

(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2005-506091

(P2005-506091A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.Cl.⁷

C12P 7/62
C12P 17/00
// C07D 339/04
(C12P 7/62
C12R 1:01)

F 1

C12P 7/62
C12P 17/00
C07D 339/04
C12P 7/62
C12R 1:01

テーマコード(参考)

4B064
4C023

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-538385 (P2003-538385)
(86) (22) 出願日 平成14年10月14日 (2002.10.14)
(85) 翻訳文提出日 平成16年4月23日 (2004.4.23)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2002/011470
(87) 國際公開番号 WO2003/035885
(87) 國際公開日 平成15年5月1日 (2003.5.1)
(31) 優先権主張番号 101 52 113.8
(32) 優先日 平成13年10月23日 (2001.10.23)
(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(71) 出願人 302028960
ヴィアトリス ゲゼルシャフト ミット
ペシュレンクテル ハフツング ウント
コンパニー コマンディートゲゼルシャフ
ト
VIA TRIS GmbH & Co. K
G
ドイツ連邦共和国 フランクフルト アム
マイン ヴァイスミューラーシュトラー
セ 45
(74) 代理人 100061815
弁理士 矢野 敏雄
(74) 代理人 100094798
弁理士 山崎 利臣

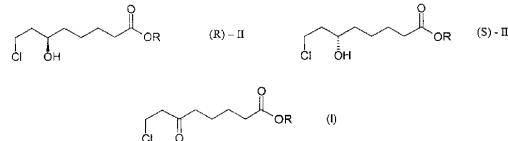
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】酵素的還元による (R) - および (S) - 8 - クロロ - 6 - ヒドロキシ - オクタン酸アルキルエス

ステルの製造方法

(57) 【要約】

本発明は、一般式 (R) - I I または (S) - I I の (R) - または (S) - 8 - クロロ - 6 - ヒドロキシ - オクタン酸アルキルエス [式中、RはC₁ ~ C₄ - アルキルを表す] を、補因子再生系の存在下にアルコールデヒドロゲナーゼ、たとえばラクトバチラス - ブレビスまたはテルモアナロビウム - プロキイによる酵素的還元によって、一般式 (I) の 8 - クロロ - 6 - オキソ - オクタン酸アルキルエス [式中、Rは上記のものを表す] から製造する方法に関する。得られる (R) - または (S) - 8 - クロロ - 6 - ヒドロキシ - オクタン酸エスは公知の方法で (R) - - リポ酸または (S) - - リポ酸へと反応させることができる。

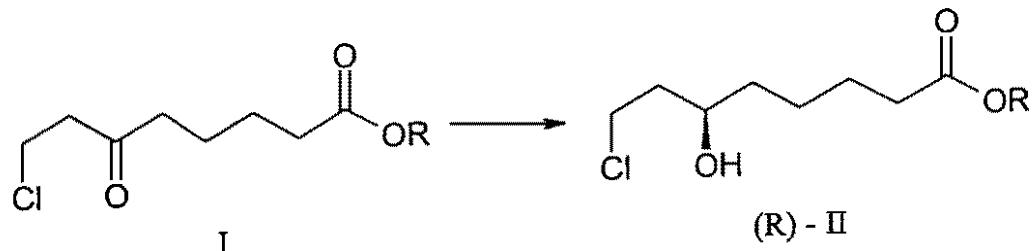


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (R) - II

【化 1】

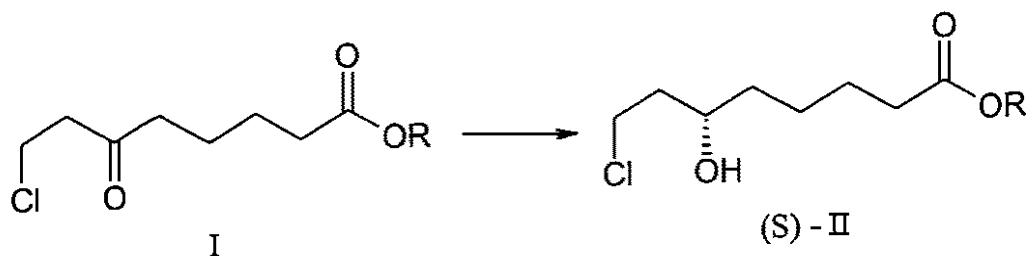


[式中、RはそれぞれC₁～C₄-アルキルを表す]の(R)-8-クロロ-6-ヒドロキシ-オクタン酸アルキルエステルの製造方法において、式Iの8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸アルキルエステルを補因子の存在下にアルコールデヒドロゲナーゼまたはカルボニルレダクターゼを用いて酵素的に還元することを特徴とする、式(R)-IIの(R)-8-クロロ-6-ヒドロキシ-オクタン酸アルキルエステルの製造方法。

【請求項 2】

式 (S) - II

【化 2】



[式中、RはそれぞれC₁～C₄-アルキルを表す]の(S)-8-クロロ-6-ヒドロキシ-オクタン酸アルキルエステルの製造方法において、式Iの8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸アルキルエステルを補因子の存在下にアルコールデヒドロゲナーゼまたはカルボニルレダクターゼを用いて酵素的に還元することを特徴とする、式(S)-IIの(S)-8-クロロ-6-ヒドロキシ-オクタン酸アルキルエステルの製造方法。

【請求項 3】

テルモアナエロビウム-ブロキイからのアルコールデヒドロゲナーゼを使用する、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

ラクトバチラス-ブレビスからのアルコールデヒドロゲナーゼを使用する、請求項2記載の方法。

【請求項 5】

還元の平衡を推移させる補因子再生系を酵素的に加える、請求項1から4までのいずれか1項記載の方法。

【請求項 6】

(R)-または(S)-リポ酸の製造方法において、請求項1から5までのいずれか1項記載の方法により得られる(R)-または(S)-8-クロロ-6-ヒドロキシ-オクタン酸アルキルエステルを自体公知の方法により反応させることを特徴とする、(R)-または(S)-リポ酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

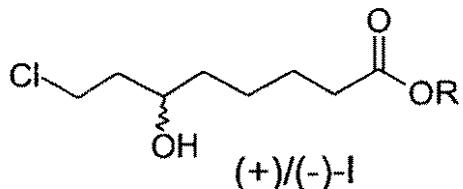
40

50

本発明は、適切なプロキラルなケト化合物を酵素的に還元することにより、式 I

【0002】

【化1】



R = アルキル

10

の(R)-および(S)-8-クロロ-6-ヒドロキシ-オクタン酸アルキルエステルを製造する方法に関する。

【0003】

工業的な規模での-リポ酸の合成は、8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸アルキルエステルから出発し、該エステルをNaBH₄-還元により8-クロロ-6-ヒドロキシ-オクタン酸アルキルエステルに変換して行われる(文献: KleemannおよびEngel, Pharmaceutical Substances, 第3版, Thieme, 1999年, 第1860頁)。連続する3段階の合成順序によりラセミ体の-リポ酸が高い全収率で得られる。ラセミ体の-リポ酸の合成以外に、適切な製薬学的使用のために純粋なエナンチオマーの合成もまた極めて重要である(たとえばEP0427247を参照のこと)。純粋なエナンチオマーの合成は、ラセミ体作用物質の確立された経済的な合成方法と同様に実施することが考えられる。相応してエナンチオマー純粋な中間体を製造するための種々の方法が開発されたが、特にDE-A19533882を参照のこと。プロキラルなケトン化合物の、キラルな第二アルコールへのエナンチオ選択性還元はDE-A-19709069に記載されており、該第二アルコールは中間体として代替的な合成経路でエナンチオマー純粋な-リポ酸を生じる。全ての方法において連続する多段階の合成順序が存在し、これらは部分的に高価な精製工程と結びついているか、またはラセミ体分割(DE4137773)に基づいており、このことにより、ラセミ化または転化により返送することなくエナンチオマーの最大の収率は50%である。これらの方法の低い全収率により、これらの方法は経済的に引き合わないように思われる。記載されている方法のいずれも、ラセミ体の-リポ酸を合成するための確立された経済的な方法のエナンチオマー純粋な中間体の直接的な1段階の製造に基づいていない。

20

30

【0004】

従って本発明の課題は、(R)-および(S)--リポ酸を製造するための特定の中間生成物および(R)-および(S)--リポ酸自体を製造するための方法であり、これらの化合物ならびに中間生成物の製造を高い収率および高いエナンチオマー純度で可能にする方法を提供することである。

【0005】

これらの課題は、アルコールデヒドロゲナーゼまたはカルボニルレダクターゼを用いて8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸アルキルエステルを酵素により還元することにより解決される。この反応の場合、特許請求の範囲に記載した式(R)-IIまたは(S)-IIの(R)-または(S)-8-クロロ-6-ヒドロキシ-オクタン酸アルキルエステルが得られる。

40

【0006】

本発明は、公知のアルコールデヒドロゲナーゼまたはカルボニルレダクターゼを用いて、使用される出発エステルを容易な方法で、および極めて効果的に還元することができるという認識に由来する。

【0007】

文献には、キラルな化合物を合成するためにデヒドロゲナーゼが適切であり得るという明

50

確な示唆が見られる（特にKraglおよびKula、*Stereoselective Biotransformations*、R. Patel、Marcel Dekker編、2000年、第839～866頁を参照のこと）。しかしこれらの、および類似の文献箇所の一般的な記載は、複合体出発化合物に転用することができない。当業者はこの場合、一般に副反応ならびにエナンチオ選択性の低下を懸念する。たとえば文献ではクロロエチルケトンの生物触媒による還元に関する例が1つ見られるにすぎない（Mele等、J. Org. Chem. 1991, 56, 6019）。この場合、全細胞生体内変化（サッカロミセス・セレビジエ）によりクロロエチル・アリール・ケトンをキラルな第二アルコールへと還元する。還元は高化学選択性にも、高エナンチオ選択性にも進行しない。生物触媒は式Iの化合物の場合と同様に第二のかさ高い置換基を有しており、該触媒によるクロロエチルケトンの還元の場合、置換基の高い空間的要件に基づいて、特定の生物触媒がこのような化合物を基質として受け入れるかどうかを予測することは不可能である。

10

20

【0008】

J. Org. Chem. 66, 8682-84(2001)から、相応するケトンから精製されたカルボニルレダクターゼおよび完全な細胞を用いて還元することにより8-クロロ-3-ヒドロキシ-オクタン酸アルキルエステルが得られることが明らかである。EP 0939132 A1は、4-ハロゲン-3-ケト酪酸エステルの酵素的還元を開示している。J. Org. Chem. 63, 1102-08(1998)には、3-クロロ-4-ケト-オクタン酸エチルエステルの還元が記載されている。EP 0487986 A2からは、リポ酸を製造するためにパン酵母を用いた還元により(3S)-3-ヒドロキシオクタン二酸ジエ斯特ルが得られることが公知である。

20

【0009】

意外なことに、種々のアルコールデヒドロゲナーゼおよびカルボニルレダクターゼは基質として式Iの化合物に関して高い受容性を有し（分析アッセイ）、これはプレパラティブ反応においても確認することができた。

【0010】

本発明は請求項1およびその他の従属請求項により詳しく記載されている。本発明による反応の場合、一般に公知の補因子、たとえばNAD(H)、NADP(H)、FADH₂を使用する。有利にはNAD(H)またはNADP(H)を使用する。

30

【0011】

得られる8-クロロ-6-ヒドロキシ-オクタン酸アルキルエステルの立体配置は使用される酵素により決定される。従って8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸アルキルエステルをテルモアナエロビウム・プロキイからのアルコールデヒドロゲナーゼにより還元することによってエナンチオマー純粋な(R)-8-クロロ-6-ヒドロキシ-オクタン酸アルキルエステルが得られる。ラクトバチラス・ブレビスのアルコールデヒドロゲナーゼによる還元の場合、エナンチオ選択性に(S)-8-クロロ-6-ヒドロキシオクタン酸アルキルエステル(ee > 65%)が形成される。基質としての式Iの化合物により活性を示す酵素を以下の表に記載する。

30

【0012】

酵素は市販されている。

40

【0013】

中間生成物、プロキラルな8-クロロ-6-オキソ-オクタン酸アルキルエステルを製造するための出発化合物は公知の方法で得られる（L. J. Reed等、J. Am. Chem. Soc. 1955, 774, 416）。

40

【0014】

Y-ADH 酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ

HL-ADH ウマ肝臓-ADH

READH ロドコッカス・エリスポリス-ADH

CPCR カンジダ・パラシローシス・カルボニルレダクターゼ

CBADH カンジダ・ボイジニイ-ADH

LKADH ラクトバチラス・ケフィア-ADH

50

L B A D H ラクトバチラス - ブレビス - A D H
 T B A D H テルモアナエロビウム - プロキイ - A D H
 T E A トリエタノールアミン
 T r i s トリスヒドロキシメチルアミノメタン
 K p i 1カリウムリン酸塩および2カリウムリン酸塩の混合物
 D T T ジチオトレイトイール

【0015】

【表1】

酵素	補因子	緩衝液	補助基質 / 補酵素	活性 / (反応率)	標準液
Y-ADH	NAD(H)	100 mM TEA, pH 7.0		20%	2-ブタノン
HL-ADH	NAD(H)	100 mM TEA, 1 mM MgCl ₂ , pH 7.0		< 1%	アセト酢酸 メチルエステル
READH	NAD(H)	100 mM グリシル -グリシン, pH 6.5		2%	アセト酢酸 メチルエステル
CBADH	NAD(H)	50 mM Kpi, pH 6.5	(30°C)	60%	アセトン
CPCR	NAD(H)	100 mM TEA, pH 7.8	(HCO ₂ Na, FDH)	60%	アセト酢酸 メチルエステル
LKADH	NADP(H)	50 mM Kpi, 0.1 mM MgCl ₂ , pH 7.0	イソ-プロパ ノール 200 mM	10% (36%)	アセトフェノン
LBADH	NADP(H)	50 mM Kpi, 1 mM MgCl ₂ , pH 6.5	イソ-プロパ ノール 200 mM	6% (> 25%)	アセト酢酸 メチルエステル
TBADH	NADP(H)	50mM Tris, 1mM DTT, pH 7.8	HCO ₂ Na, FDH (37°C)	6% (> 85%)	2-ブタノン

【0016】

プレパラティブ反応のために補因子再生系を酵素の生体内変化に取り入れることは有利であることが判明した。主反応の平衡をシフトさせる補因子再生系が特に有利であることが判明した。従ってたとえばラクトバチラス - ブレビスのアルコールデヒドロゲナーゼによる還元の場合、有利には基質結合補因子再生を過剰の第二アルコール（たとえば2-ブロパノール）の存在下に行うことができる。あるいは、NAD(P)をNAD(P)Hへと還元するために利用することができる酵素結合補因子再生系（たとえばホルメートデヒド

10

20

30

40

50

ロゲナーゼ (F D H) / ホルメート) を使用することができる。補助基質であるナトリウムホルメートの酸化から生じる CO_2 は気体として漏出し、ひいては平衡から除去される。N A D 依存型およびN A D P 依存型のホルメートデヒドロゲナーゼが文献に記載されており、かつ市販されている。

【 0 0 1 7 】

式 I の 8 - クロロ - 6 - ヒドロキシ - オクタン酸アルキルエステルの光学異性体の絶対的な立体配置は、特異的な旋光性の記号を文献データ (Gewald 等、D E 1 9 5 3 3 8 8 1) と比較することにより決定した。さらに式 I の 8 - クロロ - 6 - ヒドロキシ - オクタン酸アルキルエステルの光学異性体の相対的な含有率を、キラルな相を有するカラムを用いて G C により < 0 . 5 % の検出限界で測定した。

10

【 0 0 1 8 】

本発明により、式 I の (R) - および (S) - 8 - クロロ - 6 - ヒドロキシ - オクタン酸アルキルエステルを容易に、かつ経済的な方法で 1 段階の方法において高い化学的および光学的收率 (理論的に化学的および光学的收率 1 0 0 %) で得ることが可能である。

【 0 0 1 9 】

本発明の対象は、(R) - または (S) - - リポ酸を自体公知の方法で製造するための、本発明による方法で得られるエナンチオマー純粋なオクタン酸アルキルエステルの使用でもある。通常、公知の方法ではクロロヒドロキシオクタン酸アルキルエステルを相応するジクロロオクタン酸アルキルエステルへと変換する。公知のリポ酸構造は別の反応工程で硫黄の導入により得られる。

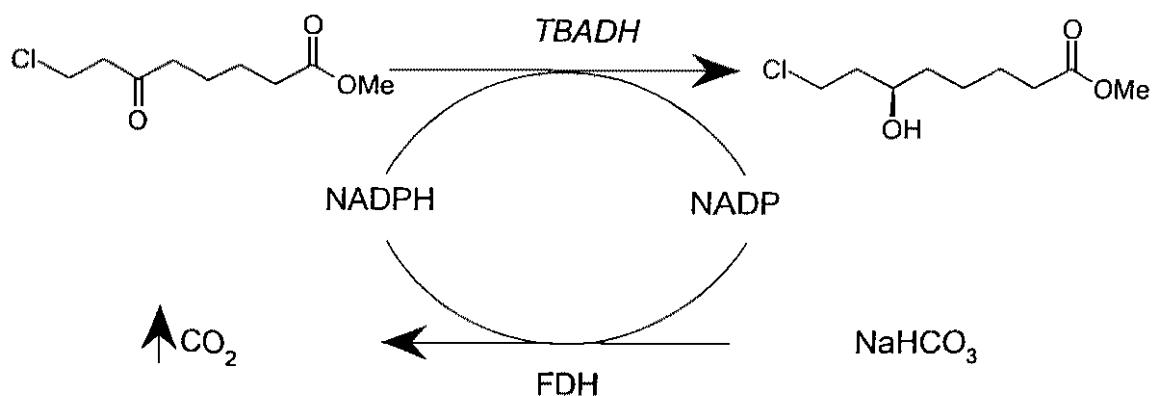
20

【 0 0 2 0 】

本発明に相応する 8 - クロロ - 6 - ヒドロキシ - オクタン酸アルキルエステルのエナンチオ選択性的な製造のための例として、以下の図式においてエナンチオマー純粋な (R) - 8 - クロロ - 6 - ヒドロキシ - オクタン酸メチルエステルの製造を示す。

【 0 0 2 1 】

【 化 2 】



30

【 0 0 2 2 】

同様にして、生物触媒としてたとえばラクトバチラス - ブレビスのアルコールデヒドロゲナーゼを使用することにより (S) - 8 - クロロ - 6 - ヒドロキシ - オクタン酸アルキルエステルが得られる。 (+) - および (-) - 8 - クロロ - 6 - ヒドロキシ - オクタン酸アルキルエステルから出発する (+) - および (-) - - リポ酸の合成は、公知の方法に相応して実施することができる。本発明を以下の実施例により詳細に説明する。

40

【 0 0 2 3 】

例 1

8 - クロロ - 6 - オキソ - オクタン酸メチルエステル (基質) 1 0 0 m g (0 . 5 ミリモル) を、 D T T 0 . 1 m M および N A D P 0 . 5 m M を含有する T R I S - 緩衝液 (p

50

H₇) 50 ml (50 mM) 中に溶解して、そのつど TBA DH および FDH (NAPD 依存性) を 2 U / mg (基質) 添加し、かつ 37 度で攪拌した。標準法による後処理によりエナンチオマー純粋 (ee > 99.5%) な (R)-8-クロロ-6-ヒドロキシオクトタン酸メチルエステル (生成物) が得られた。

【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. Mai 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/035885 A1(51) Internationale Patentklassifikation*: C12P 7/42, 7/62,
C07C 59/115, C12P 1/00, C07D 339/04SAUER, Wolfgang [DE/DE]; Platenstrasse 39, 01129
Dresden (DE); LABAN, Gunter [DE/DE]; Neulussheimer
Strasse 41, 01465 Dresden-Langebrück (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11470

(74) Anwalt: WIBBELMANN, Jobst; Wuesthoff &
Wuesthoff, Schweigerstrasse 2, 81541 München (DE).(22) Internationales Anmeldedatum:
14. Oktober 2002 (14.10.2002)(81) Bestimmungstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EI, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU,
SD, SL, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungstaaten (regional): ARIPO-Patent (GI,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 52 113.8 23. Oktober 2001 (23.10.2001) DE

{Fortsetzung auf der nächsten Seite}

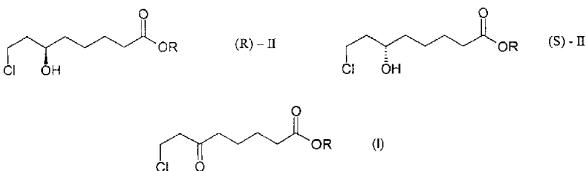
(71) Anmelder (für alle Bestimmungstaaten mit Ausnahme von
US): VIATRIS GMBH & CO. KG [DE/DE]; Weismüller-
strasse 45, 60314 Frankfurt am Main (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Michael
[DE/DE]; Pfarrer-Engelstrasse 9a, 52428 Jülich (DE).

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF (R)- AND (S)-8-CHLORO-6-HYDROXY-OCTANIC ACID ALKYL ESTERS BY ENZYMATIC REDUCTION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON (R)- UND (S)-8-CHLOR-6-HYDROXY-OCTANSÄUREALKYLESTER DURCH ENZYMATISCHE REDUKTION

**WO 03/035885 A1**(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of (R)- or (S)-8-chloro-6-hydroxy-octanic acid alkyl esters of general formula (R)-II or (S)-II, wherein R is C_{1-4} -alkyl, from 8-chloro-6-oxo-octanic acid alkyl esters of general formula (I), wherein R has the meaning cited above, by enzymatic reduction by means of alcohol dehydrogenases, such as *Lactobacillus brevis* or *Thermomoarobium brokii*, in the presence of co-factor regeneration systems. The (R)- or (S)-8-chloro-6-hydroxy-octanic acid esters thus obtained can be reacted in a manner known per se to form (R)- α -lipoic acid or (S)- α -lipoic acid.(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von (R)- bzw. (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylester der allgemeinen Formel (R)-II oder (S)-II, worin R die Bedeutung C_{1-4} -Alkyl hat, aus 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern der allgemeinen Formel (I), worin R die obige Bedeutung hat, durch enzymatische Reduktion mittels Alkoholdehydrogenasen, wie *Lactobacillus brevis* oder *Thermomoarobium brokii*, in Gegenwart von Cofaktorregenerierungssystemen. Die erhaltenen (R)- bzw. (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäureester können in bekannter Weise zu (R)- α -Liponsäure bzw. (S)- α -Liponsäure umgesetzt werden.

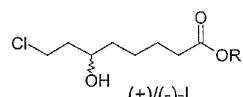
WO 03/035885 A1**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchebericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("*Guidance Notes on Codes and Abbreviations*") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**Verfahren zur Herstellung von (*R*)- und (*S*)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylestern
durch enzymatische Reduktion**

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von (*R*)- und (*S*)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylestern der Formel I durch enzymatische Reduktion einer geeigneten prochiralen Ketoverbindung.



R = Alkyl

10 Die Synthese der α -Liponsäure im technischen Maßstab erfolgt ausgehend von 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylestern, welche durch NaBH₄-Reduktion in 8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylester überführt werden (Lit.: Kleemann und Engel, Pharmaceutical Substances, 3rd Ed., Thieme, 1999, S. 1860). Durch eine nachfolgende dreistufige Synthesesequenz wird die racemische α -Liponsäure in hoher Gesamtausbeute erhalten. Neben der Synthese von racemischer α -Liponsäure ist auch die Synthese der reinen Enantiomere zum gezielten pharmazeutischen Einsatz von großer Wichtigkeit (siehe dazu z.B. EP 04 27 247). Es bietet sich an, die Synthese der reinen Enantiomeren analog dem etablierten wirtschaftlichen Syntheseverfahren des racemischen Wirkstoffes durchzuführen. Entsprechend wurden verschiedene Methoden zur Darstellung der enantiomerenreinen Zwischenstufen entwickelt, siehe unter anderem DE-19533882. Enantioselektive Reduktionen prochiraler Ketonverbindungen zu chiralen sekundären Alkoholen, welche als Zwischenstufen in alternativen Syntheserouten zu enantiomerenreinen α -Liponsäuren führen, finden sich in DE-A-197 09 069. Bei allen Verfahren werden vielstufige Synthesesequenzen durchlaufen, die teilweise mit aufwendigen Reinigungsoperationen verbunden sind oder aber auf Racematspaltung (DE 4137773) basieren, wodurch - ohne Rückführung durch Racemisierung oder Inversion - die maximale Ausbeute eines Enantiomers 50% beträgt. Die niedrige Gesamtausbeute dieser Verfahren lassen diese als wirtschaftlich unrentabel erscheinen. Keines der beschriebenen Verfahren basiert auf einer

- 2 -

direkten, einstufigen Darstellung einer enantiomerenreinen Zwischenstufe des etablierten wirtschaftlichen Verfahrens zur Synthese der racemischen α -Liponsäure.

Die Aufgabe der Erfindung bestand also darin, ein Verfahren zur Herstellung bestimmter Zwischenprodukte zur Herstellung der (R)- und (S)- α -Liponsäure und der (R)- und (S)- α -Liponsäure selber anzugeben, das eine Herstellung dieser Verbindungen sowie der Zwischenprodukte mit hoher Ausbeute und hoher Enantiomerenreinheit möglich macht.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, dass man 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylester enzymatisch mittels Alkoholdehydrogenasen oder Carbonylreduktasen reduziert. Bei dieser Umsetzung erhält man entweder den (R) oder (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylester der im Anspruch angegebenen Formel (R)-II oder (S)-II.

Die Erfindung geht auf die Erkenntnis zurück, dass der eingesetzte Ausgangsester in einfacher Weise und sehr wirkungsvoll mittels bekannter Alkoholdehydrogenasen bzw. Carbonylreduktasen reduziert werden kann.

In der Literatur findet man gewisse Hinweise, dass sich Dehydrogenasen zur Synthese von chiralen Verbindungen eignen könnten (siehe unter anderem Kragl und Kula, in Stereoselective Biotransformations, Herausgeber R. Patel, Marcel Dekker, 2000, Seiten 839-866.) Die allgemeinen Aussagen dieser und ähnlicher Literaturstellen lassen sich aber nicht auf komplexe Ausgangsverbindungen übertragen. Ein Fachmann befürchtet hier regelmäßig Nebenreaktionen sowie eine verminderte Enantioselektivität. So konnte in der Literatur nur ein Beispiel für die biokatalytische Reduktion eines Chlorethylketons gefunden werden (McLe et al., J. Org. Chem. 1991, 56, 6019). Hierbei wird durch Ganzzellbiotransformation (*Saccharomyces cerevisiae*) ein Chlorethyl-aryl-keton zum chiralen sekundären Alkohol reduziert. Die Reduktion verläuft weder hoch chemo- noch hoch enantioselektiv. Bei der Reduktion von Chlorethylketonen mit Biokatalysatoren, die wie im Fall von Verbindungen der Formel I einen zweiten sperrigen Substituenten besitzen, ist aufgrund des hohen Raumspruches der Substituenten eine Vorhersage, ob ein bestimmter Biokatalysator eine solche Verbindung als Substrat akzeptiert, nicht möglich.

Aus J. Org. Chem. 66, 8682-84 (2001) geht hervor, dass man ein 8-Chlor-3-hydroxy-octansäurealkylester durch Reduktion aus dem entsprechenden Keton mit gereinigter Carbonylreduktase und ganzen Zellen erhalten kann. Die EP 0 939 132 A1 offenbart eine enzymatische Reduktion von 4-Halogen-3-ketobuttersäureestern. In J. Org. Chem. 63, 1102-08 (1998) wird die Reduktion von 3-Chlor-4-keto-octansäureethylestern beschrieben. Aus EP 0 487 986

A2 ist bekannt (3S)-3-Hydroxyoctandisäurediester zur Herstellung von Liponsäure durch Reduktion mit Bäckerhefe zu erhalten.

Überraschenderweise zeigen verschiedene Alkoholdehydrogenasen und Carbonylreduktasen eine hohe Akzeptanz bezüglich der Verbindungen der Formel I als Substrat (analytischer Assay), welche auch in präparativen Umsetzungen bestätigt werden konnte.

Die Erfindung wird in Anspruch 1 und weiteren abhängigen Ansprüchen genauer angegeben. Bei der erfundungsgemäßen Umsetzung kommen allgemein bekannte Cofaktoren zum Einsatz, wie beispielsweise NAD(H), NADP(H), FADH₂. Vorzugsweise verwendet man NAD(H) oder NADP(H).

Die Konfiguration der erhaltenen 8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylester wird von dem eingesetzten Enzym bestimmt. So werden durch Reduktion von 8-Chlor-6-oxo-octansäure-alkylestern mittels Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium brokii* enantiomerenreine (*R*)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylester erhalten. Im Falle der Reduktion mittels *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase wird enantioselektiv (*S*)-8-Chlor-6-hydroxyoctansäure-alkylester (ee > 65%) gebildet. Enzyme, welche eine Aktivität mit den Verbindungen der Formel I als Substrat zeigen, sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Die Enzyme sind kommerziell erhältlich.

Die Ausgangsverbindungen zur Herstellung der Zwischenprodukte, die prochiralen-8-chlor-6-oxo-octansäurealkylester können auf bekanntem Wege gewonnen werden (L.J.Reed et al., J. Am. Chem. Soc. 1955, 774, 416).

Y-ADH	Hefe-Alkoholdehydrogenase
HL-ADH	Pferdeleber-ADH
R/EADH	<i>Rhodococcus erythropolis</i> -ADH
CPCR	<i>Candida parapsilosis</i> -Carbonylreduktase
CBADH	<i>Candida boidinii</i> -ADH
LKADH	<i>Lactobacillus kefir</i> -ADH
LBADH	<i>Lactobacillus brevis</i> -ADH
TBADH	<i>Thermoanaerobium brokii</i> -ADH
TEA	Triethanolamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

- 4 -

Kpi Gemisch Monokalium- und Dikaliumphosphat
 DTT Dithiothreitol

Enzym	Cofaktor	Puffer	Cosubstrat/ Coenzym	Aktivität/ (Umsatz)	Standard
Y-ADH	NAD(H)	100 mM TEA, pH 7.0		20%	2-Butanon
HL-ADH	NAD(H)	100 mM TEA, 1 mM MgCl ₂ , pH 7.0		< 1%	Acetessigsäure- methylester
READH	NAD(H)	100 mM Glycyl -glycin, pH 6.5		2%	Acetessigsäure- methylester
CBADH	NAD(H)	50 mM Kpi, pH 6.5	(30°C)	60%	Aceton
CPCR	NAD(H)	100 mM TEA, pH 7.8	(HCO ₂ Na, FDH)	60%	Acetessigsäure- methylester
LKADH	NADP(H)	50 mM Kpi, 0.1 mM MgCl ₂ , pH 7.0	iso-Propanol 200 mM	10% (36%)	Acetophenon
LBADH	NADP(H)	50 mM Kpi, 1 mM MgCl ₂ , pH 6.5	iso-Propanol 200 mM	6% (> 25%)	Acetessigsäure- methylester
TBADH	NADP(H)	50mM Tris, 1mM DTT, pH 7.8	HCO ₂ Na, FDH (37°C)	6% (> 85%)	2-Butanon

5

Für präparative Umsetzungen erweist es sich als vorteilhaft ein Cofaktorregenerierungssystem in die enzymatische Biotransformation einzubeziehen. Als besonders vorteilhaft erweisen sich Cofaktorregenerierungssysteme, welche eine Gleichgewichtsverschiebung der Hauptreaktion bewirken. So kann beispielsweise im Fall von Reduktionen mit *Lactobacillus brevis* Alkohol-dehydrogenase vorteilhaft eine substratgekoppelte Cofaktorregenerierung in Gegenwart eines Überschusses eines sekundären Alkohols (z.B. 2-Propanol) erfolgen. Alternativ können

10

- 5 -

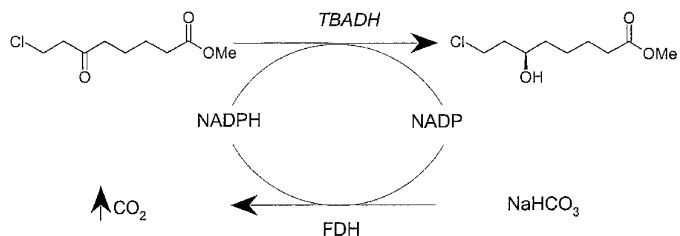
enzymgekoppelte Cofaktorregenerierungssysteme (z.B. Formiatdehydrogenase (FDH)/Formiat) eingesetzt werden, die dazu genutzt werden können, NAD(P) zu NAD(P)H zu reduzieren. Das entstehende CO₂ aus der Oxidation des Cosubstrates Natrium-Formiat entweicht als Gas und wird so dem Gleichgewicht entzogen. Es sind sowohl NAD- als auch 5 NADP-abhängige Formiatdehydrogenasen in der Literatur beschrieben und kommerziell erhältlich.

Die absolute Konfiguration der optischen Isomere der 8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylester der Formel I wurde mittels Vergleich der Vorzeichen der spezifischen optischen Drehwerte mit Literaturdaten (Gewald et al. , DE 195 33 881) bestimmt. Weiterhin wurden die relativen Gehalte der optischen Isomere der 8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylester der Formel I durch 10 GC an Säulen mit chiraler Phase mit einer Nachweisgrenze von < 0.5% ermittelt.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, die (R)- und (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäure-alkylester der Formel I auf einfache und wirtschaftliche Weise in hoher chemischer und optischer Ausbeute (theoretisch 100% chemische und optische Ausbeute) in einem einstufigen 15 Verfahren zugänglich zu machen.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der in dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen enantiomerenreinen Octansäurealkylester zur Herstellung von (R)- oder (S)- α -Liponsäure in an sich bekannter Weise. Üblicherweise werden in den bekannten Verfahren die Chlorhydroxyoctansäurealkylester in die korrespondierenden Dichloroctansäurealkylester 20 umgewandelt. Die bekannte Liponsäurestruktur erhält man dann in einem weiteren Reaktionsschritt durch Schwefeleinführung.

Als Beispiel für die enantioselektive Herstellung eines 8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkyl-esters entsprechend der vorliegenden Erfindung wird im folgendem Schema die Herstellung des enantiomerenreinen (R)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäuremethylesters gezeigt.



- 5 In analoger Weise sind (*S*)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylester zugänglich, indem als Biokatalysator beispielsweise *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase eingesetzt wird.
Die Synthese von (+)- und (-)- α -Liponsäuren ausgehend von (+)- und (-)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylestern kann entsprechend den bekannten Verfahren durchgeführt werden.
Die Erfindung wird durch nachfolgendes Beispiel näher erläutert.

10

Beispiel 1

15

100 mg (0.5 mmol) 8-Chlor-6-oxo-octansäuremethylester (Substrat), gelöst in 50 ml 50 mM TRIS-Puffer pH 7, enthaltend 0.1 mM DTT und 0.5 mM NADP, werden mit jeweils 2 U / mg(Substrat) TBADH und FDH (NADP-abhängig) versetzt und bei 37°C gerührt. Aufarbeitung nach Standardmethoden liefert enantiomerenreinen (ee > 99.5%) (*R*)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäuremethylester (Produkt).

20

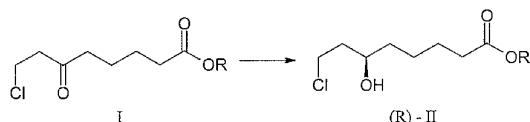
WO 03/035885

PCT/EP02/11470

- 7 -

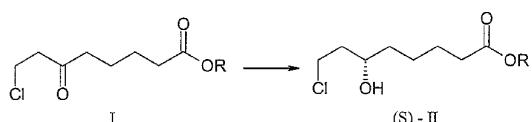
Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von (R)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylestern der Formel (R)-II,



- 10 worin R jeweils die Bedeutung C₁₋₄-Alkyl hat, dadurch gekennzeichnet, dass man 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylester der Formel I enzymatisch mittels Alkoholdehydrogenasen oder Carboxylreduktasen in Gegenwart eines Cofaktors reduziert.

- 15 2. Verfahren zur Herstellung von (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylestern der Formel
(S)-II.



- worin R jeweils die Bedeutung C₁-Alkyl hat, dadurch gekennzeichnet, dass man 8-Chlor-6-oxo-octansäurealkylester der Formel I enzymatisch mittels Alkoholdehydrogenasen oder Carbonylreduktasen in Gegenwart eines Cofaktors reduziert.

- 25 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii* einsetzt.

- 30 4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* einsetzt.

- 35 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Cofaktorre-generierungssystem, welches eine Gleichgewichtsverschiebung der Reduktion bewirkt, in die enzymatische Reduktion einbezieht.

- 40 6. Verfahren zur Herstellung der (R) oder (S)- α -Liponsäure, dadurch gekennzeichnet, dass ein nach einem der vorstehenden Verfahren erhaltener (R)- oder (S)-8-Chlor-6-hydroxy-octansäurealkylester in an sich bekannter Weise umgesetzt wird.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In - International Application No PCT/EP 02/11470
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12P7/42 C12P7/62 C07C59/115 C12P1/00 C07D339/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12P C07C C07D		
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) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 02 10422 A (ASTA MEDICA AG) 7 February 2002 (2002-02-07) the whole document	1,2,5,6
A		3,4
Y	FRONZA ET AL.: "On the Mode of Bakers' Yeast Transformation of 3-Chloropropiophenone and Related Ketones." J. ORG. CHEM., vol. 56, 1991, pages 6019-6023, XP002228458 cited in the application the whole document	1,2,5
A	---	3,4
	-/-	
<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) *C* 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 on 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 to involve an inventive step if 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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
23 January 2003	06/02/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL-2280 Rijswijk Tel: (+31-70) 340-3010, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Douschan, K	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No PCT/EP 02/11470
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TSUBOI ET AL.: "Highly Enantioselective Synthesis of Both Enantiomers of gamma-Substituted Butenolides by Bakers' Yeast Reduction and Lipase-Catalyzed Hydrolysis." J. ORG. CHEM., vol. 63, 1998, pages 1102-1108, XP002228459 cited in the application the whole document ----	1,2,5
A	EP 0 939 132 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 1 September 1999 (1999-09-01) cited in the application the whole document ----	3,4
A	EMA ET AL.: "High Enantioselectivity and Broad Substrate Specificity of a Carbonyl Reductase." J. ORG. CHEM., vol. 66, 2001, pages 8682-8684, XP002228460 cited in the application the whole document ----	1,2,5
A	DE 195 33 882 A (ARZNEIMITTELWERK DRESDEN GMBH) 20 March 1997 (1997-03-20) cited in the application the whole document ----	3,4
X	KLEEMANN UND ENGEL: "Pharmaceutical Substances" 1999, THIEME VERLAG XP001121918 cited in the application page 1860 -page 1861 ----	6

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			International Application No PCT/EP 02/11470	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0210422	A 07-02-2002	DE 10056025 A1 AU 8200201 A WO 0210422 A1	07-02-2002 13-02-2002 07-02-2002	
EP 0939132	A 01-09-1999	JP 11239478 A EP 0939132 A1 US 6168935 B1	07-09-1999 01-09-1999 02-01-2001	
DE 19533882	A 20-03-1997	DE 19533882 A1 AT 202332 T DE 59607119 D1 DK 763516 T3 EP 0763516 A1 ES 2159665 T3 GR 3036631 T3 JP 9169692 A PT 763516 T RU 2175965 C2 US 5869713 A	20-03-1997 15-07-2001 26-07-2001 17-09-2001 19-03-1997 16-10-2001 31-12-2001 30-06-1997 30-11-2001 20-11-2001 09-02-1999	

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1996)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Int'l. lokales Aktenzeichen PCT/EP 02/11470
A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12P7/42 C12P7/62 C07C59/115 C12P1/00 C07D339/04		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole) IPK 7 C12P C07C C07D		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X, P	WO 02 10422 A (ASTA MEDICA AG) 7. Februar 2002 (2002-02-07) das ganze Dokument	1,2,5,6
A	---	3,4
Y	FRONZA ET AL.: "On the Mode of Bakers' Yeast Transformation of 3-Chloropropiophenone and Related Ketones." J. ORG. CHEM., Bd. 56, 1991, Seiten 6019-6023, XP002228458	1,2,5
A	In der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	3,4
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *B* Alters-Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationale Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, eine Veröffentlichungsstelle zu bestimmen, die die Veröffentlichungsstelle einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung bezeugt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgetauschtes Dokument) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationale Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*1* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des Erfolgs der Anwendung des Prinzips oder der in ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *2* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht aufgrund der Veröffentlichung nicht als neu oder auf anderem Wege erkannt werden *3* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung in einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen vorausgegangen ist, in denen sie erörtert wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *4* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
23. Januar 2003	06/02/2003	
1	Name und Postanschrift der Internationalen Recherchebehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentamt 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-3010, Tx: 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Befvoeltmächtiger Belehrsteter Douschan, K

Formblatt PCT/SA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 02/11470
C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	TSUBOI ET AL.: "Highly Enantioselective Synthesis of Both Enantiomers of gamma-Substituted Butenolides by Bakers' Yeast Reduction and Lipase-Catalyzed Hydrolysis." J. ORG. CHEM., Bd. 63, 1998, Seiten 1102-1108, XP002228459 in der Anmeldung erwähnt	1,2,5
A	das ganze Dokument ----	3,4
A	EP 0 939 132 A (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 1. September 1999 (1999-09-01) in der Anmeldung erwähnt	1,2,5
A	das ganze Dokument ----	3,4
Y	EMA ET AL.: "High Enantioselectivity and Broad Substrate Specificity of a Carbonyl Reductase." J. ORG. CHEM., Bd. 66, 2001, Seiten 8682-8684, XP002228460 in der Anmeldung erwähnt	1,2,5
A	das ganze Dokument ----	3,4
X	DE 195 33 882 A (ARZNEIMITTELWERK DRESDEN GMBH) 20. März 1997 (1997-03-20) in der Anmeldung erwähnt	6
X	das ganze Dokument ---- KLEEMANN UND ENGEL: "Pharmaceutical Substances" 1999 , THIEME VERLAG XP001121918 in der Anmeldung erwähnt Seite 1860 -Seite 1861 ----	6

1

Formblatt PCT/SA210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT				Info - nationales Aktenzeichen PCT/EP 02/11470
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
WO 0210422	A 07-02-2002	DE 10056025 A1 AU 8200201 A WO 0210422 A1	07-02-2002 13-02-2002 07-02-2002	
EP 0939132	A 01-09-1999	JP 11239478 A EP 0939132 A1 US 6168935 B1	07-09-1999 01-09-1999 02-01-2001	
DE 19533882	A 20-03-1997	DE 19533882 A1 AT 202332 T DE 59607119 D1 DK 763516 T3 EP 0763516 A1 ES 2159665 T3 GR 3036631 T3 JP 9169692 A PT 763516 T RU 2175965 C2 US 5869713 A	20-03-1997 15-07-2001 26-07-2001 17-09-2001 19-03-1997 16-10-2001 31-12-2001 30-06-1997 30-11-2001 20-11-2001 09-02-1999	

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
(C 1 2 P 7/62	C 1 2 P 7/62	
C 1 2 R 1:24)	C 1 2 R 1:24	
(C 1 2 P 17/00	C 1 2 P 17/00	
C 1 2 R 1:01)	C 1 2 R 1:01	
(C 1 2 P 17/00	C 1 2 P 17/00	
C 1 2 R 1:24)	C 1 2 R 1:24	

(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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100099483

弁理士 久野 琢也

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス=ラインハルト

(74)代理人 230100044

弁護士 ラインハルト・アインゼル

(72)発明者 ミヒヤエル ミュラー

ドイツ連邦共和国 ユーリッヒ プファラー - エンゲルスシュトラーセ 9 アー

(72)発明者 ヴォルフガング ザウアー

ドイツ連邦共和国 ドレスデン プラターネンシュトラーセ 3 9

(72)発明者 グンター ラーバン

ドイツ連邦共和国 ドレスデン - ランゲブリュック ノイルスハイマー シュトラーセ 4 1

F ターム(参考) 4B064 AD75 AE43 CA21 CB18 CC03 CD15

4C023 MA03