

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3679715号
(P3679715)

(45) 発行日 平成17年8月3日(2005.8.3)

(24) 登録日 平成17年5月20日(2005.5.20)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 P 17/10
 //(C 1 2 P 17/10
 C 1 2 R 1:01)
 (C 1 2 P 17/10
 C 1 2 R 1:645)

C 1 2 P 17/10
 C 1 2 P 17/10
 C 1 2 R 1:01
 C 1 2 P 17/10
 C 1 2 R 1:645

請求項の数 2 (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-609597 (P2000-609597)
 (86) (22) 出願日 平成11年4月5日(1999.4.5)
 (65) 公表番号 特表2002-540797 (P2002-540797A)
 (43) 公表日 平成14年12月3日(2002.12.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1999/007445
 (87) 国際公開番号 W02000/060107
 (87) 国際公開日 平成12年10月12日(2000.10.12)
 審査請求日 平成13年10月3日(2001.10.3)

微生物の受託番号 ATCC 202210
 微生物の受託番号 ATCC 74487

(73) 特許権者 596129215
 シェーリング コーポレイション
 Schering Corporation
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
 033-0530, ケニルワース, ギャロ
 ッピング ヒル ロード 2000
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (72) 発明者 ホーマン, マイケル ジェイ.
 アメリカ合衆国 ニュー ジャージー 0
 8809, クリントン, クアリー リ
 ッジ ロード 47

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1 - (4-フルオロフェニル) - 3 (R) - [3 (S) - ヒドロキシ - 3 - (4-フルオロフェニル) プロピル] - 4 (S) - (4-ヒドロキシフェニル) - 2 - アゼチジノンの調製のため

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 - (4 - フルオロフェニル) - 3 (R) - [3 - オキソ - 3 - (4 - フルオロフェニル) プロピル] - 4 (S) - (4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - アゼチジノンの 1 - (4 - フルオロフェニル) - 3 (R) - [3 (S) - ヒドロキシ - 3 - (4 - フルオロフェニル) プロピル] - 4 (S) - (4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - アゼチジノンへの立体選択的還元のためのプロセスであって、1 - (4 - フルオロフェニル) - 3 (R) - [3 - オキソ - 3 - (4 - フルオロフェニル) プロピル] - 4 (S) - (4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - アゼチジノンを、培地中、培地および緩衝液中、培地および溶媒中、または培地および緩衝液と溶媒との混合物中の *Aspergillus niveus*、*C* 10
urvularia lunata、*Mucor racemosus*、*Mucor circinelloides*、*Saccharomyces uvarum*、*Torul*
aspora fermentati、*Torul*
aspora species、*Rh*
odococcus erythropolis、*Rhodococcus fascians*、*Rhodococcus rhodochrous*、*Rhodococcus species*、*Geotrichum candidum*に添加する工程と、得られた混合物をインキュベートする工程と、1 - (4 - フルオロフェニル) - 3 (R) - [3 (S) - ヒドロキシ - 3 - (4 - フルオロフェニル) プロピル] - 4 (S) - (4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - アゼチジノンを単離する工程とを包含する、プロセス。

【請求項 2】

前記微生物が、*Rhodococcus fascians* ATCC No. 202210または真菌単離体*Geotrichum candidum* ATCC No. 74487である、請求項1に記載のプロセス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

1 - (4 - フルオロフェニル) - 3 (R) - [3 (S) - ヒドロキシ - 3 - (4 - フルオロフェニル) プロピル] - 4 (S) - (4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - アゼチジノン
は、1995年3月30日発行のWO 95/08532にコレステロール低下剤として開示されている。米国特許第5,618,707号は、このアゼチジノンの調製に用いられるケト中間体(4 - (4 - フルオロベンゾイル) 酪酸またはそのフェニルオキサゾリジノン結合体)を微生物*Zygosaccharomyces bailii*または*Schizosaccharomyces octosporus*を用いて立体選択的に微生物還元して、対応のヒドロキシ中間体にすることを開示する。

10

【0002】

(発明の要旨)

本発明は、カルボニル基の微生物還元のプロセスに関し、これは、培地中、培地および緩衝液中、培地および溶媒中、または培地および緩衝液と溶媒との混合物中の微生物(環境中の供給源および菌株保存機関、例えばAmerican Type Culture Collection (ATCC) から得られる)の使用を包含し、これにケトン化合物を添加して、所望の立体化学のヒドロキシ基を有する化合物が形成、蓄積および単離され得る。

20

【0003】

特に、本発明は、1 - (4 - フルオロフェニル) - 3 (R) - [3 - オキソ - 3 - (4 - フルオロフェニル) プロピル] - 4 (S) - (4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - アゼチジノンから1 - (4 - フルオロフェニル) - 3 (R) - [3 (S) - ヒドロキシ - 3 - (4 - フルオロフェニル) プロピル] - 4 (S) - (4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - アゼチジノンへの立体選択的還元のためのプロセスに関し、これは1 - (4 - フルオロフェニル) - 3 (R) - [3 - オキソ - 3 - (4 - フルオロフェニル) プロピル] - 4 (S) - (4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - アゼチジノンを、培地中、培地および緩衝液中、培地および溶媒中、または培地および緩衝液と溶媒との混合物中の微生物に添加する工程と、得られた混合物をインキュベートする工程と、1 - (4 - フルオロフェニル) - 3 (R) - [3 (S) - ヒドロキシ - 3 - (4 - フルオロフェニル) プロピル] - 4 (S) - (4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - アゼチジノンを単離する工程とを包含する。

30

【0004】

以下の属からなる群から選択される微生物が本発明の還元において有用であることが見いだされている：*Aspergillus*、*Curvularia*、*Doratomyces*、*Geotrichum*、*Mortierella*、*Mucor*、*Saccharomyces*、*Scytalidium*、*Pichia*、*Torulasporea*、*Neurospora*および*Rhodococcus*。上記の属の以下の種が好ましい：*Aspergillus niveus*、*Curvularia lunata*、*Doratomyces stemonitis*、*Geotrichum candidum*、*Mortierella isabellina*、*Mucor racemosus*および*circinelloides*、*Saccharomyces cerevisiae*および*uvvarum*、*Scytalidium lignicola*、*Pichia methanolitica*、*Torulasporea fermentati*および*species*、*Neurospora crassa*および*Rhodococcus erythropolis*、*fascians*、*rhodochrous*および*species*。

40

【0005】

特に、本発明は、1 - (4 - フルオロフェニル) - 3 (R) - [3 - オキソ - 3 - (4 -

50

フルオロフェニル)プロピル)] - 4 (S) - (4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - アゼチジノン (下記の式 I I) のカルボニル基の微生物還元のためのプロセスに関し、これは上記化合物を培地中、培地および緩衝液中、培地および溶媒中、または培地および緩衝液と溶媒との混合物中の微生物に添加する工程であって、特にここで、微生物が *Rhodococcus fascians* ATCC No. 202210 または真菌単離体 *Geotrichum candidum* ATCC No. 74487 である工程と、得られた混合物をインキュベートする工程と、1 - (4 - フルオロフェニル) - 3 (R) - [3 (S) - ヒドロキシ - 3 - (4 - フルオロフェニル)プロピル)] - 4 (S) - (4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - アゼチジノン (以下の式 I) を単離する工程とを包含する。

【0006】

微生物および真菌単離体の生存培養物は、American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、Manassas、VA 20110 - 2209 の収集物に寄託されており、ここで微生物には受託番号 ATCC 202210 が付与され、真菌単離体には受託番号 ATCC 74487 が付与されている。寄託された培養物が、培養物が寄託された日から30年間、または寄託された培養物に対する最後の要請後5年間、または本出願をもとにして発行された特許の存続期間のうちの長い方の間に紛失、破壊または生存しなくなったならば、培養物は、通知によって、本出願の出願人または譲受人によって差し替えられる。*Rhodococcus fascians* ATCC No. 202210 および *Geotrichum candidum* ATCC No. 74487 は、本出願の係属中、米国特許商標庁長官によって、37 C. F. R. 1.14 および 35 U. S. C. 122 の下にその権利を有すると認められる者に入手可能であり、そして本出願に基づく特許が一旦許可されたら、制限無く、公衆に入手可能となる。微生物および真菌単離体の使用は、米国特許法に依存する。

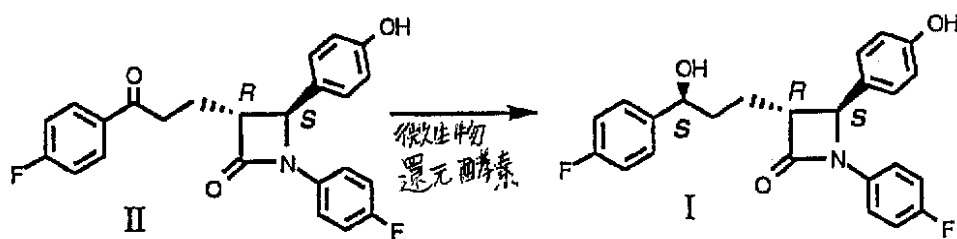
【0007】

(発明の詳細な説明)

本発明は、微生物を用いて以下の立体特異的還元を行う方法に関する。

【0008】

【化1】



微生物還元は、上記式 I I のケトン物質を、微生物を含む、培地、培地および緩衝液、培地および溶媒、または培地および緩衝液と溶媒との混合物に添加することによって行われる。インキュベーションは、約 20 と約 40 との間の範囲の温度、好ましくは 30 で行われ得、他方、反応の初期 pH 値は約 5.0 と約 9.0 との間の範囲、好ましくは 7.0 に調節される。

【0009】

反応中の式 I I の初期濃度は、約 0.5 g/l と約 10.0 g/l との間で変化し得、好ましくは 2 ~ 4.0 g/l である。

【0010】

適切な発酵培地、緩衝液および溶媒は当業者に公知である。発酵培地は、典型的には、炭素源および窒素源またはそれらの混合物を含み、当該分野で公知の酵母抽出物、栄養ブロス、デキストロース (セレロース)、ジャガイモデキストリン、大豆粉、ペプトンおよび他の成分のような成分を用いる。典型的な緩衝液は、リン酸緩衝液 (例えば、pH 7 で 0

・1 M)、MES(2-[N-モルホリノ)エタンスルホン酸)、ビス-トリス(ビス[2-ヒドロキシエチル]イミノトリス[ヒドロキシメチル]メタン)、PIPES(1,4-ピペラジン-ジエタンスルホン酸)、HEPES(N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸])、TRIS(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)およびMOPS(3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸)緩衝液(例えば、pHで7.0、1 M)である。典型的な溶媒は、アセトニトリル、アセトン、エチルエーテル、イソプロパノール、t-ブタノール、イソアミルアルコール、p-ジオキサン、イソプロピルエーテル、ジメチルスルホキシド、t-ブチルメチルエーテル(TBME)、トルエン、テトラヒドロフランおよび CH_2Cl_2 である。好ましくは、微生物還元は発酵培地中で行われる。

10

【0011】

キラル還元反応の持続時間は、約18時間から約96時間まで変化し得、好ましくは約48~72時間である。

【0012】

還元反応の終了時、式Iのヒドロキシ化合物は、周知の方法で、酢酸エチル(EtOAc)、t-ブチルメチルエーテル(TBME)、塩化メチレン(CH_2Cl_2)のような有機溶媒を用いて抽出され得る。樹脂への吸着、クロマトグラフィー、および当該分野で公知の他の物理的方法もまた、式Iのヒドロキシ化合物を抽出するために用いられ得る。

【0013】

多数の微生物を研究して、式IIのケトン化合物を還元するか否かを決定した。このような微生物の多くは、所望の特異性または生産性を提供しなかった。

20

【0014】

以下の実施例は、本発明の還元における微生物の評価、ならびに式Iのヒドロキシ化合物のミリグラム量の調製を例証する。

【0015】

(実施例1)

式Iの化合物の生産のための合成前駆体として使用する式IIの化合物の立体選択的微生物還元の同定のための一般的方法を以下、説明する。

【0016】

酵母、糸状菌、および細菌のシード培養物を、25 mlまたは50 mlのYPD(1%酵母抽出物、2%ペプトン、2%デキストロース; pH 5.5)、SIM6(3.5%大豆粉、5%ジャガイモデキストリン、0.5%セレロース、2 mg/ml塩化コバルト、0.5%炭酸カルシウム; pH 6.0)およびNYC(0.8%栄養ブロス、2%酵母抽出物、1.1%セレロース; pH 7.0)培地を各々入れた125 mlまたは300 mlのフラスコを30 で72時間、攪拌(175~250 rpm)し、その後、フラスコの発酵物中に接種(4% v/v)して(酵母および糸状菌については25 ml YPD/125 ml フラスコ、または細菌については25 ml NYC/125 ml フラスコ)、これを攪拌(250 rpm)しながら30 でインキュベートして、増殖させた。全ての発酵物中で、培地のpHは接種の前に調節したが、培養物の増殖およびケトン還元の間は制御しなかった。還元は、増殖の24時間後、エタノール中に溶解した式IIのケトン化合物(25 mg/ml)を0.5~1.0 g/l、直接培養物に添加することによって開始させた。基質との48時間のインキュベーションの後に、EtOAc(1:1)で抽出した発酵ブロスの試料を逆相HPLCで分析した。一定の還元活性を示し、この手順を用いて発酵を繰り返した後も、顕著な基質の分解を示さなかった培養物を、更にキラルHPLCで分析して、生成物のアルコールの立体配置を決定した。式IIのケトン、1.0 g/lで還元して、高エナンチオマー過剰率で式I(Sエナンチオマー)のヒドロキシ化合物を与えることができる培養物を表1にまとめる。

30

40

【0017】

(表1.1.0/1で化合物IIを化合物Iに選択的に還元できる微生物)

【0018】

50

【表1】

培養物	菌株 #	% EE, S/R	% 収率
<i>Aspergillus niveus</i>	12276	100 S	7
<i>Curvularia lunata</i>	34477	100 S	18
<i>Mucor racemosus</i>	7924	100 S	4
<i>Mucor circinelloides</i>	1207a	100 S	9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y-2034	100 S	8
<i>Saccharomyces uvarum</i>	10613	100 S	11
	32634	100 S	7
<i>Pichia methanolitica</i>	58403	84 S	24
<i>Torulaspora fermentati</i>	20100	100 S	5
<i>Torulaspora species</i>	66815	100 S	14
<i>Neurospora crassa</i>	14692	76 S	4
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	25544	100 S	6
<i>Rhodococcus fascians</i>	202210	100 S	46
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	999	100 S	12
	21243	100 S	12
	29670	100 S	13
	29675	100 S	8
<i>Rhodococcus species</i>	19071	100 S	10
	19148	100 S	8
<i>Geotrichum candidum</i>	74487	100 S	25
<i>Doratomyces stemonitis</i>	SPR 423	100 S	11
<i>Scytalidium lignicola</i>	SPR 531	89 S	30
<i>Mortierella isabellina</i>	SPR 875	57 S	35

(実施例2)

実施例1で用いたものよりも高い濃度で化合物IIを還元できる*Rhodococcus fascians* ATCC No. 202210または真菌単離体*Geotrichum candidum* ATCC No. 74487による式IIのケトン化合物の還元についての発酵パラメーターの研究のための一般的方法を以下に説明する。

【0019】

シード培養物の増殖および*Rhodococcus fascians* ATCC No. 202210および*Geotrichum candidum* ATCC No. 74487を利用した生物変換を、25mlのNYC、YPD、SIM6またはTGP(1% Tastone 154、2%グリセロール、1%リン酸水素二カリウム、pH7.0)培地を入れた125mlフラスコ中で、30℃で24~72時間攪拌(250rpm)し、その後、25mlの生物変換培地を入れた125mlフラスコ中に接種(4% v/v)して、表2および3にまとめたようにして、行った。全ての発酵物中で、培地のpHは接種の前に調節したが、培養物の増殖およびケトン還元の間は制御しなかった。還元は、増殖の24~48時間後、エタノールまたはジメチルスルホキシド(DMSO)中に溶解した式IIのケトン化合物(25~50mg/ml)を1~10g/l、直接培養物に添加す

ることによって開始させた。細胞濃縮物を用いた生物変換においては、増殖の24～48時間後に培養物を遠心分離(8000rpm×10分)で単離し、そして記載したように、ケトンの添加の前に新鮮な培地に再懸濁した。基質との48～96時間のインキュベーション後に、EtOAc(1:1)またはTBME(1:1)で抽出した発酵ブロスの試料を逆相HPLCで分析して、収率を評価した。キラルHPLCによる分析を行って、Sエナンチオマー生成物(式Iの化合物)が高エナンチオマー過剰で選択的に合成されることを確認した。

【0020】

(表2. *R. fascians* ATCC No. 202210の生産性に対する生物変換パラメーターの影響)

【0021】

【表2】

シード増殖条件 30°C, 250 rpm	生物変換条件 (25 ml 培地 / 125 ml フラスコ, 250 rpm)	% 収率
25 ml NYC / 125 ml フラスコ 24 時間 (4% v/v 移動)	1 g/l: YPD, 30°C	41
	2 g/l: YPD, 30°C	32
25 ml YPD / 125 ml フラスコ 24 時間 (4% v/v 移動)	1 g/l: YPD, 30°C	50
	2 g/l: YPD, 30°C	42
25 ml NYC / 125 ml フラスコ 72 時間 (4% v/v 移動)	1 g/l: NYC, 25°C	45
	1 g/l: NYC, 30°C	42
	1 g/l: YPD, 30°C	47
	1 g/l: NYC, 35°C	48
	2 g/l: NYC, 25°C	44
	2 g/l: NYC, 30°C	43
	2 g/l: YPD, 30°C	44
2 g/l: NYC, 35°C	39	
25 ml TGP / 125 ml フラスコ 24 時間 (4% v/v 移動)	1 g/l: TGP, 30°C	69
	2 g/l: TGP, 30°C	64
	4 g/l: TGP, 30°C	28
	10 g/l: TGP, 30°C	11
25 ml TGP / 125 ml フラスコ 24 時間 (4% v/v 移動)	4 g/l: 5X 細胞濃度, TGP, 30°C	68
	10 g/l: 5X 細胞濃度, TGP, 30°C	31

エタノールに溶解した式IIのケトン化合物(25～50mg/ml)は、増殖の24時間後に、記載したように1～10g/lで添加した。

【0022】

(表3. *G. candidum* ATCC No. 74487の生産性に対する生物変換パラメーターの影響)

【0023】

【表3】

10

20

30

40

シード増殖条件	生物変換条件 (25 ml 培地/125 ml フラスコ)	% 収率
25 ml SIM-6 /125 ml フラスコ, 30°C, 250 rpm 72 時間(4% v/v 移動)	2 g/l: TGP, 30°C	18
	4 g/l: TGP, 30°C	9
	10 g/l: TGP, 30°C	6
	2 g/l: YPD, 30°C	33
	2 g/l: YPD, 35°C	39
	2 g/l: TNC, 30°C	38
	2 g/l: TNC, 35°C	45
	2 g/l: TN2C, 30°C	54
	2 g/l: TN2C, 35°C	46

10

DMSOに溶解した式IIのケトン化合物(25~50 mg/ml)は、増殖の24~48時間後に、2~10 g/lで添加した。TNC培地: 1% Tastone 154、2% NZ-アミン、3% セレロース、pH 5.5。TN2C培地: 6% セレロースを含むTNC培地。

【0024】

(実施例3)

20

式IIのケトン化合物の立体選択的還元由来の式Iのヒドロキシ化合物のミリグラム量を、*Rhodococcus fascians* ATCC No. 202210および真菌単離体*Geotrichum candidum* ATCC No. 74487を用いて、表2および3にまとめた条件を使用して複数のフラスコ発酵で調製した。インキュベーションの72~96時間後、各培養物の発酵ブロスプールし、その後、遠心分離して、生成物の大部分を含む細胞と残余の基質とを単離した。細胞ペレットをTBMEで抽出した(10~20容量/湿潤重量)。無水MgSO₄をTBME抽出物に添加して残余の水を除去し、この抽出物を濾過し、そして濾液を蒸発によって濃縮した。

【0025】

抽出物濃縮物を、10-20 GFシリカプレート(20 cm x 20 cm x 1000ミクロン)を用いた分取薄層クロマトグラフィーによる精製に供し、EtOAc:ヘキサン(50:50)の溶液で展開した。所望の生成物と共に移動する物質を各シリカプレートから掻き取り、プールし、そしてTBMEでシリカから溶離し、これを次に蒸発乾固した。450~600 mgの式IIのケトン化合物由来の約170 mgの生成物を各培養物の生物変換から単離した。単離された物質が所望の式Iのヒドロキシ化合物であることを、逆相およびキラルHPLC、NMR、および質量スペクトル分析によって確認した。

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I
(C 1 2 P 17/10	C 1 2 P 17/10
C 1 2 R 1:66)	C 1 2 R 1:66
(C 1 2 P 17/10	C 1 2 P 17/10
C 1 2 R 1:785)	C 1 2 R 1:785
(C 1 2 P 17/10	C 1 2 P 17/10
C 1 2 R 1:85)	C 1 2 R 1:85

(72)発明者 プレバイト, エドワード
 アメリカ合衆国 ニュー ジャージー 08902, ノース プルンスウィック, グランブリ
 - クロス ロード 655エイ

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第97/016424(WO, A1)
 特表平10-512454(JP, A)
 特開昭61-141894(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12P 17/00-17/18
 C07D 205/08
 CA(STN)
 REGISTRY(STN)

(54)【発明の名称】1-(4-フルオロフェニル)-3(R)-[3(S)-ヒドロキシ-3-(4-フルオロフェ
 ニル)プロピル]-4(S)-(4-ヒドロキシフェニル)-2-アゼチジノンの調製のため
 の立体選択的微生物還元