

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)(51) Int. Cl.³
C12P 17/106(45) 공고일자 1983년 10월 26일
(11) 공고번호 특허 1983-0002438

(21) 출원번호	특 1980-0002337	(65) 공개번호	특 1983-0002876
(22) 출원일자	1980년 06월 14일	(43) 공개일자	1983년 05월 31일
(30) 우선권주장	48946 1979년 06월 15일 미국(US)		
(71) 출원인	앨크 앤드 캄파니 인코포레이티드	제임스 에프.너우톤	
	미합중국, 뉴저지 라흐웨이		
(72) 발명자	리처드 엘.모나간		
	미합중국, 뉴저지 08873, 서머셋, 존슨토오드 48		
	알프레드 떠블유.알베르츠		
	미합중국, 뉴저지 07078, 소트 힐스, 마틴 달 로오드 24		
	카알 에취.호프만		
	미합중국, 뉴저지 07076, 스코치 플레인스, 마틴 아베뉴 1570		
	조오지 알베르스-소운버그		
	미합중국, 뉴저지 08540, 프린스턴, 티슨 레인 30		
	헨리 조슈아		
	미합중국, 뉴저지 10314, 스테이튼 아일랜드 우드워드 아베뉴 256		
	마리아 비.로페즈		
	미합중국, 뉴저지 07208, 엘리자베스, 엘리자베스 로오드, 스프링 필드 로오드 214		
(74) 대리인	목돈상		

심사관 : 백남훈 (책자공보 제879호)

(54) 저 콜레스테린 혈증성 발효 생성물의 제법

요약

내용 없음.

대표도

도 1

명세서

[발명의 명칭]

저 콜레스테린 혈증성 발효 생성물의 제법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 화합물(1)의 화학 이동을 표시한 것이고,

제2도는 화합물(1)의 IR 스펙트럼을 표시한 것이고,

제3도는 화합물(2)의 화학이동을 표시한 것이고,

제4도는 화합물(2)의 IR스펙트럼을 표시한 것이다.

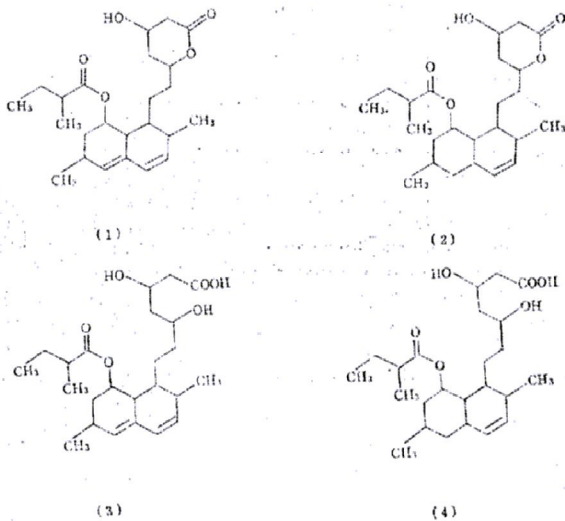
[발명의 상세한 설명]

본 발명은 아스페르길러스(Aspergillus)종의 미생물을 배양하여 저콜레스테린 혈증성 생성물을 제조하는 방법에 관한 것으로서, 특히 본 발명은 다음 일반식(1), (2), (3), 및 (4)의 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

또한 본 발명은 제약적으로 허용되는 상술한 일반식의염 및 치환기가 페닐, 디메틸아미노 또는 아세틸아미노인 카복실산의 저급 알킬 및 치환 알킬 에스테르의 제조 방법은 물론 미생물을 배양한 다음 배지로 부터 상술한 일반식의 저콜레스테린 혈증성 화합물을 분리하는 방법을 포함한다.

이들 신규 화합물은 콜레스테롤 생합성을 억제하는 성질이 우수하며 과콜레스테린 혈증 및 과지방혈증에

대하여 유용한 화합물이다.



고혈압 콜레스테롤 및 아테롤성 동맥 경화증 사이의 관계로 인하여, 포유동물에서 콜레스테롤을 감소시키는 방법 및 물질을 발견하고자 많은 노력이있었다. 이들 방법중 한가지는 포유동물의 콜레스테롤 합성능력을 억제하는 것이다.

최근에, 엔도(Endo)와 그의 동료는 미국특허 제4,049,495호 및 제3,983,140호에 페니실리움(Penicillium)속의 미생물을 배양한 다음 배지로 부터 분리함으로써 얻어지는 발효 생성물을 기술하였다. 이들은 이 발효 생성물을 ML 2361 B라 칭하고 그 구조를 두개의 관련 화합물 236A 및 236C와 함께 측정하였다. 또한 그 구조는 콤팩틴(Compactin)이라는 이름으로 A.G. Brown, T.C. Small, T.J. King에 의하여 측정되었다[J. Chem. Soc. (Perkin 1) 1165 (1975)]. 이 화합물은 생체내에서 콜레스테롤의 생합성의 억제제임이 발견 되었다.

예상외로, 본 발명자들은 엔도가 사용한 미생물과 아주 상이한 미생물, 즉 아스페르길러스 속의 미생물을 배양하여 포유동물에 있어서 콜레스테롤의 생합성의 아주 유용한 억제제인 신규 물질을 제조하게 되었다. 또한 본 발명자들은 이들 신규 물질은 단지 미량의 기타 화합물과 함께 주로 상술한 구조의 신규 화합물 (1), (2), (3) 및 (4)로 구성되었음을 알았다. 이들 신규 화합물은, 생체내에서, 엔도가 기술한 화합물 즉 ML₂₃₆B보다 콜레스테롤 합성의 훨씬 효력있는 억제제이다.

본 발명의 제약적으로 허용되는 염에는 나트륨, 칼륨, 알루미늄, 칼슘, 리튬, 마그네슘, 아연, 암모니아 에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 리신, 아르기닌, 오르기닌, 콜린, N, N'-디벤질에틸렌-디아민, 클로로 프로카인, 디에탄올아민, 프로카인, N-벤질펜에틸아민, 1-P-클로로벤질-2-디올리딘-1'-일-메틸벤즈이미 다졸, 디에틸아민, 피페라진, 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄, 및 테트라메틸암모늄 같은 양이온으로 부터 형성된 것들이 포함된다.

본 발명의 화합물은 인간에 있어서 아테롤성 동맥 경화증, 과지방 혈증 등과 같은 질병 치료를 위한 항-과콜레스테린 혈증제로서 아주 유용하다. 이들 화합물은 캡슐, 정제 또는 주사제등의 형태로 경구적으로 또는 비-경구적으로 투여된다. 통상적으로는 경구 투여가 바람직하다. 투여량은 환자의 연령, 체중 및 기타 조건에 따라 상이하지만, 성인에 대한 1일 투여량은 약2-2000mg(바람직하기로는 2-100mg)범위내에서 2-4회 분할 투여한다. 필요에 따라서는 보다 많은 투여량이 사용될 수도 있다.

또한 본 발명의 화합물은 유용한 항균 작용을 갖고 있다. 예컨대 본 발명 화합물은 페니실리움 에스 리(Penicillium Sp.) 아스페르길러스 니제르(Aspergillus niger), 클라도스 포리움 에스리(cladosporium Sp.), 코크디오보리스 미야 베오러스(Cpchllobolus miyabeorus) 및 헬민토스포리움 시노드노티스(Helminthosporium Cynodnotis)의 군주를 억제하는데 사용될 수도 있다. 본 발명 화합물을 이용하기 위하여는 이들 화합물을 적당한 형성제, 분말, 유화제 또는 용매(에탄올 수용액)와 혼합하여 보호하고자 하는 식물에 분무하거나 가루를 뿌린다.

본 발명 화합물의 제조 방법은, 아스페르길러스 속에 속하는 미생물을 배양한 다음 배양 유즙으로부터 상술한 본 발명화합물을 회수하는 것으로 구성되어 있다. 분류학적 연구에 기초하여 지금까지 기술되지 않은 미생물로서 분리되어 확인된 상술한 아스페르길러스는 뉴저지, 라흐웨이 소재 매크 앤드 캄파니 인 코포레이티드의 컬쳐 콜렉션(Cultrue Collection)에서 MF-4833로 지정되었으며, 그의 배지는 마릴랜드 20852, 토크빌, 바크론 드라이브 12301의 아메리칸 타일 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection)에 영구 보관되어 기탁 번호 ATCC 20541를 받았다. 이와 마찬가지로 매크 컬쳐 콜렉션에서 MF-4845로 지정된 유사한 미생물의 다른 샘플도 보관되어 기탁번호 ATCC 20542를 받았다. 후자의 미생물은 우수한 수율을 보여주는 미생물이다. 비록 이들의 용도가 본 발명의 방법과 관련하여 기술되지만, 상술한 미생물의 변종을 포함하는 아스페르길러스 속의 그외의 미생물 또한 이들 신규 화합물을 생성할 수 있다.

미생물 MF-4833 및 MF-4845의 형태학적 특성은 아스테르길러스 속의 특성이 있음이 발견되었다.

'Manual of the Aspergilli' (Charles Thom and Kenneth B. Rasper 1945년 Williams/and/Wilkins Company 발행)에 명시된 기준을 사용하고, 또 공지의 종과 비교함으로써 상술한 두 군주는 아스페르길러스

스 테레우스(*Aspergillus terreus*)임이 결정되었다.

신규 화합물을 제조하기 위한 이들 미생물의 배양은 기타 발효 생성물의 제조에 이용되는 것과같은 수성 배지에서 수행된다. 이러한 배지는 미생물에 의하여 동화할 수 있는 탄소, 질소 및 유기염을 함유한다.

일반적으로, 당(Sugar), 예컨대 글루코스, 프락토스, 말토스, 슈크로스, 키실로스 및 만니톨 같은 탄수화물, 및 곡식, 예컨대 귀리, 호밀, 옥수수전분 및 옥수수가루 같은 전분이 영양배지의 동화성 탄소원으로 단독으로 또는 혼합하여 사용될 수 있다. 배지에 이용되는 탄수화물원의 정확한 양은 배지의 기타 성분과 따라 다르지만, 일반적으로 탄수화물의 양은 배지의 중량을 기준으로 하여 1-6%이다. 이들 탄소원은 배지에 단독으로 또는 여러개가 사용될 수 있다. 일반적으로 단백질 물질은 발효 공정에서 질소원으로 사용될 수 있다. 적당한 질소원에는 예컨대 효모 가수분해물, 1차 효모, 콩가루, 면실가루, 카제인의 가수분해물, 옥수수 침지액, 양조가의 가용성분 또는 토마토 케이스트 등이 있다. 질소원은 단독으로 또는 혼합하여 수성 배지의 중량은 기준으로 하여 약 0.2-6% 범위의 양으로 사용된다.

배지에 혼합될 수 있는 영양 무기염에는 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 포스페이트, 셀페이트, 클로라이드, 카보네이트 및 이와 유사한 이온을 생성할 수 있는 통상적인 염이 있다. 또한 코발트, 망간, 철 및 마그네슘 같은 미량 금속도 여기에 포함된다.

실시예에 기술한 배지는 이용될 수 있는 각종 배지를 예시한 것에 지니지 않음을 알아야 한다. 특히 본 발명의 신규 화합물을 제조하기 위하여 배지에 사용되는 탄소원에는 데스트로스, 덱스트린, 귀리가루, 오토밀, 당밀, 시트레이트, 콩, 오일, 글리세롤, 맥아추출물, 간유, 전분, 에탄올, 무화과, 아스코르빈 산나트륨 및 라이드유가 있다. 질소원으로는 유병, 자기분해효모, 효모 RNA, 토마토레이스트, 양조가의 가용성분, 카제인, 1차효모, 땅콩가루, 옥수수 침지액, 콩가루, 옥수수 가루 NZ 아민, 쇠고기 추출물, 아사아라긴, 면실가루 및 황산 암모늄이 포함 되었다. 주요 이온 성분은 CaCO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 및 NaCl 이었으며, 소량의 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 및 미량의 Fe, Mn, Mo, B 및 Cu이 또한 존재하였다.

발효는 약 20-37°C의 온도에서 수행 되지만, 최적결과를 얻기 위해서는 약 22-30°C에서 발효를 행하는 것이 바람직하다. 아스페르길러스 배양균을 성장시켜 신규 화합물을 제조하는데 적당한 영양 배지의 pH는 약 6.0-8.00이다.

신규 화합물은 표면 배양 및 심부 배양에 의하여 제조되긴 하지만, 심부 상태에서 발효를 행하는 것이 바람직하다. 소규모 발효는 적당한 영양 배지를 아스페르길러스 배양균으로 접종 시킨다음 생성 배지에 옮긴후 발효가 약 28°C의 일정 온도에서 수일동안 진탕기에 진행되도록 수행하는 것이 편리하다.

발효는 한단계 이상의 종자전개를 거쳐 배지의 무균 플라스크에 시작된다. 종자 단계의 영양 배지는 탄소 및 질소원의 적당한 혼합이면 된다. 종자 플라스크는 2일동안 약 28°C의 항온실에서 진탕하거나, 또는 성장이 만족스러울때까지 진탕하며, 이와같이하여 얻어진 성장의 몇개는 제2단계 종자 또는 생성 배지를 접종하는데 사용된다. 중간 단계 종자 플라스크는 이것이 사용되는 경우 동일한 방법으로 전개되며, 즉 최종 종자 단계로 부터 플라스크의 내용물의 일부는 생성배지를 접종하는데 사용된다. 접종된 플라스크는 수일동안 항온에서 진탕시키며, 배양 기간의 마지막에 플라스크의 내용물은 원심분리하거나 여과한다.

대규모 작업에서는, 교반기 및 발효 배지를 통기 시키는 장치가 장착된 적당한 탱크에서 발효를 행하는 것이 바람직하다. 이 방법에 따르면, 영양 배지를 탱크에 채우고 약 120°C까지의 온도로 가열하여 멸균한다. 냉각시킨 후 멸균된 배지를 생성 배양균의 이미 성장한 종자로 접종시키고, 예컨대 3-5일 동안 발효가 진행되도록 하면서 영양 배지를 교반 및 또는 분리하는 것이 편리하다. 이와는 달리 이들을 화합물(3) 및 (4)의 염으로서 분리할 수도 있다.

화합물 (1) 및 (2)를 NaOH 같은 염기로 가수분해 시켜 화합물 (3) 및 (4)의 나트륨염 같은 염을 제조할 수 있다. 기타 제약적으로 허용되는 양이온을 갖는 염기를 사용하면 이들 양이온의 염이 얻어진다. 염을 주의 깊게 산성화하면 하이드록시 산 (3) 및 (4)가 얻어진다. 하이드록시 산 (3) 및 (4)는 산성 pH에서 화합물 (1) 및 (2)로 전화시킬 수 있다. 산성 또는 염기성 촉매하에서 화합물 (1) 및 (2)를 메탄올, 에탄올, 프로탄올 또는 부탄올 로 처리하거나 또는 페닐, 디메틸아미노 또는 아세틸아미노 알칸올로 처리하면 본 발명의 일부를 또한 형성하는 화합물 (3) 및 (4)의 해당하는 에스테르가 얻어진다.

화합물 (3) 및 (4), 특히 화합물 (3)은 크로마토그래피를행하지 않고 암모늄의 형태로 편리하게 분리할 수 있다. 이러한 분리는 편리하며, 크로마토그래피 보다도 상업적 용도도 아주 많이 채용된다. 더우기 화합물 (3) 및 (4)의 염은 시험 관내에서 콜레스테롤 생합성의 억제 및 항균제로서 화합물 (1) 및 (2)보다 훨씬 활성이 크다. 확실히 하이드록시 산(또는 그의 염)은 활성 형태인 것 같다. 따라서, 이들 염은 특히 바람직한 투여 형태중의 하나이다. 암모늄염이외에 바람직한 염으로는 테트라메틸암모늄 및 에틸렌디아민, 나트륨, 칼륨, 칼슘, N-메틸글루카민, 리신, 아르기닌 및 오르니틴의 염이 있다.

일반식 (1)(MSD-803)의 물리-화학적 성질을 요약하면 다음과 같다.

1. 용 점	170-171°	4. UV 스펙트럼	
2. 분자적량	404	(아세토니트릴에서)	최대
(질량스펙트럼)			E% 505.7를 갖는 230.5nm
3. 분 자 식	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_7$		E% 576.6를 갖는 237.5nm
질량 분광에 의한 실험치	404.2555		E% 395.2를 갖는 246nm
이론치	404.2563		
5. ^{13}C NMR 화학이동			

스펙트럼 CDCl_3 용액에서 기록되었다(0.35ml에서 20.1mg). 화학이동은 0ppm에서 내부 테트라메틸실란에 대하여 주어진다. 즉 실험 조건하에서 용매(CDCl_3) 시그널은 70.0pp에서 최대치를 나타낸다. 질량 스펙트럼 데이터에 따라서 24개의 탄소원자가 관찰된다. 이들 화학 이동은 다음과 같다.

11.5, 13.6, 16.0, 22.6, 24.1, 26.6, 27.2, 30.5, 32.5, 32.8, 35.9, 36.4, 37.1, 38.4, 41.3, 62.4, 67.8, 76.4, 128.4, 129.7, 131.7, 133.2, 170.8 및 177.2ppm.

6. ^1H NMR 스펙트럼

스펙트럼은 CDCl_3 용액에서 기록되었으며, 화학 이동은 0ppm에서 내부 테트라메틸실란에 대하여 ppm으로 제1도에 표시되어 있다.

7. IR 스펙트럼

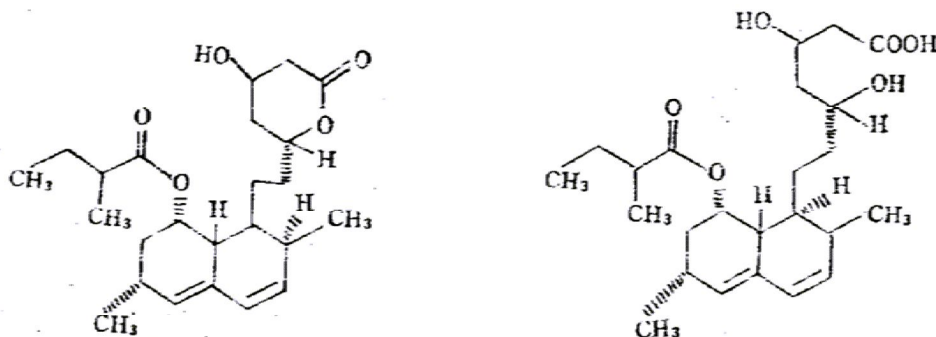
IR 스펙트럼은 시료의 KBr 펠릿 제재에서 기록되었으며, 제2도에 표시되어 있다.

8. 선광도

비 선광도 $[\alpha]_{25}^D = 320.7^\circ$ 는 5.30mg/ml CH_3CN 의 용액에서 측정되었으며, 이 값은 나트륨-D-선에서 파장을 측정함으로써 얻어졌다.

이들 데이터 및 기타 데이터를 기초로 하여, 생성물의 구조는 확실히 다음과 같은 입체 화학 구조를 가진다고 믿어진다.

상응하는 하이드록시 산, 화합물 (3)은 다음 구조를 가진다.



이들 분자에서 비대칭의 중심의 확실한 형상은 X-선 회절 패턴으로 측정하였다.

화합물 (2)(MSD-883)의 물리-화학적 성질을 요약하면 다음과 같다.

1. 용 점	129-131°C	3. 분자식	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$
2. 분자량	406	질량분광에 의한 실험치	406.2706
		이론치	406.2719
4. ^1H NMR 스펙트럼			

스펙트럼은 CDCl_3 용액에서 기록되었으며, 화학 이동은 0ppm에서 내부 테트라메틸실란에 대하여 ppm으로 제3도에 표시되어 있다.

5. IR 스펙트럼

IR 스펙트럼은 시료의 KBr 펠릿 제재에서 기록되었으며 제4도에 표시되어 있다.

6. 선광도

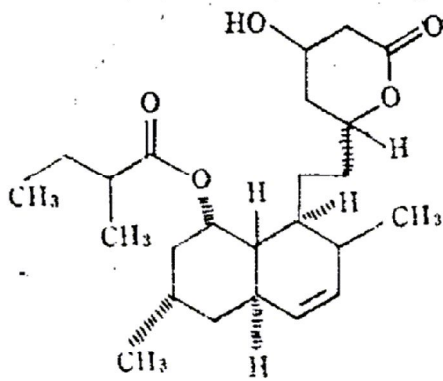
비 선광도 $[\alpha]_{25}^D = 148.6^\circ$ 는 5.23mg/ml CH_3CN 의 용액에서 측정되었으며, 이 값은 나트륨-D-선에서 파장을 측정함으로써 얻어졌다.

7. ^{13}C NMR 화학이동(CDCl_3 에서)

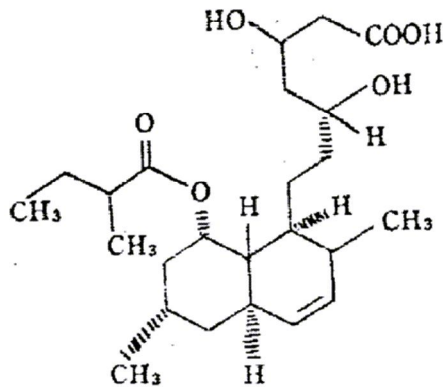
11.8, 14.9, 16.5, 21.1, 23.1, 26.7(2°), 30.9, 31.3, 33.0, 35.7, 35.9, 37.4, 38.5, 38.6, 41.9 (2°) 62.3, 70.1, 76.5, 131.0, 132.6, 171.2, 176.6

이들 데이터 및 기타 데이터를 기초로하여, 생성물의 구조는 확실히 다음과 같은 화학구조를 가진다고

얻어진다.



상용하는 하이드록시산, 화합물(4)는 다음 구조를 가진다.



본 발명을 실시예에 의거 상세히 설명하면 다음과 같다.

[실시예 1]

화합물 (1) 및 (3)의 제조

A. 발효

동결 건조시킨 배양 Mf-4833의 관(tube)을 무균적으로 열고, 그 내용물을 약 20ml의 배지 A를 함유하는 차례되지 않은 250ml 용량의 엘렌마이어(Erlenmeyer) 플라스크(종자 플라스크)에서 현탁시켰다. 배지 A는 다음과 같은 조성을 가졌다.

배 지			
옥수수 찰지액	10g	글루코스	20g
토마토 껍이스트	80g	비타민소 혼합물 제2형	20g
오트밀	20g	증류수	100ml
		PH 6.8(NaOH 사용)	
미량 원소 혼합물 제2형			
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1000mg	H ₃ BO ₃	56mg
MnSO ₄ · 4H ₂ O	1000mg	(NH ₄) ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	19mg
CuCl ₂ · 2H ₂ O	25mg	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	200mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	100mg	증류시킨 탈이온수	1000ml

접종시킨 플라스크를 28℃에서 48시간 동안 220rpm 진탕기(2인치 행정)에서 배양하였다. 그 다음 각각 배지 B를 500ml 함유하는 두개의 차례되지 않은 2ℓ 용량의 엘렌마이어 플라스크를 종자 플라스크로부터 성장 플라스크당 10ml 접종시켰다. 배지 B는 다음과 같은 조성을 가진다.

배 지			
토마토 껍이스트	20g	CoCl ₂ · 6H ₂ O	5mg
1차 효모	10g	증류수	1000ml
CPC 전분	20g	PH 7.2-7.4(NaOH 사용)	

접종시킨 이들 두 플라스크를 28℃에서 96시간 동안 배양하였다. 하나의 플라스크는 교반하지 않고 배양하였으며, 다른 하나의 플라스크는 150rpm 진탕기(2인치 행정)에서 배양하였다. 96시간 후 각각의 플라스크의 내용물을 생성물의 분리용으로 보관하였다.

B. 화합물(1)의 분리

전체 육즙을 20-30분 동안 원심분리하여 고형분은 추출용으로 보관하였다. 상징액(PH6-8)을 950ml 용량의 병에 주입한 다음 150ml의 XAD-2 수지를 가했다. 예정된 계획대로 조작되는 자동추출기를 사용하여 혼합물을 2시간동안 교반하였다. 그다음 소비된 육즙은 흡수하여 버렸다. 수지를 200ml의 탈이온수로 2회 세척한 다음 세척액을 버렸다. 그 다음 300ml의 혼합용매(이소프로판올-에틸 아세테이트-디클로로메탄 25-45-30)를 가했다. 혼합물을 2시간 동안 교반하고, 용매-수지 슬러리를 부크너(Buchner) 또는 소결 유리 깔때기에서 여과한 다음 수지는 버렸다. 육즙 고형분은 반시간 동안 100ml의 아세톤과 함께 교반한 다음 혼합물을 원심분리하고 상징액은 경사하였다. 여액과 경사액을 모아 15ml까지 농축시켰다.

C. 화합물 (1)의 시험

여액을 Kleinsek, Rangatham 및 Porter(1977, Proc. Nat. Acad. Sci 74 1431-1435)에 의하여 기술된 바와같이 제조한 효소를 사용하여 Beg, Stonik, 및 Brewer(1977 FEBS Letters 80 123-129)에 의하여 기술된 방법에 의하여 HMG-CoA 레덕타아제 효소의 억제제로서 시험하였다. 양성 시험(ml당 20마이크로그램에서 90%이상 억제 -ml당 2.3 마이크로그램의 IC₅₀) 결과 HMG-CoA 레덕타아제 농도에서 작용하는 스테롤 합성을 억제하는 고역가 억제제가 존재함을 나타냈다.

[실시에 2]

화합물 (1) 및 (3)의 제조

A. 발효

아스페르길러스 종 MF-4833의 동결 건조시킨 배양관을 무균적으로 개방하여, 그 내용물을 40ml의 배지 C를 함유하는 차폐되지 않은 250ml 용량의 엘렌마이어 플라스크(종자 플라스크 제1번)에서 현탁시켰다. 배지 C의 조성은 다음과 같다.

배 지			
옥수수 침지액	5g	미량원소	10g
토마토 씨이스트	40g	혼합물 제 2번	
오르말	10g	증류수	1000ml
글루코스	10g	PH 6.8(NaOH 사용)	

접종시킨 플라스크를 28℃에서 24시간 동안 220rpm 진탕기(2인치 행정)에서 배양하였다. 각각 40ml의 배지 C를 함유하는 8개의 차폐되지 않은 250ml 용량의 엘렌 마이어 플라스크(종자 플라스크 제2번) 각각을 종자 플라스크 제1번으로 부터 성장 플라스크 당 2ml 접종시켰다. 이들 8개의 제2종자 플라스크를 28℃에서 24시간 동안 220rpm 진탕기(2인치 행정)에서 배양 하였다. 그다음 500ml의 배지 B를 함유하는 20개의 2ℓ 용량의 차폐되지 않은 엘렌마이어 플라스크를 8개의 제2종자 플라스크의 혼합성장 플라스크 당 14ml 접종하였다. 이들 20개의 플라스크를 교반하지 않고 11일 동안 28℃에서 배양하였다. 11일 배양 후, 이들 20개의 플라스크의 내용물을 함께 모았다.

B. 추출

10.2ℓ의 총 육즙(PH6.0)을 워링(Waring) 혼합기에서 혼합하여 중질 균사체 패드(pad)를 분쇄하고, 원심 분리한 다음 투명한 상징액을 경사시켰다. 여과 후, 10ℓ의 여액을 3ℓ의 에틸아세테이트로 추출하여 1820ml의 투명한 추출물을 얻었다. 3ℓ의 에틸아세테이트 재차 추출하여 3350ml의 투명한 추출물을 얻었다. 육즙 고형분을 1시간동안 2ℓ의 메탄올과 함께 교반한 다음 여과하여 추출한 결과 2100ml의 여액이 얻어졌다.

이들 추출물의 부분 표본을 건조시킨 다음 실시예 1의 C공정에 의하여 검정한 결과 다음과 같은 결과가 얻어졌다.

추 출 물		
용 량(ml)	총 고형분(mg)	총 활성 단위
1820	1133	1,496,695
3350	787	314,900
2100	13.15	1,144,067

C. 겔 여과

실시에 2의 B의 첫번째 두 추출물로 부터 얻은 총 고형분을 모아 메탄올 에용해시킨 다음 여과하여 불용성 고형분을 제거하였다. 30ml의 여액을 세파덱스(Sephadex) LH-20이 충전된 겔 여과탑(2.5cm×200cm, 980ml)에 장입한 다음 시료를 용매로서 메탄올을 사용하여 분자 크기에 따라 분류하였다. 굴절률 및 u. v기록에 의하여 최상의 유분을 생물 검정으로 확인하였다.

총 고형분(mg)	총 활성 단위	총 고형분(mg)	총 활성 단위
유분 1-89	106,271	유분 3-779	210,357
유분 2-278	1,099,680		

D. 분리 및 정제

상술한 유분 2로부터 의시료를 워터스 본다파크(Waters Bondapak) C18/포다실(Porasil) B의 1g상(bed)을 통해 예비 여과한 다음 5용량의 메탄올로 용리하였다. 이 시료를 전기 용매로서 메탄올 : 0.05M인산 암모늄(pH2.9, 75:25)을 사용하여 워터스 μ C18탑(3.9mm×30cm)에서 수회 크로마토그래피 하였다. 유분을 백크만 분광계도 조사하여 236mm에서 최대 흡수대를 나타내며 229mm 및 245mm에서 쇼울더를 갖는 것을 모아 감압하에 농축시켰다. 농축액의 Ph를 2M 수산화칼륨으로 6.5로 조절한 다음 유효 성분을 에틸아세테이트로 추출하였다. 유기층을 건조시키고, 농축 건조시킨 다음 잔사를 0.3ml의 메탄올에 용해 시켰다. 메탄올 용액을 상술한 바와같이 크로마토그래피 한 다음 재순환 시켰다. 보다 빨리 용리하는 성분을 함유하는 유분을 모아 농축시킨 다음 클로로포름으로 추출하였다. 클로로포름 잔사를 메탄올에 취한 다음 용매를 질소하에서 증발시킨 결과 3.5mg의 건조 생성물이 얻어졌으며 이것은 하이드록시 산(화합물 3)으로 확인되었다. 제2성분을 함유하는 유분을 모아 상술한 바와같이 클로로포름으로 추출한 결과 0.87g의 건조 생성물이 얻어졌으며 이것은 락톤(화합물 1)으로 확인되었다.

[실시예 3]

화합물 (1) 및 (3)을 제조하기 위한 MF-4833의 동결 건조 배양관을 무균적으로 개방하고 그 내용물을 40ml의 배지 C를 함유하는 차폐되지 않은 250ml 용량의 엘렌마이어 플라스크(종자플라스크)에서 현탁시켰다.

접종시킨 플라스크를 28℃에서 48시간 동안 220rpm 진탕기(2인치 행정)에서 배양하였다. 두개의 250ml 용량의 차폐되지 않은 엘렌마이어플라스크(각각 40ml의 배지 D를 함유)를 종자 플라스크로 부터 성장 플라스크 당 2ml 접종시켰다. 배지 D의 조성은 다음과 같다.

배지 D		각기분해 효모	5g
락토스	20g	증류수	1000ml
양조가래 가용성분	15g	pH7.0(NaOH 사용)	

접종시킨 이들 두 플라스크를 28℃에서 96시간 동안 150rpm 진탕기(2인치 행정)에서 배양하였다. 96시간 배양 후 이들 두 플라스크에 내용물을 실시예 2의 B 공정에 의하여 추출하였다. 이들 플라스크에서의 총 생산은 1450-2000 단위 /ml였다.

[실시예 4]

화합물 (1) 및 (3)의 제조

MF-4833의 동결 건조 배양관을 무균적으로 개방하여 그 내용물을 40ml의 배지 C를 함유하는 차폐되지 않은 250ml 용량의 엘렌마이어 플라스크(종자 플라스크 제1번)에서 현탁시켰다. 접종시킨 플라스크를 28℃에서 24-48시간 동안 220rpm 진탕기(2인치 행정)에서 배양하였다. 이 플라스크의 일부(약 0.5ml)를 배지 E를 함유 하는 경사관을 접종시키는데 사용하였다. 배지 E의 조성은 다음과 같다.

배지 E			
효모 추출물	4g	한천	20g
맥아 추출물	10g	증류수	1000ml
엑스트로크스	4g	7.0(NaOH 사용)	

접종시킨 경사관을 실온에서 11일 동안 배양하였다. 그 다음 -60℃에서 3-4개월 저장하였다. 이 경사관의 내용물의 일부를 40ml의 배지 C를 함유하는 차폐되지 않은 250ml 용량의 엘렌마이어 플라스크(종자 플라스크 제2번)에서 현탁시켰다. 접종 시킨 플라스크를 28℃에서 24시간 동안 220rpm 진탕기(2인치 행정)에서 배양하였다. 그 다음 40ml의 배지 C를 함유하는 6개의 차폐되지 않은 250ml 용량의 엘렌마이어 플라스크(종자 플라스크 제3번) 각각을 종자플라스크로 제2번으로 부터 성장 플라스크 당 2ml 접종하였다. 이들 여섯개의 접종된 플라스크를 -8℃에서 48시간 동안 220rpm 진탕기(2인치 행정)에서 배양하였다. 여섯개의 차폐되지 않은 2ℓ 용량의 엘렌마이어 플라스크(500ml의 배지 F 함유를 종자 플라스크 제3번의 내용물로 접종시켰다. 배지 F의 조성은 다음과 같다.

배지 F			
옥수수 침지액	15g	(NH ₄) ₂ SO ₄	4g
CPC 전분	20g	KH ₂ PO ₄	0.3g
옥수수 가루	1g	CaCD ₃	6g
콩가루	4g	증류수	1000ml
글루코스	5g	PH6.7(NaOH 사용)	
대두유	2.5g		

접종시킨 플라스크를 교반함이 없이 28℃에서 11일 동안 배양한 다음 육즙을 실시예 2의 B 공정에 의하여 추출하기 위하여 이송하였다. 이들 플라스크에서의 총 생산은 1231 단위 1ml이었다.

[실시예 5]

MF-4845로

화합물 (1) 및 (3)을 제조하기 위한 최상의 발효법

아스페르길러스 MF-4845의 동결 건조 배양관을 무균적으로 개방하여 그 내용물을 40ml의 배지 C를 함유하는 차폐되지 않은 250ml 용량의 엘렌마이어 플라스크(종자 플라스크)에서 현탁시켰다. 접종시킨 플라스크를 28℃에서 30시간 동안 220rpm 진탕기(2인치 행정)에서 배양하였다. 40ml의 배지 G를 함유하는 차폐되지 않은 250ml 용량의 엘렌마이어 플라스크를 종자 플라스크로 부터성장 플라스크당 2ml 접종시켰다.

배지 G조성은 다음과 같다.

배지 G

엑스트라크트	45g	분리광리콜 2000	2.5ml
유청	24g	중류수	1000ml
자거분해 효모	2.5g	PH 7.0(NaOH 사용)	

이와같이 접종시킨 플라스크를 28℃에서 120시간 동안 220rpm 진탕기(2인치 행정)에서 배양한 다음 플라스크의 내용물을 실시예 2의 B 공정에 의하여 추출하였다. 이 플라스크에서의 총 생산은 21,500 단위/ml였다.

[실시예 6]

A. MF-4833으로 화합물 (1) 및 (3)를 제조하기 위한 대량 발효

발효의 각 단계에 사용된 배지의 조성은 다음과 같다.

옥수수 침지액	5g	글루코즈	10g
도마토 페이스트	40g	미량 원소 용액	10ml
커리 가루	10g	중류수	1000ml
		PH 6.8(NaOH로 조절)	

미량 원소 용액의 조성은 다음과 같다.

FeSO ₄ · 7H ₂ O	1g	H ₃ BO ₃	56mg
MnSO ₄ · 4H ₂ O	1g	(NH ₄) ₂ MoO ₄ · 4H ₂ O	19mg
CuCl ₂ · 2H ₂ O	25mg	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	200mg
CaCl ₂	100mg	중류수	1ℓ

모든 배질을 무균시험 한후에 미생물로 접종 시켰다. 250ml용량의 차폐되지 않은 엘렌마이어 플라스크에 40ml의 배지 및 동결 건조 미생물 MF 4833의 하나의 관의 내용물을 주입하였다. 그 다음 28℃에서 24시간 동안 회전 진탕기(220rpm)에서 진탕시킨 다음, 새로운 플라스크에 40ml의 배지 및 1ml의 제1플라스크의 내용물을 주입하여 28℃에서 24시간 동안 진탕하였다. 그 다음 2ℓ 플라스크에 400ml의 배지 및 10ml의 제2단계 발효 혼합물을 주입하였다. 이것 역시 28℃에서 24시간 동안 진탕하였다.

200갈론 용량의 스테인레스 스틸 발효통에 501ℓ의 다음 조성물을 주입하고, 그의 pH를 7.0으로 조절하였다. 이것을 121℃에서 15분 멸균하였다. 그 다음 제3단계의 것 1ℓ를 주입하고, 혼합물을 10cfm의 공기를 유동시키면서 -28℃ 및 130rpm에서 배양하였다.

탁토스	2% Wt/Vol	자거분해 효모	0.5% Wt/Vol
양조가의 가용 성분	1.5% Wt/Vol	분리광리콜 2000	0.25% Wt/Vol
화합물 (1)의 분리			

약 37.5 파운드(3/4)의 규토질 필터 보조물을 상술한 MF-4833의 배지로 부터 110g의 옥즙에 가하고 혼합물을 18-인치 필터프레스를 통해 여과하였다. 정화시킨 여액(pH 6.6)을 450ml의 농염산을 가하여 pH 4.0으로 조절한 다음 교반에 의하여 약 1/3용량(36갈론)의 에틸 아세테이트로 추출하였다. 분리후 상부용매층을 제거한 다음 수성층을 유사한 방법으로 에틸 아세테이트로 (38갈론)으로 다시 추출하였다. 분리후 상부용매층을 합하여 약 12갈론의 물로 교반에 의하여 다시 세척하였다. 분리후 에틸 아세테이트 용액을 30℃이하의 온도에서 감압하에 처음에는 교반 케틀(Kettle)에서, 최종적으로 회전 진공 증발기에서 잔류용량이 약 1갈론 이하까지 농축시켰다.

상기 추출로 부터의 에틸아세테이트 농축물 약 1갈론(3800ml)을 회전 증발기(약 10mm, 40℃ 욕조)에서 더욱 농축시켜 시럽으로 한 다음 약 1ℓ의 염화메틸렌을 두분으로 가한 후 두회 이상 농축시켜 극성 용매의 시럽을 유리시켰다. 건조 중량에 의한 측정으로 약 250g의 고형분이 함유되어 있는 약 300ml의 최종 오일을 에틸아세테이트-염화메틸렌(30/70 : V/V)으로 약 750ml까지 만드다음 200g의 실리카겔을 가하고 혼합하여 슬러리 형태로 만들었다. 이것을 2.5kg의 동일 실리카를 함유하는 탐상(bed)(14cm×36cm)의 정부에 채웠다.

에틸아세테이트-염화메틸렌(50/50 : V/V)으로 전개시켜 800ml의 유출 유분을 얻었다. 12개의 유분을 취한 다음 100% 에틸아세테이트 용리를 시작하고, 6개 이상의 유분을 취한 후 100% 아세톤 용리를 시작했

다. 14개로 부터 4개의 유분을 실시예 1에 언급한 HMG-CoA 레덕타아제 억제 검사로 생-활성에 대한 검사를 하였다. 유분 7-11에서 활성이 나타났으며, 유분 8에서 피크 활성이 나타났다. 더 정제하기 위하여 이것을 오일로 농축시켰다. 고형분의 건조 중량으로 9.0g이었다.

실리카겔탑으로 부터의 유분 8을 50ml의 염화메틸렌으로 분쇄한 다음 여과하였다. 건조된 필터케이크는 4.9g이었다. 여액을 염화메틸렌으로 팽윤 및 평형시킨 세파덱스 CH-20 텍스트란겔이 채워진 1m 길이의 탑에 의하여 2-인치 J.D.에 충전한 다음 분당 15ml의 비율로 염화메틸렌으로 용리하였다. 화합물 (1)은 0.64-0.81의 탑 용적사이에서 용리하였다. 상기 피크로 부터 용매를 제거하여 약 0.290g의 갈색 잔사를 얻었다. 이 잔사(213mg)를 1.5ml의 $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{CN}$ (65-35)에 취하고, 평형 실리카겔탑(EM LOBAR 사이즈 B)에 충전한 다음 분당 5ml로 $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{CN}$ (65-35)으로 용리하였다. 235-360ml의 용리제 사이에서 용리하는 피크로 부터 용매를 증발시킨 결과 121mg의 결정성 생성물(용점 ; 155-160°C)이 얻어졌다. 이 물질을 용리제로서 0.05 M 인산나트륨(pH3.0)-아세로니트릴(45-55)를 분당 2ml로 사용하여 emrp 18가역상 분석탑(E. MERCK HIBAR 11, Cat. No. 906046)에서 HPLC 한 결과 11분에 UV 흡수 피크가 나타났다.

이 물질 82mg을 0.6ml의 무수 에탄올로 부터 재 결정한 다음 다시 0.4ml의 동일 용매로 부터 재결정하여 P_2O_5 상에서 건조기에서 철야 건조시킨 결과 40mg의 백색의 깃털 같은 결정이 얻어졌다. 상술한 바와 같은 시스템에서 HPLC한 결과 11분간 용리에서 날카로운 단일 피크가 나타났다. 더욱 재결정 한 결과 용점이 170-171°C였다.

생성물은 스펙트럼 등에 의하여 화합물 (1)로서 확인되었다. 이 물질은 시험관 HMG-CoA 레덕타아제 시험(실시예 1의)에서 ml당 0.01마이크로그램의 IC_{50} 을 나타냈다.

[실시예 7]

화합물 (3)의 암모늄 염의 직접분리

실시예 20A에서와 같은 발효로 부터의 육즙(100갈론)을 H_3PO_4 를 사용하여 pH 5로 하였다. 에틸아세테이트(70갈론)을 가한 다음 혼합물을 맹렬히 교반하였다. 그 다음 균사체 잔사로부터 여과하여 케이크를 소량의 에틸아세테이트로 세척하여 주추출물과 혼합하였다. 혼합물을 맹렬히 교반한 다음 방치하였다. 수성층을 분리하여 H_3PO_4 를 가하여 pH를 9-5로 조절하였다. 그 다음 먼저 2갈론의 헥산-에틸 아세테이트(2:1) 혼합물로 추출한 다음 1갈론의 동일 혼합물로 추출하였다. 분리된 유기 추출물을 모아 무수 MgSO_4 상에서 건조시켰다. 그 다음 여과에 의하여 건조제를 분리하고, 케이크를 1ℓ의 동일헥산-에틸 아세테이트 용액으로 세척한 다음 세척액을 여액과 혼합하였다. 이 여액용액을 2ℓ의 아세톤으로 더욱 희석시킨 후 암모니아 가스를 주입하면서 교반하였다. 가스는 흡수되고 결정성 침전물이 나타났다. 암모니아가 더 이상 흡수되지 않고, 침전물에서 어두운 색이 관찰 될때 암모니아의 도입을 중단하고 혼합물을 수시간 동안 방치 한 후 여과하였다. 조잡한 암모늄염 필터 케이크를 아세톤이나 무색세정제로 세척한 다음 공기 건조시켰다.

조잡한 암모늄염은 클로로포름, 메탄올 및 농수산화암모늄 용액(80:20:2)의 혼합물 1.5 갈론에 용해시킨 다음 색깔을 띤 불용성 물질을 여과함으로써 재결정 시킬 수 있다. 여액을 동일량의 아세톤-에테르(1:1) 혼합물로 희석시킨 다음 철야 방치하였다. 결정성의 황갈색 암모늄 염(96.5g)이 여과에 의하여 얻어졌다.

추가적인 정제는 70g의 상술한 재결정 물질을 2ℓ의 비등하는 이소프로판올-농 NH_4OH 수용액(95:5)에 용해 시키므로써 달성될 수 있다. 10g의 활성탄을 가한 다음 뜨거운 용액을 여과하였다. 여액을 방치하여 실온까지 냉각시킨 다음 -20°C에서 철야 저장하였다. 여과한 다음 케이크를 냉(-20°C) 이소프로판올로 세척하고, 그 다음 냉 아세톤으로 세척한 다음 실온의 에테르로 세척하였다. 생성물을 질소하에 건조시킨 결과 약 60g의 백색 결정성 암모늄 염이 얻어졌다.

[실시예 8]

화합물 (3)의 염

2ml의 에탄올에 용해시킨 실시예 6의 생성물(40mg)의 용액에 1ml의 NaOH 수용액(10^{-4} 몰 : 1 당량)을 가했다. 실온에서 1시간 방치 후 혼합물을 진공 건조시킨 결과 화합물 (3)의 나트륨 염이 얻어졌다. 이와 같은 방법으로 칼륨염을 당량의 수산화 칼륨을 사용하여 제조하였다.

[실시예 9]

화합물 (3)의 L-리신염

1.5ml의 65% 에탄올에 용해시킨 146mg의 L-리신의 용액을, 11.5ml의 85% 에탄올에 용해시킨 44mg의 화합물 (3)의 암모늄염의 용액에 가했다. 용매를 진공에서 증발 제거한 다음 잔사를 10ml의 뜨거운 에탄올로 분쇄하고, 냉각시키고, 여과한 다음 백색 고체를 건조시킨 결과 430mg의 화합물 (3)의 L-리신염이 얻어졌다. 용점 ; 178-180(d). $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_9$ 에 대한 원소 분석

용점 ; 178-180° (d). $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_9$ 에 대한 원소 분석

이론치 : C, 63.35 ; H, 9.22 ; N, 4.93

실측치 : C, 62.80 ; H, 9.13 ; N, 4.83

[실시예 10]

화합물 (3)의 L-아르기닌염

실시에 9에 기술된 바와 유사한 방법으로, 174mg의 L-아르기닌염의 용액 및 440mg의 화합물 (3)의 암모늄염의 용액을 혼합하였다. 용매를 진공 증발시키고, 잔사를 뜨거운 에탄올로 분쇄한 다음 냉각시키고, 여과한 다음 건조시킨 결과 화합물 (3)의 L-아르기닌염이 얻어졌다.

[실시에 11]

화합물 (3)의 L-오르니틴염

실시에 9에 기술한 방법으로, 132mg의 L-오르니틴염의 용액 및 440mg의 화합물 (3)의 암모늄염의 용액을 혼합하였다. 용매를 진공 증발시키고, 잔사를 뜨거운 에탄올로 분쇄한 다음 냉각, 여과 및 건조시킨 결과 화합물 (3)의 L-오르니틴염이 얻어졌다.

[실시에 12]

화합물 (3)의 N-메틸글루카민염

실시에 9에 기술한 방법으로, 1.5ml의 물중의 195mg의 N-메틸글루카민 및 11.5ml의 85% 에탄올 중의 440mg의 화합물 (3)의 암모늄염의 용액을 혼합한 다음 용매를 진공 증발시킨 결과 화합물 (3)의 N-메틸글루카민염이 얻어졌다.

[실시에 13]

화합물 (3)의 에틸렌디아민 염

18g의 화합물 (1)을 180ml의 뜨거운 이소프로판올에 용해시키고, 90ml의 0.5 M NaOH 수용액으로 처리한 다음 1시간 숙성 시키고, 180ml의 물로 희석하고, 진공 증발에 의하여 이소프로판올을 제거한 다음 병목에서 냉각시켰다. 서서히 90ml의 0.5HCl을 가한 다음 혼합물을 에틸아세테이트($2 \times 150\text{ml}$)로 추출하고 100ml의 물로 세척한 다음 MgSO_4 상에서 건조시켰다. 용매를 저온에서 진공 제거하고, 잔사를 150ml의 에탄올에 용해시켰다. 3ml의 에틸렌디아민을 가한 다음 용매를 진공 증발시키고, 잔사를 비등하는 에틸아세테이트로 분쇄한 다음 냉각, 여과 및 30ml의 이소프로판올로 부터 재결정 시킨 다음 P_2O_5 상에서 진공 건조시킨 결과 13.1g의 백색 결정이 얻어졌다.

융점 : 152-153.5°C

$(\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{O}_6)_2 \cdot (\text{C}_2\text{H}_{10}\text{N}_2)^{++}$ 에 대한 원소분석

이론치 : C, 66.35 ; H, 9.35 ; N, 3.09

실측치 : C, 66.08 ; H, 9.49 ; N, 3.01

[실시에 14]

화합물 (3)의 칼슘 염

87.9mg의 화합물 (3)의 암모늄 염을 교반 및 가열하면서 3ml의 H_2O 에 용해시켰다. 분석용으로 7.4mg의 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 가한 다음 혼합물을 암모니아가 더 이상 증발하지 않고 또 약간의 혼탁이 유지 될때까지 교반 및 가열한 다음 원심분리에 의하여 분리하였다. 무색 투명한 상정액을 동결 건조시켰다. 무수 이소프로판올 중의 뜨거운 농축 용액이 실온으로 냉각되었을때 생성물이 침상으로 결정화되었다.

[실시에 15]

화합물 (3)의 테트라메틸암모늄 염

1ml의 CH_2Cl_2 중의 34mg의 화합물(1)을 메탄올중의 0.04ml의 24% 테트라메틸암모늄 하이드록사이드로 처리하였다. 생성물을 에테르를 사용하여 부분 결정 형태로 침전시키고, 원심분리한 다음 침전물을 먼저 에테르로 세척하고 그 다음 5ml의 에테르 및 약 5ml의 저비점 석유에테르를 가하여 1ml의 이트프로판올로부터 육각 판상으로 재결정시켰다. 27mg(65%)이 얻어졌다.

화합물 (3)의 테트라메틸암모늄 염의 ^1H Nmr 스펙트럼

(6mg/0.35ml, 25°C, CDCl_3 , 300MHz에서)

0.83t(3H, J=6.5)

0.84d(3H, J=7)

1.02d(3H, J=7)

1.05d(3H, J=7)

1.24m(~1H); 1.30-1.80br. m. 엔벨로프

1.88ddd(1H, J=2, 8, 15)

1.98dd(1H, J=3, 15)

2.16dd(1H, J=8.5, 15.5)

2.23m(1H, 불명료)

2.32m(1H, 불명료)

2.37dd(1H, J=3, 15.5)

2.40m(~1H, 불명료)

3.42s (12H; MeN^+)

3.79m(1H, 대칭 다중선)

4.06m(1H; 대칭 다중선)

5.32dt(1H, J~3)

5.50br. s(1H)

5.79dd(1H, J=6, 10)

5.98d(1H, J=10)

화학이동은 내부 TMS의 ppm 다운 필드(down field)에서이다. 괄호내의 결합 상수는 Hz에서이다.

약어 : s=단일선, d=이중선, t=3중선, m=다중선

[실시에 16]

화합물 (3)의 암모늄 염

실시에 13에 기술한 바와같은 방법으로, 화합물 (1)을 하이드록시 산, 화합물(3)으로 전환시키고, 에틸 아세테이트로 추출하고, MgSO_4 상에서 건조하고, 여과한 다음 교반 및 냉각시키면서 무수 암모니아로 처리한 결과 암모늄 염이 침전되었다.

[실시에 17]

하이드록시산, 화합물 (3)의 제조

실시에 7에서 제조한 나트륨 염을 2ml의 에탄올-물(1:1)을 재용해 시킨 다음 10ml의 0.1 염산에 가하고, 유리된 하이드록시 산을 에틸아세테이트로 추출하였다. 후자의 용매를 물로 1회 세척하고, 건조시킨 다음 30°C를 초과하지 않는 온도에서 진공 제거 하였다. 하이드록시 산은 방치하면서 서서히 락톤으로 복귀한다.

[실시에 18]

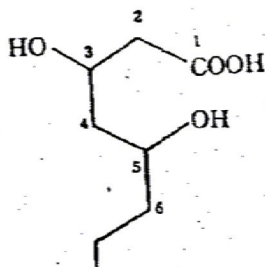
화합물 (3)

453mg의 화합물 (3)의 에틸렌 디아민 염을 6ml의 80% 에탄올에 용해시키고, 빙용에서 냉각시키고, 1m의 1M HCl로 처리하고, 진공에서 에탄올을 증발 제거하고, 3ml 이상의 물로 처리하고, 2×5ml의 에틸아세테이트로 추출하고, 물로 다시 세척한 다음 모든 용액을 빙용에서 방치하여 냉각 시켰다. 추출물을 MgSO_4 상에서 건조시킨 다음 진공에서 농축 건조 시킨 결과 하이드록시산이 무색 오일로서 얻어졌다.

CDCl_3 (190mg/ml)에서 ^{13}C -nmr 스펙트럼은 하기표에 기재한 바와같이 하이드록시산 부분의 여섯개의 탄소 원자에 대한 화학 이동을 보여준다. 이 하이드록시산은 방치하면 서서히 락톤으로 복귀한다.

[표]

^{13}C -nmr 스펙트럼, 테트라메틸실란으로 부터 ppm 다운필드



하이드록시 산 화합물 (3)

C_1	174.8
C_2, C_4	42.4, 41.6
C_3	68.8
C_5	72.3
C_6	34.9

분자의 잔여 부분의 스펙트럼은 환폐쇄에 의하여 약간만 변한다.

[실시에 19]

화합물 (3)의 에틸 에스 테르

20ml의 에탄올에 현탁시킨 500mg(1.24 밀리 몰)의 화합물 91)(MSD-803)의 현탁액을 질소 기류하에 실온에서 교반하였다. 소량의 나트륨(약 1mg)을 가하나 다음 15분 후 다시 소량의 나트륨을 가했다. 전체 반

응시간 30분이 경과한 후 균질 반응 혼합물을 에테르로 희석하고, 물로 세척하고, 포화염수로 세척한 다음 $MgSO_4$ 상에서 건조시켰다. 용매를 증발시킨 결과 왁스형 고체가 얻어졌다. 분당 6ml로 펌프되는 10% 프 이소로판올/헥산을 갖는 와트만 파르타실 10PAC담(4.6mm×25cm)에서 HPCL에 의한 분석 결과 에틸에스테 르 및 MSD-803(77:23)의 혼합물이 나타났다. 이 혼합물을 용리제로서 3% 에탄올/염화메틸렌을 사용하여 실리카 겔(230-400메쉬)에서 중간 압력 크로마토그래 피에 의하여 분리 하였다. 에스테르를 함유하는 유 분을 모아 증발시킨 결과 358(65%)의 회백색 고체가 얻어졌다. (용점 : 67℃).

이 물질의 일부를 헥산으로 부터 재결정 시킨 결과 백색 침상이 얻어졌다(용점 : 66.5-68.5℃).

$C_{26}H_{42}O_6$ 에 대한 분석

이론치 : C, 69.30 ; H, 9.40

실측치 : C, 69.22 ; H, 9.58

유사한 방법으로, 당량의 메탄올, 프로판올, 부탄올, 이소부탄올, t-부탄올, 아밀 알코올, 이소 아밀 알 코올, 2-디메틸 아미노 에탄올, 벤질알코올, 펜에탄올, 2-아세토아미도 에탄올 등을 사용하여 해당하는 에스테르를 얻었다.

[실시에 20]

화합물 (2) 및 (4)의 제조

A. 발효

동결 건조 배양 MF-4845의 관을 무균적으로 개방하고, 그 내용물을 다음과 같은 조성을 갖는 배지 약 10ml을 함유하는 차폐되지 않은 250ml 엘렌마이어 플라스크(종자 플라스크)에서 현탁시켰다.

배지			
육즙수 필지액	5g	글루코스	10g
트라이프에이브	40g	미량 원소 용액	10g
오트밀	10g	중류수	100ml
		pH 6.8(NaOH 4.8)	
미량 원소 용액		H_2BD_6	56mg
$FeSO_4 \cdot H_2O$	1000mg	$(NH_4)_2MgO_4 \cdot 4H_2O$	19mg
$MnSO_4 \cdot H_2O$	1000mg	$ZnSO_4 \cdot H_2O$	200mg
$CaCl_2 \cdot H_2O$	25mg	중류 알이온수	100ml
$CaCl_2 \cdot H_2O$	100mg		

점종시킨 플라스크를 28℃에서 24시간 동안 220rpm 진탕기(2인치 행정)에서 배양하였다. 500ml의 배지를 함유하는 차폐되지 않은 2ℓ 용량의 엘렌마이어 플라스크를 종자 혼합물로 부터 제1단계 발효 성장물 10ml로 점종하였다. 이것 역시 28℃에서 24시간 진탕하였다.

그 다음 200갈론 용량의 스테인레스 스틸 용기에 하기하는 배지 485ℓ를 주입하고, 그의 pH를 7.0으로조 절하였다. 이것을 121℃에서 15분간 멸균하였다. 그 다음 상술한 제2단계의 것 1ℓ를 주입하고, 혼합물 을 28℃에서 12시간 동안 5cfm의 공기를 유동시키면서 85rpm에서 배양한 다음 84시간 동안 10cfm의 공기 를 유동시키면서 130rpm에서 배양하였다.

배지			
세레토스	4.5%wt/Vol	자거분해 효모	0.25%wt/Vol
유병	2.5%wt/Vol	폴리글리콜 2000	0.25%wt/Vol
분리			

1. 추출

100 갈론의 전체 육즙 2벤티를 모아 800ml의 농염산을 주의 깊게 가하여 교반하면서 pH를 4.1로 조절하 고, 75갈론의 에틸아세테이트를 가해 두 시간 더 교반하여 추출하였다.

약 25파운드의 규토질 필터 보조제를 가한 다음 총 슬러리를 24-인치 필터 프레스를 통해 압송하였다. 추가로 75갈론의 에틸 아세테이트를 사용하여 압착 케이크를 세척하 다음 4시간의 압착을 통해 압송 방 향을 반대로 하여 연속 추출하였다. 그 다음 모든 세척 용액을 프레스로 부터 방출하여 제1여액과 혼합 하였다. 2-상 여액을 방치하여 수층을 제거하였다. 에틸 아세테이트층을 10 갈론의 탈이온수로 세척하 고, 상을 방치하여 분리하고 에틸 아세테이트 추출물을 진공 농축시켜 약 10갈론의 잔사를 얻었다.

2. 락톤화

(추출물중의 화합물 (4)을 화합물 (2)로 환화하기 위하여, 다음과 같은 공비 처리를 행하였다)

추가적인 300갈론의 육즙으로 부터의 에틸 아세테이트 추출물을 상기 추출물에 가한 다음 용량을 진공 증류에 의하여 약 30갈론까지 감소시켰다. 약 50갈론의 톨루엔을 가하고 벤티를 진공하에 32갈론까지 농 축시켰다. 이 단계를 반복한 다음 새로운 톨루엔을 충분히 가하여 용량을 75갈론으로 하였다. 진공을 행 함이 없이 벤티를 환류시킨 다음 106℃이상의 온도로 2시간 동안 유지시켰다.

이 용액을 진공하에 소량으로 농축시킨 다음 대규모 회전 증발기에서 감압하에 더 농축시켜 오일 잔사를 얻었다.

3. 실리카겔에서 크로마토그래피

위에서 얻은 추출물을 2갈론의 염화메틸렌을 가해 기타 용매를 제거한 다음 다시 농축시켜 오일을 얻었다.

오일 잔사를 약 5갈론의 에틸아세테이트-염화메틸렌(30/70 : V/V) 혼합물에 용해시킨 다음 2.8kg의 실리카 겔을 가해 슬러리를 만들었다.

슬러리를 동일한 용매 혼합물이 충전된 12인치×50인치의 실리카 겔탑의 정부에 레벨층으로 장입하였다.

분당 800ml에서 에틸아세테이트-염화메틸렌(40/60 : V/V)으로 용리하였다. 앞 공정의 유분 10갈론, 다른 유분 4갈론을 각각 수집하였다.

유분 6-10 모두를 감압하에 농축시켜 오일 잔사를 얻고, 이것을 뜨거운 에틸 아세테이트에 용해시키고, 탈색 탄소로 처리하고, 고온 여과한 다음 냉각시켰다. MSD 803(화합물 1)의 결정을 여별하고 모액을 농축시켜 추가적인 크로마토그래피 용의 오일을 얻었다.

4. 실리카 겔에서 재크로마토그래피

추가적인 600갈론의 발효 생성물에 해당하는 유사한 육즙 추출물로 부터의 모액 잔사를 염화메틸렌 용액에서 상술한 것과 혼합하였다. 이 용액 1/2을 다른 실리카겔크로마토 그래피 용으로 취했다. 소량의 부분표본은 325g의 총 고정분 함량을 보여 주었다. 이 용액을 40g의 탈색 탄소로 처리하고, 여과한 다음 케이크를 염화메틸렌으로 세척하였다. 여액과 세정제를 모아 진공하에 농축시켜 오일 잔사를 얻었다. 이것을 800ml의 에틸아세테이트-염화메틸렌(30/70 : V/V)에 재용해 시킨 다음 225g의 실리카겔로 슬러리를 만들었다. 슬러리를 동일 용매 혼합물이 충전된 실리카 겔의 탑상(bed)(14×36cm)의 정부에 장입하였다. 에틸아세테이트-염화메틸렌(40/60 : V/V)으로 전개 시켰다.

앞의 유분 3ℓ를 배치하고, 그 다음 800ml의 유분을 수집하였다.

5. 가역상 충전 물질에서 크로마토 그래피

상술한 크로마토그래피의 유분 12로 부터의 40ml를 농축시켜 500mg의 오일을 얻고, 이 오일을 5ml의 아세토니트릴에 다시 용해시켰다. 이 아세토니트릴 용액을 가역상 액체 크로마토그래피 탑 충전 물질 '본다파크 C 18/포라신 B'((Water Associates, Inc., Milford, Mass. 01757)가 충전된 5/8"OD×6ft 길이의 스테인레스 스틸 크로마토그래피 탑에 장입하였다. 탑을 55% 아세토니트릴 및 45% 0.05M 인산암모늄(pH 3)(V/V)으로 구성된 혼합물로 용리하였다. 1360ml 및 1700ml 사이의 용리물을 굴절을 검사하기 위해 수집하였다. 유기 용매를 진공하에 제거한 다음 잔존하는 수용액을 에틸아세테이트로 추출하였다. 에틸아세테이트를 진공 제거한 결과 120mg의 주제 화합물이 얻어졌으며, 이것을 진한 아세토니트릴 용액으로 부터 결정시켜 결정 MSD 883(화합물 2)를 얻었다. 융점 : 129-131℃

[실시예 21]

화합물 (2) 및 (4)의 분리의 변형예

1100갈론의 발효로 부터 실시예 7에 기술한 바와 같이 분리한 조잡한 암모늄 염을 실시예 20-B-2에 기술한 바와 같이 물에 용해시키고, 농염산으로 pH 3으로 산성화 시키고, 톨루엔으로 추출한 다음 두 시간동안 환류시켜 락톤화 하였다. 진공하에 소량으로 농축시킨 결과 소량의 화합물 (2)이 혼합된 조잡한 화합물 (1)의 결정이 얻어졌다. 이들을 여별한 다음 건조시켰다.

이러한 12개의 뱃취로 부터의 물질을 혼합하여 101파운드의 에탄올로 부터 재결정 시키고, 여과한 다음 에탄올로 세척하였다. 모액과 세정제를 모아 진공에서 약 3갈론까지 농축시킨 다음 화합물 (1)의 제2의 결정을 여별하였다. 이러한 여과로 부터의 모액을 다음과 같이 처리하였다.

이들 모액 약 0.5ℓ를 진공하에 농축시켜 에탄올을 제거하고, 아세토 니트릴로 세척하고 미량의 불용성분을 여과하여 가역상 크로마토그래피 용으로 제조하였다. 100ml의 아세토니트릴 용액을 C-18 가역상 충전물질의 상 200ml 위에 통과시킨 다음 이 상을 추가적인 1ℓ의 아세토니트릴로 세척하였다. 여액을 모아 농축시키고, 총 360ml의 크로마토그래피 용매(아세토니트릴-물 : 60-40 V/V)에 용해시킨 다음 여과하여 미량의 불용성분을 제거하였다. 최상의 부분 표본에 의한 고정분 함량은 15.3g였다.

상기 공급 원료 160ml를 분당 130ml 및 실온에서 용리제로서 아세토니트릴-물(60-40V/V)을 사용하고 또 C-18 가역상 충전 물질의 두개의 통(5×30cm)을 사용하는 워터스 프레프 500 시스템에서 굴절율을 검사하면서 크로마토 그래피하였다. 제1의 3900ml의 용리제에서 용리된 불순물은 제거하였다. 화합물(1)의 큰 피크가 3900-5850의 용리제에서 얻어졌다. 혼합 유분은 5850-6500ml의 용리제로 얻었으며, 이들을 크로마토그래피용으로 두었다. 정제한 화합물 (1)은 최종 피크로서 얻어졌으며, 6500-8450ml 사이에서 용리하는 유분을 모아 농축시켜 약 3g의 오일 잔사를 얻었다.

화합물 (2)의 상기 농축액이 절반(약 1.5g)을 화합물 (4)의 암모늄염으로서 크로마토그래피 하기 위하여 교반하면서 6ml의 뜨거운 메탄올에서 용액을 만든 다음 pH를 10.5-11로 유지하기에 충분한 1N 수산화나트륨을 즉시 가하여 제조 하였다. 이때 3.5-3.8ml의 알칼리가 요구된다. 반시간 방치 후 용액을 여과하여 미량의 불용성분을 제거하고, 여액을 200-325 메쉬로 분쇄된 XAD-2수지(스티텐-디비닐벤젠 공중합체)의 탑(1'×34')에 압송한 다음 40℃에서 분당 2ml로 아세토니트릴-0.1N 수산화암모늄(23%-77%)으로 용리하였다. 20ml의 유분을 수집하였는바, 유분 1-44는 불순물 및 화합물 (3)의 염의 피이크를 함유하였으며, 후자는 제거하였다. 유분 45-61은 모아서 진공하에 농축시켜 소량으로 한다음 동결 건조시켜 화합물 (4)의 암모늄염의 잔사를 얻었다(0.72g).

[실시예 22]

화합물 (4)의 염

2ml의 에탄올에 용해시킨 실시예 20의 생성물 40mg의 용액을 1ml의 NaOH 수용액(10^{-4} 몰 : 1당량)에 가했다. 실온에서 1시간후 혼합물을 진공 건조시켜 화합물 (4)의 나트륨 염을 얻었다.

유사한 방법으로, 칼륨염은 1당량의 수산화칼륨을 사용하여 제조하고, 칼슘염은 1/2 당량의 CaO를 사용하여 제조하였다.

실시예 9-12 및 14에 기술한 공정을 사용하되, 단 각각의 경우 화합물 (3)의 암모늄 염 대신에 화합물(4)의 암모늄 염의 당량을 사용하여 각각 화합물 (4)의 L-리신, L-아르기닌, L-오르니틴, N-메틸 글루카민 및 칼슘염을 제조하였다.

실시예 13, 15 및 16에 기술한 공정을 사용하되 단 각각의 경우 화합물 (1) 대신에 당량의 화합물 (2)을 사용하여 각각 화합물 (4)의 에틸렌디아민, 테트라메틸암모늄 및 암모늄염을 제조 하였다.

[실시예 23]

하이드록시산, 화합물 (4)의 제조

실시예 22에서 제조한 나트륨 염을 2ml의 에탄올-물(1:1)에 용해시킨 다음 10ml의 0.1N1 염산을 가하여 유리된 하이드록시산을 에틸아세테이트로 추출하였다. 후자의 용매를 물로 1회 세척하고, 건조시킨 다음 30°C를 초과하지 않는 온도에서 진공 제거하였다. 얻어진 하이드록시산은 방치하면 서서히 락톤으로 복귀하였다.

[실시예 24]

하이드록시산, 화합물 (4)의 제조

221의 화합물 (4)의 암모늄 염을 4.5ml의 65% 에탄올에 용해시켰다. 얼음에 냉각시키고, 약 0.5ml의 1M HCl로 pH를 3으로 조절한 다음 저온에서 회전증발기에서 증발시켜 약 2ml로 하였다. 2ml 이상의 물을 가한 다음 2×3ml의 에틸 아세테이트로 추출하고, 모든 용액을 방울에서 냉각시키면서 1ml의 물로 다시 세척하였다. 추출물을 MgSO₄상에서 건조시킨 다음 진공에서 증발 건조 시킨 결과 하이드록시산이 무색 오일로서 얻어진다.

CDCl₃에서 ¹³C-nmr 스펙트럼한 결과 하기 표에 기재한 바와같이 분자의 하이드록시산 부분의 첫번째 여섯 개의 탄소에 대한 화학 이동이 나타났다.

방치 후 하이드록시산은 락톤으로 서서히 복귀하였다.

[표]

CDCl₃에서 ¹³C-nmr 스펙트럼, 테트라메틸실란으로부터 ppm 다운 필드

하이드록시 산, 화합물 (4)	
C ₁	175.0
C ₂ , C ₄	42.2, 41.7
C ₃	68.8
C ₅	72.5
C ₆	35.0

분자의 나머지 부분의 스펙트럼은 환폐쇄에 의하여 약간만 변했다.

[실시예 25]

화합물 (4)의 에틸 에스테르

실시예 19에 기술한 공정을 사용하되, 단 1.24밀리 몰의 화합물 (1) 대신에 실시예 20으로 부터의 당량의 화합물 (2)를 사용하여 화합물 (4)의 에틸 에스테르를 얻었다.

이와 유사한 방법으로 메틸, 프로필, 부틸, 이소부틸 t-부틸, 아밀, 이소아밀, 2-디메틸 아미노에틸, 벤질, 펜에틸 및 2-아세트아미도 에틸 에스테르를 제조하였다.

[실시예 26]

A. HMG 코엔자임 레덕타아제의 시험관내 억제

Beg 등의 방법(FEBS Letters, 80,123 (1977)을 약간 변형하여 기질과의 반응 개시전에 효소르러 5분 동안 억제제와 배양하였다. 본 발명의 신규 화합물 같은 효력 있는 억제제에 있어서, 억제제-기질 혼합물에 단지 효소를 가하는 표준 공정은 비직선 운동을 나타냈다.

변형 공정에 의한, 화합물 (4)의 나트륨염은 HMG-CoA 레덕타아제의 억제에 있어서 ML236B에 대해 5.4×10^{-9} M과 비교하여 2.7×10^{-9} M의 IC₅₀를 나타냈다.

B. 콜레스테롤 합성의 생체내 억제 화합물 (2)

췌장 홀츠만(Holtzman)쥐의 그룹을 위관에 의하여 염수중의 5% 에뮬포르(emulphor) 또는 에뮬포르중의

시험 화합물로 투여하였다. 1시간 후 $80 \mu\text{Ci}$ 의 ^{14}C 아세테이트 1kg 를 복강내 투여하였다. 50분 후 쥐는 피를 흘렸으며, 콜레스테롤을 스테롤 합성 단위로서 결정하였다.

투여량(mg/kg)	억제율(%)	투여량(mg/kg)	억제율(%)
0.15	38	1.2	70
0.6	51		

[실시예 27]

세포 배양에 있어서 스테롤 합성의 억제제로서 화합물 (1), (2) 및 ML-236 B의 비교

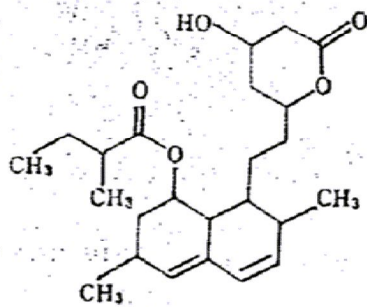
배지중의 생쥐 L-M 세포에서 ^{14}C 아세트 산으로 부터 ^{14}C 스테롤 생합성의 양을 측정하는 A.W. Alberts의 공정(J. Biol. Chem. 249:5241(1974))를 변형하여 이용하였다. 시험화합물($10 \mu\text{l}$ DMSO)을 $5 \mu\text{Ci}$ 의 ^{14}C 아세테이트를 갖는 단층 배지에 가했다. 3시간 배양 후 세포를 비누화 한 다음 ^{14}C 스테롤을 추출한 후 석유에테르-디에틸에테르-아세트산(75:25:1)을 사용하여 실리카겔 상에서 박층 크로마토그래피에 의하여 분리하였다. 스테롤을 함유하는 플레이트(plate)상의 부위는 I_2 로 착색하여 확인하였으며, 함량은 액체 신타레이션 계수기에 의하여 측정하였다.

변형 공정을 사용한 결과, 화합물 (2)은 HMG-CoA 레덕타아제의 액체에 있어서 화합물 (1)에 대한 22mM 및 ML-236B에 대한 46nM 과 비교하여 17nM 의 IC_{50} 을 나타냈다.

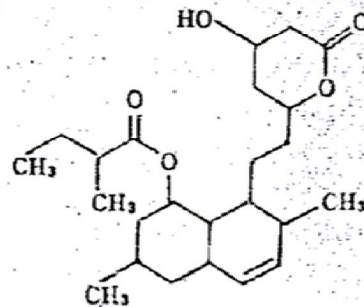
(57) 청구의 범위

청구항 1

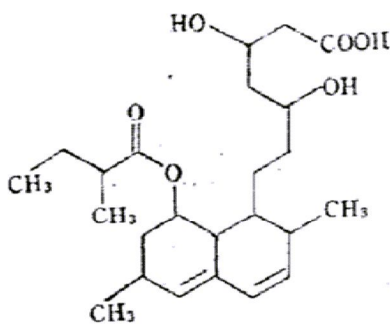
본문에 상술한 바와같이, 영양 배지를 아스페르길러스 테레우스 속(genus *Aspergillus terreus*)의 미생물과 함께 발효시킨 다음 생성물을 분리하는 것으로 구성된 다음 일반식 (1), (2), (3) 및 (4)의 화합물을 제조하는 방법.



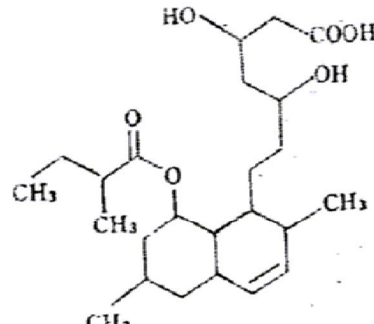
(1)



(2)



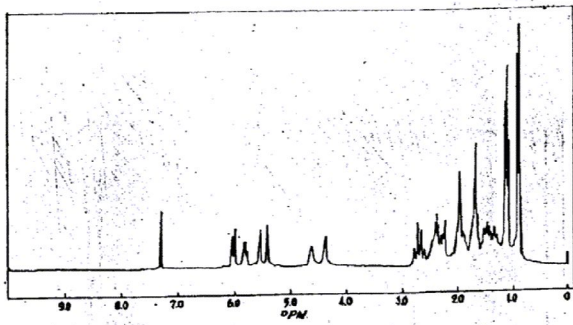
(3)



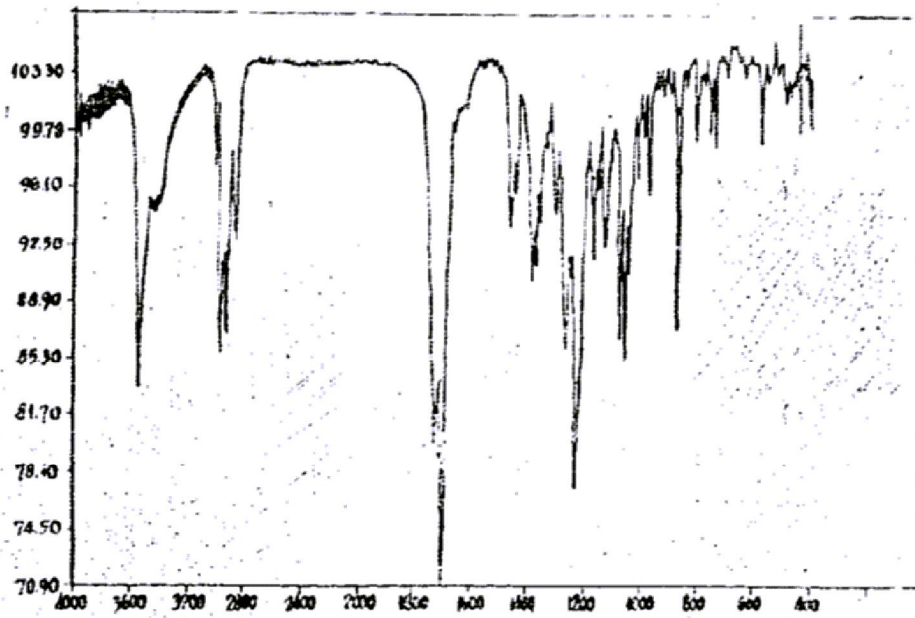
(4)

도면

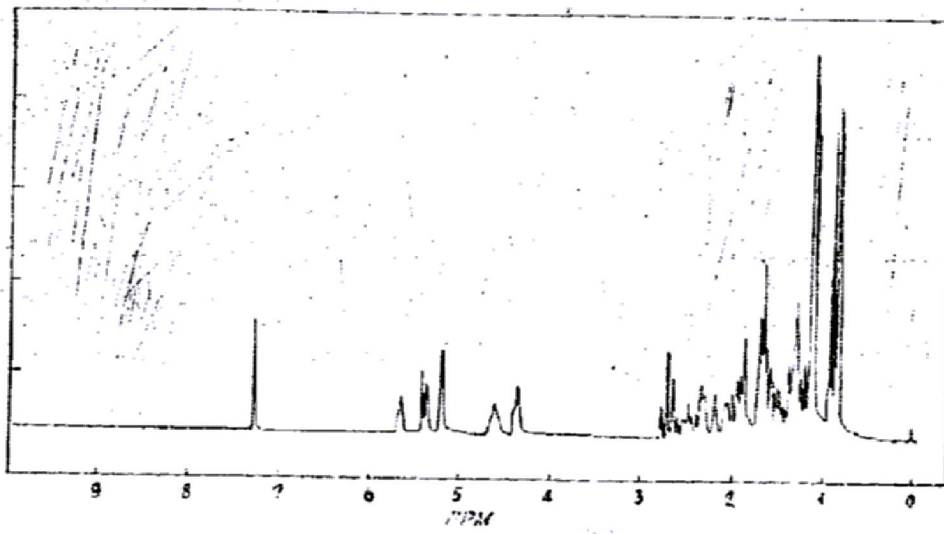
도면1



도면2



도면3



도면4

