

(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2005-520570

(P2005-520570A)

(43) 公表日 平成17年7月14日(2005.7.14)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 P 41/00

F I

C 1 2 P 41/00

D

テーマコード (参考)

4 B O 6 4

C 1 2 P 41/00

C

C 1 2 P 41/00

F

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁)

(21) 出願番号 特願2003-580559 (P2003-580559)  
 (86) (22) 出願日 平成15年3月21日 (2003. 3. 21)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年9月22日 (2004. 9. 22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/008941  
 (87) 国際公開番号 W02003/083126  
 (87) 国際公開日 平成15年10月9日 (2003. 10. 9)  
 (31) 優先権主張番号 60/366, 767  
 (32) 優先日 平成14年3月22日 (2002. 3. 22)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502141050  
 ダウ グローバル テクノロジーズ イン  
 コーポレイティド  
 アメリカ合衆国, ミシガン 48674,  
 ミッドランド, ワシントン ストリート,  
 1790 ビルディング  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次  
 (74) 代理人 100082898  
 弁理士 西山 雅也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロピレングリコールアルキル (又はアリール) エーテル及びエーテルアセテートの酵素分割

## (57) 【要約】

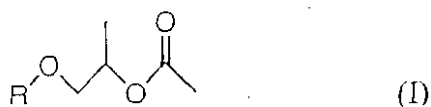
グリコールエーテルアセテート、詳細にはプロピレングリコールアルキル (又はアリール) エーテルアセテートを、高い基質濃度においてヒドロラーゼを用いたエナンチオ選択的加水分解によって酵素分割することができ; いくつかの実施態様においてヒドロラーゼはリパーゼである。グリコールエーテル、詳細にはプロピレングリコールアルキル (又はアリール) エーテルを、高い基質濃度においてアシル供与体の存在下でヒドロラーゼを用いたエナンチオ選択的エステル交換によって酵素分割でき; いくつかの実施態様においてヒドロラーゼはリパーゼである。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

反応混合物中において、式 I：

## 【化 1】



10

[ 式中、R はアルキル又はアリール基から選ばれる ]

のプロピレングリコールエーテルアセートラセミ体を有効量の酵素触媒ヒドロラーゼと接触させることによって前記ラセミ体の対掌体をプロピレングリコールエーテルの対応する異性体にエナンチオ選択的に加水分解することを含んでなる方法。

## 【請求項 2】

前記ラセミ体が約 10 % v / v 超の濃度である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記ラセミ体の R - 対掌体を対応する R - プロピレングリコールエーテルにエナンチオ選択的に加水分解する請求項 1 又は 2 に記載の方法。

20

## 【請求項 4】

前記ラセミ体の S - 対掌体を対応する S - プロピレングリコールエーテルにエナンチオ選択的に加水分解する請求項 1 又は 2 に記載の方法。

## 【請求項 5】

R が  $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  及び  $\text{C}_6\text{H}_5$  から選ばれる請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記ヒドロラーゼがリパーゼである請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記リパーゼが *Candida antarctica* リパーゼ・フラクション B、リパーゼ LP 'S'、*Pseudomonas* sp. リボ蛋白リパーゼ、*Pseudomonas* sp. リパーゼ又は及び *Pseudomonas cepacia* リパーゼである請求項 6 に記載の方法。

30

## 【請求項 8】

前記リパーゼが *Candida antarctica* リパーゼ・フラクション B である請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記ラセミ体が少なくとも 20 % v / v の濃度である請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記ラセミ体の約 30 % ~ 約 50 % が加水分解される請求項 8 に記載の方法。

40

## 【請求項 11】

加水分解されたラセミ体の対掌体純度が少なくとも約 70 % ee である請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 12】

b) 反応混合物から R - プロピレングリコールエーテルを回収することを更に含む請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 13】

a) 反応混合物から未反応 S - 対掌体基質を回収し；そして

b) 前記 S - 対掌体基質を転化して、対応する S - プロピレングリコールエーテルを得ることを更に含む請求項 3 に記載の方法。

50

## 【請求項 14】

b) 反応混合物から S - プロピレングリコールエーテルを回収することを更に含む請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 15】

a) 反応混合物から未反応 R - 対掌体基質を回収し；そして

b) 前記 R - 対掌体基質を転化して、対応する R - プロピレングリコールエーテルを得ることを更に含む請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 16】

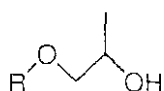
b) 酵素触媒を再循環させることを更に含む請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 17】

反応混合物中において、式 I I :

10

## 【化 2】



(II)

[ 式中、R はアルキル又はアリール基から選ばれる ]

20

のプロピレングリコールエーテルラセミ体を有効量の酵素触媒ヒドロラーゼと接触させることによって前記ラセミ体の対掌体をアシル化プロピレングリコールエーテルの対応する対掌体にエナンチオ選択的にエステル交換することを含んでなる方法であって、前記ラセミ体は少なくとも約 5 % v / v の濃度であり、前記ラセミ体混合物がアシル供与体を更に含み、前記アシル供与体が活性化エステル、エノールエステル及び無水物からなる群から選ばれた活性化アシル供与体である方法。

## 【請求項 18】

R が  $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  及び  $\text{C}_6\text{H}_5$  から選ばれる請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 19】

30

前記アシル供与体が酢酸ビニル、酢酸エチル、プロピオン酸ビニル、酢酸 2, 2, 2 - トリクロロエチル、酢酸 2, 2, 2 - トリフルオロエチル、酢酸ブチル、酢酸エチルフェニル、酢酸イソプロペニル、メトキシ酢酸エチル、酢酸 1 - エトキシビニル、ジケテン、酪酸トリフルオロエチル、無水酢酸、ラクチド及びコハク酸無水物から選ばれる請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 20】

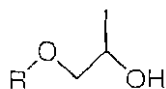
前記アシル供与体が酢酸ビニル及び酢酸イソプロペニルから選ばれる請求項 19 に記載の方法。

## 【請求項 21】

反応混合物中において、式 I I :

40

## 【化 3】



(II)

[ 式中、R はアルキル又はアリール基から選ばれる ]

のプロピレングリコールエーテルラセミ体を有効量の酵素触媒ヒドロラーゼと接触させ、

50

それによって前記ラセミ体の対掌体をアシル化プロピレングリコールエーテルの対応する対掌体にエナンチオ選択的にエステル交換することを含んでなる方法であって、前記ラセミ体が少なくとも約 5 % v / v の濃度であり、前記反応混合物がアシル供与体を更に含み、前記アシル供与体が酢酸エチル及びキラルアシル供与体からなる群から選ばれた非活性化アシル供与体である方法。

【請求項 22】

R が  $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  及び  $\text{C}_6\text{H}_5$  から選ばれる請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記アシル供与体がラセミ体 1 - メトキシ - 2 - プロパノールアセテート、ラセミ体 1 - エトキシ - 2 - プロパノールアセテート又はラセミ体 1 - プロピルオキシ - 2 - プロパノールアセテートである請求項 22 に記載の方法。

10

【請求項 24】

前記ヒドロラーゼがリパーゼである請求項 18 又は 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記リパーゼが *Candida antarctica* リパーゼ・フラクション B である請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記ラセミ体及び前記アシル供与体が反応混合物の約 100 % v / v を構成する請求項 17 又は 21 に記載の方法。

20

【請求項 27】

前記ラセミ体及び前記アシル供与体がラセミ体をアシル化プロピレングリコールエーテルに約 50 % 転化する比で存在する請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記ラセミ体の約 30 ~ 約 50 % をエステル交換する請求項 17 又は 21 に記載の方法。

【請求項 29】

アシル化プロピレングリコールエーテルの対掌体純度が少なくとも約 70 % ee である請求項 17 又は 21 に記載の方法。

【請求項 30】

a) 反応混合物からアシル化プロピレングリコールアルキルエーテルの目的対掌体を回収し；そして

30

b) 回収されたアシル化プロピレングリコールアルキルエーテル対掌体を転化して、プロピレングリコールアルキルエーテルの対応する対掌体を得ることを更に含む請求項 17 又は 21 に記載の方法。

【請求項 31】

反応混合物から未反応対掌体基質を回収することを更に含む請求項 17 又は 21 に記載の方法。

【請求項 32】

酵素触媒を再循環させることを更に含む請求項 17 又は 21 に記載の方法。

40

【請求項 33】

第 1 基質プロピレングリコールエーテルを第 2 基質アシル供与体でエステル交換するエステル交換によるプロピレングリコールエーテルのラセミ混合物の分割方法において基質転化度を制御する方法であって、

a) 転化基質の目的対掌体収率並びに転化及び / 又は未転化基質の目的純度を決定し；

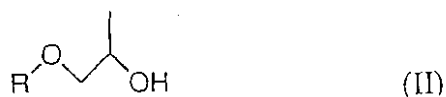
b) 前記目的収率及び前記目的純度を達成するための、第 1 基質と第 2 基質のモル比を計算し；

c) 前記目的収率及び前記目的純度を理論的に達成するための第 1 基質及び第 2 基質の量をモル比に基づいて計算し；

d) 反応混合物中において、式 I I :

50

## 【化 4】



[ 式中、R はアルキル、アリール、アリール置換アルキル、アリル又はアセタール基から選ばれる ]

のプロピレングリコールエーテルのラセミ混合物を含む第 1 計算量の第 1 基質並びに活性化エステル、非活性化エステル、エノールエステル及び無水物から選ばれた活性化又は非活性化アシル供与体であるアシル供与体を含む第 2 計算量の第 2 基質を、有効量の酵素触媒ヒドロラーゼと合し、それによってラセミ体の第 1 対掌体に対応する第 1 対掌体アシル化プロピレングリコールエーテルにエナンチオ選択的にエステル交換することを含んでなる基質転化度の制御方法。

## 【請求項 3 4】

第 1 計算量の第 1 基質及び第 2 計算量の第 2 基質が反応混合物の反応マトリックスの約 100% を構成する請求項 3 3 に記載の方法。

## 【請求項 3 5】

R が  $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ 、 $\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$  及び  $\text{CH}_2\text{OCH}_3$  から選ばれる請求項 3 3 に記載の方法。

## 【請求項 3 6】

a) 反応混合物から第 1 対掌体アシル化プロピレングリコールアルキルエーテル生成物を回収し；そして

b) 前記生成物を転化して、対応する第 1 対掌体プロピレングリコールアルキルエーテルを得ることを更に含む請求項 3 3 に記載の方法。

## 【請求項 3 7】

反応混合物から未反応の第 2 対掌体プロピレングリコールアルキルエーテルを回収することを更に含む請求項 3 3 に記載の方法。

## 【請求項 3 8】

酵素触媒を再循環することを更に含む請求項 3 3 に記載の方法。

## 【請求項 3 9】

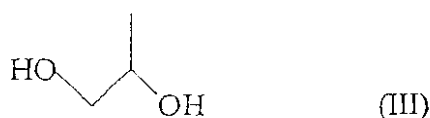
a) アシル化プロピレングリコールエーテルの収率及びアシル化若しくは非アシル化プロピレングリコールエーテルの対掌体純度を監視し；そして

b) 目的収率及び目的純度を達成するために第 2 基質に対する第 1 基質の比を調整することを更に含む請求項 3 3 に記載の方法。

## 【請求項 4 0】

式 I I I :

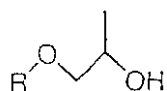
## 【化 5】



のキラル化合物の製造方法であって、

(a) 活性化エステル、エノールエステル及び無水物から選ばれたアシル供与体を更に含む反応混合物中で、式 I I :

【化 6】



(II)

10

[ 式中、R はアルキル、アリール置換アルキル、アリル又はアセタール基である ]  
 のプロピレングリコールエーテルラセミ体を、リパーゼ、エステルラーゼ、アシラーゼ及びプロテアーゼからなる群から選ばれた有効量の酵素触媒ヒドロラーゼと接触させることによって (S) - 1 - アルコキシ - 2 - プロパノール及び (R) - 1 - アルコキシ - 2 - プロパノールアシレートを得 ;

(b) 工程 (a) において形成された (R) - 1 - アルコキシ - 2 - プロパノールアシレートから (S) - 1 - アルコキシ - 2 - プロパノールを分離し ;

(c) 工程 (b) で分離された (S) - 1 - アルコキシ - 2 - プロパノールを緩和な反応条件下で酸触媒の存在下において脱アルコキシ化して、(S) - 1, 2 - プロパンジオールを得 ; そして

20

(d) 工程 (c) で得られた (S) - 1, 2 - プロパンジオールを単離する工程を含んでなるキラル化合物の製造方法。

【請求項 4 1】

(e) 工程 (b) で分離された (R) - 1 - アルコキシ - 2 - プロパノールアシレートを緩和な反応条件下で酸触媒の存在下において脱アルコキシ化して、(R) - 1, 2 - プロパンジオールを得 ; そして

(f) 工程 (e) で得られた (R) - 1, 2 - プロパンジオールを単離する工程を更に含む請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

R が  $C(CH_3)_3$ 、 $C(CH_3)_2C_6H_5$ 、 $C(CH_3)(C_6H_5)_2$ 、 $C(C_6H_5)_3$ 、 $C(CH_3)_2CH_2CH_3$ 、 $CH_2C_6H_5$ 、 $CH_2CH=CH_2$ 、 $CH_2C(CH_3)CH_3$ 、 $CH_2OCH_3$ 、 $CH_2OCH_2CH_3$  及び  $CH_2OCH_2CH_2CH_3$  から選ばれる請求項 4 0 に記載の方法。

30

【請求項 4 3】

R が  $C(CH_3)_3$  である請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記ヒドロラーゼがリパーゼ又はエステラーゼである請求項 4 0 ~ 4 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 5】

前記ヒドロラーゼが *Candida antarctica* リパーゼ・フラクション B である請求項 4 4 に記載の方法。

40

【請求項 4 6】

工程 (c) の酸触媒が p - トルエンスルホン酸又はイオン交換樹脂である請求項 4 0 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

(a) 酢酸ビニルを更に含む反応混合物中で、(R, S) - 1 - tert - ブトキシ - 2 - プロパノールを有効量の *Candida antarctica* リパーゼ・フラクション B と接触させ、それによって (S) - 1 - tert - ブトキシ - 2 - プロパノール及び (R) - 1 - tert - ブトキシ - アセトキシプロパンを得 ;

(b) 蒸留によって (R) - 1 - tert - ブトキシ - アセトキシプロパンから (S) - 1 - tert - ブトキシ - 2 - プロパノールを分離し ;

50

(c) 工程 (b) で分離された (S) - 1 - tert - ブトキシ - 2 - プロパノールを緩和な反応条件下で p - トルエンスルホン酸触媒の存在下において脱アルコキシル化して、(S) - 1, 2 - プロパンジオールを得；そして

(d) 工程 (c) で得られた (S) - 1, 2 - プロパンジオールを単離する工程を含む請求項 40 に記載の方法。

【請求項 48】

(e) 工程 (b) で分離された (R) - 1 - tert - ブトキシアセトキシプロパンを緩和な反応条件下で p - トルエンスルホン酸触媒の存在下において脱アルコキシル化して、(R) - 1, 2 - プロパンジオールを得；そして

(f) 工程 (c) で得られた (R) - 1, 2 - プロパンジオールを単離する工程を更に含む請求項 44 に記載の方法。

10

【請求項 49】

前記アシル供与体がラセミ体グリコールエーテルアセテートであり、前記方法が、反応と、蒸留又はストリップングによる副生成物アルコールの除去との組合せを含む請求項 21 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は生体触媒反応の分野である。本発明は、グリコールエーテル及びグリコールエーテルアセテートの酵素分割、詳細にはプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテル及びプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルアセテートの酵素分割に関する。

20

【背景技術】

【0002】

対掌体は、異なる空間配置を有する 2 つの異なる異性体の形態で存在できる不斉分子である。対称面を有さないので、対掌体はそれ自体の鏡像とは一致しない。2 つの対掌体の形態で存在する分子はキラルであり、これは、それらが「左」手の形態と「右」手の形態で存在すると考えることができることを意味する。有機分子におけるキラリティの最大の原因は、4 つの異なる置換基又は基に結合した四面体炭素の存在である。このような炭素はキラル中心、又は不斉中心と称される。不斉中心における原子の三次元配置（又は立体配置）を示す方法は、優先順位の最も低い基を仮想上の観察者から離して配向させた時の、基の優先順位の配列を見ることである。残りの 3 つの基の、優先順位の高いものから低いものへの配列が時計回りであれば、不斉中心は「R」（又は「D」）配置を有し；配列が反時計回りであれば、不斉中心は「S」（又は「L」）配置を有する。

30

【0003】

対掌体は同じ実験式を有し、反応においては一般に化学的に同一である。しかし、対掌体は他の不斉化合物に対しては異なる化学反応性を示し、非対称な物理的障害に対しても異なる反応を示す。最も一般的な非対称障害は偏光である。

【0004】

対掌体は、平面偏光を回転することができ；従って、対掌体は光学活性である。同一化合物の 2 つの異なる対掌体は平面偏光を反対方向に回転させる。従って、光は仮想上の観察者にとって左に、即ち反時計回りに回転されることができる（これは左旋性若しくは「l」、又はマイナス若しくは「-」である）か、あるいは右、即ち時計回りに回転されることができる（これは右旋性若しくは「d」、又はプラス若しくは「+」である）。旋光性の記号（+）又は（-）は、R、S 記号表示に関連しない。2 つのキラル対掌体の等量混合物はラセミ混合物又はラセミ体と称し、記号（+ / -）又は接頭語「d, l」によって右旋性の形態と左旋性の形態との混合物であることが表示される。ラセミ混合物は、等量の（+）型及び（-）型が存在するので、ゼロの旋光性を示す。しかし、一般に、単一の対掌体の存在は光を一方向にのみ回転させ；従って、単一对掌体は光学的に純粋であると言われる。

40

50

## 【0005】

光学的に純粋な化合物は、キラル出発原料として興味深い。1つの理由は、生体中の不斉分子は通常はそれらの可能なキラル型の一方の型だけで存在する。これに対して、キラル有機化合物を実験室で合成する場合には、合成反応（不斉触媒の不存在下における）は一般に両方のキラル型が等しい速度で生成され、生成物異性体の等モル混合物、即ちラセミ混合物が得られる。ラセミ混合物を2つの成分対掌体に分離することを分割と称するが、ラセミ混合物の分離はきわめて困難である（1つの方法は、ラセミ体と標準不斉化合物とを反応させ、異なる物理的性質を有する得られた生成物（ジアステレオマー）を分離し、次いで標準不斉化合物を除去することによる）。しかし、生体分子の三次元形状、即ち空間的配置はそれらの生物学的機能に極めて重要である。更に、同じ構造の対掌体は非常に異なる生物学的作用を有する場合がある。一例として、薬物サリドマイドはラセミ体として合成され、投与されたが、一方の対掌体のみが有効な制吐剤であり、他方の対掌体は催奇形物質として効力があつた。悲劇的にも、このことは妊婦にラセミ体が投与された後にわかつた。

10

## 【0006】

従つて、生物学的機能に関する分子（例えば薬物）の合成は、望ましい生物活性生成物を生じるであろう単一の対掌体から行うのが好ましい。例えば、キラル1,2-プロパンジオールは、心臓血管薬、抗ウィルス薬及び対掌体として純粋なクラウンエーテルの製造において有用である（非特許文献1）。これらの及び関連したキラル化合物はまた、キラルポリマーの出発原料、クロマトグラフィーマトリックスとして、又はLC若しくはNM

20

## 【0007】

Rによるキラル酸の立体化学分析用の誘導体化試薬として役立つことができる。医薬及び農業への使用の他に、光学活性第二アルコール、特に不斉炭素含有フルオロアルキル基（例えば、トリフルオロメチル-）を有する光学活性第二アルコールは強誘電性及び反強誘電性液晶において興味深い材料である（特許文献1；特許文献2）。

光学的に純粋な化合物は化学的に合成できるが、不斉化学合成は、高価で且つ/又は環境に有害な触媒を必要とすることが多く；更に、このような合成は典型的には多工程であり、しばしば、所定の化学的性質の構造要件を含む基質に限定される。典型的な化学合成から得られる異性体又は対掌体の混合物は、化学的又は酵素的に分割される（即ち純粋な対掌体に分離される）ことができる。ラセミ体の化学的分割は前述の通りである。ラセミ

30

## 【0008】

体の酵素的分割は、基質としてのラセミ体の一方の異性体に対する、酵素の優先性及び選択性に依存する。その結果、主に、好ましい基質から生成物が形成され、好ましくない基質はほとんど元の異性体のまま残される。ラセミ体の一方の異性体に対する酵素の優先性は、エナンチオ選択性として知られる。対掌体混合物の速度論的分割を実施するためにエステラーゼ、リパーゼ及びプロテアーゼを使用することは公知である。しかし、対掌体の混合物のエナンチオ選択的分割は、酵素の選択のみならず、酵素基質の化学構造にも非常に左右される。従つて、所定の基質又は一連の関連基質を分割するための酵素の最適な選択は、容易には予測されないが、可能性のある基質の化学構造を変えながら、種々の酵素を綿密にスクリーニングすることを必要とする。

いくつかのプロピレングリコールエーテル及び関連誘導体の酵素触媒分割のいくつかの例が、科学文献及び特許文献に記載されている。（±）-1-メトキシ-2-プロパノールの酢酸エステル及び酪酸エステルを含む、分割の困難な基質のエナンチオ選択的加水分解のためのスクリーニングが、最近文献記載された（非特許文献2）。著者らは、*Candida antarctica*からのリパーゼ・フラクションB（CAL-B）が（R）-1-メトキシ-2-プロパノールアセテートのエナンチオ選択的加水分解を触媒し、99%以上の対応する（S）-アセレート及び（R）-アルコールを最大収率（50%）で生成することを報告した。製造用規模の反応が、5.28%（w/v）1-メトキシ-2-プロパノールアセレート（基質20ミリモル、1.0mg/mlの酵素50mgに基づいて計算）を用いて50mlの規模で実施されたい。アシル供与体として酢酸ビ

40

50



ニルを用いた、ヘキサン中における 2, 7 % (w/v) (±) - 1 - メトキシ - 1 - プロパノールのエナンチオ選択的アシル化は、(R) - 1 - メトキシ - 2 - プロパノールアセテートを 98 % ee 及び基質転化収率 20 % で生成することが報告された (非特許文献 2)。

#### 【0009】

CAL - B リパーゼ (Novozyme 435) を用いた光学分割の別の例は、プロピオン酸ビニルを用いた 4 - イソプロピルオキシブタン - 2 - オールのエナンチオ選択的エステル交換による触媒反応であり、(R) - (+) - 4 - イソプロピルオキシブタン - 2 - プロピオネートが生成される (特許文献 1 及び 2)。エステルの化学的加水分解は、対応する (R) - アルコールを 95 % ee 超で生成した。

10

#### 【0010】

個々のプロピレングリコ - ルエーテル (例えば、プロピレングリコールフェニルエーテル又は 1 - フェノキシ - 2 - プロパノール) 及びそれらの対応する酢酸エステル (例えば、プロピレングリコールフェニルエーテルアセテート又は 1 - フェノキシ - 2 - プロピルアセテート) は、多くのグループによる生体触媒分割の対象であった。3つの日本国特許文献が、細胞全体、それらの製剤、それらに由来するリパーゼによるラセミ体酢酸エステルの処理によって、(R) - 及び (S) - 1 - アリールオキシ - 2 - アルカノールの両者を製造することを記載している (特許文献 3、4 及び 5)。これらの特許に記載された研究の多くは後で出版された (非特許文献 3)。更に、1 - フェノキシ - 2 - プロパノールのブタン酸エステルの加水分解分割が CAL - B 及び他のリパーゼを用いて研究された (非特許文献 1)。

1 - フェノキシ - 2 - プロパノールの 2 - クロロエチルブタノエート及び他のアシル供与体によるエステル交換が、生体触媒分割における対掌体比及び平衡定数の計算用のコンピュータプログラムの開発に使用されている (非特許文献 4 及び 5)。

1 - フェノキシ - 2 - プロパノール (約 3 % w/v) のエステル交換もまた、アシル供与体としてプロピオン酸ビニルを用いて、ポリマー活性化型の豚肝臓エステラーゼ (PLE) によって示されている (非特許文献 6)。

20

#### 【0011】

【特許文献 1】米国特許第 6, 239, 316 号

【特許文献 2】欧州特許出願公用第 99115154, 9 号

【特許文献 3】特開平 3 - 262377 号

30

【特許文献 4】特開平 3 - 262378 号

【特許文献 5】特開平 3 - 262379 号

#### 【0012】

【非特許文献 1】Hoff et al. (1996) Tetrahedron: Asymmetry 7: 3181 ~ 3186

【非特許文献 2】Baumann et al. (2000) Tetrahedron: Asymmetry 11: 4781 - 4790

【非特許文献 3】Yanase et al. (1993) Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1334 ~ 1337

【非特許文献 4】Anthonsen et al. (1995) Tetrahedron: Asymmetry 6: 3015 ~ 3022

40

【非特許文献 5】Hoff et al. (1996) Tetrahedron: Asymmetry 7: 3187 ~ 3192

【非特許文献 6】Gais et al. (2001) J. Org. Chem. 66: 3384 ~ 3396。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0013】

しかし、酵素による加水分解又はアシル化によるエナンチオ選択的分割は、関連プロピレングリコールアルキル (又はアリール) エーテル及びそれらの対応する酢酸エステルの

50

ラセミ体に関しては報告されていない（これらの関連グリコールエーテルの代表的構成員としては以下のものが挙げられるがこれらに限定されない：プロピレングリコールエチルエーテル、プロピレングリコール *n* - プロピルエーテル、プロピレングリコールイソプロピルエーテル、プロピレングリコール *n* - ブチルエーテル、プロピレングリコール *t* - ブチルエーテル、及びそれらの対応する酢酸エステル）。プロピレングリコールメチルエーテル若しくはプロピレングリコールフェニルエーテル又は対応する酢酸エステルを高基質濃度で加水分解あるいはアシル化して、生成物を高エナンチオ純度及び高収率で形成することについては反応条件も記載されていない。

#### 【0014】

グリコールエーテル及びそれらの対応する酢酸エステル、詳細には、プロピレングリコール（又はアリール）エーテル及びそれらの対応する酢酸エステルは、商業的に実現可能な方法で分割することが特に困難であった。従って、酵素的であって、高収率で高分離度が得られ且つ迅速で経済的な、プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテル及びそれらの対応する酢酸エステルのラセミ混合物の分割方法を開発できれば有用であろう。

10

#### 【0015】

##### 定義及び略語

本発明の理解を容易にするために、本明細書において使用した多数の略語、用語及びフレーズを以下に定義する。

「*Candida antarctica* リパーゼ・フラクション B」は、CALB 又は CAL-B と略す。

20

「酵素活性単位」は、U と略す。

「対掌体過剰」は、*ee* と略す。

「エナンチオ選択率」は、*E* と略す。

#### 【0016】

「プロピレングリコールメチルエーテル」（1 - メトキシ - 2 - プロパノール）は、PM と略す。

「プロピレングリコールメチルエーテルアセテート」（1 - メトキシ - 2 - プロパノールアセテート）は、PMA と略す。

「プロピレングリコールエチルエーテル」（1 - エトキシ - 2 - プロパノール）は、PE と略す。

30

「プロピレングリコールエチルエーテルアセテート」（1 - エトキシ - 2 - プロパノールアセテート）は、PEA と略す。

「プロピレングリコール *n* - プロピルエーテル」（1 - *n* - プロピルオキシ - 2 - プロパノール）は、P<sub>*n*</sub>P と略す。

「プロピレングリコール *n* - プロピルエーテルアセテート」（1 - *n* - プロピルオキシ - 2 - プロパノールアセテート）は、P<sub>*n*</sub>PA と略す。

「プロピレングリコールイソプロピルエーテル」（1 - イソプロピルオキシ - 2 - プロパノール）は、PiP と略す。

「プロピレングリコールイソプロピルエーテルアセテート」（1 - イソプロピルオキシ - 2 - プロパノールアセテート）は、PiPA と略す。

40

「プロピレングリコール *n* - ブチルエーテル」（1 - *n* - ブチルオキシ - 2 - プロパノール）は、P<sub>*n*</sub>B と略す。

「プロピレングリコール *n* - ブチルエーテルアセテート」（1 - *n* - ブチルオキシ - 2 - プロパノールアセテート）は、P<sub>*n*</sub>BA と略す。

「プロピレングリコール *tert* - ブチルエーテル」（1 - *tert* - ブチルオキシ - 2 - プロパノール）は、PtB と略す。

「プロピレングリコール *tert* - ブチルエーテルアセテート」（1 - *tert* - ブチルオキシ - 2 - プロパノールアセテート）は、PtBA と略す。

「プロピレングリコールフェニルエーテル」（1 - フェノキシ - 2 - プロパノール）は、

50

P P h と略す。

「プロピレングリコールフェニルエーテルアセテート」( 1 - フェノキシ - 2 - プロパノールアセテート ) は、P P h A と略す。

【 0 0 1 7 】

「プロピレン系グリコールエーテル」又は「P系グリコールエーテル」又は「P系基質」は、プロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテルを意味し、その例としては、前記化合物、P M、P E、P n P、P i P、P n P、P t B 及び P P h があげられるがこれらに限定されない。この種の化合物は一般に、プロピレンオキシドを塩基性条件下でアルコール官能基を含む化合物と反応させることによって製造されるすべてのグリコールエーテルを含む。

「プロピレン系グリコールエーテルアセテート」又は「P系グリコールエーテルアセテート」又は「P系酢酸エステル基質」は、プロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテルアセテートを意味し、その例としては、前記化合物、P M A、P E A、P n P A、P i P A、P n B A、P t B A 及び P P h A があげられるがこれらに限定されない。この種の化合物は一般に、主に、前に定義した「2 - プロパノールの1 - 置換エーテル」化合物のC - 2ヒドロキシル位における酢酸エステル誘導体を含む。

「プロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテル」は、P G A E と略す。

「プロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテルアセテート」は、P G A E A と略す。

【 0 0 1 8 】

「アシル化プロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテル」はアシル - P G A E と略し、P G A E A を含む。

「酢酸ブチル」は、B A と略す。

「酢酸4 - エチルフェニル」は、E P A と略す。

「酢酸エチル」は、E t A と略す。

「トリクロロ酢酸エチル」は、E t C A と略す。

「トリフルオロ酢酸エチル」は、E t F A と略す。

「酢酸イソプロペニル」は、I P A と略す。

「酢酸ビニル」は、V A と略す。

「メトキシ酢酸エチル」は、E M A と略す。

「酪酸2, 2, 2 - トリフルオロエチル」は、T f E B と略す。

「ジケテン」は、D K と略す。

「プロピオン酸ビニル」は、V P と略す。

「ラクチド」は、3, 6 - ジメチル - 1, 4 - ジオキサン - 2, 5 - ジオンである。

比「v / v」は、容量 / 容量である。

【 0 0 1 9 】

用語「異性体 ( i s o m e r )」は、分子式は同一であるが構造が異なる化合物を意味する。立体配置及び / 又は立体配座のみが異なる異性体は、「立体異性体」と称する。用語「異性体」はまた、対掌体を意味するのにも用いる。

【 0 0 2 0 】

用語「対掌体 ( e n a n t i o m e r )」は、互いに鏡像の関係にあり且つ重ね合わせできない1つの分子異性体の1つを記載するのに用いる。対掌体を表す又は意味するのに使用する他の用語としては、「立体異性体」(キラル中心の回りの配置、即ち空間的配置が異なるため；対掌体はすべて立体異性体であるが、立体異性体は必ずしも全てが対掌体ではない)又は「光学異性体」(純粋な対掌体は光学活性(光学活性は、異なる純粋な対掌体が平面偏光を異なる方向に回転させる能力である)であるため)が挙げられる。対掌体は一般に、融点及び沸点のような物理的性質が同一であり、また分光特性も同一である。対掌体は、平面偏光との相互作用に関して及び生物活性に関して互いに異なる可能性がある。

【 0 0 2 1 】

記号表示「R」及び「S」は、キラル中心周囲の分子の絶対配置を示すのに用いる。この記号表示は、接頭語又は接尾語として表示することができ；それらは、ハイフンによって異性体から分離してもしなくてもよく；ハイフンでつないでもつながなくてもよく；それらは丸括弧で囲んでも囲まなくてもよい。

#### 【0022】

記号表示又は接頭語「(+)及び(-)」は、化合物による平面偏光の回転の印を示すのに用い、(-)は、化合物が左旋性(左に回転)であることを意味する。(+)が前につけられた化合物は右旋性(右に回転)である。

#### 【0023】

用語「ラセミ混合物」、「ラセミ化合物」又は「ラセミ体」は、1つの化合物の2つの対掌体の混合物を意味する。理想的なラセミ混合物は、(+)対掌体の旋光性が(-)対掌体の旋光性を相殺するように、1つの化合物の両対掌体の50:50混合物であるものである。

#### 【0024】

用語「分割する」又は「分割」は、ラセミ混合物に関して使用する場合には、ラセミ体を2つの対掌体型(即ち(+)及び(-)；(R)及び(S)型)に分離することを意味する。これらの用語はまた、ラセミ体の一方の異性体を生成物にエナンチオ選択的に転化することを意味することができる。

#### 【0025】

用語「対掌体過剰」又は「e e」は、一方の対掌体が他方の対掌体より多く生成された反応生成物を意味し、(+) - 及び(-) - 対掌体の混合物に関して定義し、対掌体混合物の組成は、モル又は重量若しくは体積分率 $F_{(+)}$ 及び $F_{(-)}$ ( $F_{(+)}$ 及び $F_{(-)}$ の和=1)として示す。対掌体過剰は、 $*F_{(+)} - F_{(-)}$ として定義し、対掌体過剰%は $100 \times *F_{(+)} - F_{(-)}$ によって定義する。対掌体の「純度」は、そのe e又はe eパーセント値(% e e)によって記載される。

#### 【0026】

「精製対掌体」又は「純粋な対掌体」又は「分割(された)対掌体」又は「対掌体過剰の化合物」のいずれで表されても、これらの用語は、一方の対掌体の量が他方の対掌体の量より多いことを示すものである。従って、対掌体制剤に関しては、多い方の対掌体のパーセント(例えば、モル%又は重量%又は容量%)及び多い方の対掌体の対掌体過剰%の両方(又はいずれか)は、製剤が精製対掌体制剤であるかを判定するのに使用することができる。

#### 【0027】

異性体の「対掌体純度」は、精製対掌体の定性的又は定量的指標を意味し；典型的には、測定値はe e又は対掌体過剰に基づいて表す。

#### 【0028】

用語「実質的に精製された対掌体」、「実質的に分割された対掌体」、「実質的に精製された対掌体制剤」は、一方の対掌体が他方の対掌体よりも多く含まれる製剤(例えば、光学活性でない出発原料、基質又は中間体に由来するもの)、より好ましくは、他方の対掌体が、対掌体又は対掌体制剤の20%未満、より好ましくは10%未満、更に好ましくは5%未満、更に好ましくは2%未満に相当する製剤を示すものとする。

#### 【0029】

用語「精製された対掌体」、「分割された対掌体」及び「精製された対掌体制剤」は、一方の対掌体(例えば、R - 対掌体)が他方の対掌体よりも多く含まれる製剤(例えば、光学活性でない出発原料、基質又は中間体に由来するもの)、より好ましくは、他方の対掌体(例えば、S - 対掌体)が製剤の30%未満、好ましくは20%未満、より好ましくは10%未満(例えば、この場合には、R - 対掌体はS - 対掌体を実質的に含まない)、更に好ましくは5%未満、更にいっそう好ましくは2%未満に相当する製剤を示すものとする。精製対掌体は他方の対掌体を実質的に含まずに合成でき、あるいは精製対掌体は立体的に好ましい方法で合成した後に分離工程を行うこともできるし、あるいは精製対掌体

10

20

30

40

50

はラセミ混合物から得ることもできる。

【0030】

用語「エナンチオ選択率」は、対掌体比とも称され、記号「E」で示され、酵素が、生成物ラセミ混合物中において他方の対掌体に比べて一方の対掌体をラセミ基質から生成する選択的能力を意味する。即ちエナンチオ選択率は、酵素が2つの対掌体を区別するの能力の尺度である。非選択的反応はEが1であるが、Eが20超の分割は一般に合成又は分割に有用であると考えられる。エナンチオ選択性は、当該対掌体間の転化速度の差に存在する。反応生成物は、対掌体の一方が濃縮された形で得られ；逆に、残留基質は他方の対掌体が濃縮されている。実際的には、対掌体の一方が大過剰で得られることが一般に望ましい。これは、ある程度の転化率で転化プロセスを終了させることによって達成される。 10

【0031】

Eの計算は、3つの変数：出発原料の対掌体純度（ $e e_s$ ）、生成物の対掌体純度（ $e e_p$ ）、及び転化度（ $c$ ）のうち2つを測定することに基づく。次に、以下の3つの等式のうち1つを用いることができる（Hydrolyses in Organic Synthesis, Bornscheuer, UT and Kazlauskas, RJ (1999) Wiley-VCH, New York), section 3.1.1; 及び Chen et al., J. Am. Chem. Soc. 104: 7294 ~ 7299 (1982) から）:

$$E = \ln [1 - c(1 + e e_p)] / \ln [1 - c(1 - e e_p)]$$

$$E = \ln [(1 - c)(1 - e e_s)] / \ln [(1 - c)(1 + e e_s)]$$

$$E = \ln \{ (1 - e e_x) / [1 + (e e_s / e e_p)] \} / \ln \{ (1 + e e_x) / [1 + (e e_s / e e_p)] \}$$

20

【0032】

用語「アシル供与体」は、酵素触媒及び基質の存在下においてエステル形成を引き起こす、適当に反応する化合物を意味する。本発明において、基質はグリコールエーテル、詳細にはプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルであり、酵素触媒はヒドロラーゼ、好ましくはリパーゼ、更に好ましくはCAL-Bである。アシル供与体は、非活性化又は活性化アシル供与体を含む。非活性化アシル供与体の非限定的例としては、以下のものが挙げられる：プロピレングリコールメチルエーテルアセテート（PMA）、プロピレングリコールエチルエーテルアセテート（PEA）、プロピレングリコールn- 30  
プロピルエーテルアセテート（PnPA）、酢酸エチル（EA）、酢酸ブチル（BA）及びエチルフェニルアセテート（EPA）。活性化アシル供与体の非限定的例は、活性化エステル（その例としては酪酸トリフルオロエチル、S-エチルチオ-オクタノエート、及びピアセチルモノ-オキシムアセテートが挙げられるがこれらに限定されない）、エノールエステル（酢酸ビニル、酢酸イソプロペニル及び酢酸1-エトキシビニル及びジケテンが挙げられるがこれらに限定されない）、及び無水物（無水酢酸、ラクチド及びコハク酸無水物）である。アシル供与体の非限定的例としては、酢酸ブチル（BA）、酢酸エチルフェニル（EPA）、酢酸エチル（EtA）、トリクロロ酢酸エチル（EtCA）、トリフルオロ酢酸エチル（EtFA）、酢酸イソプロペニル（IPA）、酢酸ビニル（VA）、エチルメトキシアセテート（EMA）、酪酸2,2,2-トリフルオロエチル（TfEB）、ジケテン（DK）、プロピオン酸ビニル（VP）、PMA及びPnPAが挙げられる。 40

【0033】

用語「収率」は、酵素触媒反応における生成物の製造を記載するのに用いる場合には、その反応において生成物に転化された基質の量を意味する。収率は、反応混合物中にもともと存在する基質の量に基づき、生成物に転化された基質のパーセント（%）である。用語「収率」は、酵素触媒反応において残留未転化基質の量を記載するのに使用する。

【0034】

用語「転化率」は、酵素触媒反応における生成物の製造を記載するのに使用する場合には、反応において生成物に転化された基質の割合又はパーセントを意味する。 50

## 【 0 0 3 5 】

用語「反応混合物」は、酵素が基質を生成物に転化させる反応を触媒する、酵素触媒と基質との組合せを意味し；2種以上の基質（例えば、P G A E 及びアシル供与体）又は2種以上の生成物（例えば、P G A E A 及び P G A E ）が存在することもある。追加分も反応混合物中に存在できる。

## 【 0 0 3 6 】

用語「反応マトリックス」は、酵素触媒の存在を含まない反応混合物を意味し；従って、マトリックスは、酵素触媒が除かれた反応混合物であることができ、又は酵素触媒以外の反応混合物成分の組合せであることができる。

## 【 0 0 3 7 】

用語「反応媒体」は、酵素触媒及び少なくとも1種の基質が混ぜ合わされた（例えば、溶解又は懸濁又は混合された）溶液を意味する。媒体は、水性であることができ（好ましくは緩衝化されている）、又は水の他に溶媒を含むか、本質的に水の代替りの溶媒を含むこともできる。この溶媒は水中に可溶性でも不溶性でもよい。溶媒は、単一化合物でもよいし、いくつかの化合物の組合せでもよい。反応媒体中の溶媒の量は、ゼロ～媒体の約100%であることができる。

## 【 0 0 3 8 】

用語「二相反応媒体」は、水相と、水相とは不混和性で且つ基質（それ自体が溶媒である）に加えて存在する溶媒を含んでなる反応媒体を意味し；従って、二相反応媒体は、2相に分離する2種の不混和性溶媒を含んでなる。典型的には、このような反応媒体は、水相（一般には緩衝化されている）及び水相への溶解性が限られた有機溶媒を含んでなる。水相は極めて少なくすることができる（総反応混合物容量の約3%よりわずかに多く含むだけでよい）。

## 【 0 0 3 9 】

用語「非プロトン性」又は「非水」は、反応媒体に関して使用する場合には、水相を実質的に含まず（水相が総反応混合物容量の約3%又はそれ以下であるような）、且つ好ましくは無極性である少なくとも1種の溶媒（好ましくは、このような溶媒は有機溶媒である）を含んでなる反応混合物を意味する。

## 【 0 0 4 0 】

反応媒体に関して使用する用語「補助溶媒」は、基質及び生成物それら自体が溶媒である場合には、非基質溶媒及び非生成物溶媒を意味する。

## 【 0 0 4 1 】

用語「酵素触媒」は、基質を生成物に転化できる酵素を意味する。基質はエナンチオ選択的に生成物に転化されるのが好ましい。

## 【 0 0 4 2 】

用語「有効量」は、酵素に関して使用する場合には、基質が適度な時間内に適度なレベルで生成物に転化されるように反応を触媒する、反応混合物中に存在する酵素の量を意味する。ラセミ混合物に関する、生成物へのエナンチオ選択的基質転化の適度なレベルは、生成物又は残留生成物の目的収率及び目的純度によって決定されるであろう。典型的には、収率は目的生成物の約30～50%の範囲であり（反応転化率が基質の80%に近い場合でさえ）、純度は約75% ee～ee 99% ee 超の範囲である。適度な時間は、商業的に決定され；ラセミ混合物に関する生成物へのエナンチオ選択的基質転化については、時間は典型的に約1～約80時間であり、時間は回分法の場合にはバッチ（回分）反応期間であり、連続法の場合には、液体充填反応器容量を液体体積流量で割ったもので表される液体滞留時間である。

## 【 0 0 4 3 】

用語「再循環」は、酵素触媒に関して使用する場合には、2又はそれ以上のバッチの反応混合物中の酵素触媒の回収及び再利用、又は連続反応法における再利用による容積生産性の増大を意味する。用語「高生産性」は、酵素触媒に関して用いる場合、触媒が、回分又は連続操作モードにおいて、活性をほとんど低下させず、触媒単位重量当たり多量の液

10

20

30

40

50

体供給材料を処理するのに使用できることを意味する。

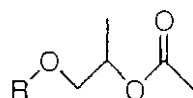
【課題を解決するための手段】

【0044】

本発明は、反応混合物中で、式 I :

【0045】

【化1】



(I)

10

【0046】

[ 式中、R はアルキル又はアリアル基から選ばれる ]

のプロピレングリコールエーテルアセートラセミ体を有効量の酵素触媒ヒドロラーゼと接触させることによってラセミ体の対掌体 (R 又は S) を対応するプロピレングリコールエーテルにエナンチオ選択的に加水分解することを含む方法を提供する。

【0047】

前記式 I 中の R の非限定的例は、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  及び  $\text{C}_6\text{H}_5$  である。

20

【0048】

本発明において使用するのに適当なヒドロラーゼ (加水分解酵素、hydrolase) はリパーゼ、エステラーゼ、アシラーゼ及びプロテアーゼからなる群から選ばれる。好ましいヒドロラーゼはリパーゼ及びエステラーゼである。最も好ましいヒドロラーゼはリパーゼであり; 特に好ましいリパーゼは、*Candida antarctica* リパーゼフラクション B、リパーゼ LP 'S'、*Pseudomonas* sp. リボ蛋白リパーゼ、*Pseudomonas* sp. リパーゼ及び *Pseudomonas cepacia* リパーゼからなる群から選ばれる。最も好ましいリパーゼは、*Candida antarctica* リパーゼ・フラクション B である。好ましいエステラーゼとしては、E001、E002 及び E003 (Thermogen Inc. から販売されている) 及び豚肝臓エステラーゼ (PLE) が挙げられる。反応混合物中のラセミ体の濃度は約 10% v/v 超、好ましくは約 20% v/v 超である。いくつかの実施態様においては、加水分解は水性反応媒体中で実施し; 別の実施態様においては、加水分解は二相反応媒体中で実施する。別の実施態様において、ラセミ体の約 30% ~ 約 50% を加水分解する。更に別の実施態様においては、加水分解されたラセミ体の対掌体純度は少なくとも 70% ee である。他の実施態様において、本発明の方法は更に、反応混合物から R - プロピレングリコールエーテルを回収することを含んでなる。更に他の実施態様において、本発明の方法は更に、反応混合物から未反応 S - 対掌体基質を回収し、そして化学的加水分解又はエステル交換のような方法によって S - 対掌体基質を転化して、対応する S - プロピレングリコールエーテルを得ることを含んでなる。更に他の実施態様において、本発明の方法は、酵素触媒を再循環することを更に含んでなる。

30

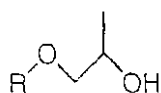
40

【0049】

別の側面において、本発明は、ラセミ混合物 (更にアシル供与体を含んでなる) 中で、式 II :

【0050】

## 【化 2】



(II)

## 【0051】

[ 式中、R はアルキル又はアリール基から選ばれる ]

のプロピレングリコールエーテルラセミ体（ラセミ体は少なくとも約 5 % v / v の濃度である）を、有効量の酵素触媒ヒドロラーゼと接触させ、それによってラセミ体の R - 対掌体に対応する R - アシル化プロピレングリコールエーテルにエナンチオ選択的にエステル交換することを含む方法を提供する。

## 【0052】

前記式 I I 中の R の非限定的例は、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  及び  $\text{C}_6\text{H}_5$  である。アシル供与体は、非活性化又は活性化アシル供与体であることができる。活性化アシル供与体は、活性化エステル、エノールエステル及び無水物から選ばれる。適当な活性化アシル供与体の非限定的例は、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル、酢酸 2, 2, 2 - トリクロロエチル、酢酸 2, 2, 2 - トリフルオロエチル、酢酸ブチル、酢酸エチルフェニル、酢酸イソプロペニル、メトキシ酢酸エチル、酢酸 1 - エトキシビニル、ジケテン、酪酸トリフルオロエチル、無水酢酸、ラクチド及びコハク酸無水物である。好ましい活性化アシル供与体は酢酸ビニル及び酢酸イソプロペニルである。適当な非活性化アシル供与体の非限定的例は、酢酸エチル、並びにキラルアシル供与体化合物、例えば、ラセミ体 1 - メトキシ - 2 - プロパノールアセテート（PMA）、プロピレングリコールエチルエーテルアセテート（PEA）、プロピレングリコール n - プロピルエーテルアセテート（PnPA）、酢酸エチル（EA）、酢酸ブチル（BA）及びエチルフェニルアセテート（EPA）である。本発明において使用するのに適当なヒドロラーゼは、リパーゼ、エステラーゼ、アシラーゼ及びプロテアーゼからなる群から選ばれる。好ましいヒドロラーゼはリパーゼ及びエステラーゼである。最も好ましいヒドロラーゼはリパーゼであり；特に好ましいリパーゼは、*Candida antarctica* リパーゼ・フラクション B、リパーゼ LP 'S'、*Pseudomonas* sp. リボ蛋白リパーゼ、*Pseudomonas* sp. リパーゼ及び *Pseudomonas cepacia* リパーゼからなる群から選ばれる。最も好ましいリパーゼは、*Candida antarctica* リパーゼフラクション B である。好ましいエステラーゼは、ポリマー活性化 - 豚肝臓エステラーゼ（PLE）である。ラセミ体及びアシル供与体は、ラセミ混合物を約 100 % v / v 含んでなることができる。いくつかの実施態様において、ラセミ体及びアシル供与体は、アシル化プロピレングリコールエーテルへのラセミ体の転化率を約 50 % とするような比で存在する。いくつかの実施態様において、ラセミ体の約 30 % ~ 約 50 % がエステル交換され、アシル化プロピレングリコールエーテルの対掌体純度は少なくとも約 70 % ee である。

## 【0053】

他の実施態様において、本発明の方法は更に、反応混合物から R - アシル化プロピレングリコールアルキルエーテルを回収し、そして R - アシル化プロピレングリコールアルキルエーテルを転化して対応する R - プロピレングリコールアルキルエーテルを得ることを含む。

## 【0054】

更に他の実施態様において、本発明の方法は更に、反応混合物から未反応 S - 対掌体を回収することを含む。更に別の実施態様において、本発明の方法は更に、酵素触媒を再循環することを含む。

## 【0055】

10

20

30

40

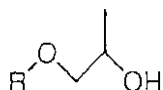
50



別の側面において、本発明は、第 1 基質プロピレングリコールエーテルを第二基質アシル供与体でエステル交換するエステル交換によるプロピレングリコールエーテルのラセミ混合物の分割方法において、基質転化度を制御する方法であって、(a) 転化基質の目的対掌体収率(典型的には、約 30% ~ 約 50%) 並びに転化及び / 又は未転化基質の目的純度(典型的に、転化率は約 30% ~ 約 70%、純度は 99% ee 超)を決定し; (b) 目的収率及び純度を達成するための、第 1 基質と第二基質のモル比を計算し; (c) 前記モル比に基づいて目的収率及び純度を理論的に達成するための、第 1 基質及び第二基質の量を計算し; そして (d) 反応混合物中で、式 I I :

【 0 0 5 6 】

【 化 3 】



(II)

10

【 0 0 5 7 】

[ 式中、R はアルキル、アリール、アリール置換アルキル、アリル又はアセタール基から選ばれる ]

のプロピレングリコールエーテルのラセミ混合物を含む第 1 基質の第 1 計算量並びに活性化エステル、非活性化エステル、エノールエステル及び無水物からなる群から選ばれたアシル供与体を含んでなる第 2 基質の第 2 計算量を、有効量の酵素触媒ヒドロラーゼと合し、それによってラセミ体の第 1 対掌体に対応する第 1 対掌体アシル化プロピレングリコールエーテルにエナンチオ選択的にエステル交換させることを含む方法をを提供する。

20

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施態様において、第 1 基質の第 1 計算量は、第 1 の容量であり、第 2 基質の計算量は第 2 の容量である。いくつかの実施態様において、第 1 基質の第 1 計算量及び第 2 基質の第 2 計算量は、反応混合物の反応マトリックスの約 100% を構成する。適当なアシル供与体は、非活性化又は活性化アシル供与体であることができる。活性化アシル供与体は、活性化エステル、エノールエステル及び無水物からなる群から選ばれる。好ましい活性化アシル供与体の非限定的例は、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル、酢酸 2, 2, 2 - トリクロロエチル、酢酸 2, 2, 2 - トリフルオロエチル、酢酸ブチル、酢酸エチルフェニル、酢酸イソプロペニル、メトキシ酢酸エチル、酢酸 1 - エトキシビニル、ジケテン、酪酸トリフルオロエチル、無水酢酸、ラクチド及びコハク酸無水物である。好ましい活性化アシル供与体は酢酸ビニル及び酢酸イソプロペニルである。適当な非活性化アシル供与体の非限定的例は、酢酸エチル、並びにキラルアシル供与体化合物、例えば、ラセミ体 1 - メトキシ - 2 - プロパノールアセテート (PMA)、酢酸ブチル (BA)、酢酸エチルフェニル (EPA)、酢酸エチル (EtA) 及び PnPA である。前記式 I I 中の R の非限定的例は、CH<sub>3</sub>、CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>、CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>、C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>、C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>、C(CH<sub>3</sub>)(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>、C(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>、C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>、CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>C≡CH、CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> 及び CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> である。

30

40

【 0 0 5 9 】

本発明において使用するのに適当なヒドロラーゼは、リパーゼ、エステラーゼ、アシラーゼ及びプロテアーゼからなる群から選ばれる。好ましいヒドロラーゼは、リパーゼ及びエステラーゼである。最も好ましいヒドロラーゼはリパーゼであり; 特に好ましいリパーゼは、Candida antarctica リパーゼ・フラクション B、リパーゼ LP 'S'、Pseudomonas sp. リポ蛋白リパーゼ、Pseudomonas sp. リパーゼ及び Pseudomonas cepacia リパーゼからなる群から選

50

ばれる。最も好ましいリパーゼは、*Candida antarctica* リパーゼ・フラクション B である。好ましいエステラーゼは、ポリマー活性化豚肝臓エステラーゼ (PLE) である。いくつかの実施態様において、ラセミ体の (R) - 対掌体は対応する (R) - 対掌体アシル化プロピレングリコールエーテルにエナンチオ選択的にエステル交換する。

#### 【0060】

他の実施態様において、本発明の方法は更に、反応体混合物から第 1 対掌体アシル化プロピレングリコールアルキルエーテル生成物を回収し、そして加水分解又はエステル交換のような適当な方法によって生成物を転化して、対応する第 1 対掌体プロピレングリコールアルキルエーテルを得ることを含む。

10

#### 【0061】

更に他の実施態様において、本発明の方法は更に、反応混合物から未反応の第 2 対掌体プロピレングリコールアルキルエーテルを回収することを含む。更に他の実施態様において、本発明の方法は更に、酵素触媒を再循環させることを含む。他の実施態様において、本発明の方法は更に、アシル化プロピレングリコールエーテルの収率及びアシル化又は非アシル化プロピレングリコールエーテルの対掌体純度を監視し、そして目的収率及び純度を得るために第 1 基質対第 2 基質の比を調整することを含んでなる。他の実施態様において、ラセミ体グリコールエーテルアセテートのアシル供与体としての使用を含む本発明の方法は更に、反応混合物からの副生成物アルコールの除去による、試薬の転化率の増加及び同一反応における 4 種以下のキラル化合物の生成を含む。

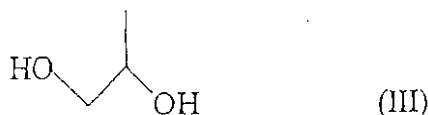
20

#### 【0062】

別の側面において、本発明は、R 又は S 配置の式 I I I :

#### 【0063】

#### 【化 4】



30

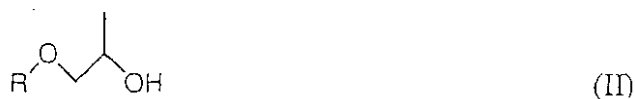
#### 【0064】

のキラル化合物の製造方法であって、前記方法が

(a) 約 4 ~ 約 80 の温度において反応混合物 (更に、活性化エステル、非活性化エステル、エノールエステル及び無水物からなる群から選ばれたアシル供与体を含む) 中で式 I I :

#### 【0065】

#### 【化 5】



40

#### 【0066】

[ 式中、R はアルキル、アリール置換アルキル、アリル又はアセタール基である ]

のプロピレングリコールエーテルラセミ体を有効量の酵素触媒、リパーゼ、エステラーゼ、アシラーゼ及びプロテアーゼからなる群から選ばれたヒドロラーゼと接触させ、それによって (S) - 1 - アルコキシ - 2 - プロパノール及び (R) - 1 - アルコキシ - 2 - プロパノールアシレートを得 ;

50

(b) 適当な分離法、例えば、蒸留又は抽出を用いて、工程(a)において形成された(R)-1-アルコキシ-2-プロパノールアシレートから(S)-1-アルコキシ-2-プロパノールを分離し；

(c) 緩和な反応条件下で、約5～15重量%、好ましくは5～10重量%の量の酸触媒、例えば、p-トルエンスルホン酸又はスルホン化イオン交換樹脂の存在下において、工程(b)で分離された(S)-1-アルコキシ-2-プロパノールを脱アルコキシル化して、(S)-1,2-プロパンジオールを得；そして

(d) 適当な分離方法、例えば、抽出及び/又は蒸留によって、工程(c)で得られた(S)-1,2-プロパンジオールを単離し；そして場合によっては更に

(e) 緩和な反応条件下で、約5～15重量%、好ましくは5～10重量%の酸触媒、例えば、p-トルエンスルホン酸又はスルホン化イオン交換樹脂の存在下において、工程(b)で分離された(R)-1-アルコキシ-2-プロパノールアシレートを脱アルコキシル化して、(R)-1,2-プロパンジオールを得；そして

(f) 適当な方法、例えば、抽出及び/又は蒸留によって、工程(e)において得られた(R)-1,2-プロパンジオールを単離する

工程を含む方法を提供する。

#### 【0067】

前記式II中のRの非限定的例は、 $C(CH_3)_3$ 、 $C(CH_3)_2C_6H_5$ 、 $C(CH_3)(C_6H_5)_2$ 、 $C(C_6H_5)_3$ 、 $C(CH_3)_2CH_2CH_3$ 、 $CH_2C_6H_5$ 、 $CH_2CH=CH_2$ 、 $CH_2C(CH_3)CH_3$ 、 $CH_2OCH_2CH_2OCH_3$ 及び $CH_2OCH_3$ である。アシル供与体は、非活性化又は活性化アシル供与体であることができる。活性化アシル供与体は、活性化エステル、エノールエステル及び無水物から選ばれる。適当な活性化アシル供与体の非限定的例は、酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル、酢酸2,2,2-トリクロロエチル、酢酸2,2,2-トリフルオロエチル、酢酸ブチル、酢酸エチルフェニル、酢酸イソプロペニル、メトキシ酢酸エチル、酢酸1-エトキシビニル、ジケテン、酪酸トリフルオロエチル、無水酢酸、ラクチド及びコハク酸無水物である。好ましい活性化アシル供与体は酢酸ビニル及び酢酸イソプロペニルである。適当な非活性化アシル供与体の非限定的例は、酢酸エチル、並びにキラルアシル供与体化合物、例えば、ラセミ体1-メトキシ-2-プロパノールアセテート(PMA)、プロピレングリコールエチルエーテルアセテート(PEA)、プロピレングリコールn-プロピルエーテルアセテート(PnPA)、酢酸エチル(EA)、酢酸ブチル(BA)及び酢酸エチルフェニル(EPA)である。

#### 【0068】

本発明において使用するのに適当なヒドロラーゼは、リパーゼ、エステラーゼ、アシラーゼ及びプロテアーゼからなる群から選ばれる。好ましいヒドロラーゼはリパーゼ及びエステラーゼである。最も好ましいヒドロラーゼはリパーゼであり；特に好ましいリパーゼは、*Candida antarctica*リパーゼ・フラクションB、リパーゼLP'S、*Pseudomonas* sp.リボ蛋白リパーゼ、*Pseudomonas* sp.リパーゼ及び*Pseudomonas cepacia*リパーゼからなる群から選ばれる。最も好ましいリパーゼは、*Candida antarctica*リパーゼ・フラクションBである。

#### 【0069】

適当な脱アルコキシル化触媒の非限定的例は、p-トルエンスルホン酸(p-TSA)、DOWEX DR-2030イオン交換樹脂、DOWEX MSC-1H+イオン交換樹脂、酸性白土、Nafion H+触媒及び無機酸、例えば、硫酸である。DOWEXは、the Dow Chemical Companyの商標である。NafionはDuPontの商標である。脱アルコキシル化工程は、約40～約130、好ましくは約80～約100の温度で実施するのが都合よい。前述のラセミ混合物の都合のよい速度論的分割は、どちらの対掌体生成物の理論最大収量も50%であるという不利点を有する。ラセミ基質中に存在する単一对掌体の完全変換は、動的速度論的分割によって達成できる。この方策は、基質のリパーゼ触媒アシル化とルテニウム触媒ラセミ化とを組合せて

10

20

30

40

50

、高収率及び高光学純度で生成物を形成できる。動的・速度論的分割において、基質の非反応性対掌体（リパーゼと反応しないか、ゆっくりとしか反応しないもの）が連続的にラセミ化され、生成物は理論的に、100%の収率で光学的に純粋な形態で得られる。このアプローチの例は、第2アルコール（Larsson, A. L. E. et al. 1997. *Angew. Chem.*, Int. Ed. Engl. 36: 1211~1212; Kim, M. - J. et al. 2001. *J. Org. Chem.* 66: 4736~4738）、ジオール（Pearson, B. A. et al. 1999. *J. Org. Chem.* 64: 5237~5249）、及び  $\alpha$ -ヒドロキシ酸エステル（Huerta, F. F. et al. 2000. *Org.*, Lett. 2: 1037~1040）に関して示されている。実際、約6%（w/v）1-フェノキシ-2-プロパノールのルテニウム-及び酵素-触媒動的・速度論的分割は、アシル供与体として酢酸4-クロロフェニルを用いてCAL-Bによって示されており（Persson et al. 1999. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 1645~1650）；R-1-フェノキシ-2-プロパノールが生成物として収率88%及び%ee > 99%で報告された-プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルのエステル交換に基づく分割へのこのアプローチの適用は、それから誘導される目的アシル化キラル生成物又は物質の収率を増大できるであろう。

10

#### 【0070】

##### 図面の説明

図1は、一連のプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテル及びそれらの対応する酢酸エステルを示す。

20

図2は、GC/FIDによって分析された反応混合物からの（S）-PMAの分割を示す。反応混合物は、水性媒体中にCAL-B（1.0 mg/ml Chirazyme L-2 lyo.）及び25%（v/v）PMAを含んでいた（リン酸ナトリウム緩衝液，pH 7.2）。保持時間：ラセミ体PM，2.81分；PMA-S，4.10分；PMA-R，4.24分。

#### 【0071】

図3は、CAL-B酵素濃度の関数としての（S）-PMAの分割を示す。水性反応混合物は、PMAを25%（v/v）で及びChirazyme L-2 lyo.を0.1 mg/ml（黒）、0.5 mg/ml（）、1.0 mg/ml（）及び2.0 mg/ml（）で含んでいた。

30

#### 【0072】

図4は、Chirazyme L-2, c.-f., C2装填量の関数として測定した、（a）（±）-1-メトキシ-3-プロパノール（PM）及び（b）（±）-1-フェノキシ-2-プロパノール（PPh）のエステル交換を示す。（R）-PM及び（R）-PPhAの対掌体過剰（%ee）及び転化率%は、理論転化率をそれぞれ35及び45%に限定するPM/VA（75:25，%v/v）及びPPh/VA（80:20，%v/v）の比を含む反応混合物において求めた。記号解説中の数字は、反応におけるChirazyme L-2, c.-f., C2の濃度をmg/mlで示す。

#### 【0073】

40

図5は、CAL-B（1 mg/ml）を含む反応混合物中における酢酸ビニル30%（v/v）によるPPh70%（v/v）のエナンチオ選択的アシル化を示す。

#### 【0074】

図6は、PEA加水分解に関する酵素再循環を示す。PEAの分割（%eeで表す）は、3つの異なる濃度のCAL-Bに関する酵素サイクルの関数として示し；サイクル時間は、サイクル3（48時間）並びにサイクル8及び13（60時間）を除いて、24時間であった。

#### 【0075】

図7は、スケールアップ条件下におけるPEA加水分解に関する酵素再循環を示す。PEAの分割（%eeで表す）は、インキュベーション時間の関数として示す。各サイクル

50

は、反応過程において、サンプルを除去し且つ分析することによって監視し；各サイクルの長さは約2時間～約9時間であった。反応混合物は1.5 lであり、PEAは20% v/vで存在し、酵素、固定化CAL-Bは反応器中に保持し、使用された反応混合物をサイクルの最後に反応器から除去し、新しい反応混合物を添加して新しいサイクルを開始した。反応がサイクル8、10、16及び25において減速したときに、新しい酵素（最初の装填量の10%）を添加した。

【0076】

図8は、32サイクルまでのスケールアップ条件下におけるPEA加水分解に関する酵素再循環を示す。(S)-PEA及び(R)-PEの両者の分割(% eeとして表す)及び総転化率(%として表す)をサイクル番号の関数として示す。反応混合物は1.5 lであり、PEAは20% v/vで存在し、酵素、固定化CAL-Bは反応器中に保持し、使用された又は分割された反応混合物をサイクルの最後に反応器から除去し、新しいサイクルを開始するために新しい反応混合物を添加した。各サイクルを反応過程（図7に示した反応と同様）において監視し、最後のサンプルを用いて、分割及び転化率を計算した。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0077】

本発明は、グリコールエーテル及びグリコールエーテルアセテートの酵素分割方法、詳細にはプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテル及びプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルアセテートの酵素分割に関する。

【0078】

本発明は、グリコールエーテル及びグリコールエーテルアセテートの、詳細にはプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテル及びプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルアセテートの酵素分割方法を提供する。

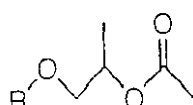
20

【0079】

代表的なグリコールエーテルアセテートは以下の化学構造を有する：

【0080】

【化6】



式 I

30

【0081】

[式中、Rはアルキル又はアリール基から選ばれる]。前記式 I IにおいてRで表されるアルキル及びアリール基の非限定的例は、CH<sub>3</sub>、CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>、CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>及びC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>である。

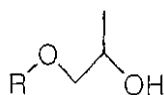
【0082】

代表的なグリコールエーテルは以下の化学構造を有する：

40

【0083】

【化7】



式 II

【0084】

50

[ 式中、R はアルキル又はアリール基から選ばれる ]。前記式 I I において R で表されるアルキル及びアリールの非限定的例は、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2$ 、 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3$ 、 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  及び  $\text{C}_6\text{H}_5$  である。

#### 【 0 0 8 5 】

前記式 I で表されるプロピレングリコールアルキル (又はアリール) エーテルアセテート及び前記式 I I で表されるプロピレングリコールアルキル (又はアリール) エーテルの非限定的例は、図 1 に示してある。

#### 【 0 0 8 6 】

ラセミ体プロピレングリコールアルキル (又はアリール) エーテルアセテートの酵素分割のための酵素触媒は、ラセミ混合物中に存在する 2 つの対掌体の一方の酢酸エステルのみを、高いラセミ混合物転化率 (例えば、いくつかの実施態様においては約 40 %、他の実施態様においては約 50 % の転化率) でにおいて高いエナンチオ選択率 (例えば、いくつかの実施態様においては残留基質が約 90 % 超、他の実施態様においては約 95 % 超の対掌体過剰 (e e)) で加水分解し、それによって残留プロピレングリコールアルキル (又はアリール) エーテルアセテート混合物を高分割する (例えば、いくつかの場合においては混合物は S - 異性体約 97.5 % 超及び R - 異性体約 2.5 % 未満を含んでなり; 他の実施態様においては、混合物は R - 異性体約 97.5 % 超及び S - 異性体約 2.5 % 未満を含んでなる) するものである。分割 (S) - プロピレングリコールアルキル (又はアリール) アセテートを生じる、R - 異性体のエナンチオ選択的加水分解の利点は、(S) - グリコールエーテルアセテートが比較的容易に対応する (S) - グリコールエーテルに化学的に転化されることである。

#### 【 0 0 8 7 】

キラル化合物のラセミ混合物の酵素分割における転化に関する e e 及びエナンチオ選択率 (E) の計算は文献記載されている (米国特許第 5,541,080 号)。

#### 【 0 0 8 8 】

本発明の開発過程において、110 種超の市販ヒドロラーゼ (リパーゼ、エステラーゼ、アシラーゼ及びプロテアーゼ) を最初に、試験グリコールアルキルエーテルアセテート、(±) - PMA [(±) - 1 - メトキシ - 2 - プロパノールアセテート] のラセミ混合物のエナンチオ選択的加水分解を触媒する能力に関してスクリーニングした。酵素スクリーニングは、0.5 % (v/v) PMA を含む水性反応条件下で実施した。DEX 325 によるキラル・キャピラリー・ガスクロマトグラフィーを用いて、酢酸エステル基質の対掌体組成及びアルコール生成物である 1 - メトキシ - 2 - プロパノール (PM) の形成を監視した。最初のスクリーニングの間に高いエナンチオ選択率を示した酵素の 1 つを、酵素バイオプロセスの開発を容易にするための、種々のパラメーター (即ち高基質濃度、二相条件、温度など) におけるその性能に関する次の試験のために選択した。同じ酵素はまた、別の関連プロピレングリコールアルキル又はアリールエーテルアセテートのエナンチオ選択的加水分解を触媒できた (実施例 5 参照)。

#### 【 0 0 8 9 】

110 種超の市販ヒドロラーゼのスクリーニングに基づく結果は、*Candida antarctica* リパーゼ B 型 (CAL - B) が、PMA [(±) - 1 - メトキシ - 2 - プロパノールアセテート] の (R) - 対掌体のエナンチオ選択的加水分解を触媒して、このグリコールエーテルアルキルアセテートの (S) - 対掌体を分割する (99 % e e 超) ことを示した (実施例 3 参照)。同じ酵素、CAL - B はまた、非プロトン性又は非水条件下におけるアシル供与体による PM のラセミ混合物のエナンチオ選択的アシル化 (エステル交換) を触媒して、対掌体として濃縮された (R) - PMA と未反応 (S) - PM を生成することがわかった (実施例 6 参照)。次いで、CAL - B 又は同様なリパーゼを使用することによって、光学活性 PMA 又は PM を生体触媒法において高収率で分割するための一般的条件を割り出した。分割された光学活性種 (グリコールエーテルアセテート及びグリコールエーテル) は共に多数の方法によって反応混合物から回収及び単離できる。このような方法としては、液液抽出、熱活性化分離、蒸留、固相抽出法、液固吸着、又

10

20

30

40

50

はそれらの組合せが挙げられる。好ましい実施態様においては、分割された光学活性種は蒸留される。回収された光学活性グリコールエーテルアセテートの化学的加水分解及びエステル交換のような方法は、対応するキラルグリコールエーテルを純粋な形態で容易に生成する。

#### 【0090】

110種超の市販ヒドロラーゼのパネルも、追加の関連グリコールエーテルアセテートのエナンチオ選択的加水分解に関してスクリーニングした。代表的な基質としては以下のものが挙げられる：(±)-1-エトキシ-2-プロパノールアセテート(PEA)、(±)-1-n-プロピルオキシ-2-プロパノールアセテート(PnPA)、(±)-1-イソプロピルオキシ-2-プロパノールアセテート(PiPA)、(±)-1-n-ブチルオキシ-2-プロパノールアセテート(PnBA)、及び(±)-1-フェノキシ-2-プロパノールアセテート(PPhA)(PMAと共に、これらの基質をP系基質と総称する)。スクリーニングされたP系基質に関しては、*Candida antarctica* リパーゼB(CAL-B)が最もエナンチオ選択的な酵素であった(例は表I~Vに示す)。Pseudomonas sp. リパーゼ(PSL)、*Candida antarctica* リパーゼA(CAL-A)及び*Candida rugosa* リパーゼ(CRL)を含む他のヒドロラーゼも、いくつかの基質のエナンチオ選択的加水分解を触媒した。

10

#### 【0091】

更に、リパーゼCAL-Bはまた、種々のアシル供与体(例えば酢酸エチル及び酢酸ビニル)が挙げられるがこれらに限定されない)と共に有機溶媒中におけるPE、PnP、PiP、PnB、PtB及びPPhのエステル交換に基づく分割に使用した。基質転化度に応じて、対応するグリコールエーテルアセテートの(R)-対掌体が高光学純度で生成物として形成され;これまた、残留未転化(S)-対掌体を高光学純度で存在させるであろう。

20

#### 【0092】

従って、本発明は、2つの異なる型の基質、プロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテル及びプロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテルアセテートの酵素分割方法を提供する。酵素触媒はヒドロラーゼであり、好ましくは可逆的にエステルの加水分解を触媒する。従って、酵素触媒、ヒドロラーゼはまた、エステル交換を触媒する。本発明の異なる実施態様において、どのようなラセミ体が基質であるか、また、適当な反応条件によって、酵素は2つの異なる反応のうち1つを触媒する。

30

#### 【0093】

いくつかの実施態様において、触媒される反応は加水分解反応であり、プロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテルアセテートがプロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテルに加水分解され、アセテート基を酢酸として遊離する。加水分解反応において、酵素は一方の異性体をエナンチオ選択的に加水分解し;その結果、この異性体の加水分解生成物が濃縮される。基質はもう一方の異性体の形で濃縮され、それほど急速には生成物に転化されない。従って、詳細な実施態様において、酵素がCAL-Bであり且つ基質がプロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテルアセテートのラセミ体である場合には、本発明の方法は、主にR型を生成物に転化するので、基質をS-プロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテルアセテートの形で濃縮し、また、S型をそれほど急速には生成物に転化しないので、生成物をR-プロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテルの形で濃縮する。従って、これらの実施態様において、加水分解反応の最後には、2つの主な対掌体はS-プロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテルアセテート及びR-プロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテルである。

40

#### 【0094】

他の実施態様において、触媒される反応はエステル交換であり、プロピレングリコールアルキル(又はアリール)エーテルはアシル基でエステル化される。エステル交換反応に

50

において、酵素はまた、一方の異性体をエナンチオ選択的にアシル化し、この結果、この異性体のアシル化生成物が濃縮され、また、基質はもう一方の異性体の形で濃縮され、これはそれほど急速には生成物に転化されない。詳細な実施態様において、酵素が C A L - B であり且つ基質がプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテル及びアシル供与体である場合には、本発明の方法は、主に R 型を生成物に転化するので、基質を S - プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルの形で濃縮し、また、S 型をそれほど急速には生成物に転化しないので、生成物を R - アシルプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルの形で濃縮する。従って、エステル交換反応の最後には、2 つの主な対掌体は、S - プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテル及び R - アシルプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルである。

10

#### 【0095】

従って、いくつかの実施態様において、本発明は、プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルアセテートのラセミ体の反応混合物中で有効量の酵素触媒ヒドロラーゼを接触させ、それによってラセミ体の一方の異性体に対応するプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルにエナンチオ選択的に加水分解することを含んでなる、プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルアセテートのラセミ混合物の分割方法を提供する。いくつかの実施態様において、酵素触媒はリパーゼ、C a n d i d a a n t a r c t i c a リパーゼ B ( C A L - B ) である。酵素触媒加水分解によってプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルアセテートのラセミ混合物を分割するための本発明の方法の詳細で好ましい実施態様についての追加情報は以下に記載する。

20

#### 【0096】

他の実施態様において、本発明は、プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルのラセミ体とアシル供与体との反応混合物中で有効量の酵素触媒ヒドロラーゼを接触させ、それによってラセミ体の一方の異性体に対応するプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルアシレートにエナンチオ選択的にエステル化することを含んでなる、プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルのラセミ混合物の分割方法を提供する。アシル供与体は他の適当に反応する化合物と交換すると、他のエステルを形成できるので、用語「アシル供与体」は総称的に用いられ；非限定的例としては、プロピオン酸ビニルの存在下におけるエステル交換ではプロピオニルエステルが形成される。いくつかの実施態様において、酵素触媒はリパーゼ、C a n d i d a a n t a r c t i c a リパーゼ B ( C A L - B ) である。酵素触媒エステル交換によってプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルのラセミ混合物を分割するための本発明の方法の詳細で好ましい実施態様についての追加情報は以下に記載する。

30

#### 【0097】

前記及び下記の加水分解又はエステル交換によるラセミ体の分割において、反応、即ち基質の生成物への転化は、多数の公知手段によって監視できる。好ましい方法としては反応体及び生成物のガスクロマトグラフィー ( G C ) による分析が挙げられ、それらのうちいくつかの異なる方法を実施例に記載してある（実施例 1 参照）。生成物の収率は、生成物に転化された基質の百分率として表し；この百分率は典型的にはモル基準で表すが、重量基準又は容量基準で表すこともできる。理想的ラセミ混合物中の任意の 1 つの特定の異性体に関しては、理論最大収率は 50 %（モル基準で表される場合）であり；これは、一方の異性体が全て生成物に転化され、他方は全く転化されなかったのに相当する。しかし、任意の特定の反応に関してはいずれも、理論最大収率は、基質の全てが生成物に転化される 100 % である。反応の特定の点における生成物又は残留基質の純度は、対掌体過剰、即ち、e e として表す。e e は、生成物又は基質の対掌体濃縮に相当し、理論最大は 100 % である。反応条件は、効率よく且つ低コストで基質転化を行いながら、その対掌体に関して理論最大収率及び e e に近づくように最適化する。最適反応条件は、50 % の転化率を可能にし、エナンチオ純粋な生成物（99 % e e 超）を形成するであろう。40 ~ 50 % の転化率及び高エナンチオ純度でどちらか一方の生成物の分割を可能にする条件も

40

50



また、望ましい。どちらか一方の対掌体が濃縮されているがホモキラルでない回収生成物は、所望のエナンチオ純度を得るための引き続く分割のために基質として使用できる。

【0098】

以下の説明は、本発明の詳細で好ましい実施態様についての追加情報を提供する。

酵素触媒

プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルアセテートのラセミ体の分割方法を提供する本発明のいくつかの実施態様において、プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルアセテートのラセミ体を分割するための酵素触媒は、ラセミ体の一方の異性体をエナンチオ選択的に加水分解するヒドロラーゼであり；エナンチオ選択的加水分解は、高対掌体純度の生成物又は出発原料を生じるのが好ましい。典型的に、生成物の高対掌体純度は、基質の生成物への転化率50%未満で得られるのに対し、基質の高対掌体純度は50%超の転化率で得られる。好ましくは、グリコールエーテル生成物の対掌体純度は約55% ee超であり、より好ましくは約70% ee超、更に好ましくは約80% ee又は85% ee超、最も好ましくは約95% ee又は98% ee超である。好ましい実施態様において、酵素触媒はR-異性体酢酸エステルを加水分解する。

10

【0099】

ヒドロラーゼはリパーゼ又はエステラーゼである。リパーゼ及びエステラーゼは共に、特にカルボン酸エステラーゼがエステルの加水分解を触媒する。代表的なヒドロラーゼは表I～Vに記載してあり、その例としては以下のものが挙げられるがこれらに限定されない：Candida antarcticaリパーゼB、Pseudomonas sp.リボ蛋白リパーゼ、Pseudomonas sp.リパーゼ、Pseudomonas cepaciaリパーゼ及びエステラーゼ。いくつかの好ましい実施態様においては、ヒドロラーゼは、水不溶性エステルの加水分解を優先的に触媒するリパーゼである。

20

【0100】

プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルのラセミ体の分割方法を提供する本発明の他の実施態様において、プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテルのラセミ体を分割するための酵素触媒は、アシル供与体の存在下でラセミ体の一方の異性体をエナンチオ選択的にエステル交換するヒドロラーゼであり；エナンチオ選択的エステル交換は高対掌体純度の生成物又は出発原料を生じるのが好ましい。典型的には、生成物の高対掌体純度は、基質の生成物への転化（又はグリコールエーテルのエステル化）率50%未満で得られるのに対し、基質の高対掌体純度は50%超の転化率で得られる。好ましくは、グリコールエーテルアシレート生成物の対掌体純度は約55% ee超であり、より好ましくは約70% ee超、更に好ましくは約80% ee又は85% ee超、最も好ましくは約95% ee又は98% ee超である。好ましい実施態様において、酵素触媒はR-異性体エーテルをエステル交換する。

30

【0101】

ヒドロラーゼはリパーゼ又はエステラーゼである。リパーゼ及びエステラーゼは共に、特にカルボン酸エステラーゼがエステルの加水分解を触媒する。代表的なヒドロラーゼは表I～Vに記載してあり、その例としては以下のものが挙げられるがこれらに限定されない：Candida antarcticaリパーゼB、Pseudomonas sp.リボ蛋白リパーゼ、Pseudomonas sp.リパーゼ、Pseudomonas cepaciaリパーゼ及びエステラーゼ。いくつかの好ましい実施態様においては、ヒドロラーゼは、水不溶性エステルの加水分解を優先的に触媒するリパーゼである。

40

【0102】

本発明の種々の実施態様において同一酵素を使用することは必要ではない。従って、ある1つの酵素をエナンチオ選択的加水分解によるグリコールエーテルアセテートのラセミ体の分割に使用し、それとは異なる酵素をエナンチオ選択的エステル交換によるグリコールエーテルのラセミ体の分割には使用することができる。本発明のいくつかの実施態様において、酵素触媒はリパーゼ、Candida antarcticaリパーゼB（CAL-B）である。本発明の異なる実施態様において、この酵素は加水分解及びエステル交

50

換の両方に使用する。

【0103】

Candida antarctica リパーゼ B (CAL-B) は、文献記載された方法 (Patkar et al. (1993) Ind. J. Chem., Sect. B 32B: 76~80) に従って、Candida antarctica 細胞から単離することもできるし、あるいは商業的供給源から入手し (例えば、NOVO Nordisk から SP 525; Roche Molecular Biochemicals から CHIRAZYME, RTM, L-2, lyo) 且つ前処理せずに触媒として使用することもできる。CAL-B はまた、ポリマーマトリックス中で可溶性若しくは不溶性有機担体 (例えば、Novo Nordisk からの NOVOZYM, RTM, 435; Roche からの Chirazyme L-2, c.-f., lyo (キャリア1); Roche からの Chirazyme L-2, c.f., C2 (キャリア2))、又は再利用のための触媒回収を単純にする無機担体上に固定化することもできる。これらの固定化方法は広範に報告されており、当業者にはよく知られている。反応混合物からの可溶性酵素の膜分離も使用できる。

10

【0104】

遺伝子改変 CAL-B を含む、CAL-B と同様な基質活性及びエナンチオ特異性を有するリパーゼも本発明に使用できる。他の実施態様において、酵素触媒は、CAL-B 又は他の適当なリパーゼ若しくはエステラーゼを発現する遺伝子組み換え全細胞形質転換体から、あるいは公知の方法によってこのような形質転換体から得られる製剤から得られる。

20

【0105】

加水分解による分割

グリコールエーテル、詳細にはプロピレングリコールアルキル (又はアリール) エーテルアセテートのラセミ体を分割するための加水分解反応の種々のパラメーターは、評価し、最適化できる (実施例 3~5 参照)。加水分解反応は、酵素触媒とラセミ基質との組合せである反応混合物中で起こり、酵素がエナンチオ選択的加水分解反応を触媒して基質を生成物に転化する。2 種以上の基質又は 2 種以上の生成物も存在できる。追加成分も反応混合物中に存在できる。反応条件は、種々の反応パラメーターの相対的重要性及び反応の間に到達すべき種々のパラメーターの目的値に応じて最適化する。種々のパラメーターの非限定的例としては、分割すべき対掌体の種類、収率及び純度の程度、分割すべきラセミ体の量又は分割される対掌体の目的量、所望の反応時間、及び添加すべき酵素触媒の量が挙げられる。従って、いくつかの実施態様においては、PMA のラセミ体のエナンチオ選択的加水分解の最適条件又は最適に近い条件を用いて高基質装填量を実現することによって、低濃度の酵素を用いて高純度の分割対掌体を得られる。「基質装填量」とは、反応混合物中に存在する基質の最初の量又は濃度を意味する。典型的には、転化率は約 30~約 50%、加水分解生成物の対掌体純度は少なくとも約 70% ee、好ましくは少なくとも約 80% ee、より好ましくは少なくとも約 90% ee、更に好ましくは少なくとも約 95% ee である。CAL-B が高選択性を示す理想的な場合には、望ましい条件は 50% の収率並びに 99% ee 超の分割基質及び生成物を可能にする。基質の対掌体純度も高いが、一般には生成物の対掌体純度ほど高くないことが多く；対掌体純度が比較的高い基質は典型的に 50% 超の転化率で得られる。本発明の反応条件下において、加水分解は可逆的反應ではないこと；即ち加水分解生成物は圧倒的に水性の条件下では (又は水が約 10% 超の条件下でさえ) エステル交換を受けないことに留意されたい。残留プロピレングリコールアルキル (又はアリール) グリコールアセテート (未転化基質) は、加水分解グリコールエーテル生成物のアシル供与体としては働かない。

30

40

【0106】

いくつかの実施態様において、加水分解反応によって分割されるラセミ体はグリコールエーテルアセテート、詳細にはプロピレングリコールアルキル (又はアリール) エーテルアセテートであり；代表的なグリコールエーテルは前記式 I で表される。プロピレングリ

50

コールアルキル（又はアリール）エーテルアセテートの非限定的例は図1に示してある。他の実施態様において、分割されるラセミ体はグリコールエーテルブチレート、詳細にはプロピレングリコールアルキル（又はアリール）ブチレート、及びグリコールエーテルプロピオネート、詳細にはプロピレングリコールアルキル（又はアリール）プロピオネートである。

#### 【0107】

種々の実施態様において、基質ラセミ体の濃度は約0.5～約50% v/vであり；好ましくは、基質の濃度は約10% v/vである。任意の特定のアシル化プロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテル（例えば、P G A E A）の最も有効な濃度は、反応混合物の他の条件に応じて、並びに反応の最後における生成物又は残留基質の望ましい最終転化率及び純度に応じて異なるであろう。しかし、以下の濃度が有効であることがわかっている（% v/vとして表す）：P M A、水性反応において約25～約40%、好ましくは約25%、及び二相反応において約10%；P E A - 水性反応において約0.5～約50%、好ましくは約20～約25%；P P h A - 水性反応において約15～約50%、好ましくは約10～約25%；P n P A、P i P A、P n B A - 水性反応において約0.5～約50%、好ましくは約10～約25%。

10

#### 【0108】

反応混合物中の酵素触媒製剤（非固定化又は固定化）の量（mg/ml）は、所望の反応速度が得られるように選択され、酵素触媒の製剤の比活性によって異なる。いくつかの実施態様において、本発明の加水分解反応における非固定化C A L - B（精製タンパク質ではなく、粗製酵素製剤として）の量は、反応混合物の約0.001～約5 mg/mlであることができるが、典型的には総反応容量ml当たりC A L - B約0.5～約2 mg、最も好ましくは約1～約2 mgである。

20

#### 【0109】

他の実施態様において、本発明の加水分解反応における固定化C A L - B（精製タンパク質ではなく、粗製酵素製剤として）の量は、反応混合物の約0.1 mg～約1 g/mlであることができるが、典型的には反応容量ml当たり固定化C A L - B約0.5 mg～約0.5 g、好ましくは約1～約200 mgである。固定化C A L - Bの場合には、反応器（例えば、ネジ蓋付き反応バイアル又は反応器）中で反応混合物に酵素を添加することによって分割を実施できる。分割はまた、ラセミ基質を含む反応混合物を、固定化酵素を含むカラムに通すことによって、又は保持酵素による反応混合物の拡散を可能にする膜反応器を用いて達成できる。固定化酵素はまた、以下に詳述するように、多数の反応に使用するために再循環することもできる。

30

#### 【0110】

いくつかの実施態様において、反応媒体、又は酵素触媒と少なくとも1種の基質が一緒にされた溶液は水性であり；他の実施態様においては、反応媒体は二相性である。水性反応媒体又は二相媒体の水性成分は緩衝化するのが好ましい。反応混合物の最初のpHの維持は、反応混合物の所望のpHの約1 pH単位内のp K aを有する適当な緩衝剤を十分な濃度で含ませることによって達成できる。反応pH 5.0、6.0及び7.0に関しては、酢酸、クエン酸 - リン酸及びリン酸緩衝液をそれぞれ使用でき；緩衝液の選択はこれらの例に限定されない。反応の間、反応混合物のpHを監視するか又は酸若しくは塩基を添加して反応混合物のpHを所望の値に保持する場合には、反応は添加緩衝液を添加せずに実施することもできる。緩衝液の濃度は様々であることもできるが、約25～約200 mMの値が典型的である。反応のpHは約3～8.5であることができるが；好ましくは、pHは約7である。

40

#### 【0111】

二相反応媒体は、水相（前述の通り）及び水相と不混和性であり且つ基質（それ自体が溶媒である）の他に存在する溶媒を含む。従って、二相反応混合物は、2相に分離する2種の不混和性溶媒を含んでなる。反応混合物の基礎をなすメカニズムを理解することは必要ではないが、また、本発明を以下の仮説によって限定するつもりはないが、最初は水相

50

が溶解された酵素を含むが、酵素は水相と不混和性基質含有有機相との界面で活性であると考えら得る。反応はまた、加水分解反応及び酵素活性の維持の両方に必要な水の少なくとも最小量が添加された有機溶媒から主になる反応混合物中で実施できる。更に、反応はまた、水及び水と混和性の極性有機溶媒を含んでなる単相水性混合物を用いて実施することもできる。

#### 【0112】

二相反応には種々の溶媒を使用でき；その例としてはヘキサン及びトルエンが挙げられるがこれらに限定されない。これらの溶媒の濃度はまた、例えば、25から65% (v/v) のように変化させることができる。好ましくは、溶媒は約40～約50% (v/v) で存在する。メタノール、ジオキサン又はアセトンのような極性有機溶媒も比較的低濃度

10

#### 【0113】

好ましくは、反応混合物は水性である。水性混合物の1つの利点は、加水分解が好都合らしいことである。

#### 【0114】

ほとんどの実施態様において、加水分解反応の温度は、反応速度、酵素触媒活性の安定性、酵素のエナンチオ選択性及び基質の安定性を最適にするように選択する。例えば、インキュベーション温度の影響は、25% (v/v) PMA並びに1.0及び0.5 mg/ml CAL-B (Chirazyme L-2 lyo) を含む水性反応混合物中において30～50において(5刻みで増加させて)調べた。これらの条件下において、PMAの加水分解は40において最も早く、最終エナンチオ純度はこの温度において影響を受けなかった。しかし、より低い酵素濃度を用いて35でインキュベートした反応は、40でインキュベートした反応に比べて長い時間持続できる触媒反応を示し、それより高い(S)-PMAエナンチオ純度を生じた。50におけるインキュベーションは5時間以内に酵素を不活性化した。測定された速度が基質溶解度の温度による差とは独立していたと仮定すれば、この結果はCAL-B (Chirazyme L-2 lyo) に最適な温度は約40であったことを示すが、水性反応混合物中では35においてより高い酵素安定性が観測された。従って、好ましい温度は約35～40であり、約37の温度を典型的に使用する。

20

30

#### 【0115】

ほとんどの実施態様において、反応混合物は攪拌しながらインキュベートし；このような攪拌を実施するための手段としては、回転振盪、機械的攪拌又は羽根車による攪拌が挙げられる。

#### 【0116】

所定の操作温度においては、反応速度は、反応中に存在するリパーゼの量に左右される。従って、反応時間は添加されるリパーゼの量に左右される。このため、例えば、CAL-B (Chirazyme L-2 lyo, 120 U/mg lyo超) を1.0、0.5、0.1、0.05、0.01、0.001 mg/mlの濃度で含む反応混合物を用いて、50%ヘキサンを含む二相条件下において10% (v/v) PMAのエナンチオ選択的加水分解を行うのに必要な最小活性単位を求めた。2時間後、1.0及び0.5 mg/mlの酵素装填量を含む反応は、ほぼ理論収率で98% ee超までPMAの(S)-対掌体を分割した。72時間までに、少なくとも0.01 mg/mlの酵素装填量を含む反応は99.5% ee超で(S)-PMAを分割した。しかし、インキュベーションの延長により、残留(S)-PMA基質が更に加水分解され、0.5及び1.0 mg/mlで酵素を含む反応における(S)-PMAの収率はそれぞれ約25および10%まで(50%の最大理論収率に基づく)低下した。

40

#### 【0117】

同様な実験において、エナンチオ選択的加水分解を、25% (v/v) PMAを含む水性反応混合物中における酵素濃度の関数として調べた。結果は、2.0、1.0及び0.

50

5 mg / ml の濃度の C A L - B ( C h i r a z y m e L - 2 l y o . ) はそれぞれ、4、6 及び 24 時間内に ( S ) - P M A を 99 % e e 超まで完全に分割することを示した ( 実施例 4 参照 )。これに対して、0.1 mg / ml の C A L - B ( C h i r a z y m e L - 2 l y o . ) を含む反応混合物は 30 時間以内に ( S ) - P M A ( 60 % e e 未満 ) を部分分割した。

#### 【 0 1 1 8 】

従って、ほとんどの実施例において、反応時間は約 2 ~ 約 72 時間であるが、約 4 ~ 約 24 時間が好ましい。P M A に関しては、反応時間は約 4 ~ 約 6 時間がより好ましいが、P E A に関しては、反応時間は約 8 ~ 約 10 時間がより好ましい。

#### 【 0 1 1 9 】

いくつかの実施態様において、加水分解反応は単一バッチ反応において実施し；他の実施態様においては、加水分解反応は連続法において実施する。

#### 【 0 1 2 0 】

##### エステル交換による分割

グリコールエーテル、詳細にはプロピレングリコールアルキル ( 又はアリール ) エーテルのラセミ体の分割のためのエステル交換又はアシル化反応の種々のパラメーターを評価し、最適化することができる ( 実施例 6 ~ 7 及び 11 参照 )。エステル交換反応は、酵素触媒及びラセミ基質の組合せである反応混合物中で起こり、酵素はエステル交換反応を触媒して、基質をアシル化生成物に転化する。2 種以上の基質又は 2 種以上の生成物も存在できる。追加成分も反応混合物中に存在できる。反応条件は、種々の反応パラメーターの相対的重要性及び反応の間に到達すべき種々のパラメーターの目的値に応じて最適化する。種々のパラメーターの非限定的例としては、分割すべき対掌体の種類、収率及び純度の程度、分割すべきラセミ体の量又は分割対掌体の目的量、所望の反応時間、及び添加される酵素触媒の量が挙げられる。典型的に、収率は約 30 ~ 約 50 %、アシル化生成物の対掌体純度は典型的には約 80 % e e 超、より好ましくは約 90 % e e 超、更に好ましくは約 95 % e e 超である。基質の対掌体純度も高いが、典型的には生成物の対掌体純度ほど高くないことが多く；対掌体純度が比較的高い基質は典型的には約 50 % 超の転化率で得られる。しかし、収率及び純度は共に、分割される対掌体の種類及び反応条件に左右される。これは一つには、形成される生成物に加水分解又はアルコール分解が起こり得るためである。即ちエステル交換生成物、プロピレングリコールアルキル ( 又はアリール ) エーテルアセテートは、ヒドロラーゼ触媒によって対応するプロピレングリコールアルキル ( 又はアリール ) エーテルに加水分解又は脱エステル化される可能性があり、それらが再び、エステル交換反応の基質となる ( しかし、これは基質の利用可能性によって制限されるであろう )。従って、可逆反応が残留出発原料の対掌体純度を低下させ、それによって分割効率が低下するであろう。収率及び純度の相互作用については以下に更に詳述する。

#### 【 0 1 2 1 】

反応混合物中の酵素触媒製剤 ( 非固定化又は固定化 ) の量 ( mg / ml ) は、所望の反応速度が得られるように選択され、酵素触媒製剤の比活性によって異なる。いくつかの実施態様において、本発明のエステル交換反応における非固定化 C A L - B ( 精製タンパク質ではなく、粗製酵素製剤として ) の量は、約 0.001 ~ 約 50 mg / ml ( 総反応容量 ) であることができるが、典型的には約 0.5 ~ 約 2 mg / ml、最も好ましくは約 1 ~ 約 2 mg / ml である。要するに、酵素装填量の調整は、反応工学によって生成物の光学純度を増加させる有効な方法であることが示された。

#### 【 0 1 2 2 】

他の実施態様において、本発明のエステル交換反応における固定化 C A L - B ( 精製タンパク質ではなく、粗製酵素製剤として ) の量は、約 0.1 mg ~ 約 1 g / ml ( 反応混合物 ) であることができるが、典型的には約 1 mg ~ 約 0.5 g / ml ( 反応混合物 )、好ましくは約 2.5 ~ 約 200 mg / ml ( 反応混合物 ) である。固定化 C A L - B の場合には、分割は、回分式で反応を実施することによって、例えば反応器 ( 例えばネジ蓋付き反応バイアル又は反応器 ) 中で反応混合物に酵素を添加することによって、又は酵素の

保持に膜を用いることによって達成できる。分割は、ラセミ基質を含む反応混合物を、固定化酵素を含むカラムに通すことによって連続式でも達成できる。回分式で使用する場合には、固定化酵素は、以下に詳述するように再循環することができる。

#### 【0123】

エステル交換用の反応媒体は好ましくは非プロトン性又は非水であり；従って、種々の実施態様において、媒体は少なくとも1種の溶媒又はイオン液体を含んでなり、好ましくは無極性である少なくとも1種の有機溶媒を含んでなるのが好ましく、少なくとも1種の有機溶媒はより好ましくは1つの有機溶媒である。このような有機溶媒の例としては、トルエン及びヘキサン並びにイオン液体が挙げられるがこれらに限定されない。溶媒のその他の例は、基質プロピレングリコールアルキル（又はアリアル）エーテル（それら自体が有機溶媒であるため）、及び生成物が形成されたときには生成物である対応するアシル化プロピレングリコールアルキル（又はアリアル）エーテル（これも有機溶媒である）である。非基質及び非生成物溶媒は補助溶媒と称される。イオン液体としては以下のものが挙げられるがこれらに限定されない：1-エチル-3-メチルイミダゾリウム（例えば、[EMIM]-[BF<sub>4</sub>]）及び1-ブチル-3-メチルイミダゾリウム（例えば、[BMIM]-[PF<sub>6</sub>]（BF<sub>4</sub>及びPF<sub>6</sub>は対イオンとして、特に陰イオン成分として働く）。（Kim, K.-W., et al., 2001, Biocatalysis in ionic liquids: markedly enhanced enantioselectivity of lipase. Organic Letters, 3: 1507~1509）及び（Lau, R.M., et al., 2000 Organic Letters, 2: 4189）。 10 20

#### 【0124】

他の実施態様（実施例9~11参照）において、(±)-1-メトキシ-2-プロパノールアセテート（PMA）を、酵素エステル交換による分割法においてエナンチオ選択的アシル化のためのアシル供与体として使用する。ラセミ体キラルグリコールエーテルをアシル供与体として使用すると、アシル化剤と分割アセテート及びアルコール又はアミン対掌体基質とが同時分割され得る。従って、酵素によって分割される基質の他に、アシル供与体の副生成物もまた、分割キラルグリコールエーテル及びグリコールエーテルアセテート化合物となる。酵素エステル交換による分割法におけるエナンチオ選択的アシル化のためのアシル供与体としての、PMA及び他の非活性化PGAEA化合物の有用性は、PMAを非活性化アシル供与体として用いた反応-ストリッピング実験によって示された。 30

#### 【0125】

エステル交換反応によって分割される基質は、グリコールエーテル、詳細にはプロピレングリコールエーテルアルキル（又はアリアル）エーテルのラセミ混合物及びアシル供与体であり；代表的なグリコールエーテルアセテートは前記式Iによって示される。プロピレングリコールアルキル（又はアリアル）エーテルの非限定的例は図1に示してある。アシル供与体としては以下のものが挙げられる：活性化アシル供与体、例えば、活性化エステル（例としては、酪酸トリフルオロエチル、S-エチル=チオ-オクタノエート、ピアセチル=モノ-オキシムアセテートが挙げられるがこれらに限定されない）、エノールエステル（例としては、酢酸ビニル、酢酸イソプロベニル、及び酢酸1-エトキシビニル、並びにジケテンが挙げられるがこれらに限定されない）及び無水物（無水酢酸、ラクチド及びコハク酸無水物）。アシル供与体としてエノールエステル及び酸無水物を使用すると、実質的に不可逆性のアシル化が起こる。可逆反応は残留出発原料の対掌体純度を低下させるので、これはアルコールの分割に特に有用である。いくつかの実施態様において、アシル供与体としては以下のものが挙げられるがこれらに限定されない：酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル、酢酸2,2,2-トリクロロエチル、酢酸2,2,2-トリフルオロエチル、酢酸ブチル、酢酸エチルフェニル、酢酸イソプロベニル、メトキシ酢酸エチル、酢酸1-エトキシビニル、ジケテン、酪酸トリフルオロエチル、無水酢酸、ラクチド及びコハク酸無水物。最初の実験は、記載した最初の2つのアシル供与体に関しては、試験した全てのプロピレングリコールアルキル（又はアリアル）エーテルの転化がアシル化供与体 40 50

としての酢酸ビニルを用いた場合に最も速いことを示した。本発明を実施するためのメカニズムを理解する必要はなく、また、本発明は基礎を成すメカニズムによって制限されないが、この速い反応の理由は、これらのエステル化剤がエノールエステルであり、その生成物であるアルコールがカルボニル化合物に互変異性化し、それが反応を推進し且つアルコール分解によって起こり得る生成物の阻害を排除することであると考えられる。アシル供与体はまた、非活性化アシル供与体、例えば酢酸エチル及びラセミ体キラル化合物、例えばラセミ体 1 - メトキシ - 2 - プロパノールアセテート (PMA) を含む。非活性化アシル供与体の他の非限定的例としては、酢酸ブチル (BA)、酢酸エチルフェニル (EPA)、酢酸エチル (EtA) 及び PnPA が挙げられる。この場合、反応混合物から副生成物アルコールを除去して、反応を推進し且つ試薬の転化を増大させるのが有利である。本発明者らは、副生成物アルコールが除去されなければ、正反応と逆反応の反応速度が本質的に同じになるように反応が平衡化される可能性があり、転化率は極限值に達することを発見した。 10

#### 【0126】

副生成物の例としては、酢酸エチルからのエタノール及びそれらの対応するキラル酢酸エステルから形成される一般的なキラル第二アルコールが挙げられる。反応器は、反応器からの蒸気の定期的除去による副生成物アルコールの除去を含む半回分式で操作できる。操作はまた、蒸気流中において除去された試薬を補充するために、試薬を定期的に添加することを含むことができる。本発明はまた、連続的に実施できる。これは、反応器からの蒸気の連続的除去及び試薬の連続的添加を含む。反応はまた、蒸留塔と組合せて実施できる。これは、転化を促進するために反応器に試薬を供給し、次いで蒸留塔までそれを進めて、副生成物を除去し且つアルコールの少ない試薬流を反応器に戻すことを含む。蒸気の除去又は蒸留を反応と組合せることによって、反応混合物から副生成物アルコールがストリップされて、副生成物アルコールを除去しない場合に可能な転化レベルよりも高い転化レベルまで反応を進めることが可能になる。 20

#### 【0127】

また、非反応性ストリップ剤は、副生成物アルコールの除去を促進するために反応混合物に添加できる。例えば、窒素又は n - ヘキサンのようなストリップ剤の使用は、所定の運転圧力で反応混合物の沸点より低い温度において蒸気の除去を可能にすることによって、反応全体にとって有益になり得る。ストリップ剤を使用することが有益であるか否か、また、ストリップ剤の最も適切な選択は、反応混合物の組成、副生成物アルコールの揮発性、並びに触媒の感熱性又は処理装置をどの程度低い圧力で運転可能であるかに関する実用限界による運転温度及び圧力への制約によるであろう。液体供給材料からの軽質成分の除去を促進するためのストリップ剤の一般的使用は公知である。 30

#### 【0128】

種々の実施態様において、基質ラセミ体の濃度は約 0.5 ~ 約 85 % v / v 超であり；好ましくは、基質濃度は約 5 % 超であり、最も好ましくは基質濃度は、可能な限り高いが、目的の転化度を達成するのに必要な充分な量のアシル供与体を収容できるものである。本発明者らは、アシル受容体 (例えばプロピレングリコールアルキル (又はアリアル) エーテル及びアシル供与体を含む反応媒体は約 100 % (v / v) が基質であることができることを発見した。これは、これらの基質自体が有機溶媒であるため、また、反応媒体が非プロトン性であるのが好ましいためであると考えられる。例えば、アシル受容体 (プロピレングリコールエーテルアルキル (又はアリアル) エーテル) の濃度は約 30 ~ 約 70 % (v / v) であって、約 100 % の総反応混合物容量までの残りの容量 (即ち約 70 ~ 約 30 % (v / v)) はアシル供与体 (例えば酢酸ビニル) であることができる。この発見は、エステル交換反応を実施するための新しいアプローチを提供する。このアプローチにはまた、いくつかの利点がある。1つは、反応が極めて高い基質濃度で行われることができ、生成物が極めて高い濃度で生成されることである。もう1つは、分割対掌体 (生成物及び基質) はそれ自体が有機溶媒であるので抽出の必要がないことである。従って、反応混合物からの固定化生体触媒の分離後に、分割対掌体を残りの反応混合物 (又は反応マ 40 50

トリックス) から直接蒸留することによって分割対掌体をより迅速に回収できるため、より効率的であり費用がかからない。

【0129】

反応混合物中の水の存在(例えば混合物に約1~約3% v/v 添加された場合)は、反応速度を遅くするようである。しかし、水の効果は、反応の程度を制御する有用な方法である場合がある。他方、反応混合物中における水の存在は、競合する酵素反応である、アシル化生成物の加水分解を活性化するようである。従って、反応混合物中の水の不在は、アシル化生成物の加水分解の可能性を著しく減少させるようである。リパーゼが働くには水が必要であると考えられているが、ほとんどの市販有機溶媒又はほとんどの市販酵素製剤中には十分な量の水が存在するようであり、従って、反応混合物への追加の水の添加は通常は必要ない。

10

【0130】

また、本発明者らは、基質溶媒のみの反応媒体中でエステル交換を行うことによって、また、反応の2種の基質、アシル受容体又はPGA E 及びアシル供与体の比を制御することによって、生成物の収率及び分割対掌体の純度を制御できることを発見した。従って、本発明はまた、基質溶媒のみの反応媒体中で酵素触媒エステル交換を制約することによって、また、反応の2種の基質、アシル受容体又はPGA E 及びアシル供与体の比を制御することによって生成物の収率及び分割対掌体の純度を制御する方法を提供する。この目的は、アシル供与体(例えば酢酸ビニル)の濃度を制限することなく、アシル受容体(例えばPGA E)の出発濃度をできるだけ高くすることである。この目的を達成することによって、分割アシル化生成物又は残留基質の実現可能な最高量が得られるであろう。この制御は、以下の仮定に基づく。基質はラセミ混合物であるので、いずれか一方の対掌体のその対応する生成物(アシル化PGA E)への理論最大転化率は50%である。しかし、触媒であるヒドロラーゼ(好ましくは、リパーゼ又はエステラーゼ)は、両方の対掌体を基質としてアシル化すると考えられるが、一方の対掌体を優先的にアシル化する(即ちそれは一方の対掌体をエナンチオ選択的にアシル化する、例えば、CAL-BはR-異性体をエナンチオ選択的にアシル化する)。従って、50%の総基質転化率において、生成物の少なくとも一部の少量部分は他方の異性体である可能性が高く、これが第1の異性体生成物の純度を低下させる。従って、これよりわずかに低い(50%よりわずかに低い、例えば、約45%の)基質転化率では、より少ない割合の第2の異性体生成物が形成されるため、より高い純度の第1の異性体生成物が、それでもなお高い収率で生成される。その反面、50%の総基質転化率では、少ないがことによると無視できない量の第1異性体基質が転化されなかった。従って、わずかに高い基質転化率(50%よりわずかに高い、例えば約55%の)基質転化率では、第1異性体基質はあまり残っていないので、より高純度の第2基質が、それでもなお高収率で存在する。従って、本発明のいくつかの実施態様において、ラセミ基質の転化度は、2種の基質、アシル受容体(即ちラセミ基質)及びアシル供与体の比によって制御できる。例えば、アシル供与体(例えば酢酸ビニル)に対するアシル受容体(例えばPGA E)のモル比が2:1である場合には理論的に約50%の総基質転化率が得られ; アシル供与体に対するアシル受容体の比は、1モルのアシル供与体が2モルのアシル受容体のうち1モル、即ちラセミ基質のちょうど約半分と選択的に反応できるように選択する。この比を変えることによって、基質転化度を制御でき、従って、第1異性体の生成物又は第2異性体の残留基質のいずれかを高収率で高純度に濃縮できる。例えば、目的ラセミ体(生成物又は残留基質のいずれか一方)の約90% ee 超の純度が約35~約65%の基質転化率で達成できるであろう。

20

30

40

【0131】

完全に選択的なエステル交換を仮定すれば、基質(グリコールエーテル及びアシル供与体)の分子量及び密度を用いることによって、目的とする転化度(最適収率)及びエナンチオ純度を達成するように計算された種々のモル比を達成するのに必要な容量を計算することができる。この時、これらの最適収率及び理論対掌体純度は予想値である。次に、計算容量の基質を、標準反応条件(以下に詳述する)下で酵素触媒と合し、基質転化度及び

50



第1異性体生成物又は残留第2異性体基質の相対純度を監視する。実験又は実際観測収率及び純度は、予想値とは異なることがある。例えば、CAL-Bの存在下におけるPPhと酢酸ビニルとの反応において、70/30 (v/v)の比は約75%の基質転化率をもたらす予想される。しかし、典型的には実際には約45%の転化率が、それぞれ約80% ee ~ 約98.5% ee 超の(S)-PPh及び(R)-PPh A純度と共に観察される。基質比を76/24 (v/v)に変化させると、約55%の基質転化率が得られると予想される。しかし、典型的には、実際には約40%の転化率が、約98% ee の(R)-PPh A純度及び約60% ee の(S)-PPh純度と共に観察される。要約すると、本発明は、高% ee で目的生成物を生成するために、アシル供与体の量を制限することによって基質転化度を制御する有効な方法を提供する。

10

#### 【0132】

従って、いくつかの実施態様において、基質転化率の制御方法は、最初に、キラルGC又はHPLC分析(例えば、実施例中に記載されたようにして)によって評価しながら、転化(又はアシル化)基質の最適収率及び転化又は未転化基質の対掌体純度を求め、次いで、これらの収率を達成する(例えば、転化率を45%又は55%に限定する量のアシル供与体を提供する)基質の適当なモル比を決定し、次に、これらのモル比を達成するための基質の容量を、基質の分子量及び密度に基づいて計算し、次にこれらの計算基質容量を酵素触媒と合し、そして得られた反応混合物を標準反応条件下でインキュベートするものである。生成物の収率及び対掌体の純度を監視し、必要に応じて、観察された収率及び対掌体純度に基づいて基質の比を調整して、目的転化度(収率)及び最適対掌体純度を達成する。

20

#### 【0133】

従って、種々の実施態様において、基質濃度は約10~約90%(v/v)であることができ、この場合にはアシル受容体とアシル供与体の百分率を合わせると総反応混合物の約100%(v/v)になる。あるいは、他の実施態様において、基質濃度は約20~約80%(v/v)であり、この場合にはアシル受容体とアシル供与体の百分率を合わせると約100%(v/v)未満になる。この場合、残りの容量は有機溶媒として供給される。

#### 【0134】

エステル交換反応の温度は、反応速度、エナンチオ選択性、酵素触媒の安定性及び基質安定性を最適化するように選択する。例えば、反応温度を低下させると、エステル交換によるPMの分割に関してはリパーゼCAL-Bのエナンチオ選択性が増加する。従って、分割速度は遅くなったが、反応温度の低下は生成物の光学純度を増加させる有効な方法であった。この効果は、-20 ~ 30 の範囲の温度において示された。従って、種々の実施態様において、好ましい温度は、個々の基質によって異なるであろう。PPhのエステル化に関しては、好ましい反応温度は約20~30 であり、約25 の温度を典型的に使用した。

30

#### 【0135】

反応は攪拌しながら実施する。このような攪拌を実施するための手段としては、回転振盪又は羽根車による攪拌が挙げられる。

40

#### 【0136】

反応速度は、反応中に存在するリパーゼの量によって異なる。従って、反応時間は、リパーゼの添加量によって異なる。エステル交換に関しては、反応時間は約2~約96時間であるが、好ましくは約4~約72時間、より好ましくは約4~約48時間である。

#### 【0137】

エステル交換反応は、単一バッチ反応で実施することもできるし、連続法で実施することもできる。例えば、膜を有する反応器を使用して、固定化酵素を効率よく保持することができる。

#### 【0138】

グリコールエーテル分割に関して前述したエステル交換反応にはいくつかの利点がある

50

。1つは、リパーゼ触媒アシル化の場合、比較的長鎖のアルキル及びアリールで置換されたグリコールエーテル及びそれらの酢酸エステルは加水分解分割条件下では限られた水溶性を有することである。更に、有機溶媒／基質中におけるリパーゼによるアシル化は極めて高い基質装填量で進行し、高い容量生産性を提供すると共に、蒸留及び生成物単離前の反応物質の抽出の必要性をなくす。

#### 【0139】

##### 生体触媒の再循環

加水分解反応及びエステル交換反応の両者に使用された酵素触媒は再循環できる。これは、触媒反応が完了した混合物から酵素を回収して、新しい反応混合物に添加できることを意味する。酵素の回収及び再利用を酵素再循環と称する。従って、再循環は、反応体、生成物及び反応混合物の他の成分から生体触媒を分離する。酵素の再循環はいくつかの点で、例えば、サイクル当たりの反応コストの低下において有利である。

10

#### 【0140】

酵素の再循環は、水性反応混合物を濾過し、それによって酵素を濾過器上に保持することによって達成できる。あるいは又は更に、再循環は好ましくは固定化酵素を使用する。次いで、固定化酵素は、遠心分離、濾過を含む（これらに限定されない）多数の手段によって反応混合物から分離することもできるし、あるいは沈澱、反応器からの残留反応混合物の排出のような重量による沈降によって反応器中に保持することによって分離してから、新しい反応マトリックス（酵素触媒を含まない反応混合物である）を添加することもできる。

20

#### 【0141】

例えば、固定型のCAL-B、Chirazyme L-2, c.-f. C2 lyo. (Roche)は、プロピレングリコールエーテルアセート基質のそれぞれを25%以下の基質装填量で分割することができた。固定化CAL-Bはまた、PPhAのエナンチオ選択的加水分解を調べるのに使用した。PPhAに関するエナンチオ選択性は優れており、25% v/vのPPhA装填量において(S)-PPhA及び(R)-PPhを99% ee超及び約50%の基質転化率で分割した。分割は、50%以下の基質装填量で示され、24時間の基質転化率は45%であり、(R)-PPh純度は99% ee超及び(S)-PPhA純度は75% eeであった。しかし、固定化CAL-Bは、25% (v/v) PPhAの基質装填量で多数の分割サイクルについて(S)-PPhA及び(R)-PPhの両者の効率的な分割を触媒した。

30

#### 【0142】

別の例において、Chirazyme L-2, c.-f. C2 (酵素装填量30、60及び120 U/ml)の性能を、20% (v/v)の基質装填量でPEA加水分解について実験規模で試験した。酵素の再循環は、15超のサイクルについて示された（実施例8及び図6参照）。多数のサイクルにわたる分割性能は、120 U/mlの酵素装填量において最良であった。また、酵素再循環を、Roche製の固定化CAL-B (Chirazyme L-2, c.-f. C2, lyo.)を26.6 mg/mlの濃度で用い、25% PMAの30バッチ（又はサイクル）の加水分解について示した。(S)-PMAのエナンチオ純度は20%又は25%の基質濃度で実施した実験において30反応サイクルの間、約97% eeであった。

40

#### 【0143】

スケールアップ実験において、固定化CAL-B (Chirazyme L-2, c.-f. C2; 約240 U/ml)を、1.5リットル規模で25%のPMAの15リサイクルのエナンチオ選択的加水分解に用いた。サイクル時間は2.5～6時間であった。反応パラメーターは、反応温度37℃、攪拌（羽根車速度）200 rpm、及びpH約7（20% (v/v)水酸化ナトリウムの添加によって維持）を含んでいた。他のスケールアップ実験においては、固定化CAL-B (Chirazyme L-2, c.-f. C2; 約240 U/ml)を、20% (v/v) PEAを基質とする30サイクル超のエナンチオ選択的加水分解に用いた（実施例8並びに図7及び9参照）。約8時間のサイクル時

50

間によって、(S)-PEA及び(R)-PEを高エナンチオ純度で分割できた。追加酵素(最初の装填量の~10%)をサイクル8、10、16及び25において供給して、所望の反応サイクル時間を維持した。32反応サイクルの間の平均生成物純度は(S)-PEAが97.9% eeを超及び(R)-REが95% eeを超であった。反応パラメーターはPMAの場合と同様とした。これらの実験の生成物の回収について以下に記載する。

#### 【0144】

##### 分割対掌体の回収

分割された両光学活性種は両方(グリコールエーテルアセテート及びグリコールエーテル)は、液液抽出、熱活性化分離、蒸留、液固吸着法又はそれらの組合せによって反応マトリックスから回収及び単離できる。

10

#### 【0145】

例えば、最初の一連の前記スケールアップ実験においては、塩化メチレンを用いた液液抽出が、99% ee超の(S)-PMA及び約85% eeの(R)-PMを含む混合物の回収を容易にした。しかし、キラル(R)-PMは水溶性であるので、水性反応混合物の抽出によって回収するのは困難であることがわかった。

#### 【0146】

別の例において、第2の一連の前記スケールアップ実験においては、塩化メチレンによる反応混合物の抽出は、それぞれ98% ee及び95% eeの(S)-PEA及び(R)-PEの混合物を生成した。

#### 【0147】

更に別の例において、15バッチ分のPMA加水分解反応及び32バッチ分のPEA加水分解反応からの材料を蒸留して、キラルグリコールエーテル及びそれらの対応する対掌体酢酸エステルを単離する。

20

#### 【0148】

##### 分割対掌体の有用性

前述のように、本発明の方法は、製薬産業(Hoff et al. (1996) Tetrahedron: Asymmetry 7: 3181~3186)及び農業において多くの用途を有する分割対掌体を提供する。例えば、分割された化合物は、医薬、コンビケム(combichem)及び強誘電性液晶への使用の可能な出発原料と考えられる。これらはまた、化学-酵素法に組込んでジアステレオマーエステル(ラセミ体エステルではなく)を形成することによって生体分割の選択性を改良すると考えられる。他の用途において、それらは、増加する選択性に関して酵素性能を増大すると考えられる。他の側面において、これらの分割化合物は、結晶化による「古典的分割」用の溶媒又は補助溶媒として並びに生体触媒反応用の補助触媒又はエステル交換用の溶媒として有用な、経済的な極性キラル溶媒を提供すると考えられる。更に、これらの溶媒は、結晶化によって誘導される動的分割(crystallization-induced dynamic resolution; CIDR)に有用であるかもしれない。更に、これらの化合物は、同時蒸留時にキラル材料の選択的又は部分選択的共沸蒸留に使用できると考えられる。キラルクロマトグラフィーにおいて、分割された化合物は、移動相の単純なアルコールと置きかわって、存在するキラル分離を促進するか、固相に結合するリガンドとしてキラル分離に使用されると考えられる。他の用途としては、キラル塩基(アルコキシド)の製造、及びTiCl<sub>4</sub>との反応によるキラルルイス酸の製造が考えられる。後者は、オレフィンのSharplessエポキシ化及びスルフィドのスルホキシドへの酸化のような選択的酸化に使用されるかもしれない。

30

40

#### 【実施例】

#### 【0149】

以下の実施例は、本発明のいくつかの好ましい実施態様及び側面を示し且つ更に説明するために記載するが、本発明の範囲を限定するものと解すべきではない。

#### 【0150】

以下の実験の開示において以下の略語を適用する: N(規定); M(モル濃度); mM

50

(ミリモル濃度) ;  $\mu\text{M}$  (マイクロモル濃度) ;  $\text{mol}$  (モル) ;  $\text{mmol}$  (ミリモル) ;  $\mu\text{mol}$  (マイクロモル) ;  $\text{nmol}$  (ナノモル) ;  $\text{pmol}$  (ピコモル) ;  $\text{g}$  (グラム) ;  $\text{mg}$  (ミリグラム) ;  $\mu\text{g}$  (マイクログラム) ;  $\text{ng}$  (ナノグラム) ;  $\text{l}$  又は  $\text{L}$  (リットル) ;  $\text{ml}$  (ミリリットル) ;  $\mu\text{l}$  (マイクロリットル) ;  $\text{cm}$  (センチメートル) ;  $\text{mm}$  (ミリメートル) ;  $\mu\text{m}$  (マイクロメートル) ;  $\text{nm}$  (ナノメートル) ;  $\text{U}$  (酵素活性の単位 ; 典型的には転化された基質のモルとして表される) ; (摂氏度) ; % (パーセント) ; (  $\text{v/v}$  ) (容量 / 容量) ; %  $\text{C}$  (転化率 %) ;  $\text{ee}$  (対掌体過剰) ;  $\text{E}$  (エナンチオ選択率) 。

【0151】

#### 実施例 1

10

#### 材料及び分析方法

##### 基質

P系グリコールエーテル及びアシレートを経験として用いた。この系は以下のものを含んでいた :

プロピレングリコールメチルエーテル (また、1 - メトキシ - 2 - プロパノール ,  $\text{PM}$  )

。プロピレングリコールメチルエーテルアセテート (また、1 - メトキシ - 2 - プロパノールアセテート ,  $\text{PMA}$  ) 。

プロピレングリコールエチルエーテル ( 1 - エトキシ - 2 - プロパノール ,  $\text{PE}$  ) 。

プロピレングリコールエチルエーテルアセテート ( 1 - エトキシ - 2 - プロパノールアセテート ,  $\text{PEA}$  ) 。

20

プロピレングリコール  $n$  - プロピルエーテル ( 1 -  $n$  - プロピルオキシ - 2 - プロパノール ,  $\text{PnP}$  ) 。

プロピレングリコール  $n$  - プロピルエーテルアセテート ( 1 -  $n$  - プロピルオキシ - 2 - プロパノールアセテート ,  $\text{PnPA}$  ) 。

プロピレングリコールイソプロピルエーテル ( 1 - イソプロピルオキシ - 2 - プロパノール ,  $\text{PiP}$  ) 。

プロピレングリコールイソプロピルエーテルアセテート ( 1 - イソプロピルオキシ - 2 - プロパノールアセテート ,  $\text{PiPA}$  ) 。

プロピレングリコール  $n$  - ブチルエーテル ( 1 -  $n$  - ブチルオキシ - 2 - プロパノール ,  $\text{PnB}$  ) 。

30

プロピレングリコール  $n$  - ブチルエーテルアセテート ( 1 -  $n$  - ブチルオキシ - 2 - プロパノールアセテート ,  $\text{PnBA}$  ) 。

プロピレングリコール  $t$  - ブチルエーテル ( 1 -  $t$  - ブチルオキシ - 2 - プロパノール ,  $\text{PtB}$  ) 。

プロピレングリコール  $t$  - ブチルエーテルアセテート ( 1 -  $t$  - ブチルオキシ - 2 - プロパノールアセテート ,  $\text{PtBA}$  ) 。

プロピレングリコールフェニルエーテル ( 1 - フェノキシ - 2 - プロパノール ,  $\text{PPh}$  )

。プロピレングリコールフェニルエーテルアセテート ( 1 - フェノキシ - 2 - プロパノールアセテート ,  $\text{PPhA}$  ) 。

40

【0152】

##### 酵素

種々のリパーゼ、エステラーゼ及びプロテアーゼを商業的供給業者から得た。その例としては、 $\text{Altus Biologicals Inc.}$  (  $\text{Cambridge, MA}$  ) からの  $\text{ChiroScreen}$  ( 商標 )  $\text{EH}$  キット ;  $\text{Roche Molecular Biochemicals}$  (  $\text{Mannheim, Germany}$  ;  $\text{US}$  販売は  $\text{BioCatalytics Inc.}$  ,  $\text{Pasadena, CA}$  による ) からのグルタリルアシラーゼ及びペニシリン  $\text{G}$  アミダーゼである  $\text{Chirazyme}$  ( 商標 )  $\text{Lipases \& Esterases Screening Set 2}$  ;  $\text{Thermogen Inc.}$  (

50

Lemont, IL)からのThermoCat(商標)QuickScreen(商標)Esterase Kit; Fluka BioChemika AG (Buchse, Switzerland)からのLipase Extension Kit及び組換えCandida antarcticaリパーゼB型;並びにAmano Pharmaceutical Co. (名古屋, 日本)、Novo Nordisk、及びGenencor International (Rochester, NY)からの工業酵素サンプルが挙げられる。酵素は、製造メーカーの忠告に従って4℃又は-20℃で貯蔵した。

#### 【0153】

##### 化学薬品及び溶液

アセトニトリル、ヘキサン(HPLC用)、酢酸ビニル、リン酸二水素カリウム( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 99.0% min.)及びリン酸水素二ナトリウム( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 99.0%以上)はFisher Scientificから得た。(S)-プロピレンオキシドはChirexから得た(バッチT67893, Chirex order no. 607)。Sorensenのリン酸緩衝液を29.6モル%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 及び70.4モル%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ から指定された濃度で製造し、必要に応じてpHを7.2から調整した。

#### 【0154】

以下のプロピレングリコールアルキル/アリールエーテル及びそれらの酢酸エステルをSigma-Aldrichから得た: PM(99.5%)、PMA(99.5%)、PEA(95%)、PnP(99%)、PnB(99%)、PtB及びPPh(93%; 7%以下のジ(プロピレングリコール)フェニルエーテル、DPPhを含む)。PE、PiP、PiPA、PnPA、PnBA、PPhA及びグリコールエーテルの対掌体標準(以下の不斉合成を参照)はThe Dow Chemical Companyにおいて製造した。PtBA対掌体の非ラセミ混合物は、5mg/mlのChirazyme L-10(Roche Molecular Biochemicals)の存在下でPtB及び酢酸ビニルを(モル比1:2)反応させることによって製造した。

#### 【0155】

##### 不斉対掌体標準

ラセミ体のどの対掌体が酵素触媒反応において加水分解又はエステル交換されるかを判定するためには、分析方法において使用するための、空間的配置のわかっている標準を得ることが必要であった。これらの標準の使用は更に、GC保持時間と特定の公知化合物との相関を可能にした。そのために、P系グリコールエーテル及びそれらの対応する酢酸エステルの個々の構成員の純粋な対掌体を化学合成した。

#### 【0156】

最初に、(S)-PM及び(S)-PMAを合成し(実施例2参照)、それらのGC溶出時間を測定した。2つの対掌体に関する溶出時間の相対的順序を、(S)-PM及び(S)-PMAの溶出時間を対応するラセミ体の溶出時間と比較することによって求めた。使用した分析条件下において、(S)-PMAは(R)-PMAより前に溶出し(それぞれ、4.1分及び4.24分)、非アシル化対掌体、(S)-PM及び(R)-PMについても同じ相対的溶出順序が観察された。種々の対掌体に関する溶出時間のこの相対的順序は、P系グリコールエーテル及びそれらの対応する酢酸エステルの他の構成員にも類推によって適用され、この系を含む酵素触媒反応の生成物及び残留基質の分析に使用された。続いて、P系グリコールエーテル及びそれらの対応する酢酸エステルの他の構成員の純粋な(S)-対掌体もまた、化学合成し(これらは、(S)-PE及び(S)-PEA、(S)-PnP及び(S)-PnPA、(S)-PnB及び(S)-PnBA、並びに(S)-PPh及び(S)-PPhAを含んでいた)、相対溶出順序が正しいと確認した(以下の記載)。GC分析の結果は、PE、PEA、PnP、PnPA、PnB、PnBA、PPh及びPPhAの(S)対掌体が、分割ラセミ標準において観察された、対応する1-アルコキシ-2-プロパノール(又は1-アルコキシ-2-プロパノールアセテート

10

20

30

40

50

）の第1溶出ピークに対応することを示した。

#### 【0157】

##### 分析方法

ガスクロマトグラフ法 標準キャピラリー入り口、水素炎イオン化検出器（FID）及びLEAP-CTC自動装入装置（100サンプルトレイ）を装着したHewlett-Packard 6890 Gas Chromatographを分析に用いた。種々のP系基質を含むサンプルの分析に5種のGC法を用いた。異なるGC法は同一オープン温度プログラムを用いたが、スクリーニングの間に使用した基質に特異的な化合物校正及び積分を含んでいた。簡潔に言うと、Supelco製のDEX 325キラル・キャピラリーカラム（30m×ID 0.25mm，フィルム厚0.25μm）を分離に用いた。カラム温度はPM及びPMAについては70 から120 まで10 /分でプログラムし、他の基質及び生成物については150 までプログラムした。キャリアガスは18.0 psi（定圧）のヘリウムとした。注入口及び検出器の温度はそれぞれ、200 及び250 とした。アセトニトリル又は水中で200：1に希釈したサンプルをスプリット比25：1で注入した（1.0μl）。方法は、Dow Chemical又はSigma Aldrich製のラセミ体サンプルを0.005～0.5%の範囲の濃度で用いて校正し、化合物全てについて $r^2$  0.99超を示した。

#### 【0158】

前記条件下における化合物保持時間を、グリコールエーテル生成物の主要成分である第二アルコール及びそれらの対応する酢酸エステルについて示す。PE、PnP、PiP、PnB、PPh及びそれらの対応する酢酸エステルの絶対立体配置は、分割ラセミ体に比較した、標準として合成された（S）-対掌体の溶出順序に基づいて対応づけた。いずれの場合にも、第二アルコール及びそれらの酢酸エステルの（S）-対掌体は、対応する（R）-対掌体の前に溶出した。（±）-PMの場合には、対掌体の基線分離は達成されなかった。記載した条件下で、化合物の保持時間は以下の通りであった：（±）-PM（2.811分）、（S）-PMA（4.104分）、（R）-PMA（4.246分）、（S）-PE（3.203分）、（R）-PE（3.248分）、（S）-PEA（4.774分）、（R）-PEA（4.936分）、（S）-PnP（4.157分）、（R）-PnP（4.224分）、（S）-PnPA（6.0分）、（R）-PnPA（6.145分）、（S）-PiP（3.629分）、（R）-PiP（3.718分）、（S）-PiPA（5.316分）、（R）-PiPA（5.448分）、（S）-PnB（5.394分）、（R）-PnB（5.484分）、（S）-PnBA（7.42分）、（R）-PnBA（7.545分）、（S）-PtB（5.559分）、（R）-PtB（5.908分）、（S）-PtBA（7.529分）及び（R）-PtBA（7.679分）。

#### 【0159】

（±）-PM対掌体は、20.0 psi（定圧）のヘリウムをキャリアガスとし且つオープン温度が50～150 に10 /分でプログラムされたSupelco製のDEX 120キラル・キャピラリーカラム（30m×ID 0.25mm，フィルム厚0.25μm）上でクロマトグラフィーによって分割できた。注入口及び検出器の温度はそれぞれ、200 及び250 とし、アセトニトリル又は水中で200：1に希釈されたサンプル（1.0μl）をスプリット比25：1で注入した。これらの条件は、（S）-PM及び（R）-PMをそれぞれ3.136分及び3.192分に分割した。

#### 【0160】

液体クロマトグラフ法 クォータナリーLCポンプ、ダイオードアレイ検出器（DAD）、Peltierカラムオープン及びSeries 200オートサンプラーを装着したPerkin-Elmer Series 200液体クロマトグラフを、DOWANOL（商標）PPh（1-フェノキシ-2-プロパノール；PPh）及びその酢酸エステル（PPhA）を含むサンプルの分析に用いた。化合物は、Chiralcel OD-RHカラム（4.6×150mm；Chiral Technologies, Inc.,

Ext on, PA) 上で一定組成の 10 / 40 / 50 エタノール / アセトニトリル / 水移動相を用いて 0.65 ml / 分の流量で、カラム温度を 35 に保持しながら分離した。これらの条件下で、(R) - PPh、(S) - PPh、(R) - PPhA 及び (S) - PPhA に関する保持時間はそれぞれ、約 6.0 分、7.3 分、12.6 分及び 13.1 分であった。この方法は、GC - 法によって完全には分割されなかった PPh 対掌体の基線分割を実現したので、PPh ee 測定に有用であった。更に、PPh 及び PPhA は、ジ(プロピレングリコール)フェニルエーテル(DPPh; PPh の市販製剤中に 7% 以下で存在する) 及びその酢酸ステル、DPPhA であると推定される微量の不純物から充分に分離された。

【0161】

## 実施例 2

(S) - PM 及び (S) - PMA の不斉合成

(S) - 1 - メトキシ - 2 - プロパノール [(S) - PM]

100 ml 3 口丸底フラスコに、冷却水コンデンサー、サーモウェル、熱マントル / 温度調節器、電磁攪拌棒及びゴムセプタムを装着した。次いで、フラスコを、攪拌プレート上に置かれている加熱マントルに移し、コンデンサーの上から反応セットアップ上に窒素パッドを置き、反応の間じゅう保持した。フラスコに、メタノール(22.99 g)を装填し、次いで、攪拌しながら水酸化カリウム(0.0322 g)を添加し、設定値を 45 に調節した。溶液が目的温度に達したら、あらかじめ冷却した (S) - プロピレンオキシド [(S) - PO; Chirex Batch T67893, Chirex order No. 607] を、シリンジを用いて約 5 ml 単位でゴムセプタムを通して反応フラスコに添加した。合計 12.19 g の PO を反応フラスコに加えた。GC 分析(以下の分析方法を参照)は、メタノール及び PO の、目的プロピレングリコールメチルエーテル(PM グリコールエーテル)への最小転化率を示した。KOH を更に 0.0294 g 添加し、反応器を約 15 時間 50 において加熱した。サンプリング及び GC 分析は、未反応 (S) - PO がわずか 0.007% であることを示した。内部温度を 150 に増加させることによって、PM グリコールエーテルを触媒及び比較的高沸点の副生成物からフラッシュ除去した。PM グリコールエーテルフラクションは、91 ~ 118 の頂部温度において沸騰し始め、約 15 ml の液体が回収された。フラッシュされた材料の GC 分析は、1 - メトキシ - 2 - プロパノール(PM - 2) 95.4% 及び 2 - メトキシ - 1 - プロ

【0162】

(S) - PO の塩基触媒加水分解は、求核置換反応を受ける炭素における完全反転と共に進行する(Ege, 1989) ので、PM - 2 を生成する開環反応は、キラル中心における立体配置を保持しながら起こり、得られる第二アルコールは (S) - 配置である。これに対して、少ない方の PM - 1 生成物は C2 炭素における置換によって形成され、得られる第一アルコールは (R) - 配置である。

【0163】

(S) - 1 - メトキシ - 2 - プロパノールアセテート [(S) - PMA]

25 ml のフラスコに、(S) - PM - 2 / (R) - PM - 1 混合物 4.0 g (0.044 モル) を無水塩化亜鉛 0.02 g と共に添加した。乾燥管を有する還流冷却器を取り付け、乾燥管を瞬間的に持ち上げることによって無水酢酸 4.7 g (0.046 モル) を添加した。混合物を約 118 において 2 時間還流し、次いで冷却させた。1% 水溶液の GC - 分析は、市販の PMA - 2 対掌体について観察された第 1 ピークと一致する保持時間を有する PMA - 2 の単一ピークを示した。これらの結果は、第 1 の PMA - 2 ピークが (S) - 対掌体であることを示した。単一ピークは PMA - 1 対掌体についても観察された。このピークはまた、市販混合物中に ~ 3% で存在する PMA - 1 の第 1 ピークと一致し、このことは、それが (R) - 2 - メトキシ - 1 - プロパノールアセテートであることを示した。これらの結果は、(R) 及び (S) PMA - 1 対掌体が、対応する PMA - 2 対掌体について観察されるのとは反対の溶出順序を示すことを示している。混合物を、

10

20

30

40

50

無水炭酸ナトリウム 2.44 g (0.024 モル) を添加し且つ  $\text{CO}_2$  を放出させながら約 1 時間攪拌することによって中和した。短工程蒸留ヘッドを取り付け、熱源としてヒートガンを用いて反応生成物を蒸留した。95 ~ 137 の範囲で沸騰する材料約 5.0 g を回収した。GC 分析は、サンプル純度が約 95 % (S - PMA - 2 92.6 % 及び R - PMA - 1 2.7 %) であることを示した。

【0164】

### 実施例 3

#### PMA の加水分解：酵素のスクリーニング

110 種超の市販ヒドロラーゼのパネルを、PMA のエナンチオ選択的加水分解についてスクリーニングした。

【0165】

#### 方法

PMA のエナンチオ選択的加水分解のための市販酵素の最初のスクリーニングを、0.065 M  $\text{KNaPO}_4$  (pH 7.2) の Sorensen リン酸緩衝液中に 0.5 % (v/v) の基質 (10 % 水性原液から添加) 及び 1.0 mg/ml の酵素を含む反応 0.2 ml 中で実施した。反応は、基質の添加によって開始し、300 rpm で水平に振盪しながら 1.8 ml のテフロンライニングを施されたネジ蓋付きオートサンプラー中で 30 (特に断らない限り) においてインキュベートした。酵素を含まない対照反応を用いて、非生物的転化を評価した。反応はアセトニトリル 0.8 ml の添加によって終了させた。得られた溶液を少なくとも 1 時間冷蔵し、次いで GC - FID (以下を参照) によ

【0166】

#### 結果

分析した最初の基質、PMA に関して、110 種超の市販ヒドロラーゼのスクリーニングに基づく結果は、*Candida antarctica* リパーゼ B 型 (CAL - B) が PMA の (R) - 対掌体 [(R) - 1 - メトキシ - 2 - プロパノールアセテート; (R) - PMA] の選択的加水分解を触媒して、(S) - PMA を 99 % ee 超で分割することを示した (表 I に示した通り; この表は、PMA のエナンチオ選択的加水分解を触媒した酵素を記載している)。Chirazyme L - 2, lyo., (Roche)、Altus 13 (Altus Biologics, Inc.)、Lipase SP - 435 (Novo Nordisk) 及び組換え CAL - B (Fluka Biochemika) として供給された酵素製剤において、CAL - B の高いエナンチオ選択性が観察された。この実施例において CAL - B に関して記載したその他の研究は、Chirazyme L - 2, lyo. (Roche) を用いて実施した。

【0167】

同様なエナンチオ選択性を示すが一般にスクリーニングアッセイにおいてより低いエナンチオ純度 (80 % ee 超) を示す他の酵素としては、*Pseudomonas* sp. リパーゼ (Chirazyme L - 6, lyo.; Roche)、*Pseudomonas* sp. リボ蛋白リパーゼ (Fluka Biochemika)、リパーゼ PS - C1 (Amano) 及び *Pseudomonas cepacia* リパーゼ (Altus Biologics, Inc.) が挙げられる (表 I)。CAL - B と逆のエナンチオ選択性を示す酵素としては、エステラーゼ E001、E002 及び E003 (Thermogen, Inc.) が挙げられる。

【0168】

10

20

30

40



【表 1】

表 1

PMA (0.5%, v/v) のエナント選択的加水分解を触媒する市販ヒドロラーゼに関するスクリーニング結果<sup>1</sup>の要約

No.	酵素	供給源(供給業者)	(S)- PMA (% v/v)	(R)- PMA (% v/v)	PMA (% ee)
1	Chirazyme L-2, Iyo	Candida antarctica リパーゼ B (Roche Molecular Biochem.)	0.0642	0.0001	99.7%S
33	リパーゼ SP-435	Candida antarctica リパーゼ B (Novo Nordisk)	0.0593	0.0001	99.7%S
49	Altus 13	Candida antarctica リパーゼ B (Altus Biologics, Inc)	0.0775	0.0001	99.7%S
106	リパーゼ B, 組み換え	Candida antarctica リパーゼ B (Fluka Biochemika)	0.0732	0.0001	99.7%S
91	リパーゼ LP 'S'	(Amano)	0.0666	0.0001	99.7%S
115	リポ蛋白リパーゼ	Pseudomonas sp. リポ蛋白リパーゼ (Fluka Biochemika)	0.0567	0.0001	99.6%S
5	Chirazyme L-6	Pseudomonas sp. リパーゼ (Roche Molecular Biochem.)	0.0594	0.0050	84.5%S
95	リパーゼ PS-CI	Pseudomonas cepacia リパーゼ (Amano)	0.0894	0.0157	70.1%S
38	Altus 2	Pseudomonas cepacia リパーゼ (Altus Biologics, Inc)	0.0707	0.0186	58.3%S
66	E001	エステラーゼ(Thermogen, Inc.)	0.0043	0.0431	81.9%S
67	E002	エステラーゼ(Thermogen, Inc.)	0.0001	0.0208	99.0%R
68	E003	エステラーゼ(Thermogen, Inc.)	0.0082	0.0476	70.6%R

<sup>1</sup> 本明細書中に記載されたようにして20時間インキュベートされた0.5%PMA及び約1.0mg/mlの酵素を含むスクリーニングアッセイの1:5希釈について、結果をGC/FIDによって測定し、容量/容量%(% v/v)として報告した。

【0169】

## 実施例 4

## 加水分解：最適化

収率又は転化率（加水分解された基質の割合又は量として定量）、異性体純度（% eeとして測定）、基質装填量（又は濃度）、酵素装填量、反応時間、反応温度及び反応媒体を含む種々の反応パラメーターを、実験室規模及び反応器規模（又はスケールアップ）のために最適化できる条件を割り出すために、実験を行った。

【0170】

## 方法

基質の加水分解速度及び分割基質の対掌体過剰を典型的には、1.8 ml のテフロンラ

10

20

30

40

50

イングを施されたネジ蓋付きオートサンブラーバイアル中にセットされた反応混合物 0.5 ml 中で評価した。特に断らない限り、反応混合物は、水平に回転振盪しながら (300 rpm)、典型的には 30 において、生体触媒として CAL-B (Chirazyme L-2, lyo., Candida antarctica リパーゼ B 型, 120 U/mg lyo 超) を用いてインキュベートした。少なくとも 10% (v/v) の基質を含む反応をサンプリングし、分析前にアセトニトリル中で 1:100 に希釈した。一連の研究は、P 系グリコールエーテルアシレートの加水分解分割のための酵素触媒としての CAL-B の性能を系統的に評価するため、及び効率的な酵素分割バイオプロセスの条件を特定するために実施した。以下の条件を、独立したスクリーニング実験において試験した：

10

- ・種々の溶媒を含む二相反応混合物 (相比 0.5)
- ・種々の二相反応混合物中における基質濃度の増加
- ・水性反応混合物中の種々の基質濃度における生成物濃度の増加
- ・水性反応及び二相反応における緩衝能の増加
- ・完全なエナンチオ選択的加水分解のための最大基質濃度
- ・二相反応における種々の酵素濃度
- ・高い酵素濃度及び基質濃度による転化反応の終点
- ・水性反応における種々のインキュベーション温度

【0171】

#### 結果

20

#### トルエン及びヘキサンを用いた二相反応

酵素触媒 CAL-B (Chirazyme L-2) による基質 (PMA) の加水分解を、二相反応条件下で比較的高い基質濃度及び種々の補助溶媒を用いて試験した。トルエン及びヘキサンを、10% (v/v) PMA を含む反応において相比 0.5 (50% v/v) で補助溶媒として添加した。同様な反応をセットアップして、基質及び溶媒の両者としての 10% (v/v) 及び 50% (v/v) の PMA を用いて CAL-B (Chirazyme L-2) の性能を試験した。反応を 30 において 16 時間インキュベートし、生成物を GC によって分析した。

【0172】

結果は以下の結論を裏付ける。基質及び溶媒の両者としての 50% (v/v) の PMA はわずかに抑制的であった。50% (v/v) のトルエンは補助溶媒としては適当であったが、分割 (S) - PMA の最終収率はより低かった (収率の低下は、より低いエナンチオ選択性又はより速い触媒反応の結果として残留 (S) - PMA を加水分解する時間が長くなったことによると考えられる)。50% (v/v) のヘキサンは、99% ee 超の (S) - PMA の高い収率が観察されたことに基づき、最良の補助溶媒であった。水性反応における 10% (v/v) の PMA は、効率よく加水分解され、(S) - PMA を高収率且つ 99% ee 超で分割した。

30

【0173】

#### ヘキサン及びトルエン二相反応における PMA 濃度の増加

基質濃度の増加の影響を、補助溶媒としてヘキサン又はトルエンを含む二相反応において試験した。

40

【0174】

補助溶媒として 50% (v/v) ヘキサンをを用いて PMA 装填量を 10% (v/v) から 25% (v/v) まで増加させると、(S) - PMA の最終エナンチオ純度は 99% ee 超から 87% ee 超まで低下した。25% 及び 40% のヘキサンを用いた 50% PMA を含む反応はそれぞれ、83% ee 超及び 66% ee 超の最終 (S) - PMA 純度を生じた。

【0175】

生成物を抑制せずに完全なエナンチオ選択性を可能にする最高基質濃度を、補助溶媒としてのヘキサン及びトルエン (25 ~ 65%, v/v) 並びに 25% v/v の一定水相濃

50

度を用いる反応において10～50% (v/v)のPMAの加水分解を測定することによって割り出した。終点の分析はまた、ヘキサンが比較的良い補助溶媒であることを立証し、補助溶媒としてヘキサンを含む10% (v/v) PMAは99% ee超で(S)-PMAを分割することを更に示した。同一条件下で20% (v/v) PMAを用いると、(S)-PMAのエナンチオ純度は93% eeに低下した。

#### 【0176】

水性反応における10% & 25% PMAを用いたPM濃度の増加の影響

CAL-B (Chirazyme L-2) がPMによって生成物抑制を受けるか否かを確認するために、水性条件下でPM濃度を増加させて、PMAの加水分解を試験した。

#### 【0177】

加水分解度は、15% (v/v) 以下の添加PMの存在下において10% (v/v) PMAを含む反応においては影響されなかった。(S)-PMAの分割は、2時間までに最大理論収率で99.5% ee超までなされた。しかし、20% (v/v) のPMを含む反応においてはわずかな抑制が見られ、(S)-PMAのエナンチオ純度は～96% eeまで低下した。この閾値を更に、添加PM濃度を増加させて(0～50%) 25% (v/v) PMAの加水分解を試験することによって分析した。これらの条件下において、基質の完全なエナンチオ選択的加水分解は、約12.5%のPMを遊離させると推測され、最終生成物の添加は、転化度を抑制し且つ(S)-PMAの最終エナンチオ純度を低下させた。従って、これらの結果は、好ましい基質濃度は約25% (v/v)であることを示している。

#### 【0178】

これらの反応の最終pHは3.5～4.5の範囲であった。従って、アルコール最終生成物による抑制に加えて、酢酸遊離によるpH抑制の可能性も考えられた(以下を参照)。

#### 【0179】

前記結果に基づき、生成物の回収及び除去を総合した選択的方法は反応をより高い基質濃度で進行させることができることが考えられる(例えば、Indlekofer, M. et al. (1996) Biotechnology and Bioengineering, 52: 459～474; 及びIndlekofer, M. et al. (1995) Biotechnology Progress 11: 436～442)。

#### 【0180】

緩衝液濃度の増加

緩衝液濃度の増加の影響を、50% (v/v) PMA及び1mg/ml CAL-B (Chirazyme L-2 lyo.)を含む水性及び二相(ヘキサン25% (v/v))中で試験した。

#### 【0181】

0、66及び200mMのSorensenリン酸緩衝液(pH7.2)を含む反応は、44時間にわたってPMAの加水分解速度及び加水分解度に差を示さなかった。水性及び二相反応の場合に18時間までに達した最終生成物のエナンチオ純度はそれぞれ、93% ee超及び84% ee超の(S)-PMAに相当した。これらの結果は、基質の加水分解過程で遊離された酢酸は反応の進行を抑制しないことを示唆した。水、66mM緩衝液及び200mM緩衝液中で実施した反応の最終pHはそれぞれ、3.0～3.5、4.0～4.5及び4.5であった。

#### 【0182】

水性及び二相反応において完全なエナンチオ選択的加水分解を受ける最大PMA濃度

水性及び二相条件(n-ヘキサン; 相比0.2)下で完全なエナンチオ選択的加水分解を引き起こすPMAの最大濃度を割り出すために、基質加水分解度及び基質加水分解の最終% eeを基質濃度の関数として測定した。酵素触媒は、1mg/mlのCAL-B (Chirazyme L-2 lyo.)とした。

#### 【0183】

25% (v/v) 以下の PMA を含む水性反応において 64 時間までに 99.5% ee 超の (S) - PMA の完全な分割が観察された。30% (v/v) 及び 40% (v/v) の PMA を含む同様な反応ではそれぞれ、97.5% ee 超及び 95.5% ee 超の (S) - PMA が生成された。20% (v/v) のヘキサンを含む二相条件下では、これより低い生成物エナンチオ純度が観察され；20% (v/v)、25% (v/v) 及び 40% (v/v) で装填された PMA は 64 時間以内にそれぞれ、98.5% ee 超、97% ee 超及び 92% ee 超で (S) - PMA に分割された。

#### 【0184】

これらの結果は、PMA は水性条件下で最も効率的に加水分解されること、及び使用実験条件下で完全なエナンチオ選択的加水分解を受ける PMA の最大濃度は 25% (v/v) であることを示した (図 2 に示した通り)。

10

#### 【0185】

水性及び 50% ヘキサン二相反応における PMA 加水分解に対する酵素濃度の影響

CAL-B (Chirazyme L-2 lyo., 120 U/ml 超) を 1.0、0.5、0.1、0.05、0.01、0.001 mg/ml の濃度で含む反応を用いて、50% (v/v) ヘキサンを含む二相条件下において 10% (v/v) PMA のエナンチオ選択的加水分解を行うのに必要な最小活性単位を求めた。

#### 【0186】

2 時間後、1.0 及び 0.5 mg/ml の酵素装填量を含む反応は、PMA の (S) - 対掌体をほぼ理論収率において 98% ee 超まで分割した、72 時間までに、0.01 mg/ml 以上の酵素装填量を含む反応は (S) - PMA を 99.5% ee 超で分割した。しかし、インキュベーション時間の延長により、更に加水分解が起こり、その結果、酵素を 0.5 及び 1.0 mg/ml で含む反応における (S) - PMA の収率はそれぞれ、約 25% 及び 10% まで (最大理論収率 50% に基づく) 低下した。

20

#### 【0187】

同様な実験において、加水分解を、25% (v/v) PMA を含む水性反応における酵素濃度の関数として試験した。結果を図 3 に示す。結果は、2.0、1.0 及び 0.5 mg/ml の濃度の CAL-B (Chirazyme L-2 lyo.) はそれぞれ、4、6 及び 24 時間以内に (S) - PMA を 99% ee 超まで完全に分割することを示した (図 3)。これに対して、0.1 mg/ml の CAL-B (Chirazyme L-2 lyo.) を含む反応は、30 時間以内に (S) - PMA を部分的に分割した (60% ee 未満)。

30

#### 【0188】

エナンチオ選択性に対する高い酵素濃度及び PMA 濃度の影響

2.0 及び 5.0 mg/ml の CAL-B (Chirazyme L-2 lyo.) 及び 25% (v/v) ~ 50% (v/v) の範囲の PMA 濃度を含む反応を用いて、酵素選択性及び基質転化度を評価した。

#### 【0189】

2.0 及び 5.0 mg/ml の酵素装填量を含む水性反応は、6 時間以内に 40% (v/v) 以下の PMA 装填量を分割し、最大収率で 95% ee 超の (S) - PMA を生じた。30 時間のインキュベーション後に (S) - PMA の % ee 又は収率にほとんど低下は見られなかった。このことは、記載した条件下では、CAL-B 製剤が (R) - PMA の加水分解に対して極めてエナンチオ選択的であることを示した。

40

#### 【0190】

水性反応における PMA の加水分解に対する温度の影響

30 ~ 50 (5 刻み) のインキュベーション温度の影響を、25% (v/v) の PMA 並びに 1.0 及び 0.5 mg/ml の CAL-B (Chirazyme L-2 lyo.) を含む水性反応において試験した。これらの条件下で、PMA の加水分解は 40 において最も速く、最終エナンチオ純度はこの温度においては影響されなかった。しかし、より少ない酵素装填量で 35 においてインキュベートされた反応は、より長い時

50

間、持続可能な触媒反応を示し、40 においてインキュベートされた反応よりも高い (S) - PMA エナンチオ純度を生じた。50 におけるインキュベーションは5時間以内に酵素を不活化した。

【0191】

測定された加水分解速度が、温度による基質溶解度の差とは独立していると仮定するならば、これらの結果は、CAL-B (Chirazyme L-2 lyo.) に最適な温度は約40 であるが、35 ではより高い酵素安定性が観察されることを示した。

【0192】

#### 実施例 5

その他の P 系グリコールエーテルアセテートのエナンチオ選択的加水分解

10

加水分解：酵素スクリーニング

PMA のエナンチオ選択的加水分解に関してスクリーニングしたのと同じパネルの110 種超の市販ヒドロラーゼを更に、その他の P 系グリコールエーテルアセテートのエナンチオ選択的加水分解に関してスクリーニングした。これらの酵素は最初に、実施例 2 に一般的に記載したようにしてスクリーニングし、基質濃度は 0.5 % (v/v) とした。各期質に関して2種の反応をセットアップし、4時間及び24時間で終了させた。4時間のサンプリングは、極めて速い加水分解反応を触媒する選択的酵素を特定するために実施した。最初に、同一 GC 条件下で分離された PEA、PnPA、PiPA 及び PnBA 対掌体の絶対配置を決める基準として PMA 対掌体の溶出順序を用い、最も速く溶出する対掌体に経験的に (S) - 配置と決めた。続いて、この溶出を、化学的に合成された、対掌体として純粋な、公知の空間的配置を有する化合物を用いて確認した (実施例 1 に記載した方法)。

20

【0193】

各基質のエナンチオ選択的加水分解を触媒するいくつかの酵素を特定した。これらの酵素を「ヒット」と称する。これらのヒットの大部分は、グリコールエーテルアセート基質の (R) - 対掌体を加水分解して、グリコールエーテルアセートの (S) - 対掌体を 85 % ee 超で分割した。逆のエナンチオ選択性を示す酵素も存在し、最初の酵素スクリーニングにおいて特定された。これらの酵素としては、エステラーゼ E001、E002 及び E003 (Thermogen, Inc) が挙げられる。しかし、これらの最初のスクリーニング反応において観察されたそれらのエナンチオ選択性は、それらの対応する酵素ほどは高くなかった。

30

【0194】

最もエナンチオ選択的な酵素を、約 2 mg/ml の酵素及び 0.5 % (v/v)、10 % (v/v)、25 % (v/v) のグリコールエーテルアセート基質を含む 0.5 ml 水性反応において再びスクリーニングした。これらの第2のスクリーニング反応を用いて、より高い基質濃度でエナンチオ選択的酵素の性能を試験した。PEA、PnPA、PiPA 及び PnBA の加水分解に関して最もエナンチオ選択的な酵素を表 II ~ V に記載する。これらのうち、Candida antarctica リパーゼ B 型 (CAL-B) がグリコールエーテルアセート基質のそれぞれに対して最も選択的であった。CAL-B の選択性能は、Chirazyme L-2, lyo., (Roche)、Altus 13 (Altus Biologics, Inc)、Lipase SP-435 (Novo Nordisk) 及び組換え CAL-B (Fluka Biochemika) として供給された酵素製剤において観察された。複数のヒットが種々の商業的供給業者から同一酵素を同定したので、スクリーニングされた酵素の回収における重複は利点と見なされた。

40

【0195】

【表 2】

表II

PEAのエナントチオ選択的加水分解を触媒する市販ヒドロラーゼに関するスクリーニング結果の要約

酵素	供給源(供給業者)	R-PE % ee (% v/v)	S-PEA % ee (% v/v)	E値 <sup>2</sup> (%C)
Lipase B, 組み換え	Candida antarctica リパーゼ B (Fluka Biochemika)	91.50% (7.16)	98.74% (6.52)	113 (53)
Chirazyme L-2, Iyo	Candida antarctica リパーゼ B (Roche Molecular Biochem.)	85.19% (8.94)	98.45% (7.99)	60 (54)
Altus 13	Candida antarctica リパーゼ B (Altus Biologics, Inc)	88.81% (6.66)	98.44% (6.01)	81 (54)
リパーゼ SP-435	Candida antarctica リパーゼ B (Novo Nordisk)	95.93% (8.46)	97.11% (6.95)	205 (55)
リパーゼ	Pseudomonas fluorescens (Fluka Biochemika)	49.92% (6.60)	97.61% (4.20)	12 (67)
リパーゼ PS-C II	Pseudomonas cepacia リパーゼ (Amano)	88.98% (8.01)	91.35% (7.49)	55 (52)
Altus 2	Pseudomonas cepacia リパーゼ (Altus Biologics, Inc)	90.09% (8.90)	88.52% (8.26)	57 (52)
リパーゼ PS	Pseudomonas cepacia リパーゼ (Amano)	90.43% (6.84)	87.64% (6.64)	57 (50)
リポ蛋白リパーゼ	Pseudomonas sp. リポ蛋白リパーゼ B型 (Fluka Biochemika)	92.22% (5.31)	74.12% (5.68)	55 (46)
Chirazyme L-6	Pseudomonas sp. リパーゼ (Roche Molecular Biochem.)	93.40% (5.03)	57.12% (6.19)	52 (40)

<sup>1</sup> 本明細書中に記載したようにして24時間インキュベートされたPEA 10%(v/v)及び約2.0mg/mlの酵素を含むスクリーニングアッセイの1:10希釈について、結果をGC/FIDによって測定し、%(v/v)として報告した。

<sup>2</sup>  $E = \ln((1 - ee\%PEA) / (1 + ee\%PEA / ee\%PE)) / \ln((1 + ee\%PEA) / (1 + ee\%PEA / ee\%PE))$   
 転化率パーセント、%C (容量パーセントに基づいて評価):  
 $[(S)PE + (R)PE] / [(S)PEA + (R)PEA + [(S)PE + (R)PE] \times 100$

【表 3】

表 III

PnPAのエナント選択的加水分解を触媒する市販ヒドロラーゼに関するスクリーニング結果<sup>1</sup>の要約

酵素	供給源(供給業者)	時間 (時間)	R-PnP % ee (% v/v)	S-PnPA % ee (% v/v)	E値 <sup>2</sup> (% C)
Chirazyme L-2, Iyo	Candida antarctica リパーゼ B (Roche Molecular Biochem.)	4	99.07% (12.86)	95.53% (6.13)	827 (67)
Chirazyme L-2, c.-f., C2, Iyo	Candida antarctica リパーゼ B (固定比)	1	98.84% (6.88)	92.86% (3.24)	587 (67)
		4	96.33% (6.96)	91.14% (2.59)	171 (72)
Chirazyme L-6	Pseudomonas sp. リパーゼ (Roche Molecular Biochem.)	4	92.79% (7.22)	73.16% (4.58)	59 (59)
リパーゼ LPS	リパーゼ B (Amano)	1	80.46% (7.39)	94.45% (5.96)	33 (57)
		4	50.12% (9.36)	90.42% (2.98)	9 (80)

<sup>1</sup> 指定された時間、30℃において振温しながら(300rpm)インキュベートされた PnPA 10% (v/v) 及び2.0mg/mlの酵素を含むスクリーニング反応1:100希釈について、結果をGC/FIDによって測定し、% (v/v) として報告した。1aに関する酵素濃度は53.2mg/mlであった。

<sup>2</sup> エナント選択率、即ち「エナント化」(E) :  

$$E = \ln((1 - ee\%PnPA) / (1 + ee\%PnPA / ee\%PnP)) / \ln((1 + ee\%PnPA) / (1 + ee\%PnPA / ee\%PnP))$$
 転化率パーセント、%C (容量パーセントに基づいて評価) :  

$$[(S)PnP + (R)PnP] / [(S)PnPA + (R)PnPA + (S)PnP + (R)PnP] \times 100$$

【表 4】

表IV

PiPAのエナントチオ選択的加水分解を触媒する市販ヒドロラーゼに関するスクリーニング結果<sup>1</sup>の要約

酵素	供給源(供給業者)	時間 (時間)	R-PIP % ee (% v/v)	S-PIPA % ee (% v/v)	E値 <sup>2</sup> (% C)
Chirazyme L-2, Iyo	Candida antarctica リパーゼ B (Roche Molecular Biochem.)	24	94.4% (3.10)	94.14% (2.32)	149 (54)
Chirazyme, L-2, c.-f., C2, Iyo	Candida antarctica リパーゼ B (固定比) (Roche Molecular Biochem.)	1	96.5% (3.39)	98.76% (1.16)	287 (60)
Chirazyme L-6	Pseudomonas sp. リパーゼ (Roche Molecular Biochem.)	24	94.86% (3.03)	84.42% (2.25)	102 (56)
Chirazyme L-10	Alcaligines sp. リパーゼ (Roche Molecular Biochem)	24	94.8% (2.99)	79.0% (2.3)	90 (54)
Altus 19	Pseudomonas cepacia リパーゼ (Altus Biologies)	1	94.46% (3.16)	95.5% (3.06)	135 (51)
リパーゼ LPS	リパーゼ (Amano)	1	95.47% (3.02)	95.27% (2.89)	164 (51)
リパーゼ PS	リパーゼ (Amano)	24	95.64% (3.14)	94.12% (2.31)	160 (57)

<sup>1</sup> 指定された時間、30℃において振盪しながら(300rpm)インキュベートされたPiPA 10% (v/v) 及び2.0mg/mlの酵素を含むスクリーニング反応1:100希釈について、結果をGC/FID分析によって測定し、容量/容量%として報告した。1aに関する酵素濃度は53.2mg/mlであった。

<sup>2</sup> エナントチオ選択率、即ち「対掌体比」(E) :

$E = \ln((1 - ee\% \text{PIPA}) / (1 + ee\% \text{PIPA} / ee\% \text{PnP})) / \ln((1 + ee\% \text{PIPA}) / (1 + ee\% \text{PIPA} / ee\% \text{PnP}))$   
 転化率%、%C (容量パーセントに基づいて評価) :

$[(S)\text{PIP} + (R)\text{PIP}] / [(S)\text{PIPA} + (R)\text{PIPA} + (S)\text{PIP} + (R)\text{PIP}] \times 100$



【表 5】

表V

PnBAの選択的加水分解を触媒する市販ヒドロラーゼに関するスクリーニング結果<sup>1</sup>の要約

酵素	供給源(供給業者)	時間 (時間)	R-PnB % ee (% v/v)	S-PnBA % ee (% v/v)	E値 <sup>2</sup> (% C)
Chirazyme L-2, lyo	Candida antarctica リパーゼ B (Roche Molecular Biochem.)	4	99.95% (3.10)	96.5% (2.81)	500超 (52)
Chirazyme, L-2, c.-f., C2, lyo	Candida antarctica リパーゼ B (固定比) (Roche Molecular Biochem.)	4	99.95% (2.24)	98.29% (1.16)	500超 (66)
Chirazyme L-6	Pseudomonas sp. リパーゼ (Roche Molecular Biochem.)	4	87.01% (2.88)	81.19% (2.89)	36 (49)
Chirazyme L-8	Thermomyces sp. リパーゼ (Roche Molecular Biochem.)	24	99.95% (1.8)	75% (1.05)	500 超 (60)
Altus 2	Pseudomonas cepacia リパーゼ (Altus Biologies)	24	91.26% (1.97)	63.64% (1.17)	42.1 (59)

<sup>1</sup> 指定された時間、30℃において振盪しながら(300rpm)30℃においてインキュベートされたPnBA 10%(v/v)及び2.0mg/mlの酵素を含むスクリーニング反応の1:100希釈について、結果をGC/FIDによって測定し、容量/容量%として報告した。1aに関する酵素濃度は53.2 mg/mlであった。

<sup>2</sup> エナンチオ選択率、即ち「対掌体比」(E)：

$$E = \ln((1 - ee\%PnBA) / (1 + ee\%PnBA / ee\%PnB)) / \ln((1 + ee\%PnBA) / (1 + ee\%PnBA / ee\%PnB))$$

転化率%、%C (容量パーセントとして評価)：

$$[(S)PnB + (R)PnB] / [(S)PnBA + (R)PnBA + (S)PnB + (R)PnB] \times 100$$

500超のE計算値は500超として報告する。

## 【0199】

CAL-BによるPEA、PnPA、PiPA及びPnBAの選択的分割(前記表II~Vに示される)に基づき、Chirazyme L-2, lyo及びChirazyme L-2, c.-f., C2, lyoを用いて、高基質濃度におけるPPhAのエナンチオ選択的加水分解を別々に試験した。1.0mg/mlのChirazyme L-2, lyo又は26.6mg/mlのChirazyme L-2, c.-f., C2, lyo及び10、15、25、35及び50%(v/v)のPPhAを含む0.2ml水性反応を用いて、PPhA転化の酵素選択性及び程度を評価した。Chirazyme L-2, c.-f., C2, lyoを含む水性反応の分析は、(S)-PPhA及び(R)-PPhAがいずれも、25%以下の基質装填量において99%ee(収率50%)で分割されることを示した。35%(81%ee)及び50%(74%ee)の基質装填量では(S)-PPhAの部分分割が観察された。Chirazyme L-2, lyoを含む反応は、10%の装填量で(S)-PPhAを完全に分割し(99%ee超)、15%(v/v)、25%(v/v)、35%(v/v)及び50%(v/v)で基質を装填すると、(S)-PPhAが約95%ee、86%ee、79%ee及び69%eeまで分割された。

【 0 2 0 0 】

C A L - B のエナンチオ選択性

種々の P 系グリコールエステルアセテートに関する C A L - B ( C h i r a z y m e L - 2 l y o . ) のエナンチオ選択性を、水性反応において種々の条件下で試験した。いくつかの実験条件及び結果を、以下の表 VI に要約する。

【 0 2 0 1 】

【表 6】

表VI

固定化CAL-B(Chirazyme L2, c.-f., G2, Iyo)を用いたグリコールエーテルアセテートの加水分解

基質	濃度 (v/v%)	温度 °C	リパーゼ <sup>1</sup> (mg/ml)	反応時間 (時間)	転化率 (%)	(R)- エーテル (% ee)	(S)-酢酸 エステル % ee
PMA	20	40	26.6	4	37.6	n. d	99超
	20	40	26.6	20	48.9	n. d	99超
	25	40	26.6	2	35.6	n. d	99超
	25	40	26.6	30	54.9	n. d	97.0
	35	40	26.6	22	38.7	n. d	95.1
	45	40	26.6	22	34.2	n. d	94.0
	50	40	26.6	30	33.4	n. d	92.2
	75	40	26.6	6.5	29.3	n. d	79.1
PEA	10	40	26.6	1.5	53.2	97.3	98.7
	20	40	26.6	3	55.2	96.4	97.1
	25	40	26.6	1.5	56.2	97.3	95.3
	30	40	26.6	3	51.7	96.8	94.6
	35	40	26.6	5	54.4	96.9	93.3
	40	40	26.6	5	51.1	97.3	91.7
	50	40	26.6	20	43.2	97.1	88.2
	75	40	26.6	6.5	29.3	n. d	79.1
PnPA	15	30	26.6	4	73.2	99超	91.4
	25	30	26.6	4	59.6	99超	89.7
	35	30	26.6	4	63.2	99超	86.0
	50	30	26.6	24	55.6	99超	80.3
PiPA	15	30	26.6	24	66.2	95.4	90.2
	25	30	26.6	24	68.1	96.4	89.2
	35	30	26.6	24	55.6	97.3	85.6
	50	30	26.6	24	42.1	97.4	79.7
PnBA	15	30	26.6	4	81.7	97.9	93.6
	25	30	26.6	4	50.4	98.9	87.5
	35	30	26.6	4	48.5	99超	83.5
	50	30	26.6	4	47.8	99超	76.9
PPhA	10	30	26.6	4	50.0	99超	99超
	15	30	26.6	4	68.6	99超	99超
	25	30	26.6	4	50.6	99超	99超
	35	30	26.6	24	44.8	99超	81.5
	50	30	26.6	24	41.3	99超	73.7

<sup>1</sup> Candida antarctica リパーゼB型、キャリア固定、Chirazyme L-2, c.-f., G2, Iyo (約10U/mg, Roche Molecular Biochemicals)として市販。

n. d 測定せず。

#### 【0202】

これらの結果は、CAL-BがPEA、PnPA、PiPA、PnBA及びPPhAのエナンチオ選択的加水分解を触媒し、(S)-酢酸エステル及び(R)-エーテルを共に高純度で生成することを示している。これらの結果はまた、CAL-Bが広い基質特定性を示し、ほとんどの場合には試験された条件下では全ての基質装填量において高いエナン

チオ選択性を保持することを示している。

【 0 2 0 3 】

高基質濃度までの種々の各グリコールエーテルアセテート基質濃度 ( 5 0 ~ 7 0 % v / v ) 及び種々の酵素濃度における C A L - B のエナンチオ選択的分割性能を表 VII に要約する。表 VII にはまた、グリコールエーテルアセテートのエナンチオ選択的加水分解に関するいくつかの最適パラメーターの概略を示してある。

【 0 2 0 4 】

【 表 7 】

表 VII

10

PMA, PEA, PnPA, PiPA, PnBA 及び PPhA のエナンチオ選択的加水分解を触媒する市販ヒドロラーゼに関するスクリーニング結果の要約

基質	スクリーニング酵素数 2回目 (1回目)	CAL-Bに関する基質濃度範囲 (%v/v)	CAL-Bに関する酵素濃度範囲	CAL-Bに関する最適条件		
				基質濃度 (% v/v)	酵素装填量	実証した再循環数
PMA	4 (110超)	0.5-70	120-180 U/ml	25	120 U/ml	30
PEA	12 (110超)	0.5-50	15-120 U/ml	20	120 U/ml	16
PnPA	8 (110超)	0.5-50	120-240 U/ml	10	240 U/ml	n. d.
PiPA	7 (110超)	0.5-50	120-240 U/ml	10	240 U/ml	n. d.
PnBA	8 (110超)	0.5-50	120-240 U/ml	10	240 U/ml	n. d.
PPhA	2	0.5-50	120 U/ml	15	120 U/ml	5

20

n. d. 測定せず。

30

【 0 2 0 5 】

実施例 6

エステル交換：最初の評価

C A L - B による P M のエステル交換

C A L - B がグリコールアルキル ( 又はアリール ) エーテルのエステル交換を触媒できることを最初にいくつかの異なる反応において試験した。0.5 ml のこれらの反応は、5.0 mg / ml の C A L - B ( C h i r a z y m e L - 2 l y o . ) 及び 1 0 % ( v / v ) の P M を含んでおり、アシル供与体として酢酸ビニル又は酢酸エチルを用い、無極性補助溶媒としてトルエン又はヘキサンを用いるか用いずに行った。結果を表 VIII に示す。

40

【 0 2 0 6 】

【表 8】

表VIII

種々の溶媒及びアシル供与体条件下におけるCAL-BによるPMのアシル化<sup>1</sup>

溶媒/アシル供与体	最初のPM (% v/v)	PM (% v/v)	(S)- PMA (% v/v)	(R)- PMA (% v/v)	(R)- PMA (% ee)
酢酸ビニル	10%	1.15	9.40	12.48	14%
トルエン/酢酸ビニル (8:1)	10%	0.08	11.06	12.20	5%
ヘキサン/酢酸ビニル (8:1)	10%	0.09	8.92	9.98	6%
トルエン/酢酸エチル (8:1)	10%	6.85	0.62	3.70	71%
酢酸エチル	10%	5.80	0.86	9.19	83%

<sup>1</sup> 結果は、本明細書中に記載した条件における16時間のインキュベーション後の反応のGC/FID分析に基づく。

## 【0207】

16時間において実施した終点の分析は、CAL-Bが、アシル供与体として酢酸ビニル又は酢酸エチルを用いたPMのエナンチオ選択的アシル化を触媒することを示した(表VIIIに示した通り)。別の実験は、最高のエナンチオ選択性が最初は無水条件下で酢酸エチルを90%(v/v)で用いた場合に起こるらしいことを示した。しかし、好ましいアルコール対掌体のより速いエステル化の後にはおそらく、あまり好ましくないアルコール対掌体のよりゆっくりとしたアシル化が起こるという仮説に基づいて、酢酸ビニルを用いた高い初期エナンチオ選択性を除外することはできなかった。この仮説は、5.0mg/mlのCAL-B(Chirazyme L-2 lyo.)が、アシル供与体として酢酸ビニル又は酢酸エチルを用いた50%(v/v)以下のPMのエナンチオ選択的アシル化を触媒することを示した、反応の時間的な分析によって確認された。PM及び酢酸エチルをそれぞれ50%(v/v)含む反応において、得られる(R)-PMAは、1時間以内に98%eeで形成された。

## 【0208】

非活性化エステルである酢酸エチルがこの反応のアシル供与体として働くことができるという観察は、光学的に活性なP系グリコールエーテルが高収率で製造できることを示している。

## 【0209】

CAL-Bによるその他のP系グリコールエーテルのエステル交換

CAL-Bを酵素触媒とし、酢酸エチル及び酢酸ビニルをアシル供与体とし、並びに有機溶媒を反応媒体としてP系グリコールエーテルPM、PE、PNP、PiP、PNB及びPPhのエステル交換による分割を試験した。対応するグリコールエーテルアセテートの(R)-対掌体が高い光学純度で生成物として形成された。

## 【0210】

試験した全てのグリコールエーテルの転化は最初は、アシル供与体として酢酸ビニルを用いた場合に最も速いことが観察された。

## 【0211】

## 実施例 7

### エステル交換：最適化

収率又は転化率（アシル化された基質の割合又は量として定量）、異性体純度（% e e として測定）、基質装填量（又は濃度）、酵素装填量、反応時間、反応温度及び反応媒体を含む種々の反応パラメーターを、実験室規模及び反応器規模（又はスケールアップ）のために最適化できる条件を割り出すために、実験を行った。

#### 【0212】

### 酵素濃度及び温度の影響

酵素装填量の調整は、反応工学によって生成物の光学純度を増加させる有効な方法であることが示された。

10

#### 【0213】

基質 / アシル供与体比 75 / 25 % (v / v) PM / VA 及び 80 / 20 % (v / v) PPh / VA の 1.0 ml の反応に関する PM 及び PPh のエナンチオ選択的エステル交換を、26.6、13.3 及び 6.7 mg / ml のキャリア固定 *Candida antarctica* リパーゼ B 型 (Chirazyme L-2, c.-f., C2, lyo.) を用いて試験した。結果は、PMA 及び PPhA の (R) - 対掌体酢酸エステル生成物に関する最高 % e e は、反応中の酵素濃度の減少と相関していることを示した。この相関は転化度とは独立していた。PM の全転化率は、3 種の酵素装填量に関する計算理論転化率（アシル供与体の量に基づく）よりも ~ 10 % 高く、PPh の転化率は計算されたリオン転化率よりも ~ 10 % 低かった。(R) - PM 及び (R) - PPhA 生成物への選択

20

#### 【0214】

酢酸ビニルを用いた PM のエステル交換を種々の酵素装填量で試験した別の実験の結果を、以下の表 IX に示す。

#### 【0215】

反応温度を低下させると、PM のエステル交換による分割に関しては CAL - B のエナンチオ選択性は増加した。分割速度は遅いが、反応温度の低下は、生成物の光学純度を増加させる有効な方法であった。この効果は、- 20 ~ 30 の範囲の温度で示された。

30

#### 【0216】

PM / 酢酸ビニル比 75 / 25 % 又は 70 / 30 % v / v の 1.0 ml の反応に関する PM のエナンチオ選択的エステル交換を、振盪せずに 30、20、4 及び - 20 (± 2) においてインキュベートされた 26.6、13.3、6.7、3.3 及び 1.7 mg / ml のキャリア固定 *Candida antarctica* リパーゼ B 型 (Chirazyme L-2, c.-f., C2, lyo.) を用いて試験した。最低酵素装填量を含み且つ最低温度 (- 20) でインキュベートされた反応は、最高 % e e の (R) - PMA を生成したが、速度は最も遅かった。しかし、結果は、所望の分割性能に適当な条件は、最適化インキュベーション温度及び酵素装填量によって確認できることを示している。種々の温度においてインキュベートされた、種々の酵素装填量を含む反応の性能を表 IX に示す。

40

#### 【0217】

【表 9】

表IX

酵素濃度及び温度の関数としての、酢酸ビニルによる(±)-1-メトキシ-2-プロパノール(PM)のエステル交換

基質	アシル 供与体	基質/アシル 供与体化	温度 (°C)	酵素装填量 (mg/ml) <sup>1</sup>	時間 (時間)	転化率 (%)	(S)-グリコー ルエーテル % ee	(R)-酢酸 エステル % ee
PM	VA	75/25	30	26.8	2	44.6	n. d.	90.34
				26.8	8	44.8		82.32
PM	VA	70/30	4	26.8	4	20.7		95.3
				26.8	24	53.6		87.6
PM	VA	70/30	-20	26.8	4	8.3		97.6
				26.8	52	45.5		96.3
PM	VA	75/25	30	13.4	2	37.3		93.2
				13.4	8	45.9		88.7
PM	VA	70/30	4	13.4	4	15.3		96.5
				13.4	26	51.9		91.7
PM	VA	70/30	-20	13.4	4	5.7		98.0
				13.4	52	35.5		97.7
PM	VA	75/25	30	6.8	2	24.3		94.7
				6.8	8	46.9		91.7
PM	VA		20	6.8	6	24.5		92.1
				6.8	22	42.4		87.7
PM	VA		4	6.8	6	20.0		96.6
				6.8	48	46.0		93.0
PM	VA		-20	6.8	6	5.5		98.4
				6.8	48	26.3		97.9
PM	VA	75/25	30	3.4	2	12.1		94.4
				3.4	6	25.5		92.5
PM	VA		20	3.4	6	17.8		93.5
				3.4	22	32.9		91.3
PM	VA		4	3.4	6	11.4		97.0
				3.4	48	40.4		94.6
PM	VA		-20	3.4	6	2.6		98.5
				3.4	48	14.6		98.3
PM	VA	75/25	30	1.7	2	6.7		94.8
				1.7	6	23.1		92.6
PM	VA		20	1.7	6	11.0		94.6
				1.7	22	30.2		92.8
PM	VA		4	1.7	6	6.3		97.3
				1.7	48	30.1		96.3
PM	VA		-20	1.7	6	1.6		98.3
				1.7	48	9.8		98.4

<sup>1</sup> Candida antarctica lipase type B、キャリア固定型、Chirazyme L-2, c.-f., C2, Iyo (約100U/mg, Roche Molecular Biochemicals)として市販。

## 【0218】

## 水の影響

アシル化速度及びエナンチオ選択性に対する水分活性及びリン酸緩衝液(3% v o l . 未満)の影響を、PM及びPPhを用いて示した。含水量(水分活性)は、反応速度を遅

10

20

30

40

50

くするが；しかし、含水量は反応の進行を制御するのに使用できると考えられる。

【0219】

#### 基質濃度の影響

表Xに示した通り、CAL-Bは、70% (v/v) 以下の基質濃度におけるグリコールエーテルPM、PE、PnP、PiP、PnB及びPPhのエナンチオ選択的分割を、50～150超のエナンチオ選択率(E)値で触媒することが示された。

【0220】

【表10】

表X

高基質濃度における(R)-アシレートの酵素分割<sup>1</sup>

基質	時間 (時間)	(S)-OH %ee	(R)-OAc %ee	E値
PE	6時間	37%	96%	71
PnP	5時間	95%	89%	65
PiP	6時間	92%	87%	49
PnB	4時間	99%超	82%	59
PPh	4時間	99%超	94%	160

<sup>1</sup> 反応容量は0.5ml；酵素濃度は(mg/ml)；基質濃度は70%(v/v)；アシル供与体は酢酸ビニであった。

【0221】

(R)-エステルの純度は、反応の持続時間、又は生成物が分析された段階によって異なる。これはまた、基質転化率が50%より高いか低いかによっても異なる(CAL-Bによって触媒された酢酸ビニルによるPPhのエステル交換に関する結果を図5に示す)。典型的には、50%未満の基質転化率においては、(R)-エステルが高いee値で存在する。例えば、(R)-酢酸エステルに関しては、PEAが約96% ee超であり、PPhAが約95% ee超であり、残りの、P系グリコールエーテルの(R)-酢酸エステルは約80% ee超であった(例えば、約87%、89%及び82%がPnBAに関して観察された)。

【0222】

#### アシル供与体

種々の可能なアシル供与体の性能を、6.6mg/mlのChirazyme L-2, c.-f., C2.lyo、基質又はアシル受容体としてのPE及び1.0モル当量に相当する量のアシル供与体を含む1.0mlの反応において試験した。得られたPE基質装填量は35～55%(v/v)の範囲であり、残りの反応容量はアシル供与体であった。同様な反応において、PnPを基質とし、アシル供与体を1:1及び1:2に対応するモル比で用いた。得られたPnP基質装填量は31～59%(v/v)の範囲であり、残りの反応容量はアシル供与体であった。試験したアシル供与体は、酢酸ブチル(BA)、酢酸エチルフェニル(EPA)、酢酸エチル(EtA)、トリクロロ酢酸エチル(EtCA)、トリフルオロ酢酸ビニル(EtFA)、酢酸イソプロペニル(IPA)、酢酸ビニル(VA)、メトキシ酢酸エチル(EMA)、酪酸2,2,2-トリフルオロエチル(TfEB)、ジケテン(DK)及びプロピオン酸ビニル(VP)である。反応は30においてインキュベートし、24時間にわたってサンプリングした。形成された分割(S)-基質及び(R)-エステルの% ee並びに転化率%を表XIに示す。

【0223】



【表 1 1】

表XI

種々のアシル供与体を用いたグリコールエーテルPE及びPnPのエステル交換

基質	アシル 供与体 <sup>1</sup>	基質／アシル 供与体比 (v/v)	温度 ℃	リパーゼ <sup>2</sup> (mg/ml)	時間 (時間)	転化率 (%)	(S)-グリコー ルエーテル ee (%)	(R)-酢酸 エステル ee (%)
PE	BA	47/53	30	6.7	20	16.9	11.7	94.9
	BA	47/53	30	6.7	24	17.8	9.5	94.7
	EPA	39/61	30	6.7	20	2.1	-1.5	51.0
	EtA	54/46	30	6.7	20	17.5	9.8	94.3
	EtA	54/46	30	6.7	24	18.4	3.1	96.7
	ETFA	42/58	30	6.7	20	1.0	-9.4	15.6
	IPA	51/49	30	6.7	20	51.6	72.4	95.6
	IPA	51/49	30	6.7	24	54.5	77.5	95.3
	VA	55/45	30	6.7	20	44.7	51.8	95.2
	VA	55/45	30	6.7	24	47.4	54.9	95.0
	EMA	47/53	30	6.7	24	1.0	10.7	11.6
	TFEB	38/62	30	6.7	20	60.6	54.5	63.9
	TFEB	38/62	30	6.7	24	63.9	58.7	65.0
	VP	51/49	30	6.7	20	62.5	73.2	67.3
	VP	51/49	30	6.7	24	65.3	77.9	67.8
PnP	BA	50.5/49.5	30	6.7	2	7.4	5.2	98.4
	BA	50.5/49.5	30	6.7	20	17.2	17.4	96.1
	BA	34/66	30	6.7	6	17.1	16.4	97.6
	BA	34/66	30	6.7	24	24.1	23.9	94.9
	EtA	58/42	30	6.7	4	11.4	9.5	98.1
	EtA	58/42	30	6.7	24	18.7	17.2	95.6
	EtA	41/59	30	6.7	4	16.0	15.3	98.0
	EtA	41/59	30	6.7	24	25.7	25.1	95.3
	IPA	55/45	30	6.7	4	33.5	38.6	97.8
	IPA	55/45	30	6.7	20	54.9	98.7	91.8
	IPA	38/62	30	6.7	6	45.1	62.5	96.9
	IPA	38/62	30	6.7	20	58.7	98.0	88.1
	VA	59/41	30	6.7	1	32.0	35.1	97.4
	VA	59/41	30	6.7	6	52.6	85.2	93.6
	VA	59/41	30	6.7	20	60.7	98.3	74.3
	VA	42/58	30	6.7	1	39.3	47.2	96.7
	VA	42/58	30	6.7	6	56.5	95.5	90.1
	VA	42/58	30	6.7	20	66.1	97.7	66.8
	TFEB	47/53	30	6.7	20	61.9	77.2	81.0
	TFEB	47/53	30	6.7	24	61.6	76.1	81.0
	TFEB	31/69	30	6.7	20	59.5	71.3	80.4
	TFEB	31/69	30	6.7	24	62.9	80.5	81.4
	VP	55/45	30	6.7	6	62.7	86.7	81.8
	VP	55/45	30	6.7	24	66.8	99.2	82.6
	VP	38/62	30	6.7	6	61.6	93.8	82.4
	VP	38/62	30	6.7	24	68.2	99.0	82.7

<sup>1</sup> 試験したアシル供与体：酢酸ブチル(BA)、酢酸エチルフェニル(EPA)、酢酸エチル(EtA)、トリフルオロ酢酸エチル(ETFA)、酢酸イソプロペニル(IPA)、酢酸ビニル(VA)、メトキシ酢酸エチル(EMA)、酢酸2,2-トリフルオロエチル(TFEB)、プロピオン酸ビニル(VP)

<sup>2</sup> *Candida antarctica* lipase type B、キャリア固定、Chirazyme L-2, C.-f., C2, Iyo (約100U/mg, Roche Molecular Biochemicals)として市販。

## 【0224】

アシル供与体としてトリクロロ酢酸エチル又はジケテンを用いた場合にはエステル交換はほとんど認められなかった。これらの結果は、酢酸ビニル及び酢酸イソプロペニルが有効なアシル供与体であって、グリコールエーテルアシル化に対して高い選択性を与えるこ

とを示している。

【 0 2 2 5 】

適当なアシル供与体の選択は、その他の考慮事項によって誘導する。このような考慮事項としては、反応中に形成される生成物の型、並びに揮発性及び毒性を含む、その生成物の特性が挙げられる。例えば、アシル供与体として酢酸ビニルを使用すると、ビニルアルコールが生成され、これはアセトアルデヒドに互変異性化することがわかっている。アセトアルデヒドは、極めて引火性で（引火点 - 40 ）、動物の発ガン物質ではないかという疑いが持たれており、蒸留によって効率よく回収するのが困難である。従って、生成物は安全上の問題があり、健康上有害であり、分割対掌体の分離に使用される蒸留装置を汚染すると考えられる。他方、アシル供与体として酢酸イソプロペニルを使用すると、イソ

10

【 0 2 2 6 】

【表 1 2】

表XII

アシル供与体としてVA及びIPAを用いたグリコールエーテルのエステル交換

基質	アシル 供与体 <sup>1</sup>	基質／アシル 供与体比 (v/v)	基質／アシル 供与体 モル比	リパーゼ <sup>2</sup> (mg/ml)	時間 (時間)	転化率 (%)	(S)-グリコー ルエーテル ee (%)	(R)-グリコー ルエーテルア セテート ee (%)
PE	IPA	51/49	1/1	6.7	20	51.6	72.4	95.6
	IPA	51/49	1/1	6.7	24	54.5	77.5	95.3
	VA	55/45	1/1	6.7	20	44.7	51.8	95.2
	VA	55/45	1/1	6.7	24	47.4	54.9	95.0
PnP	IPA	55/45	1/1	6.7	4	33.5	38.6	97.8
	IPA	55/45	1/1	6.7	20	54.9	98.7	91.8
	IPA	38/62	1/2	6.7	6	45.1	62.5	96.9
	IPA	38/62	1/2	6.7	20	58.7	98.0	88.1
	VA	59/41	1/1	6.7	1	32.0	35.1	97.4
	VA	59/41	1/1	6.7	6	52.6	85.2	93.6
	VA	59/41	1/1	6.7	20	60.7	98.3	74.3
	VA	42/58	1/2	6.7	1	39.3	47.2	96.7
	VA	42/58	1/2	6.7	6	56.5	95.5	90.1
	VA	42/58	1/2	6.7	20	66.1	97.7	66.8
	IPA	57/43	1/1	6.7	4	40.1	53.3	96.7
	IPA	57/43	1/1	6.7	6	44.8	61.2	95.9
PnB	IPA	57/43	1/1	6.7	20	58.0	99.5	81.7
	IPA	40/60	1/2	6.7	6	47.6	67.4	95.4
	IPA	40/60	1/2	6.7	20	58.7	99超	79.2
	IPA	40/60	1/2	6.7	24	60.3	99超	74.4
	VA	61/39	1/1	6.7	4	52.1	82.7	92.6
	VA	61/39	1/1	6.7	6	54.3	86.4	89.3
	VA	61/39	1/1	6.7	20	66.5	99超	56.7
	VA	44/56	1/2	6.7	2	38.5	51.5	95.2
	VA	44/56	1/2	6.7	6	55.9	99超	87.0
	VA	44/56	1/2	6.7	20	68.1	99超	53.5
	IPA	57/43	1/1	6.7	6	29.8	51.3	96.4
	IPA	57/43	1/1	6.7	20	43.5	97.9	93.1
PPh	IPA	57/43	1/1	6.7	24	44.1	98.2	92.0
	IPA	40/60	1/2	6.7	6	35.8	62.4	95.0
	IPA	40/60	1/2	6.7	20	44.5	96.1	90.5
	IPA	40/60	1/2	6.7	24	45.0	98.1	89.5
	VA	61/39	1/1	6.7	6	38.4	73.3	95.3
	VA	61/39	1/1	6.7	20	45.8	97.6	87.5
	VA	61/39	1/1	6.7	24	46.2	98.1	86.2
	VA	44/56	1/2	6.7	4	39.9	73.6	93.7
	VA	44/56	1/2	6.7	6	43.1	99超	92.8
	VA	44/56	1/2	6.7	20	47.6	98.1	81.7

<sup>1</sup> 試験したアシル供与体：酢酸イソプロペニル(IPA)、酢酸ビニル(VA)<sup>2</sup> Candida antarctica リパーゼB型、キャリア固定、Chirazyme L-2, C.-f., C2, Iyo (約10U/mg, Roche Molecular Biochemicals)として市販。

【0 2 2 7】

アシル供与体に対する基質の比：基質転化度の制御

P M及びP P hのC A L - B触媒エステル交換をそれぞれ、80%及び84%の基質装填量で示した。反応の残りの容量は酢酸ビニル(アシル供与体として)であった。アシル供与体の量の制限は、基質転化度を制御する有効な方法であり；従って、アシル供与体の量は、50%の基質転化率よりもわずかに低いかわずかに高い転化率を可能にするのに充

分な量で供給する。この概念はまた、所望の転化度に関して許容できる最高基質濃度の使用によって容量生産性を最大にすることに重点を置く。

【0228】

別の実験によって、酢酸ビニルがアシル供与体である場合の、種々のアシル供与体比におけるグリコールエーテル基質のエステル交換を試験した。結果を以下の表XIIIに示す。

【0229】

【表13】

表XIII

アシル供与体として種々の比の酢酸ビニルを用いたグリコールエーテル基質のエステル交換

基質	アシル 供与体	基質／アシル 供与体比	温度 (°C)	酵素濃度 <sup>1</sup> (mg/ml)	時間 (時間)	転化率 (%)	(S)-グリコー ルエーテル ee (%)	(R)-酢酸 エステル ee (%)
PM	VA	50/50	30	1.0	2	59.9	n. d. <sup>2</sup>	94.8
					22	84.3	n. d.	56.2
PM	VA	70/30	30	1.0	2	59.6	n. d.	94.3
					22	68.7	n. d.	81.6
PnB	VA	50/50	30	1.0	2	51.9	75.3	86.2
					22	70.5	99.0	47.6
PnB	VA	70/30	30	1.0	2	52.4	79.0	88.1
					6	59.9	99.0	76.3
PE	VA	50/50	30	1.0	4	39.6	95.7	95.7
					22	52.3	77.2	94.3
PE	VA	70/30	30	1.0	4	33.8	32.9	95.9
					22	39.6	45.4	95.7
PiP	VA	50/50	30	1.0	2	53.8	73.2	87.7
					22	65.4	95.1	73.2
PiP	VA	70/30	30	1.0	2	43.9	50.4	91.1
					22	63.6	96.9	79.4
PnP	VA	50/50	30	1.0	2	48.7	70.3	94.4
					22	67.6	99.0	59.7
PnP	VA	70/30	30	1.0	2	47.5	67.6	94.6
					5	58.4	95.4	89.0
PPh	VA	50/50	30	1.0	2	38.9	74.7	94.9
					22	52.5	99.0	68.0
PPh	VA	70/30	30	1.0	2	33.3	62.1	95.9
					6	46.0	99.0	92.2
PtB	VA	73/27	30	6.7	6	41.6	54.4	99超
					20	55.6	96.5	99超
PtB	VA	76/24	30	6.7	6	41.8	54.9	99超
					20	54.5	91.6	99超

<sup>1</sup> Candida antarctica リパーゼB型、Chirazyme L-2, Iyo(約120U/mg, Roche Molecular Biochemicals)として市販。固定型、Chirazyme L-2, C.-f., C2, Iyo(約10U/mg, Roche Molecular Biochemicals)を基質としてPtBを含む反応に用いた。

<sup>2</sup> n. d.、測定せず。

【0230】

#### 実施例 8

##### 触媒の再循環

加水分解又はエステル交換用の酵素触媒は再循環することができる。以下の実験は、プロピレングリコールエーテルアセテートのエナンチオ選択的加水分解への使用時にCAL-Bを再循環するための種々のパラメーターを評価及び最適化するために行った。

【0231】

酵素再循環は、25、35及び45%(v/v)の濃度のPMA及び13mg/mlの

10

20

30

40

50

Chirazyme L-2, c.-f., C2 (約10 U/mg)を含む0.5 mlの水性反応において試験した。反応は40 において300 rpmで回転振盪しながらインキュベートした。分析は24時間のサイクルの間に実施し、その時点で、反応溶液を除去し、基質を含む新しい緩衝液を元の固定化酵素に添加して、次の反応サイクルを開始した。35%及び45%の基質濃度において、サイクル3まで分割は不完全であり、両酵素とも(S)-PMAを92% ee以下の純度で生成した。これに対して、25%のPMAを含む反応は一般に、6つの反応サイクルを通して(S)-PMAを96~98% ee超まで分割した。別の酵素再循環の研究を、20及び25%基質装填量において実施した。Chirazyme L-2, c.-f., C2に関しては、(S)-PMAのエナンチオ純度は、20%又は25%の基質濃度を用いて実施された実験において30反応サイクルの間、約97% eeであった。 10

#### 【0232】

PMA分割のスケールアップを、BioFlo 3500 Fermentor (New Brunswick Scientific)中で1.5 Lの反応容量で、25% (v/v) PMAの基質濃度において行った。26.6 mg/mlのChirazyme L-2, c.-f., C2 (約280 U/ml)の初期酵素装填量において、15サイクルまで(各反応サイクルの長さは約2~5時間の範囲であった)の間は25% PEAの分割が観察された。各サイクルの最後に、攪拌を止め、沈降した固定化CAL-B生体触媒を反応器中に保持しながら、分割された反応マトリックスを除去した。ラセミ体PMAを含む新鮮な緩衝液を反応器に加えて、次のサイクルを開始させた。15の分割サイクルの間に、追加の酵素は添加しなかった。15の分割サイクルの間に塩化メチレン抽出後に回収された(S)-PMA及び(R)-PMの平均エナンチオ純度はそれぞれ、99.5% ee超及び85% ee超であった。 20

#### 【0233】

固定化CAL-B (Chirazyme L-2, c.-f., C2; 約240 U/ml)を、PEAを基質とするいくつかの異なる酵素再循環実験に用いた。これらの実験は実験室規模(5 ml未満)及び1.5-L規模の両方で行った。1つの実験においては、3つの異なる酵素装填量について15サイクル(サイクル時間は一般に24時間であった)より長い間、1 mlの反応容量中における20% (v/v) PEAの分割が観察された。この実験において、反応マトリックスを、各サイクルの最後に固定化CAL-Bから除去し、分析し、新しい反応マトリックスをこの固定化酵素に添加して、次のサイクルを開始させた。反応混合物を約40 においてインキュベートした。結果は図6に示す。これらの結果は、使用した実験条件下では、いくつかのサイクルで(S)-PEAの非常に良好な分割を観察できること及び酵素濃度高いほど、多くのサイクルの間、高い分割を生じることを示している。 30

#### 【0234】

別の実験において、20% (v/v) PEAの分割を、BioFlo 3500 Fermentor (New Brunswick Scientific)中で反応容量1.5 Lの反応容量までスケールアップした。生体触媒の再循環は30サイクル超の間(各サイクルの長さは約2~約9時間であった)、CAL-Bによる分割を可能にした。この実験において、反応マトリックスを、各サイクルの最後に固定化CAL-Bから除去し、分析し、新しい反応マトリックスをこの固定化酵素に添加して、次のサイクルを開始させた。反応混合物をpH 7.2に保持し(20%水酸化ナトリウムの添加によって)、37 においてインキュベートした。各サイクルの過程においてサンプルを除去し且つ分析することによって、生成物のエナンチオ純度を監視した。最初の18サイクルの結果を図7に示す。基質の分割に必要な反応サイクル時間が増加した時、新しい酵素(最初の装填量の10%)を反応器に添加した。これはサイクル8、10、16及び25において行った。32のPEA分割サイクルにわたって性能を図8に示す。各サイクルの最後のサンプルを用いて、(S)-PEA及び(R)-PE両方の分割(% eeとして表す)並びに総転化率(%として表す)を計算した。結果を図8に示す。これらの結果は、スケールアップ 40 50

条件下において、いくつかのサイクルにわたって、(S)-PEA及び(R)-PE両者の非常に良好な分割及び高転化レベルを観察できることを示している。更に、これらの実験は、スケールアップ条件下におけるChirazyme L-2, c.-f. C2の有効な再循環を示している。再循環は、サイクル当たりの酵素コスト寄与を著しく低下させた。更なる酵素再循環は、より有利なプロセス効率及び全生成物経済性を提供できるであろう。高濃度のPPhのエステル交換による分割は、以下の条件下、1.0-Lの規模でアシル供与体として酢酸ビニルを用いてChirazyme L-2, c.-f. C2 (6.6 mg/ml) によって示した。50%未満に転化される反応を、PPh/VA比70/30~76/30で構成し、室温において進行させて、(R)-PPhAを高% eeで生成した。50%超の転化率が望ましい反応に関しては、70/30のPPh/VA比を用い、4においてより高いエナンチオ選択性が得られ、典型的には(S)-PPh及び(R)-PPhAの生成物エナンチオ純度はそれぞれ90% ee超及び95% ee超である。攪拌は、電磁攪拌棒によって行う。反応容量からの固定化酵素の分離は濾過によって行うことができる。これらの条件下における酵素の再循環は5~8サイクルの間、行うことができる。

#### 【0235】

別の反応を、エステル交換条件下において1.0リットル規模で種々のPGEA基質を用いて実施して、対応する(S)-PGA E及び(R)-PGA Eを高エナンチオ純度で分割した。この研究における酵素を、バッチ分割の複数のサイクルに再利用した。条件及び分割性能を表XIVに要約する。

#### 【0236】

#### 【表14】

表XIV

バッチ No.	基質	アシル 供与体	基質/アシル 供与体比 (v/v)	温度 (°C)	理論 転化率 (観測転化 率%)	CAL-B, L -2, C2 (mg/ml)	サイクル 数	(S)-グリ コールエー テル (ee %)	(R)-グル コールエー テルア セレート (ee %)
1	PM	VA	62/38	4	65(68)	10.00	10	95.47	80.02
2	PM	IPA	69/31	4	40(約43)	13.4	3	27.56	95.44
3	PnP	VA	69/31	4	65(約63)	10	21	98.6	88.2
4	PnP	VA	78.5/21.5	4	40(約44)	3.3-6.6	8	47.55	97.1
5	PnB	IPA	69/31	4	61(約59)	6.7-18.6	7	99.9	92.1
6	PnB	IPA	73/27	4	50(約45)	6.7	8	55.7	97.7
7	PtB	VA	73/27	24	60(約56)	6.7	12	95.5	99.6
8	PPh	VA	76/24	20	56(約45)	6.7	5	62.64	96.06
9	PPh	VA	70/30	4	66(約51)	6.7	2	78.9	97.08

#### 【0237】

#### 実施例 9

キラルアシル供与体としてのラセミ体PMA

方法：

1.8 mlのバイアルに、以下の量のラセミ体1-tert-ブトキシ-2-プロパノール(PtB)、記載したアシル供与体及び生体触媒(酵素)としてのChirazyme L-2 C2を加えた。PtBのおおよその理論転化率は、基質及びアシル供与体のモル比に基づく。100%超の理論転化率値は、供給されたアシル供与体が化学量論過剰であったことを意味する。

#### 【0238】

【表 1 5】

表XV

反応番号	アシル供与体 (容量%)	酵素 (mg/ml)	基質	PtB ( $\mu$ L)	アシル供与体 ( $\mu$ L)	理論転化率 %
1	PMA 50%	13.4	PtB	500	500	104
2	PMA 70%	13.4	PtB	700	300	45
3	酢酸ビニル70%	13.4	PtB	700	300	70
4	酢酸エチル70%	13.4	PtB	700	300	66

10

## 【0239】

総容量 1.0 ml の反応混合物を、4 において振盪しながらインキュベートした。サブサンプルを、65 時間にわたって定期的に除去し、キラル GC によって分析して、PtB の転化率並びに得られた酢酸エステル生成物 1-tert-ブトキシ-2-プロパノールアセテート (PtBA)、PMA 及び PM のエナンチオ純度を監視した。

## 【0240】

20

## 結果

表XVに示した結果は、DOWANOL PMAがPtBの酵素エステル交換においてアシル供与体として働いて、(R)-PtBAを高エナンチオ純度(99% ee超)で生成できることを示している。(R)-PtBの高選択性アシル化に加えて、酵素選択性もキラルアシル供与体、PMAの使用において観察された。反応1及び2は、CAL-Bが(R)-PMAをアシル供与体として優先的に使用して、PtBのアシル化と同時に(R)-PMを副生成物として形成し且つ(S)-PMAを部分分割することを示している。グリコールエーテル基質(例えばPtB)のキラルPMAに対する比及び揮発性(R)-PMの除去は、原則として、反応転化度の制御に用いることができる。例えば、PtB/PMAを容量比50:50(反応1)及び70:30(反応2)で含む反応はそれぞれ、PtB転化率31%及び20%で99% ee超のR-PtBAを生成した。また、酵素濃度、反応時間及びインキュベーション温度を反応速度及びエナンチオ選択性の制御に使用できることも留意すべきである。結果を表XVに示す。

30

## 【0241】

【表 16】

表XV

反応	時間 (時間)	(S)-PtB (% ee)	(R)-PtBA (% ee)	PtB 転化率 (%) <sup>1</sup>	(R)-PM (% ee)	(S)-PMA (% ee)	PMA 転化率 (%)
1	0	0	0	0	0	0	0
	18	22	99超	23	93	22	12
	24	25	99超	25	96	24	13
	47	32	99超	30	86	28	16
	65	34	99超	31	84	28	17
2	0	0	0	0	0	0	0
	18	13	99超	15	94	39	19
	24	15	99超	17	92	43	21
	47	17	99超	19	87	49	24
	65	18	99超	20	84	48	26
3	0	0	0	0	— <sup>2</sup>	—	—
	18	73	99超	49	—	—	—
	24	84	99超	53	—	—	—
	47	95	99超	56	—	—	—
	65	94	99超	56	—	—	—
4	0	0	0	0	—	—	—
	18	11	99超	13	—	—	—
	24	12	99超	15	—	—	—
	47	15	99超	17	—	—	—
	65	15	99超	17	—	—	—

<sup>1</sup> PtB転化率はPtBA形成により、GC-FID(ピーク面積)に基づき、[総PtBA/総PtBA+総PtB]×100と定義する。

<sup>2</sup> アシル供与体副生成物は、酢酸ビニル又は酢酸エチルを含む反応においては測定されなかった。

【0242】

## 実施例10

キラルアシル供与体としてのラセミ体PMA

## 方法

グリコールエーテル基質とアシル供与体との比の変化の影響を更に試験した。PtB/PMA容量比30:70、40:60、50:50、60:40及び70:30のを含む反応混合物を用いて、転化度及びR-PtBA、S-PtB、R-PM及びS-PMAから得られる分割を試験した。反応は、1.8mlのバイアル中に以下の量のラセミ体PtB、アシル供与体としてのPMA及び生体触媒(酵素)としてのChirazyme L-2 C2を含んでいた。

【0243】



【表 17】

反応番号	基質／アシル供与体 (比)	酵素 (mg/ml)	PtB ( $\mu$ L)	PMA ( $\mu$ L)	理論転化率 (%)
1	PtB/PMA (30:70)	13.4	300	700	244.09
2	PtB/PMA (40:60)	13.4	400	600	156.91
3	PtB/PMA (50:50)	13.4	500	500	104.61
4	PtB/PMA (60:40)	13.4	600	400	69.74
5	PtB/PMA (70:30)	13.4	700	300	44.83

10

## 【0244】

100%超の理論転化率値は、供給されたアシル供与体が化学量論過剰であったことを意味する。1.0mlの反応混合物を4 において振盪しながらインキュベートした。サブサンプルを48時間にわたって除去し、キラルGCによって分析して、PtBの転化率並びにPtB、PtBA、PMA及びPMのエナンチオ純度を監視した。

## 【0245】

## 結果

20

種々の容量比のPtB/PMAを含む反応は、種々のPtB転化度を示し、R-PtBAを99%ee超で且つ(S)-PtBを種々のエナンチオ純度で分割した(表XV参照)。PtB/PMAを30:70の比で含む反応は、PtBの最高転化率を示し、それより高い割合のPtB及びより少ない量のアシル供与体を含む反応よりも高いエナンチオ純度にそれを分割した。更に、キラルアシル供与体としてのR-PMAの選択的利用は、R-PMを効率よく分割し、S-PMA対掌体を濃縮した。結果を表XVIに示す。

## 【0246】

【表 18】

表XVI

反応	時間 (時間)	(S)-PtB (% ee)	(R)-PtBA (% ee)	PtB 転化率 (%) <sup>1</sup>	(R)-PM (% ee)	(S)-PMA (% ee)	PMA 転化率 (%) <sup>2</sup>
1	0	1	1	1	91	1	0
	2	18	98	19	93	8	5
	5	36	99超	32	87	12	7
	20.5	57	99超	42	68	12	10
	51	52	99超	40	50	7	11
2	0	0	34	0	0	0	0
	2	16	99超	17	93	10	6
	5	30	99超	29	88	16	10
	20.5	45	99超	38	67	17	14
	51	50	99超	39	39	12	15
3	0	0	18	0	0	0	0
	2	12	99超	14	94	12	7
	5	23	98	24	90	21	12
	20.5	36	99超	33	72	25	17
	51	40	99超	34	49	19	19
4	0	0	8	0	0	0	0
	2	7	99超	8	93	10	6
	5	17	98	19	90	25	14
	20.5	28	99超	27	74	34	22
	51	31	99超	29	51	26	24
5	0	0	6	0	0	0	0
	2	4	98	6	93	10	6
	5	11	98	14	91	28	16
	20.5	20	99超	21	77	45	26
	51	22	99超	23	56	37	29

<sup>1</sup> PtB転化率は、PtBA形成により、GC-FID(ピーク面積)分析に基づき、[総PtBA/総PtBA+総PtB]×100と定義する。計算転化率の精度は約±10%である。

<sup>2</sup> PMA転化率は、GC-FID(ピーク面積)分析に基づき、[総PM/総PM+総PMA]×100と定義する。計算転化率の精度は、約±10%である。

【0247】

## 実施例 11

キラルアシル供与体としてのラセミ体 PMA

## 実験 A

## 方法

10

20

30

40

50

前記反応においてみられる転化度に基づき、減圧下におけるPMストリッピングの効果を、PtB/PMAを容量比60:40で含む100mlの反応に関して試験した。PMの除去後、反応に更にPMAを加えた。反応#1からのR-PMの回分式除去及び新しいアシル供与体(PMA)のそれに続く添加を用いて、反応性蒸留計画の概念を明らかにした。PMストリッピングを行わずに、転化度及び生成物のエナンチオ純度を評価する対照反応には、(i)PMAの単一添加(反応#2)及び(ii)回分式PMA添加(反応#3)を行った。この反応は、以下の量のラセミ体PtB、アシル供与体としてのPMA及び生体触媒(酵素)としてのChirazyme L-2 C2を含んでいた。

【0248】

【表19】

10

反応番号	反応条件	酵素 (mg/ml)	基質	基質容量 (mL)	アシル 供与体 容量 (mL)	ストリッピング 間隔
1	ストリッピング	40.2	PtB	60	40 <sup>1</sup>	1.5hr
2	対照#2	40.2	PtB	60	40 <sup>2</sup>	—
3	対照#3	40.2	PtB	60	40 <sup>3</sup>	—

<sup>1</sup> 反応を開始するためと1.5、3.0及び4.5時間におけるPMストリッピング後に、反応1に40mlのPMAアリコートを加えた。

<sup>2</sup> 対照反応2には、反応を開始するためにアシル供与体としてPMAを40mlだけ加えた。

<sup>3</sup> 対照反応3はストリッピングしないが、反応を開始するためと1.75、3.25及び4.75時間のサンプリング後に40mlのPMAアリコートを添加した。

20

【0249】

反応混合物を、250mlのガラス容器中で30℃において攪拌しながらインキュベートした。反応1のストリッピングは、1.5時間毎に以下のようにして実施した：液相を固定化酵素から丸底フラスコ中にデカントし、減圧下で74℃において回転蒸発に供して、PMを除去した。PM除去後、反応内容物を冷却し(30℃)、サンプリングし、PMAを更に供給した。

30

【0250】

結果

結果は表XVIIに示す。これらの結果は、反応1及び反応3において得られたPtBの(R)-PtBAへの最終転化率がそれぞれ、70%及び46%であったことを示す。この差は、反応3におけるアシル供与体副生成物(PM)の蓄積によるものであり、不都合な反応平衡がそれ以上の転化を抑制する。両反応において形成された(R)-PtBAは99% ee超であった。しかし、キラル副生成物(R)-PMのストリッピングによって達成されたより高い転化率は、反応1においては(S)-PtBを84% ee超に分割できたが、反応3においては(S)-PtBの分割はわずか65.6% eeであった。反応1は70%のPtB転化率を示したが99% ee超の(R)-PtBAを含んでいた。これは、ストリッピングプロセスにおける反応からのPtBの部分的減少による。PMAがアシル供与体としてエナンチオ選択的に利用されたことは、反応1において回収された(R)-PMの分析によって明らかである。回収された(R)-PMは、1.5時間、3.0時間及び4.5時間の時点で凝縮された材料についてエナンチオ純度が66% ee~74% eeの範囲であった。

40

【0251】

この実験は、回分式でオフライン副生成物除去によって行っていたが、反応性蒸留計画での

50

連続生成物除去にも概念は有効であり、拡大できるであろう。回収された(R)-PMは、アシル供与体として酢酸ビニルを用いて第2の分割において品質を向上させて、高エナンチオ純度の(R)-PMAを生成することができる。

【0252】

【表20】

表XVII

実験A

反応番号	時間 (時間)	(S)-PtB (% ee)	(R)-PtBA (% ee)	PtB転化率 (%) <sup>1</sup>	(S)-PMA (% ee)	PMA転化率 (%) <sup>2</sup>	ストリップ された(R)-PM (% ee) <sup>3</sup>
1	0	0	0	0	0	0	
	0.5	10	99%超	12	16	9	
	1	16	99%超	18	24	14	
	1.5	21	99%超	22	29	16	70
	1.75	22	99%超	27	7	3	
	2	35	99%超	34	12	7	
	2.5	40	99%超	38	14	8	
	3	44	99%超	40	15	9	74
	3.25	46	99%超	53	6	— <sup>4</sup>	
	3.5	60	99%超	56	8	—	
	4	65	99%超	58	8	—	
	4.5	71	99%超	59	8	—	66
	4.75	68	99%超	67	4	—	
	20.5	85	99	70	3	—	
2	0	0	0	0	0	0	
	0.5	10	99%超	13	16	9	
	1	17	99%超	19	24	13	
	1.5	21	99%超	22	29	16	
	1.75	22	99%超	23	29	17	
	2	25	99%超	25	31	18	
	2.5	26	99%超	26	32	19	
	3	27	99%超	27	32	20	
	3.25	28	99%超	27	32	20	
	3.5	28	99%超	27	32	21	
	4	29	99%超	28	32	21	
	4.5	29	99%超	28	31	21	
	4.75	29	99%超	28	31	21	
	20.5	36	99	32	15	26	
3	0	0	0	0	0	0	
	0.5	10	99%超	12	15	8	
	1	17	99%超	18	23	13	
	1.5	21	99%超	22	28	16	
	1.75	22	99%超	23	12	8	
	2	29	99%超	28	15	9	
	2.5	33	99%超	30	17	11	
	3	36	99%超	32	18	12	
	3.25	37	99%超	33	11	8	
	3.5	41	99%超	35	12	8	
	4	44	99%超	37	13	9	
	4.5	47	99%超	38	13	9	
	4.75	47	99%超	38	9	7	
	20.5	66	99	46	6	9	

<sup>1</sup> PtB転化率は、PtBA形成によって報告し、GC-FID(ピーク面積)分析に基づき、[総PtBA/総PtBA+総PtB]×100と定義する。計算転化率の精度は約±10%であった。反応1における50%超のPtB転化率(99%超 eeの(R)-PtBAと共に)は、ストリッピングプロセス中における反応からのPtBの部分損失にある程度は起因する。

<sup>2</sup> PMA転化率は、GC-FID(ピーク面積)分析に基づき、[総PM/総PM+総PMA]×100と定義する。計算転化率の精度は、約±10%であった。

<sup>3</sup> ストリップされた(R)-PMとは、回転蒸発によって反応から除去されたPMフラクションを意味する。

<sup>4</sup> nd、測定せず。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 5 3 】

## 実験 B

## 方法

第 2 の実験は、P t B / P M A を容量比 5 0 : 5 0 で含む 1 0 0 m l の反応において減圧下における P M ストリッピングの効果を試験するために行った。実験条件は、指定された時間に 5 0 m l の P M A をアシル供与体として供給する以外は、実験 A に記載したのと同様であった。反応は以下の成分を含んでいた。

## 【 0 2 5 4 】

## 【表 2 1 】

反応番号	反応条件	酵素 (mg/ml)	基質	基質容量 (mL)	アシル 供与体 容量 (mL)	ストリッピング 間隔
1	ストリッピング	40.2	PtB	50	50 <sup>1</sup>	1.5時間
2	対照#2	40.2	PtB	50	50 <sup>2</sup>	—
3	対照#3	40.2	PtB	50	50 <sup>3</sup>	—

<sup>1</sup> 反応 1 には、1.5、3.0 及び 4.5 時間の P M ストリッピング後に 50 ml の P M A アリコートを追加した。

<sup>2</sup> 対照反応 2 には、反応を開始するためにアシル供与体として P M A を 50 ml だけ添加した。

<sup>3</sup> 対照反応 3 はストリップしないが、反応 1 に基づいて決められた時点で追加の P M A アリコートを添加した。

## 【 0 2 5 5 】

## 結果

実験 B の結果（表 XVIII）は、実験 A において示された効果を裏付けた。反応 1 及び 3 において得られた P t B の（R）- P t B A への最終転化率はそれぞれ、77% 及び 43% であった。50% のアシル供与体の存在下でも、反応 3 におけるアシル供与体副生成物（P M）の蓄積は、実験 A において観察されたレベル以上に転化を抑制した。更に、両反応において形成された（R）- P t B A は 99% e e 超に達した。反応 1 において（R）- P M のストリッピングによって達成されたより高い転化率はまた、5 時間以内に（S）- P t B を 80% e e 超まで分割できるのに対し、（S）- P t B の分割は反応 3 においてはわずか 60% e e であった。アシル供与体副生成物の除去は、基質をより高い転化率でより高いエナンチオ純度の生成物にすることができるという点で明らかに有利である。実験 B の反応 1 から回収された、ストリッピングされた（R）- P M のエナンチオ純度は、69 ~ 87% e e であった。ストリッピングの効果は、反応 1 及び 3 の P t B 転化度並びに生成物エナンチオ純度の比較によって明らかである。

## 【 0 2 5 6 】

【表 2 2】

表XVIII

## 実験B

反応番号	時間 (時間)	(S)-PtB (% ee)	(R)-PtBA (% ee)	PtB転化率 (%) <sup>1</sup>	(S)-PMA (% ee)	PMA転化率 (%) <sup>2</sup>	ストリップ された(R)-PM (% ee) <sup>3</sup>
1	0	0	0	0	0	0	
	0.5	11	98	14	12	7	
	1	21	99%超	21	19	11	
	1.5	27	99%超	26	23	13	87
	2	45	99%超	46	10	4	
	2.5	55	99%超	50	11	5	
	3	59	99%超	51	11	5	70
	4	77	99%超	69	5	— <sup>4</sup>	
	4.5	79	99%超	70	5	—	69
	5	80	99%超	76	3	—	
	5.5	80	99%超	76	3	—	
	6	83	99%超	77	3	—	
2	0	0	0	0	0	0	
	0.5	11	98	13	11	6	
	1	20	99%超	21	18	10	
	1.5	26	99%超	26	22	13	
	2	30	99%超	29	24	14	
	2.5	33	99%超	30	25	15	
	3	34	98	31	25	15	
	4	37	99%超	33	24	15	
	4.5	37	99%超	33	24	16	
	5	38	99%超	33	23	17	
	5.5	39	99%超	34	22	17	
	6	39	99%超	34	22	18	
3	0	0	0	0	0	0	
	0.5	10	98	13	11	6	
	1	19	99%	20	18	10	
	1.5	26	99%超	25	22	12	
	2	32	99%超	30	12	7	
	2.5	37	99%超	33	13	8	
	3	42	99%超	35	14	9	
	4	51	99%超	40	10	7	
	4.5	54	99%超	41	10	7	
	5	57	99%超	43	7	5	
	5.5	58	99%超	43	7	6	
	6	60	99%超	43	7	6	

<sup>1</sup> PtB転化率は、PtBAによって報告し、GC-FID(ピーク面積)分析に基づき、[総PtBA/総PtBA+総PtB]×100と定義する。計算転化率の精度は約±10%である。反応1における50%超のPtB転化率(99%超eeの(R)-PtBAと共に)は、ストリップングプロセス中における反応からのPtBの部分損失にある程度は起因する。

<sup>2</sup> PMA転化率は、GC-FID(ピーク面積)分析に基づき、[総PM/総PM+総PMA]×100と定義する。計算転化率の精度は約±10%である。

<sup>3</sup> ストリップされた(R)-PMとは、回転蒸発によって反応から除去されたPMフラクションを意味する。

<sup>4</sup> nd 測定せず。

【0257】

## 実施例12

(R, S)-1-tert-ブトキシ-2-プロパノールからの

(S)-1,2-プロパンジオールの製造

工程(a): (R, S)-1-tert-ブトキシ-2-プロパノールの酵素分割

(R, S)-1-tert-ブトキシ-2-プロパノール(PtB) 366 ml 及び酢酸ビニル 134 ml を含む 1.0 L 反応容器に、3.35 g の固定化CAL-BをCh i 50

razyme L-2 C2として添加した。(R, S)-1-tert-ブトキシ-2-プロパノール及び酢酸ビニルを容量比73:27(PtBのPtBAへの約60%の転化に充分である)で含む500mlの反応を30において攪拌しながらインキュベートした。生成物の収率及びエナンチオ純度を、20~24時間のインキュベーション時間にわたってキラルGCによって監視した。生成物の収率は典型的には、20時間以内に約50%の転化率を示し、その時点で反応の溶媒相を固定化酵素粒子から濾過によって分離した。固定化酵素は、容量比73:27の(R, S)-1-tert-ブトキシ-2-プロパノール及び酢酸ビニルを500mlの容量ずつ更に加えることによって、このようにして10以上の分割サイクルの間、アシル化触媒として再循環した。

#### 【0258】

10

GC分析の結果は、反応の回収溶媒相が、分割生成物(R)-1-tert-ブトキシ-2-アセトキシプロパン(R-PtBA)を99% ee超で及び(S)-1-tert-ブトキシ-2-プロパノール(S-PtB)を96% ee超で含むことを示した。アセトアルデヒドを、酵素アシル化の副生成物として得た。続いて、キラル生成物を、工程(b)に記載したようにして蒸留によって単離した。

#### 【0259】

#### 工程(b): (S)-PtB/(R)-PtBAの蒸留による分離

工程(a)からのキラル生成物を2工程で精製した。第1工程において、反応混合物からアセトアルデヒドを除去した。典型的なランにおいては、3790gのアセトアルデヒド/(S)-PtB/(R)-PtBA混合物を5L丸底フラスコに入れた。1/4"セラミックサドルが充填された2フィートのガラスカラム及びSR-1を冷却剤とする磁気還流冷却器(-15に設定)から成る真空蒸発装置に、このフラスコを取り付けた。フラスコを、2/2の還流/順流比(reflux/forwarding ratio)を用いて350mmHgにおいて47に加熱した。アセトアルデヒドのほとんどは3.5時間後に除去された。次いで、アセトアルデヒドを含まない(S)-PtB/(R)-PtBA混合物を、1/4"セラミックサドルが充填された6フィートのカラムを装着した同様な蒸留装置中で蒸留した。この工程においては、冷却剤として水を用いた。典型的なランにおいては、4,033gの(S)-PtB/(R)-PtBA混合物を5Lのフラスコ中に入れ、次いでそれを、2/1の還流/順流比を用いて6~36mmHgの範囲の圧力において74~89に加熱した。24の留分を採取した。これらの留分を、キャピラリーGCによって分析し、同様な組成の留分を合した。コンビネーションb(留分7~16)は1,265gであり、(S)-PtBを98.4%含んでいた。コンビネーションe(留分20~24)は1,990gであり、(R)-PtBAを99.5%含んでいた。各コンビネーションの希釈サンプル(水中、比200:1)の分析は、(S)-PtB及び(R)-PtBAが共に99.5% ee超で存在することを示した。

20

30

#### 【0260】

#### 工程(c-1): (S)-PtBの(S)-PGへの脱アルコキシル化

10mlの2つ口コニカル・ボトム・フラスコ中に、工程(b)で得られた(S)-PtB 5.0032g及びp-トルエンスルホン酸(p-TSA)触媒0.1888gを入れた。無水CaSO<sub>4</sub>乾燥管を有する冷却器をフラスコの口の一方の取り付け付けた。フラスコの他方の口にセプタムを取り付けた。フラスコを、100に加熱されたシリコーン油浴中に入れた。サンプルを時々採取し且つGCによって分析しながら、反応を13時間進行させた。反応の完了後、(S)-PtBの98.6%が反応しており、(S)-PGへの選択率が81.6%であることが示された(表XVIII参照)。水中で希釈(比200:1)された(S)-PG生成物をキラルGCによって分析し、99.5% ee超であることがわかった。

40

#### 【0261】

#### 工程(c-2): (R)-PtBAの(R)-PGへの加水分解及び脱アルコキシル化

10mlの2つ口コニカル・ボトム・フラスコ中に、工程(b)で得られた(R)-PtBA 5.0375g、蒸留水15.0919g及びp-TSA触媒0.4671gを

50

入れた。無水  $\text{CaSO}_4$  乾燥管を有する冷却器をフラスコの口の一方の取り付けた。フラスコの他方の口にセブタムを取り付けた。フラスコを、 $100^\circ\text{C}$  に加熱されたシリコーン油浴中に入れた。時々サンプルを採取し且つ GC によって分析しながら、反応を 33 時間進行させた。反応の完了後、(R) - PtBA の 100% が反応しており、(R) - PG への選択率が 86.5% であることが示された (表 XVIII 参照)。水中で希釈 (比 200 : 1) された (R) - PG 生成物をキラル GC によって分析し、99.5% ee 超であることがわかった。

#### 【0262】

#### 工程 (d) : 脱アルコキシル化生成物からの (S) - PG の単離

5 ml の丸底フラスコに、工程 (c - 1) からの生成物混合物及び攪拌棒を入れた。温度計、真空コネクター及び受け器を装着したマイクロ - フラッシュ蒸留装置をこのフラスコに取り付けた。ヒートガンを用いて、 $84 \sim 87^\circ\text{C}$  及び 10 mmHg において生成物をフラッシュした。単離された生成物を GC によって分析し、PG を 89% 含むことがわかった。赤外分光法によって、単離された生成物の主成分が PG であって、若干のカルボニル不純物が含まれることが確認された。この不純物は後に GC - MS によってプロピレングリコールのモノ - 及びジ - アセートと確認された。単離された (S) - PG (水中で 200 : 1 の比で希釈) をキラル GC によって分析し、99.5% ee 超であることがわかった。

10

#### 【0263】

#### 工程 (e) : (S) - PtB から残留酢酸を除去することによる収率の改良

20

前記工程で記載したプロピレングリコールアセートは、工程 (b) において (R) - PtBA の部分分解によって生じる (S) - PtB 中に残留酢酸が存在するために形成されたと考えられた。このことを念頭に置いて、少量の (S) - PtB を少量の 10 N NaOH で処理し、次いでフラッシュ蒸留させた。次に、処理された (S) - PtB を用いて、表 XIV に示したように工程 (c - 1) の実験を繰り返した。今度は、(S) - 1, 2 - プロパンジオールへの選択率が 95% 超 (99.5% ee) であった。前記のフラッシュ蒸留後の生成物の IR 分析は、酢酸エステルのピークを示さなかった。これは、(S) - PtB 中の遊離酢酸の悪影響を示した。当業者ならば、工程 (b) においてより注意深い蒸留を実施することによって酢酸の形成を減少させるか、又はなくすることができることがわかるであろう。

30

#### 【0264】



【表 2 3】

表XIX

## 脱アルコキシル化の結果

反応体	転化率 %	(R) 又は (S) PG への選択率 %	温度 (°C)	反応 時間 (時間)	触媒	Wt%触媒 (反応体重量 に基づく)	水 (モル 過剰)
(S)-PtB	65.4	68.3	40-80	5.5	スチレンビーズ*	10.1	n. a. **
(S)-PtB	81	73.6	80	10.5	スチレンビーズ*	17	n. a. **
(S)-PtB	96.4	82.8	100	14.5	スチレンビーズ*	14	n. a. **
(S)-PtB	98.6	81.6	100	13	p-TSA	3.8	n. a. **
(S)-PtB (NaOH処理)	98.8	95.9	100	19	p-TSA	7.9	n. a. **
(R)-PtB	87.7	5.1	80	6.5	スチレンビーズ*	9.8	n. a. **
(R)-PtB	100	31.3	100	13.5	p-TSA	4.1	1
(R)-PtB	100	86.5	100	33	p-TSA	3.1	29

\* スチレンビーズ：The Dow Chemical Companyによって商標DOWEX DR-2030イオン交換樹脂として販売されているスルホン酸基（酸濃度2M超）で官能基化。

\*\* 反応に水を使用しなかった。

10

20

【0265】

前述の出版物及び特許は全て、参照することによって本明細書中に取り入れる。本発明の前記方法及び系についての種々の変更及び変形を、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく実施できることは、当業者には明白であろう。本発明を特定の好ましい実施態様に関連して記載したが、特許請求の範囲に記載した本発明は、このような特定の実施態様に不当に限定すべきでないことを理解すべきである。実際に、物性物理学、化学及び分子生物学又は関連分野における熟練者には自明である、本発明の前記実施形態の種々の変更は、添付した「特許請求の範囲」の範囲内であるものとする。

30

【図面の簡単な説明】

【0266】

【図1】一連のプロピレングリコールアルキル（又はアリール）エーテル及びそれらの対応する酢酸エステル。

【図2】GC/FIDによって分析された反応混合物からの（S）-PMAの分割を示すグラフ図。

【図3】CAL-B酵素濃度の関数としての（S）-PMAの分割を示すグラフ図。

【図4】Chirazyme L-2, c.-f., C2装填量の関数として測定した、（a）（±）-1-メトキシ-3-プロパノール（PM）及び（b）（±）-1-フェノキシ-2-プロパノール（PPh）のエステル交換を示すグラフ図。

40

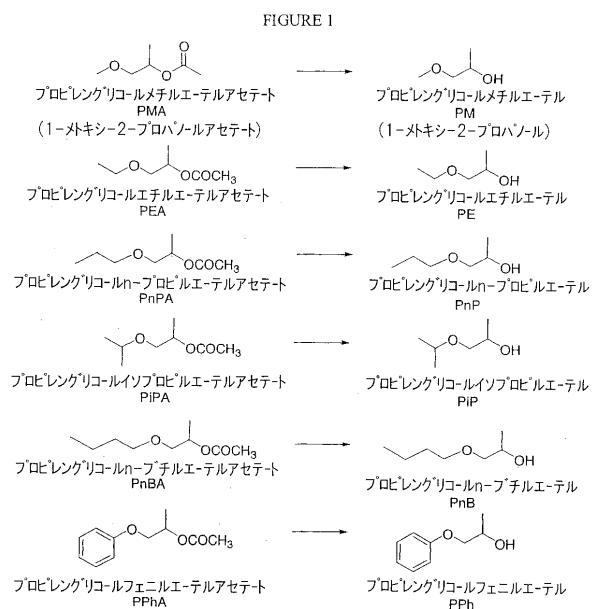
【図5】CAL-B（1mg/ml）を含む反応混合物中における酢酸ビニル30%（v/v）によるPPh70%（v/v）のエナンチオ選択的アシル化を示すグラフ図。

【図6】PEA加水分解に関する酵素再循環を示すグラフ図。

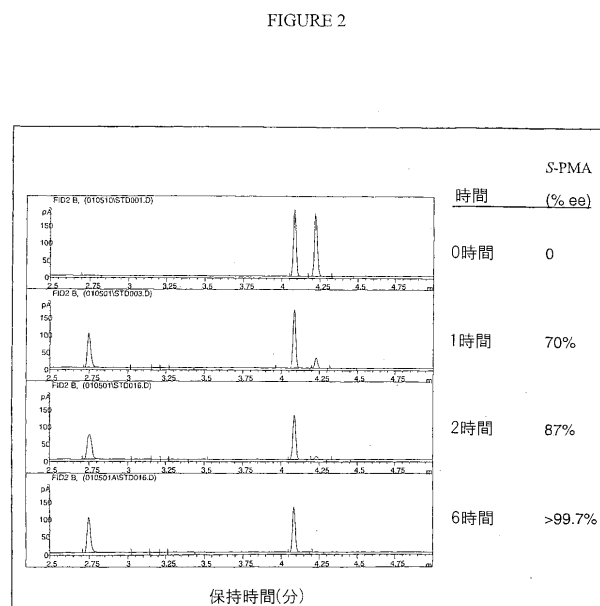
【図7】スケールアップ条件下におけるPEA加水分解に関する酵素再循環を示すグラフ図。

【図8】32サイクルまでのスケールアップ条件下におけるPEA加水分解に関する酵素再循環を示すグラフ図。

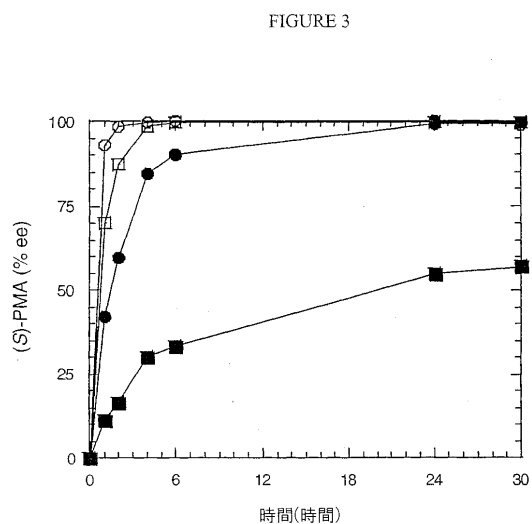
【 図 1 】



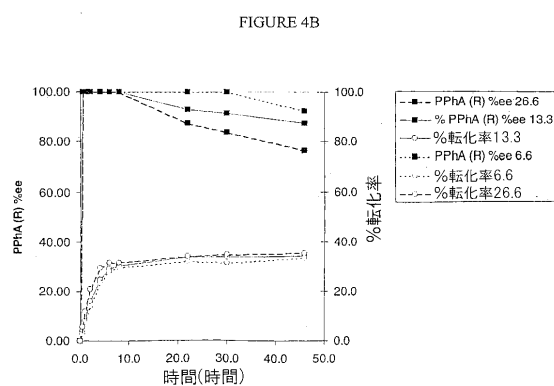
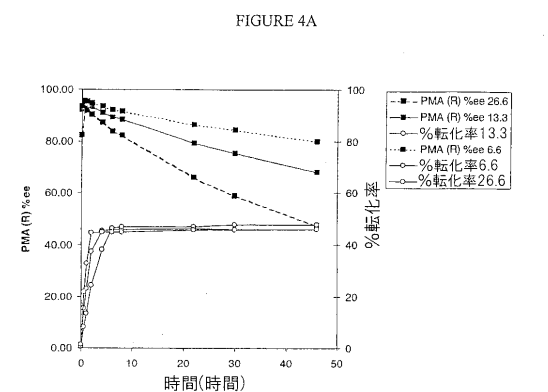
【 図 2 】



【 図 3 】

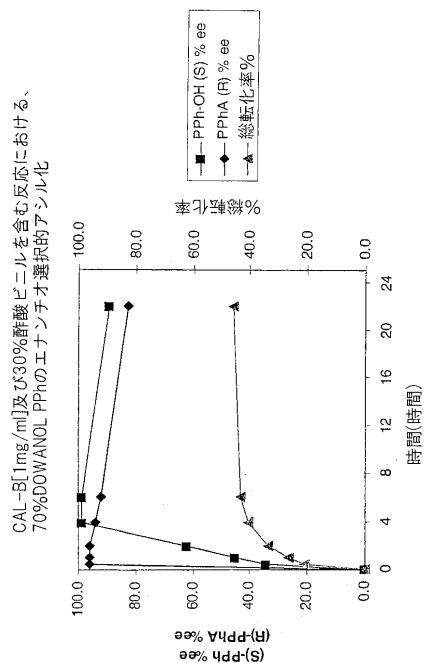


【 図 4 】



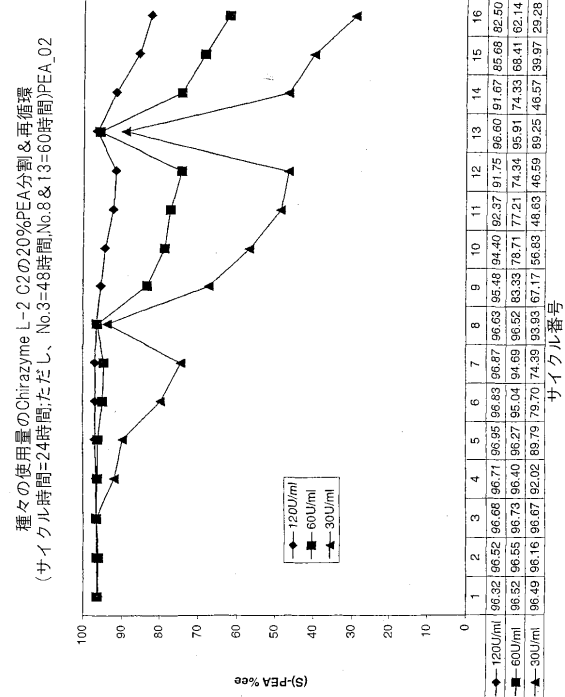
【 図 5 】

FIGURE 5



【 図 6 】

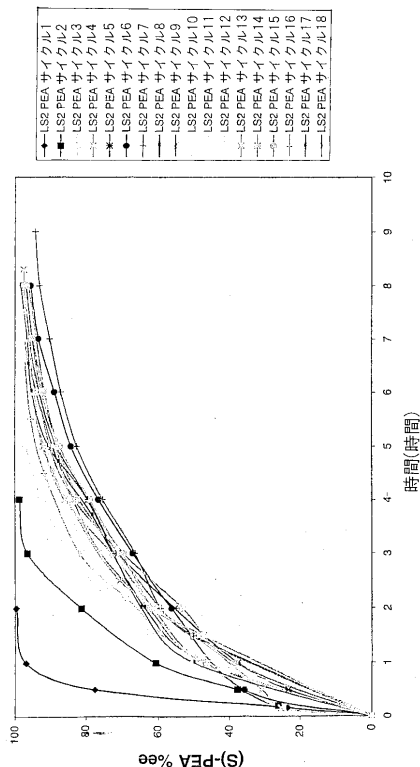
FIGURE 6



【 図 7 】

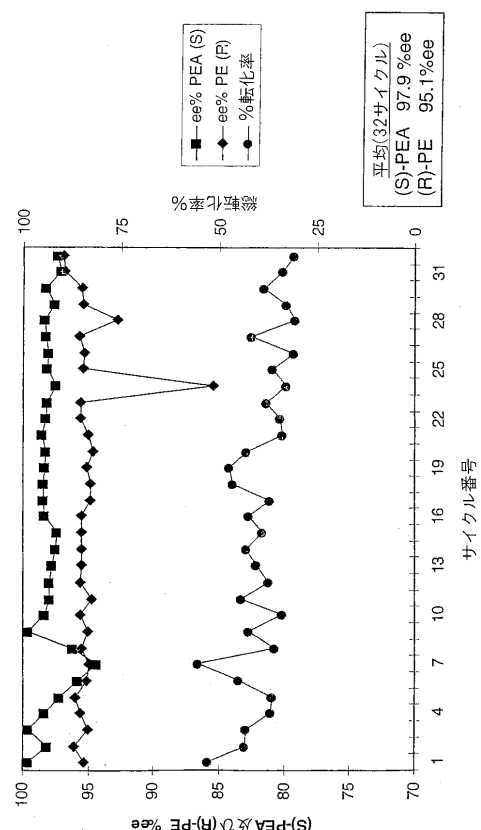
FIGURE 7

固定化CAL-B Chirazyme L-2 C2による20%PEAの  
エンナチオ選択的加水分解及び酵素再循環



【 図 8 】

FIGURE 8



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati		Application No
		PCT/US 03/08941
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12P41/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12P		
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 practical, search terms used) EMBASE, EPO-Internal, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAUMANN M ET AL: "Rapid screening of hydrolases for the enantioselective conversion of 'difficult-to-resolve' substrates" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 11, no. 23, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 4781-4790, XP004313852 ISSN: 0957-4166 cited in the application	1-20
A	Scheme 1 page 4782, line 10 - line 12 page 4783, line 12 - line 13 figures 2,3; tables 1,2 --- -/-	21-49
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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
22 October 2003		13/11/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3010		Authorized officer
		Döpfer, K-P

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l	Application No
PCT/US	03/08941

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GAIS H-J ET AL: "Activation of pig liver esterase in organic media with organic polymers. Application to the enantioselective acylation of racemic functionalized secondary alcohols" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY 18 MAY 2001 UNITED STATES, vol. 66, no. 10, 18 May 2001 (2001-05-18), pages 3384-3396, XP002258873 ISSN: 0022-3263 cited in the application Scheme 1 page 3385, right-hand column	17-20
A	DALLANOCE C ET AL: "A chemoenzymatic approach to the synthesis of the stereoisomers of a beta-adrenergic receptor antagonist" TETRAHEDRON: ASYMMETRY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 11, no. 13, 14 July 2000 (2000-07-14), pages 2741-2751, XP004228725 ISSN: 0957-4166 Scheme 2 page 2743, line 2 - line 14; table 1	17-20
X	EP 0 980 860 A (MITSUBISHI GAS CHEMICAL CO) 23 February 2000 (2000-02-23) cited in the application the whole document	17-20

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/US 03/08941

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0980860 A	23-02-2000	JP 2000063312 A	29-02-2000
		EP 0980860 A1	23-02-2000
		KR 2000017330 A	25-03-2000
		US 6239316 B1	29-05-2001

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,M Z,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

(72)発明者 レスニク, ソル エム.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 0 2 4, エンシニタス, ナルドー ロード 8 1 8

(72)発明者 ドーネイト, フェリベ エー.

アメリカ合衆国, ミシガン 4 8 6 4 2, ミッドランド, ルンド ドライブ 4 6 0 8

(72)発明者 フランク, ティモシー シー.

アメリカ合衆国, ミシガン 4 8 6 4 2, ミッドランド, フォックスポイント サークル 5 0 0  
1

(72)発明者 サイン, トーマス シー.

アメリカ合衆国, テキサス 7 7 5 6 6, レイク ジャクソン, クローカス ストリート 1 1 1

(72)発明者 フォーリー, ポール

アメリカ合衆国, ミシガン 4 8 6 4 2, ミッドランド, ゲティスバーグ ストリート 3 9 1 9

F ターム(参考) 4B064 AC05 AC21 AD63 CA21 CB03 CB26 CC09 DA20