



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월22일
 (11) 등록번호 10-1708433
 (24) 등록일자 2017년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 257/06 (2006.01) *C07D 413/12* (2006.01)
C12P 17/12 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2010-0058981
 (22) 출원일자 2010년06월22일
 심사청구일자 2015년06월15일
 (65) 공개번호 10-2010-0137389
 (43) 공개일자 2010년12월30일
 (30) 우선권주장
 1020090055576 2009년06월22일 대한민국(KR)
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020080005437 A*
 Tetrahedron, 2008, 64(8), 1635-1640*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
에스케이바이오팜 주식회사
 경기도 성남시 분당구 판교역로 221(삼평동)
 (72) 발명자
임상철
 대전광역시 유성구 엑스포로 448, 212동 1101호
 (전민동, 엑스포아파트)
업무용
 대전광역시 유성구 궁동로 49, 자연아파트 1412호
 (궁동)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 민경남

(54) 발명의 명칭 **카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라조릴-에틸 에스테르의 제조 방법**

(57) 요약

카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라조릴-에틸 에스테르의 신규 제조 방법이 제시된다. 상기 제조 방법은 아릴케톤의 비대칭 환원 단계 및 알코올 화합물의 카르바메이션 단계를 포함한다.

(72) 발명자

조남륜

대전광역시 유성구 진잠로92번길 33 (원내동)

이대원

경기도 시흥시 은행로 93-1 401동 1003호 (은행동, 시흥은행4차대우푸르지오아파트)

이주영

대전광역시 서구 문예로 174, 샘머리아파트 109동 904호 (둔산동)

김희호

대전광역시 서구 계룡로509번길 7, 705호 (탄방동, 시티빌1)

이동호

대전광역시 서구 갈마로 262, 105동 1704호 (내동, 맑은아침아파트)

이현석

대전광역시 유성구 배울2로 61, 1009동 1401호 (관평동, 대덕테크노밸리10단지아파트)

이세일

인천광역시 서구 세자봉로 94, 404동 330호 (금곡동)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 카르바산 아릴-2-테트라조릴 에틸 에스테르의 제조 방법으로서, 하기 화학식 2로 표시되는 아릴케톤의 (R)-선택적 비대칭 환원 단계 및 하기 화학식 3으로 표시되는 (R)-배열의 알코올 화합물의 카르바메이션 단계를 포함하며,

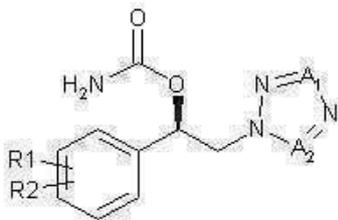
상기 (R)-선택적 비대칭 환원은,

화학식 2로 표시되는 아릴케톤, 산화환원효소를 생산하는 미생물 균주 및 환원력을 제공하는 물질을 함유하는 완충용액 중에서 이루어지는 생물학적 비대칭 환원으로서, 상기 산화환원효소를 생산하는 미생물 균주는 로도톨라 무실라지노사(*Rhodotorula mucilaginosa*), 트리곤옵시스 베리아빌리스(*Trigonopsis variabilis*), 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*), 칸디다 루고사(*Candida rugosa*), 피키아 아노말라(*Pichia anomala*), 피키아 자디니(*Pichia jadinii*), 빵 효모(*Baker's yeast*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 파스토리아누스(*Saccharomyces pastorianus*), 클레브시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*), 로도코커스 에리쓰로폴리스(*Rhodococcus erythropolis*), 로도코커스 로도크로우스(*Rhodococcus rhodochrous*), 무코 라세모서스(*Mucor racemosus*) 및 지오텐리쿰 칸디덤(*Geotrichum candidum*)으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 환원력을 제공하는 물질은 포도당(Glucose), 글리세롤(Glycerol), 자당(Sucrose), 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, 2-펜탄올, 2-메틸펜탄올, 2-헥산올, 2-헵탄올, 2-옥탄올, 시클로헵탄올 및 시클로헥산올로 이루어진 군에서 선택되는, 생물학적 비대칭 환원이거나, 또는

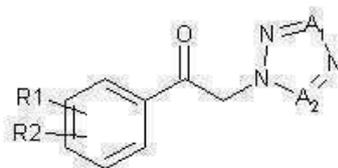
(-)-B-클로로다이아이소피노캄페일보란 및 (R)-2-메틸-CBS-옥사자보롤리딘/보란으로부터 선택되는 키랄형 보란 환원제에 의한 환원 반응, 또는 클로로 {[[(1S,2S)-(+)-아미노-1,2-디페닐에틸](4-톨루엔술포닐)아미도} (p-사이멘)루테늄(II) 존재 하에 포름산-트라이에틸아민과 화학식 2로 표시되는 아릴케톤을 반응시키는 것을 포함하는 비대칭촉매 수소전이 반응(Asymmetric Catalytic Transfer Hydrogenation)에 의하여 이루어지는 화학적 비대칭 반응인,

화학식 1로 표시되는 카르바산 아릴-2-테트라조릴 에틸 에스테르의 제조 방법:

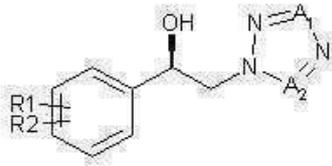
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



상기 화학식에서

R₁ 및 R₂ 는, 각각 독립적으로, 수소, 할로젠, 퍼플루오로알킬, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 탄소수 1 내지 8의 티오알콕시 및 탄소수 1 내지 8의 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되며;

A₁ 및 A₂ 중 어느 하나는 CH이고, 다른 하나는 N이다.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 카르바메이션 단계는 상기 화학식 3의 (R)-배열의 알코올 화합물을 나트륨 시아네이트 및 유기산과 반응시켜 이루어지는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 카르바메이션 단계는 상기 화학식 3의 (R)-배열의 알코올 화합물과 클로로술포닉 이소시아네이트, 트라이클로로아세틸 이소시아네이트 또는 트라이메틸실릴 이소시아네이트를 포함하는 아이소시아네이트 화합물의 반응 결과물을 가수분해하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 카르바메이션 단계는 상기 화학식 3의 (R)-배열의 알코올 화합물과 1,1'-카르보닐디이미다졸, 카르바모일할라이드, 디숙시닐 카르보네이트, 포스겐, 트라이포스겐 또는 클로로포르메이트를 포함하는 카르보닐 화합물의 반응 결과물에 NH₃를 도입하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 (R)-선택적 비대칭 환원 단계 및 카르바메이션 단계 중 어느 하나 이상의 단계 이후 결정화 단계 또는 감압분별증류 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

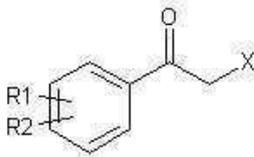
청구항 13

제12항에 있어서, 상기 결정화 단계는 반응 결과물에 아세톤, 아세토니트릴, 테트라히드로퓨란, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-디옥산, C₁ 내지 C₄의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매에서 선택되는 용해제를 첨가하는 단계; 및 물, C₁ 내지 C₄의 저급알코올, 디에틸에테르, 펜탄, 헥산, 시클로헥산, 헵탄 또는 이들의 혼합용매에서 선택되는 침전제를 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

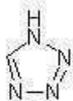
청구항 14

제1항에 있어서, 상기 화학식 2로 표시되는 아릴케톤은 하기 화학식 4로 표시되는 아릴케톤과 하기 화학식 5로 표시되는 테트라졸과의 치환 반응에 의하여 제조되는 것을 특징으로 하는 제조 방법:

[화학식 4]



[화학식 5]



상기 식에서,

X는 이탈기로서 할라이드 또는 술포네이트이며, R₁ 및 R₂는 제1항에서 정의한 바와 동일하다.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 치환 반응 후 반응 결과물에 아세톤, 아세토니트릴, 테트라히드로퓨란, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-디옥산 및 C₁ 내지 C₄의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매에서 선택되는 용해제를 첨가하는 단계; 및 물, C₁ 내지 C₄의 저급알코올, 디에틸에테르, 펜탄, 헥산, 시클로헥산, 헵탄 또는 이들의 혼합용매에서 선택되는 침전제를 첨가하는 단계를 포함하는 결정화 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 16

하기 화학식 2로 표시되는 아릴케톤의 (R)-선택적 비대칭 환원 단계에 의한 하기 화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물의 제조 방법으로서, 상기 (R)-선택적 비대칭 환원 단계는 생물학적 비대칭 환원 또는 화학적 비대칭 환원에 의하여 이루어지는 것을 특징으로 하며,

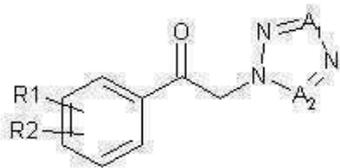
상기 생물학적 비대칭 환원은 화학식 2로 표시되는 아릴케톤, 산화환원효소를 생산하는 미생물 균주 및 환원력을 제공하는 물질을 함유하는 완충용액 중에서 이루어지며, 상기 산화환원효소를 생산하는 미생물 균주는 로도토룰라 무실라지노사(*Rhodotorula mucilaginosa*), 트리코놉시스 베리아빌리스(*Trigonopsis variabilis*), 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*), 칸디다 루고사(*Candida rugosa*), 피키아 아노말라(*Pichia anomala*), 피키아 자디니(*Pichia jadinii*), 빵 효모(*Baker's yeast*), 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 파스토리아누스(*Saccharomyces pastorianus*), 클레브시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*), 로도코쿠스 에리

쓰로폴리스(*Rhodococcus erythropolis*), 로도코쿠스 로도크로우스(*Rhodococcus rhodochrous*), 무코 라세모서스(*Mucor racemosus*) 및 지오텐리쿰 칸디둠(*Geotrichum candidum*)으로 이루어진 균에서 선택되고, 상기 환원력을 제공하는 물질은 포도당(Glucose), 글리세롤(Glycerol), 자당(Sucrose), 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, 2-펜탄올, 2-메틸펜탄올, 2-헥산올, 2-헵탄올, 2-옥탄올, 시클로헵탄올 및 시클로헥산올로 이루어진 균에서 선택되고,

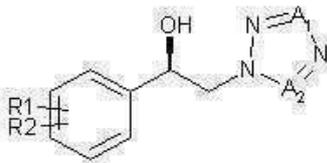
상기 화학적 비대칭 환원은 (-)-*B*-클로로다이아이소피노캄페일보란 및 (R)-2-메틸-CBS-옥사자보롤리딘/보란으로부터 선택되는 키랄형 보란 환원제에 의한 환원 반응; 또는 클로로 {[(1*S*,2*S*)-(+)-아미노-1,2-디페닐에틸](4-톨루엔술포닐)아미도} (p-사이멘)루테늄(II) 존재 하에 포름산-트라이에틸아민과 화학식 2로 표시되는 아릴케톤을 반응시키는 것을 포함하는 비대칭촉매 수소전이 반응(Asymmetric Catalytic Transfer Hydrogenation)에 의하여 이루어지는 것인,

화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물의 제조 방법:

[화학식 2]



[화학식 3]



상기 화학식에서

R₁ 및 R₂ 는, 각각 독립적으로, 수소, 할로젠, 퍼플루오로알킬, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 탄소수 1 내지 8의 디오알콕시 및 탄소수 1 내지 8의 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되며; A₁ 및 A₂ 중 어느 하나는 CH이고, 다른 하나는 N이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라졸릴-에틸 에스테르의 제조 방법이 개시된다. 더욱 상세하게는 아릴케톤의 비대칭 환원 단계를 포함하는 카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라졸릴-에틸 에스테르의 제조 방법이 개시된다.

배경 기술

[0002] 미국 특허공개 US 2006/0258718 A1에 개시된 카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라졸릴-에틸 에스테르(이하, 카르바메이트 화합물로도 지칭된다)는 항경련(anticonvulsants) 효과로 인해 CNS 장애, 특히 불안, 우울, 경련, 간질, 편두통, 조울, 약물 남용, 흡연, 주의력결핍과잉행동장애(ADHD), 비만, 수면장애, 신경병증통증, 뇌졸중, 인지 장애, 신경퇴화, 중풍에 따른 근경련 등의 치료에 유용하다.

[0003] 상기 카르바메이트 화합물은 치환된 테트라졸기의 N의 위치에 따라 테트라졸-1-일(이하, 1N 테트라졸로도 지칭된다) 화합물 및 테트라졸-2-일(이하, 2N 테트라졸로도 지칭된다) 화합물의 두 가지 위치이성질체로 나눌 수 있다. 카르바메이트 화합물을 제조하기 위한 테트라졸 도입과정에서 상기 두 가지 위치이성질체들이 1:1의 비율로 생성되는데, 약물학적으로 사용되기 위해서는 각각의 위치이성질체의 분리 정제가 필요하다.

[0004] 또한 상기의 카르바메이트 화합물은 키랄성 화합물로 의약품에 사용되기 위하여 높은 광학순도와 화학적 순도가

요구된다.

[0005] 이를 위하여 상기 미국 특허공개 US 2006/0258718에서는 순수한 거울상 입체이성질체인 (R)-아릴-옥시렌을 출발 물질로 하여 적절한 염기와 용매 하에서 테트라졸에 의한 고리 열림 반응을 통해 알코올 중간체를 제조하고, 얻어진 알코올 중간체에 카르바모일기를 도입하는 방법을 사용하였다. 또한 반응 중 생성되는 1N과 2N 위치이성질체들을 각각 분리 정제하기 위하여 알코올 형태의 중간체 제조 단계 이후 또는 카르바메이트 단계 이후에 컬럼 크로마토그래피법을 사용하였다.

[0006] 상기 제조 과정에 있어서, (R)-2-아릴-옥시렌은 치환된 (R)-만델산 유도체 등과 같은 광학활성 물질로부터 여러 단계의 경로를 통해 합성되거나, α-할로 아릴케톤의 비대칭 환원-고리형성 반응 또는 라세믹 2-아릴-옥시렌 혼합물의 거울상 이성질체 분리를 통해 얻어질 수 있다. 이와 같이 얻어지는 (R)-2-아릴-옥시렌은 고가의 화합물이다.

[0007] 또한 상기 (R)-2-아릴-옥시렌과 테트라졸의 고리 열림 반응은 테트라졸의 낮은 친핵성으로 인해 비교적 높은 온도에서 수행된다. 하지만 테트라졸 또는 테트라졸 류의 자발적 분해가 시작되는 온도는 약 110~120℃이므로, 상기의 고리 열림 반응은 폭주 반응의 위험성을 상당히 내포하고 있다.

[0008] 또한 반응선택성에 있어서 (R)-2-아릴-옥시렌 및 테트라졸은 각각 2개의 반응 자리가 존재하므로 이들의 고리 열림 반응 시 벤질 위치 또는 말단 위치에 각각 1N 및 2N 형태의 테트라졸이 치환될 수 있어 반응 결과물로서 총 4개의 위치이성질체 혼합물이 생성되므로, 반응 수율이 낮고 각각의 위치이성질체는 분리 정제가 용이하지 않다.

발명의 내용

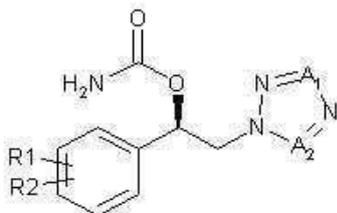
해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 한 측면은 신규한 (R)-1-아릴-2-테트라조릴-에틸 에스테르의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

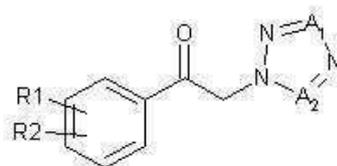
[0010] 본 발명의 한 측면에 따라, 화학식 1의 카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라조릴-에틸 에스테르의 제조 방법으로서, 화학식 2로 표시되는 아릴케톤의 (R)-선택적 비대칭 환원 단계 및 화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물의 카르바메이션 단계를 포함하는 제조 방법이 제공된다:

[0011] [화학식 1]



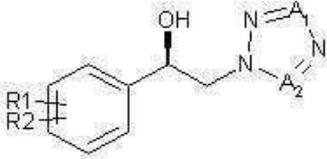
[0012]

[0013] [화학식 2]



[0014]

[0015] [화학식 3]



[0016]

[0017] 상기 화학식에서,

[0018] R₁ 및 R₂ 는, 각각 독립적으로, 수소, 할로젠, 퍼플루오로알킬, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 탄소수 1 내지 8의 티오알콕시 및 탄소수 1 내지 8의 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0019] A₁ 및 A₂ 중 어느 하나는 CH이고, 다른 하나는 N이다.

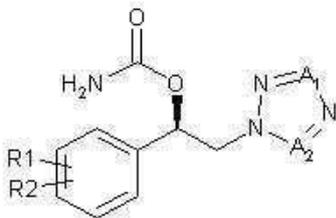
발명의 효과

[0020] 본 발명의 한 측면에 따르면, 광학 순도 및 화학적 순도가 높은 카르바메이트 화합물을 경제적으로 제조할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

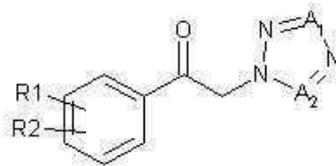
[0021] 본 발명의 일 실시예에 따른 화학식 1의 카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라조릴-에틸 에스테르의 제조 방법은 하기 화학식 2로 표시되는 아릴케톤의 (R)-선택적 비대칭 환원 단계 및 화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물의 카르바메이션 단계를 포함한다.

[0022] [화학식 1]



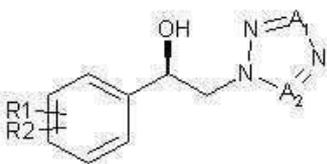
[0023]

[0024] [화학식 2]



[0025]

[0026] [화학식 3]



[0027]

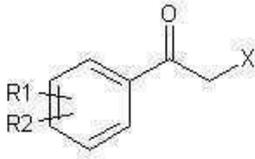
[0028] 상기 화학식에서,

[0029] R₁ 및 R₂ 는, 각각 독립적으로, 수소, 할로겐, 퍼플루오로알킬, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 탄소수 1 내지 8의 티오알콕시 및 탄소수 1 내지 8의 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0030] A₁ 및 A₂ 중 어느 하나는 CH이고, 다른 하나는 N이다.

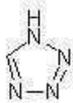
[0031] 상기 제조 방법에 있어서 출발 물질로 사용되는 화학식 2로 표시되는 아릴케톤은, 예를 들면, 하기 화학식 4의 아릴케톤과 하기 화학식 5의 테트라졸의 치환반응을 통해 제조될 수 있다:

[0032] [화학식 4]



[0033]

[0034] [화학식 5]



[0035]

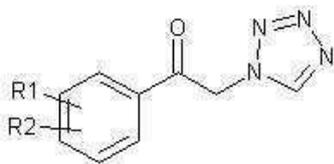
[0036] 상기 화학식에서

[0037] R₁ 및 R₂ 는 상술한 바와 같고;

[0038] X는, 예를 들면, 할라이드 또는 술포네이트와 같은 이탈기이다.

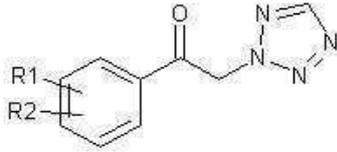
[0039] 화학식 4 및 5로 표시되는 화합물들은 상업적으로 이용 가능한 저가의 화합물로서 이들을 이용하여 화학식 2의 아릴케톤이 경제적으로 제조될 수 있다. 또한 상기 치환반응은 (R)-2-아릴-옥시렌과 테트라졸의 고리 열림 반응과는 달리 비교적 온화한 반응 조건에서 수행된다. 따라서 잠재적 폭발성을 지닌 테트라졸을 사용함에도 공정안전성이 확보될 뿐 아니라, 불필요한 벤질 위치의 위치이성질체들이 생성되지 않음으로써 수율이 높고 정제가 용이하다.

[0040] 상기 테트라졸 치환 반응에 의하여 생성되는 화학식 2로 표시되는 아릴케톤은 하기 화학식 2a로 표시되는 1N 아릴케톤 및 하기 화학식 2b로 표시되는 2N 아릴케톤의 위치이성질체 혼합물로 존재할 수 있는데, 각각의 위치 이성질체들은 상업적으로 이용 가능한 결정화 방법 또는 감압분별증류를 통해 각각의 위치이성질체들로 분리 정제될 수 있다.



2a

[0041]



2b

[0042]

[0043]

상기 결정화 방법은 상기 치환반응의 생성물인 위치이성질체의 혼합물에 용해제를 첨가하는 단계 및 침전제를 첨가하는 단계를 포함한다. 상기 결정화 방법은 침전제를 첨가하는 단계 이후, 여과 단계 및 여과액을 농축하고 침전제를 더욱 추가하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0044]

상기 용해제의 비제한적인 예는, 아세톤, 아세토니트릴, 테트라히드로퓨란, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-디옥산 및 C₁ 내지 C₄의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매를 포함한다. 상기 용해제는 상기 위치이성질체의 혼합물의 무게(g)를 기준으로 0 내지 20 부피(ml)(v/w)로 첨가될 수 있다. 본 명세서에서 용해제가 0 부피(ml)(v/w)로 첨가된다 함은, 상기 여과액을 희석함이 없이 바로 하기 기술하는 첨가제가 추가될 수 있다는 의미이다.

[0045]

상기 침전제의 비제한적인 예는, 물, C₁ 내지 C₄의 저급알코올, 디에틸에테르, 펜탄, 헥산, 시클로헥산, 헵탄 또는 이들의 혼합용매 등을 포함한다. 상기 침전제는 상기 위치이성질체의 혼합물의 무게(g)를 기준으로 0 내지 40 부피(ml)(v/w)로 서서히 첨가될 수 있다. 본 명세서에서 침전제가 0 부피(ml)(v/w)로 첨가된다 함은 침전제를 더 추가함이 없이 방치 또는 냉각 등의 방법에 의하여 결정을 얻는다는 의미이다.

[0046]

*침전제의 첨가로 얻어진 결정을 여과 단계에서 분리하면 화학식 2a의 1N 아릴케톤이 높은 순도의 결정으로 얻어질 수 있다.

[0047]

한편, 여과 단계에서 얻어지는 여과액을 농축하여 용해제 대비 침전제의 비율을 높임으로써 화학식 2b의 2N 아릴케톤이 매우 높은 순도의 결정형태로 얻어질 수 있다.

[0048]

이와 별도로 각각의 위치이성질체는 감압분별증류를 통하여 매우 높은 순도로 분리 정제가 가능하다. 감압분별증류는 약 80도 내지 230도의 온도 범위에서 수행될 수 있다. 감압 조건에 관하여, 상기 범위 내의 온도에서 각각의 위치이성질체가 증류될 수 있도록, 당업자라면 적절하게 압력을 선택할 수 있다. 예를 들면, 감압분별증류는 0.1mbar 내지 100mbar의 압력 하에서 수행될 수 있다.

[0049]

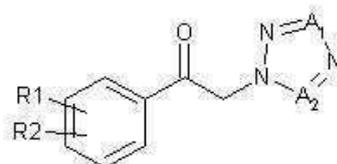
상기 결정화 방법 또는 감압분별증류 방법은 컬럼 크로마토그래피 방법과 달리, 상업적으로 용이하게 이용될 수 있다.

[0050]

화학식 2의 아릴케톤의 (R)-선택적 비대칭 환원에 의하여, 화학식 3으로 표시되는 (R)-배열의 알코올 화합물로 전환된다.

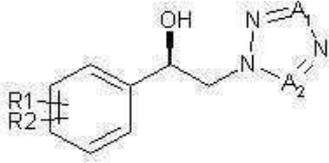
[0051]

[화학식 2]



[0052]

[0053] [화학식 3]



[0054]

[0055] 상기 화학식에서,

[0056] R₁ 및 R₂ 는, 각각 독립적으로, 수소, 할로젠, 퍼플루오로알킬, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 탄소수 1 내지 8의 티오알콕시 및 탄소수 1 내지 8의 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되며,

[0057] A₁ 및 A₂ 중 어느 하나는 CH이고, 다른 하나는 N이다.

[0058] 상기 (R)-선택적 비대칭 환원은, 예를 들면, 생물학적 비대칭 환원 또는 화학적 비대칭 환원에 의하여 이루어질 수 있다.

[0059] 본 발명의 일 구현예에 따른 카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라조릴-에틸 에스테르의 제조 방법에 있어서, 화학식 2의 아릴케톤 화합물은 생물학적 비대칭 환원 방법을 사용하여 높은 광학순도를 갖는 (R)-배열의 알코올 화합물로 제조된다.

[0060] 상기 생물학적 비대칭 환원은 산화환원효소를 생산하는 미생물 균주, 반응기질인 화학식 2의 아릴케톤 화합물, 환원력을 제공하는 물질을 함유하는 적절한 온도의 완충용액 중에서 이루어질 수 있다. 상기 완충용액은 필요에 따라 조효소를 더 함유할 수 있다.

[0061] 상기 산화환원 효소를 생산하는 미생물 균주는, 예를 들면, 칸디다(*Candida*) 속(屬)의 효모(*Yeast*), 예컨대 칸디다 파라프실로시스 (*Candida parapsilosis*) 또는 칸디다 루고사(*Candidarugosa*); 피키아(*Pichia*)속(屬)의 효모(*Yeast*), 예컨대 피키아 아노말라 (*Pichia anomala*) 또는 피키아자디니(*Pichia jadinii*); 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속의 효모, 예컨대 빵 효모(*Baker's yeast*), 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 사카로마이세스 파스토리아누스(*Saccharomyces pastorianus*); 로도토룰라 무실라지노사 (*Rhodotorula mucilaginosa*) 또는 트리곤옵시스 베리아빌리스(*Trigonopsis variabilis*)와 같은 기타 다른 효모; 세균(*Bacteria*) 계통, 예컨대 클레브시엘라 뉴모니에(*Klebsiella pneumoniae*), 엔테로박터 클로아케(*Enterobacter cloacae*), 어위니아 허비콜라(*Erwinia herbicola*), 마이크로코커스 루테우스 (*Micrococcus luteus*), 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*), 로도코커스 에리스로폴리스(*Rhodococcus erythropolis*) 또는 로도코커스 로도크로우스(*Rhodococcus rhodochrous*); 곰팡이(*Fungi*) 계통, 예컨대 무코 라세모서스(*Mucor racemosus*) 또는 지오텐리쿰 칸디둠 (*Geotrichum candidum*) 등일 수 있다.

[0062] 상기 산화환원효소를 생산하는 미생물 균주는 화학식 2의 아릴케톤 1g 당 약 0.1 내지 약 10g 사용될 수 있다.

[0063] 상기 환원력을 제공하는 물질의 예는, 포도당(*Glucose*), 글리세롤(*Glycerol*) 또는 자당(*Sucrose*) 등을 포함하는 당류; 메탄올, 에탄올, 1-프로판올, 이소프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, 2-펜탄올, 2-메틸펜탄올, 2-헥산올, 2-헵탄올, 2-옥탄올, 시클로펜탄올, 시클로헥산올 등과 같은 알코올류;를 포함한다.

[0064] 상기 완충용액은 피비에스 완충용액(인산완충된 생리식염수), 인산나트륨, 인산칼륨, 또는 트라이에탄올아민 수용액일 수 있으며, 예를 들면, 완충용액의 pH는 6 내지 8의 상태일 수 있다.

[0065] 상기 조효소는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트(NADP) 또는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD) 등일 수 있으며, 화학식 2의 아릴케톤 1g 당 약 0.1 내지 약 1mg 사용될 수 있다.

[0066] 상기 생물학적 비대칭 환원은 약 10℃ 내지 45℃에서 수행 될 수 있다.

[0067] 상기 생물학적 비대칭 환원은 경제적이고 환경친화적일 뿐만 아니라 광학선택성이 매우 높다. 또한 상술한 미생물 균주에 의하여 생산되는 효소와 상술한 반응 조건에 의하여 높은 광학순도의 (R)-배열의 알코올 화합물이 얻어질 수 있다.

[0068] 또한 본 발명의 다른 구현예에 따른 카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라조릴-에틸 에스테르의 제조 방법에 있어서,

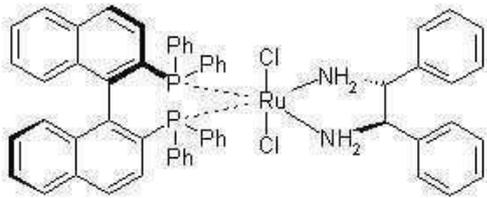
화학식 2의 아릴케톤 화합물은 비대칭 환경하에서의 화학적 방법에 의해 높은 광학순도를 갖는 (R)-배열의 알코올 화합물로 제조될 수 있다.

[0069] 화학적 비대칭 환원은, 예를 들면, 적절한 온도의 유기용매 하에서 키랄형 보란 환원제를 사용하는 방법, 비대칭 촉매 수소화 반응(Asymmetric Catalytic Hydrogenation) 또는 비대칭 촉매 수소전이 반응(Asymmetric Catalytic Transfer Hydrogenation)등의 방법에 따라 진행될 수 있다.

[0070] 상기의 키랄형 보란 환원제를 사용하는 방법으로, 화학식 2의 아릴케톤 화합물을 유기용매, 예컨대 디에틸에테르, 테트라히드로퓨란, 1,4-디옥산, 아세토니트릴, 디클로로메탄, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매에 녹인 후 1 내지 4 당량의 나트륨 (-)-B-클로로다이아이스피노캄페일보란(이하(-)-DIP-Cl) 또는 (R)-2-메틸-CBS-옥사자보롤리딘/보란(이하(R)-CBS/BH₃)등을 가하고 약 -10℃ 내지 약 60℃의 온도에서 반응이 수행될 수 있다.

[0071] 상기 비대칭 촉매 수소화 반응은, 0.0002 내지 0.1 당량의 (R)-비스포스포노-루테늄(II)-(R,R)-키랄성 디아민 착화합물 촉매를 유기용매, 예컨대 이소프로판올, 메탄올, 에탄올, t-부틸알코올 등에 녹인 용액에 0.0004 내지 0.2 당량의 무기염기를 첨가한 후 화학식 2의 아릴케톤 화합물 넣고 1 내지 20 기압의 수소 압력을 유지하며 약 -20℃ 내지 약 60℃의 반응온도에서 반응이 수행될 수 있다. 비대칭 촉매 수소화 반응의 유용한 촉매의 비제한적인 예는 디클로로[(R)-(+)-2,2'-비스(디페닐포스포노) 1,1'- 바이나프틸] [(1R, 2R) -(+)- 1,2 - 디페닐에틸렌디아민]루테늄(II)으로 화학식 6의 구조이다.

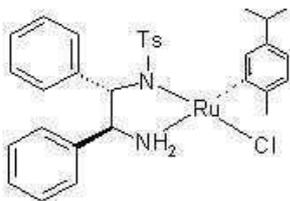
[0072] [화학식 6]



[0073]

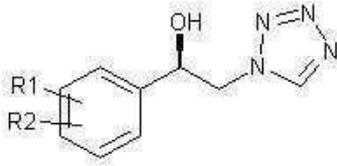
[0074] 상기 비대칭 촉매 수소전이 반응은, 화학식 2의 아릴케톤 화합물을 5:2 포름산-트라이에틸아민 공비혼합물 또는 이소프로판올등에 녹인 후 0.001 내지 0.1 당량의 [S,S]-모노술포네이트디아민-M(II) 아렌 착화합물 촉매(M은 루테늄 또는 로듐이다)를 가한 후 -10℃ 내지 약 60℃의 반응온도에서 반응이 수행될 수 있다. 비대칭 촉매 수소전이 반응의 유용한 촉매의 비제한적인 예는 클로로 {[(1S,2S)-(+)-아미노-1,2-디페닐에틸}(4-톨루엔술포닐)아미도} (p-사이멘)루테늄(II)으로, 화학식 7의 구조이다.

[0075] [화학식 7]



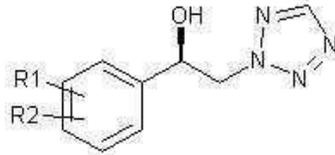
[0076]

[0077] 상기의 비대칭환원 반응을 통해 생성된 상기 화학식 3의 알코올 화합물은 하기 화학식 3a의 1N 알코올 및 하기 화학식 3b의 2N 알코올의 위치이성질체들의 혼합물로 존재할 수 있는데, 각각의 위치이성질체들의 혼합물들은 결정화 또는 감압분별증류 단계를 통해 높은 순도를 갖는 각각의 위치이성질체로 분리 정제될 수 있다:



3a

[0078]



3b

[0079]

[0080] 상기 결정화는 상기 비대칭 환원의 생성물인 위치이성질체들의 혼합물에 용해제를 첨가하는 단계; 및 침전제를 첨가하는 단계를 포함하며, 이후 여과 단계; 및 여과액을 농축하고 침전제를 더욱 추가하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0081] 상기 용해제의 비제한적인 예는, 아세톤, 아세토니트릴, 테트라히드로퓨란, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-디옥산 및 C₁ 내지 C₄의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매를 포함한다. 상기 용해제는 상기 위치이성질체의 혼합물의 무게(g)를 기준으로 0 내지 20 부피(ml)(v/w)로 첨가될 수 있다.

[0082] 상기 침전제의 비제한적인 예는, 물, C₁ 내지 C₄의 저급알코올, 디에틸에테르, 헵탄, 헥산, 시클로헥산, 헵탄 또는 이들의 혼합용매 등을 포함한다. 상기 침전제는 상기 위치이성질체의 혼합물의 무게(g)를 기준으로 0 내지 40 부피(ml)(v/w)로 서서히 첨가될 수 있다.

[0083] 침전제의 첨가 이후 여과 단계를 수행하면 1N 알코올(3a)이 높은 순도의 결정으로 얻어질 수 있다.

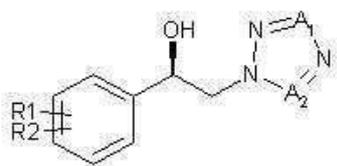
[0084] 여과 단계에서 얻어지는 여과액을 농축하고 용해제 대비 침전제의 비율을 높임으로써 2N 알코올(3b)이 매우 높은 순도의 결정형태로 얻어질 수 있다.

[0085] 이와 별도로 각각의 위치이성질체는 감압분별증류에 의하여 분리될 수 있다. 감압분별증류는 약 80도 내지 230도의 온도 범위에서 수행될 수 있다. 감압 조건에 관하여, 상기 범위 내의 온도에서 각각의 위치이성질체가 증류될 수 있도록, 당업자라면 적절하게 압력을 선택할 수 있다. 예를 들면, 감압분별 증류는 0.1mbar 내지 100mbar의 압력 하에서 수행될 수 있다.

[0086] 한편 이러한 결정화 또는 감압분별증류 단계는, 화학식 2의 아릴케톤의 위치이성질체들이 미리 결정화 방법에 의해 분리 정제되었다면, 생략될 수 있다.

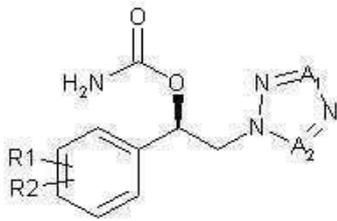
[0087] 화학식 3의 (R)-배열의 알코올 화합물은 카르바메이션 단계에서 카르바모일기가 도입됨에 따라 화학식 1로 표시되는 (R)-배열의 카르바메이트가 제조된다:

[0088] [화학식 3]



[0089]

[0090] [화학식 1]



[0091]

[0092] 상기 화학식에서

[0093] R₁ 및 R₂ 는, 각각 독립적으로, 수소, 할로젠, 퍼플루오로알킬, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 탄소수 1 내지 8의 티오알콕시 및 탄소수 1 내지 8의 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되며,

[0094] A₁ 및 A₂ 중 어느 하나는 CH이고, 다른 하나는 N이다.

[0095] 상기 카르바메이션 단계에 있어서 카르바모일기를 도입하는 방법으로, 예를 들면, 시아네이트염류-유기산, 이소시아네이트류-물, 카르보닐 화합물-암모니아를 사용하는 방법 등이 사용될 수 있다.

[0096] 상기 시아네이트염-유기산을 사용하는 방법으로서, 화학식 3으로 표시되는 (R)-배열의 알코올 화합물을 유기용매, 예컨대 디에틸에테르, 테트라히드로퓨란, 1,4-디옥산, 아세토니트릴, 디클로로메탄, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매에 녹인 후 1 내지 4 당량의 나트륨 시아네이트와 유기산, 예컨대 메탄술포닉산, 아세트산 등을 가하고 약 -10℃ 내지 약 70℃의 반응온도에서 반응이 수행될 수 있다.

[0097] 상기 이소시아네이트류-물을 사용하는 방법으로서 화학식 3을 표시되는 (R)-배열의 알코올을 유기용매, 예컨대 디에틸에테르, 테트라히드로퓨란, 1,4-디옥산, 아세토니트릴, 디클로로메탄, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매에 녹인 후 1 내지 4 당량의 이소시아네이트류, 예컨대 클로로술포닉 이소시아네이트, 트라이클로로아세틸 이소시아네이트, 트라이메틸실릴 이소시아네이트 등을 가하고 -50℃ 내지 약 40℃의 반응온도에서 반응이 진행된 후, 별도의 정제 없이 순차적으로 1 내지 20 당량의 물을 첨가하여 가수 분해 반응이 수행될 수 있다.

[0098] 상기 카르보닐 화합물-암모니아를 사용하는 방법으로서, 화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물을 유기용매, 예컨대 디에틸에테르, 테트라히드로퓨란, 1,4-디옥산, 아세토니트릴, 디클로로메탄, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매에 녹인 후 1 내지 4 당량의 카르보닐 화합물, 예컨대 1,1'-카르보닐디미다졸, 카르바모일 클로라이드, 디숙시닐 카르보네이트, 포스젠, 트라이포스젠, 클로로포르메이트 등을 가하고 -10℃ 내지 약 70℃의 반응온도에서 반응이 진행된 후, 별도의 정제 없이 순차적으로 1 내지 10 당량의 암모니아를 첨가될 수 있다.

[0099] 상기 카르바메이션 단계에서 얻어진 화학식 1의 카르바메이트 화합물은 이하 기술되는 결정화 방법을 통해 더욱 높은 광학순도와 화학적 순도로 정제될 수 있다. 결정화 방법은 카르바메이션 반응의 생성물에 용해제를 첨가하는 단계; 및 침전제를 첨가하는 단계;를 포함하며, 이후 여과 단계; 및 침전제를 추가하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0100] 상기 용해제의 비제한적인 예는, 아세톤, 아세토니트릴, 테트라히드로퓨란, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-디옥산 및 C₁ 내지 C₄ 의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매를 포함한다. 상기 용해제는 상기 반응 생성물의 무게(g)를 기준으로 0 내지 20 부피(ml)(v/w)로 첨가될 수 있다.

[0101] 상기 침전제의 비제한적인 예는, 물, C₁ 내지 C₄ 의 저급알코올, 디에틸에테르, 펜탄, 헥산, 시클로헥산, 헵탄 또는 이들의 혼합용매 등을 포함한다. 상기 침전제는 상기 반응 생성물의 무게(g)를 기준으로 0 내지 40 부피(ml)(v/w)로 서서히 첨가될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따른 제조 방법에 의하여 생물학적 또는 화학적 비대칭 환원 단계를 포함함으로써, 광학적 순도가 높은 카르바메이트 화합물을 제공될 수 있다. 상기 제조 방법은 온화한 반응 조건에서 이루어지므로 공정 안정성이 확보될 수 있다. 또한 비대칭환원 단계 전후 또는 카르바메이션 단계 후 중 어느 하나의 시기에 대규모 생산에도 적용가능한 결정화 단계 또는 감압분별 증류를 수행함으로써 화학적 순도가 더욱 우수한 카르바메이트 화합물이 제조될 수 있다.

[0102] 상기 카르바메이트 화합물은 항경련 등 중추신경계 장애에 효과가 탁월하다.

[0103] 이하 실시예를 통해 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 이에 본 발명의 범주가 한정되는 것은 아니다.

[0104] [실시예]

[0105] <테트라졸 아릴케톤류의 제조>

[0106] 제조예 1: 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-1-일)에탄-1-온의 제조

[0107] 2-브로모-2'-클로로아세트페논(228.3g, 0.978mol)과 탄산칼륨(161.6g, 1.170mol)을 아세토니트릴(2000mL)에 현탁 시킨 후 35w/w% 1H-테트라졸 디메틸포름아미드 용액(215.1g, 1.080mol)을 상온에서 첨가하였다. 반응물을 45℃에서 2시간 동안 교반하고 감압 농축하여 약 1500mL의 용매를 제거한 후 농축액을 에틸아세테이트(2000mL)로 희석하고 10% 소금물(3x2000mL)로 세척하였다. 분리된 유기층을 감압 농축하여 216.4g의 오일상의 고체 잔류물을 얻었다. 고체 잔류물을 에틸아세테이트(432mL)로 녹인 후 헵탄(600mL)을 서서히 가하였다. 생성된 결정을 상온에서 여과 세척하여 90.1g(0.405mol)의 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-1-일)에탄-1-온(이하, 1N 케톤)을 수득하였다.

[0108] ¹H-NMR(CDC1₃) δ8.87(s, 1H), δ7.77(d, 1H), δ7.39-7.62(m, 3H), δ5.98(s, 2H)

[0109] 제조예 2: 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-온의 제조

[0110] 상기 제조예 1의 여과단계에서 얻어진 여과액을 농축한 후 이소프로판올(100mL)에 녹이고 헵탄(400mL)을 서서히 가하여 결정화를 완결하였다. 생성된 결정을 5℃ 여과 세척하여 94.7g(0.425mol)의 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-온(이하, 2N 케톤)을 수득하였다.

[0111] ¹H-NMR(CDC1₃) δ8.62(s, 1H), δ7.72(d, 1H), δ7.35-7.55(m, 3H), δ6.17(s, 2H)

[0112] <생물학적 비대칭 환원 단계에 의한 (R)-배열의 알코올 화합물의 제조>

[0113] 생물학적 비대칭 환원에 있어서 효소를 생산하는 미생물 균주, 예컨대, 빵 효모(Baker's yeast, 제니코 식품(Jenico)사 제품)와 같이 동결 건조된 상태로 상업적으로 판매되는 균주는 적절하게 정량하여 반응에 사용된다. 또한, 다른 미생물 균주처럼, 급속 냉동고(Deep freezer, 레브코(Revco)사 제품)에 동결건조된 상태로 보관중인 균주는, 포도당을 포함하는 LB 평판배지(박토트리프톤: 1%, 효모추출물 : 0.5%, 염화나트륨: 0.5%, 포도당 : 0.1%, 한천: 1.5%)를 통해 콜로니(Colony)를 확보하고, 이를 3mL의 LB 액체배지를 포함하는 시험관에 접종한 뒤 30℃에서 1일 동안 전배양한다. 전배양이 완료된 균주는 다시 300mL의 LB 액체배지를 포함하는 1L 삼각 플라스크에 접종한 뒤, 교반 배양기를 통해 30℃에서 2일 동안 배양한다. 배양이 완료되면, 원심분리기를 통해 균주를 확보하고, 이를 정량하여 반응에 사용한다.

[0114] 제조예 3: 로도토룰라 무실라지노사(Rhodotorula mucilaginosa)를 이용한 1N 알코올의 제조

[0115] 5%(w/v)의 글리세롤을 포함하는 인산완충용액(10mL, pH7.0)에 산화환원 효소를 생산하는 미생물 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(Rhodotorula mucilaginosa) KCTC7117(500mg)와 상기 제조예 1에서 제조된 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-1-일)에탄-1-온(100mg, 0.449mmol)을 넣고 조효소인 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD, 0.5mg)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 교반 배양기를 통해 상온에서 4일 간 배양한 후 에틸아세테이트(1mL)로 추출하여 R-배열의 알코올 화합물인 (R)-1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-1-일)에탄-1-올(이하, 1N 알코올)을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 1에 표시하였다. 이하 전환율(%), 순도(%)

및 생성물의 광학순도(%)는 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 측정되었으며 하기의 수식을 사용하여 계산 하였다.

[0116] 전환율(%)=[(생성물의 면적)/(반응물의 면적+생성물의 면적)]x100

[0117] 순도(%)= (생성물의 면적)/(HPLC 상의 모든 peak의 면적)] x100

[0118] 광학순도(%)=[(생성물 중 R배열 면적- S배열 면적)/(생성물 중 R배열 면적+ S배열 면적)]x100

[0119] ¹H-NMR(CDC1₃) δ8.74(s, 1H), δ7.21-7.63(m, 4H), δ5.57(m, 1H), δ4.90(d, 1H), δ4.50(d, 1H), δ3.18(d, 1H)

[0120] 제조예 4: 로도토룰라 무실라지노사(Rhodotorula mucilaginosa)를 이용한 2N 알코올의 제조

[0121] 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-1-일)에탄-1-온 대신 제조예 2에서 제조된 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-온을 사용한 것을 제외하고, 상기 제조예 3과 동일한 방법을 사용하여 (R)-1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-올(이하 2N 알코올)을 제조하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 1에 함께 표시하였다.

[0122] ¹H-NMR(CDC1₃) δ8.55(s, 1H), δ7.28-7.66(m, 4H), δ5.73(d, 1H), δ4.98(d, 1H), δ4.83(d, 1H), δ3.38(br, 1H)

[0123] 제조예 5: 트리코놉시스 베리아빌리스(Trigonopsis variabilis)를 사용한 1N 알코올의 제조

[0124] 산화환원 효소를 생산하는 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(Rhodotorula mucilaginosa) KCTC7117 대신 트리코놉시스 베리아빌리스(Trigonopsis variabilis) KCTC7263로 사용한 것을 제외하고, 제조예 3과 동일한 방법을 사용하여 R-배열의 1N 알코올을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 1에 함께 표시하였다.

[0125] 제조예 6: 트리코놉시스 베리아빌리스(Trigonopsis variabilis)를 사용한 2N 알코올의 제조

[0126] 산화환원 효소를 생산하는 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(Rhodotorula mucilaginosa) KCTC7117 대신 트리코놉시스 베리아빌리스(Trigonopsis variabilis) KCTC7263로 사용한 것을 제외하고, 제조예 4와 동일한 방법을 사용하여 R-배열의 2N 알코올을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 1에 함께 표시하였다.

[0127] [표 1]

	균주명	생성물	전환율[%]	광학순도[%]
제조예 3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> KCTC 7117	1N 알코올	54.1	98.9
제조예 4	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> KCTC 7117	2N 알코올	78.5	97.4
제조예 5	<i>Trigonopsis variabilis</i> KCTC 7263	1N 알코올	11.9	99.9
제조예 6	<i>Trigonopsis variabilis</i> KCTC 7263	2N 알코올	28.3	99.9

[0128]

[0129] 제조예 7 및 8: 칸디다(Candida) 속(屬)의 효모를 이용한 1N 알코올의 제조

[0130] 산화환원 효소를 생산하는 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(Rhodotorula mucilaginosa) KCTC7117 대신 칸디다 속의 효모로서, 각각, 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*) ATCC20179 또는 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) KCTC7292를 사용한 것을 제외하고, 제조예 3과 동일한 방법을 사용하여 R-배열의 1N 알코올을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 2에 나타내었다.

[0131] 제조예 9 및 10: 칸디다(Candida) 속(屬)의 효모를 이용한 2N 알코올의 제조

[0132] 산화환원 효소를 생산하는 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(*Rhodotorula mucilaginosa*) KCTC7117 대신 칸디다 속의 효모로서, 각각, 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*) ATCC20179 또는 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) KCTC7292를 사용한 것을 제외하고, 제조예 4와 동일한 방법을 사용하여 R-배열의 2N 알코올을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 2에 함께 나타내었다.

[0133] [표 2]

	균주	생성물	전환율[%]	광학순도[%]
제조예 7	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 20179	1N 알코올	46.5	98.5
제조예 8	<i>Candida rugosa</i> KCTC 7292	1N 알코올	27.6	99
제조예 9	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 20179	2N 알코올	70.1	97.9
제조예 10	<i>Candida rugosa</i> KCTC 7292	2N 알코올	65.4	99

[0134]

[0135] 제조예 11 및 12: 피키아(Pichia) 속(屬)의 효모를 이용한 1N 알코올의 제조

[0136] 산화환원 효소를 생산하는 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(*Rhodotorula mucilaginosa*) KCTC7117 대신 피키아 속의 효모로서, 각각, 피키아 아노말라(*Pichia anomala*) KCTC1206 또는 피키아 자디니(*Pichia jadinii*) KCTC7008를 사용한 것을 제외하고, 제조예 3과 동일한 방법을 사용하여 R-배열의 1N 알코올을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 3에 나타내었다.

[0137] 제조예 13 및 14: 피키아(Pichia) 속(屬)의 효모를 이용한 2N 알코올의 제조

[0138] 산화환원 효소를 생산하는 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(*Rhodotorula mucilaginosa*) KCTC7117 대신 칸디다 속의 효모로서, 각각, 피키아 아노말라(*Pichia anomala*) KCTC1206 또는 피키아 자디니(*Pichia jadinii*) KCTC7008를 사용한 것을 제외하고, 제조예 4와 동일한 방법을 사용하여 R-배열의 2N 알코올을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 3에 함께 나타내었다.

[0139] [표 3]

	균주	생성물	전환율[%]	광학순도[%]
제조예 11	<i>Pichia anomala</i> KCTC 1206	1N 알코올	23.8	99.9
제조예 12	<i>Pichia jadinii</i> KCTC 7008	1N 알코올	56.1	99.9
제조예 13	<i>Pichia anomala</i> KCTC 1206	2N 알코올	53.8	98.2
제조예 14	<i>Pichia jadinii</i> KCTC 7008	2N 알코올	78.3	98.9

[0140]

[0141] 제조예 15 내지 20: 사카로마이세스(Saccharomyces) 속(屬)의 효모를 이용한 1N 알코올의 제조

[0142] 산화환원 효소를 생산하는 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(*Rhodotorula mucilaginosa*) KCTC7117 대신 사카로마이세스 속의 효모로서, 각각, 빵 효모(*Baker's yeast*), 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) KCTC7108, 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) KCTC1205, 사카로마이세스 세

레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) KCTC7107, 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) KCTC1552 또는 사카로마이세스 파스토리아누스 (*Saccharomyces pastorianus*) KCTC1218를 사용한 것을 제외하고, 제조예 3과 동일한 방법을 사용하여 R-배열의 1N 알코올을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 4에 나타내었다.

[0143] 제조예 21 내지 26: 사카로마이세스(Saccharomyces) 속(屬)의 효모를 이용한 2N 알코올의 제조

[0144] 산화환원 효소를 생산하는 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(*Rhodotorula mucilaginosa*) KCTC7117 대신 사카로마이세스 속의 효모로서, 각각, 빵 효모(*Baker's yeast*), 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) KCTC7108, 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) KCTC1205, 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) KCTC7107, 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) KCTC1552 또는 사카로마이세스 파스토리아누스 (*Saccharomyces pastorianus*) KCTC1218를 사용한 것을 제외하고, 제조예 4과 동일한 방법을 사용하여 R-배열의 2N 알코올을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 4에 함께 나타내었다

[0145] [표 4]

	균주	생성물	전환율[%]	광학순도[%]
제조예 15	빵 효모	1N 알코올	74.6	99.9
제조예 16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 7108	1N 알코올	32.7	93.8
제조예 17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 1205	1N 알코올	36.6	89.9
제조예 18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC7107	1N 알코올	18.2	94.6
제조예 19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 1552	1N 알코올	19.8	91.8
제조예 20	<i>Saccharomyces pastorianus</i> KCTC 1218	1N 알코올	20.4	92.5
제조예 21	빵 효모	2N 알코올	85.1	98.1
제조예 22	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 7108	2N 알코올	57.4	90.5
제조예 23	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 1205	2N 알코올	64.8	86.5
제조예 24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC7107	2N 알코올	36	87.7
제조예 25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 1552	2N 알코올	38.5	83.3
제조예 26	<i>Saccharomyces pastorianus</i> KCTC 1218	2N 알코올	33.8	77.2

[0146]

[0147] 제조예 27 내지 30: 세균(Bacteria) 계통을 이용한 1N 알코올의 제조

[0148] 산화환원 효소를 생산하는 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(*Rhodotorula mucilaginosa*) KCTC7117 대신 세균으로서, 각각, 클레브시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) IF03319, 바실러스 스테아로써모필러스 (*Bacillus stearothermophilus*) KCTC1752, 로도코커스 에리스로폴리스(*Rhodococcus erythropolis*) KCCM40452 또는 로도코커스 로도크로우스(*Rhodococcus rhodochrous*) ATCC21197를 사용한 것을 제외하고, 제조예 3과 동일한 방법을 사용하여 R-배열의 1N 알코올을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 5에 나타내었다.

[0149] 제조예 31 내지 37: 세균(Bacteria) 계통을 이용한 2N 알코올의 제조

[0150] 산화환원 효소를 생산하는 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(*Rhodotorula mucilaginosa*) KCTC7117 대신 세균으

로서, 각각, 클레브시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) IF03319, 엔테로박터 클로아케(*Enterobacter cloacae*) KCTC2361, 어위니아 허비콜라(*Erwinia herbicola*) KCTC2104, 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*) KCTC1071, 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*) KCTC1752, 로도코커스 에리쓰로폴리스(*Rhodococcus erythropolis*) KCCM40452 또는 로도코커스 로도크로우스(*Rhodococcus rhodochrous*) ATCC21197를 사용한 것을 제외하고, 제조에 4와 동일한 방법을 사용하여 R-배열의 2N 알코올을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 5에 함께 나타내었다.

[표 5]

	균주	생성물	전환율[%]	광학순도[%]
제조예 27	<i>Klebsiella pneumoniae</i> IF0 3319	1N 알코올	1.3	99.9
제조예 28	<i>Bacillus stearothermophilus</i> KCTC 1752	1N 알코올	14	94.9
제조예 29	<i>Rhodococcus erythropolis</i> KCCM 40452	1N 알코올	42	90.1
제조예 30	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC 21197	1N 알코올	14.1	92.9
제조예 31	<i>Klebsiella pneumoniae</i> IF0 3319	2N 알코올	3.4	99.9
제조예 32	<i>Enterobacter cloacae</i> KCTC 2361	2N 알코올	11.8	89.2
제조예 33	<i>Erwinia herbicola</i> KCTC 2104	2N 알코올	6	87.7
제조예 34	<i>Micrococcus luteus</i> KCTC1071	2N 알코올	13.3	92.6
제조예 35	<i>Bacillus stearothermophilus</i> KCTC 1752	2N 알코올	40.1	88.2
제조예 36	<i>Rhodococcus erythropolis</i> KCCM 40452	2N 알코올	69.8	80.6
제조예 37	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC 21197	2N 알코올	25.4	74.8

제조예 38 및 39: 곰팡이(Fungi)를 이용한 1N 알코올의 제조

산화환원 효소를 생산하는 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(*Rhodotorula mucilaginosa*) KCTC7117 대신 곰팡이로서, 각각, 무코 라세모서스(*Mucor racemosus*) KCTC6119, 지오텐리쿰 칸디덤(*Geotrichum candidum*) KCTC6195, 지오텐리쿰 칸디덤(*Geotrichum candidum*) IF05767 또는 지오텐리쿰 칸디덤(*Geotrichum candidum*) IF04597를 사용한 것을 제외하고, 제조에 3과 동일한 방법을 사용하여 R-배열의 1N 알코올을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 6에 나타내었다.

제조예 40 내지 42: 곰팡이(Fungi)를 이용한 2N 알코올의 제조

산화환원 효소를 생산하는 균주로서 로도토룰라 무실라지노사(*Rhodotorula mucilaginosa*) KCTC7117 대신 곰팡이로서, 각각, 무코 라세모서스(*Mucor racemosus*) KCTC6119, 지오텐리쿰 칸디덤(*Geotrichum candidum*) KCTC6195, 지오텐리쿰 칸디덤(*Geotrichum candidum*) IF05767 또는 지오텐리쿰 칸디덤(*Geotrichum candidum*) IF04597를 사용한 것을 제외하고, 제조에 4와 동일한 방법을 사용하여 R-배열의 2N 알코올을 수득하였다. 전환율 및 생성물의 광학순도를 하기 표 6에 함께 나타내었다.

[0157] [표 6]

	균주	생성물	전환율[%]	광학순도[%]
제조예 38	<i>Mucor racemosus</i> KCTC 6119	1N 알코올	10.2	97.1
제조예 39	<i>Geotrichum candidum</i> IF0 4597	1N 알코올	18.2	99.9
제조예 40	<i>Mucor racemosus</i> KCTC 6119	2N 알코올	32.7	95.1
제조예 41	<i>Geotrichum candidum</i> KCTC 6195	2N 알코올	25.3	96.3
제조예 42	<i>Geotrichum candidum</i> IF0 4597	2N 알코올	32	96.3

[0158]

[0159] <

[0160] 화학적 비대칭 환원 단계에 의한 (R)-배열의 알코올 화합물의 제조>

[0161] 제조예 43 및 44: 키랄형 보란 환원제를 이용한 1N 알코올의 제조

[0162] 제조예 1에서 제조된 1N 케톤(100mg, 0.449mmol)을 테트라히드로퓨란(1mL)에 녹인 후, 키랄형 보란 환원제로서 (-)-B-클로로다이아이소피노캄페일보란 또는 (R)-2-메틸-CBS-옥사자보롤리딘/보란(2당량)을 0℃에서 첨가하였다. 반응물을 상온에서 24시간 교반 후 에틸아세테이트(1mL)로 추출하여 하기 표 7의 결과를 얻었다.

[0163] 제조예 45 및 46: 키랄형 보란 환원제를 이용한 2N 알코올의 제조

[0164] 제조예 2에서 제조된 2N 케톤(100mg, 0.449mmol)을 테트라히드로퓨란(1mL)에 녹인 후, 키랄형 보란 환원제로서 (-)-B-클로로다이아이소피노캄페일보란 또는 (R)-2-메틸-CBS-옥사자보롤리딘/보란(2 당량)을 0℃에서 첨가하였다. 반응물을 상온에서 24시간 교반 후 에틸아세테이트(1mL)로 추출하여 하기 표 7의 결과를 얻었다.

[0165] [표 7]

	키랄형 보란 환원제	생성물	전환율[%]	광학순도[%]
제조예 43	(-)-B-클로로다이아이소피노캄페일보란	1N 알코올	99.0	83.0
제조예 44	(R)-2-메틸-CBS-옥사자보롤리딘/보란	1N 알코올	99.0	14.1
제조예 45	(-)-B-클로로다이아이소피노캄페일보란	2N 알코올	99.0	84.6
제조예 46	(R)-2-메틸-CBS-옥사자보롤리딘/보란	2N 알코올	99.0	31.5

[0166]

[0167] 제조예 47 및 48: 비대칭축매 수소전이를 이용한 1N 및 2N 알코올의 제조

[0168] 각각, 제조예 1에서 제조된 1N 케톤 또는 제조예 2에서 제조된 2N 케톤(222mg, 1.0mmol)을 5:2 포름산-트라이에틸아민 공비혼합물(1.4mL)에 녹인 후 아르곤 환경으로 치환하였다. 반응물을 0℃로 냉각한 후 아르곤 환경에서 화학식 7의 클로로 [(1S,2S)-(+)-아미노-1,2-디페닐에틸](4-톨루엔술포닐)아미도} (p-사이멘)루테늄(II) (2mg, 0.003mmol)을 반응용액에 첨가하였다. 반응물을 상온에서 48시간 교반 후 에틸아세테이트(2mL)로 추출하여 하기 표 9의 결과를 얻었다.

[0169] [표 8]

	반응물	생성물	전환율[%]	광학순도[%]
제조예 47	1N 케톤	1N 알코올	99.0	91.4
제조예 48	2N 케톤	2N 알코올	99.0	87.8

[0170]

[0171] 제조예 49: 감압분별증류를 통한 2N 알코올의 정제

[0172] 상기 제조예 48과 동일한 방법에 따라 제조된 2N 알코올(83.9g, 순도 96.0%)을 160℃ 1mbar조건에서 감압분별증류를 통해 1N 알코올이 제거된 높은 순도의 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-올 (67.1g, 순도 99.5%)을 회수하였다.

[0173] <카르바메이트의 제조>

[0174] 제조예 50: 카르바산 (R)-1-(2-클로로페닐)-2-(테트라졸-1-일)에틸 에스테르의 제조

[0175] 5%(w/v)의 글리세롤을 포함하는 피비에스 완충용액(1000mL, pH 7.0)에 빵 효모(50g)와 상기 제조예 1의 방법에 따라 제조된 1N 케톤(10g, 44.9mmol)을 넣고 조효소인 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD, 1 mg)를 첨가하였다. 반응 현탁액을 30℃에서 4일간 교반 하였다. 반응액에 에틸아세테이트(500mL)를 첨가 하여 수층을 제거한 후 남겨진 유기층을 10% 소금물(3x500mL)로 세척하였다. 유기층에 마그네슘설페이트를 가한 후 잔류된 현탁물과 함께 여과 하였다. 여과액을 감압 농축하여 8.5g의 고체 잔류물을 얻었다. 고체 잔류물에 에틸아세테이트(10mL)를 넣고 45℃에서 녹인 후 상온으로 냉각한 후 헵탄(20mL)을 서서히 가하여 결정화를 완결하였다. 생성된 결정을 여과 세척하여 7.32g(32.6mmol)의 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-1-일)에탄-1-올(광학순도 99.9%)을 수득하였다. 수득된 결정을 디클로로메탄(73mL)에 녹여 10℃로 냉각한 후 메탄술폰산(5.5mL, 84.7mmol)을 넣고 반응액에 나트륨 시아네이드(4.24g, 65.2mmol)을 서서히 첨가하였다. 반응물을 10℃에서 12시간 교반 후 10% 소금물(3x100mL)로 세척하였다. 유기층을 감압 농축하여 얻은 농축액에 이소프로판올(14mL)을 넣고 45℃로 가온 후 다시 상온으로 냉각하여 결정화를 완결하였다. 생성된 결정을 여과 세척하여 7.84g(29.3mmol)의 카르바산 (R)-1-(2-클로로페닐)-2-(테트라졸-1-일)에틸 에스테르(순도 >99.0%, 광학순도 >99.0%)를 수득하였다.

[0176] ¹H-NMR(Acetone-d₆) δ9.14(s, 1H), δ7.31-7.59(m, 4H), δ6.42(m, 1H), δ6.0-6.75(br, 2H) δ4.90(d, 1H), δ5.03(m, 2H)

[0177] 제조예 51: 카르바산 (R)-1-(2-클로로페닐)-2-(테트라졸-2-일)에틸 에스테르의 제조

[0178] 상기 제조예 2에 방법에 따라 제조된 2N 케톤(15.5g, 69.6mmol)을 5:2 포름산-트라이에틸아민 공비혼합물(60mL)에 녹인 후 아르곤 환경으로 치환하였다. 아르곤 환경에서 화학식 7의 클로로 {[(1S,2S)-(+)-아미노-1,2-디페닐에틸]}(4-톨루엔설포닐)아미도} (p-사이멘)루테늄(II) (140mg, 0.220mmol)을 반응용액에 첨가하였다. 반응물을 상온에서 48시간 교반 하였다. 반응액을 에틸아세테이트(200mL)로 희석한 후 10% 소금물(3x100mL)로 세척하였다. 유기층을 마그네슘설페이트로 건조 여과한 후 여과액을 감압 농축하여 14.8g(65.9mmol)의 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-올(광학 순도 87.8%)을 오일상 잔류물형태로 얻었다. 오일 잔류물에 테트라히드로퓨란(150mL)을 넣고 -15℃에서 냉각한 후 클로로설포닐이소시아네이트(6.9mL, 79.2mmol)를 서서히 첨가하였다. 반응물을 -10℃에서 2시간 교반 후 물(10mL)를 서서히 첨가하여 반응을 종결 시켰다. 반응액을

감압 농축하여 약 100mL의 용매를 제거하였다. 농축액을 에틸아세테이트(200mL)로 희석한 후 10%의 소금물 (3x150mL)로 세척하였다. 유기층을 감압 농축하여 얻은 농축액을 이소프로판올(30mL)에 녹이고 헵탄(90mL)을 서서히 가하여 결정화를 완결하였다. 생성된 결정을 여과 세척하여 15.4g(57.5mmol)의 카르바산 (R)-1-(2-클로로페닐)-2-(테트라졸-2-일)에틸 에스테르 (순도 >99.0%, 광학순도 >99.0%)를 수득하였다.

[0179]

$^1\text{H-NMR}$ (Acetone- d_6) δ 8.74(s, 1H), δ 7.38-7.54(m, 4H), δ 6.59(m, 1H), δ 6.16(br, 2H) δ 4.90(d, 1H), δ 5.09(m, 2H).