

申請日期	86 年 6 月 11 日
案 號	86108050
類 別	C12P37/00, C07C69/02
Int. CI ⁶	以上各欄由本局填註)

公告本

A4
C4

555855

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	使用可溶性側鏈酯類及醯基轉移酶來合成 β -內醯胺抗菌劑的方法
	英 文	Synthesis of β -lactam antibacterials using soluble side chain esters and enzyme acylase
二、發明 人 創作	姓 名	(1) 約翰·亞瑟 Usher, John J. (2) 岡那·羅門喜克 Romancik, Guna
	國 籍	(1) 美國 (2) 美國
	住、居所	(1) 美國紐約州東茜拉可斯桑摩海門大道486號 486 Summerhaven Drive, East Syracuse, NY 13057, USA (2) 美國紐約州詹姆史威爾桑德漢德巷6103號 6103 Thunderhead Lane, Jamesville, NY 13078, USA
	三、申請人	
	姓 名 (名稱)	(1) 必治妥施貴寶公司 Bristol-Myers Squibb Company
	國 籍	(1) 美國
	住、居所 (事務所)	(1) 美國新澤西州·普林斯頓·勞倫斯維勒／普林斯頓路 Lawrenceville-Princeton Road, Princeton, NJ, U.S.A.
	代 表 人 姓 名	(1) 史帝芬·大衛 Davis, Stephen B.

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國（地區） 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權

美國 1996 年 7 月 26 日 60/022,622 ☒有主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

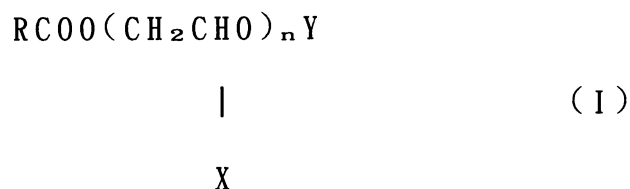
訂

線

五、發明說明(1)

本發明係關於在醯基轉移酶及作為醯基來源之可溶性酯類的存在下，製造抗菌性 β -內醯胺類即青黴素類及頭芽孢菌素類，的方法。

日本專利公告案第47-25388、47-29588、48-26985、48-35090、48-99393、49-14687、49-36890、49-48892、49-75787、49-134893及52-110896號揭示製造青黴素類或頭芽孢菌素類的方法，其係令具有醯基之甲酯或乙酯與6-氨基青黴酸或7-氨基頭芽孢酸或其衍生物反應，該醯基會被導入後者。這些參考文獻中的醯基來源是低級烷酯，特別是甲酯。Eiji Kondo氏等人擁有的美國專利第4,340,672號(1982年7月20日核准)揭示一種製備抗菌性 β -內醯胺類，即青黴素類與頭芽孢菌素類，的方法，其係藉由醯基轉移酶作用在青黴素或頭芽孢菌素之環胺並以式(I)酯作為醯基來源，



其中RCO是青黴素或頭芽孢菌素側鏈之醯基；X是氫原子，低級烷基或羥基低級烷基；Y是氫原子或低級烷基；且n是1至20之整數。上述方法中使用聚乙二醇酯

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

總

五、發明說明(2)

作為醯基來源，其充分溶於水，此可與已知醯基來源，例如甲酯類，其水中溶解度低，作一比較。

讓渡給 Novo Nordisk 之 WO 92 / 01061 於 1992 年 1 月 23 日公開，其係關於製備 β -內醯胺衍生物的方法，該方法係令母氨基 β -內醯胺與作為醯化劑之醯胺類進行酵素醯化反應。

本發明提供一種製備抗菌性 β -內醯胺類的新穎方法，該 β -內醯胺類是青黴素類與頭芽孢菌素類，此方法係藉由醯基轉移酶作用在青黴素或頭芽孢菌素主環之胺並以式(II)酯作為醯基來源



其中 RCO 是青黴素或頭芽孢菌素側鏈之醯基；R' 是 H 或 CH₂X 或 CHXY；R'' 是 H、CH₂Y 或 CHXY，且 X 及 Y 各自獨立為氫原子、羥基、低級烷基或低級羥烷基。

除非明確指出或有上下文的關聯，本說明書中使用之醯基，以 RCO 表示，其為天然或合成青黴素類或頭芽孢菌素類之醯基。低級烷基包括具有 1 至 4 個碳原子的烷基。

本發明一方面提供一種製造 β -內醯胺抗菌劑的方法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

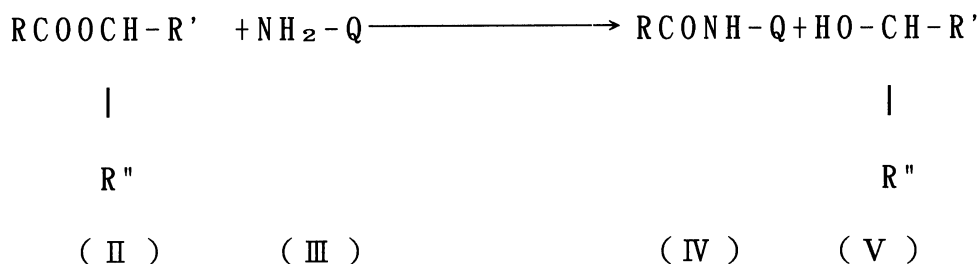
訂

線

五、發明說明 (3)

，其於醯基轉移酶存在下，令式 (II) 酯與式 (III) 吡啶酮羧酸於水性介質中反應，生成式 (IV) 之 β - 內醯胺抗菌劑。

醯基轉移酶



其中 R C O 是醯基，N H₂-Q 是氨基來源且醯基轉移酶是來自細菌或真菌或由基因重組方法製得的酵素。取代基 R' 與 R'' 定義如上。醯基 R C O 可以是直鏈、支鏈、環狀、或部份環狀之低級烷醯基或低級烯醯基、單環低級芳烷醯基、單環芳氧基低級烷醯基、(O, N, 或 S) - 雜環 - 低級烷醯基、(O, N, 或 S) - 雜環 - 硫代 - 低級烷醯基、氰基乙基、氰基甲基 - 硫代乙基、單環芳基甘氨酸醯基、單環環烯基甘氨酸醯基、單環芳基甘氨酸醯基、N - 醯基 - 芳基甘氨酸醯基、單環芳基丙二醯基或芳基磺烷醯基，上述取代基皆可任意具有下列取代基，包括低級烷基、氨基甲基、鹵基、羥基、低級烷醯基氧基及低級烷氧基，較好醯基 R C O 含有 1 至 15 個碳原子。

較佳之 R C O 基團是 D - 苯基甘氨酸醯基及 4 - 羥基 - D - 苯基甘氨酸醯基，其為已知抗生素 (例如頭孢力新 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

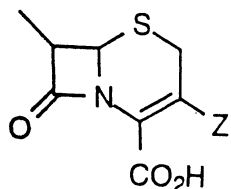
線

五、發明說明(4)

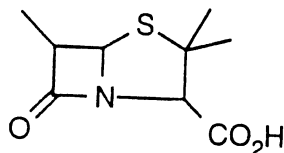
cefprozil)、阿摩西色林(amoxicillin)) 之側鏈

。

氨基來源 NH_2 - Q 表示已知頭芽孢菌素或青黴素抗生素之 7 - 氨基或 6 - 氨基，Q 具有式 (V I) 結構式



或



(V I)

其中 Z 是氫原子、鹵基、具 1 - 3 個碳原子之低級烷基、具 1 - 3 個碳原子之鹵烷基、 C_{2-4} 烯基、親核基團或被親核基團取代之具有 1 - 3 個碳原子的低級烷基。鹵原子是氯原子、溴原子或碘原子，且代表性之親核基團揭示在日本專利公開案第 4 9 - 8 1 3 8 1 號。

醯基轉移酶可以源自植物、動物、真菌或細菌、或由重組法製得。就製法、產率、成本與安定性而論，細菌或真菌之醯基轉移酶尤其重要。

提供醯基轉移酶之代表性細菌或真菌包括屬於下列菌屬之微生物菌株，例如醋桿菌屬、無色桿菌屬、氣單胞菌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(5)

屬、阿卡利菌屬(Alkaligenes)，節桿菌屬、短桿菌屬、具內克氏菌屬、桿菌屬、棒桿菌屬、埃希氏菌屬、黃桿菌屬、酸桿菌屬、克魯維菌屬(Kluyvera)、微桿菌屬、微球菌屬、諾卡氏菌屬、變形菌屬、假單胞菌屬、紅假單胞菌屬、螺菌屬、葡萄球菌屬、黃單胞菌屬、阿法諾凱丁菌(Aphanocladium)或頭芽孢菌屬，或能夠產製用於本發明反應之醯基轉移酶之上述菌種的天然或人造之突變種或變異株。舉例而言，這類菌珠包括 Advances in Applied Microbiology, 第20冊，第217頁(1976)描述者，或適用於本發明反應之這類菌株的天然或人造突變種或變異株。特別有用的酵素之一是青黴素G醯胺酶，其可藉由技藝已知的方法自大腸桿菌製得。其亦可使用技藝已知的方法自重組大腸桿菌製得，該大腸桿菌含有青黴素G醯胺酶與tac啟動子。後述方法較佳，因為該方法能提供大量上述酵素、適合工業生產。

式(Ⅲ)之吡啶酮羧酸可用其可溶水之碱金屬鹽類，例如鈉鹽、鋰鹽與鉀鹽，或用其酯類，例如甲磺醯基乙酯或乙醯甲酯。式(Ⅲ)吡啶酮羧酸及其鹽類或酯類是已知化合物，可由已知方法製得。

式(Ⅱ)酯類可由已知方法製得，即令酸 $RCOOH$ 與式(V)之二醇或二醇或多元醇反應：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (6)



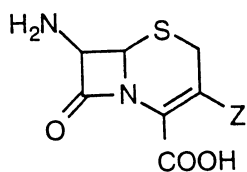
(V)



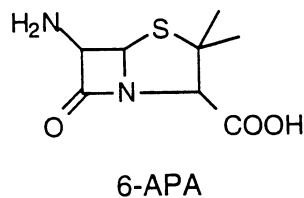
其中 R C O、R' 及 R'' 定義如上。酯化反應可在酸催化條件下以脫水作用達成，或藉由酸鹵化物或酯置換反應達成。R C O O H 與二醇、三醇或多元醇是已知化合物或可由技藝中已知方法製得者。

本發明另一方面提供酯 R - C O O - C H₂ - C H₂ - O H，其中 R 是 D - 苯基甘氨酸酯基或 4 - 羥基 - D - 苯基甘氨酸酯基。這些酯類是新穎的且為本發明反應中的重要反應物，因為這些酯類提供產量超過 90% 的終產物。這些酯類是由已知方法製備的。

本發明之較佳實施例之一是製備抗菌性 β - 內酰胺的方法，該 β - 內酰胺是頭孢力新、頭孢多芹 (cefadroxil) 及阿摩西色林，該方法係令青黴素 G 酰胺酶作用在式 (VII) 青黴素或頭芽孢菌素胺類。



或



6-APA

(VII)

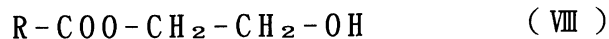
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(7)

其中 Z 是甲基 (7 - A D C A 結構中者) 或 1 - 丙烯基 (頭孢力新主環、7 - P A C A 結構中者)，並作用在式 (VIII) 之酯



其中 R 是 4 - 羥基 - D - 苯基甘氨酸基。式 (VII) 之青黴素或頭芽孢菌素胺類是已知化合物且可由技藝中已知的方法製得。式 (VIII) 之酯可由 R C O O H (其中 R 之定義如上) 與乙二醇反應而製得。化合物 R C O O H 與乙二醇在商業上可購得。

達成本發明之方法係在室溫製備一溶液，該溶液含有酯，頭芽孢菌素或青黴素胺與無緩衝液之酵素。製備此溶液係將該酯溶於水並添加氫氧化鉍至 pH 達 7.5。然後將青黴素或頭芽孢菌素胺加入該酯溶液，再以氫氧化鉍校正 pH 至 7.5。然後冷卻此混合液至 5 - 15 °C 並加入固體酵素。此時 pH 約降 0.5 單位而非維持在 7.5。然後以高效液相層析法分析該反應混合液，例如使用 C 18 逆相管柱，5 公分 × 4.6 毫米，5 微米顆粒直徑之 spherosorb C D S 2。製得之終產物有 90 - 99 % 產率。

本發明方法製得之最終抗菌性 β - 內酰胺的產率通常大於 90 %，有時大於 95 %，偶而大於 99 %。由簡單烷酯類，例如甲酯，製得之產率通常介於 70 至 90 % 之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(8)

間。由於本發明方法製得之最終抗生素具有高產率，此方法極適合用於製造青黴素或頭芽孢菌素抗生素。

典型反應混合液含有 5 - 35 % 醯基來源 (VIII) (較好 8 - 12 %) 及 2 - 20 % 胺來源 (VII) (較好 2 - 5 %)。酵素可呈溶解或不溶型式，但較好酵素呈不溶且固定化製劑的型式。此製劑具有一些優點，例如該酵素之安定性增加且相當容易由反應混合液移除固定化的酵素，此為分離該抗生素之第一步驟。

本發明可藉下列實施例說明但不受限於此：

實例 1

由式 (VII) 化合物合成頭孢力新，其中使用的酵素是固定化之重組青黴素 G 醯胺酶，醯基來源是經酸催化製得之 4 - 羥基 - D - 苯基甘氨酸羥基乙酯

在無水條件下，令 4 - 羥基 - D - 苯基甘氨酸 (10 克)，乙二醇 (15 毫升) 與濃縮硫酸 (5 毫升) 組成之混合液，於 55 °C 攪拌 18 小時。冷卻此溶液，加入冰 (10 克)，以 10 N NH_4OH (4.5 毫升) 校正 pH 至 1.0，製得 40 毫升之羥基乙酯溶液。

含有 10 % 酯、4 % 式 (VII) 化合物與 8 % 酵素 (等於每毫升酵素有 32 國際單位) 之 20 毫升酵素混合液，其不含緩衝液之製法如下：

將上述製得之酯溶液 (6.9 毫升) 與水 (2 毫升) 混合並以 10 N NH_4OH 校正 pH 至 7.5。然後加入

五、發明說明(9)

式(VII)化合物(0.8克)，以1N NH_4OH 校正pH至7.5且體積調至18.4毫升。然後將此混合液冷卻至5-15℃，加入固體酵素(1.6克；640 IU)。反應過程中，pH並非維持在7.5，而是降低約0.6單位。以HPLC分析反應混合液，其使用C18逆相管柱(5公分×4.6毫米)，5微米直徑之spherosorb ODS2。移動相是10%乙腈/0.3% H_3PO_4 ，流速為2毫升/分鐘，以215nm波長測定。頭孢力新之異構物出現在2.9分鐘(順式)及5.1分鐘(反式)。製得終產物之最大產率為92-96%。整個實驗在25-50分鐘內完成。

實例2

由式(VII)化合物合成頭孢力新，其中使用的酵素是固定化之重組青黴素G醯胺酶，醯基來源是4-羥基-D-苯基甘氨酸羥基乙酯。

製備純化之酯係令4-羥基-D-苯基甘氨酸的Dane鹽與溴乙醇反應，製得純的氫氨酸鹽結晶。

含有12.5%酯，4%式(VII)化合物及8%酵素(等於每毫升酵素有24 IU)之20毫升反應混合液係製備如下：

如上所述製得之純化酯(2.5克)與水(9毫升)混合，以濃縮 NH_4OH 校正pH至8.0而得一溶液。將式(VII)化合物(0.8克)加入此溶液，以2M之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(10)

H_2SO_4 校正溶液之 pH 至 6.76 且體積調至 18.4 毫升。令此溶液冷卻至 15℃，再加入固體酵素(1.6 克；480 IU)。反應中不維持 pH，pH 降低約 0.6 單位。所得終產物之最大產率為 99%。未反應之式(VII)化合物所占比例降低至 0.7%。此實驗在 25 分鐘內完成。

實例 3

由 7-ADCA 合成頭孢多芹，其中使用的酵素是 Boehringer 廠之青黴素 G 醯胺酶，醯基來源是經酸催化反應製得之 4-羥基-D-苯基甘氨酸羥基乙酯

酯之製備如實例 1 所述。如實例 1 所述重複該實驗，但反應在 15℃ 且使用 1.6 克 Boehringer 廠之酵素。以 HPLC 分析反應混合液，其使用 Merck 管柱，250-4，Lichrosorb RP-18 (18 微米)，移動相為 10% 乙腈 / 1% $NH_4H_2PO_4$ ，流速為 1.3 毫升 / 分鐘，以 280 nm 波長測定。所得產物之最大產率約 95%。此實驗在 35 分鐘內完成。

實例 4

由 6-APA 合成阿摩西色林，其中使用之酵素是 Boehringer 廠之青黴素 G 醯胺酶，醯基來源是經酸催化反應製得之 4-羥基-D-苯基甘氨酸羥基乙酸

體積為 20 毫升，含有 12% 酯，3% 6-APA 及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(11)

8 % 酵素之混合液製備如下：

令酯溶液（如實例 1 製備者，8 . 3 毫升）與水（2 毫升）混合，以 1 0 N NH_4OH 校正 pH 至 7 . 5 。再將化合物 6 - A P A （0 . 6 克）加入此溶液，以 1 N 氫氧化鉍校正 pH 至約 7 . 0 且體積調至 1 8 . 4 毫升。然後冷卻此溶液至 2 0 °C 並加入 Boehringer 廠之酵素（1 . 6 克）。以 H P L C 分析此溶液，使用 C 1 8 逆相管柱（5 公分 × 4 . 6 毫米），5 微米直徑之 spherosorb O D S 2 。移動相是 2 . 5 % 乙腈 / 0 . 0 2 5 M NaH_2PO_4 ，以 H_3PO_4 校正至 pH 3 . 5 ，流速是 1 毫升 / 分鐘，以 2 1 5 n m 波長測定。所得終產物之產率為 9 0 - 9 5 % ，實驗在 1 6 0 分鐘內完成。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

四、中文發明摘要（發明之名稱：

)

使用可溶性側鏈酯類及醯基轉移酶
來合成 β - 內醯胺抗菌劑的方法

本發明揭示一種合成 β - 內醯胺抗菌劑的方法，其係在醯基轉移酶存在下，使用可溶性側鏈酯類。本發明亦揭示在該方法中用來作為反應物的新穎酯類。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

英文發明摘要（發明之名稱：

)

SYNTHESIS OF β -LACTAM ANTIBACTERIALS USING SOLUBLE SIDE CHAIN ESTERS AND ENZYME ACYLASE

Disclosed is a process for the synthesis of β -lactam antibacterials using soluble side chain esters in the presence of enzyme acylase. Also disclosed are novel esters useful as reactants in said process.

訂

線

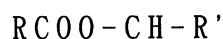
六、申請專利範圍

附件一：第 8 6 1 0 8 0 5 0 號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國 9 1 年 5 月呈

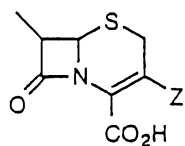
1. 一種製備青黴素或頭芽孢菌素之方法，包括在醯基轉移酶存在下，令式 (III) $\text{NH}_2 - \text{Q}$ 與式 (II) 之酯反應



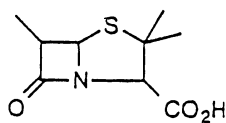
(II)



其中 Q 是



或

其中 Z 是氫原子、 C_{1-3} 烷基、或 C_{2-4} 烯基；

RCO 為 D - 苯基甘氨酸醯基或 4 - 羥基 - D - 苯基甘氨酸醯基；

R' 是氫原子、 CH_2X 或 CHXY ，

R'' 是氫原子、 CH_2Y 或 CHXY ，

其中 X 及 Y 各自獨立為氫原子、羥基、 C_{1-3} 烷基或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

經基 - C₁₋₃ 烷基；

製得式 (IV) 之青黴素或頭芽孢菌素，

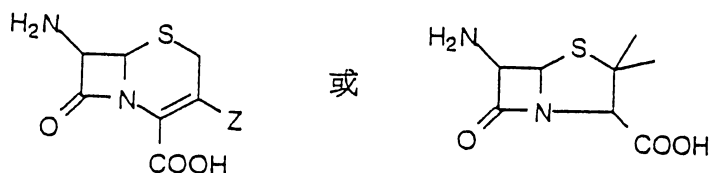


其中 R C O 與 Q 之定義如上所述。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 N H₂ - Q 是可溶水之碱金屬鹽類或酯。

3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中醯基轉移酶是固定化之重組青黴素 G 醯胺酶。

4. 一種製備抗生素頭孢力新、頭孢多芹或阿摩西色林之方法，包括在青黴素 G 醯胺酶存在下，令下列化合物



其中 Z 是甲基或 1 - 丙基

與具有化學式 R - C O O - C H₂ - C H₂ - O H 之酯反應，

其中 R C O 是 4 - 經基 - D - 苯基甘氨酸基，

製得頭孢力新、頭孢多芹或阿摩西色林。

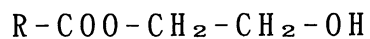
5. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該酶是固定化之重組青黴素 G 醯胺酶。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

6. 一種化合物，其具有如下化學式



其中 R C O 是 D - 苯基甘氨酸基或 4 - 羥基 - D - 苯基甘氨酸基。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂