

申請日期	87 年 7 月 10 日
案 號	87111260
類 別	C12p35/06

(以上各欄由本局填註)

公告本

565613

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	醱酵產製去醯化頭芽孢素之方法
	英 文	Process for the fermentative production of deacylated cephalosporins
二、發明 創作人	姓 名	(1) 瑪汀恩·尼波爾 Nieboer, Maarten (2) 艾克·隆 de Vroom, Erik (3) 喬漢尼斯·盧登堡 Lugtenburg, Johannis
	國 籍	(1) 荷蘭 (2) 荷蘭 (3) 荷蘭
	住、居所	(1) 荷蘭博克安羅登瑞·哥伯辛戈 1 1 2 號 Gerberasingel 112, 2651 XZ Berkel En Rodenrijs, the Netherlands (2) 荷蘭林登梅史崔夫克路六十五號 De Meij van Streefkerkstraat 65, 2313 JM Leiden, The Netherlands (3) 荷蘭歐古斯特吉斯特·雷恩凡奧波吉斯特路 2 號 Laan van Oud Poelgeest 22, 2341 NK Oegstgeest, The Netherlands
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 吉斯特布勞凱斯有限公司 Gist-Brocades B.V.
	國 籍	(1) 荷蘭
	住、居所 (事務所)	(1) 荷蘭台夫特瓦德林茲街 1 號 Wateringseweg 1, PO-Box 1, 2600 MA Delft, The Netherlands
	代 表 人 姓 名	(1) 威廉·波爾 De Boer, Willem Roelf

裝

訂

線

申請日期	87 年 7 月 10 日
案 號	87111260
類 別	

A4

C4

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	(4) 答克·史契伯 Schipper, Dirk (5) 安德納斯·沃勒瑞特 Vollebregt, Adrianus Wilhelmus Herma (6) 洛夫·包凡格 Bovenberg, Roelof Ary Lans
	國 籍	(4) 荷蘭 (5) 荷蘭 (6) 荷蘭 (4) 荷蘭台夫特奧史汀格 205 號 Oostsingel 205, 2612 HL Delft, The Netherlands
	住、居所	(5) 荷蘭 WZ 納德維克二六七一·貝洛克羅十三號 Bereklaauw 13, 2671 WZ Naaldwijk, The Netherlands
		(6) 荷蘭鹿特丹果芬唯格一二一號 's-Gravenweg 121, 3062 ZD Rotterdam, The Netherlands
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝

訂

線

五、發明說明(1)

發明領域

本發明係關於醱酵產製 N - 去鹽化頭芽孢素化合物 (諸如 7 - A D C A) 之領域。

發明背景

β - 內醯胺抗生素構成最重要之抗生素化合物族群，其具有臨床使用上之長久歷史。於該族群中，著名者係為青黴素和頭芽孢素。該等化合物於自然狀態下係分別由絲狀真菌產黃青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 和產黃枝頂孢霉 (*Acremonium chrysogenum*) 所產製。

利用古典菌種改良技術所產生之結果是，於過去的數十年間，產黃青霉和產黃枝頂孢霉所產製之抗生素量顯著地增加。藉由對產生青黴素和頭芽孢素之生合成途徑的漸進了解以及利用重組 D N A 技術之優點，已獲致改良生產菌株之新工具並使活體內衍生化該等化合物成為可能。

大多數涉及 β - 內醯胺生合成之酶係已被鑑定且其對應基因已被選殖 (參閱 Ingolia and Queener, Med. Res. Rev. 9 (1989), 245 - 264 (biosynthesis route and enzymes) 和 Aharonowitz, Cohen and Martin, Ann. Rev. Microbiol. 46 (1992), 461 - 495 (Gene Cloning) 文獻)。

產黃青霉中青黴素之生合成的頭 2 個步驟係縮合 3 個胺基酸 (L - 5 - 胺基 - 5 - 羧基戊酸 (L - α - 胺基己二酸) (A) , L - 半胱氨酸 (C) 及 L - 纈氨酸 (V)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(2)

) 生成三肽 L L D - A C V , 隨後環化該三肽以生成異青黴素 N 。該化合物含有典型 β - 內醯胺結構。

於產製青黴素、頭孢霉素及頭芽孢素之真菌和細胞中，可共同地觀察到該青黴素生成合之頭 2 個步驟。

第 3 個步驟係涉及藉由醯基轉移酶 (A T) 之作用，以 L - 5 - 胺基 - 5 - 羧基戊酸替換異青黴素 N 之親水性 D - α - 胺基己二酸側鏈。如述於 E P - A - 0 4 4 8 1 8 0 , 由 A T 調控之酶催化替換反應係發生於胞器，微體，中。

於產製頭芽孢素之微生物中，第 3 個步驟係藉由利用表異構酶使異青黴素 N 異構化以生成青黴素 N ，隨後藉由擴張酶之作用使青黴素 5 員環結構特徵擴張為頭芽孢素之 6 員環結構。

工業上重要之僅由醱酵直接產製之青黴素係為青黴素 V 和青黴素 G ，其產製係藉由於產黃青霉之醱酵期間，分別添加疏水性側鏈前驅物苯氧基醋酸或苯基醋酸，以苯氧基醋酸或苯基醋酸替代天然 β - 內醯胺之側鏈。

頭芽孢素於價格上係較青黴素昂貴。理由之一係某些頭芽孢素（例如，頭孢力新）係自青黴素經由許多化學轉化反應所生成。現今最重要之起始物頭芽孢素 C 於任何 p H 下係極易溶於水，因此意謂著須使用麻煩且昂貴之管柱技術以進行耗時且花費不貲之分離步驟。藉由該方式所獲致之頭芽孢素 C 必須經由許多化學和酶催化之轉化反應以轉化成為治療上所使用之頭芽孢素。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (3)

現今，產製頭芽孢素中間產物 7 - A D C A 係藉由青黴素 G 之化學衍生化反應。產製 7 - A D C A 之必須化學步驟係包括擴張 5 員青黴素環結構以成為 6 員頭芽孢素環結構。

近來，已揭示獲致 7 - A D C A 之醱酵製法。

E P - A - 0 5 3 2 3 4 1 使用己二酸鹽 (5 - 羧基戊酸鹽) 原料以生成具有己二醯側鏈之青黴素衍生物，即己二醯 - 6 - 胺基青黴酸。此併入作用係基於經證實醯基轉移酶具有廣泛之基質專一性 (Behrens et al., J. Biol. Chem. 175 (1948), 751 - 809 ; Cole, Process. Biochem. 1 (1966), 334 - 338 ; Balllio et al., Nature 185 (1960), 97 - 99)。此外，當己二酸鹽餵入表現擴張酶之重組產黃青霉菌株時，該己二醯 - 6 - A P A 係擴張成為其對應之頭芽孢素衍生素。最終，除去該己二醯側鏈以生成最終產物之 7 - A D C A。

E P - A - 0 5 4 0 2 1 0 描述製備 7 - A C A 之類似方法，其係包括將 A D C A 環之 3 - 甲基轉化為 A C A 之 3 - 乙醯氧基甲基之額外步驟。

W O 95 / 04148 和 W O 95 / 04149 揭示將某些具有鏈長為 6 或 7 個原子之含有硫基之二羧酸的原料餵入表現擴張酶之產黃青霉菌株中，以將該前驅物併入青黴素骨架中，且經隨後之擴張以生成對應之 7 - A D C A 衍生物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(4)

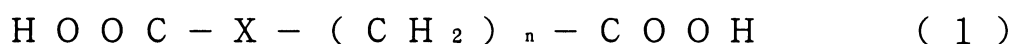
通常，提供青黴素 N 和頭芽孢素生合成間之重要連結的擴張酶被認為具有窄小之專一性 (Maeat al., Enzyme and Microbial Technology (1995) 17: 231-234; Baldwin et al., J. Chem. Soc. Chem. Commun. 374-375, 1987)，以防止利用非天然之側鏈催化青黴素 N 之氧化環擴張作用成為可能。

令人驚訝地，現今發現餵入具有鏈長超過 7 個碳原子之二羧酸的原料，將產製出併有側鏈長為 6 或 7 個原子之 β -內醯胺衍生物。

發明摘要

本發明係揭示一種產製 N-去醯化頭芽孢素化合物之方法，其係包含下述之步驟：

* 於式 (1) 側鏈前驅物



其中

n 係至少為 2 之偶數，且

X 係 $(\text{CH}_2)_p - \text{A} - (\text{CH}_2)_q$ ，其中

p 和 q 分別為 0、1、2、3 或 4，且

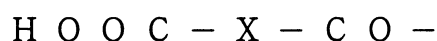
A 係 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 $\text{C}\equiv\text{C}$ 、 CHB 、 $\text{C}=\text{O}$ 、 O 、 S 、 NH ，該氮可選擇地為經取代或該硫可選擇地被氧化，且 B 係氫、鹵、 C_{1-3} 烷氧基、羥基、或可選擇經

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (7)

胺之存在下，醱酵該微生物菌株產生醯基 - 7 - 頭芽孢素衍生物，其中該醯基具有式 (2) 之結構



其中 X 係如上述所定義者。

為獲致具有醯基鏈長分別為 6 或 7 個原子之醯基 - 7 - 頭芽孢素衍生物，當 A 係 $\text{C H} = \text{C H}$ 或 $\text{C} \equiv \text{C}$ 時，p + q 應分別為 2 或 3，或當 A 係 C H B 、 $\text{C} = \text{O}$ 、 O 、 S 、 N H ，該氮可選擇地為經取代或該硫可選擇地被氧化，且 B 係如上述所定義者時，p + q 應分別為 3 或 4。

因此，在式 (1) 前驅物化合物之存在下，醱酵能夠產製 β - 內醯胺及表現醯基轉移酶和擴張酶活性之微生物菌株，產生具有式 (2) 醯基之醯基 - 6 - A P A 衍生物，其係隨後於原位擴張生成對應之醯基 - 7 - A D C A 衍生物。換言之，式 (1) 前驅物化合物經由該微生物菌株代謝生成式 (2) 之醯基。隨後，該醯基經由醯基轉移酶調控之反應，併入 β - 內醯胺骨架中。

式 (1) 前驅物化合物之鏈長上限，即 n 的上限值，並不重要。該上限主要係取決於該微生物菌株代謝該前驅物化合物之效率。合宜地，該前驅物化合物之最長鏈長係類似於仍能被該微生物菌株代謝之脂肪酸的最長鏈長。

於本發明之體系中，所使用之二羧酸係能經醱酵產生己二醯 - 7 - A D C A 衍生物。適宜產生己二醯 - 7 -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(8)

A D C A 之二羧酸具有式 (1) 之結構，其中 n 係至少為 2 之偶數，且 X 係 $(CH_2)_p - A - (CH_2)_q$ ，其中 p 係 1，q 係 2 且 A 係 CH_2 。適宜地，該產生己二醯 - 7 - A D C A 之二羧酸係為辛二酸或癸二酸 (n 分別為 2 或 4)。

於本發明之另一體系中，所使用之二羧酸係能產生含有式 (2) 醯基中的硫基之醯基 - 7 - A D C A 衍生物。適宜產生該醯基 - 7 - A D C A 化合物之二羧酸具有式 (1) 之結構，其中 n 係至少為 2 之偶數，且 X 係 $(CH_2)_p - A - (CH_2)_q$ ，其中 A 係 S。適宜地，p 和 q 係 1、2 或 3，且 p + q 係 3 或 4。最適宜地，p 係 1 且 q 係 2，或 p 係 2 且 q 係 1 或 2。

於本發明之其他 2 個體系中，係使用產生新穎之醯基 - 7 - 頭芽孢素衍生物之二羧酸。

首先，係使用經醱酵能產生庚二醯 - 7 - A D C A 衍生物之二羧酸。適宜產生庚二醯 - 7 - A D C A 之二羧酸具有式 (1) 之結構，構中 n 係至少為 2 之偶數，且 X 係 $(CH_2)_p - A - (CH_2)_q$ ，其中 p 和 q 係為 2，且 A 係 CH_2 。適宜地，該產生庚二醯 - 7 - A D C A 之二羧酸係為壬二酸 (n 為 2)。

此外，係使用產生含有於式 (2) 醯基中不飽和鍵結之醯基 - 7 - A D C A 衍生物之二羧酸。適宜產生該醯基 - 7 - A D C A 化合物之二羧酸具有式 (1) 之結構，其中 n 係至少為 2 之偶數，且 X 係

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (9)

$(CH_2)_p - A - (CH_2)_q$ ，其中 A 係 $CH = CH$ 或 $C \equiv C$ 。適宜地，A 係 $CH = CH$ ，且 p 和 q 皆為 1。因此，後者化合物之反式異構物係最適宜的。

本發明之方法所使用之微生物菌株係為能夠產製 β -內醯胺及表現醯基轉移酶和擴張酶活性之菌株。可選擇地，該微生物菌株額外地可表現羧化酶或羧化酶和乙醯基轉移酶活性。前者菌株能夠產製醯基-7-ADCA 衍生物，而後者菌株能夠產製醯基-7-ADCA 或醯基-7-ACA 衍生物。

該微生物菌株之實例係包括具有表現擴張酶之表現匣的產製青霉素之菌株，及具有表現醯基轉移酶之表現匣的產製頭芽孢素之菌株。

所使用之擴張酶基因可源自於產黃枝頂孢霉 (*Acremonium chrysogenum*)、斑鏈霉菌 (*Streptomyces chavuligerus*)、抗生鏈霉菌 (*Streptomyces antibioticus*) 或內醯胺卡氏菌 (*Nocardia lactamdurans*)。醯基轉移酶基因可源自於產黃青霉 (*Penicillium chrysogenum*)、納地青霉 (*Penicillium nalgiovense*) 或尼地枝頂孢霉 (*Acremonium nidulans*)。

於較適宜之體系中，係使用經重組表現擴張酶之產製青霉素的真菌菌株。較適宜地，係使用曲霉屬 (*Aspergillus*) 或青霉屬 (*Penicillium*) 之真菌；最適宜地，係使用產黃青霉之菌株。產黃青霉菌株 Panlabs P 14 - B 10，D 18541 (寄存機構：CBS，寄存號碼

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (10)

: 4 5 5 - 9 5) 係為表現擴張酶之適宜宿主的實例。

建構表現擴張酶之重組菌株係為熟習此技藝之人士所習知者。可用於建構表現擴張酶之重組真菌菌株的表現匣之實例，係揭示於 E P - A - 0 5 3 2 3 4 1 , Crawford et al. 文獻 (Biotechnol. 1 3 (1 9 9 5) , 5 8 - 6 2) 及 W O 9 5 / 0 4 1 4 8 中。須小心地選取出具有足夠高表現擴張酶之轉形菌株。例如，可藉由測試產製己二醯 - 7 - A D C A 之能力 (如上述 Crawford et al. 文獻所描述者) ，選取該轉形株。

於另一較佳體系中，係使用經重組能表現醯基轉移酶之產製頭芽孢素的菌株，例如產生醯基轉移酶之產黃枝頂孢霉菌株。經重組表現醯基轉移酶之產黃枝頂孢霉菌株因本身能表現羧化酶和乙醯基轉移酶，故能產製醯基 - 7 - A C A 衍生物。

本發明進一步描述一種利用特定之溶劑自微生物醱酵之醱酵液中回收醯基 - 7 - 頭芽孢素衍生物之方法，例如自表現擴張酶之產黃青霉菌株的醱酵液中回收醯基 - 7 - A D C A 衍生物 (諸如，己二醯 - 7 - A D C A 、 庚二醯 - 7 - A D C A 、 2 - (羧基乙基硫基) 乙醯基 - 7 - A D C A 、 3 - (羧基甲基硫基) 丙醯基 - 7 - A D C A 、 及反式 β - 氫己二烯二酸基 - 7 - A D C A) 之方法。

特定地，自醱酵液回收 7 - 醯化頭芽孢素衍生物係藉由於 p H 低於約 4 . 5 下，利用與水不互溶之有機溶劑萃取醱酵液之濾液，且於 p H 介於 4 至 1 0 下，利用水再萃

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (11)

取該濾液。

過濾醱酵液，並將與水不互溶之有機溶劑加入至該濾液中。調整 pH 以自水層萃取 7 - 醯化頭芽孢素衍生物。該 pH 值必須低於 4.5；適宜地介於 1 至 4 之間，最適宜地介於 1 至 2 之間。此時，自存於醱酵液之許多其他不純物中，分離 7 - 醯化頭芽孢素衍生物。適宜的係使用較少體積之有機溶劑，例如相對於水層體積之一半體積的有機溶劑，以生成 7 - 醯基頭芽孢素衍生物之濃縮液，而達成降低容積流速之目的。第 2 種可能性是整體醱酵萃取液係於 pH 4 或低於 4 下。適宜地，係於 pH 介於 1 至 4 之間，利用與水不互溶之有機溶劑萃取醱酵液。

可使用任何不干擾該頭芽孢素分子之溶劑。適宜之溶劑係為，例如，醋酸丁酯、醋酸乙酯、甲基異丁基酮，諸如丁醇之醇類，……等。適宜的係使用 1 - 丁醇或異丁醇。

隨後，於 pH 4 至 10 下，適宜地為 6 至 9 下，利用水再萃取該 7 - 醯化頭芽孢素衍生物。再一次降低最終之體積。該回收可於溫度介於 0 至 50 °C 之間，適宜地係於周溫下進行。

本發明之方法所製備之 7 - 醯化頭芽孢素衍生物係適宜地充作中間物以進行化學合成半合成之頭芽孢素，因為藉由存在適當之醯基側鏈可適當地保護 7 - 胺基。

另外，利用適當之酶（例如，假單胞菌 SE83 醯基轉移酶），以單一步驟之酶催化反應，使 7 - 醯化頭芽孢

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (12)

素衍生物去醯化。

適宜的係使用固定化酶以利於重覆使用該酶。固定化酶和製備其顆粒之方法係已廣泛地描述於

E P - A - 0 2 2 2 4 6 2 中。水溶液之 p H 值係，例如，介於 4 至 9 之間，於該 p H 範圍內頭芽孢素之降解反應極少，且使利用該酶之所欲轉化反應可達到最適化。因此，於保持 p H 在適當範圍內（其係藉由，例如，添加無機鹼，諸如氫氧化鉀溶液，或使用陽離子交換樹脂），將酶加入至頭芽孢素水溶液中。當反應完成後，利用過濾除去該固定化酶。另外，亦可使用固定床或流化床管柱中之固定化酶，或使用溶液中之酶並藉由薄膜過濾移出產物。隨後，在與水不互溶之有機溶劑的存在下，酸化反應混合物。經將 p H 調整至約 0 . 1 至 1 . 1 5 之間後，分離相層並將水層之 p H 調整至介於 2 至 5 之間。隨後，過濾結晶之 N - 去醯化頭芽孢素。

亦可藉由此技藝已知之化學方法進行該去醯化反應，例如於低於 1 0 ° C 之溫度下藉由添加五氯化磷及隨後於周溫或低於周溫下藉由加入異丁醇，以生成偕氯代亞胺側鏈。

實施例 1

醱酵產製醯基 - 7 - A D C A

對擴張酶表現匣建構物，利用產黃青霉菌株 Panlabs

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (14)

於 25 °C 和 220 r p m 下，在 250 m l 燒瓶（以乳過濾器密封）中，培養產製培養物達 168 小時。每隔 2 天補足蒸發掉的水。

產製醱酵終了時，藉由利用離心或過濾除去菌絲，並利用 H P L C 分析醣基 - 7 - A D C A。

實施例 2

醣基 - 7 - A D C A 之產製分析

利用高效液相層析（H P L C）分析轉形青霉屬菌株之醱酵產物。該 H P L C 系統係由下列元件所組成：

P 1 0 0 0 溶劑遞送系統（T S P），自動樣品連續注入模式（Spark Holland）（注射體積 3），U V 1 5 0（T S P）可變波長偵測器（設定為 260 n m）及 P C 1 0 0 0 資料處理系統（T S P）。固定相係 Y M C 堆疊 O D S A Q 1 5 0 * 4 . 6 m m 管柱。移動相係由 84 % 磷酸鹽緩衝液，p H 6 . 0（含有 0 . 1 7 % 四丁基硫酸氨鉍）和 16 % 乙腈所組成。藉由與所預期之醣基 - 7 - A D C A 之標準曲線相比較，定量產物。

實施例 3

鑑定醣基 - 7 - A D C A 產物

依據實施例 1 之方法，在下列前驅物之一的存在下：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (15)

己二酸、辛二酸、癸二酸、庚二酸及壬二酸，培養重組表現擴張酶之產黃青霉菌株。

依據實施例 2 之方法，分析該等醱酵之醱酵產物，顯示在己二酸、辛二酸及癸二酸之存在下所進行之醱酵生成己二酸 - 7 - A D C A，而在餵入庚二酸或壬二酸之情況下，生成庚二醯 - 7 - A D C A。

當醱酵過程中使用高濃度之辛二酸時（以 2 . 0 % 取代 0 . 5 % ），於己二酸 - 7 - A D C A 之後可偵測到少量但重要之辛二酸 - 7 - A D C A。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

四、中文發明摘要(發明之名稱：醱酵產製去醯化頭芽孢素之方法)
本發明係揭示一種產製 N - 去醯化頭芽孢素化合物之方法，其係經由醱酵產製其 7 - 醯化對應物。

英文發明摘要(發明之名稱：Process for the fermentative production
of deacylated cephalosporins)

The present invention discloses a process for the production of N-deacylated cephalosporin compounds via the fermentative production of their 7-acylated counterparts.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：

大 類：

I P C 分類：

A6

B6

92.9.26
年 月 日
修正
補充

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期：

案號：

，☐有 ☐無主張優先權

歐洲

1997 年 4 月 22 日 97 201196.9

☒無主張優先權

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

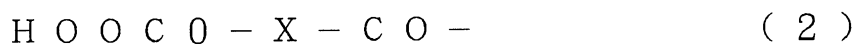
訂

線

五、發明說明(5)

取代之甲基，唯其當 A 係 $CH=CH$ 或 $C\equiv C$ 時， $p+q$ 應為 2 或 3，或當 A 係 CHB 、 $C=O$ 、 O 、 S 或 NH 時， $p+q$ 應為 3 或 4，

或其鹽、酯或醯胺之存在下，醱酵能夠產製 β -內醯胺及表現醯基轉移酶和擴張酶活性，以及可選擇地乙醯基轉移酶及／或羧化酶活性之微生物菌株，該側鏈前驅物係生成醯基-6-APA 衍生物，該醯基具有式(2)之結構



其中 X 係如上述所定義者，

該醯基-6-APA 衍生物係於原位擴張成對應之醯基-7-ADCA 衍生物，且可選擇地進一步經反應成為醯基-7-ADAC 或醯基-7-ACA 衍生物，

* 自醱酵液回收醯基-7-頭芽孢素衍生物，

* 去醯化該醯基-7-頭芽孢素衍生物，及

* 回收結晶之 7-頭芽孢素化合物。

發明詳述

本發明係揭示一種產製 N-去醯化頭芽孢素化合物(7-ADCA、7-ADAC 或 7-ACA)之方法，其係經由醱酵產製其醯化對應物，藉由餵入新穎之側鏈前驅物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

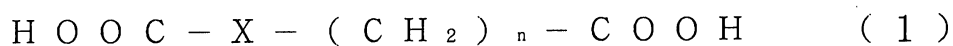
訂

五、發明說明(6)

令人驚訝地，本發明顯示在具有鏈長超過 7 個原子之二羧酸的存在下，醃酵能夠產製 β -內醃胺及表現醃基轉移酶和擴張酶活性之微生物菌株，產生併入鏈長分別為 6 或 7 個原子之醃基的醃基 - 7 - A D C A。

依據本發明，藉由利用能夠產製 β -內醃胺及表現醃基轉移酶和擴張酶活性之微生物菌株，且該微生物菌株能額外地分別表現羥化酶或羥化酶和乙醃基轉移酶活性，可產製非醃基 - 7 - A D C A 之額外的 7 - 醃化頭芽孢素衍生物，即分別為醃基 - 7 - A D A C 或醃基 - 7 - A C A。

本發明之方法中所使用之二羧酸具有式 (1) 之結構



其中

n 係至少為 2 之偶數，且

X 係 $(\text{C H}_2)_p - \text{A} - (\text{C H}_2)_q$ ，其中

p 和 q 分別為 0、1、2、3 或 4，唯其 $p + q = 2$ 、3 或 4，且

A 係 $\text{C H} = \text{C H}$ 、 $\text{C} \equiv \text{C}$ 、 C H B 、 $\text{C} = \text{O}$ 、 O 、 S 、 N H ，該氮可選擇地為經取代或該硫可選擇地被氧化，且 B 係氫、鹵、 C_{1-3} 烷氧基、羥基或可選擇經取代之甲基。

依據本發明，在式 (1) 側鏈前驅物或其鹽、酯或醃

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (13)

P 1 4 - B 1 0 (寄存機構 : C B S , 寄存日期 : 1995 年 6 月 2 日 , 寄存號碼 : 4 5 5 . 9 5) 充作宿主細胞。

所使用之表現匣 (含有擴張酶基因 , 經由產黃青霉 I P N S 基因轉錄和轉譯調節訊號) 係描述於 Crawford et al. 文獻 (如上述) 中。轉形和培養條件亦描述於 Crawford et al. 文獻 (如上述) 中。純化轉形株並藉由測試其產製己二醯 - 7 - A D C A 之能力分析轉形株之擴張酶的表現 (描述於如上述之 Crawford et al. 文獻中)。

將產製醯基 - 7 - A D C A 轉形株以 2 . 1 0 6 分生孢子 / ml 之方式接種於培養基 (組成 (g / l) 為葡萄糖 , 3 0 ; Pharmamedia (棉花種子粉) , 1 0 ; 玉米漿固物 , 2 0 ; (N H ₄) ₂ S O ₄ , 2 0 ; C a C O ₃ , 5 ; K H ₂ P O ₄ , 0 . 5 ; 乳糖 1 0 ; 酵母抽出物 , 1 0 ; 滅菌前之 p H 為 5 . 6) 中。

於 2 5 ° C 和 2 2 0 r p m 下 , 培養種培養物 (2 0 ml , 於 2 5 0 ml 燒瓶 (以棉花栓密封) 中) 。經 4 8 小時後 , 取出 1 ml 以接種至 1 5 m l 之產製培養基 (組成 (g / l) 為 K H ₂ P O ₄ , 0 . 5 ; K ₂ S O ₄ , 5 ; (N H ₄) ₂ S O ₄ , 1 7 . 5 ; 乳糖 , 1 4 0 ; Pharmamedia , 2 0 ; C a C O ₃ , 1 0 ; 豬油 , 1 0 ; 滅菌前之 p H 6 . 6) 中。

經接種種培養物後 , 將 2 0 % 所選擇之前驅物的貯存溶液 (利用 K O H 將 p H 調整至 6 . 5) 加入至醱酵液中 , 使其最終濃度為 0 . 5 % 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

附件 4(a): 第 87111260 號專利申請案

修正後無劃線之中文申請專利範圍替換本

民國 92 年 9 月 26 日修正

1. 一種產製 N-去醯化 7-頭芽孢素化合物之方法，其係包含下述之步驟：

* 於作為側鏈前驅物之未經取代之 C₇₋₁₂ 二羧酸或其鹽、酯或醯胺之存在下，醱酵能夠產製 β-內醯胺並表現醯基轉移酶和擴張酶活性，以及可選擇地乙醯基轉移酶及／或羧化酶活性之微生物菌株，該側鏈前驅物係生成醯基-6-A P A 衍生物，該醯基-6-A P A 衍生物係於原位擴張成對應之醯基-7-A D C A 衍生物，

* 自醱酵液回收醯基-7-頭芽孢素衍生物，

* 去醯化該醯基-7-頭芽孢素衍生物以得到 N-去醯化 7-頭芽孢素化合物，及

* 回收結晶之 N-去醯化 7-頭芽孢素化合物。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該側鏈前驅物係辛二酸或癸二酸。

3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該側鏈前驅物係壬二酸。

4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之方法，其中該微生物菌株係青黴素產製菌，具有表現擴張酶之表現匣。

5. 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該青黴素產製菌係產黃青霉 (Penicillium chrysogenum)。

(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

6 . 如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該結晶之頭芽孢素化合物係 7 - A D C A 。

7 . 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之方法，其中該微生物菌株係頭芽孢素產製菌，具有表現醯基轉移酶之表現匣。

8 . 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該頭芽孢素產製菌係產黃枝頂孢霉 (*Acremonium chrysogenum*) 。

9 . 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該結晶之頭芽孢素化合物係 7 - A C A 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線