



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년02월17일
(11) 등록번호 10-0883874
(24) 등록일자 2009년02월09일

(51) Int. Cl.

C07D 215/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7010128

(22) 출원일자 2003년07월31일

심사청구일자 2007년01월24일

번역문제출일자 2003년07월31일

(65) 공개번호 10-2003-0072618

(43) 공개일자 2003년09월15일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2002/000835

국제출원일자 2002년02월01일

(87) 국제공개번호 WO 2002/63028

국제공개일자 2002년08월15일

(30) 우선권주장

JP-P-2001-00026316 2001년02월02일 일본(JP)

JP-P-2001-00331480 2001년10월29일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문헌

JP 8-92217 A

전체 청구항 수 : 총 11 항

(73) 특허권자

미쯔비시 가가꾸 가부시끼가이샤

일본국 도쿄도 미나토구 시바 4초메 14방 1고

닛산 가가꾸 교교 가부시끼 가이샤

일본 도쿄도지요다구 간다니시키쵸 3초메 7반지1

(72) 발명자

하라 마리

일본국 227-8502 가나가와켄 요코하마시 아오바쿠
가모시다 쵸 1000 미쯔비시 가가꾸 그룹 과학기술
연구센터 내

호소카와 아케미

일본국 227-8502 가나가와켄 요코하마시 아오바쿠
가모시다 쵸 1000 미쯔비시 가가꾸 그룹 과학기술
연구센터 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

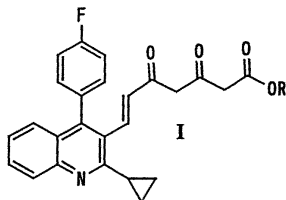
문기상, 문두현

심사관 : 여경숙

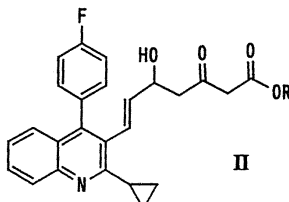
(54) (3R,5S)-(E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디하이드록시헵트-6-엔산 에스테르류의 제조방법

(57) 요약

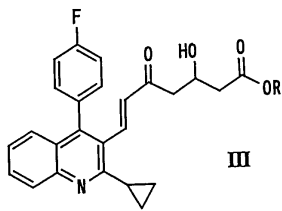
본 발명은 하기식(I), 하기식(II) 및 하기식(III)으로 표시되는 화합물로 되는 군으로부터 선택한 화합물을, 케토기를 입체 선택적으로 환원할 수 있는 능력을 갖는 미생물의 균체 및/또는 그 균체 처리물을 작용시켜 환원하여 하기식(IV)으로 표시되는 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.



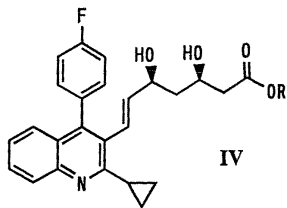
(식 중, R은 수소원자, 알킬기 또는 아릴기를 나타냄)



(식 중, R은 상기식에서와 동일함)



(식 중, R은 상기식에서와 동일함)



(식 중, R은 상기식에서와 동일함)

(72) 발명자

다쿠마 유키

일본국 227-8502 가나가와켄 요코하마시 아오바쿠
가모시다 초 1000 미쯔비시 가가꾸 가부시끼가이샤
내

가츠라다 마나부

일본국 227-8502 가나가와켄 요코하마시 아오바쿠
가모시다 초 1000 미쯔비시 가가꾸 가부시끼가이샤
내

마츠모토 요우이치

일본국 103-0028 도쿄도 주오쿠 야에스 1초메 5-20
에이피아 이 코포레이션 내

가스가 유조

일본국 806-0004 후쿠오카 기타큐슈시 야하타니시
쿠 구로사 키시로이시 1-1 에이피아 코포레이션
내

와타나베 나오키

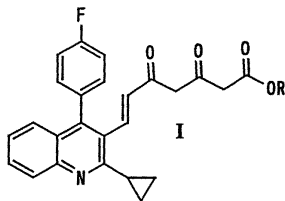
일본국 806-0004 후쿠오카 기타큐슈시 야하타니시
쿠 구로사 키시로이시 1-1 에이피아 코포레이션
내

특허청구의 범위

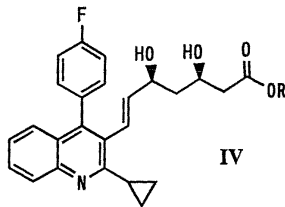
청구항 1

하기식(I)으로 표시되는 화합물을, 케토기를 입체 선택적으로 환원할 수 있는 능력을 갖는 하기 미생물의 균체 및/또는 그 균체 처리물을 작용시켜 환원하는 것을 특징으로 하는 하기식(IV)으로 표시되는 화합물의 제조 방법:

상기 미생물은 크립토크커스(*Cryptococcus*)속, 캔디다(*Candida*)속, 필로바시둠(*Filobasidium*)속, 오가타에아(*Ogataea*)속, 및 로도토룰라(*Rhodotorula*)속으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것임.



(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타냄)



(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타냄).

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

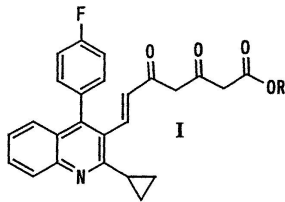
청구항 5

삭제

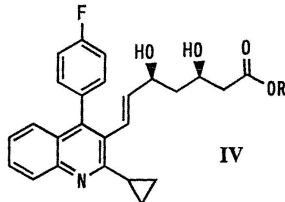
청구항 6

하기식(I)으로 표시되는 화합물을, 케토기를 입체 선택적으로 환원할 수 있는 능력을 갖는 하기 미생물의 균체 및/또는 그 균체 처리물을 작용시켜 환원하는 것을 특징으로 하는 하기식(IV)으로 표시되는 화합물의 제조 방법:

상기 미생물은 크립토크커스(*Cryptococcus*)속, 캔디다(*Candida*)속, 필로바시둠(*Filobasidium*)속, 야로위아(*Yarrowia*)속, 및 트리코노프시스(*Trigonopsis*)속으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것임.



(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타냄)



(식 중, R은 수소 원자를 나타냄).

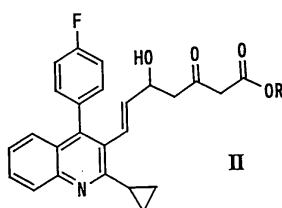
청구항 7

삭제

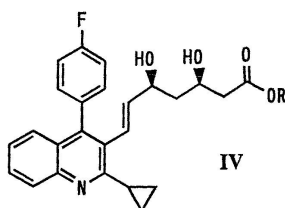
청구항 8

하기식(II)으로 표시되는 화합물을, 케토기를 입체 선택적으로 환원할 수 있는 능력을 갖는 하기 미생물의 균체 및/또는 그 균체 처리물을 작용시켜 환원하는 것을 특징으로 하는 하기식(IV)으로 표시되는 화합물의 제조 방법:

상기 미생물은 메스니코위아(*Metschnikowia*)속, 크립토크커스(*Cryptococcus*)속, 캔디다(*Candida*)속, 필로바시둠(*Filobasidium*)속, 오가타에아(*Ogataea*)속, 시테로마이세스(*Citeromyces*)속, 야로위아(*Yarrowia*)속, 로도토룰라(*Rhodotorula*)속, 엑소피알라(*Exophiala*)속, 트리고노프시스(*Trigonopsis*)속, 시조사카로마이세스(*Shizosaccharomyces*)속, 위케르하미엘라(*Wickerhamiella*)속, 피키아(*Pichia*)속, 사카로마이코프시스(*Saccharomycopsis*)속, 사이토엘라(*Saitoella*)속, 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속, 로도스포리둠(*Rhodospiridium*)속, 아시네토박터(*Acinetobacter*)속, 브레비박테룸(*Brevibacterium*)속, 셀룰로모나스(*Cellulomonas*)속, 코리네박테룸(*Corynebacterium*)속, 및 쿠르토박테룸(*Curtobacterium*)속으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것임.



(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타냄)



(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타냄).

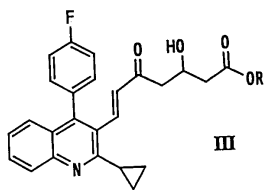
청구항 9

삭제

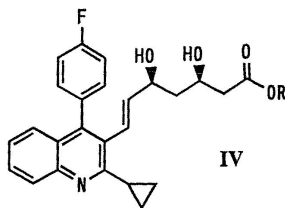
청구항 10

하기식(III)으로 표시되는 화합물을, 케토기를 임체 선택적으로 환원할 수 있는 능력을 갖는 하기 미생물의 균체 및/또는 그 균체 처리물을 작용시켜 환원하는 것을 특징으로 하는 하기식(IV)으로 표시되는 화합물의 제조 방법:

상기 미생물은 크립토크커스(*Cryptococcus*)속, 캔디다(*Candida*)속, 필로바시둠(*Filobasidium*)속, 로도토룰라(*Rhodotorula*)속, 및 피키아(*Pichia*)속으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것임.



(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타냄)

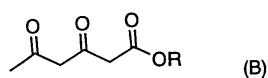
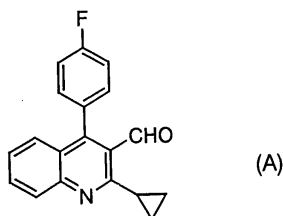


(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타냄).

청구항 11

제1항 또는 제6항에 있어서,

상기식(I)으로 표시되는 화합물이 하기식(A)으로 표시되는 2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-카르브 알데히드와, 하기식(B)으로 표시되는 화합물을 축합 반응시킴으로써 얻어지는 것을 특징으로 하는 상기식(IV)으로 표시되는 화합물의 제조 방법.

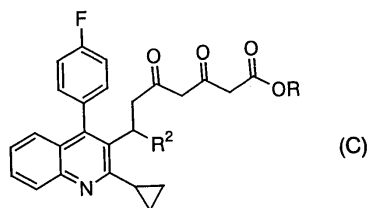


(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타냄)

청구항 12

제11항에 있어서,

상기식(A)으로 표시되는 화합물과 상기식(B)으로 표시되는 화합물의 축합 반응에 의해 상기식(I)으로 표시되는 화합물을 제조할 때, 반응 중간체로서 하기식(C)로 표시되는 화합물 또는 그 염이 제조되는 것을 특징으로 하는 상기식(IV)으로 표시되는 화합물의 제조 방법.



(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타내고, R²는 수산기를 나타냄)

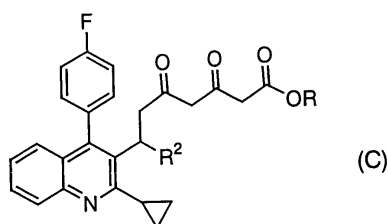
청구항 13

제12항에 있어서,

상기식(C)으로 표시되는 중간체로부터 R²를 이탈 반응시킴으로써 상기식(I)으로 표시되는 화합물을 얻는 것을 특징으로 하는 상기식(IV)으로 표시되는 화합물의 제조 방법.

청구항 14

하기식(C)으로 표시되는 화합물.

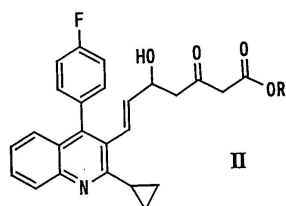


(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타내고, R²는 수산기를 나타냄)

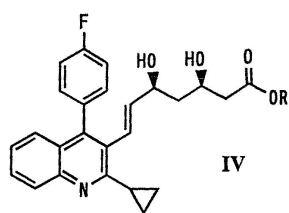
청구항 15

하기식(II)으로 표시되는 화합물을, 케토기를 입체 선택적으로 환원할 수 있는 능력을 갖는 하기 미생물의 균체 및/또는 그 균체 처리물을 작용시켜 환원하는 것을 특징으로 하는 하기식(IV)으로 표시되는 화합물의 제조 방법:

상기 미생물은 크립토크커스(*Cryptococcus*)속, 캔디다(*Candida*)속, 엑소피알라(*Exophiala*)속, 및 트리고노프시스(*Trigonopsis*)속으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것임.



(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타냄)

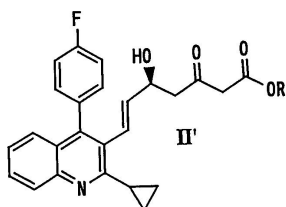


(식 중, R은 수소 원자를 나타냄).

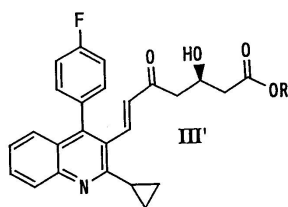
청구항 16

제8항, 제10항 또는 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기식(II) 및 상기식(III)으로 표시되는 화합물이 각각 하기 식(II') 및 하기 식(III')으로 표시되는 광학 활성체인 것을 특징으로 하는 상기 식(IV)으로 표시되는 화합물의 제조 방법.



(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타냄)



(식 중, R은 C₁-C₄의 알킬기를 나타냄)

청구항 17

제16항에 있어서,

상기식(II') 및 상기식(III')으로 표시되는 화합물이 각각 상기식(I)으로 표시되는 화합물로부터 얻어진 것을 특징으로 하는 상기식(IV)으로 표시되는 화합물의 제조 방법.

명세서

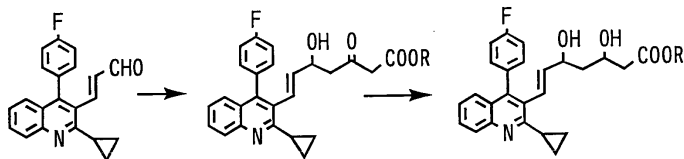
기술분야

<1> 본 발명은 (3R,5S)-(E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일] -3,5-디하이드록시헵트-6-엔산 에스테르류의 신규 제조 방법에 관한 것이다. 그 화합물은 혈중 콜레스테롤 저하제로서 유용한 특개평1-279866호 공보에 기재된 "3-하이드록시-3-메틸글루타릴 CoA 환원 효소 저해제"의 합성 중간체로서 유용하다.

<2> 또한, 본 발명은 상기 (3R,5S)-(E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디하이드록시헵트-6-엔산 에스테르류의 합성에 필요한 β-디케토카복실산 에스테르 유도체의 새로운 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

<3> (3R,5S)-(E)-7-[2시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디하이드록시헵트-6-엔산 에스테르류를 화학적으로 제조하는 방법의 예로는 특개평1-279866호 공보 및 Journal of Chromatography A, 832(1999) p55-65에 기재된 이하의 제조 루트가 알려져 있다.



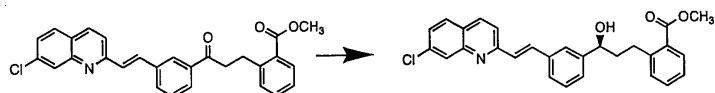
<4>

<5> 그러나, 이들 방법에서는 반응 생성물이 광학 이성체 혼합물로 되기 때문에, 최종 공정에서, 크로마토그래피 등에 의해 소망하는 광학 활성체 화합물만으로 분리·정제할 필요가 있다. 최종 공정에서의 이성체 분리는 로스도 많아 공업적으로는 첨가의 효율적인 제법이라고는 할 수 없다.

<6> 또한, 특개평8-92217호 공보에는 광학 활성인 쉬프 염기(Schiff base)를 사용하여 제조하는 방법도 보고되어 있다.

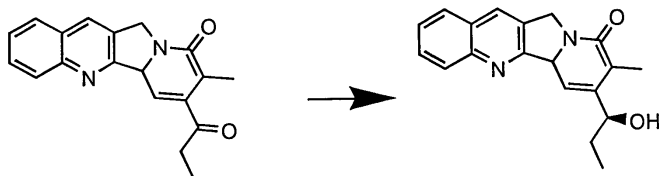
<7> 또한, 특개평8-127585호 공보에는, 메틸 (R)-3-tert-부틸디메틸실릴옥시-6-디메톡시포스피닐-5-옥소헥사노에이트를 사용하여 매우 저온에서 제조하는 방법도 보고되어 있다.

<8> 한편, 미생물의 균체 및/또는 그 균체 처리물을 사용하여 케토기를 갖는 화합물을 입체 선택적으로 환원하여, 광학 활성인 알콜체를 생성하는 방법의 예로는, 케토기의 측쇄에 퀴노린 골격을 갖는 화합물을 사용하는 것으로서, Appl. Microbiol. Biotechnol. (1998)49: p.709-717에, 이하에 나타내는 반응을 미크로박테륨 캄포크레마도네시스(*campoquemadoensis*) MB5614 주를 사용하여 행할 수 있음이 기재되어 있다.



9

<10> 또한, Bioorg. Med. Chem. Lett., vol8, p1403-(1998)에는, 이하에 나타내는 반응을 뺑 효모를 사용하여 행할 수 있음이 기재되어 있다.



<11>

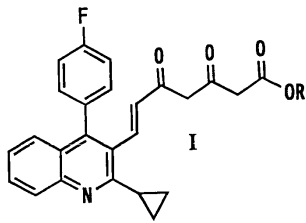
<12> 그러나, (E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디하이드록시헵트-6-엔산 에스테르류와 같이, 카보닐기의 α 위치에 올레핀이 존재하고, 또한 카보닐기가 연속하여 존재하는 화합물에 대해서는 미생물을 사용하여 입체 선택적으로 화위할 수 있는 예는 알려져 있지 않았다.

<13> 발명의 개시

<14> 따라서, (3R,5S)-(E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디하이드록시헵트-6-엔산 에스테르류를 공업적으로 첨가로 제조할 수 있는 신규한 제조 방법을 새로 개발함이 요망되었다.

<15> 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위해서, 미생물 반응을 이용한 케토기의 입체 선택적 환원 반응에 의한, (3R,5S)-(E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디하이드록시헵트-6-엔산 에스테르류의 제조 방법에 대해서, 예의 검토한 결과, 하기 화합물(I)~(III) 및 (II')~(III')로 표시되는 화합물을 원료로서 사용한 경우에, 높은 광학 순도로 목적물을 얻을 수 있음을 알아내서, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

<16> 즉, 본 발명의 요지는, 하기식(I):

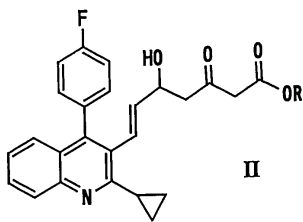


<17>

<18> (식 중, R은 수소원자, 알킬기 또는 아릴기를 나타냄)

<19> 으로 표시되는 화합물;

<20> 하기식(II):

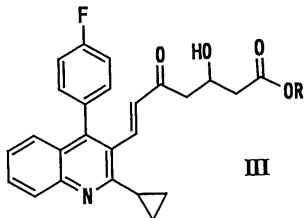


<21>

<22> (식 중, R은 상기식에서와 동일함)

<23> 로 표시되는 화합물; 및

<24> 하기식(III):

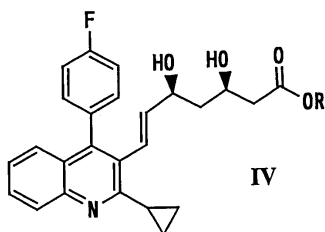


<25>

<26> (식 중, R은 상기식에서와 동일함)

<27> 으로 표시되는 화합물로 되는 군으로부터 선택한 화합물을, 케토기를 입체 선택적으로 환원할 수 있는 능력을 갖는 미생물의 균체 및/또는 그 균체 처리물을 작용시켜 환원하는 것을 특징으로 하는

<28> 하기식(IV):

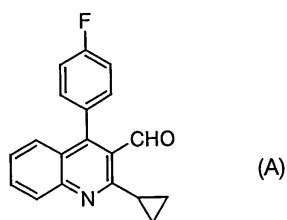


<29>

<30> (식 중, R은 상기식에서와 동일함)

<31> 으로 표시되는 화합물의 제조 방법에 관한 것이다.

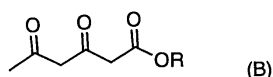
<32> 또한, 본 발명은, 하기식(A):



<33>

<34> 으로 표시되는 2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-카르브알데히드와

<35> 하기식(B):



<36>

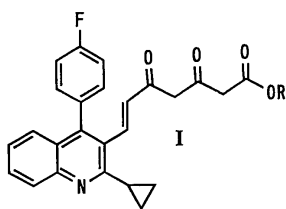
<37> (식 중, R은 수소원자, 알킬기, 아랄킬기 또는 아릴기를 나타냄)

<38> 으로 표시되는 화합물을 축합 반응시키는 것을 특징으로 하는 상기 화합물(I)의 제조 방법에 관한 것이다.

<39> 발명을 실시하기 위한 최량의 형태

<40> 이하에, 본 발명을 상세하게 설명한다.

<41> 본 발명의 (3R,5S)-(E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일] -3,5-디하이드록시헵트-6-엔산 에스테르류의 제조 방법은, 하기식(I):

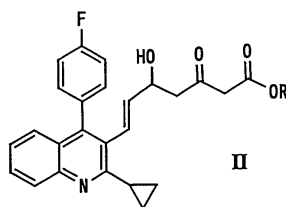


<42>

<43> (식 중, R은 수소원자, 알킬기 또는 아릴기를 나타냄)

<44> 으로 표시되는 화합물;

<45> 하기식(II):

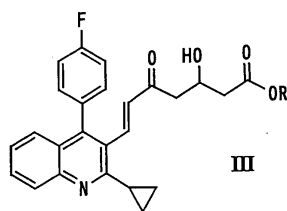


<46>

<47> (식 중, R은 상기식에서와 동일함)

<48> 으로 표시되는 화합물; 및

<49> 하기식(III):



<50>

<51> (식 중, R은 상기식에서와 동일함)

<52> 으로 표시되는 화합물로 되는 군으로부터 선택한 화합물을, 케토기를 입체 선택적으로 환원할 수 있는 능력을 갖는 미생물의 균체 및/또는 그 균체 처리물을 작용시켜 환원하는 것을 특징으로 한다.

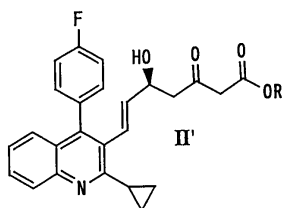
<53> 본 발명의 제조 방법에 사용되는 원료인, 상기식(I)~(III)으로 표시되는 화합물에서, R은 수소원자, 알킬기 또는 아릴기를 나타낸다.

<54> 알킬기로는 메틸기, 에틸기, 이소프로필기, 시클로프로필기, 부틸기, 이소부틸기, t-부틸기, 시클로헥실기, 벤질기, 페네틸기 등의, 알킬기 또는 아릴기로 치환되어도 좋은 직쇄, 분기 혹은 환상의 알킬기이다.

<55> 아릴기로는 페닐기, 메시틸기, 나프틸기 등의, 알킬기로 치환되어도 좋은 페닐기 또는 나프틸기를 들 수 있다.

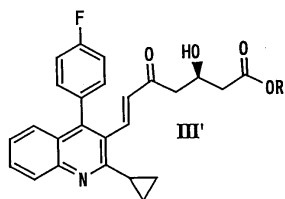
<56> 상기 R로서 바람직하게는 C₁~C₄의 알킬기, 벤질기 또는 페닐기이고, 보다 바람직하게는 C₁~C₄의 알킬기이고, 특히 바람직하게는 메틸기 또는 에틸기이다.

<57> 본 발명의 제조 방법에서, 상기식(II) 및 (III)으로 표시되는 화합물은 하기식(II') 및 하기식(III')으로 표시되는 광학 활성체라도 좋다.



<58>

<59> (식 중, R은 상기식에서와 동일함)

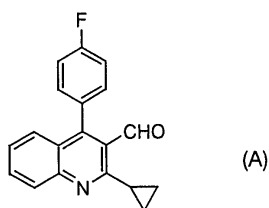


<60>

<61> (식 중, R은 상기식에서와 동일함)

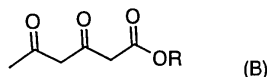
<62> 상기식(I)~(III) 및 (II')~(III')으로 표시되는 화합물은 특개평1-279866호 공보, 특개평8-127585호 공보, 특개평5-178841호 공보 등에 기재되는 방법과 공지방법을 조합함으로써, 임의로 제조할 수 있다.

<63> 또한, 상기식(I)으로 표시되는 화합물을 제조하는 바람직한 방법으로서, 본 발명자들은 하기식(A):



<64>

<65> 으로 표시되는 2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-카르보 알데히드와 하기식(B):



<66>

<67> (식 중, R은 수소원자, 알킬기, 아릴기 또는 아릴기를 나타냄)

<68> 으로 표시되는 화합물을 축합 반응시키는 방법을 찾아냈다. 이 방법을 사용함에 따라서, 간편하고 효율적으로 상기식(I)으로 표시되는 화합물을 제조할 수 있다.

<69> 화합물(A)과 화합물(B)의 축합 반응은 소위 알돌 반응과 동일한 조작으로 행할 수 있고, 통상, 질소 가스 또는 불활성 가스 분위기하에서, 화합물(B)을 함유하는 용액 중에 염기를 첨가한 후에, 이 용액 중에 화합물(A)을 함유하는 용액을 적하하여 행하는 방법이 바람직하게 행하여진다.

<70> 상기축합 반응에 사용되는 염기로는 수소화나트륨, 수소화 칼륨, 수소화 칼슘 등의 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 금속의 수소화물; n-부틸리튬, t-부틸리튬 등의 알킬 리튬 시약; t-부틸마그네슘클로라이드 등의 그리니אר 시약; 나트륨에톡사이드 등의 알칼리 금속의 알콕사이드; NaNH₂ 등을 들 수 있고, 그외에도, 산화마그네슘 등의 알칼리 토류 금속의 산화물 등의 고체 염기도 들 수 있다. 이 중 바람직하게는 알칼리 금속 또는 알칼리 토류 금속의 수소화물 및 NaNH₂ 이고, 더욱 바람직하게는 알칼리 금속 수소화물이고, 특히 바람직하게는 수소화나트륨이다.

<71> 염기의 사용량으로는, 통상, 화합물(B)에 대해서 1.5당량 이상, 바람직하게는 2당량 이상 사용되지만, 너무 과잉으로 사용하면 부반응이 일어나 수율이 저하하는 경우도 있으므로, 통상, 10당량 이하의 범위로 사용된다. 이 중 바람직한 범위는 2~3당량, 특히 바람직하게는 2~2.7당량이다.

<72> 반응은, 통상, 용매를 사용하여 행하여지며, 용매로는 톨루엔, 벤젠, 크실렌 등의 방향족 탄화수소계 용매; 메틸-t-부틸에테르, 디메톡시에탄, 테트라하이드로퓨란 등의 에테르계 용매; 염화메틸렌 등의 할로젠화 탄화수소계 용매; N,N-디메틸포름아미드 등의 비프로톤성 용매를 사용할 수 있고, 이들 중 바람직한 용매는 20℃에서의 유전율이 2.5이상, 더욱 바람직하게는 5이상인 것이다. 상기 바람직한 용매의 구체적인 예로는 테트라하이드로퓨란, 디메톡시에탄, N,N-디메틸포름아미드, N,N-디메틸이미다졸리디논을 들 수 있고, 특히 바람직하게는 테트라하이드로퓨란이다.

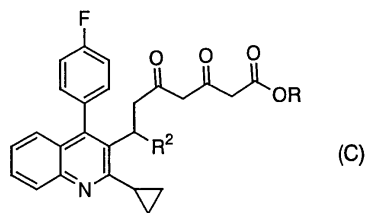
<73> 용매의 사용량은, 통상, 반응기질에 대해서 0.5배 용량~100배 용량 정도이고, 이 중, 공업적인 관점에서 20배 용량 이하로 사용하는 것이 바람직하다.

<74> 반응 조작으로는, 염기와 화합물(B)을 혼합한 후, 화합물(A)을 첨가하여도 좋고, 염기와 화합물(B)을 혼합한 것을 화합물(A) 중에 첨가하여도 좋고, 염기 중에 화합물(A)과 화합물(B)을 혼합한 것을 첨가하여도 좋고, 화합물(A)과 화합물(B)을 혼합한 것에 염기를 첨가할 수도 있다. 어느 조작으로도 반응은 진행하지만, 바람직하게는 염기와 화합물(B)을 혼합한 후, 이것에 화합물(A)을 첨가하는 방법이다.

<75> 반응은 -50℃~100℃, 바람직하게는 -20℃~40℃의 온도에서, 통상, 30분 이상, 바람직하게는 1시간 이상 반응시키고, 필요에 따라서 승온해도 좋다.

<76> 반응 종료 후, 반응계에 물, 초산, 염화암모늄 등을 첨가하여 반응을 정지한 후, 수세, 분액 추출 등의 통상의 단리·정제 조작에 의해, 화합물(I)을 얻을 수 있다.

<77> 상기 화합물(A)과 화합물(B)의 축합 반응에서, 사용하는 염기 및 용매를 선택함으로써, 하기식(C):



<78>

<79> (식 중, R은 상기식에서와 동일하고, R²는 수산기, 할로젠원자, 실릴옥시기, 설포닐옥시기, 아실옥시기, 알콕시카보닐옥시기, 알킬티오카보닐옥시기, 알콕시티오카보닐옥시기, 또는 알킬티오티오카보닐옥시기를 나타낸다)

<80> 으로 표시되는 화합물[이하, 화합물(C)라 함] 또는 그 염을 경유한 후에, 화합물(I)을 제조할 수도 있다.

<81> 상기 화합물(C)에 있어서 R은 상기한 것과 동일한 것을 사용할 수 있다. 또한, R²는 수산기; 염소원자, 브롬원자 등의 할로젠원자; 트리메틸실릴옥시기, t-부틸디메틸실릴옥시기 등의 실릴 옥시기; 메탄설포닐옥시기, 팔라듐 톨루엔설포닐옥시기 등의 설포닐옥시기; 아세톡시기, 프로피오닐옥시기 등의 아실옥시기; 메톡시카보닐옥시기, 비닐옥시카보닐옥시기 등의 알콕시카보닐옥시기; 메틸티오카보닐옥시기 등의 알킬티오카보닐옥시기; 메톡시티오카보닐옥시기 등의 알콕시티오카보닐옥시기; 또는 메틸티오티오카보닐옥시기 등의 알킬티오티오카보닐옥시기를 나타내며, 이 중 바람직하게는 수산기, 설포닐옥시기 또는 아실옥시기이고, 더욱 바람직하게는 아실옥시기이고, 특히 바람직하게는 아세톡시기이다.

<82> 상기 화합물(C)로서 바람직한 치환기의 조합으로는 상기 치환기의 설명에서 들고 있는 바람직한 R 및 R²를 조합한 것을 들 수 있다.

<83> 상기 화합물(C)을 중간체로서 사용한 경우의 구체적인 반응 공정의 한계를 이하에 나타낸다. 상기 화합물(A)과 화합물(B)의 축합 반응에서 사용하는 염기를 예를 들어 NaH와 n-BuLi의 조합으로 함으로써, 화합물(C)에서 상기 R²가 수산기인 중간체가 얻어지며, 이 중간체의 탈수 반응을 행함으로써 화합물(I)을 얻는다. 또한, 상기 중간체의 수산기를 할로젠 등의 다른 관능기로 변환시킨 후 그 관능기를 이탈시켜 화합물(I)을 얻어도 좋다. 여기서, 상기 NaH의 사용량은 화합물(A)에 대해서 등몰량 전후, n-BuLi의 사용량은 1.5~2.5당량 전후이다. 또한, 상기 탈수 반응 및 관능기의 이탈 반응은 종래 공지 방법을 사용하여 적당히 행할 수 있다.

<84> 또한, 상기 방법에 의해 생성된 화합물(I)을 단리할 때에, 상기 화합물(I)을 염으로 하는 편이 단리하기 쉽기 때문에, 그 화합물의 염으로서 얻어도 좋다. 화합물(I)의 염은 생성 반응 정지 후의 수세, 분액 추출된 유기상을 필요에 따라서 농축 및/또는 냉각한 것에 산을 첨가하여 교반함으로써 산부가염으로서 얻을 수도 있고, 산 대신에 암모니아나 아민류를 사용하여 암모늄염이나 아민 부가염으로서 얻을 수도 있다. 화합물(I)을 염으로서 얻은 경우, 후술하는 미생물의 균체 및/또는 그 균체 처리물을 사용한 환원 반응에 제공할 때, 염을 탈리시켜 화합물(I)로 하는 것이 바람직하다.

<85> 본 발명에서는 상기식(I)~(III)으로 표시되는 화합물을 미생물의 균체 및/또는 그 균체 처리물을 사용하여, 케토기를 입체 선택적으로 환원하는 것을 특징으로 한다.

<86> 본 발명에 사용되는 미생물로는 케토기를 입체 선택적으로 환원할 수 있는 능력을 갖는 미생물이면 특별히 한정되지 않는다.

<87> 구체적으로는 메시니코위아 폴케리마(*Metschnikowia pulcherrima*), 메시니코위아 비쿠스피다타(*Metschnikowia bicuspidata*), 메시니코위아 레우카우피 (*Metschnikowia reukaufii*) 및 메시니코위아 루나타(*Metschnikowia lunata*) 등의 메시니코위아(*Metschnikowia*)속에 속하는 미생물;

<88> 크립토크커스 크루바타스(*Cryptococcus curvatus*), 크립토크커스 플라버스(*Cryptococcus flavus*), 크립토크커스 후미코러스(*Cryptococcus humicolus*) 및 크립토크커스 로우렌티(*Cryptococcus laurentii*) 등의 크립토크커스 (*Cryptococcus*)속에 속하는 미생물;

<89> 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*), 캔디다 아지마(*Candida azyma*), 캔디다 인터미디아(*Candida intermedia*), 캔디다 솔라니(*Candida solani*), 캔디다 파마타(*Candida famata*), 캔디다 기리에몬디(*Candida*

guilliermondii), 캔디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*), 캔디다 루고사(*Candida rugosa*), 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) 및 캔디다 몰리시아나(*Candida molischiana*) 등의 캔디다(*Candida*)속에 속하는 미생물;

- <90> 필로바시둠 캡슐리게눔(*Filobasidium capsuligenum*) 등의 필로바시둠 (*Filobasidium*)속에 속하는 미생물;
- <91> 오가타에아 글루코자이마(*Ogataea glucozyma*) 및 오가타에아 미누타(*Ogataea minuta*) 등의 오가타에아 (*Ogataea*)속에 속하는 미생물;
- <92> 시테로마이세스 마트리텐시스(*Citeromyces matritensis*) 등의 시테로마이세스(*Citeromyces*)속에 속하는 미생물;
- <93> 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) 등의 야로위아(*Yarrowia*)속에 속하는 미생물;
- <94> 로도토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*), 로도토룰라 오우란티아카 (*Rhodotorula aurantiaca*) 및 로도토룰라 무실라기노사(*Rhodotorula mucilaginosa*) 등의 로도토룰라(*Rhodotorula*)속에 속하는 미생물;
- <95> 엑소피알라 데르마티티디스(*Exophiala dermatitidis*) 등의 엑소피알라 (*Exophiala*)속에 속하는 미생물;
- <96> 트리코노프시스 바리아빌리스(*Trigonopsis variabilis*) 등의 트리코노프시스 (*Trigonopsis*)속에 속하는 미생물;
- <97> 시조사카로마이세스 폼베(*Shizosaccharomyces pombe*) 등의 시조사카로마이세스(*Shizosaccharomyces*)속에 속하는 미생물;
- <98> 위케르하미엘라 도메르키(*Wickerhamiella domercqii*) 등의 위케르하미엘라 (*Wickerhamiella*)속에 속하는 미생물;
- <99> 피키아 페테르소니(*Pichia petersonii*) 및 피키아 아노말라(*Pichia anomala*) 등의 피키아(*Pichia*)속에 속하는 미생물;
- <100> 사카로마이코프시스 피프리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) 및 사카로마이코프시스 크라타에겐시스(*Saccharomycopsis crataegensis*) 등의 사카로마이코프시스(*Saccharomycopsis*)속에 속하는 미생물;
- <101> 사이토엘라 콤플리카타(*Saitoella complicata*) 등의 사이토엘라(*Saitoella*)속에 속하는 미생물;
- <102> 사카로마이세스 세레비시예(*Saccharomyces cerevisiae*) 등의 사카로마이세스 (*Saccharomyces*)속에 속하는 미생물;
- <103> 로도스포리둠 토루로이테스(*Rhodosporidium toruloides*) 등의 로도스포리둠 (*Rhodosporidium*)속에 속하는 미생물;
- <104> 아시네토박터 칼코아세티커스(*Acinetobacter calcoaceticus*) 등의 아시네토박터(*Acinetobacter*)속에 속하는 미생물;
- <105> 브레비박테륨 린넨스(*Brevibacterium linens*) 및 브레비박테륨 삭크로리티컴 (*Brevibacterium sacchrolyticum*) 등의 브레비박테륨(*Brevibacterium*)속에 속하는 미생물;
- <106> 셀룰로모나스 게리다(*Cellulomonas gelida*), 셀룰로모나스 플라비게나 (*Cellulomonas flavigena*), 셀룰로모나스 우다(*Cellulomonas uda*) 등의 셀룰로모나스(*Cellulomonas*)속에 속하는 미생물;
- <107> 코리네박테륨 암모니아제네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테륨 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테륨 아세트애시드필럼 (*Corynebacterium acetoacidophilum*), 코리네박테륨 비타루미니스(*Corynebacterium vitaeruminis*) 및 코리네박테륨 바리어블(*Corynebacterium variabile*) 등의 코리네박테륨(*Corynebacterium*)속에 속하는 미생물;
- <108> 쿠르토박테륨 플라컴파시엔스(*Curtobacterium flaccumfaciens*) 등의 쿠르토박테륨(*Curtobacterium*)속에 속하는 미생물을 들 수 있다.
- <109> 상기 미생물의 바람직한 구체적인 예로는 메시니코위아 풀케리마 (*Metschnikowia pulcherrima*) IF0 0863 주, 메시니코위아 풀케리마(*Metschnikowia pulcherrima*) IAM 12196 주, 메시니코위아 풀케리마(*Metschnikowia pulcherrima*) IAM 12197 주, 메시니코위아 풀케리마(*Metschnikowia pulcherrima*) IF01407 주, 메시니코위아 풀케리마(*Metschnikowia pulcherrima*) IF010796 주, 메시니코위아 비쿠스피다타(*Metschnikowia bicuspidata*) IF01408 주, 메시니코위아 레우카우피 (*Metschnikowia reukaufii*) IF010798 및 메시니코위아 루나타

(*Metschnikowia lunata*) IF01605 주;

- <110> 크립토크커스 크루바티수(*Cryptococcus curvatus*) IF0 1159 주, 크립토크커스 후미코러스(*Cryptococcus humicolus*) IF010250 주, 크립토크커스 플라버스(*Cryptococcus flavus*) IF0 0407 주, 크립토크커스 로우렌티(*Cryptococcus laurentii*) IF00609 주, 크립토크커스 로우렌티(*Cryptococcus laurentii*) IF01376 주, 크립토크커스 로우렌티 변종 로우렌티(*Cryptococcus laurentii var laurentii*) CBS5539 주, 크립토크커스 로우렌티 변종 로우렌티(*Cryptococcus laurentii var laurentii*) CBS 2174 주, 크립토크커스 로우렌티 변종 로우렌티(*Cryptococcus laurentii var laurentii*) CBS 5746 주, 크립토크커스 로우렌티 변종 로우렌티(*Cryptococcus laurentii var laurentii*) CBS 7140 주 및 크립토크커스 로우렌티 변종 로우렌티(*Cryptococcus laurentii var laurentii*) CBS 7235 주;
- <111> 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*) IF0 1594 주, 캔디다 아지마(*Candida azyma*) JCM 1691 주, 캔디다 인터미디어(*Candida intermedia*) IF00761 주, 캔디다 솔라니(*Candida solani*) IF0 0762 주, 캔디다 파마타(*Candida famata*) RIFY 7455 주(동 균주는 IF0 0856 주 로서도 입수할 수 있음), 캔디다 기리에몬디(*Candida guilliermondii*) IF0 0566 주, 캔디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*) CBS 0604 주, 캔디다 루고사(*Candida rugosa*) IF0 0591 주, 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) IF0 0618 주, 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) IF01404 주, 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) IF01647 주 및 캔디다 모리시야나(*Candida molischiana*) IF0 10296 주;
- <112> 필로바시둠 캡슐리게넘(*Filobasidium capsuligenum*) IF01119 주 및 필로바시둠 캡슐리게넘(*Filobasidium capsuligenum*) IF0 1185 주;
- <113> 오가타에아 글루코자이마(*Ogataea glucozyma*) IF0 1472 주 및 오가타에아 미누타 변종 논퍼멘탄스(*Ogataea minuta var nonfermentans*) IF0 1473 주;
- <114> 시테로마이세스 매트리티텐시스(*Citeromyces matritensis*) IF0 0651 주 및 시테로마이세스 매트리티텐시스(*Citeromyces matritensis*) IF0 0954 주;
- <115> 야로위아 리폴리티카(*Yarrowia lipolytica*) IF0 1209 주;
- <116> 로도토룰라 글루티니스 변종 다이레넨시스(*Rhodotorula glutinis var dairenensis*) IF0 0415 주, 로도토룰라 글루티니스 변종 글루티니스(*Rhodotorula glutinis var glutinis*) IF0 0395 주, 로도토룰라 오우란티아카(*Rhodotorula aurantiaca*) IF0 0754 주, 로도토룰라 무실라기노사(*Rhodotorula mucilaginosa*) IF0 0003 주;
- <117> 엑소피알라 데르마티티디스(*Exophiala dermatitidis*) IF06421 주 및 엑소피알라 데르마티티디스(*Exophiala dermatitidis*) IF08193 주;
- <118> 트리코노프시스 바리어빌리스(*Trigonopsis variabilis*) CBS 1040 주 및 트리코노프시스 바리어빌리스(*Trigonopsis variabilis*) IF0 0671 주;
- <119> 시조사카로마이세스 폼베(*Shizosaccharomyces pombe*) IF0 0344 주 및 시조사카로마이세스 폼베(*Shizosaccharomyces pombe*) IF01628 주;
- <120> 위케르하미엘라 도메르키(*Wickerhamiella domercqii*) IF01857 주;
- <121> 피키아 피타소니(*Pichia petersonii*) IF01372 주 및 피키아 아노말라(*Pichia anomala*) IF0 0118 주;
- <122> 사카로마이코프시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) IF0 0105 주 및 사카로마이코프시스 크라타에겐시스(*Saccharomycopsis crataegensis*) IF01708 주;
- <123> 사이토엘라 콤플리카타(*Saitoella complicata*) IAM 12963 주;
- <124> 사카로마이세스 세루비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) JCM 1818 주, 사카로마이세스 세루비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) IF0 0565 주 및 사카로마이세스 세루비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) IF0 0305 주;
- <125> 로도스포리둠 토르로이데스(*Rhodosporidium toruloides*) IF0 0559 주;
- <126> 아시네토박터 칼코아세티커스(*Acinetobacter calcoaceticus*) IF012552 주;
- <127> 브레비박테륨 린넨스(*Brevibacterium linens*) JCM 1328 주 및 브레비박테륨 삭크로리티킴(*Brevibacterium*

sacchrolyticum) ATCC 14066 주;

- <128> 셀룰로모나스 게리다(*Cellulomonas gelida*) JCM 1489 주, 셀룰로모나스 플라비게나(*Cellulomonas flavigena*) JCM 1490 주 및 셀룰로모나스 우다(*Cellulomonas uda*) JCM 1492 주;
- <129> 코리네박테륨 암모니아제네스(*Corynebacterium ammoniagenes*) JCM1305 주, 코리네박테륨 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) JCM1307 주, 코리네박테륨 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 12813 주, 코리네박테륨 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032 주, 코리네박테륨 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13826 주, 코리네박테륨 글루타미컴(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 14067 주, 코리네박테륨 아세트산에식필럼(*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC 13870 주, 코리네박테륨 비타루미니스(*Corynebacterium vitaeruminis*) JCM 1323 주 및 코리네박테륨 바리어블(*Corynebacterium variabile*) JCM 2154 주;
- <130> 쿠르토박테륨 플라컴파시엔스(*Curtobacterium flaccumfaciens*) ATCC12813 주를 들 수 있다.
- <131> 상기 미생물로서 바람직하게는 메시니코위아(*Metschnikowia*)속, 크립토크커스(*Cryptococcus*)속, 캔디다(*Candida*)속, 필로바시둠(*Filobasidium*)속, 오가타에아(*Ogataea*)속, 시테로마이세스(*Citeromyces*)속, 로도토룰라(*Rhodotorula*)속, 엑소피알라(*Exophiala*)속, 시조사카로마이세스(*Shizosaccharomyces*)속, 위케르하미엘라(*Wickerhamiella*)속, 피키아(*Pichia*)속, 사카로마이코프시스(*Saccharomycopsis*)속, 사이토엘라(*Saitoella*)속, 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속, 로도스포리둠(*Rhodospiridium*)속, 브레비박테륨(*Brevibacterium*)속 또는 코리네박테륨(*Corynebacterium*)속에 속하는 것이다.
- <132> 또한, 상기 메시니코위아(*Metschnikowia*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 메시니코위아 풀케리마(*Metschnikowia pulcherrima*), 및 메시니코위아 레우카우피(*Metschnikowia reukaufii*)를 들 수 있다.
- <133> 크립토크커스(*Cryptococcus*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 크립토크커스 플라버스(*Cryptococcus flavus*), 크립토크커스 후미콜러스(*Cryptococcus humicolus*), 및 크립토크커스 로우렌티(*Cryptococcus laurentii*)를 들 수 있다.
- <134> 캔디다(*Candida*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 캔디다 인터미디아(*Candida intermedia*), 캔디다 솔라니(*Candida solani*), 캔디다 파마타(*Candida famata*) 및 캔디다 모리시야나(*Candida molischiana*)를 들 수 있다.
- <135> 필로바시둠(*Filobasidium*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 필로바시둠 캡슐리게눔(*Filobasidium capsuligenum*)을 들 수 있다.
- <136> 오가타에아(*Ogataea*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 오가타에아 글루코자이마(*Ogataea glucozyma*) 및 오가타에아 미누타(*Ogataea minuta*)를 들 수 있다.
- <137> 시테로마이세스(*Citeromyces*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 시테로마이세스 매트리티텐시스(*Citeromyces matritensis*)를 들 수 있다.
- <138> 로도토룰라(*Rhodotorula*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 로도토룰라 글루티니스(*Rhodotorula glutinis*), 로도토룰라 오우란티아카(*Rhodotorula aurantiaca*) 및 로도토룰라 무실라기노사(*Rhodotorula mucilaginosa*)를 들 수 있다.
- <139> 엑소피알라(*Exophiala*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 엑소피알라 데르마티티디스(*Exophiala dermatitidis*)를 들 수 있다.
- <140> 시조사카로마이세스(*Shizosaccharomyces*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 시조사카로마이세스 폼베(*Shizosaccharomyces pombe*)를 들 수 있다.
- <141> 위케르하미엘라(*Wickerhamiella*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 위케르하미엘라 도메르퀴(*Wickerhamiella domercqiae*)를 들 수 있다.
- <142> 피키아(*Pichia*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 피키아 페테르소닐(*Pichiapetersonii*) 및 피키아 아노말라(*Pichia anomala*)를 들 수 있다.
- <143> 사카로마이코프시스(*Saccharomycopsis*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 사카로마이코프시스 피블리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*)를 들 수 있다.
- <144> 사이토엘라(*Saitoella*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 사이토엘라 콤플리카타(*Saitoella complicata*)를

들 수 있다.

- <145> 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 사카로마이세스 세루비시에(*Saccharomyces cerevisiae*)를 들 수 있다.
- <146> 로도스포리둠(*Rhodospiridium*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 로도스포리둠 토루로이데스(*Rhodospiridium toruloides*)를 들 수 있다.
- <147> 브레비박테륨(*Brevibacterium*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 브레비박테륨 삭크로리티킴(*Brevibacterium sacchrolyticum*)을 들 수 있다.
- <148> 코리네박테륨(*Corynebacterium*)속에 속하는 미생물로서 바람직하게는 코리네박테륨 암모니아제네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테륨 글루타미킴(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테륨 아세트산피실럼(*Corynebacterium acetoacidophilum*) 및 코리네박테륨 비타루미니스(*Corynebacterium vitaeruminis*) 등을 들 수 있다.
- <149> 또한, 원료로서, 식(I)으로 표시되는 화합물을 사용하여 식(IV)으로 표시되는 화합물을 제조하는 경우에는, 그 제조 중간체로서, 식(II')으로 표시되는 화합물을 경유하는 경우와, 식(III')으로 표시되는 화합물을 경유하는 경우가 있다.
- <150> 또한, 식(I)으로 표시되는 화합물로부터, 미리 식(II')으로 표시되는 화합물 및 식(III')으로 표시되는 화합물을 제조하고, 그것을 단리한 후, 식(IV)으로 표시되는 화합물로 유도해도 좋고, 식(II')으로 표시되는 화합물 및 식(III')으로 표시되는 화합물을 단리함이 없이, 그대로 식(IV)으로 표시되는 화합물을 제조해도 좋다.
- <151> 또, 원료로서, 식(I)으로 표시되는 화합물을 사용하는 경우에는 1종의 미생물을 사용하여 식(IV)으로 표시되는 화합물을 제조해도 좋고, 2종 이상의 미생물을 조합 사용하여 제조해도 좋다.
- <152> 원료로서, 식(I)으로 표시되는 화합물을 사용하는 경우에 특히 바람직한 미생물로는 크립토크커스(*Cryptococcus*)속, 캔디다(*Candida*)속, 필로바시둠(*Filobasidium*)속, 오가타에아(*Ogataea*)속, 야로위아(*Yarrowia*)속, 로도토룰라(*Rhodotorula*)속, 엑소피알라(*Exophiala*)속 및 트리코노프시스(*Trigonopsis*)속에 속하는 미생물이고, 더욱 바람직하게는 크립토크커스(*Cryptococcus*)속, 캔디다(*Candida*)속, 필로바시둠(*Filobasidium*)속, 오가타에아(*Ogataea*)속 및 로도토룰라(*Rhodotorula*)속에 속하는 미생물이고, 가장 바람직하게는 오가타에아(*Ogataea*)속에 속하는 미생물이다.
- <153> 원료로서, 식(II)으로 표시되는 화합물을 사용하는 경우에 특히 바람직한 미생물로는 메시니코위아(*Metschnikowia*)속, 크립토크커스(*Cryptococcus*)속, 캔디다(*Candida*)속, 필로바시둠(*Filobasidium*)속, 오가타에아(*Ogataea*)속, 시테로마이세스(*Citeromyces*)속, 야로위아(*Yarrowia*)속, 로도토룰라(*Rhodotorula*)속, 엑소피알라(*Exophiala*)속, 트리코노프시스(*Trigonopsis*)속, 시조사카로마이세스(*Shizosaccharomyces*)속, 위케르하미엘라(*Wickerhamiella*)속, 사카로마이코프시스(*Saccharomycopsis*)속, 사이토엘라(*Saitoella*)속, 피키아(*Pichia*)속, 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속, 로도스포리둠(*Rhodospiridium*)속, 아시네토박터(*Acinetobacter*)속, 브레비박테륨(*Brevibacterium*)속, 셀룰로모나스(*Cellulomonas*)속, 코리네박테륨(*Corynebacterium*)속 및 쿠르토박테륨(*Curtobacterium*)속에 속하는 미생물이다.
- <154> 상기 미생물 중에서 보다 바람직하게는 메시니코위아(*Metschnikowia*)속, 크립토크커스(*Cryptococcus*)속, 캔디다(*Candida*)속, 필로바시둠(*Filobasidium*)속, 오가타에아(*Ogataea*)속, 시테로마이세스(*Citeromyces*)속, 로도토룰라(*Rhodotorula*)속, 시조사카로마이세스(*Shizosaccharomyces*)속, 위케르하미엘라(*Wickerhamiella*)속, 사카로마이코프시스(*Saccharomycopsis*)속, 사이토엘라(*Saitoella*)속, 피키아(*Pichia*)속, 사카로마이세스(*Saccharomyces*)속, 로도스포리둠(*Rhodospiridium*)속, 브레비박테륨(*Brevibacterium*)속 또는 코리네박테륨(*Corynebacterium*)속에 속하는 미생물이고, 더욱 바람직하게는 메시니코위아(*Metschnikowia*)속, 캔디다(*Candida*)속, 오가타에아(*Ogataea*)속, 로도토룰라(*Rhodotorula*)속, 시조사카로마이세스(*Shizosaccharomyces*)속, 위케르하미엘라(*Wickerhamiella*)속, 사카로마이코프시스(*Saccharomycopsis*)속, 사이토엘라(*Saitoella*)속, 로도스포리둠(*Rhodospiridium*)속, 브레비박테륨(*Brevibacterium*)속 또는 코리네박테륨(*Corynebacterium*)속에 속하는 미생물이다. 가장 바람직하게는 메시니코위아(*Metschnikowia*)속, 캔디다(*Candida*)속, 오가타에아(*Ogataea*)속, 시조사카로마이세스(*Shizosaccharomyces*)속, 사이토엘라(*Saitoella*)속, 로도스포리둠(*Rhodospiridium*)속, 브레비박테륨(*Brevibacterium*)속 및 코리네박테륨(*Corynebacterium*)속에 속하는 미생물이다.

- <155> 원료로서, 식(III)으로 표시되는 화합물을 사용하는 경우에 특히 바람직한 미생물로는 크립토크커스(*Cryptococcus*)속, 캔디다(*Candida*)속, 필로바시둠(*Filobasidium*)속, 로도토룰라(*Rhodotorula*)속 및 피키아(*Pichia*)속에 속하는 미생물이요, 보다 바람직하게는 크립토크커스(*Cryptococcus*)속, 캔디다(*Candida*)속 및 로도토룰라(*Rhodotorula*)속에 속하는 미생물이다.
- <156> 또, 상기 미생물 중, IFO 번호가 부여된 미생물은 (재단)발효연구소(IFO)발행의 인터넷 카탈로그(<http://www.ifo.or.jp>)에 기재되어 있고, 그 IFO로부터 입수할 수 있다.
- <157> CBS 번호가 부여된 미생물은 The Centraalbureau voor Schimmelcultures(CBS)의 인터넷 카탈로그(<http://www.cbs.knaw.nl>)에 기재되어 있고, 그 CBS로부터 입수할 수 있다.
- <158> ATCC 번호가 부여된 미생물은 American Type Culture Collection(ATCC)의 인터넷 카탈로그(<http://www.atcc.org>)에 기재되어 있고, 그 ATCC로부터 입수할 수 있다.
- <159> IAM 번호가 부여된 미생물은 IAM Culture Collection(IAM)의 인터넷 카탈로그(<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/misyst/ColleBOX/IAMcollection.html>)에 기재되어 있고, 그 IAM로부터 입수할 수 있다.
- <160> JCM 번호가 부여된 미생물은 Japan Collection of Microorganism(JCM)의 인터넷 카탈로그(<http://www.jcm.riken.go.jp>)에 기재되어 있고, 그 JCM로부터 입수할 수 있다.
- <161> RIFY 번호가 부여된 미생물은 Research Institute of Fermentation, Yamanashi Univ.Kofu Japan(RIFY)의 카탈로그에 기재되어 있고, 그 RIFY로부터 입수할 수 있다.
- <162> 상기 미생물은 야생주 뿐만 아니라, UV조사나 NTG 처리 등의 통상의 변이 처리에 의하여 얻어지는 변이주를 사용하여도 좋다.
- <163> 혹은 세포 융합 또는 유전자 재조합법 등의 유전학적 방법에 의해 유도되는 재조합주 등의 어느 주라도 좋다.
- <164> 또한, 재조합주의 발현주로는 원래의 균주 외에, 대장균 등의 박테리아나 효모 등을 사용하여도 좋고, 이들 재조합주도 상기 미생물의 개념에 포함된다.
- <165> 본 발명의 제조 방법에서는 상기 미생물의 1종 혹은 2종 이상이 균체 및/또는 균체 처리물로서 반응에 제공된다.
- <166> 구체적으로는 상기 미생물을 배양하여 얻어진 균체를 그대로, 혹은 배양하여 얻어진 균체를 공지의 방법으로 처리한 것, 즉, 아세트 처리한 것, 동결 건조 처리한 것, 균체를 물리적 또는 효소적으로 파쇄 한 것 등의 균체 처리물을 사용할 수 있다. 또한, 이들의 균체 또는 균체 처리물로부터 환원 능력을 갖는 효소 분획을 조제물(crude product) 혹은 정제물로서 추출하여 사용할 수도 있다. 또는, 이와 같이 하여 얻어진 균체, 균체 처리물, 효소 분획 등을 통상의 고정화 기술을 사용하여, 즉, 폴리아크릴아미드, 카라기난 겔(carrageenan gel) 겔 등의 담체에 고정화한 것 등을 사용할 수 도 있다. 본 명세서에서, "균체 및/또는 그 균체 처리물"의 용어는 상술의 균체, 균체 처리물, 효소 분획, 및 그들의 고정화물 모두를 포함하는 개념으로서 사용된다.
- <167> 다음에, 본 발명의 제조 방법에 대해서 구체적으로 설명한다.
- <168> 본 발명의 제조 방법에 있어서 미생물은 통상 배양하여 사용되며, 이 배양은 통상의 방법으로 행할 수 있다. 본 미생물의 배양을 위해 사용되는 배지(culture medium)에는 본 미생물이 자화할 수 있는 탄소원, 질소원, 및 무기 이온 등이 포함된다. 탄소원으로는 글루코스, 플라토스, 사카로스 등의 탄수화물, 글리세롤, 만니톨, 크실리톨 등의 폴리알콜류, 유기산 기타가 적합하게 사용된다. 질소원으로는 NZ아민, 트리프토스, 효모 엑기스, 폴리펩톤, 고기 엑기스, 대두 추출물 등의 유기 질소원, 혹은 황산암모늄염, 질산암모늄염 등의 무기 질소원, 기타 등이 적당히 사용된다. 무기 이온으로는 인산 이온, 마그네슘 이온, 철 이온, 망간 이온, 몰리브덴 이온 기타가 필요에 따라 적당히 사용된다. 또한, 이노시톨, 판토텐산, 니코틴산 아미드 기타의 비타민류를 필요에 따라 첨가하는 것은 유효하다.
- <169> 배지 내에서의 상기 탄소원, 질소원, 무기 이온 및 비타민의 양으로는 균주 배양에서 일반적으로 사용되는 범위 라면 특별히 한정되지 않지만, 탄소원 및 질소원은 각각 통상 0.001~50wt%, 바람직하게는 0.1~5wt% 첨가된다. 무기 이온은 통상 0.0001~5wt%, 바람직하게는 0.001~1wt% 첨가된다. 비타민은 통상 0.00001~10wt%, 바람직하게는 0.001~1wt% 첨가된다.

- <170> 배양은 호기적 조건하에서, pH 약 3~11, 온도 약 4~50℃의 적당한 범위로 제어하면서, 1~100시간 행한다.
- <171> 반응 방법으로는 본 미생물을 배양하고, 이것에 의해 얻어진 균체 및/또는 그 균체 처리물을 함유하는 수성 매체에 식(I)~(III)으로 표시되는 화합물 또는 그들의 혼합물을 첨가하여, 목적으로 하는 식(IV)으로 표시되는 화합물을 얻는 방법, 배지에 식(I)~(III)으로 표시되는 화합물 또는 그들의 혼합물을 첨가하여 미생물을 배양하면서 반응을 행하는 방법, 배양 종료후, 그대로의 배지에, 식(I)~(III)으로 표시되는 화합물 또는 그들의 혼합물을 첨가하고, 계속해서 반응을 행하는 방법, 혹은 식(I)으로 표시되는 화합물을 상술한 어느 하나의 방법에 제공하고, 어느 정도 반응이 진행된 후에, 계내의 식(I)~(III)으로 표시되는 화합물의 함유량에 따라서, 별도 배양한 미생물을 추가로 첨가하는 방법 등을 적당히 사용할 수 있다.
- <172> 상기 수성 매체로는 인산나트륨이나 인산칼륨 등을 사용한 완충액, 및, 그 완충액에 유기용매나 계면 활성제 등을 적당히 첨가한 것을 들 수 있다.
- <173> 유기 용매로는 디메틸설폭사이드(DMSO)나 테트라하이드로퓨란(THF) 등의 수용성 용매나 초산부틸이나 헥산 등의 비수용성 유기 용매 등을 들 수 있다. 계면 활성제로는 Tween80이나 슈가 에스테르 등을 들 수 있다.
- <174> 완충액의 농도로는 1M이하, 바람직하게는 0.2M이하의 농도로 사용함이 좋다.
- <175> 반응은 온도 4~70℃, 바람직하게는 15~50℃의 범위로 행하며, pH는 2~9, 바람직하게는 4~8의 범위로 행한다.
- <176> 식(I)~(III)으로 표시되는 화합물 또는 그들의 혼합물의 농도로는 반응액에 대해서, 0.0001~10wt%, 바람직하게는 0.001~5wt%의 범위가 바람직하고, 필요에 따라, 식(I)~(III)으로 표시되는 화합물 또는 그들의 혼합물은 반응중에 추가로 보충 첨가하여도 좋다.
- <177> 또한, 반응을 촉진하기 위해서 보조소, 보조소와 그 재생 시스템, 혹은 탄소원을 적당히 첨가하여도 좋다.
- <178> 보조소로는, 통상, β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide, Reduced Form(이하 NADH이라 약칭함) 혹은 β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced Form(이하 NADPH라 약칭함)을 들 수 있다. 첨가량으로는 반응 기질의 100만분의 1당량~10당량, 바람직하게는 1만분의 1당량~10당량이다.
- <179> 보조소의 재생 시스템으로는, 포름산 탈수소효소 등의 β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide(이하 NAD이라 약칭함)를 NADH로 환원하는 능력을 갖는 효소와 그 효소 기질(포름산)의 조합이나 글루코스 탈수소효소 등의 β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate(이하 NADP라 약칭함)를 NADPH로 환원하는 능력을 갖는 효소와 그 효소 기질(글루코스 등)의 조합 등을 들 수 있다. 보조소를 재생하는 이들 효소는 시판의 것이라도 좋고, 보조소의 재생능을 갖는 미생물의 균체 및/또는 그 균체 처리물이라도 상관없다. 이들 시스템의 첨가량은 반응 기질의 양에 맞추어 적당히 결정된다.
- <180> 상기 반응을 촉진하기 위한 탄소원으로는, 반응에 사용하는 균체 및/또는 그 균체 처리물이 보조소를 재생하기 위해서 이용할 수 있는 탄소원이면 어느 것이라도 상관없지만, 예를 들어 글루코스, 플라토스, 사카로스 등의 탄수화물, 글리세롤, 만니톨, 크실리톨 등의 폴리알콜류, 유기산 기타가 적당히 사용된다. 첨가량으로는 0.0001~50wt%, 바람직하게는 0.01~10wt%이다.
- <181> 상기와 같이, 반응은 수성 매체를 사용하여 행하여지지만, 식(I)~(III)으로 표시되는 화합물은 물에 대한 용해도가 낮기 때문에, 유기 용매나 계면 활성제 등에 미리 용해 혹은 현탁하여 첨가함으로써 반응계 중에 균일하게 분산시키는 것이 바람직하다.
- <182> 상기 제조 방법으로 얻어지는 식(IV)으로 표시되는 화합물은 통상, 반응액으로부터 유기 용매로 추출한 후에, 통상의 정제 방법, 즉 크로마토그래피나 결정화 기술을 사용하여 불순물을 제거함으로써, 정제된 식(IV)으로 표시되는 화합물을 얻을 수 있다. 구체적으로는 식(IV)으로 표시되는 화합물을 유기 용매 등으로 가용화한 후에 미생물 등의 고형분을 원심 분리, 필터 프레스, 한외 여과 등의 통상의 분리 장치에 의해 제거함으로써, 식(I V)으로 표시되는 화합물을 함유하는 액체를 얻는다. 얻어진 액체를 통상의 방법으로, 즉 크로마토그래피나 결정화 기술을 사용하여 불순물을 제거하여, 정제된 식(IV)으로 표시되는 화합물을 얻을 수 있다.

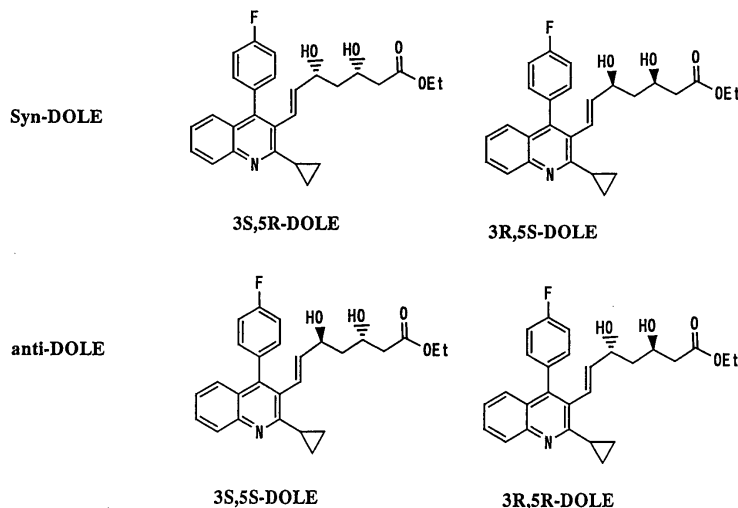
실시예

- <183> 이하에 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하지만, 그 요지를 벗어나지 않는 한, 본 발명의 기술분야에서의 통상의 변경을 할 수 있다.
- <184> 또, (E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디하이드록시헵트-6-엔산 에스테르류(이후,

"DOLE"라고 약칭함)는 목적으로 하는 3R, 5S체 외에 이성체로서, 3S, 5R체, 3R, 5R체 및 3S, 5S체가 존재하고, 그 구조식은 이하와 같다.

<185> 3S, 5R-DOLE 및 3R, 5S-DOLE는 신(Syn)체의 DOLE이고, 3S, 5S-DOLE 및 3R, 5R-DOLE는 안티(anti)체의 DOLE이다.

<186> 실시예 중, 목적 생성물인 3R, 5S체의 순도를 디아스테레오머(diastereomer) 과잉율 및 에난티오머(enantiomer) 과잉율로 나타내는 경우가 있지만, 본 명세서에서는 디아스테레오머 과잉율을 (syn-DOLE - anti-DOLE)/(syn-DOLE + anti-DOLE)로, 에난티오머 과잉율을 (3R, 5S체 - 3S, 5R체)/(3R, 5S체 + 3S, 5R체)로 나타냈다.



<187>

<188> 제조예 1

<189> (E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디옥소헵트-6-엔산 에틸에스테르(이후, DOXE라 약칭함)의 합성:

<190> 교반기, 적하 편널 및 온도계를 부착한 500mL의 4구 플라스크에, (E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-5-하이드록시-3-옥소헵트-6-엔산 에틸에스테르(이후, 5-MOLE이라 약칭함) 5.02g(11.22mmol) 및 아세톤 420mL를 가하고 교반한다. 제조된 Jones 산화제(농황산 3mL와 산화크롬 3.35g를 혼합시킨 후, 물로 25mL까지 희석함으로써 얻어진 시약) 10.5mL를 0℃에서 20분에 걸쳐 적하하고, 빙냉하에서 2시간 교반을 행한 후, 메탄올 10mL를 천천히 첨가하여 반응을 정지시켰다. 다음에 반응 혼합액을 감압하, 아세톤을 증류하여 제거시킨 후, 초산에틸 250mL를 첨가하였다. 얻어진 용액을 포화 탄산수소나트륨 수용액 60mL로 2회 세정하고, 계속해서 포화 식염수(brine) 수용액 60mL로 2회 세정하고, 이어서 초산에틸 용액을 무수황산 마그네슘으로 건조하였다. 이어서, 용매를 증류 제거한 후, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(전개 용매; 헥산:초산에틸=2:1)로 정제하여, 표기 화합물 3.03g(수율:60.6%)을 얻었다.

<191> ¹H-NMR(300MHz, CDCl₃, (δ ppm): 7.79-7.19(8H, m), 7.71(1H, d), 6.03(1H, d), 5.51(1H, s), 4.21(2H, q), 3.40(2H, s), 2.35-2.40(1H, m), 1.39-1.41(2H, m), 1.28(3H, t), 1.07-1.09(2H, m).

<192> 제조예 2

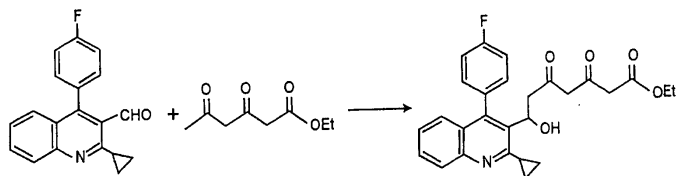
<193> 5S-(E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-5-하이드록시-3-옥소헵트-6-엔산 에틸에스테르(이후, 5S-MOLE라 약칭함)의 합성;

<194> 감압하 가열 건조한 후에 질소 가스를 도입한 슈렌크관에, (S)-2-[N-(3,5-di-tert-부틸살리실리덴)아미노]-3-메틸-1-부탄올 0.87g(3.3mmol), 염화메틸렌 5mL 및 티탄 테트라에톡사이드 0.63mL(6.0mmol)을 첨가한 후, 실온에서 1시간 교반 혼합했다. 그 슈렌크관을 -50℃로 냉각 후, (E)-3-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-프로프-2-엔-1-알 0.95g(3.0mmol)을 염화메틸렌 2mL에 용해하여 적하하고, 5분간 교반한 후, 디케텐 0.51g(6mmol)를 더 첨가하고, -50℃를 유지하면서 22시간 교반하여 반응시켰다. 얻어진 반응 혼합액을, 염화메틸렌 25mL와 0.24M 탄산수소나트륨 수용액 25mL의 혼합 용액 중에 첨가하고, 2시간, 실온에서 격렬하게 교반하여 2층 용액을 얻었다. 얻어진 2층 용액을 분액하여, 물층을 염화메틸렌 10mL로 2회 추출을 행하였다. 염화메

틸렌층과 염화메틸렌 추출액을 합쳐서 염화메틸렌 용액을 얻었다. 그 염화메틸렌 용액을 무수 황산마그네슘으로 건조하고, 용매를 증류 제거한 후, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(전개 용매; 헥산:초산에틸=3:2)로 정제하여, 5S-(E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-5-하이드록시-3-옥소헵트-6-엔산 에틸에스테르 0.75g를 얻었다(광학 순도: 73%ee, (E)-3-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-프로프-2-엔-1-알에 대한 수율:56%).

<195> 제조예 3

<196> 7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-7-하이드록시-3,5-디옥소헵탄산 에틸에스테르의 합성:



<197>

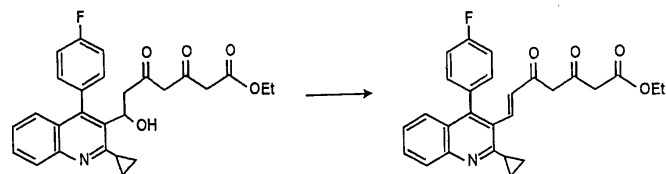
<198> 오일상 60% 수소화나트륨 2.40g, 테트라하이드로퓨란 200ml의 혼합 용액 중에, 내부 온도를 2℃ 이하로 유지하면서 3,5-디옥소헵산산 에틸에스테르 10.3g, 테트라하이드로퓨란 40ml의 혼합액을 20분에 걸쳐 적하 하였다. -10℃에서 50분간 반응시킨 후, 내부 온도를 -20~-15℃로 유지하면서 n-부틸리튬 1.6M 헥산 용액 75ml를 40분에 걸쳐 적하하고, 내부 온도 2℃ 이하에서 40분간 반응 시켰다. 이것에 내부 온도를 -15℃ 이하로 유지하면서, 2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-카르보알데히드 11.7g와 테트라하이드로퓨란 80ml의 혼합액을 40분에 걸쳐 적하하고, 10℃ 이하에서 1시간 반응 시켰다. 내부 온도를 5℃ 이하로 유지하면서, 반응계에 초산 14.4ml, 톨루엔 40ml를 첨가한 후, 물 100ml, 포화 식염수 100ml로 차례차례 세정했다. 용매를 증류 제거한 후, 얻어진 잔사에 헥산 100ml, 초산에틸 5ml를 첨가하여 결정화하고, 이것을 여과한 후 건조하여, 7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-7-하이드록시-3,5-디옥소헵탄산 에틸에스테르 16.6g(수율 89%)를 얻었다.

<199> 그 화합물의 NMR은 이하와 같다.

<200> $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 1.11(2H, m), 1.13(1H, m), 1.27(3H, t, J=10), 1.76(1H, m), 2.40(1H, m), 2.48(2H, ABq, J=66, 14), 2.69(2H, ABq, J=52, 16), 2.78(1H, m), 3.30(1H, m), 4.18(2H, m), 5.25(1H, d, J=3), 5.58(1H, dd, J=12, 4), 7.16-7.26(5H, m), 7.33(1H, dd, J=7, 7), 7, 61(1H, dd, J=7, 7), 7.93(1H, d, J=7)

<201> 제조예 4

<202> DOXE의 합성:



<203>

<204> 제조예 3에서 얻은, 7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-7-하이드록시-3,5-디옥소헵탄산 에틸에스테르 20.0g를 톨루엔 120ml에 용해하고, 실리카겔 10g, 무수 황산마그네슘 8g를 첨가하고, 95℃에서 16시간 반응시켰다. 반응계의 실리카겔 및 무기염을 제거한 후, 용매를 증류 제거하여, 얻어진 잔사를 컬럼 크로마토그래피(전개 용매; 헥산:초산에틸=2:1)로 정제하여, (E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디옥소헵트-6-엔산 에틸에스테르(DOXE)를 8.4g(수율 44%)를 얻었다.

<205> 그 화합물의 NMR은 이하와 같다.

<206> $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$: 1.09(2H, m), 1.28(3H, t, J=7), 1.40(2H, m), 2.38(1H, m), 3.40(2H, s), 4.20(2H, q, J=7), 5.51(1H, s), 6.02(1H, d, J=16), 7.16-7.26(4H, m), 7.30-7.40(2H, m), 7.70(1H, d, J=16), 7.63(1H, m), 7.97(1H, m)

- <207> 제조예 5
- <208> DOXE의 합성:
- <209> 제조예 3에서 얻은 7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-7-하이드록시-3,5-디옥소헵탄산 에틸에스테르 5.0g, 톨루엔 10ml, 무수 p-톨루엔설포산 0.37g의 혼합액을 110℃에서 3시간 반응시켰다. 반응계를 탄산수소나트륨 수용액으로 세정하였다. 이어서, 용매를 증류하고, 컬럼 크로마토그래피(전개 용매; 헥산:초산에틸=2:1)로 정제하여, (E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디옥소헵트-6-엔산 에틸에스테르(DOXE) 3.0g (수율63%)를 얻었다.
- <210> 제조예 6
- <211> DOXE의 합성
- <212> 제조예 3에서 얻은 7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-7-하이드록시-3,5-디옥소헵탄산 에틸에스테르 0.50g, 톨루엔 20ml, 무수 p-톨루엔설포산 0.037g의 혼합액을 감압 조건하, 내부 온도 105℃에서, 반응으로 생성되는 물을 톨루엔과의 공비에 의해 증류 제거하면서 1시간 반응시켰다. 상압으로 회복한 후, 반응계에 물 0.097g를 첨가하고 90℃에서 10분간 반응시킨 후, 다시 감압 조건하, 내부 온도 105℃에서, 물을 증류 제거하면서 1시간 반응시켰다. 반응계를 고속 액체 크로마토그래피로 분석한 결과, (E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3일]-3,5-디옥소헵트-6-엔산 에틸에스테르(DOXE) 0.37g(수율 78%)이 생성됨을 확인했다.
- <213> 제조예 7
- <214> DOXE의 합성:
- <215> 제조예 3에서 얻은 7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-7-하이드록시-3,5-디옥소헵탄산 에틸에스테르 0.2g, 초산비닐 2ml의 혼합액에 황산 0.01g를 첨가하고, 가열 환류에 의해 5시간 반응시켰다. 반응계를 초산에틸로 희석한 후, 탄산수소나트륨 수용액으로 세정하였다. 상기 용매를 증류하여 제거한 후, 얻어진 잔사를 컬럼 크로마토그래피(전개 용매; 헥산:초산에틸=2:1)로 정제하여, (E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디옥소헵트-6-엔산 에틸에스테르(DOXE) 0.14g(수율 73%)를 얻었다.
- <216> 제조예 8
- <217> DOXE의 합성:
- <218> 제조예 3에서 얻은 7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-7-하이드록시-3,5-디옥소헵탄산 에틸에스테르 2.0g, 초산 10ml, 무수초산 0.66g, N,N-디메틸-4-아미노피리딘 0.01g의 혼합액을 90℃에서 4시간 반응시켰다. 반응계를 초산에틸로 희석하고, 물 및 탄산수소나트륨 수용액으로 세정하였다. 그 후, 용매를 증류하여 제거하고, 얻어진 잔사를 헥산으로부터 결정화하여, (E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디옥소헵트-6-엔산 에틸에스테르(DOXE) 1.55g(수율 80%)를 얻었다.
- <219> 제조예 9
- <220> DOXE의 합성:
- <221> 제조예 3에서 얻은 7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-7-하이드록시-3,5-디옥소헵탄산 에틸에스테르 0.250g를, 4몰/L 염산/초산에틸 용액 5ml에 용해하고, 20℃에서 12시간 교반을 수행했다. 반응계를 고속 액체 크로마토그래피로 분석한 결과, (E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디옥소헵트-6-엔산 에틸에스테르(DOXE) 0.198g(수율 82%)이 생성됨을 확인했다.
- <222> 제조예 10
- <223> DOXE의 염산염의 합성
- <224> 오일상 60% 수소화나트륨 1.37g, 테트라하이드로퓨란 10ml의 혼합 용액 중에, 내부 온도를 20℃로 유지하면서 3,5-디옥소헵탄산 에틸에스테르 2.36g, 테트라하이드로퓨란 10ml의 혼합액을 5분간에 걸쳐 적하하였다. 그 온도에서 1시간 교반한 후, 2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-카르브알데히드 2.01g와 테트라하이드로퓨란 20ml의 혼합액을 20분간에 걸쳐 적하 하였다. 4시간 교반한 후, 초산 3.09g과 물 20ml 중에 반응액을 첨

가하여 반응을 정지시켰다. 초산에틸 40ml로 추출하여, 유기상을 포화 식염수 20ml로 세정하고, 무수 황산나트륨 2g으로 건조했다. 얻어진 유기상을 분석하면, 목적물인 (E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디옥소헵트-6-엔산 에틸에스테르(DOXE) 2.52g(수율 82%)이 얻어졌다.

<225> 용매를 증류 제거한 후, 얻어진 잔사에 실온에서 4몰/L 염산/초산에틸 용액 1.7ml를 첨가했다. 결정이 생성된 후, 온도를 5℃까지 냉각하고, 이것을 여과하여 얻은 후 건조하여, (E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디옥소헵트-6-엔산 에틸에스테르의 염산염 2.49g (수율 75%)를 얻었다.

<226> 실시예 1

<227> DOXE로부터 DOLE의 제조:

<228> 이스트 엑기스(Difco 사제) 5g/L, 폴리펩톤(Nihon Pharmaceutical Co 사제) 5g/L, 맥아 엑기스(Difco 사제) 3g/L, 글루코스(Nihon Shokuhinkako Co 사제) 20g/L의 조성으로 되는 액체 배지 2.5mL에, 표 1에 나타낸 각종의 균주를 접종하여, 30℃에서 21시간 호기적으로 배양했다. 얻어진 배양액을 1mL씩 취하여 원심 분리하여, 균체를 모았다. 이 균체에 화합물(I)(식 중, R=에틸기의 화합물: DOXE)를 함유하는 반응액을 0.25mL 첨가하고, 30℃에서 20시간 호기적으로 반응시켰다.

<229> 또, 상기 반응액의 조성은 DOXE를 0.3g/L, 글루코스(Nihon Shokuhinkako Co 사제) 20g/L, 디메틸설폭사이드(DMSO)(Kishida Chemical Co 사제) 20mL/L, 100mM 인산칼륨 완충액(pH7.0)이다.

<230> 반응 종료후, 반응액에 초산에틸을 0.5mL 첨가하여 격렬하게 혼합하고, 이어서 원심 분리에 의해 유기층과 물층으로 분리했다. 유기층을 다른 용기로 옮겨서, 용매를 농축 원심기로 증류 제거하였다. 그 후 건조 고상물을 초산에틸0.01mL에 용해하여, 박층 크로마토그래피(TLC)를 행했다. TLC는 실리카겔 플레이트(Merck 사제 silica gel 60F₂₅₄)를 사용하고, 전개 용매는 헥산/초산에틸=1/1을 사용했다.

<231> 전개 종료후, UV 램프에 의해 생성물을 확인했다. 화합물(I)은 R_f=0.76~0.86, 화합물(II) 및 화합물(III)은 R_f= 0.54~0.61, 화합물(IV)(식 중, R= 에틸기의 화합물: DOLE)는 R_f=0.33이다. DOLE의 TLC 상의 스폿을 긁어내서 이소프로판올 0.25mL로 용출하였다. 원심 분리 후, 상청을 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 광학 순도 및 TLC 긁어낸 샘플의 농도를 분석했다.

<232> HPLC의 조건은 이하와 같다.

<233> 컬럼: CHIRALCEL AD(Daicel Chemical Industry, Ltd 제)

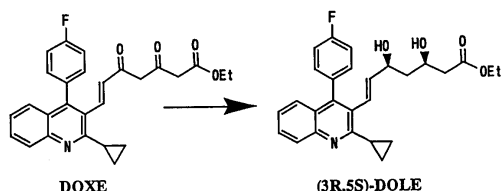
<234> 용리액: 헥산/에탄올=9/1

<235> 유속: 0.5ml/min

<236> 검출: UV 254nm

<237> 온도: 실온

<238> 결과를 표 1에 나타낸다.



<239>

<표 1>

사용 미생물	TLC 긁어낸 샘플의 농도 (디아스테레오머 과잉율, 에난티오머 과잉율)
<i>Candida famata</i> var <i>famata</i> RIFY7455	7.1mg/L (97.1% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Cryptococcus laurentii</i> IFO0609	0.4mg/L (100.0% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Filobasidium capsuligenum</i> IFO1185	2.7mg/L (100.0% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Ogataea minuta</i> var <i>nonfermentans</i> IFO1473	7.4mg/L (92.0% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)

실시예 2

DOXE로부터 DOLE의 제조:

실시예 1과 동일 조성의 액체 배지 2.5mL에, 오가타에아 미누타 변종 논퍼멘탄스(*Ogataea minuta* var *nonfermentans*) IFO1473를 접종하고, 27℃에서 각각 24시간과 48시간 호기적으로 배양했다. 얻어진 배양액을 1mL씩 취하여 원심 분리하여 균체를 모았다. 이 균체에 100mM 인산칼륨 완충액(pH7.0) 0.2mL를 첨가하여 완전히 현탁 후, 50%(w/v)의 글루코스 용액을 20 μ L, 5g/L의 DOXE(DMSO 용액)를 50 μ L 첨가하고, 잘 교반한 후, 27℃에서 20시간 반응시켰다.

반응 종료후, 실시예 1과 동일하게 초산에틸 추출 및 TLC를 행하여, DOLE의 TLC의 스폿을 긁어내서 이소프로판올 200 μ L로 용출하여, 원심 분리 후, 상청을 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 광학 순도 및 DOLE의 생성량을 분석했다.

HPLC의 조건은 이하와 같다.

컬럼: CHIRALCEL AD(Daicel Chemical Industry, Ltd제)

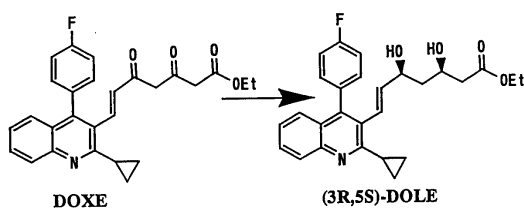
용리액: 헥산/에탄올=95/5

유속: 1mL/min

검출: UV 254nm

온도: 실온

결과를 표 2에 나타낸다.



<표 2>

배양시간	TLC 긁어낸 샘플의 농도(디아스테레오머 과잉율, 에난티오머 과잉율)
24 hours	113.3mg/L (97.4% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
48 hours	72.8mg/L (100.0% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)

또한, 상기 TLC를 행했을 때에, 5-MOLE 또는 3-MOLE에 해당하는 R_f의 스폿이 있었으므로, 24시간 배양의 것에 대해서만 동일하게 긁어내서, 고속 액체 크로마토 그래피(HPLC)를 사용하여 생성량의 분석을 행했다.

- <257> HPLC의 조건은 이하와 같다.
- <258> 컬럼: MCIGEL CHP2MGM (4.6x150mm) (Mitsubishi Chemical corporation 제)
- <259> 용리액: 메탄올/아세토니트릴/물/인산=800/100/100/0.5
- <260> 유속: 0.6ml/min
- <261> 검출: UV254nm
- <262> 온도: 60℃
- <263> 본 HPLC 조건에서, 5-MOLE의 유지 시간(retention time)이 4.73이고, 3-MOLE의 유지 시간이 5.47일 경우 5-MOLE의 상기 TLC 굽어낸 샘플 농도는 25.2mg/L이고, 3-MOLE의 샘플 농도는 2.2mg/L이었다.
- <264> 또한, 상기 분석 조건에서의 DOLE의 유지 시간은 4.02이고, DOXE는 8.02이다.
- <265> 실시예 3
- <266> DOXE로부터 MOLE의 제조:
- <267> 실시예 1과 동일한 조성의 액체 배지 2.5mL에, 로도토룰라 오우란티아카(*Rhodotorula aurantiaca*) IFO 0754 및 로도토룰라 글루티니스 변종 다이레넨시스(*Rhodotorula glutinis var dairenensis*) IFO 0415를 각각 접종하여, 27℃에서, 로도토룰라 오우란티아카(*Rhodotorula aurantiaca*)는 24시간, 로도토룰라 글루티니스 변종 다이레넨시스(*Rhodotorula glutinis var dairenensis*)는 48시간, 각각 호기적으로 배양했다. 각각 얻어진 배양액을 1ml씩 취하여 원심 분리하여, 균체를 모았다. 이 균체에 100mM 인산칼륨 완충액(pH7.0) 0.2ml를 가하여 완전히 현탁한 후, 50%(w/v)의 글루코스 용액을 20 μ l, 2g/L의 NADP와 NAD 혼합액을 20 μ l, 10g/L의 DOXE(DMSO 용액)를 30 μ l 첨가하고, 잘 교반한 후, 27℃에서 12시간 호기적으로 반응시켰다.
- <268> 반응 종료후, 실시예 1과 동일하게 초산에틸 추출 및 TLC를 행하여, 5-MOLE 또는 3-MOLE에 해당하는 Rf의 스폿 부분과 DOLE에 해당하는 Rf의 스폿 부분을 각각 굽어냈다.
- <269> 그 후, DOLE에 대해서는
- <270> 컬럼: CHIRALCEL AD (Daicel Chemical Industry, Ltd제)
- <271> 용리액: 헥산/에탄올=95/5
- <272> 유속: 1ml/min
- <273> 검출: UV 254nm
- <274> 온도: 실온
- <275> 의 조건으로,
- <276> MOLE에 대해서는
- <277> 컬럼: MCIGEL CHP2MGM (4.6x150mm) (Mitsubishi Chemical corporation 사제)
- <278> 용리액: 메탄올/아세토니트릴/물/:인산=800/100/100/0.5
- <279> 유속: 0.6ml/min
- <280> 검출: UV254nm
- <281> 온도: 60℃
- <282> 의 조건으로 각각 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의한 분석을 행했다.
- <283> 결과를 표 3에 나타낸다.

<표 3>

사용 미생물	TLC 굽어낸 샘플의 농도(각 mg/L)		
	5-MOLE	3-MOLE	DOLE
<i>Rhodotorula glutinis</i> var <i>daiarenensis</i> IFO0415	44.9	2.2	2.9 (100%de, 100%ee)
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> IFO0754	118.9	N.D.	15.3 (98.7%de, 100%ee)

실시예 4

DOXE로부터 3-MOLE의 제조:

실시예 1과 동일한 조성의 액체 배지 2.5mL에, 캔디다 인터미디아(*Candida Intermedia*) IFO 0761를 접종하여, 27℃에서 24시간 배양한 후, 실시예 2와 같은 조작으로 DOXE와 반응시키고, 반응후 동일하게 초산에틸 추출 및 TLC를 행하여, 스폿의 HPLC 분석을 행한 결과, 3-MOLE의 TLC 굽어낸 샘플의 농도는 156.9mg/L이었다.

실시예 5

DOXE로부터 3-MOLE의 제조:

실시예 1과 동일한 조성의 액체 배지 2L에, 필로바시덤 캡슐리게눔(*Filobasidium capsuligenum*) IFO1185 주를 접종하여, 30℃에서 21시간 호기적으로 배양했다. 얻어진 배양액을 원심 분리하여, 균체를 모았다. 10%(w/v)의 균체 현탁액을 10mM의 인산칼륨 완충액(pH7)을 사용하여 제작하고, 이 현탁액 12mL를 30φ의 시험관 6개에 각각 샘플링 하고, 각각에 10%(w/v)의 DOXE(DMSO 용액) 0.1mL 및 50%(w/v)의 글루코스 용액 0.15mL를 가하고, 30℃에서 20시간 호기적으로 반응시켰다.

반응 종료후, 반응 혼합물을 초산에틸로 추출했다. 추출물은 실시예 1과 동일 조건으로 TLC를 행하여, 화합물(III)을 함유하는 부분을 굽어내고, 굽어낸 실리카겔로부터 초산에틸로 추출하고, 샘플을 ¹H-NMR로 분석했다.

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.02(dt, J=6.4, 3.2Hz, 2H), 1.21(t, J=7.2Hz, 3H), 1.33(dt, J=6.4, 3.2Hz, 2H), 2.26(m, 1H), 2.43(d, J=6.4Hz, 2H), 2.60-2.66(dd, J=6.4, 6.4Hz, 2H), 3.37(m, 1H), 4.11(q, J=6.8Hz, 2H), 4.34-4.41(m, 1H), 6.27(d, J=16.8Hz, 1H), 7.06-7.36(m, 6H), 7.52-7.62(m, 1H), 7.60(d, J=16.8Hz, 1H), 7.90(d, J=8.4Hz, 1H)

이 결과로부터 3-MOLE가 생성됨이 확인되었다.

또한, 이하의 조건으로 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 광학 순도를 분석한 결과, 화합물(III')의 광학 순도는 87.3%ee로 얻어짐을 알았다.

또한, 본 예에서의 HPLC의 조건은 이하와 같다.

컬럼: CHIRALCEL AD (Daicel Chemical Industry, Ltd제)

용리액: 헥산/에탄올/트리플루오로 초산=900/100/1

유속: 1ml/min

검출: UV254nm

온도: 실온

실시예 6

DOXE로부터 DOLE 및 3R-MOLE의 제조:

실시예 1과 동일한 조성의 액체 배지 50mL를 넣은 500ml 플라스크를 120℃에서 20분 멸균했다. 이 플라스크 8개에, 오가타에아 미누타 변종 논퍼멘탄스(*Ogataea minuta* var *nonfermentans*) IFO 1473를 접종하고, 28℃에서 24시간 호기적으로 배양했다. 얻어진 배양액을 이스트 엑기스(Difco 사제) 10g/L, 폴리캡톤(Nihon Pharmaceutical Co 사제) 10g/L, 맥아 엑기스(Difco 사제) 6g/L, 글루코스(Nihon Shokuhinkako Co 사제) 20g/L의 조성으로 되는 액체 배지 20L를 넣은 30L 자 퍼멘터(Jar fermentor) 2개에 4개씩 식균하여, 28℃에서 24시간

배양했다. 배양 후, 배양액을 원심 분리하여 균체를 모았다.

<305> 이 균체를 100mM 인산칼륨 완충액(pH7.0) 9L에 가하여 완전히 현탁 후, 3등분하여, 각각 5L 자 퍼멘터에 넣었다. 각 퍼멘터에 글루코스(Nihon Shokuhinkako Co 사제)를 53g, NADPH(Oriental Yeast Co제)를 2g, 1.66g의 DOXE를 130ml의 DMSO에 녹인 용액을 첨가하고, 40℃에서 6시간 호기적으로 반응시켰다. NADPH는 2g씩, 반응 1시간후에 재첨가했다. 반응 후, 각 퍼멘터의 반응액을 일부 취하여, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 생성량을 분석한 결과 DOLE는 전부 3.43g 생성되어 있었다. (수율 71%)

<306> 반응액을 각각 원심 분리하여 침전물을 모았다. 침전물에 각 600ml의 아세토니트릴을 첨가하고, 충분히 교반 후, 원심 분리를 행하여 상청과 침전으로 나누었다. 침전층에는 아세토니트릴 200ml를 추가하여 재현탁과 원심 분리를 행했다. 상청을 모두 합쳐서 증발기로 농축하였다. 농축 후, 초산에틸600ml를 가하여 용해한 후 물 50ml로 2회 세정했다.

<307> 초산에틸층을 농축하고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 의한 정제를 행했다. 실리카겔 400ml를 컬럼에 넣고, 헥산:초산에틸=2:1의 용액으로 미리 평형화 하여 두었다. 그 후, 농축된 샘플을 넣고 헥산:초산에틸=2:1의 전개 용매를 2L 흘린 후, 헥산:초산에틸=3:2로 전개 용매를 변경하여 2L 더 흘리면서 용출시켰다.

<308> 용출된 액은 200ml씩의 분획으로 하고(전체 20), 각 분획을 TLC로 확인했다. DOLE가 검출된 분획을 모아 농축한 결과 3.4g의 조(crude)오일상의 DOLE가 얻어졌다. 이것은 순도 환산으로 2.5g의 DOLE에 상당한다.

<309> 광학 순도를 상기 실시예 2 기재의 조건으로 HPLC 분석한 결과, 면적비로 3S, 5R체: 3R, 5R체: 3R, 5S체: 3S, 5S체=0.3: 0.2: 98.9: 0.6이었다. (98.4%de, 99.4%ee)

<310> 한편, 컬럼 정제의 분획에서 3-MOLE가 주성분으로서 검출된 부분을 모은 결과, 1.5g의 조오일상의 것이 얻어졌으므로, 이것을 다른 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에 적용시켜 다시 정제하여 0.7g의 3R-MOLE을 얻었다.

<311> 광학 순도를 실시예 2와 동일하게 분석한 결과 98%ee이었다.

<312> 실시예 7

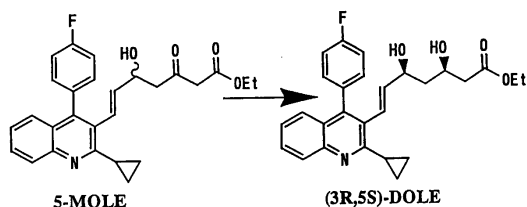
<313> 5-MOLE로부터 DOLE의 제조:

<314> 표 4에 나타낸 각종의 균주를 사용하고, 반응기질로서 DOXE 대신에 R-5MOLE와 S-5MOLE가 1:1의 비로 함유하는 5-MOLE를 사용한 것 이외는 실시예 1과 같은 조작으로 반응을 행했다.

<315> 여기서, 생성물의 DOLE 중, 3S, 5R체 및 3R, 5R체는 5R-MOLE로부터 생성되며, 3R, 5S체 및 3S, 5S체는 5S-MOLE로부터 생성된다.

<316> 반응 종료 후, 실시예 1과 동일하게 초산에틸 추출 및 TLC를 행한 후, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 광학 순도 및 생성량의 분석을 행하였다.

<317> 결과를 표 4에 나타낸다.



<318>

<표 4>

사용 미생물	TLC 긁어낸 샘플 의 농도(각 mg/L) 3s,5r 3r,5r 3r,5s 3s,5s	5S-MOLE로부터 의 3위치 비대칭 환원 선택율	에난티오머 과잉율 (ee%)
<i>Saccharomycopsis fibuligera</i> IFO0105	0.1, 8.0, 25.8, 1.7	87.6%	99.6%
<i>Wickerhamiella domercqii</i> IFO1857	0.2, 16.7, 16.0, 1.4	83.9%	97.3%
<i>Cryptococcus laurentii</i> var <i>laurentii</i> CBS5539	0.1, 3.1, 6.8, 0.6	83.0%	97.5%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> IFO10796	0.7, 6.6, 15.3, 1.9	78.3%	91.3%
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> IFO1407	0.2, 5.6, 12.1, 1.6	76.7%	97.5%
<i>Ogataea minuta</i> var <i>nonfermentans</i> IFO1473	0.2, 10.1, 15.9, 2.1	76.4%	98.1%
<i>Exophiala dermatitidis</i> IFO8193	1.5, 8.0, 16.4, 3.0	68.9%	83.4%
<i>Filobasidium capsuligenum</i> IFO1185	N.D., 12.2, 15.3, 3.5	62.6%	100.0%
<i>Rhodotorula glutinis</i> var <i>glutinis</i> IFO0395	N.D., 7.0, 7.9, 1.9	61.2%	100.0%
<i>Candida famata</i> var <i>famata</i> IFO0856	N.D., 8.1, 11.0, 2.8	60.0%	100.0%
<i>Pichia petersonii</i> IFO1372	0.1, 1.0, 3.3, 0.8	59.2%	92.3%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO0565	N.D., 1.0, 2.0, 0.6	55.5%	100.0%

실시예 8

5-MOLE로부터 DOLE의 제조:

이스트 엑기스(Difco 사제) 10g/L, 폴리펩톤(Nihon Pharmaceutical Co 사제) 8g/L, 대두 엑기스 HINUTE SMS(Fuji Oil Co., Ltd제) 7g/L, 글루코스(Nihon Shokuhinkako Co 사제) 5g/L, 글리세롤(Kishida Chemical Co 사제) 10g/L, 인산1칼륨(Wako Pure Chemical Industries, Ltd 제) 1g/L, 인산 2칼륨(Wako Pure Chemical Industries, Ltd 제) 3g/L, 황산마그네슘(Kishida Chemical Co 사제) 0.5g/L, 염화망간(Wako Pure Chemical Industries, Ltd 제) 10mg/L의 조성으로 되는 액체 배지 2.5mL에, 표 5에 나타난 각종의 균주를 접종하고, 30℃에서 24시간 호기적으로 배양했다. 얻어진 배양액을 1ml씩 취하여 원심분리하여, 균체를 모았다. 이 균체에 100mM 인산칼륨 완충액(pH7.0) 0.2ml를 가하여 완전히 현탁한 후, 50%(w/v) 글루코스 용액을 10 μ l, 2g/L NADP(Oriental Yeast Co., Ltd 제)와 NAD(Oriental Yeast Co., Ltd 제)의 혼합액을 10 μ l, R-5MOLE와 S-5MOLE가 1:1의 비로 함유하는 5-MOLE의 5g/L DMSO 용액을 10 μ l 첨가하고, 잘 교반한 후, 30℃에서 20시간 호기적으로 반응시켰다.

반응 종료후, 실시예 1과 동일하게 초산에틸 추출 및 TLC를 행했다. DOLE의 TLC의 스폿을 긁어내서 이소프로판올 200 μ l로 용출하여, 원심 분리 후 상청을 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 광학 순도 및 생성량을 분석했다.

HPLC의 조건은 이하와 같다.

컬럼: CHIRALCEL AD(Daicel Chemical Industry, Ltd제)

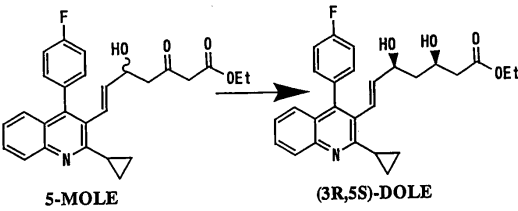
용리액: 헥산/에탄올=95/5

유속: 1ml/min

검출: UV254nm

온도: 실온

결과를 표 5에 나타낸다.



<표 5>

사용 미생물	TLC 긁어낸 샘플 의 농도(각 mg/L)	5S-MOLE로부터 의 3위 치비대칭 환원 선택율	에난티오머 과잉율 (ee%)
	3s,5r 3r,5r 3r,5s 3s,5s		
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC14067	N.D., 95.7, 54.1, N.D.	100.0%	100.0%
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13826	N.D., 112.1, 22.1, N.D.	100.0%	100.0%
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> JCM1305	N.D., 119.9, 72.8, N.D.	100.0%	100.0%
<i>Corynebacterium glutamicum</i> JCM1307	N.D., 107.7, 71.7, N.D.	100.0%	100.0%
<i>Brevibacterium saccharolyticum</i> ATCC14066	N.D., 105.2, 78.5, N.D.	100.0%	100.0%
<i>Corynebacterium acetoacidophilum</i> ATCC13870	0.5, 73.8, 42.8, N.D.	100.0%	97.7%
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	N.D., 75.9, 56.3, N.D.	100.0%	100.0%
<i>Corynebacterium vitaeruminis</i> JCM1323	0.4, 140.4, 32.0, N.D.	100.0%	99.4%

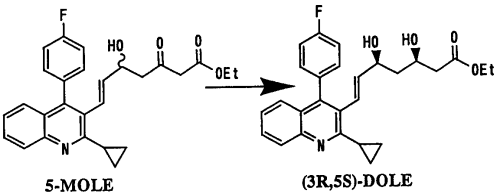
실시예 9

5-MOLE로부터 DOLE의 제조:

실시예 1과 동일한 조성의 액체 배지 2.5mL에, 표 6에 나타낸 각종의 균주를 접종하고, 27℃에서 48시간 호기적으로 배양했다. 얻어진 배양액을 1ml씩 취하여 원심분리하여, 균체를 모았다. 이 균체에 100mM 인산칼륨 완충액(pH7.0) 0.2ml를 가하여 완전히 현탁한 후, 50%(w/v)의 글루코스 용액을 20μl, R-5MOLE와 S-5MOLE가 1:1의 비로 함유하는 5-MOLE의 5g/L DMSO 용액을 50μl 첨가하고, 잘 교반한 후, 27℃에서 20시간 반응시켰다.

반응 종료후, 실시예 8과 동일하게 초산에틸 추출 및 TLC를 행한 후, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 광학 순도 및 생성량의 분석을 행했다.

결과를 표 6에 나타낸다.



<341> <표 6>

사용 미생물	TLC 클어낸 샘플 의 농도(각 mg/L) 3s,5r 3r,5r 3r,5s 3s,5s	5S-MOLE로부터의 3위치 비대칭 환원 선택율	에난티오머 과잉율 (ee%)
<i>Candida intermedia</i> IFO0761	N.D., 137.8, 50.4, N.D.	100.0%	100.0%
<i>Citeromyces</i> <i>matritensis</i> IFO0954	N.D., 4.7, 9.9, N.D	100.0%	100.0%
<i>Rhodotorula</i> <i>aurantiaca</i> IFO0754	N.D., 137.8, 50.4, N.D.	100.0%	100.0%
<i>Saitoella</i> <i>complicata</i> IAM12963	0.1, 3.7, 23.2, N.D.	100.0%	99.1%
<i>Metschnikowia</i> <i>pulcherrima</i> IFO0863	1.4, 47.9, 100.6, N.D.	100.0%	97.3%
<i>Metschnikowia</i> <i>pulcherrima</i> IFO10796	2.2, 61.7, 92.3, N.D.	100.0%	95.3%
<i>Wickerhamiella</i> <i>domercqii</i> IFO1857	1.2, 83.7, 47.6, N.D.	100.0%	95.1%
<i>Metschnikowia</i> <i>reukaufii</i> IFO10798	N.D., 43.9, 79.1, 0.2	99.5%	100.0%
<i>Saccharomycopsis</i> <i>fibuligera</i> IFO0105	2.0, 86.9, 89.1, 0.3	99.3%	95.6%
<i>Ogataea glucozyma</i> IFO1472	0.5, 169.6, 221.1, 1.4	98.7%	99.5%
<i>Metschnikowia</i> <i>Pulcherrima</i> IFO1407	N.D., 37.4, 75.3, 0.5	98.7%	100.0%
<i>Ogataea minuta</i> var <i>nonfermentans</i> IFO1473	N.D., 80.1, 80.9, 0.7	98.3%	100.0%
<i>Rhodotorula glutinis</i> var <i>dairenensis</i> IFO0415	0.3, 157.3, 50.7, 2.0	92.4%	98.8%
<i>Pichia petersonii</i> IFO1372	N.D., 8.9, 16.4, 4.8	54.7%	100.0%

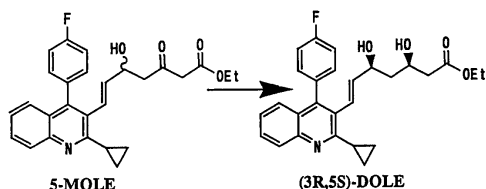
<342>

<343> 실시예 10

<344> 5-MOLE로부터 DOLE의 제조:

<345> 효모 엑기스(Difco 사제) 10g/L, 뉴트리엔트브로스(Nutrient Broth)(Difco 사제) 5g/L, 대두 엑기스 HINUTE SMS(fuji Oil Co., Ltd 제) 3g/L, 글루코스(Nihon Shokuhinkako Co 사제) 15g/L의 조성으로 되는 액체 배지 2mL에, 표 7에 나타난 각종의 균주를 접종하고, 30℃에서 24시간 호기적으로 배양했다. 얻어진 배양액을 1ml씩 취하여 원심 분리하여, 균체를 모았다. 이 균체에 반응 기질로서 DOXE 대신에 R-5MOLE와 S-5MOLE가 1:1의 비로 함유하는 5-MOLE를 사용한 것 이외는 실시예 1과 같은 조작으로 반응을 행했다.

<346> 반응 종료 후, 실시예 1과 동일하게 초산에틸 추출 및 TLC를 행한 후, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 광학 순도 및 생성량의 분석을 행했다. 결과를 표 7에 나타낸다.



<347>

<표 7>

사용 미생물	TLC 긁어낸 샘플 의 농도(각 mg/L)				5S-MOLE로부터 의 3위치비대칭 환원 선택율	에난티오머 과잉율 (ee%)
	3s,5r	3r,5r	3r,5s	3s,5s		
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IFO12552	3.0	6.6	63.8	26.6	41.2%	91.0%
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ATCC12813	0.3	30.3	60.5	8.8	74.6%	99.0%
<i>Cellulomonas flavigena</i> JCM1489	0.2	46.2	43.2	10.4	61.2%	99.1%
<i>Cellulomonas gelida</i> JCM1490	0.2	51.1	38.2	10.5	56.9%	99.0%
<i>Cellulomonas uda</i> JCM1492	1.0	37.1	53.1	8.8	71.6%	96.3%

실시예 11

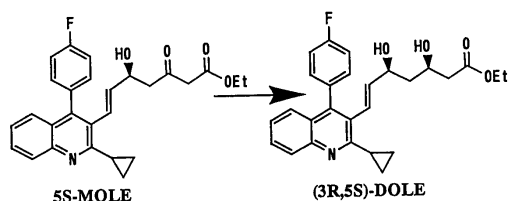
5S-MOLE로부터 DOLE의 제조:

표 8에 나타난 각종의 균주를 실시예 1과 동일하게 배양을 행하여, 얻어진 배양액을 1ml씩 취하여 원심 분리하여, 균체를 모았다. 이 균체에 글루코스(Nihon Shokuhinkako Co 사제)를 5g/L, NADP(Oriental Yeast Co., Ltd 제)를 60 μ g/L, 글루코스테하이드로게나제(Amano Pharmaceutical Co., Ltd제: 73unit/mg)를 20 μ g/L 함유하는 100mM 인산나트륨 완충액(pH6.5)를 0.25ml첨가하여, 잘 현탁하였다.

이 현탁액에 제조예 2에서 얻어진 광학 순도가 73.0%ee의 5S-MOLE를 10g/L 함유하는 DMSO를 10 μ l첨가하고, 30℃에서 20시간 호기적으로 반응시켰다.

반응 종료후, 실시예 1과 동일하게 초산에틸 추출 및 TLC를 행한 후, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 광학 순도 및 생성량의 분석을 행했다.

결과를 표 8에 나타낸다.



<357> <표 8>

사용 미생물	TLC 규어낸 샘플의 농도 (디아스테레오머 과잉율, 에난티오머 과잉율)	5S-MOLE로부터의 3위치 비대칭화율 선택율
<i>Saitoella complicate</i> IAM12963	13.28mg/L (96.1% de, 96.6% ee)	100.0%
<i>Candida solani</i> IFO0762	18.00mg/L (94.7% de, 93.3% ee)	100.0%
<i>Metschnikowia</i> <i>pulcherrima</i> IAM12197	38.53mg/L (90.5% de, 97.8% ee)	100.0%
<i>Shizosaccharomyces pombe</i> IFO0344	26.93mg/L (88.3% de, 93.3% ee)	96.6%
<i>Metschnikowia</i> <i>pulcherrima</i> IFO10796	12.62mg/L (87.6% de, 97.2% ee)	100.0%
<i>Ogataea glucozyma</i> IFO1472	87.69mg/L (84.7% de, 98.4% ee)	100.0%
<i>Ogataea minuta var</i> <i>nonfermentans</i> IFO1473	77.02mg/L (79.4% de, 98.2% ee)	100.0%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO0565	1.67mg/L (81.8% de, 78.4% ee)	100.0%
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JCM1818	1.87mg/L (77.0% de, 70.4% ee)	100.0%
<i>Metschnikowia</i> <i>bicuspidate</i> IFO1408	11.76mg/L (74.5% de, 94.3% ee)	100.0%
<i>Shizosaccharomyces pombe</i> IFO1628	12.32mg/L (74.1% de, 96.4% ee)	96.4%
<i>Candida molischiana</i> IFO10296	36.72mg/L (73.3% de, 94.7% ee)	93.4%
<i>Rhodospiridium</i> <i>toruloides</i> IFO0559	20.27mg/L (67.7% de, 95.7% ee)	100.0%
<i>Candida famata var</i> <i>Famata</i> IFO0856	114.54mg/L (64.0% de, 98.2% ee)	93.0%
<i>Filobasidium</i> <i>capsuligenum</i> IFO1185	116.20mg/L (61.2% de, 98.6% ee)	94.4%
<i>Citeromyces matritensis</i> IFO0954	6.02mg/L (59.0% de, 82.0% ee)	82.6%
<i>Cryptococcus humicola</i> IFO10250	5.02mg/L (58.9% de, 97.8% ee)	100.0%
<i>Yarrowia lipolytica</i> IFO1209	0.90mg/L (50.9% de, 56.6% ee)	100.0%
<i>Candida intermedia</i> IFO0761	84.19mg/L (49.4% de, 98.4% ee)	89.7%
<i>Trigonopsis variabilis</i> CBS1040	7.89mg/L (23.9% de, 91.9% ee)	84.6%

<358>

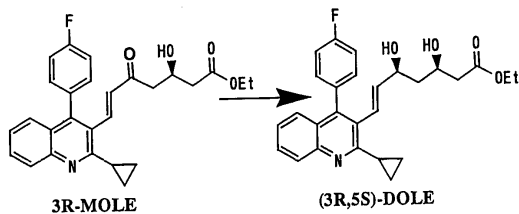
<359> 실시예 12

<360> 3R-MOLE로부터 DOLE의 제조:

<361> 실시예 1과 동일한 조성의 액체 배지 2.5mL에, 표 9에 나타난 각종의 균주를 접종하고, 27℃에서 48시간 호기적으로 배양했다. 얻어진 배양액을 1mL씩 취하여 원심분리하여, 균체를 모았다. 이 균체에 100mM 인산나트륨 완충액(pH7.0) 0.2mL를 가하여 완전히 현탁한 후, 2g/L의 NADP(Oriental Yeast Co., Ltd 제)와 NAD(Oriental Yeast Co., Ltd 제)의 혼합액을 10μL, 25unit/mL의 글루코스데하이드로게나제(Amano Pharmaceutical Co., Ltd 제)를 10μL, 50%(w/v)의 글루코스 용액을 10μL, 실시예 6에서 얻어진 3R-MOLE의 5g/L DMSO용액을 20μL 첨가하고, 잘 교반한 후, 27℃에서 20시간 반응시켰다.

<362> 반응 종료 후, 실시예 8과 동일하게 초산에틸 추출 및 TLC를 행하고, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 광학 순도 및 생성량의 분석을 행했다.

결과를 표 9에 나타낸다.



<표 9>

사용 미생물	TLC 클어낸 샘플의 농도(mg/L) (디아스테레오머 과잉율, 에난티오머 과잉율)
<i>Candida famata</i> var <i>famata</i> IFO0856	59.9, (100%de,100%ee)
<i>Filobasidium capsuligenum</i> IFO1185	24.0, (100%de,100%ee)
<i>Pichia anomala</i> IFO0118	1.0, (100%de,100%ee)
<i>Pichia petersonii</i> IFO1372	2.8, (78.6%de,100%ee)
<i>Cryptococcus laurentii</i> var <i>laurentii</i> CBS2174	23.8, (75.6%de,100%ee)
<i>Cryptococcus laurentii</i> var <i>laurentii</i> CBS5746	40.4, (73.3%de,100%ee)
<i>Cryptococcus laurentii</i> var <i>laurentii</i> CBS7140	32.4, (75.3%de,100%ee)
<i>Cryptococcus laurentii</i> var <i>laurentii</i> CBS7235	18.9, (75.7%de,100%ee)
<i>Cryptococcus flavus</i> IFO0407	36.7, (81.5%de,100%ee)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> IFO0003	81.5, (100%de,100%ee)
<i>Rhodotorula glutinis</i> var <i>dairenensis</i> IFO0415	53.3, (83.9%de,100%ee)
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> IFO0754	108.6, (100%de,100%ee)

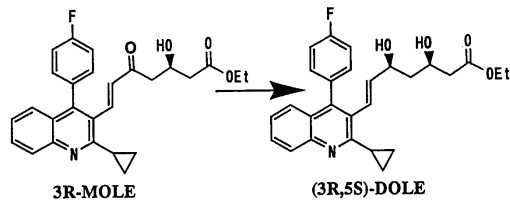
실시예 13

3R-MOLE로부터 DOLE의 제조:

실시예 1과 동일한 조성의 액체 배지 2.5mL에, 표 10에 나타낸 각종의 균주를 접종하고, 27℃에서 48시간 호기적으로 배양했다. 얻어진 배양액을 1ml씩 취하여 원심 분리하여, 균체를 모았다. 이 균체에 100mM 인산나트륨 완충액(pH7.0) 0.2ml를 가하여 완전히 현탁한 후, 2g/L의 NADP(Oriental Yeast Co., Ltd 제)와 NAD(Oriental Yeast Co., Ltd 제) 혼합액을 10 μ l, 이소프로판올을 20 μ l, 실시예 6에서 얻어진 3R-MOLE의 5g/L DMSO 용액을 20 μ l 첨가하고, 잘 교반한 후, 27℃에서 20시간 반응시켰다.

반응 종료 후, 실시예 8과 동일하게 초산에틸 추출 및 TLC를 행하고, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 광학 순도 및 생성량의 분석을 행했다.

결과를 표 10에 나타낸다.



<표 10>

사용 미생물	TLC 긁어낸 샘플의 농도(mg/L) (디아스테레오머 과잉율, 에난티오머 과잉율)
<i>Cryptococcus laurentii</i> var <i>laurentii</i> CBS2174	51.3, (75.8%de, 100%ee)
<i>Cryptococcus laurentii</i> var <i>laurentii</i> CBS5746	29.3, (74.7%de, 98.4%ee)
<i>Cryptococcus laurentii</i> var <i>laurentii</i> CBS7140	79.8, (74.4%de, 100%ee)
<i>Cryptococcus laurentii</i> var <i>laurentii</i> CBS7235	88.4, (73.5%de, 99.2%ee)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> IFO0003	97.3, (100%de, 100%ee)
<i>Rhodotorula glutinis</i> var <i>dairiensis</i> IFO0415	101.6, (83.9%de, 100%ee)
<i>Rhodotorula aurantiaca</i> IFO0754	91.6, (100%de, 100%ee)

실시예 14

DOXE로부터 DOLE의 제조:

실시예 1과 동일한 조성의 액체 배지 2.5mL에, 로도토룰라 글루티니스 변종 다이레넨시스(*Rhodotorula glutinis* var *dairiensis*) IFO 0415를 접종하고, 27℃에서 48시간 호기적으로 배양했다. 얻어진 배양액 1ml를 원심 분리하여, 균체를 모았다.

또한, 실시예 8과 동일한 조성의 액체 배지 2.5mL에, 코리네박테륨 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13826를 접종하고, 30℃에서 24시간 호기적으로 배양했다. 얻어진 배양액 1ml를 원심 분리하여, 균체를 모았다.

양자를 합치고, 100mM 인산칼륨 완충액(pH7.0) 0.2ml를 가하여 완전히 현탁한 후, 2g/L의 NADP(Oriental Yeast Co., Ltd 제)와 NAD(Oriental Yeast Co., Ltd 제) 혼합액을 10μl, 50%(w/v)의 글루코스 용액을 10μl, 20g/L의 DOXE(DMSO 용액)를 30μl 첨가하고, 잘 교반한 후, 27℃에서 18시간 반응시켰다.

반응 종료 후, 실시예 1과 동일하게 초산에틸 추출 및 TLC를 행한 후, 실시예 8과 동일한 조건으로, 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 광학 순도 및 생성량의 분석을 행한 결과, 본 반응에서는 3R,5S-DOLE만이 얻어졌으며, TLC 긁어낸 샘플의 농도는 9.5mg/L이었다.

실시예 15

DOXE로부터 DCOOH의 제조:

표 11에 나타낸 각종의 균주를 실시예 1과 동일하게 배양과 반응을 행하였다. TLC 상의 화합물(IV)(식 중, R=수소의 화합물:이하, DCOOH라 약칭함)에 상당하는 스폿(전개 용매; 헥산:초산에틸=1:1, Rf=0)을 긁어내서, 이소프로판올 0.25mL로 용출하였다. 원심 분리 후, 상청을 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 분석했다.

HPLC의 조건은 이하와 같다.

컬럼: CHIRALCEL AD(Daice Chemical Industry, Ltd제)

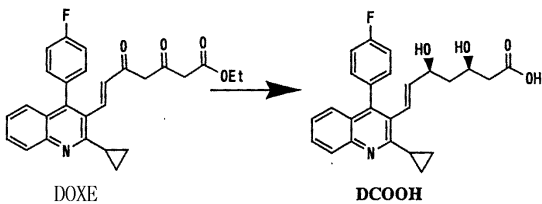
용리액: 헥산/에탄올/트리플루오로 초산=900/100/1

유속: 1ml/min

검출: UV254nm

온도: 실온

결과를 표 11에 나타낸다.



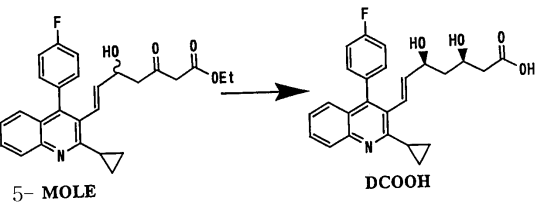
<표 11>

사용 미생물	TLC 긁어낸 샘플의 농도(mg/L) (디아스테레오머 과잉율, 에난티오머 과잉율)
<i>Candida famata</i> RIFY7455	1.3, (94.0% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Candida parapsilosis</i> CBS604	0.3, (100.0% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Candida albicans</i> IFO1594	0.7, (81.8% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Candida tropicalis</i> IFO0618	1.1, (89.6% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Candida tropicalis</i> IFO1404	0.6, 100.0% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Filobasidium capsuligenum</i> IFO1185	3.8, (94.7% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Yarrowia lipolytica</i> IFO1209	0.7, (92.5% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Trigonopsis variabilis</i> CBS1040	0.9, (79.2% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Cryptococcus curvatus</i> IFO1159	14.5, (87.3% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Cryptococcus humicolus</i> IFO10250	2.1, (100.0% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)

실시예 16

5-MOLE로부터 DCOOH의 제조:

표 12에 나타난 각종의 균주를 실시예 1과 동일하게 배양을 행하고, DOXE 대신에 5-MOLE를 사용하여 동일하게 반응을 행하였다. 그 후, TLC 상의 화합물(IV)(식 중, R=수소의 화합물: 이하, DCOOH라 약칭함)에 상당하는 스폿(전개 용매; 헥산:초산에틸=1:1, R_f=0)을 긁어내서, 이소프로판올 0.25mL로 용출하였다. 원심 분리 후, 상청을 실시예 15와 같은 조건으로 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 광학 순도를 분석했다. 결과를 표 12에 나타낸다.



<표 12>

사용 미생물	TLC 긁어낸 샘플의 농도(mg/L) (디아스테레오머 과잉율, 에난티오머 과잉율)
<i>Candida rugosa</i> IFO0591	0.5, (85.6% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Candida molischiana</i> IFO10296	1.8, (71.9% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Candida parapsilosis</i> CBS604	2.8, (71.8% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Cryptococcus laurentii</i> IFO0609	0.1, (100.0% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Exophiala dermatitidis</i> IFO6421	9.9, (71.4% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Exophiala dermatitidis</i> IFO8193	5.2, (73.1% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)
<i>Trigonopsis variabilis</i> IFO0671	0.5, (89.9% <i>d.e.</i> , 100.0% <i>e.e.</i>)

산업상 이용 가능성

<400>

본 발명에 의하면, 3R,5S-(E)-7-[2-시클로프로필-4-(4-플루오로페닐)-퀴노린-3-일]-3,5-디하이드록시헵트-6-엔 산 에스테르류를 광학 순도 좋게, 또한, 효율적으로 제조할 수 있다.