

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4452777号
(P4452777)

(45) 発行日 平成22年4月21日(2010.4.21)

(24) 登録日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/715 (2006.01)	A 6 1 K 31/715
A 6 1 K 31/718 (2006.01)	A 6 1 K 31/718
A O 1 N 33/12 (2006.01)	A O 1 N 33/12 1 O 1
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12

請求項の数 1 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-557585 (P2003-557585)	(73) 特許権者	502141050
(86) (22) 出願日	平成15年1月10日(2003.1.10)		ダウ グローバル テクノロジーズ イン
(65) 公表番号	特表2005-519057 (P2005-519057A)		コーポレイティド
(43) 公表日	平成17年6月30日(2005.6.30)		アメリカ合衆国 ミシガン州 48674
(86) 国際出願番号	PCT/DE2003/000095		, ミッドランド, ダウ センター 204
(87) 国際公開番号	W02003/057227		O
(87) 国際公開日	平成15年7月17日(2003.7.17)	(74) 代理人	110000741
審査請求日	平成18年1月6日(2006.1.6)		特許業務法人小田島特許事務所
(31) 優先権主張番号	102 00 717.9	(72) 発明者	ハアク, ペラ
(32) 優先日	平成14年1月10日(2002.1.10)		ドイツ07743イエナ・ルターシュトラ
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		ーセ111
		(72) 発明者	ハインツエ, トマス
			ドイツ07743イエナ・ケゼナーシュトラ
			ーセ13

最終頁に続く

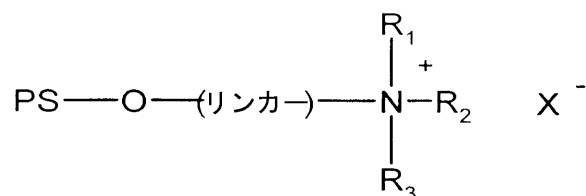
(54) 【発明の名称】 抗-感染物質としての多糖誘導体の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式(1)

【化 1】



10

式中、

P S はデンプンに基く多糖残基であり、

X はアニオンであり、

R₁ は水素、C₁₋₄ アルキル又はベンジルもしくは置換ベンジルであり、R₂ 及び R₃ は互いに独立して C₁₋₄ アルキル又はベンジルもしくは置換ベンジルから選ばれ、リンカーは場合によりヒドロキシルで置換されていてもよい C₂₋₄ アルキレンであり、リンカーにより結合している第4級アンモニウム基は 0.4 ~ 3.0 の置換度を有する、
の グリコシド結合したデンプン誘導体を有効成分として含有することを特徴とする感
染症の処置剤。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オリゴ糖類及び多糖類に基づく物質の抗感染剤、例えば抗バクテリア剤及び抗ウィルス剤としての使用に関する。これらの抗感染剤を例えば化粧品用及び製薬学的調剤中の防腐剤として、薬剤調製物中の生物学的に活性化化合物として、表面の、編織布の、ならびに例えば食物又は医学、生物学及び薬学で用いられる製品ののための包装材料の殺生物仕上げのために、ならびに化粧品及び製薬産業における、農業における及び食物及び飼料 (f e e d s t u f f s) 産業における使用のための傷保護用に用いることができる。

10

【背景技術】

【0002】

バクテリア性病原体への感染が全世界で増加していること、ならびにこれに関して抗バクテリア剤耐性 (a n t i b a c t e r i a l r e s i s t a n c e) が一般的な健康の問題であることは既知である。時間を経て通常の治療薬に耐性になったマイコバクテリア株による結核感染の世界的な増加 (非特許文献 1) 及び多剤耐性スタフィロコックスによる感染の処置 (非特許文献 2) は、新規な活性物質の設計を必要とする。特に抗生物質耐性に対抗するため及び既存の活性化化合物に対する不耐性が存在する場合にバクテリア感染を抑制するために、新規な作用機構を有する代替りの活性化化合物が緊急に必要である。

【0003】

20

ヘルペスウィルスに関する高度に選択的なヌクレオシド及びヌクレオチド制ウィルス剤 (v i r u s t a t i c a g e n t s) 、例えばアシクロビル (a c y c l o v i r) 、ペンシクロビル (p e n c i c l o v i r) 、ガンシクロビル (g a n c i c l o v i r) 、ソリブジン (s o r i v u d i n e) 及びシドフォビル (c i d o f o v i r) の開発を以って、生命を脅かす感染の抑制における有意な進歩が達成されたが、これらの治療薬はすべて同じ作用原理を有する。それらはウィルスDNAポリメラーゼを阻害する。これらの化合物の他の欠点は、それらが感染細胞のDNA代謝も妨げ、従って突然変異誘発、奇形形成及び発ガン効果を誘導する危険を宿していることである (非特許文献 3) 。さらに、ヌクレオシド及びヌクレオチドウィルス剤が長期間に及んで用いられると、感染細胞培養及び免疫抑制患者の両方においてこれらの薬剤への耐性が発現することが示された (非特許文献 4 ; 非特許文献 5) 。この理由で、別の作用機構を有する新規な高度に活性化抗ウィルス性予防薬及び治療薬をさらに開発することが必要である。

30

【0004】

生物学的に活性化物質の大きな群は第4級アンモニウム化合物を含む。それらはバクテリア及び菌・カビのような微生物を破壊することができる。低分子量の第4級アンモニウム塩は殺菌剤又は殺生物性コーティング材料として用いられる (非特許文献 6) 。低分子量化合物に伴う典型的な問題は、例えば多様な輸送及び分解プロセスにより引き起こされる不十分なバイオアベイラビリティである。ポリマー性第4級アミン - 官能基化材料を市販の第4級交換樹脂から、ポリウレタンのポリブタジエンヒドロキシテレケレス (p o l y b u t a d i e n e h y d r o x y t e l e c h e l e s) とのグラフト重合により、あるいは側鎖中に第1級アルコール官能基を有するポリシロキサンから合成することができる。これらの殺生物性ポリマーは通常高い製造コストを有し、多くの場合それらが毒性モノマーの残基を含有しているために毒性である (非特許文献 7) 。これに加え、ポリマーは体内に望ましくない且つ危険なやり方で堆積し得、それはそれらが生物的に分解可能でないためである。さらに、カチオン性官能基を含有する合成ポリマーは木材の防腐のために分散液として用いられる (特許文献 1) 。カチオン性官能基を含有する合成ポリマーの欠点は、それらの製造の高いコスト、それらの毒性 (残留モノマーによる汚染) 及び生物分解に対するそれらの安定性である。

40

【0005】

第4級アンモニウム官能基を有する多糖誘導体は既知であり、かくしてずっと特に紙及

50

び編織布産業のための表面改良添加剤として及び化粧品における稠度調節剤として用いられてきており、そのことに関連してそれらは < 0.2 の低い置換度(DS)しか有していない。今日まで、それらの生物学的効果について何も知られていない。他方、長いアルキル鎖($C_{18}-C_{22}$)を有し且つシリルエーテル基によりデンプンに結合しているデンプンエーテルは抗感染効果、特に抗バクテリア効果を有することが報告されている(特許文献2)。多糖類のアルキルシリルエーテルの低い化学的安定性は、単に大気水分の効果の結果として官能基の制御されない放出及び結局生物学的活性の低下もしくはその喪失に導く(非特許文献8)。これに加え、低分子量シリル化合物は毒性である。さらに公開文献は抗バクテリア活性を有するセルロース繊維及びキトサン誘導体に言及している(非特許文献9)。天然のカチオン性多糖として、キトサンは最も多く記載されているものであり、化粧品において殺菌・殺カビ剤として用いられる(非特許文献10、非特許文献11)。これらの多糖類の欠点は、それらが多くの場合に他の生物物質(biogenic substances)で汚染されていること、必要な念入りな単離及び精製法の結果としてそれらが高価なことならびにアンモニウム基がポリマー主鎖上のみに位置するそれらの固有の構造である。これに加え、それらの分布を制御するのが不可能であり、且つ含有量は1の置換度に限られる。カチオンの改質され且つ架橋されたセルロースのような多糖類を含む超吸収物質(super absorbers)(特許文献3)も記載されている。

10

【0006】

文献において生物学的活性が第4級アンモニウム官能基の存在から生ずるという効果に記載があるが、他方、示され得る通り、カチオン性テトラアルキル窒素基を有する典型的な化合物、例えばポリクォーターニウム10(polyquaternium 10)は生物活性を有していないことが報告されている(非特許文献12)。構造が実際に生物学的に活性かどうか、そしてもしそうならどれが活性なのか、文献において入手可能な結果から結論することは全く不可能である。

20

【特許文献1】米国特許第5,049,383号明細書

【特許文献2】日本特許第05295002号明細書(JP 05295002)

【特許文献3】欧州特許出願公開第0582624号明細書(EP 0582624B1)

【非特許文献1】B. R. Bloom, J. L. Murray 著, Science 257, 1992年, 1055

30

【非特許文献2】M. Kresken, Bundesgesundheitsblatt [Federal Health Newspaper], 38, 1996年, 170

【非特許文献3】Wutzler, P. Thust, R. 著, Antiv. Res. 49, 2001年, 55

【非特許文献4】Andrei, G. et al. 著, Antimicrob. Agents Chemother., 39, 1995年, 1632

【非特許文献5】Pavic, I. et al. 著, Antimicrob. Agents Chemother., 39, 1997年, 2686

【非特許文献6】J. Controlled Release 50, 1998年, 145

40

【非特許文献7】Trends in Polymer Science 4, 1996年, 364

【非特許文献8】D. Klemm et al. 著, Comprehensive Cellulose Chemistry, Wiley-VCH, 1998年

【非特許文献9】W. H. Daly, M. M. Guerrini 著, Polym. Mat. Sci. Eng. 79, 1998年, 220

【非特許文献10】T. Tashiro 著, Macromol. Mater. Eng. 286, 2001年, 63

【非特許文献11】K. C. Gupta, M. N. V. R. Kumar 著, J. M. S.

50

- Rev. Macromol. Chem. Phys. C40, 2000年, 273

【非特許文献12】W. A. Daly, M. M. Guerrini, D. Culbers on, J. Macossay 著, Science and Technology of Polymers and Advanced materials, Plenum Press, 1998年, 493

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、新規な抗感染活性を有するポリマーを見出す目的に基づいている；物質は広範囲に及び強力な抗感染効果を有していなければならない、バクテリア感染と関連する抗生物質耐性と有効に戦うことを可能にしなければならない、ウィルス感染の処置のための新規な可能性を与えねばならず、十分に許容され、生物分解可能であり、無毒性であり且つ製造が容易でなければならない。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明に従い、エーテル化反応を用いてカチオン性官能基が0.4～3.0の範囲内の置換度(DS)で、特にアルキルアンモニウム基が0.6～1.8の範囲内のDSで Spacer 基により多糖類中に導入されている多糖誘導体を提供することにより、目的が達成される。それらの生物分解可能性及び無毒性のために、多糖類は特に適している。

【0009】

結局本発明は、リンカーにより結合している第4級アンモニウム基によって0.4～3.0の置換度で置換されている多糖類の、抗感染剤としての及び/又は感染症の処置のための使用に関する。

【発明の効果】

【0010】

本発明に従って用いられる化合物は高い程度の生物学的活性を示し、驚くべきことに病原性バクテリア、例えばスタフィロコックス及びマイコバクテリアの成長を5～60mg/lの範囲内の最小阻止濃度において阻害し、且つ3～50mg/lの範囲内でヘルペスウィルス及びインフルエンザウィルスの複製も阻害する。これらの性質のために、バクテリア及びウィルス感染の予防及び抑制用の薬剤の製造のために化合物を用いることができる。それらのみで、及び既知の治療薬又は生理学的に許容される助剤及び担体物質と組み合わせるの両方でそれらを用いることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

抗感染性化合物を、局所的投与、静脈内、皮下もしくは筋肉内注射による非経口的投与あるいは鼻内投与のために製薬学的に許容され得る媒体中の溶液もしくは懸濁剤として、ならびに錠剤、カプセル又は座薬としての使用のために調製することができる。化合物は体重のkg当たり0.1～1000mgの用量で用いられ得る。

【0012】

多糖類、好ましくはポリグルカン類、例えばセルロース、リケナン、プルラン及びデキストランならびに特に好ましくはデンプン類、例えば種々の起源の本来のデンプン類、例えばポテトデンプン、コムギデンプン、コーンスターチ及びライスデンプンならびに化学的もしくは酵素的に部分的に加水分解されたデンプン類、例えばソラミル、アミロース、アミロペクチン及びワックス状コーンスターチならびにまた遺伝子的に改変された植物から得られたデンプン類、例えばヒロン型(hylon type)が本発明に従う活性化化合物の製造に用いられる。デンプン中のアミロースの含有率は、アミロペクチンの含有率と同様に、それぞれ0～100%、好ましくは30～70%であることができる。適した多糖類の分子量は $10^3 \sim 10^7$ g/molの範囲内である(表1を参照されたい)。無水グルコース単位繰返し単位(AGU)は (1-4)、(1-6)、(1-3)、(1-4)及び(1-3)結合もしくはそれらの組み合わせ、例えば図1において図

式的に示される通り (1 - 4) 及び (1 - 6) あるいは (1 - 6)、(1 - 3) 及び (1 - 4) により互いに結合していることができ、異なる長さであり且つ種々のやり方で結合している側鎖を含有していることができる。これに加え、他の官能基、例えば天然のポテトデンプンの場合、例えばホスフェートエステル官能基も存在することができる。

【 0 0 1 3 】

【 化 1 】

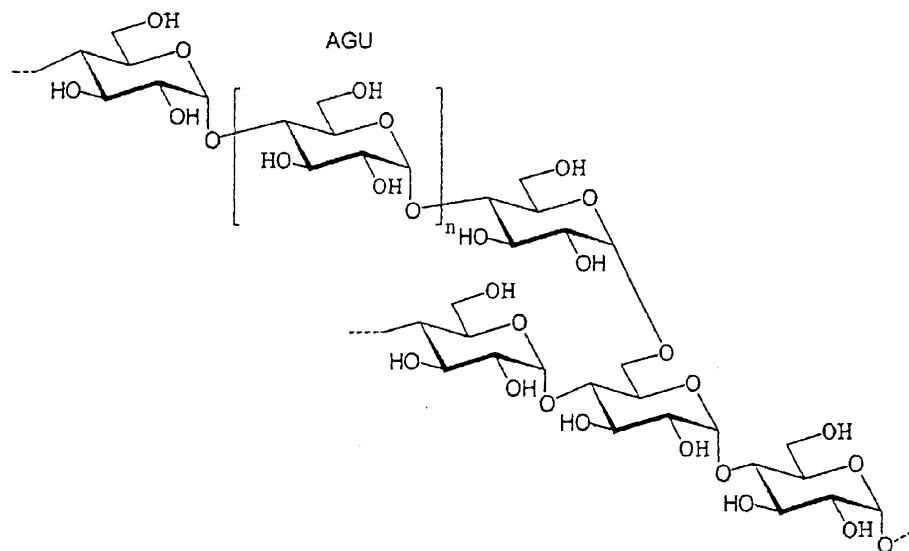


図1 持ちいられ得る多糖類の構造の例

【 0 0 1 4 】

【 表 1 】

表1:

デンプン材料	アミロース含有率(%)	分子量 (GPC ¹) (g・mol ⁻¹)
ヒロン VII (H)	70	9・10 ⁶
ポテトデンプン (P, Emsland)	28	40・10 ⁶
コーンスターチ (C)	28	76・10 ⁶
コムギデンプン (W)	26	65・10 ⁶
ワックス状コーンスターチ (WC)	1	51・10 ⁶
ソラミル (S)	28	9700

¹ DMSO中で決定

【 0 0 1 5 】

ヒドロキシル基が変換されている程度は、平均置換度 (DS) により記述される。この平均値は、何らの区別もなく、官能基化されたヒドロキシル基の数を示し、従って上記の多糖類の場合、定義により 0 ~ 3 の範囲内である。抗感染効果を有する本発明の多糖誘導体におけるカチオン性基の DS は 0 . 4 ~ 3 . 0、好ましくは 0 . 6 ~ 1 . 8 である。誘導体化の間に、それ自身が反応性基、例えばエポキシドを用いる多糖類のエーテル化の結

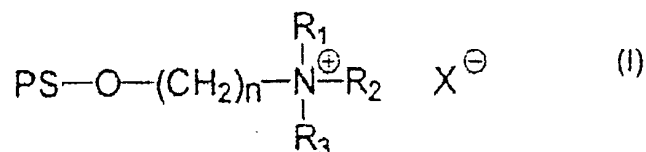
果としてのヒドロキシル基を含有する官能基が導入されると、これらの後者の基は同様に反応することができ、より長い側鎖の形成を生ずる。

【0016】

本発明に従って用いられ得る多糖誘導体は既知であるか、又はそれ自体既知の方法で、特に反応性化合物を用いて多糖類をエーテル化し、それにより一般式(I) (PS:多糖残基、1個の置換基のみが示されている)の第4級アンモニウム化合物を直接形成するか、あるいはエーテル化反応の後に第4級化を行なうことにより得られ得る。式(I)において、 R_1 、 R_2 及び R_3 は好ましくは互いに独立して、1~4個のC原子を有するアルキル又はベンジルもしくは置換ベンジル(置換基の例は1~3個のアルキル、ハロゲン、アルコキシ、カルバモイル、アルコキシカルボニル、シアノ及びジアルキルアミノである)であり、 R_1 は水素でもあり、Xはアニオン(例えばハライド、ヒドロキシド、サルフェート、水素サルフェート(hydrogen sulfate)ならびに無機及びカルボン酸の他のアニオン)であり、nは2~4であることができる。

【0017】

【化2】

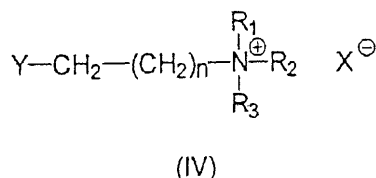
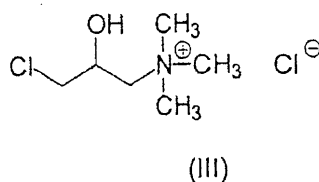
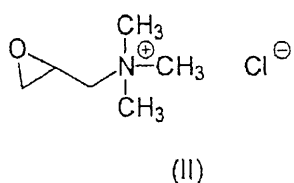


【0018】

好適に用いられる第4級カチオン化試薬は2,3-エポキシプロピルトリメチルアンモニウムクロリド(QUAB^R151, Degussa AG, 式II)又は3-クロロ-2-ヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウムクロリド(QUAB^R188, Degussa AG, 式III)である。Y=Cl又はBrであり、n=1~3である一般式IVの試薬も多糖類のエーテル化に用いることができる。

【0019】

【化3】



【0020】

従って、第4級アンモニウム基を多糖類に結合させるリンカーは、場合によりヒドロキシルで置換されていることができるC₂-C₄-アルキレンである。

【0021】

生物学的に活性な多糖誘導体の製造のためのエーテル化は種々の方法で行なわれ得、それ自体既知の方法で行なわれてカチオン性基の高い含有率が達成される。メタノール、イソプロパノール及び好ましくはエタノールのようなアルコールを用いるアルコール及び水酸化ナトリウム溶液及び水(不均一法)あるいは不均一系から均一系への遷移を用いるア

ルカリ金属水酸化物水溶液、好ましくは水酸化ナトリウム溶液／水中のポリマーの懸濁液ならびにまた塩化リチウムの存在下におけるジメチルスルホキシドもしくはジメチルアセトアミドのような双極性非プロトン性溶媒又は反応媒体としての他の溶媒中のポリマーの均一溶液の両方が適している。カチオン化試薬との反応に必要な時間は1～48時間、好ましくは3～24時間であり、温度は30～130、好ましくは40～80である。さらに、生成物の置換度は、用いられるエーテル化剤のモル当量により決定され得、広い限度内で変わることができる。これに加え、多糖誘導体を得るための多段階反応も適しており、すでにカチオン化されているか又はアミノ-官能基化されている生成物をもう一度上記の条件下で反応させる。反応生成物の仕上げのためにポリマー化学の通常の方法が用いられ、低分子量副生成物及び残留試薬が透析又は洗浄法又は有機溶媒中における水からの再沈殿により分離される。

10

【0022】

置換度は元素分析により決定される窒素値を用い、以下の定義式 (defining formula) に従って計算される：

【0023】

【数1】

$$DS_N = \frac{162.15 \cdot \%N}{1401 - 151.64 \cdot \%N}$$

20

【0024】

これに加え、化合物中に存在するクロリドのような対イオン及びNMRスペクトルがDS値の決定に適している。

【0025】

以下の実施例 (implementation examples) は本発明をさらに詳細に説明することを目的とするが、本発明を制限することは全くない。

【実施例】

【0026】

実施例：

30

1. エタノール／水酸化ナトリウム溶液／水中で不均一反応を行なうことによる化合物の製造

20gの多糖（多糖の性質、以下の表2を参照されたい）を80mlのエタノール中に懸濁させる。28mlの水中の10.85gのNaOHの溶液及び80mlのエタノールならびにまた0.246モルのQUAB^R188の溶液（69%水溶液）をこの懸濁液に滴下する。反応混合物を60で6時間攪拌する。0.1N HClを用いて生成物を中和し、透析し、凍結-乾燥する。

収率は95%（達成されたDSに基づいて）である。

元素分析：N 3.51%

平均置換度 (DS_N) = 0.66

40

【0027】

【表 2】

表2：不均一化反応

試薬			置換度	
多糖	型	モル比 AGU：試薬	生成物	
ヒロン	QUAB [®] 188	1：3	H 1 (466)	0.50
ヒロン	QUAB [®] 188	1：2	H 2 (KS005)	0.66
アミカ	QUAB [®] 188	1：3	WC 1 (505)	0.14
ポテトデンプン	QUAB [®] 188	1：3	P 1 ¹ (491)	0.34
ポテトデンプン	QUAB [®] 188	1：3	P 2 ¹ (469)	0.58
コムギデンプン	QUAB [®] 188	1：3.25	W 1 (527)	0.99
コムギデンプン	QUAB [®] 188	1：2	W 3 (571)	0.61
コムギデンプン	²	1：5	W 4	0.72
コムギデンプン	²	1：10	W 5	0.81

¹ 異なるNaOH濃度² 試薬：Cl-CH₂-CH₂-N(C₂H₅)H₂Cl

【0028】

2. 水酸化ナトリウム水溶液中における多糖類の転換

20 g の多糖（多糖の性質、以下の表 3 を参照されたい）を水酸化ナトリウム溶液（100 ml の水中の 0.5 g の NaOH）中に懸濁させる。混合物を 60 で 1 時間攪拌する。0.123 モルの QUAB^R 151 又は分解デンプン（degraded starch）ソラミルの場合は QUAB^R 188 をこの温度で滴下する。反応混合物を 60 で 6 時間攪拌する。室温に冷却した後、0.1 N HCl を用いて混合物を中和する；それを次いで透析し、生成物を凍結 - 乾燥する。

収率は 98 %（達成された DS に基づいて）である。

元素分析：N 3.34 %

平均置換度（DS_N）= 0.60

【0029】

10

20

30

【表 3】

表3：不均一/均一カチオン化

試薬				置換度	
多糖	型	モル比 AGU：試薬	生成物		
ヒロン	QUAB [®] 151	1：1	H 3 (477)	0.40	10
ヒロン	QUAB [®] 151	1：2	H 4 (KS006)	0.92	
アミオカ	QUAB [®] 151	1：0.5	WC 2 (503)	0.38	
アミオカ	QUAB [®] 151	1：1	WC 3 (501)	0.60	
アミオカ	QUAB [®] 151	1：2	WC 4 (502)	0.92	
コーンスターチ	QUAB [®] 151	1：0.5	C 1 (517)	0.35	20
コーンスターチ	QUAB [®] 151	1：1	C 2 ¹ (516)	0.55	
コーンスターチ	QUAB [®] 151	1：1	C 3 ¹ (519)	0.72	
コーンスターチ	QUAB [®] 151	1：2	C 4 (515)	1.03	
ポテト	QUAB [®] 151	1：3	P 3 (KS 016)	0.69	
ポテト	QUAB [®] 151	1：2	P 4 (KS 013)	1.05	30
コムギデンプン	QUAB [®] 151	1：0.5	W 4 (520)	0.39	
ソラミル	QUAB [®] 188	1：2	S 1 ¹ (554)	0.68	
ソラミル	QUAB [®] 188	1：3	S 2 (555)	0.76	
ソラミル	QUAB [®] 188	1：2	S 3 ¹ (568)	0.80	

¹ 異なるNaOH濃度

【0030】

3. ジメチルスルホキシド (DMSO) 中における均一反応の実施

15 g の多糖 (多糖の性質、以下の表 4 を参照されたい) を室温でジメチルスルホキシド (DMSO) 中に懸濁させ、懸濁液を 80 に加熱し、それと関連して多糖が溶解する。溶液を室温に冷却し、20 ml の水中に溶解された 0.5 g の NaOH を加える。次いで攪拌しながら 0.0925 モルの QUAB[®] 151 を滴下する。反応混合物を 60 で 24 時間攪拌する。それを室温に冷却した後、0.1 N HCl を用いて混合物を中和し、次いで透析し、凍結 - 乾燥する。

収率は 99% (達成された DS に基づいて) である。

元素分析：N 3.22%

平均置換度 (DS_N) = 0.57

【0031】

【表 4】

表4: 均一カチオン化

試薬		置換度		
多糖	型	モル比 AGU : 試薬	生成物	
ヒロン	QUAB [®] 151	1 : 3	H 5 (436)	0.55
ホテトデンブン	QUAB [®] 151	1 : 1	P 5 (KS 9)	0.42
アミカ	QUAB [®] 151	1 : 1	WC 5 (504)	0.57
コムギデンブン	QUAB [®] 151	1 : 1	W 5 (531)	0.41
コーンスターチ	QUAB [®] 151	1 : 1	C 5 (532)	0.40
ソラミル	QUAB [®] 151	1 : 1	S 4 (588)	0.60

10

20

【0032】

4. 数段階におけるカチオン化

5 g のカチオン化多糖（多糖の性質、以下の表 5 を参照されたい）を水酸化ナトリウム溶液（100 ml の水中の 0.5 g の NaOH）中に懸濁させる。混合物を 60 で 1 時間攪拌する。0.2 モルの QUAB^R 151 をこの温度で滴下する。反応混合物を 60 で 6 時間攪拌する。それを室温に冷却した後、0.1 N HCl を用いて混合物を中和し、次いで透析し、凍結 - 乾燥する。

収率は 95 %（達成された DS に基づいて）である。

元素分析：N 5.11 %

平均置換度（DS_N）= 1.32

30

【0033】

【表 5】

表5：数段階におけるカチオン化

カチオン化デンプン		試薬		置換度	
多糖	初期DS	型	AGU：試薬 モル比	生成物	DS _N
ヒロン	0.40	QUAB [®] 151	1：2	H 6 (479)	0.90
ヒロン	0.80	QUAB [®] 151	1：1.5	H 7 (498)	1.10
ホテト	0.77	QUAB [®] 151	1：2	P 6 (506)	1.18
ホテト	0.42	QUAB [®] 151	1：10	P 7 (597)	1.32
アミオカ	0.60	QUAB [®] 151	1：10	WC 6 (598)	1.25
コムギ	0.41	QUAB [®] 151	1：10	W 6 (603)	1.16
コムギ	0.88	QUAB [®] 151	1：10	W 7 (602)	1.41
コーン	0.55	QUAB [®] 151	1：10	C 6 (600)	1.13
ホテト	1.32	QUAB [®] 151	1：15	P 8	1.80
コーン	1.13	QUAB [®] 151	1：10	C 7	1.65
ソラミル	0.80	QUAB [®] 151	1：2	S 5 (610)	0.91

10

20

【0034】

5. グラム - 陽性及びグラム - 陰性バクテリアに対するならびに酵母に対する化合物の抗バクテリア / 抗微生物活性の決定

30

スタフィロコックス・アウレウス (Staphylococcus aureus) SG511、S. アウレウス 134/93 (多剤耐性) 及びマイコバクテリウム・バツカエ (Mycobacterium vaccae) IMET10670 に向けられる場合の化合物の抗バクテリア活性を、NCCLS 指針 [National Committee for Clinical Laboratory Standards: Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; 第4版, Villanova 編集; Approved standard Document M7 - A4. NCCLS, (1997)] に従い、Mueller - Hinton プロス (DIFCO) 中でのミクロプロス希釈試験 (microbroth dilution test) における最小阻止濃度 (MHCs) の決定により調べた。結果を表6に示す。

40

【0035】

【表 6】

表6：抗バクテリア活性

試料	置換度 DS _N	MHC [mg/l]		
		スタフィロコックス・アウレウス		マイコバクテリウム・ハッカエ
		SG 511	134/93	IMET10670
H 4 KS006	0.92	15.6	15.6	7.8
H 7 498	1.10	15.6	15.6	7.8
WC 4 502	0.92	31.25	62.5	15.6
C 3 519	0.72	15.6	62.5	7.8
C 4 515	1.03	31.25	62.5	15.6
P 3 016	0.69	31.25	62.5	7.8
P 4 013	1.05	15.6	125	3.9
W 2 567	0.57	62.5	62.5	15.6
W 3 571	0.61	31.25	31.25	7.8
W 1527	0.99	31.25	31.25	15.6
S 1 554	0.68	31.25	62.6	15.6
S 2 555	0.76	15.6	31.25	7.8
S 3 568	0.80	15.6	15.6	7.8

【 0 0 3 6 】

6 . ヘルペス・シンプレクス (h e r p e s s i m p l e x) ウィルス 1 型に関する抗ウィルス効果の決定

非特異的物質効果を排除できるように、抗ウィルス研究の前にミドリザル腎臓 (G M K) 細胞における 5 0 % 細胞毒性濃度 (C C ₅₀) を決定した。これを行なうために、マイクロタイタープレート (m i c r o t i t e r p l a t e s) 中の連続 G M K 細胞叢に適した物質希釈系列 (因子 2) を接種した (S c h m i d t k e e t a l . 著 , J . V i r o l . M e t h . 9 5 , 2 0 0 1 年 , 1 3 3) 。 7 2 時間のインキュベーションの後、クリスタルバイオレット / メタノールを用いて細胞を染色した。染料をこし出した後、それぞれのウェルの光学濃度を D y n a t e c h プレート光度計において測定し (5 5 0 / 6 3 0 n m) 、 6 個の未処理細胞標準の場合の平均値を 1 0 0 % としてそれと比較した。 C C ₅₀ は、希釈系列の吸光曲線が標準の場合の平均値の 5 0 % の線と交差する点における物質濃度である。 H S V - 1 に関する化合物の抗ウィルス効果を、 G M K 細胞において行なわれる細胞変性効果 - 阻害試験 (C P E - 阻害試験) で調べ、 5 0 % 阻害用量 (I C ₅₀) を決定した (S c h m i d t k e e t a l . 著 , J . V i r o l . M e t h . 9 5 , 2 0 0 1 年 , 1 3 3) 。 選択指数を C C ₅₀ 対 I C ₅₀ の比率として計算した (表 7) 。

【 0 0 3 7 】

出発化合物 (Q U A B 試薬及び非改質デンプン) は抗ウィルス効果を示さなかった (結果は示されていない) 。

【 0 0 3 8 】

【表 7】

表7：抗ウイルス活性

試料	置換度 DS _N	GMK細胞における CC ₅₀ (μg/ml)	HSV-1に対する IC ₅₀ (μg/ml)	選択指数 (CC ₅₀ /IC ₅₀)
H 3 477	0.40	> 200	8.54	> 23.42
H 1 466	0.50	> 200	5.11	> 39.14
H 2 005	0.66	> 200	7.07	> 28.29
WC 2 503	0.38	> 200	7.05	> 28.37
C 1 517	0.35	> 200	7.84	> 25.51
P 1 491	0.34	> 200	10.15	> 19.70
W 4 520	0.39	> 200	10.55	> 18.96
S 1 554	0.68	141.54	3.59	39.43

10

20

【 0 0 3 9 】

7. 改変 P R T における作用様式の決定

アシクロビル - 感受性及びホスホノギ酸 - 感受性 H S V 1 株 K u p k a を用い、化合物 M 1 を例として、改変 P R T における物質の作用の機構の研究を行なった (S c h m i d t k e e t a l . 著 , J . V i r o l . M e t h . 9 5 , 2 0 0 1 年 , 1 3 3) 。試験において、物質は種々の濃度で :

- 1 . 無細胞ウイルス (10^6 p f u / m l) のみに加えられ、それは次いで化合物と一緒に 3 7 ° で 6 時間インキュベーションされ、物質を希釈した後に P R T 中に導入された :
- 6 . 2 5 ~ 2 5 μ g / m l までの用量範囲内でプラークの減少なし (結果は示されていない) 、
- 2 . 寒天のみに加えられた : 6 . 2 5 ~ 2 5 μ g / m l の用量範囲内でプラークの減少なし (結果は示されていない) 、
- 3 . 1 時間の吸着の間のみに 4 ° において 2 時間加えられた (3 . 1 2 ~ 1 2 . 5 μ g / m l) そして
- 4 . ウィルスを加える 1 , 2 及び 4 時間前に加えられた (3 . 1 2 ~ 1 2 . 5 μ g / m l) 。

30

【 0 0 4 0 】

作用の機構の研究の結果は、無細胞ウィルスの不活性化を観察することができなかった。本発明に従う化合物が殺ウィルス効果を有していないことを示す。その代わりに、ヘルペスウィルス複製の阻害のための前提条件は、試験細胞へのウィルスの吸着の前又はその間に物質が存在することである。

40

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 8/73 (2006.01)		A 6 1 K 8/73
A 0 1 P 1/00 (2006.01)		A 0 1 P 1/00
A 0 1 P 3/00 (2006.01)		A 0 1 P 3/00
C 0 8 B 31/12 (2006.01)		C 0 8 B 31/12

(72)発明者 シュミトケ, ミヒヤエラ
 ドイツ0 7 7 4 3 イエナ・フレーベルシュテイク6アー

(72)発明者 メルマン, ウテ
 ドイツ0 7 7 4 9 イエナ・シユレンドルフアーオベルベーク17

(72)発明者 ダーセ, ハンス - マルティン
 ドイツ9 9 4 2 3 パイマー・マイエルシュトラーセ13アー

(72)発明者 ヘルトル, アルベルト
 ドイツ0 7 7 4 3 イエナ・オスカル - ツアハウ - シュトラーセ10

審査官 福井 悟

(56)参考文献 特開平01 - 156301 (JP, A)
 特開平05 - 295002 (JP, A)
 特開平01 - 121201 (JP, A)
 特開昭61 - 064701 (JP, A)
 特開昭57 - 025301 (JP, A)
 特表平05 - 506266 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A61K 31/33-33/44
 C08B 1/00-37/18
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)