

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-526293

(P2013-526293A)

(43) 公表日 平成25年6月24日(2013.6.24)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)
C 1 2 P 17/04 (2006.01) C 1 2 P 17/04 Z N A 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2013-512160 (P2013-512160)	(71) 出願人	512302533
(86) (22) 出願日	平成23年5月24日 (2011. 5. 24)		アボット プロダクツ オペレーションズ
(85) 翻訳文提出日	平成25年1月21日 (2013. 1. 21)		アーゲー
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/037745		スイス連邦 4 1 2 3 アルシュヴィル,
(87) 国際公開番号	W02011/149938		ヘーゲンハイマーマツヴェク, 1 2
(87) 国際公開日	平成23年12月1日 (2011. 12. 1)		7
(31) 優先権主張番号	61/347, 487	(74) 代理人	110000914
(32) 優先日	平成22年5月24日 (2010. 5. 24)		特許業務法人 安富国際特許事務所
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ロイド, マイケル チャールズ
			英国 シービー6 2ダブリュダブリュ
			ケンブリッジシャー州 イーリー, ウィ
			スジー ウェイ 5 2
		Fターム(参考)	4B064 AE44 CA21 DA01 DA11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 触媒を用いたシクロヘキサン - 1 , 2 - ジカルボン酸ジメチルの生物学的分割による (3 a S , 7 a R) - ヘキサヒドロイソベンゾフラン - 1 (3 H) - オンの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 触媒を用いたシクロヘキサン - 1 , 2 - ジカルボン酸ジメチルの生物学的分割による (3 a S , 7 a R) - ヘキサヒドロイソベンゾフラン - 1 (3 H) - オンの製造方法の提供。

【解決手段】 シクロヘキサン - 1 , 2 - ジカルボン酸ジメチルを酵素加水分解して (1 S , 2 R) - 2 - (メトキシカルボニル) シクロヘキサンカルボン酸を形成することを含む、 (3 a S , 7 a R) - ヘキサヒドロイソベンゾフラン - 1 (3 H) - オンの合成方法。上記酵素は非哺乳類由来とすることができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類由来でない酵素の存在下でシクロヘキサン - 1 , 2 - ジカルボン酸ジメチルを加水分解することを含む、(3 a S , 7 a R) - ヘキサヒドロイソベンゾフラン - 1 (3 H) - オンの製造方法。

【請求項 2】

酵素はリパーゼ又はエステラーゼである、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 3】

酵素は、元はオフィオストマ (O p h i o s t o m a) 属真菌から単離された組み換え酵素である、請求項 1 に記載の製造方法。

10

【請求項 4】

酵素はカンジダ・アンタークティカ リパーゼ B (C a n d i d a a n t a r c t i c a L i p a s e B) である、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 5】

酵素は、前記加水分解が可能な酵素をコードする、図 1 の配列番号 1、2 若しくは 3 の配列又はそれらの断片若しくは変異体を有する、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 6】

酵素はカイロテックエステラーゼ (C h i r o t e c h E s t e r a s e) K 又はカイロテックエステラーゼ (C h i r o t e c h E s t e r a s e) N である、請求項 1 に記載の製造方法。

20

【請求項 7】

前記酵素は固定化された形態である、請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 8】

少なくとも 9 5 % e e の (3 a S , 7 a R) - ヘキサヒドロイソベンゾフラン - 1 (3 H) - オンを製造する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 9】

少なくとも 9 8 % e e の (3 a S , 7 a R) - ヘキサヒドロイソベンゾフラン - 1 (3 H) - オンを製造する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 10】

哺乳類由来でない酵素の存在下でシクロヘキサン - 1 , 2 - ジカルボン酸ジメチルを加水分解することを含む、(1 S , 2 R) - 2 - (メトキシカルボニル) シクロヘキサンカルボン酸の製造方法。

30

【請求項 11】

酵素はリパーゼ又はエステラーゼである、請求項 10 に記載の製造方法。

【請求項 12】

酵素は、元はオフィオストマ (O p h i o s t o m a) 属真菌から単離された組み換え酵素である、請求項 10 に記載の製造方法。

【請求項 13】

酵素はカンジダ・アンタークティカ リパーゼ B (C a n d i d a a n t a r c t i c a L i p a s e B) である、請求項 10 に記載の製造方法。

40

【請求項 14】

酵素は、前記加水分解が可能な酵素をコードする、図 1 の配列番号 1、2 若しくは 3 の配列又はそれらの断片若しくは変異体を有する、請求項 10 に記載の製造方法。

【請求項 15】

酵素はカイロテックエステラーゼ (C h i r o t e c h E s t e r a s e) K 又はカイロテックエステラーゼ (C h i r o t e c h E s t e r a s e) N である、請求項 10 に記載の製造方法。

【請求項 16】

前記酵素は固定化された形態である、請求項 10 に記載の製造方法。

【請求項 17】

50

95% ee以上の(1S, 2R)-2-(メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸を製造する、請求項10~16のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項18】

98% ee以上の(1S, 2R)-2-(メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸を製造する、請求項10~16のいずれか1項に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

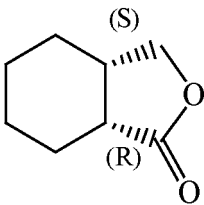
【0001】

本発明は、(2S, 3aR, 7aS)-ベンジルオクタヒドロ-1H-インドール-2-カルボン酸塩酸塩の合成中間体である(3aS, 7aR)-ヘキサヒドロイソベンゾフラン-1(3H)-オン(1)の製造方法に関する。

10

【0002】

【化1】



1

20

【背景技術】

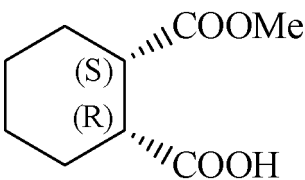
【0003】

従来の合成方法ではブタ肝臓エステラーゼを用いている。この方法のブタ肝臓エステラーゼの代わりに非哺乳類由来酵素を用いるほうが望ましい。また、上記ブタ肝臓エステラーゼを用いた生物学的分割によって得られた(1R, 2S)-2-(メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸(4)のエナンチオマー過剰率はたったの80% eeであり、これは、98% eeよりも高い物質を得るには塩の改質が必要なことを意味する。高ee物質をもたらし、そのためプロセス中での塩の改質ステップが必要ない代替の酵素は、単純で製造コストが低いものが相当であろう。また、固定化酵素を用いれば生体触媒が再利用しやすくなるであろう。

30

【0004】

【化2】



4

40

【0005】

様々な特許文献や学術論文に、光学純度の高い2-(メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸の製造方法が開示されている。特許文献1と非特許文献1及び2には、ブタ肝臓エステラーゼを触媒として用いたシクロヘキサン-1,2-ジカルボン酸ジメチル(2)の生物学的分割が記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第4,879,392号明細書

【非特許文献】

50

【0007】

【非特許文献1】F. Brion⁵, "Stereo selective Synthesis of a trans-Octahydroindole Derivative, Precursor of Trandolapril, an Inhibitor of Angiotensin Converting Enzyme," Tetrahedron Letters, Vol. 33, No. 34, 4889~4892頁, 1992

【非特許文献2】R. M. Borzilleri⁵, "Total Synthesis of the Unusual Marine Alkaloid (-)-Papuamine Utilizing a Novel Imino Ene Reaction," Journal of the American Chemical Society, Vol. 117, 10905~10913頁, 1995

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

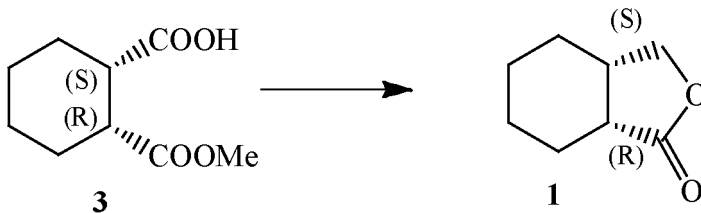
【0008】

本願の一態様は、(3aS, 7aR) - ヘキサヒドロイソベンゾフラン - 1(3H) - オン(1)の合成方法を提供する。ある態様において、本願は、(1)の製造中間体である(1S, 2R) - 2 - (メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸(3)の製造方法を提供する。

【0009】

20

【化3】



【図面の簡単な説明】

【0010】

30

【図1-1】カイロテックエステラーゼ (Chirotech Esterase) K、カイロテックエステラーゼ (Chirotech Esterase) N及びカンジダ・アンタラクティカ リパーゼ (Candida antarctica Lipase) として同定された3つの酵素の配列表である。

【図1-2】カイロテックエステラーゼK、カイロテックエステラーゼN及びカンジダ・アンタラクティカ リパーゼとして同定された3つの酵素の配列表である。

【図1-3】カイロテックエステラーゼK、カイロテックエステラーゼN及びカンジダ・アンタラクティカ リパーゼとして同定された3つの酵素の配列表である。

【図1-4】カイロテックエステラーゼK、カイロテックエステラーゼN及びカンジダ・アンタラクティカ リパーゼとして同定された3つの酵素の配列表である。

40

【図1-5】カイロテックエステラーゼK、カイロテックエステラーゼN及びカンジダ・アンタラクティカ リパーゼとして同定された3つの酵素の配列表である。

【図1-6】カイロテックエステラーゼK、カイロテックエステラーゼN及びカンジダ・アンタラクティカ リパーゼとして同定された3つの酵素の配列表である。

【発明を実施するための形態】

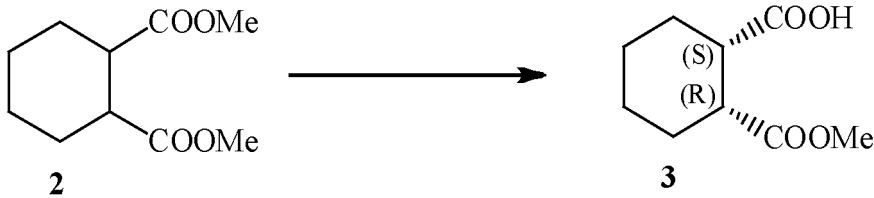
【0011】

本願の一態様は、シクロヘキサン - 1, 2 - ジカルボン酸ジメチル(2)の酵素的加水分解を含む、(1S, 2R) - 2 - (メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸(3)の合成方法を提供する。

【0012】

50

【化4】



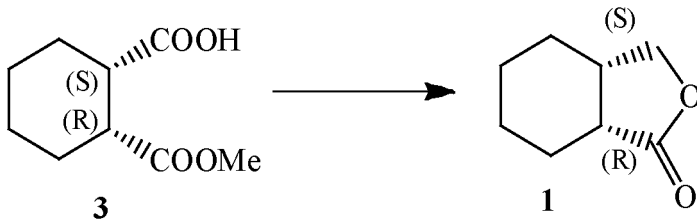
【0013】

本願の一態様は、(3)の還元的環化を含む、(3a S, 7a R) - ヘキサヒドロイソベンゾフラン - 1 (3H) - オン (1) の製造方法を提供する。

10

【0014】

【化5】



【0015】

本願の一態様は、酵素的加水分解において固定化酵素調製物を用いる方法を提供する。

20

【0016】

本願の一態様は、グルタルアルデヒド処理等によって架橋されたマトリクスを有する固定化酵素調製物を用いる方法を提供する。

【0017】

本願の一態様は、酵素的加水分解において、特に限定されないが、カイロテックエステラーゼ (Chirotech Esterase) K 又はカイロテックエステラーゼ (Chirotech Esterase) N (それらの配列表及び有用な野生型 CAL-B 酵素の配列表を図1に示す)、Novozymes A/S 製の Novozym (登録商標) (ノボザイム) 435、NZL-107 LYO 及び 42044、Codexis 製の ICR-110 CALB、Chiralvision 製の CV-CALB 及び CALB-Y、並びに、セリンエステラーゼ/チナーゼのいずれかのリパーゼ等の酵素を用いる方法を提供する。複数種の酵素の混合物も使用できる。酵素は、例えば、溶解させたり、酵素を固定化する樹脂中に分散させたりするなど、任意の物理的形態で使用できる。

30

【0018】

なかでも有用な酵素としては、カンジダ・アンタールクティカ (Candida antarctica) 由来のものが挙げられ、例えば、J. Uppenbergら, "The Sequence, Crystal Structure Determination and Refinement of Two Crystal Forms of Lipase B from Candida Antarctica," Structure, Vol. 2 (4), 293~308頁, 1994; 及び、J. Uppenbergら, "Crystallographic and Molecular-Modeling Studies of Lipase B from Candida Antarctica Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols," Biochemistry, Vol. 34 (51), 16838~16851頁, 1995に記載のもの等が含まれる。

40

【0019】

本願のいくつかの実施形態によれば、酵素的加水分解において Novozym (登録商標) (ノボザイム) 435 酵素を用いる方法が提供される。

【0020】

50

本願のいくつかの実施形態によれば、基質濃度が約 10 ~ 200 g / L である方法が提供される。

【0021】

本願のいくつかの実施形態によれば、基質濃度が少なくとも約 75 g / L である方法が提供される。

【0022】

本願のいくつかの実施形態によれば、酵素担持量が基質の重量に対して約 1 % ~ 約 20 % である方法が提供される。

【0023】

本願のいくつかの実施形態によれば、酵素担持量が基質の重量に対して約 10 % 未満である方法が提供される。

10

【0024】

本願のいくつかの実施形態によれば、酵素的加水分解温度が約 10 ~ 約 50 の範囲である方法が提供される。

【0025】

本願のいくつかの実施形態によれば、酵素的加水分解温度が約 40 である方法が提供される。

【0026】

本願のいくつかの実施形態によれば、酵素的加水分解 pH が約 6 ~ 約 9 の範囲である方法が提供される。

20

【0027】

本願のいくつかの実施形態によれば、酵素的加水分解 pH が約 7 ~ 約 8 の範囲である方法が提供される。

【0028】

本願の一態様は、反応容器に加水分解酵素を直接添加し、生物学的分割終了後に濾過して回収した後、新品のバッファで洗浄し、新品の基質 / バッファバッチに添加する方法を提供する。

【0029】

いくつかの実施形態によれば、新品のバッファはリン酸バッファである。

【0030】

本願の一態様は、加水分解酵素がカラムリアクター内に内包されており、上記カラムを通して生物学的分割バッチを連続的に循環させ、生物学的分割終了後に上記カラムを新品のバッファで洗浄し、次の基質 / バッファバッチを上記カラムを通して循環させることができる方法を提供する。

30

【0031】

いくつかの実施形態によれば、新品のバッファはリン酸バッファである。

【0032】

本願の一態様は、(1S, 2R) - 2 - (メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸(3)の還元的環化において、クロロギ酸 C₁ - C₆ アルキルを用い、水素化ホウ素で還元する方法を提供する。

40

【0033】

本願の一態様は、クロロギ酸 C₁ - C₆ アルキルがクロロギ酸エチルである方法を提供する。

【0034】

本願の一態様は、水素化ホウ素が水素化ホウ素ナトリウムである方法を提供する。

【0035】

本明細書では、酵素的加水分解の方法を例証するために、Novozym (登録商標) 435 酵素を用いている。この製品は、固定化された顆粒状のカンジダ・アンタークティカリパーゼ B (Candida antarctica Lipase B) であって、マクロ多孔質アクリル樹脂製高分子マトリクスを有する。Novozym 435 は哺乳

50

類由来ではなく、98% eeの物質を生成させることができるため、上記方法中で塩の改質ステップが不要である。この酵素源は、実験では少なくとも8回再利用できた。

【0036】

本願のいくつかの実施形態によれば、まず、(1S, 2R) - 2 - (メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸(3)をクロロギ酸エチルで処理して中間体混合無水物を得、次に水素化ホウ素ナトリウムで還元して対応のヒドロキシエステルを得、これがin situ環化して所望のcis - ラクトン物質が形成することによって、(3aS, 7aR) - ヘキサヒドロイソベンゾフラン - 1(3H) - オン(1)は製造される。

【0037】

Novozym(登録商標)435を触媒として用いたシクロヘキサン - 1, 2 - ジカルボン酸ジメチル(2)の生物学的分割によって、(1R, 2S) - ではなく(1S, 2R) - 2 - (メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸が生成する。しかしながら、下記合成ステップにおいて、エステル部分ではなく、酸部分が還元されると、ブタ肝臓エステラーゼを用いた場合に得られるものと同様の立体化学を有するcis - ラクトンが生じる。また、生物学的分割によって、従来法よりも著しくeeの高い物質が生成する(98%対80%)。Novozym(登録商標)435は固定化酵素製剤であり、生体触媒の再利用が可能である。非哺乳類酵素は再利用しやすく、高ee物質をもたらす。これにより、物質のeeを高めるために塩の改質を行う必要がない。

10

【0038】

定義

20

特に断りのない限り、本願の化合物に関して以下の定義を用いる。特定の基に含まれる炭素原子の数は、通常、「C_x - C_y」(x及びyはそれぞれ下限及び上限)で表される。例えば、「C₁ - C₆」で表される基は1~6つの炭素原子を含む。本明細書中の定義においては、炭素数は主鎖部炭素及び枝部炭素をいうが、アルコキシ置換基などの置換基の炭素原子は含まない。

【0039】

「アルキル(基)」は、直鎖又は分枝鎖であってもよい、記載された炭素数の炭化水素鎖をいう。特に数が示されてなければ、「アルキル」は、炭素数1~6(境界値を含む)の直鎖又は分枝鎖である。C₁ - C₆アルキル基としては、特に限定されないが、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、イソプロピル、イソブチル、sec - ブチル、tert - ブチル、イソペンチル、ネオペンチル及びイソヘキシルが挙げられる。

30

【0040】

「クロロギ酸C₁ - C₆アルキル」は、一般式：R - O - C(O) - Cl(RはC₁ - C₆アルキル基)で表される化合物をいう。

【0041】

「水素化ホウ素」は還元剤であり、エステルの存在下で酸を還元する。その例として、特に限定されないが、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素亜鉛、ジボラン、BH₃/THF、及び、9 - BBNが挙げられる。

40

【0042】

「ee」という用語は、物質のエナンチオマー過剰率を意味し、各エナンチオマー間のモル分率の差の絶対値として定義するものであり、%で表す。

【0043】

Celite(登録商標)として販売されている物質は融剤焼成珪藻土である。Celite(登録商標)はWorld Minerals Inc.の登録商標である。GCはガスクロマトグラフィである。NMRは核磁気共鳴分析法である。MTBEはメチルト - ブチルエーテル又は2 - メトキシ - 2 - メチルプロパンである。Novozym(登録商標)NZL - 107 LYOは真菌由来リパーゼである。Novozym(登録商標)435は、カンジダ・アンタールクティカ(Candida antarctica)由来のLipase Bが固定化された形態である。Novozym(登録商標)は、Novo

50

zyms A/S、Novo Industri A/S (デンマーク、Bagsvaerd DK-2880)の登録商標である。PLEはブタ肝臓エステラーゼである。Chirotech Esterase K310-903は、エステル、特にカルボン酸エステルの立体選択的加水分解を触媒する。カイロテックエステラーゼ (Chirotech Esterase) K310-903は、元はオフィオストマ (Ophiostoma) 属真菌から単離された組み換え酵素である。カイロテックエステラーゼ (Chirotech Esterase) N310-902は、エステル、特にカルボン酸エステルの立体選択的加水分解を触媒するものであり、元はオフィオストマ (Ophiostoma) 属真菌から単離された組み換え酵素である。

【0044】

本願の方法の特定の態様について、以下の実施例1及び2を参照して詳細に説明する。これらの実施例は例示のために記載したにすぎず、本開示の範囲を決して限定するものではない。

【0045】

実施例1：(1S, 2R) - 2 - (メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸(3)の製造

ジャケット付100mL容容器にシクロヘキサン - 1, 2 - ジカルボン酸ジメチル(2)、4g、20mmol)と0.1Mリン酸カリウムバッファ(39mL、pH8)を入れた。その混合液を40℃で連続的に攪拌し、Novozym(登録商標)435(320mg)を添加した。40℃で43時間攪拌し続け、2M NaOH溶液を添加してpHを8に維持した。反応液のサンプルをGCで分析して出発物質が5%未満しか残っていないことを確認した。反応混合液を濾過して酵素を除去し、濾液をトルエン(20mL)で抽出して残った出発物質を除去した。2M HClを用いて水相のpHを3.5に再調整し、MTBE50mLで2回抽出した。抽出物を合わせて、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮して、3.2g(86%)の(1S, 2R) - 2 - (メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸(3)をee = 98%の無色油状物として得た。分離した酵素は、次の基質/バッファバッチとともに再利用するために新品のバッファで洗浄する。

【0046】

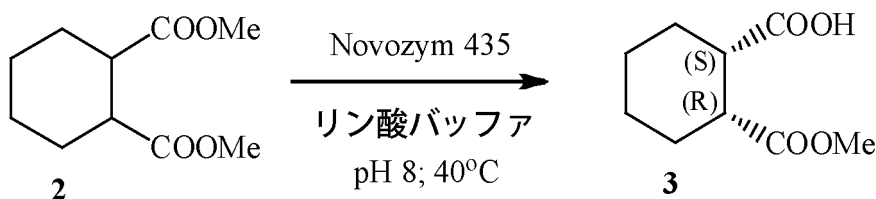
¹H-NMR (d₆-DMSO) : 1.2 - 1.7 (brs; 1H), 3.57 (s; 3H), 2.82 - 2.72 (m; 2H), 1.97 - 1.79 (m; 2H), 1.79 - 1.59 (m; 2H), 1.48 - 1.26 (m; 4H); ¹³C-NMR (d₆-DMSO) : 174.61, 173.62, 51.16, 41.63, 25.96, 25.60, 23.34, 23.17.

【0047】

GC分析条件は以下の通り。Chirasil Dex-CB 25m x 0.25mmカラム; ヘリウムキャリアガス20psi; オープンプログラム: 140℃で30分間保持した後、5℃/分で200℃まで昇温し、5分間保持(ランタイム約47分間); 検出器及びインジェクタ温度200℃; 2 - (メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸(1S, 2R)の保持時間36.99分、2 - (メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸(1R, 2S)の保持時間37.28分。

【0048】

【化6】



【0049】

実施例2：(3aS, 7aR) - ヘキサヒドロイソベンゾフラン - 1(3H) - オン(1

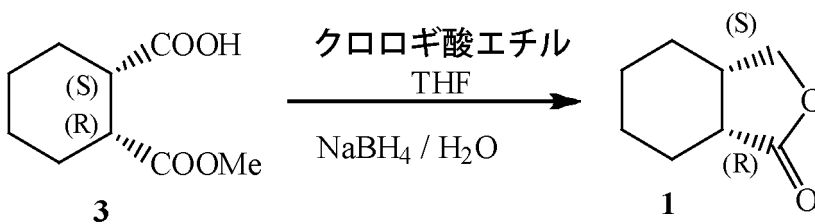
)の製造

ジャケット付25 mL容容器を0 未満に冷却し、(1S, 2R)-2-(メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸(3)、880 mg、4.72 mmol)とトリエチルアミン(659 μ L、4.72 mmol)をTHF(6.6 mL)に溶解させた溶液を入れた。クロロギ酸エチル(512 μ L、4.72 mmol)のTHF(1.2 mL)溶液を数分かけてゆっくり添加し、得た混合液を30分間攪拌した。析出したトリエチルアミン塩酸塩を濾別し、水素化ホウ素ナトリウムを水(4.6 mL)に懸濁した懸濁液に12 で濾液を滴下した。滴下終了後、反応混合液をさらに3.5時間20 で攪拌した。その後、反応混合液を10 未満に冷却し、2M HCl溶液でpH4まで酸性化し、ジクロロメタン15 mLで2回抽出した。有機抽出物を合わせて、硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧留去して、無色油状物450 mgを得た。この物質を短行程蒸留により精製して、無色油状物170 mgを $e = 98\%$ 及び $[\alpha]_D^{20} = -39.3^\circ$ (c1、メタノール)で得た。

10

【0050】

【化7】



20

【0051】

比較例：(1R, 2S)-2-(メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸の製造30 に設定したジャケット付2 L容容器にシクロヘキサン-1, 2-ジカルボン酸ジメチル(2)、84.6 g、0.42 mol)と0.1Mリン酸カリウムバッファ(900 mL、pH8)を入れた。その混合液を30 で連続的に攪拌し、PLE(600 mg、10200ユニット)を添加した。混合液を91時間攪拌し、5M NaOH溶液を添加してpHを8に維持した。混合液の一部をGCで分析して出発物質が5%未満しか残っていないことを確認した。その後、反応混合液をCelite(登録商標)ベッドを通して濾過し、濾液をMTBE(250 mL)で抽出して残った出発物質を除去した。その後、濃HClで水相をpH4まで酸性化し、MTBE500 mLで3回抽出した。抽出物を合わせて、硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を減圧留去して、69.28 g(収率88%)の(1R, 2S)-2-(メトキシカルボニル)シクロヘキサンカルボン酸(4)を $e = 79\%$ の無色油状物として得た。

30

【0052】

【化8】



40

【0053】

以上、本願の特定の実施形態を例証し、説明したが、本開示の趣旨及び範囲を逸脱することなく様々な変更及び改変が可能であることは当業者に明らかであろう。従って、添付の特許請求の範囲では本開示の範囲内のそのようなあらゆる変更及び改変を包含することを意図している。

【 図 1 - 1 】

Seq Id No 1: Chirotech Esterase K

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Ser Ala Met Gly Met Ser Ser Thr Phe
1 5 10 15

Glu Phe Glu Arg Val Ile Thr Lys Ala Val Glu Asp Arg Val Ile Pro
20 25 30

Gly Val Val Leu Leu Ala Glu Asn Ser Ser Gly Ser Tyr His Tyr Glu
35 40 45

Lys Val Leu Gly Tyr Ser Ser Ile Glu Ala Gly Asn Glu Lys Lys Leu
50 55 60

Glu Arg Asp Ser Val Phe Thr Phe Met Ser Met Thr Lys Phe Ile Thr
65 70 75 80

Ala Ile Val Ala Met Gln Ala Val Glu Arg Gly Leu Trp Asp Leu Asp
85 90 95

Ala Asp Val Ala Pro Leu Leu Pro Glu Leu Ala Ala Leu Pro Val Leu
100 105 110

Lys Gly Phe Ser Asp Asp Gly Val Pro Glu Leu Val Pro Arg Glu Ser
115 120 125

Ala Ile Thr Leu Arg Gln Leu Leu Ser His Thr Ser Gly Ala Ala Tyr
130 135 140

Asp Phe Leu Ser Pro Asp Leu Ile Asn Tyr His Ala Trp Val Arg Lys
145 150 155 160

Gln Pro Pro Ser Ala Gly Leu Glu Gln Pro Pro Ala Met Thr Val Ala
165 170 175

Pro Pro Ser Val Glu Glu Arg Phe Arg Phe Pro Leu Val Phe Gln Pro
180 185 190

Gly Gln Gly Trp Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Asp Trp Val Gly Arg Leu
195 200 205

Val Glu Arg Leu Asp Ala Lys Thr Gln Gly Lys Thr Glu Lys Glu Ala
210 215 220

【 図 1 - 3 】

Seq ID No 2: Chirotech Esterase N

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Ser Ala Met Gly Met Ser Ser Thr Phe
1 5 10 15

Glu Phe Glu Arg Val Ile Thr Lys Ala Val Glu Asp Arg Val Ile Pro
20 25 30

Gly Val Val Leu Leu Ala Glu Asn Ser Ser Gly Ser Tyr His Tyr Glu
35 40 45

Lys Val Leu Gly Tyr Ser Ser Ile Glu Ala Gly Asn Glu Lys Lys Leu
50 55 60

Glu Arg Asp Ser Val Phe Thr Phe Met Ser Met Thr Lys Phe Ile Thr
65 70 75 80

Ala Ile Val Ala Met Gln Ala Val Glu Arg Gly Leu Trp Asp Leu Asp
85 90 95

Ala Asp Val Ala Pro Leu Leu Pro Glu Leu Ala Ala Leu Pro Val Leu
100 105 110

Lys Gly Phe Ser Asp Asp Gly Val Pro Glu Leu Val Pro Arg Glu Ser
115 120 125

Ala Ile Thr Leu Arg Gln Leu Leu Ser His Thr Ser Gly Ala Ala Tyr
130 135 140

Asp Phe Leu Ser Pro Asp Leu Ile Asn Tyr His Ala Trp Val Arg Lys
145 150 155 160

Gln Pro Pro Ser Ala Gly Leu Glu Gln Pro Pro Ala Met Thr Val Ala
165 170 175

Pro Pro Ser Val Glu Glu Arg Phe Arg Phe Pro Leu Val Phe Gln Pro
180 185 190

Gly Gln Gly Trp Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Asp Trp Val Gly Arg Leu
195 200 205

Val Glu Arg Leu Asp Ala Lys Thr Gln Gly Lys Thr Glu Lys Glu Ala
210 215 220

Gly Thr Lys Leu Pro Ser Val Pro Leu Glu Glu Ile Val Ile Arg Asp
225 230 235 240

【 図 1 - 2 】

Gly Thr Lys Leu Pro Ser Val Pro Leu Glu Glu Ile Val Ile Arg Asp
225 230 235 240

Val Leu Thr Pro Leu Gly Leu Pro Ala Gly Ala Leu Thr Phe Ser Pro
245 250 255

Glu Arg Tyr Pro Asp Val Phe Ala Arg Met Trp Pro Ser Leu Pro Val
260 265 270

Arg Val Gly Asn Asn Gly Ala Leu Asp Gly Gly Pro Val Val His Gly
275 280 285

Pro Ser Val Tyr Lys Lys Ala Pro Ala Ala Leu Gly Gly Gln Gly Met
290 295 300

Tyr Gly Asp Met Pro Ser Phe Phe Lys Val Ala Leu Ser Ile Phe Arg
305 310 315 320

Asp Asp Gly Lys Leu Leu Lys Pro Glu Ser Thr Lys Leu Phe Phe Glu
325 330 335

Pro Gln Leu Ala Ser Glu Ala Ala His Ala Gly Ile Met His Gly Thr
340 345 350

Glu Asn Ser Gly Trp Ile Thr Gly Asp Val Pro Asp Thr Lys Glu Tyr
355 360 365

Asp Trp Ser Val Ala Gly Leu Leu Val Thr Gly Asp Ser His Pro Phe
370 375 380

Arg Lys Arg Gly Ala Val Leu Trp Ala Gly Ala Ile Asn Leu Thr Trp
385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Glu Ala Asp Val Cys Ala Val Phe Gly Ser Asn Tyr
405 410 415

Gln Pro Pro Gly Asp Gln Gln Gly Lys Ala Leu Met Arg Gln Trp Glu
420 425 430

Gln Phe Val Tyr Pro Gln Ala Lys Thr Ala Lys Leu
435 440

【 図 1 - 4 】

Val Leu Thr Pro Leu Gly Leu Pro Ala Gly Ala Leu Thr Phe Ser Pro
245 250 255

Glu Arg Tyr Pro Asp Val Phe Ala Arg Met Trp Pro Ser Leu Pro Val
260 265 270

Arg Val Gly Asn Asn Gly Ala Leu Asp Gly Gly Pro Val Val His Gly
275 280 285

Pro Ser Val Tyr Lys Lys Ala Pro Ala Ala Leu Gly Gly Gln Gly Met
290 295 300

Tyr Gly Asp Met Pro Ser Phe Phe Lys Val Ala Leu Ser Ile Phe Arg
305 310 315 320

Asp Asp Gly Lys Leu Leu Lys Pro Glu Ser Thr Lys Leu Phe Phe Glu
325 330 335

Pro Gln Leu Ala Ser Lys Ala Ala His Ala Gly Ile Met His Gly Thr
340 345 350

Glu Asn Ser Gly Trp Ile Thr Gly Asp Val Pro Asp Thr Lys Glu Tyr
355 360 365

Asp Trp Ser Val Ala Gly Leu Leu Val Thr Gly Asp Ser His Pro Phe
370 375 380

Arg Lys Arg Gly Ala Val Leu Trp Ala Gly Ala Phe Asn Leu Thr Trp
385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Glu Ala Asp Val Cys Ala Val Phe Gly Ser Asn Tyr
405 410 415

Gln Pro Pro Gly Asp Gln Gln Gly Lys Ala Leu Met Arg Gln Trp Glu
420 425 430

Glu Phe Val Tyr Pro Gln Ala Lys Thr Ala Lys Leu
435 440

【 1 - 5 】

Seq ID No 3: Candida antarctica lipase

Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser Val Leu
 1 5 10 15

Asp Ala Gly Leu Thr Cys Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val Ser Lys
 20 25 30

Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln Ser Phe
 35 40 45

Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr Pro Cys
 50 55 60

Trp Ile Ser Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val Asn Thr
 65 70 75 80

Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Gly Ser Gly Asn
 85 90 95

Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val Ala Gln
 100 105 110

Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp Arg Leu
 115 120 125

Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly Pro Leu
 130 135 140

Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr Thr Gly
 145 150 155 160

Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr Gln Ile
 165 170 175

Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val Gln Pro
 180 185 190

Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn Gly Lys
 195 200 205

Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Cys Gly Pro Leu Phe Val Ile Asp His
 210 215 220

Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg Ser Ala
 225 230 235 240

【 1 - 6 】

Leu Arg Ser Thr Thr Gly Gln Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly Ile Thr
 245 250 255



Asp Cys Asn Pro Leu Pro Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln Lys Val
 260 265 270

Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ile Val Ala Gly
 275 280 285

Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg Pro Phe
 290 295 300

Ala Val Gly Lys Arg Thr Cys Ser Gly Ile Val Thr Pro
 305 310 315

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2011/037745
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12P 17/04(2006.01)i, C12N 9/20(2006.01)i, C12N 9/16(2006.01)i, C07D 307/78(2006.01)i</i>		
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) C12P 17/04; C12P 7/62; C12N 11/10		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: (3aS,7aR)-hexahydroisobenzofuran-1(3H)-one, (1S,2R)-2-(methoxycarbonyl)cyclohexanecarboxylic acid, hydrolysis, cyclohexane-1,2-dicarboxylate, lipase, esterase, Candida antarctica, immobilization		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 05282313 A (KITCHELL, B. S. et al.) 16 November 1993 See abstract; fig.1; column 3, lines 25-40; column 9, lines 35-63;	1-7, 10-16
A	claims 1, 12.	8, 9, 17, 18
Y	US 04879392A A (BRION, F. et al.) 07 November 1989	1-7, 10-16
A	See columns 5, 6; claims 5.	8, 9, 17, 18
Y	JONES, J. B., CAN. J. CHEM. (1993) Vol.71, pages 1273-1282	1-7, 10-16
A	See abstract; p.1273, right column.	8, 9, 17, 18
A	TOONE, E. J. et al., J. AM. CHEM. SOC. (1990) Vol.112, pages 4946-4952 See abstract.	1-18
A	RENOLD, P. & TAMM, C., BIOCATALYSIS AND BIOTRANSFORMATION (1995) Vol.12, No.1, pages 37-46 See abstract.	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 application or patent 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 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 10 JANUARY 2012 (10.01.2012)		Date of mailing of the international search report 11 JANUARY 2012 (11.01.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer JEONG, JAE CHEOL Telephone No. 82-42-481-8403 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/037745

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

a. a sequence listing filed or furnished

- on paper
 in electronic form

b. time of filing or furnishing

- contained in the international application as filed
 filed together with the international application in electronic form
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/037745

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5262313 A	16. 11. 1993	None	
US 4879392 A	07. 11. 1989	EP 0267098 A1	11. 05. 1988
		EP 0267098 B1	22. 01. 1992
		JP 63-104957 A	10. 05. 1988
		JP 8002873 B2	17. 01. 1996

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW