



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월20일
 (11) 등록번호 10-1708437
 (24) 등록일자 2017년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 257/06 (2006.01) *A61K 31/41* (2006.01)
C12P 17/12 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7008386
 (22) 출원일자(국제) 2012년10월15일
 심사청구일자 2015년09월18일
 (85) 번역문제출일자 2012년03월30일
 (65) 공개번호 10-2012-0087124
 (43) 공개일자 2012년08월06일
 (86) 국제출원번호 PCT/KR2010/007069
 (87) 국제공개번호 WO 2011/046380
 국제공개일자 2011년04월21일
 (30) 우선권주장
 61/251,867 2009년10월15일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 Tetrahedron: Asymmetry, 2009, 20(5), 513-557
 KR1020080005437 A*
 KR1020080087000 A*
 KR1020100137389 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

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

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 민경난

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

(57) 요약

아릴케톤의 거울상이성질선택적 효소적 환원(enantioselective enzymatic reduction) 단계 및 그 결과로 생긴 알코올의 카르바화 단계를 포함하는 카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라졸릴-에틸 에스테르의 조제 방법이 개시되었다.

(72) 발명자

이대원

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

김희호

대전 서구 계룡로509번길 7, 705호 (탄방동, 시티
빌1)

이동호

대전 서구 갈마로 262, 105동 1704호 (내동, 맑은
아침아파트)

이현석

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

명세서

청구범위

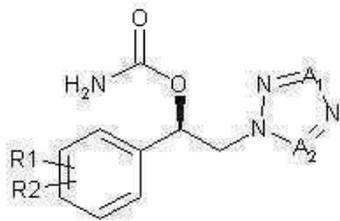
청구항 1

화학식 2로 표시되는 아릴케톤을 거울상이성질선택적 효소적 환원(enantioselective enzymatic reduction)시켜 화학식 3으로 표시되는 (R)-배열의 알코올 화합물을 생성하는 단계; 및 상기 알코올을 카르뱌화하는 단계를 포함하며,

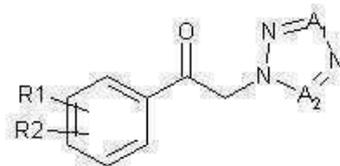
상기 거울상이성질선택적 효소적 환원이 화학식 2의 화합물, 아미노산 서열 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 4와 적어도 90%의 상동성을 갖는 옥시도리덕타아제(oxidoreductase), 환원 단계 중 산화되고 계속하여 재생성되는 보조인자인 NADH 또는 NADPH, 화학식 R_xR_yCHOH 로 표시되는 2차 알코올을 포함하는 공동기질(상기 R_x 는 x가 1 내지 10의 정수인 탄소를 의미하고, R_y 는 y가 x의 두 배에 2를 더한 정수인 수소를 의미한다), 및 버퍼를 포함하는 반응 혼합물에서 수행되는 것인,

화학식 1로 표시되는 카르뱌산 아릴-2-테트라졸릴 에틸 에스테르의 제조 방법:

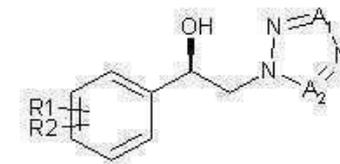
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



상기 화학식에서,

R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로, 수소, 할로젠, 퍼플로오로알킬, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 탄소수 1 내지 8의 티오알콕시, 및 탄소수 1 내지 8의 알콕시로 이루어진 그룹으로부터 선택되며;

A_1 및 A_2 중 어느 하나는 CH이고, 다른 하나는 N이다.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 옥시도리덕타아제가 각각 핵산 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7 또는 서열 번호: 8에 의해 코딩되는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 옥시도리덕타아제가 칸디다 마그놀리아(*Candida magnolia*), 칸디다 베시니(*Candida vaccinii*) 또는 굴토끼(*Oryctolagus cuniculus*)로부터 분리될 수 있는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 옥시도리덕타아제가 완전히 정제된 상태 또는 부분 정제된 상태로 반응 혼합물에 존재하거나, 또는 상기 옥시도리덕타아제를 발현한 미생물 세포에 존재하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 옥시도리덕타아제가 그것을 발현한 미생물 세포에 존재하고, 상기 미생물 세포는 네이티브(native) 상태, 투과가능한(permeabilized) 상태 또는 용해된 상태로 존재하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 미생물 세포가 형질전환된 대장균(*Escherichia coli*) 세포인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 산화된 보조인자(cofactor)의 재생성이 공동기질의 산화로부터 일어나는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 공동기질이 2-프로판올, 2-부탄올, 2-펜탄올, 4-메틸-2-펜탄올, 2-헥탄올 및 2-옥탄올을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 2차 알코올인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 옥시도리덕타아제가 화학식 2의 아릴케톤의 환원 및 공동기질의 산화 모두를 일으키는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 카르bam화 단계가 화학식 3의 (R)-배열의 알코올 화합물을 무기 시아네이트 및 유기산과 반응시켜 수행되는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 카르bam화 단계가 화학식 3의 (R)-배열의 알코올 화합물과 클로로설포닉 이소시아네이트, 트리클로로아세틸 이소시아네이트 및 트리메틸실릴 이소시아네이트로 구성된 그룹으로부터 선택되는 이소시아네이트 화합물 간의 반응으로부터 유래하는 생성물을 가수분해함으로써 수행되는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 카르bam화 단계가 화학식 3의 (R)-배열의 알코올 화합물과 1,1-카르보디이미다졸, 카르바모일 할라이드, 디숙시닐 카르보네이트, 포스겐, 트리포스겐 또는 클로로포르메이트를 포함하는 카르보닐 화합물 간의 반응으로부터 유래하는 생성물에 암모니아를 도입함으로써 수행되는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 거울상이성질선택적 효소적 환원 단계 및 카르bam화 단계 중 적어도 하나의 단계 후에 결정화 단계를 더 포함하는 방법.

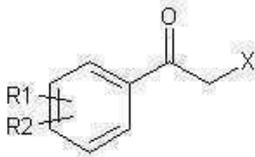
청구항 15

제14항에 있어서, 결정화 단계가 아세톤, 아세토니트릴, 테트라히드로퓨란, 에틸 아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-디옥산, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 가용화제를 반응 생성물에 첨가하는 단계; 및 그것에 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 디에틸에테르, 펜탄, 헥산, 시클로헥산 및 이들의 혼합물로 구성된 그룹으로부터 선택되는 침전제를 첨가하는 단계를 포함하는 방법.

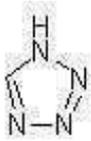
청구항 16

제1항에 있어서, 하기 화학식 4의 아릴케톤 및 하기 화학식 5의 테트라졸 간의 치환 반응에 의해 화학식 2의 아릴케톤을 제조하는 단계를 추가로 포함하는 방법:

[화학식 4]



[화학식 5]



상기 화학식에서,

R₁ 및 R₂는 제1항에서 정의된 바와 같고;

X는 할라이드 및 설포네이트로부터 선택되는 이탈기이다.

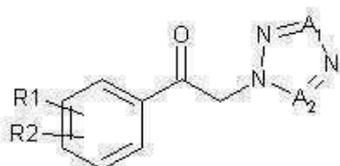
청구항 17

제16항에 있어서, 아세톤, 아세토니트릴, 테트라히드로퓨란, 에틸 아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-디옥산, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 가용화제를 치환 반응에 의해 수득한 생성물에 첨가하는 단계; 및 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 디에틸에테르, 펜탄, 헥산, 시클로헥산, 헵탄 및 이들의 혼합물로부터 선택되는 침전제를 첨가하는 단계를 포함하는 결정화 단계를 더 포함하는 방법.

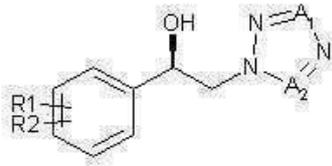
청구항 18

하기 화학식 2로 표시되는 아릴케톤을 거울상이성질선택적 효소적 환원시키는, 하기 화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물의 제조 방법으로서, 상기 환원은 상기 화학식 2의 화합물, 아미노산 서열 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 4과 적어도 90%의 상동성을 갖는 옥시도리덕타아제, 환원 단계 중 산화되고 계속하여 재생성되는 보조인자인 NADH 또는 NADPH, 화학식 R_xR_yCHOH에 의해 표시되는 2차 알코올을 포함하는 공동기질(상기 R_x는 x가 1 내지 10의 정수인 탄소를 의미하고, R_y는 y가 x의 두 배에 2를 더한 정수인 수소를 의미한다), 및 버퍼를 포함하는 반응 혼합물에서 수행되는 방법:

[화학식 2]



[화학식 3]



상기 화학식에서,

R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로, 수소, 할로젠, 퍼플로오로알킬, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 탄소수 1 내지 8의 티오알콕시, 및 탄소수 1 내지 8의 알콕시로 이루어진 그룹으로부터 선택되며;

A₁ 및 A₂ 중 어느 하나는 CH이고, 다른 하나는 N이다.

청구항 19

제18항에 있어서, 옥시도리텍타아제가 각각 핵산 서열 번호: 5, 서열 번호: 6, 서열 번호: 7 또는 서열 번호: 8에 의해 코딩되는 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 옥시도리텍타아제가 칸디다 마그놀리아(*Candida magnolia*), 칸디다 베시니(*Candida vaccinii*) 또는 굴토끼(*Oryctolagus cuniculus*)로부터 분리될 수 있는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라졸릴-에틸 에스테르의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명은 더욱 상세하게는 아릴케톤의 거울상이성질선택적 효소적 환원(enantioselective enzymatic reduction)을 포함하는 카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라졸릴-에틸 에스테르의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미국 특허공개 US 2006/0258718 A1에 개시된 바와 같이, 카르바산 (R)-1-아릴-2-테트라졸릴-에틸 에스테르(이하, "카르바메이트 화합물"로도 지칭된다)는 항경련(anticonvulsant) 효과로 인해 CNS 장애, 특히 불안, 우울, 경련, 간질, 편두통, 조울, 약물 남용, 흡연, 주의력결핍과잉행동장애(ADHD), 비만, 수면 장애, 신경병통증, 뇌졸중, 인지장애, 신경퇴화, 중풍에 따른 근경련 등의 치료에 유용하다.

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

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

[0005] 이를 위하여 상기 미국 특허공개 US 2006/0258718 A1에서는 순수한 거울상 입체이성질체인 (R)-아릴-옥시란을 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 또는 카르바메이트 단계 이후에 컬럼 크로마토그래피법을 사용하였다.

[0006] 상기 제조 과정에 있어서, (R)-2-아릴-옥시란은 치환된 (R)-만델산 유도체 등과 같은 광학활성 물질로부터 여러 단계의 경로를 통해 합성되거나, α-할로 아릴케톤의 비대칭 환원-고리형성 반응 또는 라세믹 2-아릴-옥시란 혼

합물의 거울상 이성질체 분리를 통해 얻어질 수 있다. 이와 같이 얻어지는 (R)-2-아릴-옥시란은 고가의 화합물이다.

[0007] 또한 상기 (R)-2-아릴-옥시란과 테트라졸의 고리 열림 반응은 테트라졸의 낮은 친핵성으로 인해 비교적 높은 온도에서 수행된다. 하지만 고리 열림 반응은 테트라졸류의 자발적 분해가 시작되는 온도가 약 110-120°C이므로, 상기의 고리 열림 반응은 폭주 반응의 위험성을 상당히 내포하고 있다.

[0008] 또한 반응 선택의 면에서 (R)-2-아릴-옥시란 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

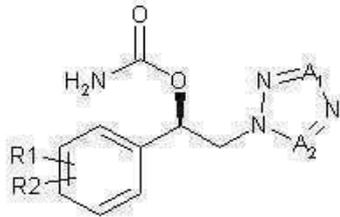
해결하려는 과제

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

과제의 해결 수단

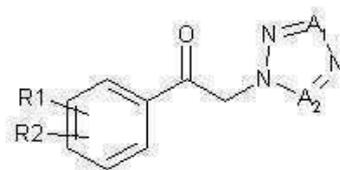
[0010] 본 발명의 한 측면에 있어서, 화학식 2로 표시되는 아릴케톤을 거울상이성질선택적 효소적 환원 (enantioselective enzymatic reduction)시키는 단계; 및 화학식 3으로 표시되는 (R)-배열의 알코올 화합물을 카르bam화하는 단계를 포함하는, 화학식 1로 표시되는 카르bam산 (R)-1-아릴-2-테트라졸릴 에틸 에스테르의 제조 방법이 제공된다:

[0011] [화학식 1]



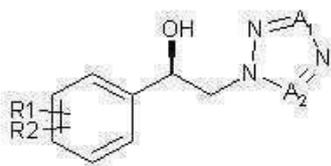
[0012]

[0013] [화학식 2]



[0014]

[0015] [화학식 3]



[0016]

[0017] 상기 화학식에서,

[0018] R₁ 및 R₂는, 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.

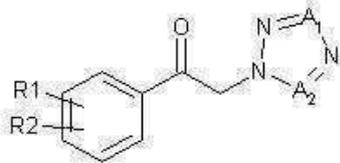
발명의 효과

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

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

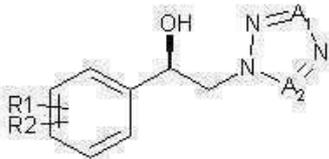
[0021] 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 하기 화학식 2로 표시되는 아릴케톤의 거울상이성질선택적 효소적 환원을 통하여 하기 화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물을 제조하는 신규한 방법이 제공된다:

[0022] [화학식 2]



[0023]

[0024] [화학식 3]



[0025]

[0026] 상기 화학식에서,

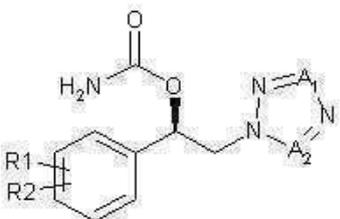
[0027] R₁ 및 R₂는, 각각 독립적으로, 수소, 할로젠, 퍼플루오로알킬, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 탄소수 1 내지 8의 티오알콕시 및 탄소수 1 내지 8의 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0028] A₁ 및 A₂ 중 어느 하나는 CH이고, 다른 하나는 N이며;

[0029] 상기 환원 단계는 상기 화학식 2의 화합물, 아미노산 서열 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 4와 적어도 60% 상동성을 갖는 옥시도리덕타아제(oxidoreductase), 환원 단계 도중 산화되며 지속적으로 재생성되는 보조인자(cofactor)인 NADH 또는 NADPH, 화학식 R_xR_yCHOH(여기서 R_x는 x가 1 내지 10의 정수인 탄소를 의미하고, R_y는 y가 x의 두 배에 2를 더한 정수인 수소를 의미한다)로 표시되는 2차 알코올을 포함하는 공동기질(cosubstrate), 및 적절한 버퍼를 포함하는 반응 혼합물에서 수행된다.

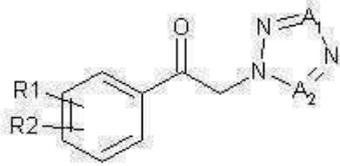
[0030] 본 발명의 구체예에 따라, 하기 화학식 2로 표시되는 아릴케톤의 거울상이성질선택적 효소적 환원 단계 및 하기 화학식 3으로 표시되는 알코올 화합물의 카르바미화 단계를 포함하는, 하기 화학식 1로 표시되는 카르바미(R)-1-아릴-2-테트라졸릴-에틸 에스테르의 제조 방법이 제공된다.

[0031] [화학식 1]



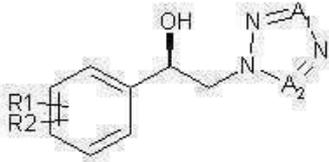
[0032]

[0033] [화학식 2]



[0034]

[0035] [화학식 3]



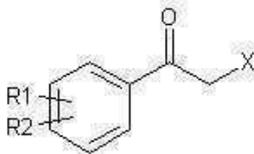
[0036]

[0037] 상기 화학식에서, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로, 수소, 할로젠, 퍼플로오로알킬, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 탄소수 1 내지 8의 티오알콕시 및 탄소수 1 내지 8의 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0038] A₁ 및 A₂ 중 어느 하나는 CH이고, 다른 하나는 N이다.

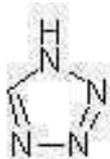
[0039] 상기 제조 방법에 있어서 출발 물질로 사용되는 화학식 2로 표시되는 아릴케톤은, 예를 들면, 하기 화학식 4의 아릴케톤과 하기 화학식 5의 테트라졸의 치환 반응으로 합성할 수 있다:

[0040] [화학식 4]



[0041]

[0042] [화학식 5]



[0043]

[0044] 상기 화학식에서,

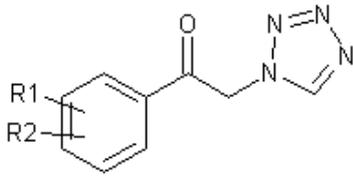
[0045] R₁ 및 R₂는 상기 정의된 바와 같고;

[0046] X는, 예를 들면, 할라이드 또는 설포네이트와 같은 이탈기이다.

[0047] 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-옥시란과 테트라졸의 고리 열림 반응과는 달리 비교적 온화한 반응 조건에서 수행될 수 있다. 따라서 잠재적 폭발성을 지닌 테트라졸을 사용함에도 공정안전성이 확보될 뿐 아니라, 불필요한 벤질 위치의 위치이성질체들이 생성되지 않음으로써 수율이 높고 정제가 용이하다.

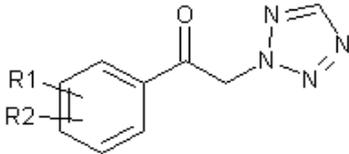
[0048] 상기 테트라졸 치환 반응에 의하여 생성되는 화학식 2로 표시되는 아릴케톤은 하기 화학식 2a로 표시되는 1N 아릴케톤 및 하기 화학식 2b로 표시되는 2N 아릴케톤의 위치이성질체 혼합물로 존재할 수 있는데, 각각의 위치 이성질체들은 상업적으로 이용 가능한 결정화 방법을 통해 각각의 위치이성질체로 분리 정제될 수 있다.

[0049] [화학식 2a]



[0050]

[0051] [화학식 2b]



[0052]

[0053] 본 발명에 유용한 결정화 방법은 상기 치환반응의 생성물인 위치이성질체의 혼합물에 가용화제를 첨가하는 단계 후에, 침전제를 첨가하는 단계를 포함한다. 임의로, 상기 결정화 방법은 침전제를 첨가하는 단계 이후, 침전물을 여과하고, 여과액을 농축하여, 추가의 침전제를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0054] 상기 가용화제의 비제한적인 예는, 아세톤, 아세토니트릴, 테트라히드로퓨란, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-디옥산 및 C₁ 내지 C₄의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매를 포함한다. 상기 가용화제는 상기 위치이성질체의 혼합물의 중량(g)을 기준으로 0 내지 20 ml(v/w)로 첨가될 수 있다. 본 명세서에서 가용화제가 0 ml(v/w)로 첨가된다 함은, 상기 여과액을 희석함이 없이 바로 하기 기술하는 첨가제가 추가될 수 있다는 것을 의미한다.

[0055] 상기 침전제의 비제한적인 예는, 물, C₁ 내지 C₄의 저급알코올, 디에틸에테르, 펜탄, 헥산, 시클로헥산, 헵탄 또는 이들의 혼합용매 등을 포함한다. 상기 침전제는 상기 위치이성질체의 혼합물의 중량(g)을 기준으로 0 내지 40 ml (v/w)로 서서히 첨가될 수 있다. 본 명세서에서 침전제가 0 ml (v/w)로 첨가된다 함은 침전제를 더 추가함이 없이 방치 또는 냉각 등의 방법에 의하여 침전물을 얻는다는 것을 의미한다.

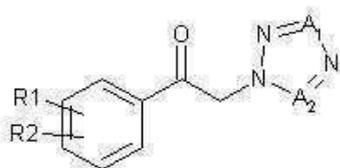
[0056] 침전제의 첨가로 얻어진 침전물을 여과 단계에서 분리하면 화학식 2a의 1N 아릴케톤이 높은 순도의 결정으로 얻을 수 있다.

[0057] 한편, 여과 단계에서 얻어지는 여과액을 농축하여 가용화제 대비 침전제의 비율을 높임으로써 화학식 2b의 2N 아릴케톤을 높은 순도로 얻을 수 있다. 여과액의 농축 비율은 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 적절히 판정할 수 있다. 예를 들어, 용매가 완전히 제거될 때까지 농축한 후, 가용화제 및 침전제를 상술한 바와 같이 첨가한다.

[0058] 상기 결정화 방법은 컬럼 크로마토그래피 방법과 달리, 상업적으로 용이하게 이용될 수 있다.

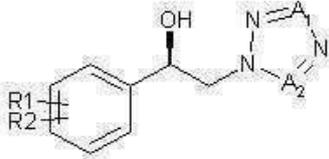
[0059] 거울상이성질선택적 효소적 환원에 의하여, 화학식 2의 아릴케톤은 하기 화학식 3으로 표시되는 (R)-배열의 알코올 화합물로 전환된다.

[0060] [화학식 2]



[0061]

[0062] [화학식 3]



[0063]

[0064] 상기 화학식에서,

[0065] R₁ 및 R₂는, 각각 독립적으로, 수소, 할로젠, 퍼플루오로알킬, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 탄소수 1 내지 8의 티오알록시 및 탄소수 1 내지 8의 알록시로 이루어진 군으로부터 선택되며,

[0066] A₁ 및 A₂ 중 어느 하나는 CH이고, 다른 하나는 N이다.

[0067] 거울상이성질선택적 효소적 환원은 반응 혼합물에 현탁되어 있거나 통상적인 방법으로 고정된(immobilized) 옥시도리덕타아제 효소를 이용하여 수행될 수 있다. 효소는 완전히 정제된 상태, 부분 정제된 상태, 또는 그것이 발현된 미생물 세포 상태로 이용될 수 있다. 상기 세포 자체는 네이티브(native) 상태, 투과가능한(permeabilized) 상태 또는 용해된(lysed) 상태일 수 있다. 본 발명의 방법을 수행함에 있어서, 세포 상태로 효소를 이용하면 비용이 상당히 절감되어 바람직하다는 것을 당업자가 이해할 수 있을 것이다. 가장 바람직한 것은, 효소가 *E. coli*에서 발현되고 네이티브 세포 현탁액으로 사용되는 것이다.

[0068] 화학식 2의 아릴케톤 화합물의 효소적 환원 단계는 상기 화학식 2의 화합물, 옥시도리덕타아제, 보조인자인 NADH 또는 NADPH, 공동기질 및 적절한 버퍼를 포함하는 반응 혼합물에서 수행될 수 있는데, 여기서 옥시도리덕타아제는 아미노산 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 4 중 하나와 적어도 60% 이상의 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0069] 아미노산 서열 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 4 중 하나를 포함하는 폴리펩티드 또는 아미노산 서열 서열 번호: 1, 서열 번호: 2, 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 4 중 하나와 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 90%의 동일한 아미노산 서열을 포함하며 옥시도리덕타아제 활성을 보유하는 폴리펩티드는 높은 전환율 및 거울상이성질 선택적으로 화학식 2의 화합물을 화학식 3(R-배열)의 화합물로 환원시키는 데 사용될 수 있다. 거울상이성질선택적 효소적 환원에서 생성된 R 배열 알코올의 거울상이성질체적 과량(enantiomeric excess)은 적어도 약 89%, 바람직하게는 적어도 약 95% 및 가장 바람직하게는 적어도 약 99%이다.

[0070] 거울상이성질선택적 효소적 환원에 유용한 옥시도리덕타아제 폴리펩티드를 생산하는 유기체는 야생주(wild strain) 또는 변종일 수 있으며 바람직하게는 칸디다 마그놀리아(*Candida magnolia*), 칸디다 배시니(*Candida vaccinii*), 및 굴토끼(*Oryctolagus cuniculus*)로부터 선택된다. 본 방법에서 이용되는 옥시도리덕타아제 효소를 생산하는데 칸디다 속(genus)의 효모가 바람직하다. 폴리펩티드 유도체는 상기된 SEQ ID들과 적어도 60 퍼센트의 상동성을 갖고 옥시도리덕타아제 활성을 보유한다. 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 서열 상동성을 정확하게 판정하기 위해 이용가능한 시스템 및 기술이 존재하고 있다는 것을 알고 있다.

[0071] 서열 번호:1을 포함하는 폴리펩티드는, 예를 들어, 부다페스트 조약의 조건 하에 Deutsche Sammlung fur Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascheroder Weg 1b, 38124에 수탁번호 DSMZ 22167로 기탁된 유기체 굴토끼(*Oryctolagus cuniculus*), 특히 *rabbit* DSMZ 22167에서 얻을 수 있는 DNA 서열 서열 번호: 5 또는 거기에 하이브리화(hybridize)하는 핵산 서열에 의해 인코딩될 수 있다. 서열 번호: 2를 포함하는 폴리펩티드는, 예를 들어, 유기체 칸디다 마그놀리아(*Candida magnoliae*) DSMZ 22052로부터 얻을 수 있는 DNA 서열 서열 번호: 6 또는 거기에 하이브리화하는 핵산 서열에 의해 인코딩될 수 있다.

[0072] 서열 번호: 3을 포함하는 폴리펩티드는, 예를 들어, 유기체 칸디다 배시니(*Candida vaccinii*) CBS7318로부터 얻을 수 있는 DNA 서열 서열 번호:7 또는 거기에 하이브리화하는 핵산 서열에 의해 인코딩될 수 있다. 서열 번호:4를 포함하는 폴리펩티드는, 예를 들어, 유기체 칸디다 마그놀리아(*Candida magnoliae*) CBS6396으로부터 얻을 수 있는 DNA 서열 서열 번호:8 또는 거기에 하이브리화하는 핵산 서열에 의해 인코딩될 수 있다.

[0073] 상기된 폴리펩티드 서열 중 하나를 갖는 옥시도리덕타아제는 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려진 통상적인 프로시저에 따라 이용가능한 양으로 얻을 수 있다. 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드

를 적절한 벡터에 클로닝한 후, 상기 서열을 코딩하는 유전자를 발현할 수 있는 숙주 유기체에 도입된다. 이러한 펩티드를 발현할 수 있도록 형질전환될 수 있는 미생물들은 해당 분야에 잘 알려져 있다. 바람직한 미생물은 *Escherichia coli*이다. 상기된 바와 같이, 형질전환된 *E. coli*에 의해 발현된 옥시도리덕타아제는 본 방법에서 이용하기 위하여 *E. coli* 세포로부터 추출하여, 부분적으로 또는 완전히 정제하거나, 네이티브, 투과가능한 또는 용해된 상태의 세포 자체로서 이용할 수 있다. 거울상이성질선택적 효소적 환원의 바람직한 구체에는 네이티브 상태의 세포 현탁액을 이용하는 것이다. 이들 형태 중 어떤 것도 자유롭게나 고정된 상태로 이용될 수 있다.

[0074] 환원 반응은 그 안에 현탁된 효소를 포함하는 세포를 갖는 단일 상 시스템(single phase system)으로 수행될 수 있다. 또한 미국 출원공개 2009/0017510 및 미국 특허 7,371,903에 설명된 바와 같이 2-상의 수성/유기 용매 시스템(two-phase aqueous/organic solvent system)에서 반응이 수행될 수 있다. 반응은 통상적인 배치(batch) 반응, 또는 연속 공정(continuous process) 수행될 수 있다. 상업적 적용을 위한 거울상이성질선택적 효소적 환원의 상당한 장점 중 하나가 연속 조작이 가능하다는 것이다.

[0075] 반응 혼합물은 바람직하게는 첨가된 반응물 1 kg당 약 35 g 내지 350 g의 세포를 포함한다. 현탁액은 반응 혼합물의 수성 부분으로서, 버퍼, 예를 들어, TEA(트리에탄올아민), 포스페이트, Tris/HCl 또는 글리신 버퍼를 포함한다. 버퍼는 추가로 효소의 안정화를 위해 이온, 예를 들어, 마그네슘 이온의 공급원을 포함할 수 있다. 효소를 안정화하기 위하여 버퍼에 존재할 수 있는 추가의 첨가제는 글리세롤, 소르비톨 등과 같은 폴리올, 1,4-DL-디티오테라이트, 글루타치온, 시스테인 등과 같은 황 화합물, 아미노산 및 펩티드, 또는 DMSO와 같은 세제를 포함할 수 있다. 효소를 위한 바람직한 안정제는 폴리올, 특히 글리세롤인데, 이는 세포 현탁액 중량 대비 약 10 중량% 내지 80 중량%, 바람직하게는 약 50 중량%로 존재할 수 있다.

[0076] 거울상이성질선택적 효소적 환원 공정은 반응 혼합물이, 보조인자 또는 조효소의 재생성을 위해 공동기질을 이용하며, 아릴케톤 기질의 환원을 위한 수소를 제공하는 공액 기질 원리(coupled substrate principle)를 이용하여 유리하게 수행된다. 바람직한 보조인자는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트 (NADP) 또는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD)이며, 이들은 각각 환원된 상태, 즉 NADPH 또는 NADH로 이용된다. 보조인자는 반응 혼합물에서 약 0.01 mM 내지 5 mM, 바람직하게는 0.05 mM 내지 0.5 mM의 농도로 존재한다. 반응에서 공동기질은 산화됨으로써 NADPH 또는 NADH 보조인자를 재생성시키는 기능을 한다. 공동기질은 화학식 R_xR_yCHOH 로 표시되는 2차 알코올인데, 여기에서 R_x 는 x 가 1 내지 10의 정수인 탄소를 의미하고, R_y 는 y 가 x 의 두 배에 2를 더한 정수인 수소를 의미한다. 적절한 공동기질의 예는 2-프로판올, 2-부탄올, 4-메틸-2-펜탄올, 2-펜탄올, 2-헥탄올, 2-옥탄올 등을 포함한다. 바람직한 공동기질은 2-부탄올이다. 공동기질은 반응 혼합물에서 약 10 부피% 내지 80 부피%, 바람직하게는 약 40 부피% 내지 60 부피%, 가장 바람직하게는 약 50 부피%로 존재한다.

[0077] 아릴케톤의 환원 중에 생성되는 산화된 보조인자는, 옥시도리덕타아제에 의해 촉매될 수도 있는, 공동기질의 산화에 의해 재생성된다. 그러므로, 본 발명의 특별한 경제적 이점은, 옥시도리덕타아제가 화학식 1의 아릴케톤의 환원 및 공동기질의 산화에 영향을 주므로 보조인자 재생성에 추가의 효소가 필요하지 않다는 것이다. 또한, 아릴케톤의 환원 속도를 증진시키기 위하여, 또 다른 효소를 반응 혼합물에 첨가하여 보조인자를 재생성하는 것도 본 발명의 범위 내에 있다.

[0078] 또 다른 구체예에서, 보조인자의 재생성에 관여하지 않는 유기용매를 반응혼합물 및 수성 유기 2-상 시스템(aqueous organic 2-phase system)에서 수행되는 환원 공정에 첨가할 수 있다. 이러한 용매의 비제한적인 예는, 디에틸 에테르, 3차 부틸 메틸 에테르, 디이소프로필 에테르, 디부틸 에테르, 에틸 아세테이트, 부틸 아세테이트, 헥산 또는 시클로헥산을 포함한다. 이러한 용매는 반응 혼합물의 부피를 기준으로, 대비 약 1 부피% 내지 50 부피%로 존재할 수 있다.

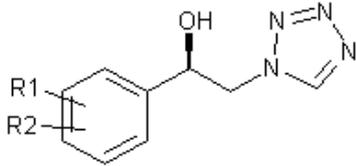
[0079] 반응 혼합물에서 아릴케톤 기질의 양은 바람직하게는 약 0.1 중량%를 초과하며 약 50 중량%까지 증가될 수 있으며, 바람직한 농도는 약 5 내지 30 중량%이다. 기질의 양은 본 발명의 제조 방법이 정제된 상태의 기질 또는 불순물의 다양한 함량 및 형태를 포함하는 원료 생성물(raw product)로 수행될 수 있기 때문에 기질의 순도에 의존한다. 모든 성분을 첨가한 후 반응 혼합물의 pH는 5 내지 10의 범위이며, 바람직하게는 7 내지 9이고, 최적 pH는 약 8이다. 본 발명에 따른 효소적 환원은 약 10~45°C, 바람직하게는 약 20~40°C, 가장 바람직하게는 약 25~35°C의 온도에서 수행된다.

[0080] 거울상이성질선택적 환원 방법은 화학식 3의 알코올을 높은 수율 및 높은 거울상이성질선택적으로 제공할 뿐만 아니라 비용절감을 가능케 하고 친환경적이다. 따라서, 상기된 반응 조건 하에서 약 12 내지 96 시간, 바람직하게는 약 24 내지 48 시간 동안 반응시키면 높은 광학순도의 (R)-배열의 알코올 화합물을 얻을 수 있다. 인큐베

이전(incubation) 중 혼합물의 pH는, 이를 주기적으로 측정하고 각각 소듐 카보네이트 및 소듐 하이드록사이드와 같은 통상적인 산성 또는 염기성 시약을 첨가하여 상기 범위로 유지한다. 거울상이성질선택적 효소적 환원의 효율은 총 턴오버 수(total turnover number, TTN)로 나타낼 수 있는데, 이는 최초로 첨가된 보조인자 1몰당 생성된 화학식 2의 키랄 알코올의 몰수를 의미한다. 거울상이성질선택적 효소적 환원의 TTN은 약 10^2 내지 10^5 , 바람직하게는 10^3 이상이다.

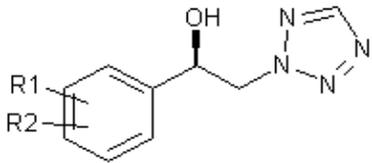
[0081] 거울상이성질선택적 효소적 환원을 통해 얻어진 알코올 화합물이 화학식 3a의 알코올 1N 및 화학식 3b의 알코올 2N의 위치이성질체 혼합물로 존재하는 경우, 결정화를 통해 높은 순도의 각각의 위치이성질체로 분리 정제할 수 있다:

[0082] [화학식 3a]



[0083]

[0084] [화학식 3b]



[0085]

[0086] 상기 결정화는 상기 환원의 생성물인 위치이성질체들의 혼합물에 가용화제를 첨가하는 단계; 및 침전제를 첨가하는 단계를 포함하며, 임의로 침전물을 여과하는 단계; 및 여과액을 농축하고 침전제를 더 첨가하는 단계;를 추가로 포함할 수 있다.

[0087] 결정화에 유용한 가용화제의 비제한적인 예는, 아세톤, 아세토니트릴, 테트라히드로퓨란, 에틸 아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-디옥산, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올, 및 이들의 혼합물을 포함한다. 상기 가용화제는 상기 위치 이성질체의 혼합물의 중량(g)을 기준으로 0 내지 20 ml (v/w)의 양으로 첨가될 수 있다.

[0088] 상기 침전제의 비제한적인 예는, 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올, 디에틸에테르, 펜탄, 헥산, 시클로헥산, 헥탄 또는 이들의 혼합물 등을 포함한다. 상기 침전제는 상기 위치이성질체의 혼합물의 중량(g)을 기준으로 0 내지 40 ml (v/w)로 서서히 첨가될 수 있다.

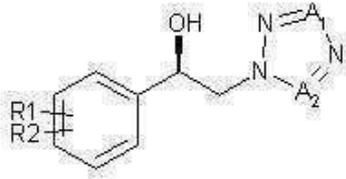
[0089] 침전제의 첨가 이후, 여과 단계를 수행하면 1N 알코올(3a)이 높은 순도의 침전물로 얻어질 수 있다.

[0090] 또한, 여과 단계에서 얻어지는 여과액을 농축하고 가용화제 대비 침전제의 비율을 높임으로써 2N 알코올(3b)이 매우 높은 순도의 결정형태로 얻어질 수 있다.

[0091] 한편 이러한 결정화는, 화학식 2의 아릴케톤의 위치이성질체들이 이미 분리 정제되었다면, 생략될 수 있다.

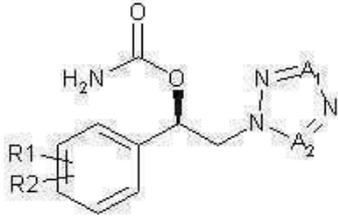
[0092] 화학식 3의 (R)-배열의 알코올 화합물에 카르바모일기가 도입됨에 따라 화학식 1로 표시되는 (R)-배열의 카르바메이트가 제조된다:

[0093] [화학식 3]



[0094]

[0095] [화학식 1]



[0096]

[0097] 상기 화학식에서,

[0098] R₁ 및 R₂는, 각각 독립적으로, 수소, 할로겐, 퍼플루오로알킬, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 탄소수 1 내지 8의 티오알콕시 및 탄소수 1 내지 8의 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되며;

[0099] A₁ 및 A₂ 중 어느 하나는 CH이고, 다른 하나는 N이다.

[0100] 상기 카르bam화 단계에 있어서 카르bamoyl기를 도입하는 방법으로, 예를 들면, 무기 시아네이트-유기산, 이소시아네이트-물, 또는 카르보닐 화합물-암모니아를 사용하여 카르bamoyl기를 도입할 수 있다.

[0101] 무기 시아네이트-유기산으로 카르bamoyl화 함에 있어서, 화학식 3으로 표시되는 (R)-배열의 알코올 화합물을 유기용매, 예컨대 디에틸에테르, 테트라히드로퓨란, 1,4-디옥산, 아세트니트릴, 디클로로메탄, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매에 용해시킨 후 1 내지 4 당량의 소듐 시아네이트와 같은 무기 시아네이트 및 메탄설폰산 또는 아세트산과 같은 유기산을 가하고 약 -10℃ 내지 약 70℃의 반응온도에서 반응이 수행될 수 있다.

[0102] 이소시아네이트-물을 사용하는 방법으로서 유기용매, 예컨대 디에틸에테르, 테트라히드로퓨란, 1,4-디옥산, 아세트니트릴, 디클로로메탄, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매 중의 화학식 3으로 표시되는 (R)-배열의 알코올 화합물 용액에 1 내지 4 당량의 이소시아네이트, 예컨대 클로로설폰산 이소시아네이트, 트리클로로아세틸 이소시아네이트, 트리메틸실릴 이소시아네이트 등을 가하고 약 -50℃ 내지 40℃의 반응온도에서 반응시킨 후, 별도의 정제 없이 순차적으로 1 내지 20 당량의 물을 첨가하여 가수 분해 반응이 수행될 수 있다.

[0103] 카르보닐 화합물-암모니아를 사용하는 방법으로서, 유기용매, 예컨대 디에틸에테르, 테트라히드로퓨란, 1,4-디옥산, 아세트니트릴, 디클로로메탄, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매 중의 화학식 3으로 표시되는 (R)-배열의 알코올 화합물 용액 1 내지 4 당량의 카르보닐 화합물, 예컨대 1,1'-카르보닐디이미다졸, 카르bamoyl 클로라이드, 디숙시닐 카르보네이트, 포스젠, 트리포스젠, 클로로포르메이트 등을 가하고 약 -10℃ 내지 70℃의 반응온도에서 반응시킨 후, 별도의 정제 없이 순차적으로 1 내지 10 당량의 암모니아를 첨가한다.

[0104] 카르bam화 단계에서 얻어진 화학식 1의 카르bamoyl 화합물은 이하 기술되는 결정화 방법을 통해 더욱 높은 광학순도와 화학적 순도로 정제될 수 있다. 결정화 방법은 카르bam화 반응의 생성물에 가용화제를 첨가하는 단계; 및 침전제를 첨가하는 단계를 포함하며, 임의로 침전물을 여과하는 단계; 및 추가의 침전제를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 약물학적으로 사용하기 위해서는 사용 전에 카르bam화된 생성물을 최종적으로 정제하는 것이 바람직하나, 결정화 단계가 선행될 수도 있다.

[0105] 상기 가용화제의 비제한적인 예는, 아세톤, 아세트니트릴, 테트라히드로퓨란, 에틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 1,4-디옥산 및 C₁ 내지 C₄의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매를 포함한다. 상기 가용화제는 상기 반응 생성물의 중량(g)을 기준으로 0 내지 20 ml (v/w)로 첨가될 수 있다.

[0106] 상기 침전제의 비제한적인 예는, 물, C₁ 내지 C₄의 저급알코올, 디에틸에테르, 펜탄, 헥산, 시클로헥산, 헵탄 또는 이들의 혼합용매 등을 포함한다. 상기 침전제는 상기 반응 생성물의 중량(g)을 기준으로 0 내지 40 ml (v/w)로 서서히 첨가될 수 있다.

[0107] 본 발명의 제조 방법에 의하여 거울상이성질선택적 효소적 환원 단계를 포함함으로써, 광학적 순도가 높은 카르바메이트 화합물을 제공할 수 있다. 또한 상기 제조 방법은 온화한 반응 조건에서 이루어지므로 공정 안정성이 확보될 수 있다. 뿐만 아니라, 거울상이성질선택적 효소적 환원 단계 전후 또는 카르바미화 단계 후 중 어느 하나의 시기에 대규모 생산에도 적용가능한 결정화 단계를 수행함으로써 화학적 순도가 더욱 우수한 카르바메이트 화합물이 제조될 수 있다. 상기 카르바메이트 화합물은 경련과 같은 중추신경계 장애의 치료에 효과가 탁월하다.

[0108] 이하 실시예를 통해 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 이에 본 발명의 범주가 한정되는 것은 아니다.

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

[0110] 2-브로모-2'-클로로아세토페논(228.3g, 0.978mol)과 탄산칼륨(161.6g, 1.170mol)을 아세토니트릴(2000mL)에 현탁시킨 후 35w/w 1H-테트라졸 디메틸포름아미드 용액(215.1g, 1.080mol)을 상온에서 첨가하였다. 반응물을 45℃에서 2시간 동안 교반하고 감압 증류하여 약 1500mL의 용매를 제거한 후 농축액을 에틸아세테이트(2000mL)로 희석하고 10% 염수(3×2000mL)로 세척하였다. 분리된 유기층을 감압 증류하여 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.

[0111] ¹H-NMR(CDC1₃) δ8.87(s, 1H), δ7.77(d, 1H), δ7.39-7.62(m, 3H), δ5.98(s, 2H)

[0112] 제조예 2: 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-온의 제조

[0113] 상기 제조예 1의 여과 단계에서 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.

[0114] ¹H-NMR(CDC1₃) δ8.62(s, 1H), δ7.72(d, 1H), δ7.35-7.55(m, 3H), δ6.17(s, 2H)

[0115] 제조예 3: 다양한 옥시도리덕타아제에 통한 거울상이성질선택적 효소적 환원에 의한 (R)-배열의 알코올 화합물의 제조

[0116] 다음과 같이 하기 4개의 용액을 제조하였다.

[0117] **효소 용액 1**

[0118] *Escherichia coli* StarBL21(De3) 컴피턴트(competent) 세포 (인비트로젠(Invitrogen)사 제품)를 옥시도리덕타아제 서열 번호 1을 코딩하는 발현 컨스트럭트(construct) pET21-MIX로 형질전환하였다. 상기 발현 컨스트럭트로 형질전환된 *Escherichia coli* 콜로니를, 550nm에서 측정시 광학밀도가 0.5가 될 때까지 각각 50 μg/mL의 암피실린 또는 40 μg/mL의 카나마이신이 첨가된 200mL의 LB 배지 (1% 트립톤, 0.5% 효모 및 1% 염화나트륨)에서 배양하였다. 원하는 재조합 단백질의 발현은 이소프로필티오갈락토사이드(IPTG)를 0.1mM 농도로 첨가하여 유도하였다. 25℃에서 16시간 동안 220 rpm으로 배양한 후, 세포를 하베스트(harvest)하고 -20℃로 동결시켰다. 효소 용액의 조제는, 30g의 세포를 150 mL의 트라에탄올아민 버퍼 (TEA 100nM, 2mM MgCl₂, 10% 글리세롤, pH 8)에서 재현탁하고 고압 균질화기(homogenizer)에서 균질화하였다. 결과 효소 용액을 150 mL 글리세롤과 혼합하여 -20℃에서 보관하였다.

[0119]

[0120] **효소 용액 2**

[0121] RB791 세포 (*E. coli* 유전 스톡(stock), 예일, 미국)을 옥시도리덕타아제 서열 번호 2를 코딩하는 발현 컨스트럭트 pET-MIX로 형질전환하였다. 상기 발현 컨스트럭트로 형질전환된 *Escherichia coli* 콜로니를, 550nm에서 측정

시 광학밀도가 0.5가 될 때까지 각각 50 µg/mL의 암피실린 또는 40 µg/mL의 카나마이신이 첨가된 200mL의 LB 배지 (1% 트립톤, 0.5% 효모 및 1% 염화나트륨)에서 배양하였다. 원하는 재조합 단백질의 발현은 이소프로필티오 갈락토사이드(IPTG)를 0.1mM 농도로 첨가하여 유도하였다. 25°C에서 16시간 동안 220 rpm으로 배양한 후, 세포를 하베스트(harvest)하고 -20°C로 동결시켰다. 효소 용액의 조제는, 30g의 세포를 150 mL의 트라이탄올아민 버퍼 (TEA 100nM, 2mM MgCl₂, 10% 글리세롤, pH 8)에서 재현탁하고 고압 균질화기(homogenizer)에서 균질화하였다. 결과 효소 용액을 150 mL 글리세롤과 혼합하여 -20°C에서 보관하였다.

[0122] **효소 용액 3**

[0123] 효소 용액 3은 옥시도리덕타아제 서열 번호 1을 코딩하는 pET21-MIX 발현 컨스트럭트 대신 옥시도리덕타아제 서열 번호 3을 코딩하는 pET21-MIX 발현 컨스트럭트가 사용되었다는 점을 제외하고는 효소 용액 1에 설명된 것과 동일한 방법으로 제조되었다.

[0124] **효소 용액 4**

[0125] 효소 용액 4는 옥시도리덕타아제 서열 번호 2를 코딩하는 pET21-MIX 발현 컨스트럭트 대신 옥시도리덕타아제 서열 번호 4를 코딩하는 pET21-MIX 발현 컨스트럭트가 사용되었다는 점을 제외하고는 효소 용액 2에 설명된 것과 동일한 방법으로 제조되었다.

[0126] 각각의 효소 용액 1 내지 4에 포함된 서로 다른 옥시도리덕타아제를 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-1-일)에탄-1-온 (1N 케톤) 및 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-온 (2N 케톤)을 각각 상응하는 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-1-일)에탄-1-올 (이하 1N 알코올) 및 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-올 (이하 2N 알코올)로 전환하기 위하여 하기한 바와 같이 시험하였다.

[0127] **반응 배치(batch) A**

- [0128] 160 µl 버퍼 (TEA 100 nM, 2 mM MgCl₂, 10% 글리세롤, pH 8)
- [0129] 100 µl NADPH (40 mg/ml)
- [0130] 40 µl 2-프로판올
- [0131] 50 µl 효소 용액 1
- [0132] 2 mg 1N 케톤 또는 2N 케톤

[0133] **반응 배치 B**

- [0134] 160 µl 버퍼 (TEA 100 nM, 2 mM MgCl₂, 10% 글리세롤, pH 8)
- [0135] 100 µl NADPH (40 mg/ml)
- [0136] 40 µl 2-프로판올
- [0137] 50 µl 효소 용액 2
- [0138] 2 mg 1N 케톤 또는 2N 케톤

[0139] **반응 배치 C**

- [0140] 350 µl 버퍼 (TEA 100 nM, 2 mM MgCl₂, 10% 글리세롤, pH 8)

- [0141] 0.05 mg NADP
- [0142] 50 μ l 효소 용액 3
- [0143] 10 mg 1N 케톤 또는 2N 케톤
- [0144] 250 μ l 4-메틸-2-펜탄올
- [0145] 50 μ l 보조인자의 재생성을 위한 효소 (*Thermoanaerobium brockii* 유래 옥시도리덕타아제)용액

[0146] **반응 배치 D**

[0147] 350 μ l 버퍼 (TEA 100 nM, 2 mM MgCl₂, 10% 글리세롤, pH 8)

[0148] 0.05 mg NADP

[0149] 50 μ l 효소 용액 4

[0150] 10 mg 1N 케톤 또는 2N 케톤

[0151] 250 μ l 4-메틸-2-펜탄올

[0152] 50 μ l 보조인자의 재생성을 위한 효소 (*Thermoanaerobium brockii* 유래 옥시도리덕타아제)용액

[0153] 각 반응 배치(batch) A, B, C 및 D를 24시간 동안 인큐베이션한 후 원심분리하고, 거울상이성질체적 과량(enantiomeric excess) 및 전환(conversion)을 판정하기 위해 HPLC 분석 용기로 옮긴 각각의 반응 배치에 1mL의 아세트니트릴을 첨가하였다. 표 1에 기재된 생성물의 전환 및 ee-값은 하기 식을 이용하여 계산하였다.

[0154] 전환율 (%) = [(생성물의 면적) / (반응물의 면적 + 생성물의 면적)] × 100

[0155] ee-값 (%) = [(R-배열 면적 - S-배열 면적) / (R-배열 면적 + S-배열 면적)] × 100

표 1

사용된 반응 배치	전환 (환원된 케톤의 %)	ee-값 %ee (거울상이성질체)	
		R-2N 알코올, 2b	R-1N 알코올, 2a
반응 배치 A	> 98	89 (R)	> 99 (R)
반응 배치 B	> 98	> 99 (R)	> 99 (R)
반응 배치 C	> 98	95 (R)	> 99 (R)
반응 배치 D	> 98	98 (R)	95 (R)

[0157] 제조예 4: 옥시도리덕타아제 SEQ NO: 2를 통한 효소적 환원

[0158] 1N/2N 케톤을 R-1N/R-2N 알코올로 전환하기 위해, 옥시도리덕타아제 SEQ NO: 2를 포함하는 30 μ l의 효소 용액 2를, 300 μ l의 버퍼 (100 mM TEA, pH 8, 1 mM MgCl₂, 10% 글리세롤), 100 mg의 1N 케톤 및 2N 케톤의 혼합물 (1N:2N=14%:86%), 0.04 mg의 NADP 및 300 μ l의 2-부탄올의 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 지속적으로 충분히 혼합하면서 실온에서 인큐베이션하였다. 48시간 후 98% 이상의 케톤이 다음 조성(R-2N 알코올 80%; S-2N 알코올 0%; R-1N 알코올 20%, S-1N 알코올 0%; 1N 케톤 0%; 2N 케톤 0%)의 알코올 혼합물로 환원되었다.

[0159] 일반적인 워크업(workup) 및 에틸 아세테이트/헥산으로 재결정화한 후, 광학적으로 순수한 알코올을 아래와 같이 수득하였다;

[0160] (R)-1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-1-일)에탄-1-올 (1N 알코올)

[0161] ¹H-NMR(CDCl₃) 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);

[0162] (R)-1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-올 (2N 알코올)

[0163] ¹H-NMR(CDC1₃) δ8.55(s, 1H), δ7.28-7.66(m, 4H), δ5.73(m, 1H), δ4.98(d, 1H), δ4.83(d, 1H), δ3.38(br, 1H).

[0164] 카르바메이트의 제조

[0165] 제조예 5: 카르바산 (R)-1-(2-클로로페닐)-2-(테트라졸-2-일)에틸 에스테르의 제조

[0166] 옥시도리덕타아제 SEQ NO: 2를 포함하는 50 ml의 효소 용액 2를 250ml의 버퍼(100 mM TEA, pH 8, 1mM MgCl₂, 10% 글리세롤), 50g(225mmol)의 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-온(2N 케톤), 4mg의 NAD, 300ml의 2-프로판올 및 150ml의 부틸 아세테이트의 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 교반하였다. 48시간 후, 98% 이상의 2N 케톤은 99%ee 초과 상응하는 (R)-1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-올 (R-2N 알코올)로 환원되었다. 상기 생성된 혼합물에 500mL의 에틸 아세테이트를 첨가하였다. 분리 후 형성된 유기층을 10% 염수(3×500mL)으로 세척하였다. 그리하여 형성된 유기층을 마그네슘 설페이트로 건조 및 여과시키고 여과액을 감압 증류하여 50.4g(224mmol)의 1-(2-클로로페닐)-2-(1,2,3,4-테트라졸-2-일)에탄-1-올 (R-2N 알코올, 광학순도 99.9%)의 유성(oily) 잔류물을 수득하였다. -15℃로 냉각 후, 38g(267mmol)의 클로로설포닐 이소시아네이트를 서서히 첨가하고 -10℃에서 2시간 동안 교반하였다. 물을 서서히 첨가하여 반응의 종료를 유도하였다. 상기 최종 용액을 약 300mL의 용매가 제거될 때까지 감압 농축하였다. 농축액을 600mL의 에틸 아세테이트로 희석하고 10% 염수(3×500mL)로 세척하였다. 유기층을 감압 농축하고 농축액을 이소프로판올(90mL)에 용해시킨 후 헵탄(180mL)을 서서히 첨가하여 결정화를 완료되도록 하였다. 수득된 침전물을 여과 및 세척하여 51.8g(194mmol)의 카르바산 (R)-1-(2-클로로페닐)-2-(테트라졸-2-일)에틸 에스테르(광학순도 99.9%)를 수득하였다.

[0167] ¹H-NMR(아세톤-d₆) δ8.74(s, 1H), δ7.38-7.54(m,4H), δ6.59(m, 1H), δ6.16(Be, 2H), δ4.90(d, 1H), δ5.09(m, 2H)

[0168] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따라 높은 광학순도 및 화학순도를 지닌 카르바메이트 화합물을 경제적으로 생산할 수 있었다.

[0169] 본 발명의 바람직한 구체예가 구체적인 설명을 위하여 개시되었다고 하더라도, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 청구항에서 개시된 발명의 범위 및 요지를 벗어나지 않으면서 다양한 변경, 추가 및 치환이 가능하다는 것을 인식할 것이다.

[0170] 서열 목록 프리 텍스트 (Sequence Listing Free Text)

[0171] 아미노산 서열

[0172] 서열 번호 1: rabbit DSMZ 22167 유래 *Oryctolagus cuniculus*

1 massgytrrd plankvaivt astdgiglai amlaqdgah vvissrkqqn vdravaalqa
 61 eglsvtgtvc hvgkaedrerc lvatalnlhg gidilvsnaa vnpffgklmd vteevwdkiĭ
 121 dinvkamalm tkavvpemek rgggsvviva siaafnpsfg lgpynvskta lvgltknlal
 181 claaqnirvn clapglikts fskalwedka qccniiqklr irrlgkpecc agivsflese
 241 dasyitgetv vvagapsrl

[0173]

[0174] 서열 번호 2: *Candida magnoliae* DSMZ 22052 단백질 서열 카르보닐 리덕타아제

```

1  msatsnalit qasrymqeat aiklalegys vtiasrgieq lnaikeklpi vkkqgqhyvw
61  qlldlsdieaa stfkqapipa ssydvffsna gvvdafpfad qsetaqkdlf tvnllspval
121 tktivkaiad kpretpahii ftssivgirq vpwvavysat kgaidsfars larefcpkni
181 hvncvnpqtt rtemtkgvdI aafgdvpikg wievdaiada vlflikskni tgqslvvdng
241 fgv
    
```

[0175]

[0176] 서열 번호 3: *Candida vaccinii* CBS7318 단백질 서열 카르보닐 리덕타아제

```

1  mrstpnaIvt ggsrgigaaa aiklaeagys vtiasrgldk lncvkaklpv vkqgqgehhw
61  qlldlsdvqaa Iefkqapipa skydlfvnsa qvatfsptae hdekdwcniI avnltspiaI
121 tkalvkavge rsndnfpqia flssaaalrg vpgtavysat kagldgftrs lakeIgpkgi
181 hvnivhpqwt qtemtagvde prdtpipgwi qpeaiaeaiv ylaksknitg tnivvdnglt
241 i
    
```

[0177]

[0178] 서열 번호 4: *Candida magnoliae* CBS6396 단백질 서열 카르보닐 리덕타아제

```

1  mnalvtggsr gigeaiatkl acdgysvtia srgidqlnkv kaklpvvreg qthhwqldI
61  sdaeaassfk gapIpassyd vlvnnagvtd pspiakqsds eihklfsvnl lspvaltkty
121 vqavtgkpre tpahiiIiss gvairgypnv avysatksqI dgfmrslare Iqpegvhvnt
181 vspgltktem asgvslddfp pspigqwiqp eaiadavryl vksknitgti lsvdngitv
    
```

[0179]

[0180] 핵산 서열

[0181] 서열 번호 5: *rabbit* DSMZ 22167 유래 *Oryctolagus cuniculus*

```

1  atggettcatt ctggcgtaac acgccgtgat ccgctggcca acaaagtcgc tattgtcact
61  gcgtcgaccg atggcatcgg actggcgatt gcgcgtcgcc ttgctcagga eggggctcac
121 gtggtaatct cttcgcglaa acagcaaaat gtagatcgtg ccgttgctgc cctgcaagca
181 gaaggtctgt ccgtaactgg tactgtgtgc catgtcggga aagccgagga ccgtgaactg
241 ctggttgcca eggcccttaa tctcatgge ggtatcgata tctggtgag taacggcgcc
301 gtcaatccgt ttttcggtaa gtaaatggac gIcaccgaag aggtgtggga laaaattctg
361 gacatcaacg tgaagaacat ggcgttgatg accaaagcgg tggftccaga aatggaaaaa
421 cgcggtgggg gctcagttgt cattgtggcc agcattgcag ccttaatcc atttagcgge
481 tIaggtccgt acaatgtgag taaaacggca ttggtggcc tgaccaagaa cctggcatIg
541 gagttagcag cgcagaacat tegtgttaac tgtttagcgc egggcctgat taagacatca
601 ttcagtaagg cactgtggga ggataaagct caggaggaaa atatcattca gaaactgcgt
661 attgccgctc tgggaaaacc ggaagaatgt gcagglateg ttagelttct gtgctctgaa
721 gatgcgtcct atattacggg tgaaaccgta gtggttgccc ggggagcgcc gagccgcctg
    
```

[0182]

[0183] 서열 번호 6: *Candida magnoliae* DSMZ 22052 핵산 서열 카르보닐 리덕타아제

```

1   atgtctgcta ctctegaacgc ttttatcact ggtgcccagc ggggaatggg cgaggccaca
61   gctattaage ttgcccttga ggggtacagc gtcacccttg catcaagcgg tatttgagcag
121  ctcaatgcc acaaggaaaa actaccate gtgaagaagg gccagcagca ctacgtttgg
181  cagctcgatc ttagtgcacat cagaggggct tccacccca agggggctcc tetgctgcc
241  agcagctacg acgtgtttct cagcaacgcc ggtgtggtgg actttgctcc gttgcagac
301  caaagcgaga ctggcgaaaa ggacctgttc acggttaacc tgetgtgccc tgttgcttg
361  accaagacca ttgttaaggc cctcgcgcgc aagcccgcg agaagcctgc tcaattatc
421  ttcacctcgt ccattgctgg aattgcgggt gttcccaacg tggcggctca cagcgcacc
481  aagggcgcga ttgacagctt tgcgcgctcg cttgctcgtg agtbogtcc caagaacac
541  cacgttaact gcgtgaaccc gggcacgacg cgcaccgaga tgacaaaggc cgttgatcc
601  ggggtttctg gcgatgttcc tatcaagggc tggatcgagg tgcgtggat tgcagagct
661  gtgctgtttt tgatcaagtc caagaacatc actggccagt cgcctgctgt tgacaaagg
721  ttccgtgttt aa

```

[0184]

[0185] 서열 번호 7: *Candida vaccinii* CBS7318 핵산 서열 카르보닐 리덕타아제

```

1   atgaggccca caccctaacgc ccttctgact ggcggcagcc gcqccattgg cgcggccgct
61   gcaattaaac tcgccgaggc aggcctacagc gtgaagctcg cgtcgcggcg tctcgacaag
121  ctcaacqagq tqaaggccaa gcttctctgc gtcaagcagc gccaggagca ccatgtatgg
181  cagcttgatc tcagcgacgt gcaggccgcg ctcgagtcca aqqcgcacc gctgcccgcg
241  agtaagtaag atttgtttgt ctcgaacgcc ggcgtggcta etttctgccc aacggctgag
301  catgacgaca aggactggca gaacattatl gccgtgaact tgacatcgcc cattgccatt
361  acgaaggcgc tcgttaaggc cgttggcgag cgcctcaaac ataacccglt tcagatcgcg
421  ttctctgcat cggcggccgc cctgcgcggc gtgcccagca ccgctgttta cagcgcctag
481  aagggccgcc tcgacgctt cacgcgctcg ctgcaccaag agctcggccc aaagggcacc
541  catgtgaaca tcgtacaccc tggatggacg cacaccgaga tgaactgcgg tctagatgag
601  cctagggata cgcaccacc gggctggatc cagccggaag ccatcgcca ggccattctg
661  tatctcgcga agtcaaaaga catcacggga acgaacatcg ttgtcgacaa cggcctgact
721  atttaa

```

[0186]

[0187] 서열 번호 8: *Candida magnoliae* CBS6396 핵산 서열 카르보닐 리덕타아제

```

1   atgaacgctc tagtgaccgg tggtagccgt ggcattggcg aggcgatcgc gaccaagctg
61   gccgaagatg gctacagcgt gacaatcgcc tcgcgcggaa tcgatcagct caacaaggta
121  aaggctaaac ttccggttgt gagggagggc cagaccacc acgtgtgcca gcttgatttg
181  agcgacgccc aggcgcgctc gtccttcaag ggcgctcctt tgccagcaag cagctacgat
241  gtccttctca acaacyccgg agtaacggat ccgagtccca ttgcgaagca gtcggatagc
301  gagattcaca agctgtttag cgtgaatctg ctgtcaccag ttgctttgac aaagacgtac
361  gtccagggcg ttaccgggaa gcctcgtgag acgccagctc acattatctt tatctcgtca
421  ggcgttgcca ttcgaggcta cccaaacgtc gctgtatact cggctactaa gagcgggctc
481  gacggtttca tgaggtctct ggcgcgcgag cttggcccog aggygctcca tgtgaacct
541  gtcagcccg gtctcaccaa aaccgagatg gccagcggcg tcagcctcga cgaactcccg
601  ccatcgccga ttgggggctg gatccagccc gaggccatcg ctgatgcagt gaggtacctg
661  gtgaagtcga agaacatcac aggcacgatt ctgtcagtgt acaacggaat cacggtttaa

```

[0188]

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SK Biopharmaceuticals Co., Ltd.

<120> METHOD FOR PREPARATION OF CARBAMIC ACID

(R)-1-ARYL-2-TETRAZOLYL-ETHYL ESTER

- <130> PC11076-SKB
- <140> PCT/KR2010/007069
- <141> 2010-10-15
- <150> US 61/251,867
- <151> 2009-10-15
- <160> 8
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 260
- <212> PRT
- <213> *Oryctolagus cuniculus* from rabbit DSMZ 22167
- <220><221> misc_feature
- <223> carbonyl reductase
- <400> 1

Met Ala Ser Ser Gly Val Thr Arg Arg Asp Pro Leu Ala Asn Lys Val

1	5	10	15
Ala Ile Val Thr	Ala Ser Thr Asp	Gly Ile Gly Leu	Ala Ile Ala Arg
	20	25	30
Arg Leu Ala Gln	Asp Gly Ala His	Val Val Ile Ser	Ser Arg Lys Gln
	35	40	45
Gln Asn Val Asp	Arg Ala Val Ala	Ala Leu Gln Ala	Glu Gly Leu Ser
	50	55	60
Val Thr Gly Thr	Val Cys His Val	Gly Lys Ala Glu	Asp Arg Glu Arg
65	70	75	80
Leu Val Ala Thr	Ala Leu Asn Leu	His Gly Gly Ile	Asp Ile Leu Val
	85	90	95
Ser Asn Ala Ala	Val Asn Pro Phe	Phe Gly Lys Leu	Met Asp Val Thr
	100	105	110
Glu Glu Val Trp	Asp Lys Ile Leu	Asp Ile Asn Val	Lys Ala Met Ala
	115	120	125
Leu Met Thr Lys	Ala Val Val Pro	Glu Met Glu Lys	Arg Gly Gly Gly

130 135 140
 Ser Val Val Ile Val Ala Ser Ile Ala Ala Phe Asn Pro Phe Ser Gly
 145 150 155 160
 Leu Gly Pro Tyr Asn Val Ser Lys Thr Ala Leu Val Gly Leu Thr Lys
 165 170 175
 Asn Leu Ala Leu Glu Leu Ala Ala Gln Asn Ile Arg Val Asn Cys Leu
 180 185 190
 Ala Pro Gly Leu Ile Lys Thr Ser Phe Ser Lys Ala Leu Trp Glu Asp

195 200 205
 Lys Ala Gln Glu Glu Asn Ile Ile Gln Lys Leu Arg Ile Arg Arg Leu
 210 215 220
 Gly Lys Pro Glu Glu Cys Ala Gly Ile Val Ser Phe Leu Cys Ser Glu
 225 230 235 240
 Asp Ala Ser Tyr Ile Thr Gly Glu Thr Val Val Val Ala Gly Gly Ala
 245 250 255

Pro Ser Arg Leu
 260

<210> 2

<

211> 243

<212> PRT

<213> *Candida magnoliae* DSMZ 22052

<220><221> misc_feature

<223> carbonyl reductase

<400> 2

Met Ser Ala Thr Ser Asn Ala Leu Ile Thr Gly Ala Ser Arg Gly Met
 1 5 10 15
 Gly Glu Ala Thr Ala Ile Lys Leu Ala Leu Glu Gly Tyr Ser Val Thr
 20 25 30
 Leu Ala Ser Arg Gly Ile Glu Gln Ile Asn Ala Ile Lys Glu Lys Leu
 35 40 45

Pro Ile Val Lys Lys Gly Gln Gln His Tyr Val Trp Gln Leu Asp Leu
 50 55 60

1 5 10 15
 Gly Ala Ala Ala Ala Ile Lys Leu Ala Glu Ala Gly Tyr Ser Val Thr
 20 25 30
 Leu Ala Ser Arg Gly Leu Asp Lys Leu Asn Glu Val Lys Ala Lys Leu
 35 40 45

 Pro Val Val Lys Gln Gly Gln Glu His His Val Trp Gln Leu Asp Leu
 50 55 60
 Ser Asp Val Gln Ala Ala Leu Glu Phe Lys Gly Ala Pro Leu Pro Ala
 65 70 75 80
 Ser Lys Tyr Asp Leu Phe Val Ser Asn Ala Gly Val Ala Thr Phe Ser
 85 90 95
 Pro Thr Ala Glu His Asp Asp Lys Asp Trp Gln Asn Ile Ile Ala Val
 100 105 110

 Asn Leu Thr Ser Pro Ile Ala Ile Thr Lys Ala Leu Val Lys Ala Val
 115 120 125
 Gly Glu Arg Ser Asn Asp Asn Pro Phe Gln Ile Ala Phe Leu Ser Ser
 130 135 140
 Ala Ala Ala Leu Arg Gly Val Pro Gln Thr Ala Val Tyr Ser Ala Thr
 145 150 155 160
 Lys Ala Gly Leu Asp Gly Phe Thr Arg Ser Leu Ala Lys Glu Leu Gly
 165 170 175

 Pro Lys Gly Ile His Val Asn Ile Val His Pro Gly Trp Thr Gln Thr
 180 185 190
 Glu Met Thr Ala Gly Val Asp Glu Pro Arg Asp Thr Pro Ile Pro Gly
 195 200 205
 Trp Ile Gln Pro Glu Ala Ile Ala Glu Ala Ile Val Tyr Leu Ala Lys
 210 215 220
 Ser Lys Asn Ile Thr Gly Thr Asn Ile Val Val Asp Asn Gly Leu Thr
 225 230 235 240

 Ile

<210> 4

<211> 239

<212> PRT

<213> *Candida magnoliae* CBS6396

<220><221> misc_feature

<223> carbonyl reductase

<400> 4

Met Asn Ala Leu Val Thr Gly Gly Ser Arg Gly Ile Gly Glu Ala Ile

1 5 10 15

Ala Thr Lys Leu Ala Glu Asp Gly Tyr Ser Val Thr Ile Ala Ser Arg

 20 25 30

Gly Ile Asp Gln Leu Asn Lys Val Lys Ala Lys Leu Pro Val Val Arg

 35 40 45

Glu Gly Gln Thr His His Val Trp Gln Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu

 50 55 60

Ala Ala Ser Ser Phe Lys Gly Ala Pro Leu Pro Ala Ser Ser Tyr Asp

65 70 75 80

Val Leu Val Asn Asn Ala Gly Val Thr Asp Pro Ser Pro Ile Ala Lys

 85 90 95

Gln Ser Asp Ser Glu Ile His Lys Leu Phe Ser Val Asn Leu Leu Ser

 100 105 110

Pro Val Ala Leu Thr Lys Thr Tyr Val Gln Ala Val Thr Gly Lys Pro

 115 120 125

Arg Glu Thr Pro Ala His Ile Ile Phe Ile Ser Ser Gly Val Ala Ile

 130 135 140

Arg Gly Tyr Pro Asn Val Ala Val Tyr Ser Ala Thr Lys Ser Gly Leu

145 150 155 160

Asp Gly Phe Met Arg Ser Leu Ala Arg Glu Leu Gly Pro Glu Gly Val

 165 170 175

His Val Asn Thr Val Ser Pro Gly Leu Thr Lys Thr Glu Met Ala Ser

 180 185 190

Gly Val Ser Leu Asp Asp Phe Pro Pro Ser Pro Ile Gly Gly Trp Ile

atgtctgcta cttcgaacgc tcttatact ggtgccagcc gcggaatggg cgaggccaca 60
 gctattaagc ttgcccttga ggggtacagc gtcacccttg catcacgcgg tattgagcag 120
 ctcaatgcca tcaaggaaaa actacccatc gtgaagaagg gccagcagca ctacgtttgg 180
 cagctcgatc ttagtgacat cgaggcggct tccacctca agggggctcc tctgcctgcc 240

 agcagctacg acgtgttctt cagcaacgcc ggtgtggtgg actttgctcc gttcgcagac 300
 caaagcgaga ctgcgcaaaa ggacctgttc acggttaacc tgctgtgcc tgttgcgttg 360
 accaagacca ttgtaaggc catcgccgac aagccccgag agacgcctgc tcacattatc 420
 ttcacctcgt ccattgtcgg aattcgcggt gttcccaac tggcggctca cagcgcacc 480
 aaggcgcgga ttgacagctt tgcgcgctcg cttgctcgtg agttcggctc caagaacatc 540
 cacgttaact gcgtgaacc gggcacgacg cgcaccgaga tgacaaagg cgttgatctc 600
 gcggctttcg gcgatgttc tatcaaggc tggatcgagg tcgatgcgat tgccgacgct 660

 gtgctgtttt tgatcaagtc caagaacatc actggccagt cgctcgttgt tgacaacgga 720
 ttcggtgttt aa 732

 <210> 7
 <211> 726
 <212> DNA
 <213> Candida vaccinii CBS7318
 <220><221> misc_feature
 <223> carbonyl reductase
 <400> 7

 atgaggtcga cacctaacgc ctttgtgact ggcggcagcc gcggcattgg cgcggccgct 60
 gcaattaaac tcgccgaggc aggtacagc gtgacgctcg cgtcgcgcgg tctcgacaag 120
 ctcaacgagg tgaaggccaa gcttctgtc gtgaagcagg gccaggagca ccatgtatgg 180

 cagcttgatc tcagcgact gcagcccgcg ctcgagtca agggcgcacc gctgcccgcg 240
 agtaagtacg atttgtttgt ctgcaacgcc ggcgtggcta ctttctcgcc aacggctgag 300
 catgacgaca aggactggca gaacattatt gccgtgaact tgacatgcc cattgccatt 360
 acgaaggcgc tcgttaaggc cgttggcgag cgtcaaacg ataaccggtt tcagatcgcg 420
 ttctgtcat cggcggcgcg cctgcgcggt gtgccgcaga ccgctgttta cagcgetacg 480
 aaggccggcc tcgacggctt cacgcgctcg ctgcccaagg agctcggccc aaaggcatc 540
 catgtgaaca tcgtacacc tggatggacg cagaccgaga tgactgcggg ttagatgag 600

 cctagggata cgccatccc gggctggatc cagccggaag ccatcgcca ggccattgtg 660

tatctcgcga agtcaaagaa catcacggga acgaacatcg ttgtcgacaa cggcctgact 720
 atttaa 726
 <210> 8
 <211> 720
 <212> DNA
 <213> Candida magnoliae CBS6396
 <220><221> misc_feature
 <223> carbonyl reductase
 <400> 8
 atgaacgctc tagtgaccgg tggtagccgt ggcattggcg aggcgatcgc gaccaagctg 60
 gccgaagatg gctacagcgt gacaatcgcc tcgcgcggaa tcgatcagct caacaaggta 120

 aaggctaaac ttccggttgt gagggagggc cagaccacc acgtgtggca gcttgatttg 180
 agcgacgccg aggccgcgtc gtccttcaag ggcgtcctt tgccagcaag cagctacgat 240
 gtccttgtea acaacgccgg agtaacggat ccgagtccca ttgcgaagca gtcggatagc 300
 gagattcaca agctgtttag cgtgaatctg ctgtcaccag ttgctttgac aaagacgtac 360
 gtccaggcgg ttaccgaaa gcctcgtgag acgccagctc acattatfff tatctcgtca 420
 ggcgttgcca ttcgaggcta cccaaacgtc gctgtatact cggtactaa gagcgggctc 480
 gacggtttca tgaggctctt ggcgcgcgag cttggccccg agggcgtcca tgtgaacact 540

 gtcagcccgg gtctcacaa aaccgagatg gccagcggcg tcagcctcga cgacttcccg 600
 ccatcgcga ttgggggctg gatccagccc gaggccatcg ctgatgcagt gaggtacctg 660
 gtgaagtcga agaacatcac aggcacgatt ctgtcagttg acaacggaat cacggtttaa 720