

新規マクロライド系抗生物質・
三環性 3-ケトエリスロマイシン類の創薬研究

乙第44号

樫村政人

新規マクロライド系抗生物質・
三環性 3-ケトエリスロマイシン類の創薬研究

榎村政人

目次

| | |
|--|----|
| 序論 | 1 |
| 第1章 マクロライド系抗生物質の研究経緯 | 1 |
| 第2章 第三世代マクロライド系抗生物質の探索 | 4 |
| 本論 | 7 |
| 第1章 三環性マクロライド系抗生物質の合成と構造決定 | 7 |
| 第1節 研究経緯 | 7 |
| 第2節 三環性マクロライド系抗生物質の効率的合成法の開発 | 8 |
| 第3節 三環性アグリコン構造の決定 | 11 |
| 第4節 考察 | 14 |
| 第2章 三環性ケトライド系抗生物質の合成 | 18 |
| 第1節 9-イミン型及び9-アミン型ケトライドの合成 | 18 |
| 第2節 9-イミン型及び9-アミン型ケトライドの構造決定 | 20 |
| 第3節 考察 | 23 |
| 第3章 四環性マクロライド系抗生物質の合成 | 26 |
| 第1節 四環性マクロライド系抗生物質の合成 | 26 |
| 第2節 考察 | 28 |
| 第4章 三環性ケトライド系抗生物質のコンホメーション解析 | 30 |
| 第1節 研究経緯 | 30 |
| 第2節 X線結晶解析によるコンホメーション解析 (torsion angle) | 30 |
| 第3節 X線結晶解析によるコンホメーション解析 (アグリコン上のプロトン間距離) | 33 |
| 第4節 NMRを用いたコンホメーション解析 (テトラヒドロジアゼピン環) | 35 |
| 第5節 NMRを用いたコンホメーション解析 (アグリコン) | 39 |

| | | |
|-------|--|----|
| 第 6 節 | NMR を用いたコンホメーション解析 (pD と温度の影響) | 41 |
| 第 5 章 | 三環性マクロライド系抗生物質の <i>in vitro</i> 抗菌活性 | 43 |
| 第 1 節 | 三環性マクロライド系抗生物質の 3 位における構造活性相関 | 43 |
| 第 2 節 | 三環性ケトライド系抗生物質の各種標準菌株に対する <i>in vitro</i> 抗菌活性 | 44 |
| 第 3 節 | 三環性ケトライド系抗生物質の臨床分離株に対する <i>in vitro</i> 抗菌活性 | 48 |
| 第 4 節 | 培地 pH 及び接種菌量の抗菌活性に及ぼす影響 | 50 |
| 第 5 節 | 三環性ケトライド系抗生物質のマクロライド耐性菌に対する <i>in vitro</i> 抗菌活性 | 50 |
| 第 6 節 | 四環性マクロライド系抗生物質の <i>in vitro</i> 抗菌活性 | 53 |
| 第 7 節 | 考察 | 54 |
| 第 6 章 | 三環性ケトライド系抗生物質の <i>in vivo</i> 抗菌活性と体内動態 | 55 |
| 第 1 節 | マウス全身感染モデルに対する感染防御試験 | 55 |
| 第 2 節 | マウス呼吸器感染モデルに対する治療効果 | 56 |
| 第 3 節 | 経口及び静脈内投与後の血漿中濃度 | 58 |
| 第 4 節 | 考察 | 60 |
| 結論 | | 62 |
| 謝辞 | | 65 |
| 実験の部 | | 66 |
| 参考文献 | | 82 |

凡 例

化学用語の略記は以下のとおりである。

EM : エリスロマイシン

CAM : クラリスロマイシン, 6-*O*-メチルエリスロマイシン A

AZM : アジスロマイシン

RXM : ロキシスロマイシン

RKM : ロキタマイシン

CAP : Community-acquired Pneumonia, 市中肺炎

ERSP : Erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, エリスロマイシン耐性肺炎球菌

PRSP : Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, ペニシリン耐性肺炎球菌

TE-802 : 大正製薬で開発中の三環性ケトライド化合物の開発コード番号

MIC : Minimal Inhibitory Concentration, 最小発育阻止濃度

MBC : Minimal Bactericidal Concentration, 最小殺菌濃度

HMBC : ¹H-Detected Multiple-bond Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectrum

COSY : Correlated Spectroscopy

HMQC : ¹H-Detected Multiple Quantum Coherence Spectrum

NOE : Nuclear Overhauser Effect

NOESY : Nuclear Overhauser Enhanced and Exchange Spectroscopy

ROESY : Rotating Frame Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy

ESI-MS : Electro Spray Ionization Mass Spectrometry

HRFAB-MS : High Resolution Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry

RU-004 : ルセル社 (現アベンティス社) の開発候補化合物コード番号

CFU : Colony Forming Units, 生菌数単位

MIC₅₀ 及び MIC₉₀ : 全体の 50%あるいは 90%の菌株の最小発育阻止濃度

ED₅₀ : 50% effective dose

C_{max} : 最高血中濃度

AUC : 血中濃度曲線下面積

T_{1/2} : 消失半減期

CL : 総クリアランス

Vdss : 定常状態分布容積

pH : Hydrogen ion exponent

po : Oral, per os, 経口

iv : Intravenous, 静注

BA : 生体内利用率

序 論

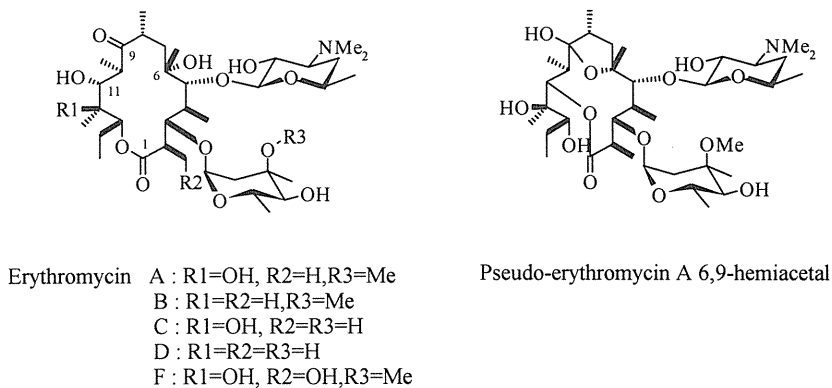
第1章 マクロライド系抗生物質の研究経緯

1929年、イギリスの細菌学者 Fleming によって世界最初の抗生物質「ペニシリン」が発見された。その後、1940年に Flory らによりペニシリンの再発見がなされ、それを皮切りに一気に抗生物質の近代研究が開始された¹⁾。天然に存在する新規な構造を持つ抗生物質の探索と、更なる活性の増強を狙ったそれらの誘導化研究が精力的に進められた結果、今日までに数千種類におよぶ天然型及び半合成型抗生物質が見い出されてきた。それらは化学構造の特徴から、 β -ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、マクロライド系抗生物質、ポリエン系抗生物質、アンストラサイクリン系抗生物質、ポリエーテル系抗生物質、ヌクレオシド系抗生物質、アンサマイシン系抗生物質、ペプチド系抗生物質等に分類される。

これらの抗生物質群の中に、12~16員環のアグリコン部分にアミノ糖、又は中性糖が結合した極めて特徴的な構造を有するマクロライド系抗生物質がある。“マクロライド (Macrolide)” とは 1957年に R. B. Woodward²⁾により命名された、大環上ラクトン環をアグリコン部分に有する化合物群の総称である。この中にはエリスロマイシン (EM)、オレアンドマイシン、ロイコマイシン、スピラマイシン等が含まれるが、特に EM はこれらマクロライド系抗生物質の中で最強の抗菌活性を誇った。

EM は 1952年に Eli Lilly 社の McGuire³⁾らにより放線菌 *Streptomyces erythraeus* からそれぞれ 14員環を持つ EM-A を主成分とした EM-B⁴⁾、EM-C⁵⁾、

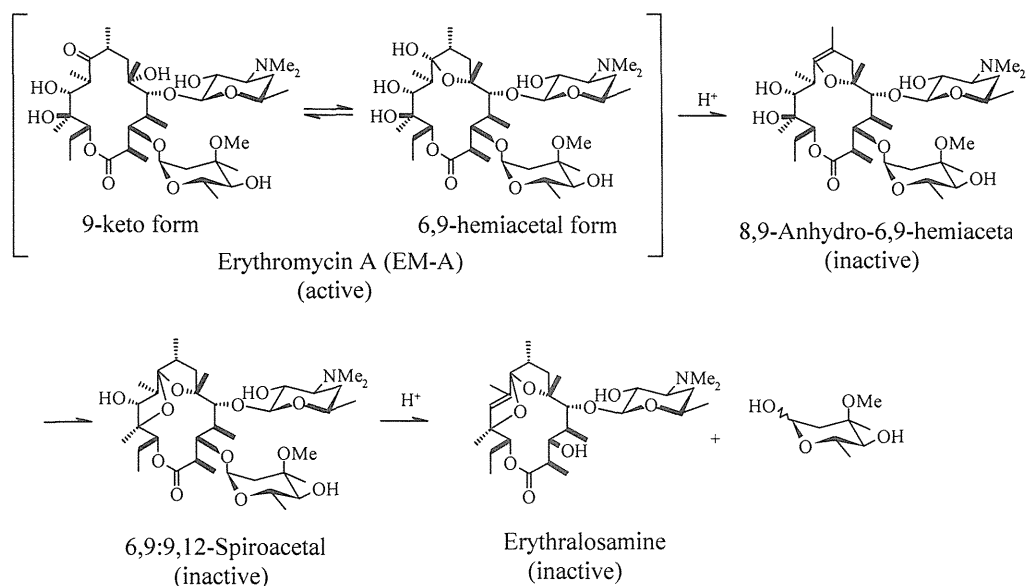
Figure 1. Structures of erythromycins



EM-D⁶⁾, EM-F⁷⁾及び 12 員環のシュードエリスロマイシン⁸⁾からなる混合物として見出されたマクロライド系抗生物質である (Figure 1).

中でも EM-A は、肺炎球菌、ブドウ球菌、化膿連鎖球菌、ジフテリア菌、リステリア菌等のグラム陽性菌に対して強い抗菌活性を有し、且つβ-ラクタム系抗生物質が効力を示さないマイコプラズマ、レジオネラ、クラミジア、キャンピロバクター、百日咳菌などに対しても強い活性を示す。このような幅広い抗菌スペクトルと高い安全性から EM-A はその発見以来、半世紀以上に渡って各種細菌感染症、特に上気道感染症の治療薬として広く臨床に用いられてきた。これらの優れた特徴を持つ一方、EM-A はその構造上の特性から酸に対し極めて不安定であり^{9,10)} (pH 1.28, 37°C, 5 分, 97-98%失活), そのため 経口投与時の吸収が一定せず、安定した血中濃度が得られないという欠点があった。Figure 2 に EM-A の酸分解パターンを示した¹¹⁾.

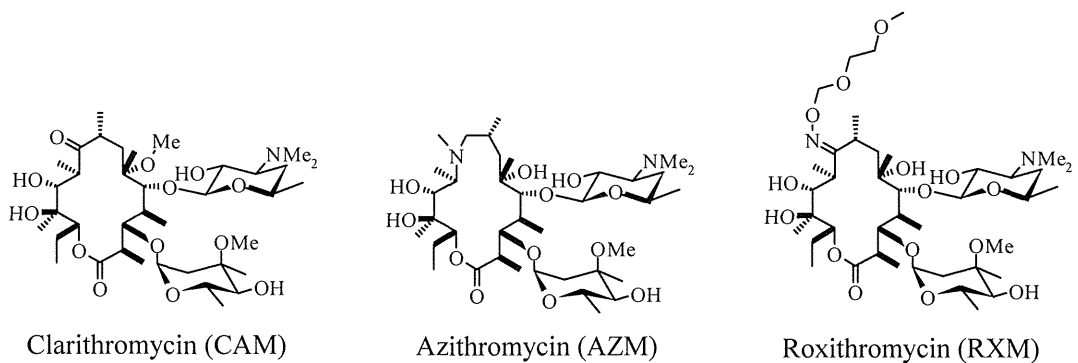
Figure 2. Acid degradation pathway of EM-A



EM-A は溶液中では通常 9-ケト型と 6,9-へミアセタール型の平衡状態をとっている。このうち 6,9-へミアセタール型は酸存在下, 8 位と 9 位の間で脱水反応が進行し 8,9-アンヒドロ体となり失活する。8,9-アンヒドロ体は速やかに 6,9:9,12-スピロアセタ

ール体へと変化し、更に酸分解が進行した場合はエリスラロサミンとクラジノースとに分解する。この EM 酸分解機構を踏まえたドラッグデザインを基に、多くの研究グループが新規 EM 誘導体の創薬研究を精力的に行った結果、1980 年代に入り、遂に“第二世代マクロライド系抗生物質”と呼ばれる、EM の欠点を克服した新規マクロライド剤が創出されるに至った。第二世代マクロライド剤としては、大正製薬で見い出され、その後米国 Abbott 社と共同開発されたクラリスロマイシン¹²⁾ (CAM), Pfizer 社において開発された世界初の 15 員環マクロライド系抗生物質であるアジスロマイシン¹³⁾ (AZM) 及び Russel-Uclaf 社 (現 Aventis 社) において開発されたロキシスロマイシン¹⁴⁾ (RXM) 等がある (Figure 3)。

Figure 3. Structures of 2nd generation macrolides

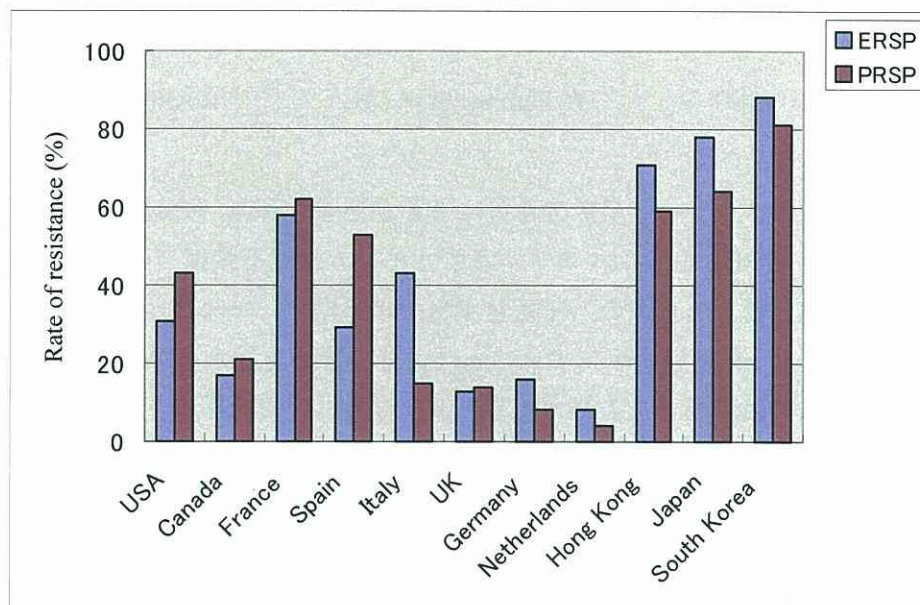


これら第二世代マクロライド系抗生物質は 6 位水酸基の保護 (CAM), 9 位カルボニル基の変換 (AZM), 9 位カルボニル基のオキシムによる保護 (RXM) 等、それぞれ誘導化戦略は異なるものの、何れも EM の酸分解パターンの第 1 段階である 6,9-ヘミアセタール体生成を阻止することにより、目的とした高い酸安定性と優れた体内動態の獲得に成功したものである。これら第二世代マクロライド系抗生物質はその優れた有効性が認められ、現在全世界で感染症に苦しむ多くの人々に処方され、その治療に貢献している (2003 年の世界の売上: CAM 約 1,700 億円, AZM 約 2,300 億円)。

第2章 第三世代マクロライド系抗生物質の探索

耐性菌出現の問題は抗生物質の持つ宿命であるが、近年、第二世代マクロライド系抗生物質に対して耐性を示す菌の増加が社会的に深刻な問題になりつつある。マクロライド剤がターゲットとしている市中肺炎（CAP, community-acquired pneumonia）の起原因菌としては肺炎球菌（*Streptococcus pneumoniae*）、インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）、マイコプラズマ（*Mycoplasma*）、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）、レジオネラ菌（*Legionella*）及びクラミジア菌（*Chlamydia*）等があげられるが、このうち特に *S. pneumoniae* は起原因菌全体の約45%の分離頻度を占めている。Figure 4に1999～2000年に世界主要各国において患者から分離された *S. pneumoniae* 臨床分離株の耐性化率を示した。この結果を見ると、マクロライド耐性肺炎球菌（ERSP, erythromycin-resistant *S. pneumoniae*）及びペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP, penicillin-resistant *S. pneumoniae*）の分離頻度が、特に日本を中心としたアジア圏で大幅に高まりつつある¹⁵⁾。

Figure 4. Rates of resistance of *S. Pneumoniae* to penicillin and macrolide



このような背景から、次なるマクロライド系抗生物質の研究ターゲットは、これらERSP、PRSP及び交叉耐性をおこした多剤耐性肺炎球菌に対し有効な化合物を見

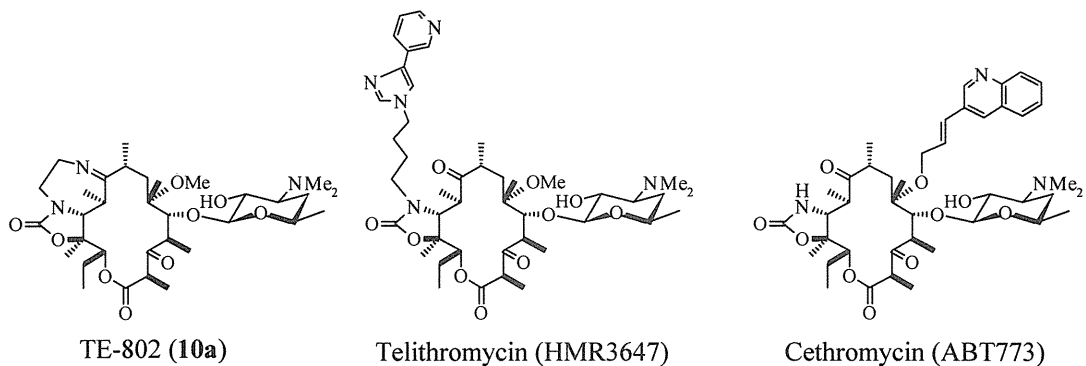
い出すことに向けられた。

CAM の開発に成功した著者の所属する研究グループにおいても、ポストクラリスの開発を目的とし、特に多剤耐性肺炎球菌に対する抗菌活性の獲得を目的とした新規エリスロマイシン系抗生物質の探索研究を開始した。

著者は目的の活性を持った化合物を見い出すべくドラッグデザインを進め、各種新規エリスロマイシン誘導体の合成を行う中で、偶然オリジナルアグリコン骨格上に環状カーバメートと、更にテトラヒドロジアゼピン構造を併せ持つユニークな三環性アグリコン構造を持つエリスロマイシン誘導体を見出し、且つそのものが各種感受性菌に対して親化合物に比較し優れた抗菌活性を示すことを発見した。しかし、これら一連の化合物群は感受性菌に対する抗菌力は優れるものの、我々が目的とした耐性菌活性の点で不満が残った。一方、同時期に進めていた研究の中から、これまで活性発現に必須であると考えられていた3位のL-クラジノースを除去した後、生成する水酸基を酸化しケトン体へと導いた化合物は、クラジノシル基の除去により一度失活した抗菌活性が再び復活し、しかも耐性誘導能を持たないという極めて興味深い知見を得た。この3位ケトン構造を有するマクロライド剤はその構造から“ケトライド (ketolide)”と呼ばれ、現在ではマクロライド研究の基本構造となっている。著者はこの2つの知見を組み合わせることにより、三環性ケトライド構造をアグルコン部分に持つ多剤耐性肺炎球菌に対し、強い抗菌活性を有する第三世代マクロライド系抗生物質と呼ぶべき“TE-802”を見出すことに成功した。この三環性ケトライド構造は新たなマクロライド系抗生物質の探索研究用 scaffold として注目され、その後多くの研究グループによって次世代マクロライド剤を見出すための研究に供されている¹⁶⁾。尚、新たに耐性菌活性を獲得したケトライド化合物の研究成果を米国化学療法学会にて発表した際¹⁷⁾、驚いたことに Russel-Uclaf 社 (現 Aventis 社) からも3位ケトン体に関する発表が同じ学会で同時になされたという経緯があり^{18,19)}、医薬品の研究開発の熾烈さをまさに実感した瞬間であった。

TE-802 以外の第三世代マクロライド系抗生物質としては、Aventis 社により開発された Telithromycin²⁰⁾ (HMR3647) や Abbott 社の Cethromycin²¹⁾ (ABT773) 等がある (Figure 5)。特に Terithromycin は 2003 年 12 月、初のケトライド系抗生剤 (ケテック) として日本での販売が開始された。

Figure 5. Structures of 3rd generation macrolides



本論文は第三世代マクロライド系抗生物質に分類される TE-802 を中心とした極めてユニークな構造と EM 耐性菌活性を有する三環性ケトライドの発見, 合成, コンホメーション解析及び *in vitro* 並びに *in vivo* 抗菌活性に関する研究成果をまとめたものである.

本 論

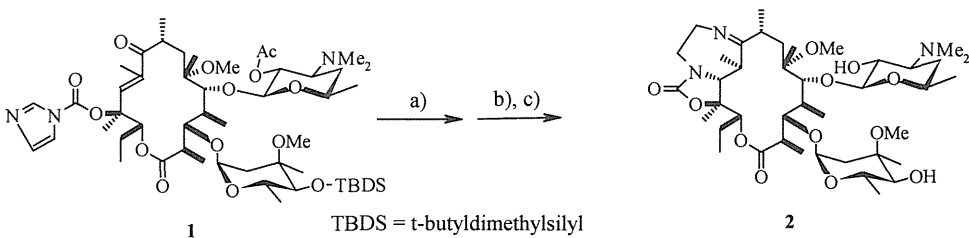
第1章 三環性マクロライド系抗生物質の合成と構造決定

第1節 研究経緯

ケトライドの発見以前にも耐性菌活性を有するエリスロマイシン誘導体に関する報告がある。例えばアボット社の Fernandes らは EM-A の 4''位水酸基が耐性菌活性に関係していることを報告している²²⁾。すなわち 4''-O-トリメチルシリル体や 4''位水酸基を還元し 4''-H 体とした化合物は、構成型耐性 *Streptococcus pyogenes* に対して MIC (Minimal Inhibitory Concentration) 値が 2 $\mu\text{g/ml}$ (EM : >128 $\mu\text{g/ml}$) の抗菌活性を持つことを報告している。また、11,12-ジオール基を環状カーバメート誘導体へと変換したある種の化合物も、構成型耐性 *S. pyogenes* に対して抗菌活性を発現することが報告されている。しかし、これらの化合物の発見は耐性菌克服の可能性を示すものの、実際の臨床に供するには抗菌スペクトル及び抗菌力の両面において満足いくものではなかった。

著者は、現在その耐性化が最も問題視されている肺炎球菌が、*pyogenes* と同じ *Streptococcus* 属であることに着目し、11,12-環状カーバメート構造を鍵骨格とした抗耐性肺炎球菌活性を有する新規誘導体の合成研究を開始した。数百種類におよぶ誘導体合成と活性測定を行う中で、12-O-イミダズリルカルボニル体 **1** とエチレンジアミンとの反応から得た反応混合物の各成分の単離精製を進めるうち、収率僅か 8%ながらユニークなアグリコン骨格を持った三環性マクロライド化合物 **2** を

Figure 6. First synthesis of tricyclic macrolide

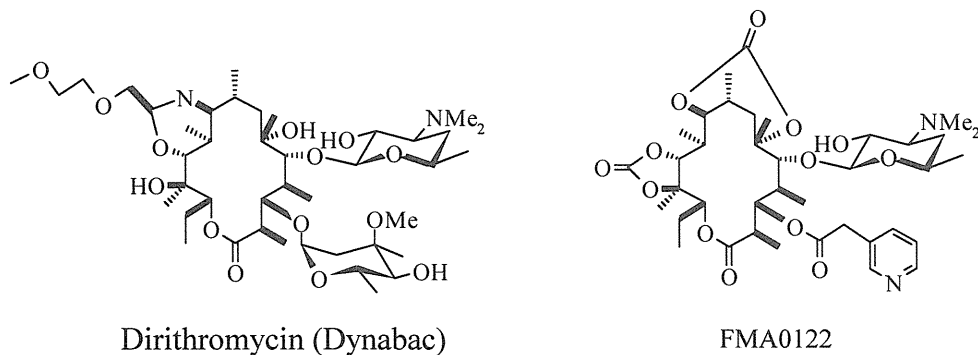


a) Ethylenediamine, CH_3CN , 50 °C, 1 hr b) MeOH, reflux, 3 hrs c) $n\text{-Bu}_4\text{NF}$, THF, r.t. 5 hrs Yield : 8% from **1**

単離同定した (Figure 6). この発見がその後の研究の端緒となった.

アグリコン骨格中に環構造を導入することにより活性向上を目指した例はいくつか報告があるが (Figure 7), その代表としては 9 位カルボニル基をアミノ基へ誘導した後, 11 位水酸基と 9-*N*-11-*O*-オキサゾリジン環を形成した Eli Lilly 社の Dirithromycin (Dynabac)²³⁾がある. Dirithromycin は 1995 年に FDA により新薬として認可を受けている. しかし, Dirithromycin は体内で速やかに分解され, 生成する 9-アミノ体が活性本体として抗菌力を発現するプロドラッグ剤であり, また第三世代マクロライド系抗生物質としての必須条件である耐性菌に対する活性が無い.

Figure 7. Structures of dicyclic and tricyclic macrolides



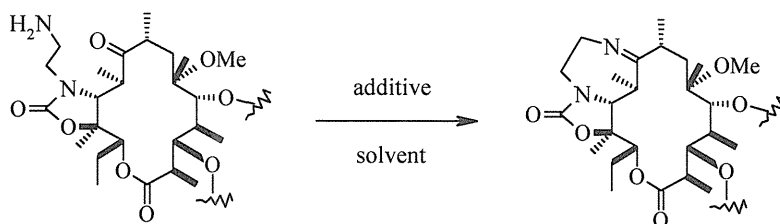
その他にも 9 位カルボニル基を還元後, 6,9:11,12-ビス環状カーボネート体へと誘導した報告²⁴⁾がある. 3 位をピリジルアセチル基へと変換した 6,9:11,12-ビス環状カーボネート体 FMA0122 (acylide と称する化合物群の 1 化合物) は, *in vitro* で耐性菌を含め興味ある抗菌スペクトルを示したが, *in vivo* 試験において期待された効果を得ることが出来なかった.

第2節 三環性マクロライド系抗生物質の効率的合成法の開発

当初, 2 は極めて低収率であり (1 から収率 8%), 興味ある抗菌活性を有することが確認されたものの, 更なる生物学的評価を進めることが困難な状況にあった. すなわち研究開発を迅速に進める上で 2 の効率的合成法の開発が急務となった. 化合物 2 の合成に際し問題となるのは, first synthesis で偶然進行した 9 位カルボニ

ル基と 11,12-環状カーバメート上のアミノ基との分子内環状イミン形成をいかに効率的に行うかであった。当初 11-*N*-アミノエチル体を各種溶媒中、加熱還流等の条件に付したが、目的とする 9 位環化体は TLC 上僅かにその生成が確認できる程度であった。そこで種々反応条件を検討した結果、反応系中に基質に対し 0.2~2.5 当量の有機酸 (*p*-トルエンスルホン酸、蟻酸、酢酸等) を共存させることにより、高収率で目的物を得ることに成功した (Table 1)。酸の添加により、11 位置換基上のアミノ基と 9 位カルボニル基から形成するヘミアミナル体の脱水反応が促進され、その結果、目的物である 9-イミン体の生成が進行したものと考えられる。

Table 1. Formation of tetrahydrodiazepine ring.



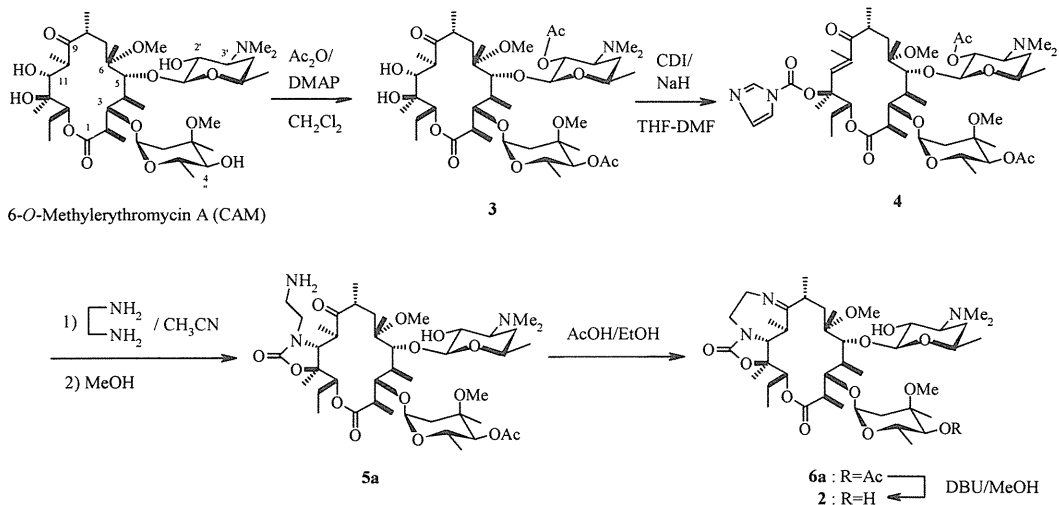
| Run | solvent | additive (eq) | temp.(°C) | time (hr) | result* |
|-----|---------|----------------------|-----------|-----------|---------------|
| 1 | MeOH | -- | reflux | 2.0 | N.R. |
| 2 | MeOH | imidazole (5) | reflux | 2.0 | N.R. |
| 3 | IPA | -- | reflux | 2.0 | N.R. |
| 4 | IPA | Pyr·HCl (2) | reflux | 0.5 | decom. |
| 5 | EtOH | AcOH (1.5) | reflux | 2.0 | quant. |
| 6 | Toluene | <i>p</i> -TsOH (0.2) | reflux | 3.5 | quant. |
| 7 | Toluene | AcOH (1.9) | 60 | 4.0 | quant. |
| 8 | EtOH | AcOH (1.9) | 60 | 4.0 | yield : 65%** |

* Detected by TLC. N.R. : No Reaction, decom. : decomposition, quant. : quantitative.

** Isolated yield as crystals.

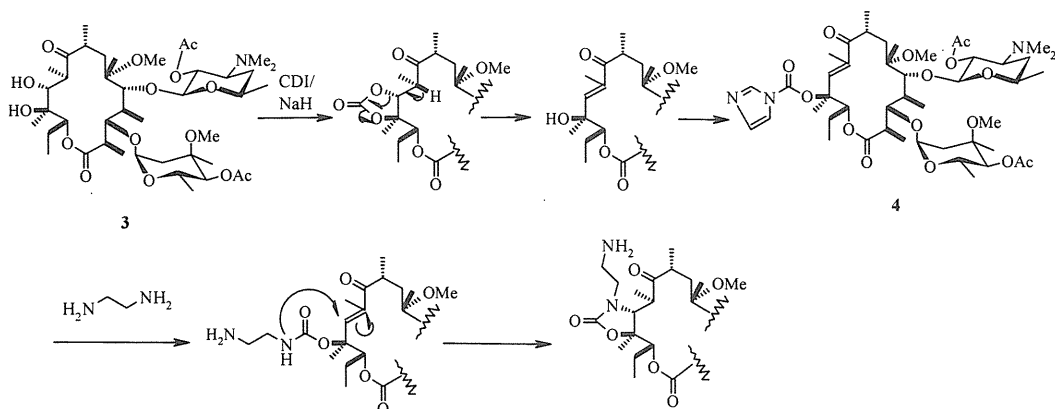
我々は新たに見出した上記環化条件とこれまでのマクロライド化合物の合成研究に関するノウハウを基に、化合物 2 の新規合成法を考案した。考案した合成ルートを Scheme 1 に示した。

Scheme 1



6-*O*-メチルエリスロマイシン A (CAM) の 2' 及び 4' 位水酸基を無水酢酸を用いて保護し 3 とした後 (収率: 87%), THF-DMF の混合溶媒中, 水素化ナトリウム (NaH) 及び *N,N'*カルボニルジイミダゾール (CDI) を反応させ 12-*O*-イミダゾリルカルボニル体 4 を結晶として収率 62% で得た. 化合物 4 の生成機構としては, Scheme 2 に示すように一旦 11,12-環状カーボネートが生成し, 次に塩基により 10 位プロトンの引き抜きと同時に脱炭酸が起こり 10,11-アンヒドロ体が生成し, 次いで 12 位水酸基が CDI と反応することにより 4 を与えたと考えられる.

Scheme 2



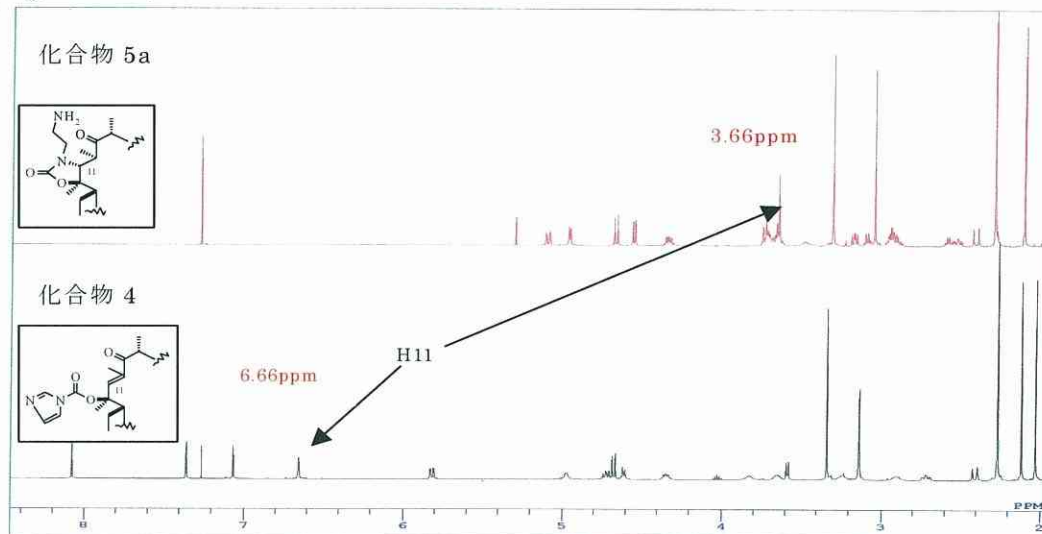
化合物 **4** はエチレンジアミンと反応させ、一旦鎖状カーバメート体とした後、分子内 Michael 付加反応を経由し (Scheme 2), 11,12-環状カーバメート体とした。次いでメタノリシスにより 2' 位のアセチル基のみを除去し、化合物 **5a** を収率 91% で得た。化合物 **5a** は酢酸存在下エタノール (EtOH) 溶媒中 60°C に加熱することにより三環性マクロライド化合物 **6a** へと導いた。続いて **6a** の 4'' 位アセチル基を 1,8-ジアザビシクロ [5.4.0] ウンデ-7-セン (DBU) により除去し、目的とする **2** を **5a** から結晶として収率 31% で得た。本合成法の開発により三環性マクロライド **2** を大量に合成することが可能となり、その後の多くの評価試験により、三環性マクロライド化合物の生物学的特徴を明らかにすることが出来た。

第3節 三環性アグリコン構造の決定

11,12-環状カーバメート構造の確認

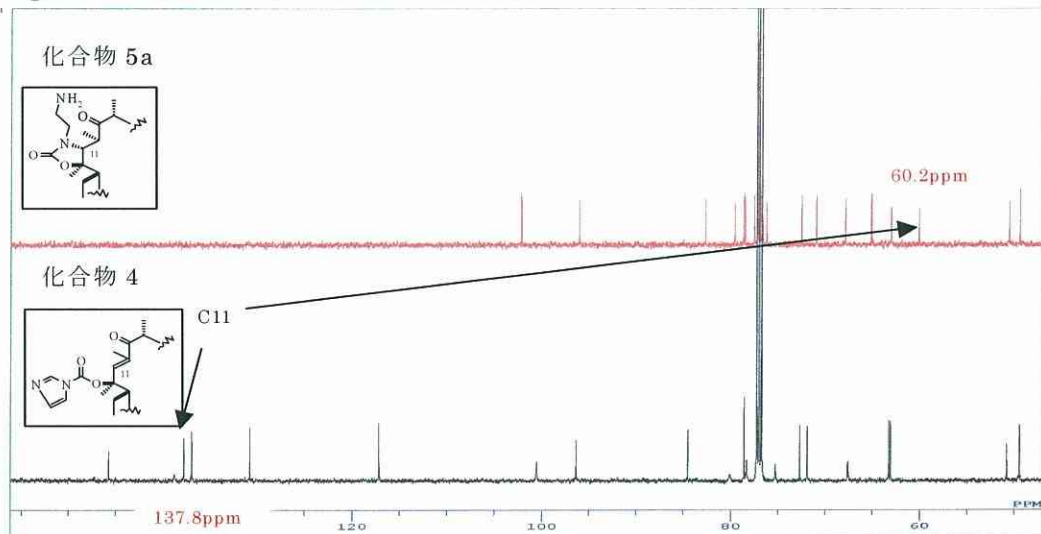
11,12-環状カーバメート構造の確認は **5a** の NMR スペクトルの解析を中心に行った。尚、各スペクトルの帰属は各種二次元 NMR スペクトルの解析により行った。12-*O*-イミダゾリルカルボニル体 **4** の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルで観測された 6.66 ppm の H11 (オレフィンプロトン) のピークが **5a** では消失し、新たに 3.66 ppm にメチンプロトンとして現れた (Figure 8)。

Figure 8. 化合物 **4** (下段) 及び **5a** (上段) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル



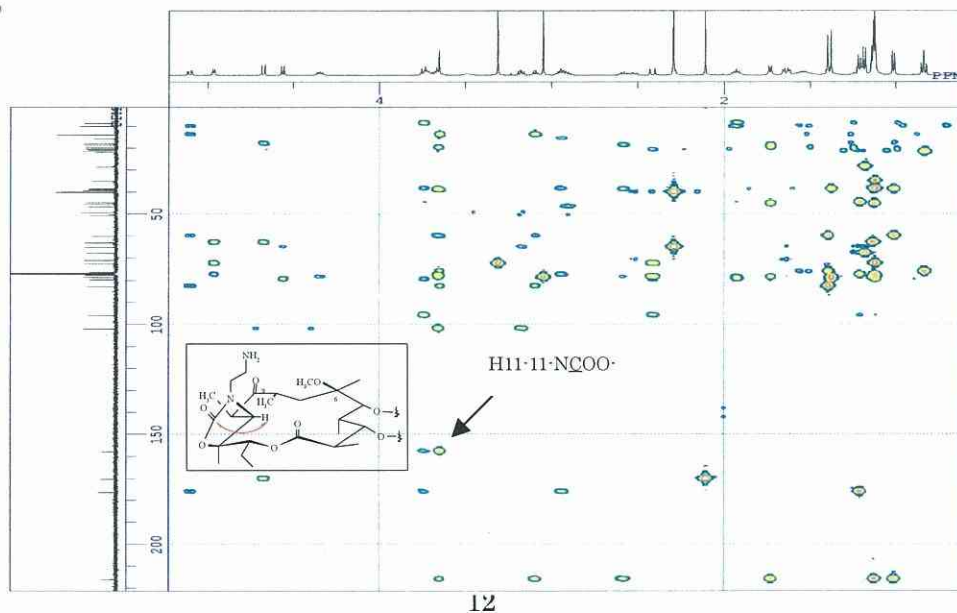
また ^{13}C -NMR スペクトルにおいて 137.8 ppm (sp^2) に観測された化合物 4 の C11 のピークが 5a では 60.2 ppm (sp^3) に高磁場シフトしていた (Figure 9).

Figure 9. 化合物 4 (下段) 及び 5a (上段) の ^{13}C -NMR スペクトル



更に 5a の ^1H -Detected Multiple-bond Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMBC) スペクトルにおいて H11 と環状カーバメート基上のカルボニル炭素の間で相関が観測された (Figure 10).

Figure 10. 化合物 5a の HMBC スペクトル

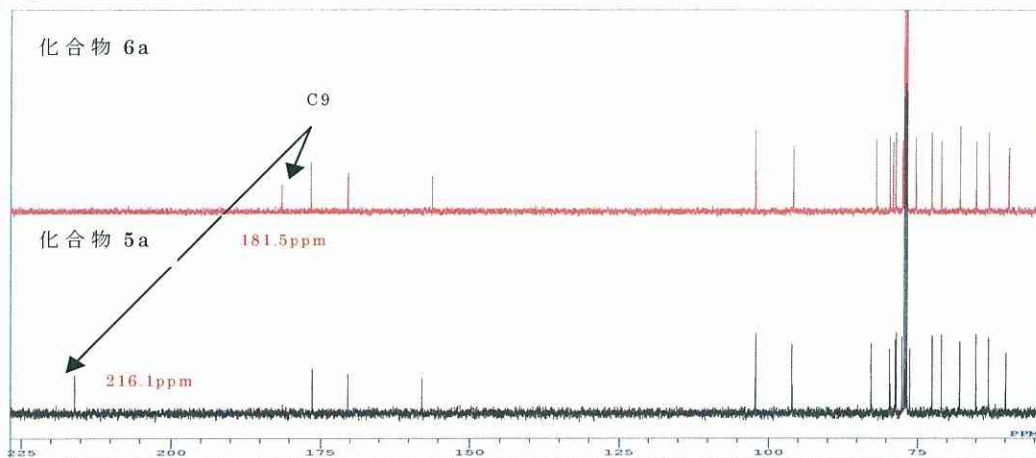


以上の各種 NMR データの解析結果より **5a** の 11,12-環状カーバメート構造を決定した。

三環性アグリコン構造の確認

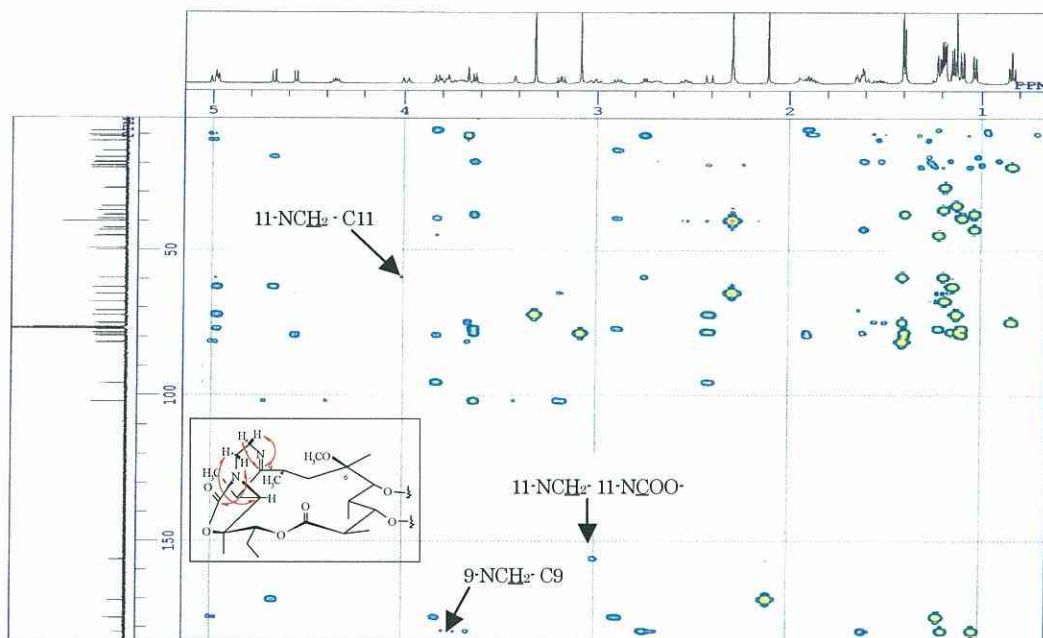
次に **9** 位で環化した三環性化合物 **6a** の構造決定を行った。構造決定は一次元 ($^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$)、及び二次元 NMR スペクトル ($^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, $^1\text{H-}^{13}\text{C COSY}$, HMBC) の解析を中心とした各種機器スペクトル測定結果により行った。HRFAB-MS より **6a** は **5a** から脱水した分子式 $\text{C}_{43}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_{13}$ 及び分子量 m/z 840.5230 ($\text{M}+\text{H}^+$, calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_{13}$: m/z 840.5222)を有することを確認した。更に **5a** の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルにおいて 216.1 ppm に観測された **9** 位カルボニルピークが **6a** では消失すると共に、新たに 181.5 ppm に **9**-イミノピークが観測された (Figure 11)。当初 **9**-イミノピークはルーチンの $^{13}\text{C-NMR}$ 測定条件では観測されず種々測定条件を検討し、ようやくピークを捕らえることに成功した。

Figure 11. 化合物 **5a** (下段) 及び **6a** (上段) の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル



また **6a** の HMBC スペクトルにおいて、11-NCH₂-のプロトン (δ : 3.01 & 3.99 ppm) と 11 位炭素 (δ : 59.7 ppm) 及びカーバメート基のカルボニル炭素 (δ : 156.3 ppm) 間で相関が観測され、11,12-環状カーバメート構造をとっていることが確認された。また **9**=NCH₂-のプロトンと **9** 位炭素間において明らかな相関が観測された (Figure 12)。

Figure 12. 化合物 **6a** の HMBC チャート

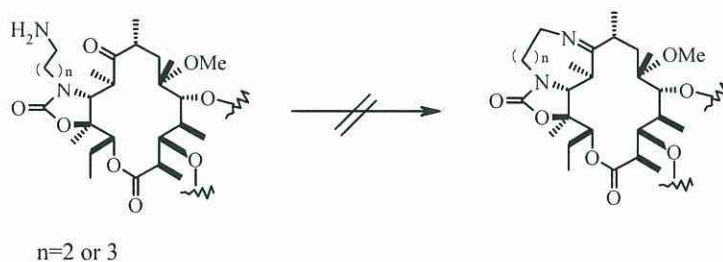


以上の結果から **6a** は 11,12-環状カーバメート構造を有し、且つ 9 位へと環化した三環性アグリコンを持った構造であると決定した。

第 4 節 考察

三環性マクロライド剤の環構造バリエーションの拡大を目的に、エチレンジアミンに代えて 1,3-ジアミノプロパン及び 1,4-ジアミノブタンを用いて *N*-置換-11,12-環状カーバメート体を合成し、三環性化合物に導くべく 9 位環化条件に付したが、対応する三環性化合物は全く得られなかった (Figure 13). おそらくアミノエチル

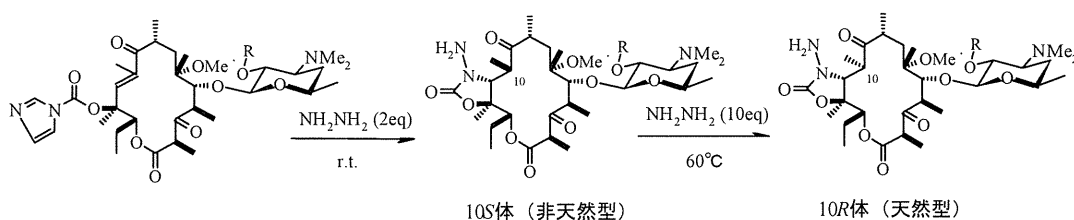
Figure 13. 環化反応への鎖長の影響



基のみが 9 位における環形成に適した鎖長を有し、それよりも鎖長を延ばしたアミノプロピル基やアミノブチル基では 9 位カルボニル基への接近が困難なのではないかと考えられる。

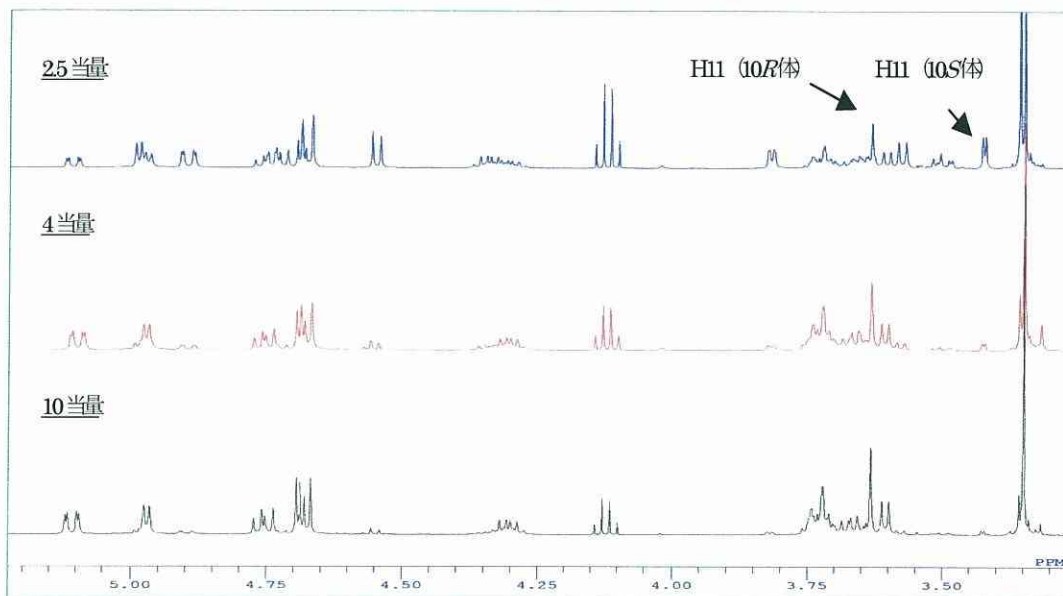
一方、Griesgraber 等は 4 の 3-ケト誘導体とヒドラジンとの反応による 11,12-環状カーバゼート体合成の際に、まず速度論的に 10 位が非天然型立体配置を持った 10*S* 11,12-環状カーバゼート体が生成することを報告している。更にこの 10*S* 体は、熱力学的に安定な 10*R* (天然型) 体への変換が可能であると報告している²⁵⁾ (Scheme 3)。

Scheme 3



今回の著者のエチレンジアミンを用いた研究においても 11,12-環状カーバメート体の生成に際し、10 位の立体化学について興味ある知見が得られた。すなわち、基質に対し 10 当量のエチレンジアミンを用いて環状カーバメート反応を行った場合 (20 時間)、92 : 8 と高い選択性を持って天然型 10*R* 体を得ることが出来た (10*R* と 10*S* の生成比率は H11 のピークを指標とした)。しかし用いるエチレンジアミンの量を 10 当量から 4 当量に減量して反応を行った場合 (20 時間)、10*R* と 10*S* の生成比率は 80 : 20 と、非天然型の生成比率が増加した。更に 2.5 当量のエチレンジアミンを用いた場合、10*R* と 10*S* の生成比率は 40 : 60 となり、天然型と非天然型の生成比率が逆転した (Figure 14)。

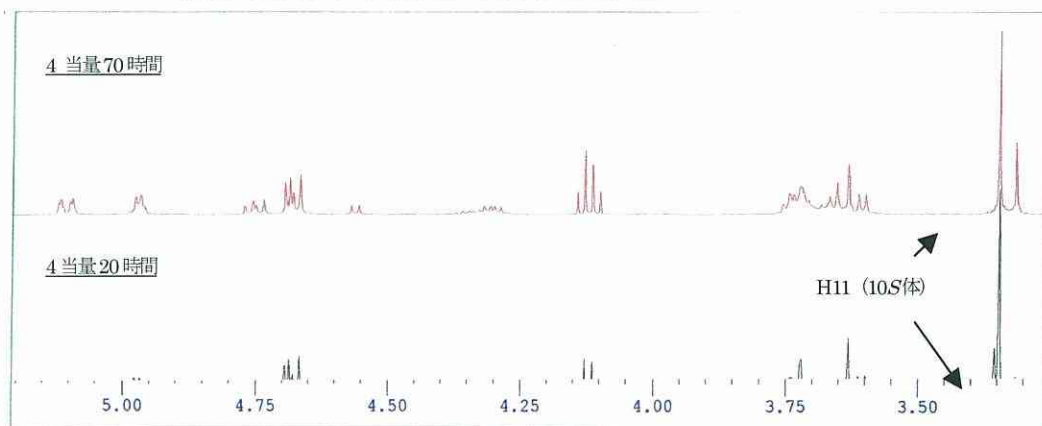
Figure 14. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを用いたジアミン使用量による 10 位エピマー体生成比の比較 (上段: 2.5 当量, 中段: 4 当量, 下段: 10 当量)



これらの結果から、本反応は Griesgraber らの例と同様、まず速度論的に進行し非天然型の 10*S* 体を与え、その後熱力学的に安定な天然型 10*R* 体へと変換したものと考えた。非天然型 10*S* 体から天然型 10*R* 体への変換はエチレンジアミンの当量が少ないときは遅く、その量が多い時には存在するアミンの影響により天然型への変換速度が加速されたものと考えた。

また 10*S* 体から 10*R* 体への変換は反応時間を延ばすことによっても達成することが出来る。4 当量のエチレンジアミンを用いた場合、20 時間後では 10*R* と 10*S* の生成比率が 80:20 であったが、そのまま 70 時間後まで攪拌を続けると、NMR 上、10*S* 体はほぼ消失し 10*R* 体のみが観測され、反応時間の延長により 10*S* 体から 10*R* 体への立体の変換を確認した (Figure 15)。

Figure 15. ^1H -NMR スペクトルを用いた反応時間による 10 位エピマー体生成比の検討（上段：70 時間、下段：20 時間）

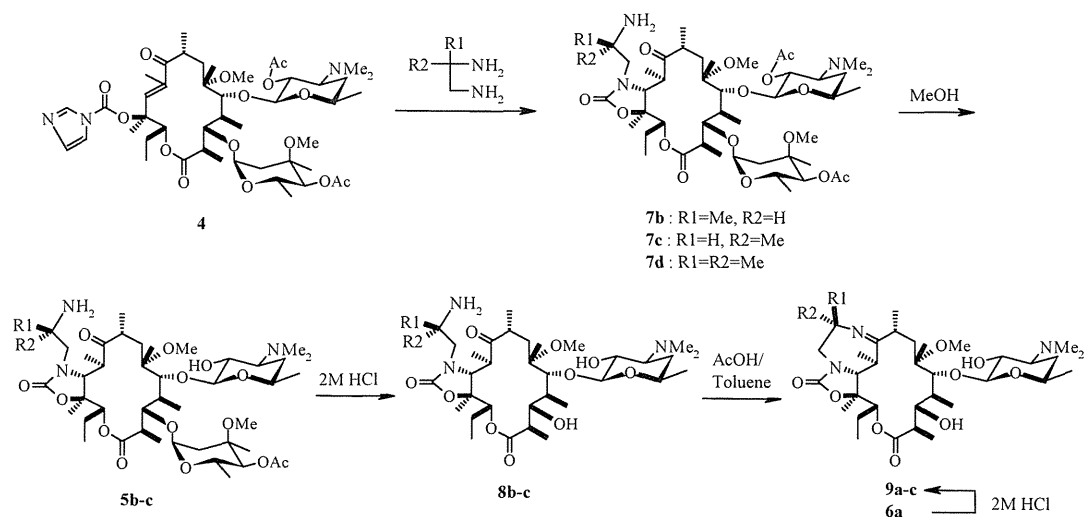


第2章 三環性ケトライド系抗生物質の合成

第1節 9-イミン型及び9-アミン型ケトライドの合成

次にエリスロマイシンの3位をカルボニル基へ変換し、且つ前章で述べた三環性アグリコン構造を併せ持った三環性ケトライド化合物の合成を計画した。同時に新たに形成されるテトラヒドロジアゼピン環上の置換バリエーションと抗菌活性との構造活性相関を検討するため、テトラヒドロジアゼピン環が無置換の化合物及び環上に置換基を持つ化合物の合成を行った。無置換化合物の合成には11,12-環状カーバメート化の際にエチレンジアミンを用い、置換化合物の合成にはエチレンジアミンに代え置換基を有するジアミン(1,2-ジアミノ-2-メチルプロパン, 1,2-ジアミノプロパン等)を用い、続く9位への環化反応を行うことにより目的とする化合物を合成した。合成ルートをScheme 4に示す。

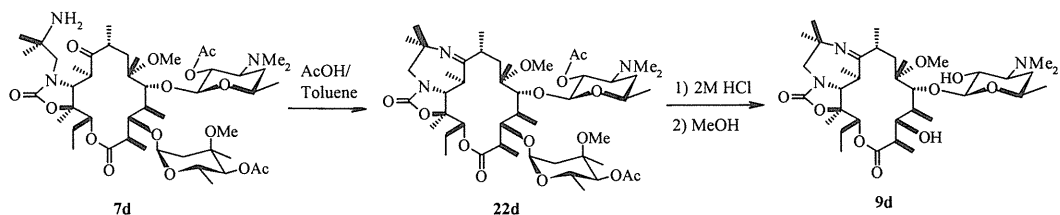
Scheme 4



化合物 **4** とジアミンとの反応においては、ジアミンの二つのアミノ基のうち α 位が無置換の第一アミン側がまず選択的に **4** と反応し、11,12-環状カーバメート体 (**7b-7d**) を与えた。その後、モノメチル置換体 **7b** 及び **7c** はメタノリシスにより 2'位水酸基上のアセチル基を除去し (ジアミンの塩基性により一部 2'位の脱アセチル

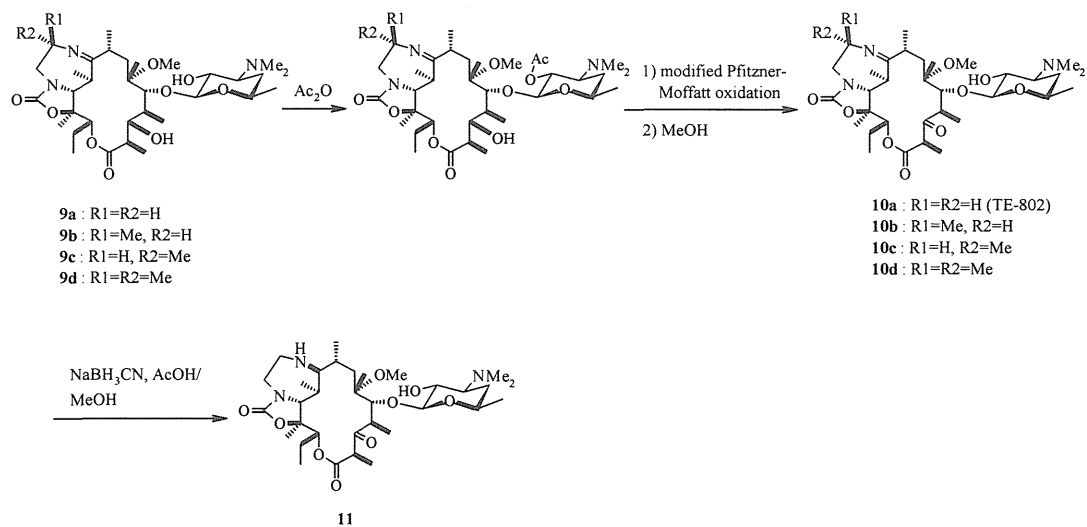
化が進行し, TLC 上 2 スポットとなりモニターが煩雑になるため), **5b-c** とした後, 2M 塩酸を用いて 3 位のクラジノシル基を除去し **8b-c** へと導いた. 2 つのエピマー体 **8b** と **8c** はこの段階でシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分離した. 化合物 **8b** 及び **8c** はトルエン溶媒中酢酸存在下, 加熱することにより三環性化合物 **9b** 及び **9c** へと導いた. 一方, scheme 1 に示す方法により合成した **6a** も **8b-c** と同様に 2M 塩酸で処理することにより 3 位水酸化体 **9a** へと導いた. また **7d** は三環性骨格形成の一般性を確認する目的で **7b-c** とは合成の順序を変え, まず最初に三環性骨格形成を行った後(**22d**), 脱クラジノシル化, 2'位水酸基の脱保護を行い **9d** へと導いた (Scheme 5). Scheme 1 に示した **6a** の合成結果と **9b-d** の合成検討結果から, アミノエチル基上の置換基及び 3 位クラジノシル基の有無は三環性骨格の形成反応には影響が無く, 何れも三環性化合物へ収率良く変換できることが明らかとなった.

Scheme 5



次に 3 位水酸基の酸化反応を行った. 化合物 **9a-d** の 2'位水酸基をアセチル基で保護した後, 塩化メチレン溶媒中, 改良 Pfitzner-Moffatt の酸化条件²⁶⁾により (1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (WSC · HCl), ジメチルスルフォキシド (DMSO), ピリジニウムトリフルオロ酢酸塩) 3 位ケトン体とした後, メタノリシスにより 2'位保護基を除去し **10a-d** とした²⁷⁾. **9**-アミン型ケトライド **11** は, **10a** をメタノール溶媒中酢酸存在下, シアノ水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元することにより収率 50%で結晶として得ることに成功した (Scheme 6).

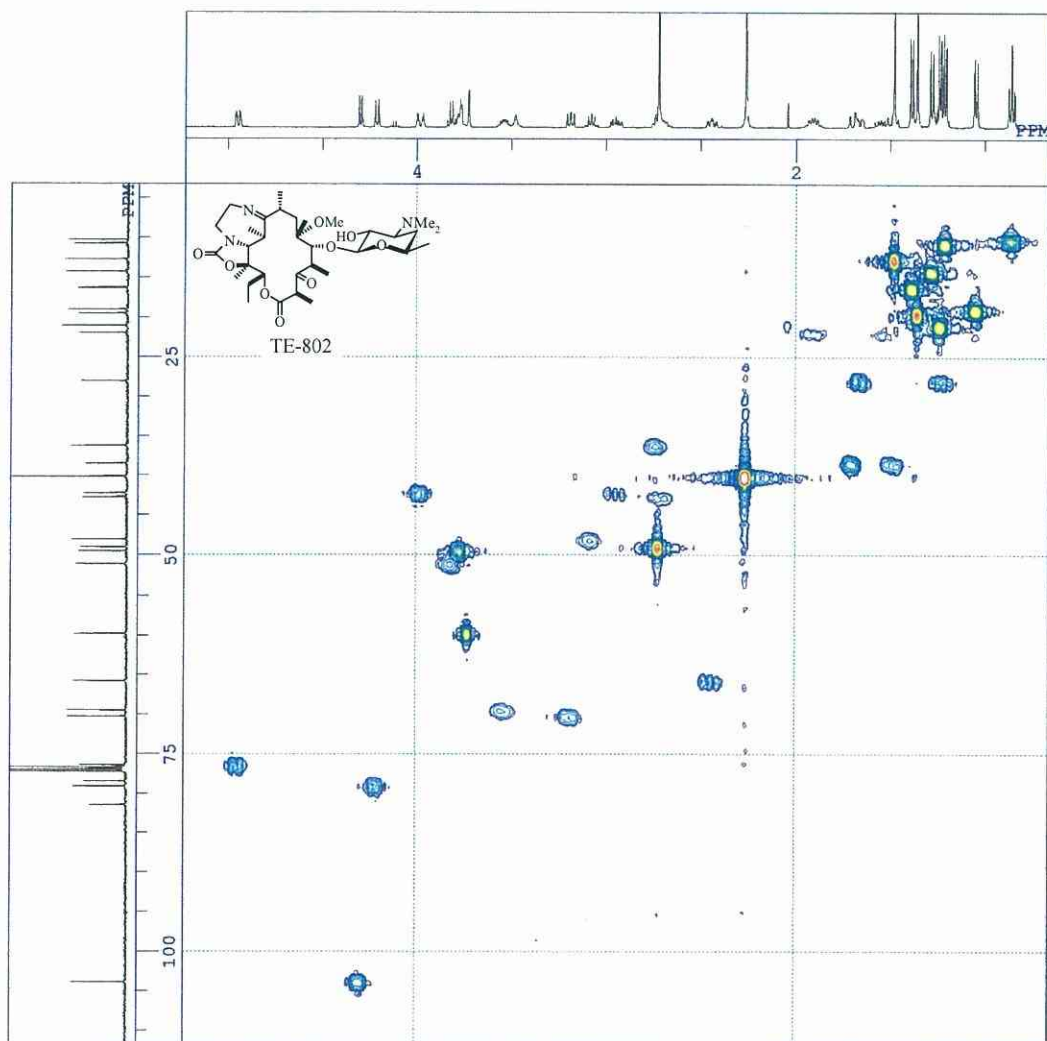
Scheme 6



第2節 9-イミン型及び9-アミン型ケトライドの構造決定

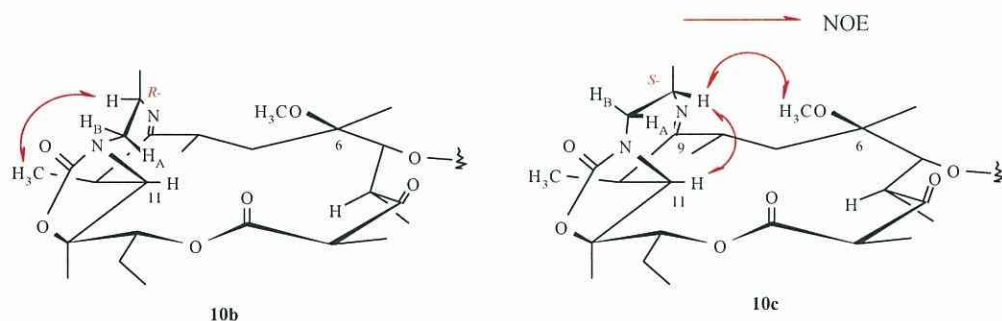
化合物 **10a-d** 及び **11** の ¹³C-NMR スペクトルにおいて、いずれも 203.8 ppm から 204.2 ppm に新たに形成した3位カルボニル炭素由来ピークが観測された (Table 3). ピーク帰属は各種2次元 NMR (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C COSY 及び HMBC 等) のスペクトル解析結果から決定した. Figure 16 に三環性ケトライド化合物の代表である **10a** (TE-802) の HMQC チャートを示した.

Figure 16. 化合物 10a (TE-802) の HMQC (^1H - ^{13}C COSY) チャート



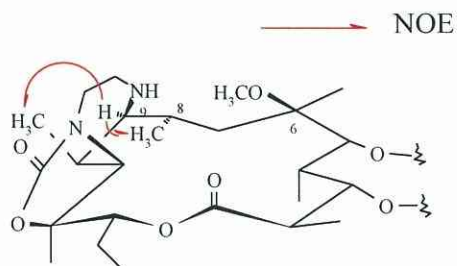
化合物 **10b** 及び **10c** のテトラヒドロジアゼピン環の立体化学については NOESY 実験の結果から決定した. すなわち **10b** において 9,11-*N*-(2-methyl)nitriloethano 部位のメチンプロトンと 10-CH₃ の間に NOE が観測された. 一方, **10c** においては 9,11-*N*-(2-methyl)nitriloethano 部位のメチンプロトンと H11 及び 6-OCH₃ 間に NOE が観測された. これらの結果より **10b** の 9,11-*N*-(2-methyl)nitriloethano 部位の立体を *R*-configuration, **10c** の同部位の立体を *S*-configuration と決定した (Figure 17).

Figure 17. Stereochemistry of tetrahydrodiazepine moiety in **10b** and **10c**.



一方, 化合物 **11** では **10a** において 181.0 ppm に観測された 9 位イミノ炭素 (sp^2) ピークが消失し, 新たに 70.5 ppm に 9-アミノ炭素 (sp^3) に由来するピークが観測され, 9-アミノ構造が証明された. また **11** の ROESY スペクトルの解析において, H9 と 8-CH₃ 及び 10-CH₃ の間に相関が見られたことから 9 位の立体化学が *S* 配位であると決定した (Figure 18).

Figure 18. Stereochemistry (*S*-) at 9-position in **11**

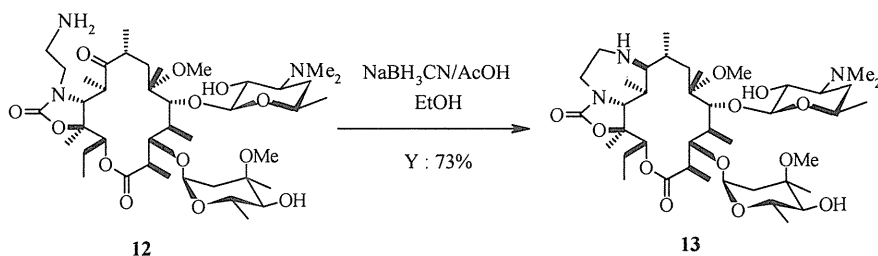


第3節 考察

3 位水酸基の酸化条件を種々検討した結果、Pfitzner-Moffatt 酸化条件を改良した方法が極めて良好な結果を示した。その他、重クロム酸カリウム/硫酸，ピリジニウムクロクロメート (PCC)，ピリジニウムジクロメート (PDC) /ピリジニウムトリフルオロ酢酸塩，過マンガン酸カリウム，重クロム酸ナトリウム/硫酸等の条件を検討したが何れも改良 Pfitzner-Moffatt 酸化条件を越える結果を得ることは出来なかった。一例として重クロム酸ナトリウム/硫酸の反応条件で 2'-アセチル体 **9a** を酸化した場合，目的物 **10a** の単離収率は僅か 30%であった。

9-アミン体 **11** は 9-イミン体 **10a** を酸性条件下，シアノ水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元することにより合成したが，アミノエチル体 **12** を前述と同様の還元条件に付すことにより三環性の 9-アミン体 **13** をワンステップで得ることに成功した (Scheme 7)。

Scheme 7



生成した 9-アミン体 **13** の 9 位の立体は NOESY スペクトルの解析結果から *S* 配位体であると決定した。また，*R* 配位体の混在は TLC 及び NMR 上確認されなかった。9 位イミノ基はアグリコンの面に対して垂直に立ち上がっており，イミノ基に対するヒドライドの攻撃がラクトン環の外側からのみ可能となり，その結果 *S* 配位体が選択的に生成したものと考えられる。

合成した 3 環性マクロライド化合物の ¹H-NMR，及び ¹³C-NMR スペクトルのケミカルシフト値をそれぞれ Table 2 及び 3 に示した。

Table 2. ¹H NMR chemical shifts for tricyclic macrolides

| Position | 10a | 10b | 10c | 10d | 11 | 2 | 9a |
|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| 2 | 3.82 | 3.82 | 3.79 | 3.79 | 3.85 | 2.86 | 2.70 |
| 3 | -- | -- | -- | -- | -- | 3.82 | 3.58 |
| 4 | 3.08 | 3.08 | 3.04 | 3.06 | 3.14 | 1.90 | 2.03 |
| 5 | 4.21 | 4.19 | 4.16 | 4.18 | 4.27 | 3.64 | 3.68 |
| 7 _A | 1.50 | 1.48 | 1.51 | 1.51 | 1.25 | 1.60 | 1.48 |
| 7 _B | 1.71 | 1.69 | 1.71 | 1.69 | 1.51 | 1.60 | 1.70 |
| 8 | 2.70 | 2.69 | 2.69 | 3.14 | 2.17 | 2.71 | 2.73 |
| 9 | -- | -- | -- | -- | 2.47 | -- | -- |
| 10 | 2.73 | 2.71 | 2.72 | 2.75 | 1.99 | 2.75 | 2.80 |
| 11 | 3.73 | 3.74 | 3.66 | 3.50 | 3.72 | 3.67 | 3.68 |
| 13 | 4.95 | 4.92 | 4.94 | 4.86 | 4.96 | 4.98 | 5.09 |
| 14 _A | 1.55 | 1.55 | 1.57 | 1.55 | 1.57 | 1.53 | 1.55 |
| 14 _B | 1.91 | 1.90 | 1.94 | 1.92 | 1.94 | 1.87 | 1.91 |
| 9-NCH _A | 3.78 | 3.91 | 3.99 | -- | 2.77 | 3.78 | 3.76 |
| 9-NCH _B | 3.78 | -- | -- | -- | 3.15 | 3.78 | 3.83 |
| 9-NC(CH ₃) _A | -- | 1.27 | 1.34 | 1.29 | -- | -- | -- |
| 9-NC(CH ₃) _B | -- | -- | -- | 1.33 | -- | -- | -- |
| 11-NCH _A | 2.95 | 2.67 | 3.38 | 2.92 | 2.82 | 3.01 | 3.00 |
| 11-NCH _B | 3.99 | 3.85 | 3.47 | 3.78 | 4.01 | 3.99 | 4.01 |
| 2-CH ₃ | 1.39 | 1.39 | 1.41 | 1.41 | 1.37 | 1.22 | 1.27 |
| 4-CH ₃ | 1.29 | 1.28 | 1.27 | 1.27 | 1.29 | 1.08 | 1.12 |
| 6-CH ₃ | 1.36 | 1.37 | 1.39 | 1.35 | 1.33 | 1.42 | 1.41 |
| 8-CH ₃ | 1.05 | 1.04 | 1.06 | 1.03 | 0.94 | 1.04 | 1.05 |
| 10-CH ₃ | 1.22 | 1.22 | 1.18 | 1.23 | 1.09 | 1.20 | 1.22 |
| 12-CH ₃ | 1.48 | 1.47 | 1.47 | 1.48 | 1.47 | 1.42 | 1.46 |
| 14-CH ₃ | 0.86 | 0.86 | 0.88 | 0.87 | 0.86 | 0.85 | 0.84 |
| 6-OCH ₃ | 2.74 | 2.71 | 2.67 | 2.70 | 2.90 | 3.09 | 3.02 |
| 1' | 4.30 | 4.30 | 4.28 | 4.28 | 4.31 | 4.43 | 4.37 |
| 2' | 3.19 | 3.20 | 3.19 | 3.19 | 3.19 | 3.19 | 3.25 |
| 2'-OH | 3.49 | 3.48 | 3.47 | -- | -- | 3.41 | 3.36 |
| 3' | 2.44 | 2.45 | 2.44 | 2.44 | 2.45 | 2.42 | 2.48 |
| 3'-N(CH ₃) ₂ | 2.26 | 2.27 | 2.26 | 2.27 | 2.27 | 2.28 | 2.26 |
| 4' _A | 1.23 | 1.22 | 1.22 | 1.23 | 1.23 | 1.20 | 1.24 |
| 4' _B | 1.67 | 1.67 | 1.66 | 1.66 | 1.67 | 1.66 | 1.68 |
| 5' | 3.54 | 3.54 | 3.53 | 3.53 | 3.54 | 3.48 | 3.54 |
| 5'-CH ₃ | 1.24 | 1.24 | 1.24 | 1.23 | 1.25 | 1.25 | 1.27 |
| 1'' | | | | | | 4.92 | |
| 2'' _A | | | | | | 1.57 | |
| 2'' _B | | | | | | 2.37 | |
| 4'' | | | | | | 3.03 | |
| 5'' | | | | | | 4.02 | |
| 3''-CH ₃ | | | | | | 1.26 | |
| 5''-CH ₃ | | | | | | 1.31 | |
| 3''-OCH ₃ | | | | | | 3.33 | |

All spectra were taken in CDCl₃ at 500 MHz and chemical shifts are reported in ppm relative to TMS.

Table 3. ^{13}C NMR chemical shifts for tricyclic macrolides

| Position | 10a | 10b | 10c | 10d | 11 | 2 | 9a |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 169.5 | 169.5 | 169.4 | 169.5 | 169.8 | 176.7 | 175.6 |
| 2 | 51.2 | 51.2 | 51.2 | 51.2 | 51.5 | 45.5 | 44.7 |
| 3 | 204.2 | 204.2 | 203.8 | 204.0 | 204.0 | 77.9 | 78.7 |
| 4 | 48.1 | 48.2 | 48.6 | 48.6 | 47.4 | 39.8 | 36.3 |
| 5 | 79.2 | 79.4 | 80.4 | 79.7 | 78.1 | 80.0 | 88.1 |
| 6 | 78.5 | 78.6 | 78.6 | 78.6 | 79.0 | 79.2 | 78.8 |
| 7 | 38.6 | 38.6 | 39.9 | 39.5 | 35.7 | 38.1 | 38.3 |
| 8 | 42.8 | 42.9 | 43.5 | 44.4 | 33.5 | 43.2 | 43.2 |
| 9 | 181.0 | 178.1 | 176.5 | 174.9 | 70.5 | 181.6 | 181.1 |
| 10 | 36.3 | 36.2 | 35.3 | 35.9 | 34.7 | 36.5 | 36.6 |
| 11 | 59.9 | 59.5 | 61.8 | 61.7 | 61.1 | 59.7 | 60.4 |
| 12 | 81.5 | 81.5 | 81.0 | 81.4 | 82.1 | 81.9 | 82.0 |
| 13 | 76.5 | 76.3 | 78.0 | 77.4 | 76.7 | 75.3 | 75.3 |
| 14 | 22.1 | 22.0 | 22.1 | 21.8 | 22.2 | 21.8 | 22.0 |
| 9-NC | 49.6 | 53.4 | 54.4 | 58.5 | 47.3 | 49.5 | 49.2 |
| 9-NC(CH ₃) _A | -- | 22.9 | 20.9 | 25.2 | -- | -- | -- |
| 9-NC(CH ₃) _B | -- | -- | -- | 32.8 | -- | -- | -- |
| 11-NCH ₂ | 42.3 | 48.0 | 48.4 | 53.4 | 46.4 | 42.4 | 42.5 |
| 11-NCOO-12 | 156.0 | 156.1 | 156.5 | 156.6 | 156.3 | 156.3 | 156.3 |
| 2-CH ₃ | 16.4 | 16.6 | 17.1 | 17.1 | 15.6 | 15.9 | 15.2 |
| 4-CH ₃ | 14.4 | 14.4 | 14.4 | 14.5 | 14.7 | 9.0 | 8.3 |
| 6-CH ₃ | 19.6 | 19.7 | 19.4 | 19.5 | 20.0 | 20.0 | 18.7 |
| 8-CH ₃ | 19.1 | 19.1 | 19.7 | 19.6 | 23.0 | 19.6 | 19.5 |
| 10-CH ₃ | 10.9 | 11.1 | 16.8 | 16.1 | 19.4 | 10.9 | 11.0 |
| 12-CH ₃ | 12.8 | 12.7 | 13.9 | 13.3 | 13.1 | 12.5 | 12.7 |
| 14-CH ₃ | 10.4 | 10.4 | 10.4 | 10.4 | 10.4 | 10.3 | 10.1 |
| 6-OCH ₃ | 49.1 | 49.0 | 49.5 | 49.2 | 49.0 | 49.9 | 49.1 |
| 1' | 103.9 | 103.9 | 104.1 | 104.1 | 103.8 | 102.9 | 106.9 |
| 2' | 70.3 | 70.3 | 70.3 | 70.3 | 70.3 | 70.9 | 70.7 |
| 3' | 65.9 | 65.9 | 65.9 | 65.9 | 65.8 | 65.5 | 65.7 |
| 4' | 40.2 | 40.2 | 40.2 | 40.3 | 40.2 | 40.2 | 40.2 |
| 5' | 28.1 | 28.1 | 28.1 | 28.2 | 28.1 | 28.6 | 28.0 |
| 3'-N(CH ₃) ₂ | 69.5 | 69.5 | 69.5 | 69.6 | 69.5 | 68.8 | 70.4 |
| 5'-CH ₃ | 21.2 | 21.1 | 21.1 | 21.2 | 21.1 | 21.4 | 21.2 |
| 1'' | | | | | | 95.9 | |
| 2'' | | | | | | 34.7 | |
| 3'' | | | | | | 72.6 | |
| 4'' | | | | | | 77.9 | |
| 5'' | | | | | | 65.6 | |
| 3''-CH ₃ | | | | | | 21.5 | |
| 5''-CH ₃ | | | | | | 18.6 | |
| 3''-OCH ₃ | | | | | | 49.4 | |

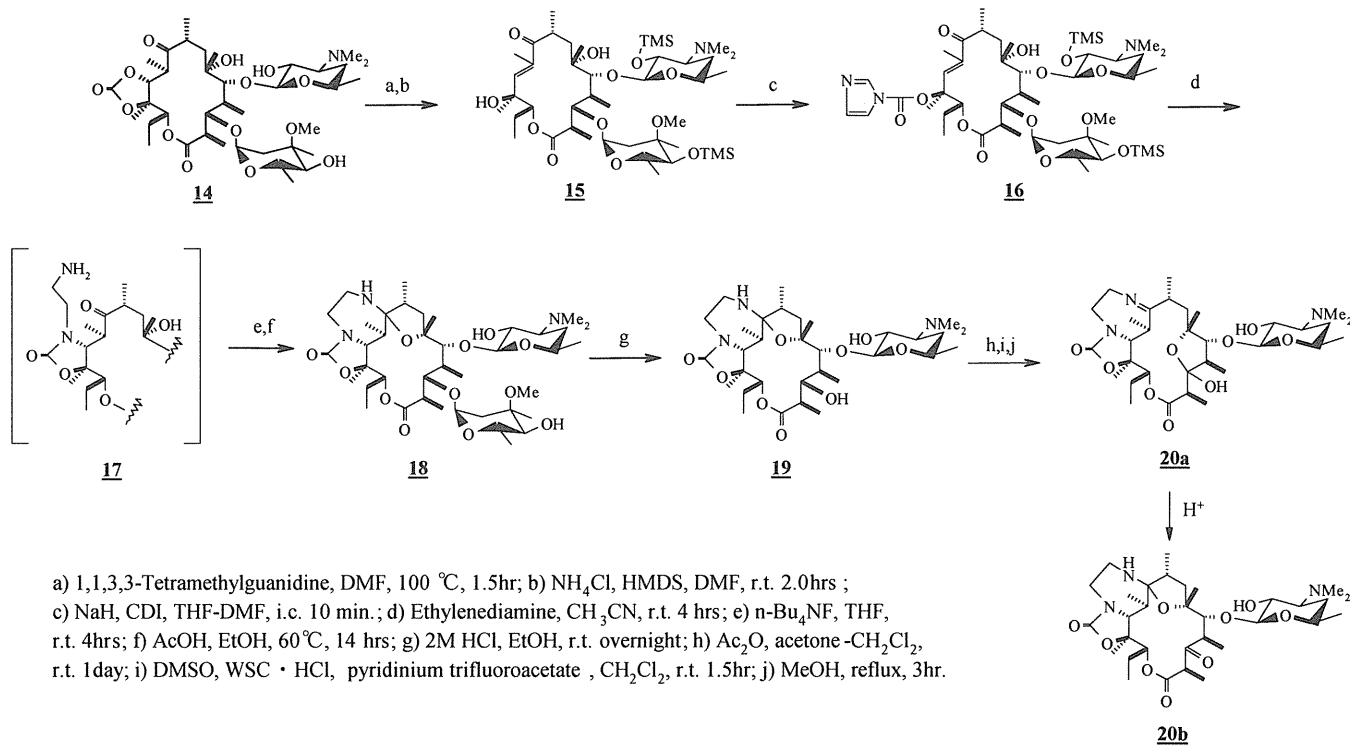
All spectra were taken in CDCl₃ at 125 MHz and chemical shifts are reported in ppm relative to CDCl₃ (77.0 ppm).

第3章 四環性マクロライド系抗生物質の合成

第1節 四環性マクロライド系抗生物質の合成

前章において三環性ケトライド化合物の合成法を確立することが出来た。そこでこの知見を活かし更なる誘導體合成の展開を図ることにした。一般にエリスロマイシン系化合物においては、分子内に極性基を多く持つ化合物が、インフルエンザ菌等のグラム陰性菌に対してより強い抗菌力を示すことが知られている。そこでグラム陰性菌に対する抗菌力増強を目的に、前章まで合成用反応基質として用いてきた6-OMe体を6-OH体に代えることにより、より高い極性を持った化合物の合成を計画した。しかし6-OH体に対し、6-OMe体と同様条件で2'位及び4'位水酸基のアセチル化を行おうとすると、6-OH体が6,9-ヘミアセタール構造を極めてとりやすいため (Figure 2), 結果としてヘミアセタール水酸基のアセチル化や脱水反応が進行し、目的物を収率良く得ることが不可能であった。そこで著者はScheme 8に示す合成ルートに従い目的化合物の合成を行った。すなわち6,9-ヘミアセタール形成を阻止する方策として、まず10,11位間で脱水反応を起こした10,11-アンヒドロ体**15**の合成を計画した。アンヒドロ体**15**は共役系をとったエノン構造となるため9位カルボニル基が6位水酸基の攻撃を受けにくく、その結果6,9-ヘミアセタール形成が阻止できるものと予想した。また2'位と4'位水酸基の保護基としてアセチル基よりも立体的に嵩高いトリメチルシリル (TMS) 基を用い、アリルアルコールタイプの12位水酸基への副反応を抑えることにした。まず文献既知²⁸⁾の11,12-環状カーボネート体**14**を*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 中、1,1,3,3-テトラメチルグアニジン (TMG) を用い脱炭酸し、続いて塩化アンモニウムとヘキサメチルジシラザン (HMDS) を用い2'位及び4'位水酸基をTMS基で保護し10,11-アンヒドロ体**15**とした。化合物**15**は¹³C-NMRにおいて210.4 ppmにC9のピークが現れ、期待どおり溶液中で9-ケト構造を形成していることを確認した。

Scheme 8. Synthesis of tetracyclic macrolides



化合物 **15** の 12 位水酸基を CDI を用いてイミダズリルカルボニル体とした後、エチレンジアミンと反応させ 11,12-環状カーバメート体 **17** とした。化合物 **17** は不安定であったため、単離することなく酢酸存在下、9 位への環化反応を行い 9 位環化体 **18** とした。化合物 **18** は、6 位水酸基と 9 位イミノ基との間で環を形成した四環性マクロライド化合物であることが NMR の検討から確認された。次に 2M 塩酸により化合物 **18** の 3 位クラジノシル基を除去した。続いて **19** の 2'位水酸基を保護するため、アセトン-塩化メチレン混合溶媒中、塩基を用いずに無水酢酸によりアセチル化を行った。続いて改良 Pfitzner-Moffatt 酸化条件により 3 位水酸基を酸化後、メタノリシスにより 2'位保護基を除去し、3 位酸化体 **20a** とした²⁹⁾。化合物 **20a** は、6 位水酸基が新たに形成した 3 位ケトン体へと巻き直しを起こした 6,3'-ヘミアセタール構造を取っていることが確認された。化合物 **20a** は酸性条件下、再び 6 位水酸基が 9 位へ巻き直しを起こし、3 位カルボニル基が再生されることが NMR の検討から明らかになった。

第2節 考察

化合物 **19** のアセチル化の際、9 位アミノ基、3 位水酸基及び 2'位水酸基の 3 箇所がアセチル化される可能性を持っていた。今回、塩基無添加条件でアセチル化を行ったので、3 位の反応性は低いと予想されたが、9 位と 2'位の反応位置選択性については、むしろ 9 位がアミノ基であることからそちらの反応可能性が高いことが予想された。そこでアセチル化反応後、生成物の NMR 解析を行うことによりアセチル化反応の位置を確認した。一般的に、アセチル化された水酸基が結合した炭素上にあるプロトンのケミカルシフトは、アセチル化前の化合物の対応するケミカルシフトに比較し大きく低磁場シフトすることが知られている。そこでアセチル化生成物の ¹H-NMR スペクトルを検討した結果、**19** の H2'が 3.27 ppm に観測されたのに対し、アセチル化成績体では対応するプロトンが 4.79 ppm に大きく低磁場シフトしていることが判明した。この結果からアセチル化は目的の 2'位水酸基上で起こっていることが確認された。2'位が優位に反応した理由は、3'-ジメチルアミノ基の隣接基効果が大きく寄与したものと推測した。

化合物 **18** 及び **19** は scheme 8 に示すように CDCl₃ 中で 6,9'-アミナール構造をとっていることが NMR の解析結果より明らかとなった。すなわちこれらの化合物の C9 のケミカルシフト値がそれぞれ 99.2 ppm 及び 98.1 ppm であり 9-イミン構造で

はなく 6,9-アミナル構造を形成していることを示唆した。一方、3位を酸化した **20a** の C9 及び C3 のケミカルシフト値がそれぞれ 181.3 ppm 及び 105.3 ppm であったことから、6位水酸基が新たに形成された3位カルボニル基との間でヘミケタール構造を取っていることが示唆された。興味深いことに、**20a** の CDCl₃ 溶液に DCI 溶液を一滴加えることにより、181.3 ppm と 105.3 ppm のオリジナルピークが消失し、新たに 201.3 ppm に C3 ピークが現れた。この結果から **20a** は酸性条件下では 6,9-アミナル体に異性化し、と同時に3位カルボニル基が再生したもの (**20b**) と考えられた。酸性条件下では **20a** の 9位イミノ基がプロトネーションを受け 9位炭素の電子密度が低下することにより 6位水酸基の求核性が増したためか、あるいはプロトネーションによりアグリコンのコンホメーションに変化が生じた結果、6,9-アミナル構造をとり易くなったものと推測される。

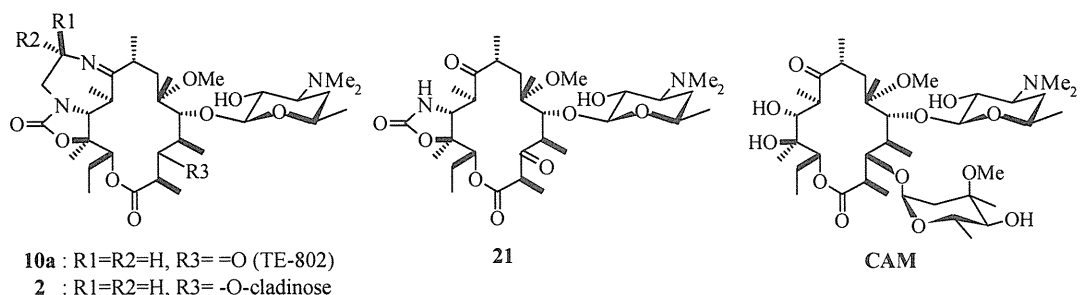
第1節 研究経緯

新たに見い出した三環性ケトライド系抗生物質は、アグリコン部分にユニークな三環性骨格と新規カルボニル基を有することを構造上の特徴としている。三環性ケトライド系抗生物質が極めて強い抗菌力を発揮することから（抗菌力の詳細に関しては後述）、活性発現時のこのアグリコン骨格の分子状態に大いに興味を持たれた。そこでこの骨格がどの様に活性発現に影響するのかを明らかにするため、**10a** (TE-802) 及びその周辺化合物の結晶及び溶液中でのコンホメーション解析を X線結晶解析及び NMR 解析を用いる手法により行った³⁰⁾。

第2節 X線結晶解析によるコンホメーション解析 (torsion angle)

結晶状態における三環性マクロライド化合物のコンホメーションの検討には以下の4化合物の X線結晶解析結果を用いた (Figure 19)。すなわち CAM³¹⁾ (基本マクロライド化合物)、**10a** (三環性ケトライド)、化合物 **2** (三環性アグリコン骨格を有し3位はクラジノシル基)、及び **21**³²⁾ (二環性ケトライド) の4化合物である。CAMの X線構造情報は文献記載データを参考にした。

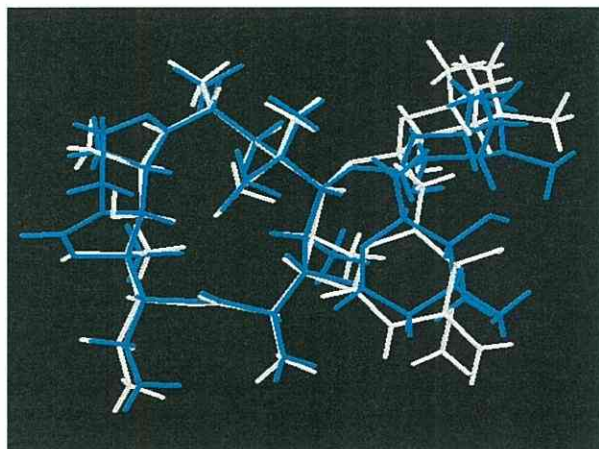
Figure 19. Structures of investigated 4 compounds



これらの結果から、結晶中におけるアグリコン部分のコンホメーションは2つのファクターが関係することが明らかとなった。すなわち 1) ジアゼピン環形成の有無、2) 3位置換基がカルボニル基かオリジナルのクラジノース基か、の2ファクターである。

まず基本マクロライド化合物である CAM と CAM に三環性アグリコン骨格を導入した **2** との構造 (X 線結晶解析結果) を比較した. その結果, アグリコン部分における大変良い一致が確認された (Figure 20).

Figure 20. CAM (white)と **2** (cyan)の結晶構造の重ね合わせ



三環性マクロライド化合物では, 僅かに 5 位デソサミンの位置が 3 位クラジノースに近づいている様子がわかる (Figure 20). CAM 及び **2** の torsion angle の値を比

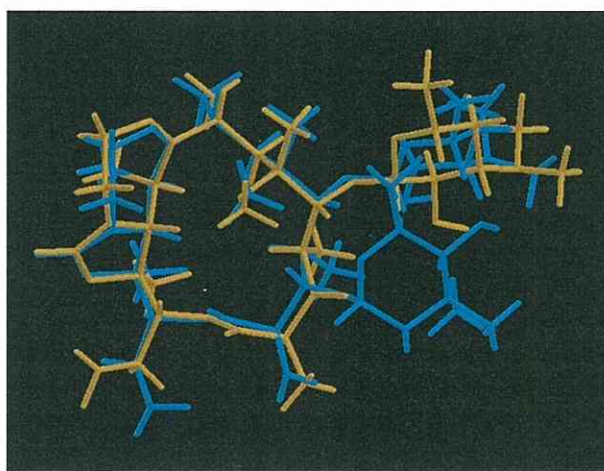
Table 4. Torsion angles of lactone ring (deg)

| | CAM | 10a | 2 | 21 |
|-----------------|------|------|----------|-----------|
| C13-O14-C1-C2 | 175 | 173 | 168 | 176 |
| O14-C1-C2-C3 | 124 | 102 | 115 | 117 |
| C1-C2-C3-C4 | -92 | -69 | -80 | -104 |
| C2-C3-C4-C5 | 157 | 155 | 164 | 157 |
| C3-C4-C5-C6 | -86 | -126 | -97 | -86 |
| C4-C5-C6-C7 | -74 | -61 | -72 | -72 |
| C5-C6-C7-C8 | -177 | 179 | 179 | -177 |
| C6-C7-C8-C9 | -74 | -74 | -74 | -66 |
| C7-C8-C9-C10 | -67 | -56 | -63 | -69 |
| C8-C9-C10-C11 | 117 | 121 | 122 | 133 |
| C9-C10-C11-C12 | -172 | -172 | -173 | -170 |
| C10-C11-C12-C13 | 169 | 150 | 157 | 150 |
| C11-C12-C13-O14 | -71 | -84 | -68 | -74 |
| C12-C13-O14-C1 | 114 | 150 | 118 | 129 |

較しても、C10-C11-C12-C13 region (CAM : 169°, 2 : 157°, $\Delta = 12^\circ$)に僅かに違いがあるもののその他では大変良い一致が見られた (Table 4). これらの結果から、単にアグリコンを三環性構造に導くだけでは、そのコンホメーションに大きな影響は与えないということが示された.

次に三環性マクロライド化合物 2 とその 3 位をカルボニル基へと変換した 10a との結晶構造の比較を行った (Figure 21). 化合物 10a の C3-C4-C5-C6 及び C12-C13-

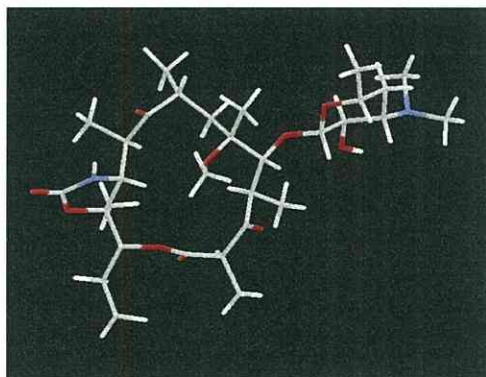
Figure 21. 三環性マクロライド 2 (cyan) と三環性ケトライド 10a (orange) の結晶構造の重ね合わせ



O14-C1 regions の torsion angle は 2 と大きく異なっていた (Table 4). 興味深いことに 5 位のデソサミンが元の位置からラクトン環上方へ大きく移動していた. マクロライドがリボゾームと結合する際に、デソサミン上の 2'位水酸基及び 3'位ジメチルアミノ基が重要な役割を果たしていると言われてている³³⁾ことから、この変化は 10a の優れた抗菌活性を考察する際の重要な要素になる可能性が考えられる. 当然のことながら、化合物 10a はオリジナルマクロライドである CAM との C3-C4-C5-C6 及び C12-C13-O14-C1 regions の値の比較においても大きな違いを示している. Figure 21 からわかるように、10a の 3 位カルボニル基はラクトン環から “exo” の方向に大きく倒れた形をとっており、その変化に伴い周辺においても変化が生じていた. この様なコンホメーションは、三環性アグリコン構造と 3 位ケトン構造を同時に持った 10a に特徴的であった. 実際に、二環性アグリコン構造を持ったケトライド化合物 21 (三環性骨格は持たず) の C3-C4-C5-C6 及び

C12-C13-O14-C1 regions の値は **10a** とは異なり、むしろ CAM に近い値を示した (CAM : -86° 及び 114° , **2** : -97° 及び 118° , **21** : -86° 及び 129°). 化合物 **21** の X 線結晶解析の図を Figure 22 に示した.

Figure 22. 二環性ケトライド **21** の X 線結晶構造



以上の結果、単にアグリコンを三環性に変換しただけ (CAM と **2** との比較)、あるいは単に 3 位をケトン体へと変換しただけ (CAM, **21** 及び **10a** との比較) ではコンホメーションに大きな変化は生じず、その両方のファクターが揃って初めて結晶中のコンホメーションに影響を与えることが明らかとなった。すなわち、化合物 **10a** は 1-及び 3-カルボニル基が、ラクトン環から “*exo*” の方向に向く独特のコンホメーションを取るが、これはジアゼピン環と 3 位ケトン構造を同時に持つことに起因している。

第 3 節 X 線結晶解析によるコンホメーション解析 (アグリコン上のプロトン間距離)

エリスロマイシン系抗生物質のコンホメーション解析は、その特徴ある構造から X 線結晶解析、MD 計算及び NMR を用いた手法等により多くの研究者によってなされてきた³⁴⁻³⁸。その中で、アグリコン部分に関して議論する場合、Everett らが初めに用いた “*fold-out*” と “*fold-in*” の概念^{39,40}が現在最も一般的に用いられている。両コンホメーションの最も顕著な違いは “*fold-out*” コンホメーションでは H3 がラクトン環平面に対し上方を向き、H4 がラクトン環平面に平行に環の内側を向いた形をとり、逆に “*fold-in*” コンホメーションでは H3 がアグリコン平面に平

行に環の内側を向いた形になり、それに伴い H4 が環の裏側に回りこんだ形をとることである。この点が 2 つのコンホメーションの特徴的な違いであるが、通常、この他に幾つか典型的な違いが観測される。

Steinmetz 等は水溶液中での詳細なコンホメーション解析を行い、CAM が水溶液中で fold-out コンホメーションをとることを明らかにしている⁴¹⁾。一方、Barber 等は CAM が fold-out 或いは fold-in コンホメーションをとった場合のそれぞれのアグリコン上のプロトン間距離を計算し、その結果をもとにそれぞれのコンホメーションにおいて観測されるべき NOE の結果を予測している⁴²⁾。NOE の結果を用いた検討は本章第 5 節で行うこととし、本節では CAM の X 線結晶解析結果と Barber 等の計算結果を参考に、化合物 **10a**, **2**, **21** 及び **10c** のアグリコン上の主要プロトン間距離の結果 (Table 5) から、これら関連化合物の結晶状態でのコンホメーションを検討した。

Table 5. Internuclear distances in lactone ring (Å)

| Contact | CAM | | | 10a | 2 | 21 | 10c |
|----------|----------|---------------|---------|------------|----------|-----------|------------|
| | crystal* | calculation** | | | | | |
| | | fold-out | fold-in | | | | |
| H3-H8 | 5.5 | 5.8 | 2.1 | - | 5.7 | - | - |
| H3-H11 | 3.7 | 3.8 | 2.5 | - | 3.6 | - | - |
| H4-H11 | 3.1 | 2.4 | 3.3 | 2.9 | 2.9 | 3.6 | 3.8 |
| H4-6Me | 4.5 | 4.6 | 2.1 | 4.4 | 4.4 | 4.6 | 4.5 |
| H5-6Me | 2.8 | 2.4 | 3.8 | 3.1 | 2.9 | 3.0 | 2.9 |
| H8-H11 | 4.1 | 4.2 | 2.3 | 4.1 | 4.4 | 4.2 | 4.3 |
| H8-6Me | 2.8 | 2.2 | 4.5 | 2.9 | 3.0 | 2.8 | 2.8 |
| 2Me-14Me | 4.5 | 2.6 | 3.3 | 6.1 | 4.4 | 4.6 | 4.5 |
| 2Me-4Me | 4.2 | 4.0 | 2.3 | 4.5 | 4.3 | 4.0 | 4.0 |

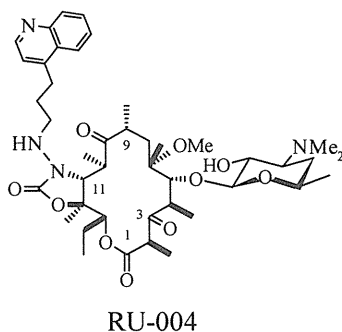
* Reference 31.

** Reference 42.

CAM の結晶構造から得た H5-6-Me 及び H8-6-Me のプロトン間距離の値は何れも 2.8 Å であり、Barber 等が fold-out コンホメーションとして計算した値 (2.4 Å 及び 2.2 Å) と近い値を示した。一方、対応する **10a**, **2**, **21** 及び **10c** の値は 2.8 Å から 3.1 Å と CAM と近い結果を与え、これらの化合物が fold-out コンホメーションを取っている可能性が示唆された。CAM の H4-H11 間距離の値が 3.1 Å であるのに対し、**10a** 及び **2** は 2.9 Å と近い値を示したが、**21** 及び **10c** においてはそれぞれ 3.6 Å 及び 3.8 Å と、fold-in コンホメーションで予測された値 (3.3 Å) をも上回る結果であった。X 線結晶解析の結果から見ると、化合物 **21** 及び **10c** では 3 位の

クラジノースが除去されることにより、5位のデソサミンがアグリコン上方に大きく移動し、それに伴いH4がアグリコン後方に引き込まれH11との距離が開いたものと考えられる。Girault等はケトライド化合物の一つであるRU-004が、溶液中

Figure 23. RU-004の構造

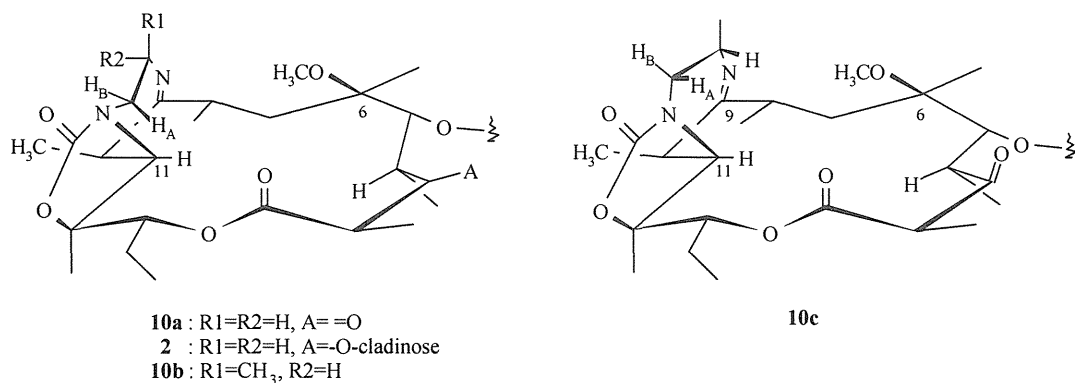


では1位、3位及び9位の3つのカルボニル基がラクトン環に対し“up”の形を主コンホメーションとしており、その時のH4-H11のプロトン間距離は4.3 Åであると報告⁴³⁾している (Figure 23). この結果は21及び10cの結果と良く一致している. 一方、同じく3位のクラジノシル基が除去された10aにおいても同様の現象が見られるはずであるが、10aにおいては1位及び3位のカルボニル基（特に3位カルボニル基）がラクトン環に対し“exo”の方向に倒れることによりH4-H11のプロトン間距離を小さな値で保持する結果となった. 化合物10a, 2, 21, 10c及びCAMの2-Me-14-Me間距離は6.1 Å, 4.4 Å, 4.6 Å, 4.5 Å及び4.5 Åであり何れもfold-outコンホメーションの計算値(2.6 Å)を大きく上回った. これらの値はfold-inコンホメーションの計算値よりも大きいものであるが、後述するNOEの検討では何れの化合物においても2-Me-14-Me間にNOEが観測されている. この結果、上記5化合物における2-Meと14-Meは結晶状態では大きな距離をとるが溶液中ではNOEを与えうる距離に接近可能であることが示唆された.

第4節 NMRを用いたコンホメーション解析 (テトラヒドロジアゼピン環)

化合物10a, 2及び10bのそれぞれのH_Bのケミカルシフトは非常に近い値を示し(3.99, 3.99及び3.85 ppm), それぞれの化合物のH_Aの値(2.95, 3.01及び2.67 ppm)に比較し大きく低磁場側に観測された (Table 2).

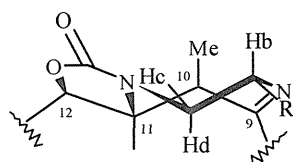
Figure 24. Conformation of tetrahydrodiazepine ring



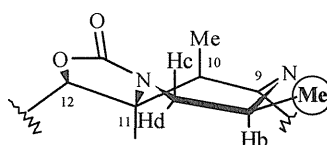
これは 11,12-環状カーバメート上のカルボニル基のアニソトロピー効果によるものと考えられる. Figure 24 に示したように, 10a, 2 及び 10b における H_B はカーバメート上のカルボニル基と平行に位置し, アニソトロピー効果を受け低磁場シフトするのに対し, H_A はそのような影響を受けない. また水溶液中における化合物 10a の H_A 及び H_B のケミカルシフトがそれぞれ 3.25 及び 4.16 ppm であることから CDCl₃ 中における 10a のテトラヒドロジアゼピン部分のコンホメーションが水溶液中でも保持されていると考えられる (Table 6). 一方, 化合物 10c は溶液中においても 9-*N*,11-*N*-エタノブリッジ部分がツイストフォームを取っている. すなわち, ツイストフォームを取ることで, 11,12-環状カーバメート上のカルボニル基が H_A と H_B のちょうど中間に位置し, その結果 10c の H_A 及び H_B のそれぞれのケミカルシフトは 10a 等と異なり, 極めて近い値 (3.38 及び 3.47 ppm) を示した (Table 2).

Kasprzyk 等は溶液中での 2,3,6,7-テトラヒドロ-1*H*-1,4-ジアゼピン化合物のコンホメーション解析を行い, これらの化合物が通常イス型フォームを取っていることを報告している⁴⁴⁾. 化合物 10b の 9-NCH-11-NCH_B 及び 9-NCH-11-NCH_A の CDCl₃ 中でのそれぞれの結合定数は 2.5 Hz 及び 11.0 Hz であり, この結果は Kasprzyk 等の 2,3,6,7-テトラヒドロ-1*H*-1,4-ジアゼピン化合物のイス型フォームの計算結果と良く一致している (Table 6).

Table 6. Coupling constants (Hz) of tetrahydrodiazepine ring



イス型フォーム



ボート型フォーム

| coupled protons | literature ⁴⁴⁾ | | 化合物 | | | | |
|-----------------|---------------------------|-----------|-----|------|------|------|-----|
| | chair form | boat form | 10a | 10a* | 2 | 10b | 10c |
| Hb-Hc | 2.0 | 8.5 | 2.8 | 2.1 | 2.7 | 2.5 | 3.1 |
| Hb-Hd | 11.0 | 10.0 | 9.7 | 11.3 | 11.6 | 11.0 | 6.7 |

* Measured in D₂O.

また **10a** の結合定数 (9-NCH_B-11-NCH_B: 2.8 Hz, 9-NCH_B-11-NCH_A: 9.7 Hz) 及び **2** の結合定数 (9-NCH_B-11-NCH_B: 2.7 Hz, 9-NCH_B-11-NCH_A: 11.6 Hz) の結果も, これら 2 化合物がイス型フォームを取っていることを示唆している. 更に **10a** はその結合定数の値から, D₂O 中でも CDCl₃ 中と同様, イス型フォームを取っていることが示された (9-NCH_B-11-NCH_B: 2.1 Hz, 9-NCH_B-11-NCH_A: 11.3 Hz). 一方, 化合物 **10c** は 9-N,11-N エタノブリッジ部分がツイストすることによりボート型フォームを取っていると考えられる. 化合物 **10c** の実際の結合定数値は 9-NCH-11-NCH_B: 6.7 Hz 及び 9-NCH-11-NCH_A: 3.1 Hz であり, Kasprzyk 等のボート型フォームの計算値 (10.0 Hz 及び 8.5 Hz) とは異なる結果であった. しかし, Kasprzyk 等は 2,3,6,7-テトラヒドロ-1*H*-1,4-ジアゼピン化合物のボート型フォームの結合定数を実測しておらず, また著者は NOESY スペクトルの解析結果より, **10c** が溶液中でボート型フォームを取っている可能性が高いことを明らかにしている²⁷⁾. 化合物 **10b** 及び **10c** と同テトラヒドロジアゼピン環上のメチル置換基がエネルギー的に有利なエクアトリアルコンフォメーションを取るため **10b** はイス型フォームを **10c** はボート型フォームを取ったものと考えられる.

Table 7. Proton chemical shift and coupling constants for **10a** at 25°C

| | in CDCl ₃ | | in D ₂ O | |
|--------------------------|----------------------|--|---------------------|---|
| | ppm (δ) | ³ J(Hz) | ppm (δ) | ³ J(Hz) |
| H-2 | 3.82 | 6.7 (2-2Me) | -- | |
| H-4 | 3.08 | 8.5 (4-5) | 3.23 | 6.1 (4-5) |
| H-5 | 4.21 | | 4.39 | |
| H-7 _A | 1.50 | 11.6 (7 _A -8) | 1.88 | 2.1 (7 _A -8) |
| H-7 _B | 1.71 | 2.4 (7 _B -8) | 2.05 | 11.6 (7 _B -8) |
| H-8 | 2.70 | 7.0 (8-8Me) | 3.09 | 6.1 (8-8Me) |
| H-10 | 2.73 | 1.5 (10-11) | 3.42 | |
| H-11 | 3.73 | | 3.83 | |
| H-13 | 4.95 | 10.6 (13-14 _A) 2.4 (13-14 _B) | 5.03 | 10.7 (13-14 _A) 2.3 (13-14 _B) |
| H-14 _A | 1.55 | 7.7 (14 _A -14Me) | 1.73 | 7.3 (14 _A -14Me) |
| H-14 _B | 1.91 | 7.7 (14 _B -14Me) | 1.85 | 7.3 (14 _B -14Me) |
| 2-Me | 1.39 | | 1.35 | |
| 4-Me | 1.29 | 7.0 (4-4Me) | 1.31 | 6.9 (4-4Me) |
| 6-Me | 1.36 | | 1.34 | |
| 8-Me | 1.05 | | 1.30 | |
| 10-Me | 1.22 | 7.0 (10-10Me) | 1.42 | 6.9 (10-10Me) |
| 12-Me | 1.48 | | 1.68 | |
| 14-Me | 0.86 | | 0.87 | |
| 9-NCH _A (eq.) | 3.78 | 4.9 (9NCH _A -11NCH _A) 2.8 (9NCH _A -11NCH _B) | 3.90 | 2.1 (9NCH _A -11NCH _A) 2.4 (9NCH _A -11NCH _B) |
| 9-NCH _B (ax.) | 3.78 | 9.7 (9NCH _B -11NCH _A) 2.8 (9NCH _B -11NCH _B) | 4.14 | 11.3 (9NCH _B -11NCH _A) 2.1 (9NCH _B -11NCH _B) |
| 11-NCH _A | 2.95 | | 3.25 | |
| 11-NCH _B | 3.99 | | 4.16 | |
| 6-OMe | 2.74 | | 2.81 | |
| H-1' | 4.30 | 7.3 (1'-2') | 4.49 | 6.9 (1'-2') |
| H-2' | 3.19 | 10.0 (2'-3') | 3.54 | 6.9 (2'-3') |
| H-3' | 2.44 | 12.2 (3'-4' _A) 3.7 (3'-4' _B) | 3.52 | 12.2 (3'-4' _A) 4.3 (3'-4' _B) |
| H-4' _A | 1.23 | 10.9 (4' _A -5') | 1.60 | 12.1 (4' _A -5') |
| H-4' _B | 1.67 | 2.1 (4' _B -5') | 2.17 | 1.5 (4' _B -5') |
| H-5' | 3.54 | 6.0 (5'-5'Me) | 3.85 | 6.1 (5'-5'Me) |
| 5'-Me | 1.24 | | 1.35 | |
| 3'-NMe ₂ | 2.26 | | 2.87 | |
| 2'-OH | 3.49 | | -- | |

Table 8. Coupling constants for **2**, **21**, **10c** and **10b** (aglycon ring)

| | Coupling constants $^3J(\text{Hz})$ | | | |
|--------------------------|---|---|--|---|
| | 2 | 21 | 10c | 10b |
| H-2 | 8.8 (2-3) | 6.7 (2-2Me) | 6.7 (2-2Me) | 6.7 (2-2Me) |
| H-3 | <1 (3-4) | | | |
| H-4 | 7.6 (4-5) | 7.9 (4-5) | 9.2 (4-5) | 8.5 (4-5) |
| H-5 | | | | |
| H-7 _A | 9.8 (7 _A -8) | 12.2 (7 _A -8) | 12.2 (7 _A -8) | 14.0 (7 _A -8) |
| H-7 _B | 3.3 (7 _B -8) | 2.4 (7 _B -8) | 2.4 (7 _B -8) | 1.8 (7 _B -8) |
| H-8 | 7.0 (8-8Me) | 6.4 (8-8Me) | 6.7 (8-8Me) | 7.3 (8-8Me) |
| H-10 | 1.5 (10-11) | <1 (10-11) | 6.7 (10-10Me) | 6.7 (10-10Me) |
| H-11 | | | | |
| H-13 | 11.0 (13-14 _A) 2.1 (13-14 _B) | 10.6 (13-14 _A) 2.5 (13-14 _B) | 10.4 (13-14 _A) 2.4 (13-14 _B) | 10.4 (13-14 _A) 2.5 (13-14 _B) |
| H-14 _A | 7.3 (14 _A -14Me) | 7.6 (14 _A -14Me) | 7.3 (14 _A -14Me) | 7.3 (14 _A -14Me) |
| H-14 _B | 7.3 (14 _B -14Me) | 7.6 (14 _B -14Me) | 7.3 (14 _B -14Me) | 7.3 (14 _B -14Me) |
| 2-Me | 7.3 (2-2Me) | | | |
| 4-Me | 7.6 (4-4Me) | 7.6 (4-4Me) | 7.3 (4-4Me) | 7.3 (4-4Me) |
| 6-Me | | | | |
| 8-Me | | | | |
| 10-Me | 7.0 (10-10Me) | 6.4 (10-10Me) | | |
| 12-Me | | | | |
| 14-Me | | | | |
| 9-NCH _A | 3.1 (9NCH _A -11NCH _A) 2.7 (9NCH _A -11NCH _B) | | 3.1 (9NCH-11NCH _A) 6.7 (9NCH-11NCH _B) 7.3 (9NCH-9NCMe) | 6.7 (9NCH-9NCMe) 11.0 (9NCH-11NCH _A) 2.5 (9NCH-11NCH _B) |
| 9-NCH _B (ax.) | 11.6 (9NCH _B -11NCH _A) 2.7 (9NCH _B -11NCH _B) | | | |

第5節 NMR を用いたコンホメーション解析 (アグリコン)

Everett 等は EM-A が fold-out コンホメーション (90%以上) をメインに取っていることを報告³⁹⁾しているが, dirithromycin⁴⁵⁾や AZM⁴⁶⁾は EM-A とは異なり溶液中で fold-in コンホメーションを取っていることが報告されている. そこで **10a** (TE-802) を中心にその周辺化合物のコンホメーションを ^1H NOE 及び ^1H ROE のデータを用いて検討した. 本章第 3 節に述べたようにマクロライド化合物が fold-out コンホメーションを取っている場合, H4-H11, H5-6-Me, H8-6-Me 及び 2-Me-14-Me 間に NOE が, また fold-in コンホメーションを取っている場合, H3-H8, H3-H11, H4-6-Me, H8-H11 及び 2-Me-4-Me 間に NOE が観測されると予測される. Table 9 に **10a**, **2**, **21**, **10c** 及び **10b** の CDCl_3 中における 2D ^1H

NOESY 実験から得た ^1H NOE データと **10a** の D_2O 中における 2D ^1H ROESY 実験から得た ^1H ROE データをまとめた (Table 9). 化合物 **10a** の水溶液中での NOESY 実験では, 正確な結果を得ることが出来なかったので ROESY にかえて実験を行った.

何れの化合物においても H5-6-Me, H8-6-Me 及び 2-Me-14-Me 間に NOE が観測され, fold-out コンホメーションをとっている可能性が示唆されたが, H4-H11 間の NOE は観測されなかった. 更に **10a**, **21**, **10c** 及び **10b** に fold-in コンホメーションで観測されるべき 2-Me-4-Me 間の NOE が観測された.

Table 9. NOEs for **10a**, **2**, **21**, **10c** and **10b**

| Compound No. | Fold-out | | | | Fold-in | | | | |
|--------------|----------|--------|--------|----------|---------|--------|--------|--------|---------|
| | H4-H11 | H5-6Me | H8-6Me | 2Me-14Me | H3-H8 | H3-H11 | H4-6Me | H8-H11 | 2Me-4Me |
| 10a | no | ob | ob | ob | — | — | no | no | ob |
| 10a* | no | ob | ob | ob | — | — | no | no | ** |
| 2 | no | ob | ob | ob | no | no | no | no | ** |
| 21 | no | ob | ob | ob | — | — | no | no | ob |
| 10c | no | ob | ob | ob | — | — | no | no | ob |
| 10b | no | ob | ob | ob | — | — | no | no | ob |

* ROESY data in D_2O .

** NOE and ROE crosspeak could not be accurately determined by noise.

no : not observed.

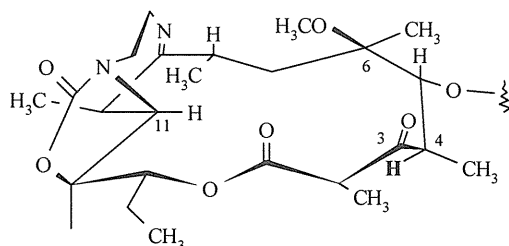
ob : observed.

また 3 位にクラジノースを有する三環性マクロライド化合物 **2** も, X 線結晶解析の結果では CAM とアグリコン部分で良い一致を示し, 本来 H4-H11 間 (2.9 \AA) に NOE が観測されるはずであるが今回の実験では観測されていない. すなわち, **10a** 及び **2** は溶液中では結晶状態と異なるコンホメーションを取っていると考えられる. おそらく **10a** 及び **2** を含めた何れの化合物 (三環性アグリコンを有するか或いはケトライド化合物) も, H4 がラクトン環後方へ引き込まれたコンホメーションを取っていると推測した. Everett 等は fold-out コンホメーションは C4 と C11 の距離が近く, 相対的に H2-H3 及び H4-H5 が大きな結合定数 ($J_{2,3} \doteq 10\text{Hz}$ 及び $J_{4,5} \doteq 8\text{Hz}$) を有し, その一方で fold-in コンホメーションでは C3 と C11 の距離が近づき, 相対的に H2-H3 及び H4-H5 が小さな結合定数 ($J_{2,3} \doteq 2\text{Hz}$ 及び $J_{4,5} \doteq 3\text{Hz}$) を有することを報告⁴⁷⁾している. Everett 等の報告に従って **10a**, **2**, **21**, **10c** 及び **10b** を検証するとそれぞれの化合物の $J_{4,5}$ の結合定数がそれぞれ 8.5, 7.6, 7.9, 7.2 及び 8.5Hz であることから fold-out コンホメーションを取っていると考えられる. ま

た、水溶液中における **10a** の $J_{4,5}$ の結合定数は 6.1Hz であり、fold-out と fold-in の中間の値を示した。

以上の結果から、溶液中において **10a**, **2**, **21**, **10c** 及び **10b** は基本的に fold-out コンホメーションの条件を満たしているが、H4 だけが fold-in ライクにラクトン環後方へ引き込まれ、その結果、H11 との距離が乖離した “semi-fold-out” と呼ぶべきコンホメーションを取っていることが示唆された (Figure 25)。

Figure 25. Semi-fold-out コンホメーション (**10a**)



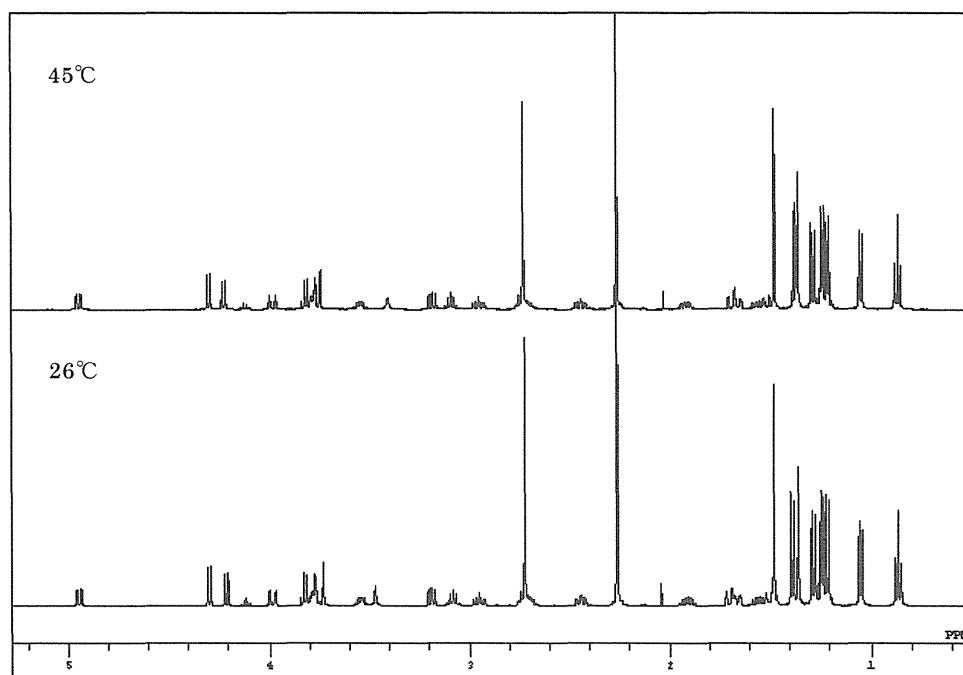
第 6 節 NMR を用いたコンホメーション解析 (pD と温度の影響)

化合物 **10a** の CDCl_3 及び D_2O 中におけるケミカルシフトと結合定数を Table 5 に示した。 D_2O 溶液の pD は 20% DCl 溶液を用いて 6.0 に調整した。 D_2O 溶液中における **10a** の結合定数は CDCl_3 中の値と極めて近い値を示した。このことは、**10a** が D_2O 中でも CDCl_3 中とほぼ同じコンホメーションを取っていることを示している。一方、 H7_A – H8 及び H7_B – H8 の結合定数はそれぞれの溶媒で全く逆転していた。 CDCl_3 中における **10a** の値は 11.6Hz 及び 2.4Hz であり、 D_2O 中における対応する値はそれぞれ 2.1Hz 及び 11.6Hz であった。7 位及び 8 位周辺の結合定数に大きな違いが無いことから、このような現象の起こった原因はコンホメーションの変化によるものではなく、DCl による 9-イミノ基の重水素化に起因すると考えられる。DCl 添加による重水素化の影響は他のプロトンにも見ることができる。 D_2O 中における 9- NCH_A 及び 9- NCH_B シグナルは、それぞれ 3.90 ppm 及び 4.14 ppm に分かれて観測されるが、 CDCl_3 中では 3.78 ppm 一箇所に観測された。更に、 CDCl_3 中において 2.44 ppm 及び 2.26 ppm に観測された $\text{H3}'$ 及び $3'\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ のシグナルは D_2O 中では $3'\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ 基の重水素化により 3.52 ppm 及び 2.87 ppm に低磁場シフ

トしていた。尚、2位のプロトンはエステル基とケトン基に挟まれた位置であり、容易に重水素による置換が起こるため D₂O 中での測定では消失していた。

次にコンホメーションに対する温度の影響を検討するため、26 °C 及び 45 °C において CDCl₃ 溶媒中、10a の ¹H-NMR 測定を行った。結果を Figure 26 に示す。Barber 等⁴²⁾はアジスロマイシンとエリスロマイシン A の NMR を測定温度 (20, 40, 60 及び 80°C) を変えて測定した時の結合定数の変化幅が 0.5 Hz 以下であり、温度の変化によってこれら 2 化合物のコンホメーションが大きく変わらないことを報告している。化合物 10a のケミカルシフト及び結合定数は何れの温度においてもほぼ一致し、この温度変化範囲ではコンホメーションに変化が無く、これは Barber 等の結果と一致した。

Figure 26. ¹H NMR spectra for 10a in CDCl₃ at 45°C (upper) and 26°C (lower).

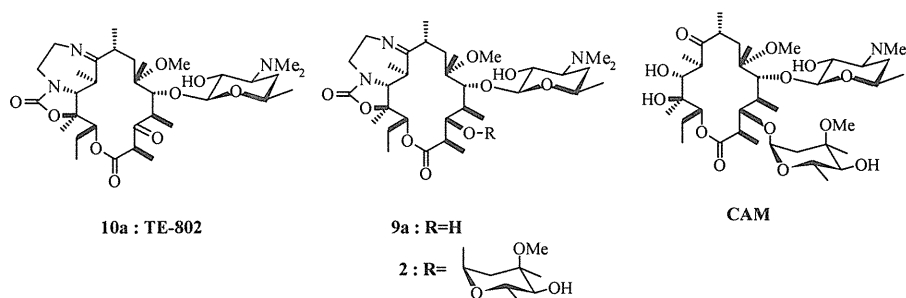


第5章 三環性マクロライド系抗生物質の *in vitro* 抗菌活性

第1節 三環性マクロライド系抗生物質の3位における構造活性相関

オリジナルのアグリコン骨格に、環状カーバメート構造とテトラヒドロジアゼピン環を導入した三環性マクロライド誘導体の3位の構造バリエーションと、エリスロマイシン感受性菌及びエリスロマイシン耐性菌に対する抗菌活性との相関を、最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法により検討した (Table 10)。

Table 10. Antibacterial activities of tricyclic macrolides



| Strain | MIC($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|---|-------------------------|------|------|------|
| | TE-802 (10a) | 2 | 9a | CAM |
| Erythromycin-susceptible | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209P-JC | 0.10 | 0.05 | 100 | 0.10 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433 | 0.10 | 0.20 | 25 | 0.78 |
| <i>E. faecium</i> ATCC19434 | 0.10 | 0.78 | 3.13 | 3.13 |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC25238 | 0.39 | 0.20 | 25 | 0.20 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> IID 553 | 0.05 | 0.05 | 3.13 | 0.10 |
| <i>Escherichia coli</i> TM36 | 3.13 | 3.13 | 50 | 6.25 |
| Erythromycin-resistant | | | | |
| <i>S. aureus</i> B1 | 0.39 | >100 | >100 | >100 |
| <i>S. aureus</i> TS166 | 0.39 | >100 | >100 | >100 |
| <i>S. pneumoniae</i> 210 | 0.10 | 0.39 | 6.25 | 0.78 |
| <i>S. pneumoniae</i> 221 | >100 | >100 | >100 | >100 |

Inoculum size : 10^6 cfu/ml.

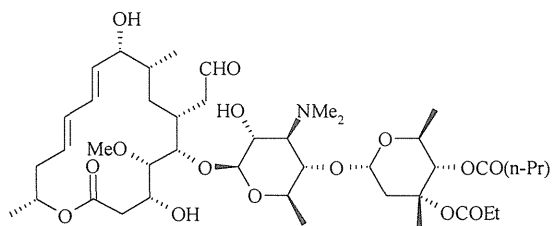
三環性アグリコンへと導いた **2** は親化合物である CAM に比較し、エリスロマイ

シン感受性菌に対して2倍から4倍強い活性を示し、三環性アグリコン構造への誘導化が抗菌力増強に有効であることが明らかとなった。しかしエリスロマイシン耐性菌に対してはCAMと同様に *S. pneumoniae* 210 以外 $>100 \mu\text{g/ml}$ のMIC値を示し、活性を示さなかった。三環性3位水酸基体 **9a** のエリスロマイシン感受性菌に対する抗菌力は、CAMの3位水酸基体（CAMのヒト代謝物：M-4）とほぼ同等の弱い活性であった⁴⁸⁾。極めて興味深いことに、水酸基を酸化しケトン体とした **10a** では活性が復活し、感受性菌のみならずその他の化合物が無効（MIC： $>100 \mu\text{g/ml}$ ）であったエリスロマイシン耐性 *Staphylococcus aureus*（黄色ブドウ球菌 B1 及び T166）及び *S. pneumoniae* 210 に対して、0.39 及び $0.10 \mu\text{g/ml}$ と臨床に供しうる強い抗菌力（MIC 値）を示した。また、グラム陰性菌の一種である *Escherichia coli* TM36（大腸菌）に対する活性は $3.13 \mu\text{g/ml}$ と CAM に比較し2倍の活性を示すものの、一般のマクロライド剤と同様やはり弱いものであった。三環性ケトライドの抗菌スペクトルに関しては、肺炎球菌の遺伝子タイプによる差異等を含め第2節から第5節において詳細に論ずることとする。

第2節 三環性ケトライド系抗生物質の各種標準菌株に対する *in vitro* 抗菌活性

三環性ケトライド誘導体 (**10a-d**) の各種標準菌及びマクロライド剤有効菌株に対する *in vitro* 抗菌活性を CAM, AZM 及び16員環マクロライド剤であるロキタマイシン⁴⁹⁾ (RKM, Figure 27) のそれらと比較した。結果を Table 11 及び 12 に示した⁵⁰⁾。

Figure 27. Rokitamycin の構造



Rokitamycin (RKM)

好気性グラム陽性菌 (*S. aureus*, *S. pneumoniae* 及び *S. pyogenes*) に対し三環性ケトライド誘導体は CAM とほぼ同等, AZM 及び RKM に比較し2倍から8倍強

い抗菌活性を示した。三環性ケトライド誘導体の EM 感受性菌に対する MIC は 0.012~0.20 $\mu\text{g/ml}$ であった。一方、三環性ケトライド誘導体は腸球菌に対し比較 3 薬剤に比べ強い抗菌活性を示し、それらの *E. faecalis* 及び *E. faecium* に対する MIC 値は 0.025~0.20 $\mu\text{g/ml}$ であり、CAM, AZM 及び RKM の 16 倍から 64 倍強い活性であった。マクロライド剤がターゲットとする呼吸器感染症の主要起因菌の一つである *H. influenzae* に対する MIC は 6.25~12.5 $\mu\text{g/ml}$ であり CAM 及び RKM とほぼ同等の活性を示したが、AZM に比較し 1/2 から 1/4 の活性であった。一般にマクロライド系抗生物質は大腸菌や緑膿菌に対して無効か弱い抗菌力しか示さないが、三環性ケトライド誘導体もこれらの菌に対しては他のマクロライド剤と同様の抗菌活性であった。化合物 **10a** (TE-802) の 嫌気性菌に対する抗菌力は CAM とほぼ同等 (MICs: 0.10~1.56 $\mu\text{g/ml}$) であったが、バクテロイデス属 (*B. flagilis*) に対しては CAM の 1/8 から 1/32 の抗菌力であった。

次に β -ラクタム剤等が無効なため、その治療にマクロライド剤が用いられる菌 (ヘリコバクターピロリ菌、マイコプラズマ肺炎菌、レジオネラ菌、クラミジア菌及びエイズ患者の感染が問題となっているマイコバクテリウム属) に対する抗菌力を CAM 及び AZM と比較した。ヘリコバクターピロリ菌に対し化合物 **10d** が CAM と同等から 2 倍 (MIC : 0.025~0.05 $\mu\text{g/ml}$)、**10b** 及び **10c** が CAM と同等の抗菌力 (MIC : 0.05~0.10 $\mu\text{g/ml}$) を示したのに対し、**10a** は CAM の 1/2 の活性 (MIC : 0.10 $\mu\text{g/ml}$) であったが、AZM (MIC : 0.20~0.39 $\mu\text{g/ml}$) には勝る結果であった。テトラヒドロジアゼピン環上の置換基が増えるに従い抗菌力が増す傾向を示した。三環性ケトライド誘導体のマイコプラズマ (*M. pneumoniae*) に対する抗菌力は、CAM とほぼ同等で AZM に劣る結果であった。しかし临床上は充分治療効果の期待できる MIC 値 (MIC : 0.003~0.025 $\mu\text{g/ml}$) であった。レジオネラ菌及びクラミジア菌に対し三環性ケトライド誘導体は、CAM 及び AZM に比較しやや劣る抗菌力を示した。

Table 11. Antibacterial activities of 10a-d, CAM , AZM and RKM against standard strains.

| Strains | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | |
|---|--------------------------|-------|-------|-------|------|------|------|
| | 10a | 10b | 10c | 10d | CAM | AZM | RKM |
| Gram-positive bacteria | | | | | | | |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 | 0.025 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.10 | 0.78 | 0.39 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209P-JC | 0.10 | 0.10 | 0.20 | 0.20 | 0.10 | 0.39 | 0.39 |
| <i>S. aureus</i> Smith4 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.78 | 0.78 |
| <i>S. epidermidis</i> IID866 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.20 | 0.10 | 0.39 | 0.39 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> IID553 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.20 | 0.20 |
| <i>S. pneumoniae</i> J-4 | 0.025 | 0.012 | 0.025 | 0.025 | 0.05 | 0.10 | 0.10 |
| <i>S. pyogenes</i> IID689 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.10 | 0.20 |
| <i>S. pyogenes</i> ATCC8668 | 0.10 | 0.20 | 0.10 | 0.10 | 0.05 | 0.20 | 0.39 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.78 | 12.5 | 0.78 |
| <i>E. faecalis</i> CSJ1212 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.78 | 6.25 | 0.39 |
| <i>E. faecium</i> ATCC19434 | 0.025 | 0.05 | 0.025 | 0.05 | 0.78 | 3.13 | 0.39 |
| Gram-negative bacteria | | | | | | | |
| <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC43095 | 6.25 | 6.25 | 3.13 | 6.25 | 6.25 | 1.56 | 12.5 |
| <i>H. influenzae</i> ATCC33533 | 6.25 | 12.5 | 6.25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 6.25 |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> ATCC25238 | 0.20 | 0.39 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.10 | 0.39 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO3317 | 6.25 | 12.5 | 6.25 | 12.5 | 50 | 3.13 | >100 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC10490 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2 | 100 | >100 | 50 | 100 | 100 | 12.5 | >100 |
| Anaerobic bacteria | | | | | | | |
| <i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> 10-2 | 0.39 | 0.39 | 0.78 | 0.78 | 0.39 | 0.78 | -- |
| <i>P. prevotii</i> ATCC9321 | 0.10 | -- | -- | -- | 0.10 | 0.78 | -- |
| <i>P. magnus</i> ATCC29328 | 1.56 | -- | -- | -- | 1.56 | 6.25 | -- |
| <i>Bacteroides fragilis</i> FA-32 | 12.5 | 6.25 | 6.25 | 6.25 | 0.78 | 6.25 | -- |
| <i>B. fragilis</i> NCTC9343 | 25 | 6.25 | 6.25 | 6.25 | 0.78 | 6.25 | -- |

Inoculum size: 10^6 CFU/ml.

Table 12. Antibacterial activities of **10a-d**, CAM, AZM and RKM against other pathogens.

| Strains | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | |
|---|--------------------------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| | 10a | 10b | 10c | 10d | CAM | AZM |
| <i>Helicobacter pylori</i> ATCC43504 | 0.10 | 0.05 | 0.05 | 0.025 | 0.05 | 0.20 |
| <i>H. pylori</i> ATCC43579 | 0.10 | 0.05 | 0.05 | 0.025 | 0.05 | 0.20 |
| <i>H. pylori</i> ATCC43629 | 0.10 | 0.10 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.39 |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i> 002 | 0.006 | 0.012 | 0.006 | 0.012 | 0.012 | ≤ 0.0002 |
| <i>M. pneumoniae</i> 003 | 0.006 | 0.012 | 0.006 | 0.012 | 0.012 | ≤ 0.0002 |
| <i>M. pneumoniae</i> 004 | 0.006 | 0.012 | 0.003 | 0.006 | 0.006 | ≤ 0.0002 |
| <i>M. pneumoniae</i> 005 | 0.003 | 0.006 | 0.003 | 0.006 | 0.006 | ≤ 0.0002 |
| <i>M. pneumoniae</i> FH | 0.012 | 0.025 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | ≤ 0.0002 |
| <i>Legionella pneumophila</i> ATCC33152 | 0.78 | 0.20 | 0.78 | 0.78 | 0.10 | 0.20 |
| <i>L. pneumophila</i> ATCC33153 | 0.78 | 0.20 | 0.39 | 0.78 | 0.10 | 0.10 |
| <i>L. pneumophila</i> ATCC33154 | 0.78 | 0.20 | 0.39 | 0.78 | 0.10 | 0.10 |
| <i>Mycobacterium avium</i> N339 | 12.5 | 12.5 | 12.5 | 6.25 | 1.56 | 12.5 |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> F/UW-6/CX | 0.125 | -- | -- | 0.063 | 0.004 | 0.016 |
| <i>C. trachomatis</i> D/UW-3/CX | 0.125 | -- | -- | 0.125 | 0.008 | 0.016 |

Inoculum size: 10^6 CFU/ml.

第3節 三環性ケトライド系抗生物質の臨床分離菌株に対する *in vitro* 抗菌活性

三環性ケトライド誘導体の臨床分離菌株（147株）に対する *in vitro* 抗菌活性を CAM, AZM 及び RKM と比較した。三環性ケトライド誘導体が臨床で有効性を示す可能性は、これら臨床分離菌株に対する抗菌力により推定できると考える。活性を測定した臨床分離菌の内訳は *S. aureus* (25株：EM感受性菌, 17株：誘導型耐性菌), *S. pneumoniae* (10株), *S. pyogenes* (23株), *E. faecalis* (9株：EM感受性菌, 7株：EM中等度耐性菌), *H. influenzae* (20株), *M. catarrhalis* (26株)及び *N. gonorrhoeae* (10株)である。Table 13に示したように、三環性ケトライド誘導体はEM感受性菌に対しCAMと同等から若干強い活性を示し、RKMに比較し2倍から8倍強い活性を示した。また三環性ケトライド誘導体はグラム陽性菌に対し、AZMの2倍から128倍強い抗菌力を示す一方、グラム陰性菌に対しては1/2から1/32の活性であった。

In vitro 抗菌力において三環性ケトライド誘導体の最も注目すべき点は、CAMやAZMが全く無効である（何れの化合物のMIC値も $>100 \mu\text{g/ml}$ ）誘導型耐性 *S. aureus* に対して優れた抗菌力を有することである。すなわち三環性ケトライド誘導体の誘導型耐性 *S. aureus* に対するMIC₅₀及びMIC₉₀の値は、それぞれ0.20及び0.39 $\mu\text{g/ml}$ と非常に強い活性を示した。更に、これら誘導体はEM中等度耐性 *E. faecalis* に対してもCAM, AZM及びRKMの4倍から128倍強い活性を示した。

Table 13. Antibacterial activities of **10a-d**, CAM, AZM and RKM against clinical isolates.

| Strains (No. of strain) | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------------|-------|-------|------|------|-------|------|
| | 10a | 10b | 10c | 10d | CAM | AZM | RKM |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (25)* | | | | | | | |
| MIC50 | 0.39 | 0.39 | 0.78 | 0.78 | 0.39 | 1.56 | 1.56 |
| MIC90 | 0.78 | 0.39 | 0.78 | 0.78 | 0.39 | 1.56 | 3.13 |
| <i>S. aureus</i> (17)** | | | | | | | |
| MIC50 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | >100 | >100 | 0.78 |
| MIC90 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | >100 | >100 | 1.56 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> (10)* | | | | | | | |
| MIC50 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.05 | 0.05 | 0.20 | 0.20 |
| MIC90 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.20 | 0.20 |
| <i>S. pyogenes</i> (23) | | | | | | | |
| MIC50 | 0.025 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.10 | 0.20 |
| MIC90 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.20 | 0.39 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (9)* | | | | | | | |
| MIC50 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.39 | 3.13 | 1.56 |
| MIC90 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.39 | 3.13 | 1.56 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (7)*** | | | | | | | |
| MIC50 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 1.56 | 12.5 | 1.56 |
| MIC90 | 0.20 | 0.20 | 0.39 | 0.20 | 3.13 | 25 | 1.56 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> (20) | | | | | | | |
| MIC50 | 6.25 | 6.25 | 3.13 | 6.25 | 6.25 | 1.56 | 6.25 |
| MIC90 | 6.25 | 6.25 | 6.25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 12.5 |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> (26) | | | | | | | |
| MIC50 | 0.20 | 0.39 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.39 |
| MIC90 | 0.39 | 0.39 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.10 | 0.39 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (10) | | | | | | | |
| MIC50 | 0.39 | 0.20 | -- | 0.39 | 0.20 | 0.013 | 0.78 |
| MIC90 | 0.39 | 0.39 | -- | 0.78 | 0.78 | 0.025 | 1.56 |

Inoculum size: 10^6 CFU/ml.

* Erythromycin-susceptible strains.

** Inducible resistant strains.

*** EMF-intermediate resistant strains.

第4節 培地 pH 及び摂取菌量の抗菌活性に対する影響

H. influenzae ATCC 43095 を試験菌に用い、摂取菌数と培地の pH の変化による抗菌活性への影響を検討した。結果を Table 14 に示した。AZM は培地の pH 値の低下に伴い (8→6) その抗菌活性が 1/32 に減弱し pH の影響が顕著であったが、同様の条件下、三環性ケトライド誘導体の活性は 1/4 乃至 1/16 に減弱するに留まった。一方、三環性ケトライド誘導体は CAM や AZM と同様、摂取菌数 ($10^4 \sim 10^6$ CFU/ml) を変化させても抗菌力への影響はほとんど見られなかった。

Table 14. Effects of inoculum size and medium pH on antibacterial activities of 10a-d, CAM and AZM against *H. influenzae* ATCC43095.

| Inoculum size (CFU/ml) | Medium pH | MIC/MBC ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | |
|---------------------------|-----------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|---------|
| | | 10a | 10b | 10c | 10d | CAM | AZM |
| 10^4 | 7.0 | 8/8 | 16/16 | 8/8 | 16/16 | 8/16 | 2/4 |
| | 6.0 | 32/32 | 32/32 | 32/32 | 64/64 | 16/32 | 16/16 |
| 10^5 | 7.0 | 16/16 | 16/16 | 8/16 | 16/16 | 8/8 | 2/2 |
| | 8.0 | 4/4 | 4/4 | 2/2 | 4/4 | 4/4 | 0.5/0.5 |
| 10^6 | 7.0 | 16/16 | 16/16 | 8/8 | 16/16 | 8/8 | 2/2 |

第5節 三環性ケトライド系抗生物質のマクロライド耐性菌に対する *in vitro* 抗菌活性

これまでの評価結果から、三環性ケトライド誘導体がエリスロマイシン感受性菌 (標準菌及び臨床分離株) に対し、既存のマクロライド剤に比較し、同等から強い抗菌力を有することが明らかとなった。本節では三環性ケトライド誘導体の最も優れた特徴であるマクロライド耐性菌に対する抗菌力を CAM, AZM 及び RKM と比較した。結果を Table 15 に示した。三環性ケトライド誘導体は CAM 及び AZM が不活性 (MICs : $>100 \mu\text{g/ml}$) なエリスロマイシン誘導型耐性 *S. aureus* に対し $0.20 \sim 1.56 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示した。また、16 員環マクロライド剤である RKM はこれらの菌に対し活性を示し、その MIC 値は $0.20 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ であり、三環性ケトライド誘導体に比較し、同等からやや弱い活性であった。残念なことに三環性ケトライド誘導体は構成型耐性 *S. aureus* に対しては $>100 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示

し、他のマクロライド剤と同様不活性であった。また、三環性ケトライド誘導体は排出型 (efflux type) エリスロマイシン耐性 *S. pneumoniae* に対し 0.05~0.10 μ g/ml の MIC 値を示し、CAM (MICs : 0.78~1.56 μ g/ml), AZM (MICs : 0.78~1.56 μ g/ml) 及び RKM (MICs : 0.20~0.39 μ g/ml) に比較し優れた抗菌力を示した。一方、三環性ケトライド誘導体はメチル化型 (methylated type) 又は排出型とメチル化型の両方の遺伝子を持ったエリスロマイシン耐性 *S. pneumoniae* に対しては CAM 及び AZM (MICs : >100 μ g/ml) に比較し同等から若干強い抗菌力 (MICs : 1.56~>100 μ g/ml) を示した。

Table 15. Antibacterial activities of 10a-d, CAM, AZM and RKM against macrolide-resistant strains.

| Strains | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | |
|--|--------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 10a | 10b | 10c | 10d | CAM | AZM | RKM |
| Inducible type | | | | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> B1 (<i>ermC</i>) | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | >100 | >100 | 1.56 |
| <i>S. aureus</i> C1 | 0.39 | 0.20 | 0.39 | 0.39 | >100 | >100 | 0.20 |
| <i>S. aureus</i> 166 | 1.56 | 0.39 | 1.56 | 1.56 | >100 | >100 | 3.13 |
| Constitutive type | | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> K-2 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| EM-resistant | | | | | | | |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> 210 (<i>mefA</i>)* | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.78 | 0.78 | 0.39 |
| <i>S. pneumoniae</i> 217 (<i>mefA</i>) | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.05 | 1.56 | 1.56 | 0.20 |
| <i>S. pneumoniae</i> 224 (<i>mefA</i>) | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.78 | 1.56 | 0.20 |
| <i>S. pneumoniae</i> 114 (<i>ermB</i>) | 25 | 1.56 | 1.56 | 6.25 | >100 | >100 | 3.13 |
| <i>S. pneumoniae</i> 207 (<i>ermB</i>)** | 50 | 50 | 100 | 50 | >100 | >100 | 3.13 |
| <i>S. pneumoniae</i> 225 (<i>ermB</i> + <i>mefA</i>)** | 6.25 | 1.56 | 3.13 | 3.13 | >100 | >100 | 3.13 |
| <i>S. pneumoniae</i> 229 (<i>ermB</i>) | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |

Inoculum size: 10^6 CFU/ml.

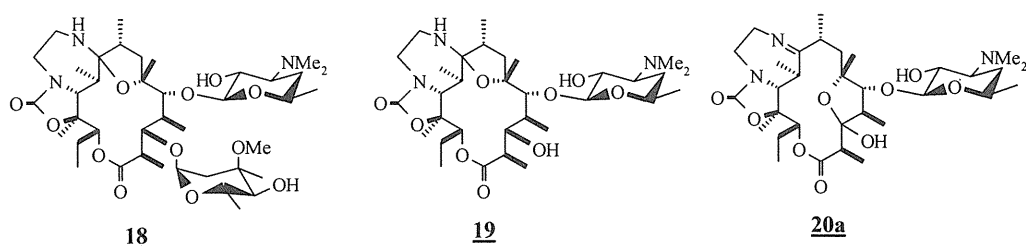
* Penicillin-resistant strain.

** Penicillin-intermediate resistant strain.

第6節 四環性マクロライド系抗生物質の *in vitro* 抗菌活性

第3章で、6位水酸化体から合成した四環性マクロライド剤 (**18**, **19** 及び **20a**)のエリスロマイシン感受性菌, 及び耐性菌に対する *in vitro* 抗菌活性を CAM と比較した. 結果を Table 16 に示した. 3位水酸化体 **19** 及び 6,3-ヘミアセタール体 **20a** は, エリスロマイシン感受性菌に対し CAM に劣る抗菌力であった. 一方, 3位クラジノース体 **18** はこれらの菌に対し CAM と同等の活性を示した.

Table 16. Antibacterial activities of tetracyclic macrolides (**18**, **19** and **20a**).



| Strains | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|---------------------------------------|--------------------------|------|------|------|
| | CAM | 18 | 19 | 20a |
| EM-susceptible | | | | |
| <i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341 | 0.025 | -- | 1.56 | 0.78 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 | 0.10 | -- | 12.5 | 3.13 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 209P-JC | 0.10 | 0.10 | 25 | 12.5 |
| <i>S. aureus</i> Smith4 | 0.20 | 0.10 | 25 | 12.5 |
| <i>S. epidermidis</i> IID866 | 0.10 | -- | 25 | 12.5 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> CSJ1212 | 0.78 | 0.78 | 3.13 | 1.56 |
| <i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2 | 100 | -- | >100 | >100 |
| <i>E. coli</i> TM36 | 6.25 | -- | 100 | >100 |
| <i>E. coli</i> K-12 | 6.25 | 6.25 | -- | -- |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> IFO03317 | 50 | 25 | >100 | >100 |
| EM-resistant | | | | |
| <i>S. aureus</i> SR138 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>S. aureus</i> J-109 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>S. aureus</i> B1 | >100 | >100 | >100 | 25 |
| <i>S. aureus</i> sp. EMR | >100 | >100 | >100 | >100 |

Inoculum size: 10^6 CFU/ml.

しかし、グラム陰性菌及び我々が当初の目的としていたエリスロマイシン耐性菌に対する抗菌力を増強させることはできなかった。しかしながら、酸性条件下（クロロホルム中 DC 1 の添加条件）で **20a** が 3 位ケトン体 **20b** へ異性化することから、酸性条件下で生息する菌に対する（ex. *Helicobacter pylori* 菌）抗菌剤開発のリードとなりうる可能性を示していると考える。

第 7 節 考察

化合物 **10a** (TE-802) に代表される三環性ケトライド誘導体は、エリスロマイシン感受性菌（標準菌及び臨床分離株）のみならず、エリスロマイシン耐性 *S. aureus*（誘導型耐性菌）及びエリスロマイシン耐性 *S. pneumoniae* に対しても強い抗菌活性を有することが示された。エリスロマイシン耐性 *S. pneumoniae* を遺伝子タイプで分類すると、*mefA* 遺伝子でコードされた薬剤排出型タイプと、*ermB* 遺伝子でコードされたメチル化型タイプに分類される。エリスロマイシンは細菌リボゾームの 50S サブユニットの 2058 番目のアデニンに結合し、タンパク合成を阻害することにより抗菌活性を発現する。メチル化型タイプの耐性菌は 2058 番目のアデニンのアミノ基をメチル化し、エリスロマイシンの結合を阻止することにより耐性を示すタイプである。三環性ケトライド誘導体は排出型に対しては強い活性を示したが、メチル化型タイプに対しては MIC 値が大きく変動していた。*S. pneumoniae* の場合、おそらく *erm* 遺伝子のコード数の違い等が抗菌力に影響を与えているのではないかと推測している。一方、*S. pneumoniae* の場合とは異なり、同じメチル化型タイプ (*ermC*) でありながらエリスロマイシン耐性 *S. aureus* に対し三環性ケトライド誘導体は強い抗菌力を示した (MIC : 0.20 μ g/ml)。この結果は三環性マクロライド誘導体の *S. pneumoniae*、及び *S. aureus* に対する作用メカニズムが異なる可能性を示唆している。実際に *S. aureus* B1（誘導型耐性菌）のプレート上に **10a** (TE-802) を存在させた場合、RKM のディスク周辺に“D”型阻止円の形成は観測されない。このことは *S. pneumoniae* を用いた同様の実験の結果⁵⁾とは明らかに異なり、これら三環性ケトライド誘導体が *S. aureus* B1 に対して耐性誘導能を有しないことを意味している。

第6章 三環性ケトライド系抗生物質の *in vivo* 抗菌活性と体内動態

第1節 マウス全身感染モデルに対する感染防御試験

S. aureus Smith4, *S. pyogenes* ATCC8668, *S. pneumoniae* IID553 及び *S. pneumoniae* 224 (efflux 耐性) の各菌を腹腔内投与することにより作成したマウス感染モデルを用い, 三環性ケトライド誘導体の *in vivo* 抗菌力を CAM 及び AZM と比較した. 感染 1 時間後, 各薬剤を経口投与し, 7 日後までの生存数を記録し, 半数のマウスが生存する薬剤濃度値 (ED₅₀) を比較した. 結果を Table 17 に示した.

Table 17. Protective effects of 10a-d, CAM and AZM against systemic infections in mice.

| Strain | Challenge dose (CFU/mouse) | Drug | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | ED ₅₀ (mg/mouse)* |
|---|-------------------------------|------|-----------------------------|---------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> Smith4 | 4.8×10^7 | 10a | 0.20 | 0.22 (0.11~0.52) |
| | | 10b | 0.20 | 0.14 (0.07~0.27) |
| | | 10c | 0.20 | 0.40 (0.24~0.72) |
| | | 10d | 0.20 | 0.38 (0.19~0.73) |
| | | CAM | 0.20 | 0.33 (0.18~0.59) |
| | | AZM | 0.78 | 0.47 (0.25~0.83) |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC8668 | 1.1×10^7 | 10a | 0.10 | 0.06 (0.04~0.11) |
| | | 10b | 0.20 | 0.04 (0.02~0.07) |
| | | 10c | 0.10 | 0.07 (0.04~0.13) |
| | | 10d | 0.10 | 0.04 (0.02~0.09) |
| | | CAM | 0.05 | 0.31 (0.10~1.02) |
| | | AZM | 0.20 | 0.34 (0.15~0.80) |
| <i>S. pneumoniae</i> IID553 | 1.1×10^3 | 10a | 0.05 | 0.047 (0.022~0.095) |
| | | 10b | 0.05 | 0.062 (0.036~0.113) |
| | | 10c | 0.05 | 0.066 (0.038~0.112) |
| | | 10d | 0.05 | 0.047 (0.022~0.095) |
| | | CAM | 0.05 | 0.58 (0.30~1.09) |
| | | AZM | 0.20 | 0.45 (0.28~0.75) |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> 224 (efflux-resistant) | 2.1×10^7 | 10a | 0.10 | 0.35 (0.21~0.65) |
| | | 10b | 0.10 | 0.19 (0.13~0.28) |
| | | 10c | 0.10 | 0.46 (0.30~0.73) |
| | | CAM | 0.78 | 2.50 (1.57~7.29) |
| | | AZM | 1.56 | >3.00 |

* 95% Confidence limits.

エリスロマイシン感受性菌 (*S. aureus* Smith4, *S. pyogenes* ATCC8668, *S. pneumoniae* IID553) に対する **10a** (TE-802) の ED₅₀ 値は 0.047~0.22 mg/mouse であり, CAM (ED₅₀ : 0.31~0.58 mg/mouse) 及び AZM (ED₅₀ : 0.34~0.47 mg/mouse) に比較し 1.5 倍から 12.3 倍強い感染防御効果を示した. 特に *S. pyogenes* ATCC8668 及び *S. pneumoniae* IID553 に対し極めて強い感染防御効果を示した. 化合物 **10b**, **10c** 及び **10d** も CAM に比較し同等から 12.3 倍, また AZM に比較し 1.2 倍から 9 倍強い抗菌力を示した. **10a** と同様にこれら 3 薬剤も *Streptococcus* 属 に対し, 特に強い *in vivo* 抗菌力を示した.

Efflux 型耐性 *S. pneumoniae* 224 を用いた感染モデルでは更に興味深い結果が得られた. CAM はこの耐性菌を用いた感染モデルでは ED₅₀ の値が 2.50 mg/mouse と弱い効果であり, AZM に至ってはその値が >3.00 mg/mouse となり治療効果を示さなかった. これら既存の第二世代マクロライド剤に比較し, 三環性ケトライド剤 **10a-c** の ED₅₀ 値はそれぞれ 0.35, 0.19 及び 0.46 mg/mouse であり, *in vitro* 抗菌力がそのまま *in vivo* 効果に反映され, 十分に臨床効果の期待できる抗菌力を示した. その効果は CAM の 5.4 倍から 13.2 倍強いものであった. これまで耐性菌に対し *in vitro* で効果を示すものの *in vivo* で満足いく効果を示すマクロライド誘導体は見出されておらず, ケトライド誘導体が最初である. またこれらの効果の強さは耐性菌によって引き起こされた感染症に対し, 十分治療効果の期待できる値であると考えられる.

第 2 節 マウス呼吸器感染モデルに対する治療効果

呼吸器感染症で最も重要な起因菌である肺炎球菌, 及びインフルエンザ菌 (*S. pneumoniae* J-4 及び *H. influenzae* J-48 ; 共に臨床分離株) を用いて呼吸器感染モデルを作成し, 各薬剤の治療効果を評価した. エアゾール法により菌を肺内に感染後 (24 時間後), 各薬剤を経口単回投与し, 感染 48 時間後に肺内生菌数をカウントしその効果を比較した. 測定限界は log<1.48 CFU/lung であり, *S. pneumoniae* J-4 におけるモデルでは明らかに肺炎症状が肉眼で観測されたが, *H. influenzae* J-48 を用いて作成した感染モデルでは顕著な肺炎症状は観測されなかった. 結果を Table 18 に示した. *S. pneumoniae* J-4 を用いたモデルにおいて **10a-d** は CAM 及び AZM に比較し, 明らかに低容量で肺内生菌数を減少させる効果を示した. 一方, *H. influenzae* J-48 を用いたモデルにおいて, **10a-d** は AZM にやや劣る結果

であるが、CAM との比較においてはほぼ同様の効果を示した。

呼吸器感染モデルは肺での局所感染モデルであり、臨床上の感染形態に極めて似たモデルであるといえる。三環性ケトライド剤が臨床分離株を用いた本モデルで、CAM 及び AZM と同等から *S. pneumoniae* に対しては上回る効果を示したことは、実際の臨床においても充分効果が期待できることを意味している。

Table 18. Activities of 10a-d, CAM and AZM against experimental respiratory infections caused by *S. pneumoniae* and *H. influenzae* in mice.

| Drug | <i>S. pneumoniae</i> J-4 | | <i>H. influenzae</i> J-48 | |
|-------------------------|--------------------------|--|---------------------------|--|
| | Dose (mg/mouse) | Viable cell counts in lung Log/lung (mean) | Dose (mg/mouse) | Viable cell counts in lung Log/lung (mean) |
| Control | | >6.75 (± 0.54)* | | 5.22 (± 0.28)* |
| CAM (0.05, 12.5) ** | 2.7 | <1.48 | 8 | <1.81 (± 0.65) |
| | 0.9 | 3.16 (± 0.54) | 4 | <1.81 (± 0.66) |
| | 0.3 | 4.03 (± 0.62) | 2 | 3.98 (± 0.90) |
| | 0.1 | 5.25 (± 1.94) | 1 | 3.77 (± 0.74) |
| AZM (0.10, 3.13) ** | 0.9 | <1.48 | 4 | <1.48 |
| | 0.3 | 3.08 (± 1.04) | 2 | <1.48 |
| | 0.1 | 6.57 (± 0.43) | 1 | 3.47 (± 0.37) |
| | 0.03 | 5.84 (± 1.55) | 0.5 | <3.88 (± 1.65) |
| 10a (0.025, 12.5) ** | 0.3 | <1.48 | 8 | <1.48 |
| | 0.1 | 3.74 (± 1.66) | 4 | <1.48 |
| | 0.03 | 5.40 (± 1.31) | 2 | <2.22 (± 1.49) |
| | 0.01 | >6.36 (± 1.02) | 1 | 4.52 (± 0.13) |
| 10b (0.012, 6.25) ** | 0.3 | <1.48 | 8 | <1.48 |
| | 0.1 | <1.48 | 4 | <1.48 |
| | 0.03 | 4.39 (± 0.45) | 2 | <3.41 (± 1.56) |
| | 0.01 | 5.55 (± 1.18) | 1 | 4.27 (± 0.97) |
| 10c (0.025, 6.25) ** | 0.3 | <1.48 | 8 | <1.48 |
| | 0.1 | <1.48 | 4 | <1.48 |
| | 0.03 | 4.02 (± 1.09) | 2 | 2.24 (± 1.32) |
| | 0.01 | 6.50 (± 1.11) | 1 | <2.93 (± 1.09) |
| 10d (0.025, 12.5) ** | 0.3 | <1.48 | 8 | <1.48 |
| | 0.1 | <1.48 | 4 | <2.10 (± 1.25) |
| | 0.03 | 3.65 (± 1.69) | 2 | <3.08 (± 1.46) |
| | 0.01 | 6.65 (± 0.32) | 1 | <3.78 (± 1.55) |

* Numbers in parentheses are standard deviations (n=3 or 4).

** MICs ($\mu\text{g/ml}$) for challenge strains (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*).

第3節 経口及び静脈内投与後の血漿中濃度

三環性ケトライド誘導体 **10a-d** をマウス及びサルに経口及び静脈内投与した際の血漿中濃度を CAM 及び AZM と比較した。各種薬動学的パラメーターを Table 19 に示した。

三環性ケトライド剤をマウスに経口投与した際の最高血漿中濃度 (C_{max}) 値は CAM 及び AZM とほぼ同様の結果であったが、血漿中濃度曲線下面積 (AUC) 値は CAM 及び AZM に対してそれぞれ 3.4 倍から 6.2 倍及び 1.2 倍から 2.3 倍の高い値を示した。化合物 **10b** 及び **10c** をサルに経口投与した際の C_{max} 及び AUC の値は CAM および AZM に比較し低い値であったが、**10a** の値は (C_{max}:0.68 µg/ml, AUC : 1.94 µg·hour/ml) CAM (C_{max} : 0.72 µg/ml, AUC : 2.47 µg·hour/ml) に比較し、C_{max} が同等、AUC がおよそ 3/4 程度であった。一方、AZM (C_{max} : 0.33 µg/ml, AUC : 0.57 µg·hour/ml) と比較した場合、C_{max} 及び AUC とも明らかに高い値であった。サルにおける生体内利用率 (BA) で比較すると、**10a** が 65.76% と高い値を示したのに対し、CAM が 42.44%、AZM が 38.78% であった。

サルに各薬剤 5 mg/kg を経口投与した際の血漿中濃度を Figure 28 に示した。化合物 **10b** 及び **10c** は AZM と同様低い血中濃度推移を示したが、**10a** は CAM とほぼ同様の濃度推移を示した。化合物 **10a** の血漿中濃度半減期が 4.23 時間と CAM (1.56 時間) の 2 倍以上の値であることと、上記血中濃度推移の結果から、本薬剤が 1 日 1 回投与で効果を発揮する可能性が示された。

Table 19. Pharmacokinetics of **10a-d**, CAM and AZM in mice and monkeys.

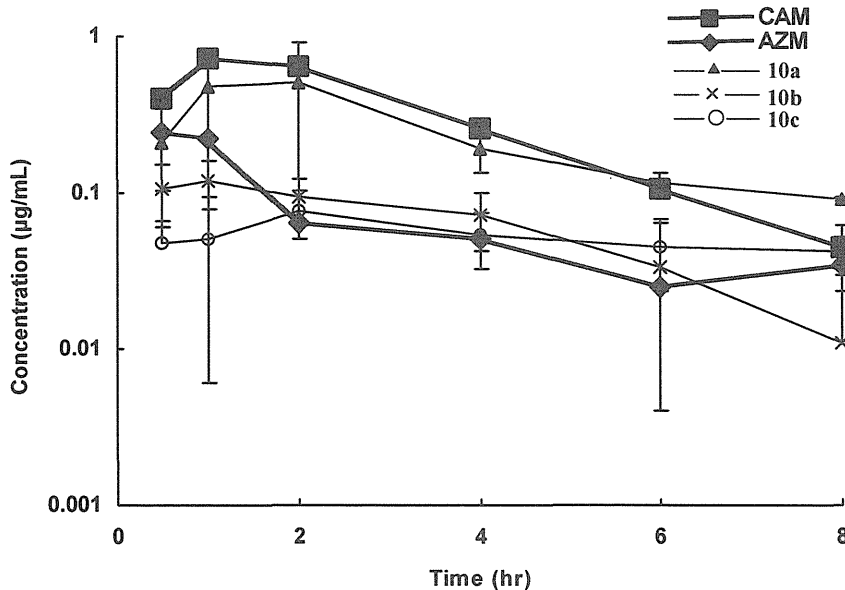
| Compound | Animal (Number) | Route* | Plasma level** | | | | | |
|------------|--------------------|--------|------------------|---------------------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|--------------|
| | | | Cmax (µg/ml) | AUC _{8hr} (µg·hour/ml) | T1/2(hour) | CL (ml/hour/kg) | Vdss (ml/kg) | BA (%) |
| 10a | Mouse (3) | po | 0.26 | 3.14*** | -- | -- | -- | -- |
| 10b | Mouse (3) | po | 0.38 | 4.16*** | -- | -- | -- | -- |
| 10c | Mouse (3) | po | 0.16 | 2.25*** | -- | -- | -- | -- |
| 10d | Mouse (3) | po | 0.27 | 3.38*** | -- | -- | -- | -- |
| CAM | Mouse (3) | po | 0.32 | 0.67*** | -- | -- | -- | -- |
| AZM | Mouse (3) | po | 0.27 | 1.84*** | -- | -- | -- | -- |
| 10a | Monkey (3) | po | 0.68±0.38 | 1.94±0.72 | 4.23±1.33 | -- | -- | 65.76 |
| 10b | Monkey (3) | po | 0.13±0.04 | 0.48±0.23 | 3.27±0.80 | -- | -- | 20.60 |
| 10c | Monkey (3) | po | 0.10±0.01 | 0.42±0.13 | 12.38±3.91 | -- | -- | 20.29 |
| CAM | Monkey (2) | po | 0.72 | 2.47 | 1.56 | -- | -- | 42.44 |
| AZM | Monkey (2) | po | 0.33 | 0.57 | 8.93 | -- | -- | 38.78 |
| 10a | Monkey (3) | iv | -- | 2.95±0.69 | 4.83±0.74 | 1760.86±440.67 | 4022.13±832.47 | -- |
| 10b | Monkey (3) | iv | -- | 2.33±0.13 | 5.65±1.39 | 2154.33±122.24 | 5980.36±729.64 | -- |
| 10c | Monkey (3) | iv | -- | 2.07±0.22 | 8.82±3.12 | 2434.02±272.98 | 6754.57±1020.69 | -- |
| CAM | Monkey (2) | iv | -- | 5.82 | 2.75 | 883.31 | 1907.25 | -- |
| AZM | Monkey (2) | iv | -- | 1.47 | 6.82 | 3416.37 | 6719.54 | -- |

* Drugs (5mg/kg) were administered orally (po) or intravenously (iv).

** Plasma levels were determined by bioassay method using *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

*** AUC value of each drug from 0 to 24 hours (AUC_{24hr}).

Figure 28. Drug concentrations in plasma after 5mg/kg oral dosing in monkeys.



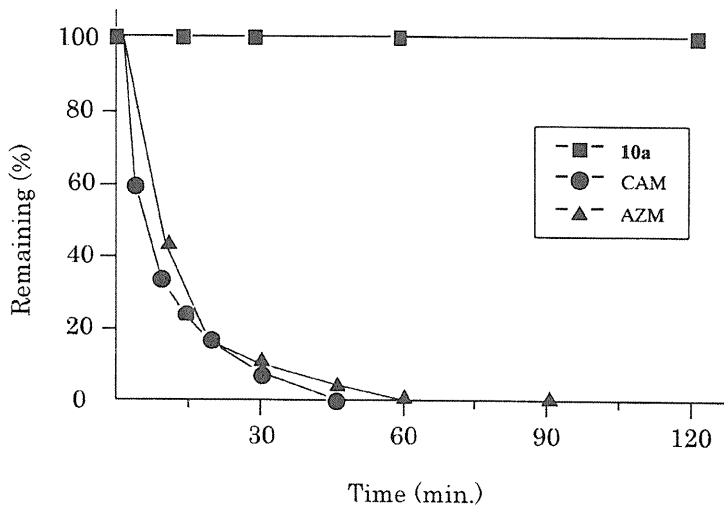
第4節 考察

三環性ケトライド誘導体は、EM 感受性 *S. aureus*, *S. pyogenes* 及び *S. pneumoniae* の各菌を用いたマウス全身感染防御試験において、CAM 及び AZM を上回る優れた感染防御効果を示した。その効果は感受性菌に対してのみならず、EM 耐性 *S. pneumoniae* (efflux 型耐性菌) に対しても CAM 及び AZM の 5 倍以上の *in vivo* 効果を示した。また、臨床での感染形態により類似していると考えられる呼吸器感染モデルの試験において、*S. pneumoniae* に対し三環性ケトライド誘導体は CAM 及び AZM を上回る効果を示した。

三環性ケトライド誘導体が優れた *in vivo* 効果を示した理由としては、強い *in vitro* 抗菌力、優れた体内動態（高い AUC 値）及び極めて高い酸安定性が考えられる。第二世代マクロライド剤が EM に比較し高い酸安定性を持つことはすでに述べたが、まだ改善の余地が残されていた。すなわち 3 位クラジノシル基が酸により加水分解を受け、3 位水酸化体へと変化することにより抗菌活性が大きく減弱する。三環性ケトライド誘導体は 3 位をカルボニル基へ変換することにより酸安定性の問題を克服した。Figure 29 に示すように、CAM 及び AZM が pH=1.2 の条件下、1

時間以内に完全に分解してしまうのに対し、**10a** は 2 時間後でも全く分解が起こっていない。従って、経口投与時に胃酸による分解はほとんど皆無と予想される。

Figure 29. Acid stability of **10a**, CAM and AZM (pH=1.2, 37°C).



以上のように、強い *in vitro* 抗菌力、優れた体内動態、物理化学的安定性等の要素が揃う事によって三環性ケトライド化合物が優れた *in vivo* 効果を表していると考えられる。

結 論

序論でも述べたように、本研究の目的は第二世代マクロライド剤が直面しているエリスロマイシン耐性菌に対する抗菌力を持つ、新たなエリスロマイシン系抗生剤を創薬することであった。各種誘導体を合成・評価する中で偶然見出した三環性のアグリコン骨格を有する化合物を足がかりに、3位をカルボニル基へと変換し、エリスロマイシン感受性菌に対する活性を保持しつつ、当初の目的であったエリスロマイシン耐性菌に対して優れた抗菌力 (*in vitro* 及び *in vivo*) を持った、TE-802 に代表される三環性ケトライド誘導体を創薬し、本研究の目的を達成したと確信する。

11,12-環状カーバメート構造を持つ誘導体合成研究の中で、カーバメート上の置換基が偶然9位へ環化した構造を持つ化合物を発見し、NMR測定 (NOESY 及び各種2次元測定) 結果を中心に各種機器データ (MS, IR, 元素分析等) から三環性アグリコンの構造決定を行った。更に生物学的評価を進めるために必要なサンプル供給を目的に、9位への環化条件の検討を中心にその効率的合成法を開発した。また11,12-環状カーバメート化の際の10位の立体化学に関して反応速度論的考察を行った (第1章)。

EM耐性菌活性の発現を目的に、新たに見出した三環性マクロライド系化合物の誘導化検討を行った。その結果、これまで活性発現に必須であると考えられていた3位のクラジノース基を除去し、生成する水酸基を酸化しケトン誘導体へと導いた化合物の合成を行った。11,12-環状カーバメート化の際に用いるジアミンの種類を変えることにより、新たに生成するテトラヒドロジアゼピン環上の置換基を変え、構造活性相関を検討した。3位の酸化条件を種々検討した結果、本化合物群の酸化に際しては金属 (クロム, マンガン) 系の酸化剤は適さず、DMSOを用いた酸化条件が収率良く目的物を与えることを明らかにした。その結果を含め、三環性ケトライド化合物の新規合成法を確立した (第2章)。

6位水酸基を出発原料に第2章と同様に三環性マクロライド誘導体を合成した結果、6位水酸基が9位イミノ基と環形成し、6,9-アミナル構造を持った四環性マクロライド誘導体を合成することに成功した。更に四環性マクロライド誘導体の3

位ケトン体は通常 6,3-ヘミアセタール構造をとっており，酸を添加した際に 3 位のケトン構造が再生され，6,9-アминаール構造をとることを明らかにした（第 3 章）。

三環性マクロライド誘導体及びケトライド誘導体の X 線結晶解析を行い，既知の情報（CAM 等）とあわせ比較検討することにより，三環性アグリコン及び 3 位ケトン構造の結晶状態でのコンホメーションの解析を行った．その結果，1) 3 位の構造，及び 2) テトラヒドロジアゼピン環の有無，の 2 つのファクターがアグリコンのコンホメーション決定に寄与していることを明らかにした．また 10a (TE-802) は結晶状態において他の化合物と異なり 3 位カルボニル基がラクトン環から “exo” の方向に倒れた構造をとっていることを明らかにした．また，各種 NMR 測定の結果を用い三環性ケトライド誘導体の溶液中でのコンホメーション解析を行った．その結果，三環性マクロライド化合物は 3 位が中性糖であってもケトン構造であっても，4 位プロトンがラクトン環後方へ引き込まれた，“semi-fold-out” と呼ぶべきコンホメーションを取ることを明らかにした（第 4 章）。

三環性ケトライド誘導体はエリスロマイシン感受性菌（標準菌及び臨床分離株）のみならず，エリスロマイシン耐性 *S. aureus*（誘導型耐性菌）及びエリスロマイシン耐性 *S. pneumoniae* に対しても，強い *in vitro* 抗菌活性を有することを明らかにした．エリスロマイシン耐性 *S. pneumoniae* を遺伝子タイプで分類すると，*mefA* 遺伝子でコードされた薬剤排出型タイプと *ermB* 遺伝子でコードされたメチル化型タイプに分類され，三環性ケトライド誘導体は排出型に対しては強い活性を示したが，メチル化型タイプに対しては菌によって MIC 値が大きく変動していた．一方，*S. pneumoniae* の場合とは異なり，同じメチル化型タイプ（*ermC*）でありながら誘導型耐性 *S. aureus* に対し三環性マクロライド誘導体は強い抗菌力を示した（MIC : 0.20 μ g/ml）．これらの実験事実に加え，*S. aureus* B1 のプレート上に 10a を存在させた場合，RKM のディスク周辺に “D” 型阻止円の形成が観測されないことから三環性ケトライド誘導体は EM 耐性 *S. pneumoniae* 及び *S. aureus* に対する作用機序が異なる可能性を示した（第 5 章）。

三環性ケトライド誘導体は，EM 感受性 *S. aureus*，*S. pyogenes* 及び *S. pneumoniae* の各菌を用いたマウス全身感染防御試験において，CAM 及び AZM を上回る優れた感染防御効果を示した．その効果は感受性菌に対してのみならず EM

耐性 *S. pneumoniae* (efflux 型耐性菌) に対しても, CAM 及び AZM の 5 倍以上の優れた *in vivo* 効果を示した. また, 臨床での感染形態により類似していると考えられる呼吸器感染モデルの試験においても, *S. pneumoniae* に対し三環性ケトライド誘導体は CAM 及び AZM を上回る効果を示した.

三環性ケトライド誘導体が優れた *in vivo* 効果を示した理由として, 強い *in vitro* 抗菌力, 優れた体内動態 (高い AUC 値) 及び極めて高い酸安定性の 3 つのファクターを示した. またサルでの体内動態結果から **10a** は高い血漿中濃度と CAM の 2 倍以上の血漿中半減期を示し, 1 日 1 回投与の薬剤としての可能性を示した.

以上述べたように, 著者はこれまでエリスロマイシン類の活性発現に必須であると言われてきた 3 位クラジノシル基 (中性糖) を除去し, 生成した 3 位水酸基を酸化しケトン体 (3-ケト体) へと導いた化合物 (ケトライド) において, クラジノシル基を除去することにより一旦消失した抗菌力が復活するのみならず, 各種 EM 耐性菌に対する活性も併せ持つことを見出した. 更に構造の最適化を進め, 第三世代マクロライド剤としての要件を満たす新規なアグリコン構造 (三環性及び 3 位ケトン構造) を有する三環性 3-ケトエリスロマイシン類の創薬に成功した. 三環性 3-ケトエリスロマイシン類の発見は次世代マクロライド系抗生物質の創薬研究において, 新たな道を切り開く端緒となった.

謝 辞

本研究に際し、御指導と御高配を賜りました城西大学薬学部教授 菊川靖雄先生に深く感謝の意を表します。

また、本研究の機会を与えて頂きました大正製薬株式会社 副社長 大平明氏、同医薬研究所 所長 森本繁夫博士，ならびに創薬化学研究室 室長 中里篤郎博士，同 GM 小野寺章氏，上原生命記念財団 長手尊俊博士に厚く御礼申し上げます。

また、入社以来直接御指導を頂き、数多くの有益な御助言を頂きました大正製薬株式会社 医薬研究所 創薬化学研究室 GM 安達孝博士，ならびに同 GM 朝賀俊文氏，医薬事業企画部 横尾千尋博士に深謝いたします。

本研究で共同研究者として、多大な御助言や御協力を頂きました大正製薬株式会社 医薬開発部 GM 明石敏氏，開発薬理研究室 河内弘行氏，鈴木啓子氏，大谷内里香氏，同リード探索研究室 松本慶太氏，同製剤研究室 生田弘史氏，医薬 QA 推進室 GM 小野武夫氏，大正総研 RSS 事業部 三沢洋子氏，ならびに宮地純子氏に心より感謝致します。また，X線結晶解析並びに各種 NMR データ測定に御協力頂きました同リード探索研究室 岡田敦司博士，ならびに薬物動態データの解析に御助言頂きました医薬動態安全性研究所 薬物動態研究室 亀谷俊一博士，間野陽子氏に感謝いたします。

最後に、精神的に支えて頂きました家族と妻 規子に感謝いたします。

実験の部

融点は全て未補正である。赤外吸収スペクトル (IR) は Perkin-Elmer Paragon 1000 PC FT-IR 赤外分光光度計, 質量スペクトル (MS) は Micromass 製 Platform-LC 質量分析計を用い, Electro Spray Ionization (ESI-MS) 法により測定した。高分解能質量スペクトル (HRMS) は日本分光 JMS-SX102 質量分析計を用いて測定した。元素分析は Perkin-Elmer 2400 CHN 分析計を用いて測定した。核磁気共鳴スペクトル (NMR) は Jeol alpha-500, Jeol lambda-500 又は VXR-300 核磁気共鳴装置を用い, 化学シフトは tetramethylsilane (TMS) より δ 値 (ppm) で示し, J 値はヘルツ (Hz) で示した (略記: s=singlet, d=doublet, t=triplet, q=quartet, m=multiplet, br=broad)。各スペクトルの帰属は, 各種二次元核磁気共鳴法 (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C COSY 及び HMBC 等) により決定した。薄層クロマトグラフィー (TLC) は Merck 社製シリカゲル 60 プレートを用いた。発色は 2% 硫酸セリウム含有・2N 硫酸を噴霧後, 110°C に加熱して行った。

2,4'-Di-*O*-acetyl-6-*O*-methylerythromycin A (3) の合成

6-*O*-メチルエリスロマイシン A (500 g, 0.668 mmol) を CH_2Cl_2 (1000 ml) に溶解し, 4-ジメチルアミノピリジン (32.7 g, 0.267 mol, 0.4 eq) 及び無水酢酸 (221 ml, 2.34 mol, 3.5 eq) を加え, 室温で2日間攪拌を続けた。反応液に 0.2 M NaOH を加え液性を塩基性とした後, そのまま抽出した。有機層を水, 続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO_4 を用いて乾燥した。減圧下溶媒を留去後, 得られた粗生成物を EtOAc から結晶化し, 化合物 3 (485 g, 収率: 87%) を無色プリズム晶として得た。mp $239\text{--}242^\circ\text{C}$: IR (KBr) cm^{-1} 3487, 1756, 1689; ESI-MS m/z 854.3 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺; HRFAB-MS m/z 832.5058 ($\text{M}+\text{H}^+$, calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{73}\text{NO}_{15}$: m/z 832.5058); ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 2.05 (3H, s, 2'-OCOCH₃), 2.10 (3H, s, 4'-OCOCH₃), 2.28 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 3.01 (3H, s, 6-OCH₃), 3.20 (1H, s, 12-OH), 3.35 (3H, s, 3''-OCH₃), 3.98 (1H, s, 11-OH), 4.67 (1H, d, $J=9.5\text{Hz}$, 4''-H), 4.76 (1H, dd, $J=7.5\text{Hz}$ & 10.5Hz, 2'-H), 5.07 (1H, dd, $J=1.5\text{Hz}$ & 11.0Hz, 13-H); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ 20.9 (4''-OCOCH₃), 21.1 (2'-OCOCH₃), 40.7 (3'-N(CH₃)₂), 49.3 (3''-OCH₃), 50.5 (6-OCH₃), 72.0 (C-2'), 78.6 (C-4''), 95.8 (C-1''), 99.9 (C-1'), 170.0 (2'-OCOCH₃), 170.4 (4''-OCOCH₃), 175.5 (C-1), 221.1 (C-9)。

10,11-Anhydro-2',4''-di-*O*-acetyl-12-*O*-imidazolylcarbonyl-6-*O*-methylerythro-mycin A (4)の合成

化合物 3 (150 g, 0.180 mol) を DMF-THF (2:3, 600ml) の混合溶媒に溶解し, *N,N*-カルボニルジイミダゾール(73.1 g, 0.451 mol, 2.5 eq)を加え, 氷冷下, 60%NaH(9.37 g, 0.234 mol, 1.3 eq)を添加した. 氷冷下 3.5 時間攪拌後, 反応液に水 (1000 ml) を加え EtOAc で抽出した. 有機層を水, 続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥した. 減圧下溶媒を留去後, 得られた組成生物を 2-プロパノールから結晶化し, 化合物 4 (102 g, 収率: 62%)を無色プリズム晶として得た. mp 144-146°C : IR (KBr) cm⁻¹ 2979, 1760, 1740, 1674 ; ESI-MS *m/z* 930.6(M+Na)⁺ ; ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 2.03 (3H, s, 2'-OCOCH₃), 2.12 (3H, s, 4''-OCOCH₃), 2.27 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 3.14 (3H, s, 6-OCH₃), 3.34 (3H, s, 3''-OCH₃), 6.66 (1H, s, 11-H), 7.07 (1H, m, imidazole-H), 7.36 (1H, m, imidazole-H), 8.08 (1H, m, imidazole-H) ; ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 40.7(3'-N(CH₃)₂), 49.5 (3''-OCH₃), 50.8 (6-OCH₃), 117.0, 130.9, 137.0 (imidazole), 137.8 (C-11), 169.9 (2'-OCOCH₃), 170.5 (4''-OCOCH₃), 174.5 (C-1), 204.7 (C-9). *Anal Calcd* for C₄₆H₇₃N₃O₁₅ : C 60.84, H 8.10, N 4.63. *Found* : C 60.51 H 8.28 N 4.46.

4''-*O*-Acetyl-11-amino-11-*N*-aminoethyl-11-deoxy-6-*O*-methylerythromycin A 11,12- cyclic carbamate (5a)の合成

化合物 4 (1.90 g, 2.09 mmol)を CH₃CN (6 ml)に溶解し, エチレンジアミン(1.40 ml, 20.9 mmol, 10.0 eq)を加え, 室温で 20 時間攪拌した. 反応後, 減圧下濃縮し, 得られた残渣を EtOAc に溶解し水, 続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥した. 減圧下溶媒を留去し 2'-*O*-アセチル 5a (1.80 g)を無色泡状物質として得た. 得られた 2'-*O*-アセチル 5a (1.80 g)を MeOH (20 ml)に溶解し室温で 20 時間攪拌後, 減圧下濃縮し 5a (1.64g, 収率: 91%)を無色泡状物質として得た. IR (KBr) cm⁻¹ 3470, 2984, 1736 ; ESI-MS *m/z* 880.4 (M+Na)⁺ ; HRFAB-MS *m/z* 858.5326 (M+H⁺, *calcd* for C₄₃H₇₅N₃O₁₄: *m/z* 858.5327); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 2.11 (3H, s, 4''-OCOCH₃), 2.30 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 3.05 (3H, s, 6-OCH₃), 3.32 (3H, s, 3''-OCH₃), 3.66 (1H, s, 11-H), 4.56 (1H, d, *J*= 7.5 Hz, 1'-H), 4.68 (1H, d, *J*=10.0 Hz, 4''-H), 4.97 (1H, d, *J*= 4.5Hz, 1''-H), 5.10 (1H, dd, *J*=2.0 & 11.0 Hz, 13-H) ; ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 39.4 (11-NCH₂-), 40.2(3'-N(CH₃)₂), 46.9 (9-NCH₂-),

49.5 (3''-OCH₃), 50.6 (6-OCH₃), 60.2 (C-11), 78.6 (C-4''), 96.1 (C-1''), 102.2 (C-1'), 158.0 (11-NCOO⁻), 170.4 (4''-OC₂H₅), 176.4 (C-1), 216.1 (C-9).

4''-O-Acetyl-11-amino-9-deoxo-11-deoxy-9,11-N-nitriloethano-6-O-methyl-erythromycin A 11,12-cyclic carbamate (6a)の合成

化合物 **5a** (5.00 g, 5.91 mmol) を EtOH (60 ml) に溶解し、酢酸(0.630 ml, 11.0 mmol, 1.9 eq) を添加後 60°C で 4 時間、さらに室温で一晩攪拌を続けた。反応液を濃縮後、2M NaOH および CHCl₃ を加えた。分液後、有機層を水、続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた組成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液: CHCl₃・MeOH・NH₄OH (30:1:0.1))により精製し、**6a** (3.20g, 収率: 65%) を得た。ジイソプロピルエーテルから結晶化し、融点および各種スペクトル測定用サンプルとした。mp 249-251°C (無色針状晶) : IR (KBr) cm⁻¹ 2976, 1760, 1744 ; ESI-MS *m/z* 862.4 (M+Na)⁺ ; HRFAB-MS *m/z* 840.5230 (M+H⁺, calcd for C₄₃H₇₃N₃O₁₃: *m/z* 840.5222); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 2.11 (3H, s, 4''-OCOCH₃), 2.30 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 3.01 (1H, m, 11-NCH_AH_B⁻), 3.09 (3H, s, 6-OCH₃), 3.19 (1H, dd, *J*=7.0Hz & 10.5Hz, 2'-H), 3.32 (3H, s, 3''-OCH₃), 3.43 (1H, br s, 2'-OH), 3.67 (1H, d, *J*=1Hz, 11-H), 3.73-3.82 (2H, m, 9=NCH₂-), 3.99 (1H, m, 11-NCH_AH_B⁻), 4.68 (1H, d, *J*= 10.0 Hz, 4''-H) ; ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 20.9 (4''-OCOCH₃), 40.2(3'-N(CH₃)₂), 42.5 (11-CH₂-), 49.5 (9-NCH₂- & 3''-OCH₃), 50.0 (6-OCH₃), 59.7 (C-11), 71.1 (C-2'), 78.6 (C-4''), 79.1 (C-6), 81.9 (C-12), 95.8 (C-1''), 102.2 (C-1'), 156.3 (11-NCOO⁻), 170.5 (4''-OC₂H₅), 176.6 (C-1), 181.5 (C-9).

11-Amino-9-deoxo-11-deoxy-9,11-N-nitriloethano-6-O-methylerythromycin A 11,12-cyclic carbamate (2)の合成

化合物 **6a** (7.00g, 8.34 mmol) 及び DBU (6.2ml, 41.5 mmol, 5.0 eq) を MeOH (70ml) に溶解し、4 時間過熱攪拌後、減圧下濃縮した。残渣を CHCl₃ に溶解後、水続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥した。減圧下溶媒を留去し、組成物 **2** を無色泡状物質として得た。AcOEt・CH₂Cl₂ から結晶化し **2** (3.2 g, 収率: 48%) を得た。mp 253-255°C : IR (KBr) cm⁻¹ 3503, 2970, 1764, 1656 ; ESI-MS *m/z* 820.4 (M+Na)⁺ ; Anal Calcd for C₄₁H₇₁N₃O₁₂ : C 61.71, H 8.97, N 5.27. Found : C 61.52 H 9.10 N 5.31.

11-Amino-9-deoxy-11-deoxy-9,11-*N*-nitriuloethano-5-*O*-desosaminyl-6-*O*-methyl erythronolide A 11,12-cyclic carbamate (9a)の合成

化合物 6a (3.20 g, 3.86 mmol)を EtOH · 2N HCl (1 : 1, 30 ml)の混合溶媒に溶解し一夜室温で攪拌を行った。反応液を減圧下濃縮し, 2M NaOH を加え塩基性とした後 EtOAc で抽出した。有機層を水, 続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥した。減圧下溶媒を留去し, 9a (2.20 g, 収率 : 89%)を白色泡状物質として得た。IR (KBr) cm⁻¹ 3472, 2980, 1754 ; ESI-MS *m/z* 662.3 (M+Na)⁺ ; HRFAB-MS *m/z* 640.4171 (M+H⁺, calcd for C₃₃H₅₇N₃O₉: *m/z* 640.4173); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 0.84 (3H, t, *J*=7.5Hz, 14-CH₃), 2.26 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 3.01 (3H, s, 6-OCH₃), 4.36 (1H, d, *J*=7.5Hz, 1'-H), 5.09 (1H, dd, *J*=2.5 & 10.5 Hz, 13-H) ; ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 40.2 (3'-N(CH₃)₂), 42.6 (9-NCH₂-), 49.1 (6-OCH₃), 49.3 (11-NCH₂-), 107.0 (C-1'), 156.4 (carbamate), 175.6 (C-1), 181.7 (C-9)

2'-*O*-Acetyl-11-amino-9-deoxy-11-deoxy-9,11-*N*-nitriuloethano-5-*O*-desosaminyl-6-*O*-methylerythronolide A 11,12-cyclic carbamate (2'-*O*-アセチル 9a)の合成

化合物 9a (2.00 g, 3.13 mmol)を acetone (20 ml)に溶解し, 無水酢酸(0.540 ml, 5.71 mmol, 1.8 eq)を加え室温で 3時間攪拌した。反応液に 0.2 M NaOH を加え反応をクエンチし, EtOAc で抽出した。有機層を水, 続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥した。減圧下溶媒を留去し, 2'-*O*-アセチル 9a (1.71 g, 収率 : 80%)を白色泡状物質として得た。得られた 2'-*O*-アセチル 9a をジイソプロピルエーテルから結晶化し, 融点及び機器スペクトル測定用サンプルとした。mp 194-196°C (無色針状晶) : IR (KBr) cm⁻¹ 3450, 2972, 1740, 1656 ; ESI-MS *m/z* 704.3 (M+Na)⁺ ; HRFAB-MS *m/z* 682.4277 (M+H⁺, calcd for C₃₅H₅₉N₃O₁₀: *m/z* 682.4279); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 0.84 (3H, t, *J*=7.5Hz, 14-CH₃), 2.06 (3H, s, 2'-OCOCH₃), 2.26 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 2.99 (3H, s, 6-OCH₃), 4.58 (1H, d, *J*=8.0 Hz, 1'-H), 4.76 (1H, dd, *J*=8.0 & 10.5 Hz, 2'-H), 5.08 (1H, dd, *J*=1.5 & 11.0Hz, 13-H) ; ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 40.6 (3'-N(CH₃)₂), 42.6 (9-NCH₂-), 49.2 (6-OCH₃), 49.4 (11-NCH₂-), 99.9 (C-1'), 156.4 (11-NCOO-), 169.8 (2'-OCOCH₃), 175.3 (C-1), 181.4 (C-9).

11-Amino-9-deoxy-3,11-dideoxy-9,11-N-nitriloethano-3-oxo-5-O-desosaminy-6-O-methylerythronolide A 11,12-cyclic carbamate (10a)の合成

2'-Oアセチル **9a** (1.71 g, 2.51 mmol), DMSO (3.56 ml, 50.2 mmol, 20.0 eq) 及び 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸(WSC·HCl, 2.88 g, 15.0 mmol, 6.0 eq)を溶解した CH₂Cl₂ (17 ml)溶液にピリジントリフルオロ酢酸塩(2.90 g, 15.0 mmol, 6.0eq)を加え室温で 3.5 時間攪拌した. 反応液を濃縮後, 2M NaOH および CHCl₃ を加えた. 分液後, 有機層を水, 続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥した. 減圧下溶媒を留去し, 2'-Oアセチル **10a** (1.53 g) を得た. 得られた 2'-Oアセチル **10a** (1.53g) を MeOH (15 ml)に溶解し室温で一夜攪拌を行った. 減圧下溶媒を留去し, 得られた組成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液: CHCl₃ · MeOH · NH₄OH (25:1:0.1))により精製後, EtOAc-CH₂Cl₂ より結晶化し **10a** (0.957 g, 収率: 60%)を得た. mp: 243-245°C : IR (KBr) cm⁻¹ 2940, 1760, 1650 ; ESI-MS *m/z* 660.5 (M+Na)⁺; *Anal Calcd for* C₃₃H₅₅N₃O₉ : C 62.14, H 8.69, N 6.59. Found : C 61.87 H 8.61 N 6.51.

4'-O-Acetyl-11-amino-11-N-(2-amino)propyl-11-deoxy-6-O-methylerythromycin A 11,12-cyclic carbamate (5b 及び 5c)の合成

エチレンジアミンの代わりに 1,2-ジアミノプロパン (2.82 ml, 33.1 mmol, 5.0 eq) と化合物 **4** (6.00 g, 6.61 mmol)を用い, 化合物 **5a** の合成と同様に操作し化合物 **5b** 及び **5c** の混合物(5.7 g)を得た.

11-Amino-11-N-(2-amino)propyl-11-deoxy-5-O-desosaminy-6-O-methylerythronolide A 11,12-cyclic carbamate (8b and 8c)の合成

化合物 **5b** 及び **5c** の混合物(280 g, 0.373 mol)を 2M HCl (900 ml) に溶解し 60°C で 3 時間攪拌した. 反応液に 2M NaOH (1200 ml)を加え, 生じた析出物を濾過し水で洗浄後乾燥し, **8b** 及び **8c** の混合物 (144 g)を得た. 一方, 上記濾液 (水層)に EtOAc を加え抽出後, 有機層を水, 続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥した. 減圧下溶媒を留去し, 得られた組成物をジエチルエーテルから結晶化し **8b** 及び **8c** の混合物(28.2 g)を得た. 得られた **8b** 及び **8c** の混合物(172 g)をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液: CHCl₃ · MeOH · NH₄OH (15:1:0.1))により精製し, **8b** (58.2 g, 収率: 4 から 24%)及び **8c** (65.8 g, 収率: 4 から 28%)を得た.

8b : Mp 221-223°C (EtOAc より結晶化) ; IR (KBr) cm^{-1} 3364, 2978, 1756 ; ESI-MS m/z 694.4 (M+Na)⁺; HRFAB-MS m/z 672.4447 (M+H⁺, calcd for C₃₄H₆₁N₃O₁₀: m/z 672.4435); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 0.85 (3H, t, $J=7.5\text{Hz}$, 14-CH₃), 1.04 (3H, d, $J=7.0\text{Hz}$, 10-CH₃), 1.12 (3H, d, $J=6.5\text{Hz}$, 11-NCH₂CH(CH₃)NH₂), 1.37 (3H, s, 6-CH₃), 1.46 (3H, s, 12-CH₃), 2.26 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 2.97 (3H, s, 6-OCH₃), 3.06 (1H, m, 11-NCH₂CH(CH₃)NH₂), 3.40 (1H, dd, $J=10.0$ & 14.0Hz , 11-NCH_AH_BCH(CH₃)NH₂), 3.64 (1H, dd, $J=3.0$ & 14.0Hz , 11-NCH_AH_BCH(CH₃)NH₂), 3.76 (1H, s, 11-H), 5.31 (1H, dd, $J=2.5$ & 11.0Hz , 13-H) ; ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 22.5 (11-NCH₂CH(CH₃)NH₂), 40.5 (3'-N(CH₃)₂), 44.9 (11-NCH₂CH(CH₃)NH₂), 49.7 (6-OCH₃), 51.6 (11-NCH₂CH(CH₃)NH₂), 60.6 (C-11), 106.8 (C-1'), 158.5 (11-NCOO⁻), 176.0 (C-1), 215.7 (C-9).

8c : Mp 231-223°C (EtOAc-CH₂Cl₂ より結晶化) ; IR (KBr) cm^{-1} 3353, 2972, 1756 ; ESI-MS m/z 694.5 (M+Na)⁺; HRFAB-MS m/z 672.4446 (M+H⁺, calcd for C₃₄H₆₁N₃O₁₀: m/z 672.4435); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 0.85 (3H, t, $J=7.5\text{Hz}$, 14-CH₃), 1.03 (3H, d, $J=7.0\text{Hz}$, 10-CH₃), 1.13 (3H, d, $J=3.0\text{Hz}$, 11-NCH₂CH(CH₃)NH₂), 1.37 (3H, s, 6-CH₃), 1.45 (3H, s, 12-CH₃), 2.26 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 3.02 (3H, s, 6-OCH₃), 3.24 (1H, m, 11-NCH₂CH(CH₃)NH₂), 3.45 (2H, m, 11-NCH₂CH(CH₃)NH₂), 3.84 (1H, s, 11-H), 5.19 (1H, dd, $J=3.0$ & 11.0Hz , 13-H) ; ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 21.6 (11-NCH₂CH(CH₃)NH₂), 40.2 (3'-N(CH₃)₂), 45.2 (11-NCH₂CH(CH₃)NH₂), 49.4 (6-OCH₃), 52.3 (11-NCH₂CH(CH₃)NH₂), 62.0 (C-11), 106.7 (C-1'), 157.4 (11-NCOO⁻), 175.6 (C-1), 215.4 (C-9).

11-Amino-9-deoxo-11-deoxy-9,11-*N*-(2*R*-methyl)nitriloethano-5-*O*-desosaminyl-6-*O*-methylerythronolide A 11,12-cyclic carbamate (9b)の合成

EtOH の代わりにトルエンを反応溶媒に用い、化合物 **9a** と同様に反応後、ジエチルエーテルから結晶化することにより化合物 **8b**(86.0 g, 0.128 mol)から **9b** (62.4g, 収率 : 75%)を無色プリズム晶として得た. mp 145-147°C : IR (KBr) cm^{-1} 3424, 2942, 1736 ; ESI-MS m/z 676.5 (M+Na)⁺; HRFAB-MS m/z 654.4328 (M+H⁺, calcd for C₃₄H₅₉N₃O₉: m/z 654.4330); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 0.83 (3H, t, $J=7.5\text{Hz}$, 14-CH₃), 1.40 (3H, s, 6-CH₃), 1.45 (3H, s, 12-CH₃), 2.26 (6H, s,

3'-N(CH₃)₂, 2.72 & 3.85 (each 1H, m, 11-NCH₂CH(CH₃)N-), 3.01 (3H, s, 6-OCH₃), 3.74 (1H, s, 11-H), 3.96 (1H, m, 11-NCH₂CH(CH₃)N-), 5.07 (1H, dd, *J*=2.0Hz & 11.0Hz, 13-H); ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 22.7 (11-NCH₂CH(CH₃)N-), 40.2 (3'-N(CH₃)₂), 48.3 (11-NCH₂CH(CH₃)N=9), 49.0 (6-OCH₃), 53.2 (11-NCH₂CH(CH₃)N-), 60.0 (C-11), 106.8 (C-1'), 156.5 (11-NCOO-12), 175.6 (C-1), 178.8 (C-9).

11-Amino-9-deoxy-3,11-dideoxy-9,11-*N*-(2*R*-methyl)nitrioloethano-3-oxo-5-*O*-desosaminyl-6-*O*-methylethronolide A 11,12-cyclic carbamate (10b)の合成

化合物 10a(2'-*O*-アセチル化, 3-OH の酸化反応及び 2'位の脱アセチル化)の合成法に従い 9b (60.0 g, 91.8 mmol)から 10b を合成した. 得られた粗生成物を EtOAc-CH₂Cl₂ より結晶化し 10b (33.8 g, 収率:57%)を無色プリズム晶として得た. mp 179-181°C : IR (KBr) cm⁻¹ 3430, 2972, 1766, 1650 ; ESI-MS *m/z* 674.4 (M+Na)⁺; *Anal* Calcd for C₃₄H₅₇N₃O₉: C 62.65, H 8.81, N 6.45. Found: C 62.32 H 8.83 N 6.17.

11-Amino-9-deoxy-11-deoxy-9,11-*N*-(2*S*-methyl)nitrioloethano-5-*O*-desosaminyl-6-*O*-methylethronolide A 11,12-cyclic carbamate (9c)の合成

EtOH の代わりにトルエンを反応溶媒に用い, 6a の合成と同様に反応することにより 8c (70.0 g, 0.104 mol)から 9c の合成を行った. 得られた粗生成物をジエチルエーテルから結晶化することにより 9c (52.0g, 収率:76%)を無色プリズム晶として得た. mp 136-137°C : IR (KBr) cm⁻¹ 3406, 2972, 1770, 1651 ; ESI-MS *m/z* 676.4 (M+Na)⁺; HRFAB-MS *m/z* 654.4332 (M+H⁺, calcd for C₃₄H₅₉N₃O₉: *m/z* 654.4330); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 0.85 (3H, t, *J*=7.5Hz, 14-CH₃), 1.34 (3H, d, *J*=6.5Hz, 11-NCH₂CH(CH₃)N-), 1.40 (3H, s, 6-CH₃), 1.46 (3H, s, 12-CH₃), 2.25 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 3.01 (3H, s, 6-OCH₃), 3.23 & 3.78 (each 1H, m, 11-NCH₂CH(CH₃)N-), 3.61 (1H, d, *J*=1.0Hz, 11-H), 4.13 (1H, m, 11-NCH₂CH(CH₃)N=9), 5.04 (1H, dd, *J*=2.0Hz & 11.0Hz, 13-H). ; ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 19.0 (11-NCH₂CH(CH₃)N-), 40.2 (3'-N(CH₃)₂), 47.9 (11-NCH₂CH(CH₃)N-), 49.3 (6-OCH₃), 55.7 (11-NCH₂CH(CH₃)N-), 78.7(C-6), 81.8(C-12), 156.8 (11-NCOO-), 175.6 (C-1), 178.0 (C-9).

11-Amino-9-deoxy-3,11-dideoxy-9,11-*N*-(2*S*-methyl)nitriloethano-3-oxo-5-*O*-desosaminy-6-*O*-methylerythronolide A 11,12-cyclic carbamate (10c)の合成

化合物 10a(2'-*O*-アセチル化, 3-OH の酸化反応及び 2'位の脱アセチル化)の合成法に従い 9c (52.0 g, 79.5 mmol)から 10c を合成した. 得られた粗生成物を EtOAc より結晶化し 10c (33.9 g, 収率: 65%)を無色プリズム晶として得た. mp 200-201°C : IR (KBr) cm^{-1} 3406, 2990, 1777, 1652 ; ESI-MS m/z 674.5 (M+Na)⁺ ; Anal Calcd for C₃₄H₅₇N₃O₉ : C 62.65, H 8.81, N 6.45. Found : C 62.63 H 8.80 N 6.52.

2',4''-Di-*O*-acetyl-11-amino-9-deoxy-11-deoxy-9,11-*N*-(2,2-dimethyl)nitriloethano-6-*O*-methylerythromycin A 11,12-cyclic carbamate (22d)の合成

12-*O*-イミダゾリルカルボニル体 4 (163 g, 0.180 mol)を THF に溶解し, 1,2-ジアミノ-2-メチルプロパン(74.8 ml, 0.721 mol, 4.0 eq)を用い, 7a と同様に反応を行い 7d の合成を行った. 続いて EtOH の代わりにトルエンを反応溶媒に用い, 6a の合成法に従い 7d を 22d へと変換した(57.4 g, 収率: 35%). mp 155-158°C (アセトン-ヘキサンより結晶化) : IR (KBr) cm^{-1} 2968, 1782, 1651 ; ESI-MS m/z 932.7 (M+Na)⁺ ; HRFAB-MS m/z 910.5630 (M+H⁺, calcd for C₄₇H₇₉N₃O₁₄: m/z 910.5640); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 0.84 (3H, t, $J=7.5\text{Hz}$, 14-CH₃), 1.30 (3H, s, 11-NCH₂C(CH₃)_A(CH₃)_BN⁻), 1.33 (3H, s, 11-NCH₂C(CH₃)_A(CH₃)_BN⁻), 1.36 (3H, s, 6-CH₃), 1.42 (3H, s, 12-CH₃), 2.05 (3H, s, 2'-OCOCH₃), 2.11 (3H, s, 4''-OCOCH₃), 2.28 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 2.97 (1H, d, $J=15.0\text{Hz}$, 11-NCH_AH_BC(CH₃)₂N⁻), 3.06 (3H, s, 6-OCH₃), 3.36 (3H, s, 3''-OCH₃), 3.50 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, 11-H), 3.79 (1H, d, $J=15.0\text{Hz}$, 11-NCH_AH_BC(CH₃)₂N⁻), 4.66 (1H, d, $J=7.8\text{Hz}$, 1'-H), 4.68 (1H, d, $J=8.5\text{Hz}$, 4''-H), 4.76 (1H, dd, $J=7.8$ & 10.5Hz , 2'-H), 4.92 (1H, dd, $J=2.3$ & 10.8Hz , 13-H), 4.97 (1H, d, $J=5.0\text{Hz}$, 1''-H) ; ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 25.1 (11-NCH₂C(CH₃)_A(CH₃)_BN⁻), 32.8 (11-NCH₂C(CH₃)_A(CH₃)_BN⁻), 40.7 (3'-N(CH₃)₂), 49.3 (3''-OCH₃), 49.9 (6-OCH₃), 53.2 (11-NCH₂-), 58.5(9=NC(CH₃)₂-), 61.2 (C-11), 71.9 (C-2'), 78.5 (C-4''), 79.0 (C-6), 81.6 (C-12), 95.6 (C-1''), 100.1 (C-1'), 156.6 (11-NCOO-), 169.8 (2'-OCOCH₃), 170.4 (4''-OCOCH₃), 175.3 (C-9), 176.5 (C-1).

11-Amino-9-deoxo-11-deoxy-9,11-*N*(2,2-dimethyl)nitriloethano-5-*O*-desosaminyl-6-*O*-methylerythronolide A 11,12-cyclic carbamate (9d)の合成

環化体 **22d** (54.0 g, 59.3 mmol) を 2M HCl (200 ml) を用い、**9a** の合成と同様に脱クラジノース化を行い 2'-*O*-アセチル **9d** を得た。得られた粗 2'-*O*-アセチル **9d** は MeOH を用いる定法により 2'-脱アセチル化を行った後、CH₃CN から結晶化し **9d** (28.0 g, 収率: 71%) を無色プリズム晶として得た。mp 148-150°C : IR (KBr) cm⁻¹ 3554, 2972, 1760, 1651 ; ESI-MS *m/z* 690.3 (M+Na)⁺ ; HRFAB-MS *m/z* 668.4487 (M+H⁺, calcd for C₃₅H₆₁N₃O₉: *m/z* 668.4486); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 1.32 (3H, s, 9-NC(CH₃)_A(CH₃)_BCH₂-), 1.33 (3H, s, 9-NC(CH₃)_A(CH₃)_BCH₂-), 2.25 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 2.97 (1H, d, *J*=15.0Hz, 9-NC(CH₃)₂CH_AH_BN-), 3.01 (3H, s, 6-OCH₃), 3.57 (1H, s, 11-H), 3.82 (1H, d, *J*=15.0Hz, 9-NC(CH₃)₂CH_AH_BN-), 4.35 (1H, d, *J*=7.5Hz, 1'-H), 5.00 (1H, dd, *J*=2.0 & 11.0Hz, 13-H) ; ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) 24.9 (9-NC(CH₃)_A(CH₃)_BCH₂-), 32.9 (9-NC(CH₃)_A(CH₃)_BCH₂-), 40.2 (3'-N(CH₃)₂), 49.2 (6-OCH₃), 53.3 (11-NCH₂-), 58.6 (9-NC(CH₃)₂-), 61.7 (C-11), 78.8 (C-6), 81.8 (C-12), 106.9 (C-1'), 156.6 (11-NCOO-), 175.1 (C-9), 175.7 (C-1).

11-Amino-9-deoxo-3,11-dideoxy-9,11-*N*(2,2-dimethyl)nitriloethano-3-oxo-5-*O*-desosaminyl-6-*O*-methylerythronolide A 11,12-cyclic carbamate (10d)の合成

化合物 **10a**(2'-*O*-アセチル化, 3-OH の酸化反応及び 2'位の脱アセチル化)の合成法に従い **9d** (52.7 g, 78.9 mmol) から **10d** を合成した。得られた粗生成物を CH₃CN より結晶化し **10d** (29.5 g, 収率: 56%) を無色プリズム晶として得た。mp 158-160°C : IR (KBr) cm⁻¹ 3456, 2971, 1767, 1651 ; ESI-MS *m/z* 688.4 (M+Na)⁺ ; *Anal Calcd* for C₃₅H₅₉N₃O₉ : C 63.13, H 8.93, N 6.31. Found : C 62.96 H 8.89 N 6.31.

9-Deoxo-9,11-diamino-3,11-dideoxy-9-*N*,11-*N*-ethano-3-oxo-5-*O*-desosaminyl-6-*O*-methylerythronolide A 11,12-cyclic carbamate (11)の合成

化合物 **10a** (0.760 g, 1.19 mmol) を EtOH (10 ml) に溶解し、酢酸 (1.36 ml, 2.38 mmol, 2.0 eq) 及び NaBH₃CN (0.300g, 4.77 mmol, 4.0 eq) を加え室温で 15 時間攪拌を続けた。反応液に飽和 NaHCO₃ 水を加え EtOAc で抽出した。有機層を水、続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥した。減圧下溶媒を留去し、得られた粗生成物を EtOAc から結晶化することにより **11** (0.374 g, 収率: 49%) を無色プリズム晶として得た。mp 231-233°C : IR (KBr) cm⁻¹ 3351, 2968, 1765 ;

ESI-MS m/z 662.5 (M+Na)⁺; *Anal* Calcd for C₃₃H₅₇N₃O₉: C 61.95, H 8.98, N 6.57.
Found: C 61.81 H 8.94 N 6.61.

9-Deoxy-11-deoxy-9,11-diamino-9-*N*,11-*N'*ethano-6-*O*-methylerythromycin A 11,12-cyclic carbamate (13)の合成

化合物 12 (1.0g, 1.23 mmol)を EtOH (10 ml)に溶解し、酢酸 (0.14 ml, 2.45 mmol, 2.0 eq)及び NaBH₃CN (0.39 g, 6.21 mmol, 5.0 eq)を加え 2 時間加熱還流を行った。NaBH₃CN (0.15 g, 2.39 mmol, 1.9 eq)を追加し、更に 1 時間加熱還流を続けた。反応後、EtOAc に代え CH₂Cl₂ を用い、化合物 11 の合成時と同様に抽出操作を行った。減圧下溶媒を留去し、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液: CHCl₃・MeOH・28% NH₄OH (300:10:1))により精製し 13 (0.71 g, 収率: 73 %) を無色泡状物質として得た。mp 247-249°C (CHCl₃-ヘキサン): IR (KBr) cm⁻¹ 3448, 2974, 1752, 1733, 1448, 1167, 1055; ESI-MS m/z 800.4 (M+H)⁺; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 0.85 (3H, t, J =7.3 Hz, 14-CH₃), 0.95 (3H, d, J =7.1 Hz, 8-CH₃), 1.36 (3H, s, 6-CH₃), 1.42 (3H, s, 12-CH₃), 2.28 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 3.29 (3H, s, 6-OCH₃), 3.33 (3H, s, 3''-OCH₃), 3.67 (1H, s, 11-H), 3.73 (1H, d, J =7.8Hz, 5-H), 3.85 (1H, d, J =9.6Hz, 3-H), 4.44 (1H, d, J =7.2Hz, 1'-H); ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) δ 40.3 (3'-N(CH₃)₂), 46.4 & 47.4 (9-NCH₂CH₂N-11), 49.5 (3''-OCH₃), 49.6 (6-OCH₃), 61.2 (C-11), 70.7 (C-9), 156.5 (11-NCOO-), 176.5 (C-1).

2',4''-Bis-*O*-trimethylsilyl-10,11-anhydroerythromycin A (15)の合成

化合物 14 (20.0 g, 26.4 mmol)を溶解した DMF (100 ml)溶液に、1,1,3,3-テトラメチルグアニジン(6.6 ml, 52.6 mmol, 2.0 eq)を加え 100°C で 1.5 時間攪拌した。反応液に水を加え、AcOEt (300ml)で抽出した。有機層を水、続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥し、減圧下溶媒を留去し粗生成物(18.6 g)を得た。得られた粗生成物は DMF (220ml)に溶解し、NH₄Cl (1.41 g, 26.4 mmol, 1.0 eq)及び 1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン(12.0 ml, 57.1 mmol, 2.2 eq)を加え 20°C で 2 時間反応した。反応液に水を加え、AcOEt (300ml)で抽出した。有機層を水、続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥し、減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液: アセトン・ヘキサン・Et₃N (5:50:1))により精製し、15 (17.7 g, 収率: 78 %)を無

色泡状物質として得た. IR (KBr) cm^{-1} 3484, 2973, 2940, 1736, 1672; HRFAB-MS m/z 860.5390 ($\text{M}+\text{H}^+$, calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{82}\text{NO}_{12}\text{Si}_2$: m/z 860.5376); ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 0.09 (9H, s, 2'-OSi(CH₃)₃), 0.10 (9H, s, 4''-OSi(CH₃)₃), 0.92 (3H, t, $J=7.3$ Hz, 14-CH₃), 2.03 (3H, d, $J=1.1$ Hz, 10-CH₃), 2.22 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 3.28 (3H, s, 3''-OCH₃), 4.04 (1H, brs, 12-OH), 4.89 (1H, dd, $J=3.3$ Hz & 9.9Hz, 13-H), 6.50 (1H, d, $J=1.1$ Hz, 11-H); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 0.8 (4''-OSi(CH₃)₃), 1.0 (2'-OSi(CH₃)₃), 40.9 (3'-N(CH₃)₂), 49.2 (3''-OCH₃), 138.2 (C-11), 139.2 (C-10), 176.1 (C-1), 210.4 (C-9).

2', 4''-Bis-*O*-trimethylsilyl-12-*O*-imidazolylcarbonyl-10, 11-anhydroerythromycin A (16)の合成

N, N'-カルボニルジイミダゾール(377 mg, 2.33 mmol, 2.0 eq)及び60% NaH (56 mg, 3.89 mmol, 1.2 eq)を用い, 化合物 4 の合成と同様の操作を行うことにより 15 (1.0 g, 1.16 mmol)から 16 の粗生成物を得た. 得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液: アセトン・ヘキサン・Et₃N (5:50:1))により精製し, 16 (680 mg, 収率: 61%) を無色泡状物質として得た. IR (KBr) cm^{-1} 3524, 2974, 2938, 1767, 1727; FAB-MS m/z 954 ($\text{M}+\text{H}^+$); HRFAB-MS m/z 954.5558 ($\text{M}+\text{H}^+$, calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{84}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{Si}_2$: m/z 954.5543); ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 0.06 (9H, s, 2'-OSi(CH₃)₃), 0.11 (9H, s, 4''-OSi(CH₃)₃), 0.92 (3H, t, $J=7.2$ Hz, 14-CH₃), 1.96 (3H, s, 10-CH₃), 2.21 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 3.23 (3H, s, 3''-OCH₃), 5.46 (1H, dd, $J=2.2$ Hz & 11.5Hz, 13-H) 7.03, 7.38, & 8.04 (each 1H, s, imidazole-H), 7.07 (1H, s, 11-H); ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) δ 0.8 (4''-OSi(CH₃)₃), 0.9 (2'-OSi(CH₃)₃), 40.9 (3'-N(CH₃)₂), 49.0 (3''-OCH₃), 117.5, 130.2, & 137.3 (imidazole-C), 135.7 (C-10), 138.6 (C-11), 146.7 (12-OCO-), 175.9 (C-1), 206.4 (C-9).

9-Deoxy-11-deoxy-9, 11-diamino-9-*N*, 11-*N*-ethano-6, 9-aminalerythromycin A 11, 12-cyclic carbamate (18)の合成

CH₃CN (10ml)中, エチレンジアミン(1.1 g, 17.5 mmol, 10 eq) を用い化合物 5a の合成と同様に操作し, 化合物 16 (1.7g, 1.78 mmol)を 11,12-環状カーバメート体 17 とした. 得られた 17 を THF (15 ml)に溶解し, Bu₄NF (0.63 g, 2.41mmol, 1.4 equiv)を加え室温で 4 時間攪拌した. 反応液に飽和 NaHCO₃ 水を加え EtOAc

で抽出した。有機層を水，続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO_4 を用いて乾燥した。減圧下溶媒を留去し，得られた粗生成物を EtOH (11 ml) に溶解し，酢酸 (0.31 ml, 5.41 mmol, 3.0 eq) を添加後， 60°C で 14 時間攪拌した。反応液に水を加えた後，2M NaOH を用いて pH を約 10 とした後， AcOEt (100 ml) で抽出した。有機層を水，続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO_4 を用いて乾燥し，減圧下溶媒を留去し粗生成物を得た。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液: アセトン・ヘキサン・ Et_3N (30 : 50 : 1)) により精製し，9 位環化体 **18** (0.21 g, 収率 : 化合物 **16** より 15%) を無色泡状物質として得た。IR (KBr) cm^{-1} 3458, 2975, 2941, 1750, 1736 ; FAB-MS m/z 784 ($\text{M}+\text{H}^+$) ; HRFAB-MS m/z 784.4948 ($\text{M}+\text{H}^+$, calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{70}\text{N}_3\text{O}_{12}$: m/z 784.4960); ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 1.51 (3H, s, 6- CH_3), 2.29 (6H, s, 3'- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.29 (3H, s, 3''- OCH_3), 3.39 (1H, d, $J=9.4\text{Hz}$, 5-H), 4.25 (1H, d, $J=7.0\text{Hz}$, 1'-H), 4.27 (1H, s, 11-H), 4.94 (1H, dd, $J=21.8\text{Hz}$, & 10.7Hz, 13-H), 4.98 (1H, d, $J=4.3\text{Hz}$, 1''-H); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ 33.0 (6- CH_3), 37.9 (9- NCH_2 -), 40.3 (3'- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 47.2 (11- NCH_2 -), 49.4 (3''- OCH_3), 79.8 (C-3), 84.2 (C-5), 85.0 (C-6), 99.2 (C-9), 156.4 (11- NCOO -), 178.1 (C-1).

9-Deoxo-11-deoxy-5-O-desosaminyl-9,11-diamino-9-N,11-N-ethano-6,9-aminal-erythronolide A 11, 12-cyclic carbamate (19) の合成

化合物 **18** (0.50g, 0.64mmol) を溶解した EtOH (2.5 ml) に 2M HCl (2.5 ml) を加え室温にて一夜攪拌を行った。反応液を 2M NaOH を用いて中和した後， AcOEt (50 ml) で抽出した。有機層を水，続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO_4 を用いて乾燥し，減圧下溶媒を留去し，得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液: CHCl_3 ・ MeOH ・28% NH_4OH (100 : 10 : 1)) により精製し **19** (0.39 g, 収率 : 98 %) を無色泡状物質として得た。IR (KBr) cm^{-1} 3396, 2972, 2941, 2880, 1754, 1740; FAB-MS m/z 626 ($\text{M}+\text{H}^+$) ; HRFAB-MS m/z 626.4019 ($\text{M}+\text{H}^+$, calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{O}_9$: m/z 626.4017); ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 0.86 (3H, t, $J=7.3\text{Hz}$, 14- CH_3), 2.26 (6H, s, 3'- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.66 (1H, s, 5-H), 3.72 (1H, d, $J=9.8\text{Hz}$, 3-H), 4.31 (1H, s, 11-H), 4.35 (1H, d, $J=7.3\text{Hz}$, 1'-H), 5.07 (1H, dd, $J=2.4\text{Hz}$, & 11.0Hz, 13-H); ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ 28.2 (6- CH_3), 39.5 (9- NCH_2 -), 40.2 (3'- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 47.1 (11- NCH_2 -), 80.5 (C-3), 98.1 (C-9), 157.2 (11- NCOO -), 175.6 (C-1).

9-Deoxo-5-O-desosaminyl-9, 11-diamino-3, 11-dideoxy-9-N, 11-Nethano-3-oxo-6, 3'-hemiacetalerhythronolide A 11, 12-cyclic carbamate (20a)の合成

化合物 **19** (0.32 g, 0.512 mmol)を溶解したアセトン・CH₂Cl₂ (3 ml・2 ml)の溶液に無水酢酸(0.07 ml, 0.741 mmol, 1.4 eq)を加え室温で一夜攪拌を行った。反応液に水を加え, 2M NaOH を用いて溶液の pH を約 11 に調整した後 AcOEt (30 ml)で抽出した。有機層を水, 続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥し, 減圧下溶媒を留去した。得られた残渣(0.28 g, 0.420 mmol)を CH₂Cl₂ (2 ml)に溶解し, DMSO (0.30 ml, 4.26 mmol, 10 eq), WSC・HCl (242 mg, 1.27mmol, 3.0 eq) 及びピリジントリフルオロ酢酸塩(243 mg, 1.25 mmol, 3.0 eq)を加え室温で 1 時間攪拌した。反応液に水を加え, 2M NaOH を用いて溶液の pH を約 11 に調整した後 CH₂Cl₂ (30 ml)で抽出した。有機層を水, 続いて飽和食塩水で洗浄後無水 MgSO₄ を用いて乾燥し, 減圧下溶媒を留去した。得られた残渣を MeOH (5 ml)に溶解し, 3 時間加熱還流させた。反応液を濃縮後, 得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶離液:CHCl₃・MeOH・28% NH₄OH (150:10:1))により精製し **20a** (0.15 g, 収率:47%)を無色泡状物質として得た。IR (KBr) cm⁻¹ 3496, 2974, 2939, 2881, 1760; FAB-MS *m/z* 624 (M+H)⁺; HRFAB-MS *m/z* 624.3859 (M+H⁺, calcd for C₃₂H₅₄N₃O₉: *m/z* 624.3860); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 0.86 (3H, t, *J*=7.3Hz, 14-CH₃), 1.42 (3H, s, 12-CH₃), 1.42 (3H, s, 6-CH₃), 2.29 (6H, s, 3'-N(CH₃)₂), 2.69 (1H, q, *J*=7.3Hz, 2-H), 3.69 (1H, d, *J*=4.9Hz, 5-H), 3.73 (1H, s, 11-H), 4.14 (1H, s, 3-OH), 4.96 (1H, dd, *J*=1.8Hz, & 11.0Hz, 13-H); ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 24.8 (6-CH₃), 40.4 (3'-N(CH₃)₂), 42.5 (9-NCH₂-), 50.0 (11-NCH₂-), 95.1 (C-5), 104.6 (C-1'), 105.3 (C-3), 156.0 (11-NCOO-), 176.9 (C-1), 181.3 (C-9).

X線結晶解析

X線回折データは, 単色化した Cu の K α 線(λ =1.54178)を用い, 全自動 4 軸型回折計 MXC18 (Mac Science/Bruker axs)により, 288 K で測定した。構造は, SHELXS86 を用いて直接法により決定した。水素以外の原子は異方性の温度因子にて精密化を行い, 一方, 水素原子は座標のみ精密化を行った。全ての計算は, Mac Science/Bruker axs 製の結晶解析ソフトウェアパッケージ CRYSTAN-G により進めた。化合物 **10a**, **2** 及び **21** に関する結晶データ⁵²⁾を Table 20 にまとめた。

Table 20. Crystal data for **10a**, **2** and **21**

| | 10a | 2 | 21 |
|--|---|---|--|
| Chemical formula | C ₃₃ H ₅₅ N ₃ O ₉ | C ₄₁ H ₇₁ N ₃ O ₁₂ ·C ₃ H ₆ O | C ₃₁ H ₅₂ N ₂ O ₁₀ |
| Formula weight | 637.82 | 856.11 | 612.76 |
| Crystal size / mm | 0.55x0.55x0.50 | 0.35x0.40x0.30 | 0.50x0.55x0.50 |
| Crystal system | Orthorhombic | Orthorhombic | Orthorhombic |
| Space group | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (#19) | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (#19) | <i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (#19) |
| <i>a</i> | 15.052 (4) Å | 20.404 (3) Å | 12.260 (2) Å |
| <i>b</i> | 16.632 (3) Å | 25.587 (4) Å | 25.040 (5) Å |
| <i>c</i> | 13.590 (2) Å | 9.021 (2) Å | 10.956 (3) Å |
| <i>V</i> | 3402 (1) Å ³ | 4709 (1) Å ³ | 3363 (1) Å ³ |
| <i>Z</i> | 4 | 4 | 4 |
| <i>D</i> _c / (g·cm ⁻³) | 1.24 | 1.12 | 1.21 |
| <i>F</i> (000) | 1384 | 1736 | 1328 |
| μ /mm ⁻¹ | 0.652 | 0.595 | 0.584 |
| Reflections measured | 3269 | 4535 | 3253 |
| Unique reflections | 3191 | 4434 | 3174 |
| Reflections used | 3182 | 4266 | 3157 |
| <i>R</i> ₁ / <i>wR</i> ₂ | 0.039 / 0.056 | 0.047 / 0.059 | 0.032 / 0.051 |

CDCl₃ 及び D₂O 溶液中での NMR 測定

測定試料は各サンプル 25mg を 0.5 mL の CDCl₃ または D₂O に溶解して調製した。NMR 測定は Jeol Delta500 核磁気共鳴装置を用いて測定した。測定に際しては Jeol 標準のパルスシーケンスを使用し、テトラメチルシラン (TMS) を内部標準物質として使用した。化合物 **10a** の D₂O 溶液の調製に際しては、溶液の pD 値を 20% DCl を用いて 6.0 に調整した。

¹H 及び ¹³C NMR の測定はそれぞれ 500.160 MHz, 125.765 MHz にて実施した。FG-DQF スペクトルは、データポイント 1 K × 0.5 K (F₂ × F₁), 積算 2 回で測定した。FG-HMQC スペクトルは、データポイント 0.5 K × 1 K [(F₁(¹³C) × F₂(¹H))], 積算 4 回で測定した。FG-HMBC スペクトルは、データポイント 0.5 K × 1 K (F₁ × F₂), 積算 8 回で測定した。位相検知 NOESY スペクトルは測定温度 25 °C, デ

ータポイント 1 K × 0.5 K, 混合時間 550 ms に設定して測定を行った. 化合物 **10a** の D₂O 溶液における ROESY スペクトルは測定温度 25 °C, データポイント 1 K × 0.5 K, 混合時間 180 ms に設定して測定した.

使用菌株

本実験に用いた臨床分離株は日本各地の病院において分離されたものを用いた. 他の試験菌は大正製薬株式会社・医薬研究所保存株及び ATCC 株を用いた.

試験薬剤及び比較薬剤

ロキタマイシン (RKM) 及びアジスロマイシン (AZM) は旭化成 (株) 及び U.S. Pharmacopeia よりそれぞれ入手した. 化合物 **10a-d** 及びクラリスロマイシン (CAM) は大正製薬社内で合成した. *In vitro* 試験に用いる保存溶液は試験薬剤 10mg を MeOH 5ml に溶解し作成した. *In vivo* 試験では薬剤を 5% アラビアゴム含有の生理食塩水に懸濁し経口投与した. 静脈内投与に際しては, 薬剤を蒸留水に懸濁し, 次いで pH7 以上に保ちながら必要量の希塩酸を加えて溶解した.

感受性試験 (MIC 測定)

各菌株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は, 日本化学療法学会標準法に準拠し寒天平板希釈法で行った⁵³⁾. 嫌気性菌の試験には GAM 寒天培地 (日水) を用いた. PPLO Broth (栄研) に寒天 (1%), 麦芽エキス (0.2%), 馬血清 (20%) を添加し, *Mycoplasma pneumoniae* 用に用いた. 摂取菌量は好気性菌, 嫌気性菌共に, 10⁶ CFU/ml とし, *M. pneumoniae* に対しては 10⁵ CFU/plate とした. 薬剤は 2 倍希釈で寒天培地に混合した. 試験菌を一夜前培養した液, あるいはその希釈液を上記の寒天培地に接種した. 好気性菌では 18 時間, 嫌気性菌では 48 時間, *M. pneumoniae* では 7 日間培養した後, 生育が認められなかった最小の薬剤濃度 (各接種スポットにつき 4 コロニー以下) を MIC とした. 培養は全て 37°C で行った.

培地 pH 及び接種菌量の抗菌活性に及ぼす影響

培地 pH 及び接種菌数の抗菌活性に及ぼす影響を検討するため, *H. influenzae* に対する MIC 及び MBC を測定を行った. MIC の測定は日本化学療法学会標準法に

従い微量液体希釈法によって実施した⁵³⁾。培地の pH は 8, 7, 6 に調整した。接種菌量は 10^6 , 10^5 及び 10^4 CFU/ml で検討した。

マウス全身感染モデルに対する感染防御試験

感染菌として *S. aureus* Smith4 株, *S. pyogenes* ATCC8668 株, *S. pneumoniae* IID553 株及び *S. pneumoniae* 224 株を用いた。*S. aureus* Smith4 株, *S. pyogenes* ATCC8668 株及び *S. pneumoniae* IID553 株は標準菌株であり, *S. pneumoniae* 224 株は臨床分離株である。CAM のこれら菌株に対する MIC はそれぞれ 0.20, 0.05, 0.05 及び 0.78 μ g/ml である。*S. pneumoniae* 224 株は *mefA* 遺伝子でコードされた薬剤排出型 EM 耐性菌である。ICR 系雄性マウス (4 週齢) に, 感染菌の懸濁液 0.5 ml (動物に対して致死量又はそれ以上の病原菌数を含む) を腹腔内投与し感染させた。Hog gastric mucin (5%, w/v) を投与前に菌の懸濁液に添加した。感染 1 時間後に試験薬剤の 5%アラビアゴム懸濁液 0.2ml を 1 群 8 匹にそれぞれ経口投与した。マウスの生死観察を 7 日間続け, 半数の動物が生存する薬剤濃度 (ED₅₀) を probit⁵⁴⁾法を用いて算出した。

マウス呼吸器感染モデルに対する治療効果

ICR 系雄性マウス (3 週齢) を使用した。感染は噴霧感染し, 感染菌は臨床で分離された *S. pneumoniae* J-4 株及び *H. influenzae* J-48 株を使用した。これら菌株に対する各試験薬剤の MIC 値を Table 17 にまとめた。感染 24 時間後, 各試験薬剤を経口単回投与した。薬剤投与 24 時間後に肺内生菌数を測定し, 治療効果を CAM 及び AZM と比較した。検出限界は $\log < 1.48$ CFU/lung であった。*S. pneumoniae* J-4 を用いて作製した感染モデルでは肉眼で炎症症状が確認した。*H. influenzae* J-48 を用いて作製したモデルでは, 未治療感染群において肉眼で炎症反応は観察されなかったが菌の定着を確認した。

血漿薬剤濃度測定

ICR 系雄性マウスに対しては 5 mg/kg を経口投与した。雄性カニクイザルに対しては 5 mg/kg を経口投与及び静脈内投与した。薬剤投与後, 一定時間ごとに採血した血液から血漿を分離した。薬剤濃度は *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を検定菌とする薄層ディスク法 (バイオアッセイ) にて測定した。

参考文献

- 1) H. W. Flory, E. B. Chain, A. D. Gardner, N. G. Heatley, M. A. Jennings, J. Orr-Ewing, A. G. Sanders, *Lancet*, **240**, 226 (1940).
- 2) R. B. Woodward, *Angew. Chem.*, **69**, 50 (1957).
- 3) J. M. McGuire, R. L. Bunch, R. C. Anderson, H. E. Boaz, E. H. Flynn, H. M. Powel, J. W. Smith, *Antibiot. Chemother.*, **2**, 281 (1952).
- 4) C. W. Pettinga, W. M. Stark, F. R. Van Abeele, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 569 (1954).
- 5) P. F. Wiley, R. Gale, C. W. Pettinga, K. Gerzon, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 6074 (1957).
- 6) J. Major, J. R. Martin, R. S. Egan, J. W. Corcoran, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 1620 (1977).
- 7) J. R. Martin, R. L. DeVault, A. C. Sinclair, R. S. Stanaszek, P. Johnson, *J. Antibiotics*, **35**, 426 (1982).
- 8) I. O. Kibwage, G. Janssen, R. Busson, *J. Antibiotics*, **40**, 1 (1987).
- 9) V. C. Stephens, J. W. Conine, H. W. Murphy, *J. Am. Pharm. Associat.*, **48**, 620 (1959).
- 10) H. Bojarska-Dahlig, W. Slawinski, D. Roslik-Kaminska, A. Scheaeffer, A. Sipak-Krzysiak, E. Dzilinski, L. Skibinska, T. Prussak-Wieckowska, W. Kotula, R. Kadlubowski, A. Kurnatowska, *J. Antibiotics*, **29**, 907 (1976).
- 11) P. Kurath, P. H. Jones, R. S. Egan, T. J. Perun, *Experientia*, **27**, 362 (1971).
- 12) S. Morimoto, Y. Takahashi, Y. Watanabe, S. Omura, *J. Antibiotics*, **37**, 187 (1984).
- 13) G. M. Bright, A. A. Nagel, J. Bordner, K. A. Desai, J. N. Dibrino, J. Nowakowska, L. Vincent, R. M. Waltrous, F. C. Sciavolino, A. R. English, J. A. Retsema, M. A. Anderson, L. A. Brennan, R. J. Borovoy, C. R. Cimochofski, J. A. Faiella, A. E. Girard, D. Girard, C. Herbert, M. Manousos, R. Mason, *J. Antibiotics*, **41**, 1029 (1988).
- 14) J. C. Gasc, S. G. D'Ambrieres, A. Lutz, J. F. Chantot, *J. Antibiotics*, **44**, 313 (1991).
- 15) D. Felmingham, R. R. Reinert, Y. Hirakawa, A. Rodloff, *J. Antimicrob.*

Chemotherapy, **50**, Suppl. S1, 25 (2002).

- 16) (a) Or, Y. S.; Griesgraber G. W.; Chu, D. T. WO 9854197, 1998. (b) Wu Y. J. EP 952157, 1999. (c) Wu, Y. J. WO 9851696, 1998. (d) Or, Y. S.; Phan, L. T.; Chu, D. T.; Spina, K. P.; Hallas, R.; Elliott, R. L. WO 9717356, 1997. (e) Phan, L. T.; Or, Y. S.; Chen, Y.; Chu, D. T. W.; Ewing, P.; Nilius, A. M.; Bui, M. H.; Raney, P. M.; Hensey-rudloff, D.; Mitten, M.; Plattner, J. J. *38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, Abstr. No. F-127.
- 17) T. Asaka, M. Kashimura, Y. Misawa, T. Ono, K. Suzuki, H. Yoshida, T. Yoshida, T. Akashi, T. Nagate, S. Morimoto, *35th Interscience Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 1995; Abstr. No F-176.
- 18) C. Agouridas, Y. Benedetti, A. Denis, O. L. Martret, J. F. Chantot, *35th Interscience Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 1995; Abstr. No F-157.
- 19) A. Bryskier, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **8**, 1171 (1999).
- 20) A. Denis, C. Agouridas, J. –M. Auger, Y. Benedetti, A. Bonnefoy, F. Bretin, J. –F. Chantot, A. Dussarat, C. Fromentin, S. G. D'Ambrieres, S. Lachaud, P. Laurin, O. L. Martret, V. Loyau, N. Tessot, J. –M. Pejac, S. Perron, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 3075 (1999).
- 21) Y. S. Or, R. F. Clark, S. Wang, D. T. W. Chu, A. M. Nilius, R. K. Flamm, M. Mitten, P. Ewing, J. Alder, Z. Ma, *J. Med. Chem.*, **43**, 1045 (2000).
- 22) P. B. Fernandes, W. R. Baker, L. A. Freiberg, D. J. Hardy, E. J. McDonald, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**, 78 (1989).
- 23) F. T. Counter, P. W. Ensminger, D. A. Preston, C. Y. Wu, J. M. Greene, A. M. Felty-Duckworth, J. W. Paschal, H. A. Kirst, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 1116 (1991).
- 24) T. Tanikawa, T. Asaka, M. Kashimura, K. Suzuki, H. Sugiyama, M. Sato, K. Kameo, S. Morimoto, A. Nishida, *J. Med. Chem.*, **46**, 2706 (2003).
- 25) G. Griesgraber, Y. S. Or, D. T. W. Chu, A. M. Nilius, P. M. Johnson, R. K. Flamm, R. F. Henry, J. J. Plattner, *J. Antibiotics*, **49**, 465 (1996).
- 26) K. E. Pfitzner, J. G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 5661 (1965).
- 27) M. Kashimura, T. Asaka, Y. Misawa, K. Matsumoto, S. Morimoto, *J.*

- Antibiotics*, **54**, 664 (2001).
- 28) T. Asaka, M. Kashimura, Y. Misawa, S. Morimoto, K. Hatayama, WO 9321200, 1993.
- 29) M. Kashimura, T. Asaka, K. Suzuki, S. Morimoto, *J. Antibiotics*, **56**, 1062 (2003).
- 30) M. Kashimura, K. Matsumoto, T. Asaka, S. Morimoto, *Heterocycles*, **63**(9), 2057 (2004).
- 31) H. Iwasaki, Y. Sugawara, T. Adachi, S. Morimoto, *Acta Cryst.* **C49**, 1227 (1993).
- 32) C. Agouridas, A. Denis, J. M. Auger, Y. Benedetti, A. Bonnefoy, F. Bretin, J. F. Chantot, A. Dussarat, C. Fromentin, S. G. D'Ambrieres, S. Lachaud, P. Laurin, O. L. Martret, V. Loyau, N. Tessot, *J. Med. Chem.*, **41**, 4080 (1998).
- 33) F. Schlunzen, R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. franceschi, *Nature*, **413**, 814 (2001).
- 34) J. G. Benarous, M. Delaforge, C. K. Jankowski, J-P. Girault, *J. Med. Chem.*, **34**, 111 (1991).
- 35) A. Awan, J. Barber, R. J. Brennam, J. A. Parkinson, *Magn. Reson. Chem.*, **30**, 1241 (1992).
- 36) J. M. McGill, R. Johnson, *Magn. Reson. Chem.*, **31**, 273 (1993).
- 37) F. Commodari, G. E. Sclavos, A. Khiat, Y. Boulanger, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1947 (1998).
- 38) J. H. Liang, G. W. Yao, *Heterocycles*, **60**, 2527 (2003).
- 39) J. R. Everett, J. W. Tyler, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1659 (1987).
- 40) J. R. Everett, J. W. Tyler, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 815 (1987).
- 41) W. E. Steinmetz, R. Bersch, J. Towson, D. Pesiri, *J. Med. Chem.*, **35**, 4842 (1992).
- 42) A. Awan, R. J. Brennan, A. C. Regan, J. Barber, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 1645.
- 43) G. Bertho, J. Gharbi-Benarous, M. Delaforge, C. Lang, A. Parent, J.-P. Girault, *J. Med. Chem.*, **41**, 3373 (1998).
- 44) S. P. Kasprzyk, R. A. Kolinski, *Polish Journal of Chemistry*, **58**, 721 (1984).
- 45) J. M. McGill, R. Johnson, *Tetrahedron*, **50**, 3857 (1994).

- 46) G. Lazarevski, M. Vinkovic, G. Kobrehel, S. Dokic, B. Metelko, D. Vikić-Topic, *Tetrahedron*, **49**, 721 (1993).
- 47) J. R. Everett, I. K. Hatton, J. W. Tyler, *Magn. Reson. Chem.*, **28**, 114 (1990).
- 48) 長手尊俊, 小野武夫, 杉田和彦, 明石敏, 森川悦子, 宮崎真奈美, 竹市千恵, 大村貞文, *Chemotherapy*, **36**, S-3, 156 (1988).
- 49) H. Sakakibara, O. Okekawa, T. Fujiwara, M. Otani, S. Omura, *J. Antibiotics*, **34**, 1001 (1981).
- 50) T. Ono, M. Kashimura, K. Suzuki, R. Oyauchi, J. Miyachi, H. Ikuta, H. Kawauchi, T. Akashi, T. Asaka, S. Morimoto, *J. Antibiotics*, **57**, 518 (2004).
- 51) P. Zhong, R. Hammond, Z. Cao, Y. Chen, D. Shortridge, A. Nilius, R. K. Flamm, Y. S. Or, *5th International Conference on Macrolides, Azalides, Streptogramins, Ketolides and Oxazolidinones*. Seville, Spain, 2000; Poster No. 02.16.
- 52) Crystallographic data for **10a**, **2** and **21** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication no. CCDC-242618, CCDC-242619 and CCDC-242620, respectively. See <http://www.ccdc.cam.ac.uk/> to obtain these crystal data.
- 53) Japan Society of Chemotherapy: Revised method for determining the minimum inhibitory concentration (MIC). *Chemotherapy*, **29**, 76 (1981).
- 54) D. J. Finney, Probit Analysis. 2nd. Ed., Cambridge University Press, 48~64 (1952).

