

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： P4111638

※ 申請日期： P4.4.13 ※IPC 分類： C12P 7/40 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

脂族二腈變為氰羧酸之立體選擇性生物轉換

STEREOSELECTIVE BIOCONVERSION OF ALIPHATIC DINITRILES INTO CYANO
CARBOXYLIC ACIDS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

輝瑞產品公司/PFIZER PRODUCTS INC.

代表人：(中文/英文)

伍德 大衛 J./WOOD, DAVID JOHN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國康乃狄格州格羅頓市東方角路/Eastern Point Road, Groton, CT 06340, USA

國 籍：(中文/英文)

美國/USA

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 布恩斯 麥克 P./BURNS, MICHAEL PAUL

2. 威佛 賈斯汀 K./WEAVER, JUSTIN KAINE

3. 王文/WONG, JOHN WING

國 籍：(中文/英文)

1. 2. 美國/USA

3. 加拿大/Canada

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國; 2004,04,14; 60/562,133

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明係關於一種經選定之脂族二腈進行區域選擇性
5 與立體選擇性轉化成為對應氰基羧酸之新穎生物催化方
法。特別，本發明提供2-異丁基-丁二腈轉化成為(S)-3-氰基
-5-甲基己酸之方法，後者為合成(S)-3-(胺基甲基)-5-甲基己
酸(普加巴林(pregabalin))之有用中間物。普加巴林可用於治
療若干腦部疾病，例如普加巴林可用於治療與預防癲癇發
10 作病症、疼痛及精神病症。因普加巴林可有效改善腦功能，
因此也可用於老年病人之治療。

【先前技術】

發明背景

有機腈類藉酶水解成為對應羧酸類及醯胺類，提供寬
15 廣多種有用化合物之重要替代合成方法。習知腈類以化學
水解成為對應羧酸類及醯胺類典型係使用強酸或強鹼催化
劑於高反應溫度進行。因此該水解反應與含有敏感官能基
之化合物不相容。此外，化學水解之選擇性不良，結果可
能導致非期望之副產物以及大量無機鹽類。相反地，酶催
20 化腈水解係於溫和條件(中性pH，30°C)下進行，提供高度
化學選擇性、區域選擇性及立體選擇性之可能。另一優點
為可避免生成副產物無機鹽類。

最佳已知之腈轉化酶之產業應用係使用得自玫瑰色紅
球菌(*Rhodococcus rhodochrous*) J1之腈水解酶而製造丙烯

醯胺(T. Nagasawa等人, Tibtech., 1992, vol. 10, 402-408) 及
菸鹼醯胺(T. Nagasawa等人, Appl. Environ. Microbiol., 1998,
vol 54, 1766-1769)。若干晚近綜論(L. Martinková等人, 流
行有機化學, 2003, vol. 7, 1279-1295及D. Cowan等人,
5 Extremophiles, 1998, vol., 2, 207-216)說明腓轉化酶之生物
化學以及可能之產物應用性。

酵素催化之腓水解係藉腓酶, 腓酶將腓轉成對應之羧
酸, 以及藉腓水解酶催化, 該酶將腓轉成對應之醯胺類。
醯胺酶將醯胺催化成為對應之羧酸, 醯胺酶可組合腓水解
10 酶用來將腓轉變成羧酸。

使用腓酶酵素來由對應之腓製備羧酸係揭示於WO
01/072856。以交聯將酶結合入聚合物基體可提供具有改良
之物理完好及生物化學完好之催化劑。

使用生物催化劑由脂族 α 、 ω -二腓類進行區域選擇性
15 製備 ω 腓羧酸係揭示於美國專利第5,814,508號。例如具有
腓酶活性之催化劑可用於將2-甲基戊二腓催化成為4-氰基
戊酸。

K. Yamamoto等人發酵生物工程期刊, 1992, vol. 73,
125-129說明使用具有腓水解酶及醯胺酶活性二者之微生
20 物細胞來將反-1,4-二氰基環己烷轉成反-4-氰基環己烷羧
酸。

曾經對一系列脂族 α 、 ω -二腓化合物, 報告使用具有
脂族腓酶活性或腓水解酶與醯胺酶活性組合之微生物細
胞, 對二腓類進行區域選擇性生物催化轉化成為經氰基取

代之羧酸(J.E. Gavagan等人, J. Org. Chem., 1998, vol. 63, 4792-4801)。

已經說明脛之立體選擇性酶催化轉化作用，來製備富含一種對映異構物之對掌性羧酸類及醯胺類(M Wieser等人, 立體選擇性生物催化章節, Marcel Dekker Inc.: 紐約, 2000, 461-486)。得自糞產鹼菌(*Alcaligenes faecalis*) ATCC 8750之立體選擇性脛酶酵素用來由外消旋扁桃脛製備(R)-扁桃酸(K. Yamamoto等人, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, vol. 57, 3028-3032)。得自玫瑰色紅球菌NCIMB 11216之脛酶偏好水解2-甲基己脛之外消旋混合物中之(+)-2-甲基己脛，而留下(+)-2-甲基己脛未反應(M. Gradley等人, 生物技術函件, 1994, vol. 16, 41-46)。美國專利第5,593,871號揭示使用含有立體選擇性脛水解酶之微生物，由脛類製備富含一種對映異構物之2-烷酸醯胺類之方法。對映異構純質之 α -胺基酸類及醯胺類可使用含有立體選擇性脛水解酶及立體選擇性醯胺酶之紅球菌屬(*Rhodococcus* sp.) AJ270，而由外消旋 α -芳基取代之及經 α -烷基取代之甘胺酸脛類製備(M.-C. Wang等人, *J. Org. Chem.*, 2002, vol. 67, 6542)。前述參考文獻全文以引用方式併入此處。

外消旋普加巴林之治療價值，特別其用作為抗驚厥劑之功效發現主要係歸因於(S)-對映異構物。為了提供具有成本效益之普加巴林藥物治療，曾經研究多種合成富含(S)-異構物化合物之合成途徑。舉例言之，非對稱性氫化適當經氫基取代之烯烴，接著還原氫基成為對應之胺，可獲得

實質富含(S)-對應異構物之普加巴林(美國專利案申請公告案第2003/0212290號)。

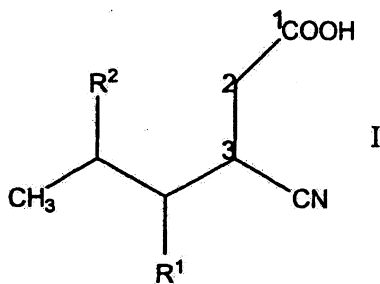
普加巴林、其衍生物及類似物藉純粹化學方法之合成係揭示於美國專利案6,642,398；6,635,673；及6,046,353。

5 【發明內容】

發明概要

於本發明方法，使用具有脛酶活性之酵素催化劑，達成脂族二脛類之區域選擇性及立體選擇性之生物催化轉化為氰基羧酸類。

10 本發明係關於一種製備式I化合物之(S)-對映異構物之新穎方法：



其中C3具有(S)組態；

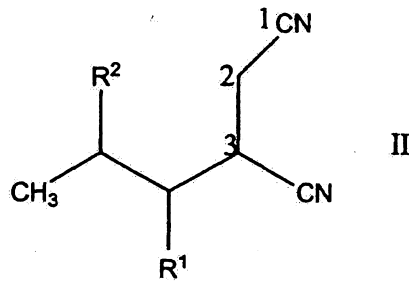
R^1 為氫、(C₁-C₆)烷基或苯基；及

15 R^2 為(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₃-C₈)環烷基、-O(C₁-C₆)烷基、-CH₂-CH₂-O-(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基-OH、-苯基-(C₁-C₆)烷基-OH、-苯基-(C₁-C₆)烷基、苯基或經取代之苯基；

但當 R^2 為甲基時， R^1 為氫、(C₁-C₆)烷基、或苯基；

20 該方法包含下列步驟：

(1a) 式II化合物：



與具有腈酶活性之酶催化劑於反應介質接觸；以及

(1b) 由該反應介質回收式I化合物之(S)-異構物；以及選擇性地回收未經改變之式II化合物之(R)-異構物。

- 5 式I化合物可用於合成具有藥學活性之化合物，諸如普加巴林。

本發明之較佳具體例中， R^1 及 R^2 各自分別為氫或 C_1 至 C_3 烷基。

- 10 本發明之較佳具體例中，式II化合物為包含3R異構物與3S異構物之外消旋混合物。

本發明之較佳具體例為該種方法，藉該方法將外消旋2-異丁基-丁二腈(式II化合物其中 R^1 為H及 R^2 為甲基)轉化成(S)-3-氰基-5-甲基己酸(式I化合物其中 R^1 為H及 R^2 為甲基)，該方法包含下列步驟：

- 15 (2a) 外消旋2-異丁基丁二腈與具有腈酶活性之酶催化劑於反應介質接觸；以及

(2b) 由水性混合物回收(S)-3-氰基-5-甲基己酸；以及選擇性地回收未改變之(R)-2-異丁基丁二腈。

較佳反應介質為水性介質。

- 20 本發明之較佳具體例中，回收且未改變之化合物II之(R)-異構物隨後經由有機溶劑存在下，與弱鹼共同加熱而

外消旋化。較佳鹼為1,8-二吡雙環[5.4.0]十一碳-7-烯，而較佳溶劑為甲苯。選擇性地，結果所得化合物II之外消旋產物可於步驟(1a)或步驟(2a)循環至前述方法。

本發明之一較佳具體例中，酶催化劑係呈全微生物細胞形式、微生物細胞萃取物、部分純化酶、純化後之酶、或制動於撐體上之酶催化劑。

本發明之另一具體例中，酶催化劑為部分純化酶。部分純化酶例如包括(但非限制性)NIT-101、NIT-102、NIT-103(生物催化公司(BioCatalytics Inc.)，加州巴薩迪那)，以及得自阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)之脞酶(茱麗(Jülich)精細化學品公司，德國茱麗)。

本發明之較佳具體例中，脞酶催化劑係制動於撐體上。被制動之脞酶催化劑例如包括(但非限制性) NIT-102 C2(生物催化劑公司，加州巴薩迪那)、NIT-102制動於尤坡吉(Eupergit)(羅門(Röhm)公司，德國丹史塔)、及得自制動於尤坡吉之阿拉伯芥之脞酶。較佳具體例中，制動之脞酶催化劑為NIT-102 C2。

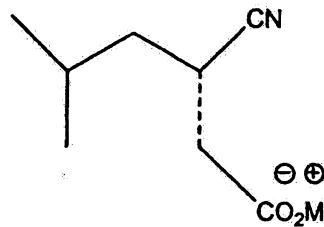
另一具體例中，反應介質係由蒸餾水或緩衝水組成。較佳緩衝水被緩衝至pH於約5.0至約10.0之範圍，及最佳pH於約6.0至約8.0之範圍。

本發明亦係關於一種製備(S)-3-(胺基甲基)-5-甲基己酸(普加巴林(pregabalin))之方法，該方法包含下列步驟：

(a) 外消旋2-異丁基-丁二脞於反應介質接觸具有脞酶活性之酶催化劑；

- (b) 由該反應介質回收(S)-3-氰基-5-甲基己酸；
 (c) 將(S)-3-氰基-5-甲基己酸轉成酸鹽；以及
 (d) 氫化酸鹽而生成(S)-3-(胺基甲基)-5-甲基己酸(普加巴林)。

5 較佳酸鹽具有式



其中M為Na、K、Li、NH₄、NH₂R⁶R⁷、NH₃R¹或NH(R⁶)₂R⁷
 其中R⁶及R⁷各自分別為(C₁-C₆)烷基。

為求方便，本說明書、實施例及隨附之申請專利範圍
 10 使用之若干術語集合於此處。除非另行定義，否則此處使用之全部技術及科學術語具有本發明所屬業界熟諳技藝人士一般所瞭解之相同定義。

「烷基」一詞為含1至8個碳原子之直鏈或分支基團包
 括(但非限制性)甲基、乙基、丙基、丁基、異丁基及第三丁基。

15 「環烷基」一詞用於此處包括含3至7個環碳原子之衍生自環狀烴類之部分，包括經以直鏈或分支烷基部分取代之環狀烴部分。

「烷氧基」一詞用於此處表示「烷基-O-」，其中「烷基」係定義如前。

20 「烯基」一詞意圖包括一或多個碳-碳雙鍵之直鏈或分支組態之烴鏈，雙鍵可出現於碳鏈沿線之任何穩定點，諸

如乙烯基及丙烯基。烯基典型含2至約12個碳原子，更典型為2至約8個碳原子。

外消旋混合物一詞用於此處表示一對對映異構物之等莫耳混合物。外消旋混合物通常係於合成產生立體中心時生成。如此處使用外消旋混合物一詞表示外消旋產物。

如此處使用，對映異構物一此表示於分子層面與其鏡像彼此無法重合之化合物。對映異構物可呈(R)組態或(S)組態存在。

如此處使用，立體選擇性合成一詞表示一種化學反應結果導致有兩種或兩種以上可能之立體異構物，生成單一立體異構物或異構物之一種對映異構物豐富異構物混合物之化學反應。

如此處使用，區域選擇性一詞表示可於選自二或二個以上可能原子或原子團之單一原子或原子團進行反應。二腓之區域選擇性水解結果導致單一腓基轉化成為羧基。

「 $^{\circ}\text{C}$ 」表示攝氏度數；

「酶催化劑」一詞用於此處表示一種催化劑其係以腓酶活性為特徵，或以腓水解酶活性與醯胺酶活性之組合為特徵。催化劑可呈全微生物細胞形式、被滲透之微生物細胞、微生物細胞萃取物之一或多種細胞成分、部分純化酶、或純化酶等形式。

如此處使用，對映異構物過量一詞表示主要對映異構物於對映異構混合物之莫耳分量，以百分比表示。

「水性反應混合物」一詞表示酶基質與酶催化劑於大

量水性介質之混合物。

「脞酶活性」一詞表示可將脞基轉成羧酸基之酶活性。

「脞水解酶活性」一詞用於此處，表示可將脞基轉成醯胺基之酶活性。

- 5 「醯胺酶活性」一詞表示可將醯胺基轉成羧酸基之酶活性。

ATCC為美國種型培養收集會，位於10801 University Boulevard, Manassas, Va., 20110-2209, U.S.A。生物催化公司係位於129 N. Hill Avenue, Suite 103, Pasadena, CA, 10 91106, U.S.A。茱麗精密化學品公司係位於Rudolf-Schulten-StraBe 5, d-52428 Jülich, Germany。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

- 15 本發明提供一種由式II二脞類製備式I脂族氰基羧酸類之酶催化方法。技藝界常用之任一種適當方法皆可用來製備二脞(II)起始物料。

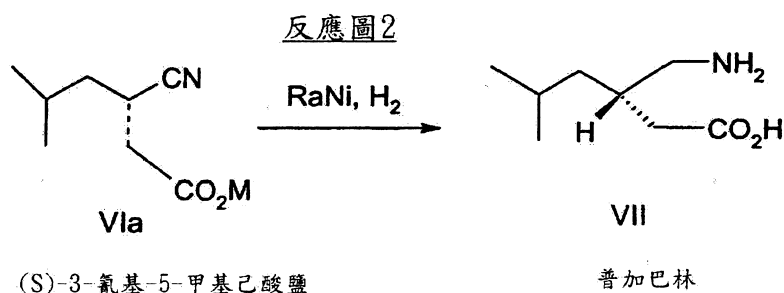
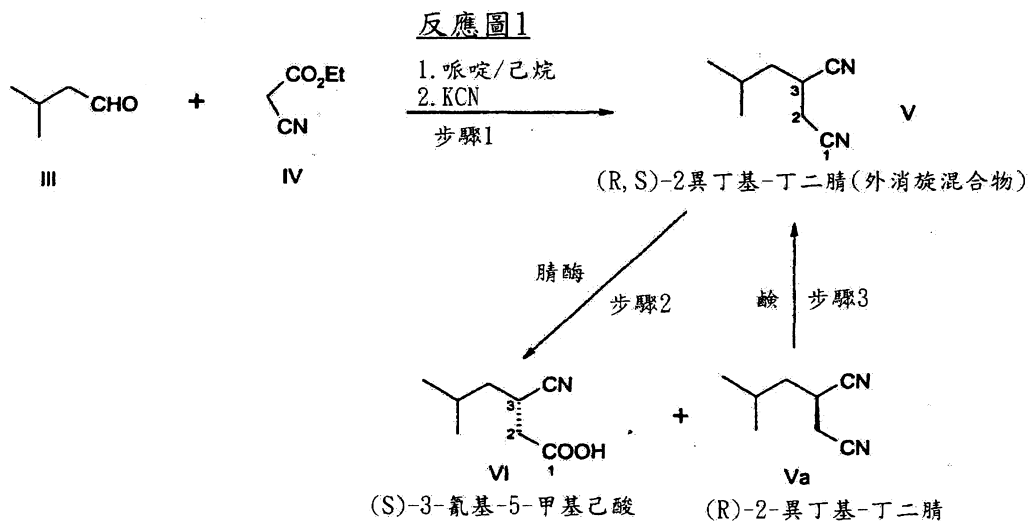
- 20 反應圖1表示本發明之特定具體例，其中化學酶催化方法用來將2-異丁基-丁二脞(V)轉成(S)-3-氰基-5-甲基己酸(VI)。化合物VI可用作為普加巴林(VII)合成時之中間物，如反應圖2所示。反應圖1之步驟3顯示副產物(R)-異構物(Va)之外消旋化，以及隨後循環進入步驟2。

於反應圖1之步驟1，外消旋2-異丁基-丁二脞(V)係經由異戊醛(III)與氰基乙酸乙酯(IV)縮合，接著加入KCN而形成。外消旋混合物係經由於V之C3碳原子形成之立體中心所產生。

反應圖1步驟2顯示二腈V外消旋混合物之區域選擇性及立體選擇性水解，結果獲得(S)-3-氰基-5-甲基己酸(VI)加未改變之V之(R)-異構物。

2-異丁基-丁二腈(V)藉腈酶催化水解，成為(S)-3-氰基-5-甲基己酸(VI)具有區域選擇性及立體選擇性二者。區域選擇性係基於氰基只於C1碳原子轉成羧基。反應為立體選擇性，在於V之(S)對映異構物主要涉及轉化，而留下(R)-對映異構物大致上不變。

如反應圖2所示，S-氰基酸VI之酸鹽VIa於隨後步驟氫化而獲得(S)-3-(氨基甲基)-5-甲基己酸(普加巴林)。反應係於氫化催化劑較佳為阮尼鎳存在下進行。可接受之酸鹽包括式VIa化合物，其中M為Na、K、Li、NH₄、NH₂R⁶R⁷、NH₃R⁶或NH(R⁶)₂R⁷其中R⁶及R⁷分別為(C₁-C₆)烷基。



如反應圖I所示，當外消旋混合物V進行區域選擇性及立體選擇性轉化成為(S)-氨基酸VI時，脞酶主要係與(S)異構物反應。如此隨著轉化之進行，反應混合物之(R)對應異構物Va之含量逐漸豐富。

- 5 本發明之另一目的係經由循環或再使用未改變之(R)-二脞Va而避免經濟上的浪費。因此本發明提供一種(R)-二脞之外消旋反應(反應圖1步驟3)，以及隨後循環通過反應圖1步驟2之方法。

- 本發明之各種酶具有脞酶活性、或脞水解酶活性與醯胺酶活性之組合，可經由篩選方案例如豐富分離技術而找出本發明之各種酶，該豐富分離技術最初基於微生物於含有豐富脞之培養基之能力而選擇微生物。豐富分離技術典型涉及使用補充豐富脞之碳有限或氮有限培養基，該豐富脞可為用於期望之生物轉化之脞酶基質，或結構類似之脞化合物。具有脞酶活性之微生物初步係基於微生物於含豐富脞之培養基之生長能力而選出。Gavagan等人(*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1999) vol. 52, 654-659)使用豐富技術使用2-乙基丁二脞作為唯一氮源而由土壤中分離出革蘭氏陰性菌*Acidovorax facilis* 72W (ATCC 55746)。*Acidovorax* 15 *facilis* 72W (ATCC 55746)顯示可用於將2-甲基戊二脞選擇性轉化成為4-氨基戊酸。豐富技術也可用於分離嗜熱菌(蒼白芽孢桿菌(*Bacillus pallidus*) Dac521，該嗜熱菌催化3-氨基吡啶轉化成為菸鹼酸(Almatawah及Cowan, *Enzyme Microb. Technol.* (1999) vol. 25, 718-724)。藉豐富技術分離

之微生物可測試其脛水解活性，測試方式係將微生物細胞懸浮液接觸脛化合物，使用諸如高效液相層析術、氣液層析術、或液相層析術質譜術(LCMS)等分析方法而測試是否存在有對應之羧酸。測定Acidovorax facilis 72W (ATCC 55746)之脛水解活性之技術報告於美國專利第5,814,508號。

一旦已經分離具有脛酶活性或脛水解酶與醯胺酶活性之微生物後，可採用酶工程處理來改良酶之各方面。此等改良可用於本發明，此等改良包括高酶選擇性、催化效率、對較高溫及較寬廣pH範圍之安定性、且讓酶可於包括水性緩衝液與有機溶劑之混合物之反應介質操作。

本發明有用之多種技術，該等技術可用來製造酶催化劑，該酶催化劑除了對特定生物轉化方法具有改良產率、產出量及產品品質外，也具有脛酶活性或脛水解酶與醯胺酶活性，該等技術包括(但非限制性)酶工程技術，諸如合理設計方法包括針對位置之突變發生、以及利用隨機突變發生或DNA穿梭技術之導向演化技術。

式II化合物轉化成為式I化合物之適當酶催化劑係呈全微生物細胞、經過滲透之微生物細胞、微生物細胞萃取物、部分純化酶或純化酶等形式，此等催化劑可制動於撐體上。

本方法可於單相經由2-異丁基丁二脛於蒸餾水接觸酶催化劑，或於水性緩衝液接觸酶催化劑進行，水性緩衝液可維持反應之初pH於約5.0至10.0，且較佳6.0至8.0之範

圍。適當緩衝劑包括磷酸鉀及乙酸鈣。隨著反應之進行，由於由二腈之對應腈官能基，生成羧酸之銨鹽，故反應混合物之pH改變。反應可於未控制pH下進行，或於反應過程可添加適當酸或鹼來維持期望之pH。但如前文指示，可使用諸如酶工程及導向演化其可於更寬廣之pH範圍有效操作，等技術來製造酶催化劑。

本方法可於包含二相之反應混合物進行：水相最初含有酶且溶解之2-異丁基-丁二腈；有機相主要係由外消旋2-異丁基-丁二腈組成。二相反應混合物之製法係經由將2-異丁基-丁二腈加至酶與緩衝劑之水溶液，讓2-異丁基-丁二腈之添加量超過其水中溶解度限度。2-異丁基-丁二腈於50 mM磷酸鉀(30°C, pH 7.5)之水中溶解度約為0.06M。反應過程中，生成(S)-3-氰基-5-甲基己酸銨鹽，於水相之濃度增高，有機相之體積縮小，而變成富含(R)-2-異丁基-丁二腈。另外，此種方法也可於包含以下三相之反應混合物進行：水相其初部含有溶解之2-異丁基-丁二腈；有機相其主要係由外消旋2-異丁基-丁二腈組成；及固相主要係由酶制動於不溶性撐體組成。三相反應混合物係經由對二相反應混合物所述程序製備，但制動於不溶性撐體之酶係用來替代未被制動之酶。

選擇性地，酶可制動於聚合物基體或不溶性撐體。制動後之酶催化劑可重複使用或以連續方法使用，制動後之酶催化劑比未經制動之酶催化劑更容易由酶催化方法產物分離。酶制動於聚合物基體(例如褐藻酸鈣或聚丙烯醯胺)，

或制動於不溶性撐體(例如西萊特(celite))之方法為熟諳技藝人士眾所周知。NIT-102 C2(生物催化公司，加州巴薩迪那)為制動於不溶性撐體之腓酶酵素，由於可重複用於批次法或連續法，因此特別可用於II轉化成為III。NIT-102 C2
5 用於反應之濃度係選擇可獲得預定反應速率，且該濃度係依據催化劑之比活性及酶基質濃度決定。典型地，NIT-102 C2之用量為每毫升反應體積約0.001克至0.3克濕重，較佳為每毫升反應體積0.01至0.15克濕重之範圍。

此外，若干由微生物細胞製備且定名為NIT-101、
10 NIT-102、NIT-103(生物催化公司，加州巴薩迪那)及得自阿拉伯芥之腓酶(茱麗(Jülich)精細化學品公司，德國茱麗)製備之凍乾水解產物也可用於將II轉化成為III。NIT-101、NIT-102、NIT-103及阿拉伯芥腓酶與I於水性反應混合物接觸，結果導致生成II。使用NIT-101、NIT-102、NIT-103及
15 得自阿拉伯芥之腓酶之反應可於二相反應混合物，使用催化劑濃度於每毫升反應體積0.001-0.04克乾重之範圍進行，較佳催化劑濃度為每毫升反應體積0.002-0.02克乾重之範圍。

水解反應溫度係選定為可最佳化反應速率及酶催化
20 劑活性安定性之溫度。反應溫度係於恰高於懸浮液冰點(約0°C)至60°C之範圍，較佳反應溫度係於5°C至35°C之範圍。

式I化合物之(3S)異構物之回收、及式II化合物之未改變(3R)異構物之回收可使用熟諳技藝人士眾所周知之分離、單離與純化技術進行。

於較佳回收方法，式II化合物之未改變之(3R)異構物，係經由使用諸如乙酸乙酯之有機溶劑萃取，而由鹼性水性反應混合物分離。式I化合物之(3S)異構物之酸鹽偏好溶解於水層，以及隨後藉酸化以及使用諸如乙酸乙酯之有機溶劑萃取而分離。

式I化合物可用於合成諸如普加巴林之化合物，該等化合物可用於治療癲癇、抽搐、焦慮、疼痛及神經退化病變，包括阿茲海墨氏病、亨丁頓氏病及帕金森氏病等病症。

特定式I化合物例如為下列化合物：

- 10 (S)-3-氰基-5-甲基-辛酸；
 (S)-3-氰基-5-甲基-庚酸；
 (S)-3-氰基-5-甲基-己酸；
 (S)-3-氰基-5-甲基-壬酸；
 (S)-3-氰基-5-乙氧基-己酸；
 15 (S)-3-氰基-5-環己基-己酸；以及
 (S)-3-氰基-5-三氟甲基-己酸。

實施例1

2-異丁基-丁二腈之製備

20 氰基乙酸乙酯(733克，6.48莫耳)，異戊醛(613.9克，7.13莫耳)，吡啶(5.5克，0.065莫耳)及己烷(0.5升)之混合物置於回流下，連續去除水。當未再收集得額外水時，混合物經冷卻，真空蒸餾去除溶劑。異丙醇(1升)添加至剩餘油，接著加入氰化鉀(422克，6.48莫耳)於水(2升)。於添加氰化鉀溶液期間，反應混合物係維持於低於35°C，然後維持於約

35°C 4小時。反應混合物於大氣壓下蒸餾至達到95°C溫度，然後於此溫度回流5小時。反應混合物經冷卻，以水(0.5升)稀釋，及以1升甲基第三丁基甲醚(MTBE)萃取。MTBE萃取出物以水(0.5升)洗滌，以無水硫酸鎂脫水，過濾及真空濃縮，

5 獲得873.4克2-異丁基-丁二腈，呈油。藉真空蒸餾(90°C於0.275毫米汞柱)獲得純化後之2-異丁基-丁二腈樣本。

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.93-0.99 (m, 6H), 1.43-1.50 (m, 1H), 1.71-1.78 (m, 1H), 1.81-1.91 (m, 1H), 2.69 (d, 2H, $J=6.5$ Hz), 2.90-2.97 (m, 1H).

10 實施例2

以NIT-101、NIT-102、NIT-103及阿拉伯芥腈酶而由2-異丁基-丁二腈製備(S)-3-氰基-5-甲基己酸

三個8毫升有螺帽之玻璃小瓶內各自進料2-異丁基-丁二腈(20毫克)，1毫升50 mM磷酸鉀緩衝液(pH 7.5, 2mM二

15 硫赤絲醇(DTT))，及10毫克選自NIT-101、NIT-102或NIT-103(生物催化公司，加州巴薩迪那)之腈酶酵素。一個8

毫升有螺帽之玻璃小瓶內進料2-異丁基-丁二腈(20毫克)及1毫升阿拉伯芥腈酶於含100 mM伸乙基二胺四乙酸(EDTA)及2 mM DTT之50 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.8)之溶液(茱麗精

20 細化學品公司，德國茱麗)。四種反應混合物於30°C使用磁攪棒攪拌15小時，然後以乙酸乙酯(2 x 6毫升)個別萃取。移開乙酸乙酯萃取出物後，水性部分使用4N鹽酸(0.15毫升)處理，使用乙酸乙酯(3 x 6毫升)萃取。酸化水性部分之乙酸乙酯萃取出物經真空濃縮，對使用NIT-101、NIT-102、NIT-103

及阿拉伯芥脞酶進行之反應分別獲得7.8毫克(34.2%產率)，8.8毫克(38.6%產率)，8.1毫克(35.5%產率)及4.0毫克(17.5%產率)(S)-3-氰基-5-甲基己酸((S)-CMHA)。得自各反應之(S)-3-氰基-5-甲基己酸樣本使用過量(三甲基矽烷基)重氮甲烷處理，獲得其甲酯衍生物，於開立迪斯(Chiraldex) G-TA管柱(30米 x 0.25毫米)內徑，15微米膜厚度)藉氣相層析術(GC)分析，來測定對映異構物純度。NIT-101、NIT-102、NIT-103及阿拉伯芥脞酶反應產物之對映異構物純度分別為96.3%、91.1%、95.5%及98.5% e.e. (e.e.表示「對映異構物過量」)。

實施例3

使用NIT-102由2-異丁基-丁二脞製備(S)-3-氰基-5-甲基己酸

125毫升有夾套之反應容器維持於30°C。容器內進料2-異丁基-丁二脞(3.33克)、NIT-102 (0.5克)及122毫升50 mM磷酸鉀緩衝液(pH 7.5)含5 mM DTT及1 mM EDTA(反應緩衝液)。攪拌12.5小時後，反應混合物以乙酸乙酯(4 x 50毫升)萃取。乙酸乙酯萃取物經去除，水性部分以4M鹽酸調整至pH 2.5，及以乙酸乙酯(3 x 50毫升)萃取。酸化水性部分之乙酸乙酯萃取物經組合，以水性硫酸鎂酸化，過濾及真空濃縮，獲得1.56克(S)-CMHA (41.1%)。反應產物樣本使用(三甲基矽烷基)重氮甲烷處理，如實施例2所述藉GC分析，顯示98.5% e.e.之對映異構物純度。

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.93-0.97 (m, 6H), 1.30-1.37 (m, 1H), 1.61-1.68 (m, 1H), 1.82-1.89 (m, 1H),

2.57-2.63(m, 1H), 2.72-2.78 (m, 1H), 2.98-3.06 (m, 1H).

實施例4

使用NIT-102 C2由2-異丁基-丁二腈製備(S)-3-氰基-5-甲基己酸鉀

5 兩個125毫升維持於30°C之有夾套之反應容器內，各別
進料2-異丁基-丁二腈(6.81克)，NIT-102 C2 (1-70克)及118.2
毫升反應緩衝液。攪拌24小時後，產物混合物經傾析，留
下酶催化劑於反應容器。反應緩衝液(20毫升)添加至各個反
應容器，約攪拌2分鐘，然後經過傾析及添加至產物混合
10 物。藉將2-異丁基-丁二腈(6.81克)及反應緩衝液(118.2毫升)
添加至各個反應容器，反應混合物攪拌24小時而重複反
應。於各容器完成四次反應(總共8批次反應)後，產物混合
物經組合，以MTBE (3 x 500毫升)萃取。MTBE萃取物經取
出，水性部分以磷酸調整至pH 2.1，以MTBE (2 x 500毫升)
15 萃取。酸化後之水性部分之MTBE萃取物經真空濃縮，留下
油，油以水(100毫升)及氫氧化鉀(8.5克)處理。所得溶液經
真空濃縮獲得24.2克(31.3%)(S)-3-氰基-5-甲基己酸鉀。由
(S)-3-氰基-5-甲基己酸甲酯，藉對掌性GC分析顯示99.1%
e.e.對映異構物純度。

20 ^1H NMR (D_2O , 400 MHz): δ 0.75-0.78 (m, 6H),
1.18-1.25 (m, 1H), 1.43-1.50 (m, 1H), 1.53-1.68 (m, 1H),
2.28-2.38 (d, 2H, J=6.5 Hz), 2.86-2.93 (m, 1H).

實施例5

使用NIT-102 C2於氫氣氣氛下由2-異丁基-丁二腈製備

(S)-3-氰基-5-甲基己酸

125毫升維持於30°C之有夾套反應容器內進料2-異丁基-丁二腈(6.53克)，NIT-102 C2 (2.61克)，120克反應緩衝液，且以氮氣掃除。所得混合物攪拌24小時，然後傾析至
5 250毫升玻璃瓶，將催化劑留在反應容器內。經由對含有用過之催化劑之反應容器內重新進料2-異丁基-丁二腈(6.53克)及120克反應緩衝液，使用氮氣掃除，攪拌所得混合物24小時，重複反應。反應樣本(0.1毫升)混合0.4毫升)水：甲醇：三氟乙酸(60:40:0.09，v/v/v)，藉HPLC於西美崔
10 (Symmetry) C8管柱(150 x 3.9毫米)維持於30°C藉HPLC分析。管柱以水：甲醇：三氟乙酸(60:40:0.09，v/v/v)洗提，使用折射率檢測器進行檢測。

催化劑回收利用共進行50批次反應。得自連續兩批次反應之產物混合物組合，使用乙酸乙酯(2 x 150毫升)萃取。
15 水性部分以4M鹽酸調整至pH 2，以乙酸乙酯(2 x 150毫升)萃取。酸化後之水性部分之乙酸乙酯萃取物經組合，以無水硫酸鎂脫水，過濾，及真空濃縮獲得(S)-CMHA。由50批次反應共獲得160.8克(43.2%產率)(S)-CMHA。第1、26及50
20 批次反應之初反應速率分別為14.8、17.4及15.1 mM (S)-CMHA/小時。由批次反應39至50分離得自(S)-CMHA甲酯衍生物，進行對掌性GC分析顯示99.0 % e.e.平均對映異構物純度。

實施例6

使用NIT-102 C2於周圍氣氛下由2-異丁基-丁二腈製備

(S)-3-氰基-5-甲基己酸

如實施例5所述進行使用NIT-102 C2將2-異丁基-丁二腈轉化成為(S)-CMHA之一系列批次反應，但反應係於周圍氣氛下而非於氮氣氣氛下進行。反應樣本係如實施例5所述藉HPLC分析。

於周圍氣氛下以催化劑回收利用共進行50批次反應。4小時時由反應樣本測得之初反應速率對批次反應1、26及50分別為14.2、13.2及9.3 mM (S)-CMHA/小時。

實施例710 (S)-3-氰基-5-甲基己酸第三丁基銨之製備

由2-異丁基-丁二腈轉化成為(S)-CMHA(實施例6，反應37-44)之產物混合物經組合，以乙酸乙酯(2 x 250毫升)萃取。乙酸乙酯萃取物以無水硫酸鎂脫水，過濾及真空濃縮，獲得油(32.5克，62.2%產率)，主要為(R)-2-異丁基-丁二腈。15 水性部分以4M鹽酸調整為pH 2，以乙酸乙酯(2 x 250毫升)萃取。乙酸乙酯萃取物經濃縮成470毫升體積，然後攪拌同時逐滴加入第三丁基胺(15.9毫升，151.5毫莫耳)。所生成之白色結晶鹽藉過濾收集及風乾隔夜，獲得30.0克(S)-3-氰基-5-甲基己酸第三丁基銨。由(S)-3-氰基-5-甲基己酸第三丁基銨製備(S)-3-氰基-5-甲基己酸甲酯，藉對掌性GC分析，20 顯示99.5% e.e.對映異構物純度。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.90-0.94 (m, 6H), 1.26-1.32 (m, 10H), 1.54-1.61 (m, 1H), 1.78-1.88 (m, 1H), 2.30-2.35 (m, 1H), 2.43-2.50 (m, 1H), 2.96-3.04 (m, 1H).

實施例8

由(S)-3-氟基-5-甲基己酸鉀製備(S)-3-胺基甲基-5-甲基己酸

(S)-3-氟基-5-甲基己酸鉀(20克，103.5毫莫耳)，水(50毫升)，45%氫氧化鉀(12克)，異丙醇(12克)及阮尼鎳之混合物於巴爾振搖器於50 psi氫壓下振搖隔夜。混合物經過濾，加熱至約50°C，以乙酸(6.5毫升)處理及於室溫攪拌隔夜。然後混合物以45%氫氧化鉀調整至略高於pH 7，真空濃縮去除大部分異丙醇。異丙醇(20毫升)添加至混合物，然後以乙酸酸化，於室溫攪拌隔夜，過濾獲得4.3克(S)-3-胺基甲基-5-甲基己酸，呈白色結晶固體。經由使用馬菲試劑(Marfey reagent)(N α -(2,4-二硝基-5-氟苯基)-L-丙胺鹽胺)製備(S)-3-胺基甲基-5-甲基己酸衍生物，於BDS海坡西爾(Hypersil) C18管柱(250 x 4.6毫米，5微米)使用乙腈：1%三乙基胺(pH 3)(38:62, v/v)洗提，藉HPLC分析，測得對映異構物純度為100% e.e.。

實施例9

由(S)-3-氟基-5-甲基己酸第三丁基銨製備(S)-3-胺基甲基-5-甲基己酸

(S)-3-氟基-5-甲基己酸第三丁基銨(26克，113.9毫莫耳)，水(48.8毫升)，乙醇(35.8毫升)，氫氧化鉀(7.2克，91%薄片)及海綿鎳(Sponge Nickel)(A-7000，16.3克水濕潤，活化金屬化學品公司，田納西州西微微爾)之混合物於巴爾振搖器內於50 psi氫壓下振搖隔夜。混合物經(西萊特)過濾，濾餅以水(10毫升)及乙醇(5毫升)洗滌。添加乙酸(9.4毫升)

至濾液，所得混合物於4°C攪拌隔夜。產物經過濾，以10毫升異丙醇清洗，真空脫水獲得11.1克(61%)白色固體。部分(10.0克)材料由異丙醇與水之1:1混合物結晶，獲得8.8克(S)-3-胺基甲基-5-甲基己酸，100% ee。

5 實施例10

使用DBU外消旋化(R)-2-異丁基-丁二腈

(R)-2-異丁基-丁二腈之外消旋化係於使用NIT-102 C2生物轉化外消旋2-異丁基-丁二腈回收得之材料進行。(R)-2-異丁基-丁二腈(1.36克，10毫莫耳，69% ee)，甲苯(5毫升)及1,8-二吡雙環[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU, 0.076克，5毫莫耳)之混合物回流2小時。水(10毫升)添加至反應，所得混合物以乙酸乙酯(2 x 10毫升)萃取。組合有機萃取物循序以5%鹽酸(20毫升)及飽和水性氯化鈉(20毫升)洗滌，以無水硫酸鎂脫水，過濾及真空濃縮，獲得外消旋2-異丁基-丁二腈(1.14克，84%)。對映異構物純度係藉GC使用開立迪斯G-TA管柱(30米 x 0.25毫米內徑，125微米薄膜厚度)測定。

實施例11

使用安伯萊特(Amberlite) IRA-400外消旋化(R)-2-異丁基丁二腈

安伯萊特IRA-400樹脂(1克濕重，羅門哈斯(Rohm & Haas)公司，賓州費城)與5%氫氧化鈉(10毫升)共同攪拌10分鐘。以水洗滌至洗液變中性。添加乙醇(25毫升)及(R)-2-異丁基-丁二腈(69% ee)至樹脂，所得混合物回流2小時。反應混合物經過濾及真空濃縮。殘餘物攝取於乙酸乙酯(25毫

升)，以水(3 x 100毫升)洗滌。有機相以無水硫酸鎂脫水，過濾，及真空濃縮，獲得外消旋(R)-2-異丁基-丁二腈(0.81克，81%)。

【圖式簡單說明】

5 (無)

【主要元件符號說明】

(無)

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種經選定之脂族二腈進行區域選擇性與立體選擇性生物轉化成為對應氰基羧酸。特別，本發明提供2-異丁基-丁二腈轉化成為(S)-3-氰基-5-甲基己酸之方法，後者為合成(S)-3-(胺基甲基)-5-甲基己酸(普加巴林(pregabalin))之有用中間物。普加巴林可用於治療若干腦部疾病，例如普加巴林可用於治療與預防癲癇發作病症、疼痛及精神病症。

六、英文發明摘要：

The present invention is directed to a regio-and stereoselective bioconversion of selected aliphatic dinitriles into corresponding cyanocarboxylic acids. More particularly, the present invention provides methods for the conversion of 2-isobutyl-succinonitrile into (S)-3-cyano-5-methylhexanoic acid, which is a useful intermediate in the synthesis of (S)-3-(aminomethyl)-5-methylhexanoic acid (pregabalin). Pregabalin can be used for treating certain cerebral diseases, for example, in the treatment and prevention of seizure disorders, pain, and psychotic disorders.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

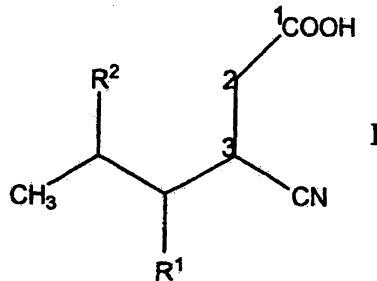
(無)

第94111638號專利申請案申請專利範圍修正本

修正日期：97年6月

十、申請專利範圍：

1. 一種製備式I化合物之方法：



5

其中C3具有(S)組態；

 R^1 為氫、(C₁-C₆)烷基或苯基；及

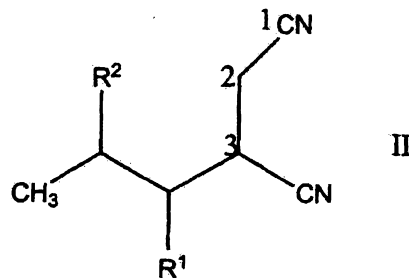
R^2 為(C₁-C₈)烷基、(C₂-C₈)烯基、(C₃-C₈)環烷基、
-O(C₁-C₆)烷基、-CH₂-CH₂-O-(C₁-C₆)烷基、(C₁-C₆)烷基
-OH、-苯基-(C₁-C₆)烷基-OH、-苯基-O-(C₁-C₆)烷基、苯
基或經取代之苯基；

10

但當 R^2 為甲基時， R^1 為氫、(C₁-C₆)烷基、或苯基；

該方法包含下列步驟：

(a) 式II化合物：



15

與具有腈酶活性之酶催化劑於一反應介質中接觸；以及

(b) 由該反應介質回收式I化合物之(3S)異構物；以
及選擇性地，回收未經改變之式II化合物之(3R)異構物。

2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該步驟(b)回收之未經改變之式II化合物之(3R)異構物係經由(3R)異構物與鹼於一有機溶劑存在下加熱，而被外消旋化成為式II化合物之外消旋物(racemate)。
- 5 3. 如申請專利範圍第2項之方法，其中使用由步驟(b)所回收之未經改變之(3R)異構物外消旋化所得之該外消旋物來重複進行步驟(a)。
4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該酶催化劑係選自於由 NIT-101、NIT-102、NIT-103 及得自阿拉伯芥
10 (*Arabidopsis thaliana*)之腓酶所組成之組群。
5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該反應介質包含蒸餾水或水，其係被緩衝至5.0至10.0之範圍內之pH。
6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該式I化合物為
15 (S)-3-氰基-5-甲基己酸，該式II化合物為外消旋2-異丁基-丁二腓，以及步驟(b)之該所回收之未經改變之異構物為(R)-2-異丁基丁二腓。
7. 如申請專利範圍第6項之方法，其中步驟(b)之該所回收之未經改變之(R)-2-異丁基丁二腓係經由與鹼於一溶劑中加熱而外消旋化成為外消旋2-異丁基-丁二腓。
- 20 8. 如申請專利範圍第7項之方法，其中使用由步驟(b)之該所回收之未經改變之(R)-2-異丁基-丁二腓外消旋化所得之外消旋2-異丁基-丁二腓來重複進行步驟(a)。
9. 一種製備(S)-3-(胺基甲基)-5-甲基己酸(普加巴林(pregabalin))之方法，該方法包含下列步驟：

(a)使2-異丁基-丁二腈於反應介質接觸具有腈酶活性之酶催化劑；

(b)由該反應介質回收(S)-3-氰基-5-甲基己酸；

(c)將(S)-3-氰基-5-甲基己酸轉化成一酸鹽；以及

5 (d)氫化該酸鹽而生成(S)-3-(胺基甲基)-5-甲基己酸(普加巴林)。

10. 如申請專利範圍第9項之方法，其中由步驟(a)之該反應介質回收未經改變之(R)-3-氰基-5-甲基己酸。

10 11. 如申請專利範圍第9項之方法，其中步驟(a)之該未經改變之(R)-3-氰基-5-甲基己酸係經由與鹼於一有機溶劑存在下加熱被外消旋化以生成外消旋2-異丁基-丁二腈，以及使用該外消旋2-異丁基-丁二腈來重複進行步驟(a)。

15 12. 如申請專利範圍第9項之方法，其中該酶催化劑為呈全微生物細胞、經過滲透之微生物細胞、微生物細胞萃取物、部分純化酶、純化酶或固定於撐體(support)之酶催化劑之形式之腈酶。

13. 如申請專利範圍第9項之方法，其中該酶催化劑係選自於由NIT-101、NIT-102、NIT-103及得自阿拉伯芥之腈酶所組成之組群。