯酮(其中 R<sup>1</sup> 等於氫之式 (I))

化合物 2b：(4S)-4-羥基-3-甲氧基-2,6,6-三甲基環己-2-烯酮(其中 R<sup>1</sup> 等於甲基之式 (I))

**實例 1： 製備重組苯基乙醇脫氫酶**

在 100 ml 艾倫美氏燒瓶 (Erlenmeyer flasks) (隔板) 中，在 37°C 下將如 WO 2005/108590 實例 1 及 2 中所述製備之大腸桿菌 LU11558 於 20 ml 之 LB-Amp/Spec/Cm (100 µg/l 安比西林 (ampicillin)、100 µg/l 大觀黴素 (spectinomycin)、20 µg /l 氯黴素 (chloramphenicol))、0.1 mM 之 IPTG、0.5 g/L 之鼠李糖 (rhamnose) 中培養 18 小時，以 5000 g/10 min 離心，用 10 mM TRIS \* HCl (pH 7.0) 洗滌一次，且再懸浮於 2 ml 相同緩衝液中。

藉由在振動研磨機 (3×5 min，中間物於冰上冷卻) 中用 0.7 ml 玻璃珠粒 (d=0.5 mm) 將大腸桿菌 LU11558 細胞糊狀物磨碎來製備無細胞粗蛋白萃取物。

**實例 2： 測定獲自大腸桿菌 LU11558 之重組脫氫酶之活性**

伴隨震盪將 10 µl 無細胞粗萃取物 (實例 1；約 10 mg/ml 蛋白總量) 培育於 770 µl 之 50 mM 磷酸鉀緩衝劑 (具有 1 mM MgCl<sub>2</sub>，pH 6.5)、100 µl 異丙醇、100 µl 之 NADH 溶液 (0.5 M) 及 20 µl 之化合物 1 (1 M，於 DMSO 中) 之混合物中。類似於實例 3 分析混合物。形成平均 0.13 mM 之 3,4-二羥基-2,6,6-三甲基環己-2-烯酮。在培養液中未添加鼠李糖之對照實驗中，不可偵測到轉化。

**實例 3： 分析化合物 1 及化合物 2**

可藉由 HPLC 來測定前驅體濃度及產物濃度。除濃度之外，視固定相及移動相之選擇而定，亦可能測定對映異構體超量。

固定相： Chiralpak AS-RH， 150\*4.6 mm， Daicel， 已在  
40°C 下平衡

移動相： 溶離劑 A： 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

溶離劑 B： CH<sub>3</sub>CN

梯度： 時間 [min] A [%] B [%] 流動速率 [mL/min]

0 90 10 0.5

10 90 10 0.5

11 60 40 0.5

20 60 40 0.5

流速： 0.5 ml/min

偵測： 於 260 nm 下之 UV 偵測

滯留時間：

(+)-3,4-二羥基-2,6,6-三甲基環己-2-烯酮： 約 9.3  
min

(-)-3,4-二羥基-2,6,6-三甲基環己-2-烯酮： 約 9.8  
min

2-羥基-3,5,5-三甲基環己-2-烯-1,4-二酮： 約 17.6  
min

經由可信物質建構校準系列，以容許測定未知樣本之濃  
度，且使得可能分配對映異構體。

實例 4：製備用於輔因子再生之葡萄糖脫氫酶

葡萄糖脫氫酶可用於輔因子再生。該酶可獲自商業來源  
(例如 Jülich Fine Chemicals，訂購號第 22.10 號或第 19.10  
號)或獲自內部來源。後者包含大腸桿菌 XL10 Gold 純系，

該純系在質體 pUC19(此構築體稱為大腸桿菌 LU11293)中  
包含來自枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*)(Genbank 寄存編號  
M12276)之葡萄糖脫氫酶基因。

配製以下培養基用於大腸桿菌 LU11293之醱酵：

560 g	酵母萃取物(65%)
448 g	胰化蛋白胨(Difco)
42 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
84 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
644 g	甘油(99%)
100 mL	SL4溶液(5 x)
1 g	Tegosipon 3062

用水將培養基配至 13.5l，將 pH 值調整至  
7.0，移除約 300 ml 用於預培養物，且接著在  
122°C 下滅菌歷時 30 min。

添加無菌鹽溶液\*

*鹽溶液：	2.1 g	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O
	3.5 g	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O
	14 g	NH <sub>4</sub> Cl
	14 ml	安比西林溶液(100 mg/ml)

溶解於 500 ml 水中且藉由過濾滅菌。

將 150 ml 部分培養基在兩個 1 l 艾倫美氏燒瓶中滅菌且補  
充 5 ml 無菌鹽溶液。自 LB-安比西林瓊脂板接種後，將預  
培養物在 37°C 及 200 rpm 下培育 12 小時，且添加至醱酵培  
養基中。在 37°C、0.1 巴內部壓力、pH 7.0(用 20% 磷酸及

25% NaOH控制)下，以7.5 l/min之氣化速率及300 rpm(以10-20 l/min供風及500-1500 rpm將 $pO_2$ 控制在20%與50%之間)開始醱酵。2 h之後，添加0.1 mM IPTG用於誘導，且總計13 h之後，醱酵終止。收穫細胞(1.3 kg)並洗滌且接著在 $-20^{\circ}C$ 下儲存直至使用(2-20 g/l，於混合物中)。

#### 實例5： 輔因子再生

輔因子之再生亦可藉由苯基乙醇脫氫酶來進行。在此情況下，不必要添加單獨之再生酶。苯基乙醇脫氫酶接受多種簡單醇作為還原劑。其經氧化為相應羰基化合物。適合於以苯基乙醇脫氫酶再生NADH之簡單醇為異丙醇。若在反應混合物中使用10%之異丙醇而非葡萄糖脫氫酶及葡萄糖，則可如實例2中所示測定苯基乙醇脫氫酶之活性。

實例6： 使用獲自固氮弧菌屬EbN1之重組苯基乙醇脫氫酶製備(4S)-3,4-二羥基-2,6,6-三甲基環己-2-烯酮(化合物2)

如實例1中，將大腸桿菌LU11558培養、收穫且轉化為無細胞粗萃取物。將該萃取物與0.2 mM  $NAD^+$ 及5.4 ml之1.68 M 3,5,5-三甲基-1,4-二側氧基環己-2-烯-2-醇鈉溶液(化合物1a)混合且在 $30^{\circ}C$ 下培育48 h。

獲自LU11558之無細胞粗萃取物( $\approx 250$  mg蛋白總量)

19.8 g 葡萄糖

0.072 g  $NAD$ ，Na鹽

GDH粗萃取物( $\approx 180$  mg蛋白總量)

450 ml 緩衝溶液(50 mM磷酸鉀、1 mM  $MgCl_2$ ，pH 6.5)

5.4 ml 2-羥基-3,5,5-三甲基-4-側氧基環己-2-烯醇鈉溶液

(1.68 M)在4.75 h之後，添加5.4 ml受質溶液，且在6 h之後，添加16.2 ml。藉由用5 M NaOH及1 M HCl滴定使反應物pH值保持在6.0-7.0，且繼而進行HPLC分析。

實例7： 使用獲自固氮弧菌屬EbN1之重組脫氫酶製備(4S)-4-羥基-3-甲氧基-2,6,6-三甲基環己-2-烯酮

如實例1中，將大腸桿菌LU11558培養、收穫且轉化為無細胞粗萃取物。將該萃取物與0.2 mM NAD<sup>+</sup>及5.4 ml之1.68 M 3,5,5-三甲基-1,4-二側氧基環己-2-烯-2-醇鈉溶液混合且在30°C下培育48 h。

獲自大腸桿菌LU11558之無細胞粗萃取物(≈20 mg蛋白質總量)

19.8 g 葡萄糖

0.014 g NAD, Na鹽

10 ml 異丙醇

450 ml 緩衝溶液(50 mM磷酸鉀、1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.5)

1.822 g 2-甲氧基-3,5,5-三甲基環己-2-烯-1,4-二酮(化合物1b)

反應之後進行HPLC分析。在7 h之後，藉由添加3.6 g 2-甲氧基-3,5,5-三甲基環己-2-烯-1,4-二酮補足前驅體之量。在75小時之後，消耗60%以上之前驅體。

### 【圖式簡單說明】

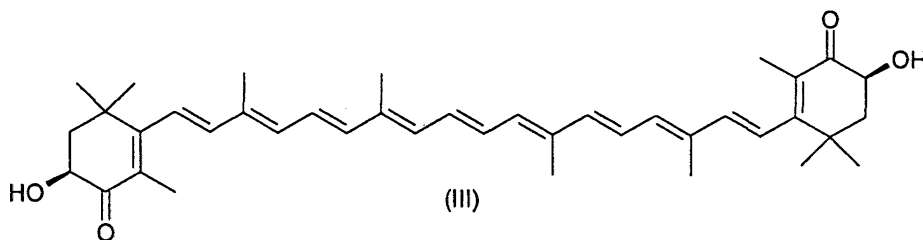
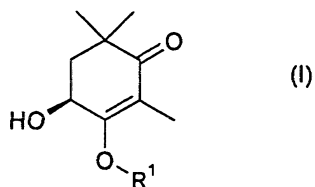
圖I描繪SEQ ID NO:1，其為獲自固氮弧菌屬EbN1之苯基乙醇脫氫酶之核酸序列(Genbank ID 25956124，區域：

25073至25822)。

圖II描繪SEQ ID NO: 2，其為獲自固氮弧菌屬EbN1之苯基乙醇脫氫酶之胺基酸序列(Genbank蛋白ID CAD58337)。

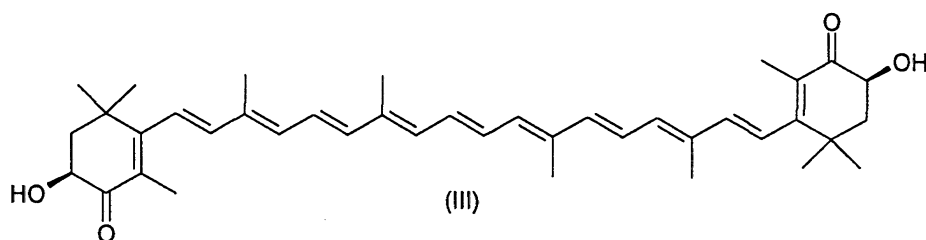
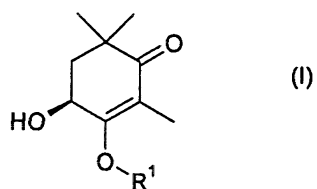
### 五、中文發明摘要：

本發明係關於製備式(I)之光學活性(4S)-4-羥基-2,6,6-三甲基環己-2-烯-1-酮衍生物之方法及製備式(III)之(3S,3'S)-蝦紅素之方法，後者方法包含首先提及之方法。



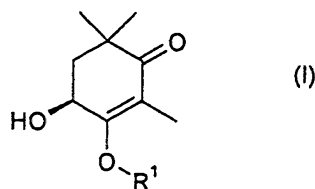
## 六、英文發明摘要：

The present invention relates to a method for preparing optically active (4S)-4-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohex-2-en-1-one derivatives of the formula (I) and a method for preparing (3S,3'S)-astaxanthin of the formula (III) comprising the first-mentioned method.



## 十、申請專利範圍：

1. 一種製備式(I)之光學活性(4S)-4-羥基-2,6,6-三甲基環己-2-烯-1-酮衍生物的方法：

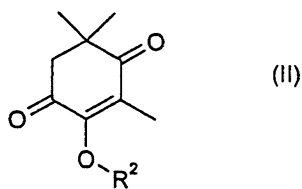


其中：

$R^1$  為氫、 $C_1$ - $C_{10}$ 烷基、 $C_7$ - $C_{14}$ 芳基烷基、鹼金屬  $M^1$  或鹼土金屬片段  $M^2_{1/2}$  或  $(M^2)^+X^-$ ，其中  $M^1$  為 Li、Na、K、Rb 或 Cs 且  $M^2$  為 Mg、Ca、Sr 或 Ba，且  $X^-$  為單價陰離子；

該方法包含以下反應步驟：

其中在還原等效物之存在下，將選自氧化還原酶類別之酶(E)培育於包含式(II)之三甲基環己-2-烯-1,4-二酮衍生物之培養基中：



其中  $R^2$  係與  $R^1$  相同或不同且為氫、 $C_1$ - $C_{10}$ 烷基、 $C_7$ - $C_{14}$ 芳基烷基、鹼金屬  $M^1$  或鹼土金屬片段  $M^2_{1/2}$  或  $(M^2)^+X^-$ ，其中  $M^1$  為 Li、Na、K、Rb 或 Cs 且  $M^2$  為 Mg、Ca、Sr 或 Ba，且  $X^-$  為單價陰離子；

其中該式(II)化合物經酶促還原為該式(I)化合物，且該反應過程期間所消耗之該等還原等效物又藉由藉助於該酶(E)或另一種酶( $E^2$ )使還原劑(RM)轉化為相應氧化產物(OP)而再生，且視情況將該氧化產物(OP)至少部分地自

- 該反應培養基或自反應平衡中移除，且分離所形成之該產物(I)。
2. 如請求項1之方法，其中該酶(E)為醇脫氫酶。
  3. 如請求項2之方法，其中該醇脫氫酶在以NADH或NADPH作為還原等效物下將該式(II)化合物還原為該式(I)化合物。
  4. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該酶(E)具有多肽序列，該多肽序列：
    - (i) 為SEQ ID NO: 2；或
    - (ii) 其中與SEQ ID NO: 2相比，至多25%之胺基酸殘基因缺失、插入、取代或其組合而改變，且仍具有SEQ ID NO: 2之至少50%的酶活性。
  5. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該酶(E)係選自獲自固氮弧菌屬(Azoarcus)之微生物的酶，尤其為獲自固氮弧菌屬細菌EbN1之酶。
  6. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該酶係由如SEQ ID NO: 1中所示之核酸序列或其功能等效物編碼。
  7. 如請求項1至3中任一項之方法，其中將包含至少一個一級醇或二級醇官能基CH(OH)的有機化合物、尤其異丙醇或葡萄糖用作還原劑(RM)。
  8. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該式(II)化合物之轉化係在選自以下菌科之微生物存在下發生：腸桿菌科(Enterobacteriaceae)、假單胞菌科(Pseudomonadaceae)、根瘤菌科(Rhizobiaceae)、乳桿菌科(Lactobacillaceae)、

鏈黴菌科 (Streptomycetaceae) 、 紅球菌科 (Rhodococcaceae)、紅環菌科 (Rhodocyclaceae) 及諾卡氏菌科 (Nocardiaceae)。

9. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該微生物為經核酸構築體轉化之重組微生物，該核酸構築體編碼如請求項1至4中任一項所定義之酶。
10. 如請求項1至3中任一項之方法，其中式(I)中之 $R^1$ 為氫、甲基或鈉，尤其為氫或鈉。
11. 一種製備(3S,3'S)-蝦紅素之方法，其包含如請求項1至10中任一項之方法作為(3s,3'S)-蝦紅素之總合成中之一反應步驟。
12. 一種具有多肽序列之酶(E)用於製備式(I)化合物之用途，該多肽序列：
  - i. 為SEQ ID NO:2；或
  - ii 其中與SEQ ID NO: 2相比，至多25%之胺基酸殘基因缺失、插入、取代或其組合而改變，且仍具有SEQ ID NO: 2之至少50%的酶活性。
13. 如請求項12之用途，其中該式(I)化合物係在其他反應步驟中經轉化為式(III)之(3S,3'S)-蝦紅素。

## 十一、圖式：

1 atgacgcaaa gactgaagga caagcttgca gtaattaccg gcggtgccaa cggcatcggg  
 61 cgggcaattg cggagcgatt tgcggtcgaa ggtgccgaca tcgcaatcgc ggatctggtg  
 121 ccggccccgg aagccgaggc agcaatcagg aacctcggtc ggcgcgttct gaccgtgaag  
 181 tgcgatgtct cgcaacctgg cgacgtagaa gcattcggaa agcaggtcat ctccacgttt  
 241 ggtcgtcgcg acatcctcgt caacaacgcg ggaattacc cgctgattcc tttgacgag  
 301 ctgaccttg aacagtggaa gaaaacattc gagatcaacg tcgattcagg tttcttatg  
 361 gcgaaggctt ttgtccccgg gatgaagagg aacgggtggg gacgcatcat caacctgact  
 421 tcgacgacat attggctaaa gatcgaggcg tataccatt acatcagcac gaaagcggca  
 481 aacataggct ttaccgcgc cctgcctcg gacctgggga aggacggaat cactgttaac  
 541 gccatcgcgc cgagcctgt ccgacggca acaaccgaag ctctgcatt gtccgcatg  
 601 ttcgacgtgc tgccaaacat gcttcaggcg attccgcgc ttcaggtgcc cctggatctg  
 661 acgggcgag ctgcgttct ggctccgat gacgccagtt ttattacagg ccagacgctc  
 721 gcggttgatg gcggtatggt gagacactga

## 圖 I

1 MTQRLKDKLA VITGGANGIG RAIERFAVE GADIAIADLV PAPEAEAAIR  
 51 NLGRRVLTVK CDVSQPGDVE AFGKQVISTF GRCDILVNNA GIYPLIPFDE  
 101 LTFEQWKKTF EINVDSGFLM AKAFVPGMKR NGWGRIINLT STTYWLKIEA  
 151 YTHYISTKAA NIGFTRALAS DLGKDGITVN AIAPSLVRTA TTEASALSAM  
 201 FDVLPNMLQA IPRLQVPLDL TGAAAFSLASD DASFITGQTL AVDGGMVRH

## 圖 II

