

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3794702号
(P3794702)

(45) 発行日 平成18年7月12日(2006.7.12)

(24) 登録日 平成18年4月21日(2006.4.21)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P 41/00 (2006.01)
C 1 2 R 1/845 (2006.01)
C 1 2 R 1/645 (2006.01)
C 1 2 R 1/64 (2006.01)
C 1 2 R 1/545 (2006.01)

C 1 2 P 41/00 D
 C 1 2 P 41/00 F
 C 1 2 P 41/00 D
 C 1 2 R 1:845
 C 1 2 P 41/00 D

請求項の数 2 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-513397
 (86) (22) 出願日 平成7年10月4日(1995.10.4)
 (65) 公表番号 特表平10-507360
 (43) 公表日 平成10年7月21日(1998.7.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1995/013225
 (87) 国際公開番号 W01996/012035
 (87) 国際公開日 平成8年4月25日(1996.4.25)
 審査請求日 平成14年9月5日(2002.9.5)
 (31) 優先権主張番号 08/321,496
 (32) 優先日 平成6年10月12日(1994.10.12)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 08/457,891
 (32) 優先日 平成7年6月1日(1995.6.1)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者
 バンダービルト・ユニバーシテイ
 アメリカ合衆国テネシー州37212ナツ
 シュビル・スイート105・セブンティ
 ンスアベニューサウス1207
 (74) 代理人
 弁理士 小田島 平吉
 (72) 発明者
 サリアスラニ, ファテム・シマ
 アメリカ合衆国デラウェア州19711-
 6014ニューアーク・ベンハムコート5
 04
 (72) 発明者
 ステイグリッツ, バリー
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州1909
 6-3511ウインウッド・クロスヒルロ
 ード127

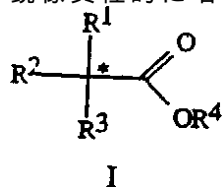
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キラルー α -第3級カルボン酸エステルの酵素的調製法

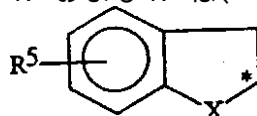
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルの調製方法であって、式 I



[式中、

 R^1 および R^2 は、それらが結合している炭素と一緒に基

(ここで、Xは、C=Oであり；

 R^3 は、OHであり； R^4 は、 $C_1 - C_3$ アルキルであり；そして R^5 は、ハロゲンである)
を形成し、式中、キラル炭素は星印によって示されている]

のエステルの鏡像異性体の混合物と、

ムコール・ミエヘイ由来リパーゼA；カンジダ・アンタルキチカ由来リパーゼB；カンジ
 ダ・アンタルキチカ由来リパーゼA；ブタの膵臓由来リパーゼ；ムコール・ミエヘイ由来
 リパーゼB；カンジダ・アンタルキチカ由来リパーゼC；カンジダ・アンタルキチカ由来

10

20

リパーゼD；フミコーラ・ラヌギノーサ由来リパーゼ；リパーゼ触媒；またはコリネバクテリウム・ホアギイ (*Corynebacterium hoagii*) ATCC 7005；フラボバクテリウム種 (*Flavobacterium sp.*) ATCC 27551；シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) NRRL - B - 3429；シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) ATCC 23973；ロドコッカス・エクイ (*Rhodococcus equi*) ATCC 14887；ロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) ATCC 4277；ロドコッカス・コプロフィラス (*Rhodococcus coprophilus*) NRRL - B - 16536；ロドコッカス・ロドニイ (*Rhodococcus rhodnii*) NRRL - B - 16535；ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) ATCC 6855；キサントモナス・カンペストリス (*Xanthomonas campestris*) ATCC 21818；カンジダ・ギリエルモンディイ (*Candida guilliermondii*) ATCC 6260；カンジダ・ケフィル (*Candida kefyr*) ATCC 4135；カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*) ATCC 46491；ロドトルラ・ルブラ (*Rhodotorula rubra*) ATCC 4557；ヤロウィア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC 9773；アスペルギルス・アリアクルス (*Aspergillus alliarius*) ATCC 10060；ボーベリア・バッシアナ (*Beauveria bassiana*) ATCC 26037；ボーベリア・バッシアナ ATCC 74292；ボーベリア・バッシアナ ATCC 26851；ボーベリア・バッシアナ ATCC 38657；ボーベリア・ニベア (*Beauveria nivea*) ATCC 74294；ロホトリカス・マルチニイ (*Lophotrichus martinii*) ATCC 11221；ペシロミセス・マルクワンヂ (*Paecilomyces marquandi*) ATCC 10525；ペスタロチア・ミクロスポラ (*Pestalotia microspora*) ATCC 11816；リゾープス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*) ATCC 10404；リゾープス・オリゼ ATCC 22580；スポロボロミセス種 (*Sporobolomyces sp.*) ATCC 20290；パチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) NRRL - B - 14591；シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) ATCC 17453；アスペルギルス・アリアセウス (*Aspergillus alliaceus*) NRRL - 315；ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*) ATCC 10002；ペニシリウム・ノタータム (*Penicillium notatum*) ATCC 36740；アミコラトプシス・ルゴサ (*Amycolatopsis rugosa*) NRRL - B - 2295；ロドコッカス・エクイ ATCC 13556；ストレプトミセス・エンダス (*Streptomyces endus*) NRRL - B - 2339；およびアスペルギルス・カンヂダス (*Aspergillus candidus*) ATCC 20022 からなる群より選ばれる微生物由来の生体触媒とを接触させることを含む方法。

【請求項2】

5 - クロロ - 2, 3 - ジヒドロ - 2 - ヒドロキシ - 1 - オキソ - 1H - インデン - 2 - カルボン酸メチルの鏡像異性体エステル混合物と生体触媒とを接触させることを含む、鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルの調製方法であって、鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルが (+) 鏡像異性体であり、そして生体触媒が、 α - キモトリプシン、 β - キモトリプシン、 γ - キモトリプシンおよび δ - キモトリプシンから選ばれることを特徴とする調製方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

多数の農業化学品および医薬品は、近年、ラセミまたはジアステレオマー混合物として市販されている。多くの場合、所望の生理的効果は、唯一の鏡像異性体 / ジアステレオマーに由来するのに対して、他の鏡像異性体 / ジアステレオマーは、不活性であるか、有害も

10

20

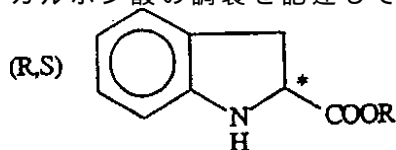
30

40

50

しくは阻害的ですからある。鏡像異性体を分離する化学的および酵素的技術は、高い鏡像異性体純度の化学品製造の益々重要な武器になりつつある。

米国特許第4,898,822号は、立体選択性エステラーゼ活性をもつ酵素または微生物を利用して対応するラセミエステルを加水分解することによって、光学活性なインドリン - 2 - カルボン酸の調製を記述している。その特許に開示された基質は、次の一般式：



[式中、星印で示されるキラル中心は、第2級置換された α - 炭素原子である]
の化合物である。

10

米国特許第5,202,260号およびYee et al., *J. Org. Chem.* (1992)57:3525-3527は、カンジダ・リポリチカ (*Candida lipolytica*) 由来の酵素を用いる α - 第3級カルボン酸エステルの部分酵素的加水分解によって、光学活性な酸およびそれらの対応するエステルの調製を開示している。利用される酵素は、ただ一種類の酵母からのみに由来し、そしてラセミ混合体のS - エステルのみをその対応するS - 酸に変換し、R - エステルはそのまま残す。

Feichterらは、*J. Chem. Soc. Perkin Trans.* (1991)1:653-654において、中でも α - キモトリプシンの作用を通して、ラセミ体アトロラクチン酸メチルを立体特異的に加水分解し、対応するR - 酸およびS - エステルを生成することを開示している。

20

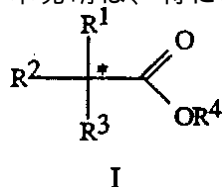
Petersらは、*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1992)38:334-340において、ケト酸もしくはエステルを立体特異的に還元して、それらの対応するキラルヒドロキシ酸もしくはエステルを生成することを開示している。特に、これらの著者は、カンジダ・パラプシロシス (*Candida parapsilosis*) およびロドコッカス・エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) の立体特異的なケトエステル・レダクターゼ活性を例証しており、そこでは、ラセミ体、非環式、 β - ケト酸エステルが、その対応するキラルヒドロキシ酸エステルに立体特異的に変換される。

発明の概要

本発明は、 α - 第3級カルボン酸もしくはエステルの鏡像異性体を、それらの対応するエステルの混合物から、該エステルの混合物と全細胞または部分的もしくは高度に精製された酵素標品を含む生体触媒との接触によって増強する方法を提供する。鏡像異性エステル化合物は、薬物的および農学的に活性な化合物の調製のための中間体として有用である。例えば、WO 92/11249は、ある種の殺節足動物性カルボキサニリド類の調製のための中間体として、5 - クロロ - 2, 3 - ジヒドロ - 2 - ヒドロキシ - 1 - オキソ - 1H - インデン - 2 - カルボン酸メチルを開示している。

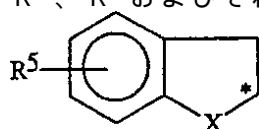
30

本発明は、特に、鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルの調製方法であって、式I



40

[式中、
 R^1 および R^2 は、独立して、フェニルおよび $C_1 - C_6$ アルキルからなる群より選ばれ、各基は、場合によって、ハロゲン、 $C_1 - C_3$ アルコキシおよびフェノキシからなる群の3個までにより置換されてもよいが；但し、 R^1 および R^2 は互いに異なる；あるいは、 R^1 、 R^2 およびそれらが結合される炭素は、一緒になって基



50

[式中、Xは、C=O, O, SおよびNHからなる基より選ばれ；R³は、OHおよびNH₂からなる基より選ばれ；R⁴は、C₁-C₆アルキルであり；そしてR⁵は、ハロゲンおよびC₁-C₃フルオロアルコキシからなる基より選ばれるが、この場合、キラル炭素は星印によって示される] を形成する]

のエステルの鏡像異性体の混合物と、

IM60Lipozyme (Novo Nordisk社より販売されているムコール・ミエヘイ (Mucor miehei) 由来のリパーゼ、本明細書では、ムコール・ミエヘイ由来リパーゼAとも言う。) ; Chirazyme L-2リパーゼ (Roche Molecular Biochemicals社より販売されているカンジダ・アンタルキチカ (Candida antarctica) 由来のリパーゼ、本明細書では、カンジダ・アンタルキチカ由来リパーゼBとも言う。) ; Chirazyme L-5リパーゼ (Roche Molecular Biochemicals社より販売されているカンジダ・アンタルキチカ (Candida antarctica) 由来のリパーゼ、本明細書では、カンジダ・アンタルキチカ由来リパーゼAとも言う。) ; Chirazyme L-7リパーゼ (Roche Molecular Biochemicals社より販売されているブタの膵臓由来のリパーゼ、本明細書では、ブタの膵臓由来リパーゼとも言う。) ; SP524リパーゼ (Novo Nordisk社より販売されているムコール・ミエヘイの (Mucor miehei) 由来のリパーゼ、本明細書では、ムコール・ミエヘイ由来リパーゼBとも言う。) ; SP526リパーゼ (Novo Nordisk社より販売されているカンジダ・アンタルキチカ (Candida antarctica) 由来のリパーゼ、本明細書では、カンジダ・アンタルキチカ由来リパーゼCとも言う。) ; SP539リパーゼ (Novo Nordisk社より販売されているカンジダ・アンタルキチカ (Candida antarctica) 由来のリパーゼ、本明細書では、カンジダ・アンタルキチカ由来リパーゼDとも言う。) ; Lipolase Lipase (市販のフミコーラ・ラヌギノーサ (Humicola lanuginosa) 由来のリパーゼ、本明細書では、フミコーラ・ラヌギノーサ由来リパーゼとも言う。) ; CRLipase (Biologics社より販売されているリパーゼ触媒、本明細書では、リパーゼ触媒とも言う。) ; コリネバクテリウム・ホアギイ (Corynebacterium hoagii) ATCC7005 ; フラボバクテリウム種 (Flavobacterium sp.) ATCC27551 ; シュードモナス・オレオボランス (Pseudomonas oleovorans) NRRL-B-3429 ; シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) ATCC23973 ; シュードモナス種 (Pseudomonas sp.) NRRL-B-11330 ; ロドコッカス・エクイ (Rhodococcus equi) ATCC14887 ; ロドコッカス・エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis) ATCC4277 ; ロドコッカス・コプロフィラス (Rhodococcus coprophilus) NRRL-B-16536 ; ロドコッカス・ロドニイ (Rhodococcus rhodnii) NRRL-B-16535 ; ロドコッカス・ロドクラス (Rhodococcus rhodochrous) ATCC55602 ; ロドコッカス種 (Rhodococcus sp.) NRRL-B-16531 ; ロドコッカス種 (Rhodococcus sp.) NRRL-B-16534 ; ストレプトミセス・グリセウス (Streptomyces griseus) ATCC6855 ; キサントモナス・カンペストリス (Xanthomonas campestris) ATCC21818 ; カンジダ・ギリエルモンディイ (Candida guilliermondii) ATCC6260 ; カンジダ・ケフィル (Candida kefyr) ATCC4135 ; カンジダ・トロピカリス (Candida tropicalis) ATCC46491 ; ロドトルラ・ルブラ (Rhodotorula rubra) ATCC4557 ; ヤロウィア・リポリチカ (Yarrowia lipolytica) ATCC9773 ; アスペルギルス・アリアクルス (Aspergillus alliocrus) ATCC10060 ; ボーベリア・バツシアナ (Beauveria bassiana) ATCC26037 ; ボーベリア・

10

20

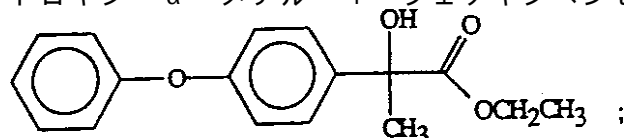
30

40

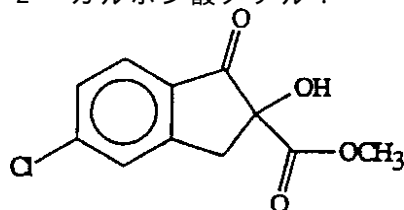
50

バッシアナ ATCC 74292 ; ボーベリア・バッシアナ ATCC 26851 ; ボーベリア・
 バッシアナ ATCC 38657 ; ボーベリア・ニベア (*Beauveria nivea*) ATCC 74294 ;
 クニンガメラ・エチヌラタ (*Cunninghamella echinulata*) ATCC 8688 ; ロボトリカス・マルチニイ (*Lophotrichus martinii*) ATCC 11221 ; ペシロミセス・マルクワンディ (*Paecilomyces marquandi*) ATCC 10525 ; ペスタロチア・
 ミクロスポラ (*Pestalotia microspora*) ATCC 11816 ; リゾープス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*) ATCC 10404 ; リゾープス・
 オリゼ ATCC 22580 ; スポロボロミセス種 (*Sporobolomyces sp.*) ATCC 20290 ;
 トリコフィトン・コンセントリカム (*Trichophyton concentricum*) ATCC 74293 ;
 バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) NRRL - B - 14591 ; ノカルジア種 (*Nocardia sp.*)
 NRRL - B - 5646 ; シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) ATCC 17453 ;
 サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) NRRL - Y - 2034 ;
 シゾサッカロミセス・オストスポラス (*Shizosaccharomyces ostosporus*) NRRL - Y - 854 ;
 アスペルギルス・アリアセウス (*Aspergillus alliaceus*) NRRL - 315 ; ペニシリウム・
 クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*) ATCC 10002 ; ペニシリウム・ノタータム (*Penicillium notatum*)
 ATCC 36740 ; アミコラトプシス・ルゴサ (*Amiclatopsis rugosa*) NRRL - B - 2295 ;
 ロドコッカス・エクイ ATCC 13556 ; ストレプトミセス・エンダス (*Streptomyces endus*)
 NRRL - B - 2339 ; アスペルギルス・カンヂダス (*Aspergillus candidus*) ATCC 20022 ;
 およびミコフィータ・ミクロスポラ (*Mycophyta microspora*) ATCC 89821 からなる群より選ばれる生
 体触媒とを接触させることを含む方法を提供する。

本発明者らは、本発明のある種の好適な生体触媒が、2種の特に好適なエステル： α -ヒ
 ドロキシ- α -メチル-4-フェノキシベンゼン酢酸エチル：



および 5-クロロ-2,3-ジヒドロ-2-ヒドロキシ-1-オキソ-1H-インデン-2-カルボン酸メチル：



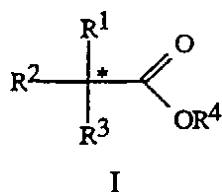
の鏡像異性体混合物の(+)または(-)鏡像異性体いずれかの増強に有用であることを
 発見した。

鏡像特異的生物変換のための本発明の仮定されるメカニズムは、 α -第3級エステル混
 合物の1種の鏡像異性体の鏡像特異的加水分解によって、対応するカルボン酸を生成す
 こと、およびケト酸エステルの鏡像異性体混合物の場合には、ケト基の鏡像特異的還元
 により、対応する α -第3級ヒドロキシ酸エステルの生成をもたらすことからなる。

発明の詳細

本発明は、鏡像異性的に増強された α -第3級カルボン酸もしくはエステルを、それら
 の対応するエステルの鏡像異性体混合物からなる出発基質から調製する方法に関する。

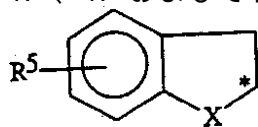
出発化合物は、 α -第3級炭素をもつエステルの鏡像異性体混合物であり、式I



[式中、

R^1 および R^2 は、独立して、フェニルおよび $C_1 - C_6$ アルキルからなる群より選ばれ、各群は、場合によって、ハロゲン、 $C_1 - C_3$ アルコキシおよびフェノキシからなる群の 3 個までにより置換されてもよいが；但し、 R^1 および R^2 は互いに異なる；あるいは、 R^1 、 R^2 およびそれらが結合される炭素は、一緒になって基

10

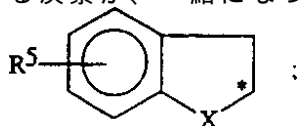


(式中、 X は、 $C=O$ 、 O 、 S および NH からなる群より選ばれ； R^3 は、 OH および NH_2 からなる群より選ばれ； R^4 は、 $C_1 - C_6$ アルキルであり；そして R^5 は、ハロゲンおよび $C_1 - C_3$ フルオロアルコキシからなる群より選ばれるが、この場合、キラル炭素は星印によって示される) を形成する]

によって示される。

好適な基質は、式中、 R^1 が、場合によって、フェノキシにより置換されているフェニルであり； R^2 が $C_1 - C_3$ アルキルであるか；あるいは、 R^1 、 R^2 およびそれらが結合される炭素が、一緒になって基

20



を形成し； X は、 $C(=O)$ であり； R^3 は、 OH であり； R^4 は、 $C_1 - C_3$ アルキルであり；そして R^5 は、ハロゲンである、式 I の化合物である。

特に、好適な基質は：

α - ヒドロキシ - α - メチル - 4 - フェノキシベンゼン酢酸エチル；および
5 - クロロ - 2, 3 - ジヒドロ - 2 - ヒドロキシ - 1 - オキソ - 1H - インデン - 2 - カルボン酸メチルである。

30

本発明の基質は、当業者に既知の技術によって容易に調製される。例えば、 α - ヒドロキシ - α - メチル - 4 - フェノキシベンゼン酢酸エチルは、下記のように調製できる。マグネチックスターラー、水凝縮器、125 mL 滴下ロート、温度計および窒素導入口を備えた 250 - mL フラスコに、マグネシウム金属 2.7 g (110 mmol) を添加し、そして強力な窒素パージ下でヒートガンにより乾燥した。冷却後、ロートに、乾燥 THF 67 mL 中 4 - ブロモジフェニルエーテル 17.5 mL (24.9 g, 100 mmol) 溶液を入れ、そして 10 mL をフラスコに流入した。攪拌しつつ、グリニャール反応が自然に始まり、そしてフッ化物溶液の残りが 15 分間かけて添加され、内部温度 67 - 68
に維持された。添加が完了した時、5 分間 68 に保たれた温度は、次いで低下し始め、45 分後に 30 になった。その間、250 mL フラスコ、マグネチックスターラーおよびオープン乾燥された 125 mL 滴下ロートを、窒素下で熱時組み立て、そして放冷した。次いで、低温温度計を付着し、フラスコに、乾燥 THF 66 mL 中ピルビン酸エチル 11.5 mL (12.2 g, 105 mmol) 溶液を入れ、そしてグリニャール試薬の溶液を、注射器を用いて滴下ロートに移した。ピルビン酸エステル溶液を、-10 まで冷却し、そしてグリニャール溶液を、内部温度 -5 ~ -10 に維持するように、十分攪拌、冷却しながら 15 分かけて滴下した。得られた溶液を、水 50 mL、続いて飽和塩化アンモニウム水溶液 50 mL によって攪拌、処理して、2 つの澄明相を得た。これらを分離し、そして上相をロータリーエバポレーターにかけて、ほとんどの THF を除去した。水お

40

50

よび塩化メチレン 50 mL づつを添加して、2つの澄明相を得た。これらを分離し、その水相を、別な塩化メチレン 25 mL で洗浄し、そして合体した有機相を水および塩水で洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥し、そして蒸発させると黄橙色オイル 23.8 g が残った。140 / 0.1 ~ 0.2 mM で 60 分間の Kugelrohr 蒸留により、揮発性不純物を除去して、澄明な橙色オイルとしての生成物 17.1 g (60%) を得た。

同様に、5 - クロロ - 2, 3 - ジヒドロ - 2 - ヒドロキシ - 1 - オキソ - 1 H - インデン - 2 - カルボン酸メチルは、次の方法で調製できる。水素化ナトリウム (オイル中 60% 溶液の 24 g, 0.6 mol) をヘキサンで洗浄してそのオイルを除去した。得られた洗浄 NaH を、DMF 200 mL 中に懸濁し、次いで、反応温度を 35 以下に維持するような速度で、5 - クロロ - 1 - インダノン 50 g (0.3 mol) と DMF 150 mL の溶液によって処理した。得られた混合物を、30 分間攪拌し、次いで、15 分かけて添加した炭酸ジメチル 38 mL (0.45 mol) で処理した。得られた混合液を、室温で 1.5 時間攪拌し、次いで、一夜放置した。その反応混合液を、濃 HCl 100 mL と氷約 1000 mL の混合液中に注意深く注いだ。次に、エーテル 500 mL を添加し、その水層を、エーテルで 2 回抽出した。その合体した有機層を、H₂O で 3 回洗浄し、乾燥 (MgSO₄) し、そして濃縮して、褐色オイル 64.6 g を得た。前記生成物 5.0 g (0.022 mol) と塩化メチレン 70 mL の溶液を、室温で 50 ~ 60% m - クロロ過安息香酸 (Aldrich) 10 g (約 0.032 mol) で処理した。1 時間後、その反応を 0 に冷却し、飽和炭酸ナトリウム水溶液を注意深く添加して止めた。その層を、飽和炭酸ナトリウム水溶液で 2 回、飽和重亜硫酸ナトリウムで 1 回洗浄し、乾燥 (MgSO₄) し、そして濃縮して、黄色固体 4.0 g を得た。

本発明の 1 つの実施態様では、開示された酵素および生物材料の生体触媒作用は、変化を受けなかった鏡像異性体から容易に分離される生成物への、望ましくない鏡像異性体の転化をもたらす。本開示に関し、本調製法の効率、1) 回収率および 2) 目的の生成物の鏡像異性純度を定量化することによって測定された。回収率は、生体触媒処理の後、残存している出発基質のパーセントである。目的の生成物の鏡像異性純度は、生体触媒処理に続いて回収された基質に残存している不要の鏡像異性体に対する目的の鏡像異性体の過剰量の算出によって決定される。この鏡像異性体過剰量 (% e. e.) は、次の式の 1 つを用いて個々の鏡像異性体濃度から算出される：

$$(+)\text{型の \% e. e.} = ([(+)] - [(-)]) / ([(+)] + [(-)]) \times 100$$

$$(-)\text{型の \% e. e.} = ([(-)] - [(+)]) / ([(-)] + [(+)]) \times 100$$

[式中、[(+)] および [(-)] は、それぞれ、(+) および (-) 型の濃度である]。

それは、本方法の必須の態様ではないけれども、必要によっては、鏡像異性的に増強されたエステル生成物 (50% e. e. として定義される) は、数種の技術上周知の手段のいずれかによって、生体触媒反応混合物から分離されてもよい。本発明の目的のために、開示された方法の基質として働く鏡像異性体混合物は、% e. e. が 50 未満である鏡像異性体エステルの混合物である。これは、必然的に、両鏡像異性体が、等しい割合で存在するラセミ混合物、ならびに 1 種の鏡像異性体が、その相補的鏡像異性体に対して過剰に存在するが、鏡像異性体過剰量が 50% 未満である光学活性混合物を包含する。いずれの場合でも、本発明の方法は、目的の鏡像異性体が、少なくとも 50 の % e. e. までで得られた鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルの調製をもたらす。

本開示の目的では、本発明者らは、次の用語が、以下に述べられる意味をもつことを意図している。

用語「鏡像異性的に増強された」は、目的の鏡像異性体が、少なくとも 50 の % e. e. までで得られたことを意味する。

用語「生体触媒」は、細菌、酵母もしくは真菌の全細胞、または細胞抽出物もしくは生成物によって供される酵素活性；あるいは細菌、酵母、真菌もしくは哺乳動物細胞から精製もしくは部分精製された形状での酵素活性であって、本発明の反応工程を酵素的に触媒する活性を包含する。

10

20

30

40

50

50%を超える鏡像異性体過剰量（残存する他の鏡像異性体種に対して目的の鏡像異性体の3倍過剰量を超える量を表す）を得るそのような生体触媒が好適である。より好適には約90%以上、さらに好適には約95%以上、もっとも好適には約99%以上の増強である。

実験過程において、本発明者は、400以上の強力な生体触媒源を評価した。驚くべきことに、本明細書に開示されるものは、本発明者らによって探求されたその活性を保持した。したがって、本発明は、特に、鏡像特異的反応を実施できる生体触媒（微生物もしくはその変異株、または酵素）を特徴とする。好適な生体触媒は、次の微生物由来のものを含む：コリネバクテリウム・ホアギイATCC7005；フラボバクテリウム種ATCC27551；シュードモナス・オレオボランスNRRL-B-3429；シュードモナス・ブチダATCC23973；シュードモナス種NRRL-B-11330；ロドコッカス・エクイATCC14887；ロドコッカス・エリスロポリスATCC4277；ロドコッカス・コプロフィラスNRRL-B-16536；ロドコッカス・ロドニイNRRL-B-16535；ロドコッカス・ロドクラスATCC55602；ロドコッカス種NRRL-B-16531；ロドコッカス種NRRL-B-16534；ストレプトミセス・グリセウスATCC6855；キサントモナス・カンペストリスATCC21818；カンジダ・ギリエルモンディイATCC6260；カンジダ・ケフィルATCC4135；カンジダ・トロピカリスATCC46491；ロドトルラ・ルブラATCC4557；ヤロウィア・リポリチカATCC9773；アスペルギルス・アリアクルスATCC10060；ボーベリア・パッシアナATCC26037；ボーベリア・パッシアナATCC74292；ボーベリア・パッシアナATCC26851；ボーベリア・パッシアナATCC38657；ボーベリア・ニベアATCC74294；クニンガメラ・エチヌラタATCC8688；ロホトリカス・マルチニイATCC11221；ペシロミセス・マルクワンジATCC10525；ペスタロチア・ミクロスポラATCC11816；リゾープス・オリゼATCC10404；リゾープス・オリゼATCC22580；スポロボロミセス種ATCC20290；トリコフィトン・コンセントリカムATCC74293；バチルス・セレウスNRRL-B-14591；ノカルチア種NRRL-B-5646；シュードモナス・ブチダATCC17453；サッカロミセス・セレビシエNRRL-Y-2034；シゾサッカロミセス・オストスポラスNRRL-Y-854；アスペルギルス・アリアセウスNRRL-315；ペニシリウム・クリソゲナムATCC10002；ペニシリウム・ノタータムATCC36740；アミコラトブシス・ルゴサNRRL-B-2295；ロドコッカス・エクイATCC13556；ストレプトミセス・エンダスNRRL-B-2339；アスペルギルス・カンジダスATCC20022；およびミコフィータ・ミクロスポラATCC89821。本発明の方法を実施できる鏡像特異的酵素を含む生物材料は、単離または生合成でき、そしてそれだけで使用できるが、適当な微生物を直接使用することが、通常は、より便利である。

また、好適なものは、次の給源からの加水分解酵素の精製標品である： α -キモトリプシン（ウシ膵臓由来、Sigma Chemical Co.）； β -キモトリプシン（ウシ膵臓由来、Sigma Chemical Co.）； γ -キモトリプシン（ウシ膵臓由来、Sigma Chemical Co.）； δ -キモトリプシン（ウシ膵臓由来、Sigma Chemical Co.）；IM60Lipozyme（Novo Nordisk）；Chirazyme L-2リパーゼ（Boehringer Mannheim）；Chirazyme L-5リパーゼ（Boehringer Mannheim）；Chirazyme L-7リパーゼ（Boehringer Mannheim）；SP524リパーゼ（Novo Nordisk）；SP526リパーゼ（Novo Nordisk）；SP539プロテアーゼ（Novo Nordisk）；Lipolaseリパーゼ（Novo Nordisk）；およびCRLipase（Altus Biologics, Inc.）。

もっとも好適なものは、次の微生物において発見されるものを含む生体触媒である：ロドコッカス・ロドクラスATCC55602；トリコフィトン・コンセントリカムATCC74293；ボーベリア・パッシアナATCC74292；およびボーベリア・ニベアATCC74294。

(+) - または (-) - 鏡像異性体のいずれかについて、 α -第3級カルボン酸エステル

10

20

30

40

50

の鏡像異性体混合物を増強する方法では、生体触媒作用は、鏡像特異的酵素の生産に適した培地中で微生物を培養することによって都合よく得られる１種以上の鏡像特異的酵素の作用によって達成される。このようにして得られた酵素は、混合物の（＋）-または（－）- α -第３級カルボン酸エステル of theいずれかに選択的に作用するように添加され、残存する（＋）-または（－）-カルボン酸エステルの増強をもたらす。次いで、目的の生成物（増強されたカルボン酸エステル）が、酸からカルボン酸エステルを、ヒドロキシ酸エステルからケト酸エステルを分離するため、そして個々の鏡像異性体を分離するために、当業者に既知の方法によって、不要な生成物（（＋）-または（－）カルボン酸、または（＋）-または（－）-ヒドロキシ酸エステル）から分離できる。明らかに、本発明者らは、本発明の方法がまた、 α -第３級カルボン酸エステルの鏡像異性体の対応する混合物の選択的生体触媒作用を通しての、（＋）または（－） α -第３級カルボン酸、または（＋）または（－）ヒドロキシ酸エステルの鏡像異性的増強法としても、同様に良好に述べることができると認識している。

10

本発明の生体触媒は、細菌、酵母、真菌および哺乳動物細胞から由来されるか、またはそれらの中に位置される生物材料を含む。これらの生体触媒のいくつかは、ブダペスト条約の約定の下に、ATCC（アメリカン タイプ カルチャー コレクション、12301 パークローン ドライブ、ロックビル、MD 20852（American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852））に寄託され、そして次の受託番号を有する：

生体触媒

受託番号

20

ロドコッカス・ロドクラス

ATCC 55602

トリコフィトン・コンセントリカム

ATCC 74293

ボーベリア・バッシアナ

ATCC 74292

ボーベリア・ニベア

ATCC 74294

次の略語が、本明細書で使用される：

M C I C - 5 - クロロ - 2 , 3 - ジヒドロ - 2 - ヒドロキシ - 1 - オキソ - 1 H - イ
ンデン - 2 - カルボン酸メチル

30

E H P A - α - ヒドロキシ - α - メチル - 4 - フェノキシベンゼン酢酸エチル

H P L C - 高速液体クロマトグラフィー

D M F - ジメチルホルムアミド

A C N - アセトニトリル

e . e . - 鏡像異性体過剰量

S M - サブロー・マルトースブロス

S B G - ソイビーングリセロール

N B - ニートリエントブロス

P D - ポテトデキストロースブロス

40

生体触媒活性の測定では、適当な生長培地 2.5 mL に、標準微生物学技術を用いて、試験生物体の凍結または凍結乾燥保存株の少量部分を接種した。本明細書に開示される生物体の生長のために利用される培地は、次のものから選ばれた：

S M（サブロー・マルトースブロス；BBL Inc., Cockeysville, MD）；

P D（ポテトデキストロースブロス；Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI）

N B（ニートリエントブロス；Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI）；

<u>S B G (ソイビーングリセロール) (p H 7. 0)</u>	<u>g / l</u>
グリセロール	20. 0
酵母エキス	5. 0
大豆粉	5. 0
塩化ナトリウム	5. 0
リン酸カリウム (二塩基性)	5. 0

10

各開示微生物に使用された生長培地は、表 1 ~ 6 に示される。接種された培養菌は、定常的に振盪しながら 28 ~ 30 で 72 時間増殖された (250 rpm ; 段階 I 増殖)。この種菌培養液の 10 ~ 20 % を、新鮮培地 (25 mL) に移植し、培養をさらに 24 時間継続した (段階 II 増殖)。細胞を収穫し、そして適切なバッファー (p H 4. 5 ~ 8. 5) に再懸濁したが、この場合、生体触媒の最終濃度は、バッファー 1 mL 当たり触媒約 10 ~ 250 mg (乾燥重量) であり、基質の最終濃度は、約 2 ~ 200 mM であった。生物変換を達成すべきインキュベーションは、定常的に振盪 (250 rpm) しながら 25 ~ 50 で 4 ~ 72 時間継続された。次いで、反応液を酸性にし、塩化メチレンで抽出した。CH₂Cl₂の蒸発に続いて、その残渣を A C N に再懸濁した。A C N 溶液中の基質の回収 % を、逆相 H P L C によって測定し、そして鏡像異性純度をキラル H P L C によって測定した。

20

分析操作

第 3 級 α - 置換カルボン酸エステルおよび加水分解産物を、逆相 H P L C によって測定した。検出は、紫外線吸収によった。M C I C については、40 % アセトニトリルおよび 60 % H₂O + 0. 1 % トリエチルアミンの移動相 (p H 6. 5 に調整) を用いる Z o r b a x ^{▲ R ▼} R X - C₈ カラム (4. 6 x 250 mm) を使用した。E H P A については、0. 1 % H₃P O₄ で酸性にした 50 % アセトニトリルおよび 50 % H₂O の移動相を用いる Z o r b a x ^{▲ R ▼} C₁₈ カラム (4. 6 x 250 mm) を使用した。エステルのクロマトグラフィーによる同定および定量は、純標準品との比較によって決定した。

30

鏡像異性体分離のためのキラル H P L C は、Chromatech (Sweden) から入手される α - 酸糖タンパク質カラムを用いて実施される。エステル鏡像異性体の分離用移動相は、以下にまとめられる。

鏡像異性体

移動相

M C I C	98 % 0. 01 M リン酸バッファー (p H 4. 8):
	2 % エタノール
E H P A	91 % H ₂ O + 0. 1 % トリエチルアミン (p H 6. 0): 9 % アセトニトリル

40

実施例 10 における E H P A 鏡像異性体の分離のためのキラル H P L C は、J. T. Baker から入手される B a k e r b o n d ^{▲ R ▼} キラル O D カラムを用いて実施された。E H P A 鏡像異性体の分離用移動相は、90 % ヘキサン : 10 % プロパノールであった。

鏡像異性体組成、純度および前記エステルのクロマトグラフィーによる同定は、鏡像異性体もしくはラセミ混合物の純標準品との比較によって決定された。

(実施例 1)

表 1 に挙げられる微生物菌株では、細胞を、段階 II 増殖から遠心分離によって回収し、50 mM リン酸バッファー、p H 6. 0 の 5 mL に再懸濁した (細胞湿重量 50 ~ 100

50

mg / バッファー 1 mL)。次いで、DMF 50 μ L 中ラセミ MCIC 10 μ mol を添加した。30 で 24 時間インキュベーション後、反応を終結するか (2 mM 生物変換)、または DMF 50 μ L 中ラセミ MCIC 10 μ mol をさらに添加し、インキュベーションをさらに 24 時間継続した (4 mM 生物変換)。2 mM と 4 mM の両 MCIC 生物変換を、3 M H₂SO₄ で pH 3 に酸性化することによって終結した。塩化メチレン 2 倍量を、各サンプルに添加し、その懸濁液を 15 分間攪拌した。塩化メチレン層を採取し、窒素通気下で蒸発乾固し、そして残渣をアセトニトリル 10 mL に再懸濁した。回収された両 MCIC の% および (+) - MCIC e . e . を、それぞれ、逆相 HPLC およびキラル HPLC によって測定し、そしてその結果を表 1 に示す。

(実施例 2)

10

各キモトリプシン酵素 (表 1) のサンプル 10 mg を、50 mM リン酸バッファー pH 6 . 0 の 2 mL に添加した。次いで、DMF 20 μ L 中ラセミ MCIC 4 μ mol を添加した。同様に、Chirazyme L - 7 リパーゼのサンプル 20 mg を、50 mM リン酸バッファー pH 6 . 0 に添加し、そして DMF 20 μ L 中ラセミ MCIC 40 μ mol を添加した。30 (キモトリプシン) または 25 (L - 7) で 24 時間インキュベーション、そして続いて実施例 1 と同様な抽出および分析操作の後、回収された MCIC の% および (+) - MCIC e . e . を測定した。その結果を表 1 に示す。

表1

・(+)-5-クロロ-2, 3-ジヒドロ-2-ヒドロキシ-1-
オキソ-1H-インデン-2-カルボン酸メチルの鏡像異性体増強

菌 株	生長 培地	インキュ ベーション 時間 (h)	基 質		
			mM 添加量	% 回収率	% e. e.
<i>Corynebacterium hoagii</i> ATCC 7005	SM	48	4	53	50
<i>Flavobacterium</i> sp. ATCC 27551	SM	48	4	47	52
<i>Pseudomonas oleovorans</i> NRRL-B-3429	SBG	24	2	19	100
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 23973	NB	24	2	49	60
<i>Pseudomonas</i> sp. NRRL-B-11330	SBG	48	4	14	64
<i>Rhodococcus equi</i> ATCC 14887	NB	48	4	29	80
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 4277	SBG	48	4	21	82
<i>Rhodococcus coprophilus</i> NRRL-B-16536	SBG	48	4	33	100
<i>Rhodococcus rhodnii</i> NRRL-B-16535	SBG	48	4	15	100
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC 55602	SBG	48	4	35	98
<i>Rhodococcus</i> sp. NRRL-B-16534	SBG	48	4	14	66
<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 6855	SBG	48	4	33	66
<i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 21818	SBG	48	4	36	100
<i>Rhodotorula rubra</i> ATCC 4557	SBG	48	4	37	86
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 74292	PD	48	4	41	92
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 26851	PD	48	4	31	100
<i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 8688	PD	24	2	36	50
<i>Paecilomyces marquandi</i> ATCC 10525	SM	48	4	52	60
<i>Pestalotia microspora</i> ATCC 11816	PD	48	4	20	50
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 10404	PD	48	4	49	100
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 22580	PD	48	4	48	100
<i>Trichophyton concentricum</i> ATCC 74293	PD	48	4	20	92
α-キモトリプシン(Sigma)	NA ^a	24	2	46	100
β-キモトリプシン(Sigma)	NA	24	2	45	100
γ-キモトリプシン(Sigma)	NA	24	2	30	100
δ-キモトリプシン(Sigma)	NA	24	30	60	72
Chirazyme L-7 リパーゼ(Boehringer Mannheim)	NA	24	20	34	80

^aNA - 適用なし

(実施例 3)

表 2 に挙げられる微生物菌株では、細胞を、段階 I I 増殖から遠心分離によって回収し、50 mM リン酸バッファー pH 6.0 の 5 mL に再懸濁した (細胞湿重量 50 ~ 100 mg / バッファー 1 mL)。実施例 1 と同様の方法で、ラセミ M C I C 10 μmol を添加した。実施例 1 と同様のインキュベーション (4 mM 生物変換)、抽出および分析操作に続いて、回収された M C I C % および (-) - M C I C e. e. を、測定した。その結果を表 2 に示す。

(実施例 4)

Chirazyme L-2 リパーゼ 5 mg、SP524 リパーゼ、SP526 リパーゼ、SP539 プロテアーゼ 10 mg または Chirazyme L-5 リパーゼ 20 mg (表 2) を、50 mM リン酸バッファー pH 6.0 の 2 mL に添加した。次いで、DMF 20

10

20

30

40

50

μL 中ラセミ M C I C $40\mu\text{mol}$ (S P 5 2 6 では $20\mu\text{mol}$) を添加した。25 で 24 時間インキュベーション、そして続く実施例 1 と同様な抽出および分析操作の後、回収された M C I C % および (-) - M C I C e . e . を測定した。その結果を表 2 に示す。

表 2

(-) - 5 - クロロ - 2 , 3 - ジヒドロ - 2 - ヒドロキシ - 1 -
オキソ - 1 H - インデン - 2 - カルボン酸メチルの鏡像異性体増強

菌 株	生長 培地	インキュ ベーション 時間 (h)	基 質		
			mM 添加量	% 回収率	% e . e .
<i>Candida guilliermondii</i> ATCC 6260	SM	48	4	33	100
<i>Candida kefyr</i> ATCC 4135	SM	48	1	ND ^a	50
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 46491	SM	48	4	29	76
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 9773	SM	48	4	32	50
<i>Aspergillus alliocrus</i> ATCC 10060	SM	48	1	ND	100
<i>Beauveria nivea</i> ATCC 74294	PD	48	4	38	86
<i>Lophotrichus martinii</i> ATCC 11221	PD	48	4	36	100
<i>Sporobolomyces sp.</i> ATCC 20290	PD	48	4	45	100
SP 524 リパーゼ (Novo Nordisk)	NA ^b	24	20	16	66
SP 526 リパーゼ (Novo Nordisk)	NA	24	10	22	85
SP 539 プロテアーゼ (Novo Nordisk)	NA	24	20	40	68
Chirazyme L-2 リパーゼ (Boehringer Mannheim)	NA	24	20	13	100
Chirazyme L-5 リパーゼ (Boehringer Mannheim)	NA	24	20	14	80

^aND - 測定なし

^bNA - 適用なし

(実施例 5)

表 3 に挙げられる微生物菌株では、各 24 時間の段階 I I 培養液 (25 mL S B G 培地) に、DMF 100 μL 中ラセミ M C I C $42\mu\text{mol}$ を添加した。M C I C 添加に続いて、27 で 8 時間もしくは 29 時間インキュベーション後の培養液から 4 mL ずつを採取した。各サンプルに、酢酸エチル 1 mL を添加し、その懸濁液を 10 秒間攪拌した。酢酸エチル層の 2 / 10 mL を、各サンプルから採取し、窒素通気下で蒸発乾固し、そして残渣をアセトニトリル 3 mL に再懸濁した。回収された M C I C の % および (-) - M C I C e . e . を、それぞれ、逆相 H P L C およびキラル H P L C によって測定し、そしてその結果を表 3 に示す。

表3

(一) -5-クロロ-2, 3-ジヒドロ-2-ヒドロキシ-1-
オキソ-1H-インデン-2-カルボン酸メチルの鏡像異性体増強

菌 株	生長 培地	インキュ ベーション 時間 (h)	基 質		
			mM 添加量	% 回収率	% e. e.
<i>Bacillus cereus</i> NRRL-B-14591	SBG	29	1.7	27	48
<i>Nocardia</i> sp. NRRL-B-5646	SBG	29	1.7	12	60
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17453	SBG	29	1.7	19	46
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NRRL-Y-2034	SBG	29	1.7	35	78
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i> NRRL-Y-854	SBG	8	1.7	30	98
<i>Aspergillus alliaceus</i> NRRL-315	SBG	29	1.7	12	64
<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 10002	SBG	8	1.7	38	50
<i>Penicillium notatum</i> ATCC 36740	SBG	29	1.7	19	46

10

(実施例6)

表4に挙げられる微生物菌株では、細胞を、段階II増殖から遠心分離によって回収し、50mMリン酸バッファーpH6.0の5mLに再懸濁した(細胞湿重量50~100mg/バッファー1mL)。次いで、DMF50μL中ラセミEHPA 10μmolを添加した。30℃で24時間インキュベーション後、反応を終結するか(2mM生物変換)、またはDMF50μL中ラセミEHPA 10μmolをさらに添加し、インキュベーションをさらに24時間継続した(4mM生物変換)。2mMと4mMの両EHPA生物変換を、3MH₂SO₄でpH3に酸性化することによって停止した。塩化メチレン2倍量を、各サンプルに添加し、その懸濁液を15分間攪拌した。塩化メチレン層を採取し、窒素通気下で蒸発乾固し、そして残渣をアセトニトリル10mLに再懸濁した。回収された両EHPAの%および(+)-EHPA e. e.を、それぞれ、逆相HPLCおよびキラルHPLCによって測定し、そしてその結果を表4に示す。

30

(実施例7)

IM60Lipozyme、SP524リパーゼ、SP526リパーゼのサンプル20mg、またはLipolaseリパーゼ1mLを、50mMリン酸バッファーpH6.0の2mL(Lipolaseでは1mL)に添加した。次いで、DMF20μL中ラセミEHPA20μmolを添加した。30℃で48時間(IM60Lipozyme)または25℃で24時間(SP525、SP526、Lipolase)インキュベーション後、反応を3MH₂SO₄でpH3に酸性化することによって停止した。実施例6と同様の抽出および分析操作の後、EHPA%および(+)-EHPA e. e.を測定した。その結果を表4に示す。

40

表 4

(+) - α -ヒドロキシ- α -メチル-4-フェノキシベンゼン酢酸
エチルの鏡像異性体増強

菌 株	生長 培地	インキュ ベーション 時間 (h)	基 質		
			mM 添加量	% 回収率	% e. e.
<i>Pseudomonas</i> sp. NRRL-B-11330	SBG	24	2	52	86
<i>Rhodococcus equi</i> ATCC 13556	SBG	24	2	40	88
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 46491	SM	24	2	87	42
<i>Aspergillus candidus</i> ATCC 20022	SM	24	2	48	24
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 26851	PD	24	2	43	90
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 38657	PD	24	2	28	100
<i>Mycophyta microspora</i> ATCC 89821	PD	48	4	44	40
<i>Tricophyton concentricum</i> ATCC 74293	PD	48	4	39	100
IM60 Lipozyme (Novo Nordisk)	NA ^a	48	10	47	84
SP 524 リパーゼ(Novo Nordisk)	NA	24	10	10	60
SP 526 リパーゼ(Novo Nordisk)	NA	24	10	36	51
<u>Lipolase リパーゼ(Novo Nordisk)</u>	NA	24	10	22	50

^aNA - 適用なし

(実施例 8)

表 5 に挙げられる微生物菌株では、細胞を、段階 I I 増殖から遠心分離によって回収し、50 mM リン酸バッファー pH 6.0 の 5 mL に再懸濁した (細胞湿重量 50 ~ 100 mg / バッファー 1 mL)。実施例 5 と同様の方法で、ラセミ EHPA 10 μ mol を添加した。実施例 5 と同様のインキュベーション (2 mM 生物変換)、抽出および分析操作に続いて、回収された EHPA % および (-) - EHPA e. e. を、測定した。その結果を表 5 に示す。

10

20

30

表5

(-) - α -ヒドロキシ- α -メチル-4-フェノキシベンゼン酢酸エチルの鏡像異性体増強

菌 株	基 質					
	インキュ					
	生長	ベージョン	mM	%		
	培地	時間 (h)	添加量	回収率	% e. e.	
<i>Amycolatopsis rugosa</i> NRRL-B-2295	SM	24	2	38	50	
<i>Streptomyces endus</i> NRRL-B-2339	SBG	24	2	12	82	

(実施例9)

表6に挙げられる微生物菌株では、段階II増殖から遠心分離によって回収され、-80℃で凍結保存された細胞を、50mMリン酸バッファーpH6.0の2mLに再懸濁した(細胞湿重量150~300mg/バッファー1mL)。その細胞懸濁液を、50% e. e. (+)-MCIC 100 μ molを含む反応バイアルに添加した。30℃で24時間インキュベーション後、反応を3M H₂SO₄でpH3に酸性化することによって停止した。塩化メチレン5倍量を、各サンプルに添加し、その懸濁液を15分間攪拌した。各塩化メチレン層の1/2を採取し、窒素通気下で蒸発乾固し、そして残渣をアセトニトリル10mLに再懸濁した。回収された両MCICの%および(+)-MCIC e. e. を、それぞれ、逆相HPLCおよびキラルHPLCによって測定し、そしてその結果を表6に示す。

表6

50% e. e. (+)-5-クロロ-2,3-ジヒドロ-2-ヒドロキシ-1-オキソ-1H-インデン-2-カルボン酸メチルの鏡像異性体増強

菌 株	生長 培地	細胞 濃度 (g/mL)	インキュ ベージョン 時間 (h)	基 質		
				mM	%	
				添加量	回収率	% e. e.
<i>Rhodococcus sp.</i> NRRL-B-16531	SBG	0.30	24	50	67	82
<i>Rhodococcus sp.</i> NRRL-B-16534	SBG	0.30	24	50	82	82
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC 55602	SBG	0.30	24	50	67	86
<i>Tricophyton concentricum</i> ATCC 74293	PD	0.16	24	50	77	76
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 26037	PD	0.29	24	50	82	76
細胞無添加	-	-	24	50	100	50

(実施例10)

CRLipaze (Altus Biologics Inc., Cambridge, MA) 10mgを、50mMリン酸バッファーpH6.0の2mLに添加した。次いで、DMF 20 μ mol中ラセミEH

P A 1 0 μ m o l を添加した。3 0 で 2 4 時間インキュベーション後、反応を 3 M H₂ S O₄ で p H 3 に酸性化することによって停止した。塩化メチレン 5 倍量を、各サンプルに添加し、その懸濁液を 1 5 分間攪拌した。各塩化メチレン層の 1 / 2 を採取し、窒素通気下で蒸発乾固し、そして残渣をアセトニトリル 1 0 m L に再懸濁した。回収された両 E H P A の % および (+) - E H P A を、それぞれ、逆相 H P L C およびキラル H P L C に よって測定し、そしてその結果を表 7 に示す。

表 7

(+)- α -ヒドロキシ- α -メチル-4-フェノキシベンゼン
酢酸エチルの鏡像異性体増強

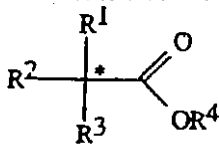
10

酵 素	インキュ ベーション 時間 (h)	基 質		
		mM 添加量	% 回収率	% e. e.
C R リパーゼ(Altus Biologics)	24	5	38	90

本発明の主な態様は次のとおりである。

1. 鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルの調製方法であって、式 I

20



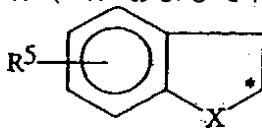
I

[式中、

R¹ および R² は、独立して、フェニルおよび C₁ - C₆ アルキルからなる群より選ばれ、各基はハロゲン、C₁ - C₃ アルコキシおよびフェノキシからなる群の 3 個までにより、場合によって、置換されてもよく；但し、R¹ および R² は互いに異なることを前提とする；あるいは、

R¹、R² およびそれらが結合される炭素は、一緒になって基

30



(ここで、X は、C = O, O, S および N H からなる群より選ばれ；R³ は、O H および N H₂ からなる群より選ばれ；R⁴ は、C₁ - C₆ アルキルであり；そして R⁵ は、ハロゲン および C₁ - C₃ フルオロアルコキシからなる群より選ばれる) を形成し、式中、キラル炭素は星印によって示されている)

のエステルの鏡像異性体の混合物と、

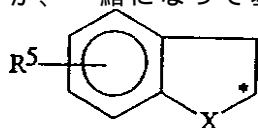
I M 6 0 L i p o z y m e ; C h i r a z y m e L - 2 リパーゼ ; C h i r a z y m e L - 5 リパーゼ ; C h i r a z y m e L - 7 リパーゼ ; S P 5 2 4 リパーゼ ; S P 5 2 6 リパーゼ ; S P 5 3 9 プロテアーゼ ; L i p o l a s e L i p a s e ; C R L i p a s e ; コリネバクテリウム・ホアギイ (Corynebacterium hoagii) A T C C 7 0 0 5 ; フラボバクテリウム種 (Flavobacterium sp.) A T C C 2 7 5 5 1 ; シュードモナス・オレオボランス (Pseudomonas oleovorans) N R R L - B - 3 4 2 9 ; シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) A T C C 2 3 9 7 3 ; シュードモナス種 (Pseudomonas sp.) N R R L - B - 1 1 3 3 0 ; ロドコッカス・エクイ (Rhodococcus equi) A T C C 1 4 8 8 7 ; ロドコッカス・エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis) A T C C 4 2 7 7 ; ロドコッカス・コプロ

40

50

フィラス (*Rhodococcus coprophilus*) NRRL - B - 16536 ; ロドコッカス・ロドニイ (*Rhodococcus rhodni*) NRRL - B - 16535 ; ロドコッカス・ロドクラス (*Rhodococcus rhodochrous*) ATCC 55602 ; ロドコッカス種 (*Rhodococcus sp.*) NRRL - B - 16531 ; ロドコッカス種 (*Rhodococcus sp.*) NRRL - B - 16534 ; ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) ATCC 6855 ; キサントモナス・カンペストリス (*Xanthomonas campestris*) ATCC 21818 ; カンジダ・ギリエルモンディイ (*Candida guilliermondii*) ATCC 6260 ; カンジダ・ケフィル (*Candida kefyr*) ATCC 4135 ; カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*) ATCC 46491 ; ロドトルラ・ルブラ (*Rhodotolula rubra*) ATCC 4557 ; ヤロウィア・リポリチカ (*Yarrowia lipolytica*) ATCC 9773 ; アスペルギルス・アリアクルス (*Aspergillus alliocrus*) ATCC 10060 ; ボーベリア・バッシアナ (*Beauveria bassiana*) ATCC 26037 ; ボーベリア・バッシアナ ATCC 74292 ; ボーベリア・バッシアナ ATCC 26851 ; ボーベリア・バッシアナ ATCC 38657 ; ボーベリア・ニベア (*Beauveria nivea*) ATCC 74294 ; クニンガメラ・エチヌラタ (*Cunninghamella echinulata*) ATCC 8688 ; ロホトリカス・マルチニイ (*Lophotrichus martinii*) ATCC 11221 ; ペシロミセス・マルクワンヂ (*Paecilomyces marquandi*) ATCC 10525 ; ペスタロチア・ミクロスボラ (*Pestalotia microspora*) ATCC 11816 ; リゾープス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*) ATCC 10404 ; リゾープス・オリゼ ATCC 22580 ; スポロボロミセス種 (*Sporobolomyces sp.*) ATCC 20290 ; トリコフィトン・コンセントリカム (*Trichophyton concentricum*) ATCC 74293 ; バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) NRRL - B - 14591 ; ノカルディア種 (*Nocardia sp.*) NRRL - B - 5646 ; シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*) ATCC 17453 ; サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) NRRL - Y - 2034 ; シゾサッカロミセス・オストスポラス (*Shizosaccharomyces ostosporus*) NRRL - Y - 854 ; アスペルギルス・アリアセウス (*Aspergillus alliaceus*) NRRL - 315 ; ペニシリウム・クリソゲナム (*Penicillium chrysogenum*) ATCC 10002 ; ペニシリウム・ノタータム (*Penicillium notatum*) ATCC 36740 ; アミコラトプシス・ルゴサ (*Amycolatopsis rugosa*) NRRL - B - 2295 ; ロドコッカス・エクイ ATCC 13556 ; ストレプトミセス・エンダス (*Streptomyces endus*) NRRL - B - 2339 ; アスペルギルス・カンヂダス (*Aspergillus candidus*) ATCC 20022 ; およびミコフィータ・ミクロスボラ (*Mycophyta microspora*) ATCC 89821 からなる群より選ばれる生体触媒とを接触させることを含む方法。

2. 式 I において、 R^1 が、場合によって、フェノキシにより置換されたフェニルであり ; R^2 が $C_1 - C_3$ アルキルであるか ; あるいは、 R^1 、 R^2 およびそれらが結合される炭素が、一緒になって基



[式中、X は、 $C(=O)$ であり ; R^3 は、OH であり ; R^4 は、 $C_1 - C_3$ アルキルであり ; そして R^5 は、ハロゲンである] を形成する、上記の 1 記載の方法。

10

20

30

40

50

3. 式 I の鏡像異性体エステル混合物が、5 - クロロ - 2 , 3 - ジヒドロ - 2 - ヒドロキシ - 1 - オキソ - 1 H - インデン - 2 - カルボン酸メチルであり、鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルが (+) 鏡像異性体であり、そして生体触媒が、コリネバクテリウム・ホアギイ A T C C 7 0 0 5、フラボバクテリウム種 A T C C 2 7 5 5 1、シュードモナス・オレオボランス N R R L - B - 3 4 2 9、シュードモナス・ブチダ A T C C 2 3 9 7 3、シュードモナス種 N R R L - B - 1 1 3 3 0、ロドコッカス・エクイ A T C C 1 4 8 8 7、ロドコッカス・エリスロポリス A T C C 4 2 7 7、ロドコッカス・コプロフィラス N R R L - B - 1 6 5 3 6、ロドコッカス・ロドニイ N R R L - B - 1 6 5 3 5、ロドコッカス・ロドクラス A T C C 5 5 6 0 2、ロドコッカス種 N R R L - B - 1 6 5 3 1、ロドコッカス種 N R R L - B - 1 6 5 3 4、ストレプトミセス・グリセウス A T C C 6 8 5 5、キサントモナス・カンペストリス A T C C 2 1 8 1 8、ロドトルラ・ルブラ A T C C 4 5 5 7、ボーベリア・バッシアナ A T C C 2 6 0 3 7、ボーベリア・バッシアナ A T C C 7 4 2 9 2、ボーベリア・バッシアナ A T C C 2 6 8 5 1、クニンガメラ・エチヌラタ A T C C 8 6 8 8、ペシロミセス・マルクワンヂ A T C C 1 0 5 2 5、ペスタロチア・ミクロスボラ A T C C 1 1 8 1 6、リゾーブス・オリゼ A T C C 1 0 4 0 4、リゾーブス・オリゼ A T C C 2 2 5 8 0、トリコフィトン・コンセントリカム A T C C 7 4 2 9 3 および Chirazyme L - 7 リパーゼから選ばれる、上記の 2 の方法。

4. 式 I の鏡像異性体エステル混合物が、5 - クロロ - 2 , 3 - ジヒドロ - 2 - ヒドロキシ - 1 - オキソ - 1 H - インデン - 2 - カルボン酸メチルであり、鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルが (-) 鏡像異性体であり、そして生体触媒が、カンジダ・ギリエルモンディイ A T C C 6 2 6 0、カンジダ・ケフィル A T C C 4 1 3 5、カンジダ・トロピカリス A T C C 4 6 4 9 1、ヤロウィア・リポリチカ A T C C 9 7 7 3、アスペルギルス・アリアクルス A T C C 1 0 0 6 0、ボーベリア・ニベア A T C C 7 4 2 9 4、ロホトリカス・マルチニイ A T C C 1 1 2 2 1、スポロボロミセス種 A T C C 2 0 2 9 0、バチルス・セレウス N R R L - B - 1 4 5 9 1、ノカルチア種 N R R L - B - 5 6 4 6、シュードモナス・ブチダ A T C C 1 7 4 5 3、サッカロミセス・セレピシエ N R R L - Y - 2 0 3 4、シゾサッカロミセス・オストスボラス N R R L - Y - 8 5 4、アスペルギルス・アリアセウス N R R L - 3 1 5、ペニシリウム・クリソゲナム A T C C 1 0 0 0 2、ペニシリウム・ノタータム A T C C 3 6 7 4 0、S P 5 2 4 リパーゼ、S P 5 2 6 リパーゼ、S P 5 3 9 プロテアーゼ、Chirazyme L - 2 リパーゼおよび Chirazyme L - 5 リパーゼから選ばれる、上記の 2 の方法。

5. 式 I の鏡像異性体エステル混合物が、 α - ヒドロキシ - α - メチル - 4 - フェノキシベンゼン酢酸エチルであり、鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルが (+) 鏡像異性体であり、そして生体触媒が、シュードモナス種 N R R L - B - 1 1 3 3 0、ロドコッカス・エクイ A T C C 1 3 5 5 6、カンジダ・トロピカリス A T C C 4 6 4 9 1、アスペルギルス・カンヂダス A T C C 2 0 0 2 2、ボーベリア・バッシアナ A T C C 2 6 8 5 1、ボーベリア・バッシアナ A T C C 3 8 6 5 7、ミコフィータ・ミクロスボラ A T C C 8 9 8 2 1、トリコフィトン・コンセントリカム A T C C 7 4 2 9 3、I M 6 0 L i p o z y m e、S P 5 2 4 リパーゼ、S P 5 2 6 リパーゼ、L i p o l a s e リパーゼおよび C R L i p a s e から選ばれる、上記の 2 の方法。

6. 式 I の鏡像異性体エステル混合物が、 α - ヒドロキシ - α - メチル - 4 - フェノキシベンゼン酢酸エチルであり、鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルが (-) 鏡像異性体であり、そして生体触媒が、アミコラトプシス・ルゴサ N R R L - B - 2 2 9 5 およびストレプトミセス・エンダス N R R L - B - 2 3 3 9 から選ばれる、上記の 2 の方法。

7. さらに、生体触媒反応混合物から鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルを分離する付加的段階を含む、上記の 1 の方法。

8. 該分離が、抽出または相分離によって達成される、上記の 7 の方法。

9. 5 - クロロ - 2 , 3 - ジヒドロ - 2 - ヒドロキシ - 1 - オキソ - 1 H - インデン - 2 - カルボン酸メチルの鏡像異性体エステル混合物と生体触媒とを接触させることを含む、鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルの調製方法であって、鏡像異性的に増強され

たカルボン酸エステルが(+)鏡像異性体であり、そして生体触媒が、 α -キモトリプシン、 β -キモトリプシン、 γ -キモトリプシンおよび δ -キモトリプシンから選ばれることを特徴とする調製方法。

10. さらに、生体触媒反応混合物から鏡像異性的に増強されたカルボン酸エステルを分離する付加的段階を含む、上記の9の方法。

11. 該分離が、抽出または相分離によって達成される、上記の10の方法。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 R	1/01	(2006.01)	C 1 2 R	1:645	
C 1 2 R	1/40	(2006.01)	C 1 2 P	41/00	D
C 1 2 R	1/38	(2006.01)	C 1 2 R	1:64	
C 1 2 R	1/20	(2006.01)	C 1 2 P	41/00	D
C 1 2 R	1/15	(2006.01)	C 1 2 R	1:545	
			C 1 2 P	41/00	D
			C 1 2 R	1:01	
			C 1 2 P	41/00	D
			C 1 2 R	1:40	
			C 1 2 P	41/00	D
			C 1 2 R	1:38	
			C 1 2 P	41/00	D
			C 1 2 R	1:20	
			C 1 2 P	41/00	D
			C 1 2 R	1:15	

(72)発明者 ウイツターホルト, ビンセント・ジー

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 8 0 3 - 2 4 2 2 ウイルミントン・スパルディングロード 3 3 4

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献 特開平 0 7 - 0 3 9 3 9 1 (J P , A)

J.Org.Chem., 1992, Vol. 57, No. 13, p. 3525-3527

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12P 1/00 - 41/00