

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7209633号
(P7209633)

(45)発行日 令和5年1月20日(2023.1.20)

(24)登録日 令和5年1月12日(2023.1.12)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P 17/16 (2006.01)

C 1 2 P 17/16

C 0 7 D 309/30 (2006.01)

C 0 7 D 309/30

Z C S P

A 6 1 K 31/351 (2006.01)

A 6 1 K 31/351

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

C 1 2 N 1/20 (2006.01)

C 1 2 N 1/20

A

請求項の数 15 (全40頁)

(21)出願番号 特願2019-550649(P2019-550649)

(86)(22)出願日 平成30年3月16日(2018.3.16)

(65)公表番号 特表2020-510065(P2020-510065
A)

(43)公表日 令和2年4月2日(2020.4.2)

(86)国際出願番号 PCT/EP2018/056665

(87)国際公開番号 WO2018/167270

(87)国際公開日 平成30年9月20日(2018.9.20)

審査請求日 令和3年3月16日(2021.3.16)

(31)優先権主張番号 17382140.6

(32)優先日 平成29年3月17日(2017.3.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

微生物の受託番号 CECT CECT 9225

(73)特許権者 505404208

ファルマ、マール、ソシエダード、アノ
ニマ

PHARMA MAR, S. A.

スペイン・E-28770・マドリッド

・コルメナール・ヴィエホ・アヴェニー

ダ・デ・ロス・レジェス・1・ポリゴノ

・インダストリアル・ラ・ミナ

Poligono Industrial

La Mina, Avda. de los

Reyes, 1, Colmenar V

iejo, E-28770 Madri

d, SPAIN

(74)代理人 100108453

弁理士 村山 靖彦

最終頁に続く

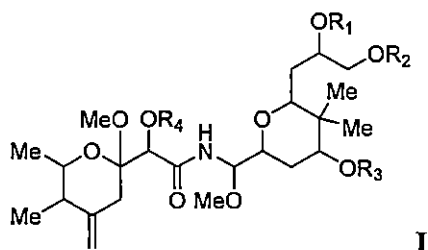
(54)【発明の名称】 抗がん化合物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

一般式Iの化合物、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体

【化1】



(式中、

R₁及びR₃は、水素、置換又は非置換C₁～C₁₂アルキル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルケニル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルキニル、-C(=O)R_a、-C(=O)OR_b及び-C(=O)NR_cR_dからそれぞれ独立して選択され;

R₂は、水素、-C(=O)R_a、-C(=O)OR_b、及び-C(=O)NR_cR_dから選択され;

R₄は、水素、-C(=O)R_a、-C(=O)OR_b、及び-C(=O)NR_cR_dから選択され;

R_aは、水素、置換又は非置換C₁～C₁₂アルキル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルケニル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルキニル、アリール及びヘテロシクリルから選択され;

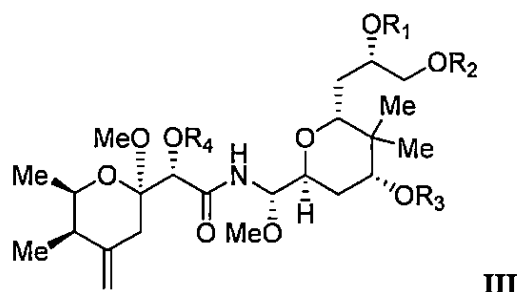
R_bは、置換又は非置換C₁～C₁₂アルキル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルケニル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルキニル、アリール及びヘテロシクリルから選択され;並びに

R_c及びR_dは、水素、置換又は非置換C₁～C₁₂アルキル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルケニル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルキニル、アリール及びヘテロシクリルから独立して選択される)。

【請求項2】

前記化合物が一般式IIIを有する請求項1に記載の化合物、又はその薬学的に許容される塩若しくは互変異性体

【化2】



III

(式中、R₁、R₂、R₃及びR₄は、式Iについて請求項1に規定の通りである)。

【請求項3】

R₁が、水素及び置換又は非置換C₁～C₆アルキルから選択される、請求項1又は2に記載の化合物。

【請求項4】

R₁が、水素及びメチルから選択される、請求項3に記載の化合物。

【請求項5】

R₂が、水素及び-C(=O)R_aから選択され、ここで、R_aは、置換又は非置換C₁～C₆アルキルから選択される、請求項1から4のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項6】

R₂が、水素及びアセチルから選択される、請求項5に記載の化合物。

【請求項7】

R₃及びR₄が、水素及び-C(=O)R_aから独立して選択され、ここで、それぞれの出現におけるR_aは、置換又は非置換C₁～C₆アルキルから独立して選択される、請求項1から6のいずれか一項に記載の化合物。

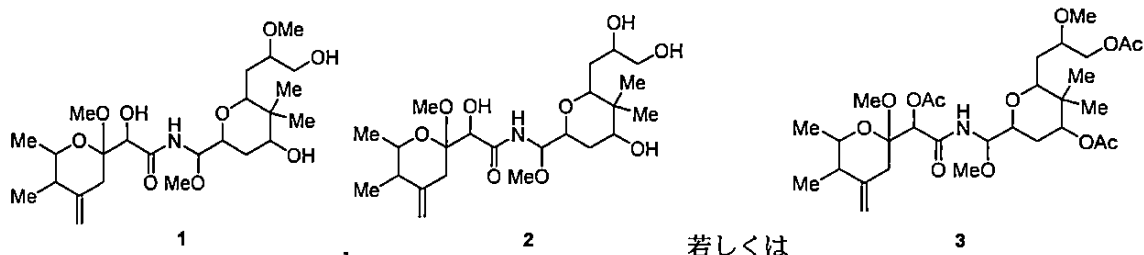
【請求項8】

R₃及びR₄が、水素及びアセチルから独立して選択される、請求項7に記載の化合物。

【請求項9】

式:

【化3】



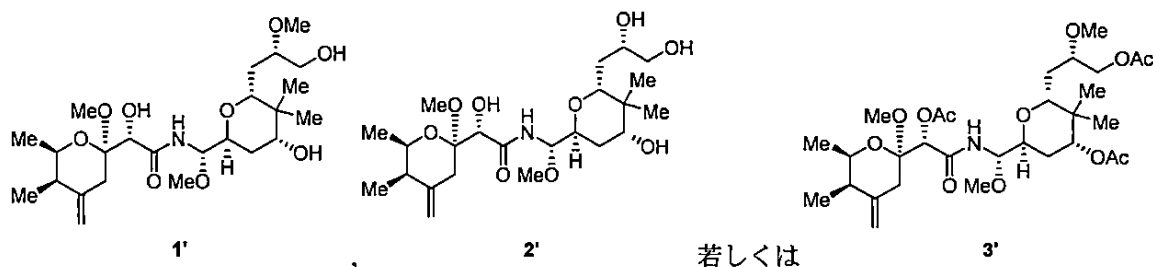
若しくは

の請求項1に記載の化合物、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体。

【請求項10】

式:

【化 4】



の請求項9に記載の化合物、又はその薬学的に許容される塩若しくは互変異性体。

10

【請求項 1 1】

請求項1から10のいずれか一項に記載の化合物、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体と、薬学的に許容される担体又は希釈剤とを含む医薬組成物。

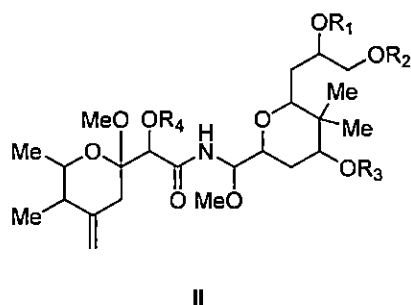
【請求項 1 2】

脾臓がんの治療用の、請求項1から10のいずれか一項に記載の化合物、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体を含む医薬組成物。

【請求項 1 3】

式IIの化合物、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体

【化 5】



20

(式中、

30

- R_1 及び R_3 は、水素、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、 $-C(=O)R_a$ 、 $-C(=O)OR_b$ 及び $-(C=O)NR_cR_d$ からそれぞれ独立して選択され;

- R_2 は、水素、 $-C(=O)R_a$ 、 $-C(=O)OR_b$ 、及び $-(C=O)NR_cR_d$ から選択され;

- R_4 は、水素、 $-C(=O)R_a$ 、 $-C(=O)OR_b$ 、及び $-(C=O)NR_cR_d$ から選択され;

- R_a は、水素、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、アリール及びヘテロシクリルから選択され;

- R_b は、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、アリール及びヘテロシクリルから選択され;

- R_c 及び R_d は、水素、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、アリール及びヘテロシクリルから独立して選択される)

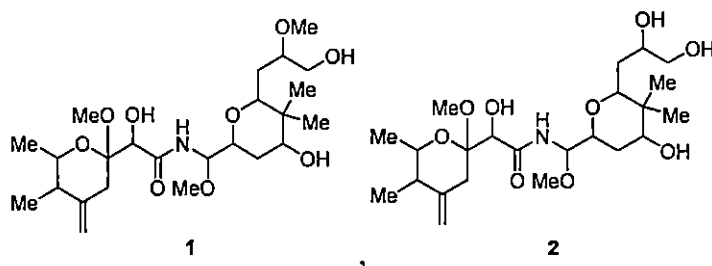
40

を得る方法であって、

- スペインバレンシア大学のColeccion Espanola de Cultivos Tipoに受託番号CECT-9225で寄託された野生型海洋細菌株PHM005又はその変異体を適切な条件下で培養して式:

50

【化 6】



の化合物1及び/又は2を生成する工程;

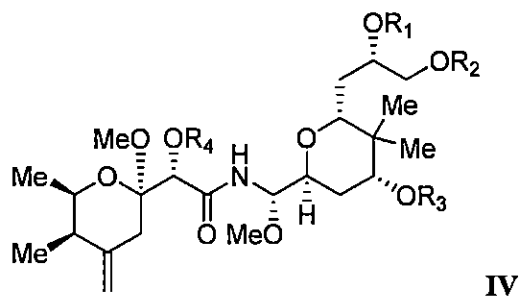
- 化合物1又は2を単離する工程;及び、必要に応じて、
- 化合物1又は2を誘導体化する工程

を含む、方法。

【請求項 1 4】

式IIの前記化合物が一般式IVを有する化合物

【化 7】



又はその薬学的に許容される塩若しくは互変異性体

(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 、及び R_4 は、式IIについて請求項13に規定の通りである)

である、請求項13に記載の方法。

【請求項 1 5】

スペインバレンシア大学のColeccion Espanola de Cultivos Tipoに受託番号CECT-9 225で寄託された、生物学的に純粋な菌株PHM005。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、細菌からの抗がん化合物の直接又は間接的製造及び新規な抗がん化合物、それらを含む医薬組成物、並びに抗がん剤としてのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

1949年、Uetaは、甲虫パエデルス・フスキペス(Paederus fuscipes)からの毒性成分の単離を報告した(Kyushu Igaku Zasshi、1949、249頁)。4年後、同じ甲虫種からの同一の物理的特性を持つ物質が、Pavan及びBo(Physiol. Comp. Oecol. 1953、3、307頁)によっても記述された。ペデリンと命名されたこの毒性化合物の構造は、1965年、Cardani及び共同研究者(Tetrahedron Lett. 1965、2537頁)によって最初に提案されたが、1968年、Furusaki及び共同研究者(Tetrahedron Lett. 1968、6301頁)によって誘導体の結晶構造に基づき修正された。ペデリンの構造は、次の通りである:

【0 0 0 3】

10

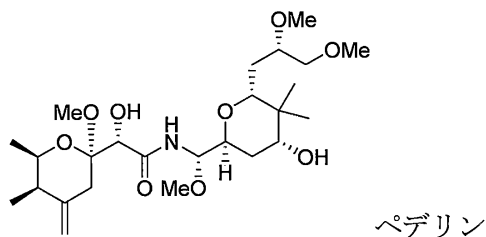
20

30

40

50

【化1】



10

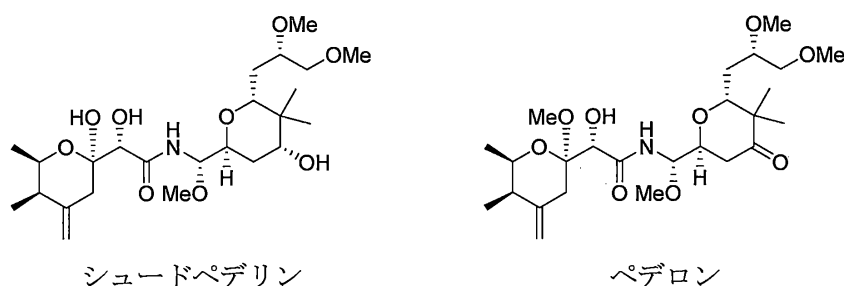
【0004】

加えて、Cardaniのグループは、シュードペデリン及びペデロンと命名された、パエデルス・フスキペスからの2種の追加の化合物の単離を報告している。ペデロンは、2年後に記述された(Tetrahedron Lett. 1967、41、4023頁)。

【0005】

【化2】

20



30

【0006】

ペデリンは、強力な細胞毒性剤であり発癌剤である。Brega及び共同研究者(J. Cell Biol. 1968, 485～496頁)は、多数の細胞株、例えばEUE、E6D、HeLa、KB、Hep、AS、MEF、CE、BHK、Z1及びM1に対してペデリンをテストし、分析した全ての細胞株で4日以内に細胞死を引き起こすには3nMのオーダーの濃度で十分であることを報告している。加えて、ペデリンは、タンパク質及びDNA合成の即時障害を引き起こす。

【0007】

シュードペデリンの細胞毒性は、Soldati及び共同研究者(Experientia 1966、3、176～178頁)によっても記述されている。シュードペデリンは、ペデリンよりも毒性が低く、10倍の用量で活性がある。

40

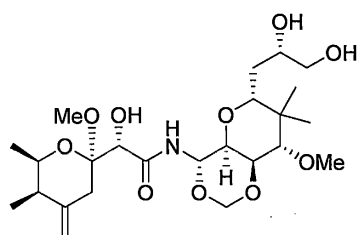
【0008】

欧州特許EP0289203は、ニュージーランドにおいて収集されたミカーレ属(Mycale sp.)海綿から単離された化合物であるミカラミドAの単離並びに抗腫瘍及び抗ウイルス活性を開示する。

【0009】

50

【化3】



ミカラミド A

10

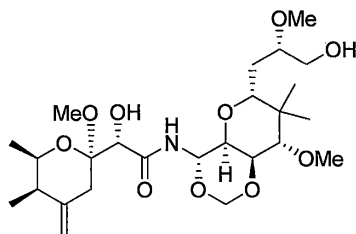
【0010】

その発明者であるMunroのグループは、同じ供給源から抗腫瘍及び抗ウイルス活性を持つ密接に関連する化合物であるミカラミドBの単離を更に報告した(J. Org. Chem. 1990、55、223頁)。

【0011】

【化4】

20



ミカラミド B

30

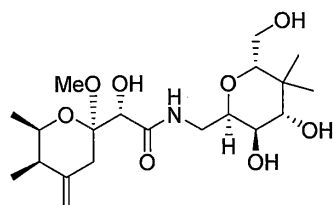
【0012】

彼らは更に、2種の追加のミカラミドであるミカラミドC及びDをスティリノス(Stylinos)海綿から単離した(J. Nat. Prod. 2000、63、704頁)。ミカラミドA、B、C及びDは、P-388マウス白血病細胞株に対するIC₅₀値がそれぞれ3.0、0.7、95.0及び35ng/mLである。

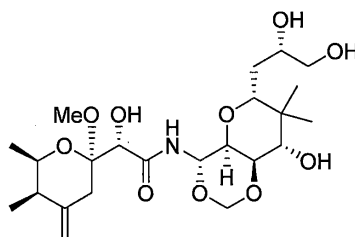
【0013】

【化5】

40



ミカラミド C



ミカラミド D

50

【0014】

ミカラミドは、臨床薬シクロスポリンAに匹敵するin vitro有効性を持つ強力な免疫抑制性であることも示されている。

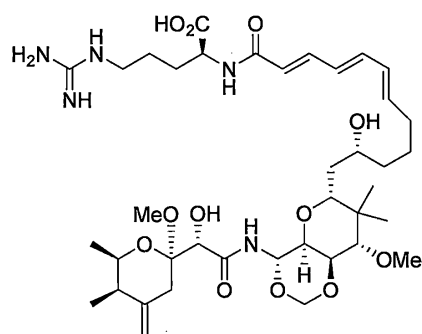
【0015】

US4801606は、日本沖で収集されたテオネラ属(*Theonella* sp.)サンプルからのオンナミドAの単離を記載する。オンナミドAは、マウスP388細胞株に対する IC_{50} 値が1ng/mLの抗腫瘍化合物である。抗ウイルス活性も有している。

【0016】

【化6】

10



オンナミドA

20

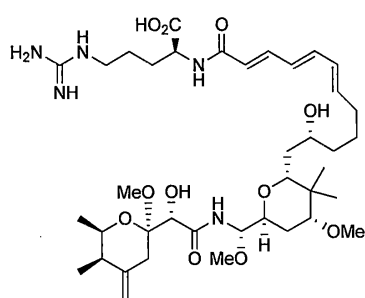
【0017】

オンナミドファミリーは、幾つかのメンバーを含有する。そのうちの3種、オンナミドD～Fは、オンナミドAのジオキソラン環が欠如している。オンナミドD及びEは、テオネラ海綿からMatsunaga及び共同研究者(Tetrahedron、1992、48、8369頁)によって単離され、オンナミドFは、海綿トラキクラドゥス・ラエヴィスピルリファ(*Trachycladus laevispirulifer*)からCaponグループ(J. Nat. Prod. 2001、64、640頁)によって採取された。

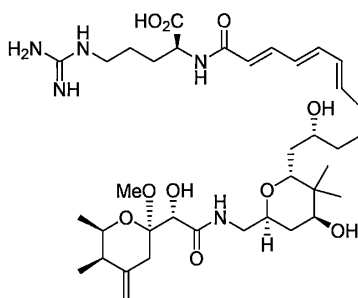
30

【0018】

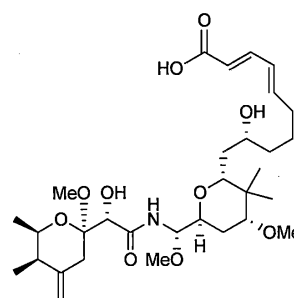
【化7】



オンナミドD



オンナミドE



オンナミドF

40

【0019】

オンナミドEは、0.4 μ g/mLの濃度ではP388細胞株に対して細胞毒性活性を示さず、オ

50

ンナミドFは、強力な抗線虫剤として記述されている。

【0020】

ペデリンの細菌生合成に関する実験的証拠は、Kellnerによって最初に提供され、Kellnerは、ペデリン陽性の雌の卵を育てることでペデリン産生形質を非産生パエデルス属(*Paederus* spp.)株に伝播できると報告した(Chemoecology、2001、11、127頁)。対照的に、抗生剤で処理された卵は、この効果を引き起こさなかった。この結果は、非産生菌にコロニーを作ることができるペデリン産生菌の存在を示している(J. Insect. Physiol.、2001、47、475頁)。

【0021】

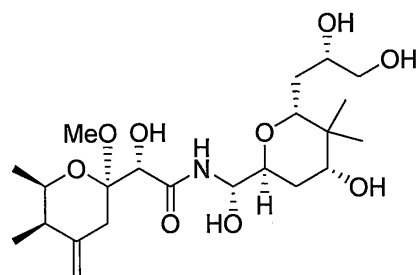
Piel及び共同研究者は、ペデリン(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、2002、99、14002頁及びWO2003044186)、及びオンナミド(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、2004、101、16222頁)のポリケチドシンターゼ(PKS)のための遺伝子クラスターを単離した。この研究は、これらの化合物の真の供給源としての共生細菌を強く示唆し、それは、異種生命体からの構造的に類似した化合物の単離に対する説明を提供する。共生生物の提案に関する概説については、Piel、J.、Curr. Med. Chem. 2006、13、39頁を参照されたい。

【0022】

別の密接に関連する化合物、ジアホリンは、Nakabachi及び共同研究者(Current Biology 2013、23(15)、1478~1484頁)によって昆虫ジアホリナ・シトリ(*Diaphorina citri*)から単離された。この化合物も細胞毒性があり、IC₅₀値はB104及びHeLa細胞に対してそれぞれおよそ1 μ M及びおよそ2 μ Mである。ジアホリナ・シトリの抽出物におけるその存在は、ジアホリナ・シトリに関連する防御的な共生細菌であるカンジダタス・プロフテラ・アルマツラ(*Candidatus Proffttella armatura*)のポリケチドシンターゼ(PKS)系の分析により、同じ出版物において予測された。

【0023】

【化8】



ジアホリン

【0024】

他方、特許出願WO2013016120は、ペデリンと式:

【0025】

10

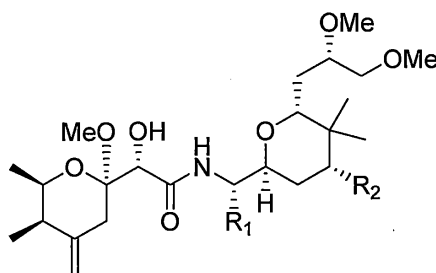
20

30

40

50

【化 9】



10

【0026】

のその類似体の全合成を記載し、ここで、 R_1 又は R_2 の少なくとも一方は、標的部分に結合できる反応性官能基を含むリンカーを含む。この全合成は、多成分アシルアミナル構造に基づく。

【0027】

ペデリン、ミカラミド及びオンナミドの薬理学的特性に関する詳細な研究は、天然源からのこれらの化合物の希少性によって妨げられてきた。例えば、ペデリンの構造を解明するのに十分な材料を単離するには、およそ100kgのパエデルス・フスキペスが必要であった。ペデリン及びオンナミドのPKS系は記述されているが、バイオテクノロジー的な方法でこれらの化合物を得ることは未だに不可能である。従って、現時点でこれらの興味深い化合物を得るための実用的な方法は、全合成である。ペデリン及びミカラミドの全合成が多数報告されている。最近、それらがWitezak及び共同研究者(Mini Rev. Med. Chem. 2012、12(14)、1520～1532頁)、並びにFlorescu及びMosey(Nat. Prod. Rep. 2012、29、980頁)によって再検討された。

20

【0028】

これらの合成は、十分な材料を生物学的試験に供給するのに十分に短い経路を導き出し、これらの化合物の構造-活性相関の開発に有用な類似体を提供した。しかし、これらの化合物及びその新規な抗腫瘍類似体へのより簡潔な経路を提供する必要性が依然として残っている。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0029】

【文献】 欧州特許EP0289203

US4801606

WO2003044186

WO2013016120

40

【非特許文献】

【0030】

【文献】 Ueta、Kyushu Igaku Zasshi、1949、249頁

Pavan及びBo、Physiol. Comp. Oecol. 1953、3、307頁

Cardani及び共同研究者、Tetrahedron Lett. 1965、2537頁

Furusaki及び共同研究者、Tetrahedron Lett. 1968、6301頁

Cardaniのグループ、Tetrahedron Lett. 1967、41、4023頁

Brega及び共同研究者、J. Cell Biol. 1968、485～496頁

Soldati及び共同研究者、Experientia 1966、3、176～178頁

Munroのグループ、J. Org. Chem. 1990、55、223頁

50

Munroのグループ、J. Nat. Prod. 2000、63、704頁
 Matsunaga及び共同研究者、Tetrahedron、1992、48、8369頁
 Caponグループ、J. Nat. Prod. 2001、64、640頁
 Kellner、Chemoecology、2001、11、127頁
 Kellner、J. Insect. Physiol.、2001、47、475頁
 Piel及び共同研究者、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、2002、99、14002頁
 Piel及び共同研究者、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、2004、101、16222頁
 Piel、J.、Curr. Med. Chem. 2006、13、39頁
 Nakabachi及び共同研究者、Current Biology 2013、23(15)、1478～1484頁
 Witezak及び共同研究者、Mini Rev. Med. Chem. 2012、12(14)、1520～1532頁
 Floreancig及びMosey、Nat. Prod. Rep. 2012、29、980頁
 Wuts、PGM及びGreene TW、Protecting Groups in Organic Synthesis第4版、Wiley-Interscience
 Kocienski PJ、Protecting Groups第3版、Georg Thieme Verlag
 Biebl及び共同研究者、Evol. Microbiol. 2007、57、1095～1107頁
 Cook及びMyers、International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology、2003、53、1907～1915頁
 March's Advanced Organic Chemistry第7版、2013、Wiley Interscience
 Weber及び共同研究者、Nucleic Acid Research、2015 doi: 10.1093/nar/gkv437
 J. Piel、J. Bacteriol. 2004、186(5)、1280～1286頁
 Simpson、J. S.ら、J. Nat. Prod. 2000、63、704～706頁
 Matsuda、F.ら、Tetrahedron 1988、44、7063～7080頁
 Wan、S.ら、J. Am. Chem. Soc. 2011、133、16668～16679頁
 Skehanら、J. Natl. Cancer Inst. 1990、82、1107～1112頁
 The American National Standards Institute and the Society for Laboratory Automation and Screening (ANSI SLAS 1-2004(R2012)10/12/2011)
 Boyd MR及びPaull KD. Drug Dev. Res. 1995、34、91～104頁

【発明の概要】

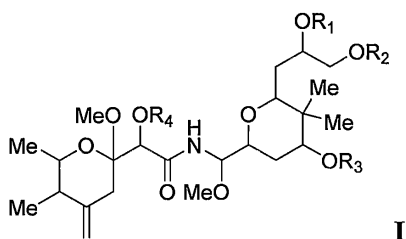
【課題を解決するための手段】

【0031】

第1の態様において、本発明は、一般式Iの化合物、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体

【0032】

【化10】



【0033】

(式中、

R₁、R₂、及びR₃は、水素、置換又は非置換C₁～C₁₂アルキル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルケニル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルキニル、-C(=O)R_a、-C(=O)OR_b及び-(C=O)N

$R_c R_d$ からそれぞれ独立して選択され;

R_4 は、水素、 $-C(=O)R_a$ 、 $-C(=O)OR_b$ 、及び $-C(=O)NR_c R_d$ から選択され;

R_a は、水素、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、アリール及びヘテロシクリルから選択され;

R_b は、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、アリール及びヘテロシクリルから選択され;

R_c 及び R_d は、水素、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、アリール及びヘテロシクリルから独立して選択され;

ただし、 R_1 及び R_2 は、同時にメチルではない)
に関する。

10

【0034】

第2の態様において、本発明は、式Iの化合物、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体を、薬学的に許容される担体又は希釈剤と共に含む医薬組成物に関する。

【0035】

第3の態様において、本発明は、医薬として、特にがんを治療するための医薬として使用するための、式Iの化合物、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体に関する。

【0036】

第4の態様において、本発明は、医薬として、特にがんを治療するための医薬として使用するための、式Iの化合物を含む医薬組成物に関する。

20

【0037】

第5の態様において、本発明はまた、がんの治療、又は好ましくはがんの治療のための医薬の調製における、式Iの化合物、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体の使用に関する。本発明の他の態様は、治療方法、及びこれらの方法で使用するための化合物である。従って、本発明は更に、がんに罹患した患者、とりわけヒトを治療する方法であって、先に規定の化合物の治療効果のある量の投与を、それを必要とする前記罹患個体に行うことを含む方法を提供する。

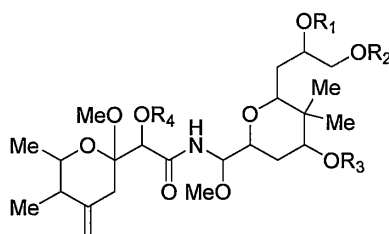
【0038】

第6の態様において、本発明は、式IIの化合物、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体

30

【0039】

【化11】



II

40

【0040】

(式中、

R_1 、 R_2 、及び R_3 は、水素、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、 $-C(=O)R_a$ 、 $-C(=O)OR_b$ 及び $-(C=O)N$

50

$R_c R_d$ からそれぞれ独立して選択され;

R_4 は、水素、 $-C(=O)R_a$ 、 $-C(=O)OR_b$ 、及び $-C(=O)NR_c R_d$ から選択され;

R_a は、水素、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、アリール及びヘテロシクリルから選択され;

R_b は、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、アリール及びヘテロシクリルから選択され;

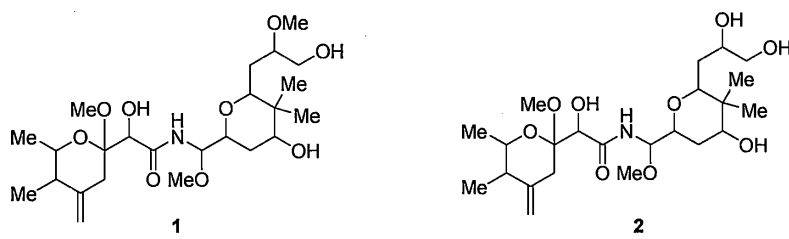
R_c 及び R_d は、水素、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルケニル、置換又は非置換 $C_2 \sim C_{12}$ アルキニル、アリール及びヘテロシクリルから独立して選択される)

を得る方法であって、

- 野生型海洋細菌株PHM005又はその変異体を適切な条件下で培養して式:

【0041】

【化12】



【0042】

の化合物1及び/又は2を生成する工程;

- 化合物1又は2を単離する工程;及び、必要に応じて、
- 化合物1又は2を誘導体化する工程

を含む方法に関する。

【0043】

第7の態様において、本発明は、菌株PHM005に関する。化合物1及び2の自由生活性海洋アルファプロテオバクテリア生産菌は、特許を目的としてCECTコレクションにコードCECT-9225で寄託されている。

【0044】

第8の態様において、本発明は、Lab生合成遺伝子クラスターを含む、又はLab生合成遺伝子クラスターを含む配列に相補的である単離された核酸配列を提供する。この遺伝子クラスターは、ペデリン様及びオンナミド様化合物の生合成をコード化する培養可能細菌由来の遺伝子の最初の例を表す。

【0045】

第9の態様において、本発明は、図3に示す遺伝子lab706、lab707、lab708、lab709、lab710、lab711、lab712、lab713、lab714、lab715、lab716、lab717、lab718、lab719、lab720、lab721、lab722、lab723、lab724、lab725及び/又はlab726からなる群から選択される核酸断片を提供する。

【0046】

第10の態様において、本発明は、上記の核酸配列によってコード化されたモジュール型酵素系に関する。モジュール型酵素系は、好ましくはペデリン様及びオンナミド様化合物並びに/又はポリケチド部分並びに/又は非リボソームペプチド部分の生合成において機能活性を有する。

【0047】

第11の態様において、本発明は、ラブレミア属(*Labrenzia* sp.)、特に菌株PHM005に由来するLab生合成遺伝子クラスターから本質的になる核酸を含むベクター、又は上記の核酸配列を含むベクターに関する。

【0048】

第12の態様において、本発明は、前記核酸を含む、又は前記ベクターを含有する組換え型宿主細胞又はトランスジェニック生物に関する。

【0049】

第13の態様において、本発明は、上記のPHM005の変異体又は組換え型宿主細胞又はトランスジェニック生物を使用してペデリン様又はオンナミド様化合物を生成する方法であって、

- PHM005の変異体又は組換え型宿主細胞又はトランスジェニック生物をLab生合成遺伝子クラスターを発現させる条件下で培養する工程;及び

- 生成されたペデリン様及び/又はオンナミド様化合物を単離する工程を含む方法に関する。

【0050】

本発明の他の態様は、改変Lab生合成遺伝子クラスターの調製における先に規定の核酸の使用、ペデリン様又はオンナミド様化合物の調製における先に規定の核酸の使用、並びに細菌におけるペデリン様及びオンナミド様化合物の産生を改善するための方法であって、a)変異誘発剤の存在下で菌株PHM005を変異誘発を可能にする十分な期間培養する工程、及びb)ペデリン様又はオンナミド様化合物の産生増加をもたらす表現型の変化による前記変異体を選択する工程を含む方法に関する。変異誘発剤は、化学的薬剤、例えばダウノルビシン及びニトロソグアニジン;物理的变化を生じさせるもの、例えばガンマ線照射若しくは紫外線照射;又は生物学的薬剤、例えばトランスポゾン等であってもよい。例示的な改変としては、メチル化及びヒドロキシル化を回避するためのテラリング遺伝子のノックアウトが挙げられる。

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】ラブレミア属PHM005の電子顕微鏡法(ネガティブ染色)。中期指数増殖期の細胞を400メッシュの炭素-コロジオンコーティングしたグリッドに2分間吸着させ、2%酢酸ウラニルでネガティブ染色し、100kVで作動するJeol社JEM 1011透過型電子顕微鏡で画像化し、CCDのGatan社Erlangshen ES1000Wカメラで撮影した。

【図2】PHM005とラブレミア及びスタピア(*Stappia*)属の近縁種の基準株との関係を示す16S rRNA遺伝子配列に基づく近隣結合樹。系統樹は、ペアワイズアラインメントベースの類似度係数とBioNumerics V7.5(Applied Maths社)を使用したクラスター分析用のUPGMAによって生成した。系統発生的近隣を同定し、SILVA LTPs123データベースとの比較によりペアワイズ16S rDNA遺伝子配列の類似性を計算した。

【図3】Lab生合成遺伝子クラスターのマップ。全Lab遺伝子クラスターアイランド:69Kb。

【図4】CDCl₃中の化合物1の¹H NMRスペクトル。

【図5】CDCl₃中の化合物1の¹³C NMRスペクトル。

【図6】CDCl₃中の化合物1のgCOSYスペクトル。

【図7】CDCl₃中の化合物1のTOCSYスペクトル。

【図8】CDCl₃中の化合物1のgHSQCスペクトル。

【図9】CDCl₃中の化合物1のLR-HSQMBCスペクトル。

【図10】CDCl₃中の化合物1のROESYスペクトル。

【発明を実施するための形態】

【0052】

配列の簡単な説明

本願において言及される配列は、添付の配列リストに記載されている。これらの配列を下記に簡単に要約する:

10

20

30

40

50

- 配列番号1 ラブレングシア属PHM005の16S rRNA遺伝子の配列(1355bp)。
配列番号2 Lab生合成遺伝子クラスターの核酸配列。
配列番号3 Lab706推定アシル担体タンパク質のタンパク質配列。
配列番号4 Lab707推定HMGSのタンパク質配列。
配列番号5 Lab708PKSのタンパク質配列。
配列番号6 Lab709TransAT PKSのタンパク質配列。
配列番号7 Lab710推定アシル担体タンパク質のタンパク質配列。
配列番号8 Lab711推定FADオキシゲナーゼのタンパク質配列。
配列番号9 Lab712推定o-メチルトランスフェラーゼのタンパク質配列。
配列番号10 Lab713推定シトクロムP450のタンパク質配列。
配列番号11 Lab714推定マロニルCoA-ACPトランスアシラーゼ又はFMTオキシドレダクターゼのタンパク質配列。
配列番号12 Lab715推定マロニルCoA-ACPトランスアシラーゼ又はアシルトランスフェラーゼのタンパク質配列。
配列番号13 Lab716マロニルCoA-ACPトランスアシラーゼのタンパク質配列。
配列番号14 Lab717エノイル-CoAヒドラーゼのタンパク質配列。
配列番号15 Lab718ベータ-ケトアシルシンテターゼのタンパク質配列。
配列番号16 Lab719TransAT PKS/NRPSのタンパク質配列。
配列番号17 Lab720推定FADモノオキシゲナーゼのタンパク質配列。
配列番号18 TransAT PKSの一部であるLab721のタンパク質配列。
配列番号19 TransAT PKSの一部であるLab722のタンパク質配列。
配列番号20 PKSの一部であるLab723のタンパク質配列。
配列番号21 TransAT PKS/NRPSの一部であるLab724のタンパク質配列。
配列番号22 PKSの一部であるLab725のタンパク質配列。
配列番号23 Lab726推定o-メチルトランスフェラーゼのタンパク質配列。

【0053】

本発明は、先に規定した一般式Iの化合物に関する。

【0054】

本明細書においてマーカッシュ式により規定されている化合物では、下記のガイダンスに従い基を選択することができる：

【0055】

アルキル基は、分枝でも非分枝でもよく、好ましくは1～約12個の炭素原子を有する。アルキル基のより好ましいクラスの1つは、1～約6個の炭素原子を有する。更により好ましいのは、1、2、3又は4個の炭素原子を有するアルキル基である。メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、並びにn-ブチル、tert-ブチル、sec-ブチル及びイソブチルを含むブチルが本発明の化合物における特に好ましいアルキル基である。本明細書において使用した場合、アルキルという用語は、特に明記しない限り、環状及び非環状基の両方を指すが、ただし、環状基は、少なくとも3個の炭素環員を含む。

【0056】

本発明の化合物におけるアルケニル及びアルキニル基は、分枝でも非分枝でもよく、1つ又は複数の不飽和結合と2～約12個の炭素原子を有する。アルケニル及びアルキニル基のより好ましいクラスの1つは、2～約6個の炭素原子を有する。更により好ましいのは、2、3又は4個の炭素原子を有するアルケニル及びアルキニル基である。アルケニル及びアルキニルという用語は、本明細書において使用した場合、環状及び非環状基の両方を指すが、ただし、環状基は、少なくとも3個の炭素環原子を含む。

【0057】

本発明の化合物における好適なアリール基は、分離及び/又は縮合アリール基を含有する複数の環化合物を含む、単一及び複数の環化合物を含む。典型的なアリール基は、1～3つの分離又は縮合環と、6～約18個の炭素環原子を含有する。好ましくは、アリール基は、6～約14個の炭素環原子を含有する。特別に好ましいアリール基としては、置換又は非置

10

20

30

40

50

換フェニル、置換又は非置換ナフチル、置換又は非置換ビフェニル、置換又は非置換フェナントリル及び置換又は非置換アントリルが挙げられる。最も好ましいアリール基は、置換又は非置換フェニルである。

【0058】

好適な複素環基としては、1～3つの分離及び/又は縮合環と5～約18個の環原子を含有する複素芳香族及び複素脂環式基が挙げられる。好ましくは、複素芳香族及び複素脂環式基は、5～約10個の環原子、より好ましくは5、6又は7個の環原子を含有する。本発明の化合物における好適な複素芳香族基は、N、O又はS原子から選択される1、2又は3個のヘテロ原子を含有し、例えば、8-クマニルを含むクマニル、8-キノリルを含むキノリル、イソキノリル、ピリジル、ピラジニル、ピラゾリル、ピリミジニル、フリル、ピロリル、チエニル、チアゾリル、イソチアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、イソオキサゾリル、オキサゾリル、イミダゾリル、インドリル、イソインドリル、インダゾリル、インドリジニル、フタラジニル、プテリジニル、プリニル、オキサジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、ピリダジニル、トリアジニル、シンノリニル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾフラニル、ベンゾフラザニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル、及びフロピリジルが挙げられる。本発明の化合物における好適な複素脂環式基は、N、O又はS原子から選択される1、2又は3個のヘテロ原子を含有し、例えば、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジル、モルホリニル、チオモルホリニル、チオキサニル、ピペラジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ホモピペリジル、オキセパニル、チエパニル、オキサゼピニル、ジアゼピニル、チアゼピニル、1,2,3,6-テトラヒドロピリジル、2-ピロリニル、3-ピロリニル、インドリニル、2H-ピラニル、4H-ピラニル、ジオキサニル、1,3-ジオキサソラニル、ピラゾリニル、ジチアニル、ジチオラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロフラニル、ピラゾリジニル、イミダゾリニル、イミダゾリジニル、3-アザビシクロ[3.1.0]ヘキシル、3-アザビシクロ[4.1.0]ヘプチル、3H-インドリル、及びキノリジニルが挙げられる。

【0059】

上記の基は、1つ又は複数の利用可能な位置で、1つ又は複数の好適な基、例えばOR'、=O、SR'、SOR'、SO₂R'、OSO₂R'、NO₂、NHR'、NR'R'、=N-R'、N(R')COR'、N(COR')₂、N(R')SO₂R'、N(R')C(=NR')N(R')R'、CN、ハロゲン、COR' COOR'、OCOR'、OCOOR'、OCONHR'、OCON(R')R'、CON(R')R'、CON(R')OR'、CON(R')SO₂R'、PO(OR')₂、PO(OR')R'、PO(OR')(N(R')R')、保護されたOH、置換又は非置換C₁～C₁₂アルキル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルケニル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルキニル、置換又は非置換アリール、及び置換又は非置換複素環基によって置換されていてもよく、ここで、R'基のそれぞれは、水素、OH、NO₂、NH₂、SH、CN、ハロゲン、COH、COアルキル、COOH、置換又は非置換C₁～C₁₂アルキル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルケニル、置換又は非置換C₂～C₁₂アルキニル、置換又は非置換アリール、及び置換又は非置換複素環基からなる群から独立して選択される。こうした基がそれ自体置換されている場合、置換基は前述のリストより選択されてもよい。

【0060】

本発明の化合物における好適なハロゲン基又は置換基としては、F、Cl、Br、及びIが挙げられる。

【0061】

1,2-ジオールのための保護基を含むOHのための好適な保護基は、当業者に周知である。有機化学における保護基の総説は、Wuts、PGM及びGreene TWによるProtecting Groups in Organic Synthesis第4版、Wiley-Interscience、並びにKocienski PJによるProtecting Groups第3版、Georg Thieme Verlagに提供されている。これらの参考文献は、OHのための保護基に関する項目を提供している。これらの参考文献は全て、その全体が参照により組み込まれる。

【0062】

本発明の範囲内で、OH保護基は、好適な保護されたOH基の形成によるOH基の保護から生じるO結合部分であると規定される。そうした保護されたOHの例としては、エーテル、シリルエーテル、エステル、スルホナート、スルフェナート及びスルフィナート、カルボナート及びカルバマートが挙げられる。エーテルの場合、OHのための保護基は、メチル、メトキシメチル、メチルチオメチル、(フェニルジメチルシリル)メトキシメチル、ベンジルオキシメチル、p-メトキシベンジルオキシメチル、[(3,4-ジメトキシベンジル)オキシ]メチル、p-ニトロベンジルオキシメチル、o-ニトロベンジルオキシメチル、[(R)-1-(2-ニトロフェニル)エトキシ]メチル、(4-メトキシフェノキシ)メチル、グアイアコールメチル、[(p-フェニルフェニル)-オキシ]メチル、t-ブトキシメチル、4-ペンテニルオキシメチル、シロキシメチル、2-メトキシエトキシメチル、2-シアノエトキシメチル、ビス(2-クロロエトキシ)メチル、2,2,2-トリクロロエトキシメチル、2-(トリメチルシリル)-エトキシメチル、メントキシメチル、O-ビス(2-アセトキシエトキシ)メチル、テトラヒドロピラニル、亜フッ素酸テトラヒドロピラニル、3-ブロモテトラヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、1-メトキシシクロヘキシル、4-メトキシテトラヒドロピラニル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニル、4-メトキシテトラヒドロチオピラニルS,S-ジオキシド、1-[(2-クロロ-4-メチル)フェニル]-4-メトキシピペリジン-4-イル、1-(2-フルオロフェニル)-4-メトキシピペリジン-4-イル、1-(4-クロロフェニル)-4-メトキシピペリジン-4-イル、1,4-ジオキサ-2-イル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチオフラニル、2,3,3a,4,5,6,7,7a-オクタヒドロ-7,8,8-トリメチル-4,7-メタノベンゾフラン-2-イル、1-エトキシエチル、1-(2-クロロエトキシ)エチル、2-ヒドロキシエチル、2-ブロモエチル、1-[2-(トリメチルシリル)エトキシ]エチル、1-メチル-1-メトキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシエチル、1-メチル-1-ベンジルオキシ-2-フルオロエチル、1-メチル-1-フェノキシエチル、2,2,2-トリクロロエチル、1,1-ジアニル-2,2,2-トリクロロエチル、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-フェニルイソプロピル、1-(2-シアノエトキシ)エチル、2-トリメチルシリルエチル、2-(ベンジルチオ)エチル、2-(フェニルセレニル)エチル、t-ブチル、シクロヘキシル、1-メチル-1'-シクロプロピルメチル、アリル、プレニル、シンナミル、2-フェナリル、プロパルギル、p-クロロフェニル、p-メトキシフェニル、p-ニトロフェニル、2,4-ジニトロフェニル、2,3,5,6-テトラフルオロ-4-(トリフルオロメチル)フェニル、ベンジル、p-メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、2,6-ジメトキシベンジル、o-ニトロベンジル、p-ニトロベンジル、ペンタジエニルニトロベンジル、ペンタジエニルニトロピペロニル、ハロベンジル、2,6-ジクロロベンジル、2,4-ジクロロベンジル、2,6-ジフルオロベンジル、p-シアノベンジル、亜フッ素酸ベンジル、4-フルオロウサルコキシベンジル、トリメチルシリルキシリル、p-フェニルベンジル、2-フェニル-2-プロピル、p-アシルアミノベンジル、p-アジドベンジル、4-アジド-3-クロロベンジル、2-トリフルオロメチルベンジル、4-トリフルオロメチルベンジル、p-(メチルスルフィニル)ベンジル、p-シレタニルベンジル、4-アセトキシベンジル、4-(2-トリメチルシリル)エトキシメトキシベンジル、2-ナフチルメチル、2-ピコリル、4-ピコリル、3-メチル-2-ピコリルN-オキシド、2-キノリニルメチル、6-メトキシ-2-(4-メチルフェニル-4-キノリンメチル、1-ピレニルメチル、ジフェニルメチル、4-メトキシジフェニルメチル、4-フェニルジフェニルメチル、p,p'-ジニトロベンズヒドリル、5-ジベンゾスベリル、トリフェニルメチル、トリス(4-t-ブチルフェニル)メチル、α-ナフチルジフェニルメチル、p-メトキシフェニルジフェニルメチル、ジ(p-メトキシフェニル)フェニルメチル、トリ(p-メトキシフェニル)メチル、4-(4'-ブロモフェナシルオキシ)フェニルジフェニルメチル、4,4',4''-トリス(4,5-ジクロロフタルイミドフェニル)メチル、4,4',4''-トリス(レブリンイルオキシフェニル)メチル、4,4',4''-トリス(ベンゾイルオキシフェニル)メチル、4,4'-ジメトキシ-3''-[N-(イミダゾリルメチル)]トリチル、4,4'-ジメトキシ-3''-[N-(イミダゾリルエチル)カルバモイル]トリチル、ビス(4-メトキシフェニル)-1'-ピレニルメチル、4-(17-テトラベンゾ[a,c,g,i]フルオレニルメチル)-4,4''-ジメトキシトリチル、9-アントリル、9-(9-フェニル)キサンテニル、9-フェニルチオキサントニル、9-(9-フェニル-10-オキソ)アントリル、1,3-ベンゾジチオラン-2-イル、及び4,5-ビス(エトキシカルボニル)-[1,3]-ジオキサラン-2-イル、ベンゾイソチアゾ

10

20

30

40

50

リルS,S-ジオキシドから選択することができる。シリルエーテルの場合、OHのための保護基は、トリメチルシリル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリル、ジメチルイソプロピルシリル、ジエチルイソプロピルシリル、ジメチルヘキシルシリル、2-ノルボルニルジメチルシリル、t-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリル、トリベンジルシリル、トリ-p-キシリルシリル、トリフェニルシリル、ジフェニルメチルシリル、ジ-t-ブチルメチルシリル、ビス-(t-ブチル)-1-ピレニルメトキシシリル、トリス(トリメチルシリル)シリル、(2-ヒドロキシステチル)ジメチルシリル、(2-ヒドロキシステチル)ジイソプロピルシリル、t-ブチルメトキシフェニルシリル、t-ブトキシジフェニルシリル、1,1,3,3-テトライソプロピル-3-[2-(トリフェニルメトキシ)エトキシ]ジシロキサン-1-イル、及びフルオラスシリルから選択することができる。エステルの場合、OHのための保護基は、それが結合している保護されていないOHの酸素原子と一緒にあって、ホルメート、ベンゾイルホルメート、アセテート、クロロアセテート、ジクロロアセテート、トリクロロアセテート、トリクロロアセトアミデート、トリフルオロアセテート、メトキシアセテート、トリフェニルメトキシアセテート、フェノキシアセテート、p-クロロフェノキシアセテート、フェニルアセテート、ジフェニルアセテート、3-フェニルプロピオネート、ビスフルオラス鎖型プロパノイル、4-ペンテノエート、4-オキソペンタノエート、4,4-(エチレンジチオ)ペンタノエート、5-[3-ビス(4-メトキシフェニル)ヒドロキシメチルフェノキシ]レブリネート、ピバロエート、1-アダマントエート、クロトネート、4-メトキシクロトネート、ベンゾエート、p-フェニルベンゾエート、2,4,6-トリメチルベンゾエート、4-プロモベンゾエート、2,5-ジフルオロベンゾエート、p-ニトロベンゾエート、ピコリネート、ニコチネート、2-(アジドメチル)ベンゾエート、4-アジドブチレート、(2-アジドメチル)フェニルアセテート、2-[[トリチルチオ]オキシ]メチル}ベンゾエート、2-[[[(4-メトキシトリチルチオ)オキシ]メチル}ベンゾエート、2-[[メチル(トリチルチオ)アミノ]メチル}ベンゾエート、2-[[[(4-メトキシトリチル)チオ]メチルアミノ]-メチル}ベンゾエート、2-(アリルオキシ)フェニルアセテート、2-(プレニルオキシメチル)ベンゾエート、6-(レブリニルオキシメチル)-3-メトキシ-2-ニトロベンゾエート、6-(レブリニルオキシメチル)-3-メトキシ-4-ニトロベンゾエート、4-ベンジルオキシブチレート、4-トリアルキルシリルオキシブチレート、4-アセトキシ-2,2-ジメチルブチレート、2,2-ジメチル-4-ペンテノエート、2-ヨードベンゾエート、4-ニトロ-4-メチルペンタノエート、o-(ジプロモメチル)ベンゾエート、2-ホルミルベンゼンスルホネート、4-(メチルチオメトキシ)ブチレート、2-(メチルチオメトキシメチル)ベンゾエート、2-(クロロアセトキシメチル)ベンゾエート、2-[(2-クロロアセトキシ)エチル]ベンゾエート、2-[2-ベンジルオキシ)エチル]ベンゾエート、2-[2-(4-メトキシベンジルオキシ)エチル]ベンゾエート、2,6-ジクロロ-4-メチルフェノキシアセテート、2,6-ジクロロ-4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノキシアセテート、2,4-ビス(1,1-ジメチルプロピル)フェノキシアセテート、クロロジフェニルアセテート、イソブチレート、モノスクシノエート、(E)-2-メチル-2-ブテノエート、o-(メトキシカルボニル)ベンゾエート、 α -ナフトエート、ニトレート、アルキルN,N,N',N'-テトラメチルホスホロジアミデート、及び2-クロロベンゾエートから選択することができるエステルを形成する。スルホナート、スルフェナート及びスルフィナートの場合、OHのための保護基は、それが結合している保護されていないOHの酸素原子と一緒にあって、スルフェート、アリルスルホネート、メタンスルホネート、ベンジルスルホネート、トシレート、2-[(4-ニトロフェニル)エチル]スルホネート、2-トリフルオロメチルベンゼンスルホネート、4-モノメトキシトリチルスルフェネート、アルキル2,4-ジニトロフェニルスルフェネート、2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-3-オン-1-スルフィネート、及びジメチルホスフィノチオリルから選択することができるスルホナート、スルフェナート又はスルフィナートを形成する。カルボナートの場合、OHのための保護基は、それが結合している保護されていないOHの酸素原子と一緒にあって、メチルカルボネート、メトキシメチルカルボネート、9-フルオレニルメチルカルボネート、エチルカルボネート、プロモエチルカルボネート、2-(メチルチオメトキシ)エチルカルボネート、2,2,2-トリクロロエチルカルボネート、1,1-ジメチル-2,2,2-トリクロロエチルカルボネート、2-(トリメチルシリル)エチルカルボネート、2-[ジメチル

10

20

30

40

50

(2-ナフチルメチル)シリル]エチルカルボネート、2-(フェニルスルホニル)エチルカルボネート、2-(トリフェニルホスホニオ)エチルカルボネート、cis-[4-[[[メトキシトリチル)スルフェニル]オキシ]テトラヒドロフラン-3-イル]オキシカルボネート、イソブチルカルボネート、t-ブチルカルボネート、ビニルカルボネート、アリルカルボネート、シンナミルカルボネート、プロパルギルカルボネート、p-クロロフェニルカルボネート、p-ニトロフェニルカルボネート、4-エトキシ-1-ナフチルカルボネート、6-ブromo-7-ヒドロキシクマリン-4-イルメチルカルボネート、ベンジルカルボネート、o-ニトロベンジルカルボネート、p-ニトロベンジルカルボネート、p-メトキシベンジルカルボネート、3,4-ジメトキシベンジルカルボネート、アントラキノ-2-イルメチルカルボネート、2-ダンシルエチルカルボネート、2-(4-ニトロフェニル)エチルカルボネート、2-(2,4-ジニトロフェニル)エチルカルボネート、2-(2-ニトロフェニル)プロピルカルボネート、アルキル2-(3,4-メチレンジオキシ-6-ニトロフェニル)プロピルカルボネート、2-シアノ-1-フェニルエチルカルボネート、2-(2-ピリジルアミノ-1-フェニルエチルカルボネート、2-[N-メチル-N-(2-ピリジル)]アミノ-1-フェニルエチルカルボネート、フェナシルカルボネート、3',5'-ジメトキシベンゾインカルボネート、メチルジチオカルボネート、及びS-ベンジルチオカルボネートから選択することができるカルボネートを形成する。カルバマートの場合、OHのための保護基は、それが結合している保護されていないOHの酸素原子と一緒にあって、ジメチルチオカルバマート、N-フェニルカルバマート、及びN-メチル-N-(o-ニトロフェニル)カルバマートから選択することができるカルバマートを形成する。

【0063】

本発明の範囲内で、1,2-ジオール保護基は、保護された1,2-ジオールの形成による1,2-ジオールの同時保護から生じるO結合部分であると規定される。そうした保護された1,2-ジオールの例としては、環状アセタール及びケタール、環状オルトエステル、シリル誘導体、ジアルキルシリレン誘導体、環状カルボナート、環状ボロナートが挙げられる。環状アセタール及びケタールの例としては、メチレンアセタール、エチリデンアセタール、t-ブチルメチリデンアセタール、1-t-ブイルエチリデンケタール、1-フェニルエチリデンケタール、2-(メトキシカルボニル)エチリデン(モクデン)アセタール、又は2-(t-ブチルカルボニル)エチリデン(ボクデン)アセタール、フェニルスルホニルエチリデンアセタール、2,2,2-トリクロロエチリデンアセタール、3-(ベンジルオキシ)プロピルアセタール、アクロレインアセタール、アセトニド(イソプロピリデンケタール)、シクロペンチリデンケタール、シクロヘキシリデンケタール、シクロヘプチリデンケタール、ベンジリデンアセタール、p-メトキシベンジリデンアセタール、1-(4-メトキシフェニル)エチリデンケタール、2,4-ジメトキシベンジリデンアセタール、3,4-ジメトキシベンジリデンアセタール、p-アセトキシベンジリデンアセタール、4-(t-ブチルジメチルシリルオキシ)ベンジリデンアセタール、2-ニトロベンジリドアセタール、4-ニトロベンジリデンアセタール、メシチレンアセタール、6-ブromo-7-ヒドロキシクマリン-2-イルメチリデンアセタール、1-ナフトアルデヒドアセタール、2-ナフトアルデヒドアセタール、9-アントラセンアセタール、ベンゾフェノンケタール、ジ-(p-アニシル)メチリデンアセタール、キサント-9-イリデンケタール、2,7-ジメチルキサント-9-イリデンケタール、ジフェニルメチレンケタール、カンファーケタール、及びメントンケタールが挙げられる。環状オルトエステルの例としては、メトキシメチレンアセタール、エトキシメチレンアセタール、2-オキサシクロペンチリデンオルトエステル、ジメトキシメチレンオルトエステル、1-メトキシエチリデンオルトエステル、1-エトキシエチリデンオルトエステル、フタリドオルトエステル、1,2-ジメトキシエチリデンオルトエステル、 α -メト

キシベンジリデンオルトエステル、1-(N,N-ジメチルアミノ)エチリデン誘導体、 α -(N,N-ジメチルアミノ)ベンジリデン誘導体、ブタン2-3-ビスアセタール(BBA)、シクロヘキサ-1,2-ジアセタール(CDA)、及びジスピロケタールが挙げられる。シリル誘導体の例としては、ジ-t-ブチルシリレン基(DTBS(OR)₂)、1-(シクロヘキシル)-1-(メチル)シリレン(Cy)(Me)Si(OR)₂、ジ-イソプロピルシリレン(i-プロピル)₂Si(OR)₂、ジシクロヘキシルシリレン(Cy)₂Si(OR)₂、1,3-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサニリデン)誘導体(TIPDS(

10

20

30

40

50

OR)₂)、1,1,3,3-テトラ-*t*-ブトキシジシロキサニリデン誘導体(TBDS(OR)₂)、メチレン-ビス-(ジイソプロピルシラノキサニリデン)(MDPS(OR)₂)、及び1,1,4,4-テトラフェニル-1,4-ジシラニリデン(SIBA(OR)₂)が挙げられる。環状ボロナートの例としては、メチルボロナート、エチルボロナート、フェニルボロナート、及び*o*-アセトアミドフェニルボロナートが挙げられる。

【0064】

これらの基についての言及は、OHのための保護基の単なる例示として言及されているため、本発明の範囲の限定として解釈すべきではないが、前記機能を有する更なる基が当業者に知られている可能性もあり、それらも本発明に包含されると理解すべきである。

【0065】

「薬学的に許容される塩」という用語は、患者に投与されると、本明細書に記載の化合物を(直接又は間接的に)提供することができる任意の薬学的に許容される塩を指す。ただし、当然のことながら、薬学的に許容されない塩も、薬学的に許容される塩の調製に有用な場合があるため、本発明の範囲に含まれる。塩の調製は、当技術分野で公知の方法により行うことができる。

【0066】

例えば、本明細書において提供される化合物の薬学的に許容される塩は、従来の化学的方法により塩基性又は酸性部分を含有する親化合物から合成される。一般に、そうした塩は、例えば、水中又は有機溶媒中又は両者の混合物中でこれらの化合物の遊離酸又は塩基形態を化学量論量の適切な塩基又は酸と反応させることによって調製される。一般に、エーテル、酢酸エチル、エタノール、2-プロパノール又はアセトニトリルのような非水性媒体が好ましい。酸付加塩の例としては、鉱酸付加塩、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等、及び有機酸付加塩、例えば酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、マンデル酸塩、メタンスルホン酸塩及び*p*-トルエンスルホン酸塩等が挙げられる。アルカリ付加塩の例としては、無機塩、例えばナトリウム、カリウム、カルシウム及びアンモニウム塩等、及び有機アルカリ塩、例えばエチレンジアミン、エタノールアミン、*N,N*-ジアルキレンエタノールアミン、トリエタノールアミン及び塩基性アミノ酸塩等が挙げられる。

【0067】

本発明の化合物は、遊離化合物又は溶媒和物(例えば水和物、アルコール、特にメタラート)のいずれかとして結晶形でも非晶形でもよく、これらの形態のいずれもが本発明の範囲内にいることが意図される。溶媒和の方法は、当技術分野において一般に公知である。本発明の化合物は、異なる多形形態を呈してもよく、本発明はそのような形態全てを包含することが意図される。

【0068】

本明細書において言及される化合物はいずれも、そうした特定の化合物に加え、特定のバリエーション又は形態を表すことが意図されている。特に、本明細書において言及される化合物は、不斉中心を有してもよく、従って、異なる鏡像異性体又はジアステレオマーの形態で存在してもよい。従って、本明細書において言及される所与の化合物はいずれも、ラセミ化合物、1つ又は複数の鏡像異性体形態、1つ又は複数のジアステレオマー形態、及びこれらの混合物のいずれか1種を表すことが意図される。同様に、二重結合に関する立体異性又は幾何異性も可能であり、従って、場合によっては、分子が(*E*)-異性体又は(*Z*)-異性体(トランス及びシス異性体)として存在する可能性もある。分子が幾つかの二重結合を含有する場合、各二重結合はそれ自体の立体異性を有しており、それは、分子の他の二重結合の立体異性と同じである可能性も異なる可能性もある。更に、本明細書において言及される化合物は、アトロプ異性体として存在してもよい。本明細書において言及される化合物のエナンチオマー、ジアステレオ異性体、幾何異性体及びアトロプ異性体を含む立体異性体の全て、並びにそれら混合物は、本発明の範囲内にあるとみなされる。

【0069】

【 0 0 7 0 】

10

【 0 0 7 1 】

20

【 0 0 7 2 】

【 0 0 7 3 】

【化 1 3】



【 0 0 7 4 】

【 0 0 7 5 】

40

【 0 0 7 6 】

50

最も好ましい R_2 は、水素及びアセチルである。

【0077】

一般式I及びIIIの化合物において、特に好ましい R_3 及び R_4 は、水素及び $-C(=O)R_a$ から独立して選択され、ここで、それぞれの出現における R_a は、置換又は非置換 $C_1\sim C_{12}$ アルキルから独立して選択される。より好ましくは、それぞれの出現における R_a は、置換又は非置換 $C_1\sim C_6$ アルキルから独立して選択される。更により好ましくは、それぞれの出現における R_a は、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*tert*-ブチル、*sec*-ブチル及びイソブチルから独立して選択される。最も好ましくは、 R_3 及び R_4 は、水素及びアセチルから独立して選択される。

【0078】

追加の好ましい実施形態において、異なる置換基についての上記の優先傾向が組み合わされる。本発明はまた、上記一般式I及びIIIにおける好ましい置換のそうした組合せに関する。

【0079】

一実施形態において、 R_1 は、置換又は非置換 $C_1\sim C_6$ アルキルから選択され、 R_2 は水素である。

【0080】

別の実施形態において、 R_1 は、置換又は非置換 $C_1\sim C_6$ アルキルから選択され、 R_2 は $-C(=O)R_a$ であり、ここで、 R_a は、置換又は非置換 $C_1\sim C_{12}$ アルキルである。

【0081】

更なる実施形態において、 R_1 と R_2 の両方が水素である。

【0082】

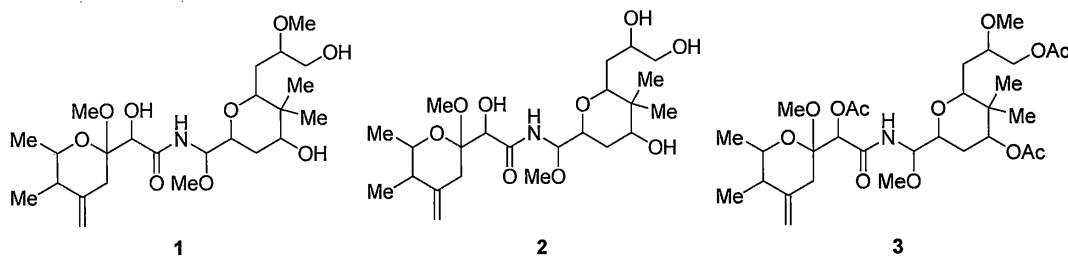
本発明の説明及び定義において、本発明の化合物中に幾つかの基 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 又は R が存在し、明示的にそう述べられていない限り、当然ながらそれらは、所与の定義の中でそれぞれ独立して異なる可能性がある、即ち、 R_a は、本発明の所与の化合物において必ずしも同時に同じ基を表すとは限らないことを理解するべきである。

【0083】

本発明の特に好ましい化合物は、下記

【0084】

【化14】



【0085】

又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体である。

【0086】

本発明の最も好ましい化合物は、下記:

【0087】

10

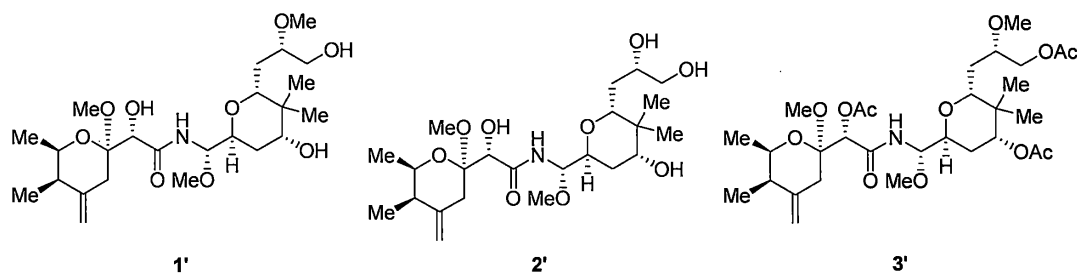
20

30

40

50

【化 15】



10

【0088】

又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体である。

【0089】

化合物1及び2は、菌株PHM005と命名されたラブレングア属から単離された。このアルファプロテオバクテリアは、インド洋で収集された海洋堆積物サンプルから単離された。透過型電子顕微鏡法による細胞の観察(図1)により、単一の垂極性の挿入された鞭毛を有する運動性桿菌(幅0.6~0.8 μm 、長さ1.6~2.1 μm)の識別が可能であった。この菌株の培養物は、スペインバレンシア大学のCECT(「Coleccion Espanola de Cultivos Tipo」)に受託番号CECT-9225で寄託されている。この寄託は、ブダペスト条約の規定の下でなされた。

20

【0090】

この細菌は、増殖するには2.5%を超えるNaClを必要とするため、明らかに海洋塩に依存しており、1の産生のための海洋塩の最適濃度は、海洋条件に類似の36g/Lである。マリンアガー2216(DIFCO)上のコロニーはベージュ色であり、ほぼ透明で平滑であり、全縁を持つ。3週間後、コロニーは、ラブレングア・アレキサンドリイ(*Labrenzia alexandrii*)DFL-11^Tに関して記載(Biebl及び共同研究者、Evol. Microbiol.、2007、57、1095~1107頁)されているように、おそらくはバクテリオクロロフィルaとカロテノイド産生の影響のために暗褐色となる。

30

【0091】

産生微生物の単離のため、操作は全て無菌状態で行われた。PHM005は下記の組成(g/L)の海塩培地を用いてペトリ皿に直接広げた堆積物の冷凍サンプルから単離された:海塩(Tropic Marin(登録商標)PRO-REEF)、27;寒天、16;シクロヘキシミド0.2mg/mLを補充。プレートを大気圧下28℃で3週間インキュベートした。この期間の後、わずかに褐色のコロニーを選んで同じ海塩培地に移し、純度を確認し、分類と発酵の研究を開始した。

【0092】

PHM005の分類学的評価は、標準的手順に従い16S rRNAの部分配列により行った。PHM005をマリンブロス(DIFCO 1196)で72時間増殖させた。細胞を回収し、4%NP40で10分間煮沸することにより溶解させた。細胞残屑を遠心分離により廃棄した。16S rRNAを、Cook及びMyers (International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology、2003、53、1907~1915頁)が記載する細菌プライマF1及びR5を使用したポリメラーゼ連鎖反応により増幅させた。得られたほぼ全長の16S rRNA遺伝子配列を配列番号:1に示す。

40

【0093】

系統樹は、ペアワイズアラインメントベースの類似度係数とクラスター分析用BioNumerics V7.5を使用したクラスター分析用のUPGMAによって生成した。系統発生的近隣を同定し、SILVA LTPs123データベースとの比較によりペアワイズ16S rRNA遺伝子配列の類似性を計算した。系統樹を図2に示す。

50

【0094】

PHM005は、適切な培地において制御された条件下で培養すると、化合物1及び2を産生する。この菌株は、増殖するために明らかに海洋塩を必要とする。この菌株を、好ましくは従来の水性栄養培地で増殖させる。培養は、好気性条件で推進しなければならず、化合物1及び2の産生は、3日間の26～28℃の間の増殖制御温度の後に開始させるべきである。従来の発酵タンクは、この生命体の培養を行うのに非常に適していることがわかっている。発酵の様々な段階での栄養素とpH制御、及び消泡剤の添加が、産生量を増やし、発泡を回避するために必要になる場合がある。

【0095】

本発明の化合物は、十分なバイオマスを成長させるために、菌株PHM005のコロニー又は冷凍した純粋な培養物から出発して生産することができる。この工程は、必要に応じて数回繰り返してもよく、収集した材料は、適切な培養培地を含む1つ又は幾つかの発酵フラスコ又はタンクに播種するための接種材料として使用される。これらのフラスコ又はタンクは、必要なブロスの体積に応じて、接種材料の成長又は産生段階に使用することができる。場合によっては、産生培地は、接種材料の成長に使用されるものとは異なっているもよい。

【0096】

本発明の化合物は、発酵ブロスから、主として細胞と菌株PHM005の上清から、適切な溶媒混合物で抽出するか、適切な樹脂に吸収させることにより、単離することができる。

【0097】

粗活性抽出物からの本発明の分離及び精製は、従来のクロマトグラフィー技法の適切な組合せを使用して遂行することができる。

【0098】

加えて、本発明の化合物は、天然源から既に得られているものを改変することにより、又は様々な化学反応を使用して既に改変されたものを更に改変することにより得ることができる。従って、ヒドロキシル基は、標準的なカップリング又はアシル化手順によって、例えばピリジン等の中で塩化アセチル又は無水酢酸を使用することによりアシル化することができる。ホルマート基は、対応するアルコキシドを酢酸ギ酸無水物と反応させることにより得ることができる。カルバマートは、ヒドロキシル前駆体をイソシアナートと共に加熱することにより得ることができる。カルボナートは、対応する無水物と活性剤、例えば $Mg(ClO_4)_2$ 又は $Zn(OAc)_2$ を使用することにより得ることができる。ヒドロキシル基は、臭化アルキル、ヨウ化アルキル若しくはスルホン酸アルキルを使用したアルキル化によってアルコキシ基に、又は例えば保護された2-プロモエチルアミンを使用することによりアミノ低級アルコキシ基に変換することもできる。必要な場合は、適切な保護基を置換基に使用して、反応基が影響を受けないようにし、ヒドロキシル基の選択的官能基化を全て達成することができる。これらの誘導体の調製に必要な手順及び試薬は、当業者に公知であり、一般的なテキスト、例えばMarch's Advanced Organic Chemistry第7版、2013、Wiley Interscienceに見いだすことができる。

【0099】

上記式I及びIIIの化合物の重要な特徴は、その生物活性、特に腫瘍細胞に対するその細胞毒性活性である。従って、本発明を用いて、細胞毒性活性を有する一般式I及びIIIの化合物、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体の医薬組成物、並びにその抗がん剤としての使用を提供する。本発明は更に、一般式I及びIIIの化合物、又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体を、薬学的に許容される担体又は希釈剤と共に含む医薬組成物を提供する。

【0100】

医薬組成物の例としては、経口、局所又は非経口投与用の任意の固体(タブレット、ピル、カプセル、顆粒、バイアル用粉末等)又は液体(溶液、懸濁液若しくはエマルション)組成物が挙げられる。

【0101】

10

20

30

40

50

本発明の化合物又は組成物の投与は、任意適切な方法、例えば静脈内注入、経口調製物、並びに腹腔内及び静脈内投与によるものであってもよい。最大24時間、より好ましくは1～12時間、最も好ましくは1～6時間の注入時間を使用することが最も好ましい。病院に一晩滞在せずに治療が行える短い注入時間がとりわけ望ましい。ただし、注入は、12～24時間でもよく、必要に応じて更に長くなってもよい。注入は、例えば1～4週間の適切な間隔で行ってもよい。本発明の化合物を含有する医薬組成物は、徐放性製剤において、リポソーム又はナノ粒子カプセル化により、又は他の標準的な送達手段により送達してもよい。

【0102】

化合物の正確な用量は、特定の製剤、適用様式、並びに治療されている特定の状況、宿主及び腫瘍に応じて変化する。他の要因、例えば年齢、体重、性別、食事、投与時間、排出速度、宿主の病状、薬物の組合せ、反応感度及び疾患の重症度を考慮すべきである。投与は、最大耐性用量内で連続的又は定期的に行うことができる。

【0103】

本明細書において使用した場合、「治療する」、「治療すること」及び「治療」という用語は、腫瘍又は原発性、局所性、若しくは転移性のがん細胞若しくは組織の根絶、除去、改変、又は制御及びがんの転移の最小化又は遅延を含む。

【0104】

本発明の化合物は、肺がん、結腸がん、乳がん及び膵臓がんを含むが、これに限定されない幾つかのがんのタイプに対する抗がん活性を有する。

【0105】

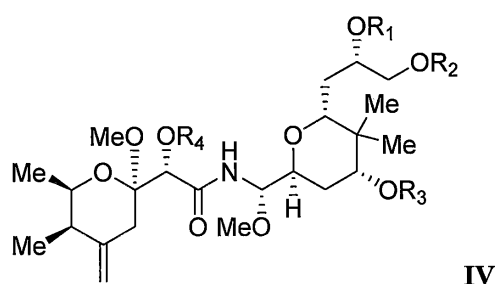
従って、本発明の代替的な実施形態において、先に規定した式I及びIIIの化合物を含む医薬組成物は、肺がん、結腸がん、乳がん又は膵臓がんの治療用である。

【0106】

第6の態様において、本発明は、式IIの化合物の製造方法に関する。本発明のこの態様による好ましい方法は、式IV

【0107】

【化16】



【0108】

又はその薬学的に許容される塩、互変異性体若しくは立体異性体
(式中、 R_1 、 R_2 、 R_3 及び R_4 は、一般式IIにおいて先に規定の通りである)
を更に有する化合物を製造する方法である。

【0109】

式II及びIVの化合物を合成する方法において、特に好ましい R_1 は、水素、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキル、及び $-C(=O)R_a$ から選択され、ここで、 R_a は、置換又は非置換 $C_1 \sim C_{12}$ アルキルである。より好ましくは、 R_1 は、水素、置換又は非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキル及び $-C(=O)R_a$ から選択され、ここで、 R_a は、置換又は非置換 $C_1 \sim C_6$ アルキルである。更により好ましくは、 R_1 は、水素、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*te*

rt-ブチル、sec-ブチル、イソブチル及び-C(=O)R_aから選択され、ここで、R_aは、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、tert-ブチル、sec-ブチル及びイソブチルから選択される。最も好ましいR₁は、水素及びメチルから選択される。

【0110】

式II及びIVの化合物を合成する方法において、特に好ましいR₂は、水素、置換又は非置換C₁~C₁₂アルキル、及び-C(=O)R_aから選択され、ここで、R_aは、置換又は非置換C₁~C₁₂アルキルである。より好ましくは、R₂は、水素、置換又は非置換C₁~C₆アルキル及び-C(=O)R_aから選択され、ここで、R_aは、置換又は非置換C₁~C₆アルキルである。更により好ましくは、R₂は、水素、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、tert-ブチル、sec-ブチル、イソブチル及び-C(=O)R_aから選択され、ここで、R_aは、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、tert-ブチル、sec-ブチル及びイソブチルから選択される。最も好ましいR₂は、水素、メチル及びアセチルである。

10

【0111】

式II及びIVの化合物を合成する方法において、特に好ましいR₃及びR₄は、水素及び-C(=O)R_aから独立して選択され、ここで、それぞれの出現におけるR_aは、置換又は非置換C₁~C₁₂アルキルから独立して選択される。より好ましくは、それぞれの出現におけるR_aは、置換又は非置換C₁~C₆アルキルから独立して選択される。更により好ましくは、R_aは、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、tert-ブチル、sec-ブチル及びイソブチルから選択される。最も好ましいR₃及びR₄は、水素及びアセチルから独立して選択される。

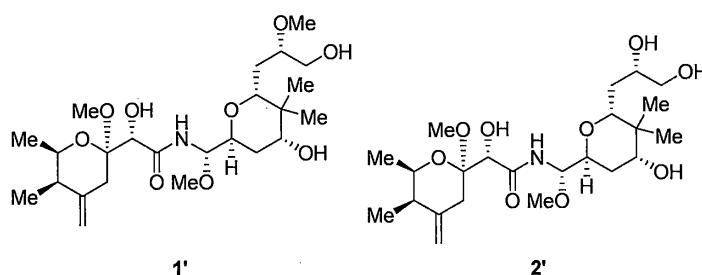
20

【0112】

式II及びIVの化合物を合成する方法において、特に好ましい化合物1及び2は、それぞれ下記の相対立体化学を有する：

【0113】

【化17】



30

【0114】

追加の好ましい実施形態において、異なる置換基についての上記の優先傾向が組み合わされる。本発明はまた、上記式II及びIVの化合物を合成する方法における好ましい置換基のそうした組合せに関する。

40

【0115】

本発明のこの態様のより好ましい実施形態において、式II又はIVの化合物は、ペデリンである。

【0116】

更により好ましい実施形態において、ペデリンは、化合物1'から、

- 保護された二次OHの存在下で保護された一次OHから選択的に除去されるのに好適な-OHのための保護基で化合物1'中の全てのヒドロキシ基を保護すること。そうした保護基の例としては、トリメチルシリル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリル及びtert-ブチルジメチルシリルが挙げられる。この工程に最も好ましい保護基は、tert-ブチルジメ

50

チルシリルである;

- 一次OH保護基を選択的に除去すること;
- 結果として得られる一次ヒドロキシ基を好適なメチル化試薬でメチル化すること;及び
- 他のOHのための保護基を除去すること

によって得られる。

【0117】

別のより好ましい実施形態において、ペデリンは、化合物2'から、

- 1,2-ジオール基を1,2-ジオールのための好適な保護基で保護すること。1,2-ジオールのための適切な保護基の例としては、対応する1,2-ジオールとの反応後にモクデン(Mocdene)アセタール、ボクデン(Bocdene)アセタール、アクロレインアセタール、ベンジリデンアセタール、(t-ブチルジメチルシリルオキシ)ベンジリデンアセタール、メシチレンアセタール、メトキシメチレンアセタール、エトキシメチレンアセタール、環状カルボナート、メチルボロナート及びエチルボロナートを生成する基が挙げられるが、これに限定されない。この工程により好ましい保護基は、モクデンアセタール、ボクデンアセタール、ベンジリデンアセタール及び環状カルボナートを生成するものであり、ベンジリデンアセタールを生成する保護基が最も好ましい;

- 他のヒドロキシ基を前工程の1,2-ジオール保護基と直交する-OHのための保護基で保護すること。この工程に好適なOHのための保護基の例は、トリメチルシリル、トリエチルシリル、トリイソプロピルシリルtert-ブチルジメチルシリル、及びアセチルである。この工程に最も好ましい保護基は、tert-ブチルジメチルシリル及びアセチルである;

- 1,2-ジオール保護基を除去すること;
- 結果として得られる1,2-ジオールを好適なメチル化試薬でメチル化すること;及び
- 他のOHのための保護基を除去すること

によって得られる。

【0118】

好適なメチル化試薬の例としては、ヨウ化メチル、臭化メチル、硫酸ジメチル及びメチルトリフラートが挙げられる。

【0119】

本発明の第8の態様による単離された核酸は、好ましくはラブレングシア属、特に菌株PHM005に由来するものである。

【0120】

この細菌の完全なゲノム配列は、ペデリン及びオンナミドの合成に関与する生合成遺伝子クラスターを明らかにした。生物情報学的分析を使用してクラスター内の遺伝子の機能を予測した。

【0121】

Lab遺伝子クラスターと命名されたこの遺伝子クラスターは、69KbのTrans-ATハイブリッドポリケチドシンターゼ/非リボソームシンターゼ(PKS/NRPS)遺伝子クラスターである。これは、ペデリン遺伝子クラスターについて記載されたものに相同な20のORFにより構成された菌株PHM005のゲノムの全配列決定からのゲノムマイニングから推定された。それは、ペデリン様及びオンナミド様化合物の生合成のための遺伝子コード化酵素を含有する。

【0122】

好ましい実施形態において、単離された核酸は、図3により詳細に示すように、好ましくはLab生合成遺伝子クラスターの個々のユニット及び/又はモジュールを形成する核酸断片を含む。図3に図示するように、Lab遺伝子クラスターは、ユニットlab706~lab726を含有する。

【0123】

特に好ましい実施形態において、本発明の第8の態様による単離された核酸は、配列番号2に示すヌクレオチド配列;又は
配列番号2の相補体であるヌクレオチド配列;又は

10

20

30

40

50

高度にストリンジェントな条件下で配列番号2若しくはその相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列;又は

配列番号2若しくはその相補体に対して少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0124】

本発明の第9の態様による特に好ましい核酸断片は、遺伝子lab708、lab709、lab710、lab721、lab722、lab723、lab724及びlab725の少なくとも1つを本質的に含む核酸断片である。更に好ましいのは、配列番号3～23に示すタンパク質配列をコード化する1つ又は複数のヌクレオチド配列を含む核酸断片である。ヌクレオチド配列の配列番号2の対応部分も好ましい部分である。

10

【0125】

別の好ましい実施形態において、特に好ましい断片は、lab719及び/又はlab720から本質的になるものである。更に好ましいのは、配列番号16及び/又は配列番号17に示すタンパク質配列をコード化するヌクレオチド配列を含む核酸断片である。ヌクレオチド配列の配列番号2の対応部分も好ましい。

【0126】

PHM005の全ゲノムの注釈は、長さ6167bp、コード配列(CDS)5651個、tRNA53個及びrRNA10個、G+Cが55%の環状染色体を明らかにしている。

【0127】

antiSMASH V3.0(Weber及び共同研究者、Nucleic Acid Research、2015 doi: 10.1093/nar/gkv437)のような二次代謝の予測/識別のためのソフトウェアを使用して、全ゲノムを探索して固有のコンティグにすると、102Kbの大きなハイブリッドPKS/NRPS遺伝子クラスターが検出される。分析した317個のORFの中で、Table 1(表1)により詳細に示すように、20個の遺伝子(69Kb)が、パエデルス・フスキペス(GenBank AH013687.2)の共生細菌及びテオネラ・スウィンホエイ(Theonella swinhoei)(GenBank AY688304.1)の細菌共生生物に対するBLASTpに基づくペデリン(ped)及びオンナミド(onn)配列との相同性を示した。

20

【0128】

30

40

50

【表 1 A】

Table 1. *ped*(ペデリン)及び *onn*(オンナミド)遺伝子に対する *lab* 遺伝子の相同性。

<i>lab</i> 遺伝子	タン パク 質サ イズ(アミ ノ酸)	ラブレングア属 PHM005 に おける推定機能	細菌共生生物 パエデルス・フス キペス (AH013687.2)		細菌共生生物 テオネラ・スウィ ンホエイ (AY688304.1)	
			遺伝 子	% H/Q*	遺伝 子	% H/Q
706	80	ポリケチド生合成アシル担 体タンパク質(ACP)	<i>pedN</i>	47/87	-	相同性な し
707	425	ポリケチド生合成 3-ヒドロ キシ-3 メチルグルタリル ACP シンターゼ(HMGS)	<i>pedP</i>	61/99	<i>onnA</i>	60/99
708	1165	ポリケチドシンターゼ (GNAT-ACP-KS-DHt)	<i>pedI</i>	42/93	<i>onnB</i>	39/98
709	3219	TransAT PKS (KR-cMT-ACP-KS-TransAT- ECH-ACPb-ACPb-KS-KR)	<i>pedI</i>	49/94	<i>onnB</i> <i>onnI</i>	41/73 45/73
710	97	ホスホパンテテイン結合部 位(ACP)	<i>pedI</i>	46/90	<i>onnI</i>	34/73
711	373	モノオキシゲナーゼ(OX)	<i>pedJ</i>	60/98	<i>onnC</i>	58/98
712	318	メチルトランスフェラーゼ (oMT)	<i>pedA</i>	47/97	<i>onnG</i> <i>onnD</i>	51/99 46/97
713	414	シトクロム P450		相同性な し		相同性な し
714	447	マロニル CoA-ACP トランス アシラーゼ(又はオキシドレ ダクターゼ)	<i>pedB</i>	56/98		相同性な し
715	337	マロニル CoA-ACP トランス アシラーゼ	<i>pedC</i>	38/94		相同性な し
716	375	マロニル CoA-ACP トランス アシラーゼ	<i>pedD</i>	51/95		相同性な し
717	253	エノイルトランスフェラー ゼ	<i>pedL</i>	43/91		相同性な し
718	411	ベータ-ケトアシル-シンター ゼ	<i>pedM</i>	30/81		相同性な し
719	2254	混合 TransAT PKS/NRPS (ACP-KS-TransAT-DH-KR- ACP-KS-DH-DH-ACP-KS- TransAT-KR-ACP-KS- TransAT-C-A-PCP-TE)	<i>pedH</i>	42/99	<i>onnI</i>	35/84
720	437	オキシドレダクターゼ(Ox)	<i>pedG</i>	73/94		相同性な し

【 0 1 2 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 B】

721	1986	TransAT-PKS (PS-KR-ACP-KS-TransAT- KR-KS-TransAT)	<i>pedF</i>	40/99	<i>onnI</i>	30/82
722	1949	TransAT ポリ ケチ ドシンター ゼ (TransAT-KR-cMT-ACPb-KS- TransAT-DH)	<i>pedF</i>	44/97	<i>onnI</i> <i>onnB</i>	36/86 34/85
723	875	ポリ ケチ ドシンターゼ (KR-ACP-KS)	<i>pedF</i>	49/93	<i>onnB</i> <i>onnI</i>	52/96 45/95
724	1986	混合 PKS/NRPS (Dht-ACP-C-A(gly)-PCP-KS- TransAT)	<i>pedF</i>	42/99	<i>onnI</i>	38/96
725	377	ポリ ケチ ドシンターゼ(KS)	<i>pedF</i>	48/99	<i>onnI</i> <i>onnB</i>	46/92 41/88
726	278	メチルトランスフェラーゼ (MT)	<i>pedE</i>	51/98	<i>onnH</i>	43/99

(*) H: %単位 of 同源性. Q: %単位 of クエリーカバー率

【0130】

推定Lab遺伝子クラスターは、図3により詳細に示すように、ペデリン生合成遺伝子クラスターについて記載されたものと同様の個々のユニット及び/又はモジュールを形成する69Kbの核酸断片を含む。

【0131】

TransATハイブリッドPKS/NRPS Lab遺伝子クラスターは主に、1つのPKS(ORF lab708、lab709及びlab710により構成される)と、J. Pielにより*ped*遺伝子について記載されたのと同様の閉じた構造においてオキシゲナーゼ、オキシドレダクターゼ及びメチラーゼと隣接する2つの混合PKS/NRPS系(lab721、lab722、lab723、lab724、lab725及びlab719)とにより構成される。各ORFのアミノ酸の予測される機能及び組成をTable 1(表1)に詳述する。

【0132】

TransAT-PKS lab708、lab709、lab710(4,481のアミノ酸)は、*pedI*について記載されているものと同様のモジュールGNAT-ACP-KS-DHt-KR-cMT-ACP-KS-TransAT-EC H-ACP-ACP-KS-KR-ACP)によって構成され、同源性は42~49%である。この生合成遺伝子クラスターは、ペデリン構造のエキソメチレン基を持つ6員環の生合成に関与し得る。ここで、ドメインは、GNAT:Gcn5-関連-N-アセチルトランスフェラーゼ;ACP:アシル担体タンパク質;KS:ケトシンターゼ;DHtデヒドラターゼ;KR:ケトレダクターゼ;cMT:メチルトランスフェラーゼ;ECH:エノイル-CoA-ヒドラターゼ又はクロトナーゼ;TransAT:トランスアシルトランスフェラーゼである。

【0133】

lab721、lab722、lab723、lab724、lab725(5,385のアミノ酸)によって形成されるハイブリッドTrans-AT PKS/NRPSは、グリシンのアデニル化が明確な6つのケトシンターゼと1つのNRPSによって構成される(PS-KR-ACP-KS-TransAT-KR-KS-TransAT-transAT-KR-cMT-ACP-KS-TransAT-DH-KR-ACP-KS-DHt-ACP-C-A(gly)-PCP-KS-TransAT-KS)。pedFに対して40~49%の同源性を有するが、機能とモジュール構成は本質的に同じである。ここで、ドメインは、C:非リボソームペプチド縮合;A:非リボソームペプチドアデニル化;PCP:チオール化及びペプチド担体タンパク質である。

【0134】

第9の態様の好ましい実施形態によると、Lab遺伝子クラスターから任意のオンナミド様化合物の生合成に関連するlab719 PKS/NRPS系を同定した。この推定上の新しい化合物は、PHM005の発酵ブロスでは同定されていなかった。遺伝子lab720の生成物、オキシドレダクターゼが、lab719における最初のドメインACPに付加する前にペデリン構造を切断することによりオンナミド様化合物の形成を妨げるか、又は最終的な酸化の突発的発生がその生合成の後に起こる可能性がある。同じ疑念が、W003/044186A2においてJ. Pielによって議論されている。遺伝子lab719(pedGに相同)の遺伝子改変が、この不確実性を解決する。

【0135】

lab719(2,254のアミノ酸)で表されるこの「寡黙な」ハイブリッドtransAT PKS/NRPS遺伝子は、4つのKSとおそらくはarg(オンナミドの場合のように)の組み込みのために不確実なアデニル化ドメインを持つ1つのNRPSによって構成されているが、asp、asn、glu及びglnが、NRSPredictor2 SVMアルゴリズムによって提案されているような他の可能な代替物となる可能性もある。このORFの組成は、(ACP-KS-TransAT-DH-KR-ACP-KS-DH-DH-ACP-KS-TransAT-KR-ACP-KS-TransAT-C-A-PCP-TE)である。ここで、TE:チオエステラーゼドメインである。

【0136】

ped、onn又はnsp(ノスペリン(nosperin))アイランドに対する配列相同性のないlab領域における単一のORFは、シトクロムP450に対して推定されたlab713であり、J. Piel(J. Bacteriol. 2004. 186(5)、1280~1286頁)により類似の機能が割り当てられた遺伝子を持つpedアイランドの場合に記載されているように、おそらくはポリケチドの酸素化に役割を果たす。

【0137】

本発明の第10の態様による特に好ましいモジュール型酵素系は、配列番号:3~配列番号23の配列のいずれかによるタンパク質配列、又はこれらの配列に対し少なくとも80%の配列同一性を有するタンパク質配列を含む。

【0138】

本発明の第12の態様による特に好ましい宿主細胞は、細菌細胞である。より特に好ましい宿主細胞は、シュードモナス(Pseudomonas)、アシネトバクター(Acinetobacter)、バシラス(Bacillus)、ストレプトミセス(Streptomyces)及び大腸菌(E. coli)である。

【0139】

Lab生合成遺伝子クラスターに対する本発明の改変は、改変Lab生合成遺伝子クラスターの調製、又はペデリン様若しくはオンナミド様化合物の調製に使用することができる。

【0140】

本発明の第13の態様による好ましい実施形態において、lab719の生成物を発現させる。

【実施例】

【0141】

一般的構造解明手順。旋光度は、Jasco社P-1020旋光計を使用して判定した。NMRスペクトルは、Varian社「Unity 500」分光計で500/125MHz($^1\text{H}/^{13}\text{C}$)で、及びVarian社「Unity 400」分光計で400/100MHz($^1\text{H}/^{13}\text{C}$)で得た。化学シフトは、内部参照としての CDCl_3 に対する残留溶媒ピーク(δ 、 ^1H の場合7.26ppm、 ^{13}C の場合77.0ppm)を使用して、ppm単位で報告した。(+)ESI-MSは、Agilent社の1100 Series LC/MSD分光計を使用して記録した。Agilent社6230 TOF LC/MSシステムとESI-MS技術を使用して、高分解能質量分析(HRMS)を遂行した。

【0142】

(実施例1)

細菌単離

ペデリン型産生細菌、ラブレングア属PHM005を、2005年にケニア沖の着生性の高い未確認のサンゴ海綿生息地から18mの深さで収集した堆積物サンプルから単離した。およそ5グラムの海砂利材料を滅菌人工海水(ASW)を含有する50mlのファルコンチューブに収

10

20

30

40

50

集し、5日間5℃に維持してから処理した。実験室に入れた後、サンプルを均質化し、ASWでの1:100希釈物100 µlを、27g/Lの海洋塩(Tropic Marin(登録商標)PRO-REEF)、16g/Lの寒天及び0.2mg/mLのシクロヘキシミドからなる海塩培地と共に直接ペトリ皿に広げた。3週間28℃でインキュベートした後、わずかに褐色のコロニーを選び、同じ海塩培地に移して純度を確認し、分子特性評価用のバイオマスを生成し、更に細胞バンクとして20%グリセロールで-80℃で保存するために1つのコロニーを液体海洋ブロスに接種した。

【0143】

(実施例2)

電子顕微鏡法。

中期指数増殖期の細胞を400メッシュの炭素-コロジオンコーティングしたグリッドに2分間吸着させ、2%酢酸ウラニルでネガティブ染色し、100kVで作動するJeol社JEM1011透過型電子顕微鏡で画像化し、CCDのGatan社ErlangshenES1000Wカメラで撮影した。

【0144】

(実施例3)

16S rRNAの特性評価。

DNA抽出のため、菌株を海洋ブロス(DIFCO 1196)中で72時間増殖させた。細胞を回収し、4%NP40で10分間煮沸することにより溶解させた。細胞残屑を遠心分離により廃棄した。16S rDNA遺伝子を、細菌プライマF1及びR5を使用したポリメラーゼ連鎖反応により増幅させた。系統樹(図2)は、ペアワイズアラインメントベースの類似度係数とBioNumerics V7.5(Applied Maths社)を使用したクラスター分析用のUPGMAによって生成した。系統発生的近隣を同定し、SILVA LTPs123データベースとの比較によりペアワイズ16S rDNA遺伝子配列の類似性を計算した。

【0145】

(実施例4)

培養及び抽出。

菌株は、増殖するために明らかに海洋塩を必要とする。培養後、全ブロスを凍結乾燥し、有機溶媒の混合物で抽出し、粗抽出物の0.5mLサンプルを乾燥させ、細胞毒性活性についてスクリーニングした。最高の細胞毒性活性は、120時間で16B/d培地において達成された。この培地は、17.5g/Lの醸造用酵母(Sensient社、G2025)、76g/Lのマニトール、7g/Lの(NH₄)₂SO₄、13g/LのCaCO₃、0.09g/LのFeCl₃及び36g/Lの海洋塩(Tropic Marin(登録商標)PRO-REEF)からなっていた。16B/d培地におけるこの細菌の50Lのスケールアップを、それぞれ作業容量が250mLの200×2Lの三角フラスコで調製した。別の高度に増殖させた前接種材料から海洋ブロス(DIFCO 1196)中で72時間増殖させた細菌の2%を生産用フラスコに接種した。スケールアップは、5cm偏心の220rpmの回転式振とう機で、28℃で120時間インキュベートした。次いで、培養物を6,000rpmで20分間遠心分離し、45Lの水性上清を得、これをEtOAcで2回抽出し、有機相を乾燥させて粗抽出物(1.8g)を得た。

【0146】

(実施例5)

化合物1の単離。

抽出物をシリカゲルVFC(真空フラッシュクロマトグラフィー)システムに適用し、n-ヘキサン-EtOAcとEtOAc-MeOHの混合物での段階的勾配溶離を使用して11の画分を得た。活性画分をEtOAcとEtOAc-MeOHの9:1(550.0mg)で溶出し、13.5mL/分の流量にて30分かけてSymmetry C₁₈カラム(19×150mm、7 µm)とCH₃CNが5%~35%のH₂O/CH₃CNの直線勾配を使用した分取逆相HPLCに供し、保持時間24.5分でHPLC-MSクロマトグラムに基づく1を含有する非常に活性のあるピーク画分(77.0mg)を得た。この画分を更にXBridge C₁₈カラム(10×250mm、5 µm)でのセミ分取HPLCと流量4mL/分でのH₂O/CH₃CN(78:22)による定組成溶離により精製し、これらのHPLC条件での保持時間25.0分で、24.5mgの純粋な化合物1を得た。

【0147】

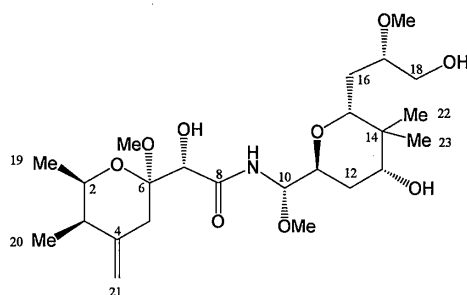
(1):無色油; $[\alpha]_D^{20} + 82.4$ ($c=0.49$; CHCl_3)及び $[\alpha]_D^{20} + 81.3$ ($c=0.36$; MeOH); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 3.99 (1H, dq, $J=6.6$, 2.7 Hz, H-2), 2.25 (1H, dq, $J=7.1$, 2.7 Hz, H-3), 2.43 (1H, d, $J=14.1$ Hz, H-5a), 2.36 (1H, dt, $J=14.1$, 2.3 Hz, H-5b), 4.31 (1H, s, H-7), 7.18 (1H, d, $J=9.8$ Hz, NH), 5.37 (1H, dd, $J=9.8$, 7.8 Hz, H-10), 3.83 (1H, dt, $J=7.8$, 2.7 Hz, H-11), 2.04 (1H, dt, $J=13.5$, 3.6 Hz, H-12a), 1.75 (1H, m, H-12b), 3.64 (1H, m, H-13), 3.31 (1H, m, H-15), 1.75 (1H, m, H-16a), 1.57 (1H, dd, $J=14.3$, 9.7 Hz, H-16b), 3.36 (1H, m, H-17), 3.65 (1H, m, H-18a), 3.48 (1H, m, H-18b), 1.19 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-19), 1.01 (3H, d, $J=7.1$ Hz, H-20), 4.85 (1H, t, $J=2.3$ Hz, H-21a), 4.73 (1H, t, $J=2.3$ Hz, H-21b), 0.95 (3H, s, C-22), 0.88 (3H, s, C-23), 3.32 (3H, s, MeO-6), 3.38 (3H, s, MeO-10), 3.32 (3H, s, MeO-17); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 69.6 (d, C-2), 41.3 (d, C-3), 145.7 (s, C-4), 34.1 (t, C-5), 99.7 (s, C-6), 73.1 (d, C-7), 171.9 (s, C-8), 79.4 (d, C-10), 72.6 (d, C-11), 29.6 (t, C-12), 71.8 (d, C-13), 38.4 (s, C-14), 75.4 (d, C-15), 29.2 (t, C-16), 79.0 (d, C-17), 63.8 (t, C-18), 17.9 (q, C-19), 12.0 (q, C-20), 110.5 (t, C-21), 23.1 (s, C-22), 13.5 (s, C-23), 49.1 (q, MeO-6), 56.4 (q, MeO-10), 56.6 (q, MeO-17); (+)-ESIMS m/z 512.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; (+)-HRES-TOFMS m/z 512.2873 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ($\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{NO}_9\text{Na}$ の計算値, 512.2830).

【0148】

化合物1の相対立体化学を、ROESYデータと結合定数の分析に基づき、

【0149】

【化18】



【0150】

であると確定した。化合物1の旋光度($[\alpha]_D^{20}+82.4$ 、 $c=0.49$; CHCl_3 及び $[\alpha]_D^{20}+81.3$ 、 $c=0.36$; MeOH)は、ペデリン($[\alpha]_D^{20}+86.8$ 、 $c=1.00$; CHCl_3)と同じ符号を示した。ペデリンの絶対立体化学はX線結晶学的研究(Simpson, J. S.ら、J. Nat. Prod. 2000、63、704~706頁)及び立体選択的合成(Matsuda, F.ら、Tetrahedron 1988、44、7063~7080頁)によって既に確立されている。従って、化合物1の絶対配置は、ペデリン及び他の報告されている類似化合物(Wan, S.ら、J. Am. Chem. Soc. 2011、133、16668~16679頁)と同じであると暫定的に提案する。

【0151】

(実施例6)

化合物2の単離

化合物2を、海洋由来菌株PHM005の発酵ブロス(15L)の全ブロス粗抽出物(9.5g)から単離した。抽出物をn-ヘキサン-EtOAcとEtOAc-MeOHの混合物での段階的勾配溶離を使用したシリカゲルVFC(真空フラッシュクロマトグラフィー)システムに適用し、7つの画分を得た。化合物2を含有する活性画分をEtOAc-MeOH4:1(659.0mg)で溶出し、 CH_3CN が5%~60%の $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ の直線勾配を使用して、Symmetry C₁₈カラム(7.8×150mm、5 μm)を備えたセミ分取逆相HPLCに流量3.0mL/分にて25分供し、25~30分の間に

HPLC-MSクロマトグラムに基づく化合物2を含有する非常に活性のある時間画分(time-fraction)(28.0mg)を得た。この画分を、CH₃CNが20%~30%のH₂O/CH₃CNの直線勾配を使用して、Symmetry C18カラム(7.8×150mm、5 μm)で再度セミ分取HPLCにより流量2.5mL/分にて20分で精製し、これらのHPLC条件での保持時間11.5分で、2.6mgの純粋な化合物2を得た。

【0152】

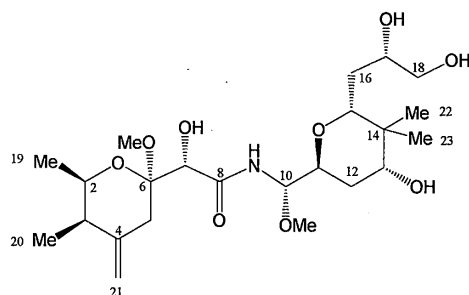
2:無色油;[α]_D²⁰ + 64.5 (c=0.16; CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.97 (1H, dq, J=6.6, 2.6 Hz, H-2), 2.25 (1H, dq, J=7.1, 2.6 Hz, H-3), 2.50 (1H, dt, J=14.2, 1.45 Hz, H-5a), 2.45 (1H, d, J=14.1 Hz, H-5b), 4.32 (1H, s, H-7), 7.17 (1H, d, J=9.9 Hz, NH), 5.44 (1H, dd, J=9.9, 7.5 Hz, H-10), 3.95 (1H, m, H-11), 2.05 (1H, dt, J=13.5, 4.0 Hz, H-12a), 1.75 (1H, m, H-12b), 3.66 (1H, m, H-13), 3.58 (1H, m, H-15), 1.80 (1H, m, H-16a), 1.55 (1H, m, H-16b), 3.80 (1H, m, H-17), 3.57 (1H, m, H-18), 3.44 (1H, dd, J=11.5, 6.5 Hz, H-18), 1.19 (3H, d, J=6.6 Hz, H-19), 1.01 (3H, d, J=7.1 Hz, H-20), 4.85 (1H, t, J=1.45 Hz, H-21a), 4.75 (1H, t, J=1.45 Hz, H-21b), 0.96 (3H, s, C-22), 0.89 (3H, s, C-23), 3.34 (3H, s, MeO-6), 3.41 (3H, s, MeO-10); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 69.6 (d, C-2), 41.3 (d, C-3), 146.1 (s, C-4), 34.2 (t, C-5), 99.6 (s, C-6), 74.5 (d, C-7), 171.9 (s, C-8), 79.3 (d, C-10), 72.2 (d, C-11), 29.8 (t, C-12), 71.6 (d, C-13), 38.4 (s, C-14), 80.9 (d, C-15), 31.4 (t, C-16), 72.8 (d, C-17), 66.6 (t, C-18), 17.8 (q, C-19), 11.9 (q, C-20), 110.2 (t, C-21), 23.4 (s, C-22), 14.3 (s, C-23), 49.6 (q, MeO-6), 56.3 (q, MeO-10); (+)-ESIMS m/z 498.4 [M + Na]⁺; (+)-HRES-TOFMS m/z 498.2713 [M + Na]⁺ (C₂₃H₄₁NO₉Naの計算値, 498.2674).

【0153】

化合物2の相対立体化学は、結合定数の分析に基づき、

【0154】

【化19】



【0155】

であると指定した。化合物2の旋光度([α]_D²⁰+64.5、c=0.16;CHCl₃)は、ペデリン([α]_D²⁰+86.8、c=1.00;CHCl₃)と同じ符号を示した。従って、化合物2の絶対配置は、ペデリン及び他の報告されている類似化合物(Wan, S.ら、J. Am. Chem. Soc. 2011、133、16668~16679頁)と同じであると暫定的に提案する。

【0156】

(実施例7)

化合物3の合成

窒素雰囲気下、1(2.5mg、5.1 μmol)の乾燥DCM(2mL)溶液に、ピリジン(10 μL、124 μmol)、DMAP(触媒量)及びAc₂O(2.9 μL、31mmol)を添加した。反応物を室温で一晩放置した。混合物を真空下で濃縮し、シリカゲル(n-ヘキサン/EtOAc1:1)上でのフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製して、3(3mg、95%)を白色固体として得た。

【 0 1 5 7 】

^1H NMR (CDCl_3) δ 3.96 (1H, dq, $J=6.6$, 2.6 Hz, H-2), 2.24 (1H, dq, $J=7.0$, 2.6 Hz, H-3), 2.62 (1H, dt, $J=14.5$, 2.2 Hz, H-5a), 2.37 (1H, d, $J=14.5$ Hz, H-5b), 5.25 (1H, s, H-7), 6.62 (1H, d, $J=9.6$ Hz, NH), 5.27 (1H, dd, $J=9.6$, 4.1 Hz, H-10), 3.91 (1H, dt, $J=6.3$, 4.6 Hz, H-11), 2.02 (1H, m, H-12a), 1.66 (1H, m, H-12b), 4.91 (1H, dd, $J=4.7$, 4.1 Hz, H-13), 3.55 (1H, m, H-15), 2.02 (1H, m, H-16a), 1.67 (1H, m, H-16b), 3.60 (1H, dd, $J=11.3$, 2.2 Hz, H-17), 4.32 (1H, dd, $J=12.1$, 2.6 Hz, H-18a), 4.12 (1H, m, H-18b), 1.15 (3H, d, $J=6.6$ Hz, H-19), 0.97 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-20), 4.86 (1H, t, $J=2.0$ Hz, H-2a), 4.76 (1H, t, $J=2.0$ Hz, H-21b), 0.97 (3H, s, C-22), 0.89 (3H, s, C-23), 3.21 (3H, s, MeO-6), 3.39 (3H, s, MeO-10), 3.38 (3H, s, MeO-17), 2.20 (3H, s, OCOMe-7), 2.08 (3H, s, OCOMe-13), 2.10 (3H, s, OCOMe-18); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 69.6 (d, C-2), 41.3 (d, C-3), 145.5 (s, C-4), 33.8 (t, C-5), 99.1 (s, C-6), 72.1 (d, C-7), 167.4 (s, C-8), 81.8 (d, C-10), 70.0 (d, C-11), 26.7 (t, C-12), 74.2 (d, C-13), 36.7 (s, C-14), 76.5 (d, C-15), 29.3 (t, C-16), 76.4 (d, C-17), 64.0 (t, C-18), 17.9 (q, C-19), 12.0 (q, C-20), 110.4 (t, C-21), 24.7 (s, C-22), 17.2 (s, C-23), 48.4 (q, MeO-6), 56.3 (q, MeO-10), 57.0 (q, MeO-17), 20.7 (q, OCOMe-7), 169.8 (s, OCOMe-7), 21.2 (q, OCOMe-13), 170.3 (s, OCOMe-13), 20.9 (q, OCOMe-18), 170.0 (s, OCOMe-18); (+)-ESIMS m/z 638.3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

10

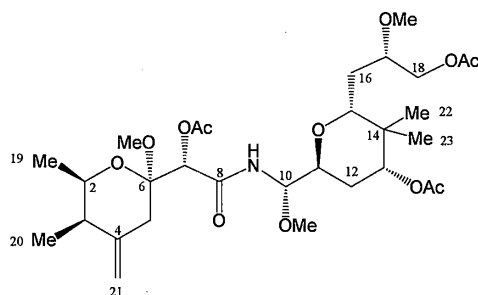
【 0 1 5 8 】

化合物3の相対立体化学を、その前駆体である化合物1との類推により

20

【 0 1 5 9 】

【化20】



30

【 0 1 6 0 】

と確定した。

【 0 1 6 1 】

(実施例8)

抗腫瘍活性の検出のためのin vitroバイオアッセイ

40

このアッセイの目的は、試験対象のサンプルのin vitro細胞増殖抑制(腫瘍細胞の増殖を遅延若しくは停止させる能力)又は細胞毒性(腫瘍細胞を殺す能力)活性を評価することである。

【 0 1 6 2 】

細胞株

【 0 1 6 3 】

50

【表 2】

名称	N° ATCC	種	組織	特性
A549	CCL-185	ヒト	肺	肺がん(NSCLC)
HT29	HTB-38	ヒト	結腸	結腸直腸腺がん
MDA-MB-231	HTB-26	ヒト	乳	乳腺腺がん
PSN1	CRM-CRL-3211	ヒト	膵臓	膵臓腺がん

10

【0164】

SBR比色分析アッセイを使用した細胞毒性活性の評価

スルホローダミンB(SRB)反応を使用した比色分析アッセイを、細胞増殖及び生存率を定量的に測定するために適用した(Skehanら、J. Natl. Cancer Inst. 1990, 82, 1107～1112頁が記載する技法に従った)。

【0165】

この形式のアッセイは、The American National Standards Institute and the Society for Laboratory Automation and Screening (ANSI SLAS 1-2004 (R2012)10/12/2011)の基準に従い、96ウェル細胞培養マイクロプレートを利用する。この研究に使用した細胞株は全て、アメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)から入手し、異なるタイプのヒトのがんに由来するものである。

20

【0166】

細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)、2mMのL-グルタミン、100U/mLのペニシリン及び100U/mLのストレプトマイシンを補充したダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)に37℃、5%CO₂、及び湿度98%で維持した。実験のため、細胞をトリプシン処理を使用してサブコンフルエント培養物から採取し、新鮮な培地に再懸濁させてから計数及びプレーティングを行った。

【0167】

細胞を96ウェルマイクロタイタープレートにおいて、ウェル当たり5000細胞で150μLのアリコートに播種し、薬物を含まない培地で18時間(一晚)、プレート表面に付着させた。その後、各細胞株の1つの対照(未処理)プレートを固定し(以下に記載するように)、ゼロ時参照値用に使用した。次いで、10回の2/5連続希釈(10～0.003μg/mLの範囲の濃度)と三重反復培養(DMSO中最終の濃度1%)を使用して、培養プレートをテスト化合物(完全培養培地中4×原液の50μLアリコートプラス4%DMSO)で処理した。72時間の処理後、SRB方法論を使用することにより抗腫瘍効果を測定した:簡潔には、細胞をPBSで2回洗浄し、1%グルタルアルデヒド溶液中に室温で15分間固定し、PBS中で2回すすぎ、0.4%SRB溶液中室温で30分間染色した。次いで、細胞を1%酢酸溶液で数回すすぎ、室温で空気乾燥させた。次いで、SRBを10mMのtrizma塩基溶液に抽出し、自動分光測光プレートリーダーにより490nmで吸光度を測定した。細胞増殖及び生存に対する効果をNCIアルゴリズム(Boyd MR及びPaull KD. Drug Dev. Res. 1995、34、91～104頁)を適用することにより推定した。

30

40

【0168】

三重反復培養で得られた値を、非線形回帰分析により4パラメータロジスティック曲線に当てはめた。こうした当てはめて得られた曲線の自動補間によって、3つの参照パラメータを(NCIアルゴリズムに従い)計算した:GI₅₀=対照培養物と比較して50%細胞成長阻害を生じる化合物濃度;TGI=対照培養物と比較した総細胞増殖阻害(細胞制止作用)、及びLC₅₀=50%正味細胞死滅細胞障害効果を生じる化合物濃度。

【0169】

50

【表 3】

Table 2 は、本発明の化合物の生物学的活性に関するデータを示す。

化合物	生物学的活性(M)				
		細胞株			
		A549	HT29	MDA-MB-231	PSN-1
1	GI ₅₀	2.04E-09	2.86E-09	2.66E-09	2.66E-09
	TGI	7.97E-09	8.99E-09	5.31E-09	5.72E-09
	LC ₅₀	3.68E-08	>2.04E-07	1.08E-08	1.94E-08
2	GI ₅₀	7.15E-09	8.83E-09	8.20E-09	8.62E-09
	TGI	2.52E-08	4.42E-08	1.56E-08	1.91E-08
	LC ₅₀	1.22E-07	>2.10E-06	3.15E-08	7.78E-08
3	GI ₅₀	1.15E-07	1.62E-07	3.09E-07	1.62E-07
	TGI	8.77E-07	9.26E-07	2.44E-06	6.66E-07
	LC ₅₀	8.61E-06	>1.62E-05	>1.62E-05	3.90E-06

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

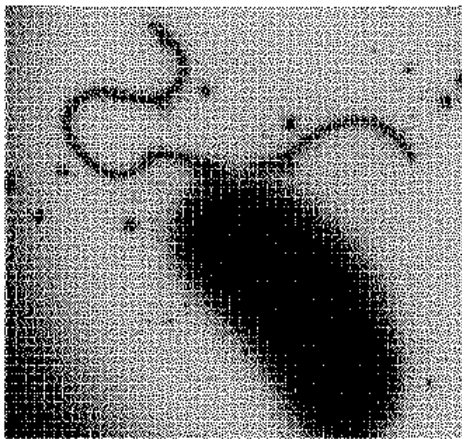
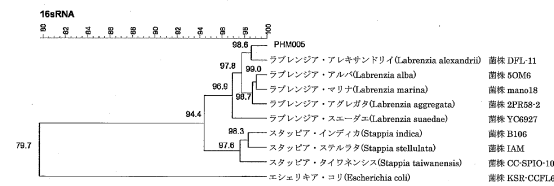


Figure 1

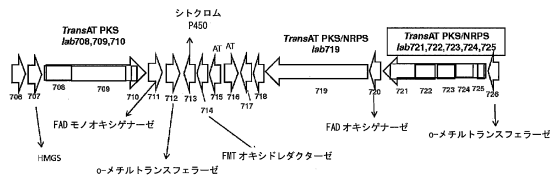
【図 2】



10

20

【図 3】



【図 4】

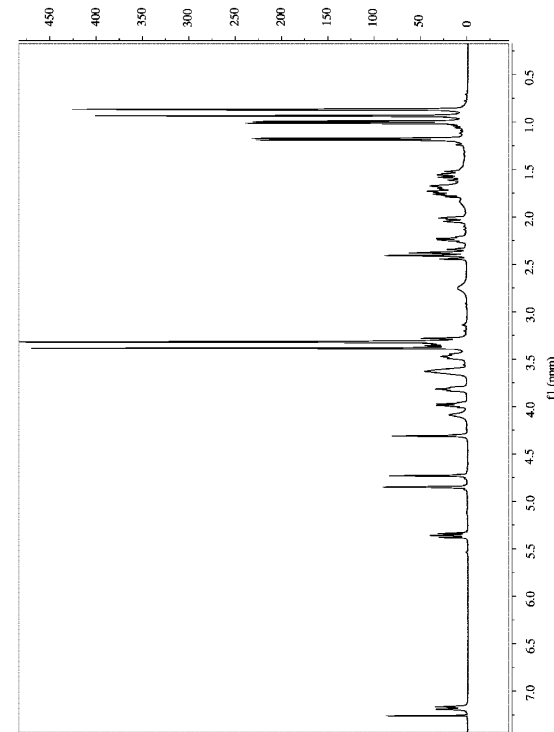


Figure 4

30

40

50

【図 5】

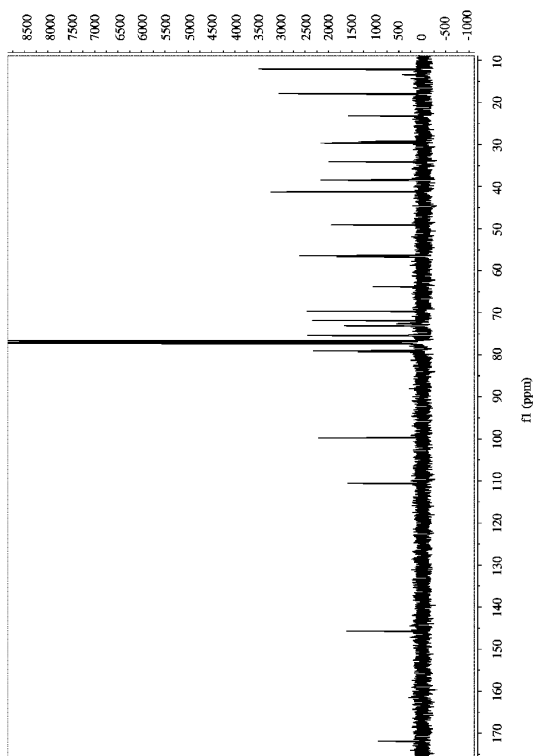


Figure 5

【図 6】

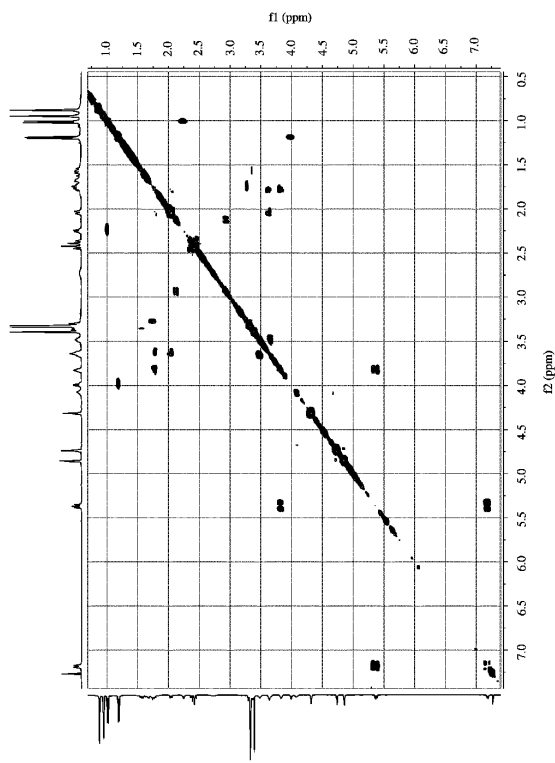


Figure 6

【図 7】

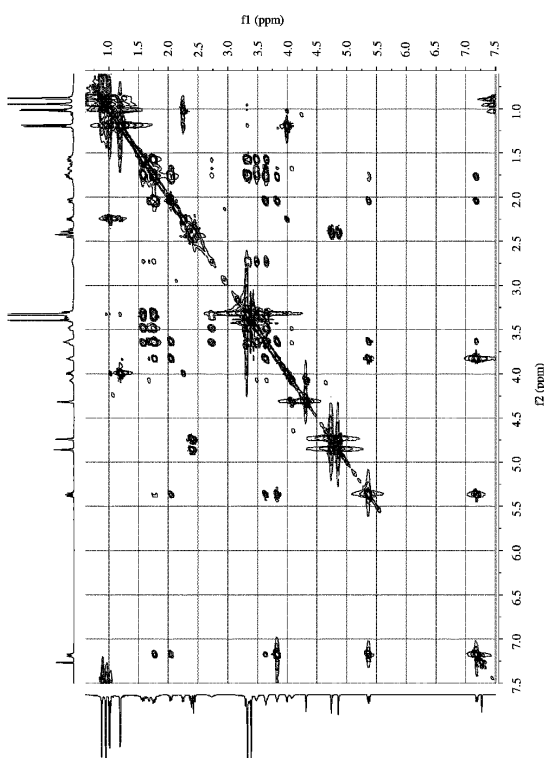


Figure 7

【図 8】

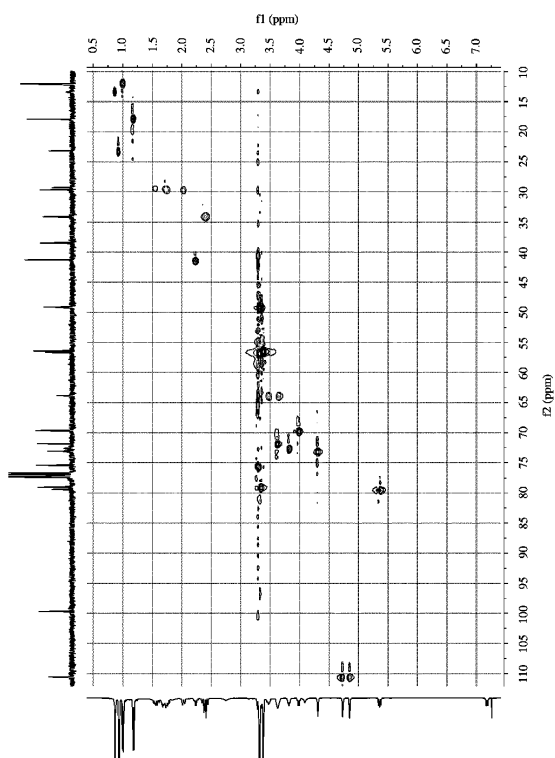


Figure 8

10

20

30

40

50

【図 9】

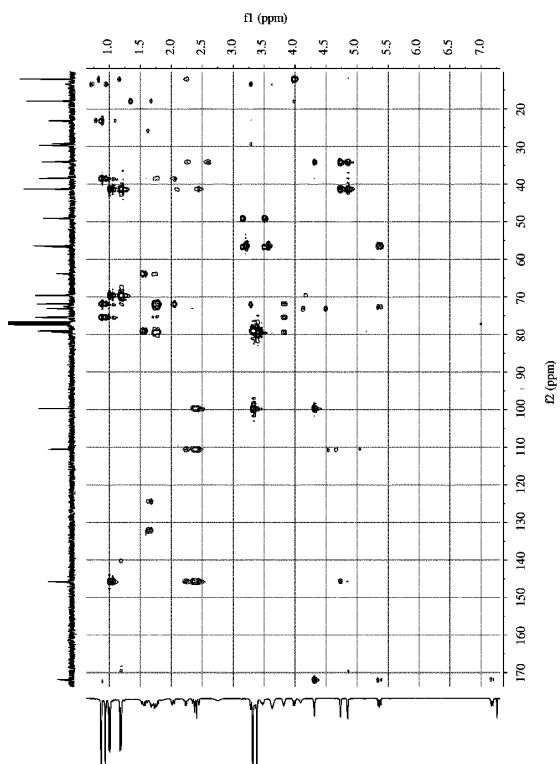


Figure 9

【図 10】

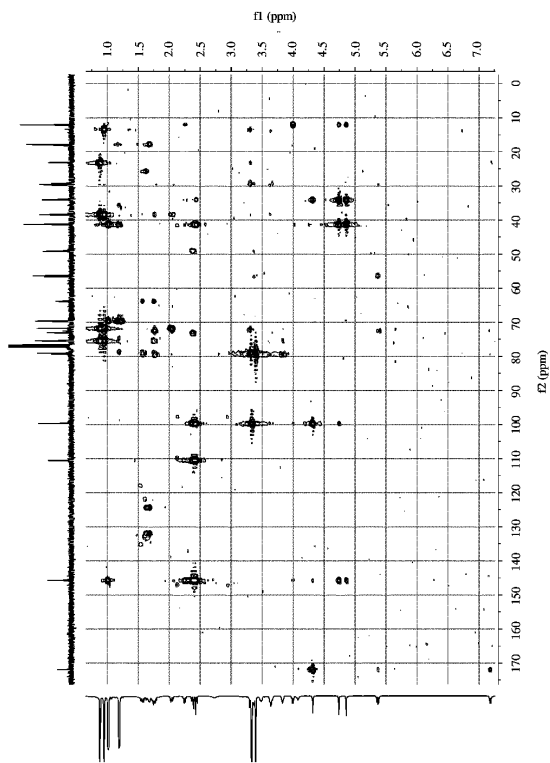


Figure 10

【配列表】

0007209633000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100110364
弁理士 実広 信哉
- (74)代理人 100133400
弁理士 阿部 達彦
- (72)発明者 リブラダ・マリア・カニエド・エルナンデス
スペイン・E-28770・マドリード・コルメナール・ヴィエホ・アヴェニーダ・デ・ロス・レ
ジェス・1・ポリゴノ・インダストリアル・ラ・ミナーノルテ・ファルマ、マール、ソシエダード
、アノニマ
- (72)発明者 フェルナンド・デ・ラ・カレ・ヴェルドゥ
スペイン・E-28770・マドリード・コルメナール・ヴィエホ・アヴェニーダ・デ・ロス・レ
ジェス・1・ポリゴノ・インダストリアル・ラ・ミナーノルテ・ファルマ、マール、ソシエダード
、アノニマ
- (72)発明者 マリア・ピラル・ロドリゲス・ラモス
スペイン・E-28770・マドリード・コルメナール・ヴィエホ・アヴェニーダ・デ・ロス・レ
ジェス・1・ポリゴノ・インダストリアル・ラ・ミナーノルテ・ファルマ、マール、ソシエダード
、アノニマ
- (72)発明者 マリア・デル・カルメン・シュライスナー・サンチェス
スペイン・E-28770・マドリード・コルメナール・ヴィエホ・アヴェニーダ・デ・ロス・レ
ジェス・1・ポリゴノ・インダストリアル・ラ・ミナーノルテ・ファルマ、マール、ソシエダード
、アノニマ
- (72)発明者 パス・スニガ・ヒロン
スペイン・E-28770・マドリード・コルメナール・ヴィエホ・アヴェニーダ・デ・ロス・レ
ジェス・1・ポリゴノ・インダストリアル・ラ・ミナーノルテ・ファルマ、マール、ソシエダード
、アノニマ
- 審査官 斉藤 貴子
- (56)参考文献 米国特許出願公開第2014/0161877 (US, A1)
WU, F. et al., Total Synthesis of Pederin and Analogs, Angewandte Chemie, International
Edition, 2011年, Vol. 50, P. 1131-1134
NAKABACHI, A. et al., Defensive Bacteriome Symbiont with a Drastically Reduced Genome
, Current Biology, 2013年, Vol. 23, P. 1478-1484
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12P
C07D
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)