

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4054063号
(P4054063)

(45) 発行日 平成20年2月27日 (2008. 2. 27)

(24) 登録日 平成19年12月14日 (2007. 12. 14)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 P 21/02 (2006. 01)

C 1 2 P 21/02

C 0 7 K 11/00 (2006. 01)

C 0 7 K 11/00

C 1 2 R 1/645 (2006. 01)

C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:645

請求項の数 2 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願平9-520934
 (86) (22) 出願日 平成8年11月25日 (1996. 11. 25)
 (65) 公表番号 特表2000-500984 (P2000-500984A)
 (43) 公表日 平成12年2月2日 (2000. 2. 2)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1996/005190
 (87) 国際公開番号 WO1997/020945
 (87) 国際公開日 平成9年6月12日 (1997. 6. 12)
 審査請求日 平成15年9月11日 (2003. 9. 11)
 (31) 優先権主張番号 19545639. 4
 (32) 優先日 平成7年12月7日 (1995. 12. 7)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

微生物の受託番号 DSM 10345

(73) 特許権者 591063187
 バイエル アクチエンゲゼルシャフト
 Bayer Aktiengesellschaft
 ドイツ連邦共和国 レーフエルカーゼン (番地なし)
 D-51368 Leverkusen, Germany
 (74) 代理人 100060782
 弁理士 小田島 平吉
 (72) 発明者 イエシユケ, ペーター
 ドイツ連邦共和国デー—51373レーフ
 エルカーゼン・ハイマンシュトラッセ38

最終頁に続く

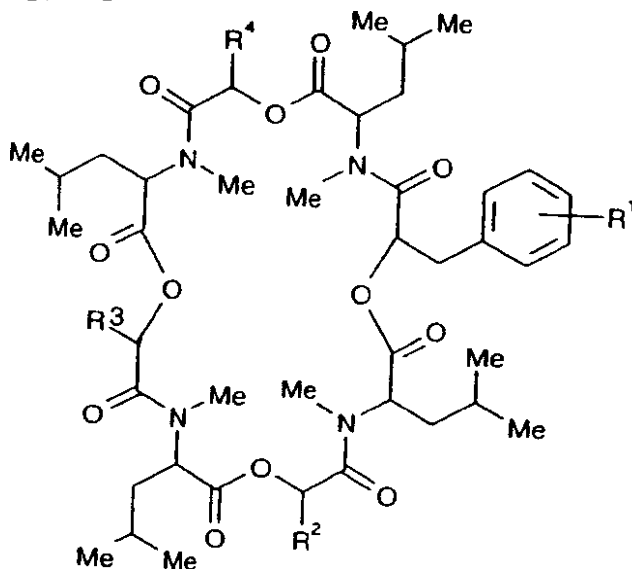
(54) 【発明の名称】 24個の環原子を有する置換アリアル乳酸含有シクロデブシペプチドの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式 (I)

【化1】



式 中、

R^1 は、直鎖状もしくは分岐鎖状アルキル、環状アルキル、アルケニル、アルコキシ、アルケニルオキシ、アリールアルコキシ、シクロアルコキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、アルコキシカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、ヘテロアリールカルボニル、アルコキシスルホニル、アルキルアミノスルホニル、ジアルキルアミノスルホニル、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、ヘテロアリールスルホニルを表し、それらの各々は場合により置換された、ヒドロキシル、ハロゲン、ニトロ、アミノ、カルボキシル、カルバモイル、シアノであるか、または、適切には、置換された環状アミノ基であることができ、そして

R^2 、 R^3 および R^4 は、相互に独立して、直鎖状もしくは分岐鎖状アルキル、ヘテロアリールメチルまたはベンジル基を表し、ベンジル基は場合により水素、直鎖状もしくは分岐鎖状アルキル、環状アルキル、アルケニル、アルコキシ、アルケニルオキシ、アリールアルコキシ、シクロアルコキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、アルコキシカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、ヘテロアリールカルボニル、アルコキシスルホニル、アルキルアミノスルホニル、ジアルキルアミノスルホニル、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、ヘテロアリールスルホニルよりなる群からの基によって置換され、群の各々は場合により置換された、ヒドロキシル、ハロゲン、ニトロ、アミノ、カルボキシル、カルバモイル、シアノであることができるか、または場合により適切な環状アミノ基によって置換されているが、

但し、 R^1 が4-ヒドロキシを表し、

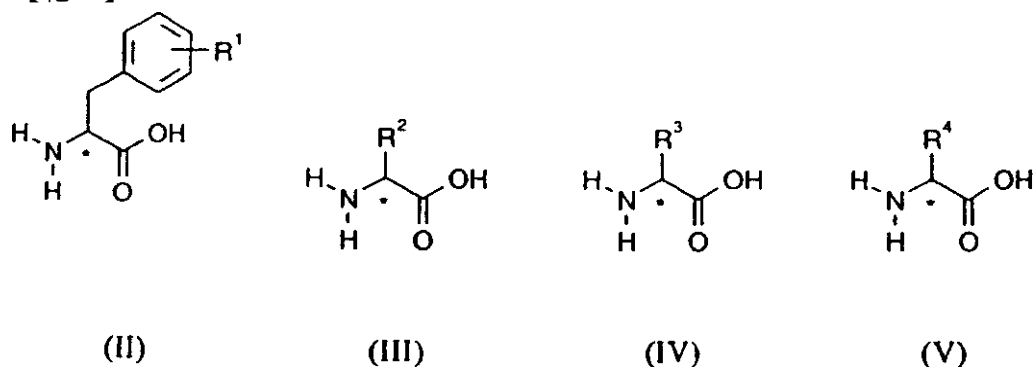
R^3 が非置換ベンジルを表し、そして他の基が上記の意味を有する、

式(I)で示される化合物は除く、

で示される24個の環原子を有する置換アリール乳酸含有シクロデブシペプチドの製造方法であって、

a) 一般式(II)、(III)、(IV)および(V)

【化2】

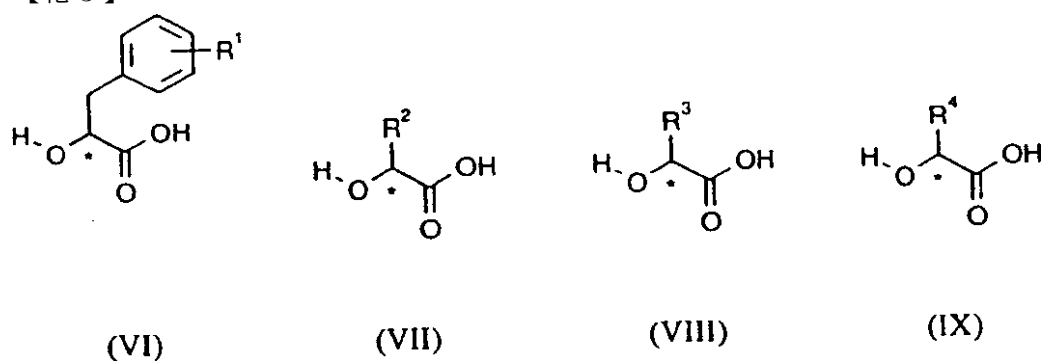


(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は上記の意味を有す)

で示される光学活性またはラセミアミノ酸、或いは

b) 一般式(VI)、(VII)、(VIII)および(IX)

【化3】



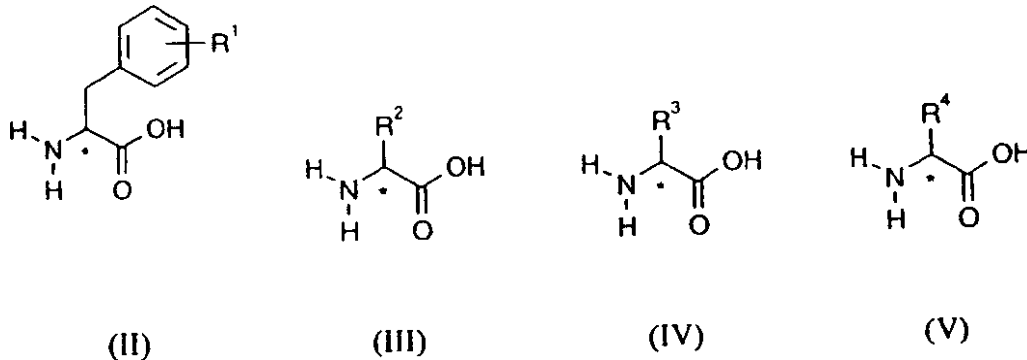
(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は上記の意味を有す)
 で示される光学活性またはラセミ 2-ヒドロキシカルボン酸を、
 緩衝系中で、適切な栄養溶液中の置換アリール乳酸含有シクロデブシペプチドの生産能を
 有する ミセリア・ステリリア (Mycelia sterilia) に属する種である真
 菌株の存在下で反応させ、次いで所望の 24 個の環原子を有する置換アリール乳酸含有シ
 クロデブシペプチドを単離することを特徴とする、一般式 (I) で示されるペプチドの製
 造方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の一般式 (I) で示されるペプチドの製造方法であって、一般式 (II)
 、(III)、(IV) および (V)

10

【化 4】



20

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は、請求項 1 における一般式 (II)、(III)、(IV) および (V) について定義した意味を有す)
 で示される光学活性またはラセミアミノ酸を、緩衝系中で、適切な栄養溶液中の置換アリ
 ール乳酸含有シクロデブシペプチドの生産能を有する ミセリア・ステリリア (Mycelia sterilia) に属する種である真菌株の存在下で反応させ、次いで所望の 2
 4 個の環原子を有する置換アリール乳酸含有シクロデブシペプチドを単離することを特徴
 とする、上記製造方法。

【発明の詳細な説明】

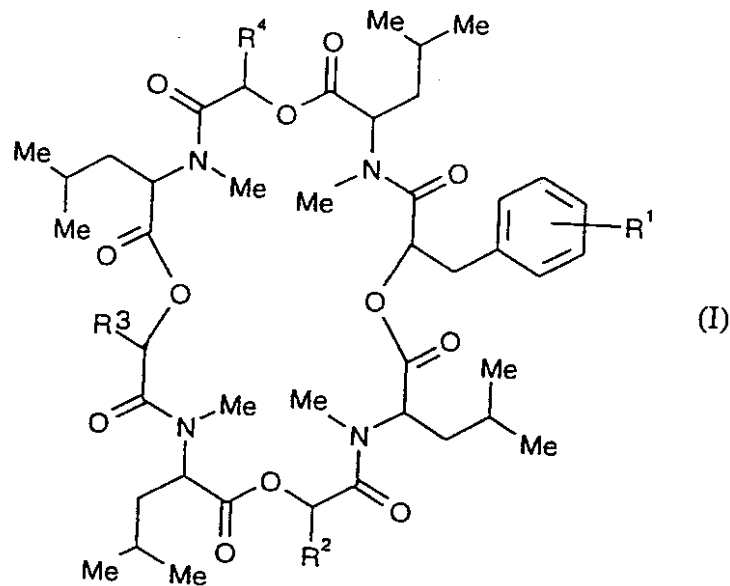
本発明は、その幾つかが既知である、24 個の環原子を有する置換アリール乳酸含有シク
 ロデブシペプチドの新規な製造方法に関する。

30

微生物法による 24 個の環原子を有する種々の環状、アリール乳酸含有デブシペプチド、
 例えば、PF 1022A、PF 1022B、PF 1022C、PF 1022D お
 よび PF 1022E の製造は既に記載された (シクロオクタデブシペプチドの発酵：欧
 州特許出願公開第 382173 号明細書；T. Sasaki et al., J. Ant
 ibiotics 45, 1992, 692-697 における、ミセリア・ステリリア (F
 ERM BP-2671；前名称 FERM P-10504) からの PF 1022
 A；同一の培養物から単離された：PF 1022B、PF 1022C および PF 1
 022D；JP-Pat. 5170740、PF 1022E；JP-Pat. 6184
 126 を参照)。

40

PF 1022 群の化合物は以下の式 (I) を有する：



名称	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
PF1022A	-H	-メチル	-ベンジル	-ベンジル
PF1022B	-H	-ベンジル	-ベンジル	-ベンジル
PF1022C	-H	-メチル	-ベンジル	-ベンジル
PF1022D	-H	-メチル	-メチル	-メチル
PF1022E	4-ヒドロキシ	-メチル	-ベンジル	-メチル

また、24個の環原子を有する多種類の環状、置換アリール乳酸含有デプシペプチドが化学合成法によって製造することができることは既に開示された（シクロオクタデプシペプチドの全合成：JP Pat. 5 229 997；JP Pat. 5 320 148；Makoto Ohya et al., Biosci. Biotech. Biochem. 58 (6), 1994, 1193-1194頁；Makio Kobayashi et al., Annu. Rep. Sankyo Res. Lab. 46, 1994, 67-75頁；Stephen J. Nelson et al., J. Antibiotics 47, (11), 1994, 1322-1327頁；J. Scherkebeck et al., Tetrahedron 51 (31), 1995, 8459-8470頁 [PF 1022A]；国際公開第94/19334号明細書；国際公開第95/19053号明細書；欧州特許出願公開第634408号明細書；欧州特許出願公開第626375号明細書；欧州特許出願公開第626376号明細書を参照）。

さらに、24個の環原子を有する一定のアリール乳酸含有シクロデプシペプチドは殺内部寄生体剤として使用することができることは知られている（例えば、欧州特許出願公開第382号明細書；欧州特許出願公開第503538号明細書；国際公開第93/19053号明細書；欧州特許出願公開第0634408号明細書；国際公開第94/19334号明細書；；国際公開第95/07272号明細書；欧州特許出願公開第626375号明細書；欧州特許出願公開第626376号明細書を参照）。

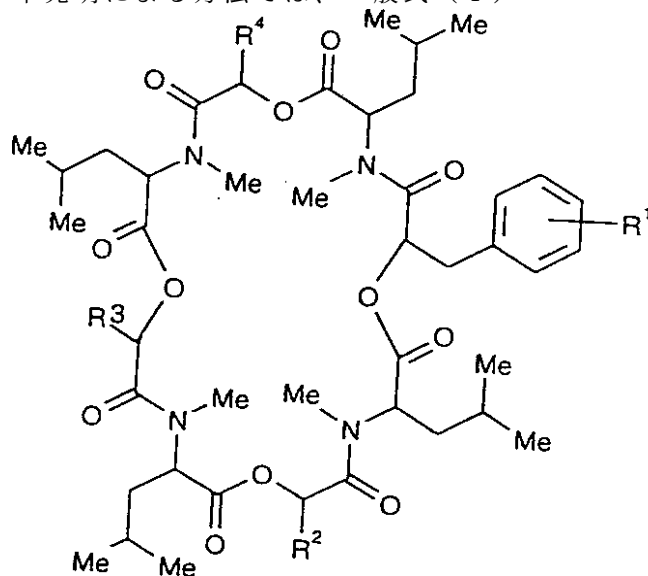
化学合成法によって、一定のシクロオクタデプシペプチドのフェニル乳酸フラグメント中の置換基R¹の広範な変形が可能になるが（国際公開第94/19334号明細書；国際公開第95/19053号明細書；欧州特許出願公開第634408号明細書；欧州特許

出願公開第626375号明細書；欧州特許出願公開第626376号明細書を参照）、現在まで、微生物法では、非置換D-フェニル乳酸含有シクロオクタデプシペプチドだけが好適には生成した（ $R^1 = -H$ ；PF 1022A、PF 1022B、PF 1022CおよびPF 1022Dを参照）。

D-（4-ヒドロキシフェニル）乳酸含有シクロオクタデプシペプチド PF 1022E（ $R^1 = 4$ -ヒドロキシ；JP Pat. 6 184 126を参照）の既に記載した発酵の外には、他の置換アリール乳酸含有シクロオクタデプシペプチドの発酵的製造は現在まで開示されていなかった。

それ故、本発明は、無孢子不完全菌目（Agonomycetales）に属する種である真菌（fungal）株またはそれらから単離された酵素製剤による24個の環原子を有する置換アリール乳酸含有シクロデプシペプチドの製造方法に関する。

本発明による方法では、一般式（I）



(I)

式中、

R^1 は、直鎖状もしくは分岐鎖状アルキル、環状アルキル、アルケニル、アルコキシ、アルケニルオキシ、アリールアルコキシ、シクロアルコキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、アルコキシカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、ヘテロアリールカルボニル、アルコキシスルホニル、アルキルアミノスルホニル、ジアルキルアミノスルホニル、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、ヘテロアリールスルホニルを表し、それらの各々は場合により置換された、ヒドロキシル、ハロゲン、ニトロ、アミノ、カルボキシル、カルバモイル、シアノであるか、または、適切には、置換された環状アミノ基であることができ、そして

R^2 、 R^3 および R^4 は、相互に独立して、直鎖状もしくは分岐鎖状アルキル、ヘテロアリールメチルまたはベンジル基を表し、ベンジル基は場合により水素、直鎖状もしくは分岐鎖状アルキル、環状アルキル、アルケニル、アルコキシ、アルケニルオキシ、アリールアルコキシ、シクロアルコキシ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アルキルカルボニル、アルキルカルボニルオキシ、アルコキシカルボニル、アルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、ヘテロアリールカルボニル、アルコキシスルホニル、アルキルアミノスルホニル、ジアルキルアミノスルホニル、アルキルチオ、アルキルスルフィニル、アルキルスルホニル、ヘテロアリールスルホニルよりなる群からの基によって置換され、群の各々は場合により置換された、ヒドロキシル、ハロゲン、ニトロ、アミノ、カルボキシル、カルバモイル、シアノであることができるか、または場合により適切な環状アミノ基によって置換されているが、 R^1 が4-ヒドロキシを表し、

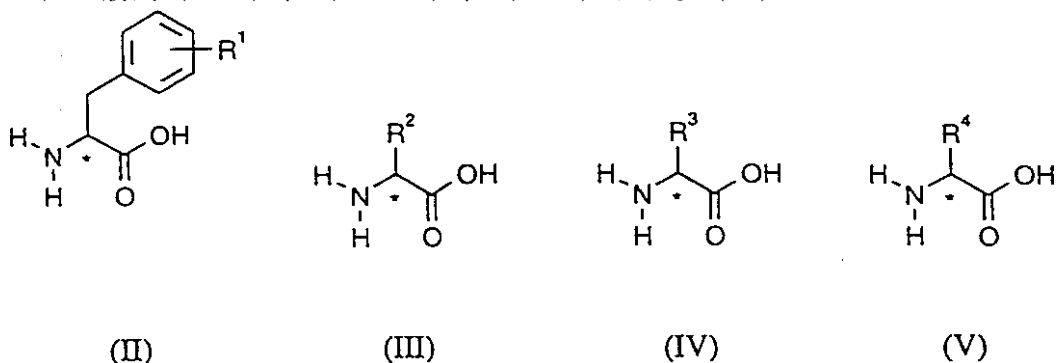
R^3 が非置換ベンジルを表し、

そして他の基が上記の意味を有する、

式 (I) で示される化合物は除く、

で示される 24 個の環原子を有する置換アリール乳酸含有シクロデブシペプチドは、

a) 一般式 (II)、(III)、(IV) および (V)

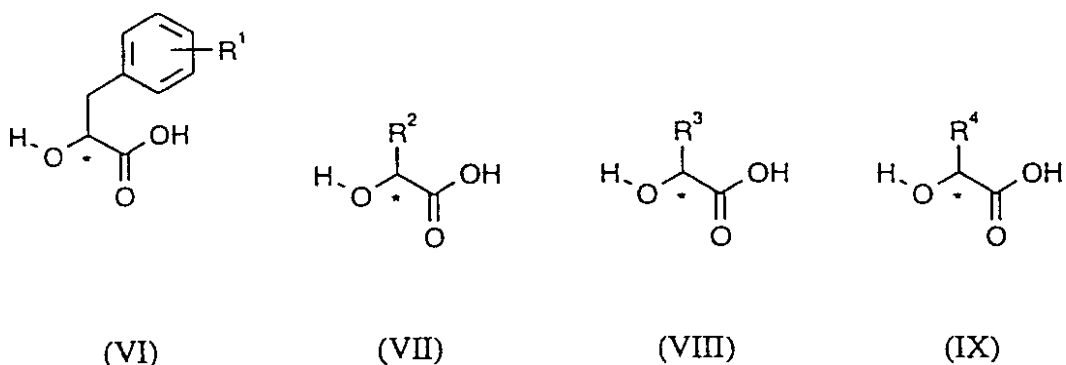


10

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は上記の意味を有す)

で示される光学活性またはラセミアミノ酸、或いは

b) 一般式 (VI)、(VII)、(VIII) および (IX)



20

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は上記の意味を有す)

で示される光学活性またはラセミ 2-ヒドロキシカルボン酸を、適切な栄養溶液中の無胞子不完全菌目に属する種である真菌株の存在下または緩衝系中のこれらの真菌株から単離されたシンテターゼの存在下で反応させ、次いで所望の 24 個の環原子を有する置換されたアリール乳酸含有シクロデブシペプチドを単離することによって製造される。

30

一般式 (I) で示される 24 個の環原子を有する置換アリール乳酸含有シクロデブシペプチド並びにそれらの酸付加塩および金属塩錯体は、特に医学および獣医学の分野において、内部寄生体の防除に顕著に適する。

上記一般式における基それ自体または基の成分として、場合により置換されたアルキルは、好適には 1~6 個、特に 1~4 個の炭素原子を有する直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキルを示す。挙げることのできる例は、場合により置換されたメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、1-メチルブチル、2-メチルブチル、3-メチルブチル、1, 2-ジメチルプロピル、1, 1-ジメチルプロピル、2, 2-ジメチルプロピル、1-エチルプロピル、ヘキシル、1-メチルペンチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、1, 1-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、1, 1, 2-トリメチルプロピル、1, 2, 2-トリメチルプロピル、1-エチルブチルおよび 2-エチルブチルである。好適には、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチルおよび *tert*-ブチルが挙げられてもよい。

40

上記一般式における基それ自体または基の成分として、場合により置換されたアルケニルは、好適には 1~6 個、特に 1~4 個の炭素原子を有する直鎖状もしくは分岐鎖状のアルケニルを示す。挙げることのできる例は、場合により置換されたビニル、2-プロペニル、2-ブテニル、3-ブテニル、1-メチル-2-プロペニル、2-メチル-2-プロペ

50

ニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、4-ペンテニル、1-メチル-2-ブテニル、2-メチル-2-ブテニル、3-メチル-2-ブテニル、1-メチル-3-ブテニル、2-メチル-3-ブテニル、3-メチル-3-ブテニル、1, 1-ジメチル-2-プロペニル、1, 2-ジメチル-2-プロペニル、1-エチル-2-プロペニル、2-ヘキセニル、3-ヘキセニル、4-ヘキセニル、5-ヘキセニル、1-メチル-2-ペンテニル、2-メチル-2-ペンテニル、3-メチル-2-ペンテニル、4-メチル-2-ペンテニル、3-メチル-3-ペンテニル、4-メチル-3-ペンテニル、1-メチル-4-ペンテニル、2-メチル-4-ペンテニル、3-メチル-4-ペンテニル、4-メチル-4-ペンテニル、1, 1-ジメチル-2-ブテニル、1, 1-ジメチル-3-ブテニル、1, 2-ジメチル-2-ブテニル、1, 2-ジメチル-3-ブテニル、1, 3-ジメチル-2-ブテニル、1, 3-ジメチル-3-ブテニル、2, 2-ジメチル-3-ブテニル、2, 3-ジメチル-2-ブテニル、2, 3-ジメチル-3-ブテニル、1-エチル-2-ブテニル、1-エチル-3-ブテニル、2-エチル-2-ブテニル、2-エチル-3-ブテニル、1, 1, 2-トリメチル-2-プロペニル、1-エチル-1-メチル-2-プロペニルおよび1-エチル-2-メチル-2-プロペニルである。好適には、場合により置換されたエテニル、2-プロペニル、2-ブテニルまたは1-メチル-2-プロペニルを挙げることができる。

10

上記一般式における基それ自体上または基の成分として、場合により置換されたシクロアルキルは、好適には3～10個、特に3、5もしくは7個の炭素原子を有する一、二または三環式シクロアルキルを表す。挙げることのできる例は、場合により置換されたシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、ビスクロ〔2. 2. 1〕ヘプチル、ビスクロ〔2. 2. 2〕オクチルおよびアダマンチルである。

20

上記一般式における基それ自体または基の成分として、場合により置換されたアルコキシは、好適には1～6個、特に1～4個の炭素原子を有する直鎖状もしくは分岐鎖状のアルコキシを表す。挙げることのできる例は、場合により置換されたメトキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、イソプロポキシ、*n*-ブトキシ、イソブトキシ、*sec*-ブトキシおよび*tert*-ブトキシである。

上記一般式における基それ自体または基の成分として、場合により置換されたアルキルチオは、好適には1～6個、特に1～4個の炭素原子を有する直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキルチオを表す。挙げることのできる例は、場合により置換されたメチルチオ、エチルチオ、*n*-プロピルチオ、イソプロピルチオ、*n*-ブチルチオ、イソブチルチオ、*sec*-ブチルチオおよび*tert*-ブチルチオである。

30

上記一般式における基それ自体または基の成分として、場合により置換されたアルコシカルボニルは、好適には1～6個、特に1～4個の炭素原子を有する直鎖状もしくは分岐鎖状のアルコシカルボニルを表す。挙げることのできる例は、場合により置換されたメトシカルボニル、エトシカルボニル、*n*-プロポシカルボニル、イソプロポシカルボニル、*n*-ブトシカルボニル、イソブトシカルボニル、*sec*-ブトシカルボニルおよび*tert*-ブトシカルボニルである。

上記一般式における基それ自体または基の成分として、場合により置換されたアルキルカルボニルは、好適には1～6個、特に1～4個の炭素原子を有する直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキルカルボニルを表す。挙げることのできる例は、場合により置換されたメチルカルボニル、エチルカルボニル、*n*-プロピルカルボニル、イソプロピルカルボニル、*n*-ブチルカルボニル、イソブチルカルボニル、*sec*-ブチルカルボニルおよび*tert*-ブチルカルボニルである。

40

上記一般式において、場合により置換されたアリールアルキルは、好適にはアリール部分および／またはアルキルにおいて場合により置換されており、好適にはアリール部分に炭素原子6個または10個、特に8個有し（好適にはフェニルまたはナフチル、特にフェニル）、そしてアルキル部分に炭素原子を1～4個、特に1～2個有するものであり、アルキル部分が直鎖状もしくは分岐鎖状であることのできる、アリールアルキルを表す。場合

50

により置換されたベンジルおよびフェニルエチルを好ましい例として挙げることができる。

上記一般式における基それ自体または基の成分として、場合により置換されたヘタリル (heteraryl) は、好適には1~3個、特に1または2個の、同一もしくは異なるヘテロ芳香族基を有する5~7員環を表す。ヘテロ芳香族基におけるヘテロ原子は酸素、硫黄または窒素である。場合により置換されたフリル、チエニル、ピラゾリル、イミダゾリル、1, 2, 3-および1, 2, 4-トリアゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、1, 2, 3-, 1, 3, 4-, 1, 2, 4-および1, 2, 5-オキサジアゾリル、アゼピニル、ピロリル、ピリジル、ピペラジニル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、1, 3, 5-, 1, 2, 4-および1, 2, 3-トリアジニル、1, 2, 4-, 1, 3, 2-, 1, 3, 6-および1, 2, 6-オキサジニル、オキセピニル、チエピニル並びに1, 2, 4-ジアゼピニルを好ましい例として挙げることができる。

上記一般式の置換された基は、一つまたはそれ以上、好適には1~3個、特に1~2個の、同一もしくは異なる置換基を持つことができる。好ましい例として挙げることのできる置換基は：

メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチルおよびtert-ブチルのような好適には1~4個、特に1~2個の炭素原子を有するアルキル；メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、イソプロポキシ、n-ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシおよびtert-ブトキシのような好適には1~4個、特に1~2個の炭素原子を有するアルコキシ；メチルチオ、エチルチオ、n-プロピルチオ、イソプロピルチオ、n-ブチルチオ、イソブチルチオ、sec-ブチルチオおよびtert-ブチルチオのようなアルキルチオ；ジフルオロメチル、トリフルオロメチル、トリクロロメチルのような、好適には1~4個、特に1~2個の炭素原子および好適には1~5個、特に1~3個のハロゲン原子を有し、ハロゲン原子が同一もしくは異なりそしてハロゲン原子として好適にはフッ素、塩素または臭素特にフッ素または塩素であるハロゲンノアルキル；ヒドロキシル；ハロゲン、好適にはフッ素、塩素、臭素およびヨウ素、特にフッ素および塩素；シアノ；ニトロ；アミノ；メチルアミノ、メチルエチルアミノ、ジメチルアミノ、n-プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、メチル-n-ブチルアミノのような、好適にはアルキル当たり1~4個、特に1~2個の炭素原子を有するモノアルキルアミノおよびジアルキルアミノ；メチルカルボニルのようなアルキルカルボニル基；メトキシカルボニルおよびエトキシカルボニルのような、好適には2~4個、特に2~3個の炭素原子を有するアルコキシカルボニル；1~4個、特に1~2個の炭素原子を有するアルキルスルフィニル；トリフルオロメチルスルフィニルのような、1~4個、特に1~2個の炭素原子および1~5個のハロゲン原子を有するハロゲノスルフィニル；スルホニル ($-SO_2-OH$)；メチルスルホニルおよびエチルスルホニルのような好適には1~4個、特に1ない2個の炭素原子を有するアルキルスルホニル或いはトリフルオロメチルスルホニルのような、1~4個、特に1~2個の炭素原子および1~5個のハロゲン原子を有するハロゲノアルキルスルホニルである。

可能で適切な環状アミノ基は、ヘテロ原子として一つまたはそれ以上の窒素を有するヘテロ芳香族基または脂肪族環系であり、式中、ヘテロ環は飽和もしくは不飽和の、環系もしくは数種の縮合環系であることができ、そして場合により窒素、酸素および硫黄などのような他のヘテロ原子を含有す。追加的には、環状アミノ基はまたスピロ環または橋かけ環系を表すことができる。環状アミノ基を形成する原子数は、例えば、それらが3~8個の原子よりなる単環系の場合および7~11個の原子の三環系の場合、制限されない。

挙げることのできる環状アミノ基の例は、1-アゼチジニル、ピロリジノ、2-ピロリン-1-イル、1-ピロリル、ピペリジノ、1, 4-ジヒドロピリジン-1-イル、1, 2, 5, 6-テトラヒドロピリジン-1-イル、ホモピペリジノのような、ヘテロ原子として窒素を有する飽和および不飽和単環式環系であり；挙げることのできる環状アミノ基の例は、1-イミダゾリジニル、1-イミダゾリル、1-ピラゾリル、1-トリアゾリル、1-テトラゾリル、1-ピペラゾニル、1-ホモピペラジニル、1, 2-ジヒドロピリダジ

10

20

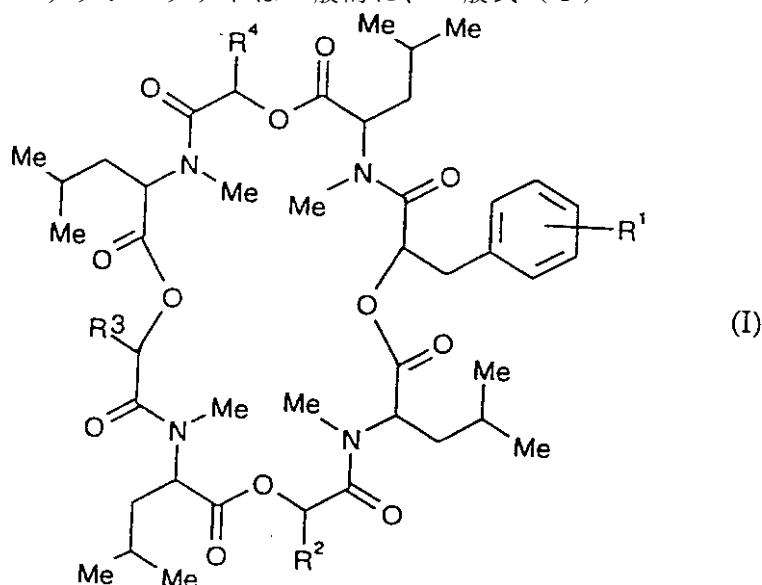
30

40

50

ン-1-イル、1, 2-ジヒドロプロピリミジン-1-イル、ペルヒドロピリミジン-1-イルおよび1, 4-ジアザシクロヘプタン-1-イルのような、ヘテロ原子のような2個またはそれ以上の窒素原子を有する飽和および不飽和の単環式環系であり；挙げることのできる環状アミノ基の例は、オキサゾリジン-3-イル、イソキサゾリド-2-イル、モルホリンまたは2, 6-ジメチルモルホリンのような、ヘテロ原子として1~3個の窒素原子および1~2個の酸素原子を有する飽和および不飽和の単環式環系であり；挙げることのできる環状アミノ基の例は、ヘテロ原子として1~3個の窒素原子および1~2個の硫黄原子を有する飽和および不飽和の単環式環系であり、挙げることのできる環状アミノ基の例は、インドール-1-イル、1, 2-ジヒドロベンゾイミダゾール-1-イル、ペルヒドロピロロー[1, 2-a]ピリジン-2-イルのような、飽和および不飽和の縮合環式環系であり；挙げることのできる環状アミノ基の例は、2-アザスピロ[4, 5]デカン-2-イルのようなスピロ環式環系であり；言及されてもよい環状アミノ基の例は、2-アザビシクロ[2. 2. 1]ヘプタン-7-イルのような橋かけヘテロ環式環系である。

本発明に従って製造することができる24個の環原子を有する飽和アリール乳酸含有シクロデプシペプチドは一般的に、一般式(I)



によって特定される。

好適に製造される一般式(I)で示される化合物は、式中、

R¹が、4個までの炭素原子を有する直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル、特にメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル；6個までの炭素原子を有する環状アルキル、特にシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル；アルコキシ、特にメトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ；シクロアルコキシ、特にシクロプロピルオキシ；アルケニルオキシ、特にアリルオキシ；ジオキソアルキレン、特にジオキソメチレン；アルキルアミノ、特にメチルアミノ、エチルアミノ；ジアルキルアミノ、特にジメチルアミノ、ジエチルアミノ；アルコキシカルボニル、特にメトキシカルボニル、エトキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル；アルキルアミノカルボニル、特にメチルアミノカルボニル；ジアルキルアミノカルボニル、特にジメチルアミノカルボニル；アルキルアミノスルホニル、特にメチルアミノスルホニル；ジアルキルアミノスルホニル、特にジメチルアミノスルホニル；アルキルチオ、特にメチルチオまたはtert-ブチルチオ；アルキルスルフィニル、特にメチルスルフィニルまたはtert-ブチルスルフィニル；アルキルスルホニル、特にメチルスルホニルまたはtert-ブチルスルホニル；ヘテロアリールスルホニル、特にN-モルホリルスルホニルまたはN-ピラゾリルスルホニルを表し、それらの各々は場合により置換された、

ヒドロキシル、ハロゲン、特に臭素、塩素、フッ素もしくはヨウ素、ニトロ、アミノ、カルボキシル、カルバモイル、シアノまたは、適切には、置換された環状アミノ基、特にN-ピロリジノ、N-ピペリジノ、N-モルホリノ、N-(2, 6-ジメチルモルホリノ)、N-メチルピペラジノ、N-チオモルホリノまたはN-ジオキソチオモルホリノであることができ、そして

R^2 および R^4 が、4個までの炭素原子を有する直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル、特にメチルを表し、そして

R^3 が、4個までの炭素原子を有する直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル、特にメチルを表すか、或いは水素；4個までの炭素原子を有する直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル、特にメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル；6個までの炭素原子を有する環状アルキル、特にシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル；アルコキシ、特にメトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ；シクロアルコキシ、特にシクロプロピルオキシ；アルケニルオキシ、特にアリルオキシ；ジオキソアルキレン、特にジオキソメチレン；アルキルアミノ、特にメチルアミノ、エチルアミノ；ジアルキルアミノ、特にジメチルアミノ、ジエチルアミノ；アルコキシカルボニル、特にメトキシカルボニル、エトキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル；アルキルアミノカルボニル、特にメチルアミノカルボニル；ジアルキルアミノカルボニル、特にジメチルアミノカルボニル；アルキルアミノスルホニル、特にメチルアミノスルホニル；ジアルキルアミノスルホニル、特にジメチルアミノスルホニル；アルキルチオ、特にメチルチオまたはtert-ブチルチオ；アルキルスルフィニル、特にメチルスルフィニルまたはtert-ブチルスルフィニル；アルキルスルホニル、特にメチルスルホニルまたはtert-ブチルスルホニル；ヘテロアリアルスルホニル、特にN-モルホリノスルホニルまたはN-ピラゾリルスルホニルよりなる群からの基によって場合により置換されているをベンジル基を表し、それらの各々は場合により置換された、ヒドロキシル、ハロゲン、特に臭素、塩素、フッ素もしくはヨウ素；ニトロ、アミノ、カルボキシル、カルバモイル、シアノであることができるか、或いはそれは適切な環状アミノ基、特にN-ピロリジノ、N-ピペリジノ、N-モルホリノ、N-(2, 6-ジメチルモルホリノ)、N-メチルピペラジノ、N-チオモルホリノもしくはN-ジオキソチオモルホリノによって場合により置換されているが、 R^1 が4-ヒドロキシを表し、

R^3 が非置換ベンジルを表し、

そして他の基は上記の意味を有する

式(I)で示される化合物は除く、

ものである。

特に好適に製造される一般式(I)で示される化合物は、

式中、

R^1 が、アルコキシ、特にメトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ；アルキルアミノ、特にメチルアミノ、エチルアミノ；ジアルキルアミノ、特にジメチルアミノ、ジエチルアミノ；ヒドロキシル；ハロゲン、特に臭素、塩素、フッ素もしくはヨウ素；ニトロ；アミノ；適切には、置換された環状アミノ基、特にN-モルホリノ、N-メチルピペラジノまたはN-ジオキソチオモルホリノを表し、そして

R^2 および R^4 が、4個までの炭素原子を有する直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル、特にメチルを表し、そして

R^3 が、4個までの炭素原子を有する直鎖状もしくは分岐鎖状のアルキル、特にメチルを表すか、或いは水素；アルコキシ、特にメトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ；アルキルアミノ、特にメチルアミノ、エチルアミノ；ジアルキルアミノ、特にジメチルアミノ、ジメチルアミノ；ヒドロキシル；ハロゲン、特に臭素、塩素、フッ素またはヨウ素；ニトロ；アミノよりなる群からの基によって場合により置換されているか、或いは適切な環状アミノ基

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-4-ブロムフェニルラク
 チル-N-メチル-L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-3-ブロムフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-3-ブロムフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-フェニルラクチル-N-
 メチル-L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-3-ブロムフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-3-ブロムフェニルラク
 チル-N-メチル-L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-2-ブロムフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-2-ブロムフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-フェニルラクチル-N-
 メチル-L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-2-ブロムフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-2-ブロムフェニルラク
 チル-N-メチル-L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-4-クロルフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-4-クロルフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-フェニルラクチル-N-
 メチル-L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-4-クロルフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-4-クロルフェニルラク
 チル-N-メチル-L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-3-クロルフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-3-クロルフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-フェニルラクチル-N-
 メチル-L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-3-クロルフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-3-クロルフェニルラク
 チル-N-メチル-L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-2-クロルフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-2-クロルフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-フェニルラクチル-N-
 メチル-L-ロイシル-D-ラクチル)、
 シクロ(-N-メチル-L-ロイシル-D-2-クロルフェニルラクチル-N-メチル-
 L-ロイシル-D-ラクチル-N-メチル-L-ロイシル-D-2-クロルフェニルラク
 チル-N-メチル-L-ロイシル-D-ラクチル)。

一般式(I)で示される化合物は幾つかの場合に知られている(例えば、国際公開第94
 /19334号明細書; 国際公開第95/19053号明細書; 欧州特許出願公開第62
 6375号明細書; 欧州特許出願公開第626376号を参照)。

10

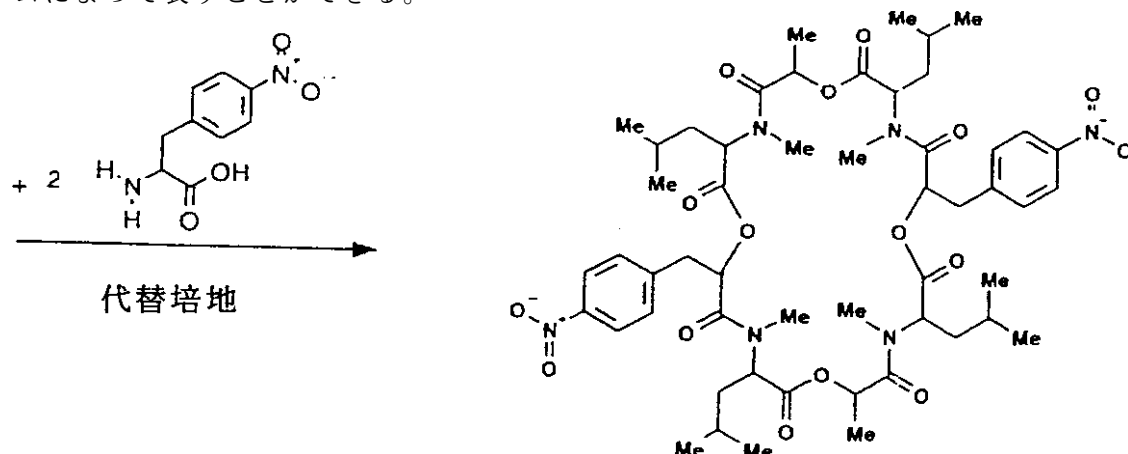
20

30

40

50

24個の環原子を有する置換アリール乳酸含有シクロデブシペプチド (I) の製造のための本発明による方法aにおいて、4-ニトロフェニルアラニン ($R^1 = 4-NO_2$) が式 (II) で示されるアミノ酸として使用される場合、方法は、例えば、以下の反応スキームによって表すことができる。



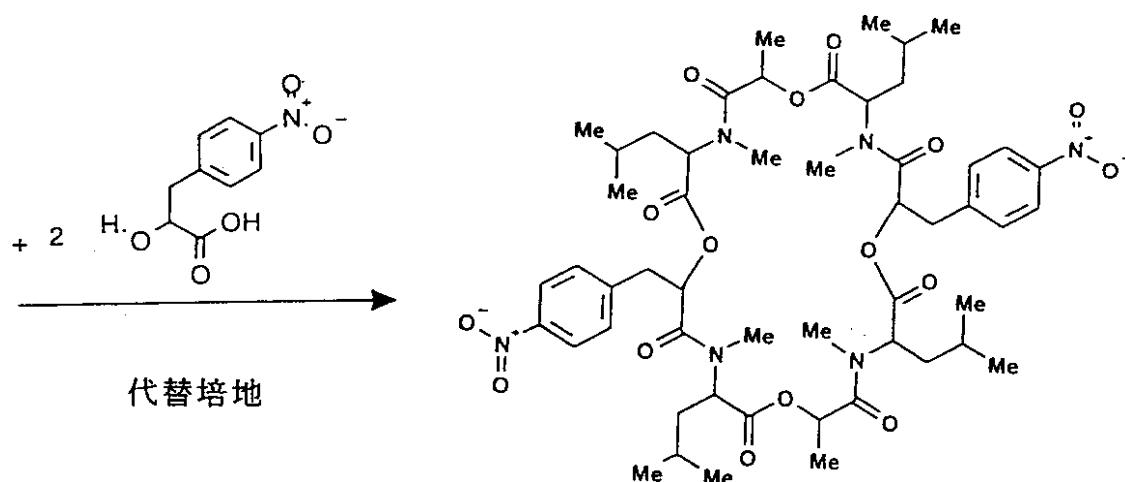
式 (II) ~ (V) は、本発明による方法aを行うための出発物質として必要なアミノ酸の一般的定義を提供する。これらの式では、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は好適には、本発明による式 (I) で示される物質の説明に関連して、これらの置換基に好適であるとして既に記載されたそれらの基を表す。

出発物質として使用された天然または合成アミノ酸は、それらがキラルである場合、(S) -または (R) -立体配置 (L-またはD-型) で存在することができる。しかし、(S) -立体配置を有する α -アミノ酸は好適である。

挙げることのできる例は：

Aad、Abu、j Abu、ABz、2ABz、 ϵ Aca、Ach、Acp、Adpd、Ahb、Aib、 β Aib、Ala、 β Ala、 Δ Ala、Alg、All、Ama、Amt、Ape、Apm、Apr、Arg、Asn、Asp、Asu、Aze、Azi、Bai、Bph、Can、Cit、Cys、(Cys)₂、Cyta、Daad、Dab、Dadd、Dap、Dapm、Dasu、Djen、Dpa、Dtc、Fel、Gln、Glu、Gly、Guv、hAla、hArg、hCys、hGln、hGlu、His、hIle、hLeu、hLys、hMet、hPhe、hPro、hSer、hThr、hTrp、hTyr、Hyl、Hyp、3Hyp、Ile、Ise、Iva、Kyn、Lant、Lcn、Leu、Lsg、Lys、 β Lys、 Δ Lys、Met、Mim、Min、nArg、Nle、Nva、Oly、Orn、Pan、Pec、Pen、Phe、Phg、Pic、Pro、 Δ Pro、Pse、Pse、Pya、Pyr、Pza、Qin、Ros、Sar、Sec、Sem、Ser、Thi、 β Thi、Thr、Thy、Thx、Tia、Tle、Tly、Trp、Trta、Tyr、Val、Nal、Tbg、Chg、Thiaである (例えば、Houben-Weyl, 有機化学の方法 (Methoden der Organischen Chemie), 第XV/1および2巻, Stuttgart, 1974年を参照)。

しかし、好適には、置換フェニルアラニン (Phe) を挙げることもできる。一般式 (II) で示される置換フェニルアラニンでは、 R^1 は好適には、本発明による式 (I) で示される物質の説明に関連して、この置換基に好適であるとして既に記載された基を表す。24個の環原子を有する置換アリール乳酸含有シクロデブシペプチド (I) の製造のための本発明による方法bでは、4-ニトロフェニル乳酸 ($R^1 = 4-NO_2$) が式 (VI) で示される2-ヒドロキシカルボン酸として使用される場合、方法bは、例えば、以下の反応スキームによって表すことができる。



10

式(VI)～(IX)は、本発明による方法bを行うための出発物質として必要な2-ヒドロキシカルボン酸の一般的定義を提供する。

これらの式では、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 は好適には、本発明による式(I)で示される物質の説明に関連して、これらの置換基に好適であるとして既に記載されたそれらの基を表す。

出発物質として使用された2-ヒドロキシカルボン酸は、それらがキラルである場合、(S)-または(R)-立体配置(L-またはD-型)で存在することができる。しかし、(S)-立体配置を有する2-ヒドロキシカルボン酸は好適である。

20

挙げることのできる例は：

Hyac、Hyba、Hydd、Hyde、Hyic、Hyiv、Hymb、Hypp、Hypr(Lac)、Hytd、Hyud、Hyva、PhLac(例えば、Houben-Weyl、有機化学の方法(Methoden der Organischen Chemie)、第XV/1および2巻、Stuttgart、1974年を参照。

しかし、好適には、置換フェニル乳酸(PhLac)を挙げることもできる。一般式(VI)で示される置換フェニル乳酸では、 R^1 は好適には、本発明による式(I)で示される物質の説明に関連して、この置換基に好適であるとして既に記載された基を表す。

本発明による方法aおよびbを行うために言及されてもよい適切な真菌株は無孢子不完全菌目に属する種であるミセリア・ステリリア(*Mycelia sterilia*)である。

30

特に、ブダペスト条約に従ってBrunswickのドイツ微生物保存機関(the German Collection for Microorganisms)(DMS)に寄託番号DSM10345として1995年11月30日に寄託された真菌株ミセリア・ステリリア541-11を挙げることもできる。

方法はまた微生物から単離されたシンテターゼを用いて行うこともできる。これに必要なシクロデブシペプチド・シンテターゼは、文献から既知である方法によって上記の真菌株から単離することができる(例えば、エンニアチン・シンテターゼの単離(Isolation of enniatin synthetase): R. Pieper, H. Kleinkauf, R. Zocher, J. Antibiotics 45, 1993, 1273-1277頁; 西独特許出願公開第4406025号明細書を参照)。

40

無孢子不完全菌目に属する種である真菌株の発酵は、適切な栄養溶液の存在下で、それ自体が既知である方法によって行われる。これらの栄養溶液は、真菌の増殖に必要な塩並びに炭素源および窒素源を含有する。

本発明による方法を行うために適切で可能な有機塩は、周期表のII乃至VIII亜族の元素のすべてのアルカリ金属塩、アルカリ土金属塩および金属塩である。

これらについて挙げることのできる例は、リチウム、ナトリウム、カリウム、セシウム、マグネシウム、カルシウム、バリウム、亜鉛、カドミウム、スカンジウム、チタン、ジルコニウム、バナジウム、ニオブ、クロム、モリブデン、マンガン、鉄、コバルトまたはニッケルの酢酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、フッ化物、硝酸塩、亜硝酸塩、リン酸塩、

50

リン酸水素塩、リン酸二水素塩、亜リン酸塩、亜リン酸水素塩、硫酸塩、硫酸水素塩、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、炭酸塩および炭酸水素塩である。

好適には、アルカリ土類金属、特にマグネシウム、並びに周期表のⅠⅠ、ⅤⅠⅠおよびⅤⅠⅠⅠ亜族の金属、例えば、亜鉛、マンガンおよび鉄の酢酸塩、ハロゲン化物、リン酸塩、リン酸水素塩、リン酸二水素塩および硝酸塩が使用される。

本発明による方法を行うための可能な炭素源は炭水化物および炭水化物含有生成物である。

これらについて挙げることのできる例は、ペントース、特にリボース、ヘキソース、特にグルコースおよびフラクトースのような単糖、二糖、特にスクロース、マルトースおよびラクトース、三糖、特にラフィノース、並びに四、五および六糖のようなオリゴ糖である

10

好適には、ヘキソース、特にグルコースのような単糖、および二糖、特にスクロースのようなオリゴ糖が使用される。

本発明による方法を行うための可能な窒素源はアミノ三および窒素含有塩である。

これらについて挙げることのできる例は、上記の天然および合成アミノ酸、または硝酸アンモニウム、亜硝酸アンモニウムまたは上記の金属の硝酸塩および亜硝酸塩のような窒素含有塩である。

好適には、上記の天然アミノ酸および硝酸アンモニウムのような窒素含有塩が使用される。

発酵法のために使用された真菌株は、最初に、それ自体が既知である方法によって、例えば、糖蜜／コーンステープリカーよりなる培地中で培養される。培養が起こった後、菌糸体が単離される。自由（free）培養物の製造のために、炭素源および無機塩よりなる赤カビ（Fusarium）規定培地（FDM）に菌糸体を植菌し、そして再び発酵させる。数日後、FDM主培養物は前培養物の各1mlの“uberimpten”によって製造され、同様に発酵させることができる。

20

次いで実際の発酵は式（ⅠⅠ）～（Ⅴ）または（ⅤⅠ）～（ⅠⅩ）で示される化合物の存在下で行われる。

発酵期間は1～30日である。発酵は、+5℃～+40℃、好適には+15℃～+35℃、特に好適には+25℃～+30℃の範囲内の温度で行われる。それは無菌条件下で常圧下で行われる。

30

発酵を行うために、式（ⅠⅠ）～（Ⅴ）または（ⅤⅠ）～（ⅠⅩ）で示される化合物は一般的に5mM～100mM、好適には5mM～70mMの濃度で使用される。

発酵が完了した後、菌糸体は培養物から取り出し、そして濾液は場合により有機溶媒で数回抽出し、ホモジナイズし、次いで濾過する。得られた培養濾液は常法で抽出し、乾燥し、真空下で濃縮する。

得られたシクロデブシペプチド粗生成物は、カラムクロマトグラフィーまたは向流分配によって常法で精製することができる。どれが最適な方法であるかは場合場合により決定されなければならない（製造実施例も参照）。

本発明による方法が単離されたシクロデブシペプチド・シンテターゼの存在下で行われる場合、水性緩衝系中で、金属塩、S-アデノシル-L-メチオニン（SAM）およびアデノシン三リン酸（ATP）の存在下で行われる。

40

挙げることのできる金属は：リチウム、ナトリウム、カリウム、セシウム、マグネシウム、カルシウムまたはバリウムの酢酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、フッ化物、硝酸塩、リン酸塩、リン酸水素塩、亜リン酸塩、亜リン酸水素塩、硫酸塩、硫酸水素塩、亜硫酸塩、亜硫酸水素塩、炭酸塩および炭酸水素塩である。

好適には、アルカリ土類金属塩、例えば、フッ化マグネシウム、硫酸マグネシウムまたは酢酸マグネシウムが使用される。

本発明による方法aおよびbは水性緩衝液中で行われる。

これについて挙げることのできる例は市販の緩衝液、例えば、pH1.0の場合は特にグリシン-塩酸、pH2.0～4.0の場合は特にクエン酸塩-塩酸、pH5.0～6.0

50

の場合は特にクエン酸塩－水酸化ナトリウム溶液、pH 7.0の場合は特にリン酸塩、特にホウ酸塩－塩酸、およびpH 8.0、pH 9.0～10.0の場合は特にホウ酸／塩化カリウム－水酸化ナトリウム溶液である。

方法は好適には「生理学的範囲」内、即ち、6.0～9.5のpHで行われ、そしてこのためにリン酸緩衝液、特にリン酸水素カリウム／リン酸水素二ナトリウムまたはリン酸水素カリウム／リン酸水素二カリウムが好適には使用される。

方法を行う場合、一般的に2 mM～8 mM、好適には3 mM～5 mMの式 (I I)～(V) または (V I)～(I X) で示される化合物、S－アデノシル－L－メチオニン (S A M)、3 mM～9 mM、好適には4 mM～6 mMのアデノシン三リン酸 (A T P)、および2 mM～25 mM、好適には5 mM～15 mMのアルカリ土類金属塩、10 mM～100 mM、好適には40 mM～60 mMの緩衝液が、100 μg～1000 μg、好適には200 μg～600 μgの単離シクロデプシペプチド・シンテターゼと共に生体外で使用される。

10

酵素的生体外合成の反応時間は2分乃至24時間である。酵素的生体外合成は、0℃～+50℃、好適には+10℃～+35℃、特に好適には+20℃～+30℃の温度範囲内で行われる。

それは、6.5～9.5、好適には7.0～8.0のpH範囲内で進行し、pHは全反応の間は緩衝液の添加によって7.3の一定に維持される。

好適には、方法は無菌反応条件下および常圧下で行われる。

酵素的生体外合成は水の添加によって停止することができる。

20

式 (I I)～(V) で示される化合物が使用される場合、酵素的生体外合成を、対応するトランスアミナーゼまたはデヒドロゲナーゼの存在下で、行うことは有利である。

後処理のために、水性相は有機溶媒で数回抽出し、乾燥しそして真空下で濃縮する。

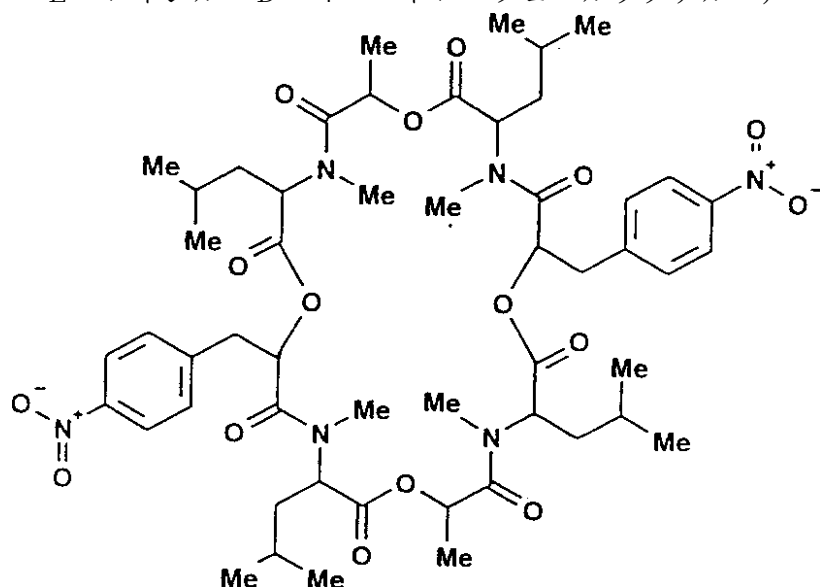
得られたシクロデプシペプチド粗生成物はカラムクロマトグラフィーまたは向流分配によって常法で精製することができる。どれが最適な方法かはまた場合場合により決定しなければならない（製造実施例も参照）。

製造実施例

実施例 1：

シクロ (－N－メチル－L－ロイシル－D－ラクチル－N－メチル－L－ロイシル－D－4－ニトロフェニルラクチル－N－メチル－L－ロイシル－D－ラクチル－N－メチル－L－ロイシル－D－4－ニトロフェニルラクチル－)

30



40

方法 a による製造

4－ニトロフェニルアラニンのインビボでの取り込み：

50 mMの濃度の4－ニトロフェニルアラニンを、無菌条件下で、無孢子不完全菌目 (Agonomycetales) に属する種であるミセリア・ステリリア (Myceli

50

a s t e r i l i a) の 3 日 令 である主培養液に添加し、発酵をさらに 3 日間継続する。次いで、菌糸体を赤カビ属 (*F u s a r i a*) の培養物から取り出し、凍結乾燥した後、メタノールで数回抽出する。次いで収集した有機相を蒸発乾固する。

方法 b による製造

4-ニトロフェニル乳酸のインビボでの取り込み：

50 mM の濃度の 4-ニトロフェニル乳酸を、無菌形態で、無孢子不完全菌目に属する種であるの ミセリア・ステリリア の 3 日 令 である主培養液に添加し、発酵をさらに 3 日間継続する。次いで、菌糸体を赤カビの培養物から取り出し、凍結乾燥した後、メタノールで数回抽出する。次いで収集した有機相を蒸発乾固する。

方法 a および b によって得た生成物を、調製用 H P L C (R P - 1 8 / アセトニトリル-水) によって精製する。

10

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , δ) : 7.43 (d, 8H, =CH_{メタ}; 4- NO_2 -ベンジル) ; 8.15 ; 8.18 (2d, 8H, =CH_{オルト}; 4- NO_2 -ベンジル) ppm [配座異性体混合物]

A P C I - M S m/z (%) : 1040 (MH^+ , 13)

4-ニトロフェニル乳酸のインビボでの取り込み：

50 ~ 100 μg の酵素を、4 mM のジチオスレイトール、20 % のグリセロールおよび以下の基質を持つトリス緩衝液 pH 7.8 の混合物の 200 μl 中で 26 °C で 2 時間インキュベートする：

5 mM A T P、

10 mM M g C l ₂、

2 mM L - ロイシン、

0.5 mM S - アデノシル-L - メチオニン、

2 mM D - 乳酸、

50 ~ 100 μM D - 4 - ニトロフェニル乳酸。

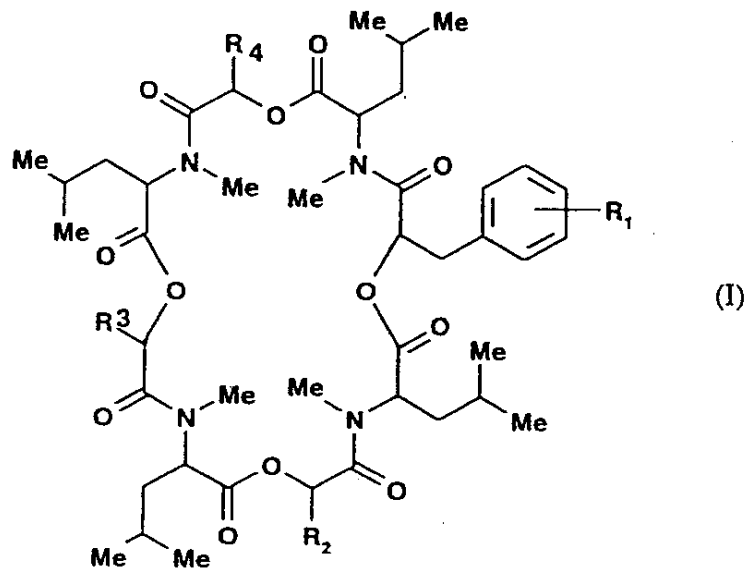
次いで全反応混合物を酢酸エチルで抽出し、生成した生成物をクロマトグラフィーに付す (T L C、H P L C)。

下記の表 1 に示した一般式 (I) で示される化合物を、L D L D L D L D 立体異性体として同様に製造することができる：

20

表 1 :

一般式 (I) で示される化合物の例



実施例番号	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	物理データ
2	4-NO ₂	-CH ₃	-ベンジル	-CH ₃	1017 (M+Na ⁺ , 3); 1012 (M+H ₂ O, 18); 995 (MH ⁺ , 8) ^{a)} ; 7.37; 7.43 (2d, 4H, =CH _{メタ} ; 4-NO ₂ - ベンジル); 8.10 (d, 4H, =CH _{オルト} ; 4-NO ₂ - ベンジル) ^{b)} 121.5; 123.6 (4xC _{オルト} ; 4-NO ₂ -ベンジル); 129.3; 130.0 (4xC _{メタ} ; 4-NO ₂ -ベンジル) ^{c)}
3	4-NH ₂	CH ₃	-ベンジル	-CH ₃	986 (M+Na ⁺ , 20); 964 (MH ⁺ , 100) ^{a)} ; 6.60 (d, 2H, =CH _{オルト} ; 4-NH ₂ -ベンジル) ^{b)}

^{a)} APCI-MS or EI-MS m/z (%)

^{b)} ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ in ppm

^{c)} HMQC シグナル (600 MHz, CDCl₃) δ in ppm

培養、前培養および主培養

1. 寒天上の培養

寒天上の真菌培養物の培養の場合、以下の培地を使用する：

グルコース 2. 0 %、

ペプトン 1. 0 %、

酵母エキス 1. 0 %、

麦芽エキス 1. 0 %、

KH₂PO₄ 0. 0 5 %、

寒天 1. 5 %。

次いで 121°C での滅菌を 20 分間行う。

滅菌後の培地の pH は 7.0 である。

2. 液体培養

a) コーンステープ／糖蜜培地：

関係する ミセリア・ステリリア 株を、糖蜜 (30 g/l)、コーンステープリカー (10 g/l) およびグルコース (30 g/l) よりなる培地中で培養する。

前培養物の製造のために、培地に寒天プレートからの菌糸体を接種し、振盪装置上で約 3 日間の後、さらに同一培地のフラスコ (内容物、各々 100 ml) に接種するのに使用する。

b) 代替培地：

別法として、以下の培地もまた、真菌培養物の培養に使用することができる：

コムギ胚芽エキス 2.0%

ファーマメディア (Pharmamedia) 1.0% 、

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2% 、

NaCl 0.2% 、

澱粉 2.6% 、

麦芽シロップ 6.0% 、

CaCO_3 0.3% 。

次いで 121°C での滅菌は 20 分間行う。

滅菌後の培地の pH は 7.5 である。

以下の供給実験の場合、関係する前駆物質 (例えば、4-ニトロフェニルアラニン、4-ニトロフェニル乳酸、4-アミノフェニルアミン、4-アミノフェニル乳酸) を 3 日令の培養物に添加する；最終濃度は 50 mM である。

10

20

フロントページの続き

- (72)発明者 ボンゼ, ゲルハルト
ドイツ連邦共和国デー 5 1 0 6 1 ケルン・ゲルステンカンフ 1
- (72)発明者 テイルキング, ゲルハルト
ドイツ連邦共和国デー 5 1 3 7 9 レーフェルクゼン・ゲプハルトシュトラッセ 1 1
- (72)発明者 エツエル, ビンフリート
ドイツ連邦共和国デー 4 2 7 9 9 ライヒリンゲン・アンデアブツペル 3 3
- (72)発明者 ハルダー, アヒム
ドイツ連邦共和国デー 5 1 1 0 9 ケルン・オイロパリング 5 4
- (72)発明者 メンケ, ノルベルト
ドイツ連邦共和国デー 5 1 3 8 1 レーフェルクゼン・グルンデルミューレ 2
- (72)発明者 クラインカウフ, ホルスト
ドイツ連邦共和国デー 1 2 2 0 5 ベルリン・バゼラーシュトラッセ 1 7
- (72)発明者 ツオヒヤー, ライナー
ドイツ連邦共和国デー 1 2 1 6 9 ベルリン・ラウエンブルガーシュトラッセ 3 7
- (72)発明者 飯沼 勝春
神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社薬品技術研究所
- (72)発明者 宮本 功一
神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社薬品技術研究所

審査官 新留 豊

- (56)参考文献 特開平 0 3 - 0 3 5 7 9 6 (J P, A)
特開平 0 5 - 1 7 0 7 4 9 (J P, A)
特開平 0 6 - 1 8 4 1 2 6 (J P, A)
特開平 0 7 - 2 5 2 2 9 7 (J P, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B名)
C12P 21/02