

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C07D 473/32 (2006.01) C07D 473/40 (2006.01)		(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년08월30일 10-0577886 2006년05월02일
(21) 출원번호 (22) 출원일자	10-1998-0016803 1998년05월11일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	10-1998-0086933 1998년12월05일
(30) 우선권주장	1116/97 2740/97	1997년05월13일 1997년11월27일	스위스(CH) 스위스(CH)
(73) 특허권자	론자 아게 스위스 체하-3945 감펠/발리스		
(72) 발명자	베르네거 크리스틴 스위스 체하-3985 뮌스터 반호프슈트라쎄 우어만 에바 마리아 스위스 체하-3930 비슈 나폴레옹슈트라쎄 7 버취 올웬 메리 스위스 체하-3930 비슈 바인가르텐베크 16 부르크도르프 쿠르트 스위스 체하-3911 리트-브리크 링그부름 23 브룩스 프랭크 스위스 체하-3942 라롱 하우스 포르메스 라보랑트 에터 카이-사라 스위스 체하-3945 니더감펠 오버도르프 보샤르트 피에르 스위스 체하-1213 오넥스 (칸톤 겐프) 31 에버뉴 두 그로스 웨네 브리덴 발터 스위스 체하-3902 브리크-글리스 그룬트빌슈트라쎄9 뒤끄 로렝 스위스 체하-3971 체르미그논 고르돈 존 스위스 체하-3904 나터즈 푸르카슈트라쎄 39 오뮌르취 끌름 스위스 체하-3930 비슈 게브라이텐베크 4베 구기스베르크 웍스		

스위스 체하-3930 지에레 로토른 11

(74) 대리인

특허법인코리아나

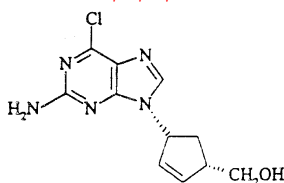
심사관 : 김경미

(54) (1S,4R)-또는(1R,4S)-4-(2-아미노-6-클로로-9H-푸린-9-일)-2-시클로펜텐-1-메탄올의제조방법

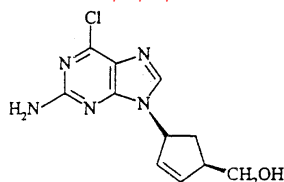
요약

하기 화학식 1 또는 2 의 (1S,4R)- 또는 (1R,4S)-4-(2-아미노-6-클로로-9H-푸린-9-일)-2-시클로펜텐-1-메탄올의 신규 제조 방법을 기재한다. 이것은 제 1 단계에서 하기 화학식 3 의 (±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온을 아실화시켜 하기 화학식 4 의 (±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 유도체를 얻고, 제 2 단계에서 이것을 환원시켜 하기 화학식 5 의 시클로펜텐 유도체를 얻으며, 그 다음 제 3 단계에서 시클로펜텐 유도체를 생물공학적으로 하기 화학식 6 또는 7 의 (1R,4S)- 또는 (1S,4R)-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐으로 전환시키고, 제 4 단계에서 이것을 하기 화학식 8 의 N-(2-아미노-4,6-디클로로-5-피리미디닐)포름아미드를 이용하여 하기 화학식 9 또는 10 의 (1S,4R)- 또는 (1R,4S)-4-[(2-아미노-6-클로로-5-포름아미도-4-피리미디닐)아미노]-2-시클로펜텐-1-메탄올로 전환시키며, 제 5 단계에서 이것을 공지된 방식으로 고리화시켜 하기 화학식 1 또는 2 의 최종 생성물을 얻는 것을 수반한다:

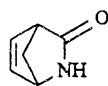
화학식 1



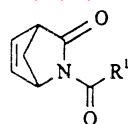
화학식 2



화학식 3

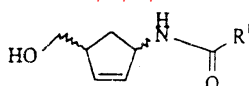


화학식 4

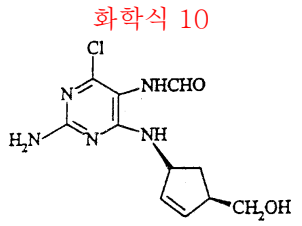
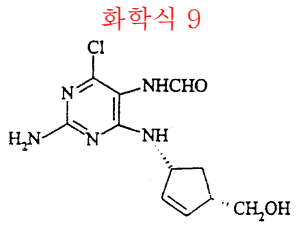
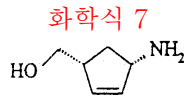
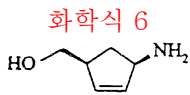


[식중, R¹ 은 C_{1~4}-알킬, C_{1~4}-알콕시, 아릴 또는 아릴옥시를 나타낸다],

화학식 5



[식중, R¹ 은 상기 의미를 갖는다],



대표도

도 1

명세서

도면의 간단한 설명

도 1 은 pH 의 함수로서 로도코쿠스 에리트르폴리스(Rhodococcus erythropolis) CB 101 (DSM 10686) 로부터 N-아세틸아미노-알콜 가수분해효소 (무세포 추출물)의 활성을 나타낸다. 실시예 16.2 에 기재된 반응에 대한 온도 최적 조건은 25 내지 30 ℃ 이다.

도 2 는 온도의 함수로서 로도코쿠스 에리트르폴리스 CB 101 (DSM 10686) 으로부터 N-아세틸아미노-알콜 가수분해효소(무세포 추출물)의 활성을 나타낸다.

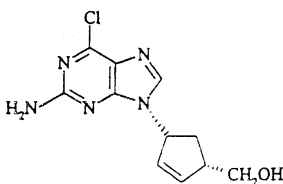
발명의 상세한 설명

발명의 목적

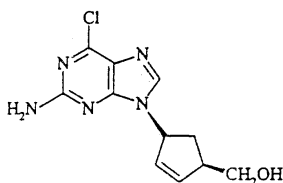
발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 하기 화학식 1 또는 2 의 (1S,4R)- 또는 (1R,4S)-4-(2-아미노-6-클로로-9H-푸린-9-일)-2-시클로펜텐-1-메탄올의 신규 제조 방법 및 하기 화학식 16 또는 17 의 광학 활성 화합물의 신규 제조 방법에 관한 것이다.

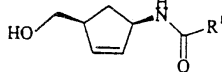
[화학식 1]



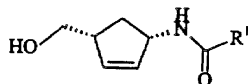
[화학식 2]



화학식 16



화학식 17



(1S,4R)-4-(2-아미노-6-클로로-9H-푸린-9-일)-2-시클로펜텐-1-메탄올은 2-아미노푸린 뉴클레오시드의 제조, 예컨대 (1S,4R)-4-[2-아미노-6-(시클로프로필아미노)-9H-푸린-9-일]-2-시클로펜텐-1-메탄올(WO 95/21 161)의 제조 또는 1592U89의 제조(J. Org. Chem., 1996, 61, 4192~4193; J. Org. Chem., 1996, 61, 7963~7966)에 중요한 중간체이다.

(1S,4R)-4-아미노-2-시클로펜텐-1-메탄올에서 출발한 (1S,4R)-4-(2-아미노-6-클로로-9H-푸린-9-일)-2-시클로펜텐-1-메탄올의 제조 방법을 WO 95/21 161에 기재한다. 이 방법의 단점은 선구물질 (1S,4R)-4-아미노-2-시클로펜텐-1-메탄올을 값비싼 BOC 보호기(tert-부틸옥시카르보닐 보호기)에 의해 치환된 (±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온을 거쳐야만 수득할 수 있다는 것이다(J. Org. Chem., 1995, 60, 4602~4616).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

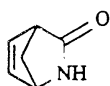
본 발명의 목적은 (1S,4R)- 또는 (1R,4S)-4-(2-아미노-6-클로로-9H-푸린-9-일)-2-시클로펜텐-1-메탄올의 단순, 저비용 및 더욱 경제적인 제조 방법을 제공하는 것이다.

이 목적을 청구항 1에 따른 신규 방법에 의해 달성하였다.

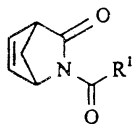
발명의 구성 및 작용

신규 방법에서 제 1 단계는 하기 화학식 3의 (±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온을 아실화시켜 하기 화학식 4의 (±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 유도체를 얻는 것이다.

[화학식 3]



[화학식 4]



[식중, R¹ 은 C_{1~4}-알킬, C_{1~4}-알콕시, 아릴 또는 아릴옥시를 나타낸다].

C_{1~4}-알킬은 치환 또는 비치환될 수 있다. 치환된 C_{1~4}-알킬은 이후 할로겐 원자에 의해 치환된 C_{1~4}-알킬을 의미한다. F, Cl, Br 또는 I를 할로겐 원자로서 사용할 수 있다. C_{1~4}-알킬의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 이소부틸, tert-부틸, 이소프로필, 클로로메틸, 브로모메틸, 디클로로메틸, 디브로모메틸이다. 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 이소부틸 또는 클로로메틸을 C_{1~4}-알킬로서 사용하는 것이 바람직하다.

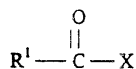
C_{1~4}-알콕시로서, 예를 들어, 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 부톡시, tert-부톡시 또는 이소부톡시를 사용하는 것이 가능하다. 바람직하게 사용되는 C_{1~4}-알콕시는 tert-부톡시이다.

아릴로서, 예를 들어, 페닐 또는 벤질, 바람직하게는 페닐을 사용하는 것이 가능하다. 벤질옥시 또는 페녹시를 예를 들어 아릴옥시로서 사용할 수 있다.

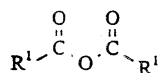
선구물질 (±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온을 EP-A 0 508 352 에 기재된대로 제조할 수 있다.

아실화를 하기 화학식 11 의 카르보닐 할라이드 또는 하기 화학식 12 의 카르복실산 무수물로 실행할 수 있다.

화학식 11



화학식 12



[식중, R¹ 은 상기 의미를 갖고, X 는 할로겐 원자를 나타낸다]. 할로겐 원자로서 F, Cl, Br 또는 I 를 사용할 수 있다. Cl 또는 F 를 사용하는 것이 바람직하다.

카르보닐 할라이드의 예는 아세틸 클로라이드, 클로로아세틸 클로라이드, 부티릴 클로라이드, 이소부티릴 클로라이드, 페닐아세틸 클로라이드, 벤질 클로로포르메이트(Cbz-Cl), 프로피오닐 클로라이드, 벤조일 클로라이드, 알릴 클로로포르메이트 또는 tert-부틸옥시카르보닐 플루오라이드이다. 카르복실산 무수물의 예는 디-tert-부틸 디카르보네이트, 부티르산 무수물, 아세트산 무수물 또는 프로피온산 무수물이다.

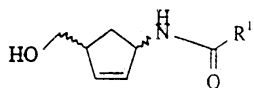
아실화를 용매 없이 또는 비양성자성 용매와 함께 실행할 수 있다.

아실화를 비양성자성 용매에서 실행하는 것이 편리하다. 적당한 비양성자성 용매의 예는 디이소프로필 에테르, 피리딘, 아세토니트릴, 디메틸포름아미드, 트리에틸아민, 테트라히드로푸란, 톨루엔, 염화메틸렌, N-메틸피롤리돈 또는 이의 혼합물이다.

아실화를 -80 내지 50 ℃, 바람직하게는 0 내지 25 ℃ 의 온도에서 실행하는 것이 편리하다.

신규 방법의 제 2 단계에서, 화학식 4 의 (±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 유도체를 환원시켜 하기 화학식 5 의 시클로펜텐 유도체를 얻는다.

[화학식 5]



[식중, R¹ 은 상기 의미와 같다].

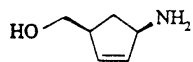
환원 반응을 알칼리 금속 보로히드라이드 또는 알칼리 토금속 보로히드라이드, 알칼리 금속 알루미늄 히드라이드 또는 알칼리 토금속 알루미늄 히드라이드, 또는 비트라이드(Vitride)(나트륨 비스(2-메톡시에톡시)알루미늄 히드라이드)로 실행하는 것이 편리하다. 나트륨 또는 칼륨 알루미늄 히드라이드를 알칼리 금속 알루미늄 히드라이드로서 사용할 수 있다. 나트륨 또는 칼륨 보로히드라이드를 알칼리 금속 보로히드라이드로서 사용할 수 있다. 칼슘 보로히드라이드를 알칼리 토금속 보로히드라이드로서 사용할 수 있다. 알루미늄 니트라이드를 예를 들어 니트라이드로서 사용할 수 있다.

환원 반응을 양성자성 용매에서 실행하는 것이 편리하다. 사용될 수 있는 양성자성 용매는 저급 지방족 알콜, 예컨대 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, sec-부탄올, tert-부탄올, 이소부탄올 또는 물, 또는 상기 알콜 및 물의 혼합물이다.

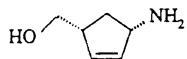
환원 반응을 -40 °C 내지 40 °C, 바람직하게는 0 내지 20 °C 의 온도에서 실행하는 것이 편리하다.

신규 방법에서 제 3 단계인, 화학식 5 의 시클로펜텐 유도체를 하기 화학식 6 또는 7 의 (1R,4S)- 또는 (1S,4R)-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐으로 전환하는 것은 미생물 또는 N-아세틸아미노-알콜 가수분해효소 활성을 지닌 효소를 이용하여 또는 페니실린 G 아실라제를 이용하여 실행한다. 이 생체변환은 아실화된 (1S,4R)- 또는 (1R,4S)-아미노알콜 유도체를 전환시켜 (1R,4S)- 또는 (1S,4R)-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐(화학식 6, 7)을 생성한다.

[화학식 6]



[화학식 7]



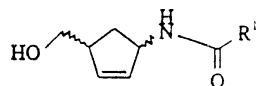
화학식 5 의 시클로펜텐 유도체를 단독 질소원, 단독 탄소원 또는 단독 탄소 및 질소원으로서 이용하는 모든 미생물이 상기 생체변환에 적합하다. 미생물을 종래 미생물학적 기술의 도움으로 토양 샘플, 슬러지 또는 폐수로부터 분리시킬 수 있다. 미생물을 하기 화학식 5 의 시클로펜텐 유도체를

·단독 탄소 및 질소원으로서

·적당한 탄소원을 지닌 단독 질소원으로서 또는

·적당한 질소원을 지닌 단독 탄소원으로서 함유하는 영양 배지에서 이들을 종래 방식으로 배양시켜 분리한다:

[화학식 5]



[식중, R¹ 은 상기 의미를 갖는다].

화학식 5 의 적당한 시클로펜텐 유도체의 예는 N-아세틸-, N-프로피오닐-, N-이소부틸-, N-tert-부톡시카르보닐-(N-BOC), N-부틸-, 또는 N-페닐아세틸-1-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐이다.

미생물은 적당한 질소원으로서, 예를 들어, 암모늄, 니트레이트, 아미노산 또는 우레아(Urea)를 증식용 기질로서 사용할 수 있다. 미생물은 적당한 탄소원으로서, 예를 들어, 당, 당알콜, C₂~C₄-카르복실산 또는 아미노산을 증식용 기질로서 사용할 수 있다. 글루코스 또는 펜토스와 같은 헥소스를 당으로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 글리세롤을 당알콜로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 아세트산 또는 프로피온산을 C₂~C₄-카르복실산으로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 류신, 알라닌, 아스파라긴을 아미노산으로서 사용할 수 있다.

사용될 수 있는 선택 배지 및 배양기는 당업자들 사이에 통상적인 것, 예컨대 표 1 에 기재된 것, 또는 완전 배지(효모 추출 물을 함유하는 배지) 예컨대 영양 효모 육즙 (NYB)이고, 바람직하게는 표 1 에 기재된 것을 이용한다.

배양 및 선택 동안에, 미생물의 활성 효소를 유발시키는 것이 편리하다. 화학식 5 의 시클로펜텐 유도체를 효소 유발인자로 사용할 수 있다.

배양 및 선택은 20 °C 내지 40 °C, 바람직하게는 30 °C 내지 38 °C 의 온도 및 pH 5.5 내지 pH 8, 바람직하게는 pH 6.8 내지 pH 7.8 의 pH 에서 통상 발생한다.

시클로펜텐 유도체의 (1R,4S) 이성질체를 단독 탄소원, 단독 탄소 및 질소원 또는 단독 질소원으로서 이용하는 미생물로 생체변환을 실행하는 것이 편리하다.

알칼리제니스(Alcaligenes)/보르데텔라(Bordetella) 속, 로도코쿠스 속, 아르트로박터(Arthrobacter) 속, 알칼리제니스 속, 아그로박테리움(Agrobacterium)/리조비움(Rhizobium) 속, 바실루스(Bacillus) 속, 슈도모나스(Pseudomonas) 속 또는 고르도나(Gordona) 속, 특히 알칼리제니스/보르데텔라 FB 188 (DSM 11172) 종, 로도코쿠스 에리트로폴리스 CB 101 (DSM 10686) 종, 아르트로박터 sp. HSZ5 (DSM 10328) 종, 로도코쿠스 sp. FB 387 (DSM 11291) 종, 알칼리제니스 크실로속시단스(xylosoxydans) ssp. 데니트리피칸스(Denitrificans) HSZ17 (DSM 10329) 종, 아그로박테리움/리조비움 HSZ30 종, 바실루스 심플렉스(Simplex) K2 종, 슈도모나스 푸티다(putida) K32 종 또는 고르도나 sp. CB 100 (DSM 10687) 종의 미생물과 이의 기능적으로 동등한 변종 및 돌연변이체를 이용하여 생체변환을 실행하는 것이 바람직하다. 마셔오더백 1 베, 데38124 브라운슈바이크에 있는 도이체 잠룽 폰 미크로올가니스멘 운트 쉘쿨투어렌 게엠베하(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)에서 부다페스트 협약에 따른 기탁이 미생물 DSM 10686 및 10687 에 대해 1996 년 5 월 20 일, 미생물 DSM 10328 및 DSM 10329 에 대해 1995 년 11 월 6 일, 미생물 DSM 11291 에 대해 1996 년 10 월 8 일 및 미생물 DSM 11172 에 대해 1996 년 9 월 20 일에 일어났다.

"기능적으로 동등한 변종 및 돌연변이체"는 원미생물과 본질적으로 동일한 성질 및 기능을 갖는 미생물을 의미한다. 이런 형태의 변종 및 돌연변이체를 우연히, 예를 들어 UV 방사에 의해 제조할 수 있다.

알칼리제니스/보르데텔라 FB 188 (DSM 11172) 의 분류학적 기재

세포 형태 간상균

폭(μm) 0.5~0.6

길이(μm) 1.0~2.5

운동성 +

편모 발생 주모성

그람(Gram) 반응 -

3 % KOH 에 의한 세포 용해 +

아미노펩티다제(세르니(Cerny)) +

포자 -

옥시다제 +

카탈라제 +

ADH(알콜 탈수소효소) -

NO₃ 로부터 NO₂ -

탈질소작용 -

우레아제 -

젤라틴의 가수분해 -

하기로부터의 산(OF 시험):

글루코스 -

프루토스 -

아라비노스 -

아디페이트 +

카프레이트 +

시트레이트 +

말레이트 +

만니톨 -

로도코쿠스 에리트로폴리스 CB 101 (DSM 106 86) 의 분류학적 기재

1. 콜로니의 형태 및 색채: 노후시, 간상균 및 구균으로 분해하는 단지 균사(short branched hyphae), 반짝이고 부분적으로 융합성인 콜로니, 핑크색조의 베이지색, RAL 1001;
 2. 펩티도글리칸의 규명된 아미노산: 메조디아미노피멜산;
 3. 미콜산: 로도코쿠스 미콜산; 미콜산쇄 길이(C₃₂~C₄₄)의 측정 및 DSM 미콜산 데이터 बैं크에서 엔트리를 지닌 데이터의 비교는 로도코쿠스 에리트로폴리스 균주의 패턴과 매우 대단한 유사도를 나타낸다(유사도 0.588).
 4. 지방산 패턴: 미분지형, 포화 및 불포화 지방산 + 투베르쿨로스테아르산.
 5. 균주의 16S rDNA 의 부분적 서열에 관해, 로도코쿠스 에리트로폴리스의 특정 부위의 서열과 고수준의 일치도(100 %)을 발견하였다.
- 세가지 상호 독립적인 방법(미콜산, 지방산, 16S rDNA)이 특정 로도코쿠스 에리트로폴리스에 균주를 할당했기 때문에 확인 결과는 분명하다.

고르도나 sp. CB 100 (DSM 10687) 속의 분류학적 기재

1. 콜로니의 형태 및 색채: 노후시, 간상균 및 구균으로 분해하는 단지 균사, 연한 오렌지색 콜로니, (RAL 2008);
2. 펩티도글리칸의 규명된 아미노산: 메조디아미노피멜산;
3. 메나퀴논 패턴: MK-9 (H₂) 100 %;
4. 미콜산: 고르도나 미콜산; 미콜산쇄 길이(C₅₀~C₆₀)를 고온 기체 크로마토그래피에 의해 측정했다. 이 패턴은 고르도나 속의 표본에서 발견된 패턴에 일치한다.
5. 지방산 패턴: 미분지형, 포화 및 불포화 지방산 + 투베르쿨로스테아르산.
6. 균주의 16S rDNA 의 부분적 서열에 관해, 고르도나 루브로퍼팅타(rubropertincta) 의 특정 부위의 서열과 상대적으로 저일치도(98.8 %)을 발견하였다.

유용한 결과(메나퀴논, 미콜산, 지방산, 16S rDNA)에 기초하여, 비록 분리 균을 고르도나속에 명확하게 할당할 수 있어도 공지된 고르도나 속에 할당하는 것은 상기 결과에 기초하여 가능하지 않다. 그러므로 균주 DSM 10687 는 신규이고, 이전에 기재되지 않은 고르도나속의 종으로 추정된다.

알칼리제니스 크실로속시단스 ssp. 데니트리피칸스 HSZ 17 (DSM 10329) 의 분류학적 기재

균주의 특성

세포 형태 간상균

폭(μm) 0.5~0.6

길이(μm) 1.5~3.0

운동성 +

편모 발생 주모성

그람 반응 -

3 % KOH 에 의한 세포 용해 +

아미노펩티다제(세르니) +

포자 -

옥시다제 +

카탈라제 +

혐기성 증식 -

ADH(알콜 탈수소효소) +

NO₃ 로부터 NO₂ +

탈질소작용 +

우레아제 -

젤라틴의 가수분해 -

트윈(Tween) 80 의 가수분해 -

하기로부터의 산(OF 시험):

글루코스 호기성 -

크실로스 80 -

기질 이용

글루코스 -

프룩토스 -

아라비노스 -

시트레이트 +

말레이트 +

만니톨 -

아르트로박터 sp. HSZ5 (DSM 10328) 의 분류학적 기재

특성: 뚜렷한 간상-구균 증식 주기를 갖는 그람 양성 불규칙 간상균; 엄격히 호기성; 글루코스로부터 산 또는 기체 형성이 없음.

운동성 -

포자 -

카탈라제 +

세포벽에서 메조디아미노피멜산: 없음

펩티도글리칸 형태: A3a, L-Lys-L-Ser-L-Thr-L-Ala

16S rDNA 서열 유사도: 최대 변이성으로 국부를 서열화시키는 것에 관해 발견된 최고값은 아르트로박터 파센스 (pascens), A. 라모수스(ramosus) 및 A. 옥시단스(oxydans)의 98.2 % 이었다.

아그로박테리움/리조비움 HSZ30 의 분류학적 기재

세포 형태 다형태성 간상균

폭(μm) 0.6~1.0

길이(μm) 1.5~3.0

그람 반응 -

3 % KOH 에 의한 세포 용해 +

아미노펩티다제 +

포자 -

옥시다제 +

카탈라제 +

운동성 +

혐기성 증식 -

질산염으로부터 아질산염 -

탈질소작용 -

우레아제 +

젤라틴의 가수분해 -

하기로부터의 산:

L-아라비노스 +

갈락토스 -

멜레지토스(Melezitose) -

푸코스 +

아라비톨 -

만니톨 -

에리트리톨 -

리트머스 밀크의 알칼리화 +

케토락토스 -

16S rDNA 의 부분적 서열화는 아그로박테리움 및 리조비움 속들의 표본과 상당히 큰 유사도 약 96 % 를 나타낸다. 이들 속들 내에 기재된 종에 명확한 할당은 불가능하다.

바실루스 심플렉스 K2 의 분류학적 기재

세포 형태 간상균

폭(μm) 0.8~1.0

길이(μm) 3.0~5.0

포자 -

엘리프소이달(Ellipsoidal) -

환상 -

포자낭 -

카탈라제 +

혐기성 증식 -

VP 반응 n.g.

최대 온도

양성 증식(℃) 40

음성 증식(℃) 45

pH 5.7 에서 증식 -

NaCl 2 % +

5 % -

7 % -

10 % -

라이소자임 배지 +

하기로부터 산(ASS)

D-글루코스 +

L-아라비노스 +

D-크실로스 -

D-만니톨 +

D-프룩토스 +

프룩토스로부터 기체 -

레시티나제(Lecithinase) -

하기의 가수분해

전분 +

젤라틴 +

카세인 -

트윈 80 +

에스쿨린(Aesculin) -

하기의 이용

시트레이트 +

프로피오네이트 -

질산염으로부터 아질산염 +

인돌 -

페닐알라닌 디아미나제(deaminase) -

아르기닌 탈가수분해효소 -

세포성 지방산의 분석은 바실루스속의 할당을 확인하게 한다.

16S rDNA 의 부분적 서열화는 바실루스 심플렉스와 유사도 100 % 를 나타낸다.

슈도모나스 푸티다 K32 의 분류학적 기재

세포 형태 간상균

폭(μm) 0.8~0.9

길이(μm) 1.5~4.0

운동성 +

편모 발생 극성 > 1

그람 반응 -

3 % KOH 에 의한 세포 용해 +

아미노펩티다제 +

포자 -

옥시다제 +

카탈라제 +

혐기성 증식 -

안료

형광제 +

피오시아닌(Pyocyanin) -

ADH +

질산염으로부터 아질산염 -

탈질소작용 -

우레아제 -

젤라틴의 가수분해 -

기질 이용

아디페이트 -

시트레이트 +

말레이트 +

D-만델레이트 +

페닐아세테이트 +

D-타트레이트 -

D-글루코스 +

트레할로스(Trehalose) -

만니톨 -

벤조일포르메이트 -

프로필렌 글리콜 +

부틸아민 +

벤질아민 +

트리프트아민(Tryptamine) -

아세트아미드 +

히푸레이트(Hippurate) +

세포성 지방산의 윤곽은 슈도모나스 푸티다의 전형이다.

16S rDNA 의 부분적 서열화는 슈도모나스 멘도시나 및 슈도모나스 알칼리제니스와 유사도 약 98 % 를 나타낸다. 슈도모나스 푸티다와의 유사도는 97.4 % 이다.

로도코쿠스 sp. FB 387 (DSM 11291) 의 분류학적 기재

1. 콜로니의 형태 및 색채: 노후시, 간상균 및 구균으로 분해하는 단지 균사, 윤이 없는, 연한 붉은오렌지색 콜로니 RAL 2008;

2. 펩티도글리칸의 규명된 아미노산: 메조디아미노피멜산;

3. 미콜산: 로도코쿠스 미콜산; 미콜산쇄 길이($C_{32} \sim C_{44}$)의 측정 및 DSMZ 미콜산 데이터뱅크에서 엔트리를 지닌 데이터의 비교는 로도코쿠스 루버(ruber) 균주의 패턴과 매우 작은 유사도만을 나타낸다(유사도 0.019). 이 상관인자는 종 확인으로 사용되기에는 너무 낮다.

4. 지방산 패턴: 미분지형, 포화 및 불포화 지방산 + 투베르쿨로스테아르산. 이 지방산 패턴은 로도코쿠스속 및 이의 밀접한 관계에 있는 것 예컨대 미코박테리움, 노카르디아 및 고르도나의 모든 표본에 대해 규명되었다. 지방산 패턴에서 질적 및 양적 차이를 포함시킴으로써 종 수준으로의 분화를 실행하려는 시도를 하였다. 로도코쿠스 sp. FB 387의 지방산 패턴과 데이터뱅크에서 엔트리를 비교하는데 수많은 방법을 사용하였다. 작은 유사도(0.063) 때문에, 로도코쿠스 sp. FB 387을 임의의 기재 로도코쿠스 종에 이 방법으로 할당하는 것이 불가능하였다.

5. 균주의 16S rDNA의 부분적 서열에 관해, 96-818을 상관관계 97.9%의 로도코쿠스 오파쿠스(opacus)에 할당한다. 이 서열 일치치는 이 분류군에 명확한 종 할당에 필요한 99.5% 훨씬 밑이다.

유용한 결과에 기초하여, 균주 로도코쿠스 sp. FB 387는 신규이고 이전에 기재되지 않은 로도코쿠스 종으로 추정할 수 있다.

이들 미생물의 종래 초기 배양후, 무활동 세포(탄소 및 에너지원이 더 이상 필요없는 무증식 세포) 또는 증식 세포로 생체변환을 실행할 수 있다. 바람직하게는 무활동 세포로 생체변환을 실행한다.

생체변환에 적합한 N-아세틸아미노-알콜 가수분해효소 활성을 지닌 효소를 예를 들어 당업계에서 일반적인 분열에 의해 기재된 미생물 세포로부터 단리할 수 있다. 이것을 위해 예를 들어 초음파 또는 프렌치 프레스(French press)법을 이용하는 것이 가능하다. 이들 효소를 로도코쿠스 에리트로폴리스 CB101 (DSM 10686)의 미생물로부터 단리하는 것이 바람직하다.

적당한 페니실린 G 아실라제를 다수 미생물, 예컨대, 박테리아 또는 방선균류, 구체적으로 하기 미생물: 대장균 ATCC 9637, 바실루스 메가테리움, 스트렙토마이세스 라벤둘레(*Streptomyces lavendulae*) ATCC 13664, 노카르디아(*Nocardia*) sp. ATCC 13635, 프로비덴시아 레트게리(*Providencia rettgeri*) ATCC 9918, 아르트로박터 비스코수스(*Arthrobacter viscosus*) ATCC 15294, 로도코쿠스 파스시안스(*Rhodococcus fascians*) ATCC 12975, 스트렙토마이세스 페오크로모젠스(*Streptomyces phaeochromogenes*) ATCC 21289, 아크로모박터(*Achromobacter*) ATCC 23584 및 미크로코쿠스 로제우스(*Micrococcus roseus*) ATCC 416 으로부터 수득한다. 예컨대 대장균(*E.coli*)(보링거 만하임) 또는 바실루스 메가테리움으로부터의 페니실린 G 아실라제 EC 3.5.1.11 과 같은 구할 수 있는 페니실린 G 아실라제를 특히 사용한다.

고정화된 페니실린 G 아실라제를 바람직한 구현예에서 사용한다.

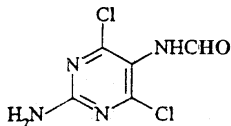
생체변환을 당업계에서 일반적인 배지, 예컨대 물에, 낮은 몰농도의 인산염, 시트르산염 또는 헤페스(Hepes) 완충용액에서, 완전 배지, 예컨대 영양 효모 육즙(NYB) 또는 표에 기재된 것에서 실행할 수 있다. 생체변환을 표 1에서 나타낸 배지에서 또는 낮은 몰농도의 인산염 완충용액에서 실행하는 것이 바람직하다.

시클로펜텐 유도체(화학식 5)의 1 회 또는 연속 첨가로 생체변환을 실행시켜 농도가 10 중량%, 바람직하게는 2 중량%를 초과하지 않도록 하는 것이 편리하다.

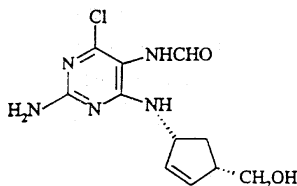
생체변환 중의 pH는 5 내지 9, 바람직하게는 6 내지 8의 범위일 수 있다. 생체변환을 20 내지 40 °C, 바람직하게는 25 내지 30 °C 온도에서 실행시키는 것이 편리하다.

제 4 단계에서, 하기 화학식 8 의 N-(2-아미노-4,6-디클로로-5-피리미디닐)포름아미드를 이용하여 시클로펜텐 유도체 (화학식 6 또는 7)를 하기 화학식 9 또는 10 의 (1S,4R)- 또는 (1R,4S)-4-[(2-아미노-6-클로로-5-포름아미도-4-피리미디닐)아미노]-2-시클로펜텐-1-메탄올로 전환시킨다.

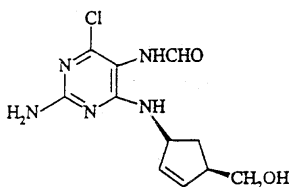
[화학식 8]



[화학식 9]



[화학식 10]



N-(2-아미노-4,6-디클로로-5-피리미디닐)포름아미드를 WO 95/21 161 에 기재된 것과 같이 제조할 수 있다.

제 4 단계에서 반응을 염기의 존재하 실행시키는 것이 편리하다. 유기 염기 및 무기 염기를 염기로서 사용할 수 있다. 트리알킬아민을 유기 염기로서 사용할 수 있다. 사용되는 트리알킬아민의 예는 트리에틸아민, 트리부틸아민, 트리벤질아민, 피리딘 또는 N-메틸피롤리딘이다. 사용할 수 있는 무기 염기의 예는 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 카르보네이트, 또는 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 비카르보네이트, 예컨대 칼륨 카르보네이트 및 나트륨 비카르보네이트이다.

제 4 단계에서 반응을 양성자성 용매에서 실행시키는 것이 바람직하다. 저급 지방족 알콜 예컨대 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이소부탄올을 양성자성 용매로서 사용할 수 있다.

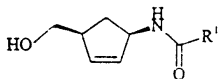
제 4 단계에서 반응을 0 내지 150 °C, 바람직하게는 20 내지 100 °C 의 온도에서 실행시키는 것이 편리하다.

제 5 단계에서, (1S,4R)- 또는 (1R,4S)-4-[(2-아미노-6-클로로-5-포름아미도-4-피리미디닐)아미노]-2-시클로펜텐-1-메탄올(화학식 9, 10)을 WO 95/21 161 에 기재된 대로 공지된 방식으로 고리화시켜 화학식 1 또는 2 의 최종 생성물을 얻는다.

고리화를 진한 수성산의 존재하에서 트리알킬 오르토포르메이트에 용해하여 실행시키는 것이 통상이다. 사용될 수 있는 트리알킬 오르토포르메이트의 예는 트리메틸 또는 트리에틸 오르토포르메이트이다. 수성산으로서, 예를 들어, 염산, 황산 또는 메탄술폰산을 사용하는 것이 가능하다.

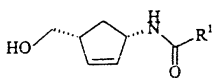
본 발명은 또한 하기 화학식 16 및 17 의 광학 활성 화합물의 제조 방법에 관한 것이다.

[화학식 16]



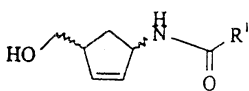
[식중, R¹ 은 상기 의미를 갖는다],

[화학식 17]



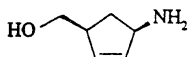
[식중, R¹ 은 상기 의미를 갖는다]. 이전에 이미 기재한 미생물, N-아세틸아미노-알콜 가수분해효소 또는 페니실린 G 아실라제를 이용하여 하기 화학식 5 의 시클로펜텐 유도체를 하기 화학식 6 또는 7 의 (1R,4S)- 또는 (1S,4R)-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐으로 전환시켜 이들 화합물을 얻을 수 있고 후자를 화학식 16 또는 17 의 화합물로 아실화한다.

[화학식 5]

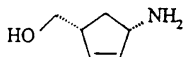


[식중, R¹ 은 상기 의미를 갖는다]

[화학식 6]



[화학식 7]



미생물학적 전환 및 아실화 모두를 그 자체로 상기와 동일한 조건하에서 실행시킨다.

이 아실화를 20 °C 내지 100 °C, 바람직하게는 0 °C 내지 80 °C 온도에서 실행시키는 것이 편리하다.

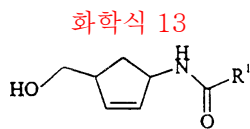
이 방법에 의해 제조되는 광학 활성 화합물의 예는 ee 98 % 의 (1R,4S)-N-

tert-부톡시카르보닐-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐, ee 98 % 의 (1R,

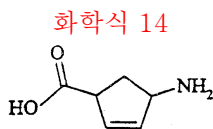
4S)-N-아세틸-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐, ee 98 % 의 (1R,4S)-N-부티릴-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐, 광학 활성 (1S,4R)-N-아세틸-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐 및 광학 활성 (1S,4R)-N-부티릴-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐이다.

이들 화합물중, 광학 활성 (1R,4S)-N-부티릴-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐은 문헌에서 아직 기재되지 않은 화합물이다. 따라서, 본 발명은 ee 0 % 초과, 바람직하게는 ee 80 %, 90 % 또는 95 % 이상, 특히 ee 98 % 이상의 광학 활성 (1R,4S)-N-부티릴-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐에 또한 관한 것이다. 이들 광학 활성 화합물을 숙련자에 공지된 방식으로 라세미화시켜 문헌에 아직 기재되지 않은 라세미 N-부티릴-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐을 얻을 수 있다.

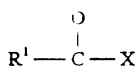
제 1 단계에서, 라세미체 또는 이의 광학 활성 이성질체들중의 한 형태로 하기 화학식 14 의 시클로펜텐-4-카르복실산을 하기 화학식 11 의 카르보닐 할라이드로 아실화시켜 하기 화학식 15 의 라세미 또는 광학 활성 시클로펜텐-4-카르복실산 유도체를 수득하고, 제 2 단계에서 이것을 하기 화학식 13 의 목적 생성물로 환원시킴에 의해 화학식 13 의 라세미 또는 광학 활성 4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐 유도체의 제조 방법을 실행시킨다.



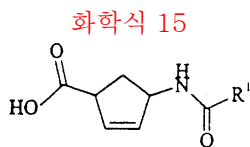
[식중, R¹ 은 상기 의미를 갖는다]



[화학식 11]



[식중, R¹ 및 X 는 상기 의미를 갖는다],



광학 활성 4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐 유도체(화학식 13) 및 광학 활성 시클로펜텐-4-카르복실산 유도체(화학식 15)는 대응 (1R,4S) 또는 (1S,4R) 이성질체를 의미한다.

이 방법의 제 1 단계, 아실화를 화학식 11 의 카르보닐 할라이드로 실행시킨다. 사용될 수 있는 카르보닐 할라이드는 상기 와 동일한 것이고, tert-부틸옥시카르보닐 플루오라이드를 사용하는 것이 바람직하다.

제 1 단계에서 반응을 8 내지 14, 바람직하게는 12 내지 14 의 pH, 0 내지 50 ℃, 바람직하게는 15 내지 25 ℃ 의 온도에서 실행하는 것이 편리하다.

적당한 용매는 물과 에테르의 혼합물이다. 사용될 수 있는 에테르는 디옥산, 테트라히드로푸란, 디에틸 에테르, 글리콜 디메틸 또는 디에틸 에테르이다.

이 방법의 제 2 단계, 환원 반응을 알칼리 금속 알루미늄 히드라이드, 보란/디-C_{1~4}-알킬 술피드 착물 또는 보란/테트라히드로푸란 착물로 실행할 수 있다. 리튬, 나트륨 또는 칼륨 알루미늄 히드라이드를 알칼리 금속 알루미늄 히드라이드로서 사용할 수 있고, 리튬 알루미늄 히드라이드를 사용하는 것이 바람직하다. 보란/디메틸 술피드, 보란/디에틸 술피드, 보란/디프로필 술피드 또는 보란/디부틸 술피드 착물을 보란/디-C_{1~4}-알킬 술피드 착물로서 사용할 수 있다. 보란/디메틸 술피드 착물을 사용하는 것이 바람직하다.

물 없이, 제 2 단계에서 상기 에테르중의 하나를 용매로서 사용하는 것이 편리하다.

제 2 단계에서 반응을 -50 ℃ 내지 5 ℃, 바람직하게는 -25 ℃ 내지 -10 ℃ 온도에서 실행시킬 수 있다.

실시예:

실시예 1

(±)-2-아세틸-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온의 제조

(±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 100 g 을 질소하에서 아세토니트릴(800 ml) 및 피리딘(161.26 ml)에 용해시킨다. 12 °C 에서, 아세틸 클로라이드 104.5 g 을 2 시간에 걸쳐 적가한다. 그 다음 혼합물을 4.5 시간 동안 실온에서 교반시킨다. 물 800 ml 를 혼합물에 첨가하고, 아세토니트릴을 진공내에서 증발제거시킨다. 수성상을 아세트산에틸 400 ml 로 3 회 추출시킨다. 합한 유기상을 1N HCl(400 ml), 물(400 ml), 포화 NaCl(400 ml)로 세정하고, 황산마그네슘으로 건조시키며 완전히 증발시킨다. 잔류물을 염화메틸렌으로 취하고 실리카겔을 통해 여과시킨다. 여과물을 농축시키고 생성물을 증류에 의해 정제시킨다. 생성물 107.76 g 을 맑은 액체로서 수득하였다. 수율은 71 % 였다.

비점 (0.07 토르): 51 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ[ppm] 400 MHz

2.25(AB syst., 2H); 2.8(s, 3H); 3.42(m, 1H); 5.30(m, 1H); 6.89(m, 1H); 6.92(m, 1H).

실시예 2

(±)-2-부티릴-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온의 제조

(±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 100.3 g 을 질소하에서 아세토니트릴(720 ml) 및 피리딘(142 ml)에 용해시킨다. 12 °C 에서, 부티릴 클로라이드 141.8 g 을 1 시간에 걸쳐 적가한다. 그 다음 반응을 실온에서 3 시간 동안 교반시킨다. 물 720 ml 를 혼합물에 첨가하고, 상을 분리시킨다. 아세토니트릴을 진공내에서 증발제거시키고, 수성상을 아세트산에틸(300 ml)로 3 회 추출시킨다. 합한 유기상을 1N HCl(350 ml), 포화 NaCl(400 ml) 및 물(500 ml)로 세정하고, 황산마그네슘으로 건조시키며 완전히 증발시킨다. 생성물을 증류에 의해 정제시킨다. 생성물 107.76 g 을 맑은 액체로서 수득하였다. 수율은 85 % 였다.

비점 (0.05 토르): 70 °C

¹H-NMR (CDCl₃): δ[ppm] 400 MHz

0.98(t, J = 8.5 Hz, 3H); 1.58~1.65(2H); 2.23(AB syst., 2H); 2.82~2.90(2H); 3.42(m, 1H); 5.30(m, 1H); 6.62(m, 1H); 6.90(m, 1H).

실시예 3

(±)-2-페닐아세틸-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온의 제조

(±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 33.4 g 을 질소하에서 아세토니트릴(240 ml) 및 피리딘(48.3 ml)에 용해시킨다. 12 °C 에서, 페닐아세틸 클로라이드 68.6 g 을 30 분에 걸쳐 적가한다. 그 다음 혼합물을 실온에서 3.5 시간 동안 교반시킨다. 물 240 ml 를 혼합물에 첨가시킨다. 아세토니트릴을 진공내에서 증발제거시키고, 수성상을 아세트산에틸(150 ml)로 3 회 추출시킨다. 합한 유기상을 1N HCl(150 ml), 포화 NaCl(150 ml) 및 물(150 ml)로 세정하고, 황산마그네슘으로 건조시키며 완전히 증발시킨다. 조(粗)생성물을 실리카겔(헥산:아세트산에틸 = 1:1)을 통해 여과시킨다. 조생성물 78.34 g 을 황색 오일로서 수득하였다.

실시예 4

(±)-2-프로피오닐-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온의 제조

(±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 47 g 을 질소하에서 아세토니트릴(325 ml) 및 피리딘(41 ml)에 용해시킨다. 12 °C 에서, 프로피오닐 클로라이드 43.9 g 을 1 시간에 걸쳐 적가한다. 그 다음 반응을 실온에서 5 시간 동안 교반시킨다. 물 145 ml 를 혼합물에 첨가시키고, 아세토니트릴을 진공내에서 증발제거시킨다. 수성상을 아세트산에틸 115 ml 로

3 회 추출시킨다. 합한 유기상을 1N HCl(140 ml), 포화 NaHCO_3 (40 ml) 및 NaCl(40 ml) 용액으로 세정하고, 황산나트륨으로 건조시키며 완전히 증발시킨다. 잔류물을 증류에 의해 정제시킨다. 표제 화합물 55.8 g 을 수득하고 방치시켜 고화시켰다. 수율은 81.6 % 였다.

비점 2.8 mbar 75~80 °C

융점: 54~56 °C

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ [ppm] 400 MHz

0.95(t, 3H); 2.10(quant., 1H); 2.28(quant., 1H); 2.64(m, 2H); 3.42(s, 1H); 5.16(s, 1H); 6.78(m, 1H); 6.96(m, 1H).

실시예 5

(±)-2-이소부틸릴-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온의 제조

(±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 45.1 g 을 질소하에서 아세토니트릴(310 ml) 및 피리딘(39 ml)에 용해시킨다. 10 °C 에서, 이소부틸릴 클로라이드 54.1 g 을 1 시간에 걸쳐 적가한다. 그 다음 반응을 실온에서 5 시간 동안 교반시킨다. 물 140 ml 를 혼합물에 첨가시키고, 아세토니트릴을 진공내에서 증발제거시킨다. 수성상을 아세트산에틸 120 ml 로 4 회 추출시킨다. 합한 유기상을 1N HCl(50 ml), 포화 NaHCO_3 (50 ml) 및 NaCl(50 ml) 용액으로 세정하고, 황산나트륨으로 건조시키며 완전히 증발시킨다. 잔류물을 n-헥산(240 ml)에서 환류하 활성탄과 함께 끓인다. 활성탄의 여과후, 여과물을 0 °C 로 냉각시키고 표제 화합물을 여과시킨다. 생성물 54.5 g 을 수득하였다. 수율은 76 % 였다.

융점: 41~42 °C

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ [ppm] 400 MHz

0.92(d, 3H); 1.06(d, 3H); 2.10(m, 1H); 2.28(m, 1H); 3.40(m, 2H); 5.16(s, 1H); 6.78(m, 1H); 7.92(m, 1H).

실시예 6

(±)-2-클로로아세틸-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온의 제조

(±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 10.1 g 을 10 °C 질소하에서 디클로로메탄(10 ml), 피리딘(8.4 ml) 및 4-N,N-디메틸아미노피리딘 0.22 g 의 혼합물에 용해시킨다. 클로로아세틸 클로라이드 13.5 g 을 1 시간에 걸쳐 적가한다. 온도를 44 °C 로 올린다. 혼합물을 실온에서 추가로 2 시간 동안 교반시킨다. 물 100 ml 를 용액에 첨가시킨다. 상 분리후, 수성상을 디클로로메탄 100 ml 로 추출시킨다. 합한 유기상을 황산나트륨으로 건조시키며 완전히 증발시킨다. 잔류물을 디이소프로필 에테르 100 ml 에서 환류하 활성탄 1 g 의 존재하에 10 분 동안 끓인다. 고온여과후, 여과물을 실온으로 냉각시키고, 고체를 여과시키고 건조시킨다. 표제 화합물 10.35 g 을 수득하였다. 수율은 60 % 였다. 융점: 86~88 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] 400 MHz

2.28(d, 1H); 2.40(d, 1H); 3.48(s, 1H); 4.56(d, 2H); 5.30(s, 1H); 6.70(d, 1H); 6.94(m, 1H).

실시예 7

(±)-1-아세틸아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

(±)-2-아세틸-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 79.56 g 을 질소하에서 에탄올(450 ml)에 용해시키고, -10 °C 로 냉각시킨다. 나트륨 보로히드라이드 19.8 g 을 45 분에 걸쳐 부분으로 첨가한다.

반응을 3 시간 동안 0 °C 에서 교반시킨후 진한 황산으로 pH 를 1.8 로 조정시킨다. 아세트산에틸(200 ml)을 이 혼합물에 첨가시키고, 고체를 여과제거시킨다. 그 다음 완전히 증발시킨다. 잔류물을 물로 취하고, 염화메틸렌으로 세정하고 증발시킨다. 조생성물을 실리카겔 여과에 의해 정제시킨다. 생성물 51.83 g 을 백색 고체로서 수득하였다. 수율은 사용된 2-아세틸-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온에 기초하여 64 % 였다.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] 400 MHz

1.18(m, 1H); 1.78(s, 3H); 2.29(m, 1H); 2.66(m, 1H); 3.35(s, 2H); 4.58(s, 1H); 4.72(m, 1H); 5.61(d, 1H); 5.85(d, 1H); 7.83(d, 1H).

실시예 8

($\pm$)-1-부티릴아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

($\pm$)-2-부티릴-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 73.87 g 을 질소하에서 에탄올(400 ml)에 용해시키고 -10 °C 로 냉각시킨다. 나트륨 보로히드라이드 15.68 g 을 45 분에 걸쳐 부분으로 첨가한다. 반응을 0 °C 에서 3 시간 동안 교반시킨후 진한 황산으로 pH 를 1.5 로 조정시킨다. 아세트산에틸(200ml)을 이 혼합물에 첨가시키고, 고체를 여과제거시킨다. 그 다음 완전히 증발시킨다. 잔류물을 물로 취하고, 염화메틸렌으로 세정하고, 증발시키고 고진공하에서 건조시킨다. 생성물 60.55 g 을 수득하였다. 수율은 사용된 ($\pm$)-2-부티릴-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온에 기초하여 80 % 였다.

융점: 71~72 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃): δ [ppm] 400 MHz

0.98(t, J = 8.5 Hz, 3H); 1.40~1.50(1H); 1.58~1.68(2H); 2.10~2.18(2H); 2.42~2.55(1H); 2.85(m, 1H); 3.62(AB syst., 2H); 4.98(m, 1H); 5.78~5.82(2H); 6.38(m, 1H).

실시예 9

($\pm$)-1-페닐아세틸아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

조 ($\pm$)-2-페닐아세틸-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 77 g 을 질소하에서 에탄올(450 ml)에 용해시키고 -10 °C 로 냉각시킨다. 나트륨 보로히드라이드 13.2 g 을 1 시간에 걸쳐 부분으로 첨가한다. 반응을 실온에서 3.5 시간 동안 교반시킨후 진한 황산으로 pH 를 1.8 로 조정시킨다. 이 혼합물을 실리카겔 여과(헥산:아세트산에틸 = 2:8)에 의해 정제시킨다. 아세트산에틸로부터 재결정후, 백색 고체 15.89 g 을 수득하였다. 수율은 사용된 ($\pm$)-2-페닐아세틸-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온에 기초하여 80 % 였다.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃): δ [ppm] 400 MHz

1.28~1.35(1H); 1.40(m, 1H); 2.38~2.45(1H); 2.79(m, 1H); 3.50(AB syst., 2H); 3.52(s, 3H); 4.98(m, 1H); 5.75(m, 2H); 5.98(m, 1H); 7.20~7.38(5H).

실시예 10

($\pm$)-1-BOC-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조(BOC = tert-부톡시카르보닐)

조 ($\pm$)-1-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐 히드로클로라이드(J. Org. Chem. 1981, 46, 3268 에 기재된 대로 제조됨) 15 g 을 질소하 실온에서 물 150 ml 와 디옥산 150 ml 의 혼합물에 용해시킨다. 1N NaOH 로 용액을 pH 14 로 조정 한후, tert-부틸옥시카르보닐 플루오라이드의 디에틸 에테르 용액(BOC-F, 20 % 과량)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 추가로 3 시간 동안 교반시킨다(BOC-F 는 Synthesis 1975, 599 에 기재된 대로 제조됨). 진한 HCl 로 pH 를 2 로 조정 한

다. 유기 용매의 증류후, 50 ml 의 물을 잔류물에 첨가하고, 혼합물을 아세트산에틸 3×100 ml 로 추출한다. 합한 유기 상을 완전히 증발시킨다. 잔류물을 디이소프로필 에테르 110 ml 와 n-헥산 80 ml 의 혼합물에서 결정화시킨다. 표제 화합물 11.95 g 을 수득하였다. 수율은 56 % 였다.

용점: 68~70 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ[ppm] 400 MHz

1.18(m, 1H); 1.38(s, 9H); 2.26(m, 1H); 2.65(m, 1H); 3.33(t, 2H); 4.45(m, 1H); 4.55(t, 1H); 5.62(m, 1H); 5.79(m, 1H); 6.73(d, 1H).

실시예 11

(±)-1-프로피오닐아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

(±)-2-프로피오닐-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 16.6 g 을 질소하에서 물(140 ml) 및 2-부탄올(66 ml) 에 용해시키고 -5 °C 로 냉각시킨다. 나트륨 보로히드라이드 3 g 을 2 시간에 걸쳐 부분으로 첨가한다. 혼합물을 10 °C 에서 2.5 시간 동안 교반시킨후 진한 염산과 물(1/1)의 혼합물로 pH 2.2 로 조정한다. 용액을 40 g 까지 증발시키고 2N NaOH 로 pH 6.2 로 조정한다. 혼합물을 디클로로메탄 5×50 ml 로 추출한다. 합한 유기상을 완전히 증발시키고, 잔류물을 톨루엔(150 ml)에서 재결정화시킨다. 표제 화합물 11.1 g 을 수득하였다. 수율은 65 % 였다.

용점: 67~68 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ[ppm] 400 MHz

0.96(t, 3H); 1.16(quint., 1H); 2.04(quart., 2H); 2.26(m, 1H); 2.66(m, 1H); 3.34(m, 2H); 4.58(t, 1H); 4.72(m, 1H); 5.61(m, 1H); 5.84(m, 1H); 7.72(d, 1H).

실시예 12

(±)-1-이소부틸아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

(±)-2-이소부틸-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 9 g 을 질소하에서 물(32 ml) 및 2-부탄올(84 ml) 에 용해시키고 0 °C 로 냉각시킨다. 나트륨 보로히드라이드 1.37 g 을 3.5 시간에 걸쳐 부분으로 첨가한다. 혼합물을 20 °C 에서 3 시간 동안 추가로 교반시킨후 진한 염산과 물(1/1)의 혼합물로 pH 2.5 로 조정후 2N NaOH 로 중화시킨다. 용액을 40 g 까지 증발시킨다. 잔류물을 디클로로메탄 3×80 ml 로 추출한다. 합한 유기상을 완전히 증발시킨다. 생성 고체를 톨루엔 25 ml 에서 결정화시킨다. 표제 화합물 6.8 g 을 수득하였다. 수율은 73.6 % 였다.

용점: 80~81 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ[ppm] 400 MHz

0.98(d, 6H); 1.16(quint., 1H); 2.30(m, 2H); 2.68(m, 1H); 3.32(t, 2H); 4.58(t, 1H); 4.70(m, 1H); 5.61(m, 1H); 5.82(m, 1H); 7.68(d, 1H).

실시예 13

페니실린 G 아실라제를 이용한 (1R,4S)-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

대장균(뵈링거 만하임) 165 U (단위)/g 으로부터의 페니실린 G 아실라제 EC 3.5.1.11 또는 바실루스 메가테리움으로부터의 페니실린 G 아실라제 EC 3.5.1.11 을 생체변환에 사용한다.

이를 위해, 50 mM 나트륨 포스페이트 완충용액(pH 5~9; 4 ml)을 37 °C 에서 비(非)라세미성 1-페닐아세틸아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐 1 중량% 및 적당한 페니실린 G 아실라제 400 mg 와 함께 항온배양시킨다.

한정된 시간 간격으로 샘플을 취한후 박막 크로마토그래피(실리카겔 60, 부탄올:물:빙초산 = 3:1:1; 닌히드린으로 검출), 기체 크로마토그래피(모세관 칼럼, HP-5, 5 % 페닐메틸실록산) 또는 HPLC 에 의해 분석하였다. 효소는 고활성으로 페닐아세틸기를 제거하였고 이에 의해 대응 아미노 알콜의 40 % 이하를 유리시켰다. 유리 아미노 알콜은 ee 80 % 로 수득되었다.

실시에 14

미생물을 이용한 (1R,4S)-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

14.1 Visp 내 ARA 수 처리소로부터 하수 슬러지(20 %)를 진탕시키면서 37 °C 에서 0.5 중량% 의 1-아세틸-, 1-프로피오닐-, 1-이소부티릴- 또는 1-부티릴아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐을 함유하는 A + N 배지(표 1 참조)에서 항온배양시킨다. 박막 크로마토그래피가 (1R,4S)-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 형성을 추적한다.

이들 증균의 1 % 로 1~3 전이를 실행하고, 고체 배지(표 1 의 배지에서 평균 카운트 한천; 20 g/l)상에서 단리가 발생한다. 미생물 알칼리제니스/ 보르데텔라 FB 188 (DSM 1172), 로도코쿠스 에리트로폴리스 CB 101 (DSM 10686), 고르도나 sp. CB 100 (DSM 10687) 및 로도코쿠스 sp. FB 387 (DSM 11291)을 이런 식으로 단리시킨다.

14.2 이런 식으로 단리된 미생물을 0.5 % 의 1-아세틸-, 1-프로피오닐-, 1-이소부티릴- 또는 1-부티릴아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐을 함유하는 배지 (표 1)에서 배양시킨다. 이들은 24 내지 36 시간내에 광학밀도(OD) 2 내지 3 으로 증식한다. 이런 식으로 수득된 세포를 후 지수적 증식기에서 수득하고 10 mM 포스페이트 완충용액에서 세정시킨다.

이후 1 중량% 의 1-아세틸-, 1-이소부티릴- 또는 1-부티릴아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐을 함유하는 50 mM 포스페이트 완충용액(pH 4.5~9)에서 생체변환을 실행한다. 박막 크로마토그래피에 의해 기질의 50 % 가 (1R,4S)-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐으로 가수분해되었음을 발견하였다. HPLC 분석은 80 내지 93 % 의 ee 값을 나타내었다.

1-부티릴아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐을 기질로서 사용하는 경우, 생체내변화율은 균주 DSM 10686 에 대해 A + N 배지상에서 배양을 했을 때 0.14 (g/l/h/OD)였고, 1-부티릴아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐을 함유하는 NYB(영양 효모 육즙) 배지상에서 배양을 했을 때 0.03 (g/l/h/OD)였다.

기질 농도(1-부티릴아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐) 200 mM 에서 균주 DSM 10687 로 동일한 전환을 실행시키는 경우, 생체변환은 0.161 (g/l/h/OD) 였다.

[표 1]
A + N 배지

MgCl ₂	0.4 g/l
CaCl ₂	0.014 g/l
FeCl ₃	0.8 mg/l
Na ₂ SO ₄	0.1 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
Na ₂ HPO ₄	2.5 g/l
NaCl	3 g/l
비타민 용액	1 ml/l
미량 원소 용액 pH 7.5	1 ml/l

14.3 로도코쿠스 에리트르폴리스 DSM 10686 을 6 l 발효조내 탄소 및 질소원으로서 세포밀도 OD 650 > 25 로 30 ℃ 에서 암모늄 아세테이트(3 g/l)로 최소 배지(표 2 참조)에서 배양시킨다. 세포증식중, 50 % 아세트산을 부가적 C 원으로서 연속해서 첨가한다. 효소 활성을 유도하기 위해, (+/-)-1-아세틸아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐 60 g 을 그 다음 첨가하고, 항온배양을 추가로 10 시간 동안 지속시킨다. 마지막으로, 또 한번 (+/-)-1-아세틸-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐 40 g 을 첨가하고, 항온배양을 추가로 10 시간 동안 실행시킨다. 생체변환의 진행을 HPLC 에 의해 온라인으로 추적한다. 사용된 라세미 기질에 기초하여 분석 수율 40 %, 및 ee 85 % 에 도달했을 때에, 산 첨가에 의해 발효를 중지시켰다.

[표 2]
배지 조성

성 분	농 도
효모 추출물	0.5 g/l
펩톤 M66	0.5 g/l
KH ₂ PO ₄	4.0 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.5 g/l
K ₂ SO ₄	2.0 g/l
NH ₄ 아세테이트	3.0 g/l
CaCl ₂	0.2 g/l
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.0 g/l
미량 원소 용액(하기 참조)	1.5 ml/l
PPG(폴리프로필렌 글리콜)	0.1 g/l
미량 원소 용액 KOH 15.1 g/l EDTA · Na ₂ · 2H ₂ O 100.0 g/l ZnSO ₄ · 7H ₂ O 9.0 g/l MnCl ₂ · 4H ₂ O 4.0 g/l H ₃ BO ₃ 2.7 g/l CoCl ₂ · 6H ₂ O 1.8 g/l CuCl ₂ · 2H ₂ O 1.5 g/l NiCl ₂ · 6H ₂ O 0.18 g/l Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O 0.27 g/l	

14.4 실시예 14.3 과 유사하게, 미생물 아르트로박터 sp. HSZ 5 (DSM 10328), 로도코쿠스 sp. FB387 (DSM 11291), 알칼리제니스 크실로속시단스 ssp. 데니트 리피칸스 HSZ 17 (DSM 10329), 아그로박테리움/리조비움 HSZ 30, 바실루스 심플렉스 K2 및 슈도모나스 푸티다 K32 를 1-아세틸-, 1-프로피오닐-, 1-이소부티릴- 또는 1-부티릴-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐(이후 아미노 알콜로 약술함)이 있거나 없이 배지(표 1)내 아세트산나트륨 상에서 배양시킨다.

하기 결과를 아미노 알콜 없이 배양된 지수적 세포로 수득하였다 (HPLC 분석):

균 주	비율[mmol/OD.h]	ee/전환율[%]
HSZ 5 (DSM 10328)	0.05	88.7/16
HSZ 17 (DSM 10329)	0.005	95/23
K32	0.05	54/1
CB101 (DSM 10686)	0.1	84/39

균주 K2 및 K17 을 배양하고, 수득하여 60 시간 생체변환을 시킨다.

균 주	비율[mmol/OD.h]	ee/전환율[%]
K2	-	92/10
HSZ 30	-	93/3.5

지수적 및 정지적 세포를 모든 बै치(batch)로부터 수득하고 생체변환을 위한 무활동 세포로서 사용한다. 아미노 알콜로 유도하거나 유도되지 않은 세포의 초기 비율에서, TLC 분석으로부터 관측가능한 차이는 없다.

실시에 15

로도코쿠스 에리트르폴리스 CB101 (DSM 10686)로부터 N-아세틸아미노-알콜 가수분해효소의 정제

분자량 50 kD 에서 SDS-PAGE(파마시아 페이스트 겔(Pharmacia Phast gel), 10~15 % 성분)내 1 개의 단백질 밴드 (band)만이 있을 때까지 하기와 같이 효소를 정제시킨다.

로도코쿠스 에리트르폴리스 CB101 (DSM 10686) 의 세포를 50 mM 트리스 완충용액 (pH 6.2) 에서 세정시키고 광학밀도 OD_{650 nm} 190 으로 농축시킨다. 최종 농도 1 mM 으로의 페닐메탄술폰닐 플루오라이드(PMSF), 및 DNase 의 첨가후, 세포를 프랜치 프레스로 처리시켜 조추출물을 얻는다. 원심분리로 단백질 농도 4.8 mg·ml⁻¹ 의 무세포 추출물 200 ml 를 얻는다.

무세포 추출물 960 mg 을 1 mM 디티오프레이톨(DTT)을 함유하는 50 mM 트리스 완충용액(pH 8.0)으로 평형이 된 HiLoad 26/10 Q-세파로스(Sepharose) 이온 교환 크로마토그래피 칼럼 (파마시아)상에 로딩한다.

칼럼을 동일 완충용액으로 세정시킨후, 단백질을 선형 완충용액 구배 (1500 ml; 구배: 1 mM DTT 를 함유하는 50 mM 트리스 완충용액(pH 8.0) - 1 mM DTT 및 1 M NaCl 을 함유하는 50 mM 트리스 완충용액(pH 7.0))으로 용리시킨다. 효소를 370 내지 430 mM NaCl 칼럼으로부터 pH 7.6 에서 용리시킨다. 활성 부분을 수집하고 9 ml 로 농축시킨다. 단백질 함량은 41 mg 이다.

추가 정제를 위해, 단백질 용액을 50 mM NaCl 및 1 mM DTT 를 함유하는 50 mM 트리스 완충용액으로 평형이 된 HiLoad 26/60 superdex 75 겔 여과 크로마토그래피 칼럼 (파마시아)상에 로딩한다. 활성 부분을 합하여 전체 단백질 함량은 10.9 mg 이다.

이 단백질 용액을 1 mM DTT 를 함유하는 50 mM 트리스 완충용액(pH 8.5)으로 평형이 된 모노 Q HR5/5 칼럼 (파마시아) 상에 로딩한다. 단백질을 1 mM DTT 를 함유하는 50 mM 트리스 완충용액(pH 8.5) - 1 mM DTT 및 1 M NaCl 을 함유하는 50 mM 트리스 완충용액(pH 8.5)의 선형 구배 (40 ml)로 용리시킨다. 효소를 390 mM NaCl 내지 440 mM NaCl 에서 용리시킨다. 활성 부분은 단백질 1.4 mg 을 함유한다.

마지막 정제 단계에서, 동일 칼럼을 사용하고, 동일 완충용액으로 평형시킨다. 사용된 용리 구배는 0~500 mM NaCl 및 pH 7.0~8.5 의 동일한 완충용액이다. 이런 식으로 순수 효소 430 µg 을 분리시키는 것이 가능하다.

효소의 N-말단 서열을 단백질 블롯(blot)으로부터 직접 측정한다. 하기 20 아미노산의 서열을 수득하였다: Thr-Glu-Gln-Asn-Leu-His-Trp-Leu-Ser-Ala-Thr-

Glu-Met-Ala-Ala-Ser-Val-Ala-Ser-Asn.

이 서열은 공지된 단백질과 상동 부분을 나타내지 않는다.

실시에 16

효소 특성화

효소 특성화를 정제 효소, 및 Sephadex G-25 칼럼(PD-10, 파마시아)을 이용하여 탈염된 무세포 추출물로 실행시킨다.

무세포 추출물에서 단백질 농도는 $7.3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 이고 정제 효소의 단백질 농도는 $135 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 이다. PMSF 를 무세포 추출물에 첨가시키지 않는다.

16.1 K_m 측정

무세포 추출물에서 K_m 측정을 실행시킨다. pH 7.0 및 30 °C 온도에서 반응에 대한 K_m 은 기질 1-아세틸아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐에 대해 22.5 mM 이다.

16.2 pH 최적 조건

1-아세틸아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐(25 mM)의 가수분해에 대한 pH 최적조건을 정제 효소로 및 하기 완충용액에서 pH 6.2~9.0 의 pH 범위에서 무세포 추출물에서 측정한다.

트리스 완충용액 100 mM pH 9.0; 8.5; 8.0; 7.5; 7.0

시트레이트/포스페이트 완충용액 100 mM pH 7.0; 6.55; 6.2

활성을 24 시간 동안 측정한다.

반응에 대한 pH 최적 조건은 1R,4S 및 1S,4R 거울상 이성질체의 제조에 대해 pH 7.0 내지 pH 7.5 이다.

무세포 추출물에서 활성에 대한 pH 최적 조건은 pH 7.0 이다. 선택도는 그러나 pH 6.0 내지 pH 7.0 에서 더욱 우수하다.

16.4 분자량을 SDS-PAGE 에 의해 측정하여, 50 kD 이었다.

16.5 하기 기질을 가수분해시킨다: 1-아세틸-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐, 1-부티릴-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐, 1-프로피오닐-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐, 1-이소부티릴-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐.

실시예 17

(1R,4S)-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐 히드로클로라이드의 제조

(1R,4S)-1-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐의 용액 374.1 g(실시예 14 의 것과 유사하게 제조)을 123.7 g 으로 증발시킨다. 용액은 상기 화합물의 60.2 mmol (HPLC)을 함유하고 30 % 진한 NaOH 로 pH 2 내지 pH 11.7 로 조정후 이소부탄올 3×70 ml 로 추출한다. 합한 이소부탄올 추출물을 기체 HCl 로 pH 1 로 조정하고, 65 g 으로 농축시키고 여과시킨다(고체 불순물의 제거). 아세톤 60 ml 를 격렬히 교반되는 여과물에 20 °C 에서 적가한다. 흐린 혼합물을 표제 화합물의 결정으로 집중시키고 1 시간 동안 5 °C 에서 교반시킨다. 여과 및 건조로 생성물 5.2 g 을 얻었다. 수율은 58 % 였다.

용점: 125~127 °C

ee 98 % (보정된 카이랄 HPLC 칼럼)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ [ppm] 400 MHz

1.44(m, 1H); 2.35(m, 1H); 2.83(m, 1H); 3.42(m, 2H); 4.10(s, 1H); 4.80(s, 1H); 5.80(d, 1H); 6.06(d, 1H); 8.13(s, 3H).

실시예 18

(1R,4S)-1-BOC-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

(1R,4S)-1-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐의 용액 75 g(실시예 14 에서의 것과 유사한 제조; 화합물 44.6 mmol)을 30 % 진한 NaOH 로 pH 8 로 조정하고, NaHCO₃ 6 g 을 첨가한다. 혼합물을 52 °C 로 가열시킨다. 격렬히 교반 시키면서, 디이소프로필 에테르 60 ml 를 첨가한후 디이소프로필 에테르 18.2 ml 내 BOC 무수물 11.12 g 의 용액을 2 시간에 걸쳐 계량한다. 혼합물을 셀라이트를 통해 여과시키고, 상을 분리시킨다. 수성상을 디이소프로필 에테르 65 ml 로 추출한다. 합한 유기상을 물 45 ml 로 세정한후 37.5 g 으로 증발시키며 50 °C 로 가열시킨다. 용액에 n-헥산 31 ml 를 적가한다. 0 °C 로 천천히 냉각(2 시간)시킨후, 표제 화합물을 여과시키고, n-헥산/디이소프로필 에테르 1/1 12 ml 로 세정하고 건조시킨다. 생성물 6.75 g 을 수득하였다. 수율은 71% 였다.

용점: 70~71 °C

ee 98 % (보정된 카이랄 HPLC 칼럼)

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ[ppm] 400 MHz

1.18(m, 1H); 1.27(s, 9H); 2.28(m, 1H); 2.63(m, 1H); 3.33(q, 2H); 4.43(m, 1H); 4.56(t, 1H); 5.62(m, 1H); 5.78(m, 1H); 6.72(d, 1H).

실시예 19

(1R,4S)-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐 히드로클로라이드의 제조

(1R,4S)-1-BOC-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐 87.8 g 을 2N HCl 의 270 ml 및 메탄올 1340 ml 에 용해시킨다. 혼합물을 환류하 4.5 시간 동안 끓인다. 메탄올의 증류후, 잔류물을 물 800 ml 에 용해시킨다. 수용액을 아세트산에틸 340 ml 로 2 회 추출한다. 수성상을 완전히 증발시킨다(50 °C/60 mbar). 고체를 진공내 50 °C 에서 건조시키고, 디에틸 에테르 150 ml에서 현탁시키고, 여과제거하고 디에틸 에테르 50 ml 로 2 회 세정한다. 건조로 표제 화합물을 95 % 수율 (58.4 g)로 얻었다.

생성물의 물리학적 및 분광학적 데이터는 실시예 17 과 동일하였다.

실시예 20

(1R,4S)-1-아세틸아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

(1R,4S)-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐 히드로클로라이드 25 g 을 아세트산 무수물 182 ml 에 용해시키고, 0 °C 에서, 아세트산 무수물 60 ml 내 트리에틸아민 18.25 g 의 용액을 첨가한다. 혼합물을 3 시간 동안 80 °C 에서 교반시킨후 실온으로 냉각시킨다. 트리에틸아민 히드로클로라이드를 여과제거하고 n-헥산 120 ml로 세정시킨다. 여과물을 증발시킨다. 잔류물을 톨루엔 300 ml 와 혼합하고 활성탄 5.2 g 및 셀라이트 13 g 의 존재하 20 분 동안 실온에서 교반시킨다. 여과 및 필터 케이크(톨루엔 3×40 ml)의 세정후, 용매를 완전히 증발제거시킨다. 잔류물을 메탄올 180 ml 및 K₂CO₃ 15.5 g 과 혼합하고 실온에서 10 시간 동안 교반시킨다. 현탁액을 여과시키고 여과물을 증발시킨다. 잔류물을 이소프로필 아세테이트 750 ml 에 현탁시키고 환류하 1.5 시간 동안 활성탄 0.5 g 의 존재하 끓인다. 활성탄 여과(70~80 °C)후, 여과물을 밤새 0 °C 에서 냉각시킨다. 표제 화합물을 여과시키고, 차가운 이소프로필 아세테이트 80 ml 로 세정하며 진공내 건조시킨다. 생성물 17.2 g 을 수득하였다. 수율은 66 % 였다.

용점: 77~80 °C

ee 98 % (보정된 카이랄 HPLC 칼럼)

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ[ppm] 400 MHz

1.15(m, 1H); 1.78(s, 3H); 2.25(m, 1H); 2.66(m, 1H); 3.35(m, 2H); 4.58(t, 1H); 4.70(m, 1H); 5.62(m, 1H); 5.85(m, 1H); 7.80(d, 1H).

실시예 21

(1S,4R)-1-아세틸아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

(1S,4R)-1-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐 히드로클로라이드(수율 68 %) 25 g 에서 출발하는 실시예 18 의 방법에 의해 표제 거울상 이성질체를 제조하는 것이 가능하다. 생성물의 분광학적 및 물리학적 데이터는 실시예 20 과 동일하였다.

실시예 22

(1R,4S)-1-부티릴아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

(1R,4S)-1-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐 히드로클로라이드 34.7 g 및 4-N,N-디메틸아미노피리딘 2 g 을 염화메틸렌 600 ml 에 용해시킨다. 용액을 0 °C 로 냉각시킨다. 그 다음 트리에틸아민 52 g 을 적가한다(5 분). 혼합물을 추가로 30 분 동안 교반시킨다. 염화메틸렌 60 ml 내 부티릴 클로라이드 35.2 g 의 용액을 1 시간에 걸쳐 0 °C 에서 혼합물에 계량한다. 혼합물을 추가로 0 내지 20 °C 에서 1.5 시간 동안 교반시킨후, 물 600 ml 를 첨가한다. 상분리후, 수성상을 염화메틸렌 600 ml 로 추출한다. 합한 유기상을 매회 10 % 진한 NaOH 500 ml 로 3 회 세정한후, 완전히 증발시킨다. 건조된 고체를 메탄올 120 ml 에 용해시킨다. 용액을 K₂CO₃ 5 g 과 혼합하고 실온에서 추가로 2 시간 동안 교반시킨다. 무기염을 여과제거하고 메탄올 20 ml 로 세정한다. 여과물을 2N HCl 로 중화시킨다. 현탁액을 여과시키고 필터 케이크를 메탄올 20 ml 로 세정시킨다. 여과물을 완전히 증발시킨다. 고체 잔류물을 건조시키고 톨루엔 150 ml 에서 결정화시킨다. 표제 화합물 28.5 g 을 수득하였다. 수율은 67 % 였다.

용점: 71~72 °C

ee 98 % (보정된 카이랄 HPLC 칼럼)

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ[ppm] 400 MHz

0.85(t, 3H); 1.15(m, 1H); 1.50(q, 2H); 2.03(d, 2H); 2.28(m, 1H); 2.67(m, 1H); 3.35(d, 2H); 4.62(s, 1H); 4.76(m, 1H); 5.63(m, 1H); 5.85(m, 1H); 7.77(d, 1H).

실시예 23

(1S,4R)-1-부티릴아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

(1S,4R)-1-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐 히드로클로라이드(수율 63 %) 34.7 g 에서 출발하는 실시예 20 의 방법에 의해 표제 거울상 이성질체를 제조하는 것이 가능하다. 생성물의 분광학적 및 물리학적 데이터는 실시예 22 와 동일하였다.

실시예 24

(1R,4S)-1-[(2-아미노-6-클로로-5-포르미아미도-4-피리미디닐)아미노]-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

N-(2-아미노-4,6-디클로로-5-피리미디닐)포르미아미드 2.07 g 을 이소부탄올(백색 현탁액) 40 ml 내 80 °C 까지 가열시킨다. (1R,4S)-1-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐 히드로클로라이드 1.97 g, 트리에틸아민 3.8 g 및 이소부탄올 15 ml 의 용액을 혼합물에 첨가한다. 혼합물을 추가로 13 시간 동안 80 °C 에서 교반시킨다. 1N NaOH 10 ml 를 20 °C 에서 상기 맑은 용액에 첨가한후, 증발시켜 건조하게 한다. 잔류물을 플래시 크로마토그래피(실리카겔 60 칼럼, 길이 8 cm, 직경 6.5 cm, 용리액 아세트산에틸/메탄올 95/5)시킨다. 용리액의 증발제거 및 잔류물의 건조후, 표제 화합물 2.1 g 을 수득하였다. 수율은 74 % 였다.

용점: 174~176 °C

ee 98 % (보정된 카이랄 HPLC 칼럼)

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ[ppm] 400 MHz

1.37(m, 1H); 2.35(m, 1H); 2.73(m, 1H); 3.38(t, 2H); 4.68(m, 1H); 5.08(m, 1H); 5.70(d, 1H); 5.85(d, 1H); 6.40; 6.55 및 6.65(s, dd, 모두 3H); 7.78 및 8.10(d 및 s, 모두 1H); 8.55 및 8.95(d 및 s, 모두 1H).

실시예 25

(1R,4S)-1-[(2-아미노-6-클로로-5-포름아미도-4-피리미디닐)아미노]-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

(1R,4S)-1-아미노-4-히드록시메틸-2-시클로펜텐(실시예 14 에서와 유사하게 제조)의 용액 145.2 ml 를 25.5 ml 로 농축시키고 셀라이트를 통해 여과시킨다. 필터 케이크를 물 7.5 ml 로 세정시킨다. 여과물은 상기 화합물(HPLC) 17.7 mmol 을 함유하고 진한 HCl 로 pH 6.6 에서 pH 1 로 조정후 이소부탄올 20 ml 로 3 회 추출한다. 유기상을 버린다. 수성상을 30 % 진한 NaOH 를 이용하여 pH 12 로 조정하고 이소부탄올 10 ml 로 3 회 추출시킨다. 합한 유기상을 15 ml 로 증발시키고 트리에틸아민 2.53 g 을 첨가한다. 에탄올 40 ml 내 N-(2-아미노-4,6-디클로로-5-피리미디닐)포름아미드 2.07 g 의 용액을 실시예 24 에서와 동일하게 혼합물에 첨가한다. 혼합물을 16 시간 동안 80 °C 에서 교반시킨다. 실시예 22 에서와 같은 워크업(Working up)으로 표제 화합물 2.4 g 을 얻었다. 수율은 85 % 였다.

생성물의 물리학적 및 분광학적 데이터는 실시예 24 와 동일하였다.

실시예 26

(±)-1-BOC-아미노-2-시클로펜텐-4-카르복실산의 제조

조 (±)-1-아미노-2-시클로펜텐-4-카르복실산 히드로클로라이드(J. Org. Chem. 1981,46, 3268 에 따라 제조됨) 16.4 g 을 질소하 실온에서 물 80 ml 및 디옥산 80 ml 의 혼합물에 용해시킨다. 혼합물을 1N NaOH 로 pH 14 로 조정하고, tert-부틸옥시카르보닐 플루오라이드의 디에틸 에테르 용액(BOC-F, 20 % 과량)을 첨가한다(Synthesis 1975, 599 에서와 같이 제조된 BOC-F). 혼합물을 추가로 실온에서 5 시간 동안 교반시킨다. 진한 HCl 로 pH 를 2 로 조정시킨다. 유기용매의 증류후, 물 50 ml 를 잔류물에 첨가하고, 혼합물을 아세트산에틸 100 ml 로 3 회 추출한다. 유기상을 50 ml 로 조정하고 톨루엔 25 ml 로 희석시킨다. 냉각(0~10 °C)후, 표제 화합물을 여과 및 건조시킨다. 생성물 14.3 g 을 수득하였다. 수율은 63 % 였다.

용점: 126~127 °C

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ[ppm] 400 MHz

1.14(s, 9H); 1.70(m, 1H); 2.40(m, 1H); 3.40(m, 1H); 4.47(m, 1H); 5.70(t, 1H); 4.87(t, 1H); 6.88(d, 1H); 12.30(d, 1H).

실시예 27

(±)-1-BOC-아미노-2-시클로펜텐-4-카르복실산으로부터 (±)-1-BOC-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

테트라히드로푸란 250 ml 및 LiAlH₄ 10.02 g(0.164 mol)을 500 ml 교반 장치속에 도입시키고, 테트라히드로푸란 75 ml 내 (±)-1-BOC-아미노-2-시클로펜텐-4-카르복실산 30.0 g(0.132 mol)의 용액을 1 시간에 걸쳐 -10 °C 에서 계량한다. 그 다음 물 10 g, 15 % 진한 NaOH 용액 10 g 및 물 20 g 을 첨가한후 여과시킨다. 잔류물을 매회 tert-부틸 메틸 에테

르 100 ml 로 2 회 세정하고, 합한 유기상을 증발시켜 건조하게 한다. 헥산 80 ml 의 첨가 및 실시예 10 의 화합물의 접중 후, 표제 화합물을 결정성 고체로서 분리시킨다. 수율은 15.84 g(56 %) 였다. 물리학적 및 분광학적 데이터는 실시예 10 과 동일하였다.

실시예 28

(1R,4S)-1-BOC-아미노-2-시클로펜텐-4-카르복실산으로부터 (1R,4S)-1-BOC-아미노-4-

-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐의 제조

테트라히드로푸란 80 ml 및 (1R,4S)-1-BOC-아미노-2-시클로펜텐-4-카르복실산(Tetrahedron: Asymmetry 1993, 4, 1117에서와 같이 제조됨) 11.38 g(50.07 mmol)을 500 ml 교반장치에 도입하고, 보란/디메틸 술피드 착물 5 ml 를 1 시간에 걸쳐 -15 °C 에서 계량하고, 혼합물을 그 다음 이 온도에서 3 시간 동안 교반시킨다. 물 60 ml 내 NaOH 4 g 의 용액을 첨가하고 실온으로 가온시킨다. 톨루엔으로 추출, 실리카겔을 통한 여과 및 아세트산에틸/n-헥산 1:1 로의 후속 결정화가 백색 결정성 고체로서, 수율 57 % 에 상당하는, 표제 화합물 5.4 g 을 얻었다. 물리학적 및 분광학적 데이터는 실시예 10 과 동일하였다. ee 는 99 % 였다(동일한 카이랄 HPLC 칼럼).

발명의 효과

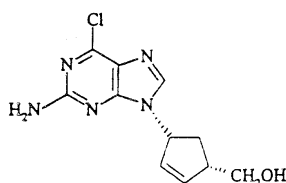
본 발명은 (1S,4R)- 또는 (1R,4S)-4-(2-아미노-6-클로로-9H-푸린-9-일)-2-시클로펜텐-1-메탄올을 단순, 저비용 및 더욱더욱 경제적으로 제조할 수 있는 방법을 제공한다.

(57) 청구의 범위

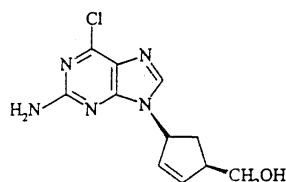
청구항 1.

제 1 단계에서, 하기 화학식 3 의 (±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온을 아실화시켜 하기 화학식 4 의 (±)-2-아자비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-3-온 유도체를 얻고, 제 2 단계에서 이것을 환원시켜 하기 화학식 5 의 시클로펜텐 유도체를 얻으며, 제 3 단계에서 시클로펜텐 유도체를 단독 질소원, 단독 탄소원 또는 단독 탄소 및 질소원으로서 화학식 5 의 시클로펜텐 유도체를 이용할 수 있는 미생물, N-아세틸아미노-알콜 가수분해효소 활성을 갖는 효소 또는 페니실린 G 아실라제를 이용하여 하기 화학식 6 또는 7 의 (1R,4S)- 또는 (1S,4R)-1-아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐으로 전환시키고, 제 4 단계에서 이것을 하기 화학식 8 의 N-(2-아미노-4,6-디클로로-5-피리미디닐)포름아미드를 이용하여 하기 화학식 9 또는 10 의 (1S,4R)- 또는 (1R,4S)-4-[(2-아미노-6-클로로-5-포름아미도-4-피리미디닐)아미노]-2-시클로펜텐-1-메탄올로 전환시키며, 제 5 단계에서 이것을 공지된 방식으로 고리화시켜 하기 화학식 1 또는 2 의 최종 생성물을 얻는 것을 특징으로 하는, 화학식 1 또는 2 의 (1S,4R)- 또는 (1R,4S)-4-(2-아미노-6-클로로-9H-푸린-9-일)-2-시클로펜텐-1-메탄올 또는 이의 염의 제조 방법:

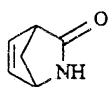
[화학식 1]



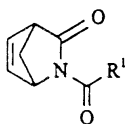
[화학식 2]



[화학식 3]

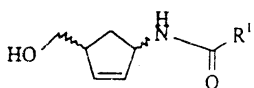


[화학식 4]



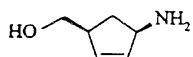
[식중, R¹ 은 C_{1~4}-알킬, C_{1~4}-알콕시, 아릴 또는 아릴옥시를 나타낸다],

[화학식 5]

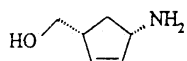


[식중, R¹ 은 상기 의미를 갖는다],

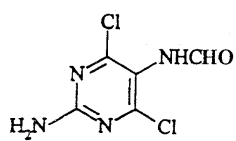
[화학식 6]



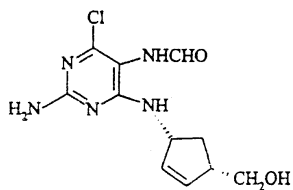
[화학식 7]



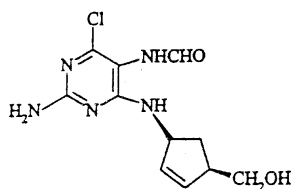
[화학식 8]



[화학식 9]



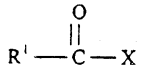
[화학식 10]



청구항 2.

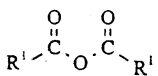
제 1 항에 있어서, 제 1 단계에서 아실화가 하기 화학식 11 의 카르보닐 할라이드, 또는 하기 화학식 12 의 카르복실산 무수물로 실행되는 것을 특징으로 하는 방법:

[화학식 11]



[식중, R¹은 C_{1~4}-알킬, C_{1~4}-알콕시, 아릴 또는 아릴옥시를 나타내고, X 는 할로젠 원자를 나타낸다],

[화학식 12]



청구항 3.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 1 단계에서 아실화가 비양성자성 용매에서 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 2 단계에서 환원반응이 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 боро히드라이드, 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 알루미늄 히드라이드 또는 비트라이드(Vitride)로 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 2 단계에서 환원반응이 양성자성 용매에서 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 3 단계에서 반응이 로도코쿠스(Rhodococcus) 속, 고르도나(Gordona) 속, 아르트로박터(Arthrobacter) 속, 알칼리제니스(Alcaligenes) 속, 아그로박테리움(Agrobacterium)/리조비움(Rhizobium) 속, 바실루스(Bacillus) 속, 슈도모나스(Pseudomonas) 속 또는 알칼리제니스/보르데텔라(Bordetella) 속의 미생물을 이용하여 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 3 단계에서 반응이 바실루스 메가테리움(megaterium) 종 또는 대장균(Escherichia coli)종의 미생물유래의 페니실린 G 아실라제를 이용하여 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 3 단계에서 생체변환이 20 내지 40 ℃ 의 온도 및 5 내지 9 의 pH 에서 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 4 단계에서 반응이 염기의 존재하 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10.

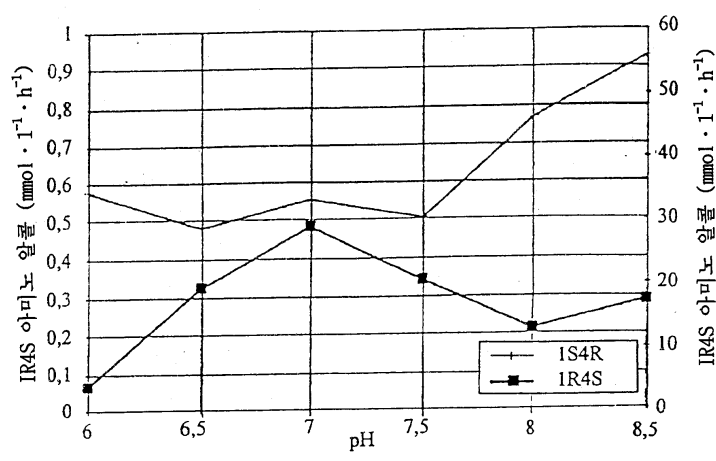
제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 제 4 단계에서 반응이 양성자성 용매에서 실행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11.

라세미 1-부티릴아미노-4-(히드록시메틸)-2-시클로펜텐.

도면

도면1



도면2

