

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C12P 21/02
C07K 9/00

(45) 공고일자 1995년09월 18일
(11) 공고번호 특1995-0010461

(21) 출원번호	특 1986-0011488	(65) 공개번호	특 1987-0010194
(22) 출원일자	1986년 12월 29일	(43) 공개일자	1987년 11월 30일
(30) 우선권주장	8608809 1986년 04월 11일 영국(GB)		
(71) 출원인	그루포 레페티트 에스. 피. 에이. 레나토 스 가르비 이탈리아공화국, 20159 밀라노, 비아 무라트 23		

(72) 발명자 엔리코 셀바
이탈리아공화국, 27027 그로펠로 카이롤리(피 브이), 비아 카를로 칸토니 35
에르네스토 리바
이탈리아공화국, 20122 밀라노, 코스소 디 포르타로마나 119
지오반니 카싸니
이탈리아공화국, 27100 파비아, 비아 비타디니 3
프란체스코 파렌티
이탈리아공화국, 20020 라이나테 (엠아이), 비아 벤베누토 셀리니 24

(74) 대리인 장수길, 이세진

심사관 : 이세진 (책자공보 제4125호)

(54) 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 및 항생물질 A 40926 아글리콘의 제조 방법

요약

내용 없음.

대표도

도 1

명세서

[발명의 명칭]

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 및 항생물질 A 40926 아글리콘의 제조 방법

[도면의 간단한 설명]

제 1 도는 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB의 U.V. 스펙트럼.

제 2 도는 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB의 I.R. 스펙트럼.

제 3 도는 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB의 ¹H-NMR 스펙트럼.

제 4 도는 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A의 I.R. 흡수 스펙트럼.

제 5 도는 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A의 ¹³C-NMR 스펙트럼.

제 6 도는 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₀의 I.R. 흡수 스펙트럼.

제 7 도는 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₀의 ¹H-NMR 스펙트럼.

제 8 도는 항생물질 A 40926 아글리콘의 U.V. 흡수 스펙트럼.

제 9 도는 항생물질 A 40926 아글리콘의 I.R. 흡수 스펙트럼.

제 10도는 항생물질 A 40926 아글리콘의 ¹H-NMR 스펙트럼.

제 11도는 항생물질 A 40926 인자 A의 U.V. 흡수 스펙트럼.

제 12도는 항생물질 A 40926 인자 A의 I.R. 흡수 스펙트럼.

- 제13도는 항생물질 A 40926 인자 A의 ¹H-NMR 스펙트럼.
- 제14도는 항생물질 A 40926 인자 B의 U.V. 흡수 스펙트럼.
- 제15도는 항생물질 A 40926 인자 B의 I.R. 흡수 스펙트럼.
- 제16도는 항생물질 A 40926 인자 B의 ¹H-NMR 스펙트럼.
- 제17도는 항생물질 A 40926 인자 PA의 U.V. 흡수 스펙트럼.
- 제18도는 항생물질 A 40926 인자 PA의 I.R. 스펙트럼.
- 제19도는 항생물질 A 40926 인자 PA의 ¹H-NMR 스펙트럼.
- 제20도는 항생물질 A 40926 인자 PB의 U.V. 흡수 스펙트럼.
- 제21도는 항생물질 A 40926 인자 PB의 I.R. 흡수 스펙트럼.
- 제22도는 항생물질 A 40926 인자 PB의 ¹H-NMR 스펙트럼.
- 제23도는 항생물질 A 40926 인자 PB의 ¹H-NMR 스펙트럼.
- 제24도는 항생물질 A 40926 만노실 아글리콘의 U.V. 흡수 스펙트럼.
- 제25도는 항생물질 A 40926 만노실 아글리콘의 I.R. 흡수 스펙트럼.
- 제26도는 항생물질 A 40926 만노실 아글리콘의 ¹H-NMR 스펙트럼.

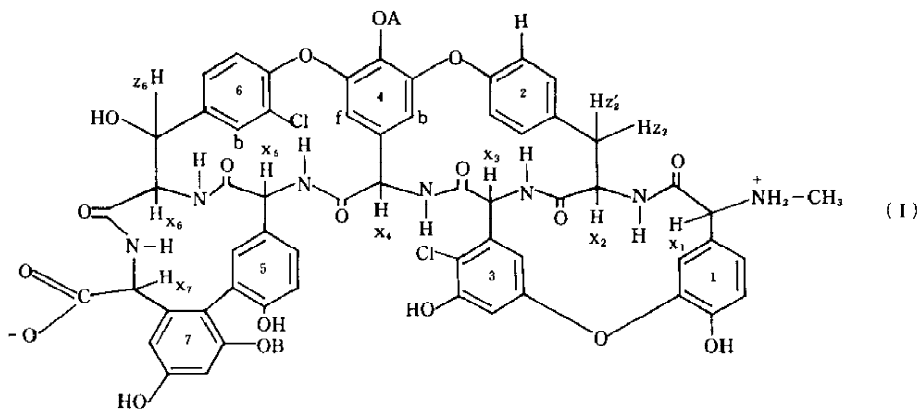
[발명의 상세한 설명]

본 발명은 항생물질 A 40926 복합체 또는 그의 인자로부터 출발하는 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₀, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₁, 항생물질 A 40926 아글리콘 및 그의 부가염의 제조 방법에 관한 것이다.

항생물질 A 40926 복합체 및 그의 인자들은 그람 양성균 및 나이세리아에속(Neisseriae) 균주에 대하여 유효한 항생물질로서 악티노마두라(Actinomadura) 균주에 의해 생성된다.

A 40926를 생산하는 악티노마두라속 균주는 부다페스트 조약의 규정 하에서 ATCC(American Type Culture Collection-미합중국, 20852 메릴랜드주, 록빌, 파크로운 드라이브 12301 소재)에 1984년 6월 8일자로 기탁되었다(이 균주는 1985년 12월 5일자로 한국과학기술원에 기탁번호 제KCTC. 8171p 호로 기탁되었고, 1985년 10월 11일자 특허출원 제7474호와 관련하여 1985년 12월 6일자로 대한민국 특허청에 미생물 수탁번호 통지서를 제출한 바 있음).

항생물질 A 40926 및 그의 인자들은 물론 이를 생성하는 미생물 및 이들의 제조 방법은 유럽 특허 공개 제177882호에 기재되어 있다. 그의 이화학적 자료에 기초하고, 공지된 항생 물질의 구조를 참고로 하여 A 40926 인자들을 다음과 같은 일반식으로 표시할 수 있다[번호를 매기는 방식은 제이. 윌리엄스(J. Williams)의 J.A.C.S., 제106호, 제4895-4902페이지 (1984년)에 기재되어 있는 방식과 유사하다].



상기 식 중, A는 N(C₁₁-C₁₂)아실아미노글루쿠로닐기이고, B는 만노실 또는 아세틸만노실기이다.

더욱 구체적으로, 항생물질 A 40926 인자 A는 상기 일반식(1)에 있어서, A가 운데카노일아미노글루쿠로닐기, B가 만노실기인 화합물이고, 항생물질 A 40926 인자 B₀는 A가 이소도데카노일아미노글루쿠로닐기이고 B가 만노실기인 화합물이며, 항생물질 A 40926 인자 B₁은 A가 도데카노일아미노글루쿠로닐기이고 B가 만노실기인 화합물이다.

항생 물질 A 40926 인자 PA 및 인자 PB는 만노스 단위가 아세틸-만노스 단위로 대체되었다는 점에서 대응하는 인자 A 및 B와 상이하다.

항생물질 A 40926은 복합 살균물질로서 그의 5개의 성분들은 단리되어 인자 PA, PB, A, B 및 B₀로 동정되었다.

항생물질 A 40926인자 PA 및 PB는 최소한 특정 발효 조건하에서, A 40926을 생산하는 미생물의 주요한 항생 효과 생성물이다.

항생물질 A 40926 인자 A 및 B는 주로 항생물질 A 40926 인자 PA 및 인자 PB 각각의 형질 전환 생성물이며, 흔히 발효 브로스 중에 이미 존재한다.

본 발명자들은 혐기성 조건 하에서 항생 물질 A 40926 인자 PA를 항생물질 A 40926 인자 A로 형질 전환시킬 수 있고, 항생물질 A 40926 인자 PB를 항생물질 A 40926 인자 B로 형질 전환시킬 수 있음을 발견하였다.

그 결과로서, 발효 브로스 또는 항생물질 A 40926 함유 추출물 또는 그의 농축물을 혐기성 조건하에서 일정 시간 동안 (예를 들면, 친핵성 염기의 수용액, pH 9초과에서 철야) 방치시킬 경우, 항생물질 A 40926 복합체가 얻어지는데, 이 중에는 항생물질 A 40926 인자 A와 인자 B가 풍부하다.

본 명세서 및 특허 청구 범위에 있어서, "항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘"은 항생물질 A 40926 N-아실아미노 글루쿠로닐 아글리콘 인자 AB 및(또는) 그의 단일 인자(예, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₀ 및 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₁)를 의미한다.

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB(비부가염 형태)는 다음과 같은 특성을 갖는다.

A) 다음과 같은 최대 흡수치를 나타내는 자외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제 1 도에 나타내었음) :

	λ_{max} (nm)
a) 0.1N HCl	282
b) 인산염 완충액 pH 7.4	282
	310(쇼울더)
c) 0.1N KOH	302

B) 다음과 같은 최대 흡수치(cm^{-1})를 나타내는 적외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제 2 도에 나타내었음) : 3700-3100, 3000-2800(뉴졸), 1650, 1620-1550, 1500, 1460(뉴졸), 1375(뉴졸), 1300, 1250-1180, 1150, 1060, 1010, 970, 930, 840, 820.

C) DMSO d₆ (헥사데테로디메틸술폭시드)+CF₃COOH 중에서 내부 표준 물질(0.00ppm)로서 TMS를 사용하여 기록했을 때 270MHz에서 다음과 같은 시그널(ppm) 군을 나타내는 ²H-NMR 스펙트럼(이 스펙트럼은 제 3 도에 나타내었음)(δ =ppm) : 0.84, d 및 t[이소프로필 CH₃'s 및 말단 CH₃], 1.14m[(CH₂)_n], 1.44m[-CH₂-C-CO 및 이소프로필 CH], 2.00t[-CH₂-(CO)], 2.5s(DMSO d₅), 2.5s(N-CH₃), 2.93m[CH, (Z2)], 3.33m[CH, (Z'2)], 3.20-3.80m[당 CH's], 5.34d[아실아미노글루쿠론산의 아노머 양성자], 4.10m(X6), 4.33d, (X5), 4.43d(X7), 4.9m(X2), 5.1(4F 및 Z6), 5.4s(X1), 5.58d(X4), 5.7s(4B), 6.06d(X3), 7.73s(6B), 6.26-8.42s 및 m[방향족 CH's 및 펩티드 NH's], 8.70-10.5br s[페놀 OH's 및 NH₂⁺]

br=브로드

d=이중선

m=다중선

s=단일선

t=삼중선

D) 다음과 같은 조건 하에서 역상 HPLC에 의해 분석했을 때 테이코플라닌(Teicoplanin) A₂ 성분 2(Rt=20.3qns)에 대한 체류 시간(Rt)이 1.20 및 1.30임.

컬럼 : Ultrasphere ODS(5 μ m) Altex[백크만사 (Beckman Co.)제품]4.6mm

(내경)×250mm

예비컬럼 : Brownlee Labs RP 18(5 μ m)

용출제 A : CH₃CN
 (2.5g/l) NaH₂PO₄ · H₂O 10% } pH 6.0으로 조절
 90% }
 용출제 B : CH₃CN 70% } pH 6.0으로 조절
 (2.5g/l) NaH₂PO₄ · H₂O 30% }

용출 : 용출제 A중의 용출제 B 5 내지 60%의 선형 구배로 40분 이내에 용출시킴.

유속 : 1.8ml/분

U.V. 검출기 : 254nm

내부 표준 물질 : 테이코플라닌 A₂ 성분 2[그루포 레페티트 에스. 피. 에이.(Gruppo Lepetit S.p.A) 제품]

E) 염을 형성할 수 있는 산 관능기.

F) 염을 형성할 수 있는 아미노 관능기.

G) 중심 핵에 결합된 만노스 단위가 없음.

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A(비부가염 형태)는 다음과 같은 특성을 갖는다.

A) 다음과 같은 최대 흡수치를 나타내는 자외선 흡수 스펙트럼 :

	λ max (nm)
a) 0.1N HCl	282
b) 인산염 완충액 pH 7.4	282
	310(쇼올더)
c) 0.1N KOH	302

B) 다음과 같은 최대 흡수치(cm⁻¹)를 나타내는 적외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제 4 도에 나타내었음) : 3700-3000, 3000-2800, 1650, 1585, 1505, 1460(뉴졸), 1375(뉴졸), 1295, 1230, 1210, 1150, 1070, 1060, 1010, 845, 820, 720(뉴졸).

C) DMSO d₆ (헥사데우테로디메틸술폭시드) 중에서 내부 표준 물질 (0.00ppm)로서 TMS를 사용하여 기록했을 때 270MHz에서 다음과 같은 시그널(ppm) 군을 나타내는 ²H-NMR 스펙트럼(이 스펙트럼은 제 5 도에 나타내었음)(δ =ppm) : 0.85t(말단 CH₃), 1.0-1.3 (지방족 CH₂'s), 1.42m((OC-C)CH₂), 2.00t((CO)CH₂), 2.35s(NCH₃), 2.49s(DMSO d₆), 2.82m(Z2), 2.8-3.8(당의 양성자 및 Z'2) ; 4.12m(X6), 4.56s(X1), 4.34d(X5), 4.41d(X7), 4.96m(X2), 5.08-5.12(4F 및 Z6) ; 5.40d(아실아미노글루쿠론산의 아노머 양성자), 5.58d(X4), 5.74s(4B), 6.05d(X3), 7.75s(6B), 6.25-8.40s, d 및 m (방향족 CH's 및 펩티드 NH's).

D) 다음과 같은 조건 하에서, 역상 HPLC에 의해 분석했을 때 테이코플라닌 A₂ 성분 2(Rt=20.3분)에 대한 체류 시간(Rt)이 1.20임.

컬럼 : Ultrasphere ODS(5 μ m) Altex[백크만사 제품]

4.6mm(내경)×250mm

예비컬럼 : Brownlee Labs RP 18(5 μ m)

용출제 A : CH₃CN
 (2.5g/l) NaH₂PO₄ · H₂O 10% } pH 6.0으로 조절
 90% }
 용출제 B : CH₃CN 70% } pH 6.0으로 조절
 (2.5g/l) NaH₂PO₄ · H₂O 30% }

용출 : 용출제 A중의 용출제 B 5 내지 60%의 선형 구배로 40분 이내에 용출시킴.

유속 : 1.8ml/분

U.V. 검출기 : 254nm

내부 표준 물질 : 테이코플라닌 A₂ 성분 2[그루포 레페티트 에스. 피. 에이. 제품]

- E) FAB-MS로 측정된 분자량은 약 1554임.
- F) 염을 형성할 수 있는 관능기.
- G) 염을 형성할 수 있는 아미노 관능기.
- H) 중심 핵에 결합된 만노스 단위는 없음.

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₀ (비부가염 형태)는 다음과 같은 특성을 갖는다 :

A) 다음과 같은 최대 흡수치를 나타내는 자외선 흡수 스펙트럼 :

	λ_{\max} (nm)
a) 0.1N HCl	282
b) 인산염 완충액 pH 7.4	282
	310(쇼울더)
c) 0.1N KOH	302

B) 다음과 같은 최대 흡수치(cm^{-1})를 나타내는 적외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제 6 도에 나타내었음) : 3700-3100, 3000-2800(뉴줄), 1650, 1585, 1505, 1460(뉴줄), 1375(뉴줄), 1295, 1230, 1210, 1150, 1060, 1010, 980, 840, 820, 720(뉴줄).

C) DMSO d₆ (핵사듀테로디메틸술폰) 중에서 내부 표준 물질 (0.00ppm)로서 TMS를 사용하여 기록했을 때 270MHz에서 다음과 같은 시그널(ppm) 군을 나타내는 ²H-NMR 스펙트럼(이 스펙트럼은 제 7 도에 나타내었음) : 0.84d(이소프로필 CH₃'s), 1.0-1.3(지방족 CH₂'s), 1.3-1.6((OC-C)-CH₂ 및 이소프로필 -CH), 2.00t((CO)CH₂), 2.32s(NCH₃), 2.49s(DMSO d₅), 2.82m(Z2), 2.9-3.8(당의 양성자), 4.12m(X6), 4.44s(X1), 4.33d(X5), 4.37d(X7), 4.95m(X2), 5.06-5.10(4F 및 Z6), 5.38d(아실아미노글루쿠론산의 아노머 양성자), 5.59d(X4), 5.72s(4B), 6.05d(X3), 7.74s(6B), 6.27-8.5(방향족 CH's 및 펩티드 NH's).

D) 다음과 같은 조건 하에서, 역상 HPLC에 의해 분석했을 때, 테이코플라닌 A₂ 성분 2(Rt=20.3분)에 대한 체류 시간(Rt)이 1.30임.

컬럼 : Ultrasphere ODS(5 μ m) Altex[백크만사 제품]

4.6mm(내경)×250mm

예비컬럼 : Brownlee Labs RP 18(5 μ m)

용출제 A : CH ₃ CN	10%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	90%	
용출제 B : CH ₃ CN	70%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	30%	

용출 : 용출제 A중의 용출제 B 5 내지 60%의 선형 구배로 40분 이내에 용출시킴.

유속 : 1.8ml/분

U.V. 검출기 : 254nm

내부 표준 물질 : 테이코플라닌 A₂ 성분 2[그루포 레페티트 에스. 피. 에이. 제품]

- E) FAB-MS로 측정된 분자량은 약 1568임.
- F) 염을 형성할 수 있는 산 관능기.
- G) 염을 형성할 수 있는 아미노 관능기.
- H) 중심 핵에 결합된 만노스 단위는 없음.

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₁은 FAB-MS로 측정된 분자량이 약 1568이며, 실질적으로 이것이 상기 NMR시스템에서 n-프로필 기능의 메틸기에 기인하여 0.84 δ ppm에서 삼중선을 가지며, 상기 시스템에 있어서, 테이코플라닌 A₂ 성분 2에 대한 체류 시간이 1.32인 것을 갖는 것을 제외하고는, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₀에 대하여 기재된 바와 동일한 이화학적 특성을 갖는다.

항생물질 A 40926 아글리콘은 다음과 같은 특성을 갖는다 :

A) 다음과 같은 최대 흡수치를 나타내는 자외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제 8 도에

나타내었음) :

	λ max (nm)
a) 0.1N HCl	280
b) 인산염 완충액 pH 7.4	280
	310(쇼올더)
c) 0.1N KOH	299

B) 다음과 같은 최대 흡수치(cm^{-1})를 나타내는 적외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제 9 도에 나타내었음) : 3700-3100, 3000-2800(뉴졸), 1655, 1620-1550, 1500, 1460(뉴졸), 1375(뉴졸), 1300, 1205, 1145, 1010, 970, 930, 840.

C) DMSO d_6 (헥사데로디메틸설폭시드)+CF₃COOH 중에서 내부 표준 물질 (0.00ppm)로서 TMS를 사용하여 기록했을 때 270MHz에서 다음과 같은 시그널(ppm) 군을 나타내는 ²H-NMR 스펙트럼(이 스펙트럼은 제10도에 나타내었음) (δ =ppm) : 2.51s(DMSO d_5), 2.50s(NCH₃), 2.88m(Z2), 3.33m(Z'2), 4.10m(X6), 4.34d(X5), 4.43d(X7), 4.93m(X2), 5.04s(4F), 5.09s(Z6), 5.54d(X4), 5.75s(4B), 6.05d(X3), 7.76s(6B), 6.3-8.4(방향족 및 펩티드 NH's).

D) 다음과 같은 조건 하에서, 역상 HPLC에 의해 분석했을 때, 테이코플라닌 A₂ 성분 2(Rt=20.3분)에 대한 체류 시간(Rt)이 0.59임.

컬럼 : Ultrasphere ODS(5 μ m) Altex[백크만사 제품]

4.6mm(내경)×250mm

예비컬럼 : Brownlee Labs RP 18(5 μ m)

용출제 A : CH ₃ CN	10%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	90%	
용출제 B : CH ₃ CN	70%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	30%	

용출 : 용출제 A중의 용출제 B 5 내지 60%의 선형 구배로 40분 이내에 용출시킴.

유속 : 1.8ml/분

U.V. 검출기 : 254nm

내부 표준 물질 : 테이코플라닌 A₂ 성분 2[그루포 레페티트 에스. 피. 에이. 제품]

동일한 조건 하에서, 항생물질 L 17054(본건 출원인인 그루포 레페티트(Gruppo Lepetit)의 유럽 특허출원 공개 제119575호)에 대한 체류시간은 1.42임.

E) FAB-MS로 측정된 분자량은 약 1211임.

F) 염을 형성할 수 있는 산 관능기.

G) 염을 형성할 수 있는 아미노 관능기.

H) 중심 핵에 결합된 만노스 단위는 없음.

이화학적 특성에 기초하고, 동일한 부류의 공지된 항생 물질의 구조를 참고하여, 상기 일반식(1)의 화합물 중 A가 N-(C₁₁-C₁₂)아실아미노글루쿠로닐기이고 B가 수소인 화합물은 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘에 해당될 수 있다.

더욱 구체적으로, 상기 일반식(1)의 화합물 중 A가 n-운데카노일아미노글루쿠로닐기이고 B가 수소인 화합물은 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A에 속할 수 있고, A가 이소도데카노일아미노글루쿠로닐기이고 B가 수소인 화합물은 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₀에 해당할 수 있고, A가 n-도데카노일아미노글루쿠로닐기이고 B가 수소인 화합물은 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₁에 해당할 수 있다. 후자는 항생물질 A 40926 인자 B₁으로부터 본 발명의 공정에 의하여 얻어지며, 이 40926 인자 B₁은 유럽 특허출원공개 제177882호에 기재되고, 이하에 보고된 역상 시스템에서 테이코플라닌 A₂ 성분 2에 대한 Rt가 1.27인 항생물질 A 40926 인자 B의 성분이다. 이 인자 B₁은 항생물질 A 40926 인자 B로 부터 인자 B₀(주요인자)의 분리 후 얻어진다.

상기 일반식(1)의 화합물 중, A와 B가 수소인 화합물은 항생물질 A 40926 아글리콘에 해당할 수 있다.

본 명세서 및 특허 청구의 범위에 있어서, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 또는 그의 인자 또는 항생물질 A 40926 아글리콘을 언급할 때에는, 가능한 산 및 염기성 부가염은 물론 "내부염"의 의미도 포함된다.

본 발명의 화합물의 항균 작용은 상이한 미생물 배양에 대한 표준 희석 시험에 의해서 시험관 내에서 입증할 수 있다.

MIC(최소 억제 농도)를 측정하기 위한 배기 및 성장 조건은 다음과 같다. 즉, 포도상구균(*Staphylococci*), 대변 연쇄상구균(*Strep. faecalis*) 및 그람-음성균[대장균(*Escherichia coli*)]에 대해서 24시간 동안 아이소센시테스트 브로스(Isosensitest broth)[옥소이드(Oxoid)제품] ; 기타 연쇄상 구균종에 대해서 24시간 동안 토드-휴이트 브로스(Todd-Hewitt broth)[디프코(Difco)제품] ; 임균(*Neisseria gonorrhoeae*)에 대해서 CO₂-풍부 분위기 하에서 48시간 동안 GC 염기 브로스(디프코 제품)+1% Isovitalex(BBL) ; 인플루엔자균(*Haemophilus influenzae*)에 대해서 48시간 동안 브레인 하트 브로스(Brain Heart broth)(디프코 제품)+1% 서플리먼트 씨(Supplement C)(디프코 제품) ; 웰치균(*Clostridium perfringens*)에 대해서 혐기성 분위기 하에서 24시간 동안 AC 브로스(디프코 제품) ; 기타 혐기성[씨. 디피실(*C. difficile*), 프로피오니박테륨 아크네스(*Propionibacterium acnes*), 박테로이데스 프라길리스(*Bacteroides fragilis*)]에 대해서 혐기성 분위기 하에서 48시간 동안 윌킨스-살그렌(Wilkins-Chalgren) 한천[티.티. 윌킨스(T.D. Wilkins)와 에스. 살그렌(S. Chalgren), Antimicrod. Ag. Chemother. 제10권 제926페이지 (1976년 참조)] ; 마이코플라스마 갈리셉티쿰(*Mycoplasma gallisepticum*)에 대해서 48시간 동안 PLO브로스(디프코 제품)+10%말혈청+1% 글루코오스 ; 유. 우레알리티쿰(*U. urealyticum*)에 대해서 24시간 동안, 알. 티. 에반스(R.T. Evans)와 디. 테일러-로빈슨(D. Taylor-Robinson)의 방식(J. Antimicrob. Chemother. 제 4 호, 제57페이지 참조)에서와 같이 보충한 PLO브로스를 사용한다. 배양온도는 37°C이었다. 접종물은 다음과 같다. 즉 엠. 갈리셉티쿰(*M. gallisepticum*)에 대해서 48시간 브로스 배양물 1%(v/v), 유. 우레알리티쿰에 대해서 약 10⁴ 색 변화 단위/ml, 기타 브로스 희석 MICs에 대해서 약 10⁴-10⁵ 콜로니-형성 단위/ml, 한천 희석 MICs[씨. 디피실(*C. difficile*), 피. 아크네스(*P. acnes*), 농양균(*B. fragilis*)]에 대해서 10⁴-10⁵ 박테리아/스포트(멀티포인트 접종기로 접종기로 접종함).

일부의 미생물에 대한 최소 억제 농도(MIC, µg/ml)를 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

균 주	M.I.C(µg/m) 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB	항생물질 A 40926 아글리콘
황색포도상구균 L165 (<i>Staph. aureus</i>)	0.13	0.13
황색포도상구균 L165 (10 ⁶ cfu/ml) (<i>Staph. aureus</i>)	0.13	0.25
표피포도상구균 L147 ATCC 12228(웅고 효소 음성) (<i>Staph. epidermids</i>)	0.13	0.13
화농연쇄상구균 L49 C203 (<i>Strep. pyogenes</i>)	0.06	0.5
폐렴 연쇄상구균 L44 UC41 (<i>Strep. pneumoniae</i>)	0.13	1
대변연쇄상구균 L149 ATCC 7080 (<i>Strep. faecalis</i>)	0.13	0.5
녹색연쇄상구균 L796(임상단리품) (<i>Strep. mitis</i>)	0.06	0.5
웰치균 L290 ISS 30543 (<i>Clostridium perfringens</i>)		0.25

클로스트리듐 디피실 L1363 ATCC 9689 (<i>Clostridium difficile</i>)	0.25	1
프로피오니박테리움 아크네스 L1014 ATCC 6919 (<i>Propionibacterium aenes</i>)	0.06	1
박테로이데스 프라길리스 L1010 ATCC 23745 (<i>Bacteroides fragilis</i>)	16	32
임균 L997 ISM68/126 (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	4	16
인플루엔자균 L970 b형 ATCC 19418 (<i>Haemophilus influenzae</i>)		32
대장균 L47 SKF 12140 (<i>Escherichia coli</i>)	>128	128
마이코플라스마 갈리세프티쿰 L431 S6 Weybridge (<i>Mycoplasma gallisepticum</i>)	64	>128
황색포도상구균 L165	0.06	0.06
황색포도상구균 L165(10 ⁹ cfu/ml)	0.13	0.13
스타필로코커스 헤몰리티쿠스 L602(응고 효소 음성) (<i>Staph. haemolyticus</i>)	0.25	0.25
표피포도상구균 L147 ATCC 12228(응고 효소 음성)	0.06	0.06
화농연쇄상구균 L29 C203	0.06	0.06
채염연쇄상구균 L44 UC41	0.06	0.06
대변연쇄상구균 L149 ATCC 7080	0.13	0.13
녹색연쇄상구균 L796(임상 단리물)	0.06	0.06
렙치균 L290 ISS 30543	0.03	0.03
임균 L997 ISM68/126	8	8
인플루엔자균 L970 b형 ATCC 19418	32	32
대장균 L47 SKF 12140	> 128	>128
우레아플라스마 우레알티쿰 L 1479(임상 단리물) (<i>Ureaplasma urealyticum</i>)	>128	>128

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB 및 그의 인자들은 특히 응고 효소음성인 포도상구균에 대하여 효과적인 것으로 밝혀졌다. 표피포도상구균 및 스타필로코커스 헤몰리티쿠스의 일련의 임상 분리주에 대한 M.I.C($\mu\text{g/ml}$)를 이하에 나타내었다.

[표 11]

균 주	M.I.C. ($\mu\text{g/ml}$) 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘복합체 AB
표피포도상구균 L 393	0.06
표피포도상구균 L 408	0.13
표피포도상구균 L 410	0.06
스타필로코커스 헤몰리티쿠스 L381	0.25
스타필로코커스 헤몰리티쿠스 L382	0.13
스타필로코커스 헤몰리티쿠스 L383	0.5
스타필로코커스 헤몰리티쿠스 L403	0.25

또한, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB의 M.I.C.₉₀ ($\mu\text{g/ml}$), 예를 들면 응고 처리된 효소 음성인 포도상구균의 임상 분리주 36개를 적어도 90% 억제하는 농도는 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 인 것으로 판명되었다.

본 발명의 화합물의 항균 작용은 또한 마우스의 실험적인 패혈증에서도 확인되었다.

대조군 및 처리군에 체중 18-22g의 CD-1 마우스[찰스 리버(Charles River)종] 10마리를 포함시켰다. 이들을 화농연쇄상구균(*S. pyogenes*) C 203 (L49)의 철야 배양물을 멸균 펄톤화된 염수로 희석시켜 제조한 박테리아 현탁액 0.5ml를 복강 내로 주입하여 감염시켰다. 접종물을 조절하여 미처리 동물은 48시간 이내에 패혈증으로 죽도록 하였다. 시험 화합물은 감염 직후 피하로 투여하였다. 7일째에 각각의 투여량에서 생존 동물의 백분율로부터 스피어맨(Spearman)과 캐르버(Karber)의 방법으로 ED₅₀ (mg/kg)을 계산하였다. [디.제이 피네이(D.J. Finney)의 "Statistical Methods in Biological Assay", 그리핀(Griffin) 출판사, 제524페이지(1952년) 참조].

이들 조건 하에서, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB와 항생물질 A 40926 아글리콘의 ED₅₀ 값은 각각 0.54 및 6.2mg/kg이었다.

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB, 그의 인자들 및 항생물질 A 40926 아글리콘은 산 및 염기성 관능기를 가지며, 종래 방법에 의하여 유기 및 무기 카운터 이온(counter ion)과의 염을 형성할 수 있다.

본 발명에 의한 화합물의 대표적인 적합한 산 부가염으로는 유기산 및 무기산, 예를들면 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 트리클로로아세트산, 숙신산, 시트르산,

아스코르브산, 락트산, 말레산, 푸마르산, 팔미트산, 콜산, 팜산, 정액산, 글루탐산, 장뇌산, 글루타르산, 글리콜산, 프탈산, 타르타르산, 라우르산, 스테아르산, 살리실산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, 소르브산, 피크르산, 벤조산, 신남산 등과 표준 반응에 의해 형성된 염이 포함된다.

염기의 대표적인 예로서는 알칼리금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물(예, 수산화나트륨, 수산화칼륨 및 수산화칼슘, 수산화마그네슘, 수산화바륨), 암모니아 및 지방족, 지환족, 방향족 유기 아민(예, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민 및 피콜린)을 들 수 있다.

본 발명에 의한 비-염(non-salt) 화합물을 대응하는 부가염으로 전환시키거나 또는 이와 역으로, 본 발명에 의한 화합물의 부가염을 비-염 형태로 전환시키는 것은 통상의 기술 범주 내에 있으므로 본 발명에 포함된다.

예를 들면, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB 및 (또는) 그의 인자들 및 항생물질 A 40926 아글리콘의 비-염 형태를 수용성 용매 중에 용해시키고, 여기에 선택된 산 또는 염기를 약간 몰 과량으로 첨가하여 대응하는 산 또는 염기 부가염으로 전환시킬 수 있다. 이어서 생성된 용액 또는 현탁액을 동결건조시켜서 목적하는 염을 회수한다.

최종 염이 비-염 형태가 용해되어 있는 용매 중에 불용성인 경우에는, 여기에 선택된 산 또는 염기를 화학양론적 양 또는 약간 몰 과량으로 첨가한 후 비-염 형태의 유기 용액으로부터 여과시켜서 회수한다.

이들 불용성 염의 예로서 칼슘염, 마그네슘염 및 바륨염을 들 수 있다.

비-염 형태는 대응하는 산성 또는 염기성 염을 수용성 용매 중에 용해시키고, 이어서 중화시켜 비-염 형태를 유리시켜 제조할 수 있다.

중화시킨 후 과량의 산 또는 염기를 제거시킬 필요가 있는 경우에는, 통상의 탈염법을 사용할 수 있다.

예를 들면, 실란화 실리카겔, 무관능성 폴리스티렌, 아크릴계의 포어(pore)조절 폴리덱스트란 수지(예, Sephadex LH 20) 또는 활성탄 상에서 컬럼 크로마토그래피를 사용하는 것이 편리할 수 있다. 불필요한 염을 수용액으로 용출시킨후, 목적 생성물을 물과 극성 또는 비극성 용매 혼합물의 선형 구배 또는 단계 구배(예, 아세토니트릴/물, 50 : 50에서 약 100% 아세토니트릴까지)에 의해 용출시킨다.

당 업계에 공지된 바와 같이, 정제 기술로서는 제약상 허용되는 산(또는 염기) 또는 제약상 허용되지 않는 산(또는 염기)과의 염 형성 방법을 사용하는 것이 편리할 수 있다. 염을 형성 및 단리시킨 후, A 40926 항생물질의 염 형태를 대응하는 비-염 형태 또는 제약상 허용되는 염으로 전환시킬 수 있다.

경우에 따라서, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB, 그의 인자 및 항생물질 A 40926 아글리콘의 염기 부가염이 물 및 친수성 용매중에 더 잘 용해될 수 있다.

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 및 항생물질 A 40926 아글리콘의 제조 :

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB, N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A, N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₀, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₁ 및 항생물질 A 40926 아글리콘은, 항생물질 A 40926 복합체 또는 단일 인자 또는 상기 인자들의 임의 비율의 혼합물, 예를 들면 A 40926 A, A 40926 B, A 40926 인자 PA, A 40926 인자 PB, A 40926 인자 B₀ 및 A 40926 인자 B₁의 조절된 산 가수분해에 의해 제조된다.

일반적으로, 이 가수분해는 적합한 유기 용매 중에서 강산 존재 하에서 행한다. 반응 온도 상당 범위로 변화시킬 수 있는데, 4 내지 100°C가 적합하며 25 내지 80°C가 가장 적합하다.

반응 시간은 특정 반응 조건에 따라 달라진다.

일반적으로, 반응 시간은 30분 내지 120시간이다.

그러한, 반응 경로는 TLC 또는 HPLC에 의해 추적될 수 있으므로, 숙련가는 출발 물질의 가수분해가 종결될 때와 회수 공정을 시작하여야 할 시기를 결정할 수 있다.

강산의 대표적인 예로서 다음과 같은 무기산 또는 유기산, 예를 들면, 할로겐화수소(예, 염화수소, 브롬화수소, 요오드화수소), 인산, 황산, 할로아세트산(예, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산, 클로로디플루오로아세트산 등)등이 있다.

적합한 유기 용매는 a) 적어도 부분적으로 출발물질을 용해시킬 수 있고, b) 일단 얻어진 생성물들이 분리시키거나 또는 통상적인 기술에 의하여 이들 용매로부터 분리시킬 수 있음, c) 어떤 경우이든 이들 용매가 반응 경로를 방해하지 않는 것이 바람직하다.

상기 유기 용매의 예로서, 양성자성 용매는 비양성자성 용매, 예를 들면, (C₁-C₄)알킬술폰시드(예, 디메틸술폰시드 및 디에틸술폰시드), (C₁-C₄)알킬포름아미드(예, 디메틸포름아미드, 디에틸포름아미드), 디옥산 테트라히드로푸란 및 유사한 용매를 들 수 있으며, 이 용매는 물론 선택된 산과 혼합될 수 있다.

일반적으로, 가수분해는 제한된 양의 물, 예를 들면 반응 혼합물의 0.1 내지 10%(w/w) 존재하에서 행한다. 이러한 물의 양은 출발 물질, 용매 및(또는) 시약중에 미리 포함시킬 수 있거나, 또는 필요에 따라서 특별히 첨가할 수 있다.

본 발명의 공정의 적합한 실시방법으로서는 40 내지 80°C의 온도에서 디메틸술폰/진한 염산의 혼합물을 사용하는 것이 대표적이다. 전형적으로 디메틸술폰/진한 염산 혼합물의 비는 8 : 2 내지 9.5 : 0.5이다. 적합한 진한 염산은 37%(w/w) 염산이다.

일반적으로, 반응 생성물은 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘과 아글리콘의 혼합물이다. 온도, 어떤 경우에는 산의 농도 및 세기도 조절함으로써 2개의 주요생성물중 하나, 예를들면 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 또는 항생제 A 40926 아글리콘에 대한 생산 공정을 최소한 어느 정도까지는 조작할 수 있다. 더욱 구체적으로, 비교적 저온을 유지하고, 산 혼합물의 농도를 적당하게 감소시키고, 반응 시간을 적당하게 조절하면, N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘의 수율이 증가하지만, 한편 비교적 더 높은 온도 및 더 긴 시간에서는 아글리콘이 단독으로 얻어진다.

또한 이 경우에 있어서, 반응 경로는 TLC 또는 바람직하기로는 HPLC에 의해 모니터되고, 후속되는 회수 공정의 수율을 최대화 하기 위하여, 목적 물질의 최적 생산이 얻어졌을 때 반응을 정지시킬 수 있다.

생성물이 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘과 항생물질 A 40926 아글리콘의 혼합물로서 얻어졌을 때, 이 생성물을 크로마토그래피(예, 액체/액체 크로마토그래피, 플래쉬 크로마토그래피, 고압 액체 크로마토그래피 및 친화성 크로마토그래피)에 의해 분리할 수 있다.

친화성 크로마토그래피가 사용되는 경우, 적합한 흡착제는 유럽 특허공개 공보 제122969호에 기재된 바와 같은 고정성 D-알라닌-D-알리닌이다. 특히 바람직한 것은 아가로스-ε-아미노카프로일-D-알라닌-D-알리닌이다. 용출 혼합물은 수성 완충액과 염수용액의 혼합물이다. pH 및 염 농도를 조절함으로써 항생물질 A 40926 아글리콘으로부터 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘이 분리된다.

본 발명의 또 다른 목적 및 바람직한 실시태양은 항생물질 A 40926 복합체 또는 그의 단일 인자(항생물질 A 40926 복합체 AB, 항생물질 A 40926 인자 A, 항생물질 A 40926 인자 B, 항생물질 A 40926 인자 B₀, 항생물질 A 40926 인자 B₁, 항생물질 A 40926 인자 PA 및 항생물질 A 40926 인자 PB)를 제한된 양(0.1-10%, w/w)의 물존재하에 실온 내지 100°C, 바람직하기로는 40 내지 65°C에서 3 내지 120시간 동안 극성 비양성자성 용매와 강한 무기산 또는 유기산의 혼합물로 조절된 가수분해시킴을 포함하여 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB 또는 그의 인자를 유효하게 제조하는 방법이다.

가장 바람직하게는 가수분해 혼합물은 디메틸술폰과 37% 염산의 9 : 1 내지 9.5 : 0.5의 혼합물이고, 온도는 65°C이며, 반응시간은 5시간이다.

N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘의 제조를 위한 출발 물질이 항생물질 A 40926 복합체일 경우에는, 최종 생성물로서 여전히 원래의 복합체에 실질적으로 대응하는 인자들의 혼합물이 얻어지는 한편, 단일 인자(예, 항생물질 A 40926 인자 A 또는 인자 B)가 사용되는 경우, 각각 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 및 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B, B₀ 또는 B₁과 같은 단일 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자가 얻어진다.

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB가 얻어진 경우에는, 이를 그 자체 공지된 방법(예, 액체/액체 크로마토그래피 및 적합하기로는 예비 HPLC)에 의해 그의 단일 인자로 분리시킬 수 있다.

적합한 방법에는 4.935-49.35기압(5-50bar)의 중간 압력 또는 98.7-197.4기압(100-200bar)의 고압하에서, 바람직하게는 스테인레스 스틸 컬럼에서의 역상 액체 크로마토그래피가 포함된다. 고체상은 (2-18) 탄소 원자(가장 적합하기로는 C18) 또는 페닐기의 탄화수소 상을 갖는 실란화 실리카겔일 수 있고, 용출제는 상기 정의된 바와같이 극성 수산화성 용매와, 수지와 사용성인 pH에서의 수성 완충액(바람직하기로는 pH 4-8)과의 혼합물이다.

가장 바람직한 것은 pH4 내지 8 및 적합하기로는 pH 약 6에서 아세트니트릴과 수성 완충액 중에서 선택된 극성 수성 비양성자성 용매의 선형 구배 용출 혼합물(예, 아세트니트릴/인산염 완충액(pH6) 70 : 30 및 아세트니트릴/인산염 완충액(pH6) 10 : 90 혼합물의 5% 내지 45% 선형 구배)이다.

본 발명의 또 다른 목적 및 바람직한 실시 태양은 (a) 반응 온도에서 액체인 지방족 및 알파-할로겐화 지방족 산, 반응 온도에서 약간의 수산화성을 나타내는 액체인 지방족 알칸올 및 지환족 알칸올, 페닐성분이 반응 온도에서 약간의 수산화성을 나타내는 액체인 (C₁-C₄)알킬, (C₁-C₄)알콕시 또는 할로젠기를 임의로 함유할 수 있는 페닐 치환 저급 알칸올, 및 반응 온도에서 액체인 베타-폴리할로겐화 저급 알칸올 중에서 선택된 유기 양성자성 용매, 및 (b) 강무기산, 강유기산 및 수소 형태의 강산 양이온 교환 수지 중에서 선택된, 용매와 혼합성인 강산 존재하에 (c) 약 20 내지 약 100°C의 반응 온도에서 항생물질 A 40926 복합체, 또는 그의 단일 인자, 즉, 항생물질 A 40926 복합체 AB, 항생물질 A 40926 인자 A, 항생물질 A 40926 인자 B, 항생물질 A 40926 인자 PA, 항생물질 A 40926 인자 PB, 항생물질 A 40926 인자 B₀, 항생물질 A 40926 인자 B₁, 항생물질 A 40926 만노실 아글리콘 및 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘(복합체 AB/또는 그의 단일인자)를 조절된 산 가수분해시키는 것을 포함하여 항생물질 A 40926 아글리콘을 선택적으로 제조하는 방법이다.

양성자성 용매가 지방족 산 및 알파-할로겐화 지방족 산중에서 선택된 경우, 반응 온도에서 출발 물질 충분량을 용해시킬 수 있는 임의의 지방족 산 및 알파-할로겐화 지방족 산이 유용하게 사용될 수 있긴 하지만, 각각 탄소 원자수 1 내지 5의 지방족산 및 탄소 원자 수 2 내지 5의 알파-할로겐화 지방족 산이 적합하다.

상기 산의 예로서 포름산, 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 이소부티르산, 발레르산, 이소발레르산, 트리메틸아세트산, 플루오로아세트산, 클로로아세트산, 디플루오로아세트산, 디클로로아세트산, 트리플루오로아세트산, 트리클로로아세트산, 펜타플루오로프로피온산, 2,2,3,4,4,4-헥

사플루오로부티르산, 헵타플루오로부티르산 등이 있다.

본 발명의 일 실시태양에 따르는 바람직한 반응 용매로서는 저급 지방족 산(예, 아세트산 및 프로피온산) 또는 저급 알카-할로겐화 지방족 산(예, 클로로아세트산, 디클로로아세트산, 트리클로로아세트산, 디플루오로아세트산, 클로로디플루오로아세트산, 트리플루오로아세트산 및 펜타플루오로프로피온산)을 들 수 있다. 이들 산 용매 중에서, 산의 세기가 강한 용매들은 용매로서, 가수분해 반응을 촉진하는 강산으로서 동시에 작용할 수 있으므로, 가수 분해 반응을 촉진하기 위해서 추가로 강산을 첨가할 필요가 없다. 이 목적을 위해서, 트리플루오로아세트산을 75% 내지 95% 농도로, 60° 내지 90°C에서 0.5 내지 8시간의 반응 시간 동안 사용하는 것이 특히 유용한 것으로 입증되었다.

가장 바람직한 실시 태양에 의하면, 이 조절된 산 가수분해의 반응 용매로서 탄소 원자수 5 내지 10의 1급 및 2급 알칸올과 2급 시클로알칸올이 유용하게 사용될 수 있다. 상기 알칸올의 예로서, 1-펜탄올, 2-펜탄올, 3-펜탄올, 1-헥산올, 2-헥산올, 3-헥산올, 3,3-디메틸-1-부탄올, 4-메틸-1-펜탄올, 3-메틸-2-펜탄올, 2,2-디메틸-3-펜탄올, 2,4-디메틸-3-펜탄올, 4,4-디메틸-2-펜탄올, 5-메틸-2-헥산올, 1-헵탄올, 2-헵탄올, 5-메틸-1-헥산올, 2-에틸-1-헥산올, 2-메틸-3-헥산올, 1-옥탄올, 2-옥탄올, 시클로펜탄올, 2-시클로펜틸에탄올, 3-시클로펜틴-1-프로판올, 시클로헥산올, 시클로헵탄올, 시클로옥탄올, 2,3-디메틸시클로헥산올, 4-에틸시클로헥산올, 시클로옥틸메탄올, 6-메틸-5-헵텐-2-올, 1-노난올, 2-노난올, 1-데칸올, 2-데칸올 및 3-데칸올을 들 수 있다.

페닐 치환 저급 알칸올의 예로서 벤질알코올, m-클로로벤질 알코올, o-플루오로벤질 알코올, m-플루오로벤질 알코올, p-플루오로 벤질알코올, m-메틸벤질 알코올, m-메톡시벤질 알코올, o-에톡시벤질 알코올, m-부톡시벤질 알코올, p-tert. 부톡시 벤질 알코올, p-tert. 부틸벤질 알코올, 페네틸 알코올, o-클로로페네틸 알코올, m-클로로페네틸 알코올, o-메톡시페네틸 알코올, m-메톡시페네틸 알코올, o-프로필페네틸 알코올, o-에톡시페네틸 알코올, p-플루오로페네틸 알코올, p-브로모페네틸 알코올, o-프로폭시페네틸 알코올, o-부톡시페네틸 알코올, 1-(p-이소프로필페닐)에탄올, 3-페닐-1-프로판올, 2-페닐-1-프로판올, 4-페닐-1-부탄올 및 3-페닐-1-부탄올이 있다.

유기 양성자성 용매가, 반응 온도에서 액체인 베타-폴리할로겐화 저급 알칸올중에서 선택되는 경우, 탄소 원자수 1 내지 4의 베타-클로로-치환된 알칸올 및(또는) 플루오로-치환 알칸올이 적합하다. 상기 베타-폴리 할로겐화 저급 알칸올의 예로서 디클로로에탄올, 트리클로로에탄올, 디클로로플루오로에탄올, 디플루오로클로로에탄올, 디플루오로에탄올, 트리플루오로에탄올, 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올, 2,2,3,4,4,4-헥사플루오로부탄올 및 2,2,3,3,4,4,4-헵타플루오로부탄올을 들 수 있다.

항생물질 A 40926 아글리콘의 제조를 위해 40 내지 100°C, 적합하기로는 65 내지 90°C에서 1 내지 4 시간 동안 제한된 양(0.1-10%, w/w)의 물 존재하에서, 극성 양성자성 용매와 강무기산 또는 강유기산의 혼합물을 사용하는 조절된 가수분해 조건이 바람직하다.

가수분해 혼합물로서는 디메틸술폰과 37% 염산의 8 : 2 내지 9.5 : 0.5의 혼합물이 가장 바람직하고, 온도는 약 80°C, 반응시간은 약 3 시간이 가장 바람직하다.

상술한 바와같이, 상기 조건하에서 항생물질 A 40926 복합체(또는 그의 단일 인자 또는 상기 인자들의 혼합물)의 당(sugar) 잔기의 부분적 가수분해 생성물인, 항생물질 A 40926 난노실 아글리콘 및 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘(복합체 AB 또는 그의 단일 인자)도 항생물질 A 40926 아글리콘으로 전환된다.

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB 및 단일 인자 A, B, B₀와 B₁ 및 항생물질 A 40926 아글리콘은 다수의 광범위하게 만연되는 감염의 원인이 되는 그람 양성균에 대해서 활성을 나타낸다. 통상적인 치료 요법에 대한 이들 병원체의 내성이 증가함으로 인해서 신규 항생물질에 대한 필요성이 여전히 크게 요구되고 있다.

일반적으로, 항균 치료에 있어서, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB, 그의 인자 및(또는) 항생물질 A 40926 아글리콘과 그의(또는 그의 혼합물) 비독성 제약상 허용되는 염들은 국소 또는 비경구와 같은 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다.

주사용 조성물은 오일상 또는 수성 비히클 중의 현탁제, 액제, 또는 에멀전제와 같은 제형으로 제제할 수 있으며, 보조제(예, 현탁제, 안정화제 및(또는) 분산젤)를 함유할 수 있다.

다른 방법으로, 유효, 성분은 적합한 비히클(예, 멸균수)를 이에 가할때 전달과 동시에 재구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.

투여 경로에 따라 이들 화합물은 여러가지 투여형태로 배합처방될 수 있다.

경우에 따라서, 본 발명의 혼합물을 경구 투여용 장용피로 배합처방 할 수 있다. 이 제형은 당 업계에 공지된 방법으로 배합처방 할 수 있다. 이 제형은 당 업계에 공지된 방법으로 배합처방 할 수 있다[예, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 제15판, 미합중국 펜실베니아주 이스톤 소재, 맥(Mack) 출판사, 제1614면 참조].

상기 제형은 특히 위를 통과하는 동안에는 변화하지 않으므로, 항균 물질의 흡수가 특히 장관에서 요구되는 경우에 적합하다.

투여될 유효 성분의 양은 여러가지의 요인, 즉 치료할 대상의 크기 및 상태, 투여 방식 및 투여 빈도수 및 관련 병원체 등에 좌우된다.

본 발명의 항생물질, 즉, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 및 항생물질 A 40926 아글리콘 및 생리학적으로 허용되는 그 염류는 일반적으로 환자의 체중 1kg당 유효 성분 약 0.5 내지 50mg의 1일 투여량으로 투여하되, 경우에 따라서 이 투여량을 1일 1-4회 분할해서 투여한다.

특히 적합한 조성물은 투여 단위 당 약 100 내지 약 5,000mg의 유효 성분을 함유하도록 제제한 것이다.

작용 지속 제형은 당 업계에 알려진 상이한 메카니즘 및 방법에 기초해서 내합처방 될 수 있다.

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 또는 항생물질 A 40926 아글리콘을 함유하는 작용 지속 제형을 제조하기 위한 적합한 방법은 수성 또는 유성 매질 중에 현탁시킨 이 항생물질의 수 불용성 형태의 사용과 관련이 있다.

제약 조성물의 제조 :

근육내 주사용 단위 투여 형태를 8% 프로필렌 글리콜 및 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB의 생리학적으로 허용되는 염기 부가염 500mg을 함유시킨 미합중국 약전(USP)의 멸균 현탁액 5ml로 제제한다.

근육내 주사용 단위 투여 형태를 8% 프로필렌 글리콜 및 항생 물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A의 생리학적으로 허용되는 염기 부가염 500mg을 함유시킨 미합중국 약전(USP)의 멸균 현탁액 5ml로 제제한다.

근육내 주사용 단위 투여 형태를 8% 프로필렌 글리콜 및 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B의 생리학적으로 허용되는 염기 부가염 500mg을 함유하는 미합중국 약전(USP)의 멸균 현탁액 5ml로 제제한다.

근육내 주사용 단위 투여 형태를 주사용 멸균수 5ml 중에 현탁시킨 수불용성산 형태의 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 1,000mg으로 제제한다.

또한 본 발명의 항생물질은 장에서 위막 대장염을 유발하는 클로스트리듐 디피실(*Clostridium difficile*)의 성장을 억제시키는데 유용하다. 이들 항생물질을 제약학상 허용되는 투여 형태로 제제한 항생물질 또는 제약학상 허용되는 그 염류의 유효 투여량을 경구 투여함으로써 위막 대장염의 치료에 사용할 수 있다. 이렇게 사용하기 위해서, 항생물질을 젤라틴 캡슐 또는 액체 현탁액 상태로 투여할 수 있다.

약제로서의 작용 이외에, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 및 그이 항생물질 A 40926 아글리콘 및 그의 제약학상 허용되는 염은 동물의 성장 촉진제로 사용할 수 있다.

이 목적을 위해서, 본 발명의 화합물을 적합한 사료에 첨가해서 경구로 투여한다. 정확한 사용 농도는 정상 급식량이 소비될 경우에 성장 촉진 유효량으로 유효성분을 제공하기 위해서 요구되는 농도이다.

동물 사료에 본 발명의 유효 화합물의 첨가 방법으로는, 유효 화합물을 유효량으로 함유하는 적합한 급식 프리믹스(premix)를 제조하고, 이 프리믹스를 완전한 정량으로 혼입시키는 것이 적합하다.

다른 방법으로, 유효 성분을 함유하는 중간 농축물 또는 사료 보충물을 사료에 혼합시킬 수 있다.

이러한 사료 프리믹스 및 완전한 정량은 본원에 참조 문헌으로서 인용된 문헌[예, "Applied Animal Nutrition", 더블유, 에이치. 프리드만 앤드 캄파니(W.H. Freedman and Co.), 미합중국 샌프란시스코 소재, 1969년, 또는 "Livestock Feeds and Feeding" O and B Books, 미합중국, 오레곤주, 코발리스 소재, 1977년 참조]의 방법에 따라 제조하고 투여하다.

A 40926 출발 물질의 서명 및 제조

항생물질 A 40926 복합체, 항생물질 A 40926의 인자 A, 인자 B, 인자 B₀, 인자 PA 또는 인자 PB는 이들을 생성시킬 수 있는 악티노마두라 종(*Actinomadura* sp.), 즉 악티노마두라종 ATCC 39727 또는 항생물질 A 40926을 생산하는 그의 변종 또는 돌연변이체를, 동화될 수 있는 탄소, 질소 및 무기 영양공급원을 함유하는 수성 영양 배지 중에서 호기성 조건하에 배양시켜서 생산할 수 있다. 발효 기술에서 통상적으로 사용되는 많은 배양 배지들이 사용될 수 있으나, 특정 배지가 바람직하다. 적합한 탄소원은 글루코오스, 만노스, 갈락토오스, 전분, 옥수수 가루 등이다. 적합한 질소원은 암모니아, 질산염, 콩가루, 펄톤, 고기 추출물, 이스트 추출물, 트립톤, 아미노산 등이다. 배양 배지 중에 혼입시킬 수 있는 무기염류 중에서 나트륨, 칼륨, 철, 아연, 코발트, 마그네슘, 칼슘, 암모늄, 염화물, 탄산염, 황산염, 인산염, 질산염 등의 이온을 생성시킬 수 있는 통상의 가용성 염류가 있다.

통상적으로, 항생물질 생산 균주를 진탕 플라스크 중에서 사전 배양시키고, 이어서, 이 배양물을 항아리 모양의 발효조에 접종시켜 실질량의 항생물질을 제조한다. 사전배양용으로 사용하는 배지는 보다 대량 발효에 사용되는 배지와 동일 할 수 있으나, 기타 배지도 사용될 수 있다. 항생물질 A 40926 생산 균주는 20 내지 40°C의 온도에서, 적합하기로는 24 내지 35°C의 온도에서 성장시킬 수 있다.

발효 도중, 항생물질 생산은 예를들면, 생물학적 분석법 또는 TLC 또는 HPLC 방법에 의해서 브로스 또는 균사 추출 시료의 항생작용을 조사함으로써 모니터할 수 있다.

항생물질 A 40926에 민감한 미생물[예, 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)] 및 황색 포도상구균(*S. aureus*)]을 피시험 미생물로서 사용할 수 있다. 생물학적 분석은 한천 평판상에서 한천 확산법에 의해서 행한다는 것이 편리하다. 일반적으로, 항생 작용의 최대 형성은 발효 제 2 일 내지 제 5 일 사이에 일어난다.

항생물질 A 40926은 악티노마두라종 ATCC 39727 균주, 또는 항생물질 A 40926을 생산하는 그의 돌연변이체 또는 변종을 배양시켜 제조하는데, 이는 주로 배양 브로스 중에서 발견된다.

악티노마두라종 A 40926 ATCC 39727의 특성은 다음과 같다 :

육안 및 현미경 검사

영양 균사는 굴곡형 및 측쇄형균사(직경 약 $0.8\mu\text{m}$)로 구성되어 있는데, 표 III에 별표(*)로 표시한 일부의 배지 상에서는 수일 성장 후, 봉상 형태로 되는 경향이 있는 반면에, 글루코오스-아스파라긴 배지에서는 구상형태로 되는 경향이 있다.

이 균주의 특성은 몇개의 배지 상에서 영양 균사가 나타내는 버건디 색채(Burgundy color)이다.

호기성 균사는 소수의 배지중에서만 존재하며, 특히, 표 III에 기재한 것들중에서 오토밀 한천 및 토양 한천에서만 존재한다. 이들 배지에서, 호기성 균사는 회백색을 띠고, 약 10-20 포자의 갈고리형(hooks) 및 짧은 나선형으로 배열된 포자체들을 형성한다.

이 포자들은 원통형이고, 평균 크기 $0.8 \times 1.2\mu\text{m}$ 를 갖는다.

생장 특성의 측정

배양 특성을 검사하기 위해서, 악티노마두라종 ATCC 39727을 쉐링(Shirling E.B.)과 고틀리이브(Gottlieb D.)에 의해 제안된 여러가지 표준 배지[1966-"Method for characterization of *Streptomyces species*", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 제16권, 제313-340면 참조]에 왁스만(Waksman, S.A.)에 의해서 추천된 수 개의 배지[1961-"The Actinomycetes", 볼티모어(Baltimore) 소재, 더 윌리엄스 앤드 윌킨스 캄파니(The Williams and Willkins Co.) 출판사, 제 2 권, 제328-334면 참조]를 첨가해서 배양시켰다.

색 측정은 필요한 때마다 마에르쯔 및 포울의 방법[마에르쯔 에이. (Maerz A.) 및 엠. 리 포울(M. Rea Paul), 1950-"A Dictionary of Color", 제 2 판, 뉴욕 소재, 맥그로우-힐 출판사(McGraw-Hill Book Company Inc.) 참조]에 의해서 행하였다.

다른 탄소원을 이용하기 위한 미생물의 능력을 쉐링과 고틀리이브의 방법에 의해서 조사하였다.

배양 및 생리학적 특성 및 사용된 탄소원을 표 III, IV 및 V에 나타내었다.

표 III의 기록은 28°C에서 2주 배양시킨 후 측정된 것들이다.

[표 III]

악티노마두라종 ATCC 39727 균주의 배양 특성

배 지	특 성
배지번호 2 (이스트 추출물-대아 한천)	풍부한 성장, 피각질 표면, 8/L/8, 미량의 호박색-핑크색 가용성 색소
배지번호 3 (오트밀 한천)	풍부한 성장, 평활 표면, 자색 55/E/4, 호기성 균사가 극히 빈약함 회색, 가용성 색소, 자색, 55/II/4
배지번호 4 (무기염-원분 한천)	보통성장, 평활하고 얇은 표면 크림색, 10/D/2
배지번호 5 (글리세롤-아스파라긴 한천)	보통성장, 평활하고 얇은 표면, 살구색, 10/B/2
배지번호 6* (펄프-이스트 추출물 철(iron) 한천)	보통성장, 약간 피각질 표면, 호박색, 12/D/9
배지번호 7 (티로신 한천) (오트밀 한천)*	풍부한 성장, 평활하고 얇은 표면, 호박색-갈색, 13/K/12 풍부한 성장, 평활 표면, 버건디색, 8/L/7. 호기성 균사, 보통 연한 황색-회색, 44/B/2
히키와 트레스너 (Hickey and Tresner)의 한천*	풍부한 성장, 주름진 표면, 호박색- 갈색, 13/K/12
짜펙(Czapeck) 글루코오스 한천	보통 성장, 평활 표면, 연한 황색 9/L/3
글루코오스 아스파라긴 한천*	빈약한 성장, 크림색 표면, 밀감색- 황색 9/E/1
배양 한천	풍부한 성장, 주름진 표면, 연한 오렌지색 11/C/7
감자 한천*	풍부한 성장, 주름진 표면, 버건디색 8/L/9
베넷(Bennett) 한천*	풍부한 성장, 피각질 표면, 버건디색, 8/L/8, 가용성 색소, 깊은 호박색-강미트, 5/J/10
칼슈 말레이트 한천	보통성장, 평활 표면, 살구색 10/B/3
달지유 한천	풍부한 성장, 약간 주름진 표면, 오렌지색 9/B/9
짜펙(Czapeck) 슈크로오스 한천	풍부한 성장, 평활 표면, 살구색 10/B/6
난 알부미 한천*	풍부한 성장, 평활 표면, 강미트 52/B/3, 미량의 가용성 색소, 강미트 52/B/3
사부르(Sabouraud) 한천 트양 한천	무성장 빈약한 성장, 무색, 회백색 호기성 균사
텍스트로스 트립톤 한천*	보통 성장, 평활하고 얇은 표면, 연한 황색 10/G/2
감자 플러그(plug)	풍부한 성장, 오렌지색-갈색 미량의 회백색 호기성 균사

생리학적 특성

[표 IV]

생리학적 특성

시 험	결 과
전분 가수분해	음성
H ₂ S 형성	배지번호 6에서 음성 아세트산 납편(strip)에 양성
티로신 반응	양성
카제인 가수분해	양성
칼슈 말레이트 가수분해	음성
젤라틴 액화	양성
리트머스(Litmus) 밀크	음성
<div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> 음질 ↓ 락톤화 </div>	양성
셀룰로오스 분해	음성
질산염 환원	양성

이용 탄소원

[표 V]

탄소 이용

탄 소 원	생 장
아라비노오스	+
크실로오스	+
만노오스	+
프록토오스	+
라피노오스	+
람노오스	+
글루코오스	+
락토오스	+
갈락토오스	+
이노시톨	-
슈크로오스	+
셀룰로오스	-
살리신	+
만니톨	+
리보오스	-

+ = 생장, - = 무생장

화학분류 특성 :

세포벽 분석 :

세포벽 중에 존재하는 아미노산의 분석은 벡커(Becker) 등의 문헌["Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole cell hydrolysates", *Appl. Microbiol.* 제 2 권 제421-423면(1964년)]에 기재된 방법으로 행하였다.

가수분해시킨 전체 세포의 분석 결과 메조-디아미노피멜사이드 존재하는 것으로 나타났다.

가와모토(I. Kawamoto) 등의 방법[아이. 가와모토 티. 오카(T. Oka) 및 티. 나라(T. Nara)의 "Cell-wall composition of *Micromonospora olivoasterospora*, *Micromonospora sagamiensis* and related organism", *J. of Bacteriology*, 제146호, 제527-534면 (1981년) 참조]으로 얻은 순수한 세포벽의 분석결과를 글리신이 존재하지 않았다.

당(糖) 분석 :

당 함량의 분석은, 제이. 엘. 스타네크(J. L. Staneck) 및 지. 디. 로버츠(G. D. Roberts)의 "Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography", 제28권, 제226-2321면 (1974)년에 기재되어 있는 바와같이 박층크로마토그래피 셀룰로오스 시이트를 사용하고, 에틸 아세테이트-피리딘-물(100 : 35 : 25 용적비)의 용매계를 사용해서, 엠. 피. 레체 발리어(M. P. Lechevalier)의 방법["Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance", *J. Lab. Clin. Med.* 제71호, 제934-944면 (1968년) 참조]에 의해서 형성했다.

분석 결과, 주로 글루코오스 및 리보오스가 존재하는 것으로 밝혀졌지만, 갈락토오스, 만노오스 및 마두로오스(3-O-메틸-D-갈락토오스)도 소량 검출되었다.

미콜산(Mycolic acids) :

미콜산의 존재를 검출하기 위한 분석은 민니킨(Minnikin) 등의 방법[디.이. 민니킨(D.E. Minnikin), 엘. 알샤마오니(L. Alshamaony) 및 엠. 굿펠로우(M. Goodfellow)의 "Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin layer chromatography analysis of whole organism methanolysates", *Journal of General Microbiology*, 제88호, 제200-204면(1975년) 참조]에 의해서 행했다.

분석 결과는 음성이었으며, 미콜산은 검출되지 않았다.

균주의 동정(同定)

이 균주는 메조-디아미노피멜산 및 마두로오스가 존재하고 펩티도글리칸 중에 글리신이 결핍되고, 미콜산이 결핍되며, 적당히 긴 포자 사슬을 갖는 호기성 균사를 형성하기 때문에, 악티노마이세트 속의 악티노마두라(*Actinomadura*)로 정했다.

기타 미생물의 경우와 같이, A 40926 생산 균주의 특성들은 변화될 수 있다. 예를들면, 이 균주의 인공 변종 및 돌연변이체는 자외선, X-선, 고주파, 방사선, 및 아질산, N-메틸-N'-니트로-N-니트로 소구아니딘 등의 화학 약품 등과 같은 여러가지 공지된 변이 유발소로 처리해서 얻을 수 있다. 악티노마두라 속의 종에 속하고, 항생물질 A 40926을 생산하는 천연 및 인공 변종 또는 돌연변이체는 모두 악티노마두라종 ATCC 39727 균주와 같은 것으로서, 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

생산 미생물의 발효 브로스로부터 본 발명의 항생물질을 그 자체 공지된 방법으로 회수하고, 이 방법으로는 용매에 의한 추출, 비-용매 첨가 또는 용액의 pH변화에 의한 침전, 분배 크로마토그래피, 역상 분배 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피법 등이 포함한다.

적합한 방법으로는 고정된 D-알라닐-D-알리닌을 사용하는 친화성 크로마토그래피를 수행하고, 이어서, 역상 컬럼 크로마토그래피 시키는 방법이 있다.

이 회수 방법에 적합한 고정된 D-알라닐-D-알리닌 매트릭스들은 유럽 특허 출원 제8311255호에 기재되어 있다. 본 발명에 적합한 매트릭스는 조절된 포어를 갖는 가교된 폴리덱스트란과 결합시킨 D-알라닐-D-알리닌이다.

발효 브로스는 여과 직후 또는 예비 정제 과정 직후 친화성 크로마토그래피시킬 수 있다. 이때 후자의 방법에는 전체 발효체를 염기성, 적합하기로는 pH 8.5 내지 10.5 사이로 조절해서 균사에 흡착되어 있는 항생물질을 용해시키고, 이어서, 여과시키는 것이 포함된다. 맑은 여액을 pH 2.5-4.5로 조절한 후, 여과기를 사용해서 다시 여과시킨다. 여액을 따라 버리고, 한편 회수된 여과 케이크를 물중에 현탁시켜서 염기성, 적합하기로는 pH 8 내지 9사이로 조절시킨 후, 여과시킨다. 여과 케이크를 같은 방법으로 다시 처리하는 한편, 항생물질 A 40926을 함유하는 여액과 합하였다.

이어서, 이 여액 또는 여과시킨 발효 브로스를 컬럼식 또는 배치식으로 고정상 D-알라닐-D-알리닌 상에서 친화성 크로마토그래피하였다.

A 40926 항생물질과 친화성 매트릭스와의 결합은 pH 약 7.0-8.0에서 바람직하게 이루어지며, 그 용출은 염기 수용액을 사용해서 보다 염기성인 pH값(바람직하기로는 pH 9.0 내지 10.5사이)에서 행한다. 이 수성염기는 암모니아, 휘발성 아민, 알칼리 또는 알칼리금속 수산화물, 또는 하기 정의한 바와같은 수산화성 극성 용매와 같은 극성 유기 용매 존재하에서 임의로 염기성 완충 용액일 수 있다.

컬럼을 임의로 염, 요소 및(또는) 수산화성 용매를 함유하는 수성 완충액(pH 4-9)을 사용해서 행구어서 불순물을 제거시킨 후, 항생물질 A 40926을 상기 용출 혼합물로 용출시켰다. 이어서, 조(祖) 항생물질을 물과 최소 공비 혼합물을 형성할 수 있는 유기 용매와 함께 공비 증류시켜서, 합해진 항생물질을 함유하는 분획물로부터 물을 제거하고, 이어서 목적 생성물을 석출시키기 위해서 비-용매를 첨가해서 회수하는 것이 적합하다.

물과 최소 공비 혼합물을 형성시킬 수 있는 유기 용매의 대표적인 예로서 n-부탄올, 벤젠, 톨루엔, 부틸 에테르, 사염화탄소, 클로로포름, 시클로헥산, 2,5-디메틸푸란, 헥산 및 m-크실렌 등을 들 수 있으며, 이 중에서 적합한 용매는 n-부탄올이다.

비-용매의 예로서는 석유 에테르, 저급 알킬 에테르, 예를들면, 에틸 에테르, 프로필 에테르 및 부틸 에테르, 및 아세톤과 같은 저급 알킬 케톤을 들 수가 있다.

다른 방법으로, 합해진 항생물질 함유 분획물을 적합하기로는 상기한 바와같은 유기 용매와 함께 공비 증류시켜서 소량의 용적으로 농축시키고, 생성된 수용액을 동결건조시킨다.

용출에 사용되는 수성 염기가 비휘발성인 경우에는, 침전시키거나 또는 동결건조시키기 전에 농축물을 중화 및 탈염시킬 필요가 있다.

편리한 탈염 방법으로는 실란화 실리카겔 컬럼에 항생물질 함유 수용액을 적용하고, 증류수로 세척하고, 수산화성 극성 용매와 물과의 혼합물로 용출시키는 것이 있다.

수산화성 극성 용매의 대표적인 예는 다음과 같다. 즉, 수용성 알코올(예, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, n-부탄올), 아세톤, 아세토니트릴, 저급 알킬 알카노에이트(예, 에틸 아세테이트), 테트라히드로푸란, 디옥산 및 디메틸포름아미드 및 그 혼합물.이 중에서 가장 적합한 극성 수산화성 용매는 아세토니트릴이다.

다른 탈염법으로, 항생물질 함유 수용액을 상기 친화성 컬럼에 적용하고, 증류수로 세척하고, 상기한 바와 같이 휘발성 수성 염기로 용출시켜서 친화성 크로마토그래피를 행할 수 있다.

이와 같이 하여 얻어진 생성물은 항생물질 A 40926 복합체이다. 필요에 따라서, 이 생성물을 그의 인자 A, B, B₀, PA 및 PB로 분리시키기 위해서 더욱 정제시킬 수 있다.

순수한 항생물질 A 40926 복합체를 얻기 위한 편리한 방법은 친화성 크로마토그래피 컬럼에서 위에서 얻은 복합체를 더 정제시키는 것이다. 일반적으로 상기와 같은 고정상(고정된 D-알라닐-D-알리닌)이 사용되며, 목적 항생물질은 비이동상 D-알라닐-D-알리닌을 사용하는 친화성 크로마토그래피법으로 용출시킨다.

고정된 D-알라닐-D-알리닌 중 적합한 것은 세파로오스-ε-아미노카프로일-D-알라닐-D-알리닌이고, 평형 혼합물로 적합한 것은 0.16%(w/v) 암모니아를 함유하는 pH 7-8로 조절된 2M NaCl이고, 행궁액으로 적합한 것은 0.16%(w/v) 암모니아를 함유하는 pH 8-9.5로 조절된 2M NaCl이고, 용출 혼합물로 적합한 것은 0.16%(w/v) 암모니아를 함유하는 pH 10.5-12로 조절된 2M NaCl이고, 용출 혼합물 중 가장 적합한 것은 pH 11.5로 조절된 상기 혼합물이다.

항생물질 A40926 인자들, 즉 항생물질 A40926 인자 A, 항생물질 A40926 인자 B, 항생물질 A40926 인자 B₀, 항생물질 A40926 인자 PA 및 항생물질 A40926 인자 PB는 컬럼 크로마토그래피, 적합하기로는 역상 컬럼 크로마토그래피에 의해서 항생물질 A40926 복합체의 수용액으로부터 단리시킬 수 있다. 역상 컬럼 크로마토그래피의 경우에 있어서, 적합한 고정상은 실란화 실리카겔이다. 그러나, 상품명 Amberlite XAD-2, XAD-4, XAD-7 및 XAD-8[롬 앤드 하스(Rohm & Hass)사 제품] 또는 Diaion HP 20 [미쯔비시(Mitsubishi)사 제품]으로 시판되는 것과 같은 아크릴 수지 및 비관능성 폴리스티렌을 사

용해서 컬럼 크로마토그래피시켜도 양호한 결과를 얻을 수 있다.

역상 크로마토그래피의 경우에 있어서, 정제 단계는 고정상으로서 실란화 실리카겔을 사용해서 행하며, 컬럼은 pH 4 내지 9(적합하기로는 pH 5.5-6.5)에서 완충 수용액으로 미리 평형시키고, 이어서 동일한 완충 용액중의 수산화성 극성 용매의 선형 구배로 용출시키는 것이 적합하다. 수산화성 극성 용매의 대표적인 예로서는 수용성 알코올(예, 메탄올, 에탄올, 이소-프로판올, n-부탄올), 아세톤, 아세트니트릴, 테트라히드로푸란, 디옥산 및 디메틸포름아미드 및 이들의 혼합물이며, 이 중에서 적합한 용매는 아세트니트릴이다.

용출된 분획물 중 항생물질의 함량은 통상의 생물학적 분석, 예를 들면, 감수성 미생물에 대해서 페이퍼-디스크(paper-disc) 또는 한천-확산 분석법으로 분석할 수 있다. 민감한 미생물의 예에는 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis) 및 황색 포도상 구균(S. aureus)이 있다.

크로마토그래피는 또한 TLC 또는 HPLC법에 의해서 편리하게 모니터할 수 있다.

적합한 HPLC 방법은 항생물질 A40926 항생물질의 분석을 위해 HPLC법으로 다를 경우, 상기한 방법에 의하여 실란화 실리카겔의 다공성 및 구형 입자를 충전시킨 컬럼을 사용하는 역상 HPLC이다.

유사한 항생물질 함량을 갖는 분획물을 상기와 같이 합하고, 탈염시켜서 본질적으로 순수한 항생물질 A40926 인자 A, 인자 B, 인자 B₀, 인자 PA 및 인자 PB를 얻는다.

본질적으로 순수한 항생물질 A40926 인자 A 및 항생물질 A40926 인자 B, 항생물질 A40926 인자 B₀, 항생물질 A40926 인자 PA 및 항생물질 A40926 인자 PB는 이들을 함유하는 그 분획물로부터 동결건조법, 비-용매 첨가에 의한 침전법 또는 수용액의 pH를 변화시켜서 행하는 침전법 등과 같은 여러가지 공지 방법에 의해서 얻을 수 있다.

편리한 방법으로는 물과 공비 혼합물을 형성할 수 있는 용매를 첨가시키고, 공비 종류에 의해서 물을 제거한 후, 이어서 상기한 것과 같은 비용매의 첨가 후 얻은 침전물을 여과시켜 수집하는 방법이다.

항생물질 A40926 인자 PA 및 PB는, 적어도 특정 발효 조건 하에서는, A40926을 생산하는 미생물의 주된 항생물질 생성물이다.

항생물질 A40926 인자 A 및 B는 주로 항생물질 A40926 인자 PA 및 PB 각각의 전환 생성물이며, 흔히 발효 브로스 중에 이미 존재한다.

본 발명자들은 혐기성 조건 하에서 항생물질 A40926 인자 PA를 항생물질 A40926 인자 A로 전환시킬 수 있고, 항생물질 A40926 인자 PB를 항생물질 A40926 인자 B로 전환시킬 수 있는 것을 발견하였다. 예를 들면, 항생물질 A40926 인자 PA 및 항생물질 A40926 인자 PB는, 0.5-10% 암모니아 수용액, 또는 유기 아민과 같은 기타 친핵성 염기로 실온에서 8-24시간 동안 처리해서 항생물질 A40926 인자 A 및 인자 B로 각각 전환시킨다.

결과적으로, 발효 브로스, 또는 항생물질 A40926을 함유하는 추출물 또는 그의 농축물을 혐기성 조건 하에서 일정 시간 동안(예, pH 9를 초과하는 친핵성 염기의 수용액 중에서 철야) 방치시키면, 항생물질 A40926 인자 A 및 인자 B가 풍부한 항생물질 A40926 복합체가 얻어진다. 발효 브로스, 추출물 또는 그 농축물을 혐기성 조건에 단시간 노출시킬 경우에는, 항생물질 A40926 인자 PA 및 인자 PB가 풍부한 항생물질 A40926 복합체가 얻어진다.

따라서, 인자 A 및 인자 B가 풍부한 항생물질 A40926 복합체를 얻는 적합한 방법으로는 항생물질 A40926 복합체(이 복합체는 주로 항생물질 A40926 인자 PA 및 PB를 함유함)의 용액을 수성 암모니아와 같은 수성 친핵성 염기중에서 실온에서 8-12시간 동안 방치하고, 이어서 상기의 방법으로 목적 항생물질 복합체를 분리시키는 것이다.

A40926을 함유하는 용액의 예로는 발효 브로스, 추출액 및 친화성 크로마토그래피 용출 분획물이 있다.

순수한 항생물질 A40926은 조 복합체를 상기한 바와 같이 친화성 크로마토그래피에 의해서 더 정제하여 얻을 수 있다.

이와 같이 해서, 그 순수한 인자들로부터 유도할 수 있는 생물학적 및 이화학적 특성을 갖는 생성물은 이후에 기술하는 실시예에서 항생물질 A40926 복합체 AB로 기재하였다.

인자 PA 및 PB가 풍부한 항생물질 A40926 복합체를 제조하는 적합한 방법은 친화성 크로마토그래피 용출 분획물을 산, 적합하기로는 무기산(예, 황산 또는 염산)으로 신속하게 중화시키는 것이다.

이 복합체로부터 순수한 항생물질 A40926 인자 PA 및 PB를 분리하는 것은 상기 방법 중의 1가지 방법에 의해서 행할 수 있다.

적합한 방법은, 적합하기로는 스테인레스 스틸 컬럼 중에서 중간 압력[약 4.935-49.35기압(5-50bar)] 또는 고압[약 98.7-197.4기압(100-200bar)]하에 역상 액체 크로마토그래피로 행하는 것이다. 고체상은 (2-18)탄소 원자(가장 적합하기로는 C18)의 탄화수소상 또는 페닐기를 갖는 실란화 실리카겔일 수 있으며, 용출제는 상기한 바와 같은 수산화성 극성 용매와, 수지와 병용할 수 있는 pH(적합하기로는 pH 4-8)의 완충 수용액과의 혼합물이다.

용출을 통상의 방법으로 모니터하고, 균일한 항생물질 함량을 갖는 분획물을 합하고, 상기와 같은 방법으로 처리해서 하기의 특성을 갖는 순수한 화합물을 분리시킨다.

정밀 HPLC 분석결과, 항생물질 A40926 인자 B는 실제로 인자 B₀ 및 인자 B으로 명명된 2가지 인자의 혼합물이라는 사실이 밝혀졌다.

항생물질 A40926 인자 B₀ (이 인자는 항생물질 A40926 인자 B의 약 90%임)는 인자 B의 이화학적 특성 중 D지점 하의 하기 시스템 중에서 테이코플라닌 A₂ 성분 2에 대해서 1.22의 Rt를 갖는 인자인 반면에, 인자 B₁ (이 인자는 항생물질 A40926 인자 B의 약 10%임)은 동일한 시스템 중에서 Rt 1.27의 상대치 Rt를 갖는다.

순수한 항생물질 A40926 인자 B₀는 항생물질 A40926 인자 B를, 예를 들면, 단리목적으로 역상 크로마토그래피를 반복 실시하여 더욱 정제시켜서 얻는다.

항생물질 A40926 인자 B₀의 이화학적 및 생물학적 특성은, 항생물질 A40926 인자 B의 것들과 실질적으로 동일하나, 예외로 상기한 것과 같은 시스템 중에서 HPLC 분석 결과, 이것은 1개의 피이크만을 갖는다(상기 HPLC 시스템 중에서 테이코플라닌 A₂ 인자 2에 비하여 Rt=1.22).

본 발명의 명세서와 특허청구 범위에 있어서, 항생물질 A40926 인자 B 및 항생물질 A40926 인자 B₀ 간의 상기 유사성으로 인해서, 항생물질 인자 B의 생물학적 특성에 관한 참조는 항생물질 A40926 인자 B₀ [이 인자는 항생물질 A40926 인자 B의 주성분(약 90%)이고, 인자 B의 생물학적 특성에 주로 기여하므로]에 관한 것으로도 이해할 수 있다.

다른 방법으로, 본 발명의 항생물질은 발효 브로스로부터 단리시켜도 좋고, 또는 관능성 폴리스티렌, 아크릴 또는 폴리덱스트란 매트릭스를 포함하는 강 음이온 수지 또는 약 음이온 수지를 사용하여 더 정제시켜도 좋다. 약 음이온 교환 수지의 예에는 다음과 같은 상품명으로 시판되는 것들이 있다. 즉, Dowex MWA-1 또는 WGR [다우 케미칼(Dow Chemical)제품], Amberlite IRA-73 (롬 앤드 하스 제품), DEAE-Sephadex [파르마시아(Pharmacia)제품], 본 발명에서 사용될 수 있는 강 음이온 교환 수지의 예에는 다음과 같은 상품명으로 시판되는 것들이 있다. 즉, Dowex MSA-1, SBR, SBR-P (다우 케미칼 제품), Amberlite IR-904 (롬 앤드 하스 제품) 및 QAE-Sephadex (파르마시아 제품).

이들 수지로부터 A40926 항생물질을 용출시키는 방법으로서 물, 또는 수산화성 유기 용매 즉, 저급 알코올(예, C₁-C₄) 알칸올) 또는 저급 알킬 케톤(예, 아세톤)과 물과의 혼합물 중에서, 염화수소나트륨 또는 염화수소칼륨과 같은 전해질 수용액의 선형 구배 혼합물에 의해서 행한다.

항생물질 A40926 만노실 아글리콘은 조절된 산성 조건하에서, 인자 A 및 인자 B가 풍부한 항생물질 A40926 복합체, 항생물질 A40926 인자 A, 인자 B, 인자 B₀ 또는 그의 혼합물을 가수분해시켜서 제조한다. 이들 조절된 산 조건이란 비양성자성 유기 용매 존재하의 무기 강산 또는 유기 강산의 진한 수용액이다. 강한 무기산의 적합한 예로서 황산 및 인산을 들 수 있다.

적합한 강산 유기산은 트리플루오로아세트산이다.

비양성자성 유기 용매중 적합한 것은 지환식 또는 시클릭 알킬 에테르(예, 디옥산 및 테트라히드로푸란), 저급 알킬 술폰산(예, 디메틸술폰산) 및 저급 알킬 아마이드(예, 디메틸포름아מיד)이다.

반응 온도는 일반적으로 0 내지 반응 혼합물의 환류 온도 사이에서 유지시킨다. 다수의 경우에서, 반응 온도는 15 내지 75°C이고, 적합한 온도는 20 내지 55°C이며, 가장 적합하기로는 실온이다.

반응 시간은 특정 반응 변수에 따르며, 반응 경로는 TLC 또는 HPLC 기술에 의해 추적되므로 당업계에서 숙련된 사람은 반응 경로를 모니터하고, 반응이 종결됐다고 생각되는 때를 결정할 수 있다.

이 방법의 적합한 실시태양은 실온에서, 80-95% 트리플루오로아세트산 수용액 존재하에서 항생물질 A40926 복합체 또는 그의 순수한 인자를 조절된 가수분해에 의해 항생물질 A40926 만노실 아글리콘을 얻는 것이다.

이 방법의 또 다른 적합한 실시태양은 1-2N 수성 황산과 수성 디옥산의 2 : 1 내지 1 : 2 혼합물 존재 하에서 항생물질 A40926 만노실 아글리콘의 조절된 가수분해이다.

가수분해 단계 마지막에서 회수된 것과 같은 조 항생물질 A40926 만노실 아글리콘의 정제는 비-용매 첨가에 의한 침전, 용매를 사용하는 추출 및 크로마토그래피와 같은 공지된 기술에 의하여 달성할 수 있다.

적합한 크로마토그래피 방법은 컬럼 크로마토그래피이며 가장 적합한 크로마토그래피 방법은 역상 컬럼 크로마토그래피이다.

적합한 역상 액체 크로마토그래피 방법은 중간 압력[약 4.935-49.35기압(5-50bar)] 또는 [약 98.7-197.4기압(100-200bar)]하에서 적합하기로는 스테인레스 스틸 컬럼을 사용한다. 고체상은 (2-18)탄소 원자(가장 적합하기로는 C18)의 탄화수소상 또는 페닐기를 갖는 실란화 실리카겔일 수 있으며, 용출제는 수산화성 극성 용매와, 수지와 병용할 수 있는 pH(적합하기로는 pH 4-8)의 완충 수용액과의 혼합물이다.

수산화성 극성 용매의 대표적인 예는 다음과 같다. 즉, 수용성 알코올(예, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, n-부탄올), 아세톤, 아세토니트릴, 저급 알킬 알카노에이트(예, 에틸아세테이트), 테트라히드로푸란, 디옥산 및 디메틸포름아מיד 및 그 혼합물, 이 중에서 가장 적합한 극성 용매는 아세토니트릴이다.

용출된 분획물 중 항생물질의 함량은 민감한 미생물에 대해서 통상의 생물학적 분석 방법, 예를 들면 페이퍼-디스크(paper-disc) 또는 한천-확산법으로 분석할 수 있다. 민감한 미생물의 예에는 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis) 및 황색 포도상 구균(S. aureus)이 있다.

반응은 물론 정제도 또한 TLC 또는 HPLC법에 의해서 편리하게 모니터할 수 있다.

적합한 HPLC 방법은 C-18알킬기로 관능화시킨, 적합하기로는 직경 5마이크로미터[예, 5 μ m Ultrasphere[®] ODS Altex, 벡크만(Beckman Co.)제품]의 실란화 실리카겔의 다공성, 구형 입자를 충전시킨 칼럼, C-18 알킬기로 관능화시킨 실리카겔을 충전시킨 예비컬럼(예, RP18 Brownlee Labs) 및 수용성 완충용액 중에서 상기의 것들 중의 1가지와 같은 수산화성 극성 용매의 선형 구배 혼합물인 용출제를 사용하는 역상 HPLC이다.

이 완충용액은 pH 5-7로 조절하는 것이 적합하다. 가장 적합한 용출제는 용출제 A[여기서, 용출제 A는 아세토니트릴/수용성 완충액(10 : 90)의 혼합물, pH 5-7]중에서 용출제 B[용출제 B는 아세토니트릴/수용성 완충액(70 : 30)의 혼합물, pH 5-7] 5-60%로 된 선형 구배를 갖는 것이다. 당업계에서 공지된 바와 같이, 많은 물질들이 내부 표준 물질로서 사용될 수 있다. 이 경우에 있어서, 매우 편리한 물질은 항생물질 L17054이고, 이 물질은 이 HPLC 시스템 중에서 본 발명의 혼합물에 가까운 체류시간을 갖는다. 이 표준 물질은 공지되어 있고, 유럽 특허 공개 제0119575호에 기재되어 있다.

본 발명에 의한 화합물의 항균 작용은 상이한 미생물 배양에 대한 표준 희석 시험에 의하여 시험관 내에서 증명될 수 있다.

항생물질 A40926 인자 A의 이화학적 특성

A) 다음과 같은 최대 흡수치를 나타내는 자외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제11도에 나타냄) :

	λ_{max} (nm)
a) 0.1N HCl	281
b) 인산염 완충액 pH 7.38	281
	300(쇼올더)
c) 0.1N 수산화나트륨 또는 수산화 칼륨	300
d) 메탄올	282
e) 인산염 완충액 pH 9.0	282
	300(쇼올더)

B) 다음과 같은 최대 흡수치(cm^{-1})를 나타내는 적외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제12도에 나타냄) :

3700-3100, 3100-2800(뉴졸), 1655, 1620-1560, 1510, 1480-1410(뉴졸), 1375(뉴졸), 1320-1250, 1250-1190, 1100-950, 845, 810, 720(뉴졸).

C) DMSO d_6 (헥사데로디메틸술폭시드) 중에서 내부 표준 물질(0.00ppm)로서 TMS를 사용해서

270MHz에서 기록했을 때, 다음과 같은 시그널(ppm) 군을 나타내는 1H -NMR 스펙트럼(이 스펙트럼은 제13도에 나타내었음), (δ =ppm) :

δ 0.86(t's, 6H), 1.21(~1H), 1.43(2H), 2.01(2H), 2.31-2.34(3H), 4-6.2(~16H), 6.2-8(~23H), 8.44, 9.22, 9.66(브로드 밴드, 이동 양자), 2.5-4(H_2O 피이크로부터 간섭).

D) 다음과 같은 조건 하에서, 역상 HPLC로 분석했을 때, 테이코플라닌 A₂ 성분 2(Rt=20.3분)에 대한 체류 시간(Rt)이 1.12임.

컬럼 : Ultrasphere ODS(5 μ m) Altex(벡크만사 제품)

4.6mm(내경) × 250mm

예비컬럼 : Brownlee Labs RP 18(5 μ m)

용출제 A : CH ₃ CN	10%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	90%	
용출제 B : CH ₃ CN	70%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	30%	

용출 : 용출제 A중의 용출제 B 5 내지 60%의 선형 구배로 40분 이내에 용출시킴.

유속 : 1.8ml/분

U.V. 검출기 : 254nm

내부 표준 물질 : 테이코플라닌 A₂ 성분 2[그루포 레페티트 에스. 피. 에이.(Gruppo Lepetit S.p.A.)제품]

같은 조건하에서, 테스토스테론[로우셀 우클라프(Roussel Uclaf)제품]에 대한 체류 시간은 0.60임.

E) 샘플을 불활성 분위기 하의 약 140°C에서 미리 건조시킨 후($\Delta W=4.6\%$), 원소 분석 결과, 다음과 같은 대략적인 백분율 조성(평균치)을 나타내었다 :

탄소 55.82%, 수소 5.17%, 질소 6.31%, 염소(총량) 4.24%, 염소(이온) 0.37%, 공기 중의 900°C 무기 잔류물 1.2%.

F) 과량의 HCl을 첨가시킨 후, KOH로 적정한 후에, 2-메톡시에탄올(MCS) : 물(4 : 1) 중에서 산-염기 적정 결과 다음과 같은 pK_{MCS} 를 갖는 4개의 이온화성 관능기를 나타내었다. 4.6, 5.6, 7.2, 9.2.

G) 다음과 같은 크로마토그래피 시스템 중에서 Rf값 0.24 및 테이코플라닌 A₂ 성분 2에 대한 Rf값 0.70을 갖는다.

5%(w/v) Na₂SO₄ 수용액 70
아세토니트릴 30

실란화실리카겔 60 F₂₅₄ Merck 플레이트(총두께 0.25mm)를 사용했음.

가시화 :

- 자외선.

- 파울리(Pauly)시약(즉, 디아조화 술파닐산)[J. Chromatog. 제20호, 제171면(1965년), Z. Physiol. Chem. 제292호, 제99면(1953년 참조)]을 사용했을 때 황색을 띠며.

- 최소 데이비스(Davis) 배지에서, 바실루스 서브틸리스 ATCC 6633을 사용하는 바이오오토그래피(bioautography).

H) 1717에서 M+H⁺ 피이크를 나타내는 FAB-MS 스펙트럼에 의한 MW는 약 1.716임.

항생물질 A40926 인자 B의 이화학적 특성 :

A) 다음과 같은 최대 흡수치를 나타내는 자외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제14도에 나타내었음).

	λ max (nm)
a) 0.1N HCl	282
b) 인산염 완충액 pH 7.38	281
	300(쇼울더)
c) 0.1N 수산화나트륨 또는 수산화 칼륨	300
d) 인산염 완충액 pH 9.0	283
	300(쇼울더)
e) 메탄올	282

B) 다음과 같은 최대 흡수치(cm^{-1})를 나타내는 적외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제15도에 나타내었음) :

3700-3080, 3080-2700(뉴즐), 1720-1625, 1625-1560, 1505, 1460(뉴즐), 1375(뉴즐), 1295, 1230, 1210, 1150, 1100-1040, 1030, 1015, 970, 890, 840, 810, 720(뉴즐).

C) DMSO d₆ (헥사데루오디메틸술폭시드) 중에서 내부 표준 물질(0.00ppm)로서 TMS를 사용해서

270MHz ¹H-NMR중에서 기록한 다음과 같은 시그널(ppm)의 군을 나타내는 ¹H-NMR 스펙트럼(이 스펙트럼은 제16도에 나타내었음), (δ =ppm) :

δ 0.85(이소프로필, CH₃ 's), 1.15(~13H), 1.44(~2H), 2.02(2H), 2.32-21.35(3H), 4-6.1(~16H), 6.1-8(~23H), 8.52, 9.30, 9.68(브로드 밴드, 이동 양자), 2.5-4(H₂O 피이크로부터 간섭).

D) 다음과 같은 조건 하에서, 역상 HPLC로 분석했을 때, 테이코플라닌 A₂ 성분 2(Rt=20.3분)에 대한 체류 시간(Rt)이 1.22 및 1.27임.

컬럼 : Ultrasphere ODS(5 μ m) Altex(백크만사 제품)

4.6mm(내경) × 250mm

예비컬럼 : Brownlee Labs RP 18(5 μ m)

용출제 A : CH ₃ CN	10%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	90%	
용출제 B : CH ₃ CN	70%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	30%	

용출 : 용출제 A중의 용출제 B 5 내지 60%의 선형 구배로 40분 이내에 용출시킴.

유속 : 1.8ml/분

U.V. 검출기 : 254nm

내부 표준 물질 : 테이코플라닌 A₂ 성분 2[그루포 레페티트 에스. 피. 에이. 제품]

E) 샘플을 불활성 분위기 하의 약 140°C에서 미리 건조시킨 후($\Delta W=9.6\%$), 원소 분석 결과, 다음과 같은 대략적인 백분율 조성(평균치)을 나타내었다.

탄소 54.09%, 수소 5.13%, 질소 6.34%, 염소(총량) 4.12%, 염소(이온) 0.39%, 900°C 공기 중에서 무기 잔류물 5%.

F) 과량의 HCl(pH 2.7)을 첨가한 후, KOH로 적정한 후에, 2-메톡시에탄올(MCS) : 물(4 : 1) 중에서 산-염기 적정 결과 다음과 같은 pK_{MCS} 를 갖는 4개의 이온화성 관능기를 나타내었다. 4.6, 5.6, 7.2, 9.2.

G) 다음과 같은 크로마토그래피 시스템 중에서 Rf값 0.21 및 테이코플라닌 A₂ 성분 2에 대한 Rf값 0.53.

5%(w/v) Na₂SO₄ 수용액 70

아세토니트릴 30

실란화실리카겔 60 F₂₅₄ Merck 플레이트(총두께 0.25mm)를 사용했음.

가시화 :

- 자외선.

- 파울리(Pauly)시약(즉, 디아조화 술파닐산)[J. Chromatog. 제20호, 제171면(1965년), Z. Physiol. Chem. 제292호, 제99면(1953년) 참조]을 사용했을 때 황색을 띠.

- 최소 데이비스(Davis) 배지에서, 바실루스 서브틸리스 ATCC 6633을 사용하는 바이오오토그래피.

H) 1731에서 MH^+ 피이크를 나타내는 FAB-MS 스펙트럼으로부터 MW는 약 1,730임.

항생물질 A40926 인자 B₀의 이화학적 특성 :

A) 다음과 같은 최대 흡수치를 나타내는 자외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제14도에 나타내었음) :

	λ max (nm)
a) 0.1N HCl	282
b) 인산염 완충액 pH 7.38	281
	300(쇼올더)
c) 0.1N 수산화나트륨 또는 수산화 칼륨	300
d) 인산염 완충액 pH 9.0	283
	300(쇼올더)
e) 메탄올	282

B) 다음과 같은 최대 흡수치(cm^{-1})를 나타내는 적외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제15도에 나타내었음) :

3700-3080, 3080-2700(뉴졸), 1720-1625, 1625-1560, 1505, 1460(뉴졸), 1375(뉴졸), 1295, 1230, 1210, 1150, 1100-1040, 1030, 1015, 970, 890, 840, 810, 720(뉴졸).

C) DMSO d₆ (헥사데루오디메틸술폭시드) 중에서 내부 표준 물질(0.00ppm)로서 TMS를 사용해서

270MHz ¹H-NMR중에서 기록한 다음과 같은 시그널(ppm)의 균을 나타내는 ¹H-NMR 스펙트럼(이 스펙트럼은 제16도에 나타내었음) (δ =ppm).

δ 0.85(이소프로필, CH₃ 's), 1.15(~13H), 1.44(~2H), 2.02(2H), 2.32-2.35(3H), 4-6.1(~16H), 6.1-8(~23H), 8.52, 9.30, 9.68(브로드 밴드 ; 이동 양자), 2.5-4(H₂O 피이크로부터 간섭).

D) 다음과 같은 조건 하에서, 역상 HPLC로 분석했을 때, 테이코플라닌 A₂ 성분 2(Rt=20.3분)에 대한 체류 시간(Rt)이 1.22임.

컬럼 : Ultrasphere ODS(5 μ m) Altex(백크만사 제품)

4.6mm(내경) × 250mm

예비컬럼 : Brownlee Labs RP 18(5 μ m)

용출제 A : CH ₃ CN	10%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	90%	
용출제 B : CH ₃ CN	70%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	30%	

용출 : 용출제 A중의 용출제 B 5 내지 60%의 선형 구배로 40분 이내에 용출시킴.

유속 : 1.8ml/분

U.V. 검출기 : 254nm

내부 표준 물질 : 테이코플라닌 A₂ 성분 2[그루포 레페티드 에스. 피. 에이. 제품]

E) 샘플을 불활성 분위기 하의 약 140°C에서 미리 건조시킨 후($\Delta W=9.6\%$), 원소 분석 결과, 다음과 같은 대략적인 백분을 조성(평균치)을 나타내었다.

탄소 54.09%, 수소 5.13%, 질소 6.34%, 염소(총량) 4.12%, 염소(이온) 0.39%, 900°C 공기 중의 무기 잔류물 5%.

F) 과량의 HCl을 첨가한 후, KOH로 적정한 후에, 2-메톡시에탄올(MCS) : 물(4 : 1) 중에서 산-염기 적정 결과 다음과 같은 pK_{MCS}를 갖는 4개의 이온화 관능기를 나타내었다. 4.6, 5.6, 7.2, 9.2.

G) 다음과 같은 크로마토그래피 시스템 중에서 Rf값 0.21 및 테이코플라닌 A₂ 성분 2에 대한 Rf값 0.53임.

5%(w/v) Na ₂ SO ₄ 수용액	70
아세토니트릴	30

실란화실리카겔 60 F₂₅₄ Merck 플레이트(총두께 0.25mm)를 사용했음.

가시화 :

- 자외선.

- 파울리(Pauly)시약(즉, 디아조화 술파닐산)[J. Chromatog. 제20호, 제171페이지(1965년), Z. Physiol. Chem. 제292호, 제99페이지(1953년 참조)]을 사용했을 때 황색을 띠.

- 최소 데이비스(Davis) 배지에서, 바실루스 서브틸리스 ATCC 6633을 사용하는 바이오오토그래피.

H) 1731에서 M⁺ 피이크를 나타내는 FAB-MS 스펙트럼으로부터 MW는 약 1,730이었다.

항생물질 A40926 인자 PA의 이화학적 특성 :

A) 다음과 같은 최대 흡수치를 나타내는 자외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제17도에 나타내었음).

	λ_{max} (nm)
a) 0.1N HCl	282
b) 0.1N 수산화 칼륨	300
c) 인산염 완충액 pH 7.38	282
	300(쇼울더)
d) 인산염 완충액 pH 9.0	283
	300(쇼울더)

B) 다음과 같은 최대 흡수치(cm⁻¹)를 나타내는 적외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제18도에 나타내었음).

3700-3100, 3000-2800(뉴줄), 1760-1710, 1655, 1620-1550, 1505, 1460(뉴줄), 1375(뉴줄), 1260, 1250-950, 845, 805, 720(뉴줄).

C) DMSO d₆ (헥사데로디메틸설폭사이드) 중에서 내부 표준 물질(0.00ppm)로서 TMS를 사용해서

270MHz ¹H-NMR 중에서 기록한 다음과 같은 시그널(ppm단위)의 군을 나타내는 ¹H-NMR 스펙트럼(이 스펙트럼은 제19도에 나타내었음), (δ =ppm).

0.86d's(CH₃), 1.15-1.22m(CH₂)_n, 1.41(CH₂), 2.01s(CH₃), 2.01m(CH₂), 2.28s(N-CH₃), 4.26-5.96br(펩티드 및 방향족 CH's), 6.33-7.73br(방향족 CH's 및 펩티드 NH's).

br=브로드

d=이중선

dd=이중선의 이중선

m=다중선

s=단일선

t=삼중선

D) 다음과 같은 조건 하에서, 역상 HPLC로 분석했을 때, 테이코플라닌 A₂ 성분 2(Rt=20.3분)에 대한 체류 시간(Rt)이 1.15임.

컬럼 : Ultrasphere ODS(5 μ m) Altex(백크만사 제품)

4.6mm(내경) × 250mm

예비컬럼 : Brownlee Labs RP 18(5 μ m)

용출제 A : CH ₃ CN	10%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	90%	
용출제 B : CH ₃ CN	70%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	30%	

용출 : 용출제 A중의 용출제 B 5 내지 60%의 선형 구배로 40분 이내에 용출시킴.

유속 : 1.8ml/분

U.V. 검출기 : 254nm

내부 표준 물질 : 테이코플라닌 A₂ 성분 2[그루포 레페티트 에스. 피. 에이. 제품]

E) 다음과 같은 크로마토그래피 시스템 중에서 테이코플라닌 A₂ 성분 2에 대한 Rf값이 0.62임.

5%(w/v) Na₂SO₄ 수용액 70

아세토니트릴 30

실란화실리카겔 60 F₂₅₄ Merck 플레이트(총두께 0.25mm)를 사용했음.

가시화 :

- 자외선.

- 파울리시약(즉, 디아조화 술파닐산)[J. Chromatog. 제20호, 제171페이지(1965년), Z. Physiol. Chem. 제292호, 제99페이지(1953년)참조]을 사용했을 때 황색을 띠.

- 최소 데이비스 배지에서 바실루스 서브틸리스 ATCC 6633을 사용하는 바이오오토그래피.

H) 1761에서 최대 강도 피이크를 갖는 피이크의 군을 나타내는 FAB-MS 스펙트럼으로부터 MW는 약 1,758이었다.

FAB-MS 분석의 조작 조건은 다음과 같다.

기기 : FAB gun Ion Tech가 장치된 VG Mod ZAB SE

조건 : 포티지브 FAB, Xe

가속전압, 8KV

매트릭스 : 티오글리세롤-글리세롤(1 : 1, v/v).

항생물질 A40926 인자 PB의 이화학적 특성

다음과 같은 최대 흡수치를 나타내는 자외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제20도에 나타내었음).

	λ max (nm)
a) 0.1N HCl	282
b) 0.1N 수산화 칼륨	300
c) 인산염 완충액 pH 7.38	282
	300(쇼울더)
d) 인산염 완충액 pH 7.0	282
	300(쇼울더)

B) 다음과 같은 최대 흡수치(cm⁻¹)를 나타내는 적외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제21도에 나타내

있음).

3700-3100, 3000-2800(뉴졸), 1760-1710, 1655, 1620-1560, 1605, 1480-1420(뉴졸), 1375(뉴졸), 1320-1270, 1230-1190, 1150, 1120-920, 845, 810, 720(뉴졸).

C.1) DMSO d₆ (헥사데테로디메틸술폭사이드) 중에서 내부 표준 물질(0.00ppm)로서 TMS를 사용해서 270MHz에서 다음과 같은 시그널(ppm)의 군을 나타내는 ¹H-NMR 스펙트럼(이 스펙트럼은 제22도에 나타내었음), (δ=ppm), 다중도, (속성) :

0.84d(이소프로필 CH₃'s), 1.17m(CH₂)_n, 1.43m(CH₂), 1.99s(CH₃), 2.01m(CH₂), 2.31s(N-CH₃), 2.79dd(C-H), 3.70m(C-H), 4.06-6.02br(펩티드 및 방향족 CH's), 6.45-7.74br(방향족 CH's 및 펩티드 NH's), 8.19-9.99br(펩티드 NH's 및 페놀 OH's).

C.2) DMSO d₆+CF₃COOD 중에서 내부 표준 물질(0.00ppm)로서 TMS를 사용해서 270MHz에서 다음과 같은 시그널(ppm)의 군을 나타내는 ¹H-NMR 스펙트럼(이 스펙트럼은 제23도에 나타내었음). (δ=ppm) 다중도 (속성).

0.84d(이소프로필 CH₃), 1.13m(CH₂)_n, 1.40m(CH₂), 1.98s(CH₃), 2.00m(CH₂), 2.92dd(C-H), 3.29-3.71m(당 C-H's), 4.07-6.09s 및 m(펩티드 및 방향족 CH's) ; 6.45-7.83s 및 m(방향족 CH's 및 펩티드 NH's), 8.17-10.38(펩티드 NH's, 페놀 OH's).

D) 다음과 같은 조건 하에서, 역상 HPLC로 분석했을 때, 테이코플라닌 A₂ 성분 2(Rt=20.3분)에 대한 체류 시간(Rt)이 1.27 및 1.32임.

컬럼 : Ultrasphere ODS(5μm) Altex(백크만사 제품)

4.6mm(내경)×250mm

예비컬럼 : Brownlee Labs RP 18(5μm)

용출제 A : CH ₃ CN	10%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	90%	
용출제 B : CH ₃ CN	70%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	30%	

용출 : 용출제 A중의 용출제 B 5 내지 60%의 선형 구배로 40분 이내에 용출시킴.

유속 : 1.8ml/분

U.V. 검출기 : 254nm

내부 표준 물질 : 테이코플라닌 A₂ 성분 2[그루포 레페티트 에스. 피. 에이. 제품]

E) 다음과 같은 크로마토그래피 시스템 중에서 테이코플라닌 A₂ 성분 2에 대한 Rf값이 0.53임.

5%(w/v) Na₂SO₄ 수용액 70

아세트니트릴 30

실란화실리카겔 60 F₂₅₄ Merck 플레이트(총두께 0.25mm)를 사용했음.

가시화 :

- 자외선.

- 파울리(Pauly) 시약(즉, 디아조화 술폰닐산[J. Chromatog. 제20호, 제171페이지(1965년), Z, Physiol. Chem. 제292호, 제99페이지(1953년) 참조]을 사용했을 때 황색을 띠).

- 최소 데이비스(Davis) 배지에서, 바실루스 서브틸리스 ATCC 6633을 바이오오토그래피.

F) 1776에서 최대 강도 피크를 갖는 피크의 군을 나타내는 FAB-MS 스펙트럼으로부터 MW는 약 1,772이었다. FAB-MS 분석의 조작 조건은 다음과 같다.

기기 : FAB gun Ion Tech가 장치된 VG Mod ZAB SE

조건 : 포티지브 FAB, Xe

가속전압, 8KV.

매트릭스 : 티오글리세롤-글리세롤 1/1(v/v)

항생물질 A 40926 만노실 아글리콘은 다음과 같은 특성을 갖는다 :

A) 다음과 같은 최대 흡수치를 나타내는 자외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제24도에 나타내었음).

	λ_{max} (nm)
a) 0.1N HCl	280
b) 인산염 완충액 pH 7.38	280
	300(쇼올더)
c) 0.1N 수산화칼륨	298
d) 인산염 완충액 pH 9.0	282
	300(쇼올더)

B) 다음과 같은 최대 흡수치(cm^{-1})를 나타내는 적외선 흡수 스펙트럼(이 스펙트럼은 제25도에 나타내었음).

3700-3100, 3000-2800(뉴줄), 1655, 1620-1540, 1460(뉴줄), 1375(뉴줄), 1350-1250, 1210, 1150, 1020, 970, 850, 810.

C) DMSO d_6 (핵사듀테로디메틸술폰) + CF_3COOH 중에서 내부 표준 물질(0.00ppm)로서 TMS를 사용해서 270MHz에서 기록했을 때 다음과 같은 시그널(ppm)의 군을 나타내는 ^1H-NMR 스펙트럼(이 스펙트럼은 제26도에 나타내었음), ($\delta = ppm$).

2.51s(DMSO d_6), 250s(NCH_3), 2.88m(Z2), 3.30m(Z'2), 4.08m(X6), 4.44d(X5), 4.49d(X7), 4.83m(X2), 5.02s(4F), 5.08s(Z6), 5.31s(만노스의 아노머 양성자), 5.53d(X4), 5.78s(4B), 4.08d(X3), 7.70s(6B), 6.44-8.52(방향족 및 펩티드 $NH's$).

d=이중선

m=다중선

s=단일선

D) 다음과 같은 조건 하에서, 역상 HPLC로 분석했을 때, 항생물질 L 17054(TA3-1)($R_t=8.78$ 분)에 대한 체류 시간(R_t)이 1.18임.

컬럼 : Ultrasphere ODS($5\mu m$) Altex(백크만사 제품)

4.6mm(내경) \times 250mm

예비컬럼 : Brownlee Labs RP 18($5\mu m$)

용출제 A : CH_3CN	10%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	90%	
용출제 B : CH_3CN	70%	} pH 6.0으로 조절
(2.5g/l) $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	30%	

용출 : 용출제 A종의 용출제 B 5 내지 60%의 선형 구배로 40분 이내에 용출시킴.

유속 : 1.6ml/분

U.V. 검출기 : 254nm

내부 표준 물질 : 항생물질 L 17054(TA3-1)[그루포 레페티트 에스. 피. 에이. 제품]

E) 다음과 같은 크로마토그래피 시스템 중에서 R_f 값이 0.39임.

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 5g/l 를 함유하는 1M NaCl 70

아세트니트릴 30

pH를 6.0으로 조절하고, 실란화 실리카겔 60F₂₅₄ Merck 플레이트(총두께 0.25mm)를 사용함.

가시화 :

- 자외선.

- 파울리사약(즉, 디아조화솔파닐산)[J. Chromatog. 제20호, 제171페이지(1965년), Z, Physiol. Chem. 제292호, 제99페이지(1953년) 참조]을 사용했을 때 황색을 띠.

- 최소 데이비스 배지에서 바실루스 서브틸리스 ATCC 6633을 바이오오토그라피.

F) 약 1374에서 $M+H^+$ 를 갖는 고속 원자 충격(FAB) 질량 스펙트럼. 이하, 본 발명을 다음의 비한정적인 실시예로 더욱 구체적으로 설명한다.

[실시예 1]

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB 및 항생물질 A 40926 아글리콘의 제조

a) 항생물질 A 40926 복합체 AB(실제로 제조에 3의 방법에 따라서 제조된 것과 같음) 750mg을 디메틸설폭시드(DMSO)/37%(w/w) 염산(HCl), 9 : 1(v/v)의 혼합물 150ml 중에 용해시키고, 반응 혼합물을 약 65°C로 가열하였다.

반응 경로를 HPLC로 모니터하고 출발 물질이 완전히 반응했을 때(약 5시간 후), 반응물을 냉각수 600ml로 급냉시키고, 생성 혼합물의 pH를 약 7.5로 조절하였다. 이 혼합물은 표제 화합물의 혼합물을 함유하며, 이 표제 화합물은 다음과 같은 방법에 의한 치화성 크로마토그래피에 의해 그의 2가지 주요 성분으로 분리된다.

b) 상기에서 얻은 수성 혼합물 750ml를 제조에 8에서 기재한 바와 같이 제조된 세파로스-D-알라닐-D-알리닌 크로마토그래피 컬럼(10mM 트리스·HCl pH 7.5 완충액 중의 팽창된 수지 100ml, 층높이 10cm)에 적용하였다. 2M NaCl을 함유하는 pH 7.5의 0.05M NH₄OH·HCl(완충액 B) 200ml를 컬럼에 통과시키고, 이어서 2M NaCl을 함유하는 pH 9.5의 0.05M NH₄OH·HCl(완충액 C) 1500ml로 용출시켜서 컬럼으로부터 A 40926 아글리콘을 선택적으로 제거시켰다. 이어서 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB를 0.1M 암모니아 수용액(완충액 D)으로 용출시켰다. 이어서 용출된 분획물을 pH 약 7.5로 조정된 그들의 항생물질 함량에 따라서 합하고, 각각의 항생물질을 함유하는 용액을 세파로스-D-알라닐-D-알리닌 컬럼(10mM 트리스·HCl pH 7.5 완충액 중의 팽창된 수지 100ml, 층높이 10cm) 상에서 크로마토그래피 시켰다. 무기 염류가 세척될 때까지 증류수를 컬럼에 통과시켰다. 이어서 항생물질을 0.1N 암모니아 수용액으로 용출시켰다. 항생물질 함량에 따라서 합해진, 이들 용출된 분획물을 감압 하에서 n-부탄올과 함께 공비 증류시켜서 소량으로 농축시키고, 동결건조시켜서 각각 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB 201mg 및 A40926 아글리콘 236mg을 얻었다.

약 40°C에서, 약 5일 동안 DMSO/37% HCl 95 : 5의 혼합물을 사용하는 것 이외에는 상기와 동일한 실험을 반복하면, N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB의 수율이 약 15% 증가한 반면, A 40926 아글리콘의 수율은 상응하게 감소되었다.

항생물질 A 40926 복합체, 항생물질 A 40926 인자 A, 항생물질 A 40926 인자 B, 항생물질 A 40926 인자 B₀, 항생물질 A 40926 인자 PA 및 항생물질 A 40926 인자 PB에서 출발하는 이들 실험을 반복하여 실질적으로 동일한 결과를 얻었다(즉, 수율은 ±5% 범위 내에서 변함)

특히, 항생물질 A 40926 인자 A 또는 PA에서 출발하여 얻어진 생성물이 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A인 반면에, 항생물질 A 40926 인자 PB 또는 인자 B₀에서 출발하여 얻어진 생성물은 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₀이다. 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B로부터 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₀ 및 B₁을 얻으며, 이 혼합물을 HPLC에 의해 분리할 수 있다.

[실시예 2]

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A, B₀ 및 B₁의 분리

항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB 20mg을 아세트니트릴 10%를 함유하는 pH 6.0의 18mM 인산나트륨 완충액 1ml 중에 용해시켰다. 이 용액을 HPLC 분취 컬럼(직경 7mm×250mm) Lichrosorb RP18 실란화 실리카겔(입도 7 마이크로미터)(Merck Co.)에 주입하였다.

컬럼을 상 A의 10% 내지 55% 선형 구배를 사용하여 상 A 및 B의 유속 5ml/분에서 55분 이내에 용출시켰다.

상 A : NaOH를 첨가하여 pH 6.0으로 조절한 18mM 인산나트륨/CH₃CN 30/70

상 B : NaOH를 첨가하여 pH 6.0으로 조절한 18mM 인산나트륨/CH₃CN 90/10

254nm에서 컬럼 용출물의 UV 흡수를 기록하였고 기록하였고, 균일한 함량을 갖는 용출 분획물을 모으고, 각각 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A, B₀ 및 B₁을 함유하는 3개의 용출물 균을 분리하였다.

11회의 후속적인 크로마토그래피 시행으로 정제된 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자를 함유하는 용출을 합하고, 이들을 팽창한 세파로스-D-Ala-D-Ala 5ml의 컬럼에 하중시켜서 통상적으로 탈염시켰다(예, 제조에 8). 1mM HCl 10ml 및 이어서 증류수 10ml(5회)로 염을 제거한 후, 항생물질 1% w/v 암모니아 수용액 10ml로 5회 용출시켰다. 이어서 암모니아 용출물을 따로 모으고, 동결건조시켜서 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A 15mg 및 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₁ 3mg을 얻었으며, 이들의 이화학적 자료 및 화학식은 위에서 기재하였다.

[실시예 3]

항생물질 A 40926 아글리콘의 선택적 제조

a) 항생물질 A 40926 복합체 AB에서 출발

항생물질 A 40926 복합체 AB(실질적으로 제조에 3의 방법에 따라서 제조된 것과 같음) 750mg을 디메틸설폭시드/37% 염산, 9 : 1(v/v)의 혼합물 150ml 중에 용해시키고, 반응 혼합물을 약 80°C로 가열

하였다. 반응 경로를 HPLC로 모니터하고, 출발 물질이 완전히 반응했을 때(약 3시간 후), 반응물을 냉각수 600ml로 급냉시키고, 생성 혼합물의 pH를 약 7.5로 조절하였다. 이 혼합물 750ml는 항생물질 A 40926 아글리콘을 함유하는데, 이것은 제조에 8에 기재된 바와 같이 제조된 세파로스-D-알라닐-D-알리닌 크로마토그래피 컬럼(pH 7.5의 10mM 트리스·HCl 중의 팽창된 수지 100ml, 층높이 10cm) 상에서 친화성 크로마토그래피로 분리시켰다. 2M NaCl을 함유하는 pH 9.5의 0.05M NH₄OH·HCl(완충액 C) 1500ml로 용출시켜서 컬럼으로부터 A 40926 아글리콘을 선택적으로 제거시켰다. 이어서 용출된 분획물을 그들의 항생물질 함량에 따라서 합하고, pH 약 7.5로 조절시키고 세파로스-D-알라닐-D-알리닌 컬럼(pH 7.5의 10mM 트리스·HCl 중의 팽창된 수지 100ml, 층높이 10cm) 상에서 크로마토그래피시켰다. 무기염류가 세척될 때까지 컬럼에 증류수를 통과시켰다. A 409 아글리콘을 0.1N 암모니아 수용액으로 용출시켰다. 이들 용출물을 감압 하에서 n-부탄올과 함께 공비 증류시켜서 소량으로 농축시키고, 동결 건조시켜서 a 40926 아글리콘 530mg을 얻었다.

출발 물질의 제조 방법

[제조예 1.]

악티노마두라종(*Actinomadura* sp.) ATCC 39727의 발효

항생물질 A 40926 생산 균주(*Actinomadura* sp.) ATCC 39727의 배양물을 28℃의 오토밀 한천 사면판 상에서 2-3주 동안 성장시킨 후, 이것을 사용해서 0.5% 고기 추출물, 0.5% 자기분해된 이스트, 0.5% 펩톤, 0.3% 카제인 가수분해물, 2% 글루코오스 및 0.15% NaCl(평균 이전 pH 7.5)로 되는 배지 100ml를 넣은 엘렌마이어 플라스크 500ml를 접종시켰다.

이 플라스크를 28℃ 회전 진탕기에서 200rpm으로 약 72시간 동안 배양시키고, 이어서 이 배양물을 상기 배지 4리터를 넣은 발효조로 옮겼다. 이 배양물을 28℃에서 약 72시간 동안 분 당 약 2리터로 통기시키면서 성장시키고, 약 900rpm으로 교반시켰다. 이어서, 이것을 사용해서 동일 배지를 넣은 200리터들이 발효조에 접종하였다. 이 발효조를 분 당 100리터의 평균 공기로 통기시키고, 약 28℃에서 250rpm으로 교반시켰다. 항생물질의 생산을 시험 미생물로서 최소 배지에서 바실루스 서브틸리스(*B. subtilis*)를 사용하는 페이퍼-디스크 한천 확산 방법으로 모니터했다. 최대 활동도는 72-96시간 후에 얻어졌다.

[제조예 2.]

항생물질 A 40926의 회수

A) 상기 발효 브로스를 4℃로 냉각시키고, pH 9.5로 조절시킨 후, 교반시켰다. 약 1시간 후, 이것을 여과시키고, 이 여액에 수성 무기산을 첨가해서 pH 약 3.5로 조절하였다. 이 혼합물을 4℃에서 R 30 분 동안 교반시키고, 이어서(Hyflo-FloMa®) 여과기를 사용해서 여과시켰다. 맑은 여액을 제거하고, 여과 케이크를 탈이온수 중에 현탁시키고, pH를 약 8.5로 조절하고, 교반시킨 후, 여과시켰다. 회수된 케이크를 동일한 방법으로 처리했다. 합한 여액은 항생물질 A 40926을 함유하였다.

A) 팽윤시킨 D-Ala-D-Ala-ε-아미노카프로일-세파로오스 개질 매트릭스(2리터)를 제조예 1에 의해서 얻은 발효 브로스에 첨가(이것을 여과시킨 후, 맑은 여액의 pH를 약 8.5로 조절시킴)하거나, 또는 상기 실시예 2A에 의해서 얻은 합해진 여액에 첨가했다. 이것을 실온에서 철야 교반시킨 후, 이 수지를 여과하여 회수하고, 이어서, 5%(w/v) NaCl을 함유하는 0.45mM HCl-TRIS 완충액 pH 7.5(TRIS=2-아미노-2-히드록시메틸-1,3-프로판디올) 약 10리터로 2회 세척한 다음 증류수 20리터로 4회 세척했다. 이 항생물질 A 40926을 수지로부터 1%(w/v) 암모니아 소량의 용적(약 2.5리터)까지 농축시켰다. 물을 n-부탄올과 함께 공비 증류시켜서 제거했다. 이어서, 석유 에테르를 첨가하고, 조 항생물질 A 40926 복합체 3.4g을 석출시켰다.

[제조예 3.]

항생물질 A 40926 복합체 AB의 정제

필수적으로 상기 제조예 2의 방법에 따라서 얻은 조 항생물질 A 40926 복합체 750mg(HPLC 역가 70%)을 물 400ml 중에 용해시키고, pH 7.5로 조절하고, 여과하였다. 이어서, 이 여액을 D-Ala-D-Ala-ε-아미노카프로일-세파로오스 컬럼(팽윤시킨 수지, 층높이=5cm) 상에서 친화성 크로마토그래피로 처리했다. 이 컬럼을 2M NaCl을 함유시키고 HCl을 첨가해서 pH 7.5로 조절시킨 0.16%(w/v) 암모니아로 평형시키고, 다음과 같은 3가지 완충액을 사용해서 순차적으로 전개시켰다.

완충액 A : 2M NaCl을 함유시키고, HCl을 첨가해서 pH 7.5로 조절시킨 0.16%(w/v) 암모니아(2.6컬럼 증부피).

완충액 B : 2M NaCl을 함유시키고, HCl을 첨가해서 pH 9.5로 조절시킨 0.16%(w/v) 암모니아(16컬럼 증부피).

완충액 C : 1%(w/v) 암모니아 수용액, pH 11.4(2.6컬럼 증부피).

완충액 C는 항생물질 A 40926 복합체 AB를 단일 분획으로 용출시킨다. 용출된 분획물을 pH 7.0으로 조절시키고, 10mM TRIS-HCl pH 7.0으로 완충시킨 동일한 친화성 컬럼에 재적용하였다. 이 컬럼을 완전히 탈염될 때까지 증류수로 세척했다.

이어서, 항생물질을 pH 11.0의 0.39%(w/v) 암모니아 수용액 2컬럼 증부피로 용출시켰다.

용출된 분획물을 소량의 수성 혼합물로 농축시키고, 이어서 동결-건조시켰다. 그리하여, 순수한 항생물질 A 40926 복합체 AB 374mg을 얻었다.

[제조예 4.]

항생물질 A 40926 인자 A 및 B의 단리

A) 제조에 2에서 얻은 항생물질 A 40926 복합체 3.3g 또는 제조에 3에서 얻은 항생물질 A 40926 복합체 AB 2.3g을 물 0.5리터 중에 현탁시키고, 교반시킨후, 여과시켰다. 이 맑은 여액을 용액 A[0.25%(w/v) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 및 2.5%(w/v) NaCl을 함유시키고, NaOH를 첨가해서 pH 6.0으로 조절시킨 0.001M 수성 나트륨 EDTA]로 미리 평형시킨 실란화 실리카겔 컬럼[200g, 총높이 18, 실란화 실리카겔 60, 70-230메쉬, (Merck Inc.)]에 충전시켰다. 이 컬럼을 총부피 약 7리터로 용액 A중의 0% 내지 40%(v/v)의 아세트니트릴의 선형 구배로 약 48시간 이내에 용출시켰다. 약 15.5ml의 분획물을 모으고, 바실루스 서브틸리스에 대한 생물학적 분석법으로 분석하고, HPLC에 의해서 분석했다. 유사한 항생물질 함량을 갖는 분획물을 합했다. 분획물 번호 제310-330호 및 제348-365호는 각각 항생물질 A 40926 인자 A 및 A 40926 인자 B로 명명된 항생물질을 함유하였다.

B) 단일 항생물질 A 40926 인자 A 및 B를 함유하는 합해진 분획물을 감압하에서 농축시켜서 아세트니트릴을 제거하고, 물로 희석시키고(초기 용액 부피의 약 2배), 상기한 종류의 실란화 실리카겔 컬럼(평운시킨 매트릭스의 부피 50ml, 총높이 15cm)에 충전시켰다. 이 컬럼을 완전히 탈염될 때까지 탈이온수로 세척하고, 최종적으로 아세트니트릴/물 60/40(v/v)로 전개시켰다.

용출된 분획물을 감압 하에서 농축시킨 후, 잔류물을 동결-건조시켜서, 용출 분획물 중 제 1군(상기 분획물 번호 제310-330호)으로부터 항생물질 A 40926 인자 A 134mg을 얻고, 용출 분획물 중 제 2군(상기 분획물 번호 제348-365호)으로부터 A 40926 인자 b 206mg을 각각 얻었다.

[제조예 5.]

항생물질 A 40926 인자 PA 및 인자 PB 단리

제조예 2A의 방법, 및 제조예 2B의 방법 중 제 1 단계에 따라서 행하여, 수지에 결합된 항생물질을 1%(w/v) 암모니아 수화물 20리터로 2회 용출시켰다. 이 용출물을 황산을 첨가해서 pH 7.8로 조절하고, n-부탄올을 첨가해서 감압 하에서 공비 증류시켜서 소량의 부피로 농축시켜서 수성 농축물을 얻고, 이어서 이것을 여과지를 사용해서 여과시켰다. 회수된 여액은 항생물질 A 40926 인자 PA, A 40926 인자 PB와 소량의 A 40926 인자 A 및 인자 B를 함유했다(HPLC).

순수한 항생물질 A 40926 복합체 약 50mg/ml(HPLC 분석)을 함유하는 이 수성농축물의 시료 10ml를 5 μm 의 포어 크기를 갖는 필터[Acrodisc®, 겔만 사이언스 인크. (Gelman Science Inc.) 제품]를 사용해서 여과시키고, 이어서 옥타데실 실릴역상 실리카겔(Lichrosorb RP 18, Merck Inc., 입도 10 μm) 20g을 함유하는 스테인레스 스틸 컬럼(직경=2cm)에 걸었다. 이어서, 이 실리카겔을 Chromatospac Modulprep 장치[요벤 이본(Yoben, Yvon), 프랑스]의 스테인레스 스틸 컬럼 중에 중간 압력 약 13.8 기압(14bar) 하에서 충전시키고, 아세트니트릴과 18mM 인산나트륨 완충액(pH 6.0)의 25 : 75(v/v) 혼합물을 첨가해서 평형시켰다. 평형에 사용한 것과 동일한 용매 혼합물을 약 10.5ml/분의 유속으로 사용해서 용출시켰다. 용출은 바실루스 서브틸리스에 대한 생물학적 분석법 및 HPLC에 의해서 모니터링했다.

유사한 항생물질 함량을 갖는 분획물들을 합하고, 5회 크로마토그래피 시험으로 얻은 균일한 분획물을 농축시켜서 유기 용매를 증발시켰다.

생성된 용액에 1M 수성 염화나트륨을 첨가해서 초기 부피의 2배로 희석시키고, 물을 사용해서 평형시킨 실란화 실리카겔 컬럼(50g, 총높이 5cm, 실란화 실리카겔 60, Merck Inc.)에 충전시켰다.

이 컬럼을 완전히 탈염될 때까지(수성 AgNO_3 첨가 후 용출물 중에 AgCl 침전이 없음) 탈이온수로 세척하고, 이어서 아세트니트릴 : 물 1 : 1(v/v)로 용출시켰다. 유사한 항생물질 함량(HPLC 분석)을 갖는 용출물을 합하고, n-부탄올과 함께 공비 증류시켜서 소량의 부피로 농축해서 수용액 상을 얻고, 이어서 동결건조시켰다.

수율 :

항생물질 인자 A 40926 PA : 55mg

항생물질 인자 A 40926 PB : 51mg

항생물질 인자 A 40926 A : 38mg

항생물질 인자 A 40926 B₀ : 33mg

제조예 6.

항생물질 A 40926 인자 B를 단리시키기 위한 별법

제조예 2(최종 단계)에 의해서 제조한 2개의 제제물의 합한 농축물을 여과시키고, 여액을 물로 미리 평형화시킨 실란화 실리카겔 크로마토그래피 컬럼(400g, 총높이 30cm, 실리카겔 60, 70-230메쉬, Merck Inc.)에 걸었다.

이 컬럼을 물(6리터)로 수세하고, 흡착된 항생물질을 다음과 같은 순서에 의해서 아세트니트릴/물로 용출시켰다.

물 중의 5%(v/v) 아세트니트릴 2.7리터

물 중의 10%(v/v) 아세트니트릴 1.6리터

물 중의 15%(v/v) 아세트니트릴 2.9리터

물 중의 20%(v/v) 아세토니트릴 3.15리터

약 18ml의 분획물을 모았다.

용출된 분획물의 활성을 바실루스 서브틸리스 같은 민감한 미생물에 대하여 페이퍼 디스크 생물학적 분석에 의해 시험하고, HPLC에 의해서 분석하였다. 유사한 항생물질 함량을 갖는 분획물(번호 제 472-526호)을 합하고, 감압 하에서 농축시켰다. 이 농축물에 n-부탄올을 첨가해서 공비 증류시켜 물을 제거했다. 잔류하는 부탄올성 용액을 소량의 부피로 농축시켜서 항생물질 A 40926 인자 B 1.4g을 석출시켰다. 이 생성물을 교반 하에서 석유 에테르로 세척하고, 여과(3회)시켜서 모았다. 이것을 진공 하에서 건조시켜서, A 40926 인자 B 760mg을 얻었다.

상기 컬럼 크로마토그래피에 항생물질 A 40926 인자 B를 다시 적용하여, 항생물질 A 40926 인자 B₀ 생성물 540mg을 얻었으며, 이 인자는 항생물질 A 40926 인자 B₀가 HPLC 분석에서 단지 1개의 피이크, 즉 테이코플라닌 A₂ 성분 2에 대하여 1.22의 체류 시간을 갖는 피이크를 나타내는 것을 제외하고는 항생물질 A 40926 인자 B에 대해 상기한 것들과 동일한 이화학적 특성을 갖는다.

[제조예 7.]

항생물질 A 40926 인자 PA 및 항생물질 A 40926 인자 PB를 각각 항생물질 A 40926 인자 A 및 인자 B로 전환시키는 방법

항생물질 A 40926 인자 PA 및 항생물질 A 40926 인자 PB 50mg을 따로 1%(w/v) NH₄OH 수용액 2.5ml 중에 용해시키고, 생성된 각각의 용액을 실온에서 약 24시간 동안 교반하에 방치시켰다.

각 용액을 n-부탄올과 함께 공비 증류시켜서 물을 제거하고, 에틸에테르로 침전시킨 후, 여과시켜 침전물을 모음으로써 초기에 항생물질 A 40926 인자 PA를 함유하는 용액으로부터 항생물질 A 40926 인자 A를 얻었고, 초기에 항생물질 A 40926 인자 PB를 함유하는 용액으로부터 항생물질 A 40926 인자 B를 얻었다(수율 약 74%).

[제조예 8.]

D-알라-D-알라-세파로스의 제조

a) 에피클로로히드린을 사용하는 세파로스의 활성화

다공성 유리질 필터 상에서 여과시키고, 탈염수로 세척한 세파로스 4B[파마시아 파인 케미칼스(Pharmacia Fine Chemicals)] 1리터를 실온에서, 온화한 교반하에 NaOH N/1 1.2리터에 첨가하였다. 에피클로로히드린 100ml를 첨가한 후, 물질을 24시간 동안 차가운 물로 외부 냉각시켜서 약 20℃에서 진탕유지시켰다. 현탁액을 여과시키고, 고상물을 중성 pH가 되도록 탈염수 약 5리터로 세척하였다.

b) 세파로스 ε-ACA-D-Ala-D-Ala

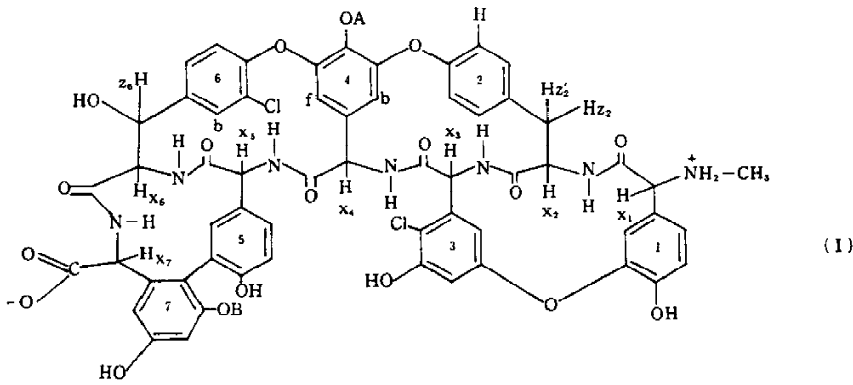
20% NaOH를 첨가하여 pH 11로 조절시킨, 물 200ml 중의 ε-ACA-D-Ala-D-Ala 17g(62.2밀리몰)의 용액에 에피클로로히드린(총 에폭시드 함량 약 15.5밀리당량)으로 유도된 세파로스 4B 약 500ml를 기계적 교반 하에서 첨가하였다.

현탁액을 pH 11의 실온에서 약 2일 동안(에폭시드 함량을 측정하기 위해 사용된 시험이 음성이 될 때까지) 교반시키고, 여과시킨 후 물 300ml로 세척하였다. 여과시킨 수지를 pH가 중성이 될 때까지 물(약 3리터)로 재차 세척하여 세파로스 ε-ACA-D-Ala-D-Ala 460ml를 얻었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

a) 항생물질 A 40926 복합체, 항생물질 A 40926 복합체 AB, 항생물질 A 40926 인자 A, 항생물질 A 40926 인자 B, 항생물질 A 40926 인자 B₀, 항생물질 A 40926 인자 PA, 항생물질 A 40926 인자 PB를 일정량(0.1-10% w/w)의 물의 존재 하에 적합한 유기 용매 중에서 강산으로 조절된 산 가수분해시키고, b) 최종 생성물의 혼합물이 얻어지는 경우, 크로마토그래피법으로 이들을 임의로 분리시킴을 포함하는 하기 일반식(1)로 표시되는 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B₀, 항생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 B₁, 항생물질 A 40926 아글리콘 및 그의 부가염 중에서 선택된 항생물질의 제조 방법.



상기 식 중, A는 수소이거나 또는 N-(C₁₁-C₁₂)아실아미노글루쿠로닐기이고, B는 수소이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 반응 온도가 4 내지 80℃인 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 강산이 할로겐화수소, 인산, 황산 및 할로아세트산 중에서 선택되는 방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 강산이 진한 염산인 방법.

청구항 5

제 2 항에 있어서, 유기 용매가 (C₁-C₄)알킬 술폭시드, (C₁-C₄)알킬 포름아미드, 디옥산, 테트라히드로푸란 등의 용매 중에서 선택되는 방법.

청구항 6

제 2 항에 있어서, 가수분해를 40 내지 80℃의 온도에서 디메틸술폭시드/진한 염산 8 : 2 내지 9.5 : 0.5의 혼합물로 행하는 방법.

청구항 7

제 2 항에 있어서, 향생물질 A 40926 복합체, 향생물질 A 40926 복합체 AB, 향생물질 A 40926 인자 A, 향생물질 A 40926 인자 B, 향생물질 A 40926 인자 B₀, 향생물질 A 40926 인자 PA, 향생물질 A 40926 인자 PB를 약 65℃에서 약 5시간 동안 디메틸술폭시드/37%(w/w) 염산 9 : 1 내지 9.5 : 0.5의 혼합물로 조절된 산 가수분해시키고, 임의로 향생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 A 및 향생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 인자 B를 크로마토그래피법으로 분리시킴을 포함하는 향생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB 또는 그의 인자의 제조 방법.

청구항 8

제 2 항에 있어서, (a) 반응 온도에서 액체인 지방족 산 및 알파-할로겐화 지방족 산, 반응 온도에서 약간 수산화성 액체인 지방족 알칸올 및 지환족 알칸올, 페닐 치환 저급 알칸올(여기서 페닐 잔기는 반응 온도에서 약간 수산화성 액체인(C₁-C₄)알킬, (C₁-C₄)알콕시 또는 할로 잔기를 함유할 수 있음) 및 반응 온도에서 액체인 베타-폴리할로겐화 저급 알칸올 중에서 선택되는 유기 양성자성 용매, 및 (b) 강한 무기산, 강한 유기산 및 수소 형태의 강산 양이온 교환 수지 중에서 선택된 용매와 상용성인 강산의 존재하에 (c) 약 20 내지 약 100℃의 반응 온도에서 향생물질 A 40926 복합체, 또는 그의 단일 인자, 즉 향생물질 A 40926 복합체 AB, 향생물질 A 40926 인자 A, 향생물질 A 40926 인자 B, 향생물질 A 40926인자 PA, 향생물질 A 40926 인자 PB, 향생물질 A 40926 인자 B₀, 향생물질 A 40926 만노실 아글리콘 및 향생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘(복합체 AB/또는 그의 단일 인자)을 조절된 산 가수분해 시킴을 포함하는 향생물질 A 40926 아글리콘의 제조 방법.

청구항 9

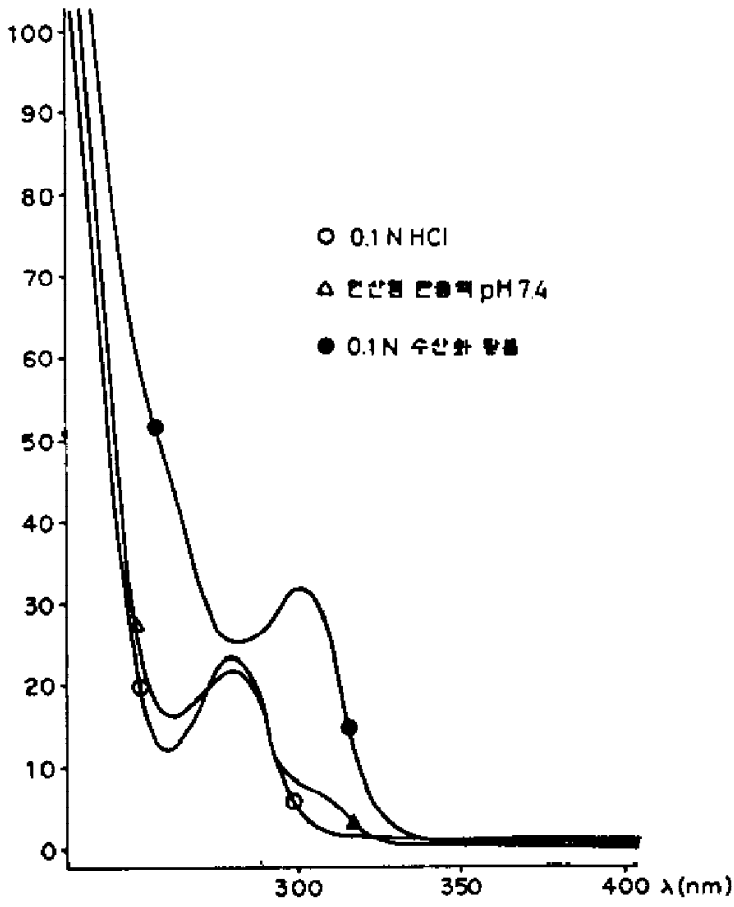
제 2 항에 있어서, 향생물질 A 40926 복합체, 향생물질 A 40926 복합체 AB, 향생물질 A 40926 인자 A, 향생물질 A 40926 인자 B, 향생물질 A 40926 인자 B₀, 향생물질 A 40926 인자 PA, 향생물질 A 40926 인자 PB, 향생물질 A 40926 N-아실아미노글루쿠로닐 아글리콘 복합체 AB 또는 그의 인자, 및 향생물질 A 40926 만노실 아글리콘을 약 80℃에서 디메틸술폭시드/37%(w/w) 염산 8 : 2 내지 9.5 : 0.5의 혼합물로 조절된 산 가수분해시킴을 포함하는 향생물질 A 40926 아글리콘의 제조방법.

청구항 10

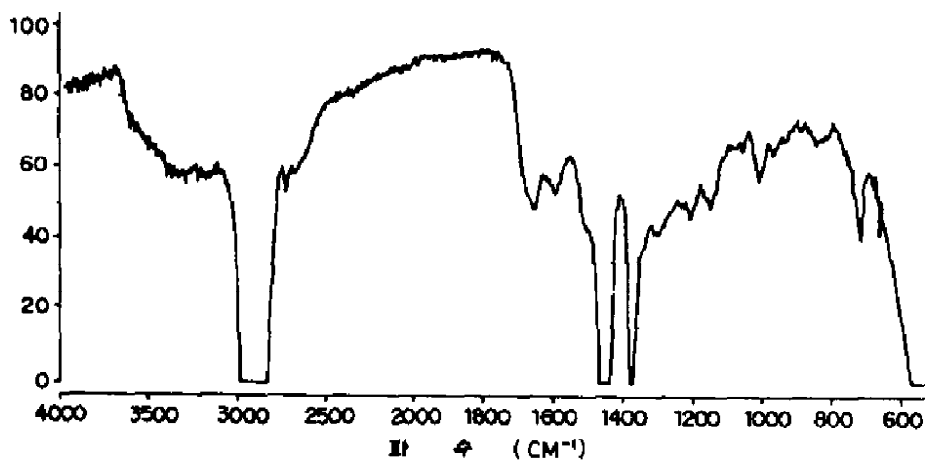
제 1 항에 있어서, A가 운데카노일아미노글루쿠로닐기, 도데카노일아미노글루쿠로닐기 및 이소도데카노일아미노글루쿠로닐기 중에서 선택되는 것인 방법.

도면

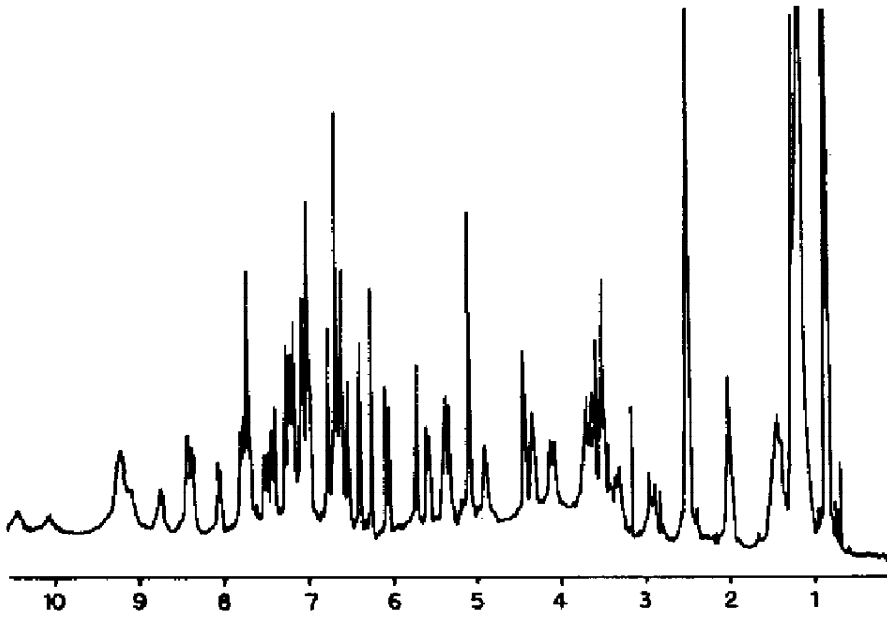
도면1



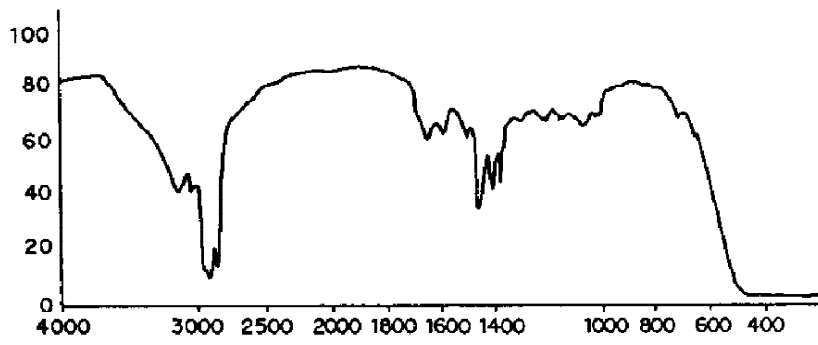
도면2



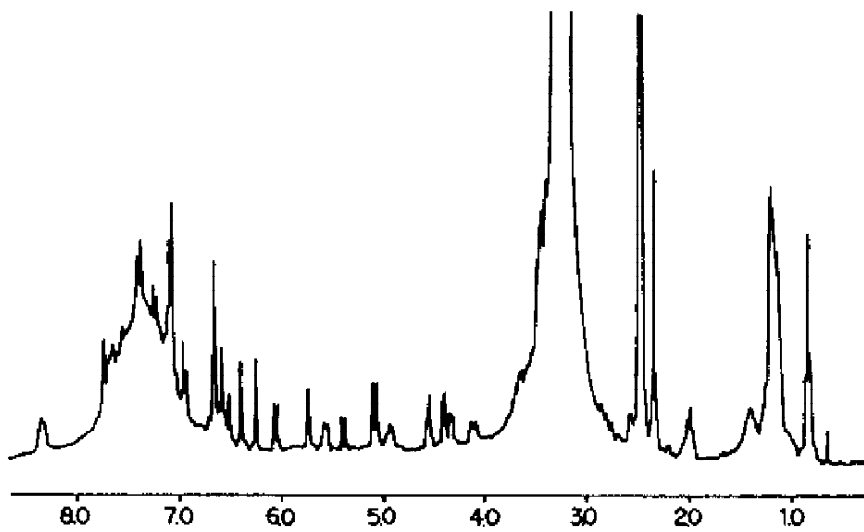
도면3



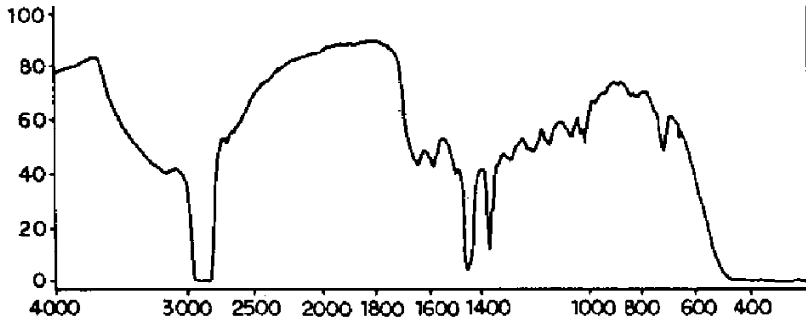
도면4



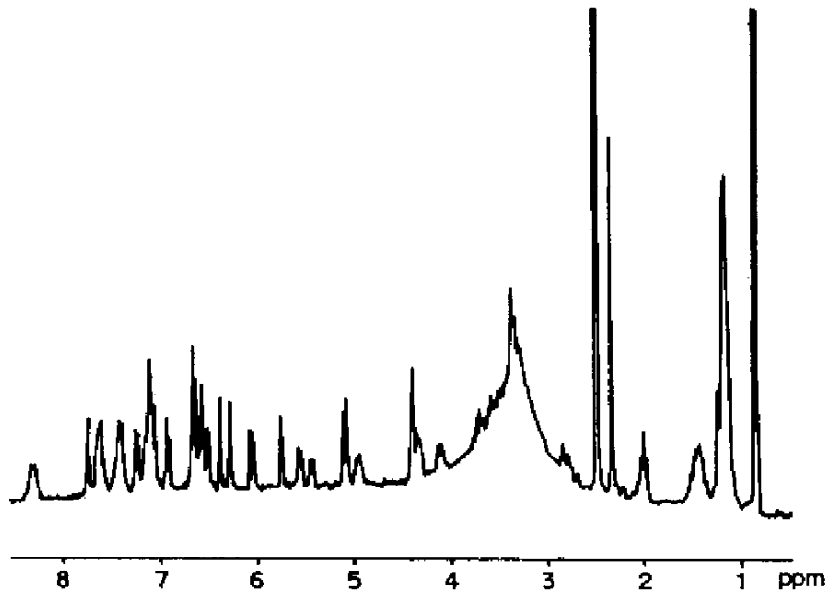
도면5



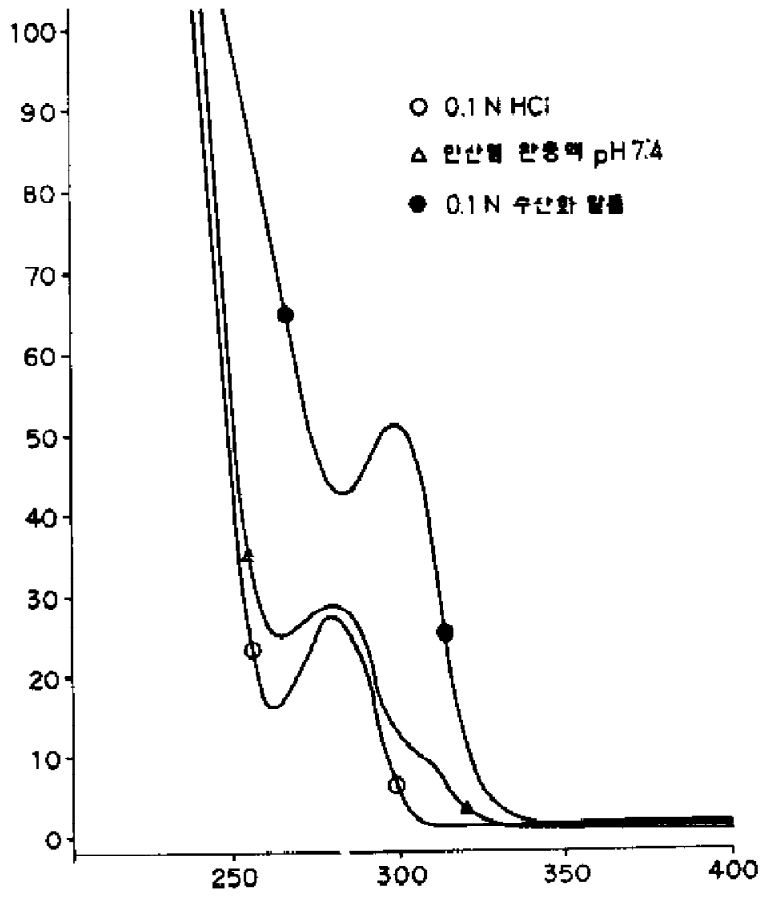
도면6



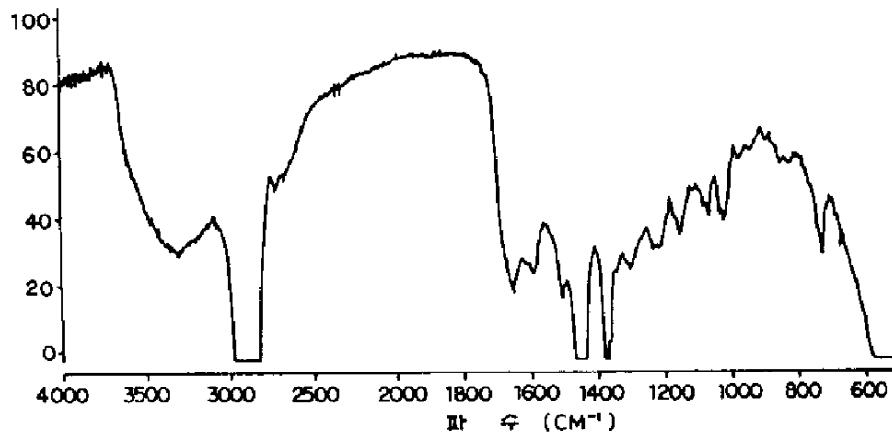
도면7



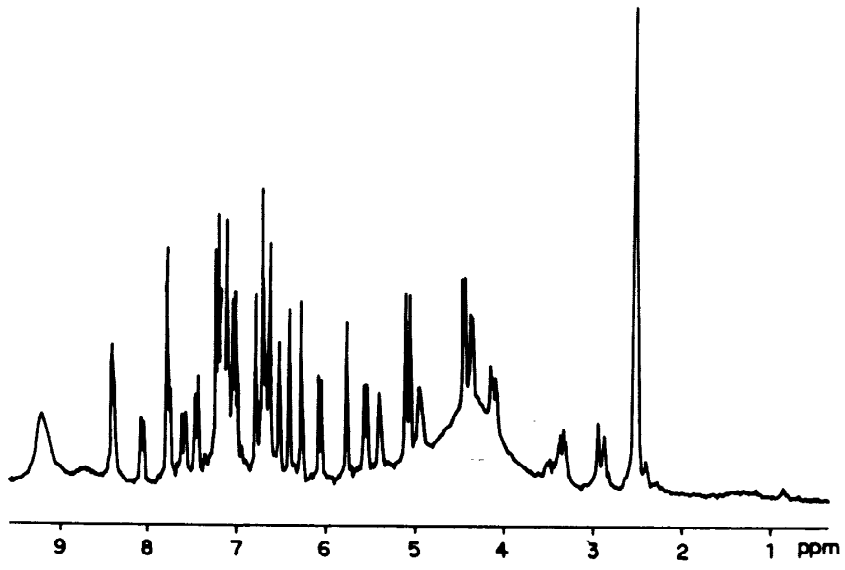
도면8



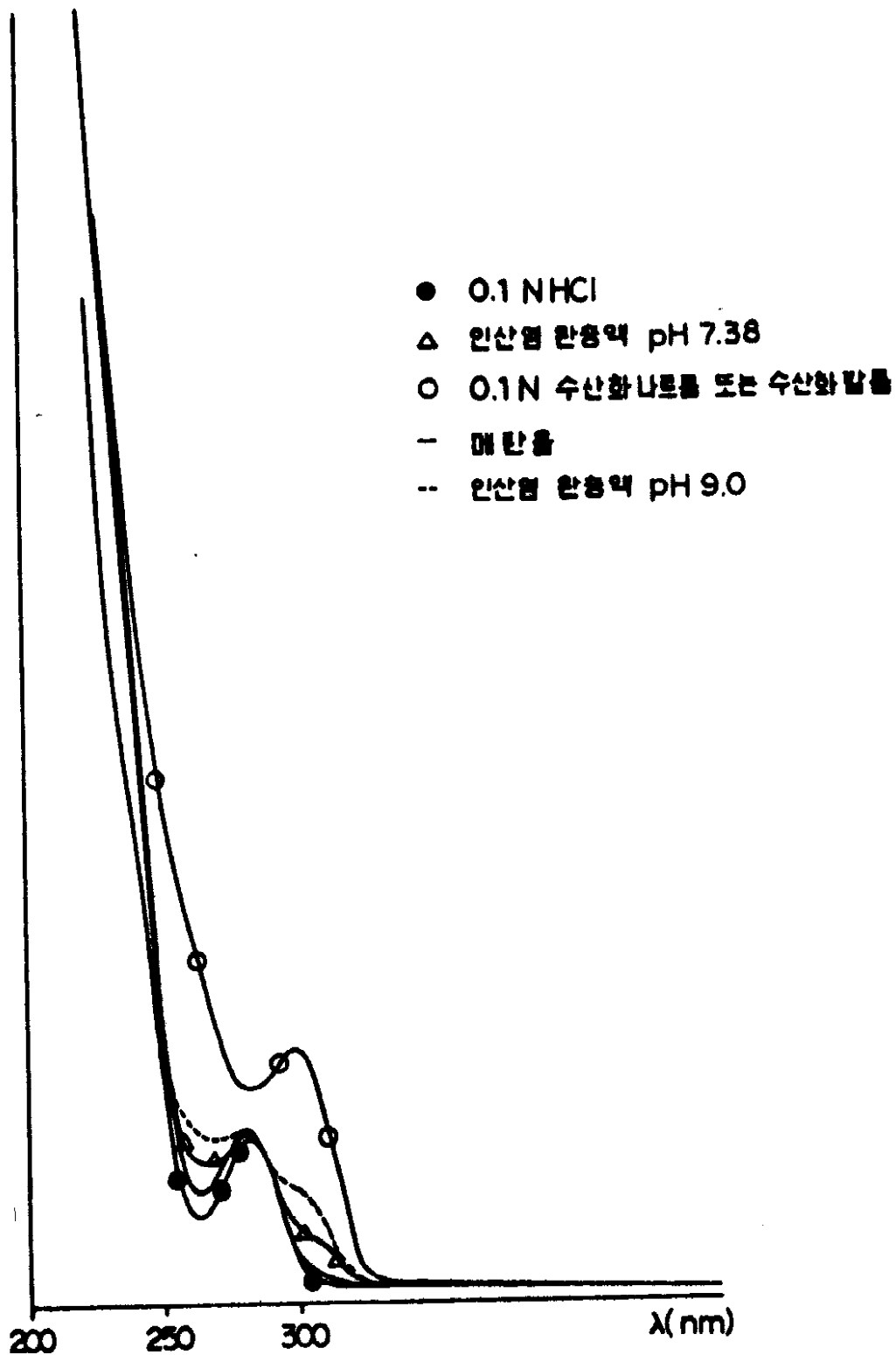
도면9



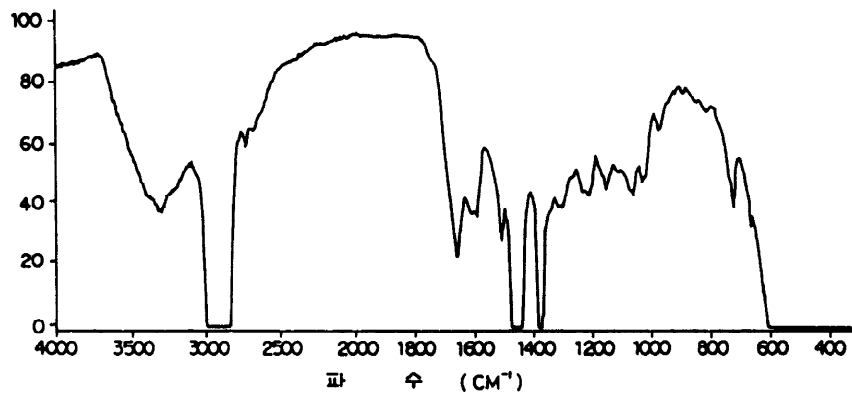
도면 10



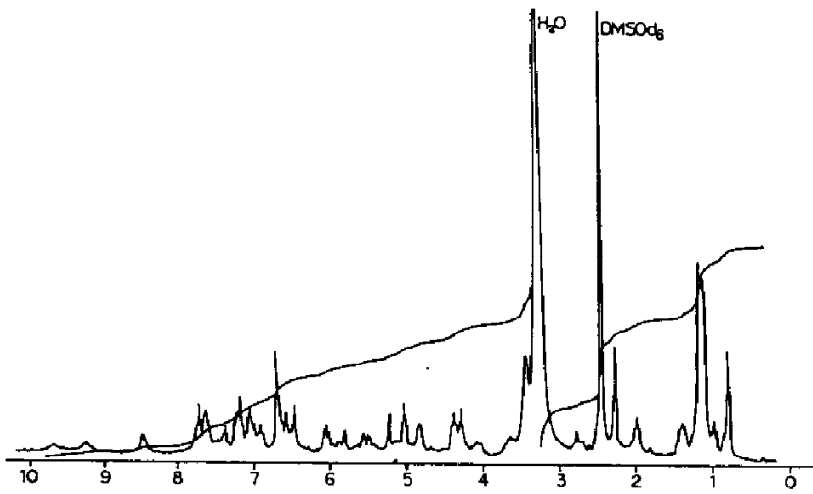
도면 11



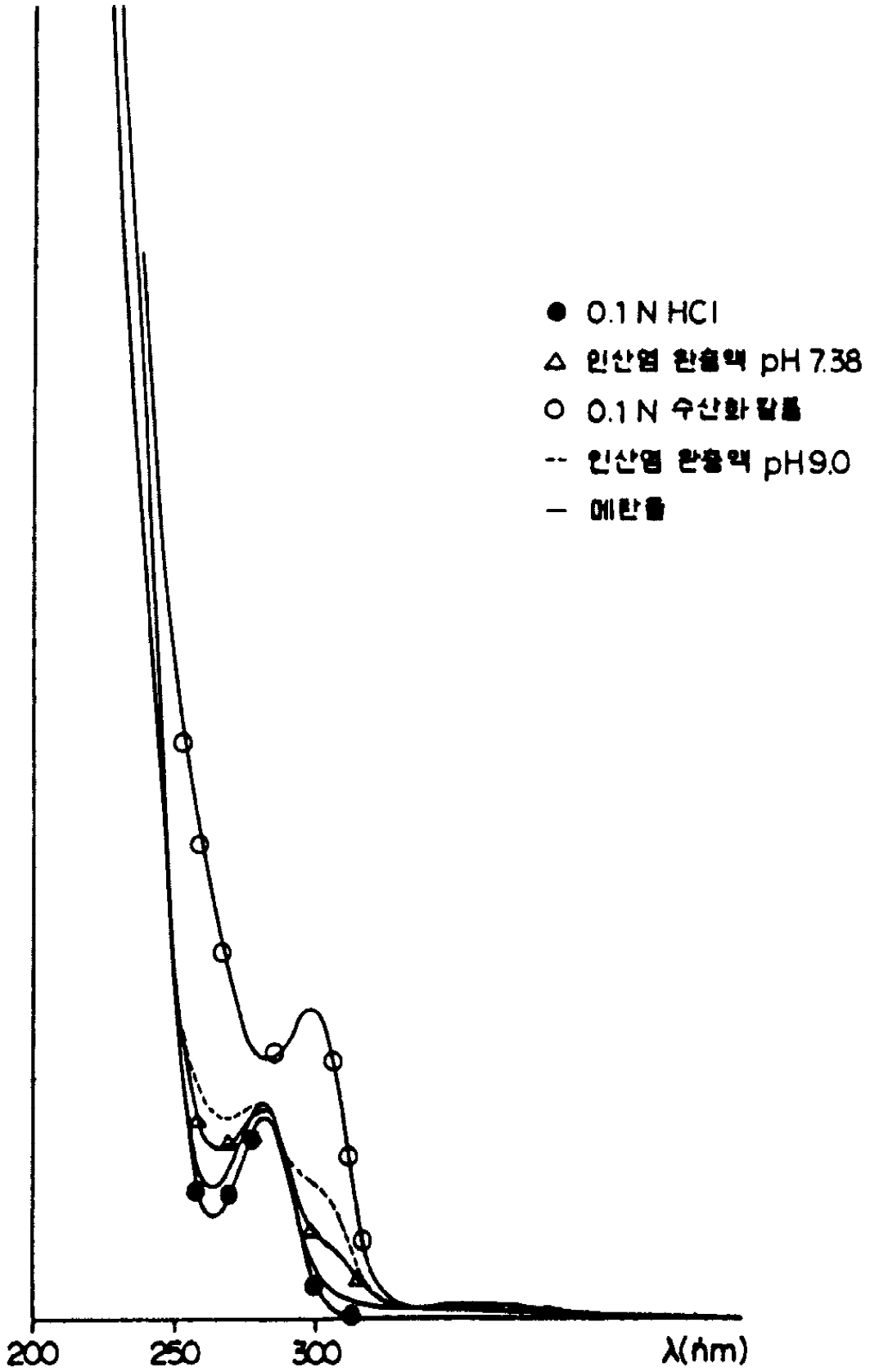
도면12



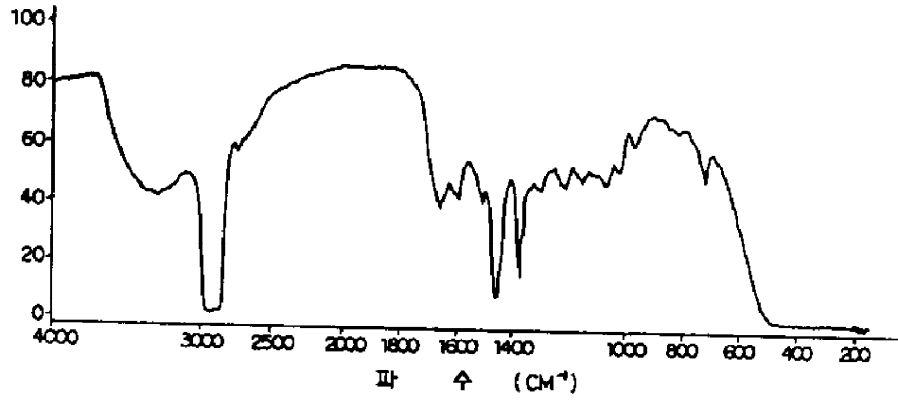
도면13



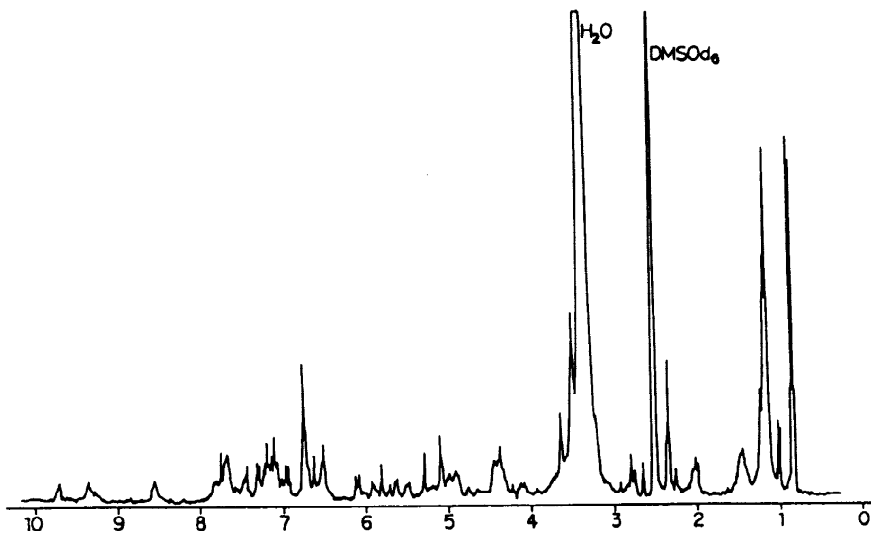
도면 14



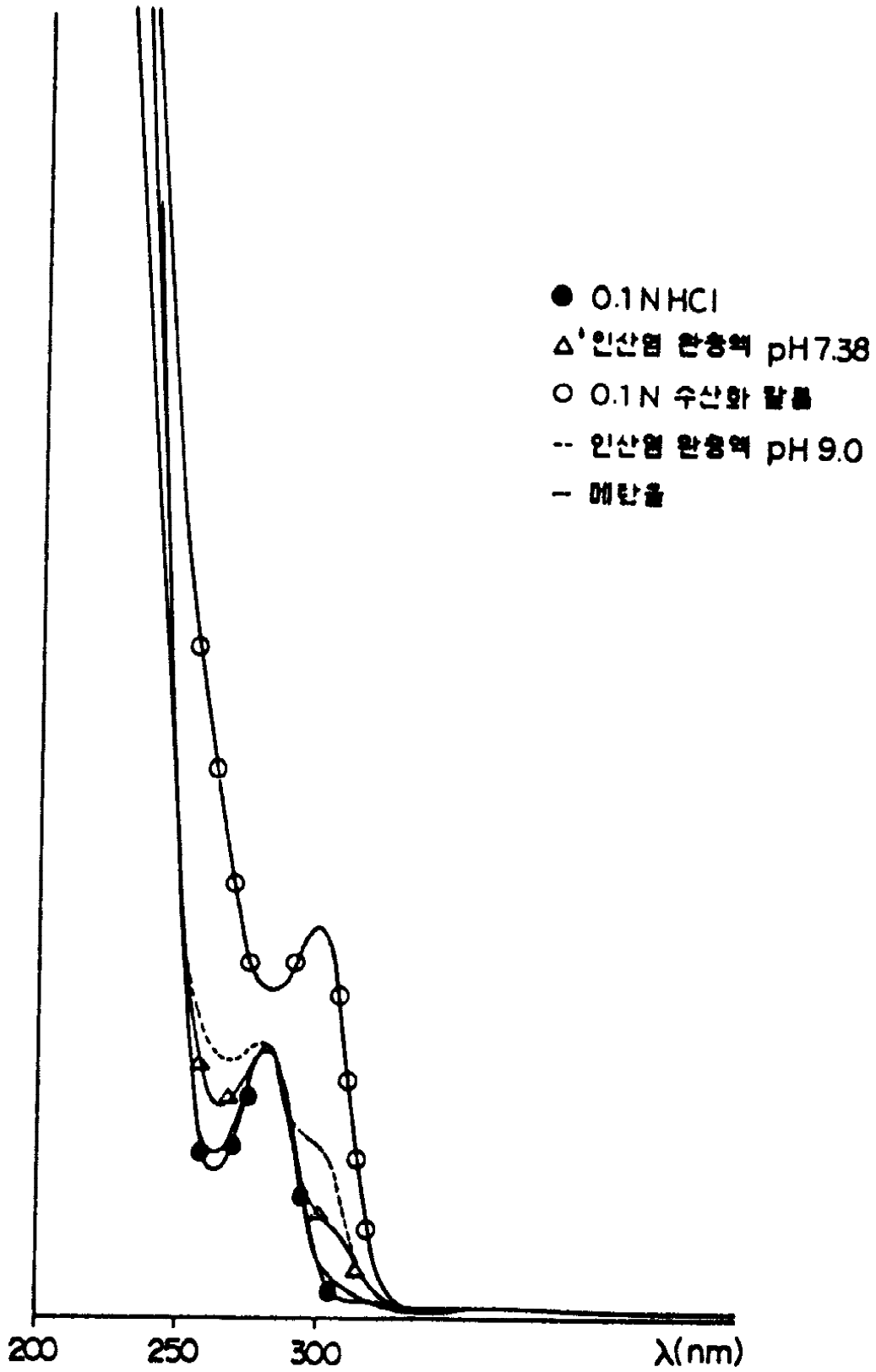
도면 15



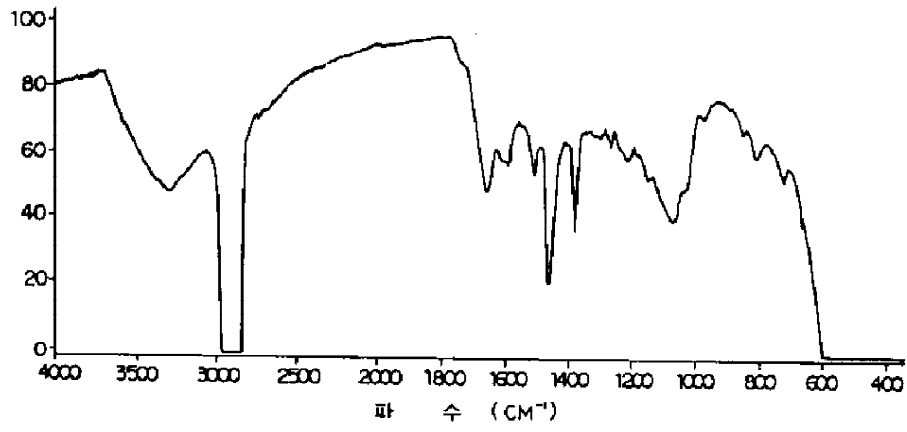
도면 16



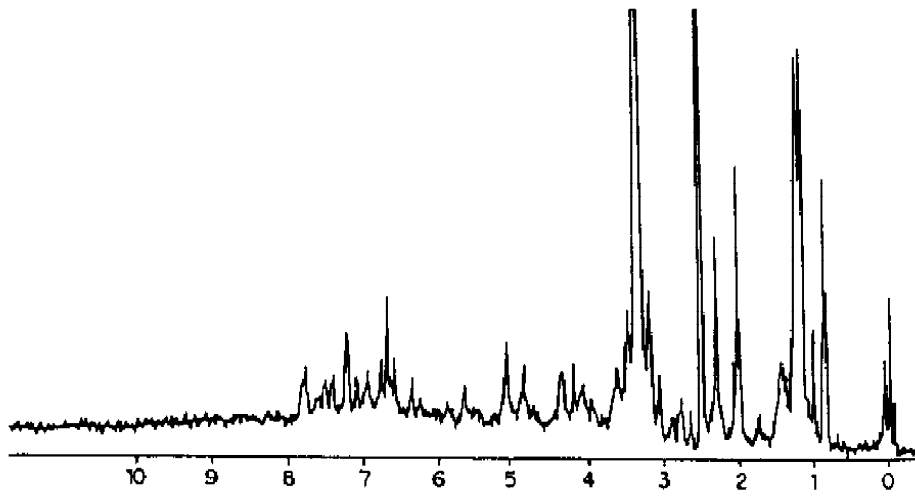
도면 17



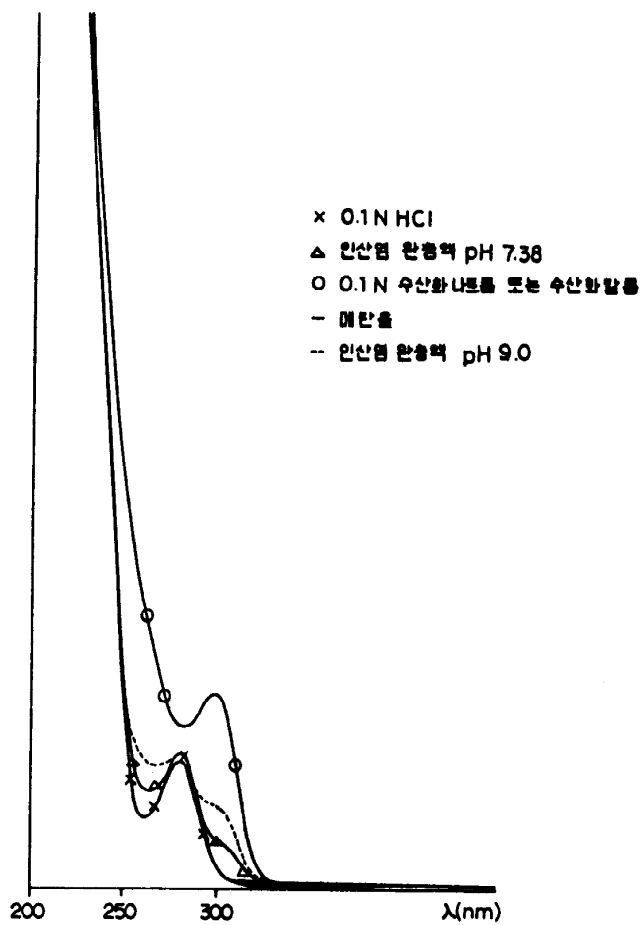
도면 18



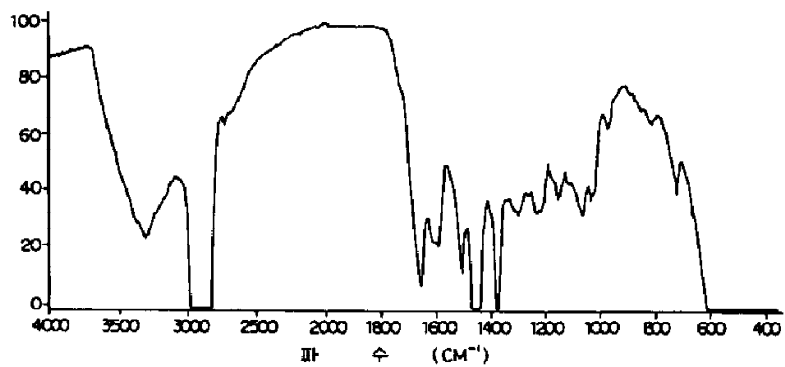
도면 19



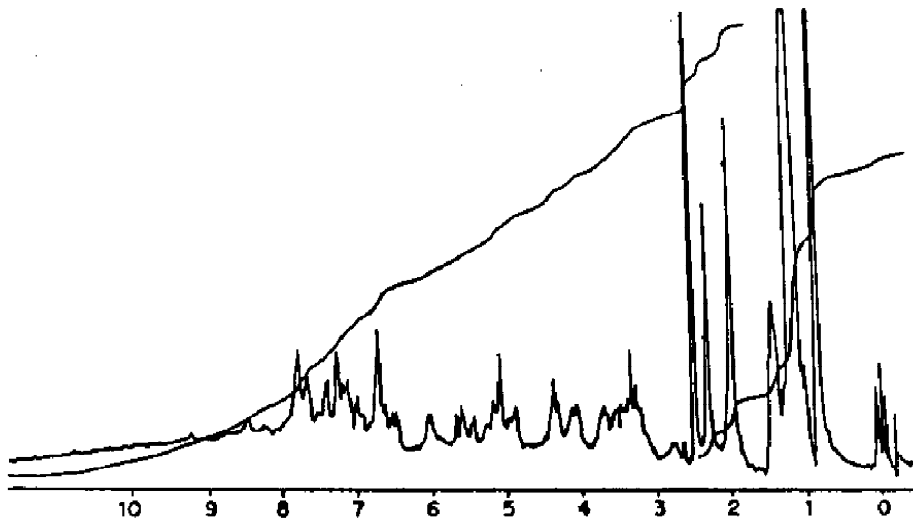
도면20



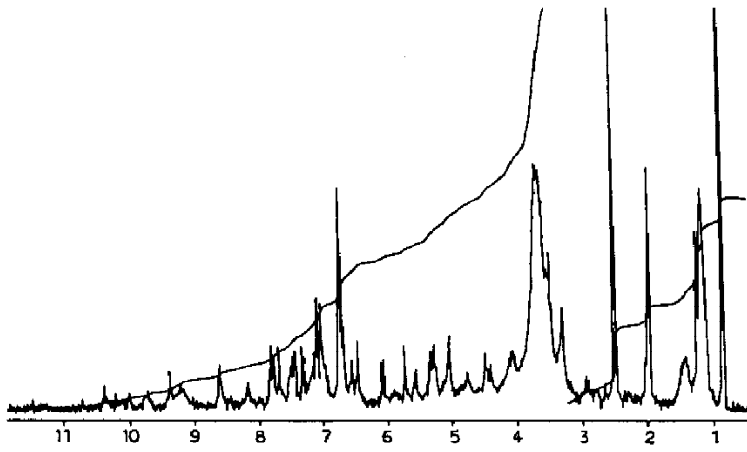
도면21



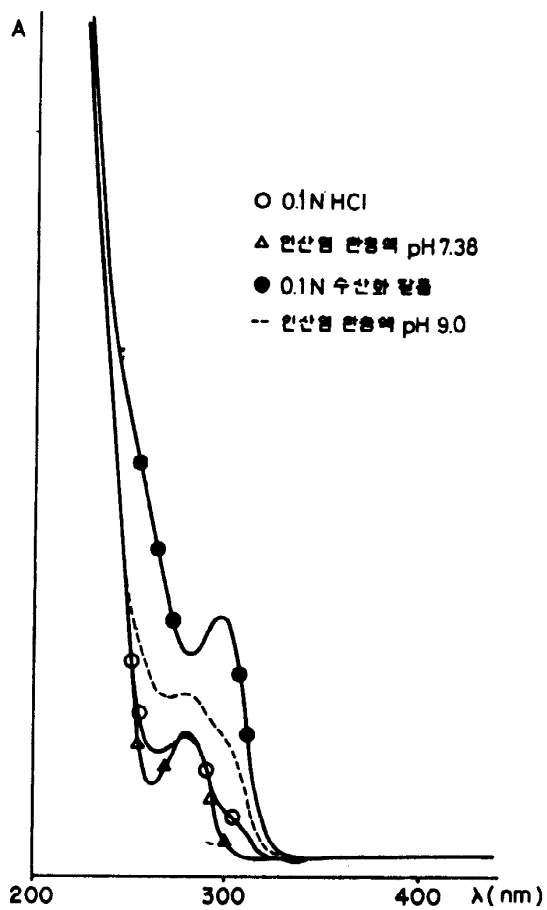
도면22



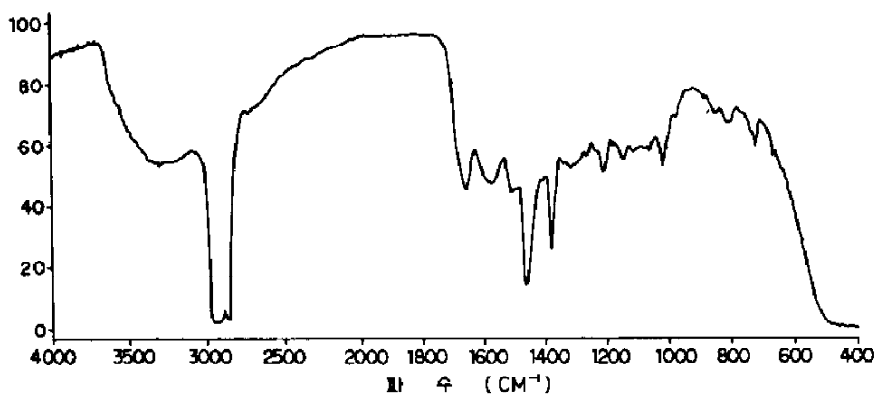
도면23



도면24



도면25



도면26

