

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03815053.0

[51] Int. Cl.

C07D 313/00 (2006.01)

A61K 31/335 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 100363359C

[22] 申请日 2003.8.26 [21] 申请号 03815053.0

[30] 优先权

[32] 2002.8.29 [33] US [31] 60/407,345

[86] 国际申请 PCT/US2003/026991 2003.8.26

[87] 国际公布 WO2004/019879 英 2004.3.11

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.27

[73] 专利权人 菲塞股份有限公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 D·圣 B·梅特卡夫

C·卡雷拉斯 Y·刘

R·麦克丹尼尔斯

E·J·罗德里格斯

[56] 参考文献

US 6403775 B1 2002.6.11

JP 60218321 A 1985.11.1

EP 0184921 A2 1986.6.18

GASTROINTESTINAL MOTOR – STIMULATING ACTIVITY OF MACROLIDE ANTIBIOTICS AND THE STRUCTURE – ACTIVITY RELATIONSHIP. SATOSHI OMURA, et al. THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, Vol. XXXVIII No. 11. 1985

审查员 周子文

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

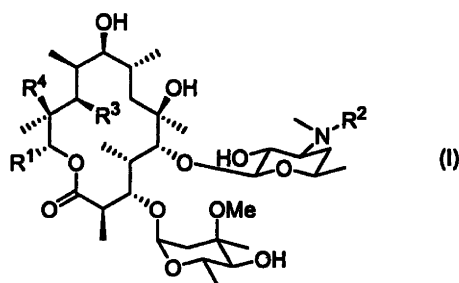
权利要求书 4 页 说明书 30 页

[54] 发明名称

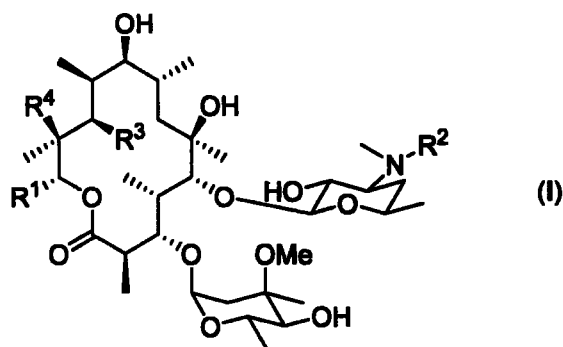
运动内酯化合物

[57] 摘要

由式 (I) 表示的运动内酯化合物，其中 R¹、R²、R³ 和 R⁴ 如本文所述，以及上述化合物的制备方法，在治疗由于胃运动减弱引起的疾病中的用途。



1. 一种式 (I) 表示的化合物



和其药学上可接受的盐,

其中:

R^1 是取代或未取代的 C_1 - C_{10} 烷基;

R^2 是取代或未取代的 C_1 - C_5 烷基;

R^3 是 H 或 OH; 和

R^4 是 H 或 OH;

条件是, 当 (a) R^1 是乙基且(b) R^3 是 OH 时, R^2 不是 H 或甲基; 取代基选自高达 5 个碳原子的烷基和卤素。

2. 如权利要求1所述的化合物, 其特征在于:

R^1 是乙基;

R^2 是乙基、丙基、异丙基、或 2-丁基; 和

R^3 和 R^4 是 OH。

3. 如权利要求1所述的化合物, 其特征在于:

R^1 是取代的乙基;

R^2 是 H、乙基、丙基、异丙基或 2-丁基; 和

R^3 和 R^4 是 OH。

4. 如权利要求1所述的化合物，其特征在于：

R^3 和 R^4 各自是 H 或 OH；

R^1 选自乙基、2-氟乙基和 1-丙基；和

R^2 选自甲基、乙基、异丙基和 2-丁基；

条件是，当 R^1 是乙基且 R^3 是 OH 时， R^2 不是甲基。

5. 如权利要求1所述的化合物，其特征在于所述 R^1, R^2, R^3 和 R^4 是如下表所述的组合：

(1) R^1 是 CH_3CH_2 ， R^2 是 $CH(CH_3)_2$ ，且 R^3 和 R^4 都是 OH；

(2) R^1 是 FCH_2CH_2 ， R^2 是 CH_3 ，且 R^3 和 R^4 都是 OH；

(3) R^1 是 FCH_2CH_2 ， R^2 是 CH_2CH_3 ，且 R^3 和 R^4 都是 OH；

(4) R^1 是 FCH_2CH_2 ， R^2 是 $CH(CH_3)_2$ ，且 R^3 和 R^4 都是 OH；

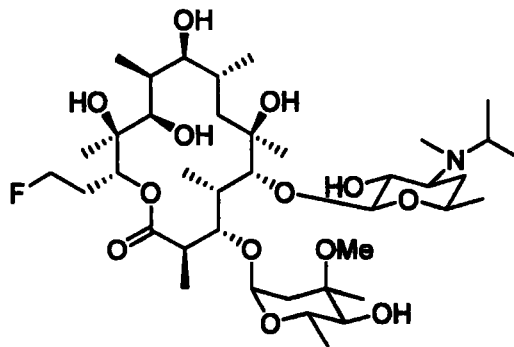
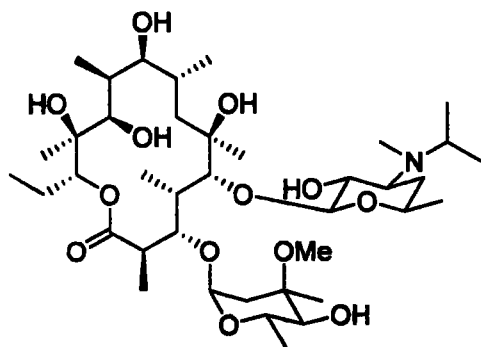
(5) R^1 是 $CH_3CH_2CH_2$ ， R^2 是 CH_3 ，且 R^3 和 R^4 都是 OH；

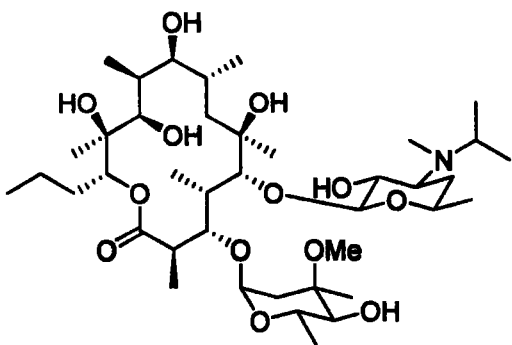
(6) R^1 是 $CH_3CH_2CH_2$ ， R^2 是 $CH(CH_3)_2$ ，且 R^3 和 R^4 都是 OH；

(7) R^1 是 $CH_3CH_2CH_2$ ， R^2 是 $C(CH_3)CH_2CH_3$ ，且 R^3 和 R^4 都是 OH；

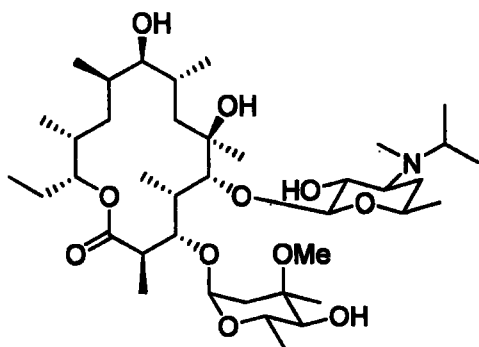
(8) R^1 是 CH_3CH_2 ， R^2 是 $CH(CH_3)_2$ ，且 R^3 和 R^4 都是 H。

6. 如权利要求1所述的化合物，它选自下述化合物：

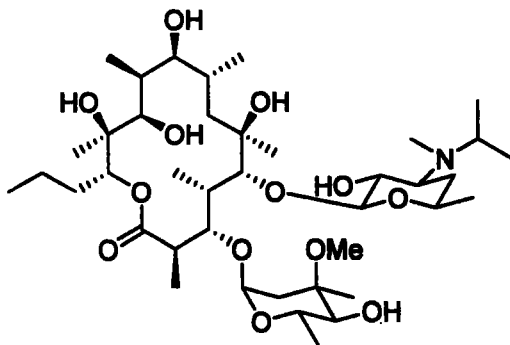




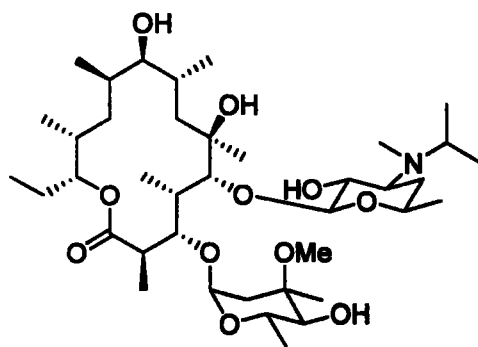
和



7. 如权利要求1所述的化合物，其特征在于它具有下式表示的结构：



8. 如权利要求1所述的化合物，其特征在于它具有下式表示的结构：



9. 一种药物组合物，它包含权利要求1所述的化合物和药学上可接受的载体。

10. 权利要求1所述的化合物在制备治疗病人胃疾病的药物中的用途。

运动内酯化合物

技术领域

本发明提供了具有超级药理学和遗传药理动力学性质的促动力制剂（prokinetic agents），它可用于治疗肠胃运动失调（motility disorder）。本发明涉及化学、药物化学、药物、分子生物学和药理学领域。

背景技术

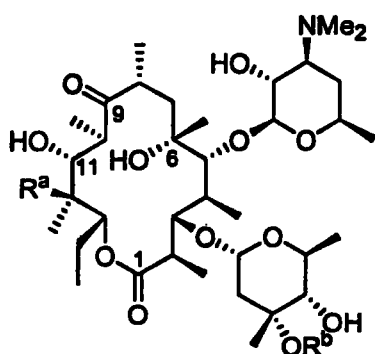
肠胃（“GI”）运动调控着消化物质通过肠道的有序移动，以保证营养物、电解质和流体的充分吸收。通过食道、胃、小肠和结肠的适当转运取决于腔内压力和一些括约肌（它们能调节GI内含物向前运动并防止返流）的区域性控制。正常的GI运动方式可能受到许多环境因素（包括疾病和手术）的伤害。

肠胃运动疾病包括例如胃轻瘫和胃食管倒流疾病（“GERD”）。胃轻瘫指胃内含物排空延迟。胃轻瘫的症状包括胃不适、胃灼热、恶心、和呕吐。急性胃轻瘫可由例如药物（如麻醉剂）、病毒性肠胃炎、和高血糖症引起，通常通过治疗下述疾病而不是治疗运动失调来处理的。慢性胃轻瘫的最常见原因与长期患有糖尿病或特发性假性梗阻（pseudo-obstruction）有关，通常称为“非溃疡性”或“功能性”消化不良。

GERD指胃和十二指肠内含物返流入食管的各种临床表现。最常见的症状是胃灼热和言语障碍；由于食管腐蚀（esophageal erosion）也可能发生失血。GERD可能与食管下括约肌的紧张力低和不适当松弛有关，约40%的病例会发生胃轻瘫。在多数病例中，GERD看来可用下述药剂治疗，所述药剂可减少胃释放的酸性刺激物（如Prilosec），或者增加食管下括约肌的张力（如西沙比利（Cisapride））。其症状包括肠胃运动受损疾病的其他例子是厌食、胆囊淤积、手术后麻痹性肠梗阻、硬皮病、肠道假性梗阻、胃炎、呕吐和慢性便秘（结肠无力）。

这些GI疾病通常用能增强推动力的促动力制剂来治疗。运动内酯 (motilide) 是大环内酯类化合物, 如红霉素及其衍生物, 它们是促胃动素受体的激动剂。运动内酯的潜在临床疗效的证据包括它们能诱发第III相迁移运动复合物 (Migrating Motor Complexes (“MMC”))。MMC指胃和小肠在禁食状态所显示的四相 (I-IV) 电活动。肌肉收缩发生在第III和IV相中, 与蠕动波一致, 所述蠕动波在禁食期间可推动肠内含物到远端。其他相关的临床作用包括: 提高正常自愿者和GERD病人的食管蠕动和LES (腔) 压; 加速患有胃轻瘫病人的胃排空; 刺激正常自愿者、胆结石去除后病人和患有自主性神经病的糖尿病患者的胆囊收缩。

所述红霉素是一类大环内酯抗生素, 通过发酵放线菌类红色糖多孢菌 (*Saccharopolyspora erythraea*, 从前称为产红霉素链霉菌) 制得。红霉素A (一种常用抗生素) 是这一类中最丰富和最重要的成员。



红霉素 A

 $R^a = OH$ $R^b = \text{甲基}$

红霉素 B

 $R^a = H$ $R^b = \text{甲基}$

红霉素 C

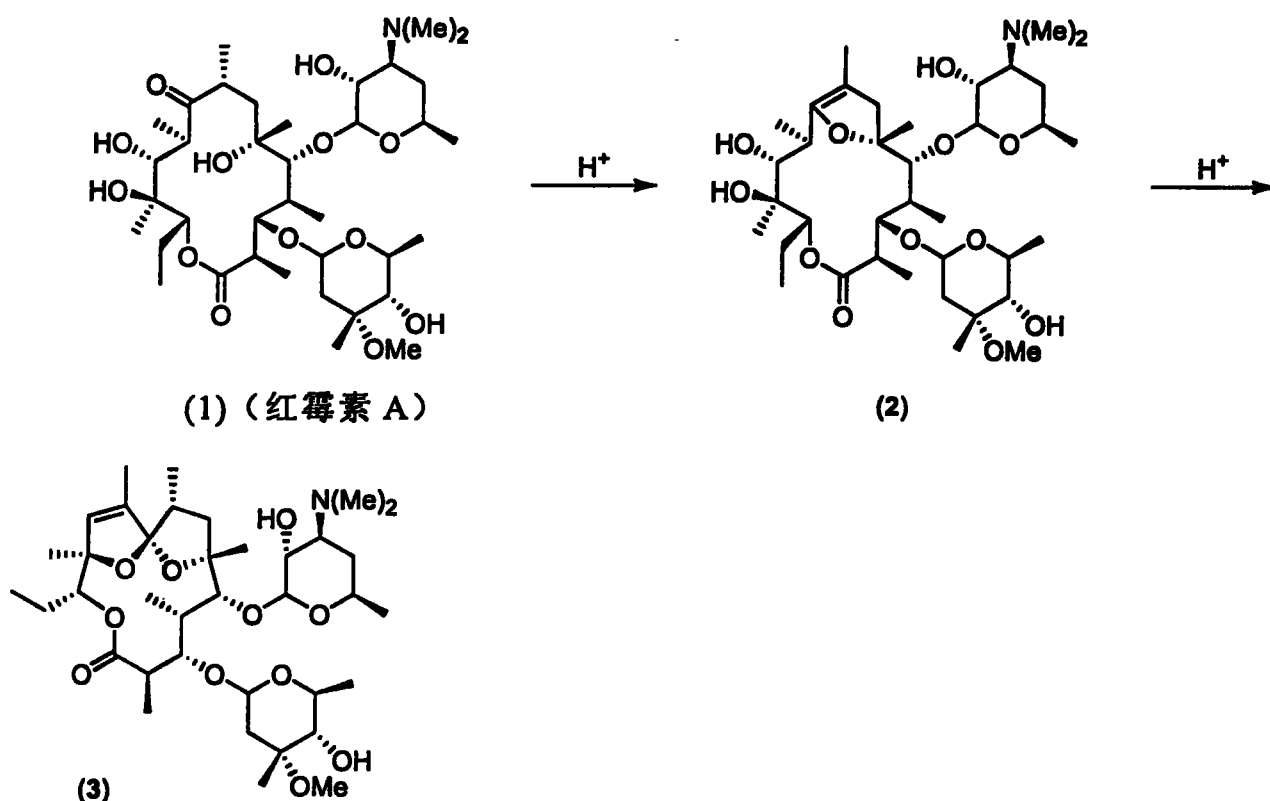
 $R^a = OH$ $R^b = H$

红霉素 D

 $R^a = H$ $R^b = H$

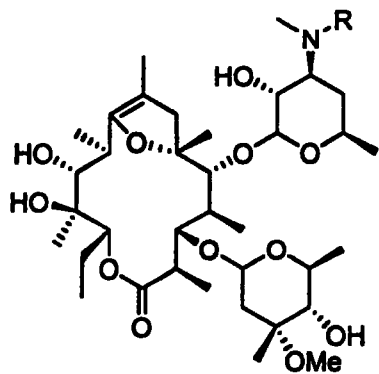
1950年以来, 红霉素A (1) 已知可引起GI副作用, 如恶心、呕吐、和腹部不适。如流程A所示, 红霉素A可在胃中经酸催化降解, 先形成8,9-脱水-6,9-半缩醛 2 (也称为红霉素A烯醇醚), 然后形成螺旋缩酮 (spiroketal) 3。其GI副作用主要可由红霉素A本身和半缩醛2的促胃动素刺激活性解释 (螺旋缩酮3没有活性)。

流程 A

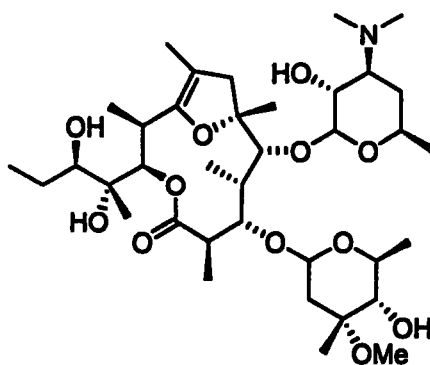


Omura等人在“大环内酯抗生素的肠胃运动刺激活性以及结构-活性关系” (*J. Antibiotics* (1985年) 38: 1631-2) 中公开了红霉素A、9-二氢红霉素A和其他大环内酯能刺激非麻醉狗肠道收缩的相对能力。在该试验中, 用1毫克/千克(体重)的剂量, 9-二氢红霉素A的活性据报道是红霉素活性的65%。由于9-二氢红霉素不能形成烯醇醚, 所以显然烯醇醚的形成对于运动内酯活性来说不是必需的。目前红霉素A可用来治疗运动失调, 甚至引起了其抗菌活性会提高产生耐药性微生物的担心。由于9-二氢红霉素也具有抗菌活性, 所以当其用作运动内酯时来有类似的担心。

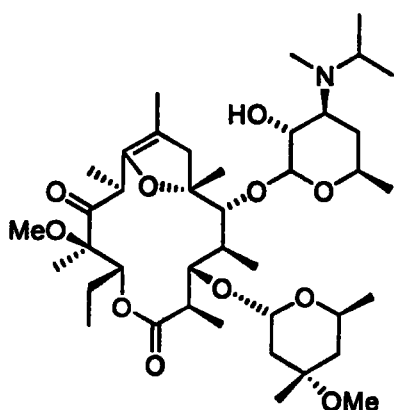
许多红霉素烯醇醚类似物已经制成为运动内酯, 包括EM-523 (4)、EM-574 (5)、LY267,108 (6)、GM-611 (7)、和ABT-229 (8), 其结构如下述。具体参见美国专利 5,578,579、5,658,888、5,922,849、6,077,943、和6,084,079, 它们的全部内容参考结合于此。



(4) 乙基
(5) 异丙基

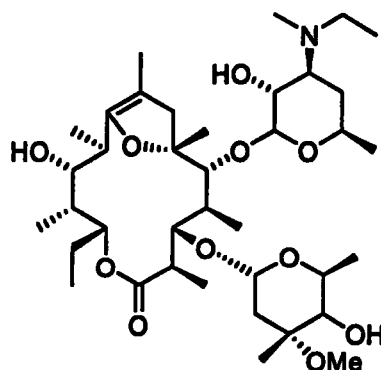


(6)



(7)

和



(8)

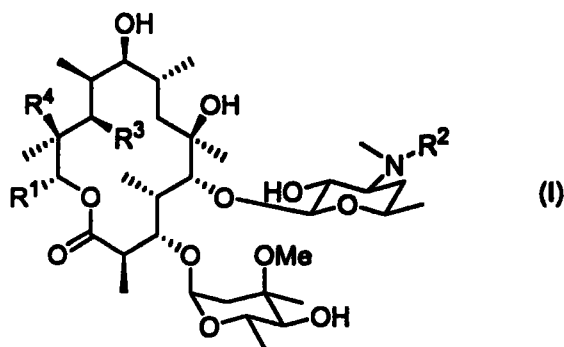
其他重要的运动内酯包括内酰胺烯醇醚和内酰胺环氧化物衍生物。具体参见美国专利5,712,253、5,523,401、5,523,418、5,538,961、和5,554,605，它们的全部内容参考结合于此。

不考虑红霉素烯醇醚作为运动内酯的高效能，它们的代谢不稳定性限制了它们的临床发展。而且，化合物如7和8在细胞为基础的和肌肉条收缩试验中表现出对促胃动素受体有脱敏作用。该脱敏作用可能预示对多剂量的运动内酯疗效下降。

因此，目前需要新的运动内酯化合物，它具有降低的抗菌活性、提高的代谢稳定性和降低的受体脱敏作用。本发明提供了符合该要求的9-二氢红霉素类似物。

发明内容

本发明一方面提供了式 (I) 表示的化合物:



及其药学上可接受的盐、酯、以及其前体药物形式，其中 R^1 是取代或未取代的 C_1 - C_{10} 烷基、取代或未取代的 C_2 - C_{10} 烯基、取代或未取代的 C_2 - C_{10} 炔基、取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的杂环基； R^2 是H、取代或未取代的 C_1 - C_5 烷基、取代或未取代的 C_2 - C_5 烯基、取代或未取代的 C_2 - C_5 炔基、取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的杂环基； R^3 是H或OH； R^4 是H或OH，或者 R^3 和 R^4 一起形成 $O-C(=O)-O$ ，条件是当(a) R^1 是乙基，(b) R^3 是OH，或者 R^3 和 R^4 一起形成 $O-C(=O)-O$ 时， R^2 不是H或甲基。

本发明的第二方面提供了一种治疗患胃运动失调的病人的方法，它包括将治疗有效量的本发明组合物给予病人。

本发明的第三方面提供了一种药物组合物，它包括本发明的化合物和药学上可接受的载体。

在第四方面，本发明的化合物 (I) 用来制备治疗患者胃运动失调的药物。

本发明的第五方面提供一种重组宿主细胞，它可产生11-脱氧红霉素（具体是11-脱氧红霉素B），以及它们表达的修饰的多聚乙酰（polyketide）合酶基因和用于基因工程改造它们的媒载体。所述11-脱氧红霉素可用作合成本发明化合物的中间体。所述重组宿主细胞具有 $eryAI$ 基因，所述基因通过用含有脱水酶功能域、烯酰还原酶功能域和酮还原酶功能域的盒（cassette）代替其模块2中的酮还原酶功能域作了基因改造。本发明的第六方面提供了一种产生11-脱氧红霉素的方法，它包括培养这种重组宿主细胞。

本发明的实施方式

定义

下述术语的定义可应用到本说明书、所附权利要求书所述的术语，除非另有其他明确说明。

“烷基”指直链或支链烃部分，在其链上具有一定数目的碳原子，或者当碳原子数不具体指定时，在其链上可具有高达5个碳原子。

“烯基”指具有至少一个碳—碳双键的直链或支链烃部分，其链上具有一定数目的碳原子，或者当碳原子数不具体指定时，在其链上可具有高达5个碳原子。

“炔基”指具有至少一个碳—碳三键的直链或支链烃部分，在其链上具有一定数目的碳原子，或者当碳原子数不具体指定时，在其链上可具有高达5个碳原子。

“烷芳基”、“芳烷基”、“杂环烷基”、“烷杂芳基”、“烷杂环基”等指直接链接于烷基部分的芳基、杂环基或杂芳基，如苯甲基、苯乙基等。

“芳基”指在环部分具有6—12个碳原子的单环或二环芳香族烃环体系，如苯基、萘基、和联苯基部分，它们各自可任选地在一个或多个位置上含有取代。

“环烷基”指任选取代的、饱和环状烃环体系，优选含1-3个环且每个环含3-7个碳原子，所述环可进一步与不饱和 C_3 - C_7 碳环稠合。示例性的环烷基环体系包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环癸基、环十二烷基和金刚基(adamantyl)。

“卤素”或“卤”指氟、氯、溴、和碘。

“杂环”、“杂环基”或“杂环族”指任选取代的、完全饱和或不饱和、芳香族或非芳香族环体系，例如4—7元单环、7—11元二环、或10—15元三环体系，在至少一个含碳环中具有至少一个杂原子。“杂芳基”指环体系是芳基的杂环。含杂原子的杂环基团的每个环可具有1、2或3个选自N、O和S的杂原子，其中N和S可任选氧化，N可任选季铵化。

示例性的单环杂环体系包括吡咯烷基、吡咯基、吡啶基、吡唑基、氮杂环丁烷基、吡唑啉基、咪唑基、咪唑啉基、咪唑烷基、噁唑基、噁唑烷基、异噁唑啉基、异噁唑基、噻唑基、噻二唑基、噻唑啉基、异噻唑基、异噻唑烷基、呋喃基、四氢呋喃基、噻吩基、噁二唑基、哌啶基、哌嗪基、2-氧代哌嗪基 (oxopiperazinyl)、2-氧代吡啶基 (oxopiperidinyl)、2-氧代吡咯烷基 (oxopiperidinyl)、2-噁氮杂基 (oxazepinyl)、氮杂基 (azepinyl)、4-哌啶酮基、吡啶基、N-氧代-吡啶基、吡嗪基、嘧啶碱基、哒嗪基、四氢吡喃基、四氢硫代吡嗪基、四氢硫代吡嗪基砜 (tetrahydrothiopyranyl sulfone)、吗啉基、硫代吗啉基、硫代吗啉基亚砜、硫代吗啉基砜、1,3-二氧戊烷和四氢-1,1-二氧噻吩基、二噁烷基、异噻唑烷基、thietanyl、thiiranyl、三嗪基、和三唑基等。优选的杂环基团包括吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡咯基 (pyrrolyl)、吡唑基、咪唑基、噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噻二唑基、噁二唑基、噻吩基、呋喃基、噻啉基、异噻啉基等。

“药学上可接受的酯”指在体内（例如在人体内）水解产生亲代化合物或其盐，或者本身具有与亲代化合物相同活性的酯。合适的酯基团包括，但不限于这些化合物，所述化合物衍生自药学上可接受的脂肪族羧酸酯，特别是链烷酸酯、链烯酸酯、环烷酸酯和链烷二酸酯，其中每个烷基或烯基部分优选具有不超过6个碳原子。示例性的酯包括甲酸酯、乙酸酯、丙酸酯、丁酸酯、丙烯酸酯、柠檬酸酯、琥珀酸酯和乙基琥珀酸酯。

“药学上可接受的盐”指适用于药学制剂的化合物的盐。合适的药学上可接受的盐包括酸加成盐，它例如可通过混合化合物溶液和药学上可接受的酸（如盐酸、氢溴酸、硫酸、富马酸、马来酸、琥珀酸、苯甲酸、乙酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、碳酸等）的溶液制得。当化合物带有一个或多个酸性部分时，药学上可接受的盐可通过用药学上可接受的碱溶液（如氢氧化锂、氢氧化钠、氢氧化钾、四烷基铵氢氧化物、碳酸锂、碳酸钠、碳酸钾、氨水、烷基胺等）处理所述化合物的溶剂制得。

当基团的特征为被取代时（如“取代烷基”、“取代烯基”等），这种基团可具有一个或多个独立选择的取代基，优选是1—5个、更优选1或2个取代基。可以理解，本领域的普通技术人员可选择取代基和取代位置，以得到化学稳定并且能用本领域已知的方法和本文所述方法合成的化合物。除了本文提到的这些，合适的取代

基的例子包括烷基、烯基、炔基、芳基、卤素、三氟甲氧基、三氟甲基、羟基、烷氧基、环烷氧基、杂环氧基、烷酰基、烷酰氧基、氨基、烷基氨基、季铵基、芳烷基氨基、环烷基氨基、杂环基氨基、二烷基氨基、烷酰基氨基、硫代、烷基硫代、环烷基硫代、杂环基硫代、脲基、硝基、氰基、羧基、羧烷基、氨基甲酰、烷氧基羰基、烷基硫羰基、芳基硫羰基、烷基磺酰基、磺酰氨基、芳氧基等。所述取代基还可被例如卤素、羟基、烷基、烷氧基、芳基、取代芳基、取代烷基、取代芳烷基等取代。

除非具体指明具体的立体异构体（例如在结构式中，在相应的立构中心用黑体或破折号键表示），所有的立体异构体作为纯化合物以及其混合物都包含在本发明的范围内。除非有其他说明，各对映异构体、非对映异构体、几何异构体及其组合和混合物都包含在本发明的范围内。多态性晶体形式和溶剂化物也包含在本发明的范围内。

本发明的范围也包括本发明化合物的前体药物。这种前体药物通常是所述化合物的能在体内转变成所需化合物的功能衍生物。因此，在本发明的治疗方法中，术语“给药”应包括用具体公开的化合物或并没有具体公开但在给药后能在体内根据需要转变成特定化合物的药物来治疗所述的各种疾病。选择和制备合适前体药物衍生物的常规程序可参见例如 *Design of Prodrugs*, Bundgaard 编, Elsevier, 1985 年。

化合物和方法

在一个实例中，提供了式 (I) 表示的化合物，其中 R^1 是取代或未取代 C_1 - C_{10} 烷基、取代或未取代 C_2 - C_{10} 烯基、取代或未取代 C_2 - C_{10} 炔基、取代或未取代芳基、或者取代或未取代杂环； R^2 是 H、乙基、丙基、异丙基、或 2-丁基； R^3 是 H 或 OH； R^4 是 H 或 OH，或者 R^3 和 R^4 一起形成 $O-C(=O)-O$ ，条件是当 R^1 是乙基， R^3 是 OH，或者 R^3 和 R^4 一起形成 $-C(=O)-O$ 时， R^2 不是 H 或甲基。

在本发明的另一个实例中，提供了式 (I) 表示的化合物，其中 R^1 是取代或未取代 C_1 - C_5 烷基； R^2 是 H、取代或未取代 C_1 - C_5 烷基、取代或未取代 C_2 - C_5 烯基、或者取代或未取代 C_2 - C_5 炔基； R^3 是 H 或 OH； R^4 是 H 或 OH，或者 R^3 和 R^4 一起形成 $O-C(=O)-O$ ，

条件是当(a)R¹是乙基, 且(b) R³是OH, 或者R³和R⁴一起形成O-C(=O)-O时, R²不是H或甲基。

在本发明的另一个实例中, 提供了式(I)表示的化合物, 其中R¹是乙基; R²是取代或未取代C₂-C₅烷基、取代或未取代C₂-C₅烯基、或者取代或未取代C₂-C₅炔基; R³是H或OH; R⁴是H或OH, 或者R³和R⁴一起形成O-C(=O)-O。

在本发明的另一个实例中, 提供了式(I)表示的化合物, 其中R¹是乙基; R²是乙基、丙基、异丙基、或2-丁基; R³是H或OH; R⁴是H或OH, 或者R³和R⁴一起形成O-C(=O)-O。

在本发明的另一个实例中, 提供了式(I)表示的化合物, 其中R¹是取代乙基; R²是H、取代或未取代的C₁-C₅烷基、取代或未取代的C₂-C₅烯基、或者取代或未取代的C₂-C₅炔基; R³是H或OH; R⁴是H或OH, 或者R³和R⁴一起形成O-C(=O)-O。

在本发明的另一个实例中, 提供了式(I)表示的化合物, 其中R¹是氟乙基或叠氮基乙基; R²是H、取代或未取代的C₁-C₅烷基、取代或未取代的C₂-C₅烯基、或者取代或未取代的C₂-C₅炔基; R³是H或OH; R⁴是H或OH, 或者R³和R⁴一起形成O-C(=O)-O。

在本发明的另一个实例中, 提供了式(I)表示的化合物, 其中R¹是取代的乙基; R²是H、乙基、丙基、异丙基、或2-丁基; R³是H或OH; R⁴是H或OH, 或者R³和R⁴一起形成O-C(=O)-O。

在本发明的另一个实例中, 提供了式(I)表示的化合物, 其中R¹是氟乙基或叠氮基乙基; R²是H、乙基、丙基、异丙基、或2-丁基; R³是H或OH; R⁴是H或OH, 或者R³和R⁴一起形成O-C(=O)-O。

在本发明的另一个实例中, 提供了式(I)表示的化合物, 其中R¹是丙基; R²是H、取代或未取代的C₁-C₅烷基、取代或未取代的C₂-C₅烯基、或者取代或未取代的C₂-C₅炔基; R³是H或OH; R⁴是H或OH, 或者R³和R⁴一起形成O-C(=O)-O。

在本发明的另一个实例中, 提供了式 (I) 表示的化合物, 其中 R^1 是丙基; R^2 是H、乙基、丙基、异丙基、或2-丁基; R^3 是H或OH; R^4 是H或OH, 或者 R^3 和 R^4 一起形成O-C(=O)-O。

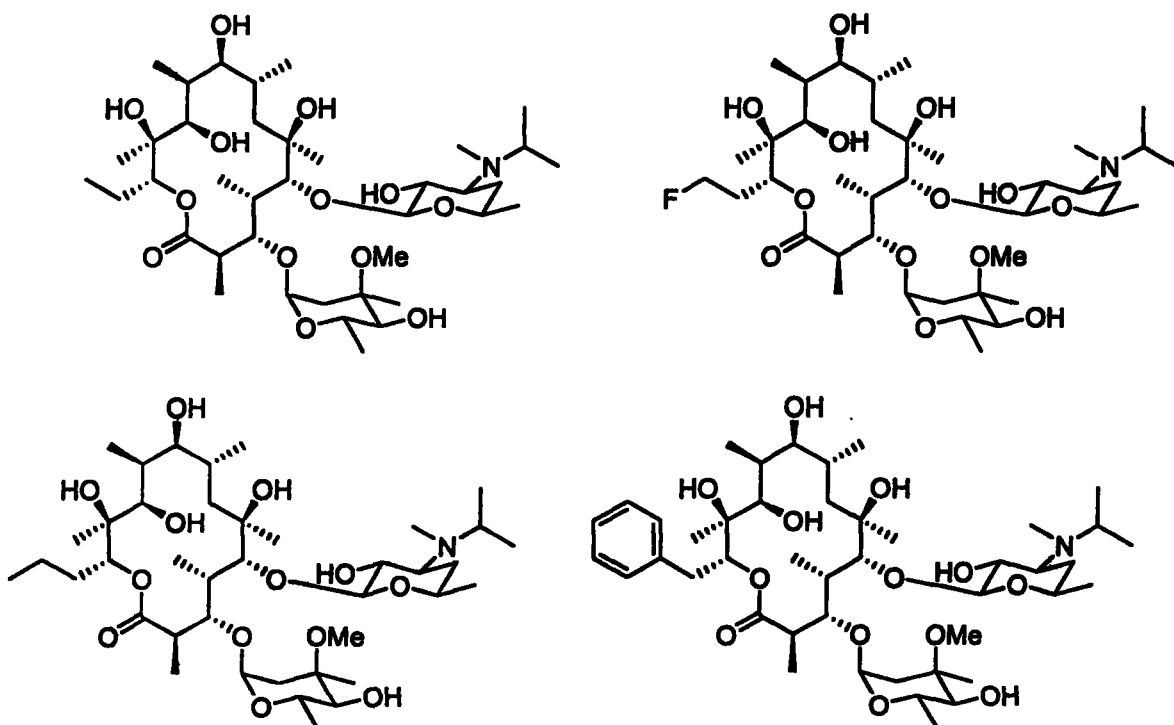
在本发明的另一个实例中, 提供了式 (I) 表示的化合物, 其中 R^1 是乙烯基、丁基、苯甲基、丁-3-稀-1-基、苯基、或4-羟基苯基; R^2 是H、取代或未取代的 C_1 - C_5 烷基、取代或未取代的 C_2 - C_5 烯基、或者取代或未取代的 C_2 - C_5 炔基; R^3 是H或OH; R^4 是H或OH, 或者 R^3 和 R^4 一起形成O-C(=O)-O。

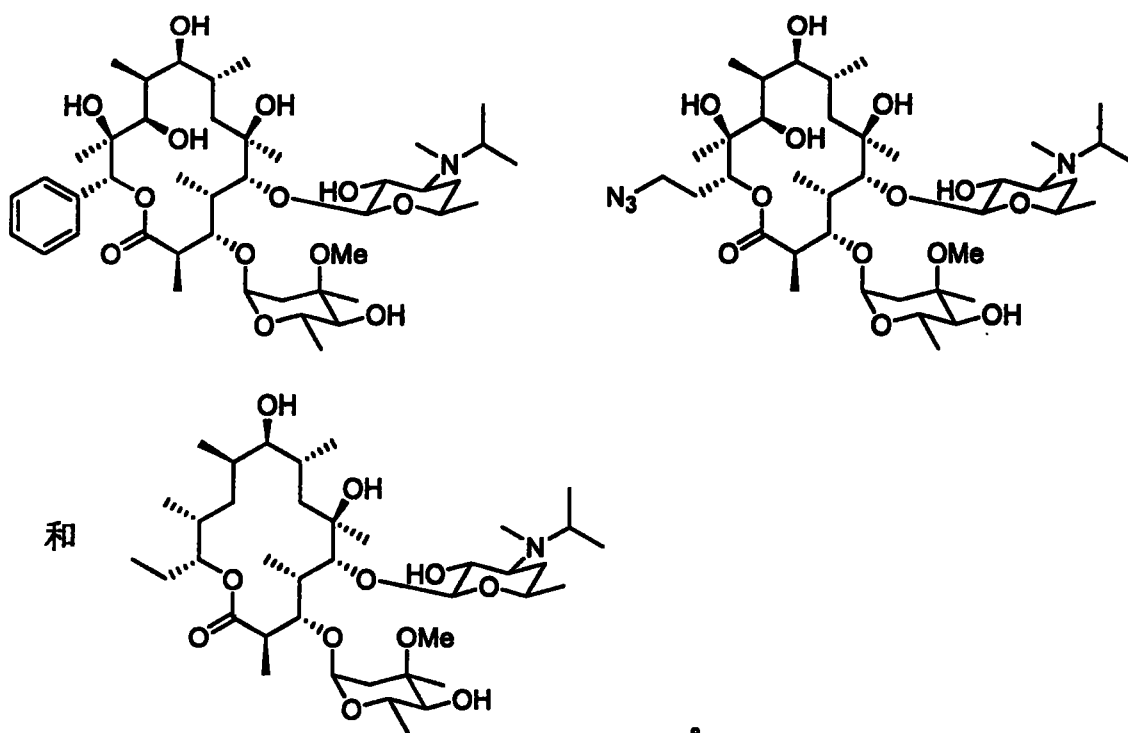
在本发明的另一个实例中, 提供了式 (I) 表示的化合物, 其中 R^1 是乙烯基、丁基、苯甲基、丁-3-稀-1-基、苯基、4-羟基苯基; R^2 是H、乙基、丙基、异丙基、或2-丁基; R^3 是H或OH; R^4 是H或OH, 或者 R^3 和 R^4 一起形成O-C(=O)-O。

在本发明的另一个实例中, 提供了式 (I) 表示的化合物, 其中 R^3 和 R^4 各自是H或OH; R^1 选自乙基、2-氟乙基和1-丙基; R^2 选自甲基、乙基、异丙基和2-丁基; 条件是当 R^1 是乙基且 R^3 是OH时, R^2 不是甲基。

在另一个实例中, R^1 是取代或未取代的 C_1 - C_5 烷基(优选是乙基); R^2 是H、甲基、乙基、丙基、异丙基、或2-丁基; R^3 是H; R^4 是H或OH。

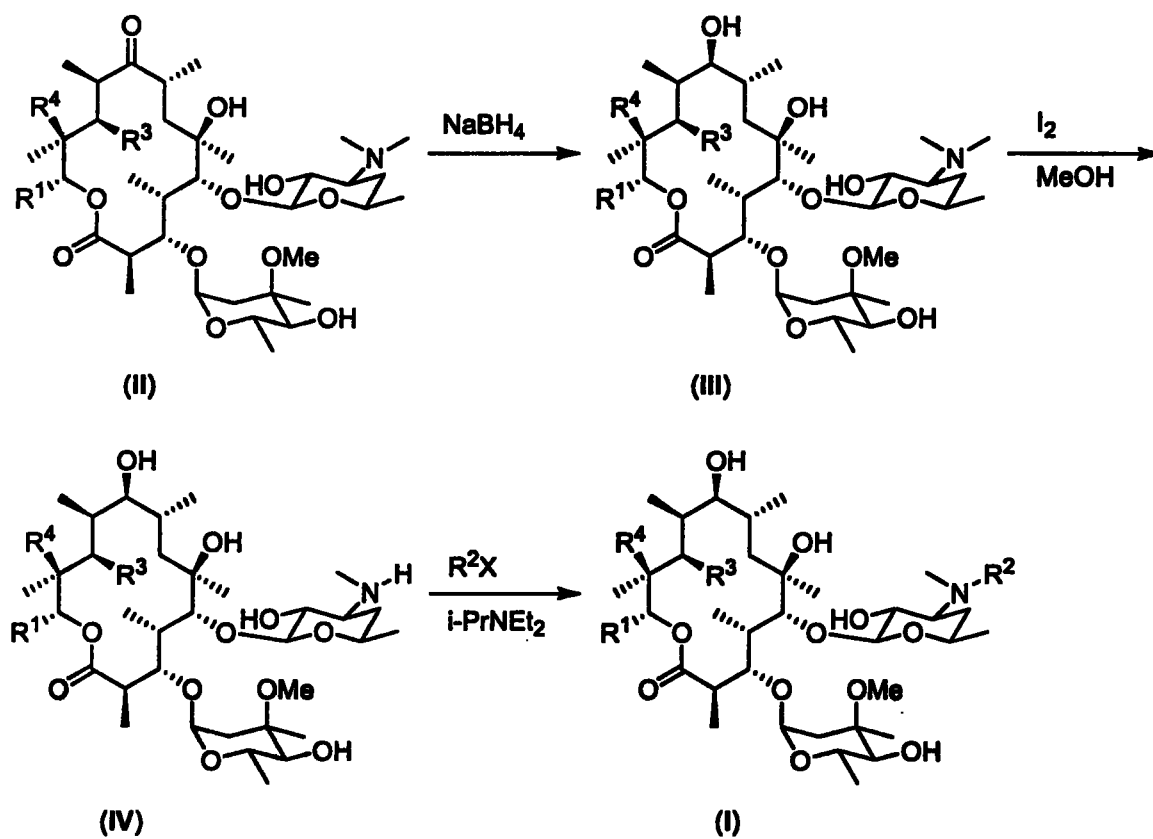
在本发明的另一个实例中, 提供了具有下述结构的化合物:





本发明的另一个方面提供了制备式 (I) 表示的化合物的方法。在一个实例中，式 (I) 表示的化合物由流程1所述的相应红霉素 (II) 制得。

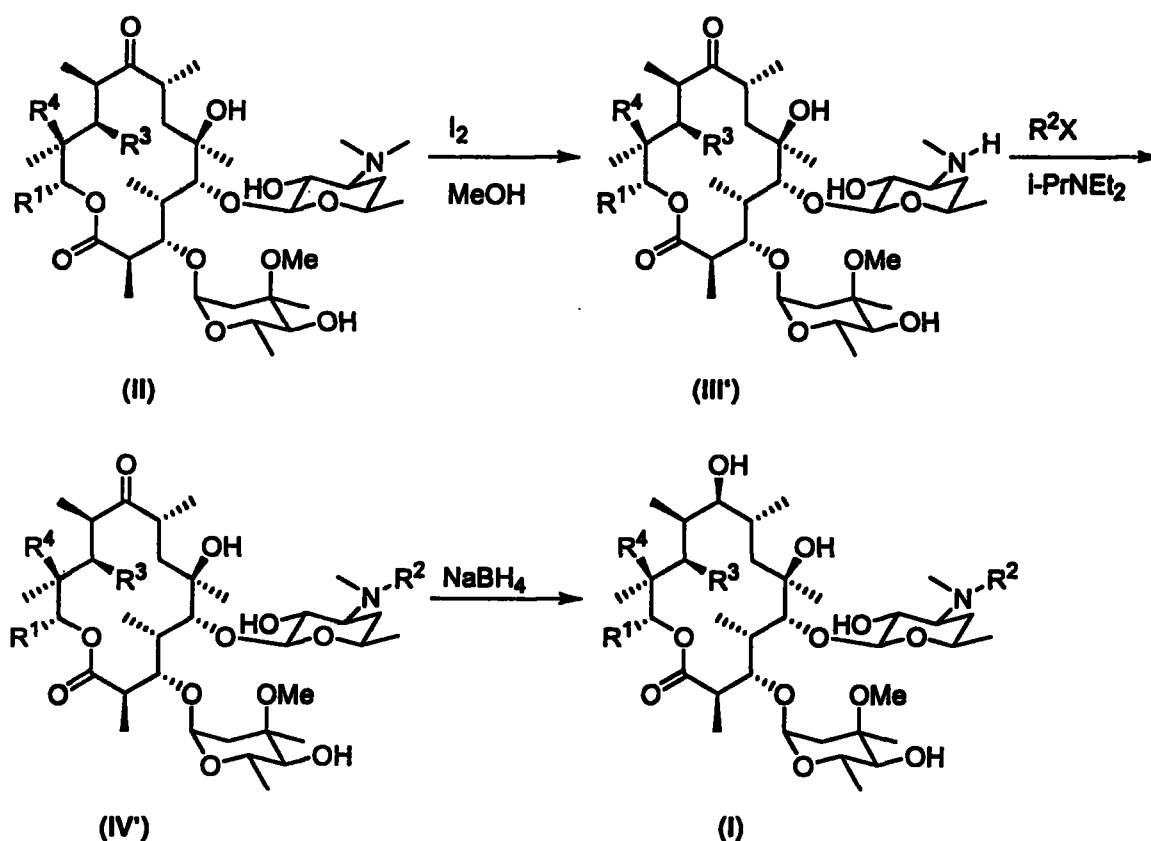
流程 1



在该实例中，红霉素（II）用硼氢化钠的甲醇溶液处理，得到(9S)-9-二氢红霉素(III)。化合物（III）可例如用缓冲甲醇配的碘和光照（light），或者使用乙腈配的 N-碘琥珀酰亚胺去甲基化，得到化合物（IV）。如上述用 R^2X （其中 R^2 如上述，X 是卤素（优选是溴或碘）、或磺酸盐（优选是三氟乙酸或甲苯磺酸盐））使化合物（IV）在碱（如 N,N-二异丙基乙基胺）存在下烷基化，得到式（I）表示的化合物。

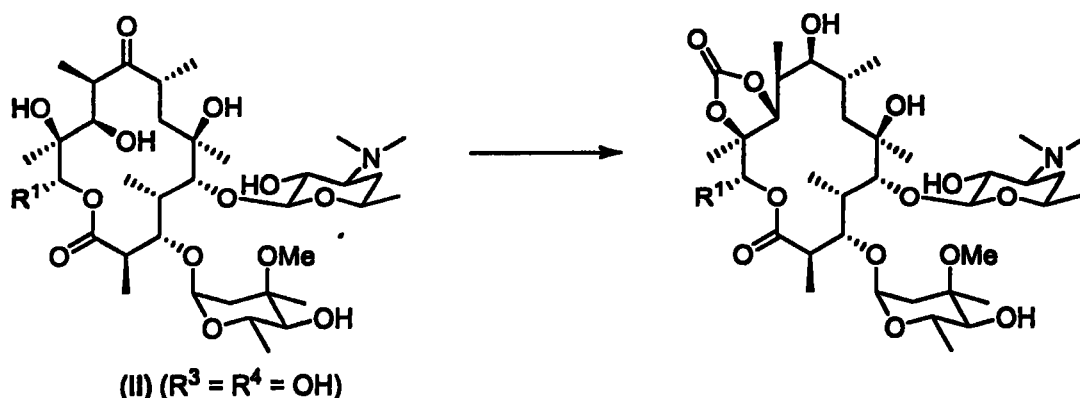
或者，去甲基化/烷基化步骤和硼氢化物还原步骤的顺序可以掉过来，具体如流程1A所示：

流程 1A



在本发明的另一个实例中，如流程2所述制得了红霉素（II），其中 R^3 和 R^4 一起形成了 $O-C(=O)-O$ 。

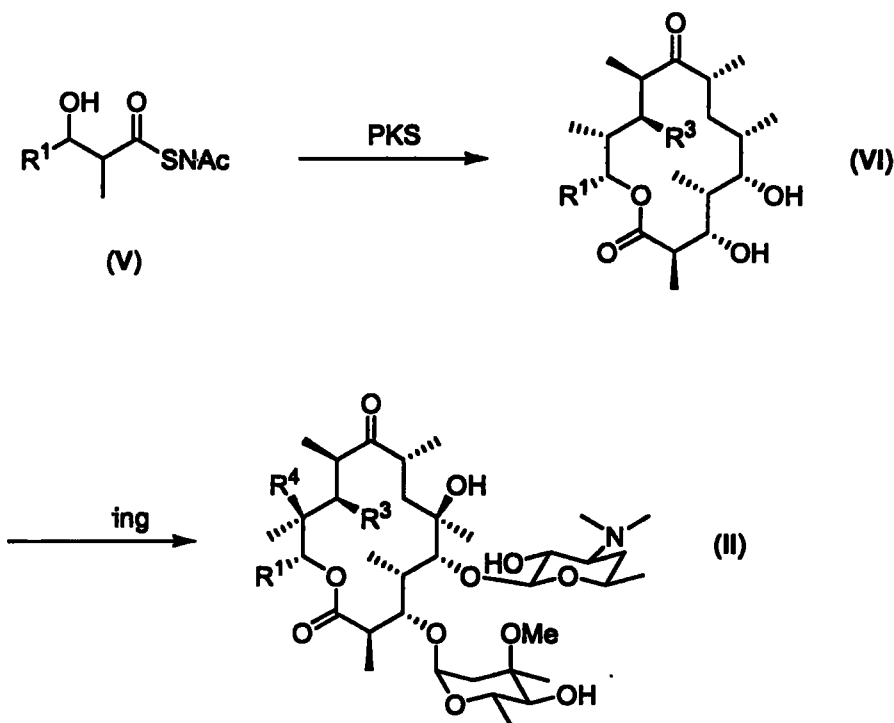
2



红霉素(II)(其中 R^3 和 R^4 都是OH)与羰基化试剂(例如碳酸乙二酯或1,1-羰基二咪唑)在碱(例如碳酸钾或4-(二甲基氨基)吡啶存在下反应,得到11,12-环状碳酸酯。然后,所述环状碳酸酯可根据流程1所述的方法转变成最终产品。

式(II)表示的红霉素如流程3所述制得,具体参见美国专利6,066,721; 6,261,816; 和6,395,710,它们的全部内容参考结合于此。

流程 3



总之,式(V)表示的二聚乙酰(diketide)硫酯可提供给多聚乙酰合酶,产生结构式(VI)表示的多聚乙酰。二聚乙酰硫酯的制备可参见WO 00/44717,其全部内容参考结合于此。在本发明中,所述多聚乙酰合酶是6-脱氧红诺霉素B

合酶或 8,8a-脱氧夹竹桃内酯 (deoxyoleandolide) 合酶。6-脱氧红诺霉素 B 合酶的适当例子可参见例如美国专利 5,824,513 所述的红色糖多孢菌和 WO 01/27284 所述的黑孢小单孢菌, 它们的全部内容参考结合于此。8,8a-脱氧夹竹桃内酯合酶的例子可参见美国专利 6,251,636 所述的抗生素链霉菌, 其全部内容参考结合于此 i。这些多聚乙酐合酶已进行过修饰, 以防止它们的天然起始单元 (native starter unit) 掺入。突变多聚乙酐合酶以防止天然起始单元掺入 (例如通过灭活模块 1 的酮合酶 (ketosynthase)) 的方法可参见美国专利 6,066,721, 其全部内容参考结合于此。

当如美国专利 6,080,555 (其全部内容参考结合于此) 所述, 二聚乙酐硫酯 (V) 可提供给细胞内游离形式的多聚乙酐合酶时, 更方便的是将 (V) 提供给能表达突变多聚乙酐合酶的生物培养物。所述生物可以是放线菌 (如链霉菌属或糖多孢菌属, 优选是天蓝色链霉菌, 具体参见美国专利 6,066,721 和 PCT 公开 WO 01/83803), 或者非放线菌 (如大肠杆菌或酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevesiae*), 具体参见 WO 01/31035), 它们的全部内容都参考结合于此。可任选从培养培养基中分离出产生的多聚乙酐 (VI)。该工艺的一种方法可具体参见下述实施例 1 所述。使用天然多聚乙酐合酶, 可制得 $R^3=OH$ 的多聚乙酐。

在本发明的一个实例中, 所述天然多聚乙酐合酶可变异, 以产生 $R^3=H$ 的多聚乙酐。产生合适突变多聚乙酐合酶的方法可参见例如美国专利 6,391,594 和 6,403,775, 它们的全部内容都参考结合于此。

多聚乙酐 (VI) 可通过一系列定制 (tailoring) 步骤转变成红霉素 (II), 所述定制步骤包括在 C-6 羟基化, 在 3-OH 上加入碳霉糖 (mycarose), 在 5-OH 上加入去氧糖胺, 在 C-12 羟基化, 在碳霉糖的 3"-OH 甲基化。红霉素的其他形式可使用定制酶 (tailoring enzyme) 的合适亚组来制得。例如, 红霉素 B ($R^4=H$) 可通过省略在 C-12 的羟基化来制得。

所述定制最方便是将多聚乙酐提供给能表达用于转变的所有必需酶的生物培养物, 例如红色糖多孢菌的突变种包括无活性多聚乙酐合酶, 具体参见美国专利 6,395,710, 其全部内容参考结合于此。用于该工艺的一种方法具体参见下述实施例 2。

式(I)表示的化合物是肠胃动素受体的激动剂。表1描述了激活肠胃动素受体的EC₅₀值, 根据Carreras 等人的*Anal. Biochem.* 300, 146-151 (2002年)中所述的钙-流入试验测得, 其全部内容参考结合于此。

表 1 促胃动素受体活性					
化合物编号	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	EC ₅₀ (μM)
红霉素 A ¹	CH ₃ CH ₂	CH ₃	OH	OH	1.1
A ¹	CH ₃ CH ₂	CH ₃	OH	OH	2.5
B	CH ₃ CH ₂	CH(CH ₃) ₂	OH	OH	0.49
C	FCH ₂ CH ₂	CH ₃	OH	OH	5
D	FCH ₂ CH ₂	CH ₂ CH ₃	OH	OH	2
E	FCH ₂ CH ₂	CH(CH ₃) ₂	OH	OH	0.52
F	CH ₃ CH ₂ CH ₂	CH ₃	OH	OH	8.6
G	CH ₃ CH ₂ CH ₂	CH(CH ₃) ₂	OH	OH	1.4
H	CH ₃ CH ₂ CH ₂	C(CH ₃)CH ₂ CH ₃	OH	OH	3.3
J	CH ₃ CH ₂	CH(CH ₃) ₂	H	H	0.16

¹ 不属于本发明的比较化合物

Compound-Kosan # 关系: A = 152-44; B = 152-48; C = 152-92; D = 152-94; E = 152-93; F = 152-81; G = 152-83; H = 152-111; J = 1468

使用微生物领域已知的方法, 通过体外抗肺炎链球菌ATCC 6301 (一种大环内酯敏感株) 测试抗菌活性 (表2)。

表 2	
对于 ATCC 6301 的体内最小抑制浓度	
化合物	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
红霉素 A	0.03
A	0.3
F	1
G	>100
J	>100

使用细胞为基础的试验（参见Carreras等人US 2002/0192709 A1 (2002年)，“评价治疗效率的方法”，其全部内容参考结合于此）测试化合物对促胃动素受体的脱敏作用。如下表3所示，在接触1或10 μM 的测试化合物后，所述化合物没有表现出或表现出很少的脱敏作用。

表 3		
肠胃动素受体去敏作用		
化合物	暴露给化合物后的活性 (保留的原始活性的%)	
	1 μM 化合物	10 μM 化合物
F	100	100
G	100	100
J	88	88

本发明的另一方面提供了使用式 (I) 表示的化合物治疗肠运动损伤的方法。通常，使用本发明化合物的方法包括将治疗有效量的本发明化合物给药给需要治疗的

病人。可用本发明化合物治疗的疾病的例子包括但不限于胃轻瘫、胃食管返流疾病、厌食、胆囊淤积、手术后麻痹性肠梗阻、硬皮病、肠假性梗阻、胃炎、呕吐和慢性便秘（结肠无力）。

治疗有效量可表示为本发明化合物的总日剂量，并且可以单次或多次剂量给药给病人。所述总日剂量可以是例如约0.01-10毫克/千克体重，更优选是约0.1-2毫克/千克体重。单次剂量组合物可包含上述数量或其约数，以组成日剂量。通常，本发明的治疗方式包括，每天分一次或多次剂量将约10-1000毫克本发明化合物给药给需要治疗的病人。

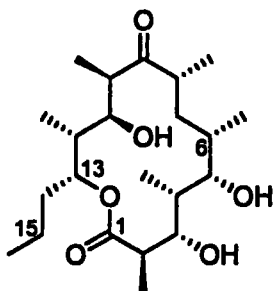
通常，本发明化合物可组成药物组合物或制剂的一部分，所述制剂可以是任何合适的形式，如固体、半固体、或液体形式。通常，所述药物制剂可包含一种或多种作为活性组分的本发明化合物和药学上接受的载体。通常，所述活性组分位于适合于外部、肠胃内、或肠胃外施用的有机或无机载体的混合物中，或位于赋型剂中。所述活性组合物可与例如常规无毒、药学上可接受的用于片剂、丸剂、胶囊、栓剂、阴道栓剂、溶液、乳化液和任何其他适用形式的载体混合（compound）。口服试剂形式可参见Hondo等人，1987，*Transplantation Proceedings XIX*, Supp. 6: 17-22进行制备，其全部内容参考结合于此。

可用载体包括水、葡萄糖、乳糖、阿拉伯树胶、明胶、甘露醇、淀粉糊浆、三硅酸镁、滑石、玉米淀粉、角蛋白、胶状二氧化硅、马铃薯淀粉、尿素、和其他适合用来制造制剂的载体，其形式为固体、半固体或液体形式。另外，可使用稳定性辅助剂、增稠剂、和着色剂以及芳香剂。例如，本发明的化合物可与羟丙基甲基纤维素一起使用，具体参见美国专利4,916,138（其全部内容参考结合于此），或者与表面活性剂一起使用，具体参见EPO公开428,169，其全部内容参考结合于此。

总之，本发明提供了运动内酯化合物，制造和使用所述运动内酯化合物的方法，它可有下列实施例进一步描述，但并没有局限于此。

实施例1

本实施例描述了制造15-甲基-6-脱氧红诺霉素B (也称为13-丙基-6-dEB或15-甲基-6-dEB)，它是用来合成本发明的特定化合物的中间体。（其他红诺霉素也是类似命名的；例如在15位由氟原子取代甲基的红诺霉素称为15-氟-6-dEB）。



15-甲基-6-脱氧红诺霉素 B

解冻1毫升小瓶内的CH999/pJRJ2 (天蓝色链霉菌，它包含PKS，其中模块1的酮合酶功能域通过突变而失活) 工作细胞库 (working cell bank)，并且将小瓶的内含物加入到250毫升具塞烧瓶内的50毫升培养基1中。

培养基1包含45克/升玉米淀粉、10克/升玉米浆、10克/升干的、灭活啤酒酵母、和1克/升 CaCO_3 。该溶液在121℃的高压锅中灭菌90分钟。灭菌后，在使用前加入1毫升/升除菌过滤的用100%DMSO配的50毫克/毫升硫链丝菌肽 (thiostrepton) 和1毫升/升高压锅灭菌的100%放泡沫B硅乳化液 (J.T. Baker)。

将含解冻细胞和培养基1的烧瓶在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 和175±25RPM的培养器/混合器中放置 48 ± 10 小时。然后，将50毫升培养物放入2.8升含500毫升培养基1的具塞烧瓶中。该烧瓶在 $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 和175±25RPM的培养器/混合器中培养 48 ± 10 小时。然后，使用500毫升培养物接种含5升培养基1的10升发酵罐 (fermenter)。所述发酵罐控制在 30°C ，通过加入2.5N H_2SO_4 和2.5 N NaOH将pH调节到6.5，搅动速率为600 RPM，空气流动速率为1-2 LPM。通过加入所需的50%放泡沫B溶液控制起泡。使所述发酵罐培养物在这些条件下生长 24 ± 5 小时。

通过在121℃将100升的培养基1灭菌45分钟准备好150升的发酵罐。生长期后，来自10升发酵罐的内含物在无菌条件下加入到150升发酵罐中。所述发酵罐控制在 30°C ，通过加入2.5 N H_2SO_4 和2.5 N NaOH将pH调节到6.5，通过调节搅动速率(500-700

RPM)使溶解的氧 $\geq 80\%$ 空气饱和度, 空气流动速率(10-50 LPM), 和/或反压控制(0.1-0.4巴)。通过加入所需的50%放泡沫B溶液控制起泡。

在 35 ± 5 小时, 在溶解的氧达到最小, 且发酵罐废气中 CO_2 含量达到最大后, 加入(±)-(2*R**, 3*S**)-2-甲基-3-羟基己酰-N-丙酰半胱胺(丙基二聚乙酰), 使之最终浓度为4克/升。丙基二聚乙酰可如下制备: 以2: 3(二聚乙酰: DMSO)制备溶解在甲基亚砷中, 然后过滤除菌(0.2微米, 尼龙过滤器)。将第8天停止产生15-甲基-6-脱氧红诺霉素B(13-丙基-6-dEB), 收集发酵物。在Alpha Laval AS-26离心分离机中以20500克离心所述发酵肉汤。所述产物主要在上清液中; 丢掉离心后的细胞团块。

离心分离后, 使用HP20树脂(Mitsubishi)进行固相抽提。根据上清液体积和滴度选择柱尺寸, 不致超过15克15-甲基-6-dEB每升HP20树脂的负载能力。离心分离得到的肉汤(broth)以 300 ± 20 厘米/小时的线性流速通过该树脂床。柱的压力应该不超过15psi。然后所述树脂用2倍柱体积(CV)的水清洗, 再用2CV的30%甲醇清洗, 它们的速率都为 300 ± 20 厘米/小时。13-丙基-6-dEB用7-10 CV 100%甲醇以 300 ± 20 厘米/小时洗提。在洗提过程中, 收集1CV的诸组分。然后分析诸组分, 将含有产物的组分合并得到离心分离肉汤中含 $>95\%$ 原始15-甲基-6-dEB的合并产物(product pool)。使用旋转蒸发将所述合并产物减少成固体。在该阶段产物纯度为5—35%。通过将固体悬浮在3升100%甲醇每100升体积初始肉汤(broth), 混合20分钟, 并过滤, 将不溶于甲醇的物质从合并产物中除去。

最终的纯化步骤是使用HP20SS树脂(Mitsubishi)的层析方法。根据产物的量选择柱体积, 不致超过15克15-甲基-6-dEB每升HP20SS树脂的负载能力。过滤的甲醇通过加入等体积的水稀释。使50%的甲醇溶液以 300 ± 20 厘米/小时的线性速率通过树脂床。然后用2CV的50%甲醇以 300 ± 20 厘米/小时的速率清洗此柱。产物用12CV的70%甲醇以 300 ± 20 厘米/小时的速率洗提。在洗提过程中, 收集1CV的诸组分。然后分析诸组分, 将含有 >50 毫克/升的15-甲基-6dEB, 并具有 $>20\%$ 色谱纯度的那些组分合并。通过旋转蒸发将所述合并产物减少成固体。在该阶段产物纯度 $>65\%$, 并适合于生物转化为相当的红霉素。

根据相似的方法可制备其他修饰的6-dEB类似物, 如在丙基二聚乙酰的位置取代相应的二聚乙酰硫酸酯。因此, 可使用(±)-(2*R*³; 3*S*³)-5-氟-2-甲基-3-羟基戊酰-N-丙酰半胱胺制备15-氟-6-dEB。而且, 15-甲基-6-dEB和15-氟-6-dEB的合成可参见Ashley等人的WO 00/44717 A2 (2000年), 其全部内容参考结合于此。

实施例2

本实施例描述了将15-甲基-6-脱氧红诺霉素B转化成15-甲基红霉素A (式II, $R^1 = -CH_2CH_2CH_3$; $R^3 = R^4 = OH$)。转化技术也可参见Carreras等人的*J. Biotechnology*, 92, 217-228页(2002年), 其全部内容参考结合于此。

解冻1毫升小瓶中的工作细胞库K39-14V(红色糖多孢菌的一种*eryA*突变株, 它不能产生6-dEB), 将小瓶的内含物加入到250毫升具塞烧瓶中的50毫升培养基2中。

培养基2包括16克/升玉米淀粉、10克/升玉米糊精、15克/升大豆粉(soy meal flour)、4克/升CaCO₃、5克/升玉米浆、6克/升大豆油、2.5克/升NaCl、和1克/升(NH₄)₂SO₄。该溶液用121℃的高压锅灭菌60分钟, 在使用前加入1毫升/升的高压锅处理的100%放泡沫B硅乳化液。

将含解冻细胞和培养基2的烧瓶在34±1℃和175±25RPM的培养器/混合器中放置48±10小时。然后, 将50毫升培养物加入到含500毫升培养基2的2.8升具塞烧瓶中。所述烧瓶在34±1℃和175±25RPM的培养器/混合器中培养48±10小时。然后, 使用500毫升培养物来接种含5升培养基2的10升发酵罐。所述发酵罐控制在34℃, 通过加入2.5 N H₂SO₄和2.5 N NaOH将pH调节到7.0, 搅动速率为600RPM, 空气流速1-2 LPM。通过加入所需的50%放泡沫B溶液来控制起泡。使所述发酵培养物在这些条件下生长24±5小时。

通过在121℃、在45分钟内灭菌100升培养基3准备好150升的发酵物。培养基3包括17.5克/升玉米淀粉、16克/升玉米糊精、16.5克大豆粉、4克/升CaCO₃、6克/升玉米浆、3克/升大豆油、3.5克/升NaCl、和1克/升(NH₄)₂SO₄。生长期后, 将来自10升发酵罐的内含物在无菌条件下转移到150升发酵罐中。所述发酵罐控制在34℃, 通过加入2.5 N H₂SO₄和2.5 N NaOH将pH调节到7.0, 通过搅动速率(500-700 RPM)调

节使溶解氧 $\geq 80\%$ 空气饱和度, 空气流动速率(15-50 LPM), 和/或反压控制(0.1-0.4 巴)。通过加入50%放泡沫B的溶液控制起泡。

在 24 ± 5 小时后, 开始以58-60毫升/小时进料15%糊精(w/v)。在进料过程中连续混合所述糊精溶液。在 24 ± 5 小时内向所述发酵罐加入25克13-丙基-6dEB。将25克13-丙基-6dEB溶解在400-600毫升100%乙醇中, 并过滤(0.2微米, 尼龙过滤器), 制得13-丙基-6dEB。在 60 ± 10 小时后停止13-丙基-6dEB到13-丙基-红霉素A的转化, 获得发酵物。在Alpha Laval AS-26离心分离机中以20500克离心发酵肉汤。所述产物主要位于上清液中; 丢掉离心后的细胞团块。

离心分离后, 使用HP20树脂(Mitsubishi)进行固相抽提。根据上清液体积和滴定度选择柱尺寸, 不致超过15克15-甲基红霉素A每升HP20树脂的负载能力。离心分离的肉汤调节到pH9, 然后以 275 ± 25 厘米/小时的线性速率通过树脂床。柱子的压力应该不超过15psi。接着, 用1柱体积(CV)的水以 275 ± 25 厘米/小时的速率清洗树脂。使用5CV100%甲醇以 275 ± 25 厘米/小时的速率洗提15-甲基红霉素。在洗提过程中, 收集1CV诸组分。然后分析诸组分, 将含有产物的那些组分合并得到合并的产物。使用旋转蒸发将所述合并的产物减少成固体。

将所述固体悬浮在1升100%甲醇每100升初始肉汤体积中, 调节到pH9, 并过滤, 除去该合并产物中不溶于甲醇的物质。使用旋转蒸发将所述合并的产物(过滤物)减少成固体。

加入2升4: 1己烷: 丙酮每100升体积初始肉汤, 混合20分钟, 然后过滤, 从所述合并的产物(固体)中抽提15-甲基红霉素A。以相同的方法再进行2次, 抽提剩余的固体, 合并过滤物。使用旋转蒸发将合并的产物减少成固体。

最终纯化步骤是使用HP20SS树脂(Mitsubishi)的层析法。根据产物的量选择柱尺寸, 不致超过15克15-甲基红霉素A每升HP20SS树脂的负载能力。将前一步骤得到的固体溶解在1升甲醇每100升体积初始肉汤中, 并加入相等体积的水。使50%甲醇溶液以 275 ± 25 厘米/小时线性速率通过树脂床。然后, 用1CV50%甲醇, 接着用3CV60%甲醇清洗层析柱, 它们的速率都是 275 ± 25 厘米/小时。使用3CV70%甲醇, 然后10CV75%甲醇洗提产物, 它们的速率都是 275 ± 25 厘米/小时。在洗提过程中, , 收

集1CV的诸组分。然后，分析诸组分，将包含15-甲基红霉素A的那些组分合并。使用旋转蒸发将所述合并的产物减少成固体。

使用相同的方法可制备其他修饰的红霉素，在15-甲基-6-dEB的位置取代相应的6-dEB类似物。因此，15-氟红霉素A可使用15-氟-6-dEB制得。

实施例3

本实施例描述了制备 (9S)-9-二氢红霉素(式II)的常规方法，具体参见流程1。

将红霉素（0.36毫摩尔）的1: 3乙醇/乙醚（20毫升）溶液冷却到-15 °C，并用硼氢化钠（0.9毫摩尔）处理。在4小时内，使所述反应物缓慢变暖到环境温度。通过加入pH为6的磷酸盐缓冲液除去过量的硼氢化物，并加入10毫升三乙醇胺。1小时后，用乙酸乙酯抽提混合物，用MgSO₄干燥，过滤，并减压浓缩到干燥。通过使用1: 1丙酮-己烷和1%三乙胺进行二氧化硅凝胶层析纯化产物。使用该程序制备下述化合物：

(9S)-9-二氢红霉素A；
(9S)-9-二氢-15-甲基红霉素A； 和
(9S)-9-二氢-15-氟红霉素A。

实施例4

本实施例描述了制备N-脱甲基（desmethyl）-(9S)-9-二氢红霉素(式III)的常规方法，具体参见流程1。

在10毫升8: 2甲醇/水配的(9S)-9-二氢红霉素溶液（150毫克）依次加入乙酸钠三水合物(139毫克)和碘(52毫克)。在1小时内，分4部分加入0.2 M LiOH（1毫升）溶液。通过薄层色谱分析确定完全反应。通过加入饱和硫代硫酸钠溶液淬灭过量试剂，减压除去挥发物，并用乙酸乙酯抽提所述混合物。用饱和NaHCO₃清洗所述有机相，用Na₂SO₄干燥，过滤并浓缩得到粗产物。通过二氧化硅凝胶层析(丙酮/己烷 + 2% Et₃N)得到了纯产物。使用该程序制得下述化合物：

N-脱甲基(9S)-9-二氢红霉素A；

N-脱甲基(9S)-9-二氢-15-甲基红霉素A；和
N-脱甲基(9S)-9-二氢-15-氟红霉素A。

实施例5

本实施例描述了制备N-脱甲基-N-R²-(9S)-9-二氢红霉素，具体参考流程1，化合物用式II(R³=R⁴=OH)表示。

密封N-脱甲基(9S)-9-二氢-红霉素A类似物(0.035毫摩尔)、二异丙基乙胺(62.5微升)、R²I (1.3毫摩尔)、和乙腈(1毫升)的混合物，并在70 °C搅拌过夜。冷却所述混合物，用水性NaHCO₃稀释，并用乙酸乙酯抽提。所述抽提物用MgSO₄干燥，过滤，并蒸发到干燥。通过使用2: 1己烷/丙酮+ 1% Et₃N进行二氧化硅凝胶层析纯化所述产物。根据该程序制备下述化合物：

- (a) N-脱甲基-N-乙基(9S)-9-二氢-15-氟红霉素 A，使用 N-脱甲基(9S)-9-二氢-15-氟红霉素 A 和乙基碘制备；
- (b) N-脱甲基-N-异丙基(9S)-9-二氢-15-氟红霉素 A，使用 N- 脱甲基(9S)-9-二氢-15-氟红霉素 A 和异丙基碘制备；
- (c) N-脱甲基-N-异丙基(9S)-9-二氢-15-甲基红霉素 A，使用 N-脱甲基(9S)-9-二氢-15-甲基红霉素 A 和异丙基碘制备；和
- (d) N-脱甲基-N-(2-丁基) (9S)-9-二氢-15-甲基红霉素 A，使用 N-脱甲基(9S)-9-二氢-15-甲基红霉素 A 和 2-碘丁烷制备。

实施例6

本实施例描述了流程1A的脱甲基化 (demethylation) 步骤，具体参考N-脱甲基-15-甲基红霉素A (化合物III'； R¹=1-丙基； R³=R⁴=OH)，尽管可以理解所述程序通常可应用到其他类似化合物中。

在50°C搅拌15-甲基红霉素A (化合物III， R¹=1-丙基； R³=R⁴=OH； 5.00克， 6.15毫摩尔)和乙酸钠三水合物(4.18克， 30.75毫摩尔)溶于甲醇-水(8:2 体积/体积, 100毫升)的混合物。然后加入碘(1.56克， 6.15毫摩尔)。在反应过程中，加入少部分的1N氢氧化钠(6.15毫升)。通过薄层色谱分析确定完全反应。除去溶剂后，用乙酸乙酯萃

取所述混合物三次，用硫酸钠干燥。得到黄色固体的粗产物(4.97克)，它无须进一步纯化用于下一步骤。

实施例7

本实施例描述了流程1A的烷基化步骤，具体参考N-脱甲基-N-异丙基-15-甲基红霉素A(化合物IV', $R^1=1\text{-丙基}$; $R^2=\text{异丙基}$; $R^3=R^4=\text{OH}$)，尽管可以理解所述程序通常可应用到其他类似化合物中。

将前述实施例得到的粗N-脱甲基-15-甲基红霉素A(2.50克, 3.41毫摩尔)、二异丙基乙胺(6.1毫升, 10当量)、2-碘丙烷(10.2毫升, 30当量)溶于乙腈(50毫升)的混合物在70℃水浴中加热24小时。加入水和饱和碳酸氢钠。所述溶液用乙酸乙酯抽提三次，并用硫酸镁干燥。粗产物通过二氧化硅凝胶柱层析(3: 1己烷-丙酮, 1%三乙胺)纯化，得到纯N-脱甲基-N-异丙基-15-甲基红霉素A(1.80克, 两步的产率为75%)。 m/z : 777.0 (MH); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 221.86, 175.62, 103.11, 96.15, 83.30, 79.85, 78.01, 75.10, 74.90, 74.59, 72.58, 70.35, 68.91, 68.75, 65.48, 62.79, 52.49, 49.47, 45.12, 44.76, 39.32, 38.43, 37.85, 34.96, 33.06, 30.76, 30.19, 26.93, 21.48, 21.41, 20.99, 20.46, 19.47, 18.62, 18.27, 16.15, 15.84, 14.00, 12.04, 9.01.

实施例8

本实施例描述了流程1A的羰基还原步骤，具体参考N-脱甲基-N-异丙基-15-甲基-(9S)-9-二氢红霉素A(化合物I, $R^1=1\text{-丙基}$; $R^2=\text{异丙基}$; $R^3=R^4=\text{OH}$)，尽管可以理解所述程序通常可应用到其他类似化合物。

将N-脱甲基-N-异丙基-15-甲基红霉素A (1.74克, 2.24毫摩尔)溶解在甲醇-乙醚(1:3 体积/体积, 50毫升)中，然后冷却到-20℃。加入硼氢化钠(189毫克, 5.0毫摩尔)。接着，在3小时内，使所述混合物逐渐变暖到室温。通过加入pH6.0的磷酸盐缓冲液除去过量的硼氢化钠，接着加入三乙醇胺 (10毫升)，30分钟后，用乙酸乙酯抽提所述混合物，并用硫酸镁干燥。粗产物用二氧化硅凝胶柱层析(3: 1己烷-丙酮, 1%三乙胺)纯化。得到纯N-脱甲基-N-异丙基-15-甲基-(9S)-9-二氢红霉素A(1.63克, 93%产率)。 m/z : 779.0 (MH); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 177.28, 102.59, 95.81, 83.45, 82.76,

78.81, 77.86, 75.68, 75.03, 74.67, 72.68, 70.38, 70.24, 69.26, 65.97, 62.28, 52.52, 49.34, 44.83, 42.00, 36.78, 34.80, 34.37, 33.01, 31.96, 31.02, 30.76, 25.46, 21.58, 21.28, 21.10, 20.41, 19.93, 19.74, 18.27, 16.37, 14.86, 14.30, 14.02, 9.17.

实施例9

本实施例描述了构造红色糖多孢菌的菌株(K24-1/159-44)，它能生物合成11-脱氧红霉素，具体参考11-脱氧红霉素B，它可用作合成本发明特定化合物的中间体。

可在基因工程改造的宿主细胞中通过单次发酵制备11-脱氧红霉素B，所述宿主细胞表达了基因(*eryAI*、*eryAII*和*eryAIII*)的DEBS组合的修饰形式。如下进行所述*eryAI*基因的工程改造：用含脱水酶功能域、烯酰还原酶功能域和酮还原酶功能域的盒（例如来自雷帕霉素PKS的模块1）代替模块2中的酮还原酶功能域。功能域替换的方法可参见例如McDaniel的US6,403,775(2002年)，其全部内容参考结合于此。在产生红霉素过程中，一旦加入工程改造的PKS基因，将工程改造的*eryAI*基因与*eryAII*和*eryAIII*基因一起掺入胜任的（competent）宿主细胞中。在优选的实例中，这些宿主细胞是“干净的宿主细胞（clean host）”，其中它们本身的PKS基因已经除去。合适的宿主细胞的例子包括但不限于干净的宿主细胞红色糖多孢菌K24-1和具有突变PKS基因的红色糖多孢菌菌株（具体参见Santi等人的US2002/0004229 A1 (2002年)，其全部内容参考结合于此）。菌株K24-1具有天然的*eryAI*、*eryAII*和*eryAIII*基因，它们被放线菌噬菌体ΦC31的*attB* 噬菌体结合位点（attachment site）代替，具体参见U.S.专利5,190,871，其全部内容参考结合于此，然后是*ermE** 启动子（promoter）。从而在噬菌体整合酶的存在下，含有互补的*attP* 噬菌体结合位点的质粒载体与所述基因一起整合入染色体的*attB*位点。合适的整合性噬菌体载体的例子包括但不限于pSET152及其衍生物。

起始宿主菌株红色糖多孢菌K24-1的制备可参见Santi等人的US 2002/0004229 A1 (2002)，根据布达佩斯条约，所述菌株于2003年3月12日保藏在American Type Culture Collection, P.O. Box 1549, Manassas, Virginia 20108, USA，保藏号为PTA-5061.

pKOS159-8和pKOS159-10是pSET152的衍生物，它们分别包含*ermEp**启动子控制下的*eryA*基因和*actIp/actII-ORF4*启动子-活化剂对。将带有*eryA*基因和*actIp/actII-ORF4*区域的pKAO127的35 kb *NsiI* 片段克隆入pKOS97-64c(一种pSET152衍生物，它包含*ermEp**启动子和 λ *cos*位点)，产生pKOS159-10。pKAO127片段的*fd* 转录终止子(transcriptional terminator)可防止该质粒中*ermEp**启动子的任何基因的表达。在pKOS159-10中，含*fd* 终止子和*actIp/actII-ORF4*区段的片段可用*PacI*消化来除去，并自身连接(self-ligation)产生pKOS159-8。为了在它们的天然启动子调控下表达*eryA*基因，pKOS159-31可如下构建：将带有pKOS159-10的*eryA*基因(和 λ *cos*位点)的*NdeI-XbaI*片段以及上述*XbaI-NdeI*消化的PCR扩增*eryAI*左边侧接片段，克隆入用*XbaI*消化的pSET152中。包含红色糖多孢菌K41-135的*eryA*基因的pKOS159-33可使用pKOS108-04的*eryA*片段以相同的方法构建。同样地，可使用pKOS159-31作为框架(scaffold)，以及使用合适的限制性内切酶，去除现有质粒中经基因修饰的*eryA*片段，从而制造所有基因工程改造的DEBS表达质粒。

pKOS159-44是pSET152(Bierman等人, *Gene* 116, 43-49 (1992年), “用于将DNA从大肠杆菌接合转移到链霉菌spp的质粒克隆载体”)的衍生质粒，它具有在*eryAI*启动子控制下的基因修饰的*eryA*基因(KR2 $\rightarrow$ rapDH/ER/KR1)(Rodriguez等人, *J. Ind. Microbio. Biotechnol.*, “通过基因转移到工业最优化菌株来快速工程改造多聚乙酰的过量产生” 网络公开的文档号为10.1007/s10295-003-0045-1 (<http://link.springer-ny.com>) (2003年4月16日))。分离pKOS11-66的30 kb *NdeI-NsiI*片段(带有经基因修饰的*eryA*基因)(Xue等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 11740-11745 (1999年) “制备多聚乙酰大文库的多质粒方法”)，并连接到(ligate)到KOS159-33的8 kb *NdeI-NsiI*片段 (Rodriguez等人, 具体如上述)，它包含载体pSET152、*eryAp*启动子和 $\cos \lambda$ 位点)。使用Gigapack III Gold包装抽提物(extract) (Stratagene) 包装所述连接混合物，并用来感染大肠杆菌XL-1 Blue。在含60微克/毫升阿普拉霉素的L β 琼脂板上选择重组体。分离pKOS159-44质粒DNA，并通过限制性消化(digestin)来核实。

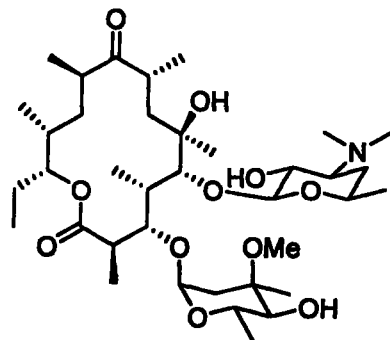
红色糖多孢菌K24-1(它包含浅青紫链霉菌的链霉菌属噬菌体 ϕ C31的三个*eryA*基因缺失和插入*attB*基因库的染色体，后面在它们位置上是*ermE**启动子)可如下制

备：收集生长在1-2 M1板上(每升，5克葡萄糖、5克蛋白胨、0.5克盐酸甜菜碱、5克玉米淀粉、1克玉米浆(50%)、200毫克 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2毫克 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.8毫克 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.2毫克 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、4毫克 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、80毫克 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、150毫克 KH_2PO_4 、10克 NaCl 、20克琼脂)菌株的孢子，通过无菌棉花过滤所述孢子，悬浮在1毫升20%的甘油中。孢子悬浮液可储存在 -20°C 。孢子悬浮液的20微升等分试样加入到5毫升2xYT中，并在 30°C 在振荡条件下培养。1小时后，通过离心分离收集所述孢子(受体细胞)。供体细胞如下制备：用pKOS159-44转化大肠杆菌ET12567/pUZ8002，并仅筛选阿普拉霉素抗性细胞。从原代转化板上挑出几个菌落，用于接种含氯霉素(10微克/毫升)、卡那霉素(100微克/毫升)和阿普拉霉素(60微克/毫升)的5毫升LB。所述细胞在 37°C 生长3-4小时(OD_{600} 为0.4-0.6)，通过离心分离进行收集，用5毫升LB清洗，离心并再次悬浮在100微升LB中。通过将受体细胞再悬浮在100微升供体悬浮液中，进行供体和受体细胞之间的接合转移，所述细胞铺展在含50微克/毫升萘啶酮酸的R5板上(Hopwood等，链霉菌属的基因操作：实验室手册(The John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985年)，并在 34°C 培养16小时。接着，用3毫升含1毫克萘啶酮酸和2毫克阿普拉霉素的软营养琼脂覆盖所述板。再次培养48小时后观察到接合后体K24-1/159-44。

根据布达佩斯条约，菌株K24-1/159-44于2003年3月12日保藏在American Type Culture Collection, P.O. Box 1549, Manassas, Virginia 20108, USA，保藏号为PTA-5054。

实施例10

本实施例描述了使用前述实施例描述的菌株生物合成11-脱氧红霉素B，它是合成本发明特定化合物的中间体。



11-脱氧红霉素 B

下述发酵技术具体参见Frykman等人的*Biotechnol. Bioeng.*, 76, 303-310 (2001年)“通过红色糖多孢菌的红霉素类似物的前体-引导制备方法”和Rodriguez等人(具体如上述), 它们的全部内容参考结合于此。

使用下列培养基: (a)含16克/升玉米淀粉、10克/升糊精(D-2256, Sigma-Aldrich)、15克/升大豆粉(S-9633, Sigma-Aldrich)、2.5克/升氯化钠、5克/升玉米浆、1克/升硫酸铵(A-2939, Sigma-Aldrich)、6克/升大豆油(S-7381, Sigma-Aldrich)和4克/升碳酸钙(C-4830, Sigma Aldrich)的种子培养基V1; (b)含28克/升玉米淀粉、24克/升大豆粉、5.5克/升氯化钠、8克/升玉米浆、和1.5克/升硫酸铵、4.5克/升大豆油、和6克/升碳酸钙的发酵媒介F2。所有的媒介都在121℃的高压锅中杀菌90分钟。

从冰冻细胞库中取出1毫升小瓶的红色糖多孢菌K24-1/pKOS159-44, 解冻, 并将小瓶内含物加入50毫升培养基V1中, 启动两组种子烧瓶(seed flask), 在34℃培养40-48小时。接着, 将50毫升等分试样从种子烧瓶转移到500毫升培养基V1中, 产生两组第二种子, 在34℃培养40-48小时。

将两瓶500毫升第二种子培养物转移到含9升培养基V1的B. Braun B10发酵罐中。所述发酵罐在34℃工作, 并通过加入2.5N硫酸和2.5N氢氧化钠将pH保持在7.0。提供3LPM的通风和600-800rpm的搅动, 保持溶解的氧强度大于40%。约24小时后获得产物。

然后, 将10升发酵罐种子培养物转移到含300升培养基F2的B. Braun Biostat UD500发酵罐中。所述Biostat UD500发酵罐在34℃工作, 并通过加入2.5N硫酸和2.5N氢氧化钠使pH保持在7.0。提供200-300 rpm的搅动和40-250 LPM的通风, 使溶氧强度保持大于40%。以675毫升/小时的进料速率在24-98小时内通入糊精(150克/升)。以64毫升/小时的速率在24-140小时内通入大豆油, 以26毫升/小时的速率在24-140小时内通入正丙醇。180小时后获得产物。

通过加入所需的50%放泡沫B(JT Baker)溶液控制起泡。

发酵肉汤通过离心分离澄清化，使用HP20树脂(Mitsubishi)进行固相抽提。用甲醇洗提吸附产物，并干燥。然后，所述粗产物用乙酸乙酯：水（液体：液体）抽提。干燥混合的乙酸乙酯抽提物。使用HP20SS树脂进行层析纯化所述产物，用50%-80%甲醇逐步洗提。合并含有产物的组分，并干燥，得到11-脱氧红霉素B。 m/z : 702.64 (MH); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 219.13, 175.56, 102.48, 95.92, 82.73, 79.40, 78.92, 77.79, 74.88, 72.52, 70.79, 68.80, 65.52, 65.13, 49.25, 45.98, 44.31, 43.40, 40.15 (2x), 38.11, 37.20, 36.54, 34.79, 33.19, 28.52, 26.37, 24.55, 21.37, 21.19, 18.54, 18.31, 15.69, 14.68, 11.96, 10.36, 9.16 ppm.

实施例11

本实施例描述了使用流程1的方法，将11-脱氧红霉素B转化到N-脱甲基-N-异丙基-11-脱氧-(9S)-9-二氢红霉素B (化合物I, R^1 =乙基, R^2 =异丙基, $\text{R}^3=\text{R}^4=\text{H}$; 化合物J, 表1)。

通常如实施例8所述的程序还原11-脱氧红霉素B(200毫克, 0.285毫摩尔)，得到(9S)-9-二氢红霉素B(94毫克, 47%产率)。 m/z : 705.0 (MH); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 176.82, 102.38, 95.82, 83.04, 80.95, 80.23, 79.01, 77.82, 74.89, 72.71, 70.89, 69.14, 66.04, 65.12, 49.28, 44.67, 42.23, 40.28 (2x), 37.36, 34.81 (2x), 33.50, 32.58, 29.39, 28.90, 25.29, 25.17, 21.53, 21.16, 20.04, 18.13, 17.98, 13.82, 10.59, 10.22, 9.24.

通常如实施例6和7所述的程序，将11-脱氧-(9S)-9-二氢红霉素B(94毫克, 0.134毫摩尔)转化成N-脱甲基-N-异丙基-11-脱氧-(9S)-9-二氢红霉素B(57毫克, 58%产率)。 m/z : 733.0 (MH); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 176.98, 102.05, 95.55, 82.33, 81.11, 80.22, 78.90, 77.89, 74.93, 72.69, 70.29, 69.11, 65.98, 65.16, 52.53, 49.28, 44.52, 42.38, 37.27, 34.91, 34.73, 33.38, 32.96, 32.60, 30.99, 29.38, 25.18 (2x), 21.54, 21.22, 21.05, 20.34, 19.91, 18.12, 17.85, 13.68, 10.45, 10.21, 9.10.

通过上述说明书和实施例，已经详细的描述了本发明，本领域的普通技术人员可以认识到，本发明可具有各种实例，并且前述描述和实施例只是为了说明的目的，并没有限制下述权利要求书。根据前述系统可得到许多变化，所述变化都没有离开本发明的范围。尽管已经参照一个或多个具体实例详细描述了本发明，但是本领域

的普通技术人员可以认识到，可对本说明书所述的具体实例作一些变化，且这些变化或改进都包括在下述权利要求书的范围之内。本说明书所述的所有出版物和专利文献都参考结合于此，尽管每篇出版物或文献都已经单独参考结合于此。

上述出版物和文献的引证并不需要得到许可，因为所引用的文献或出版物都已经是相关的现有技术，对于这些出版物或文献的内容或日期的引用也不需要许可。