

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4077551号
(P4077551)

(45) 発行日 平成20年4月16日 (2008. 4. 16)

(24) 登録日 平成20年2月8日 (2008. 2. 8)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 P 17/12 (2006. 01)
C 0 7 F 9/59 (2006. 01)
A 6 1 K 31/675 (2006. 01)
A 6 1 P 11/02 (2006. 01)
A 6 1 P 11/06 (2006. 01)

C 1 2 P 17/12
 C 0 7 F 9/59
 A 6 1 K 31/675
 A 6 1 P 11/02
 A 6 1 P 11/06

請求項の数 5 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-57634
 (22) 出願日 平成10年3月10日 (1998. 3. 10)
 (65) 公開番号 特開平10-259191
 (43) 公開日 平成10年9月29日 (1998. 9. 29)
 審査請求日 平成17年2月25日 (2005. 2. 25)
 (31) 優先権主張番号 19709898:3
 (32) 優先日 平成9年3月11日 (1997. 3. 11)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)
 (31) 優先権主張番号 19751498:7
 (32) 優先日 平成9年11月21日 (1997. 11. 21)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 397056695
 サノフィー・アベンティス・ドイツラン
 ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンク
 テル・ハフツング
 ドイツ連邦共和国デー 6 5 9 2 9 フラン
 クフルト・アム・マイン、ブリュニングシ
 ユトラーセ 5 0
 (74) 代理人 100091731
 弁理士 高木 千嘉
 (74) 代理人 100080355
 弁理士 西村 公佑
 (72) 発明者 ヨハネス・マイヴエス
 ドイツ連邦共和国 6 5 5 1 0 イートシュタ
 イン、テオドルーフ・フリートナー・シュ
 トラーセ 3 9

最終頁に続く

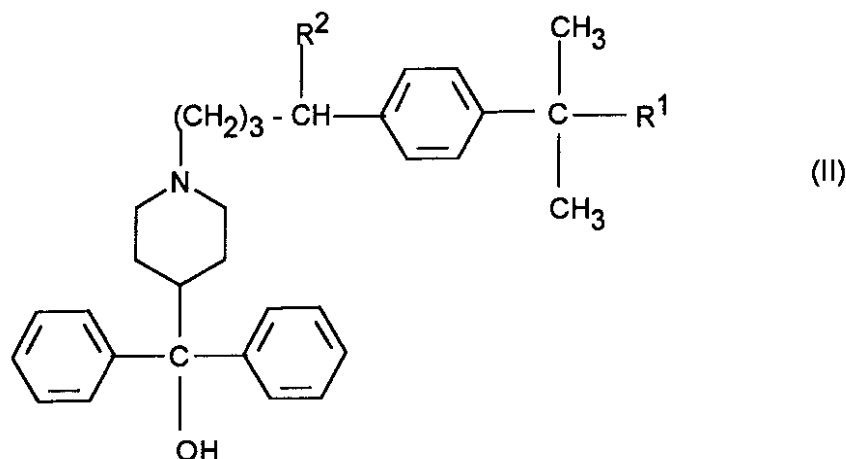
(54) 【発明の名称】 4 - (4 - (4 - (ヒドロキシジフェニル) - 1 - ピペリジニル) - 1 - ヒドロキシブチル) -
 α 、 α - ジメチルフェニル酢酸およびホスホリル化誘導体の製法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 II

【化 1】



10

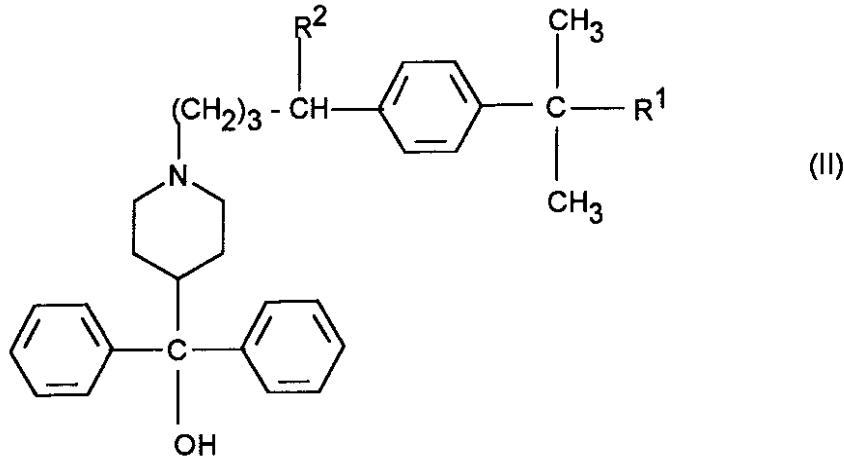
(式中、

R^1 は $-CH_2-O-P(O)(OH)_2$ であり、そして R^2 は $-OH$ であるか、または
 R^1 は $-CH_3$ であり、そして R^2 は $-O-P(O)(OH)_2$ である) の化合物。

20

【請求項 2】

α - (p-第3ブチルフェニル) - 4 - (α -ヒドロキシ- α -フェニルベンジル) - 1-ピペリジニルブタノール、または、適当である場合は、4 - (4 - (4 - (ヒドロキシジフェニル) - 1-ピペリジニル) - 1-ヒドロキシブチル) - α , α -ジメチルフェニル酢酸をクニンガメラ(Cunninghamella)属の菌類と一緒に培養することからなる式II【化 2】



10

(式中、

20

R^1 は-OHまたは-CH₂-O-P(O)(OH)₂であり、そして R^2 は-OHであるか、 R^1 は-CH₃であり、そして R^2 は-O-P(O)(OH)₂である)の化合物の製法。

【請求項 3】

医薬的に適当なそして生理学的に許容し得る賦形剤と一緒に有効量の請求項 1 記載の式 II を有する化合物の少なくとも 1 種を含有する薬剤。

【請求項 4】

アレルギー性疾患、アレルギー性鼻炎または喘息の治療用の薬剤を製造するための請求項 1 記載の式 II を有する化合物の少なくとも 1 種の使用。

【請求項 5】

請求項 1 記載の化合物の少なくとも 1 種と医薬的に適当なそして生理学的に許容し得る賦形剤とを適当な投与形態にすることからなる請求項 3 記載の薬剤の製法。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、4 - (4 - (4 - (ヒドロキシジフェニル) - 1-ピペリジニル) - 1-ヒドロキシブチル) - α , α -ジメチルフェニル酢酸 (化合物 1) およびそのホスホリル化誘導体および α - (p-第3ブチルフェニル) - 4 - (α -ヒドロキシ- α -フェニルベンジル) - 1-ピペリジニルブタノール (化合物 2) のホスホリル化誘導体の微生物学的製法、並びに薬剤としてのこれらの化合物の使用に関するものである。さらに、本発明は、化合物 1 をホスホリル化する微生物学的方法に関するものである。

【0002】

40

化合物 2 がヒトの体内において化合物 1 に変換されることは知られている (DE 23 03 306、US 4,254,129、US 4,285,957、DE 30 07 498)。さらに、例えばCunninghamella属の微生物によってエバスチンがカルエバスチンに酸化されることが知られている (DE 40 34 218; Schwarz等、Appl. Microbiol. Biotechnol. (1996) 44:731-735頁)。

CunninghamellaおよびAbsidia属の菌類は、化合物 2 を選択的に式 I またはIIの化合物に変換するということが見出された。酸化されることのできる化合物 2 における 2 個のヒドロキシル基が酸化されないの、相当するカルボキシル基を与える化合物 2 の p-第3ブチルフェニル基におけるだけの選択的酸化は驚くべきことである。

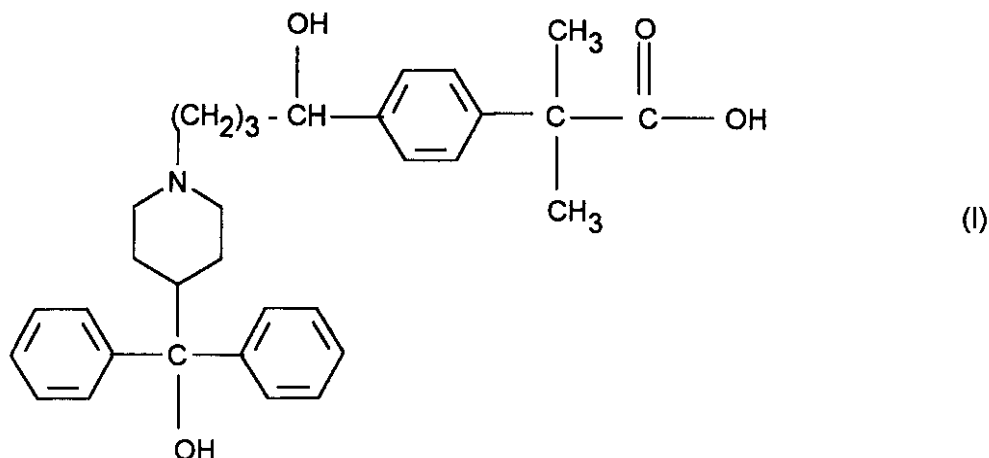
【0003】

それ故に、本発明は、 α - (p-第3ブチルフェニル) - 4 - (α -ヒドロキシ- α -フ

50

エニルベンジル) - 1 - ピペリジニルブタノールを、CunninghamellaまたはAbsidiaの菌類と一緒に、培養することからなる式 I

【化 4】



10

の化合物の製法に関するものである。

【0004】

好ましくは、Cunninghamella blakesleeana、Cunninghamella elegansおよびCunninghamella echinulataからなる群から選択される菌類、特にATCC 8688a、DSM 1905、DSM 1908およびATCC 9244が使用される。さらに、化合物2を式Iおよび（または）IIの化合物に変換する限り、Cunninghamella属の菌類の突然変異株およびセレクトアントも、本発明による方法に使用するのに適している。さらに、Cunninghamella属の菌類は、化合物1のホスホリル化に対して使用することができる。

20

【0005】

栄養溶液は、スクロース、とうもろこし澱粉、デキストロースまたは糖蜜のような炭素源、および大豆粉、落花生粉、麦芽エキスまたは酢酸アンモニウムのような窒素源を含有する。

栄養培地は、また、無機塩、例えばリン酸水素ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウムまたはリン酸水素カリウムを含有する。さらに、脂肪、例えばオレイン酸メチルまたは大豆油を、栄養培地に加えることができる。さらにまた、微量の元素、例えば鉄、マンガン、銅、亜鉛、コバルトまたは他の金属塩を加えることもできる。

30

【0006】

菌類は、20℃～35℃の温度、好ましくは28℃で、そして5～9のpH、好ましくはpH 8で培養される。培養は、攪拌しながらそして空気または純粋な酸素を通気しながら、はじめに振盪フラスコ中で、それから発酵器中において、好氣的に実施される。発酵器中における微生物の培養は、48～240時間、好ましくは70～110時間の時間にわたって実施される。

化合物2の添加は、培養の開始時に直接実施されるが、後に、好ましくは約48時間後に実施することもできる。化合物2は、固体の物質として、懸濁液としてまたは溶液として添加することができる。

40

【0007】

適当な溶剤は、エタノール、ジメチルホルムアミド（DMF）であるが、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ジメチルアセトアミド（DMA）、ジメトキシエタン（DME）、テトラヒドロフラン（THF）、そしてまた、ジブチルー、ジイソプロピルーまたはジエチルホルムアミド、1-メチルー、1-エチルーまたは1-シクロヘキシルピロリドン、4-ホルミルモルホリン、1-ホルミルピペリジン、1-ホルミルピロリジン、テトラメチルー、テトラエチルーまたはテトラブチル尿素、トリピペリジノーまたはトリピロリジノホスフィンオキシド、スルホランまたはN-メチルカプロラクタム、または上述した溶

50

剤の混合物であってもよい。

可溶化剤、例えばトウィーン^(R) 80 またはドデシル硫酸ナトリウムもまた加えることができる。

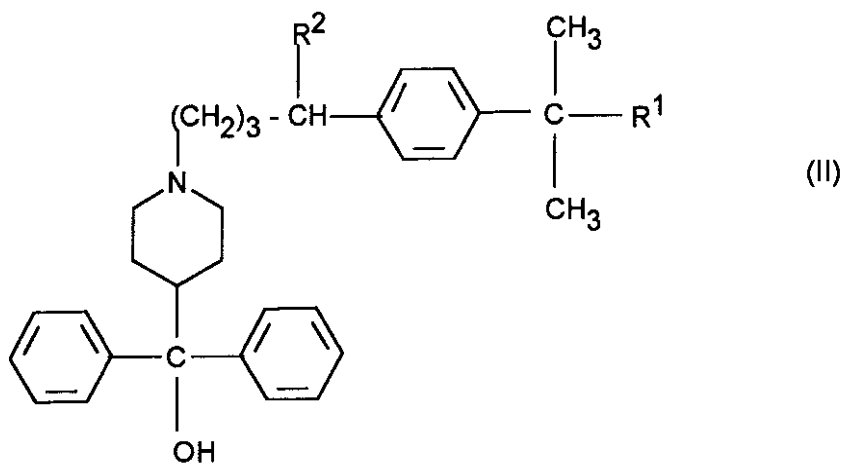
【0008】

化合物 1 は、栄養溶液から直接に、または例えば遠心分離もしくは濾過による細胞の分離後に、単離される。化合物 1 は、溶剤による抽出によって、または XAD 16、HP 20 もしくはイオン交換体のような疎水性樹脂上の吸着によって単離することができる。

さらに、本発明は、 α -(p-第3ブチルフェニル)-4-(α -ヒドロキシ- α -フェニルベンジル)-1-ピペリジニルブタノールまたは適当である場合は 4-(4-(4-(ヒドロキシジフェニル)-1-ピペリジニル)-1-ヒドロキシブチル)- α , α -ジメチル酢酸を、Cunninghamella または Absidia 属の菌類と一緒に培養することからなる式 I

10

【化 5】



20

(式中、

R^1 は、 $-OH$ または $-CH_2-O-P(O)(OH)_2$ であり、そして R^2 は $-OH$ であるか、 R^1 は、 $-CH_3$ であり、そして R^2 は $-O-P(O)(OH)_2$ であるか、または R^2 は、 $-O-P(O)(OH)_2$ であり、そして R^1 が $-C(O)OH$ である) の化合物の製法

30

に関するものである。
反応は、本質的に、式 I の化合物の製法におけるように実施される。 R^1 が $-COOH$ であり R^2 が $-O-P(O)(OH)_2$ である式 II の化合物の製造に対しては、好ましくは、化合物 1 が反応に対する基質として使用される。

【0009】

さらに、本発明は、

R^1 が $-CH_2-O-P(O)(OH)_2$ であり、そして R^2 が $-OH$ である (化合物 3)、 R^1 が $-CH_3$ であり、そして R^2 が $-O-P(O)(OH)_2$ である (化合物 4)、または R^2 が $-O-P(O)(OH)_2$ であり、そして R^1 が $-COOH$ である式 II の新規な化合物に関するものである。

40

さらに、本発明は、 α -(p-第3ブチルフェニル)-4-(α -ヒドロキシ- α -フェニルベンジル)-1-ピペリジニルブタノールを Cunninghamella または Absidia 属の菌類と一緒に培養することからなる、 R^1 が $-OH$ であり R^2 が $-OH$ である式 II の化合物 (トリオール) の製法に関するものである。

【0010】

本発明は、また、医薬的に適当なそして生理学的に許容し得る賦形剤と一緒に、有効量の式 II を有する化合物の少なくとも 1 種および (または) 式 II を有する化合物の生理学的に許容し得る塩を含有する薬剤に関するものである。

本発明は、また、式 II の化合物の医薬的に許容し得る塩を包含する。本発明による化合物の医薬的に許容し得る酸付加塩は、適当な無機酸または有機酸との塩である。適当な無機

50

酸は、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸および燐酸である。適当な有機酸は、カルボン酸、例えば酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、シクラメン酸、アスコルビン酸、ヒドロキシマレイン酸、ジヒドロキシマレイン酸、安息香酸、フェニル酢酸、4-アミノ安息香酸、4-ヒドロキシ安息香酸、アントラニル酸、桂皮酸、サリチル酸、4-アミノサリチル酸、2-フェノキシ安息香酸、2-アセトキシ安息香酸およびマンデル酸、スルホン酸、例えばメタンスルホン酸、エタンスルホン酸、および β -ヒドロキシエタンスルホン酸である。無機または有機塩基と上記式の化合物との非毒性塩もまた本発明の範囲に含まれる。これらは、例えばアルカリ金属例えばナトリウム、カルウムおよびリチウムとの塩、アルカリ土類金属、例えばカルシウムおよびマグネシウムとの塩、IIIA族の軽金属、例えばアルミニウムとの塩、有機アミン、例えば第一級、第二級および第三級アミン、例えばシクロヘキシルアミン、エチルアミン、ピリジン、メチルアミノエタノールおよびピペラジンとの塩を包含する。塩は、慣用の方法で、例えば、式IIの化合物を適当な酸または塩基と反応させることによって形成される。

その薬理学的性質のために、本発明による式IIの化合物は、抗ヒスタミン剤、抗アレルギー剤および気管支拡張剤として適している。

本発明による式IIの化合物は、アレルギー性鼻炎、喘息または他のアレルギー性疾患の治療に適している。

【0011】

本発明による式IIの化合物は、経口的に、非経口的に、例えば皮下に、静脈内に、筋肉内にまたは腹腔内に、または例えば噴霧もしくは粉末形態の本発明による化合物の小さな粒子を含有するエアロゾルスプレーの形態での鼻、咽喉または気管支の粘膜に対する鼻内導入または適用によって投与することができる。

投与される化合物の量は、患者および投与方法に依存する。投与される量は、望ましい効果を得よう1日につき体重1kg当たり約0.01~20mgの有効量を投与単位が有するように、広い範囲内において変えることができる。例えば、望ましい抗ヒスタミン、抗アレルギーまたは気管支拡張作用は、本発明の化合物5~300mg、好ましくは10~200mgを有する投与単位、例えば錠剤を1日に1~4回投与することによって達成することができる。

【0012】

本発明は、また式IIの化合物少なくとも1種を、医薬的に適当な且つ生理学的に許容し得る担体、および適当である場合はさらに他の適当な活性化化合物、添加剤または補助剤と一緒に、適当な投与形態にすることからなる薬剤の製法に関するものである。

適当な固体のまたは医薬的製剤形態は、例えば顆粒、粉末、被覆錠剤、錠剤、(マイクロ)カプセル、坐剤、シロップ、ジュース、懸濁液、エマルジョン、滴下剤または注射用溶液、そしてまた活性化化合物を持続的に放出する製剤である。これらの製剤においては、慣用の補助剤、例えば賦形剤、崩壊剤、結合剤、被覆剤、膨潤剤、滑剤または滑沢剤、風味料、甘味料および可溶化剤が使用される。しばしば使用される補助剤は、炭酸マグネシウム、二酸化チタン、ラクトース、マンニトールおよび他の糖、タルク、乳汁蛋白質、ゼラチン、澱粉、セルロースおよびその誘導体、動物および植物油、例えばタラ肝油、ヒマワリ油、落花生またはゴマ油、ポリエチレングリコールおよび溶剤、例えば滅菌水および一価または多価アルコール、例えばグリセロールがあげられる。

【0013】

本発明による式IIの化合物は、また滅菌された液体である医薬担体、例えば水または油を使用して、生理学的に許容し得る希釈剤中の注射できる溶液または懸濁液として投与することもできる。界面活性剤および他の医薬的に許容される補助剤を加えることができる。適当な油の例は、石油、または動物、植物もしくは合成源の油、例えば落花生油、大豆油または鉱油である。一般に、水、生理食塩溶液、デキストロース水溶液または同様な糖溶液、およびグリコール、例えばプロピレングリコールまたはポリエチレングリコールが、液体担体として特に注射用溶液に対して好ましい。

【0014】

エアロゾルとしての使用にあたっては、本発明による化合物は、適当な発射剤、例えば炭化水素発射剤、例えばプロパン、ブタンもしくはイソブタン、または二酸化炭素もしくは窒素もしくは他の生態学的に許容し得る発射剤、および慣用の補助剤と一緒に、エアロゾル容器中に溶液また懸濁液として加圧下に置かれる。化合物は、また、例えば噴霧器を使用して、加圧しない形態で投与することもできる。

投与にあたって、可能な動物は、温血動物、鳥、哺乳動物、例えば、ヒト、猫、犬、馬、羊、牛、豚、子羊、ラット、マウスおよびモルモットである。

【0015】

実施例 1

10

菌株の保持

Cunninghamella菌株であるCunninghamella blakesleeana FH 001、Cunninghamella blakesleeana FH 002、Cunninghamella blakesleeana FH 003、Cunninghamella echinulata DSM 1905、Cunninghamella echinulata変異株elegans ATCC 8688a、Cunninghamella elegans DSM 1908およびCunninghamella echinulata変異株echinulata ATCC 9244の孢子懸濁液 100 μ lを、寒天プレート（麦芽エキス20 g／リットル、ペプトン2 g／リットル、および寒天20 g／リットル、pH6.5）上に接種（plate out）し、そして28℃で72時間培養する。それから、プレートは、4℃で少なくとも8週間貯蔵することができる。このようにする代わりに、菌株を、寒天の添加なしに同じ培地中で液内培養に受けしめることができる。28℃で72時間培養した後に、培養物を20%グリセロールで処理し、そして懸濁液を液体窒素上で約-120℃で貯蔵する。

20

【0016】

実施例 2

高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）分析

試料の調製：培養液をメタノールで希釈（1：1）し、そして懸濁液を30分間攪拌する。遠心分離による透明な相の分離。

溶離剤A：	H ₂ O	900ml
	アセトニトリル	100ml
	トリフルオロ酢酸 (TFA)	1ml
溶離剤B：	アセトニトリル	900ml
	H ₂ O	100ml
	TFA	1ml
検出：	215nm	
流速：	1ml/分	
勾配：	0分	50%B
	10分	80%B
	15分	80%B
	16分	50%B
	21分	50%B
カラム温度：	55℃	
カラム：	Merck RP 18 5 μm Licrospher 100	
	長さ25cm、直径4mm	
保持時間：	化合物1	5.4分
	化合物2	9分
	トリオール	5.7分
	化合物3	3.5分
	化合物4	6.9分

10

20

30

【0017】

実施例3

Cunninghamella菌株による検査 (screening)

検査培地 (1000ml容量の三角フラスコ中のpH5.0の大豆ペプトン5g/リットル、酵母エキス5g/リットル、NaCl 5g/リットル、K₂HPO₄ 5g/リットル、寒天3g/リットルおよびグルコース20g/リットル (別個にオートクレーブ処理)) 100mlに、実施例1に述べた菌株の一種の寒天の片を接種した。培養は、はじめに、回転振盪器上で28℃および1分当たり180回転 (180rpm) で48時間実施した。この時間の後に、DMFまたはエタノール100μlに溶解した化合物2の20mgの添加を実施した。72時間後またはより早い時間において、培養物のアリコートを取り50%メタノールで処理した。得られた懸濁液をUltra-Turraxを使用して30秒間懸濁し、それから、懸濁液を10,000gで遠心分離した。得られた透明な上澄液を、HPLC (実施例2参照) によって分析した。

40

72時間の培養時間後に、すべての菌株の培養液中の5mg/リットルまでの濃度において、化合物1を検出することができた。

【0018】

実施例4

種々なCunninghamella菌株を使用したフラスコ規模における化合物1の製造

前培養培地 (1000mlの容量の三角フラスコ中のpH5.0の大豆ペプトン5g/リットル)

50

ル、酵母エキス 5 g / リットル、NaCl 5 g / リットル、 K_2HPO_4 5 g / リットル、寒天 3 g / リットルおよびグルコース 20 g / リットル（別々にオートクレーブ処理）100 ml に、それぞれ実施例 1 に述べた菌株の一種を生長させた寒天の片を接種した。培養は、回転振盪器上で 28 °C および 180 rpm で 48 時間実施した。生産培地〔500 ml の容量の三角フラスコ中の pH 8.0 の大豆ペプトン 5 g / リットル、とうもろこし浸出液 10 g / リットル、グルコース 20 g / リットル、NaCl 5 g / リットル、 K_2HPO_4 1 g / リットル、寒天 3 g / リットル、2-（〔ヒドロキシー-1,1-ビス（ヒドロキシメチル）エチル〕アミノ）エタンスルホン酸（TES）（ナトリウム塩）25.1 g / リットル、デスモフェン 100 μ l〕100 ml に、上述した前培養菌 10 ml を接種した。はじめに、培養を回転振盪器上で 28 °C および 180 rpm で 48 時間実施した。この時間後に、DMF 100 μ l に溶解した化合物 1 の 20 mg を加えた。72 時間後に、培養物のアリコートを取り 50 % メタノールで処理した。得られた懸濁液を Ultra-Turra x を使用して 30 秒間懸濁し、それから懸濁液を 10,000 g で遠心分離した。得られた透明な上澄液を HPLC（実施例 2）によって分析した。

【0019】

分析は、表 1 に示した収量を示す。次の化合物が見出された。

化合物 1 は、式 I の化合物であり；

化合物 2 は、 R^1 が $-CH_3$ であり R^2 が $-OH$ である式 II の化合物であり；

化合物 3 は、 R^1 が $-CH_2-O-P(O)(OH)_2$ であり R^2 が $-OH$ である式 II の化合物であり；

化合物 4 は、 R^1 が $-CH_3$ であり R^2 が $-O-P(O)(OH)_2$ である式 II の化合物でありそして

トリオールは、 R^1 が $-OH$ であり R^2 が $-OH$ である式 II の化合物である。

【0020】

【表 1】

菌 株	トリオール [mg / l]	化合物 1 [mg / l]	化合物 3 [mg / l]	化合物 4 [mg / l]
C. blak. FH 001	4.9	<1.0	11.9	60.4
C. blak. FH 002	26.0	50.7	42.5	3.0
C. blak. FH 003	2.1	<1.0	1.6	18.4
C. echinu. ATCC 8688a	4.7	43.2	27.3	2.2
C. echinu. DSM 1905	13.8	3.3	40.4	23.1
C. el. DSM 1908	17.3	1.1	15.2	37.0
C. ech. ATCC 9244	18.5	5.1	20.7	7.4

【0021】

実施例 5

Cunninghamella echinulata 変異株 elegans ATCC 8688a によるフラスコ規模における化合物 1 の改良された製造

前培養培地（1000 ml の容量の三角フラスコ中の pH 5.0 の大豆ペプトン 5 g / リットル、酵母エキス 5 g / リットル、NaCl 5 g / リットル、 K_2HPO_4 5 g / リットル、寒天 3 g / リットルおよびグルコース 20 g / リットル（別個にオートクレーブ処理）

） 100mlに、それぞれ実施例1において述べた菌株の一種を生長させた寒天の片を接種した。培養は、回転振盪器上で28℃および180rpmで48時間実施した。生産培地（500mlの容量の三角フラスコ中のpH8.0の大豆ペプトン5g／リットル、カゼインペプトン5g／リットル、可溶性澱粉20g／リットル、NaCl 5g／リットル、 K_2HPO_4 1g／リットル、 $NH_4(SO_4)_2$ 1g／リットル、寒天3g／リットル、TES（ナトリウム塩）25.1g／リットル、デスモフェン100μl）100mlに、上述した前培養物10mlを接種した。はじめに、培養を回転振盪器上で28℃および180rpmで24時間実施した。

【0022】

この時間の後に、エタノール800μlに溶解した化合物2の20mgを加えた。72時間後に、培養物のアリコートを取り50%メタノールで処理した。得られた懸濁液を、Ultra-Turraxを使用して30秒間懸濁し、それから懸濁液を10,000gで遠心分離した。それから、得られた透明な上澄液をHPLC（実施例2）によって分析した。分析は、化合物1の145mg／リットル、トリオール（2）の6.5mg／リットル、化合物3の22mg／リットル、および化合物4の5mg／リットルの収量を示した。

【0023】

実施例6

10リットルの発酵器における式IIの化合物の製造

前培養培地（1000mlの容量の三角フラスコ中のpH5.0の大豆ペプトン5g／リットル、酵母エキス5g／リットル、NaCl 5g／リットル、 K_2HPO_4 5g／リットル、寒天3g／リットル、およびグルコース20g／リットル（別個にオートクレーブ処理））100mlに、菌株Cunninghamella echinulata変異株elegans ATCC 8688aの寒天片を接種した。培養を、回転振盪器上で28℃および180rpmで48時間実施した。生産培地（大豆ペプトン5g／リットル、酵母エキス5g／リットル、グルコース20g／リットル（別個にオートクレーブ処理）、NaCl 5g／リットル、 K_2HPO_4 1g／リットル、デスモフェン100μl、pH5.0）10リットルに、上述した前培養物100mlを接種した。それから、生産培地の1リットル当たり200mgの最終濃度が発酵器において達成されるようにして、化合物2を加えた。発酵は、28℃、700rpmおよび0.5vvmにおいて96時間実施した。

HPLC分析によれば、培養液は、化合物1約10mg／リットル、トリオール（2）約10mg／リットル、化合物3約100mg／リットル、および化合物4約100mg／リットルを含有する。

【0024】

実施例7

式IIの化合物の単離

実施例6によって得られた培養液（8800ml）を、バケット遠心分離器（5000g／10分）によって、上澄液（8000ml）およびバイオマス（800g）に分離しそして両方の相を別個に処理した。

XAD 7のようなマクロ多孔性アクリルアミド／ポリスチレン吸着剤樹脂160gを上澄液に加えた。吸着は、おだやかに攪拌しながらpH2.5および室温で2時間実施した。吸着剤樹脂を濾去し、そしてメタノール160mlで4回溶離した。溶離液を合し、そして減圧下で濃縮乾固した（凍結乾燥後の油状固体約50g）。

【0025】

以下の操作により分取用HPLCによって微細な精製を実施した。

溶離剤A： H₂O 800ml
 アセトニトリル 200ml
 TFA 1ml
 溶離剤B： アセトニトリル 1000ml
 TFA 0.9ml

検出： 215nm

流速： 50ml/分

10

勾配： 0分 0%B
 60分 0%B
 133分 43%B
 134分 100%B
 157分 100%B

カラム温度： 室温

カラム： Kromasil、C18、7μm
 長さ350mm、直径50mm

20

試料 メタノール/水(1:1)350mlに溶解した粗製生成物5g

【0026】

適当なフラクションを合し、減圧下で濃縮し、そして水性残留物を凍結乾燥した後、2回の実施から化合物1の20mgおよび化合物3の160mgを得た。

バイオマス(800g)を、30%強度および100%強度のn-プロパノール(全体で1500ml)で抽出し、そして固体を、フィルター層(K300)を通した濾過によって分離する。濾液を減圧下で濃縮し、そして油状の固体26.2gを得た。

30

【0027】

さらに、次の操作によって、分取用HPLCにより精製を実施した。

溶離剤A : H₂O 800ml
 アセトニトリル 200ml
 TFA 1ml

溶離剤B : アセトニトリル 1000ml
 TFA 0.9ml

検出 : 215nm

流速 : 50ml/分

10

勾配 : 0分 0%B
 34分 0%B
 121分 51%B
 122分 100%B
 148分 100%B

カラム温度 : 室温

カラム : Kromasil, C18, 7μm

20

長さ350mm、直径50mm

試料 メタノール/水(1:1)400mlに溶解した粗製生成物5g

適当なフラクションを合し、減圧下で濃縮し、そして水性残留物を凍結乾燥した後、2回の実施からトリオール(2) 4mg、化合物4の20mg、および化合物1の80mgを得た。

【0028】

実施例8

式IIの化合物の確認

UV/VISスペクトロスコピーによる確認のほかに、成分を、¹H-NMRおよびESI-MSまたはFAB-MSによって確認した。

30

MSデータ :

トリオール(2) ESI-MS : m/e = 488.4 [M+H]⁺

化合物1 ESI-MS : m/e = 502.3 [M+H]⁺

化合物3 ESI-MS : m/e = 568.3 [M+H]⁺

HR-FAB-MS : m/e = 568.2827 [M+H]⁺

化合物4 ESI-MS : m/e = 552.3 [M+H]⁺

40

¹H-NMRデータは表2に示す通りである。

【0029】

300°KにおけるDMSO中の¹H化学シフト

【表2】

	化合物 1	化合物 3	トリオール 2	化合物 4
1-CH ₃	1.45	1.25	1.20	1.25
1-CH ₂	—	3.83	3.39	—
3	7.30	7.34	7.30	7.32
4	7.28	7.26	7.23	7.27
6	4.52	4.52	4.51	5.11
7	1.66/1.59	1.68/1.59	1.68/1.58	1.71
8	1.59	1.58	1.58	1.73
9	2.98	2.98	2.97	2.97
10	3.43/2.89	3.43/2.89	3.41/2.88	3.31/2.83
11	1.66/1.46	1.66/1.45	1.66/1.46	1.74/1.37
12	2.83	2.83	2.82	2.81
15	7.49	7.49	7.49	7.50
16	7.28	7.29	7.30	7.28
17	7.16	7.16	7.16	7.15

10

20

【0030】

実施例 9

麻酔されたモルモットの気管支直径に対する作用

調査は、312～415 g の体重を有する雄の白モルモットに対してKonzett-Roesslerの方法 (Arch. exp. Path. U.Pharmak. 195 (71-74), 1940) によって実施した。試験調製物は、体重 1 kg 当たり 2 ml の投与容量を使用して、懸濁液として 10 mg/kg の投与量で投与した。静脈内 (i.v.) に投与されたヒスタミン 20 µg/kg による 2 回の予備的な値の後に、物質を、十二指腸管によって一回投与し、そして喘息試験を調製物の投与後 15、30、60、90、120、150、180、210 および 240 分において反復した。

30

比較対照測定と比較した気管支直径の変化は、%で示した。一回の投与量当たり 6 匹の動物を使用した。統計は、t-試験によって得た。

結果は、表 3 に示す通りである。

【0031】

【表 3】

40

ヒスタミン誘発の喘息発作の阻害 (%)

調製物	15分	30分	60分	90分	120分	150分	180分	210分	240分
テルフェナジン (TELDANE ^(R))*	11.7±9.4	26.8±14.3	38.2±13.9	61.8±11.5	83.5±12.5	88.0±4.8	87.6±6.6	81.2±9.3	75.4±11.2
化合物 3	30.7±21.7	66.2±17.2	85.7±8.9	84.3±15.7	88.7±6.3	91.8±3.8	91.3±3.8	94.0±2.7	92.6±4.9
化合物 4	68.3±16.7	91.8±3.3	94.2±2.0	93.5±1.9	94.5±1.5	93.8±1.2	91.7±1.7	93.7±1.2	92.0±3.6

投与量 = 10 mg/kg (十二指腸内に)

N = 6匹/投与

* = 懸濁液 ; 活性化合物に変換

【0032】

化合物 3 は、その最高の作用をもっとも急速に〔投与後 (p. a.) 60 分〕達成し、そして作用は、投与後 240 分まで殆ど減少しないで持続し、化合物 4 は、作用のより緩慢な開始 (投与後約 150 分) を示した。

テルフェナジンは、投与後 150 分後の最高の作用および投与後 60 分後の作用の開始を

10

20

30

40

50

示し、化合物 3 および 4 は、テルフェナジンよりもより急速に且つ高度に活性である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 37/08 (2006.01) A 6 1 P 37/08
C 1 2 R 1/645 (2006.01) C 1 2 P 17/12
C 1 2 R 1:645

(72)発明者 マンフレート・ヴォルム
ドイツ連邦共和国 6 5 2 0 7 ヴイースバーデン、エアプゼンアカー 2 7

審査官 内藤 伸一

(56)参考文献 特開平 0 5 - 0 1 5 3 8 6 (J P, A)
特開昭 4 8 - 0 8 5 5 7 8 (J P, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12P 17/12
C07F 9/59
A61K 31/675
CA(STN)
REGISTRY(STN)
WPIDS(STN)