

387941

公告本

申請日期	82. 2. 1
案 號	82100636
類 別	Int. Cl. 12P7/42, 17/06

A4 387941
C4

(以上各欄由本局填註)

發明 專利 說明 書
新 型

一、發明名稱	中 文	新法史坦醇 (SIMVASTATIN) 之生化純化
	英 文	BIOCHEMICAL PURIFICATION OF SIMVASTATIN
二、發明人	姓 名	1. 邁克·J·康德 2. 史帝文·J·西安塞歐西 3. 艾利克·T·皮斯克 4. 格列高里·L·泰瓦特
	籍 貫 (國籍)	1. 英國 2-4. 美國
	住、居所	1. 美國維吉尼亞州哈利森堡市北田園巷767號 2. 美國維吉尼亞州哈利森堡市公園路1852號 3. 美國維吉尼亞州哈利森堡市模倣鳥大道927號 4. 美國維吉尼亞州雪納杜哈市第六街400號
三、申請人	姓 名 (名稱)	美國默克大藥廠
	籍 貫 (國籍)	美國
	住、居所 (事務所)	美國新澤西州雷維市東林肯大道126號
	代表人 姓 名	詹姆斯·福·諾頓

請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 ()

之生物轉形作用

使集合細枝穗黴 ATCC 38009 生長在含有 12 毫升 EN 培養基之 250 毫升振盪燒瓶中，在 29℃ 下 3 天。添加洛法史坦醇胺鹽至 2.5 克 / 升之濃度，繼續進行醱酵 2 天。製備粗均質液時，於 3000rpm 下離心 10 分鐘收集培養物，然後以 50mM N-參(羥甲基) 甲基-2- 胺基乙磺酸 (TES) 緩衝液，pH 7.7 洗滌。培養基再離心一次，細胞質體於冰中冷卻後，於含有玻璃片與乾冰粉之研鉢中研磨。磨好之均質物相當於一個振盪燒瓶中之份量，再度懸浮在 2.0 毫升 50mM TES 緩衝液中，於 6000rpm 下離心 10 分鐘去除細胞碎片與玻璃片。使用上澄液作為粗均質液之來源，蛋白質濃度為約 0.5 毫克 / 毫升。

為了進行生物轉形作用，使一體積粗均質液與等體積洛法史坦醇酸胺鹽 (5 克 / 升) 合併，混合物於 29℃ 下培養。採用此方法，在 2 小時內，有 80-90% 洛法史坦醇酸轉化成三醇酸。

使用呈粗細胞萃取物形態之水解酶時，比活性為水解 0.11 毫莫耳洛法史坦醇酸胺鹽 / 毫克蛋白質 / 小時。

實例 3來自集合細枝穗黴細胞之洛法史坦醇水解酵素之純化法

進行洛法史坦醇酸形成三醇酸之生物轉形作用所使用之水解酵素純化法係採用下述製程，由集合細枝穗黴之均質液經過快速蛋白質液相層析法 (FPLC[®]) 使用 MONO Q[®] 陰離子交換管柱純化至幾近同質。

五、發明說明 (1)

發明概要

本發明係有關洛法史坦醇 (lovastatin) 進行生物合成轉化作用形成 7-[1',2',6',7',8',8a'(R)-六氫-2'(S),6'(R)-二甲基-8'(S)-羥基-1'(S)萘基]-3.(R),5(R)-二羥基庚酸,“三醇酸”之方法,係於洛法史坦醇合成新法史坦醇 (Simvastatin) 之過程中進行微生物水解作用,以促使新法史坦醇與未反應之洛法史坦醇起始物質分離與單離。該製法利用一種可以水解洛法史坦醇之 2-甲基丁醯氧基側鏈之細菌或真菌,或此類微生物之突變種,或來自該等微生物之水解酶。

該三醇酸及其內酯型係相關技藝上已知者,且為 3-羥基-3-甲基戊二醯基-輔酶 A(HMG-CoA) 還原酶之抑制劑,HMG-CoA 還原酶係一種涉及膽固醇生合成作用之酵素。

洛法史坦醇鹽形成三醇鹽之選擇性轉化作用適用於在洛法史坦醇合成新法史坦醇過程中,使新法史坦醇與未反應之洛法史坦醇分離。洛法史坦醇酸之 8'-位置上具有一個 2-甲基丁醯氧基側鏈,且很難與 8'-位置具有一個 2,2-二甲基-丁醯氧基側鏈之新形成之新法史坦醇酸分離。申請者現已發現可採用本發明方法選擇性裂解洛法史坦醇酸鹽上之 2-甲基丁醯氧基側鏈,本發明方法則使用來自一種微生物之水解酶,該微生物包括:真菌如:集合細枝穗黴 (*Clonostachys compactiuscula* (ATCC 38009 與 ATCC 74178), 紅色紅曲 (*Monascus ruber*), 深黃被孢黴 (*Mortierella Babellina*), *Emericella unguis*), 二異

五、發明說明 ()

依實例 2 所述，但改用 50mM 參 (羥甲基) 胺基甲烷 (TRIS) 緩衝液 (pH 7.8) 替代 50mM TES 緩衝液，取得 6000rpm 離心後之上澄液，於 15,000rpm 下離心 20 分鐘，所得上澄液經過 0.45 μ M 濾紙過濾。取 10 毫升含有 0.3-0.5 毫克 / 毫升蛋白質之濾液，依 1.0-2.0 毫升 / 分鐘之速率加至與法馬公司 (Pharmacia) 之快速蛋白質液相層析儀 (FPLC) 系統連接之法馬 MONO Q[®] (HR5/5) 陰離子交換管柱中。

陰離子蛋白質與管柱基質結合後，利用含氯化鈉 (0-500mM) 之 20mM TRIS，pH 7.8 之線性梯度溶液專一溶離出水解酶。以 1 毫升溶離份收集溶出之蛋白質，使用洛法史坦酞胺鹽分析 (此時利用 TLC (薄層層析法) 及光密度計或 HPLC 估計水解百分比)，或利用一種可對該酵素顯示水解活性之比色受質 (丁酸鄰硝基苯酯，o-NPB) 分析。當使用後者受質時，基本上依 R.C. 勞倫斯 (Lawrence) 等人述於 J. Gen. Microbiol., (1967), 48, 401-418 之方法，於 410nm 下利用分光光度測定法監視水解反應。這二種分析法均顯示，當 NaCl 濃度達 300mM 時，可溶離出水解酶。

十二烷基硫酸鈉 - 聚丙烯醯胺 (SDS) 凝膠電泳顯示含最高量洛法史坦酞酸水解酶之溶離份含有一段顯著之條帶，分子量約 45,000 Da。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (2)

孢 (*Diheterospora Chlamydospora*)，棕黑腐質黴 (*Humicola fuscoatra*)，*Dechotomomyces Ceipii*，非洲新赤殼 (*Neocosmospora africana*)，*Xylogone sphaerospora*，*Torulomyces ragna*，毛梭孢 (*Thielavia fimeti*)，爪甲曲黴 (*Aspergillus unguis*)，卷枝毛黴 (*Mucor circinelloides*)，皮鏢孢 (*Fusarium solani*)，產黃青黴 (*Penicillium chrysogenum*)，棒曲黴 (*Aspergillus clavatus*)，普通帚黴 (*Scopulariopsis communis*)，*Gilmaniella humicola*，拜尼爾毛黴 (*Mucor bainieri*)，*Tricharus spiralis*，及螺卷毛殼 (*Chaetomium cochliodes*)，或細菌，尤指放線菌類如：白淺灰鏈黴菌 (*Streptomyces alboxriscolus*)，寡生孢鏈黴菌 (*Streptomyces paucisporogenes*)，吸水鏈黴菌 (*Streptomyces hygroscopius*)，綠色產色鏈黴菌 (*Streptomyces viridochromogenes*)，排孢游動單孢菌 (*Planomonospora parontospora*)，及 *Kibdelosporangium aridum*，產生三醇鹽，結果造成更容易分離之混合物，及較高純度之新法史坦甾產物。

發明背景

本發明係有關適用為抗血膽固醇過高之製劑之 HMG-CoA 還原酶抑制劑。現已確認，血膽固醇過為心血管疾病，特定言之動脈硬化症，發展中之一個顯著危險因子。可抑制 HMG-CoA 還原酶之化合物會干擾且限制膽固醇之生合成，因此具有作為抗血膽固醇過高症製劑之功能。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 ()

十二烷基硫酸鈉 - 聚丙烯醯胺 (SDS) 凝膠電泳顯示含最高量洛法史坦醇酸水解酶之溶離份含有一段顯著之條帶，分子量約 45,000 Da。

以純酵素取代實例 2 之粗製均質物，估算以洛法史坦醇銨鹽為受質時該水解酶之 K_m 及比活性。所得到之 K_m 值為 4.14mM，且在飽和受質之條件下發現，酵素比活性為水解 0.04 毫莫耳洛法史坦醇銨鹽 / 毫克蛋白質 / 分鐘。

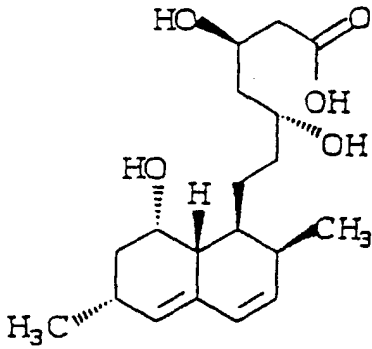
實例 5

在過量新法史坦醇銨鹽之存在下使洛法史坦醇銨鹽進行生物轉形作用

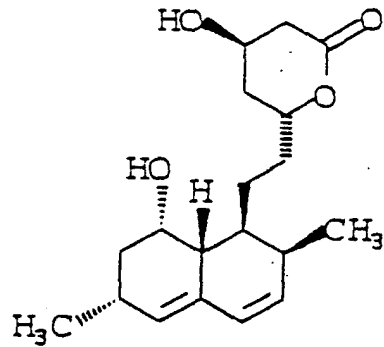
自實例 2 所詳述之 EN 培養基中取出 45 克冷凍之集合細枝穗黴 (ATCC 38009) 細胞 (冷凍前係先經 50mM Tris, pH 7.8 緩衝液洗液)，使用研鉢與杵與玻璃片及乾冰均質化。將所得均質之冷凍粉末移入適當試管內，並使用最少量 50mM Tris, pH 7.8 將殘留在研鉢中之物質洗入相同試管內。然後使混合物解凍，於 6000rpm 下離心 10 分鐘，去除大型細胞碎片與玻璃。

使用 6000rpm 上澄液作為水解酶粗來源，取 0.8 毫升與 0.2 毫升甲醇及 1.0 毫升新法史坦醇溶液 (18.6mM 及洛法史坦醇 (1.4mM) 銨鹽之 50mM Tris 溶液，pH 7.8) 混合。反應混合物於 29°C 下培養，經過 1 小時，2 小時，及 17 小時後取出 0.1 毫升樣本，並以 0.9 毫升甲醇稀釋。利用 HPLC，使用華特曼 Whatman C-8 管柱作為固定相，以 60：

五、發明說明 (3)



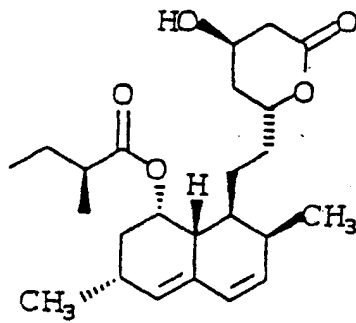
三醇酸



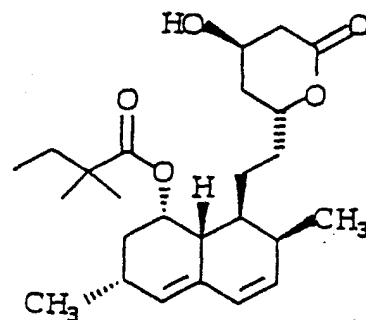
二醇內酯

如上已述，三醇酸與其內酯型為舊化合物。呈其內酯型之三醇酸已述於例如：Endo之日本專利申請案 86-13798 (1986)，其中亦說明其利用紅色紅曲 (*Monascus ruber*) 之醱酵生產法，及其降低血膽固醇含量能力之證明。

洛法史坦醇與新法史坦醇在相關技藝中亦已知為 HMG-CoA 還原酶抑制劑。這二種化合物之差異在於洛法史坦醇之 8'- 位置上具有一個 2-甲基丁醯氧基側鏈，而新法史坦醇則具有一個 2,2-二甲基丁醯氧基側鏈



洛法史坦醇



新法史坦醇

雖然，過去曾由洛法史坦醇合成新法史坦醇，但是很難自新法史坦醇與洛法史坦醇之混合物中分離及純化新法史

84.5.25 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

Xylogone sphaerospora	42047	48	8
產黃青黴 (Penicillium chrysogenum)	10002	9	0
棒曲黴 (Aspergillus clavatus)	1007	7	0
普通帚黴 (Scopulariopsis communis)		30	0
Gilmaniella humicola	16013	5	0
拜尼爾毛黴 (Mucor bainieri)	42642	1	0
Tricharus spiralis		2	0
螺卷毛殼 (Chaetomium cochliodes)	10195	6	0
普通帚黴 (Scopulariopsis communis)		40	0
集合細枝穗黴 (Clonostachys compactiuscula)	100		5
	38009		
	74178		
集合細枝穗黴 (Clonostachys compactiuscula)		87	3
	38009		
	74178		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (4)

坦酞。這二種化合物之間之結構類似（其間差異僅在於一個甲基），利用高壓液相層析法（HPLC）分離時，因為滯留時間相近，因此也很難分開。一種自新法史坦酞與洛法史坦酞之混合物中單離新法史坦酞之方法係利用鹼水解作用，例如：氫氧化鈉（NaOH）或氫氧化鋰（LiOH），將未反應之洛法史坦酞轉化成三醇酸或二醇內酯。然而，此鹼水解作用僅水解一部份洛法史坦酞，留下未反應之洛法史坦酞成為新法史坦酞終產物之雜質。鹼水解法之另一個問題為新法史坦酞會部份水解，因此減少了所需新法史坦酞之收量。本發明提供一種自新法史坦酞與洛法史坦酞之混合物中單離出更高純度且不會損失產量之製法。

Komagata等人，J. Antibiotics, 39, 1574-77 (1986)，說明康帕丁（compactin）（ML-236B）形成8-羥基類似物（ML-236A）之酵素水解轉化法，其中亦如同本發明脫除了相同之側鏈。研究1600種真菌菌種後，發現其中有59種可有效催化該水解反應，且Emericella unguis顯示最強活性。

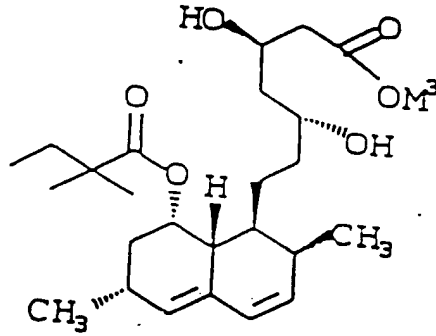
Endo之日本專利申請案85-176595（1985）說明了與上述Komagata等人相同之轉化作用，但尚包括“莫那克林 K”（monacolin K）（係洛法史坦酞）形成“莫那克林 J”（即本發明之三醇酸）之轉化作用。尤其適用者為下列黴菌：Mortierella isabellina，Emericella unguis，二異孢（Diheterospora chlamydosporia），棕黑腐質黴（Humicola fuscoatra），Dichotomomyces ceipii，非

六、申請專利範圍

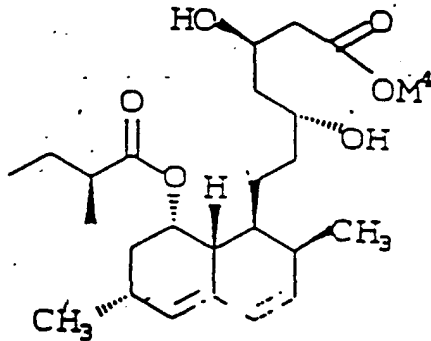
修正
年月日
89. 1. 17 補充

公告本

1. 一種自含有式(1)雜質之混合物中分離式(4)化合物之方法，



(1) 洛法史坦酞酸 / 鹽 (Lovastatin Acid / Salt)



(4) 新法史坦酞酸 / 鹽 (Simvastatin Acid / Salt)

係包括：

以一種可選擇性裂解洛法史坦酞 2-甲基丁醯氧基側鏈之微生物培養物，或以來自該微生物培養物之水解酶處理該等化合物之混合物，使式(1)化合物轉化成式(2)化合物，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (5)

洲新赤殼 (*Neocosmospora africana*), *Xylogone sphaerospora*, *Torulomyces ragenae*, 及毛梭孢 (*Thielavia fimeti*)。

歐洲專利公告案 EPO 486 153 中說明集合細枝穗黴 (*Clonostachys compactiuscula*) ATCC 38009 可以使洛法史坦醇酸轉化成三醇酸。此相同菌種亦已存在放在美國菌種收集中心 (American Type Culture Collection) ATCC 74178。

洛法史坦醇可被轉化成活性更高之 HMG-CoA 還原酶抑制劑，係由天然 2(S)- 甲基丁醯氧基側鏈進行 C-甲基化作用，製得新法史坦醇。

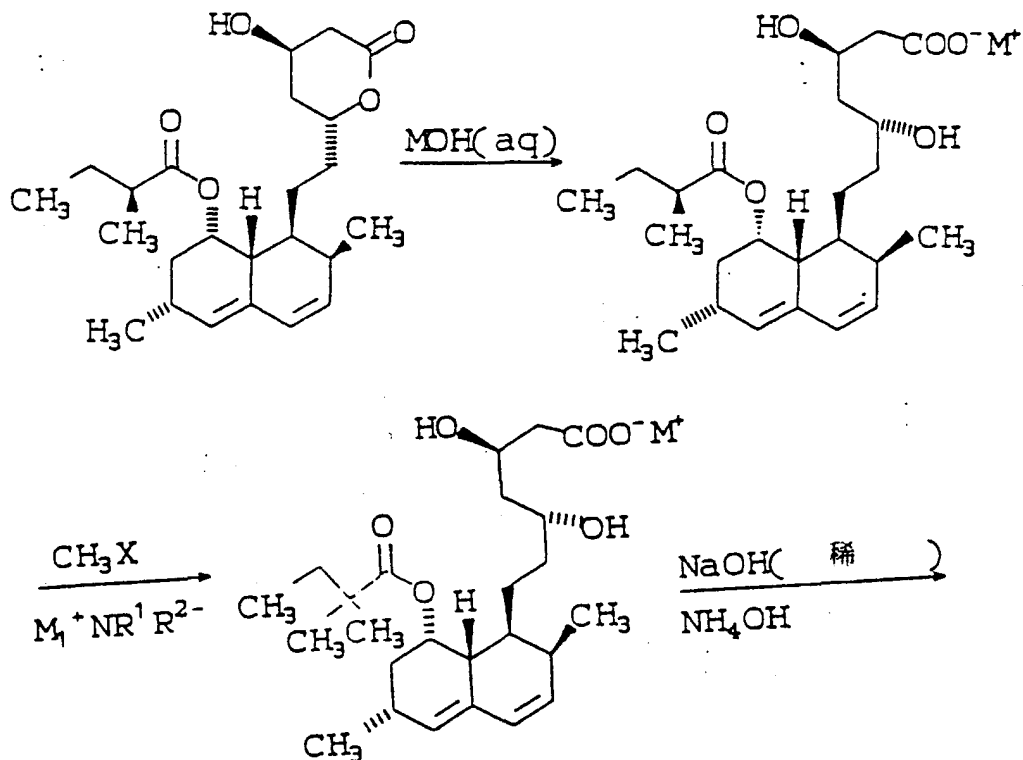
一種使 2(S)- 甲基丁醯氧基側鏈直接進行 C-甲基化作用之方法述於美國專利案 No. 4,582,915。此製法詳述於圖 I，及下文說書中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

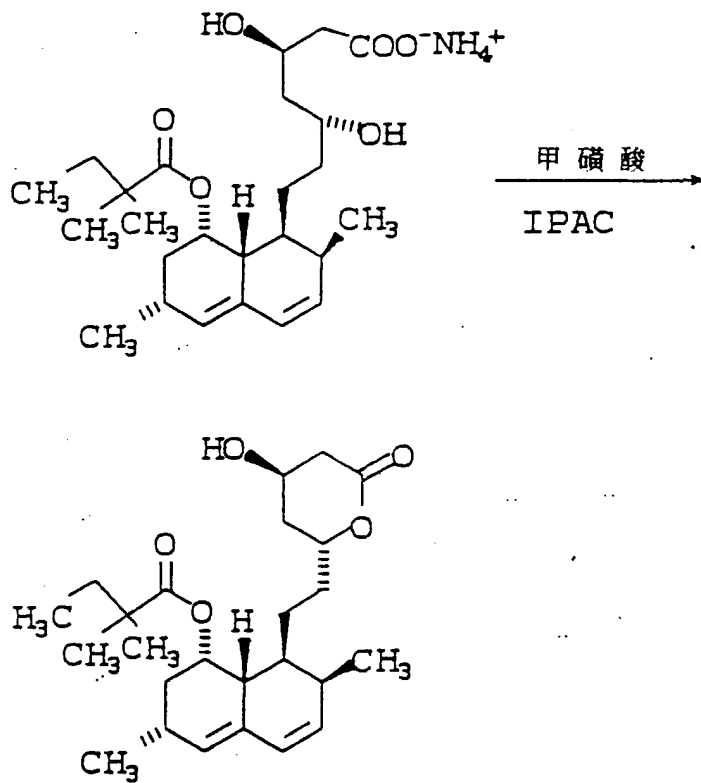
裝
訂

五、發明說明 (6)

圖 I



續圖 1



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 訂

五、發明說明(7)

式中：

M 為鹼金屬鹽，以鉀鹽較佳；

X 為鹵素，如：氯，溴或碘，以溴或碘較佳；

M₁⁺ 為來自鋰，鈉或鉀，最好來自鋰，之陽離子；及

R¹與R²為

1) 分別為C₁₋₃烷基，或

2) R¹及R²共同與所附接之氮形成一個5或6員雜環，如

：吡咯啉或六氫吡啶，以吡咯啉較佳。

由洛法史坦醇直接進行甲基化作用形成新法史坦醇之方法中，首先使洛法史坦醇內酯化合物轉化成一種鹼金屬鹽，最好為二羥基羧酸之鉀鹽。雖然任何可製成無水鹽之方法均可，但仍宜添加實質上呈化學計量之氫氧化鉀水溶液至內酯起始物質之一種烴溶劑溶液中，該烴溶劑為含有少量C₁₋₃烷醇，最好為異丙醇，乙醇或甲醇之苯，甲苯或環己烷，或至該內酯之四氫呋喃(THF)溶液中，THF中可添加或不添加烷醇，攪拌數分鐘至約1小時，最後真空濃縮至乾。殘質接受嚴格脫水條件處理，如：與環己烷，甲苯或無水四氫呋喃進行共沸蒸餾，最好與相當無水(低於0.08毫克H₂O/毫升)之四氫呋喃進行。

使無水鹼金屬鹽溶於一種醚溶劑中如：四氫呋喃，乙醚，1,2-二甲氧乙烷中，冷卻至約-80℃至-25℃，並以過量強鹼如：鹼金屬醯胺處理，其中該鹼金屬為鋰，鈉或鉀，最好為鋰，且該醯胺為二乙醯胺，吡咯啉，二甲醯胺或二異丙醯胺等於無水，惰性環境下之一種醚溶劑溶液。於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (8)

-80° 至 -25℃ 下，最好於 -35° 至 -30℃ 下歷時約 2 至 8 小時後，仍保持在低溫下添加一種甲基鹵化物如：甲基溴，甲基氯或甲基碘，最好為甲基溴或甲基碘。若仍存留相當多量起始物質時，可依上述重覆強鹼與甲基鹵化物之處理。最後一次添加甲基鹵化物後 0.5 至約 3 小時後，添加過量水中止反應混合物反應。

繼此直接甲基化作用後，使用 NaOH 或 LiOH 使未反應洛法史坦醇轉化成三醇酸或二醇內酯供純化終產物用。然而，此鹼水解作用僅水解少量洛法史坦醇。因此，未反應之洛法史坦醇仍存留在新法史坦醇終產物中成為雜質。此外，鹼水解作用亦水解了新法史坦醇，因此降低了所需新法史坦醇產物之產量。繼水解作用之後，新法史坦醇之開環酸型或其一種鹽型則再利用加熱或酸催化之內酯化作用轉化成內酯，並分離及結晶純化。

本發明之詳細說明

本發明係有關自新法史坦醇與洛法史坦醇之混合物中純化及單離高收量且高純度新法史坦醇之方法，該方法係利用一種可選擇性水解洛法史坦醇 2-甲基丁醯氧基側鏈形成 6(R)-[2-8(S)- 羥基-2(S), 6(R)-二甲基-1',2',6',7', 8',8a'(R)-六氫萘基) 乙基)-4(R)- 羥基-3,4,5,6- 四氫-2H-吡喃-2- 酮，三醇酸或相應之二醇內酯之真菌或細菌進行。該三醇酸或二醇內酯很容易利用習知方法如：結晶法，高壓液相層析法或其他層析法與新法史坦醇（或新法史坦醇酸）分離，本發明特別適用於在由洛法史坦醇合成

五、發明說明 (9)

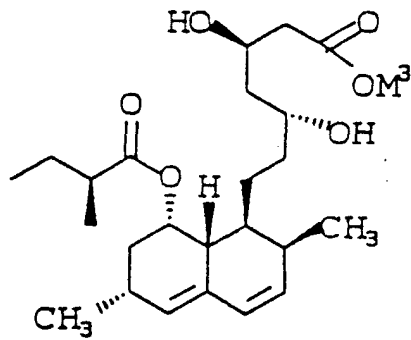
新法史坦耐之過程中，排除新法史坦耐中未反應之洛法史坦耐。

本發明之方法可用來分離不論呈內酯型或其酸型之洛法史坦耐與新法史坦耐之混合物。由於呈酸型之洛法史坦耐與新法史坦耐於水性系統中之溶解度高於內酯型，因此最好使用酸型。

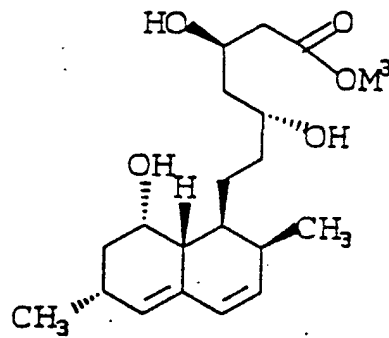
洛法史坦耐與新法史坦耐主要呈鹽型使用。除非另外說明，否則當本發明之起始物質，中間物及終產物使用“酸”，“開環酸”，及“酸型”時，則亦包括任何適合之鹽型。任何具有良好溶解度且在進行特定反應時不會干擾其他條件之鹽類均可。可使用例如：鹼金屬鹽類，如：鋰，鈉與鉀等鹽類；鹼土金屬鹽類如：鈣或鎂等鹽類；或使用與其他金屬如：鋁，鐵，鋅，銅，鎳或鈷等之鹽類；由鹼性胺基酸如：精胺酸，離胺酸， α, β -二胺基丁酸及鳥胺酸等形成之胺基酸鹽類；胺鹽類如：三級辛胺，二苄胺，乙二胺，嗎啉，及叁(羥甲基)胺基甲烷；或銨鹽。最好使用洛法史坦耐之鹼金屬鹽類(Li, Na 與 K)及銨鹽型。特別佳者為鉀鹽與銨鹽型。

為了方便起見，洛法史坦耐酸，三醇酸，其內酯型，及新法史坦耐之結構式分別示於下列式 1, 2, 3 與 4:

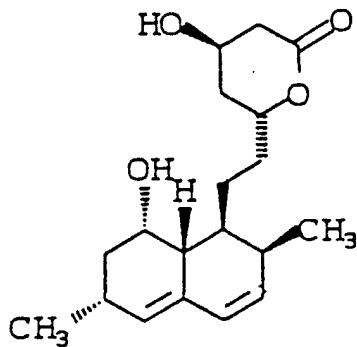
五、發明說明 (10)



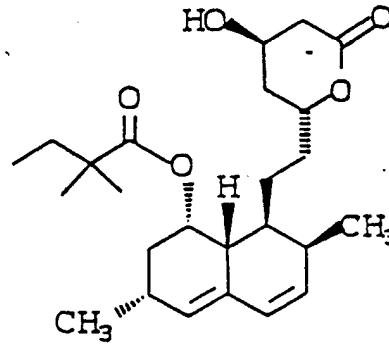
1 洛法史坦醇酸



2 三醇酸



3 二醇內酯



4 新法史坦醇

式中

M³係選自下列：

- a) H,
- b) 一種鹼金屬鹽如：Li, Na或K,
- c) 一種鹼土金屬鹽如：Ca或Mg,
- d) 一種與其他金屬如：Al, Fe, Zn, Cu, Ni或Co形成之鹽類,
- e) 一種由鹼性胺基酸如：精胺酸, 離胺酸, α, β-二胺丁酸或鳥胺酸形成之鹽類,
- f) 一種胺鹽如：三級辛胺, 二甲胺, 或叁(羥甲基)

五、發明說明 (11)

、胺基甲烷，及

g) 銨鹽。

如上文已解釋者，為了溶解度之故，已發現最需要使用呈開環或酸型之洛法史坦醇與新法史坦醇之混合物，因此最好使用洛法史坦醇之銨鹽，鉀鹽，鈉鹽與鎂鹽。

適用於本發明製法之真菌為彼等在新法史坦醇之存在下，可選擇性裂解洛法史坦醇 2-甲基丁醯氧基側鏈之真菌。

屬於 *Clonostachys* 屬，*Emericella* 屬，二異孢屬 (*Diheterospora*)，腐質黴屬 (*Humicola*)，*Dichotomomyces* 屬，新赤殼屬 (*Neocosmospora*)，帚黴屬 (*Scopulariopsis*)，*Xylogone* 屬，*Torulomyces* 屬及 *Thiavela* 屬之真菌可以水解洛法史坦醇側鏈。特別適用之真菌包括：集合細枝穗黴 (*Clonostachys compactiuscula*)，紅色紅曲 (*Monascus ruber*)，深黃被孢黴 (*Mortierella Babellina*)，*Emericella unguis*，二異孢 (*Diheterospora Chlamydosporia*)，棕黑腐質黴 (*Humicola fuscoatra*)，*Dechotomomyces Ceipii*，非洲新赤殼 (*Neocosmospora africana*)，*Xylogone sphaerospora*，*Torulomyces ravena*，毛梭孢 (*Thielavia fimeti*)，爪甲曲黴 (*Aspergillus unguis*)，卷枝毛黴 (*Mucor circinelloides*)，皮鏢孢 (*Fusarium solani*)，產黃青黴 (*Penicillium chrysogenum*)，棒曲黴 (*Aspergillus clavatus*)，普通帚黴 (*Scopulariopsis communis*)，*Gilmaniella humicola*，拜尼爾毛黴 (*Mucor*

五、發明說明 (12)

bainieri), *Tricharus spiralis*, 及螺卷毛殼 (*Chaetomium cochliodes*)。

尤其佳者為集合細枝穗黴 (*Clonostachys compactiuscula*), 棕黑腐質黴 (*Humicola fuscoatra*), 非洲新赤殼 (*Neocosmospora africana*), 普通帚黴 (*Scopulariopsis communis*) 及 *Xylogone sphaerospora* 等真菌。最佳真菌為集合細枝穗黴 (*Clonostachys compactiuscula*) (ATCC 74178 或 ATCC 38009)。

適用於本發明方法之細菌為彼等可在新法史坦醇之存在下選擇性裂解洛法史坦醇 2-甲基丁醯氧基側鏈之細菌。屬於鏈黴菌屬 (*Streptomyces*), 游動單孢菌屬 (*Planomonospora*) 及 *Kibdelosporagium* 屬之放線菌類可以水解洛法史坦醇側鏈。特別適用之細菌包括：白淺灰鏈黴菌 (*Streptomyces albogriscolus*), 寡生孢鏈黴菌 (*Streptomyces paucisporogenes*), 吸水鏈黴菌 (*Streptomyces hygroscopius*), 綠色產色鏈黴菌 (*Streptomyces viridochromogenes*), 排孢游動單孢菌 (*Planomonospora parontospora*), 及 *Kibdelosporangium aridum*。

洛法史坦醇與新法史坦醇或其酸類之混合物可接受微生物本身, 或其突變種, 或來自該微生物之不含細胞萃物, 或自不含細胞萃物 (或真菌或細菌曾經生長過之廢液, 不含細胞之培養液或培養基) 中純化之水解酶處理。

“突變種”一詞係指一種有機體中之基因組內之一些基

五、發明說明 (13)

因 (或其 DNA 調節區) 經過修飾, 留下負責有機體使洛法史坦醇水解成三醇酸之能力之有功能且可遺傳之基因。本發明範圍內之突變種基本上具有與母株菌種相同之特性, 且可水解洛法史坦醇 2-甲基丁醯氧基側鏈。

由微生物培養物或其突變種生產之酵素可依相關技藝專家們咸知之許多種任何方式與新法史坦醇及洛法史坦醇之混合物接觸。所有這些接觸方式均在本發明所定義之“處理”一詞之定義內。例如: 可使用全醱酵培養液, 且根據此製程, 僅添加新法史坦醇與洛法史坦醇之混合物至所產生之微生物醱酵培養基中, 並回收新法史坦醇純產物。

此全培養液製程之一項變化為產生如上述微生物之醱酵培養物, 但僅添加低濃度 (0.5 至 2.5 克/升, 最好 1.0 至 2.0 克/升) 之洛法史坦醇酸, 供誘發水解活性之用。然後離心或過濾收集細胞質體, 並回收沈澱塊或菌絲塊, 可立即使用或冷凍保存供日後使用。沈澱塊或菌絲塊可直接加入新法史坦醇與洛法史坦醇之混合物中, 使洛法史坦醇經由甲基化作用轉化成新法史坦醇。或者, 洛法史坦醇與新法史坦醇之混合物可部份純化, 然後使之與上述微生物培養物之冷凍沈澱塊接觸。

真菌之全細胞不一定要活的。亦可使用死細胞, 例如: 已經過丙酮脫水者。

除了全細胞外, 亦可使用來自此等全細胞培養物之粗均質液。亦可自粗均質液中單離水解酵素本身, 並採用相當純之水解酵素。

五、發明說明 (14)

當微生物分泌水解酵素至醱酵 / 培養基中時，可使用單離之酵素。

使水解酵素與新法史坦耐及洛法史坦耐起始物質之混合物接觸之方式可以分批或連續進行。此等反應物本身之接觸方式可配合技術的進步依各種方式進行改良。因此，可利用一種固定化酵素管柱，使水解酵素與新法史坦耐及洛法史坦耐之混合物共同通過管柱。這種方法技術之另一項實例為有關膜反應器。反應物接觸之較佳方法為利用上述固定化酵素管柱或使用一種純酵素製品。

下文所示之操作實例說明目前用來證明洛法史坦耐雜質在新法史坦耐之存在下進行酵素性水解作用形成三醇酸，以產生高純度新法史坦耐之方法。然而，彼等操作實例中之方法不一定為商業生產所採用。

採用本發明之方法自新法史坦耐與洛法史坦耐之混合物中分離及純化新法史坦耐之過程示於圖 II。

新法史坦耐與洛法史坦耐內酯之混合物最好經過基本上呈化學計量之鹼金屬氫氧化物（如：氫氧化鉀或氫氧化鈉）於含少量 C₁₋₃ 烷醇（最好含異丙醇，乙醇或甲醇）之一種煙溶劑（如：苯，甲苯或環己烷）中之溶液處理，攪拌數分鐘至約一小時。然後以一種水性介質萃取基質，該水性介質如：TRIS（參（羥甲基）-胺基甲烷），甘胺酸，TES（N-參 [羥甲基 - 甲胺基] - 2-羥基丙磺酸），磷酸鈉，MOPSO（3-[N-嗎啉基] - 2-羥基丙磺酸），BIS-TRIS丙烷（1,3-雙 [參 - (羥甲基) 甲胺基] 丙烷），BES（N,N-雙 [2-

五、發明說明 (15)

羥乙基]-2-胺基乙磺酸)，MOPS(3-[N-嗎啉基]-丙磺酸)，HEPES(N-[2-羥乙基]-六氫吡啶-N'-[2-乙磺酸])，DIPSO(3-[N,N-雙(2-羥乙基)胺基]-2-羥基丙磺酸)，TAPSO(3-[N-叁(羥甲基)-甲胺基]-2-羥基丙磺酸)，HEPPSO(N-[2-羥乙基]六氫吡啶-N'-[2-羥基丙磺酸])，POPSO(六氫吡啶-N,N'-雙[2-羥基丙磺酸])，EPPS(N-[2-羥乙基]-六氫吡啶-N'-[3-丙磺酸])，TEA(N-叁[羥甲基]甲基-2-胺基乙磺酸)，TRICINE(N-叁[羥甲基]-甲基甘胺酸)，BICINE(N,N-雙[2-羥乙基]-甘胺酸)，TAPS(N-叁[羥甲基]甲基-3-胺基丙磺酸)，AMPSO(3-[(1,1-二甲基-2-羥乙基)胺]-2-羥基丙磺酸)，或CHES(2-(N-環己胺基)-2-羥基丙磺酸)等緩衝液，pH 7-10，25mM至1M；蒸餾水，或上述一種水性介質另補充至高20%(v/v)一種與水互溶水溶劑如：甲醇，乙醇，丙醇，丁醇，或四氫呋喃。較佳者為含12%甲醇之TRIS，甘胺酸，TES及磷酸鈉緩衝液，pH 7.5-9.5，25mM至75mM。然後以微生物或其突變種或來自該等微生物之不含細胞萃物或來自該等微生物之水解酶處理已溶解或懸浮之基質，或使基質轉化成銨鹽，並以微生物或其突變種或來自該等微生物之不含細胞萃物或來自該等微生物之水解酶處理。該水性系可在添加所選擇微生物或其可接受之突變種，或來自該等微生物之不含細胞萃物或水解酶之前或同時添加。

隨後利用酸催化法或熱催化法進行內酯化作用，例如：於含有7mM甲磺酸之乙酸異丙酯(IPAC)中，在室溫下攪拌

五、發明說明 (16)

2 小時。所形成之新法史坦醇內酯與二醇內酯則利用高壓液相層析法 (HPLC) 或結晶法分離，得到相當純之新法史坦醇。

進行逆相 HPLC 時，使用一種有機 - 水性混合物作為移動相，其中該水性成份為 0.01 至 1.0% 磷酸或三氟乙酸或其他適合酸類，且適合之有機成份包括乙腈，甲醇與乙醇。

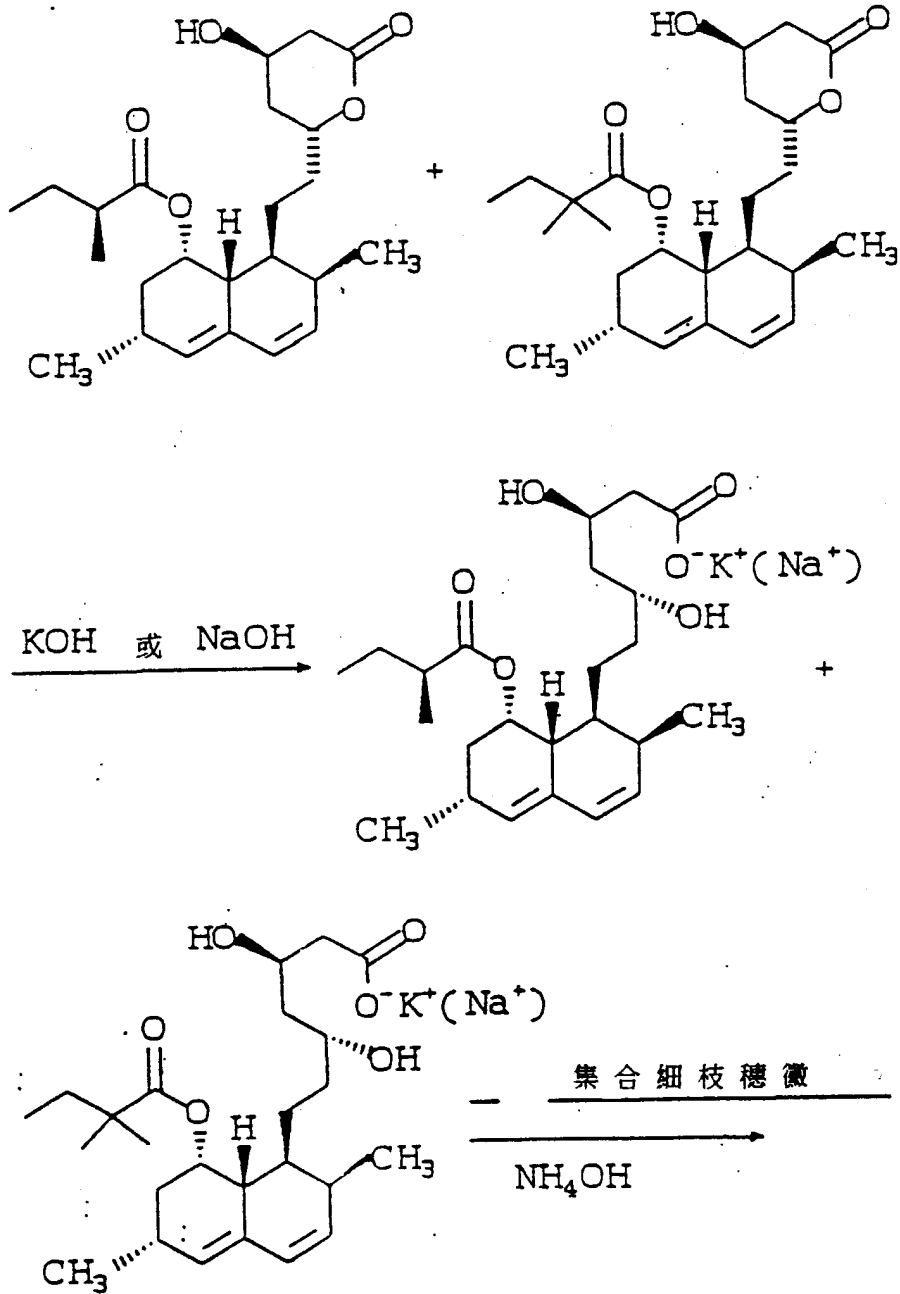
新法史坦醇亦可自三醇酸 / 二醇內酯中單離，且自乙酸乙酯，乙酸異丙酯，及甲醇中結晶純化。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂

五、發明說明 (17)

圖 II

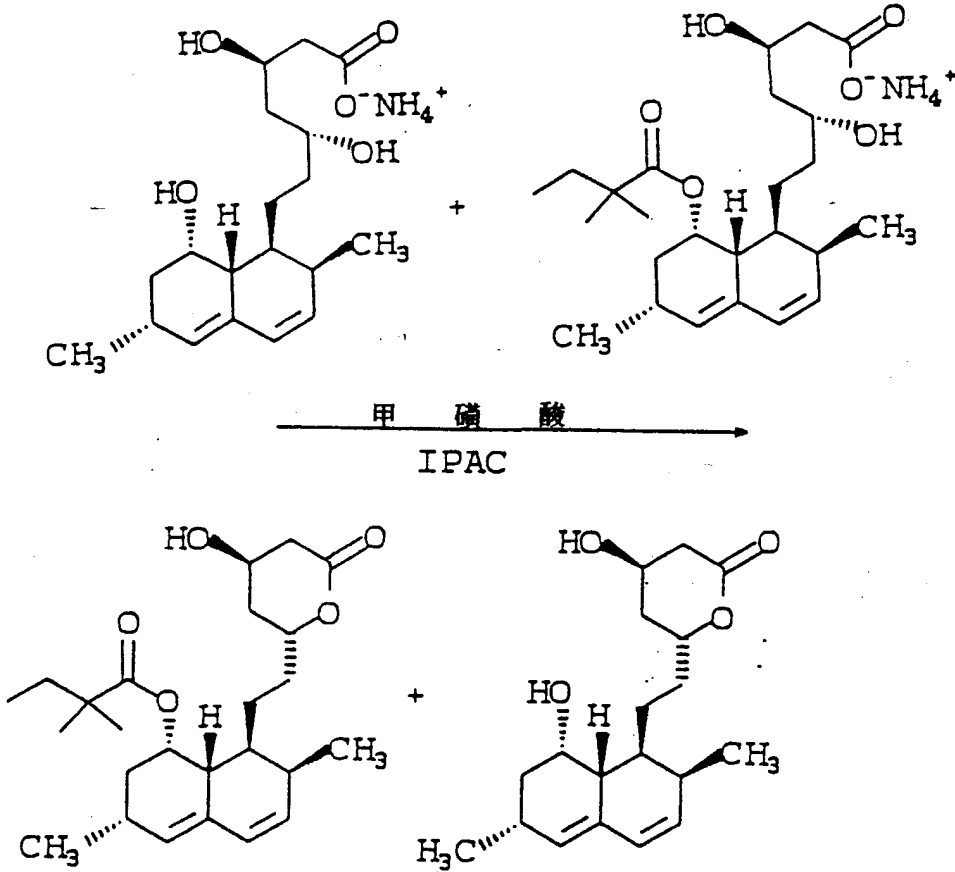


(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 訂

五、發明說明 (18)

續圖 II



利用結晶法，HPLC分離

由洛法史坦醇直接進行甲基化作用製備新法史坦醇之過程中，亦可利用洛法史坦醇酸形成三醇酸之酵素性水解作用。此全部過程示於圖 III。

由洛法史坦醇之直接甲基化作用形成新法史坦醇之過程中，首先使洛法史坦醇內酯化合物轉化成一種鹼金屬鹽，最好為二羥基羧酸之鉀鹽。雖然任何可製成無水鹽之方法均可，但仍宜添加實質上呈化學計量之氫氧化鉀水溶液至內酯起始物質之一種烴溶劑溶液中，該烴溶劑為含有少量

五、發明說明 (19)

C₁₋₃ 烷醇，最好為異丙醇，乙醇或甲醇之苯，甲苯或環己烷，或者可使用四氫呋喃 (THF) 溶液中，THF 中可添加或不添加烷醇，攪拌數分鐘至約 1 小時，最後真空濃縮至乾。殘質接受嚴格脫水條件處理，如：與環己烷，甲苯或無水四氫呋喃進行共沸蒸餾，最好與相當無水 (低於 0.08 毫克 H₂O/毫升) 之四氫呋喃進行。

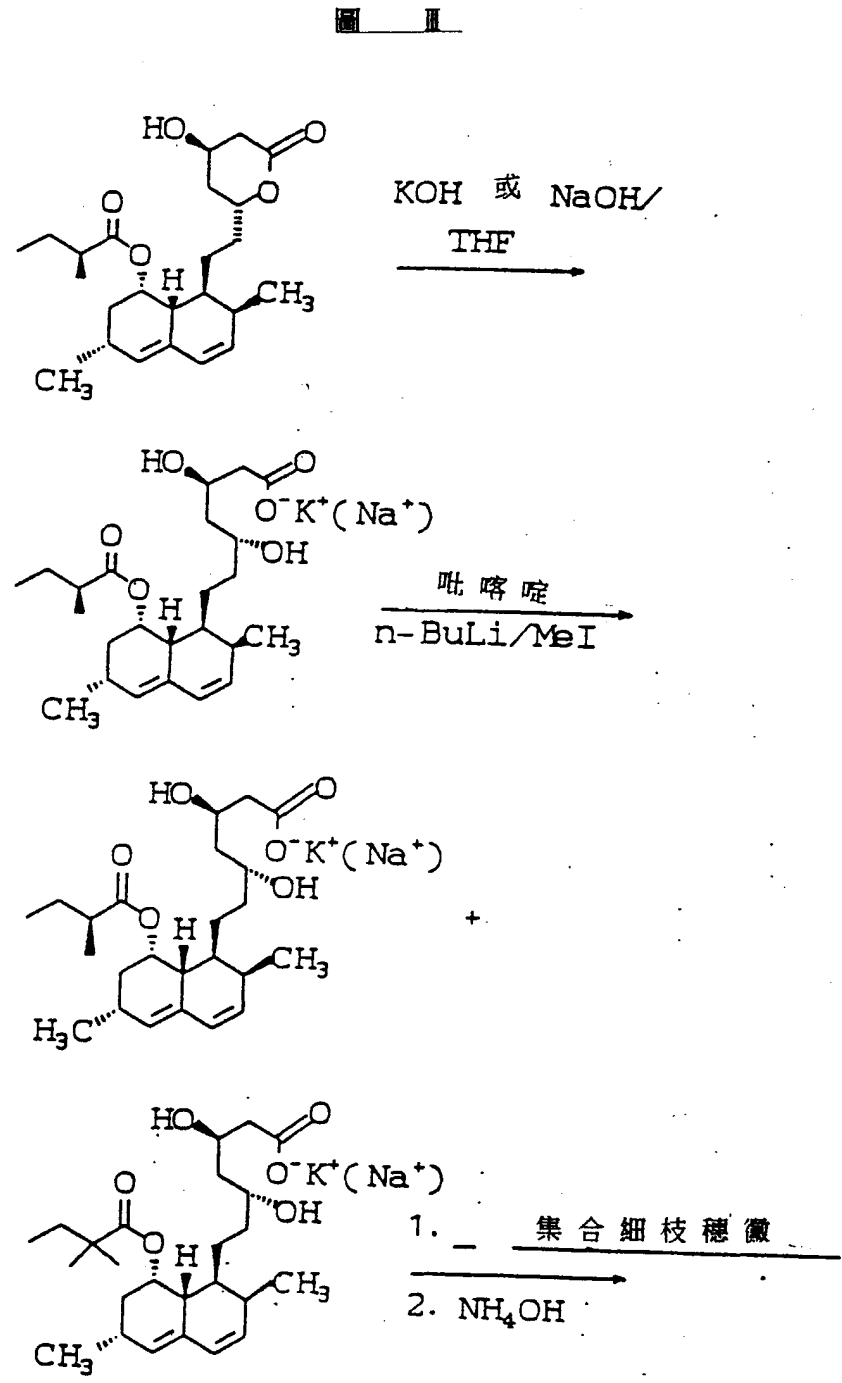
使無水鹼金屬鹽溶於一種醚溶劑中如：四氫呋喃，乙醚，1,2-二甲氧乙烷，等等中，冷卻至約 -80 至 -25℃，最好至 -35 至 -30℃，並以過量強鹼如：鹼金屬醯胺處理，其中該鹼金屬為鋰，鈉或鉀，最好為鋰，且該醯胺為二乙醯胺，吡咯啉，二甲醯胺或二異丙醯胺等於無水，惰性環境下之一種醚溶劑溶液。於 -80° 至 -25℃ 下，最好於 -35° 至 -30℃ 下歷時約 2 至 8 小時後，仍保持在低溫下添加一種甲基鹵化物如：甲基溴，甲基氯或甲基碘，最好為甲基溴或甲基碘。若仍存留相當多量起始物質時，可依上述重覆強鹼與甲基鹵化物之處理。最後一次添加甲基鹵化物後 0.5 至約 3 小時後，添加過量水中止反應混合物反應。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂

五、發明說明 (20)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

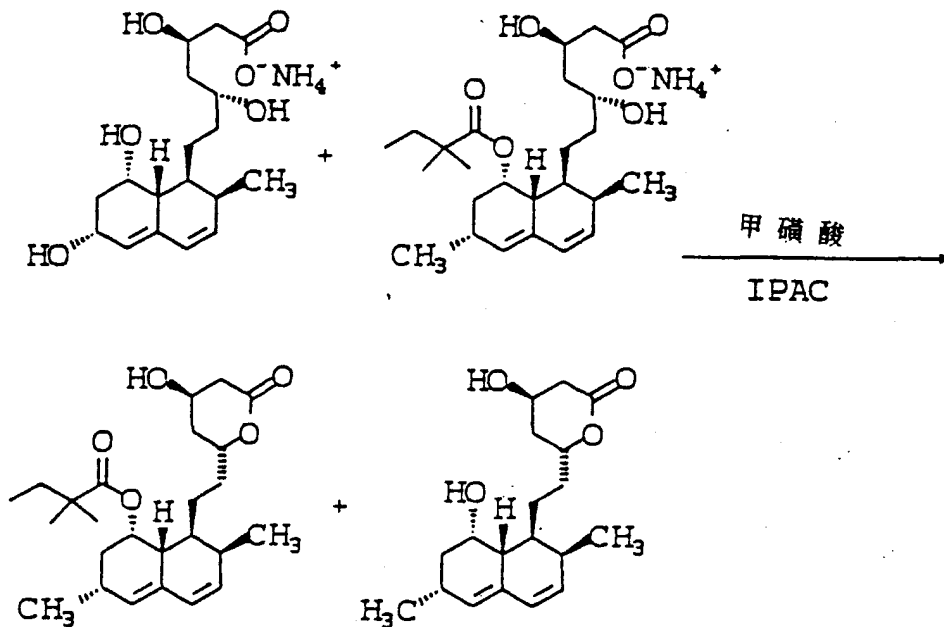


經濟部中央標準局員工消費合作社印製

裝 訂

五、發明說明 (21)

續圖 III



利用結晶法或 HPLC 分離

洛法史坦醇酸鹽及新法史坦醇酸鹽之混合物隨後最好經由含氫氧化銨 - 甲醇之乙酸乙酯溶液轉化成相應之銨鹽，然後單離銨鹽（最好利用結晶法），並再度懸浮在一種水性介質中，以所選擇之微生物，或其突變種或來自該等微生物之水解酶處理。

或者在蒸餾排除殘留之有機溶劑後，直接添加水解酵素至洛法史坦醇鹽與新法史坦醇鹽之混合物中。

所形成之新法史坦醇酸與三醇酸之混合物可經由適當方法，例如：熱催化或酸催化內酯化作用，轉化成相應之內酯混合物。新法史坦醇可利用 HPLC 或結晶法自所形成之新法史坦醇及二醇內酯之混合物中分離。或者，新法史坦醇

五、發明說明 (22)

酸可利用 HPLC 或結晶法與三醇酸分離，然後使純新法史坦
酞酸轉化成新法史坦酞內酯。若欲單離新法史坦酞且利用
結晶法純化時，最好在進行內酯化作用之前先將新法史坦
酞酸轉化成銨鹽。

本發明亦有關於特定微生物菌種：集合細枝穗黴
(Clonostachys compactiuscula) (ATCC 38009 與 ATCC
74178)，紅色紅曲 (Monascus ruber) (FERM-P. No.
4822)，深黃被孢黴 (Mortierella isabellina) (IFO
7844, ATCC 42613, ATCC 36670, ATCC 38063, 或 ATCC
44853)，Emericella unguis (IFO 8087, ATCC 10073,
ATCC 12063, ATCC 13431 或 ATCC 16812)，二異孢
(Diheterospora chlamydosporia) (IFO 9249, ATCC
16449, ATCC 18956, ATCC 20537)，棕黑腐質黴
(Humicola fuscoatra) (IFO 9530, ATCC 12774, ATCC
52073, ATCC 62175)，Dechotomomyces ceipii (IFO
9929, ATCC 22149, ATCC, 42284)，非洲新赤殼
(Neocosmospora africana) (IFO 7590, ATCC 24342)，
Xylogone sphaerospora (IFO 9516, ATCC 42027)，
Torulomyces ragenae (IFO 30008)，毛梭孢 (Thielavia
fineti) (IFO 30419)，爪甲曲黴 (Aspergillus
unguis) (MF 1416)，卷枝毛黴 (Mucor
circinelloides) (ATCC 1207a)，皮鑣孢 (Fusarium
solani) (ATCC 12826)，產黃青黴 (Penicillium
chrysogenum) (ATCC 10002)，棒曲黴 (Aspergillus

五、發明說明 (23)

clavatus) (ATCC 1007) , 普通帚霉 (Scopulariopsis communis) (MF 3769), Gilmaniella humicola (ATCC 16013) , 拜尼爾毛霉 (Mucor bainieri) (ATCC 42642), Trichcharus spiralis (MF 5295) , 螺卷毛殼 (Chaetomium cochliodes) (ATCC 10195) , 白淺灰鏈黴菌 (Streptomyces albobriscolus) (NRRL 5748) , 寡生孢鏈黴菌 (Streptomyces paucisporogenes) (ATCC 25482) , 吸水鏈黴菌 (Streptomyces hygroscopius) (ATCC 21722), 綠色產色鏈黴菌 (Streptomyces viridochromogenes) (ATCC 21724) , 排孢游動單孢菌 (Planomonospora parontospora) (ATCC 23864) , 及 Kibdelosporangium aridum (NRRL 12647) , 該等微生物可使洛法史坦醇酸轉化成三醇酸。醱酵技藝上習知改良各種微生物菌種生產所需產物收量之技術。例如：所指定之生產菌種可經過照射或接受已知可大幅度增加該微生物遺傳物質之進行式突變之其他刺激物處理。利用敏感性篩選，則可自所產生之許多突變中僅選出彼等增加所需產物產量之突變種。依此方式通常可以透過各種選出之後代不斷改良生產菌種之生產能力。突變種之生物上純培養物為實質上由一種突變菌種組成之培養物。就本發明而言，選擇真菌或放線菌之突變種同樣地可改良洛法史坦醇水解酶之生產能力。為達成此目的之令人滿意之篩選法為採用高效液相層析法 (HPLC) , 該方法可偵測濃度極低之酵素裂解產物，因此可清楚地確認任何特定突變種使洛法史坦醇轉化成三醇酸之情形。

五、發明說明 (24)

培 養 基

微生物之醱酵作用係在如其他醱酵產物之生產所採用之水性介質中進行。此等培養基包括可被微生物同化之碳源，氮源及無機鹽類。

通常，營養素培養基之可同化碳源為碳水化合物如：糖類，例如：乳糖，葡萄糖，果糖，麥芽糖，甘露糖，蔗糖，木糖，甘露糖醇，等等，及澱粉如：穀類，例如：燕麥，裸麥，玉米澱粉，粟，玉米磨粉，等等，可單獨使用或組合使用。培養基中一種或多種碳水化合物來源之確實用量部份依培養基中其他成份而定，但碳水化合物用量通常佔培養基約1重量%至6重量%之間。此等碳源可個別使用，或培養基中可併用數種此等碳源。醱酵過程中通常可使用許多種蛋白質物質作為氮源。適合之氮源包括例如：酵母水解物，初級酵母，大豆磨粉，棉花籽磨粉，酪蛋白之水解物，玉米浸漬液，酒糟，或番茄糊，等等。該等氮源可單獨使用或組合使用，其用量範圍佔水性介質約0.2至6重量%。

可加至培養基中之營養素無機鹽為可產生鈉，鉀，鉍，鈣，磷酸根，硫酸根，氯，碳酸根，等離子之習知鹽類。亦包括微量金屬如：鈷，錳，鐵及鎂。此外，若必要時，尤其若培養基起泡過度時，可添加消泡劑如：聚乙二醇或矽酮。

應注意，實例中所述之培養基僅說明可採用之許多種培養基之範例，不應視為限制範圍。明確言之，培養基中所

五、發明說明 (25)

使用之碳源包括：右旋糖，糊精，燕麥麵粉，燕麥磨粉，糖蜜，檸檬酸鹽，大豆油，甘油，麥芽萃物，鱈魚肝油，澱粉，乙醇，無花果，抗壞血酸鈉及豬油。氮源則包括腓化牛奶，自溶酵母，酵母RNA，番茄糊，酪蛋白，初級酵母，花生磨粉，酒糟，玉米浸漬液，大豆磨粉，玉米磨粉，NZ胺，豆餅，精胺酸，玉米籽粉及硫酸銨。主要離子成份為 CaCO_3 ， KH_2PO_4 ， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及 NaCl ，與少量 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，亦含微量Fe，Mn，Mo，B，Co與Cu。

內酯化作用

根據本發明之製法，以可以水解洛法史坦醇2-甲基丁醯氧基側鏈之微生物培養物，或其突變種，或來自該微生物之不含細胞萃物，或來自該等微生物之水解酶處理新法史坦醇酸與洛法史坦醇酸之混合物，該方法很容易分離新法史坦醇酸與三醇酸之混合物。若需要新法史坦醇酸之內酯型時，產物混合物可以內酯化並分離，自新法史坦醇內酯中分離二醇內酯，或者，新法史坦醇酸可自三醇酸中分離，然後使新法史坦醇內酯化，形成新法史坦醇。三醇酸之內酯化作用係採用標準製程進行，即進行熱催化或酸催化內酯化作用。洛法史坦醇酸之相關化合物之酸催化式內酯化作用製程係已知者且述於美國專利案4,916,239。進行新法史坦醇與三醇酸之內酯化作用時，則係於含7mM甲磺酸之乙酸異丙酯中，室溫下攪拌2小時。

實例 1

利用集合細枝穗黴 (*Clonostachys compactiuscula*) 全細胞

五、發明說明 (26)

胞使洛法史坦醇酸形成三醇酸之生物轉形作用

使集合細枝穗黴 ATCC 38009 生長在操作體積為 1.8 升之 2 升通氣醱酵槽中，其中含培養基 EN (葡萄糖 1%，蛋白胨 0.2%；牛肉萃物 0.1%；酵母萃物 0.1%；及玉米浸漬液，0.3%)，29℃，通氣速率 1.25 vvm，48-72 小時。添加洛法史坦醇銨鹽 (最終濃度 0.5 克 / 升)，以誘發水解活性。添加洛法史坦醇銨鹽 24-72 小時後，經過篩網過濾，以緩衝液 (20mM Tris, pH 8.5) 洗滌，收集醱酵物。細胞沈澱物冷凍保存至需要用時為止。

進行生物轉形作用時，使來自通氣醱酵作用之集合細枝穗黴沈澱塊 (淨重 17 克) 與 20 毫升含有自土曲黴 (*Aspergillus terreus*) 醱酵作用中收集之洛法史坦醇酸粗物質 (@ 20 克 / 升) 之碳酸鹽緩衝液溶液接觸。於 250 毫升錐形燒瓶中，27℃，160rpm 下進行生物轉形作用。17 小時後，約 60% 洛法史坦醇酸轉化成三醇酸。

另一項實驗中，使來自通氣醱酵作用之集合細枝穗黴沈澱塊與甲醇自土曲黴醱酵中所萃取之 10 毫升洛法史坦醇酸 (3.5 克 / 升) 萃物接觸。生物轉形作用混合物中之甲醇終濃度為 25%。該生物反應係於 250 毫升錐形燒瓶中，27℃ 及 160rpm 下進行。2 小時後，由薄層層析法測定顯示，使用集合細枝穗黴之生物轉形作用使幾乎 100% 洛法史坦醇酸轉化成三醇酸。

實例 2

利用集合細枝穗黴之粗均質液使洛法史坦醇酸形成三醇酸

五、發明說明 ()

之生物轉形作用

使集合細枝穗黴 ATCC 38009 生長在含有 12 毫升 EN 培養基之 250 毫升振盪燒瓶中，在 29℃ 下 3 天。添加洛法史坦醇胺鹽至 2.5 克 / 升之濃度，繼續進行醱酵 2 天。製備粗均質液時，於 3000rpm 下離心 10 分鐘收集培養物，然後以 50mM N-參(羥甲基) 甲基-2- 胺基乙磺酸 (TES) 緩衝液，pH 7.7 洗滌。培養基再離心一次，細胞質體於冰中冷卻後，於含有玻璃片與乾冰粉之研鉢中研磨。磨好之均質物相當於一個振盪燒瓶中之份量，再度懸浮在 2.0 毫升 50mM TES 緩衝液中，於 6000rpm 下離心 10 分鐘去除細胞碎片與玻璃片。使用上澄液作為粗均質液之來源，蛋白質濃度為約 0.5 毫克 / 毫升。

為了進行生物轉形作用，使一體積粗均質液與等體積洛法史坦醇酸胺鹽 (5 克 / 升) 合併，混合物於 29℃ 下培養。採用此方法，在 2 小時內，有 80-90% 洛法史坦醇酸轉化成三醇酸。

使用呈粗細胞萃取物形態之水解酶時，比活性為水解 0.11 毫莫耳洛法史坦醇酸胺鹽 / 毫克蛋白質 / 小時。

實例 3來自集合細枝穗黴細胞之洛法史坦醇水解酵素之純化法

進行洛法史坦醇酸形成三醇酸之生物轉形作用所使用之水解酵素純化法係採用下述製程，由集合細枝穗黴之均質液經過快速蛋白質液相層析法 (FPLC[®]) 使用 MONO Q[®] 陰離子交換管柱純化至幾近同質。

五、發明說明 ()

依實例 2 所述，但改用 50mM 參 (羥甲基) 胺基甲烷 (TRIS) 緩衝液 (pH 7.8) 替代 50mM TES 緩衝液，取得 6000rpm 離心後之上澄液，於 15,000rpm 下離心 20 分鐘，所得上澄液經過 0.45 μ M 濾紙過濾。取 10 毫升含有 0.3-0.5 毫克 / 毫升蛋白質之濾液，依 1.0-2.0 毫升 / 分鐘之速率加至與法馬公司 (Pharmacia) 之快速蛋白質液相層析儀 (FPLC) 系統連接之法馬 MONO Q[®] (HR5/5) 陰離子交換管柱中。

陰離子蛋白質與管柱基質結合後，利用含氯化鈉 (0-500mM) 之 20mM TRIS，pH 7.8 之線性梯度溶液專一溶離出水解酶。以 1 毫升溶離份收集溶出之蛋白質，使用洛法史坦酞胺鹽分析 (此時利用 TLC (薄層層析法) 及光密度計或 HPLC 估計水解百分比)，或利用一種可對該酵素顯示水解活性之比色受質 (丁酸鄰硝基苯酯，o-NPB) 分析。當使用後者受質時，基本上依 R.C. 勞倫斯 (Lawrence) 等人述於 J. Gen. Microbiol., (1967), 48, 401-418 之方法，於 410nm 下利用分光光度測定法監視水解反應。這二種分析法均顯示，當 NaCl 濃度達 300mM 時，可溶離出水解酶。

十二烷基硫酸鈉 - 聚丙烯醯胺 (SDS) 凝膠電泳顯示含最高量洛法史坦酞胺水解酶之溶離份含有一段顯著之條帶，分子量約 45,000 Da。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (29)

實例 4

利用來自集合細枝穗黴之純水解酶使洛法史坦醇酸形成三醇酸之生物轉形作用

使洛法史坦醇酸形成三醇酸之生物轉形作用所採用之水解酵素係經過快速蛋白質液相層析儀 (FPLC*) 使用 MONO Q[®] 陰離子交換管柱，依下文所述之製程，使集合細枝穗黴之均質液純化至同質。

依實例 2 所述，但改用 20mM 叁 (羥甲基) 胺基甲烷 (TRIS) 緩衝液替代 50mM TES 緩衝液，取得 6000rpm 離心後之上澄液，於 15,000rpm 下離心，所得上澄液經過 0.45 微米濾紙過濾。取 10 毫升含有 0.3-0.5 毫克 / 毫升蛋白質之濃液，加至與法馬公司 (Pharmacia) 之快速蛋白質液相層析儀 (FPLC) 系統連接之法馬 MONO Q[®] 陰離子交換管柱中。

陰離子蛋白質與管柱基質結合後，利用氯化鈉 (0-500mM) 之線性梯度溶液專一溶離出水解酶。以 1 毫升溶離份收集溶出之蛋白質，使用洛法史坦醇銨鹽分析 (此時利用 TLC (薄層層析法) 及光密度計或 HPLC 估計水解百分比)，或利用一種可對該酵素顯示水解活性之比色受質 (丁酸鄰硝基苯酯，o-NPB) 分析。當使用後者受質時，基本上依 R.C. 勞倫斯 (Lawrence) 等人述於 J. Gen. Microbiol., (1967), 48, 401-418 之方法，於 410nm 下利用分光光度測定法監視水解反應。這二種分析法均顯示，當 NaCl 濃度達 300mM 時，可溶離出水解酶。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 ()

十二烷基硫酸鈉 - 聚丙烯醯胺 (SDS) 凝膠電泳顯示含最高量洛法史坦甞酸水解酶之溶離份含有一段顯著之條帶，分子量約 45,000 Da。

以純酵素取代實例 2 之粗製均質物，估算以洛法史坦甞鉍鹽為受質時該水解酶之 K_m 及比活性。所得到之 K_m 值為 4.14mM，且在飽和受質之條件下發現，酵素比活性為水解 0.04 毫莫耳洛法史坦甞鉍鹽 / 毫克蛋白質 / 分鐘。

實例 5

在過量新法史坦甞鉍鹽之存在下使洛法史坦甞鉍鹽進行生物轉形作用

自實例 2 所詳述之 EN 培養基中取出 45 克冷凍之集合細枝穗黴 (ATCC 38009) 細胞 (冷凍前係先經 50mM Tris, pH 7.8 緩衝液洗液)，使用研鉢與杵與玻璃片及乾冰均質化。將所得均質之冷凍粉末移入適當試管內，並使用最少量 50mM Tris, pH 7.8 將殘留在研鉢中之物質洗入相同試管內。然後使混合物解凍，於 6000rpm 下離心 10 分鐘，去除大型細胞碎片與玻璃。

使用 6000rpm 上澄液作為水解酶粗來源，取 0.8 毫升與 0.2 毫升甲醇及 1.0 毫升新法史坦甞溶液 (18.6mM 及洛法史坦甞 (1.4mM) 鉍鹽之 50mM Tris 溶液，pH 7.8) 混合。反應混合物於 29°C 下培養，經過 1 小時，2 小時，及 17 小時後取出 0.1 毫升樣本，並以 0.9 毫升甲醇稀釋。利用 HPLC，使用華特曼 Whatman C-8 管柱作為固定相，以 60：

五、發明說明 (31)

40之乙腈：0.5%磷酸混合物為移動相分析樣本；此等條件下，新法史坦耐，洛法史坦耐及三醇銨鹽之滯留時間分別為4.4分鐘，3.8分鐘，及2.5分鐘。17小時後，洛法史坦耐高峰之面積百分比已由23.2%降至0.7%，表示轉化率超過99%。經過相同接觸時間，最初之新法史坦耐銨鹽仍有96%以上保持不變。

實例 6

繼洛法史坦耐酸進行直接甲基化作用合成新法史坦耐酸之後，殘留之洛法史坦耐酸形成三醇酸之生物轉形作用

步驟 1：洛法史坦耐鉀鹽之製法

在氮氣下製備含洛法史坦耐（純度99%；25克；60.57毫莫耳）之325毫升四氫呋喃（THF）溶液後，冷卻至5℃。以15分鐘時間添加10.01M氫氧化鋰水溶液（6.1毫升），然後加溫混合物至25℃，並攪拌熱化直到完全（99%以上）轉化成鉀鹽為止（利用HPLC分析）。

步驟 2：新法史坦耐鉀鹽之製法

使步驟1所製備之洛法史坦耐鉀鹽溶液加熱至回流，經過10吋Vigreux管柱蒸餾共500-700毫升THF，同時至少保留反應容器體積215毫升經過分子篩脫水之THF。洛法史坦耐鉀鹽溶之水份含量因此降至0.1毫克/毫升以下。以150毫升分子篩脫水之THF（水份含量低於0.1毫克水/毫升）稀釋此溶液，產生總體積365毫升。一次添加全量分子篩脫水之吡咯啉（5.81克；81.7毫莫耳；水份含量低於0.2毫克/毫升），使反應於乾冰/丙酮浴中冷卻至

五、發明說明 (32)

-78℃。隨後以一小時時間，自表面下添加117毫升1.6M正丁基鋰之己烷溶液，同時保持快速攪拌及-70℃以下之內部溫度。

使含有吡咯鋰中間物之洛法史坦醇鉀鹽溶液經由乾冰-乙腈浴回溫至-35℃，並熱化2小時。再度冷卻至-45℃後，一次添加全量13.32克分子篩脫水之甲基碘（93.0毫莫耳；密度2.89克/毫升），混合物於-30℃下（係添加甲基碘後之內部溫度）熱化30分鐘。以200毫升中止混合物反應，於分離漏斗中分離各相。下層水相加水稀釋至1250毫升之體積後，冷卻至10℃以下，使用6M鹽酸調至pH 6後，添加250毫升乙酸乙酯，再調pH至2.0（再度使用HCl）。再次使各相分離，水層再以175毫升冷（5-10℃）乙酸乙酯萃取。合併二份有機層（乙酸乙酯），以150毫升水洗滌後，最終有機相經硫酸鈉脫水（至10毫克/毫升水以下）並過濾。隨後添加112.3毫升甲醇至（425毫升）無水，25℃下過濾混合物中，然後以5分鐘時間添加1.3毫升甲醇：氫氧化銨水溶液（3:1）。混合物中接種新法史坦醇銨鹽（SAS）並熱化10分鐘後，續以1小時時間滴加35.9毫升甲醇：氫氧化銨水溶液（3:1）。混合物以2.5小時時間冷卻至-10℃，並再熱化1小時。過濾產物，以25毫升冷（0℃）甲醇洗滌，所得之白色晶體真空乾燥，產生新法史坦醇銨鹽之白色針狀物（純度87%之SAS，含有10%殘留之洛法史坦醇之銨鹽）。

步驟3：殘留之洛法史坦醇酸（呈銨鹽）形成三醇酸之

五、發明說明 (33)

生物轉形作用

採用實例 1 與 3 詳述之方法，自己生長在 EN 培養基中之 57 克菌絲體細胞純化集合細枝穗黴酯酶。採用法馬 (Pharmacia) HR 10/10 MONO Q[®] 管柱，添加 85 毫升不含細胞之粗萃物進行純化。共得到 0.89 毫克純酯酶 (含於 10 毫升體積中)，然後利用阻斷範圍在分子量 10,000 之 CENRIPRER[®] 裝置 (AMICON[®]) 進行超過濾法，濃縮至 0.175 毫克蛋白質 / 毫升。

然後使酯酶樣本與由洛法史坦醇直接甲基化製成之新法史坦醇銨鹽共同培養；蛋白質之終體積為 0.4, 4.0 與 40 微克 / 毫升，且所使用之新法史坦醇濃度為 10, 35 與 50 mM。其他改變之條件為 pH (分析 pH 7.8 與 9.5) 及甲醇濃度 (0, 10, 與 20% [v/v, 終濃度])。包含 100 mM TRIS (若反應於 pH 7.8 下進行時) 或 100 mM 甘胺酸 (pH 9.0) 緩衝反應。在下列條件下 16 小時內，殘留之洛法史坦醇酸形成三醇酸之水解率超過 90%。

<u>酵素濃度</u>	<u>新法史坦醇濃度</u>	<u>pH</u>	<u>甲醇濃度</u>
(微克 / 毫升)	(mM)		(% v/v)
4.0	10	7.8	0
4.0	10	7.8	10
4.0	10	9.5	0
4.0	10	9.5	10
4.0	10	9.5	20
4.0	35	9.5	10

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝 訂

五、發明說明 (34)

40.0	35	7.8	0
40.0	35	7.8	10
40.0	35	9.5	0
40.0	35	9.5	10
40.0	35	9.5	20

實例 7

繼洛法史坦耐酸進行直接甲基化作用合成新法史坦耐酸之後，殘留之洛法史坦耐酸形成三醇酸之生物轉形作用

步驟 1：新法史坦耐銨鹽之製法

根據實例 6，步驟 1 之製法，由 5 克洛法史坦耐開始，製備鉀鹽之 THF 溶液。使含分子篩脫水之吡咯啉（2.48 毫升；2.4 當量；29.67 毫莫耳； <0.2 毫克水 / 毫升）之 12.3 毫升分子篩脫水之 THF 溶液於乾冰 / 乙腈浴中冷卻至 -20°C 。然後以保持 -10°C 以下溫度之速率添加 1.6M 丁基鋰之己烷溶液（18.2 毫升；2.35 當量）。添加完畢後，吡咯啉鋰 / THF 溶液於 -20°C 下熱化 15 分鐘。使含洛法史坦耐鉀鹽之 THF 無水溶液於乾冰 / 乙腈冷卻槽中冷卻至 -35°C 。添加 -20°C 之吡咯啉鋰 / THF 溶液至快速攪拌之混合物中，添加之速率應使添加期間之內部溫度保持在 -30°C 以下。混合物於 -35°C 下熱化 2 小時後，冷卻至 -40°C ，一次添加全量 1.16 毫升（18.67 毫莫耳；1.5 當量）甲基碘至溶液中，此舉使混合物內部溫度上升（至約 -20°C ）；再度使內部溫度降回 -30°C 並熱化 1 小時，然後回升至 -10°C ，並熱化 30 分鐘。

五、發明說明 (35)

以 40 毫升水中止混合物反應於分離漏斗中分離各相。下層水相加水稀釋至 250 毫升之體積後，冷卻至 10℃ 以下，使用 6M 鹽酸水溶液調至 pH 6 後，添加 50 毫升乙酸乙酯，再調 pH 至 2.0 (再度使用 HCl)。再次使各相分離，水層再以 35 毫升冷 (5-10℃) 乙酸乙酯萃取。合併二份有機層 (乙酸乙酯)，以 30 毫升水洗滌後，最終有機相經硫酸鈉脫水並過濾。隨後添加 22.5 毫升甲醇至無水，25℃ 下過濾混合物中，然後以 5 分鐘時間添加 0.26 毫升甲醇：氫氧化銨水溶液 (3:1)。混合物中接種新法史坦耐銨鹽 (SAS) 並熟化 10 分鐘後，續以 1 小時時間滴加 7.2 毫升甲醇：氫氧化銨。混合物以 2.5 小時時間冷卻至 -10℃，並再熟化 1 小時。過濾產物，以 5 毫升冷 (0℃) 甲醇洗滌，所得之白色晶體真空乾燥，產生新法史坦耐銨鹽。

步驟 2：殘留之洛法史坦耐酸 (呈銨鹽) 形成三醇酸之生物轉形作用

根據實例 6，步驟 3 之製程進行生物轉形作用。

實例 8：

新法史坦耐銨鹽之內酯作用及純新法史坦耐內酯之結晶與單離

步驟 1：新法史坦耐銨鹽之內酯化作用

添加蒸餾水 (20 毫升)，冰醋酸 (40 毫升) 及丁基化羥基苯甲醚 (BHA, 50 毫克) 至氮大氣下，250 毫升 3 頸圓底燒瓶中。調整槽溫至 20-25℃，添加新法史坦耐銨鹽 (12.5 克，27.56 毫莫耳)，於 20-25℃ 下攪拌 15 分鐘或攪

五、發明說明 (36)

拌至溶解為止。添加甲磺酸 (70% , 4.35克 , 30.8毫莫耳 , 1.118 當量) , 混合物於 20-25℃ 下靜置 2 小時 , 直到內酯化反應完成 75% 以上。

依製法 A 之條件 , 利用 HPLC 測定轉化率百分比。轉化率百分比之計算法如下 :

面積 % (新法史坦耐銨鹽)

$$\frac{\text{面積 \% (新法史坦耐銨鹽)}}{\text{面積 \% (新法史坦耐銨鹽 + 新法史坦耐)}} \times 100\%$$

面積 % (新法史坦耐銨鹽 + 新法史坦耐)

步驟 2 : 純新法史坦耐之結晶與單離

在反應物內接種新法史坦耐粗物質晶種 (60毫克) , 於 20-25℃ 下熟化 0.5 小時。以 3 小時時間添加蒸餾水 (22.5毫升 , 0.13毫升 / 分鐘) , 再以 1 小時時間添加第二份蒸餾水 (35毫升 , 0.58毫升 / 分鐘) 。反應物於 20-25℃ 下熟化 1 小時後 , 滴加 28w/w % 氫氧化銨 (4.0 毫升) 處理。

反應物於 20-25℃ 下熟化 1 小時 , 過濾收集新法史坦耐粗晶體。以 2:1 蒸餾水 : 乙酸 (50毫升) , 蒸餾水 (50毫升) 及 1:1 甲醇 : 蒸餾水 (50毫升) 洗滌新法史坦耐粗物質濕塊。產物於氮氣沖刷下 , 25-30℃ 下真空乾燥一夜 , 產生新法史坦耐粗物質之白色針狀物 (10.38 克 , HPLC 分析為 98w/w %) 。

實例 9

純新法史坦耐之結晶與單離作用

添加新法史坦耐粗物質 (10克 , 23.89 毫莫耳) 及丁基

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝訂

五、發明說明 (37)

化羥基苯甲醚 (50毫克) 至氮大氣下含 126.4 毫升已脫氣之甲醇之燒瓶內。調整槽溫至 20-25℃，攪拌 15分鐘，直到固體溶解為止。溶液經過 ECOSORB C[®] 床過濾，ECOSORB C[®] 床係一種活性碳，其組成如下：水，活性碳，纖維素纖維，苯乙烯二乙烯基苯，及陰離子交換樹脂 (91.5克經甲醇 (50毫升) 洗滌之 ECOSORB C[®])，且該碳塊以 40 毫升已脫氣之甲醇洗滌。將合併之甲醇溶液移入 250 毫升之 3 頸圓底燒瓶中，並於氮大氣下加熱至 38-40℃。以 30 分鐘時間自表面下添加已脫氣之蒸餾水 (83.3 毫升，2.78 毫升 / 分鐘)，於 38-40℃ 下熟化 30 分鐘。反應物以 1 小時時間冷卻至 25℃。於 25℃ 下，以 1 小時時間自表面下添加已脫氣之蒸餾水 (83.3 毫升，1.38 毫升 / 分鐘)，並以 1 小時時間冷卻至 10-15℃。

漿物過濾，於 10℃ 下，以 50 毫升 50% 甲醇 / 蒸餾水 (v/v) 洗滌濕濾塊。產物在氮氣沖刷下，35-40℃ 下真空乾燥一夜，產生純新法史坦醇之白色針狀物 (9.49 克，HPLC 分析 = 99w/w %)。

實例 10真菌微生物之洛法史坦醇酯酶活性篩選

使下表 I 所列之菌種生長在 10 毫升 EN 培養基內 48 或 72 小時後，加至含呈銨鹽形式之洛法史坦醇 (篩選結果示於第 2 列) 或新法史坦醇 (篩選結果示於第 3 列) 之燒瓶內，最終濃度為 2.5 克 / 升。培養物繼續培養 96 小時後，利用薄層層析法分析培養液中洛法史坦醇或新法史坦醇形成三

五、發明說明 (38)

醇酸之轉化率。利用TLC板之光密度掃描定量水解程度，並與純洛法史坦甾醇銨鹽，新法史坦甾醇銨鹽及三醇酸銨鹽樣本之標準濃度移動之線條比較。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (39)

表 I

菌種名稱	ATCC	洛法史坦酞	新法史坦酞
	No.	水解%	水解%
深黃被孢黴 (<i>Mortierella isabellina</i>)	42013	11	<1
棕黑腐質黴 (<i>Humicola fuscoatra</i>)		12	3
爪甲曲黴 (<i>Aspergillus unguis</i>)		21	0
卷枝毛黴 (<i>Mucor circinelloides</i>)	1207a	2	0
皮鐮孢 (<i>Fusarium solani</i>)	12826	9	0
<i>Dechotomomyces cejpii</i>	22149	2	0
<i>Dechotomomyces cejpii</i>	42284	4	0
二異孢 (<i>Diheterospora chlamyosporia</i>)	16449	11	2
二異孢 (<i>Diheterospora chlamyosporia</i>)	18056	12	4
二異孢 (<i>Diheterospora chlamyosporia</i>)	20537	3	10
<i>Emericella unguis</i>	10073	9	2
<i>Emericella unguis</i>	12063	4	1
<i>Emericella unguis</i>	13431	4	0
<i>Emericella unguis</i>	16812	1	2
棕黑腐質黴 (<i>Humicola fuscoatra</i>)	12774	57	0
棕黑腐質黴 (<i>Humicola fuscoatra</i>)	52037	14	4
棕黑腐質黴 (<i>Humicola fuscoatra</i>)	62175	25	7
深黃被孢黴 (<i>Mortierella isabellina</i>)	36670	5	10
深黃被孢黴 (<i>Mortierella isabellina</i>)	38063	14	0
深黃被孢黴 (<i>Mortierella isabellina</i>)	44853	12	6
非洲新赤殼 (<i>Neocosmospora africana</i>)	24342	73	5

84.5.25 修正
年 月 日 補充

五、發明說明 ()

Xylogone sphaerospora	42047	48	8
產黃青黴 (Penicillium chrysogenum)	10002	9	0
棒曲黴 (Aspergillus clavatus)	1007	7	0
普通帚黴 (Scopulariopsis communis)		30	0
Gilmaniella humicola	16013	5	0
拜尼爾毛黴 (Mucor bainieri)	42642	1	0
Tricharus spiralis		2	0
螺卷毛殼 (Chaetomium cochliodes)	10195	6	0
普通帚黴 (Scopulariopsis communis)		40	0
集合細枝穗黴 (Clonostachys compactiuscula)	100		5
	38009		
	74178		
集合細枝穗黴 (Clonostachys compactiuscula)		87	3
	38009		
	74178		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(41)

實例 11

放線菌之洛法史坦醇酯酶活性篩選

使下表 II 所列之菌種生長在 10 毫升 YN 培養液 (1% 肉萃物, 0.5% 酵母萃物, 0.5% 葡萄糖, 0.6% 蛋白胨, pH 7.2) 或 10 毫升 ISP-1 培養基中 72 小時後, 加至含呈銨鹽形式之洛法史坦醇 (篩選結果示於第 2 列) 或新法史坦醇 (篩選結果示於第 3 列) 之燒瓶中, 最終濃度為 2.5 克 / 升。使培養物繼續培養 96 小時後, 利用薄層層析法分析培養液中洛法史坦醇或新法史坦醇形成三醇酸之轉化率。利用 TLC 板之光密度掃描定量水解程度。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂

五、發明說明(42)

表 II

菌種名稱	ATCC	洛法史坦酞	新法史坦酞
	No.	水解%	水解%
白淺灰鏈黴菌(<i>Streptomyces albogriscolus</i>)		6	3
	*NRRL No. 5748		
寡生孢鏈黴菌(<i>Streptomyces paucisporogenes</i>)		13	0
	25482		
吸水鏈黴菌(<i>Streptomyces hygroscopius</i>)		25	5
	21722		
綠色產色鏈黴菌(<i>Streptomyces viridochromogenes</i>)		7	0
	21724		
排孢游動單孢菌(<i>Planomonospora parontospora</i>)		7	0
	23864	2	0
<i>Kibdelosporangium aridum</i>		18	0
	*NRRL No. 12647		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (43)

製品A

乾燥新法史坦耐粗物質之HPLC重量百分比分析

正確稱取30毫升標準物或樣本至100毫升定量瓶中，並以60:40乙腈:0.1M KH_2PO_4 (pH=4.0) 稀釋至標線。

管柱: PERKIN-ELMER[®] C₁₈, 長3公分, 粒子大小3微米, 逆相管柱

溫度: 25℃

流速: 3.0 毫升 / 分鐘

偵測: UV 238nm

注入: 5 微升

移動相: 50:50 乙腈: 0.1% H_3PO_4 (aq)

滯留時間:

時間 (分鐘)	鑑 定
1.28	1. 新法史坦耐銨鹽
2.20	2. 洛法史坦耐及差向異構物
3.44	3. 新法史坦耐粗物質

重量% 之計算式如下:

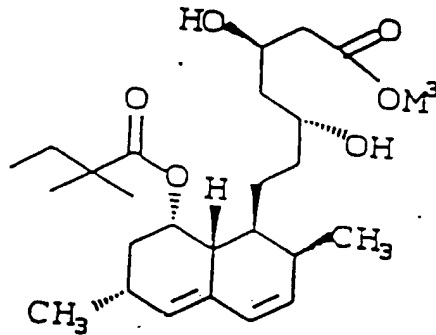
$$\frac{(\text{樣本之平均感應因數}) \times 100}{(\text{標準物之平均感應因數})} = \text{重量} \%$$

六、申請專利範圍

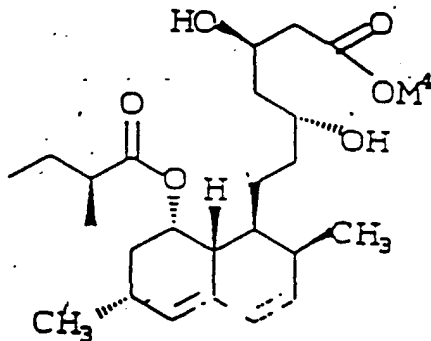
修正
年月日
89. 1. 17 補充

公告本

1. 一種自含有式(1)雜質之混合物中分離式(4)化合物之方法，



(1) 洛法史坦酞酸 / 鹽 (Lovastatin Acid / Salt)



(4) 新法史坦酞酸 / 鹽 (Simvastatin Acid / Salt)

係包括：

以一種可選擇性裂解洛法史坦酞 2-甲基丁醯氧基側鏈之微生物培養物，或以來自該微生物培養物之水解酶處理該等化合物之混合物，使式(1)化合物轉化成式(2)化合物，

(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: 新法史坦醇(SIMVASTATIN)之生化純化

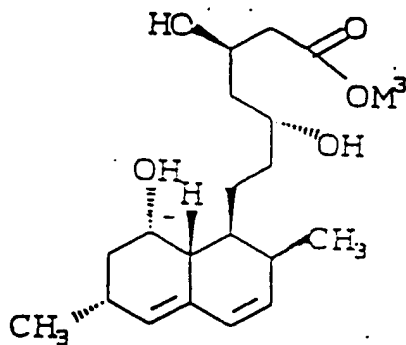
新法史坦醇(simvastatin)之合成法中,由洛法史坦醇(lovastatin)直接進行甲基化作用,殘留之洛法史坦醇進行選擇性水解作用,以一種可以水解2-甲基-丁醯氧基側鏈之細菌或真菌或此類微生物之突變種或來自該等微生物之不含細胞之萃物或來自該等微生物之水解酶等處理洛法史坦醇酸或其鹽類,產生7-[1',2',6',7',8',8a'(R)-六氫-2'(S),6'(R)-二甲基-8'(S)-羥基-1'(S)萘基]-3(R),5(R)-二羥基庚酸,三醇酸,或三醇鹽,該等物質不論在進行內酯化作用形成內酯形式之前或之後,均很容易與新法史坦醇分離。此製法產生高收量及高純度之新法史坦醇。

英文發明摘要(發明之名稱: BIOCHEMICAL PURIFICATION OF SIMVASTATIN)

In the synthesis of simvastatin by direct methylation of lovastatin, selective hydrolysis of residual lovastatin, lovastatin acid or a salt thereof by treatment with a bacterium or fungus capable of hydrolyzing the 2-methyl-butryloxy side chain or a mutant of such microbe or a cell-free extract derived therefrom, or a hydrolase derived therefrom yields 7-[1',2',6',7',8',8a'(R)-hexahydro-2'(S),6'(R)-dimethyl-8'(S)-hydroxy-1'(S)naphthyl]-3(R),5(R)-dihydroxy-heptanoic acid, the triol acid, or triol salt which can be easily separated from simvastatin, either before or after lactonization to the lactone form. This process produces simvastatin of high yield and purity.

附註: 本案已向 美 國(地區)申請專利、申請日期: 1992.2.7 案號: 832,545

六、申請專利範圍



(2) 三醇酸 / 鹽

並分離及單離出呈開環酸，鹽或內酯型之式(4)與式

(2) 化合物，式中：

M³ 與 M⁴ 分別為：

(a) H，

(b) Li，Na 或 K，

(c) Ca 或 Mg，

(d) Al，Fe，Zn，Cu，Ni，或 Co，

(e) 精胺酸，離胺酸， α ， β -二胺基丁酸，或鳥胺酸，

(f) 三級辛胺，二苳胺，乙二胺，嗎啉，或叁(羥甲基)-胺基甲烷，或

(g) NH⁴；

其中微生物培養物係衍生自棕黑腐質黴 (*Humicola fuscoatra*)，非洲新赤殼 (*Neocosmospora africana*) ATCC No. 24342, *Xylogone sphaerospora* ATCC No. 42047 及集合細枝穗黴

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

(*Clonostachys compactiuscula*)。

2. 根據申請專利範圍第2項之方法，其中該真菌係選自下列菌屬：
 - (a) 集合細枝穗黴 (*Clonostachys compactiuscula*) ATCC Nos. 38009 及 74178，
 - (b) 棕黑腐質黴 (*Humicola fuscoatar*)，ATCC Nos. 12774, 52037 及 62175，
 - (c) 非洲新赤殼 (*Neocosmospora africana*) ATCC No. 24342，及
 - (d) *Xylogone sphaerospora* ATCC No. 42047。
3. 根據申請專利範圍第2項之方法，其中該真菌為集合細枝穗黴 (*Clonostachys compactiuscula* ATCC 74178或38009) 或其一種突變種。
4. 根據申請專利範圍第2項之方法，其中係以來自其培養物中之純化水解酶處理該混合物。
5. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中式(4)化合物與式(1)雜質之混合物係由式(1)化合物直接進行甲基化作用產生，且其中係利用 HPLC 或結晶法分離式(4)化合物，並回收。
6. 根據申請專利範圍第5項之方法，其中式(1)化合物或其一種鹽之直接甲基化作用係包括以 CH_3X 及 $\text{M}_1^+ \text{NR}^1\text{R}^2-$ 處理，其中：

X 為

 - a) 氯，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

b) 溴，或

c) 碘，

 M_1^+ 為a) Li^+ ，b) Na^+ ，或c) K^+ ；且 R^1 與 R^2 a) 分別為 C_{1-3} 烷基，或b) R^1 及 R^2 與所附接之氮共同形成一個 5 或 6 員雜環。

7. 根據申請專利範圍第 6 項之方法，其中 X 為碘，且 $R^1 R^2$ 與所附接之氮共同形成吡咯啉，且 M^3 與 M^4 為 NH_4 或 K。
8. 根據申請專利範圍第 5 項之方法，其中係利用結晶法分離與單離式 (4) 產物。
9. 根據申請專利範圍第 5 項之方法，其中係利用 HPLC 分離產物。
10. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中式 (2) 與 (4) 化合物之分離法與單離法包括：
 - (a) 以乙酸異丙酯及甲磺酸處理，形成式 (3) 與 (5) 之內酯，且
 - (b) 利用 HPLC 或結晶法分離及純化式 (3) 與 (5) 內酯，且
 - (c) 回收呈封環內酯型之式 (3) 與 (5) 產物，

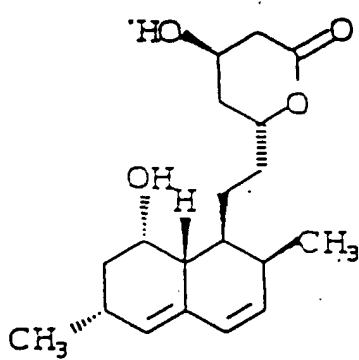
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

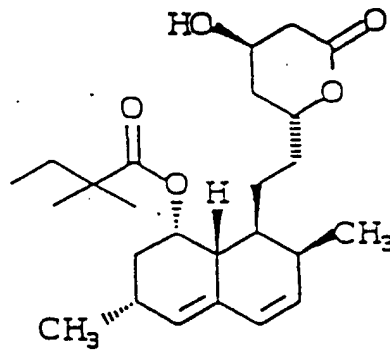
訂

線

六、申請專利範圍



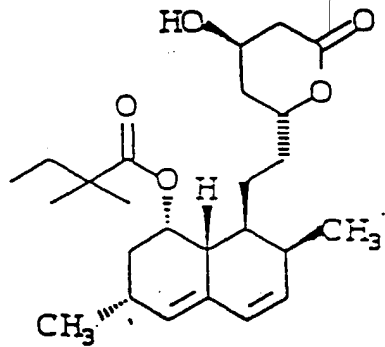
(3) 二醇內酯



(5) 新法史坦甾

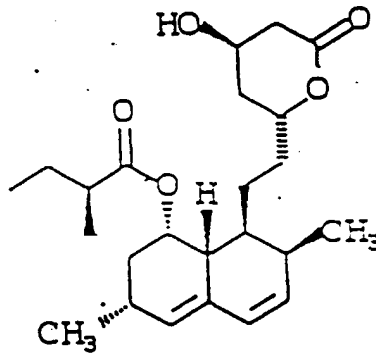
11. 根據申請專利範圍第1項之方法，係製備可回收量之式

(5) 化合物或其一種鹽，



(5) 新法史坦甾

其包括使式(6)化合物直接進行甲基化作用



六、申請專利範圍

(6) 洛法史坦酐

係使式(6)內酯轉化成開環酸，然後以 CH_3X 及 $\text{M}_1^+ \text{NR}^1\text{R}^{2-}$ 處理，其中：

X 為

- a) 氯，
- b) 溴，或
- c) 碘，

M_1^+ 為

- a) Li^+ ，
- b) Na^+ ，或
- c) K^+ ；且

R^1 與 R^2

- a) 分別為 C_{1-3} 烷基，或
- b) R^1 及 R^2 與所附接之氮共同形成一個 5 或 6 員雜環；

然後以一種可選擇性裂解洛法史坦酐 2-甲基丁醯氧基側鏈之微生物培養物或來自該微生物培養物之水解酶處理，然後進行內酯化作用，利用 HPLC 或結晶法分離，並回收式(5)產物。

12. 根據申請專利範圍第 11 項之方法，其中 X 為碘，且 R^1R^2 與所附接之氮共同形成吡咯啉，且 M^3 與 M^4 為 NH_4 或 K。
13. 根據申請專利範圍第 11 項之方法，其中係利用結晶法單離及分離式(4)產物。
14. 根據申請專利範圍第 12 項之方法，其中係利用 HPLC 分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

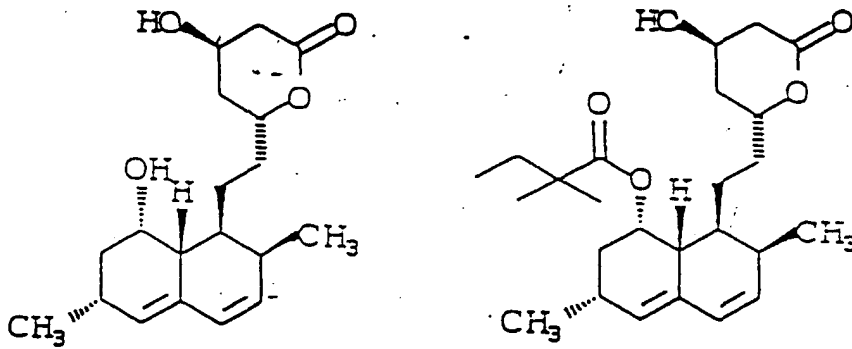
紙

六、申請專利範圍

離產物。

15. 根據申請專利範圍第14項之方法，其中係以集合細枝穗微 (*Clonostachys compactiuscula* ATCC 74178或38009) 之純水解酶處理混合物。

16. 根據申請專利範圍第14項之方法，其中該內酯化作用包括以乙酸異丙酯及甲磺酸處理，形成式(3)與(5)內酯



(3) 二醇內酯 (5) 新法史坦甾。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線