

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4796300号  
(P4796300)

(45) 発行日 平成23年10月19日(2011.10.19)

(24) 登録日 平成23年8月5日(2011.8.5)

(51) Int. Cl. F I  
**C07H 17/08 (2006.01)** C O 7 H 17/08 C S P B  
**A 6 1 K 31/7048 (2006.01)** A 6 1 K 31/7048  
**A 6 1 P 1/00 (2006.01)** A 6 1 P 1/00

請求項の数 7 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2004-531645 (P2004-531645)	(73) 特許権者	307020121
(86) (22) 出願日	平成15年8月26日 (2003. 8. 26)		ファイザー インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2005-537317 (P2005-537317A)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100
(43) 公表日	平成17年12月8日 (2005. 12. 8)		17 ニューヨーク イースト フォーテ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/026991		イーセカンド ストリート 234
(87) 国際公開番号	W02004/019879	(74) 代理人	100082005
(87) 国際公開日	平成16年3月11日 (2004. 3. 11)		弁理士 熊倉 禎男
審査請求日	平成18年7月27日 (2006. 7. 27)	(74) 代理人	100084009
(31) 優先権主張番号	60/407, 345		弁理士 小川 信夫
(32) 優先日	平成14年8月29日 (2002. 8. 29)	(74) 代理人	100084663
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		(74) 代理人	100114007
			弁理士 平山 孝二

最終頁に続く

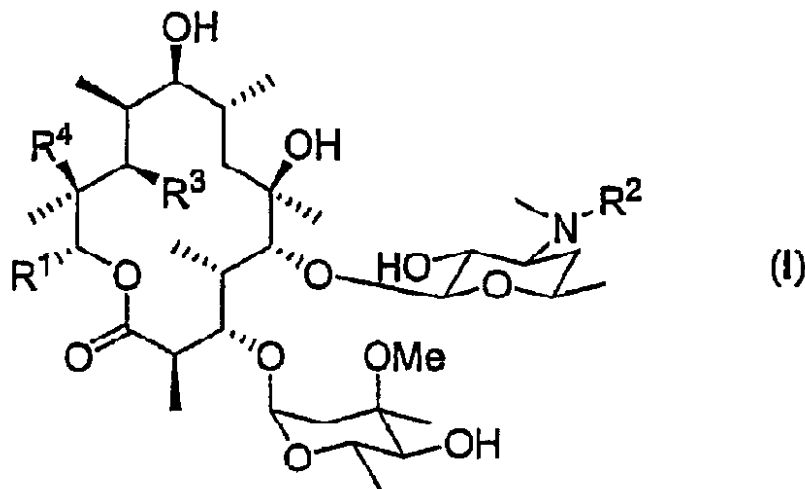
(54) 【発明の名称】 モチライド化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の式(1)で表される化合物、その医薬上許容し得る塩。

【化1】



(式中、R<sup>1</sup>が、置換または非置換のC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルキル、置換または非置換のC<sub>2</sub>~C<sub>10</sub>アルケニル、置換または非置換のC<sub>2</sub>~C<sub>10</sub>アルキニル、置換または非置換のアリール、または非

置換のヘテロシクロであり；

R<sup>2</sup>が、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピルまたは2-ブチルであり；そして、R<sup>3</sup>とR<sup>4</sup>がOHであるが；

R<sup>1</sup>がエチルであるときは、R<sup>2</sup>は、Hでないことを条件とし、及び、R<sup>2</sup>がメチルであるときは、R<sup>1</sup>は、FCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>又はCH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>であることを条件とする。 )

【請求項2】

R<sup>1</sup>が、エチルであり；

R<sup>2</sup>が、エチル、プロピル、イソプロピルまたは2-ブチルであり；そして、R<sup>3</sup>とR<sup>4</sup>がOHである、請求項1記載の化合物。

【請求項3】

R<sup>1</sup>が、置換されたエチルである、請求項1記載の化合物。

【請求項4】

R<sup>1</sup>が、プロピルである、請求項1記載の化合物。

【請求項5】

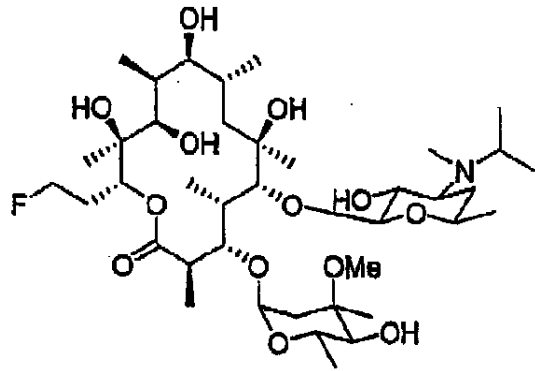
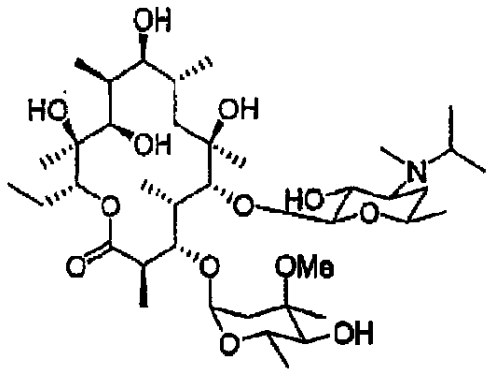
R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>4</sup>が下記の表に示した組合せに従う、請求項1記載の化合物。

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OH
FCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	OH
FCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH	OH
FCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OH
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	OH
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	OH
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	C(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH	OH

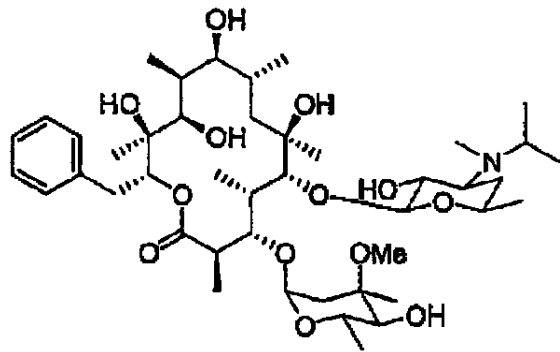
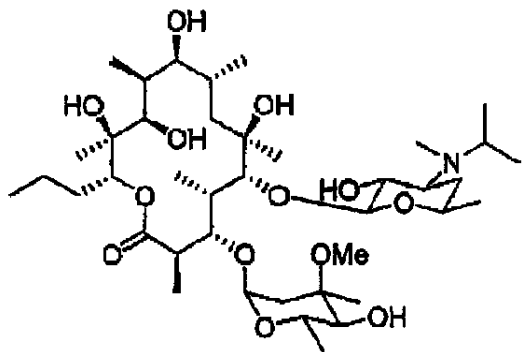
【請求項6】

下記からなる群から選ばれた、請求項1記載の化合物：

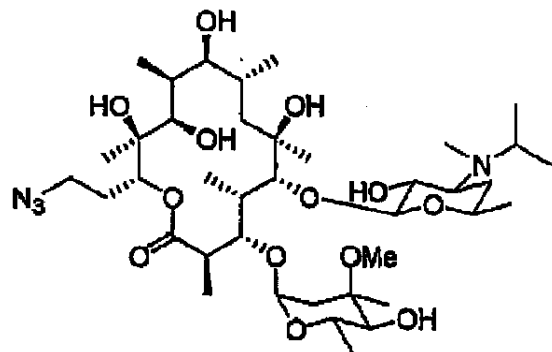
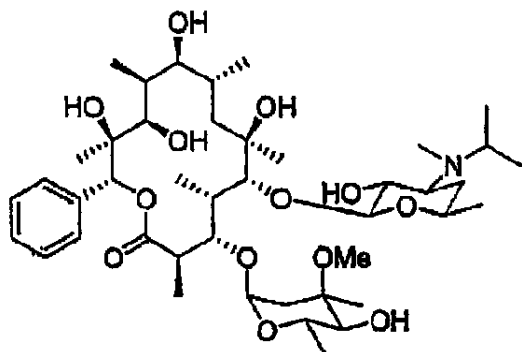
【化2】



10



20

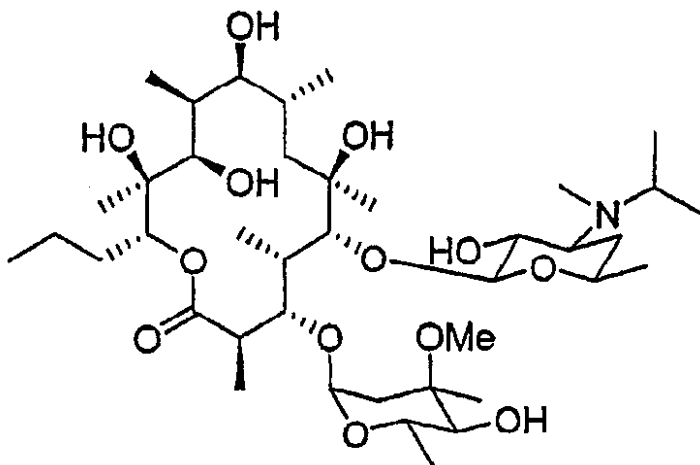


30

【請求項7】

下記の式で表される請求項1記載の化合物：

【化3】



40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

## 【 0 0 0 1 】

本発明は、胃腸運動性障害の治療において優れた薬理および薬物動態特性を有する消化管運動促進剤(prokinetic agent)を提供する。本発明は、化学、薬化学、医薬、分子生物学および薬理学の分野に関する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 2 】

胃腸(“GI”)運動は、栄養物、電解質および流体の適切な吸収を確実にするための消化物の内臓への順序正しい移動を調節する。食道、胃、小腸および結腸と通る適切な移動は、管腔内圧力並びに前方移動を調節しGI内容物の逆流を防止する数種の括約筋との分割制御に依存している。正常なGI運動パターンは、疾病および外科処置のような種々の状況により損傷され得る。

10

胃腸運動性障害としては、例えば、胃不全麻痺および胃食道逆流疾病(“GERD”)がある。胃不全麻痺は、胃内容物の排出遅延である。胃不全麻痺の症状としては、腹痛、胸焼け、吐気および嘔吐がある。急性胃不全麻痺は、例えば、薬物(例えば、アヘン類)、ウイルス性腸炎および高血糖症によって生じ得、通常、上記運動性障害よりはむしろ基礎疾病を治療することによって管理される。慢性胃不全麻痺の最も一般的な原因は、多くの場合、いわゆる“非潰瘍性”または“機能的”消化不良を伴う長期持続性糖尿病または特発性仮性閉塞症に関連している。

GERDは、胃および十二指腸内容物の食道中への逆流の様々な臨床徴候である。最も一般的な症状は、胸焼けおよび不完全失語症であり；失血も食道糜爛により生じ得る。GERDは、下部食道括約筋の低調性と不適切な弛緩に関連し得、約40%の症例において胃不全麻痺を伴って発症している。殆どの症例において、GERDは、胃による酸性刺激物の放出を低減させる薬剤(例えば、プリロセク(Prilosec))または下部食道括約筋の調子を増進させる薬剤(例えば、シサプリド)によって治療可能なようである。症状が胃腸運動性障害を含む疾病の他の例は、食欲不振、鬱滞胆嚢、術後麻痺性イレウス、強皮症、腸仮性閉塞症、胃炎、嘔吐および慢性便秘(結腸無力症)がある。

20

## 【 0 0 0 3 】

これらのGI障害は、推進運動性を増強する消化管運動促進剤によって一般に治療する。モチライド(motilide)類は、モチリンレセプターの作用薬であるエリスロマイシンおよびその誘導体のようなマクロライド化合物である。モチライド類の潜在的な臨床使用の証しとしては、その進行性胃腸運動群(Migrating Motor Complexes ; “MMC”)の第III期を誘発する能力がある。MMCは、絶食状態における胃および小腸が示す電気活動の4つの期(I~IV)を称する。筋収縮は、絶食中に末梢的に腸内容物を推進させる蠕動波と同時に、第III期と第IV期に生ずる。他の臨床的な関連作用としては、健常有志者およびGERD患者における食道蠕動およびLES圧の増進；胃不全麻痺患者における胃内容物排出の促進；並びに健常有志者、胆石除去後の患者および自律性ニューロパシーを伴う糖尿病における胆嚢収縮の刺激がある。

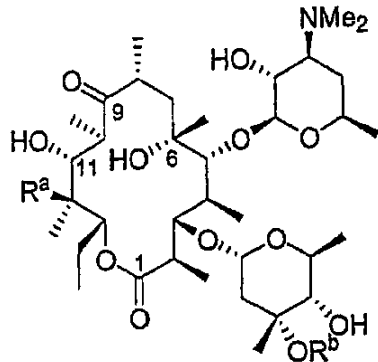
30

エリスロマイシン類は、放線菌類のサッカロポリスポラ エリスラエア(Saccharopolyspora erythraea) (以前のストレプトミセス エリスレウス(*Streptomyces erythreus*))の発酵によって製造される群のマクロライド抗生物質である。エリスロマイシンAは、一般的に使用される抗生物質であり、この群の最も豊富で重要な1員である。

40

## 【 0 0 0 4 】

## 【化1】



エリスロマイシン A

 $R^a = \text{OH}$      $R^b = \text{Me}$ 

エリスロマイシン B

 $R^a = \text{H}$      $R^b = \text{Me}$ 

エリスロマイシン C

 $R^a = \text{OH}$      $R^b = \text{H}$ 

エリスロマイシン D

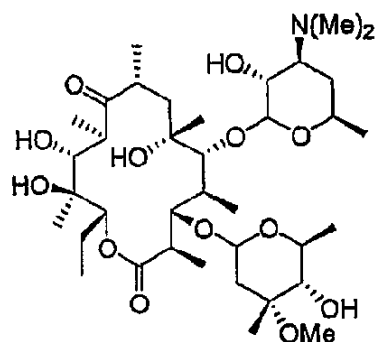
 $R^a = \text{H}$      $R^b = \text{H}$ 

10

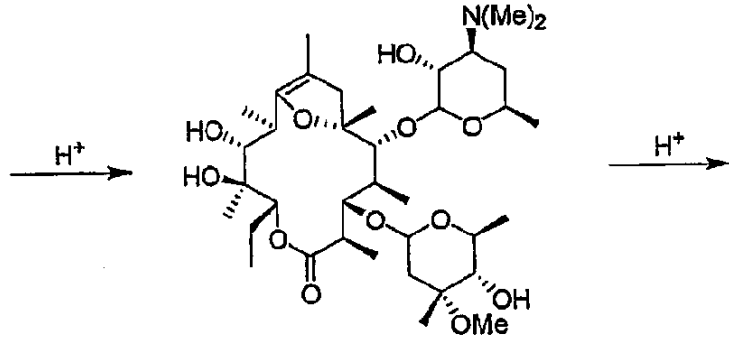
1950年代以来、エリスロマイシンA (1)は、吐気、嘔吐および腹部不快感のようなGI副作用を生ずることが知られている。エリスロマイシンAは、下記の式Aに示すように、胃内で酸触媒による分解を受け、最初に8,9-アンヒドロ-6,9-ヘミアセタル (2) (エリスロマイシンAエノールエーテルとしても知られる)、次いでスピロケタル (3)を形成する。GI副作用は、エリスロマイシンA自体およびヘミアセタル (2)中のモチリン作用薬活性によって大いに説明される。(スピロケタル (3)は不活性である)。

## 【化2】

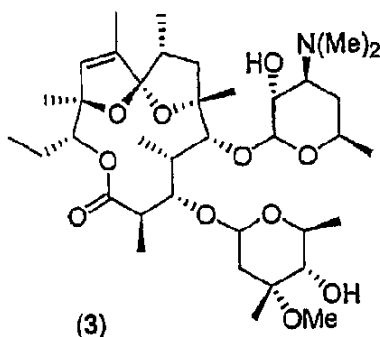
## 式 A



(1) (エリスロマイシンA)



(2)



(3)

20

30

40

## 【0005】

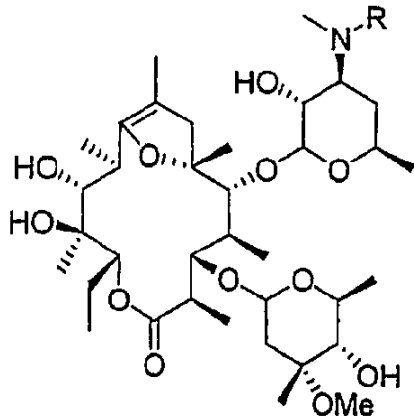
Omura et al., "Gastrointestinal motor-stimulating activity of macrolide antibiotics and the structure-activity relationship," J. Antibiotics (1985) 38: 1631-2は、エリスロマイシンA、9-ジヒドロエリスロマイシンAおよび他のマクロライド類の意識あるイヌの内臓収縮を刺激する相対的能力を開示している。この分析において、9-ジヒドロエリスロマイシンAは、1 mg/kgの投与量においてエリスロマイシンの65%程の活性であると報告されている。9-ジヒドロエリスロマイシンはエノールエーテルを形成し得ないので、エノールエーテル形成がモチライド活性において不可欠ではないことが明らかである。エリスロマイシンAは、その抗細菌活性が耐性微生物発生についての懸念を生じてい

50

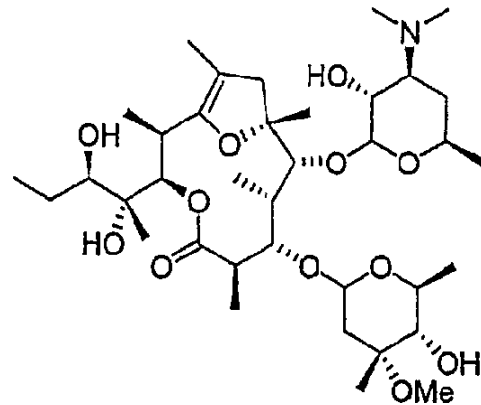
るのもかわらず、運動性障害の治療に現在使用されている。9-ジヒドロエリスロマイシンも抗細菌活性を示すので、そのモチライドとしての使用による同様な懸念は存在する。

EM-523 (4) ; EM-574 (5) ; LY267,108 (6) ; GM-611 (7) および ABT-229 (8) のような多くのエリスロマイシンエノールエーテルアナログ類がモチライドとして製造されており、これらの構造を下記に示す。米国特許第5,578,579号、第5,658,888号、第5,922,849号、第6,077,943号および第6,084,079号を参照されたい；これら米国特許の各々は、参考として本明細書に引用する。

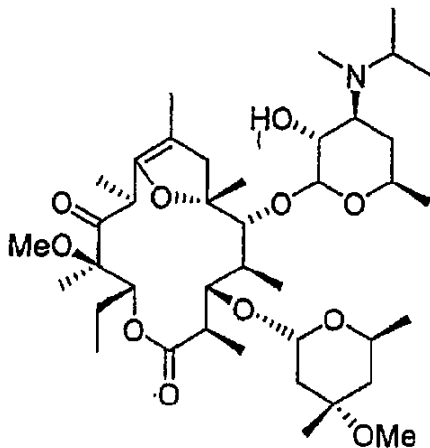
【化3】



(4) R = エチル  
(5) R = イソプロピル

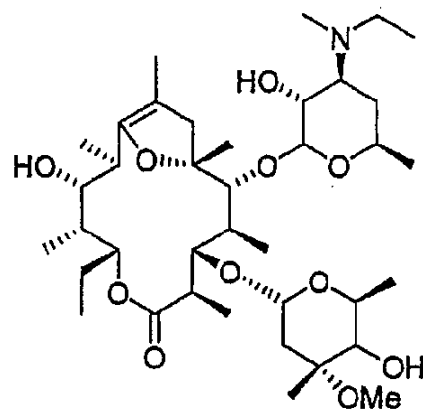


(6)



(7)

および



(8)

【0006】

他の興味あるモチライド類としては、ラクタムエノールエーテル類およびラクタムエポキシド誘導体がある。米国特許第5,712,253号；第5,523,401号；第5,523,418号；第5,538,961号および第5,554,605号を参照されたい；これら米国特許の各々は、参考として本明細書に引用する。

エリスロマイシンエノールエーテル類のモチライド類としての高潜在力にもかかわらず、その代謝不安定性は、その臨床における発展性を妨げている。さらに、7および8のような化合物は、細胞系および筋肉片収縮性アッセイの双方においてモチリンレセプター脱感作性を示している。この脱感作性は、上記モチライドの複数回投与時の有効性の低下を予兆し得る。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

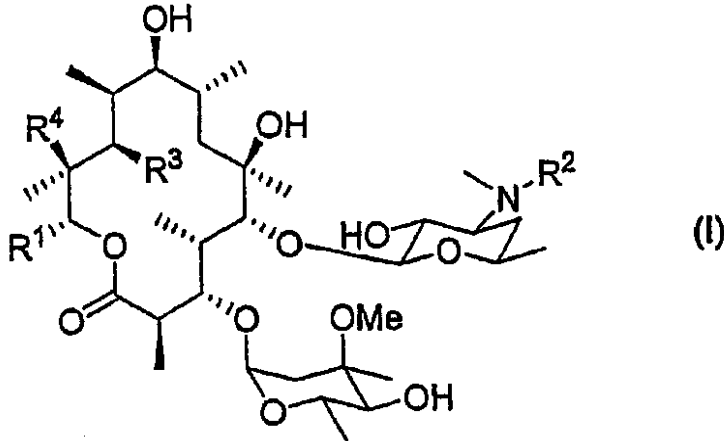
従って、低減された抗細菌活性、増大した代謝安定性および低減されたレセプター脱感作性を有する新規なモチライド化合物が求められている。本発明は、この要求を満たす9-ジヒドロエリスロマイシンを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の1つの局面は、下記の式(I)を有する化合物、並びにその医薬上許容し得る塩、エステルおよびプロドラッグを提供する。

【化4】



10

20

(式中、 $R^1$ は、置換または非置換の $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、置換または非置換の $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル、置換または非置換の $C_2 \sim C_{10}$ アルキニル、置換または非置換のアリール、または置換または非置換のヘテロシクロであり； $R^2$ は、H、置換または非置換の $C_1 \sim C_5$ アルキル、置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルケニル、置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルキニル、置換または非置換のアリール、または置換または非置換のヘテロシクロであり； $R^3$ は、HまたはOHであり；そして、 $R^4$ は、HまたはOHであるか、或いは $R^3$ と $R^4$ は、一緒になってO-C(C=O)-Oを形成するが；(a)  $R^1$ がエチルであり、(b)  $R^3$ がOHであるかまたは $R^3$ と $R^4$ が一緒になってO-C(C=O)-Oを形成するときは、 $R^2$ は、Hまたはメチルでないことを条件とする)。

第2の局面においては、胃運動性障害を患っている患者に治療上有効量の本発明の組成物を投与することを含む、胃運動性障害を患っている患者における胃運動性障害の治療方法を提供する。

30

第3の局面においては、本発明の化合物と医薬上許容し得る担体を含む医薬組成物を提供する。

【0009】

第4の局面においては、本発明の化合物(I)は、対象者の胃運動性障害の治療用医薬の製造において使用する。

第5の局面においては、本発明は、11-デオキシエリスロマイシン類(とりわけ、11-デオキシエリスロマイシンB)を産生する組換え宿主細胞を、それらが発現する変性ポリケチドシンターゼ遺伝子およびそれら进行操作するのに使用するベクター類と一緒に提供する。11-デオキシエリスロマイシンは、本発明の化合物合成における中間体として有用である。上記組換え宿主細胞は、モジュール2中のケトレダクターゼドメインをデヒドラターゼドメイン、エノイルレダクターゼドメインおよびケトレダクターゼドメインを含有するカセットで置換することによって操作されているeryA1遺伝子を有する。第6の局面においては、本発明は、そのような組換え宿主細胞を培養することを含む11-デオキシエリスロマイシンの製造方法を提供する。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

定義

以下に示す用語の定義は、その概念が他のことを明らかに示さない限り、本明細書およ

50

び特許請求の範囲の全体に亘って使用するときのその用語に対して適応する。

“アルキル”は、鎖中に特定の炭素原子数を有する或いは炭素原子数は特定されないが鎖中に5個までの炭素原子数を有する直鎖または枝分れ鎖の炭化水素成分を意味する。

“アルケニル”は、少なくとも1個の炭素-炭素二重結合を有し、且つ鎖中に特定の炭素原子数を有する或いは炭素原子数は特定されないが鎖中に5個までの炭素原子数を有する直鎖または枝分れ鎖の炭化水素成分を意味する。

“アルキニル”は、少なくとも1個の炭素-炭素三重結合を有し、且つ鎖中に特定の炭素原子数を有する或いは炭素原子数は特定されないが鎖中に5個までの炭素原子数を有する直鎖または枝分れ鎖の炭化水素成分を意味する。

“アルキルアリール”、“アリールアルキル”、“ヘテロシクロアルキル”、“アルキルヘテロアリール”、“アルキルサイクル”等は、ベンジルおよびフェネチル等におけるように、状況に応じて、アルキル成分に直接結合したアリール、複素環式またはヘテロアリール基を意味する。

#### 【0011】

“アリール”は、フェニル、ナフチルおよびビフェニル成分のような環位置に6~12個の炭素原子を有し、各々が1個以上の位置で必要に応じて置換された単環式または二環式の芳香族炭化水素環状系を意味する。

“シクロアルキル”は、好ましくは1~3個の環および環当り3~7個の炭素を含有し、さらに不飽和 $C_3$ ~ $C_7$ 炭素環と縮合させ得る必要に応じて置換された飽和環状炭化水素環状系を意味する。シクロアルキル環状系の例としては、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、シクロデシル、シクロドデシルおよびアダマンチルがある。

“ハロゲン”または“ハロ”は、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素を意味する。

#### 【0012】

“ヘテロサイクル”、“ヘテロサイクリック”または“ヘテロサイクロ”は、必要に応じて置換された十分に飽和または不飽和の芳香族または非芳香族環状系を意味し、例えば、4~7員の単環式、7~11員の二環式または10~15員の三環式の環状系であって、少なくとも1個の炭素原子含有環中に少なくとも1個のヘテロ原子を有する。“ヘテロアリール”は、環状系がアリールである複素環を意味する。ヘテロ原子を含有する複素環基の各環は、N、OおよびSから選択された1個、2個または3個のヘテロ原子を有し得、NおよびSは必要に応じて酸化させ得、Nは必要に応じて第4級化させ得る。

単環式複素環系の例としては、ピロリジニル、ピロリル、インドリル、ピラゾリル、オクセタニル、ピラゾリニル、イミダゾリル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、オキサゾリル、オキサゾリジニル、イソキサゾリル、チザオリル、チアジアゾリル、チアゾリジニル、イソチアゾリル、イソチアゾリジニル、フリル、テトラヒドロフリル、チエニル、オキサジアゾリル、ペペリジニル、ペペラジニル、2-オクソペペラジニル、2-オクソペペリジニル、2-オクソピロリジニル、2-オクサゼピニル、アゼピニル、4-ペペリドニル、ピリジニル、N-オクソ-ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、テトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、テトラヒドロチオピラニルスルホン、モルホリニル、チオモルホリニル、チオモルホリニルスルホキシド、チオモルホリニルスルホン、1,3-ジオキサランおよびテトラヒドロ-1,1-ジオキソチエニル、ジオキサニル、イソチアゾリジニル、チエタニル、チエラニル、トリアジニル、およびトリアゾリル等がある。好ましい複素環基としては、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、チエニル、フラニル、キノリニル、イソキノリニル等がある。

#### 【0013】

“医薬上許容し得るエステル”は、生体内(例えば、ヒトの体内)で加水分解して親化合物またはその塩を生成させるか或いはそれ自体親化合物の活性と同様な活性を有するエステルを意味する。適切なエステル基としては、限定するものではないが、医薬上許容し得る脂肪族カルボン酸、とりわけ、アルカン酸、アルケン酸、シクロアルカン酸およびアル

10

20

30

40

50

カン二酸から誘導されたエステルであって、各アルキルまたはアルケニル成分が好ましくは6個よりも多くない炭素原子を有するものである。エステル類の例としては、フマレート類、アセテート類、プロピオネート類、ブチレート類、アクリレート類、シトレート類、スクシネート類およびエチルスクシネート類がある。

“医薬上許容し得る塩”は、医薬調合物において適し得る化合物の塩を意味する。適切な医薬上許容し得る塩類としては、例えば、化合物の溶液を塩酸、臭化水素酸、硫酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、安息香酸、酢酸、クエン酸、酒石酸、リン酸または炭酸等のような医薬上許容し得る酸の溶液と混合することによって調製し得る酸付加塩がある。化合物が1個以上の酸成分を担持する場合、医薬上許容し得る塩類は、その化合物の溶液を水酸化リチウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化テトラアルキルアンモニウム、炭酸リチウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、アンモニアまたはアルキルアミン類等のような医薬上許容し得る塩基の溶液で処理することによって調製し得る。

#### 【0014】

基が置換されていることに特徴を有する場合(“置換アルキル”、“置換アルケニル”等におけるように)、そのような基は、1個以上の、好ましくは1~5個、好ましくは1個または2個の個々に選択された置換基を有し得る。当業者であれば、置換基および置換パターンを選定して、化学的に安定であり且つ当該技術において公知の方法または本明細書において説明する方法によって合成し得る化合物を提供し得ることを理解されたい。適切な置換基の例としては、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ハロ、トリフルオロメトキシ、トリフルオロメチル、ヒドロキシ、アルコキシ、シクロアルキルオキシ、ヘテロシクロオキシ、アルカノイル、アルカノイルオキシ、アミノ、アルキルアミノ第4級アンモニウム、アラルキルアミノ、シクロアルキルアミノ、ヘテロシクロアミノ、ジアルキルアミノ、アルカノイルアミノ、チオ、アルキルチオ、シクロアルキルチオ、ヘテロシクロチオ、ウレイド、ニトロ、シアノ、カルボキシ、カルボキシルアルキル、カルバミル、アルコキシカルボニル、アルキルチオノ、アリールチオノ、アルキルスルホニル、スルホンアミンド、アリーロキシ、およびここで特定した以外の他の基がある。置換基は、例えば、ハロ、ヒドロキシ、アルキル、アルコキシ、アリール、置換アリール、置換アルキル、置換アラルキル等によってさらに置換し得る。

#### 【0015】

特定の立体異性体は明確に示されない限り(例えば、構造式中で関連立体中心での肉太または破線結合により)、全ての立体異性体は、純粋化合物またはそれらの混合物として、本発明の範囲に包含される。特に断らない限り、個々の光学異性体、ジアステレオマー、幾何異性体並びにこれらの組合せおよび混合物は、全て本発明に属する。多形性結晶形および溶媒和物も本発明の範囲に属する。

本発明は、その範囲内に本発明の化合物のプロドラッグ類を包含する。そのようなプロドラッグは、一般に、生体内で所定の化合物に容易に転化し得る化合物の官能性誘導体である。即ち、本発明の治療方法において、用語“投与”は、明確に開示した化合物による或いは明確には開示していないが必要に応じて対象者に投与した後体内で特定の化合物に転化する化合物による上述の各種障害の治療を包含する。適切なプロドラッグ誘導体の選択および製造における通常の手順は、例えば、Design of Prodrugs, Bundgaard, ed., Elsevier, 1985に記載されている。

#### 【0016】

##### 化合物および方法

1つの実施態様においては、 $R^1$ が、置換または非置換の $C_1 \sim C_{10}$ アルキル、置換または非置換の $C_2 \sim C_{10}$ アルケニル、置換または非置換の $C_2 \sim C_{10}$ アルキニル、置換または非置換のアリール、または置換または非置換のヘテロシクロであり； $R^2$ が、H、エチル、プロピル、イソプロピルまたは2-ブチルであり； $R^3$ がHまたはOHであり； $R^4$ がHまたはOHであるか或いは $R^3$ と $R^4$ は一緒になってO-C(=O)-Oを形成しているが； $R^1$ がエチルであり、 $R^3$ がOHであるかまたは $R^3$ と $R^4$ が一緒になってO-(=O)-Oを形成するときは、その場合、 $R^2$ はHまたはメチルでないことを条件とする、式(1)を有する化合物を提供する。

本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^1$ が、置換または非置換の $C_1 \sim C_5$ アルキルであり； $R^2$ が、H、置換または非置換の $C_1 \sim C_5$ アルキル、置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルケニル、または置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルキニルであり； $R^3$ がHまたはOHであり； $R^4$ がHまたはOHであるか或いは $R^3$ と $R^4$ は一緒になって $O-C(=O)-O$ を形成しているが；(a)  $R^1$ がエチルであり、(b)  $R^3$ がOHであるかまたは $R^3$ と $R^4$ が一緒になって $O-(=O)-O$ を形成するときは、その場合、 $R^2$ はHまたはメチルでないことを条件とする、式(1)を有する化合物を提供する。

【0017】

本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^1$ がエチルであり； $R^2$ が、置換または非置換の $C_1 \sim C_5$ アルキル、置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルケニル、または置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルキニルであり； $R^3$ がHまたはOHであり； $R^4$ がHまたはOHであるか或いは $R^3$ と $R^4$ は一緒になって $O-C(=O)-O$ を形成している、式(1)を有する化合物を提供する。

10

本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^1$ が、エチルであり； $R^2$ が、エチル、プロピル、イソプロピルまたは2-ブチルであり； $R^3$ がHまたはOHであり； $R^4$ がHまたはOHであるか或いは $R^3$ と $R^4$ は一緒になって $O-C(=O)-O$ を形成している、式(1)を有する化合物を提供する。

本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^1$ が置換されたエチルであり； $R^2$ が、H、置換または非置換の $C_1 \sim C_5$ アルキル、置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルケニル、または置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルキニルであり； $R^3$ がHまたはOHであり； $R^4$ がHまたはOHであるか或いは $R^3$ と $R^4$ は一緒になって $O-C(=O)-O$ を形成している、式(1)を有する化合物を提供する。

20

【0018】

本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^1$ が、フルオロエチルまたはアジドエチルであり； $R^2$ が、H、置換または非置換の $C_1 \sim C_5$ アルキル、置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルケニル、または置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルキニルであり； $R^3$ がHまたはOHであり； $R^4$ がHまたはOHであるか或いは $R^3$ と $R^4$ は一緒になって $O-C(=O)-O$ を形成している、式(1)を有する化合物を提供する。

本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^1$ が置換されたエチルであり； $R^2$ が、H、エチル、プロピル、イソプロピルまたは2-ブチルであり； $R^3$ がHまたはOHであり； $R^4$ がHまたはOHであるか或いは $R^3$ と $R^4$ は一緒になって $O-C(=O)-O$ を形成している、式(1)を有する化合物を提供する。

30

本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^1$ が、フルオロエチルまたはアジドエチルであり； $R^2$ が、H、エチル、プロピル、イソプロピルまたは2-ブチルであり； $R^3$ がHまたはHであり； $R^4$ がHまたはOHであるか或いは $R^3$ と $R^4$ は一緒になって $O-C(=O)-O$ を形成している、式(1)を有する化合物を提供する。

本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^1$ がプロピルであり； $R^2$ が、H、置換または非置換の $C_1 \sim C_5$ アルキル、置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルケニル、または置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルキニルであり； $R^3$ がHまたはOHであり； $R^4$ がHまたはOHであるか或いは $R^3$ と $R^4$ は一緒になって $O-C(=O)-O$ を形成している、式(1)を有する化合物を提供する。

本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^1$ が、プロピルであり； $R^2$ が、H、エチル、プロピル、イソプロピルまたは2-ブチルであり； $R^3$ がHまたはOHであり； $R^4$ がHまたはOHであるか或いは $R^3$ と $R^4$ は一緒になって $O-C(=O)-O$ を形成している、式(1)を有する化合物を提供する。

40

【0019】

本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^1$ がビニル、ブチル、ベンジル、ブテ-3-エン-1-イル、フェニルまたは4-ヒドロキシフェニルであり； $R^2$ が、H、置換または非置換の $C_1 \sim C_5$ アルキル、置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルケニル、または置換または非置換の $C_2 \sim C_5$ アルキニルであり； $R^3$ がHまたはOHであり； $R^4$ がHまたはOHであるか或いは $R^3$ と $R^4$ は一緒になって $O-C(=O)-O$ を形成している、式(1)を有する化合物を提供する。

本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^1$ がビニル、ブチル、ベンジル、ブテ-3-エ

50

ン-1-イル、フェニルまたは4-ヒドロキシフェニルであり； $R^2$ が、H、エチル、プロピル、イソプロピルまたは2-ブチルであり； $R^3$ がHまたはOHであり； $R^4$ がHまたはOHであるか或いは $R^3$ と $R^4$ は一緒になってO-C(=O)-Oを形成している、式(1)を有する化合物を提供する。

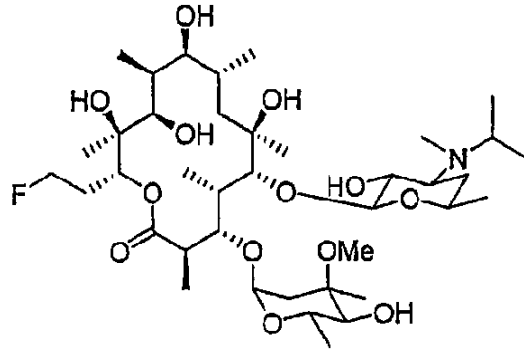
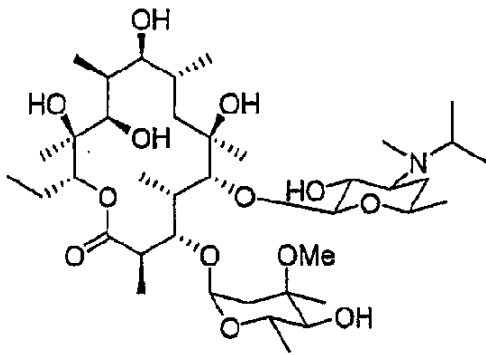
本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^3$ と $R^4$ が、個々に、HまたはOHであり； $R^1$ が、エチル、2-フルオロエチルおよび1-プロピルからなる群から選ばれ； $R^2$ が、メチル、エチル、イソプロピルおよび2-ブチルからなる群から選ばれるが； $R^1$ がエチルであり $R^3$ がOHであるときは、その場合、 $R^2$ はメチルでないことを条件とする、式(1)を有する化合物を提供する。

もう1つの実施態様においては、 $R^1$ は、置換または非置換の $C_1 \sim C_5$ アルキル(好ましくは、エチル)であり； $R^2$ は、H、メチル、エチル、プロピル、イソプロピルまたは2-ブチルであり； $R^3$ は、Hであり； $R^4$ は、HまたはOHである。

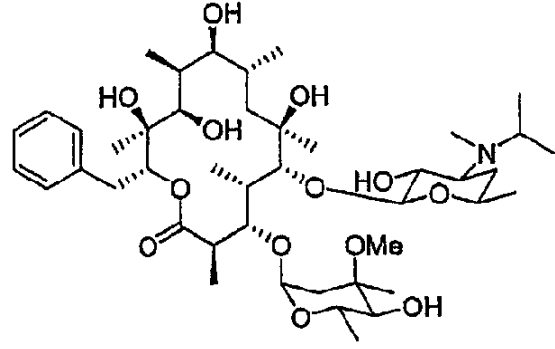
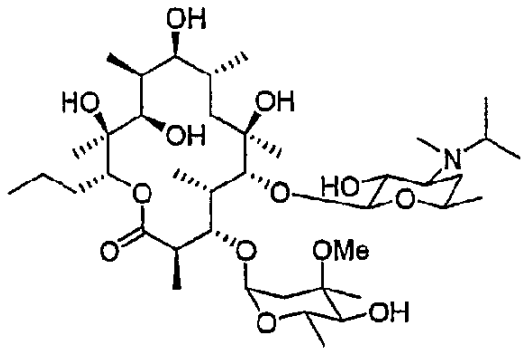
10

本発明のもう1つの実施態様においては、下記の構造を有する化合物を提供する：

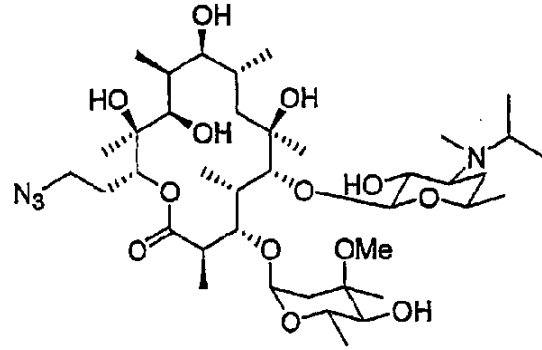
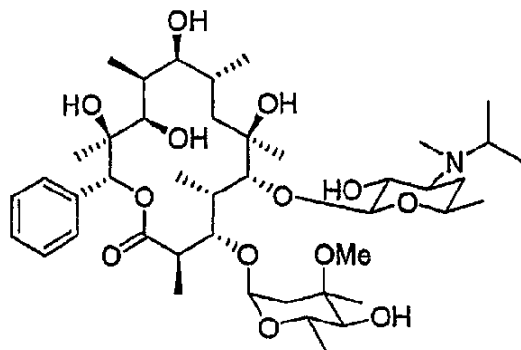
【化5】



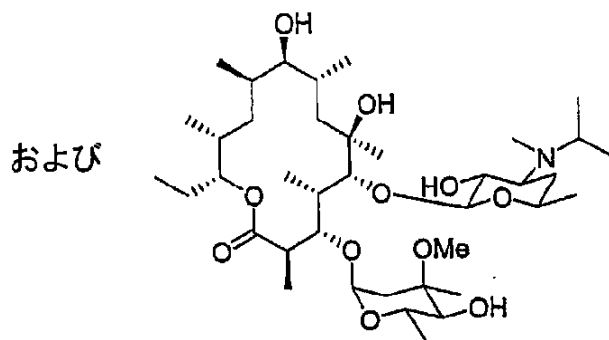
10



20



30



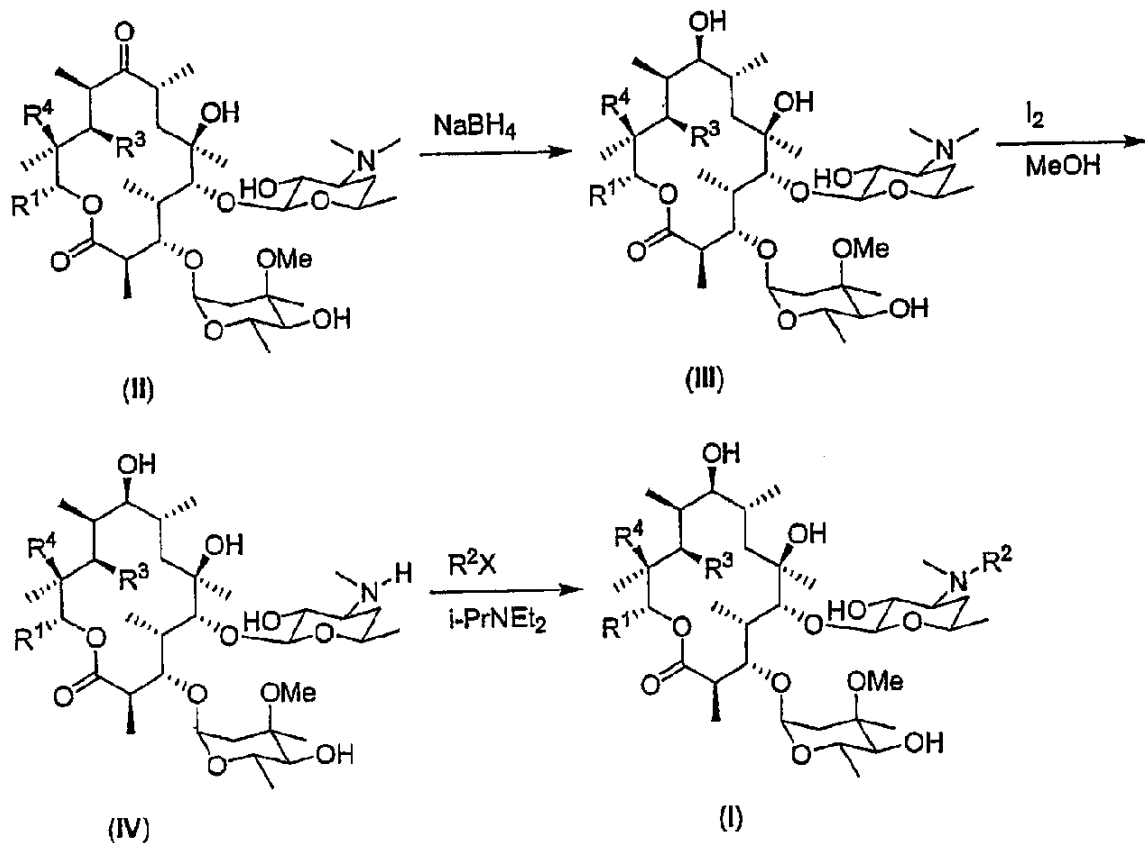
40

【0020】

本発明のもう1つの局面は、式(1)の化合物製造方法を提供する。1つの実施態様においては、式(1)の化合物は、下記の式1において例示するような対応するエリスロマイシン類(11)から調製する：

【化6】

式 1



10

20

【0021】

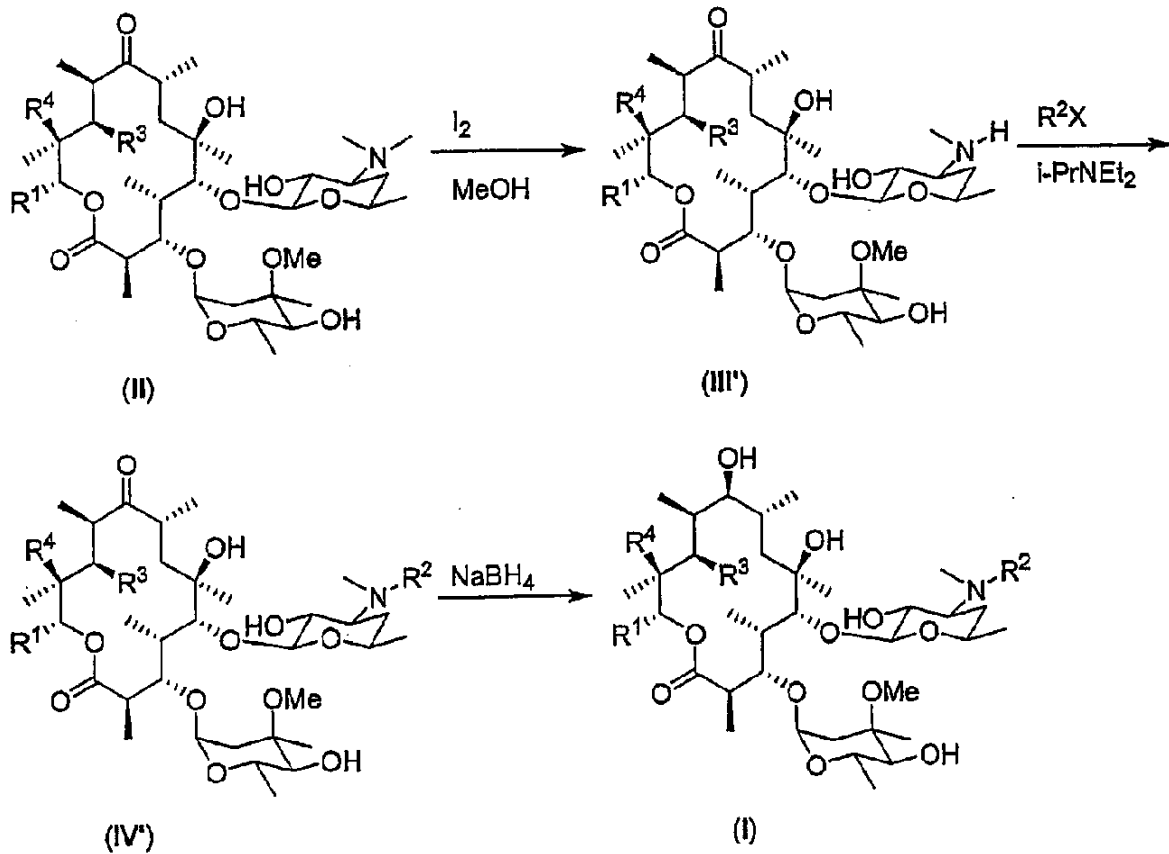
この実施態様においては、エリスロマイシン(II)をメタノール中の水素化ホウ素ナトリウムで処理して(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシン、(III)を調製する。化合物(III)を、例えば、緩衝化メタノール中のヨウ素および光を使用するかまたはアセトニトリル中のN-イオドスクシンイミドを使用して脱メチル化して化合物(IV)を調製する。 $\text{R}^2\text{X}$  (式中、 $\text{R}^2$ は上記で定義したとおりであり、Xは、ハライド(好ましくは、臭素またはヨウ素)またはスルホネート(好ましくは、トリフレートまたはトシレート)である)をN,N-ジイソプロピルエチルアミンのような塩基の存在下に使用する化合物(IV)のアルキル化により、式(I)の化合物を調製する。

30

また、脱メチル化/アルキル化工程とホウ化水素還元工程の順序は、下記の式1Aに示すように逆転し得る：

【化7】

式 1A



10

20

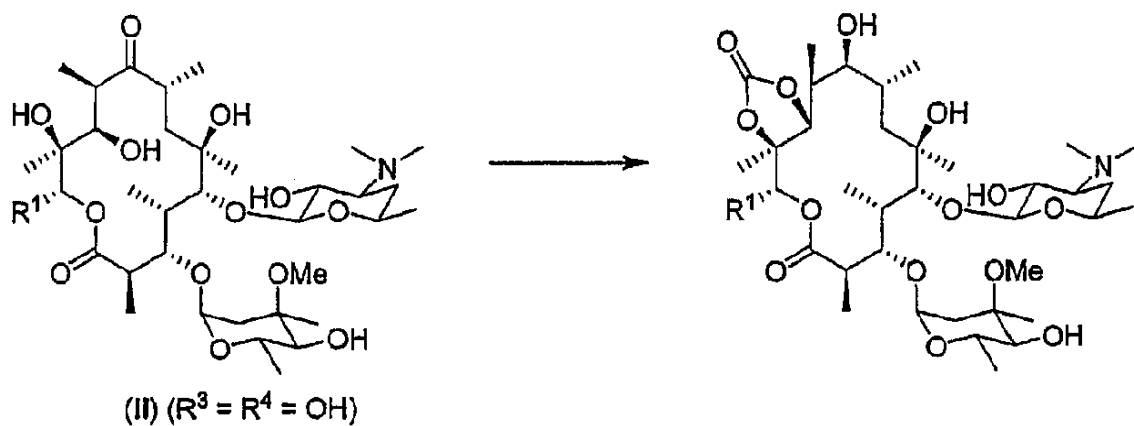
【0022】

本発明のもう1つの実施態様においては、 $R^3$ と $R^4$ は一緒になって $O-C(=O)-O$ を形成するエリスロマイシン類(II)は、下記の式2に例示するようにして調製する：

30

【化8】

式 2



40

$R^3$ と $R^4$ が共にOHであるエリスロマイシン(II)をカルボニル化剤、例えば、炭酸エチレンまたは1,1-カルボニルジイミダゾールを塩基、例えば、炭酸カリウムまたは4-(ジメチルアミノ)ピリジンの存在下に反応させて、11,12-環状カーボネートを調製する。そのあと、これらの環状カーボネートを、式1に例示した方法に従い最終生成物に転化する。

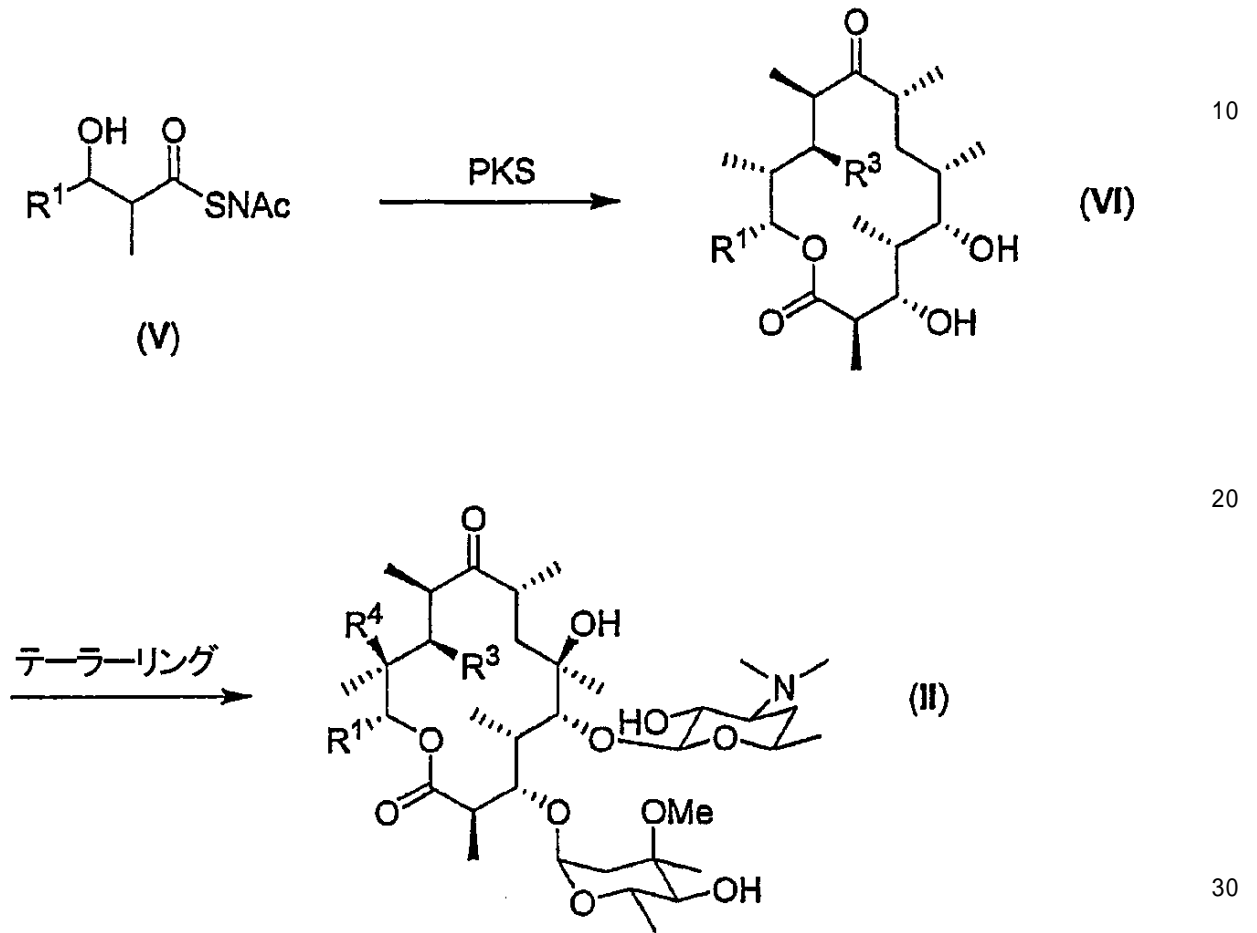
【0023】

50

式(II)のエリスロマイシン類は、下記の式3に例示したようにして、また米国特許第6,066,721号；第6,261,816号および第6,395,710号に記載されているようにして調製する。これら米国特許の各々は参考として本明細書に引用する。

【化9】

式 3



【0024】

要するに、式(V)のジケチドチオエーテルをポリケチドシンターゼに供給して構造(VI)のポリケチドを産生させる。ジケチドチオエーテル類の調製は、WO 00/44717号に記載されており、該公報は参考として本明細書に引用する。本発明においては、ポリケチドシンターゼは、6-デオキシエリスロノライドBシンターゼまたは8,8a-デオキシオレアンドライドシンターゼである。6-デオキシエリスロノライドBシンターゼの適切な例は、例えば、米国特許第5,824,518号に記載されているようなサッカロポリスポラ エリスラエア(Saccharopolyspora erythraea)において、さらにPCT公報WO 01/27284号に記載されているような

ミクロモノスポラ メガロミセア(Micromonospora megalomicea)において見出されており、これらの特許は、各々参考として本明細書に引用する。8,8a-デオキシオレアンドライドシンターゼの例は、米国特許第6,251,636号に記載されているようなストレプトマイセス アンチピオチカス(Streptomyces antibioticus)において見出されており、該米国特許は参考として本明細書に引用する。これらのポリケチドシンターゼは、その天然スターター単位の混入を防ぐように修飾されている。ポリケチドシンターゼを、例えば、モジュール1ケトシンターゼの不活化により変異させて天然スターター単位の混入を防ぐ方法は、米国特許第6,066,721号に記載されており、該米国特許は参考として本明細書に引用する。

【0025】

10

20

30

40

50

ジケチドチオエーテル(V)は、米国特許第6,080,555号(参考として本明細書に引用する)に記載されているようにして、無細胞形のポリケチドシンターゼに供給し得るけれども、変異ポリケチドシンターゼを発現する生物体の培養物に(V)を供給するのがより好都合である。生物体は、米国特許第6,066,721号またはWO 01/83803号に記載されているようなストレプトマイセスまたはサッカロポリスポラ、好ましくはストレプトマイセス コエリカラ(Streptomyces coelicolor)のような放線菌、またはWO 01/31035号に記載されているような大腸菌またはサッカロミセス セレヴィシエ(Saccharomyces cerevesiae)のような非放線菌であり得、これらの特許は参考として本明細書に引用する。得られたポリケチド(VI)を必要に応じて培養培地から分離する。この過程における方法は、以下の実施例1に詳述している。天然ポリケチドシンターゼを使用して、 $R^3 = OH$ であるポリケチド類を産生させる。

10

## 【0026】

本発明の1つの実施態様においては、天然ポリケチドシンターゼは、 $R^3 = H$ を有するポリケチドを産生するように変異させている。適切な変異ポリケチドシンターゼを産生させる方法は、例えば、米国特許第6,391,594号および第6,403,775号に記載されており、これらの米国特許は参考として本明細書に引用する。

ポリケチド(VI)は、C-6でのヒドロキシル化、3-OHへのミカローゼの付加、5-OHへのデソサミンの付加、C-12でのヒドロキシル化およびミカローゼ3"-OHでのメチル化を含む1連のテーラーリング(tailoring)工程により、エリスロマイシン(II)に転化させる。他の形のエリスロマイシンは、テーラーリング酵素の適切なサブセットを使用して調製し得る。例えば、エリスロマイシンB ( $R^4 = H$ )は、C-12でのヒドロキシル化を省略することによって調製する。

20

## 【0027】

このテーラーリングは、ポリケチド(VI)を上記形質転換において必要な酵素類の全てを発現する生物体、例えば、参考として本明細書に引用する米国特許第6,395,710号に記載されている不活性ポリケチドシンターゼを含むサッカロポリスポラ エリスラエアの変異体の培養物に供給することにより、最も好都合に実施し得る。この過程の方法は、以下の実施例2において詳述している。

式(I)の化合物は、モチリンレセプターの作用薬である。下記の表1は、Carreras et al., Anal. Biochem. 300, 146-151 (2002) (該文献内容は、参考として本明細書に引用する)に記載されているようなカルシウム負荷アッセイによって測定したときのモチリンレセプターの活性化における $EC_{50}$ 値を示す。

30

## 【0028】

表1：モチリンレセプター活性化

化合物参照	$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^4$	$EC_{50}$ ( $\mu M$ )
エリスロマ イシンA <sup>1</sup>	$CH_3CH_2$	$CH_3$	OH	OH	1.1
A <sup>1</sup>	$CH_3CH_2$	$CH_3$	OH	OH	2.5
B	$CH_3CH_2$	$CH(CH_3)_2$	OH	OH	0.49
C	$FCH_2CH_2$	$CH_3$	OH	OH	5
D	$FCH_2CH_2$	$CH_2CH_3$	OH	OH	2
E	$FCH_2CH_2$	$CH(CH_3)_2$	OH	OH	0.52
F	$CH_3CH_2CH_2$	$CH_3$	OH	OH	8.6
G	$CH_3CH_2CH_2$	$CH(CH_3)_2$	OH	OH	1.4
H	$CH_3CH_2CH_2$	$C(CH_3)CH_2CH_3$	OH	OH	3.3
J	$CH_3CH_2$	$CH(CH_3)_2$	H	H	0.16

40

<sup>1</sup> 本発明に従わない比較化合物

## 【0029】

50

抗細菌活性(表2)は、微生物技術において公知の方法を使用して、マクロライド感受性株である肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*) ATCC 6301に対する生体外感受性試験によって測定した。

表2：ATCC6301に対する生体外最小抑制濃度

化合物	MIC (μg/mL)
エリスロマイシンA	0.03
A	0.3
F	1
G	>100
J	>100

10

各化合物を、Carreras et al., US 2002/0192709 A1 (2002), “Methods for Evaluating Therapeutic Efficacy” (該文献は、参考として本明細書に引用する)に記載されている細胞系アッセイを使用して、モチリンレセプター脱感作性について試験した。下記の表3に示すように、各化合物は、1または10 μM量の試験化合物への暴露後に脱感作を殆どまたは全く示さなかった。

【0030】

表3：モチリンレセプター脱感作

化合物	化合物への暴露後の活性 (初期活性保持%)	
	1 μM化合物	10 μM化合物
F	100	100
G	100	100
J	88	88

20

【0031】

本発明のもう1つの局面は、胃運動性障害の治療における式(1)を有する化合物の使用方を提供する。一般に、本発明の化合物の使用方は、必要のある対象者に治療上有効量の本発明の化合物を投与することを含む。本発明の化合物によって治療し得る障害の具体的な例としては、限定するものではないが、胃不全麻痺、胃食道逆流疾患、食欲不振、鬱滞胆嚢、術後麻痺性イレウス、強皮症、腸仮性閉塞症、胃炎、嘔吐および慢性便秘(結腸無力症)がある。

30

治療上の有効量は、本発明の化合物(1種以上)の総投与日量として表し得、対象者に単回または分割投与量で投与し得る。総投与日量は、例えば、約0.01~約10 mg/kg体重、より通常は約0.1~約2 mg/kg体重の量であり得る。単回投与組成物は、投与日量を構成するような量またはその分割数量を含有し得る。一般に、本発明に従う治療処方は、そのような治療を必要とする対象者に、1日当たり約10 mg~約1000 mgの本発明の化合物(1種以上)を単回または複数回投与量で投与することを含む。

【0032】

典型的には、本発明の化合物は、固形、半固形または液体形のような任意の適切な剤形であり得る医薬組成物または調合物の1部であり得る。一般に、医薬調合物は、活性成分としての本発明の1種以上の化合物と医薬上許容し得る担体とを含有する。典型的には、活性成分は、外的、経腸または非経口投与に適する有機または無機担体または賦形剤との混合物中に存在する。活性成分は、例えば、錠剤、ペレット剤、カプセル剤、座薬、ペッサリー剤、溶液、乳化液、懸濁液および使用に適する任意の他の剤形用に通常は無毒性の医薬上許容し得る担体と配合し得る。経口投与量剤形は、参考として本明細書に引用する Hondo et al., 1987, Transplantation Proceedings XIX, Supp. 6: 17-22に本質的に記載されているようにして調製し得る。

40

使用し得る担体としては、水、グルコース、ラクトース、アカシアゴム、ゼラチン、マンニトール、澱粉ペースト、三ケイ酸マグネシウム、タルク、コーンスターチ、ケラチン

50

、コロイド状シリカ、ポテトスターチ、尿素、および固形、半固形または液体化形の製剤の製造において使用するのに適する他の担体がある。さらに、補助的な安定剤、増粘剤、着色剤および香料も使用し得る。例えば、本発明の化合物は、参考として本明細書に引用する米国特許第4,916,138号に本質的に記載されているようなヒドロキシプロピルメチルセルロース、または参考として本明細書に引用するEPO特許公報第428,169号に本質的に記載されているような界面活性剤と一緒に使用し得る。

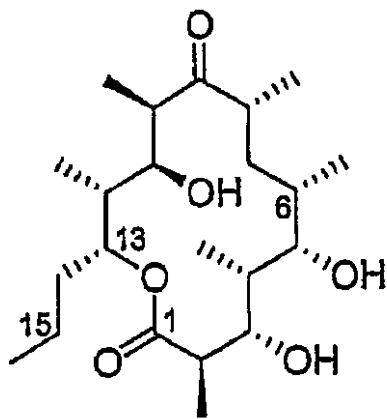
要するに、本発明は、モチライド化合物、その製造方法およびその使用方法を提供するものであり、以下、実施例によりさらに具体的説明するが、限定するものではない。

【実施例1】

【0033】

本実施例は、本発明のある種の化合物の合成において使用する中間体である15-メチル-6-デオキシエリスロノライドB (13-プロピル-6-dEBまたは15-メチル-6-dEBとも称する)の製造を説明する。(他のエリスロノライド類も同様に命名し得る；例えば、15-位置のメチル基の代わりにフルオロ基を有するエリスロノライドは、15-フルオロ-6-dEBと称する)。

【化10】



15-メチル-6-デオキシエリスロノライドB

CH999/pJRJ (モジュール1のケトシンターゼドメインが変異によって不活化されているPKSを含有するストレプトマイセス コエリカラー (*Streptomyces coelicolor*)) 研究用セルバンクの1 mLバイアルを解凍し、バイアル内容物を250 mLの邪魔板付きフラスコ内の50 mLの培地1に添加する。

【0034】

培地1は、45 g/Lのコーンスターチ、10 g/Lのコーンステイプリカー、10 g/Lの乾燥不活化醸造用酵母および1 g/LのCaCO<sub>3</sub>を含む。この溶液を121 °Cで90分間オートクレーブ処理することによって滅菌する。滅菌後、1 mL/Lの100%DMSO中滅菌濾過50 mg/mlチオストレプトンと1 mL/Lのオートクレーブ処理100%発泡防止剤Bシリコンエマルジョン(J.T. Baker社)を使用前に添加する。

解凍細胞と培地1を含む上記フラスコを、30 ± 1 °Cおよび175 ± 25RPMに維持したインキュベーター/シェーカー内に48 ± 10時間置く。その後、50 mLの培養物を、500 mLの培地1を含む2.8 Lの邪魔板付きフラスコに添加する。このフラスコをインキュベーター/シェーカー内で30 ± 1 °Cおよび175 ± 25RPMで48 ± 10時間インキュベートする。その後、500 mLの培養物を使用して5 Lの培地1を含む10 Lのファーメンターに接種する。このファーメンターを、2.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>および2.5 N NaOHの添加、600 RPMの攪拌速度および1 ~ 2 LPMの空気流量によって30 °C、pH 6.5に調整する。発泡は、発泡防止剤Bの50%溶液を必要に応じて添加することによって制御する。ファーメンター培養物をこれらの条件下に24 ± 5時間増殖させる。

【0035】

150 Lのファーメンターを、100 Lの培地1を121 °Cで45分間滅菌することによって準備する。増殖期間後、上記10 Lファーメンターからの内容物を150 Lファーメンターに無菌的に添加する。このファーメンターを、2.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>および2.5 N NaOHの添加、並びに攪

拌速度(500~700 RPM)、空気流量(10~50 LPM)および/または逆圧制御(0.1~0.4バール)による溶解酸素 80%の空気飽和によって30、pH 6.5に調整する。発泡は、発泡防止剤Bの50%溶液を必要に応じて添加することによって制御する。

35±5時間で、溶解酸素が最小値に達しファーマンター排ガス中のCO<sub>2</sub>含有量が最高値に達した後、(±)-(2R\*,3S\*)-2-メチル-3-ヒドロキシヘキサノイル-N-プロピオニルシステアミン(プロピルジケチド)を4 g/Lの最終濃度まで添加する。プロピルジケチドは、メチルスルホキシド中に2:3の比(ジケチド対DMSO)で溶解させることによって調製し、その後濾過滅菌する(0.2 μm、ナイロンフィルター)。15-メチル-6-デオキシエリスロノライドB(13-プロピル-6-dEB)の産生は8日目で止み、ファーマンターを収穫する。発酵培地をAlpha Laval AS-26遠心分離機内で20,500 gで遠心分離する。生成物は主として上清中に存在し、遠心分離した細胞塊は廃棄する。

#### 【0036】

遠心分離後、固相抽出をHP20樹脂(Mitsubishi社)を使用して実施する。カラムサイズは上清容量および力価に基づいて選定し、HP20樹脂1リットル当り15gの15-メチル-6-dEBの負荷容量を超えないようにする。遠心分離した培養液を樹脂床に300±20 cm/hの線流量で通す。カラム上の圧力は、15 psi (103.4 kPa)を越えないようにすべきである。その後、樹脂を、2カラム容量(CV)の水次いで2 CVの30%メタノールで各々300±20 cm/hの速度で洗浄する。13-プロピル-6-dEBを、7~10 CVの100%メタノールを300±20 cm/hの速度で使用して溶出させる。溶出中に、1 CVの各画分を集める。その後、これらの画分を分析し、生成物を含有する画分を混ぜ合せて、遠心分離培養液中の元の15-メチル-6-dEBの> 95%を含有する生成物プールを得る。生成物プールを回転蒸発を使用して減量し固形物とする。この段階での生成物純度は、5~35%である。メタノール不溶性物質を、生成物プールから、上記固形物を元の培養液容量100 L当り3 Lの100%メタノール中に懸濁させ、20分間混合し、濾過することによって除去する。

#### 【0037】

最終精製工程は、HP20SS樹脂(Mitsubishi社)を使用するクロマトグラフィーである。カラムサイズは生成物量に基づいて選定し、HP20SS樹脂1リットル当り15gの15-メチル-6-dEBの負荷容量を超えないようにする。上記濾過メタノール溶液を等容量の水を添加することによって希釈する。この50%メタノール溶液を樹脂床に300±20 cm/hの線流量で通す。その後、カラムを2 CVの50%メタノールで300±20 cm/hの速度で洗浄する。生成物を12 CVの70%メタノールを使用して300±20 cm/hの速度で溶出させる。溶出中に、1 CVの各画分を集める。その後、これらの画分を分析し、> 50 mg/Lの15-メチル-6-dEBを含有し> 20%のクロマトグラフィー純度を有する画分を混ぜ合わせる。生成物プールを回転蒸発を使用して減量し固形物とする。この段階での生成物純度は、> 65%であり、適切なエリスロマイシンへの生物転換に適している。

他の修飾6-dEBアナログ類は、上記プロピルジケチドの代りに適切なジケチドチオエステルを置換えて、同じ手順に従って調製する。即ち、15-フルオロ-6-dEBは、(±)-(2R\*,3S\*)-5-フルオロ-2-メチル-3-ヒドロキシペンタノイル-N-プロピオニルシステアミンを使用して調製する。また、15-メチル-6-dEBおよび15-フルオロ-6-dEBの合成は、Ashley等のWO 00/44717 A2 (2000年)に教示されており、該文献の開示は参考として本明細書に引用する。

#### 【実施例2】

#### 【0038】

本実施例は、15-メチル-6-デオキシエリスロノライドBの15-メチルエリスロマイシンA(式II、R<sup>1</sup> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = OH)への転化を説明する。また、転化方法は、Carerras et al., J. Biotechnology, 92, 217-228 (2002)にも教示されており、該文献の開示は参考として本明細書に引用する。

研究用セルバンクK39-14V(6-dEBを産生し得ないS. エリスラエアのeryA変異体)からの1 mLバイアルを解冻し、バイアル内容物を250 mLの邪魔板付きフラスコ内の50 mLの培地2に添加する。

10

20

30

40

50

培地 2 は、16 g/Lのコーンスターチ、10 g/Lのコーンデキストリン、15 g/Lの大豆ミール粉末、4 g/LのCaCO<sub>3</sub>、5 g/Lのコーンスティープリカー、6 g/Lの大豆油、2.5 g/LのNaClおよび1 g/Lの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を含む。この溶液を121 60分間オートクレーブ処理することによって滅菌し、1 mL/Lのオートクレーブ処理100%発泡防止シリコンエマルジョン(J.T. Baker社)を使用前に添加する。

#### 【 0 0 3 9 】

解凍細胞と培地 2 を含む上記フラスコを、34 ± 1 および175 ± 25RPMに維持したインキュベーター/シェーカー内に48 ± 10時間置く。その後、50 mLの培養物を、500 mLの培地 2 を含む2.8 Lの邪魔板付きフラスコに添加する。このフラスコをインキュベーター/シェーカー内で34 ± 1 および175 ± 25RPMで48 ± 10時間インキュベートする。その後、500 mLの培養物を使用して5 Lの培地 2 を含む10 Lのファーマンターに接種する。このファーマンターを、2.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>および2.5 N NaOHの添加、600 RPMの攪拌速度および1 ~ 2 LPMの空気流量によって34 、pH 7.0に調整する。発泡は、発泡防止剤Bの50%溶液を必要に応じて添加することによって制御する。ファーマンター培養物をこれらの条件下に24 ± 5時間増殖させる。

#### 【 0 0 4 0 】

150 Lのファーマンターを、100 Lの培地 3 を121 で45分間滅菌することによって準備する。培地 3 は、17.5 g/Lのコーンスターチ、16 g/Lのコーンデキストリン、16.5 g/Lの大豆ミール粉末、4 g/LのCaCO<sub>3</sub>、6 g/Lのコーンスティープリカー、3 g/Lの大豆油、3.5 g/LのNaClおよび1 g/Lの(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を含む。増殖期間後、上記10 Lファーマンターからの内容物を150 Lファーマンターに無菌的に移す。このファーマンターを、2.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>および2.5 N NaOHの添加、並びに攪拌速度(500 ~ 700 RPM)、空気流量(15 ~ 50 LPM)および/または逆圧制御(0.1 ~ 0.4バール)による溶解酸素 80%の空気飽和によって34 、pH 7.0に調整する。発泡は、発泡防止剤Bの50%溶液を添加することによって制御する。

24 ± 5時間で、58 ~ 60 mLの15%デキストリン(質量/容量)の供給を開始する。デキストリン溶液は、供給期間中連続混合する。24 ± 5時間で、25グラムの13-プロピル-6dEBをファーマンターに添加する。13-プロピル-6dEBは、25グラムの13-プロピル-6dEBを400 ~ 600 mLの100%エタノール中に溶解させ、濾過(0.2 μm、ナイロンフィルター)することによって調製する。13-プロピル-6dEBの13-プロピル-エリスロマイシンAへの転換は60 ± 10時間後に止み、ファーマンターを収穫する。発酵培地をAlpha Laval AS-26遠心分離機内で20,500 gで遠心分離する。生成物は主として上清中に存在し、遠心分離した細胞塊は廃棄する。

#### 【 0 0 4 1 】

遠心分離後、固相抽出をHP20樹脂(Mitsubishi社)を使用して実施する。カラムサイズは上清容量および力価に基づいて選定し、HP20樹脂 1 リットル当り15gの15-メチルエリスロマイシンAの負荷容量を超えないようにする。遠心分離した培養液をpH 9に調整し、その後、樹脂床に275 ± 25 cm/hの線流量で通す。カラム上の圧力は、15 psi (103.4 kPa)を越えないようにすべきである。その後、樹脂を、1カラム容量(CV)の水で275 ± 25 cm/hの速度で洗浄する。15-メチルエリスロマイシンを5 CVの100%メタノールを使用して275 ± 25 cm/hの速度で溶出させる。溶出中に、1 CVの各画分を集める。その後、これらの画分を分析し、生成物を含有する画分を混ぜ合せて生成物プールを得る。生成物プールを回転蒸発を使用して減量し固形物とする。

メタノール不溶性物質を、生成物プールから、上記固形物を元の培養液容量100 L当り1 Lの100%メタノール中に懸濁させ、pH 9に調整し、濾過することによって除去する。生成物プール(濾液)を回転蒸発を使用して減量し固形物とする。

#### 【 0 0 4 2 】

15-メチルエリスロマイシンAを、上記生成物プール(固形物)から、元の培養液容量の100 L当り2 Lの4 : 1ヘキサン対アセトンを添加し、20分間混合し、濾過することによって抽出する。残余の固形分を同じ方法により2回以上抽出し、濾液を混ぜ合わせる。生成物プールを回転蒸発を使用して減量し固形物とする。

最終精製工程は、HP20SS樹脂(Mitsubishi社)を使用するクロマトグラフィーである。カラムサイズは生成物量に基づいて選定し、HP20SS樹脂 1 リットル当り15gの15-メチルエリスロマイシンAの負荷容量を超えないようにする。上記の工程からの固形物を元の培養液容量の100 L当り1 Lのメタノール中に溶解させ、等容量の水を添加する。この50%メタノール溶液を樹脂床に275 ± 25 cm/hの線流量で通す。その後、カラムを、1 CVの50%メタノール、次いで3 CVの60%メタノールで各々275 ± 25 cm/hの速度で洗浄する。生成物を、3 CVの70%メタノール、次いで10 CVの75%メタノールを使用して各々275 ± 25 cm/hの速度で溶出させる。溶出中に、1 CVの各画分を集める。その後、各画分を分析し、15-メチルエリスロマイシンAを含有する画分を混ぜ合わせる。生成物プールを回転蒸発を使用して減量し固形物とする。

10

他の修飾エリスロマイシンは、同じ方法を使用し、適切な6-dEBアナログを15-メチル-6-dEBの代りに置換えて調製する。即ち、15-フルオロエリスロマイシンAは、15-フルオロ-6-dEBを使用して調製する。

#### 【実施例 3】

##### 【0043】

本実施例は、式1に関連しての(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシン類(式II)の一般的製造方法を説明する。

1 : 3エタノール/エーテル(20 mL)中の上記エリスロマイシン(0.36ミリモル)溶液を - 15 に冷却し、水素化ホウ素ナトリウム(0.9ミリモル)で処理する。反応を4時間に亘って周囲温度にゆっくり温める。過剰の水素化ホウ素をリン酸塩緩衝液、pH 6の添加により破壊し、10 mLのトリエタノールアミンを添加する。1時間後、混合物を酢酸エチルで抽出し、MgSO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、減圧下に濃縮乾固させる。生成物を、シリカゲルクロマトグラフィーにより、1%トリエチルアミンを含む1 : 1アセトン-ヘキサンを使用して精製する。この方法を使用して、以下の化合物を調製する：

20

(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシンA；

(9S)-9-ジヒドロ-15-メチルエリスロマイシンA；および、

(9S)-9-ジヒドロ-15-フルオロエリスロマイシンA。

#### 【実施例 4】

##### 【0044】

本実施例は、式1に関連してのN-デスメチル-(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシン類(式II)の製造における一般的手順を説明する。

30

酢酸ナトリウム三水和物(139 mg)とヨウ素(52 mg)を、10 mLの8 : 2メタノール/水中の上記(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシン(150 mg)溶液に順次添加する。LiOHの0.2 M溶液(1 mL)を1時間に亘って4分割して添加する。反応終了は、薄層クロマトグラフィー分析により測定する。過剰の試薬を飽和チオ硫酸ナトリウム溶液を添加して失活させ、揮発物を減圧下に除去し、混合物を酢酸エチルで抽出する。有機相を飽和NaHCO<sub>3</sub>で洗浄し、MgSO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、濃縮して粗生成物を得る。シリカゲルクロマトグラフィー(アセトン/ヘキサン + 2% Et<sub>3</sub>N)により、純生成物を得る。この方法を使用して、以下の化合物を調製する：

N-デスメチル-(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシンA；

40

N-デスメチル-(9S)-9-ジヒドロ-15-メチルエリスロマイシンA；および、

N-デスメチル-(9S)-9-ジヒドロ-15-フルオロエリスロマイシンA。

#### 【実施例 5】

##### 【0045】

本実施例は、とりわけ式1に関連するN-デスメチル-N-R<sup>2</sup>-(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシン類、即ち、式II (R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = OH)を有する化合物の製造を説明する。

上記N-デスメチル-(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシンAアナログ(0.035ミリモル)、ジイソプロピルエチルアミン(62.5 μL)、R<sup>2</sup>I (1.3ミリモル)およびアセトニトリル(1 mL)の混合物を密閉し、70 °Cで1夜攪拌する。混合物を冷却し、NaHCO<sub>3</sub>水溶液で希釈し、酢酸エチルで抽出する。抽出物をMgSO<sub>4</sub>上で乾燥させ、濾過し、蒸発乾固させる。生成物を、シリ

50

カゲルクロマトグラフィーにより、2:1ヘキサン/アセトン + 1% Et<sub>3</sub>Nを使用して精製する。以下の化合物をこの手順に従い調製した：

(a) N-デスメチル-(9S)-9-ジヒドロ-15-フルオロエリスロマイシンAとヨウ化エチルを使用しての、N-デスメチル-N-エチル-(9S)-9-ジヒドロ-15-フルオロエリスロマイシンA；

(b) N-デスメチル-(9S)-9-ジヒドロ-15-フルオロエリスロマイシンAとヨウ化イソプロピルを使用しての、N-デスメチル-N-イソプロピル-(9S)-9-ジヒドロ-15-フルオロエリスロマイシンA；

(c) N-デスメチル-(9S)-9-ジヒドロ-15-メチルエリスロマイシンAとヨウ化イソプロピルを使用しての、N-デスメチル-N-イソプロピル-(9S)-9-ジヒドロ-15-メチルエリスロマイシンA；および、

(d) N-デスメチル-(9S)-9-ジヒドロ-15-メチルエリスロマイシンAと2-イオドブタンを使用しての、N-デスメチル-N-(2-ブチル)-(9S)-9-ジヒドロ-15-メチルエリスロマイシンA。

#### 【実施例6】

##### 【0046】

本実施例は、N-デスメチル-15-メチルエリスロマイシンA (化合物III', R<sup>1</sup> = 1-プロピル；R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = OH)に特定的に関連する式1Aの脱メチル化工程を例示するが、その手順は他のアナログ化合物にも一般的に応用可能であることを理解すべきである。

メタノール-水(8:2(容量/容量)、100 mL)中の15-メチルエリスロマイシンA (化合物II I, R<sup>1</sup> = 1-プロピル；R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = OH；5.00 g、6.15ミリモル)と酢酸ナトリウム三水和物(4.18 g、30.75ミリモル)の混合物を50 で攪拌した。その後、ヨウ素(1.56 g、6.15ミリモル)を添加した。反応中、1 N水酸化ナトリウム(6.15 mL)を小分割で添加した。反応終了を薄層クロマトグラフィー分析により測定した。溶媒を除去した後、混合物を酢酸エチルで3回抽出し、硫酸ナトリウム上で乾燥させた。粗生成物(4.97 g)を黄色固形物として得、これをさらに精製することなく次の工程において使用した。

#### 【実施例7】

##### 【0047】

本実施例は、N-デスメチル-N-イソプロピル-15-メチルエリスロマイシンA (化合物IV', R<sup>1</sup> = 1-プロピル；R<sup>2</sup> = イソプロピル；R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = OH)に特定的に関連する式1Aのアルキル化工程を例示するが、その手順は他のアナログ化合物にも一般に応用可能であることを理解すべきである。

実施例6からの粗N-デスメチル-15-メチルエリスロマイシンA (2.50 g、3.41ミリモル)、ジイソプロピルエチルアミン(6.1 mL、10当量)、2-イオドプロパン(10.2 mL、30当量)のアセトニトリル(50 mL)中混合物を70 の浴中で24時間加熱した。水と飽和重炭酸ナトリウムを添加した。溶液を酢酸エチルで3回抽出し、硫酸マグネシウム上で乾燥させた。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(3:1ヘキサン-アセトン、1%トリエチルアミン)により精製して純粋N-デスメチル-N-イソプロピル-15-メチルエリスロマイシンA (1.80 g、2工程において75%の収率)を得た。m/z: 777.0 (MH)；<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>)：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。

#### 【実施例8】

##### 【0048】

本実施例は、N-デスメチル-N-イソプロピル-15-メチル-(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシンA (化合物I, R<sup>1</sup> = 1-プロピル；R<sup>2</sup> = イソプロピル；R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = OH)に特定的に関連する式1Aのカルボニル還元工程を例示するが、その手順は他のアナログ化合物にも一般に応用可能であることを理解すべきである。

N-デスメチル-N-イソプロピル-15-メチルエリスロマイシンA (1.74 g、2,24ミリモル)

をメタノール-エーテル(1:3(容量/容量)、50 mL)中に溶解し、次いで -20 に冷却した。水素化ホウ素ナトリウム(189 g、5.0ミリモル)を添加した。その後、混合物を3時間に渡ってゆっくり室温まで温めた。過剰の水素化ホウ素ナトリウムをpH 6.0のリン酸塩緩衝液およびその後のトリエタノールアミン(10 mL)の添加により破壊させた。30分後、混合物を酢酸エチルで抽出し、硫酸マグネシウム上で乾燥させた。粗生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(1%トリエチルアミンを含む3:1ヘキサン-アセトン)により精製した。純粋N-デスメチル-N-イソプロピル-15-メチル-(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシンA (1.63 g、93%収率)が得られた。m/z : 779.0 (MH) ; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 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。

#### 【実施例9】

#### 【0049】

本実施例は、本発明のある種の化合物の合成における中間体として有用である、とりわけ11-デオキシエリスロマイシンBに関連しての11-デオキシエリスロマイシン類の生合成を可能とするサッカロポリスボラ エリスラエア株(K24-1/159-44)の構築を説明する。

11-デオキシエリスロマイシンBは、DEBS群の遺伝子(eryAI、eryAIIおよびeryAIII)の修飾バージョンを発現する遺伝子操作宿主細胞における1回の発酵で調整し得る。上記eryAI遺伝子は、モジュール2中のケトレダクターゼドメインを、例えば、ラパマイシンPKSのモジュール1から採ったデヒドラターゼドメイン、エノイルレダクターゼドメインおよびケトレダクターゼドメインを含有するカセットで置換することによって操作する。ドメイン置換方法は、例えば、McDanielの米国特許第6,403,775号(2002年)に提示されており、該米国特許は参考として本明細書に引用する。この操作されたeryAI遺伝子を、eryAIIおよびeryAIII遺伝子と一緒に、上記操作されたPKS遺伝子を一旦添加するとエリスロマイシン類の産生に有能である宿主細胞中に組み込む。好ましい実施態様においては、これらの宿主細胞は、その天然PKS遺伝子が除去されている“クリーン宿主”である。適切な宿主の例としては、限定するものではないが、クリーン宿主サッカロポリスボラ エリスラエアK24-1、およびSanti等の米国特許出願第2002/0004229 A1号(2002年)に記載されている宿主のような変異PKS遺伝子を有するサッカロポリスボラ エリスラエア株があり、該米国特許出願は参考として本明細書に引用する。株K24-1は、天然eryAI、eryAIIおよびeryAIII遺伝子が米国特許第5,190,871号(参考として本明細書に引用する)に記載されているアクチノファージ C31のattBファージ結合部位およびその後のermE\*プロモーターによって置換されている。このことは、相補性のattPファージ結合部位を含むプラスミドベクターが伝達されるべき遺伝子と一緒にファージインテグラーゼの存在下に染色体中にattB部位で統合するのを可能にする。適切な組込み用ファージベクターの例としては、限定するものではないが、pSET152およびその誘導体がある。

出発宿主株サッカロポリスボラ エリスラエアK24-1の製造は、Santi等の米国特許出願第2002/0004229 A1号(2002年)に記載されており、この株は、2003年3月12日のブタペスト条約の条項に従い、受託番号PTA-5061として、米国バージニア州20108、マナッサス、P.O. Box1549のAmerican Type Culture Collectionに寄託されている。

#### 【0050】

pKOS159-8およびpKOS159-10は、それぞれ、ermEp\*プロモーターおよびactIp/actII-ORF4プロモーター-アクチベーター対の制御下にeryA遺伝子類を含有するpSET152の誘導体である。eryA遺伝子類およびactIp/actII-ORF4領域を担持するpKA0127からの35 kbのNsiIフラグメントを、pKOS97-64c (ermEp\*プロモーターおよび cos部位を含有するpSET152誘導体)中にクローニングして、pKOS159-10を構築した。pKA0127フラグメントからのfd転写ターミネーターは、このプラスミド中のermEp\*プロモーターからのあらゆる遺伝子の発現を阻止する。pKOS159-10中のfdターミネーターおよびactIp/actII-ORF4セグメントを含有するフラグメントをPacIによる消化および自己ライゲーションによって除去し、pKOS159-8

10

20

30

40

50

を生成させた。eryA遺伝子類のその天然プロモーター下での発現においては、pKOS159-31を、pKOS159-10からのeryA遺伝子類(および cos部位)を担持するNdeI-XbaIフラグメントおよび上記からのXbaI-NdeI消化PCR増幅eryAI左歯面フラグメントをXbaIにより消化したpSET152中にクローニングすることによって構築した。S.エリスラエアK41-135からのeryA遺伝子類を含有するpKOS159-33を、pKOS108-04からのeryAフラグメントを使用して同様な方法で構築した。同様に、操作DEBS発現プラスミドは、全て骨格としてのpKOS159-31および適切な制限酵素を使用して構築し、現存するプラスミドから遺伝子的に修飾されたeryAフラグメントを除去した。

【 0 0 5 1 】

pKOS159-44は、eryAIプロモーターの制御下に遺伝的に修飾されたeryA遺伝子類(KR2 rapDH/ER/KR1)を有するpSET152(Bierman et al., Gene 116, 43-49 (1992), "Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from Escherichia coli to Streptomyces spp")誘導プラスミドである[ドキュメント番号10.1007/s10295-003-0045-1 (<http://link.springer-ny.com>) (2003年4月16日)としてウェブ公表されたRodriguez et al., J. Ind. Microbio. Biotechnol., "Rapid Engineering of Polyketide Overproduction by Gene Transfer to Industrially Optimized Strains"]。pKOS11-66 (Xue et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 11740-11745 (1999), "A multiplasmid approach to preparing large libraries of polyketides")からの30 kbのNdeI-NsiIフラグメント(遺伝的に修飾されたeryA遺伝子類を担持する)を分離し、ベクターpSET152、eryApプロモーターおよびcos 部位を含有するpKOS159-33 (Rodriguez等、前出)からの8 kbのNdeI-NsiIフラグメントに結合させた。このライゲーション混合物を、Gigapack III Goldパッケージング抽出物(Stratagene社)を使用してパッケージングし、大腸菌XL-1 Blueを感染させるのに使用した。組換え体を、60 µg/mlのアプラマイシンを含有するLB寒天プレート上で選択した。pKOS159-44プラスミドDNAを分離し、制限消化によってチェックした。

【 0 0 5 2 】

3つのeryA遺伝子の染色体欠落並びにストレプトマイセス リビダンス(*Streptomyces lividans*)からのストレプトマイセスファージ C31のためのattB座およびその後のその場のermE\*プロモーターとの挿入を含むS. エリスラエア株K24-1を、1-2 M1プレート(リットル当り、5 gのグルコース、5 gのトリプトン、0.5 gのベタインヒドロクロライド、5 gのコンスターチ、1 gのコンスターチプリカー(50%)、200 mgのMgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O、2 mgのZnSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O、0.8 mgのCuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O、0.2 mgのCoCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O、4 mgのFeSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O、80 mgのCaCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O、150 mgのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 gのNaCl、20 gの寒天)上で増殖させた株からの胞子を収穫し、これらの胞子を滅菌綿により濾過し、1 mlの20%グリセリン中に再懸濁させることによって調製した。胞子懸濁液を-20 で保存した。胞子懸濁液の20 µLのアリコートに5 mLの2xYTに添加し、30 で振盪させながらインキュベートした。1時間後、胞子を遠心分離により集めた(レシピエント細胞)。ドナー細胞は、大腸菌ET12567/pUZ8002をpKOS159-44により形質転換させアプラマイシン耐性のみについて選択することによって調製した。数個のコロニーを上記1次形質転換プレートから採取し、クロランフェニコール(10 µg/mL)、カナマイシン(100 µg/mL)およびアプラマイシン(60 µg/mL)を含む5 mLのLBに接種するのに使用した。細胞を37 で3~4時間増殖させ(0.4~0.6のOD<sub>600</sub>)、遠心分離により集め、5 mLのLB中で洗浄し、遠心分離し、100 µLのLB中に再懸濁させた。ドナー細胞とレシピエント細胞間の接合伝達を、レシピエント細胞を100 µLのドナー懸濁液中に再懸濁させることによって実施し、細胞を、50 µg/mLのナリジクス酸を含有するR5プレート(Hopwood et al., Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985)上に拡散させ、34 で16時間インキュベートした。その後、プレートを、1 mgのナリジクス酸と2 mgのアプラマイシンを含有する3 mLの軟質栄養寒天で被覆した。接合完了体K24-1/159-44を48時間の更なるインキュベーション後に観察した。

株K24-1/159-44は、2003年3月12日のブタベスト条約の条項に従い、受託番号PTA-5054として、米国バージニア州20108、マナッサス、P.O. Box1549のAmerican Type Culture C

10

20

30

40

50

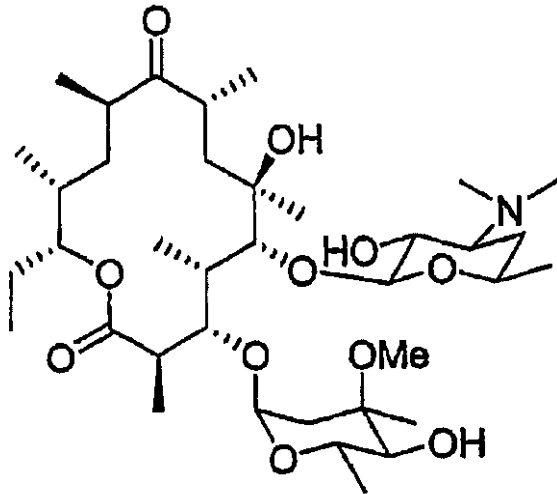
ollectionに寄託した。

【実施例 10】

【0053】

本実施例は、実施例 9 において説明した株を使用しての、本発明のある種の化合物合成用の中間体である11-デオキシエリスロマイシンBの生合成を説明する。

【化 11】



11-デオキシエリスロマイシンB

10

20

Frykman et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 76, 303-310 (2001) "Precursor-Directed Production of Erythromycin Analogs by *Saccharopolyspora erythraea*", およびRodriguez等、前出に開示されている発酵方法を追試した；これら文献の開示は、参考として本明細書に引用する。

【0054】

以下の培地を使用した：(a) シード培地V1は、16 g/Lのコーンスターチ、10 g/Lのデキストリン(D-2256、Sigma-Aldrich社)、15 g/Lの大豆粉末(S-9633、Sigma-Aldrich社)、2.5 g/Lの塩化ナトリウム、5 g/Lのコーンステープリカー、1 g/Lの硫酸アンモニウム(A-2939、Sigma-Aldrich社)、6 g/Lの大豆油(S-7381、Sigma-Aldrich社)および4 g/Lの炭酸カルシウム(C-4830、Sigma-Aldrich社)を含有していた。(b) 発酵培地F2は、28 g/Lのコーンスターチ、24 g/Lの大豆ミール、5.5 g/Lの塩化ナトリウム、8 g/Lのコーンステープリカー、1.5 g/Lの硫酸アンモニウム、4.5 g/Lの大豆油および6 g/Lの炭酸カルシウムを含有していた。全ての培地を121 °Cで90分間オートクレーブ処理することによって滅菌した。

30

2個のシードフラスコは、*サッカロポリスポラ エリスラエア* K24-1/pKOS159-44の1 mLバイアルを凍結セルバンクから取出し、解凍し、バイアル内容物を50 mLの培地V1に添加し、34 °Cで40~48時間インキュベートすることによって出発した。その後、2つの2次シードを、上記シードフラスコからの50 mLアリコートをもとに500 mLの培地V1に移し、34 °Cで40~48時間インキュベートすることによって作成した。

両500 mL 2次シード培養物を9 Lの培地V1を含有するB.Braun B10ファーマンターに移した。ファーマンターを34 °Cで操作し、2.5 N 硫酸と2.5 N 水酸化ナトリウムを添加することによってpH 7.0に維持した。3 LPMでの通気および600~800 rpmでの攪拌を行って、40%よりも高い溶解酸素緊張度を維持した。収穫は、約24時間後であった。

40

【0055】

その後、10 Lの上記ファーマンターシード培養物を300 Lの培地F2を含有するB.Braun Biostat UD500ファーマンターに移した。このBiostat UD500ファーマンターを34 °Cで操作し、2.5 N 硫酸と2.5 N 水酸化ナトリウムを添加することによってpH 7.0に維持した。200~300 rpmでの攪拌および40~250 LPMでの通気を行って、40%よりも高い溶解酸素緊張度を維持した。デキストリン(150 g/L)を675 mL/hの流量で24~98時間供給した。大豆油を64 mL/hの流量で24~140時間供給した。n-プロパノールを26 mL/hの流量で24~140時間

50

供給した。収穫は、約180時間後であった。

発泡は、必要に応じて発泡防止剤B(JT Baker社)の50%溶液を添加することによって制御した。

発酵培養液を遠心分離により浄化し、HP20樹脂(Mitsubishi社)を使用する固相抽出に供した。吸着生成物をメタノールで溶出させ、乾燥させた。その後、粗生成物を酢酸エチル：水の液：液抽出に供した。混ぜ合せた酢酸エチル抽出物を乾燥させた。生成物を、HP20 SS樹脂を使用し、50%から80%の段階勾配メタノールによって溶出させるクロマトグラフィーにより精製した。生成物含有画分をプールし乾燥させて、11-デオキシエリスロマイシンBを得た。m/z : 702.64 (MH) ; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 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。

10

#### 【実施例 11】

##### 【0056】

本実施例は、式1の方法を使用しての、11-デオキシエリスロマイシンBのN-デスメチル-N-イソプロピル-11-デオキシ-(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシンB (化合物I、R<sup>1</sup> = エチル ; R<sup>2</sup> = イソプロピル ; R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = H ; 化合物J、表1)への転換を説明する。

11-デオキシエリスロマイシンB (200 mg、0.285ミリモル)を概して実施例8の手順に従い還元し、(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシンBを得た(94 mg、47%収率)。m/z : 705.0 (MH) ; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 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。

20

概して実施例6および7の手順に従い、11-デオキシ-(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシンB (94 mg、0.134ミリモル)をN-デスメチル-N-イソプロピル-11-デオキシ-(9S)-9-ジヒドロエリスロマイシンBに転化させた(57 mg、58%収率)。m/z : 733.0 (MH) ; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) : 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。

30

##### 【0057】

今回、本発明を書面説明および実施例により説明してきたが、当業者であれば、本発明は種々の実施態様で実施し得ること並びに上述の説明および実施例は例示目的であり特許請求の範囲の限定ではないことを認識されたい。多くの修正が上述の方式にその基本的教示からはなれることなく可能である。本発明を1つ以上の特定の実施態様に関連して実質的に詳細に説明してきたが、当業者であれば、本出願で詳細に開示した実施態様に変更を加え得、さらにこれらの修正および改良は、特許請求の範囲に記載したような本発明の範囲および精神に属することを認識されたい。本明細書において引用した全ての刊行物または特許文献は、各々のそのような刊行物または文献を特定の且つ個々に参考として本明細書に合体させるように記載しているように、参考として本明細書に合体させる。

40

上記の刊行物または文献の引用は、引用した刊行物または文献のいずれかが関連従来技術であることを認めることを意図するものではなく、これら刊行物または文献の内容または日付に関して何ら認めるものではない。

## フロントページの続き

- (72)発明者 サンティ ダニエル  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 7 サン フランシスコ ベルグレイヴ アベニュー  
ー 2 1 1
- (72)発明者 メトカルフ ブライアン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 5 6 モラガ レイクフィールド プレイス 2 9 7
- (72)発明者 カレラス クリストファー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 0 2 ベルモント チェヴィー ストリート 9 1 0
- (72)発明者 リウ ヤオクアン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 4 5 カストロ ヴァリー ジェイムス アベニュー  
4 4 1 5
- (72)発明者 マクダニエル ロバート  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 6 パロ アルト マタデロ アベニュー 6 9 8
- (72)発明者 ロドリゲス エデュアード ジェイ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 4 0 マウンテン ビュー ファイエット ドライブ  
2 6 8 0 # 6 1 1

審査官 三上 晶子

- (56)参考文献 国際公開第02/051855(WO, A1)  
国際公開第01/060833(WO, A1)  
国際公開第00/063224(WO, A1)  
国際公開第03/004509(WO, A1)  
特開昭62-292795(JP, A)  
国際公開第97/035590(WO, A1)  
国際公開第98/040392(WO, A1)  
特表2005-538998(JP, A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07H 1/00- 99/00  
A61K 31/33- 33/44  
A61P 1/00- 43/00  
CAPlus/REGISTRY(STN)