



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년11월26일
(11) 등록번호 10-0996977
(24) 등록일자 2010년11월22일

(51) Int. Cl.
C12P 7/62 (2006.01) C07C 69/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7005996(분할)
(22) 출원일자(국제출원일자) 2001년05월01일
심사청구일자 2008년03월11일
(85) 번역문제출일자 2008년03월11일
(65) 공개번호 10-2008-0042129
(43) 공개일자 2008년05월14일
(62) 원출원 특허 10-2002-7014987
원출원일자(국제출원일자) 2001년05월01일
심사청구일자 2006년03월04일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2001/001915
(87) 국제공개번호 WO 2001/85975
국제공개일자 2001년11월15일
(30) 우선권주장
0011120.3 2000년05월09일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
EP0569998 A
W01997000968 A1
EP0579370 A
Patel, et al. Enzyme and Microbial
Technology, Vol.15(12), pp. 1014-1021.
전체 청구항 수 : 총 28 항

(73) 특허권자
아스트라제네카 유케이 리미티드
영국 런던 더블유1와이 6엘엔 스탠호프 게이트 15
(72) 발명자
홀트, 로버트, 안토니
영국, 클리블랜드 티에스23 1와이엔, 빌링햄,
피.오. 박스 2, 벨라시스 애버뉴
블랙커, 앤드류, 존
영국, 웨스트 요크셔 에치디2 1지아이, 허더스필드— 피.오. 박스521, 리즈 로드
리브, 크리스토퍼, 데이비드
영국, 클리블랜드 티에스23 1와이엔, 빌링햄,
피.오. 박스 2, 벨라시스 애버뉴
(74) 대리인
리앤목특허법인

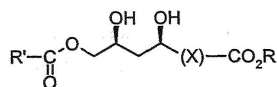
심판번호 거절결정불복 2009원002094
심판청구일 2009년03월06일
심판관합의체 심판장 홍정표, 심판관 신경아, 심
판관 정운재

(54) 디하이드록시 에스테르 및 이의 유도체의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 하기 화학식(1)의 화합물(식중 R 및 R'은 선택적으로 치환된 하이드로카빌 그룹이고 X는 하이드로카빌 결합 그룹임)을 제조하는 방법에 관한다.

[화학식 1]



본 방법은 디하이드록시 케토 전구체내 케토 그룹의 입체선택적 환원 단계, 1차 하이드록시의 선택적 에스테르화 또는 디하이드록시 케토 전구체의 1차 하이드록시의 선택적 에스테르화 단계 및 케토 그룹의 선택적 환원을 포함한다.

(81) 지정국

AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
 BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
 DM, DZ, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD,
 SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
 UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, AP(GH, GM, KE, LS,
 MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ,
 BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH,
 CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
 MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI,
 CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG),

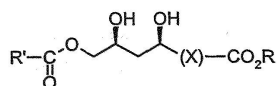
특허청구의 범위

청구항 1

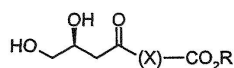
a)하기 화학식(2)의 화합물을 입체선택적으로 환원시켜 하기 화학식(3)의 화합물을 얻는 단계 및 b)화학식 R"-O-COR'의 화합물 및 하이드롤라제 효소 존재하에 화학식(3)의 화합물을 에스테르화시켜 하기 화학식(1)의 화합물을 얻는 단계; 또는

c)화학식 R"-O-COR'의 화합물 및 하이드롤라제 효소 존재하에 화학식(2)의 화합물을 에스테르화시켜 하기 화학식(4)의 화합물을 얻는 단계 및 d)화학식(4)의 화합물을 입체선택적으로 환원시켜 화학식(1)의 화합물을 얻는 단계를 포함하는 화학식(1) 화합물을 제조하는 방법:

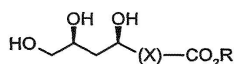
[화학식 1]



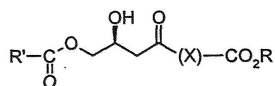
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



식중, X는 선택적으로 치환된 하이드로카빌 연결 그룹(linking group)이고 R 및 R"은 각각 독립적으로 선택적으로 치환된 하이드로카빌 그룹이며 R'은 선택적으로 치환된 하이드로카빌임.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하이드롤라제는 리파제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, X가 화학식 CH₂의 그룹을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, R"이 비닐 또는 이소프로페닐 그룹을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, R'이 치환되거나 치환되지 않은 알킬 그룹인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, R'이 치환되거나 치환되지 않은 C₁₋₆-알킬 그룹인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, R'이 메틸 그룹인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 화학식(2) 또는 (4)의 화합물을 미생물 환원 방법으로 접촉에 의해 환원시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 화학식(2) 또는 (4)의 화합물을 보베리아(*Beauveria*), 피키아(*Pichia*), 칸디다(*Candida*), 클루베로마이세스(*Kluyveromyces*) 또는 토르라스포라(*Torulaspora*) 속에서 선택되는 미생물 유래의 환원 효소와 접촉시켜 환원시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 화학식(2) 또는 (4)의 화합물을 피키아 안구스타(*Pichia angusta*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 칸디다 길러몬디(*Candida guilliermondii*), 사카로마이세스 칼스버그렌시스(*Saccharomyces carlsbergensis*), 피키아 트레할로필라(*Pichia trehalophila*), 클루베로마이세스 드로소플리아룸(*Kluyveromyces drosophilium*) 및 토루로스포라 한세니(*Torulospora hansenii*)로 이루어지는 그룹에서 선택되는 생물체 또는 그로부터 추출된 환원 효소와 접촉시켜 환원시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제8항 또는 제9항에 있어서, 전체 세포를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제8항 또는 제9항에 있어서, 화학식(2) 또는 (4)의 화합물을 pH 4 내지 5에서 환원시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

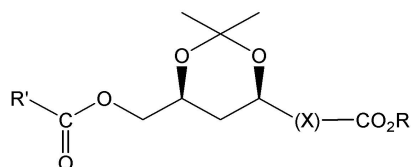
제2항에 있어서, 돼지 췌장 리파제, 칸디다 실린드라키아 리파제(*Candida cylindracea* lipase), 슈도모나스 플루오레스스 리파제(*Pseudomonas fluorescens* lipase), 칸디다 안타кти카 분급물 B(*Candida antarctica* fraction B) 및 휴미콜라 라누기노사(*Humicola lanuginosa*)의 리파제로 이루어지는 그룹에서 선택되는 효소 존재 하에 화학식(2) 또는 (3)의 화합물을 에스테르화시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

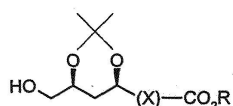
제1항에 있어서, 화학식 R"-O-COR'의 화합물이 비닐 아세테이트인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

- 제1항, 제2항, 및 제8항 내지 제10항 중 어느 한 항의 방법으로 화학식(1)의 화합물을 제조하는 단계;
- 화학식(1)의 화합물을 2,2-디메톡시프로판과 반응시켜 하기 화학식 6의 아세토나이드를 형성시키는 단계; 및
[화학식 6]



- 화학식 6의 화합물에서 그룹 R'-(C=O)-를 제거하는 단계를 포함하는 화학식(5) 화합물의 제조 방법:
[화학식 5]



식중, X는 선택적으로 치환된 하이드로카빌 연결 그룹, R은 선택적으로 치환된 하이드로카빌 그룹, R'은 선택적으로 치환된 하이드로카빌임.

청구항 16

제15항에 있어서, R'-(C=O)-를 염기성 알콜 용액으로 처리하여 제거하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

삭제

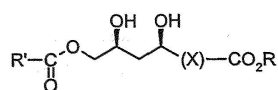
청구항 18

삭제

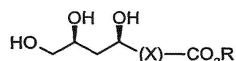
청구항 19

화학식 R"-O-COR' 화합물 및 하이드롤라제 효소의 존재하에 하기 화학식(3)의 화합물을 에스테르화하여 하기 화학식(1)의 화합물을 형성하는 것을 포함하는 하기 화학식(1) 화합물의 제조 방법:

[화학식 1]



[화학식 3]

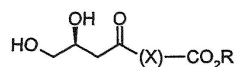


식중, X는 선택적으로 치환된 하이드로카빌 결합 그룹, R 및 R"은 각각 독립적으로 선택적으로 치환된 하이드로카빌 그룹, R'은 선택적으로 치환된 하이드로카빌 그룹임.

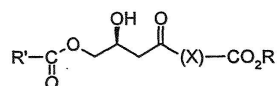
청구항 20

화학식 R"-O-COR'의 화합물 및 하이드롤라제 효소의 존재하에 하기 화학식(2)의 화합물을 에스테르화하여 화학식(4)의 화합물을 형성시키는 것을 포함하는 하기 화학식(4) 화합물의 제조 방법:

[화학식 2]



[화학식 4]



식중, X는 선택적으로 치환된 하이드로카빌 결합 그룹, R 및 R"은 각각 독립적으로 선택적으로 치환된 하이드로카빌 그룹, R'은 선택적으로 치환된 하이드로카빌임.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 하이드롤라제는 리파제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, R'은 선택적으로 치환된 알킬 그룹인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제19항에 있어서, R'은 CH₃, R은 t-부틸, X는 -CH₂-인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제19항에 있어서, R"이 비닐 또는 이소프로페닐 그룹인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제21항에 있어서, 상기 하이드롤라제 효소는 돼지 췌장 리파제, 칸디다 실린드라키아 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제, 칸디다 안탁티카 분급물 B 및 휴미콜라 라누기노사의 리파제로 이루어지는 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제20항에 있어서, 상기 하이드롤라제는 리파제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제20항에 있어서, R'은 선택적으로 치환된 알킬 그룹인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제20항에 있어서, R'은 CH₃, R은 t-부틸, X는 -CH₂-인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제20항에 있어서, R"이 비닐 또는 이소프로페닐 그룹인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제26항에 있어서, 상기 하이드롤라제 효소는 돼지 췌장 리파제, 칸디다 실린드라키아 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제, 칸디다 안탁티카 분급물 B 및 휴미콜라 라누기노사의 리파제로 이루어지는 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 디하이드록시 에스테르 및 이의 유도체의 입체선택적 제조 방법에 관한다.

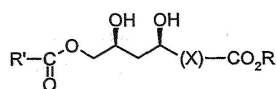
발명의 내용

과제 해결수단

[0002] 본 발명의 제1의 양상은 a)하기 화학식(2)의 화합물을 입체선택적으로 환원시켜 하기 화학식(3)의 화합물을 얻는 단계 및 b)화학식 R"-O-COR'의 화합물 및 리파제 또는 하이드롤라제 효소 존재하에 화학식(3)의 화합물을 에스테르화시켜 하기 화학식(1)의 화합물을 얻는 단계; 또는

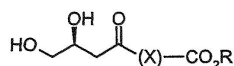
[0003] c)화학식 R"-O-COR'의 화합물 및 리파제 또는 하이드롤라제 효소 존재하에 화학식(2)의 화합물을 에스테르화시켜 하기 화학식(4)의 화합물을 얻는 단계 및 d)화학식(4)의 화합물을 선택적으로 환원시켜 화학식(1)의 화합물을 얻는 단계를 포함하는 화학식(1) 화합물을 제조하는 방법을 제공한다:

화학식 1



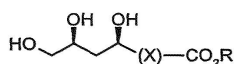
[0004]

화학식 2



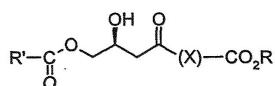
[0005]

화학식 3



[0006]

화학식 4



[0007]

[0008] [식중, X는 선택적으로 치환된 하이드로카빌 연결 그룹(linking group)이고 R 및 R"은 각각 독립적으로 선택적으로 치환된 하이드로카빌 그룹이며 R'은 선택적으로 치환된 하이드로카빌, 바람직하게는 선택적으로 치환된 알킬 그룹임].

[0009] X, R, R' 또는 R"이 나타내는 하이드로카빌 그룹은 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있고, 예를들어 페할로겐화 와 같이 과치환될 수도 있다. 치환기의 예는 할로, 특히 플루오로 및 클로로, C₁₋₄-알콕시와 같은 알콕시 및 옥소를 포함한다.

[0010] 바람직하게는, X는 화학식-(CH₂)_n(식중, n은 1-4)의 그룹이고 가장 바람직하게는 화학식 -CH₂-의 그룹이다.

[0011] R"은 C₁₋₆-알킬 그룹과 같은 알킬 그룹, C₁₋₆-알킬카보닐 그룹과 같은 알킬카보닐 그룹, 예를들어 CH₃(C=O)- 또는 CF₃(C=O)- 그룹일 수 있을 것이다. R"은 가장 바람직하게는 비닐 또는 이소프로페닐 그룹이다.

[0012] R은 바람직하게는 선형 또는 분지형일 수 있는 C₁₋₆-알킬 그룹이고 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있을 것이다. R은 가장 바람직하게는 t-부틸 그룹이다.

[0013] R'은 치환된 알킬, 종종 CF₃- 또는 CF₃CH₂-와 같은 C₁₋₆-알킬 그룹일 수 있을 것인데 바람직하게는 비치환된 C₁₋₆-알킬 그룹, 가장 특별하게는 메틸 그룹이다.

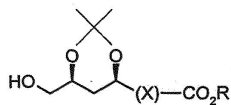
[0014] 화학식(2) 또는 (4)의 화합물의 입체선택적 환원은 수소화, 전달 수소화(transfer hydrogenation), 금속 하이드라이드 환원 또는 탈수소효소와 같은 화학적 또는 미생물적 환원 방법을 사용하는 것이 바람직하다. Helv. Chim. Acta 69, 803, 1986(본원에 참고문헌으로 포함)에 기술된 바와 같은 적당한 수소화 방법의 예는 메탄올, 에탄올, t-부탄올, 디메틸포름아미드, t-부틸메틸에테르, 톨루엔 또는 헥산과 같은 용매 중에서 1-10 bar 하에서 수소 분자를 사용하여 카본, 알루미늄, 실리카와 같은 이형 지지체상에서 백금, 팔라듐 또는 로듐과 같은 0.01-10%(w/w) 촉매를 사용하는 것을 포함한다. 이와는 다르게 EP0583171(본원에 참고문헌으로 포함)에 기술된 바와 같은 동형 수소화 촉매를 사용할 수 있을 것이다.

[0015] 적절한 화학적 전달 수소화 방법의 예는 Zassinovich, Mestroni 및 Gladiali, Chem. Rev. 1992, 92, 1051(본원에 참고문헌으로 포함) 또는 Fuji등 J. Am. Chem. Soc. 118, 2521, 1996(본원에 참고문헌으로 포함)에 기술된 것을 포함한다. 바람직한 화학 전달 수소화 방법은 루테튬 또는 로듐과 같은 전이 금속의 킬랄 리게이트된 착물, 특히 킬랄 디아민리게이트된 중성 방향족 루테튬 착물을 사용한다. 바람직하게는, 이러한 화학 전달 수소화는 수소 공급원으로서 산, 특히 트리에틸암모늄 포르메이트와 같은 포르메이트 염을 사용한다.

- [0016] Tet.1993, 1997, Tet.Asymm.1990, 1, 307(본원에 참고문헌으로 포함) 또는 J. Am. Chem. Soc. 1998, 110, 3560(본원에 참고문헌으로 포함)에 기술된 바와 같은 금속 하이드라이드 시약을 사용할 수 있다.
- [0017] 적절한 미생물 환경의 예는 보베리아(*Beauveria*), 바람직하게는 보베리아 바시아나(*Beauveria bassiana*), 피키아(*Pichia*), 바람직하게는 피키아 안구스타(*Pichia angusta*) 또는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 트레할로필라(*trehalophila*), 하플로필라(*haplophila*) 또는 멤브라네파시엔스(*membranefaciens*), 칸디다(*Candida*), 바람직하게는 칸디다 후미콜라(*Candida humicola*), 솔라니(*solani*), 길러몬디(*guillermundii*), 디덴시아이(*diddenssiae*) 또는 프리에드리키(*friedrichii*), 클루베로마이세스(*Kluveromyces*), 바람직하게는 클루베로마세스 드로소필라룸(*Kluyveromyces drosophilorum*) 또는 토루라스포라(*Torulaspora*), 바람직하게는 토루라스포라 한세니(*Torulaspora hansenii*)에서 선택되는 미생물의 특성을 가지는 생물체와 화학식(2) 또는 (4)의 화합물을 접촉시키는 것을 포함한다. 전술한 미생물에서 추출한 효소와 화학식(2) 또는 (4)의 화합물을 접촉시켜 환원시킬 수 있을 것이다. 가장 바람직하게는, 화학식(2) 또는 (4)의 화합물은 피키아 안구스타, 피키아 파스토리스, 칸디다 길러몬디, 사카로마세스 칼스버겐시스, 피키아 트레할로필라, 클루베로마세스 드로소필리아룸 및 토루로스포라 한세니에서 선택된 미생물 또는 전술한 생물체의 추출물과 접촉시킨다.
- [0018] 본 발명은 바람직하게는 전술한 미생물, 바람직하게는 피키아 안구스타, 피키아 파스토리스, 칸디다 길러몬디, 사카로마이세스 칼스버겐시스, 피키아 트레할로필라, 클루베로마이세스 드로소필리아룸 및 토루로스포라 한세니에서 얻은 전체 세포 또는 추출물을 사용하여 화학식(2)의 화합물을 선택적으로 환원시킴으로써 화학식(3)의 화합물을 제조하는 것을 포함한다.
- [0019] 본 발명은 가장 바람직하게는 유기물의 전체 세포를 사용하여 수행하는데 이것이 필요한 효소를 분리하고 반응공-인자(co-factor)를 제공할 필요가 없기 때문이다.
- [0020] 상기 미생물 중에서 임의의 종을 사용할 수 있을 것이나 다수의 구체예에서 피키아 안구스타의 전체 세포 또는 효소를 사용하여 높은 전환율 및 선별도를 얻을 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0021] 일반적으로 공-인자, 통상적으로 NAD(P)H(니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 또는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트) 및 공-인자를 재생시키는 시스템, 예를 들어 글루코스 및 글루코스 디하이드로제나제를 효소와 더불어 사용하여 반응을 유도한다. 전체 세포에는 적당한 공-인자 및 환원 메카니즘이 존재하므로 바람직하게는 슈거, 예를 들어 말토즈, 스크로즈 또는 바람직하게는 글루코스, 폴리올 예를 들어 글리세롤 또는 소비톨, 시트르산 또는 저급 알콜, 예를 들어 메탄올 또는 에탄올 중 하나 이상을 포함할 수 있는 적절한 탄소 공급원을 함유하는 영양배지의 전체 세포를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0022] 반응시 전체 세포가 성장할 것을 의도할 경우 질소 및 인의 공급원 및 미량 원소가 배지 내에 존재하여야 한다. 이들은 미생물을 배양시킬 때 통상 사용되는 것들일 수 있을 것이다.
- [0023] 본 방법은 바람직하게는 탄소 공급원을 함유하나 성장에 필수적인 영양분을 하나 이상 함유하지 않는 배지 내의 생 세포 현탁액 또는 성장을 지원할 수 있는 배지 내에서 성장하는 미생물의 배양액에 화학식(2) 또는 (4)의 화합물을 가함으로서 수행할 수 있을 것이다. 필수적인 효소 및 공-인자가 존재한다면 죽은 세포 또한 사용할 수 있을 것이며; 필요하다면, 필수적인 효소 및 공인자를 죽은 세포에 부가할 수 있다.
- [0024] 필요하다면, 전술한 바와 같은 적절한 탄소 공급원의 존재하에 화학식(2) 또는 (4)와 접촉하는 지지체 상에 세포를 고정시킬 수 있을 것이다.
- [0025] pH는 적절하게는 3.5-9, 예를 들어 4-9, 바람직하게는 6.5이하, 더 바람직하게는 5.5이하이다. pH 4-5를 사용하는 것이 매우 적당하다. 본 방법은 적절하게는 10-50℃, 바람직하게는 20-40℃, 더 바람직하게는 25-35℃에서 수행할 수 있을 것이다. 전술한 생물체의 살아있는 전체 세포가 존재할 경우 공기 조건 하에 작업하는 것이 바람직하다. 분당 배양 매질 부피당 표준 온도 및 압력에서 측정된 공기의 부피가 0.01-1.0에 해당하는 공기 속도가 전술한 pH 및 온도 조건에서 사용되는 것이 적당하나 상당히 변형시킬 수도 있을 것이다. 본 방법과 별도로 수행할 경우 유사한 pH, 온도 및 공기 조건을 생물체의 성장시 사용할 수 있을 것이다.
- [0026] 정제된 효소는 공지의 방법, 적절하게는 분리시킨 세포의 현탁액을 원심분리하여 잔류물로부터 맑은 용액을 분리하고, 예를 들어 이온 강도를 증가시키는 액체로 칼럼으로부터 적당히 용출시켜 이온 교환 크로마토그래피로 의도하는 효소를 용액에서 분리 및/또는 예를 들어 암모늄 설페이트와 같은 이온 물질을 부가하여 선택 침전시킴으로써 적절히 분리시킬 수 있을 것이다. 바람직하면 순도를 증가시키기 위하여 이러한 조작을 반복할 수 있을 것이다.

- [0027] 화학식(2) 또는 (4)의 화합물의 미생물 환원이 특히 바람직한데 이 방법은 본 발명의 제2 양상을 구성한다.
- [0028] 화학식(2) 또는 (3)의 화합물의 에스테르화에서 또다른 에스테르로 교차에스테르화시키는 것이 바람직한데 이것은 알콜에 대하여 몰당량 이상으로 존재하고 적당하게는 비닐 에스테르이다(부산물로서, 아세트알데하이드는 역반응에 포함되지 않음). 택일적으로는, 아세트산 무수물 또는 트리플루오로아세트산 무수물과 같은 무수물 또는 에틸아세테이트와 같은 에스테르 또는 트리플루오로에틸아세테이트와 같은 플루오르화된 에스테르를 사용할 수 있을 것이다. 바람직하게는 20-75℃, 더 바람직하게는 25-50℃의 온도에서 아세토니트릴, 에틸아세테이트, 테트라하이드로퓨란, t-부틸메틸에테르, 톨루엔, 부타논, 펜타논 또는 헥사논과 같이 1%(w/w) 미만의 물을 함유하는 유기 용매내에서 위치특이(ragiospecific) 에스테르화 반응을 수행하는 것이 바람직하다. 에스테르는 바람직하게는 2-8개의 탄소 원자를 함유하는 저급 알칸산의 에스테르 또는 이의 치환된 유도체이다. 임의로 불활성 분위기를 사용할 수 있을 것인데 예를들어 질소 흐름을 용액에 통과시킬 수 있을 것이다.
- [0029] 효소는 그대로 또는 이를 포함하는 전체 세포로서 제공될 수 있다. 이들은 생성물로부터 분리하기 쉽고 필요하다면 재사용할 수 있도록 고정시키는 것이 바람직하다.
- [0030] 바람직한 효소는 돼지 췌장 리파제, 칸디다 실린드라키아 리파제, 슈도모나스 플루오레센스 리파제, 칸디다, 안탁티카 분글물 B와 같은 리파제 이를테면 상표명 Chirazyme L2로 시판되는 것들, 예를들어 상표명 Lipolase로 시판되는 후미콜라 라누기노사류 또는 상표명 SAM II로 시판되는 슈도모나스류 및 더 바람직하게는 상표명 Chirazyme으로 시판되는 칸디다 안탁티카류를 포함한다.
- [0031] R'은 CH₃이고 R은 선택적으로 치환된 하이드로카빌, X는 -(CH₂)_n-, n은 1-4인 화학식(1)의 화합물은 본 발명의 제3의 양상을 구성한다. 바람직하게는, R은 t-부틸이고 가장 바람직하게는 X는 -CH₂-이다.
- [0032] 화학식(1)의 화합물은 제약학적 화합물의 제조에 유용한 중간물이다. 통상적으로 이들은 2,2-디메톡시프로판과 같은 1,3-디하이드록시 모이어티에 대한 보호 그룹과 반응하여 Synthesis 1998, 1713에 기술된 바와 같은 아세토나이드를 생성시킨다. 그룹 R'-(C=O)-는 이후 미국 제5,278,313호에 기술된 바와 같은 약염기 알콜 용액 예를들어 K₂CO₃ 용액 또는 가수분해를 지원할 수 있을 정도의 충분한 물을 함유하는 유기 용액 또는 수성 용액 중의 리파제로 처리하여 선택적으로 제거, 하기 화학식(5)의 화합물을 생성시킬 수 있다.

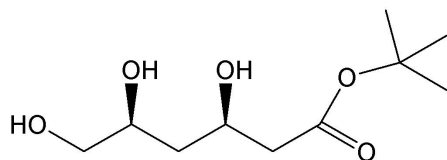
화학식 5



- [0033]
- [0034] 이러한 화학식(5) 화합물의 제조 방법은 본 발명의 제4의 양상을 구성한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

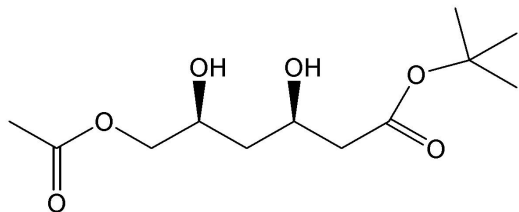
- [0035] 실시예 1
- [0036] (3R,5S)t-부틸 3,5,6-트리하이드록시헥사노에이트의 제조



- [0037]
- [0038] 250ml의 교반 둥근 바닥 플라스크에 20ml의 아세토니트릴, 0.405g(0.662몰)의 디-무-클로로비스[(p-시텐)클로로 우데늄(II)] 및 0.492g(1.34몰)의 (1S,2S)-(+)-N-(4-톨루엔설포닐)-1,2-디페닐에틸렌디아민을 채웠다. 질소를 살포하고 이후 조금씩 새게 유지하여 용액의 산소를 제거하였다. 산소를 뺀, 15ml의 아세토니트릴내 26g(0.119몰)의 임의로 순수한 (5S) t-부틸 3-케토-5,6-디하이드록시헥사노에이트 용액을 반응 용기에 채우고 용액을 20분간 주위 온도에서 교반시켰다. 이후 증류시킨 포름산 및 트리에틸아민의 5:2(몰/몰) 혼합물 65ml를 10분에 걸쳐 가하고 반응 혼합물을 주위 온도에서 48시간동안 교반하였다. 이 용액에 80ml의 디클로로메탄 및 120ml의 포화 소듐 비카보네이트를 서서히 가하였다. 70g의 암모늄 클로라이드를 수성 층에 채우고 유기층

을 분리하였다. 수성 층을 90ml의 에틸아세테이트로 세번 더 세척하고 유기 분급물을 수거, 소듐 설페이트 상에서 건조하고 용매를 제거하여 주로 (3R,5S) t-부틸 3,5,6-트리하이드록시헥사노에이트를 함유하는 21.1g의 크루드 오일을 얻었다. 다이아스테레오모의 비는 ^{13}C NMR 5.2:1 (3R:5S):(3S:5S)인 것으로 측정되었다. 이 물질은 차우 반응에서 크루드로 사용하였고 칼럼 크로마토그래피로 정제할 수 있었다.

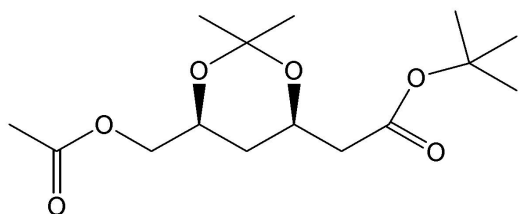
[0039] (3R,5S) t-부틸 6-아세톡시-3,5-디하이드록시헥사노에이트의 제조



[0040]

[0041] 1리터의 둥근 바닥 플라스크에 700ml의 테트라하이드로푸란 및 70.7g(0.32몰)의 (3R,5S) t-부틸 3,5,6-트리하이드록시헥사노에이트, 41ml(0.46몰)의 비닐아세테이트 및 6.3g의 지지된 리파제 Chirazyme L2™를 채웠다. 주위 온도에서 3시간 교반한 후 스크린하여 리파제를 제거하고 진공하에서 증류하여 휘발성 물질을 제거하였다. 크루드 오일의 질량은 78.7g이고 주요 성분은 (3R,5S) t-부틸 6-아세톡시-3,5-디하이드록시헥사노에이트인 것으로 측정되었다. 이 물질을 다음 단계에 직접 사용하였다.

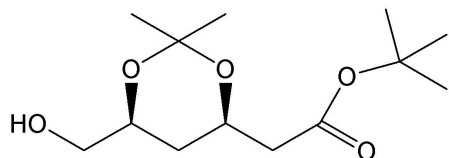
[0042] (4R,6S)-6-[(아세틸옥시)메틸]-2,2-디메틸-1,3-디옥산-4-아세트산, 1,1-디메틸에틸에스테르의 제조



[0043]

[0044] 1리터의 둥근 바닥 플라스크에 78.7g의 (3R,5S) t-부틸 6-아세톡시-3,5-디하이드록시헥사노에이트, 800ml의 2,2-디메톡시프로판 및 5.7g의 p-톨루엔설폰산을 채웠다. 35분후 세 반응물을 그 부피의 반으로 농축하고 300ml의 디클로로메탄 및 300ml의 1M 소듐비카보네이트를 가하였다. 유기층을 분리하고 수성 층을 150ml의 에틸아세테이트로 세번 더 세척하였다. 유기 분급물을 수거하여 소듐 설페이트 상에서 건조시키고 진공하에 증류하여 휘발성 물질을 제거하였다. 92g의 크루드 오일을 얻었다. 이것은 단칼럼 플래쉬 실리카에 통과시키고 헥산으로 용출시킨 다음 헥산:에틸아세테이트 85:15(v/v)로 용출하고 헥산으로부터 3회 결정 석출하여 22.17g의 (4R,6S)-6-[(아세틸옥시)메틸]-2,2-디메틸-1,3-디옥산-4-아세트산, 1,1-디메틸에틸에스테르를 얻었고 이것은 키랄 GC로 측정하였을때 99.9%였다.

[0045] (4R,6S)-6-(하이드록시메틸)-2,2-디메틸-1,3-디옥산-4-아세트산, 1,1-디메틸에틸에스테르의 제조

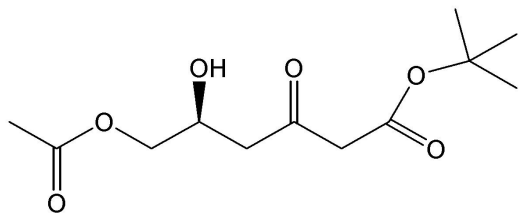


[0046]

[0047] 500ml의 교반 둥근 바닥 플라스크에 22.17g의 (4R,6S)-6-[(아세틸옥시)메틸]-2,2-디메틸-1,3-디옥산-4-아세트산, 1,1-디메틸에틸에스테르, 250ml의 메탄올 및 5.05g의 분쇄한 포타슘 카보네이트를 채웠다. 가수분해가 완결될때까지 반응물을 35분간 교반한 다음 스크린하여 포타슘 카보네이트를 제거하고 반응물을 농축, 150ml의 5%(w/w) 브라인 및 150ml의 톨루엔을 가하였다. 유기층을 분리하고 수성층을 250ml의 톨루엔으로 두번 더 세척하였다. 유기 층을 수거하여 15%(w/w) 브라인으로 세번 세척하고 진공 증류하여 용매를 제거하여 얻은 17.78g의 맑은 오일을 측정하였더니 (4R,6S)-6-[(아세틸옥시)메틸]-2,2-디메틸-1,3-디옥산-4-아세트산, 1,1-디메틸에틸에스테르가 99%를 넘는 것으로 측정되었다.

[0048] 실시예 2

[0049] (5S) t-부틸 6-아세톡시-5-하이드록시-3-케토흡사노에이트의 제조

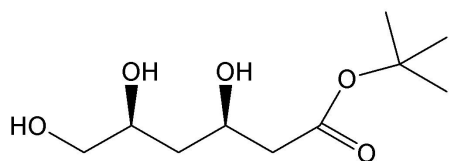


[0050]

[0051] 교반시킨 250ml의 둥근 바닥 플라스크에 2.32g(0.0106몰)의 (5S) t-부틸 5,6-디하이드록시-3-케토흡사노에이트, 40ml의 테트라하이드로퓨란, 0.98ml(0.0106몰)의 비닐 아세테이트 및 0.22g의 지지된 리파제 Chirazyme L2™를 채웠다. 20분후 리파제를 스크린하여 제거하고 진공하에 증류하여 휘발성 물질을 제거하여 얻은 2.96g의 크루드 오일은 NMR에 의하여 (5S) t-부틸 6-아세톡시-5-하이드록시-3-케토흡사노에이트의 특성을 보였다.

[0052] 실시예 3

[0053] (3R,5S) t-부틸 3,5,6-트리하이드록시햡사노에이트의 제조



[0054]

[0055] *Pichia angusta* NCYC R230(1995년 5월 18일 부다페스트 조약에 따라 기탁)을 다음 매질(리터당)에서 Braun Biostat Q 멀티-배양 시스템에서 성장시켰다: 글루코스 40g; $MgSO_4$ 1.2g; K_2SO_4 0.21g; KH_2PO_4 0.69g; H_3PO_4 (농축) 1ml; 이스트 추출물(옥소이드) 2g; $F_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g; 발포방지제 (EEA 142 Foammaster), 미량 원소 용액 1ml(이 용액은 리터당 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02g; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.1g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g; $CaCO_3$ 1.8g 함유함).

[0056] 4 배양물 각각에 250ml의 매질을 채우고 오토클레이빙하여 살균하였다. 7몰 암모늄 하이드록사이드 용액을 사용하여 pH를 4.5로 조절하고 온도를 28℃로 맞춘 다음 공기 유속을 300ml/분으로, 교반기 속도를 1200rpm으로 세팅하였다. 배양물에 글루코스 농도가 20g/리터인 것을 제외하고 상기한 바와 동일한 매질을 포함하는 한천 플레이트(2% 한천)에서 채취한 세포를 넣었다. 배양기에서 22시간 성장시킨후 (5S) t-부틸 3-케토-5,6-디하이드록시햡사노에이트를 가하여 생환원 반응을 개시하였는데; 두 배양물에는 각각 3.75ml를 다른 두개에는 각각 5ml를 채웠다.

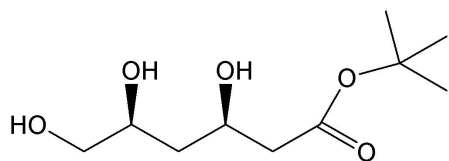
[0057] 기질이 100% 전환될때까지 다시 78시간동안 반응을 계속시켰다. 이 기간동안 배양액에 글루코스 50% 용액을 1-3g 글루코스/리터 배양액/시간의 속도로 공급하여 세포 생존성을 유지하고 환원 분말의 공급원을 제공하였다. 원심분리로 세포를 제거하여 반응을 종결시켰다. 회수한 세포 없는 상청액에 소듐 클로라이드를 가하여 최종 농도를 20% w/v로 하고 혼합물을 동부피의 아세토니트릴로 3회 추출하였다. 폴링시킨 아세토니트릴 추출물을 무수 소듐 설페이트로 건조시키고 로터리 증발기(수조 온도 45℃)에서 감압하에 용매를 제거하여 점성 담황색 오일을 얻었다. 각 반응의 생성물은 (3R,5S) t-부틸 3,5,6-트리하이드록시햡사노에이트인 것으로 확인되었고 각 샘플의 다이아스테레오머 과량을 아래 표에 나타내었다.

실험	다이아스테레오머 과량(%)
1	99.6
2	99.6
3	99.4
4	99.6

[0058]

[0059] 실시예 4

[0060] (3R,5S) t-부틸 3,5,6-트리하이드록시헥사노에이트의 제조



[0061]

[0062] *Pichia angusta* NCYC R320(1995년 5월 18일 부다페스트 조약에 따라 기탁)을 다음 매질(리터당)에서 Braun Biostat Q 멀티-배양 시스템에서 성장시켰다: 글루코스 20g; 암모늄 설페이트 10g; 이스트 추출물(옥소이드) 2g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2g; KH_2PO_4 0.69g; K_2SO_4 0.21g; $F_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g; H_3PO_4 (농축) 1ml; EEA 142 "Foamaster" 발포방지제 0.5ml, 미량 원소 용액 1ml(이 용액은 리터당 $Ca(CH_3CO_2)_2$ 2.85g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.075g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02g; 황산(농축) 1ml 함유).

[0063] 한 배양물에 250ml의 매질을 채우고 오토클레이빙하여 살균하였다. 2몰 소듐 하이드록사이드 용액을 사용하여 pH를 5.0으로 조절하였다. 온도를 28℃, 공기 유속을 분당 250ml, 교반기 속도를 1200rpm으로 세팅하였다. *Pichia angustar* NCYC R320의 한천 플레이트에서 제조한 살균 탈염수내 세포의 2.5ml 상청액을 배양물에 가한다. 17시간 생장시킨후 수성 용액으로서 6.36g의 5(S) t-부틸 3-케토-5,6-디하이드록시헥사노에이트를 가하여 생환원을 개시하였다. 동시에 배양물로의 글루코스 공급을 2g 글루코스/L.h로 개시하였다.

[0064] 기질이 96% 전환될때까지 다시 78시간동안 반응을 계속하였다. 출발 물질 및 생성물을 HPLC로(Hichrom S5 CN-250A 칼럼, 온도 35℃, 유동 상: 수성 TFA(0.1%): 아세토니트릴 95:5, 유속 분당 1ml, 주입 부피 5ml, 굴절 인텍스 검출기) 검출하였다.

[0065] 20분간 4000 x g에서 원심분리하여 세포를 제거하여 반응을 종결시켰다. 회수한 세포 없는 상청액의 pH를 2M의 NaOH를 사용하여 7.5로 조절하였다. $MgSO_4 \cdot 1.6H_2O$ (무수 기준으로 15% w/v)를 세포 없는 상청액에 용해시키고 얻은 용액을 동부피의 2-펜타논으로 두번 추출하였다. 용매 상을 수거하고 45℃에서 로터리 증발기내에서 감압하에 용매를 증발시켜 오렌지색 점성 오일을 얻었다. 이것을 50ml의 건조시킨 증류 2-펜타논에 재용해시키고 다시 로터리 증발기에서 용매를 제거하여 t-부틸 3,5,6-트리하이드록시헥사노에이트(5.08g, 80% 분리수율)를 얻었다. 다이아스테레오머 과량은 다음과 같이 측정하였다: 과량의 트리플루오로아세테이트 무수물에서 실온에서 10분 이상 반응시켜 t-부틸 3,5,6-트리하이드록시헥사노에이트(30mg)를 유도하고 과량의 무수물을 건 질소 스트림하에 제거하고 잔류 오일을 디클로로메탄(1ml)으로 희석하였다. 140℃(등온)에서 Chiralcel Dex CB 칼럼(25미터)을 사용하여 샘플을 분석하였다. 다이아스테레오머는 14.4분에 (3R,5S 다이아스테레오머), 15.7분에 (3S,5S 다이아스테레오머)로 용출되었다. 이 방법으로 측정된 샘플의 다이아스테레오머 과량은 99.7%였다.