

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-535324

(P2005-535324A)

(43) 公表日 平成17年11月24日(2005.11.24)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 P 15/00
 A 6 1 K 31/439
 A 6 1 K 31/44
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 33/02

F I

C 1 2 P 15/00
 A 6 1 K 31/439
 A 6 1 K 31/44
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 33/02

テーマコード (参考)

4 B O 6 4
 4 C O 8 6
 4 H O O 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-527034 (P2004-527034)
 (86) (22) 出願日 平成15年8月7日 (2003.8.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年3月28日 (2005.3.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2003/003452
 (87) 国際公開番号 W02004/015122
 (87) 国際公開日 平成16年2月19日 (2004.2.19)
 (31) 優先権主張番号 0218578.3
 (32) 優先日 平成14年8月9日 (2002.8.9)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 397009934
 グラクソ グループ リミテッド
 GLAXO GROUP LIMITED
 イギリス ミドルセックス ユービー6
 Oエヌエヌ グリーンフォード パークレ
 ー アベニュー グラクソ ウェルカム
 ハウス (番地なし)
 Glaxo Wellcome Hous
 e, Berkeley Avenue G
 reenford, Middlesex
 UB6 ONN, Great Brita
 in
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロイロムチリン類の製造方法

(57) 【要約】

本発明は、a)液体培地中でプロイロムチリン類産生微生物を培養するステップ；と、b)水非混和性有機溶媒により未濾過の培地からプロイロムチリン類を抽出するステップ；とを含む、1種以上のプロイロムチリン化合物の製造方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1種以上のプロイロムチリン化合物の製造方法であって、

a)液体培地中でプロイロムチリン類産生微生物を培養するステップ；及び、

b)水非混和性有機溶媒により未濾過の培地からプロイロムチリン類を抽出するステップ

；
を含む上記方法。

【請求項 2】

1種以上のプロイロムチリン化合物の製造方法であって、

a)液体培地中でプロイロムチリン類産生微生物を培養するステップ；

b)水非混和性有機溶媒により未濾過の培地からプロイロムチリン類を抽出するステップ

；
c)抽出されたプロイロムチリン類を濃縮するステップ；
d)プロイロムチリン類を結晶化させるステップ；

を含む上記方法。

【請求項 3】

抽出されたプロイロムチリン類(ステップb)または濃縮されたプロイロムチリン類(ステップc)が、活性炭を用いて脱色処理される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

プロイロムチリンを製造するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記プロイロムチリン類産生微生物が、*Clitopilus*種、*Octojuga*種、*Gerronema*種、*Psathyrella*種、またはそれらの突然変異体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記プロイロムチリン類産生微生物が、*Clitopilus passeckerianus* NRRL 3100/DSM 16 02、*Clitopilus passeckerianus* CBS 299.35、*Clitopilus passeckerianus* CBS 330.85、*Clitopilus pinsitus* CBS 623.70、*Clitopilus hobsonii* CBS 270.36、*Octojuga pseudopinsitus* NRRL11179、*Gerronema josserandii* CBS 309.36、*Psathyrella subatrata* CBS 3 25.39、またはそれらの突然変異体である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記プロイロムチリン類産生微生物が、*Clitopilus passeckerianus* NRRL 3100またはその突然変異体である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記水非混和性有機溶媒が芳香族炭化水素または水非混和性脂肪族ケトンである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記芳香族炭化水素はトルエンである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記水非混和性脂肪族ケトンはMIBKである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

前記抽出が約 10 ~ 約 50 で行われる、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記抽出前の水溶液のpHがpH6 ~ 8の範囲内にある、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

4:1 ~ 1:4の有機溶媒と未濾過の培地との体積当量比が抽出に用いられる、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記プロイロムチリン類がトルエンまたはMIBKから直接結晶化される、請求項 2 ~ 13

10

20

30

40

50

のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記プロイロムチリン類がトルエンから直接結晶化され、かつ結晶化に使用されるトルエン溶液の濃度が 10% ~ 50% w/w である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記プロイロムチリン類がトルエンから直接結晶化され、かつトルエンの初期温度が 60 ~ 70 であり、その後、8 ~ 10 時間にわたり 0 ~ 5 に冷却される、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記プロイロムチリン類が MIBK から直接結晶化され、かつ結晶化に使用される MIBK 溶液の濃度が 20% ~ 45% w/w である、請求項 14 に記載の方法。 10

【請求項 18】

前記プロイロムチリン類が MIBK から直接結晶化され、かつ MIBK の初期温度が 45 ~ 60 であり、その後、25 ~ 35 に冷却される、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 19】

前記プロイロムチリン類が、MIBK および混和性非極性溶媒から直接結晶化される、請求項 2 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記混和性非極性溶媒がヘプタンである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

結晶化された前記プロイロムチリン類が再結晶によりさらに精製される、請求項 2 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 22】

ムチリン 14-アセテートが、酢酸エチルおよびヘプタンによる再結晶により結晶化プロイロムチリン類から選択的に除去される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

再結晶に使用される前記プロイロムチリン類の濃度が 20% ~ 40% w/w である、請求項 21 または請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記初期温度が 45 ~ 50 であり、その後、15 ~ 25 に冷却される、請求項 21 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 25】

続いてヘプタン添加し、さらに 0 ~ 5 に冷却される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

ムチリン 14-アセテートが、MIBK およびヘプタンによる再結晶により結晶化プロイロムチリン類から選択的に除去される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 27】

再結晶に使用される前記プロイロムチリン類の濃度が 20% ~ 45% w/w である、請求項 21 または請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記初期温度が 45 ~ 65 である、請求項 21、26、および 27 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

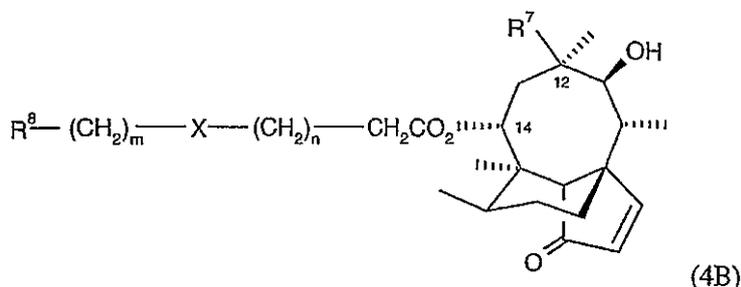
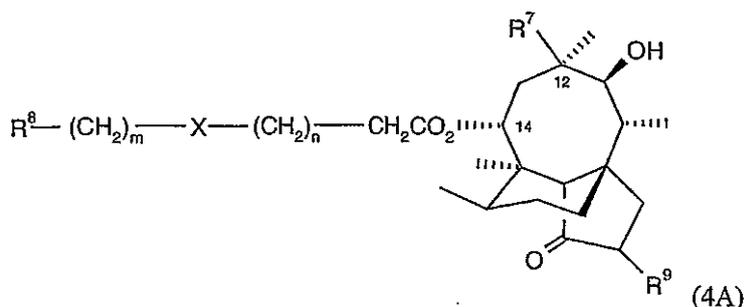
【請求項 29】

請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法によるプロイロムチリン類の製造を含む、半合成プロイロムチリン類誘導体の製造方法。

【請求項 30】

前記半合成プロイロムチリン類誘導体が、一般式 (4A) または (4B) :

【化1】



10

〔式中、

n および m のそれぞれは、独立して、0、1、もしくは2であり；

X は、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 SO_2 、 $-COO-$ 、 $-NH-$ 、 $-CONH-$ 、 $-NHCONH-$ 、および結合から選択され；

R^7 は、ビニルもしくはエチルであり；

R^8 は、1個もしくは2個の塩基性窒素原子を含有しかつ環炭素原子を介して結合された、場合により置換されていてもよい非芳香族の単環式基もしくは二環式基であり；

R^9 は、 H もしくは OH であり；または

(4A)もしくは(4B)の14位の部分 $R^8(CH_2)_mX(CH_2)_nCH_2COO$ は、 $R^aR^bC=CHCOO$ (ここで、 R^a および R^b のうち的一方は水素でありかつ他方は R^8 であり、もしくは R^a および R^b は一緒になって R^8 を形成する)に置き換えられている]

20

30

で示される化合物またはその薬学的に許容される塩である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記半合成プロイロムチリン類誘導体が、式(4A)または(4B)(ここで、 R^8 は、場合により置換されていてもよいピペリジニル、ピロリジル、キヌクリジニル、アザビシクロ[2.2.1]ヘプチル、アザビシクロ[4.3.0]ノニル、アザビシクロ[3.2.1]オクチル、アザビシクロ[3.3.0]オクチル、アザビシクロ[2.2.2]オクチル、アザビシクロ[3.2.1]オクテニル、アザビシクロ[3.3.1]ノニル、およびアザビシクロ[4.4.0]デシルから選択される)で示される化合物である、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記半合成プロイロムチリン類誘導体が、式(4A)または(4B)(ここで、 R^8 は、アルキル、アルキルオキシ、アルケニル、またはアルケニルオキシにより置換されており、これらは、場合により、アリール、ヘテロシクリル、 (C_{1-6}) アルコキシ、 (C_{1-6}) アルキルチオ、アリール (C_{1-6}) アルコキシ、アリール (C_{1-6}) アルキルチオ、アミノ、モノ-またはジ- (C_{1-6}) アルキルアミノ、シクロアルキル、シクロアルケニル、カルボキシおよびそのエステル類、カルボキシのアミド類、ウレイド、カルバムイミドイル(アミジノ)、グアニジノ、アルキル-スルホニル、アミノ-スルホニル (C_{1-6}) アシルオキシ、 (C_{1-6}) アシルアミノ、アジド、ヒドロキシ、及びハロゲンから選択される1つ以上の基によりさらに置換されていてもよい)で示される化合物である、請求項30または31に記載の方法。

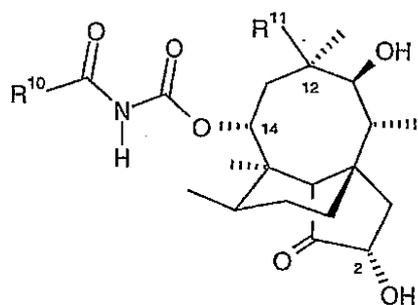
40

【請求項33】

前記半合成プロイロムチリン類誘導体が、一般式(5)：

50

【化2】



(5)

10

〔式中、

R^{10} は、5員または6員の場合により置換されていてもよいヘテロアリール基であり；そして

R^{11} は、ビニルまたはエチルである〕

で示される化合物またはその薬学的に許容される塩である、請求項29に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、1種以上のプロイロムチリン化合物 (pleuromutilins)、とくにプロイロムチリンの製造方法に関する。

20

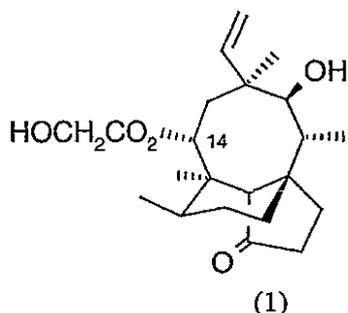
【背景技術】

【0002】

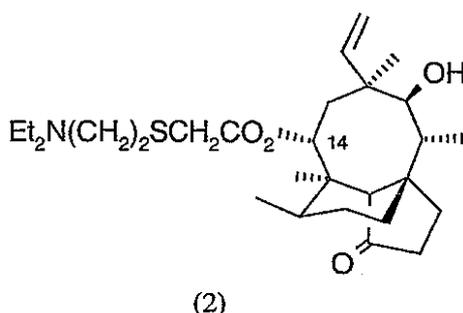
プロイロムチリン(式(1)で示される化合物)は、抗マイコプラズマ活性および弱い抗細菌活性を有する天然に存在する抗生物質である。ムチリンおよびC-14位に遊離のOHを有する他の化合物は、不活性である。プロイロムチリンの活性に及ぼすC-14位のさらなる修飾の影響について調べられてきた。14位のグリコール酸エステル部分をR-X-CH₂CO₂基〔式中、Rは、脂肪族部分または芳香族部分であり、そしてXは、O、S、またはNR'である〕に置き換えることにより、抗微生物活性を改善できることが明らかにされている(H Egger and H Reinshagen, J. Antibiotics, 1976, 29, 923)。獣医学用抗生物質として用いられるチアムリン(式(2)で示される化合物)は、このタイプの誘導体である(G Hogenauer in Antibiotics, Vol. V, part 1, ed. F E Hahn, Springer-Verlag, 1979, p.344)。

30

【化1】



(1)



(2)

40

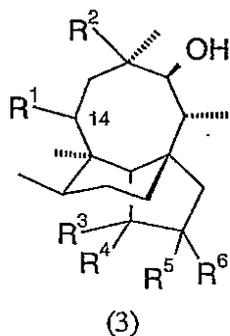
【0003】

本出願では、文献(G Hogenauer, loc.cit.)で広く用いられている非公式の番号付け方式を使用する。

【0004】

最近になって、一般式(3)を有するさらなるプロイロムチリン化合物が報告された。

【化2】



10

【0005】

たとえば、WO 97/25309(SmithKline Beecham)には、アシルオキシ基のさらなる修飾についての記載があり、カルバモイル基のN原子が無置換型、一置換型、または二置換型である14-O-カルバモイル誘導体が開示されている。

【0006】

WO 98/05659(SmithKline Beecham)には、アザ二環式部分を含む基によりカルバモイル基のN原子がアシル化されている14-O-カルバモイル誘導体が開示されている。

【0007】

WO 99/21855(SmithKline Beecham)には、14位のグリコール酸エステル部分が基 $R^2(CH_2)_mX(CH_2)_nCH_2COO-$ 〔式中、 R^2 は、非芳香族の単環式基または二環式基である〕に置き換えられているさらなる誘導体が記載されている。

20

【0008】

WO 00/27790(SmithKline Beecham)には、C-14スピロ環式アシルカルバメート誘導体、C-14ヘテロアリアルアルキル(heteroarylalkyl)カルボキシレート誘導体、またはC-14アリアルアルコキシアルキルカルボキシレート誘導体が記載されている。

【0009】

WO 00/37074(SmithKline Beecham)には、C-14位にヘテロアリアルアセテート置換基を有するさらなる誘導体が記載されている。

30

【0010】

WO 00/73287(SmithKline Beecham)には、C-14位にイソキサゾリンカルボキシレート置換基を有するさらなる誘導体が記載されている。

【0011】

WO 01/14310(SmithKline Beecham)には、C-14位に α -ケトエステル置換基を有するさらなる誘導体が記載されている。

【0012】

WO 01/74788(SmithKline Beecham)には、2-ヒドロキシムチリンカルバメート誘導体が記載されている。

【0013】

WO 02/12199(SmithKline Beecham)には、C-14位にヘテロ環式エステル置換基を有する誘導体が記載されている。

40

【0014】

WO 02/30929(SmithKline Beecham)には、C-14位にオキシカルボニルカルバメート置換基を有する誘導体が記載されている。

【0015】

WO 02/38528(SmithKline Beecham)には、C-14位にマロンアミド置換基またはマロン酸エステル置換基を有する誘導体が記載されている。

【0016】

さらに、19,20-ジヒドロ-2-ヒドロキシ-ムチリンが、G. SchulzおよびH. Bernerによ

50

りTetrahedron, 1984, vol. 40, pp 905-917に記載され、いくつかのC-14エーテル誘導体、C-14カルバメート誘導体、C-14アミド誘導体、およびC-14ウレア誘導体が、BrooksらによりBioorg. Med. Chem, 2001, vol. 9, pp1221-1231に記載されている。

【0017】

プロイロムチリンは、Clitopilus種、Octojuga種、およびGerronema種のような微生物の発酵により産生されうる。これらの生物はまた、いくつかの関連プロイロムチリン化合物、たとえば、ムチリン14-アセテートを産生しうる。これらの他のプロイロムチリン化合物は、生物および培養条件に依存してさまざまなレベルで産生されるが(F Knauseder and E Brandl, Pleuromutilins: Fermentation, Structure and Biosynthesis, J. Antibiotics, 1976, 29,125-131)、典型的には、プロイロムチリンほど豊富に産生されることはない。 10

【0018】

発酵後、プロイロムチリンおよび他のプロイロムチリン化合物は、発酵培地中および微生物細胞内の両方に存在する。プロイロムチリン類の抽出および後続の精製を行う公知の方法が、米国特許第4,092,424号、同第4,129,721号、同第4,247,542号、英国特許第1,197,942号に開示され、Antibiotic Substances from Basidiomycetes (Basidiomycetes由来の抗生物質) VIII, F. Kavanagh et al., Proc. N.A.S., 1951, 570-574のような論文に発表されている。これらの方法には、水非混和性溶媒、たとえば、トルエン、酢酸エチル、またはクロロホルムによる濾過されたブrossの抽出が含まれる。アセトンなどの水混和性溶媒による培養菌系体からのプロイロムチリンの抽出、それに続く酢酸エチルなどの水非混和性溶媒による抽出についても記載されている。その後、プロイロムチリンを有機溶媒から結晶化させる。これらの方法の欠点は、それぞれの抽出のために、採取された発酵ブrossを菌系体ペレットと培養液とに分離することが必要とされる点である。 20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

したがって、大規模な工業操作に適した効率的な抽出が行える発酵後のプロイロムチリン類(とくに、プロイロムチリン)の改良された抽出方法を提供する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0020】

この問題に対する解決策は、プロイロムチリン類の抽出に高い特異性を示す水非混和性有機溶媒による未濾過の培地全体または発酵ブross全体(すなわち、発酵液と菌系体の両方)の抽出を含む方法により提供される。 30

【0021】

この結果、中間精製ステップを必要とすることなく直接結晶化させることのできる高純度の生成物が得られる。したがって、この方法の利点および改善点としては、菌系体中および上清中の両方に存在するプロイロムチリン類を回収するときの処理ステップ数がより少ないことおよび収率が高いことが挙げられる。

【0022】

かくして、本発明によれば、 40

a)液体培地中でプロイロムチリン類産生微生物を培養するステップと；

b)水非混和性有機溶媒により未濾過の培地からプロイロムチリン類を抽出するステップと；

を含む、1種以上のプロイロムチリン化合物の製造方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

好ましくは、得られたプロイロムチリン類を、たとえば結晶化により、さらに精製する。かくして、本発明はまた、

a)液体培地中でプロイロムチリン類産生微生物を培養するステップと；

b)水非混和性有機溶媒により未濾過の培地からプロイロムチリン類を抽出するステップ 50

と;

c)抽出されたプロイロムチリン類を濃縮するステップと;

d)プロイロムチリン類を結晶化させるステップと;

を含む、1種以上のプロイロムチリン化合物の製造方法を提供する。

【0024】

このほか、結晶化前に、たとえば活性炭を用いて、抽出されたプロイロムチリン類に脱色処理を施してもよい。脱色処理は、プロイロムチリン類を未濾過の培地から抽出した後(ステップbの後)で行ってもよいし、抽出されたプロイロムチリン類を濃縮した後(ステップcの後)で行ってもよい。好ましくは、抽出されたプロイロムチリン類を濃縮した後(ステップcの後)で、脱色処理を行う。

10

【0025】

プロイロムチリン類産生微生物は、1種以上のプロイロムチリン化合物を産生しうる任意の微生物であってよい。好ましくは、本発明の方法で使用されるプロイロムチリン類産生微生物は、*Clitopilus*種、たとえば、*Clitopilus passeckerianus* NRRL 3100/DSM 1602、*Clitopilus passeckerianus* CBS 299.35、*Clitopilus passeckerianus* CBS 330.85、*Clitopilus pinsitus* CBS 623.70、*Clitopilus hobsonii* CBS 270.36; *Octojuga*種、たとえば、*Octojuga pseudopinsitus* NRRL11179; *Gerronema*種、たとえば、*Gerronema josserandii* CBS 309.36; または任意のそのような種の突然変異体である。プロイロムチリン類産生微生物はまた、*Psathyrella*種、たとえば、*Psathyrella subatrata* CBS 325.39、またはそのような種の突然変異体であってよい。とりわけ好ましいのは、*Clitopilus*種またはその突然変異体、とくに*Clitopilus passeckerianus* NRRL 3100またはその突然変異体である。突然変異体は、従来手段により、たとえば、UVまたは化学的突然変異誘発により、作製することができる。

20

【0026】

微生物は、米国特許第4,092,424号に開示されているような当業者に周知の発酵培養法により増殖させることができる。

【0027】

本発明の方法では、水非混和性有機溶媒は、典型的には、芳香族炭化水素または水非混和性脂肪族ケトンである。好ましい芳香族炭化水素はトルエンであり、好ましい水非混和性脂肪族ケトンは4-メチル-2-ペンタノン(MIBK)である。

30

【0028】

抽出は、約10 ~ 約50で行うことができる。好ましくは、約20で抽出を行う。抽出前の水溶液のpHは、3~9の範囲でなければならない。好ましくは、pHは、ほぼ中性、たとえばpH6~8、より好ましくはpH 6.9 ± 0.2 である。培地のpHは、好適な酸または塩基、たとえば酢酸または水酸化ナトリウムを添加することにより、調整可能である。

【0029】

一般的には、4:1~1:4の範囲の有機溶媒と未濾過の培地との体積当量比を抽出に用いることができる。有機溶媒と未濾過の培地との好ましい比は、1:2である。

【0030】

本発明の一実施形態では、2つの流れを合流させてパッフル付きチューブまたはメカニカルミキサーに通すことにより、溶媒と未濾過の培地とをインラインで混合することが可能である。その後、ディスクスタック遠心機のような遠心分離機または好ましくはスクロール(向流)デカンターのような抽出/分離兼用デカンターに通すことにより、相を分離させることが可能である。

40

【0031】

他の選択肢として、タンク中で二相を攪拌して合わせた相を重力下で静置することにより、または二相間の十分な接触および後続の分離を提供する向流抽出塔または類似の装置を用いることにより、抽出を行うことも可能である。

【0032】

有機層を分離した後、真空中でまたは当業者に周知の他の方法により、溶媒の体積減少

50

による抽出物の濃縮を行うことが可能である。体積減少後、プロイロムチリン類を濃縮抽出物から結晶化させることが可能である。プロイロムチリン類をトルエンまたはMIBKから直接結晶化させることができる。好ましくは、混和性非極性溶媒(たとえば、ヘプタン)を添加して、MIBKからの結晶化を行う。

【0033】

結晶化に使用されるトルエン溶液の濃度は、10%～50% w/wでありうる。トルエンの初期温度は、好ましくは60～70であり、その後、0～5に8～10時間冷却させて結晶化を終了する。

【0034】

結晶化に使用されるMIBK溶液の濃度は、20%～45% w/w、好ましくは35～40% w/wでありうる。MIBKの初期温度は、一般的には45～60、とくに50～55であり、25～35、とくに約30に冷却させて結晶化を開始させる。結晶化を促進するために、約2倍体積までのヘプタンを添加してもよい。好ましくは、1～1.5倍体積を添加する。15分間～1時間かけてヘプタンを添加してもよい。ヘプタン添加後、好ましくは結晶化混合物を0～5に冷却させるが、周囲温度で保持してもよい。

【0035】

先に述べたように、結晶化前に、場合により、活性炭を用いてプロイロムチリン類の抽出物または濃縮物に脱色処理を施してもよい。たとえば、ムチリン濃縮物を粉末状または顆粒状の木炭でバッチ処理してもよいし、木炭が充填されたカートリッジ、カラム、または濾床に通してもよい。通常、1:15までの炭素:プロイロムチリン類の比w/wが用いられる。脱色処理ステップにおけるMIBK中のプロイロムチリン類の濃度は、1～40%、好ましくは7～20% w/wでありうる。バッチ処理の場合、Norit GSK (Norit UK Ltd, Clydesmill Place, G32 8RF, UK)のような活性炭を使用しうる。

【0036】

本発明の方法に従って製造された結晶化生成物は、1種以上のプロイロムチリン化合物を含みうる。一般的には、結晶化生成物は、プロイロムチリンに加えてわずかな関連プロイロムチリン化合物(とくに、ムチリン14-アセテート)を含有する可能性のあるプロイロムチリンである。結晶化生成物は、さらなる精製を行うことなく半合成プロイロムチリン類誘導体の製造に使用可能である。たとえば、プロイロムチリンとムチリン14-アセテートとの混合物をムチリンに加水分解することができ、その後、それを合成出発物質として使用することが可能である。しかしながら、本発明の方法は、好ましくは、プロイロムチリンを製造するために用いられる。したがって、結晶化されたプロイロムチリン類の生成物を、再結晶(たとえば、酢酸エチルとヘプタンからのまたはMIBKとヘプタンからの再結晶)のような方法によりさらに精製してもよい。

【0037】

本発明の一実施形態では、酢酸エチルとヘプタンからの再結晶により、ムチリン14-アセテートをプロイロムチリン類の生成物から選択的に除去しうる。結晶化に用いられる酢酸エチル中のプロイロムチリン類の濃度は、20～40% w/w、好ましくは20～30% w/w、とくに約30% w/wでありうる。このプロセスの初期温度は、好ましくは45～50であり、15～25、とくに約20に冷却させて結晶化を開始させ、その後、ヘプタンを添加して、周囲温度または好ましくは0～5にさらに冷却させる。結晶化を促進するために、0～2倍体積、好ましくは1～1.5倍体積のヘプタンを添加してもよい。ヘプタンは、典型的には、15分間～1時間かけて添加されるが、もっと時間をかけて添加してもよい。

【0038】

本発明のさらなる実施形態では、MIBKとヘプタンからの再結晶により、ムチリン14-アセテートをプロイロムチリン類の生成物から選択的に除去しうる。MIBKを用いて最初の抽出および結晶化を行うと、再結晶ステップでMIBKを使用する際に、複雑な溶媒混合物を作製することなく、乾燥させた生成物を用いて再結晶を行うこともできるし、湿潤ケーキ(すなわち、乾燥前に結晶化から直接得られるプロイロムチリン類の生成物)を用いてin situで再結晶を行うこともできるという利点が得られる。再結晶に使用されるMIBK溶液の濃

10

20

30

40

50

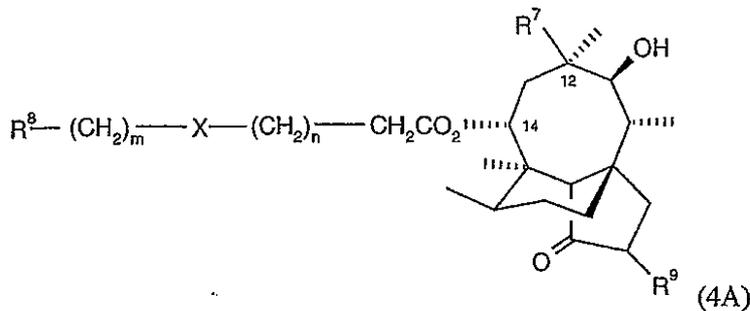
度は、20% ~ 45% w/w、好ましくは35 ~ 45% w/wでありうる。MIBKの初期温度は、一般的には45 ~ 65、とくに約60である。結晶化を促進するために、約2倍体積までのヘプタンを添加してもよい。好ましくは、1 ~ 1.5倍体積を添加する。10分間 ~ 1時間かけて、好ましくは10分間 ~ 30分間かけて、ヘプタンを添加してもよい。ヘプタン添加後、好ましくは結晶化混合物を0 ~ 5 に冷却させる。

【0039】

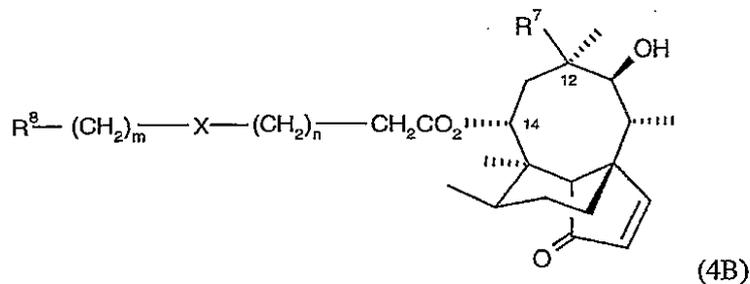
好ましい一実施形態では、本発明の方法に従って製造されるプロイロムチリン類は、WO 99/21855(参照により本明細書に組み入れられるものとする)に記載されている半合成プロイロムチリン類誘導体の製造に使用される。かくして、本発明の方法に従って製造されるプロイロムチリン類は、好ましくは、一般式(4A)または(4B)：

10

【化3】



20



【0040】

30

[式中、

nおよびmのそれぞれは、独立して、0、1、もしくは2であり；

Xは、-O-、-S-、-S(O)-、SO₂、-CO.O-、-NH-、-CONH-、-NHCONH-、および結合から選択され；

R⁷は、ビニルもしくはエチルであり；

R⁸は、1個もしくは2個の塩基性窒素原子を含有しかつ環炭素原子を介して結合された、場合により置換されていてよい非芳香族の単環式基もしくは二環式基であり；

R⁹は、HもしくはOHであり；または

(4A)もしくは(4B)の14位の部分R⁸(CH₂)_mX(CH₂)_nCH₂COOは、R^aR^bC=CHCOO(ここで、R^aおよびR^bのうちの一方は水素でありかつ他方はR⁸であり、もしくはR^aおよびR^bは一緒になってR⁸を形成する)に置き換えられている]

40

で示される半合成プロイロムチリン類誘導体またはその薬学的に許容される塩の製造に用いられる。

【0041】

R⁸が単環式である場合、それは、典型的には、4 ~ 8個の環原子を含有し、二環式である場合、それは、典型的には、それぞれの環に5 ~ 10個の環原子を含有し、場合により3個までの置換基により置換されていてよい。好適な置換基としては、アルキル、アルキルオキシ、アルケニル、およびアルケニルオキシが挙げられ、それらは、それぞれ、橋頭炭素原子または非橋頭炭素原子のいずれかにより保有されうる。さらに、このまたはそれぞれの窒素原子は、酸素により置換されてN-オキシドを形成していてもよいし、またはモノア

50

ルキルもしくはジアルキルにより置換されていてもよい(この場合、第四級カチオンが形成されうことは理解されよう)。対イオンは、ハロゲン化物イオン、たとえば、塩化物イオンまたは臭化物イオン、好ましくは塩化物イオンでありうる。アザ環系は、このほかに、1つ以上の二重結合を含有しうる。

【0042】

R⁸に対する代表的な二環式基および単環式基としては、ピペリジニル、ピロリジル、キヌクリジニル、アザビシクロ[2.2.1]ヘプチル、アザビシクロ[4.3.0]ノニル、アザビシクロ[3.2.1]オクチル、アザビシクロ[3.3.0]オクチル、アザビシクロ[2.2.2]オクチル、アザビシクロ[3.2.1]オクテニル、アザビシクロ[3.3.1]ノニル、およびアザビシクロ[4.4.0]デシルが挙げられ、これらはいずれも、置換されていても無置換であってもよい。R⁸に対する好ましい実施例としては、キヌクリジニル(quinuclidinyl)が挙げられる。

10

【0043】

好ましくは、nは0である。好ましくは、mは0または1である。

【0044】

好ましい化合物は、式(4A)で示される化合物である。

【0045】

式(4A)または(4B)に関連して本明細書に示されるアルキル基およびアルケニル基としては、6個までの炭素原子を含有する直線状および分枝状の基が挙げられ、これらは、場合により、アリール、ヘテロシクリル、(C₁₋₆)アルコキシ、(C₁₋₆)アルキルチオ、アリール(C₁₋₆)アルコキシ、アリール(C₁₋₆)アルキルチオ、アミノ、モノ-またはジ-(C₁₋₆)アルキルアミノ、シクロアルキル、シクロアルケニル、カルボキシおよびそのエステル類、カルボキシのアミド類、ウレイド、カルバムイミドイル(アミジノ)、グアニジノ、アルキル-スルホニル、アミノ-スルホニル(C₁₋₆)アシルオキシ、(C₁₋₆)アシルアミノ、アジド、ヒドロキシ、およびハロゲンよりなる群から選択される1つ以上の基により置換されていてもよい。

20

【0046】

式(4A)または(4B)に関連して本明細書に示されるシクロアルキル基およびシクロアルケニル基としては、3~8個の環炭素原子を有する基が挙げられ、場合により、アルキル基およびアルケニル基に対して先に本明細書に記載したように置換されていてもよい。

【0047】

式(4A)または(4B)に関連して本明細書で使用する場合、「アリール」という用語は、好適にはそれぞれの環に4~7個、好ましくは5または6個の環原子を含有する単環および縮合環を意味し、これらの環は、それぞれ、無置換でも置換されていてもよく、たとえば、3個までの置換基により置換されていてもよい。縮合環系は、脂肪族環を含んでいてもよいが、芳香環を1つだけは含んでいる必要がある。代表的なアリール基としては、フェニルおよびナフチル、たとえば、1-ナフチルまたは2-ナフチルが挙げられる。

30

【0048】

好適には、フェニルおよびナフチルをはじめとするアリール基は、いずれも、場合により、5個まで、好ましくは3個までの置換基により置換されていてもよい。好適な置換基としては、ハロゲン、(C₁₋₆)アルキル、アリール、アリール(C₁₋₆)アルキル、(C₁₋₆)アルコキシ、(C₁₋₆)アルコキシ(C₁₋₆)アルキル、ハロ(C₁₋₆)アルキル、アリール(C₁₋₆)アルコキシ、ヒドロキシ、ニトロ、シアノ、アジド、アミノ、モノ-およびジ-N-(C₁₋₆)アルキルアミノ、アシルアミノ、アリールカルボニルアミノ、アシルオキシ、カルボキシ、カルボキシ塩類、カルボキシエステル類、カルバモイル、モノ-およびジ-N-(C₁₋₆)アルキルカルバモイル、(C₁₋₆)アルコキシカルボニル、アリールオキシカルボニル、ウレイド、グアニジノ、スルホニルアミノ、アミノスルホニル、(C₁₋₆)アルキルチオ、(C₁₋₆)アルキルスルフィニル、(C₁₋₆)アルキルスルホニル、ヘテロシクリル、ならびにヘテロシクリル(C₁₋₆)アルキルが挙げられる。さらに、2個の隣接する環炭素原子は、(C₃₋₅)アルキレン鎖により連結されて炭素環を形成してもよい。

40

【0049】

50

式(4A)または(4B)に関連して本明細書で使用する場合「ヘテロシクリル」および「ヘテロ環式」という用語は、別段の定義がないかぎり、好適にはそれぞれの環に4個までのヘテロ原子(それぞれ、酸素、窒素、および硫黄から選択される)を含有する芳香族および非芳香族の単環および縮合環を包含し、これらの環は、無置換でも置換されていてもよく、たとえば、3個までの置換基により置換されていてもよい。それぞれのヘテロ環は、好適には4~7個、好ましくは5または6個の環原子を有する。縮合ヘテロ環系は、炭素環を含んでいてもよいが、ヘテロ環を1つだけは含んでいる必要がある。

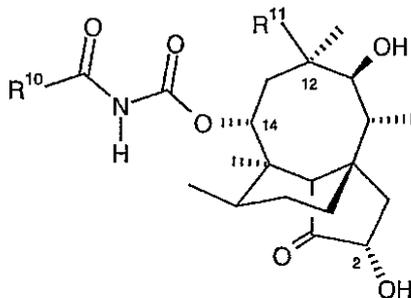
【0050】

好ましくは、ヘテロシクリル基に対する置換基は、ハロゲン、 (C_{1-6}) アルキル、アリール (C_{1-6}) アルキル、 (C_{1-6}) アルコキシ、 (C_{1-6}) アルコキシ (C_{1-6}) アルキル、ハロ (C_{1-6}) アルキル、ヒドロキシ、アミノ、モノ-およびジ-N- (C_{1-6}) アルキル-アミノ、アシルアミノ、カルボキシ、カルボキシ塩類、カルボキシエステル類、カルバモイル、モノ-およびジ-N- (C_{1-6}) アルキルカルボニル、アリールオキシカルボニル、 (C_{1-6}) アルコキシカルボニル (C_{1-6}) アルキル、アリール、オキシ基類、ウレイド、グアニジノ、スルホニルアミノ、アミノスルホニル、 (C_{1-6}) アルキルチオ、 (C_{1-6}) アルキルスルフィニル、 (C_{1-6}) アルキルスルホニル、ヘテロシクリル、ならびにヘテロシクリル (C_{1-6}) アルキルから選択される。

【0051】

さらに好ましい実施形態では、本発明の方法に従って製造されるプロイロムチリン類は、WO 01/74788(参照により本明細書に組み入れられるものとする)に記載されている半合成プロイロムチリン類誘導体の製造に使用される。かくして、本発明の方法に従って製造されるプロイロムチリン類は、好ましくは、一般式(5)：

【化4】



(5)

【0052】

〔式中、

R¹⁰は、5員または6員の場合により置換されていてもよいヘテロアリール基であり；そして

R¹¹は、ビニルまたはエチルである〕

で示される半合成プロイロムチリン類誘導体またはその薬学的に許容される塩の製造に用いられる。

【0053】

R¹⁰に対するヘテロアリール基の例としては、1個または2個の窒素原子を含み、場合により、酸素もしくは硫黄から選択されるさらなるヘテロ原子を含む5員もしくは6員の単環を有する基、たとえば、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、イソオキサゾール、チアゾール、イミダゾール、ピラゾール；または3個の窒素原子を含む5員環もしくは6員環、たとえば、1,2,3-トリアゾール、1,2,4-トリアゾール；またはベンゼン環に縮合した1個もしくは2個の窒素原子を含む5員環もしくは6員環、たとえば、ベンゾイミダゾールが挙げられる。R¹⁰に対するヘテロアリール基のさらなる例としては、1個もしくは2個の窒素原子を含む第2の5員もしくは6員の場合により置換されていてもよいヘテロアリー

ル環に縮合した1個もしくは2個の窒素原子を含む5員環もしくは6員環を有する基が挙げられる。

【0054】

R¹⁰に対するそのようなヘテロアリアル基の代表例としては、たとえば、ピリジン、ピラジン、ピリダジン、3-オキソ-3,4-ジヒドロピリド[2,3-b]ピラジン、ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン、ピリミジン、およびチアゾールが挙げられる。R¹⁰に対するそのようなヘテロアリアル基の好ましい例としては、たとえば、ピリジン、ピリミジン、およびチアゾールが挙げられる。

【0055】

R¹⁰に対する代表的な場合により存在していてもよい置換基としては、アミノ、モノ-もしくはジ-(C₁₋₆)アルキルアミノ、(C₁₋₆)アルキル、(C₁₋₆)アルコキシ、ニトロ、および場合により置換されていてもよいN含有ヘテロシクリル、たとえば、ピペリジン-4-イルが挙げられる。典型的には、R¹⁰は、1個もしくは2個の置換基を含みうる。

10

【0056】

式(5)に関連して本明細書で使用する場合、「アリアル」という用語は、別段の定義がないかぎり、フェニルまたはナフチルを意味する。置換アリアル基は、5個まで、好ましくは3個までの置換基を含む。

【0057】

ベンジル基の一部をなすときのフェニルを含めてアリアル基に対する好適な置換基としては、たとえば、別段の定義がないかぎり、ハロゲン、(C₁₋₆)アルキル、アリアル、アリアル(C₁₋₆)アルキル、(C₁₋₆)アルコキシ、(C₁₋₆)アルコキシ(C₁₋₆)アルキル、ハロ(C₁₋₆)アルキル、アリアル(C₁₋₆)アルコキシ、ヒドロキシ、ニトロ、シアノ、アジド、アミノ、モノ-およびジ-N-(C₁₋₆)アルキルアミノ、アシルアミノ、アリアルカルボニルアミノ、アシルオキシ、カルボキシ、カルボキシ塩類、カルボキシエステル類、カルバモイル、モノ-およびジ-N-(C₁₋₆)アルキルカルバモイル、(C₁₋₆)アルコキシカルボニル、アリアルオキシカルボニル、ウレイド、グアニジノ、(C₁₋₆)アルキルグアニジノ、アミジノ、(C₁₋₆)アルキルアミジノ、スルホニルアミノ、アミノスルホニル、(C₁₋₆)アルキルチオ、(C₁₋₆)アルキルスルフィニル、(C₁₋₆)アルキルスルホニル、ヘテロシクリル、ヘテロアリアル、ヘテロシクリル(C₁₋₆)アルキル、ならびにヘテロアリアル(C₁₋₆)アルキルが挙げられる。さらに、2個の隣接する環炭素原子は、(C₃₋₅)アルキレン鎖により連結されて炭素環を形成してもよい。

20

30

【0058】

式(5)に関連して本明細書で使用する場合、「アルキル」および「アルケニル」という用語は、6個までの炭素原子を含有する直線状および分枝状の基を意味する(個別にまたはアルコキシもしくはアルケニルオキシの一部として)。

【0059】

式(5)に関連して本明細書で使用する場合、「シクロアルキル」および「シクロアルケニル」という用語は、3~8個の環炭素原子を有する基を意味する。

【0060】

置換型の場合、アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基は、4個までの置換基、好ましくは2個までの置換基を含みうる。アルキル基、アルケニル基、シクロアルキル基、またはシクロアルケニル基に対する好適な置換基としては、アリアル、ヘテロアリアル、ヘテロシクリル、(C₁₋₆)アルコキシ、(C₁₋₆)アルキルチオ、アリアル(C₁₋₆)アルコキシ、アリアル(C₁₋₆)アルキルチオ、アミノ、モノ-またはジ-(C₁₋₆)アルキルアミノ、シクロアルキル、シクロアルケニル、カルボキシおよびそのエステル類、アミド、ウレイド、グアニジノ、(C₁₋₆)アルキルグアニジノ、アミジノ、(C₁₋₆)アルキルアミジノ、(C₁₋₆)アシルオキシ、アジド、ヒドロキシ、およびハロゲンが挙げられる。

40

【0061】

式(5)に関連して本明細書で使用する場合、「ヘテロシクリル」および「ヘテロ環式」

50

という用語は、別段の定義がないかぎり、好適にはそれぞれの環に4個までのヘテロ原子(それぞれ、酸素、窒素、および硫黄から選択される)を含有する非芳香族の単環および縮合環を意味する。それぞれのヘテロ環は、好ましくは4~7個、好ましくは5または6個の環原子を有する。縮合ヘテロ環系は、炭素環を含んでいてもよいが、ヘテロ環を1つだけは含んでいる必要がある。

【0062】

置換型の場合、ヘテロシクリル基は、3個までの置換基を含みうる。好ましくは、ヘテロシクリル基に対する置換基は、オキソおよび先に本明細書に好適なアリール置換基として定義された基から選択される。

【0063】

式(5)に関連して本明細書で使用する場合、「ヘテロアリール」という用語は、好適には、別段の定義がないかぎり、4個まで、好ましくは1個または2個のヘテロ原子(それぞれ、酸素、窒素、および硫黄から選択される)を含む単環式または二環式の複素芳香環系を包含する。それぞれの環は、4~7個、好ましくは5個または6個の環原子を有する。二環式複素芳香環系は、炭素環を含みうる。

【0064】

置換されている場合、ヘテロアリール基は、3個までの置換基を含みうる。好ましくは、ヘテロアリール基に対する置換基は、先に本明細書に好適なアリール置換基として定義された基から選択される。

【0065】

置換基の結合位置に依存して、2つ以上のジアステレオアイソマーが存在しうる可能性がある。その状況では、本発明は、それぞれのジアステレオアイソマーおよびそれらの混合物を包含する。

【0066】

式(4A)の2-ヒドロキシ化合物は、(2S)配置もしくは(2R)配置をとりうるか、またはそれらの混合物として提供されうる。(2S)配置が好ましい。式(5)で示される2-ヒドロキシ置換化合物は、2-(S)配置である。

【0067】

本明細書で使用する場合、「プロイロムチリン類(pleuromutilins)」という用語は、プロイロムチリン(先に定義した式(1)で示される化合物)およびプロイロムチリン関連化合物、たとえば、プロイロムチリンエステル類、具体的には、プロイロムチリン22-アセテートもしくは脂肪酸のエステル類、ムチリンまたはムチリン14-アセテートを包含する。とくに、「プロイロムチリン類」という用語は、プロイロムチリンおよびムチリン14-アセテート、とりわけプロイロムチリンを包含する。

【0068】

本明細書で使用する場合、「プロイロムチリン類誘導体」という用語は、たとえば官能基相互変換により、本発明の方法に従って生成されるプロイロムチリン類から製造される半合成誘導体を包含する。

【0069】

本発明の方法により生成されるプロイロムチリン類は、HPLCにより分析可能である。ブロス中および抽出サンプル中のプロイロムチリン類は、10mmガードカラムを備えたC18 Waters Spherisorb S5 ODS2カラム(4.6×250mm)を用いて定量可能である。UV検出は、205nmで行われる。水中の45% MeCNのアイソクラティック移動相1ml/分および注入体積20μlを使用する。ブロスサンプルでは、2mlの全ブロスと4mlのアセトニトリルと共に15分間ソニケートし、アッセイ前にガラス繊維濾紙に通して濾過する。

【0070】

本明細書に引用されているすべての刊行物、たとえば、限定されるものではないが、特許および特許出願は、あたかも個々の刊行物が具体的かつ個別的に表記されて完全に明記されたがごとく参照により本明細書に組み入れられているように、参照により本明細書に組み入れられるものとする。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0071】

以下の実施例により本発明について具体的に説明する。

【0072】

実施例1

トルエン抽出を用いるプロイロムチリンの単離

1,280mg/Lのプロイロムチリン(1,746g)を含む1,364Lの*Clitopilus passeckerianus* NRRL 3100全ブrossを、20%水酸化ナトリウムによりpH7に調整し、半分の体積のトルエンで抽出した。抽出および分離は、Westfalia SA-7-01遠心機およびWestfalia TA-7ディスクスタック遠心機を用いて行った。3L/分の全ブrossおよび1.5L/分のトルエンになるように、ポンプ流動を調整した。2,573mg/L(1,751gのプロイロムチリン)を含む681Lのトルエン抽出物を得た(段階収率100%)。 10

プロイロムチリン抽出物から調製された6.76Lの部分濃縮トルエン抽出物(17.74g/Lのプロイロムチリン(119.9g)を含有する)を、760ml(15.8% w/vプロイロムチリン)までさらに濃縮した(60、真空中)。攪拌しながらトルエン濃縮物を室温に冷却し、結晶化を開始させた。スラリーを5で一晩放置した。Whatman No. 541ペーパーで濾過することにより結晶を回収し、2×20mlの低温ヘプタンで洗浄し、そして55、900mBargで48時間乾燥させた。89.6gの純度100%の結晶プロイロムチリンを得た(段階収率75%)。

【0073】

実施例2

トルエン抽出を用いるプロイロムチリンの単離

1500μg/gのプロイロムチリンを含有する2,600Lの*Clitopilus passereckianus* NRRL 3100発酵ブrossをWestfalia CA226スクロールデカンターにより2:1のブross/溶媒比でトルエンで抽出した。pHを6.8~7.5に保持し(1M NaOH)、周囲温度で抽出を行った。リッチソルベントストリーム(rich solvent stream)を精製するために、Westfalia TA-7セパレーターに通した。2400μg/mlのプロイロムチリンを含有する1,275Lのリッチソルベントを捕集した(溶媒抽出収率76%)。 20

60~75および25in Hgで減圧蒸留を用いて、1,275Lのプロイロムチリンリッチトルエンを22.5L(16% w/w)まで濃縮した(濃縮収率93.5%)。

22.5Lのプロイロムチリン濃縮物を2つのほぼ等しいアリコートに分け、ロータリーエバポレーター(70)を用いて40~50% w/wまでさらに濃縮した(約25% w/wから結晶化が観測された)。氷/水浴中に一晩入れて結晶化を終了させた。 30

No.54 Whatman濾紙に通して濾過することにより、生成物を回収した。秤量された湿潤生成物(2×1.83kg)を湿潤生成物1kgあたり1Lのトルエン中に2分間スラリー化させ、再び濾過により生成物を回収した。もとの湿潤生成物1kgあたり0.5kgのトルエンで乾燥床を洗浄した(結晶化収率86.7%)。

2×1.5kgの湿潤生成物を45~50で真空下で一晩乾燥させ、合計2.59kgのプロイロムチリン生成物を95.7%の純度で得た(全収率61.5%)。

【0074】

実施例3

MIBK抽出を用いるプロイロムチリンの単離

1,280mg/Lのプロイロムチリン(1,788g)を含有する1,397Lの*Clitopilus passeckerianus* NRRL 3100全ブrossを、20%水酸化ナトリウムにより、pH7に調整した。全ブrossを半分の体積のMIBKで抽出した。抽出および分離は、Westfalia SA-7-01遠心機およびWestfalia TA-7ディスクスタック遠心機を用いて行った。3L/分の全ブrossおよび1.5L/分のMIBKになるように、ポンプ流動を調整した。3,010mg/Lを含む628LのMIBK抽出物を得た(1,890gのプロイロムチリン)(段階収率100%)。 40

プロイロムチリン抽出物から調製した2.82Lの部分濃縮MIBK抽出物(39.02g/Lプロイロムチリン(110g)を含有する)を、0.275L(40% w/vプロイロムチリン)までさらに濃縮した。濃縮物を27まで冷却し、結晶化を開始させた。激しく攪拌しながら同体積のヘプタンを20 50

分間かけて滴下した。スラリーを周囲温度で1時間保持し、その後、5 で一晩保持した。Whatman No. 541ペーパーで濾過することにより結晶を回収し、2×20mlの低温ヘプタンで洗浄し、そして55 、900mBargで48時間乾燥させた。98.6gの純度96%の結晶プロイロムチリンを得た(段階回収率86.1%)。

実施例4

MIBK抽出を用いるプロイロムチリンの単離

4.08kgのプロイロムチリンを含有する4500LのClitopilus passeckerianus NRRL 3100発酵物を半分の体積のMIBKで抽出した。抽出および分離は、Westfalia CA226向流デカンターおよびWestfalia TA-7ディスクスタック遠心機を用いて行った。Sulzerスタティックミキサーを用いて相を予備混合した。プロス対MIBKの比を2:1に保持して、プロセス全体にわたり流量を3および1.5L/分から7および3.5L/分に増大させた。これらの流動では、相分離または抽出効率の劣化は観測されなかった。MIBK抽出物を真空中で約10% w/vプロイロムチリンまで濃縮した。3.62kgのプロイロムチリンをリッチ抽出物に回収した(段階収率89%)。

実施例3からの1Lの部分濃縮MIBK抽出物(約100gのプロイロムチリン化合物を含有する)を、35% w/vプロイロムチリンまでさらに濃縮した(60 、真空中)。濃縮物を3Lフラスコに移し、250rpmで攪拌した。濃縮物を室温に冷却し、約30mgの種結晶を添加した。結晶化は30分後に観測された。その後、過度に飛び散ることなく良好な混合が確実に行えるように攪拌機の速度を監視しながら、1.1倍体積のヘプタンを10ml/分で添加した。室温で1.5時間後、容器を5 の部屋に2時間移した。真空濾過によりWhatman 541ペーパー上に結晶を回収した。結晶ケーキを2×10mlのヘプタンで洗浄し、50 、900mbarで48時間乾燥させた。84gの純度94%のプロイロムチリン結晶を得た(段階収率79%)。

【0075】

実施例5

活性炭処理を用いるMIBK抽出物からのプロイロムチリンの脱色処理

約20% w/wプロイロムチリン類を含有する13kgのMIBK半濃縮物を、173gのNorit GSX粉末カーボン[Norit UK Ltd, Clydesmill Place, G32 8RF, UK]で処理し、5分間攪拌した。炭素処理された濃縮物をセライト床[Harborlite UK Ltd, Livingstone Rd, HU13 OEG, UK]に通して濾過し、炭素を除去した。

黄色度指数(光学的に透明な溶液を測定するための規格ASTM D-5386-93bおよびEN1557に定義されている)の測定に基づく色は、32.3から18.2に減少した(47%除去)。

12kgの炭素処理されたリッチ濃縮物をロータリーエバポレーションにより6kgまで減少させ、熱水コイルおよび8Lの加温されたMIBKを用いてあらかじめ50 に加温された30Lガラス反応器に移した。濃縮物を移す直前にMIBKを排出させた。

コイルに送る熱水を遮断し、7Lのヘプタンを25分間かけて攪拌しながら濃縮物に添加した。ヘプタン添加時の初期温度は55~35 の間であり、その後、自然冷却させた。ヘプタン添加の終了時、グリコールをコイルに導入し、温度を4 まで低下させて結晶化させた。混合物を60分間攪拌した。

ブフナー濾過により結晶を回収し、室温でケーキを2Lのヘプタンで洗浄した。ステンレス鋼トレイ上、真空下、周囲温度で生成物を一晩乾燥させ、淡色クリーム状自由流動性顆粒状結晶を得た(97.7%プロイロムチリン類)(段階収率88.3%)。

【0076】

実施例6

酢酸エチル再結晶によるムチリン不純物の減少

12gのプロイロムチリン類の結晶を100mlの酢酸エチルに溶解させた。溶液を20% w/wまで濃縮させ、50 の水浴中に入れられた50ml丸底フラスコに移した。水浴温度を20 まで低下させ、30分間かけて攪拌しながら45mlのヘプタンを添加した。その後、氷浴中で結晶を60分間攪拌した。再結晶生成物を濾過により回収し、周囲温度でケーキを10mlヘプタンで洗浄した。真空下、周囲温度で生成物を一晩乾燥させ、86.2%プロイロムチリンおよび2.9%ムチリン14-アセテートを含有する白色微結晶を得た。ムチリン14-アセテートの減

10

20

30

40

50

少は77.0%であった(段階収率82.1%)。

【0077】

実施例7

MIBK再結晶によるムチリン不純物の減少

ムチリン14-アセテートを含有する30gのプロイロムチリン類を、60 に制御されたジャケット付きガラス反応容器中で、攪拌しながら80ml MIBKに溶解させた。溶解時、容器を密閉して大気を遮断した。固体が十分に溶解されたとき、プロイロムチリン溶液の温度を60 に保持しながら、周囲温度の80mlのヘプタンを15~20分間かけて滴下漏斗から添加した。ヘプタン添加の終了時、スラリーを600mlガラスビーカーに移し、クリングフィルムで覆い、氷浴中で3時間攪拌した。No.54 Whatman濾紙に通して真空濾過することにより再結晶生成物を回収し、40mlの3:1ヘプタン/MIBK混合液でケーキをin situで洗浄した。真空を用いて濾紙上でケーキを吸引乾燥させ、その後、トレー上に配置して、わずかなエアブリードを行いながら真空下で室温オープン中で一晩乾燥させた。このプロセスにより、1.5% w/wのムチリン14-アセテートを含有する22.3gの白色結晶生成物を得た(重量収率74.5%、プロイロムチリンとしての収率81.2%、84%の14-ムチリンアセテート除去)。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/GB 03/03452
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12P15/00 C07C49/513		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12P C07C		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PALMA N ET AL: "PLEUROMUTILIN RELATED METABOLITES PRODUCED BY SUBMERGED CULTURE OF THE BASIDIOMYCETOUS GENUS CLITOPILUS KUMMER" PROCEEDINGS OF EUROPEAN CONGRESS BIOTECHNOLOGY, XX, XX, vol. 1, 1984, pages 533-542, XP002047840	1, 2, 4-7, 11, 12
Y	page 533 - page 535	3, 21, 29-33
Y	KAVANAGH, FREDERICK ET AL.: PROC. NAT. ACAD. SCI. USA, vol. 37, 1951, pages 570-574, XP0001091347 cited in the application page 570, paragraph 5 - page 571 ----- -/-	3, 21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *B* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 18 December 2003		Date of mailing of the international search report 07/01/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Krische, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 03/03452

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/21855 A (SMITHKLINE BEECHAM) 6 May 1999 (1999-05-06) cited in the application claims 1,5 -----	29-32
Y	WO 01/074788 A (SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB)) 11 October 2001 (2001-10-11) cited in the application claims 1,10 -----	29,33
Y	US 4 247 542 A (MICHEL KARL H ET AL) 27 January 1981 (1981-01-27) cited in the application claims 1,2; example 4 column 5, line 1 - column 6, line 58 -----	1,2,4-6, 8-10,13, 14
Y	CH 650 531 A (RICHTER GEDEON VEGYESZET) 31 July 1985 (1985-07-31) column 1, line 46 - column 4, line 14 -----	1,2,4-6, 8-10,13, 14

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (May 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 03/03452

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9921855	A	06-05-1999	AU 742167 B2	20-12-2001
			AU 9636198 A	17-05-1999
			BR 9814747 A	20-11-2001
			CA 2307551 A1	06-05-1999
			CN 1283197 T	07-02-2001
			EP 1028961 A1	23-08-2000
			WO 9921855 A1	06-05-1999
			HU 0004040 A2	28-05-2001
			JP 2001521033 T	06-11-2001
			NO 20002173 A	05-06-2000
			NZ 504203 A	26-11-2002
			PL 340254 A1	29-01-2001
			TR 200001203 T2	21-08-2000
			US 6281226 B1	28-08-2001
ZA 9809767 A	28-04-2000			
WO 0174788	A	11-10-2001	AU 6382701 A	15-10-2001
			BR 0109809 A	21-01-2003
			CA 2405132 A1	11-10-2001
			CN 1427827 T	02-07-2003
			CZ 20023290 A3	12-03-2003
			WO 0174788 A1	11-10-2001
			EP 1268443 A1	02-01-2003
			HU 0300370 A2	28-06-2003
			JP 2003529593 T	07-10-2003
			NO 20024745 A	19-11-2002
			US 2003114674 A1	19-06-2003
			US 4247542	A
CH 650531	A	31-07-1985	HU 183266 B	28-04-1984
			BE 891421 A1	10-06-1982
			CH 650531 A5	31-07-1985
			CS 250211 B2	16-04-1987
			FR 2496123 A1	18-06-1982
			IT 1142098 B	08-10-1986
			JP 1041314 B	05-09-1989
			JP 1556624 C	23-04-1990
JP 57150398 A	17-09-1982			

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 C 67/52	C 0 7 C 67/52	
C 0 7 C 67/56	C 0 7 C 67/56	
C 0 7 C 67/58	C 0 7 C 67/58	
C 0 7 C 69/675	C 0 7 C 69/675	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72) 発明者 リース, マイケル, ジョン

イギリス国 シーエム 1 9 5 エイダブリュ, エセックス, ハーロウ, サード アベニュー, ニュー フロンティアーズ サイエンス パーク サウス, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 ロビンス, キース, グラハム

イギリス国 ビーエヌ 1 4 8 キューエイチ, ウェスト サセックス, ウォーシング, クラレンドン ロード, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 ステファンスカ, アンナ, ルイーザ

シーノオー イギリス国 ティーダブリュ 8 9 ジーエス, ミドルセックス, プレントフォード, グレート ウェスト ロード 9 8 0, シーアイピー シーエヌ 9 2 5 . 1, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 シルケトル, ジャン, エドワード

イギリス国 ビーエヌ 1 4 8 キューエイチ, ウェスト サセックス, ウォーシング, クラレンドン ロード, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 ヴァーラル, マイケル, シドニー

シーノオー イギリス国 ティーダブリュ 8 9 ジーエス, ミドルセックス, プレントフォード, グレート ウェスト ロード 9 8 0, シーアイピー シーエヌ 9 2 5 . 1, グラクソスミスクライン

(72) 発明者 イエアンドル, デイヴィッド, アラン

イギリス国 ビーエヌ 1 4 8 キューエイチ, ウェスト サセックス, ウォーシング, クラレンドン ロード, グラクソスミスクライン

F ターム(参考) 4B064 AC38 CA05 CE08 CE09 DA02

4C086 AA01 AA04 BC17 CB17 ZB35 ZB37

4H006 AA02 AD15 AD17 BB11 BB16 BB17 BJ30 BN20 BP10 BR70