

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-503049

(P2006-503049A)

(43) 公表日 平成18年1月26日(2006.1.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 307/83 (2006.01)	C O 7 D 307/83 C S P	4 B O 6 4
A 6 1 K 31/365 (2006.01)	A 6 1 K 31/365	4 C O 3 7
A 6 1 P 7/10 (2006.01)	A 6 1 P 7/10	4 C O 8 6
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2004-536901 (P2004-536901)
 (86) (22) 出願日 平成15年7月17日 (2003. 7. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年4月1日 (2005. 4. 1)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/007805
 (87) 国際公開番号 W02004/026854
 (87) 国際公開日 平成16年4月1日 (2004. 4. 1)
 (31) 優先権主張番号 102 38 257.3
 (32) 優先日 平成14年8月21日 (2002. 8. 21)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 505063360
 ヨハンネス グーテンベルク・ユニヴェル
 ズィテート マインツ
 ドイツ連邦共和国, 5 5 1 2 2 マインツ
 , ザールシュトラッセ 2 1 タティス 3
 (71) 出願人 505063382
 フライシュタート バイアーン フェアト
 レーテン ドゥルヒ ディ ユリウス・マ
 クシミリアーン・ユニ ヴェルズィテ
 ート ヴェルツブルク
 ドイツ連邦共和国, 9 7 0 7 0 ヴェルツ
 ブルク, ザンデアリング 2
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆

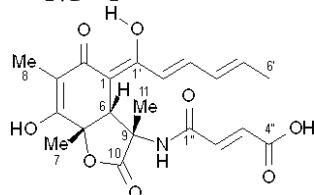
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ソルビシルラクトンAおよびソルビシルラクトンA誘導体、これらの製造方法、これらを含む薬剤、およびこれらの使用

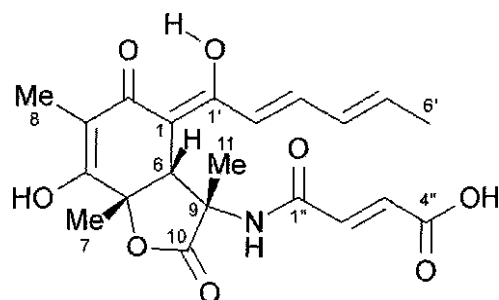
(57) 【要約】

一般式Iの化合物ソルビシルラクトンAおよびソルビシルラクトンA誘導体、ならびにそれらの製造方法に関する。ソルビシルラクトンAおよびソルビシルラクトンA誘導体は、細胞培養モデルにおいて、抗腫瘍性および抗ウイルス性特性を発揮する。更に、ソルビシルラクトンAは炎症抑制特性を有する。最後に、ソルビシルラクトンAおよびその誘導体の合成を記述する。

【化1】



ソルビシルラクトンA



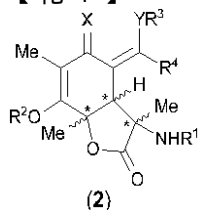
Sorbicillactone A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (2) の化合物：

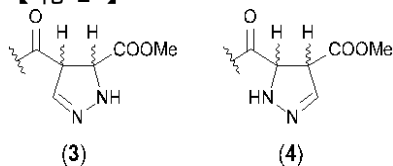
【化 1】



10

式中、 R^1 は - H、($C_1 \sim C_{10}$) アルキル、ここでアルキルは直鎖または分枝である、($C_3 \sim C_{10}$) アルケニル、またはアシル基 (例えば、フォルミル、アセチル、トリクロロアセチル、フマリル、マレイル、サクシニル等) から選択され、ここで最終的な遊離 - COOH 基はこのアシル基上でエステル型 (例えばメチルエステル - COOMe) としても存在可能である、または、任意に R^1 は複素環アシル置換体 (3) または (4) の中の 1 でも有り得る、

【化 2】



20

R^2 は - H、($C_1 \sim C_{10}$) アルキル、ここでアルキルは直鎖または分枝である、またはアシル基 (例えば、フォルミル、アセチル等) から選択される；

R^3 は - H、($C_1 \sim C_{10}$) アルキル、ここでアルキルは直鎖または分枝である、またはアシル基 (例えば、フォルミル、アセチル等) から選択される；

R^4 は ($C_1 \sim C_{10}$) アルキル、ここでアルキルは直鎖または分枝である、または ($C_3 \sim C_{10}$) アルケニル、ここでアルケニル残基は 1 または数個の二重結合を含むことができる；

X は O、S、NOH または $NO R^5$ から選択され、ここで R^5 は直鎖または分枝鎖の ($C_1 \sim C_6$) アルキルである；

30

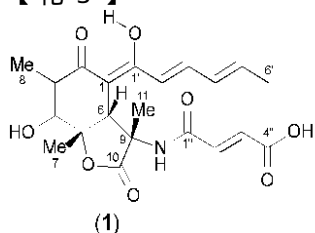
Y は O であるか、または Y と X が N 原子であって互いに結合してピラゾール環を形成する；

そして、ここで該化合物は (R, R, R) 立体異性体、(R, R, S) 立体異性体、(R, S, R) 立体異性体、(R, S, S) 立体異性体、(S, R, R) 立体異性体、(S, R, S) 立体異性体、(S, S, R) 立体異性体および (S, S, S) 立体異性体として存在することができる、および (2) の医薬的に許容される塩または溶媒和物。

【請求項 2】

式 (1)：

【化 3】



40

を有する、請求項 1 に記載の化合物 (ソルビシルラクトン A) またはその誘導体、それらのジアステレオマー、および対応するエナンチオマー、およびこの化合物の医薬的に許容される塩または溶媒和物。

【請求項 3】

50

ペニシリウム属、特にペニシリウム クリソジナム属の菌を既知の様式で増殖し、その培養培地および / または菌バイオマスから本発明化合物の少なくとも 1 を単離することを含み、請求項 1 または 2 に記載の化合物の製造方法。

【請求項 4】

増殖が海洋生物、特に海綿動物イルシニア ファシクラータ (ポリフェーラ) において行われることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

単離した化合物を引き続き合成的に誘導体化することを更に含む請求項 3 または 4 に記載の方法

【請求項 6】

請求項 1 または 2 に記載の化合物を生体模倣的に合成する方法であって、

a) ソルビシリンおよび / またはその誘導体を準備すること、

b) 酸化により脱芳香族化し、続いてアラニンまたは他のアミノ酸およびこれらの類似体を添加すること、および

c) 引き続きフマル酸または類似のアシル残基を付加すること

を含む方法。

【請求項 7】

疾患治療に使用する請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 8】

適切な賦形剤または添加剤と共に請求項 1 または 2 に記載の化合物を含む医薬組成物。

【請求項 9】

適切な医薬的に許容される希釈剤または担体物質と共に、該化合物が持続性薬物の形態で、または前駆体として存在することを特徴とする請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

該化合物が $20 \mu\text{g}$ の量で存在することを特徴とする請求項 8 または 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

治療時に生体内濃度が $0.3 \sim 3.0 \mu\text{g/ml}$ の範囲となるような量で存在することを特徴とする請求項 8 または 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

化学療法剤が更に含有されることを特徴とする請求項 8 から 11 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

錠剤、糖衣剤、カプセル剤、液滴剤、坐剤、経口用、直腸用もしくは非経口用の注入または点滴の製剤の形態である請求項 8 から 12 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

腫瘍ならびに / もしくはウイルス性疾患の治療用および / または炎症性状態の治療用の薬剤を製造するための請求項 1 または 2 に記載の化合物の使用。

【請求項 15】

適切な医薬的に許容される希釈剤または担体物質と共に、持続性薬物の形態でのまたは前駆体としての請求項 14 に記載の使用。

【請求項 16】

HIV - 1 の治療のための、 $0.3 \sim 3.0 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲での請求項 14 または 15 に記載の使用。

【請求項 17】

炎症の治療のための、 $2 \mu\text{g/ml}$ の濃度での請求項 14 または 15 に記載の使用。

【請求項 18】

浮腫形成の治療のための、 $20 \mu\text{g}$ の量での請求項 14 または 15 に記載の使用

【請求項 19】

請求項 1 または 2 に記載の化合物または請求項 8 から 13 のいずれか 1 項に記載の医薬

10

20

30

40

50

組成物を投与することを含む、腫瘍ならびに / もしくはウイルス性疾患および / または炎症性状態から選択された疾患の治療方法。

【請求項 20】

適切な医薬的に許容される希釈剤もしくは担体物質と共に、持続性薬物の形態での、または前駆体として、医薬組成物を投与することを含む請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

ウイルス性疾患が HIV - 1 であり、該化合物を $0.3 \sim 3.0 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で投与する、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

炎症を治療し、該化合物を $2 \mu\text{g/ml}$ の濃度で投与する請求項 19 または 20 に記載の方法。 10

【請求項 23】

浮腫形成を治療し、該化合物を $20 \mu\text{g}$ の量で投与する請求項 19 から 22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ソルビシルラクトン A と指称される、海洋生物由来の新規な生物活性化合物、およびそれらの誘導体に関する。更に本発明は、これらの化合物の製造方法、これらを含む含有する薬剤、および疾患の治療におけるこれらの使用に関する。更に、ソルビシルラクトン A とそれらの誘導体の合成を記載する。 20

【背景技術】

【0002】

海洋の真核生物、特に海綿類、ヒドロ虫類、ブリオ虫類、被囊類から生物活性物質の非常に豊富な資源が提供されている（非特許文献 1）。これは、これらの多細胞生物は固着生物であって、栄養源を周囲の環境に存在する微生物から得ているためである。したがって、これら生物には、細菌ないし真菌による感染から自分自身を防護するための有効な防衛的メカニズムが必要である。その最も活性な防衛的物質は、これら海洋真核生物の体内に存在している共生生物が産生する二次代謝産物に似ている。そこで、大部分の事例では、この生物活性物質の実際の生産者は宿主（海綿類、ヒドロ虫類、ブリオ虫類、被囊類）であるのか、あるいはこの宿主にしばしば共生している微生物（真菌類、細菌類）であるのかは、今日に至っても不明である（非特許文献 2）。近年、海綿類にはウイルスを排除する防衛メカニズムがあるということも提示された（非特許文献 3）。かくして、これら微生物を培地で増殖させて、生物活性物質を生産させることが主要な研究目標である。 30

【0003】

現在では、海洋真核生物の体内に存在する細菌類と真菌類の中で培地に保持可能なのは 5 % 未満であると推定できる。したがって、これらの有用物は未だ開発されていない。生物活性のある有用物を首尾よく持続的に開発するためには、培地から高収率で生物活性物質を収得する最適な微生物培養方法を開拓することが必須であり、その目的は効果的な精製と分析の方法によってこれら生物活性物質を同定することである。海洋真核生物が産生する薬物で今日までに臨床治療に導入されているのは、9 - β - D - アラビノフラノシル アデノシン [ara A] の唯一つだけである（非特許文献 4）。 40

【0004】

生物活性のある二次代謝産物を商品的に開発する利用範囲は広く、その範囲は神経変性疾患のある腫瘍の治療から細菌類、ウイルス類および / または真菌類による感染症の治療に至る。

【0005】

特定の腫瘍に対し高度の特異性を発揮すると同時にウイルスによる等の不特定な感染を縮小する生物活性物質が集中的に研究されている。

【非特許文献 1】 Sarma AS, Daum T, Muller WEG (1993) 海綿からの二次代謝産物. Acade 50

my of non-profitsciences in Erfurt, Ullstein-MosbyVerlag, Berlin

【非特許文献2】Althoff et al.(1998) Marine Biol 130:529-536; Wiens et al., Marine Biol.; in press

【非特許文献3】Grebenjuk et al.(2002)Europ.J.Biochem.269: 1382-1392

【非特許文献4】Muller et al. (1977) Ann. New York Acad Sci 284:34-48

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、それ故、海洋生物由来の新規生物活性物質、その製造方法、およびその使用の提供である。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明によれば、この目的は、まずソルビシルラクトン A およびソルビシルラクトン A 誘導体と指称される生物活性物質の提供によって解決される。ソルビシルラクトン A は天然化合物であって、今日までその記載はない。したがって、その宿主範囲も大部分は未知である。ソルビシルラクトン A の関連化合物で文献に記載されたものはない。

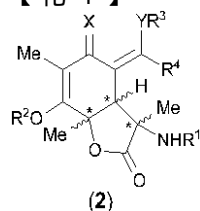
【0008】

一般式 (1) および (2) のソルビシルラクトン A およびソルビシルラクトン A 誘導体は明確な抗腫瘍および抗ウイルスの特性を発揮することを見出した。すなわち本発明により一般式 (2) の化合物が提供される：

20

【0009】

【化4】



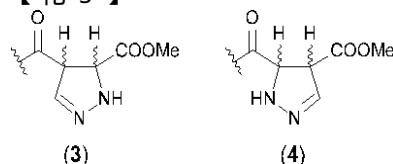
【0010】

式中、 R^1 は - H、($C_1 \sim C_{10}$) アルキル、ここでアルキルは直鎖または分枝、($C_3 \sim C_{10}$) アルケニル、またはアシル基 (例えば、フォルミル、アセチル、トリクロロアセチル、フマリル、マレイル、サクシニル等) から選択され、最終的にここでこのアシル基には遊離 - COOH がエステル型 (例えばメチルエステル - COOMe) としても存在可能である、または、任意に R^1 は複素環アシル置換体 (3) または (4) の中の 1 でも有り得る、

30

【0011】

【化5】



40

【0012】

R^2 は - H、($C_1 \sim C_{10}$) アルキル、ここでアルキルは直鎖または分枝、またはアシル基 (例えば、フォルミル、アセチル等) から選択される；

R^3 は - H、($C_1 \sim C_{10}$) アルキル、ここでアルキルは直鎖または分枝、またはアシル基 (例えば、フォルミル、アセチル等) から選択される；

R^4 は ($C_1 \sim C_{10}$) アルキル、ここでアルキルは直鎖または分枝、または ($C_3 \sim C_{10}$) アルケニルから選択され、ここでアルケニル残基は 1 または数個の二重結合を含むことができる；

50

XはO、S、NOHまたはNOR⁵から選択され、ここでR⁵は直鎖または分枝鎖の(C₁～C₆)アルキルである；

YはOであるか、またはYとXがN元素であって互いに結合してピラゾール環を形成する；

なお、ここで該化合物は(R, R, R)立体異性体、(R, R, S)立体異性体、(R, S, R)立体異性体、(R, S, S)立体異性体、(S, R, R)立体異性体、(S, R, S)立体異性体、(S, S, R)立体異性体および(S, S, S)立体異性体として存在することができる、および(2)の医薬的に許容される塩または溶媒和物。

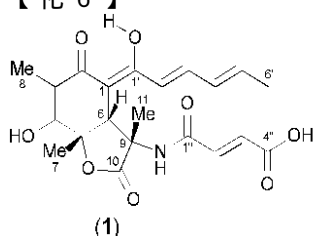
【0013】

本発明による好ましい化合物は、式(1)：

10

【0014】

【化6】



【0015】

を有する化合物(ソルビシルラクトンA)またはその誘導体、それらのジアステレオマー、および対応するエナンチオマー、およびこの化合物の医薬的に許容される塩または溶媒和物である。

20

【0016】

本発明において、「誘導体」とは、一般式(2)から誘導される化合物であって、例えばR¹ないしR⁴およびXまたはYとして上に示した各種の残基で置換されたもの、並びにこれら化合物の数種の混合物であって、例えば診断データあるいは治療成功または治療成果に関するデータに基づいて治療対象の疾患に適合したおよび/または患者に適合した「個人別の」薬剤に調製可能なもの、とすることができる。更に、ソルビシルラクトンAのクラスの化合物とは、他の(例えば)海洋生物から単離可能な誘導体であって、本明細書に(例示的に)挙げたようなものと理解するものとする。

30

【0017】

本発明において、「前駆体」として理解される物質とは、一方で治療投与の過程で生体内条件(例えば、胃内pHなど)により変化し、あるいは摂取後に生体を通過する過程で代謝され、その結果本発明化合物またはその誘導体を活性物質として形成するものとする。他方、生物から単離されたソルビシルラクトンAの誘導体であって、各生物において該化合物が合成される出発物質として機能し、本明細書に示したソルビシルラクトンAの特性を既に発揮しているものは前駆体として理解されるものとする。

【0018】

ソルビシルラクトンAおよびこの物質から誘導したソルビシルラクトンA誘導体には明確ながら予測不能な抗腫瘍および抗ウイルス特性があることを見出した。更に驚くべきことに、この新規物質の炎症阻止特性が見出された。これらの特性により、およびソルビシルラクトンAおよびソルビシルラクトンA誘導体は哺乳動物(例えばマウス)に対し、顕著に毒性がないという知見に基づけば、本明細書に記載の当該物質は腫瘍およびウイルス性疾患の治療に適している。適切な医薬的に許容される賦形剤または担体物質と共に、該物質をそのままの形態でまたは持続性薬物の形態または前駆体として使用することが推奨される。

40

【0019】

海洋資源、無脊椎動物、および微生物に由来する多数の天然化合物が記述されている。従って、生物学的に活性な新規化合物を求める研究のためには、効果的な重複回避が必要であり、すなわち既知化合物は同定作業の初期段階で前もって発見し明確に同定しなければ

50

ばならない。この目的のためには、数種の分光学的検知方法と組み合わせた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が特に適切である。HPLCとNMR、MS、およびCDが結合した「LCトリード（LC-triade）」は特に有能である（Bringmann et al. (1998) Anal. Chem. 70:2805-2811; Bringmann et al. (1999) Anal. Chem. 71:2678-2686）。抽出物の成分化合物に関して分光学的データが得られれば、個々の化合物を実際に単離しなくても、データベースを調査することにより既知物質を明瞭に同定することができる。更に、状況が適切であれば、予め単離していなくても未知天然化合物の完全な立体構造の解明であっても可能である。

【0020】

ソルビシルラクトンAは天然化合物であり、ソルビシルラクトンA誘導体はそれから誘導した合成産物であり、これらは今日まで未知であり、その活性は記述されていない。 10

【0021】

本発明によれば、これらの化合物は、通常の溶媒、賦形剤および担体物質を使用して錠剤、糖衣剤、カプセル剤、液滴剤、坐剤、注入および点滴用製剤に加工することができ、その目的は経口、直腸または非経口投与のための治療用途を見出すことである。

【0022】

また、本発明は、上記化合物の製造方法であって、該物質を好ましくは海洋生物、例えば海綿体の体内共生生物として増殖しているペニシリウム属の真菌から単離することの特徴とする方法に関する。ペニシリウム属の真菌（好ましくはペニシリウム クリソジナム）が本発明化合物の生産者であることは本発明において最初に検出された。以下の培養条件の下でソルビシルラクトンAは培養培地中に分泌され、また特に真菌のバイオマスに蓄積する。真菌は、無性世代のトリココマーケア/デューテロマイセット/マイトスポリックフンジ、コードグループ1. A2. 15として系統的に特徴化されているペニシリウム L I N K (1 8 0 9) 属のメンバーである。この属の特徴は、注目に値する生化学的な潜在能力を有する種が広範に多数あることである。現存の種は1910年以来公知であり、陸上に小さな棲息圏を持つ生物と今日まで説明されてきた。しかし、本真菌単離体（真菌株）は、海洋に棲む環境から誘導され、海綿イルシニア ファシキュラータ（ポリフェーラ）から単離された。しかし、本発明で行った構造的解明に基づけば、本発明化合物は通常の合成化学によっても製造できるし、あるいは誘導体および前駆体に変更することもできる。この目的には、本発明の別の態様として、本発明化合物を生体模倣的に合成する方法が好ましく、最初にソルビシリンおよび/またはその誘導体を得て、次に酸化的に脱芳香族化し、引き続きアラニン（ソルビシリンAの場合）または他のアミノ酸およびそれらの同族体（他のソルビシリン誘導体に対して）を公知の方法で添加し、次にフマル酸（ソルビシリンAの場合）または同族のアシル残基（他のソルビシリン誘導体に対して）を付加する。 20 30

【0023】

本発明の他の態様は上記化合物の少なくとも1を疾患、例えば腫瘍性および/またはウイルス性疾患の治療におよび/または感染状態の治療に使用することに関する。この使用は、例えば適切な医薬的に許容される希釈剤または担体物質と共に持続性薬物の形態でまたは前駆体として行うことができる。HIV-1関連疾患の治療の場合には、0.3~3.0 μg/mlの濃度範囲での治療が好ましく、感染の治療の場合には、約2 μg/mlの濃度が好ましい。浮腫形成の治療では、上記化合物の約20 μgの量を使用する。更なる態様は、1つまたは数個の本発明化合物を腫瘍性ならびに/もしくはウイルス性疾患の治療用、および/または炎症状態の治療用薬剤の製造に使用することである。この製造は、上記と同様な方法でかつ上記の濃度で、そして特に上記使用のために行うことができる。 40

【0024】

本発明の他の態様は適切な添加剤または賦形剤と共に本発明化合物を含有する医薬組成物に関する。この医薬組成物の特徴は、適切な医薬的に許容される希釈剤または担体物質と共に該化合物が持続性薬物の形態でまたは前駆体として存在可能であることである。 50

【0025】

特に好ましいのは、本発明医薬化合物が（浮腫形成の治療に特に適する） $20\text{ }\mu\text{g}$ の量で存在する医薬組成物、または本発明化合物が、治療中の生体内に（ウイルス性および/または炎症性疾患の治療に特に適する） $0.3\sim 3.0\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲で存在するような量で存在する医薬組成物である。

【0026】

好ましい本発明の医薬組成物は更に化学療法剤を含有する。これら化学療法剤には、癌療法において当業者に周知の化学療法剤（例えばタキソール他）が全て包含される。

【0027】

本発明によれば、上記医薬組成物は錠剤、糖衣剤、カプセル剤、液滴剤、坐剤、経口用、直腸用または非経口用の注入または点滴の製剤の形態で存在することができる。そのような投与形態およびその製造は当業者に公知である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

一般式（1）および（2）の、本方法の製造物は有益な薬理学的特性を発揮する。特にL5178yマウスリンパ腫細胞系（ATCC CRL 1722）を使用して抗腫瘍効果が確認された。これらの細胞は以前に既述したような懸濁培地に保持した（Mulleret al. (1979) Cancer Res. 39: 1102-1107）。これら腫瘍細胞株中のソルビシルラクトンA（培養： 10^6 細胞/ ml 、培養時間：72時間）の ED_{50} 濃度は $2.2\pm 0.3\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。腫瘍細胞株PC-12（副腎クロム親和性細胞腫，[ラット]；ATCC CRL 1721）、肉腫180（マウス肉腫；ATCC TIB 66）、およびHeLa S3（上皮癌[頸；ヒト]；ATCC CCL 2.2）ではソルビシルラクトンAの効果は僅かに低くなり、 ED_{50} 濃度は $8\sim 15\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

【0029】

更に、本発明は、腫瘍性ならびに/もしくはウイルス性疾患および/または炎症性状態から選択される疾患の治療方法であって、本発明化合物を例えば本発明医薬組成物の形態で投与することの特徴とする方法に関する。本発明によれば、この投与は適切な医薬的に許容される希釈剤または担体物質と共に持続性薬物の形態でまたは前駆体として行うことができる。

【0030】

特に好ましい治療方法は、ウイルス性疾患がHIV-1感染である場合である。この場合には、化合物の投与を $0.3\sim 3.0\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の生体内濃度範囲で行うことができる。この濃度を達成するのに必要な量を得ることは当業者には容易であり、この量は特に個々の患者、疾患、および使用する個々の化合物の生体利用性に依存する。治療対象の別のウイルス性疾患としては、別の典型的なHIV感染、HCV（C型肝炎ウイルス）感染、ヘルペスおよび/またはRSVウイルス性疾患が挙げられる。

【0031】

更に好ましい疾患治療方法は、炎症を治療する場合である。これのためには、ウイルス性疾患での投与と同様に、 $2\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の生体内濃度で行うことができる。可能な更なる治療は浮腫形成への治療である。これのためには、本発明化合物を $20\text{ }\mu\text{g}$ の量で投与することができる。

【0032】

治療の場合に使用する化合物濃度では培地中の非腫瘍細胞は細胞増殖抑制効果を受けないということは、腫瘍性疾患の化学療法および抗ウイルス療法に本方法の生産物を使用する上で特に重要である。リンパ球培地での実験からこの結果が結論された。すなわち、脾臓のリンパ球を6週令のNMRIマウスから得て、赤血球を塩化アンモニア処理で懸濁液から除去した。脾臓のリンパ球は、20%ウシ胎仔血清含有RPMI 1640培地に $2\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ コンカナバリンAの存在下に 1.5×10^7 細胞/ ml の密度で72時間保持された。実験終了18時間前に $[^3\text{H}]$ チミジンを加えた。本方法の生産物 $15\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ と共に培養したが、DNA合成の速度に対する逆効果は測定されなかった。 $20\text{ }\mu\text{g}/$

10

20

30

40

50

m l の存在下でも、 $[^3\text{H}]$ チミジンのDNAへの蓄積速度は20%阻害されただけであった。

【0033】

ソルビシルラクトンAおよびその誘導体を $> 20\text{ mg/kg}$ を腹腔内投与にて5日以上マウスに処理したところ、毒性は亜急性であったのは非常に有利なことであり、本方法の生産物を癌疾患の化学療法に使用するのには有望である。

【0034】

本方法の生産物の抗ウイルス効果が大きいことはHTLV-IIIIB (HIV-1) テスト系で確認された。ウイルスの生産を特異的に阻害することが $0.3 \sim 3.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で検出された。

10

【0035】

更に、ソルビシルラクトンAおよびソルビシルラクトンA誘導体は大きな炎症抑制特性を示す。この効果はインピトロ（モデル：フォスフォリパーゼA2〔ハチ毒由来〕）でもインビボ（モデル：マウスの耳の浮腫）でも測定することができた。フォスフォリパーゼA2（ハチ毒由来）を使用した実験において、 $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度でほぼ80%の阻害が得られることを示すことができた。更にソルビシルラクトンAのマウス浮腫に対する効果が測定された。TPA（ $10\text{ }\mu\text{g}$ ）でマウス（スイス、約25g）に浮腫を誘起させた。TPAをアセトンに溶解し、右側の内耳に局部投与した。左側の内耳はコントロール（アセトンコントロール）とした。4時間後に斬首屠殺して浮腫の領域を切り取り、重量を測定した。処理組織とコントロールとの間の重量比をソルビシルラクトンAの効果の指標として使用した（CarlsonRP et al. (1985) AgentsActions17: 197-204）。通常、TPA処理10分後に活性物質を処理部位に局所投与した。3時間後にコントロールでは浮腫の展開は $12.3 \pm 0.9\text{ mg}$ であった。ソルビシルラクトンAの浮腫形成に対する効果は有意であった（ $p \leq 0.01$ ）。すなわち、 $20\text{ }\mu\text{g}$ で処理した場合に $39.2 \pm 5.3\%$ の阻害率が得られた（ $n = 5$ ）。

20

【0036】

本発明を更に実施例に基づいて以下に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【実施例1】

【0037】

30

生体材料からの物質ソルビシルラクトンAの取得

最初に、ペニシリウム属（好ましくはペニシリウム クリソジナム）の真菌を新規天然化合物ソルビシルラクトンAの生産者として検出した。以下の培養条件でソルビシルラクトンAが培地中に分泌され、更に特に真菌のバイオマスに蓄積する。真菌は、無性世代のトリココマーケア/デューテロマイセツト/マイトスポリックフンジ、コードグループ1.A2.15として系統的に特徴化されているペニシリウムLINK（1809）属のメンバーである。この属の特徴は、注目に値する生化学的な潜在能力を有する種が広範に多数あることである。本種は1910年以来公知であり、陸上に小さな棲息圏を持つ生物と今日まで説明されてきた。しかし、本真菌単離体（真菌株）は、海洋に棲む環境から生じ、海綿イルシニア ファシキュラータ（ポリフェーラ）から単離された。

40

【0038】

真菌の単離と培養の一般的な方法の説明

続いて、増殖した菌系体を含む培養培地を収穫し、培養培地 300 ml あたり酢酸エチル 40 ml を補充し、 -86°C で凍結した。

【0039】

抽出には好ましくは、メタノール、ジクロロメタン、および酢酸エステルが使用されるが、他の溶媒、例えばエタノール、プロパノール、ブタノール、エーテル、n-ヘキサン、ベンゼン、トルエン、アセトン、メチルエチルケトン、酢酸t-ブチルエステルも考えられる。得られた抽出物を減圧で濃縮乾燥し、任意に予備分画した後、1つまたは数個のクロマトグラフ法を援用しながら液-液抽出によって分別した。このためには好ましくは

50

、水／アセトニトリルまたは水／メタノールの濃度勾配がある「逆相」材料（R P₁₈）上の予備的H P L Cを利用する。二酸化ケイ素、酸化アルミニウム、またはセルロースも固定相として利用できるが、液－液クロマトグラフィー、例えばH S C C Cを採用することができた。各種画分を集め、H P L Cまたは薄層クロマトグラフィーによって本発明化合物の含量を調べる。所望の画分を濃縮後、化合物を精製形で取得する。

【実施例 2】

【0040】

本発明化合物の実施例

ソルビシルラクトン A の単離

イタリア、エルバ島フェトバイア湾（北緯 42°43′24″、東経 10°09′31″）の水深 17.5 m から採取した海綿イルシニア ファシキュラータから 2001 年 5 月 2 日に、本ペニシリウムの真菌株を単離した。採取後直ちに海洋菌学的方法を援用して海綿中の真菌含量を検査した。切開した海綿の小片組織を次の組成の栄養寒天プレート（C Y A S , P i t t 1973）の上に並べて本単離を行った。

【0041】

ツアベック - 酵母抽出物 - 寒天 + 海水：

30 g スクロース

5 g 酵母抽出物

3 g NaNO₃

1 g K₂HPO₄

10 ml ミネラル溶液：

5 g KCl、5 g MgSO₄ + 7 H₂O、0.1 g FeSO₄ + 7 H₂O / 100 ml H₂O

1 ml 微量金属溶液：

1 g ZnSO₄ + 7 H₂O、0.5 g CuSO₄ + 5 H₂O / 100 ml H₂O

1 H₂O

抗生物質

1000 ml 海水（30 - 33 PSU）

【0042】

粗製の一次培地を数回の精製工程により、無菌の純粋培地にした。次の組成（G P Y N S , S c h a u m a n n 1974）の傾斜寒天管の上で株化培養を行った。

【0043】

グルコース - ペプトン - 酵母抽出物 - 硝酸アンモニウム - 海水 - 寒天：

1.0 g グルコース

0.5 g ペプトン

0.1 g 酵母抽出物

1.0 g 硝酸アンモニウム

15.0 g 寒天

1000 ml 海水（30 - 33 PSU）

pH 7.2 ~ 7.4

【0044】

新規天然化合物ソルビシルラクトン A を得るための真菌培地の増殖は 1 リットルのエルレンマイヤービーカーで行い、各ビーカーには次の組成（W S , W i c k e r h a m 1951）の栄養溶液 300 ml を充填した。

【0045】

ウィッカーハム - 海水 - 培地：

3.0 g 酵母抽出物

3.0 g 麦芽抽出物

5.0 g ペプトン

10.0 g グルコース

1 0 0 0 m l 海水 (3 0 - 3 3 P S U)

p H 7 . 2 ~ 7 . 4

【 0 0 4 6 】

栄養溶液の滅菌は、1 2 1 / 1 b a r、1 5 分の圧熱滅菌で行った。実験的な真菌培養のための接種材料として、各ビーカーの菌糸体（直径 5 m m）をスライスした 1 0 片を使用した。これらは、W S 寒天上で 7 日間予備培養した後、コルク抜きを使って打ち抜き、栄養液中に移した。接種したビーカーでの培養は、室温または 2 0 の定温で暗所の静置培地にて 1 4 日以上行った。次に、増殖した菌糸体を含む培養培地を収穫し、培養培地 3 0 0 m l あたり酢酸エチル 4 0 m l を補充し、- 8 6 で凍結した。

【 0 0 4 7 】

三つの 3 0 0 m l 培地物において、菌糸体を培地から濾過によって分離し、切り分けて小片とし、ジクロロメタン - メタノール混液（1 : 1）2 5 0 m l で 4 8 時間攪拌しながら抽出した。次に、菌糸体を遠心分離にて分離し、抽出物を減圧で濃縮乾燥した。培地濾液を 3 回各酢酸エステル 2 5 0 m l で抽出し、酢酸エステル相を合わせ、同様に減圧で濃縮乾燥した。培地濾液と菌糸体抽出物をメタノール 2 0 0 m l と水 6 m l の混液と一緒に溶解し、石油エーテル 2 0 0 m l で抽出した。石油エーテル相を捨て、メタノール水相を減圧で濃縮し、H P L C - U V、H P L C - N M R および H P L C - M S によって検査した。このようにして得られた各種成分の分光的数据をデータベースと比較することによって、数種の既知化合物、例えばメラアグリニンおよびロケフォルチン C を同定することができた。一つの化合物は新規な未知の天然化合物であることが認められた。抽出物について、二次元の H P L C - N M R 実験、例えば H P L C - W E T - C O S Y および H P L C - W E T - R O E S Y 実験を行ったところ、この抽出物は極めて興味深い構造に関係していることが判ったので、この化合物を分離用 H P L C によって単離した。

【 0 0 4 8 】

カラム : W a t e r s S y m m e t r y P r e p C 1 8 , 1 9 x 3 0 0 m m

溶出液 : アセトニトリル + 0 . 0 5 % T F A , 水 + 0 . 0 5 % T F A

勾配 : 1 0 % アセトニトリルから 1 0 0 % アセトニトリルへ 3 0 分間

流速 : 1 1 m l / 分

検出 : 2 5 4 n m

【 0 0 4 9 】

ソルビシルラクトン A は 1 9 分 ~ 2 0 分で溶出した。対応する画分を集め、減圧で濃縮乾燥した。黄色無晶形の固体 6 m g が得られ、メタノールに可溶性であった。

【 0 0 5 0 】

化合物の構造解析

得られたソルビシルラクトン A の分光的特性は以下のごとくであり、表 1 にまとめてある。

【 0 0 5 1 】

10

20

30

【表 1】

ソルビシルラクトンAのNMRデータ(THF-d8中に約6mg;600MHz)

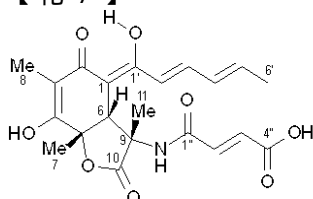
位置	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	COSY	HMBC	ROESY
1	99.55				
2	192.1				
3	110.92				
4	166.53				
5	80.98				
6	53	3.43, s		1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 1'	7, 11, 2'
7	~25.00	1.55, s		5, 6	6
8	7.29	1.54, s		2, 3, 4	
9	59.98				
10	172.98				
11	~26.00	1.42, s		6, 9, 10	NH, 6, 2'
1'	169.72				
2'	121.68	6.38, d	3' (14.7 Hz)	1', 4'	6, 11
3'	139.12	7.19, dd	2', 4' (11 Hz)	4', 5'	5'
4'	131.95	6.28, ddd	3', 5', 6' (1.3 Hz)	6'	
5'	136.91	6.08, m	4' (14.5 Hz), 6' (6.2 Hz)	3', 6'	3'
6'	18.54	1.83, dd	4', 5'	4', 5'	
1''	162.53				
2''	136.01	6.67, d	3'' (15.4 Hz)	1'', 3'', 4''	NH
3''	131.22	6.49, d	2''	1'', 2'', 4''	
4''	166.31				
1'-OH		16.60, s		1, 1', 2'	
NH		7.60, s		9, 10, 11, 1''	11, 2''

ESI-MS (MeCN/H₂O中): m/z 418 [M+H]⁺, 459 [M+MeCN+H]⁺FAB-MS (3-ニトロベンジルアルコール中): m/z 418 [M+H]⁺UV/VIS (アセトニトリル/水+0.05% TFA): λ_{max} [nm] 215, 271, 379

10

【0052】

【化7】



ソルビシルラクトンA

20

【0053】

単離された化合物は、黄色無晶形固体であり、ESI-MSの[M+H]⁺シグナルはm/z = 418に現れ、その結果として分子質量は417であることがFAB-MS測定によっても確認される。

30

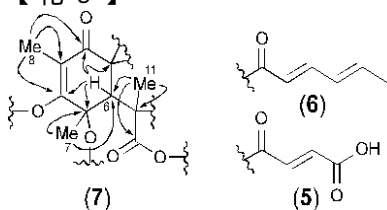
【0054】

NMRデータ、特に-HMBC-およびCOSY-関連のデータから、該分子の二つの部分的な構造を導くことができる。二重結合のE立体配置を高い結合定数(15.4 Hz)が占めているフマル酸残基(5)、およびソルビル残基(6)である。後者が該分子の残基にどのように結合しているかは現在不明なままである。C-1'で測定された化学シフト(169.7 ppm)から、ソルビン酸エステル並びにC-C結合のソルビル残基はエノール形の可能性がある。中央6位の環(7)の置換パターンは、三つのメチル基C-7、C-8、およびC-11並びにH-6のHMBC相互作用により可能である。

40

【0055】

【化8】



【0056】

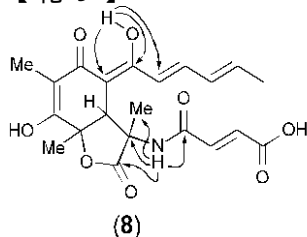
更に、THF-d₈中でNMR測定を行うと、互換可能なプロトンとそれらの相互作用を観察することができる。この場合に二つの別の鋭いシグナルが¹Hスペクトルで認めら

50

れ、環の結合ケト基に対し水素結合を形成して深い部分に強くシフト（ 16.6 ppm ）しているエノール水酸基、および 7.6 ppm のアミドのプロトンである。これらプロトンの H M B C 相互関係を基礎にして三つの部分構造を全て組み合わせれば、全体の構造（**8**）となる。

【0057】

【化9】



10

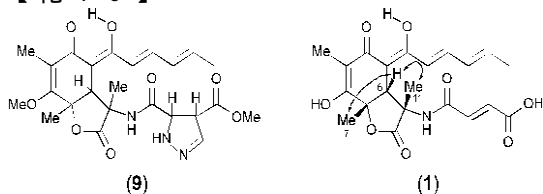
【0058】

ラクトン環および遊離酸基および水酸基の位置を確定するために、当該天然化合物をジアゾメタンでメチル化して、ジメチル化誘導体を形成した。この際に更にジアゾメタンがフマル酸残基の二重結合に付加して環化が行われた。該誘導体を N M R 測定し構造（**9**）「ソルビシルラクトン A 誘導体 1（S O D - D 1）」が判明した。またこれにより天然化合物の構造（**1**）が確認される。三つの立体配置の相対的な関連を R O E S Y 相互作用によって決定することができる。すなわちメチル基 7 および 11 に対する H - 6 の相互関係から、二つのメチル基は共に H - 6 に対しシスの位置にあることが確認される。

20

【0059】

【化10】



【0060】

更に、この新規天然化合物の絶対配置を解明することができた。この化合物は全く新規な構造タイプに関係しているので、その C D スペクトルを立体配置が構造的に判っている物質と比較しても配置を単純に決定することはできなかった。しかし、該配置は最新の量子化学的な C D 計算を駆使することによって容易に得られた。すなわち、問題の二つのエナンチオマーに対して予想される C D スペクトルをシミュレートし、計算によって予測されるこれらスペクトルをこの天然化合物について実験で測定した実際のスペクトルと比較した。この戦略により図に示すようなソルビシルラクトン A の完全絶対立体構造が確立された。

30

【実施例3】

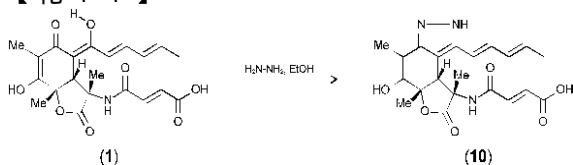
【0061】

ソルビシルラクトン A をピラゾール誘導体に誘導

40

【0062】

【化11】



【0063】

エタノール 2 m l 中のソルビシルラクトン A 1 0 0 m g の溶液にヒドラジン 1 0 m g を加えた。室温で 6 時間攪拌後、溶媒を留去した。シリカゲル上のカラムクロマトグラフィ

50

ー（溶媒：ジクロロメタン - メタノール混液）により残渣を精製し、所望のピラゾール誘導体（10）を得た。

【実施例4】

【0064】

該化合物の生物学的特性

【0065】

a) 抗腫瘍活性

ソルビシルラクトンAとその誘導体の一つの抗腫瘍活性（ここでは誘導体SOA-D1を使用して代表例として示した）を腫瘍形質転換細胞シリーズ、例えばL5178yマウスリンパ腫細胞系（ATCC CRL 1722）で試験した。既述（Mulleret al. (1979) Cancer Res. 39: 1102-1107）のごとく、細胞を10%ウシ胎仔血清を加えたRPMI培地に培養した。接種濃度として10,000細胞/mlを選択した。開始時点で選択した物質を加え、培地を72時間インキュベートした。その後、比色XTT手法で生細胞の数を測定し、ELISAリーダーで分析した（参照：Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR(1988)ヒト等の腫瘍細胞株を使用する、培地中での細胞増殖と薬剤感受性についてのテトラゾリウム/フォルマザン測定法の評価.CancerRes 48: 4827-4833; Daum T, Engels J, Mag M, Muth J, Lucking S, Schroder HC, Matthes E, Muller WEG (1992) アンチセンスオリゴヌクレオチド：ヒト免疫不全ウイルスmRNAのスプライシング阻害剤.Intervirology33:65-75）で分析した。コントロールの光学濃度を100%と定義した。

【0066】

【表2】

化合物	化合物濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	光学濃度 (595 nm)
コントロール	0	0.38
ソルビシルラクトンA	0.1	0.24
	0.3	0.19
	1	0.07
	3	0.06
SOA-D1	0.1	0.29
	0.3	0.22
	1	0.05
	3	0.03

【0067】

結果：ソルビシルラクトンAとその誘導体SOA-D1の $> 0.1 \mu\text{g/ml}$ の低濃度で細胞増殖は72時間後に劇的に減少した。使用したL5178y細胞に対するED50濃度（SachsL. (1984) Applied Statistics.Springer,Berlinにより計算した）は $0.18 \mu\text{g/ml}$ であった。

【0068】

腫瘍形質転換細胞の他に、ヒト包皮繊維芽細胞についても本方法の生産物の影響を検討した。培養の細胞と方法は以前に記述された（参照：Muller WEG, Maidhof A, Zahn RK, Schroder HC, Gasic MJ, Heidemann D, Bernd A, Kurelec B, Eich E, Seibert G (1985)新規細胞増殖抑制剤アバロンとその同族体のインビトロおよびインビボにおける強力な抗白血病活性.CancerRes. 45: 4822-4827）。実験には6と9継代の間の細胞を使用した。培養をコラーゲン被覆プラスチックフラスコで行った。細胞数は顕微鏡で測定した。実験の結果、 $30 \mu\text{g/ml}$ の濃度でソルビシルラクトンAは細胞増殖に影響を及ぼさなかった。

【0069】

b) 抗ウイルス活性

この方法の参考文献と特性を広範囲にリスト化したものは以前の刊行物（Sarin PS, Sun D, Thornton A, Muller WEG(1987) 後天性免疫不全症候群（ヒトTリンパ節性レトロウイルス/リンパ節症関連ウイルス）の病因物質複写をアバロールおよびアバロンにより阻害.JNatl Cancer Inst 78: 663-666; SchroderHC, Sarin PS, Rottmann M, Wenger R, Maidhof A, RenneisenK, Muller WEG(1988) アバロールとAZTのインビトロでの組み合わせによ

る、宿主細胞及びH I V 遺伝子発現の差分変調BiochemPharmacol37:3947-3952) にまとめられている。

【0070】

検査パラメータ：細胞増殖

H 9 細胞並びにH T L V - I I I B 細胞 (H I V - 1) で感染したH 9 細胞を使用し、それぞれ $0.2 \times 1,000,000$ 細胞 / 培地 ml の濃度で培地に接種した。接種4日後にH 9 細胞の密度は $1.3 \times 1,000,000$ 細胞 / 培地 ml であった。他方、H T L V - I I I B で感染したH 9 細胞の密度は $0.6 \times 1,000,000$ 細胞 / 培地 ml にすぎなかった。これら二つの値をコントロール値とした。

【0071】

次に、H 9 - H T L V - I I I B 細胞 ($0.2 \times 1,000,000$ 細胞 / ml) の試料を各種濃度のソルビシルラクトンAで4日間処理した。以下の結果が得られた。

【0072】

化合物	化合物濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞濃度 $\times 1,000,000 / \text{ml}$
コントロール	0	0.62
ソルビシルラクトンA	0.1	0.68
	0.3	0.83
	1	1.39
	3	0.92

【0073】

結果：濃度 0.3 と $3.0 \mu\text{g/ml}$ の間のソルビシルラクトンAにより、H 9 - H T L V - I I I B 細胞の増殖速度はコントロール、すなわちH T L V - I I I B に感染していないH 9 細胞の範囲の値にまで上昇しているのが見られる。

【0074】

検査パラメータ：逆転写酵素の生産

このアプローチでは、本方法の生産物によってH 9 細胞中でのH I V (H T L V - I I I B) ウイルスの産生がどの程度にまで阻害されるかを試験する。ウイルス量のパラメータとして、これら粒子内に存在する逆転写酵素を測定した。

【0075】

ソルビシルラクトンAまたはソルビシルラクトンA誘導体をH 9 - H T L V - I I I B 細胞に4日間投与した後にH T L V - I I I B (H I V - 1) ウイルスの産生がどの程度にまで減縮されているかを検査した。培地中のウイルス量の指標として逆転写酵素を選択した。すなわち逆転写酵素の産生が阻害されていれば、ウイルスの産生が阻害されていることを示唆するとした。結果は次の表にまとめてある。

【0076】

【表4】

化合物	化合物濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	逆転写酵素活性 (100%)
コントロール	0	100
ソルビシルラクトンA	0.1	83
	0.3	28
	1	22
	3	14

【0077】

結果：ソルビシルラクトンAで処理しなかったH 9 - H T L V - I I I B 細胞の上澄液には逆転写酵素の活性が顕著に存在したことが判る。ソルビシルラクトンAまたはソルビシルラクトンA誘導体を加えると上澄液中の逆転写酵素の活性は用量依存的に減少している。 $0.1 \mu\text{g/ml}$ の用量で既に顕著な阻害が観察された。本発明の使用のための化合物は、たとえ別のインビトロパラメータ、例えば細胞増殖が実際に影響を受けないような濃度であっても、ウイルスの複製をほぼ完全に阻害することができる。

【0078】

検査パラメータ：p 24 - および p 15 - 蛋白質の発現

ソルビシルラクトンAおよびソルビシルラクトンA誘導体 S O A - D 1 は、感染したH

10

20

30

40

50

9 細胞において H I V p 2 4 (g a g タンパク質) および p 1 5 (G a g タンパク質) の発現を強力に阻害する効果を有することが示された。標的 H 9 細胞を H I V (H T L V - I I I B) 単離物と共に、ただしテスト化合物はなしで増殖したところ、p 2 4 および p 1 5 のタンパク質が発現し、間接免疫蛍光測定法によって確認することができた。しかし、H 9 - H T L V - I I I B 細胞をテスト化合物と共に培養した後では、完全な防護効果が観察された。p 2 4 および p 1 5 のタンパク質発現は 2 4 % まで減少した。以下の結果が得られた。

【 0 0 7 9 】

【 表 5 】

化合物	化合物濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	p15およびp24の発現 (m %)	
		p15	p24
コントロール	0	100	100
ソルビシルラクトン A	0.1	98	93
	0.3	65	42
	1	31	28
	3	47	24

10

【 0 0 8 0 】

結果：ソルビシルラクトン A およびソルビシルラクトン A 誘導体 (S O A - D 1) が H T L V - I I I B (H I V - 1) タンパク質の発現を有意に減少させることが見られる。

【 0 0 8 1 】

【 実施例 5 】

20

【 0 0 8 2 】

ソルビシルラクトン A の生体内効果

これらの検査のために、雄 (異系交配した) N M R I マウス (3 2 ~ 3 6 g 、 8 ~ 9 月齢) を使用した。テスト物質ソルビシルラクトン A をメチルセルロースに溶解し、動物の腹腔内に注入した。2 0 m g / k g (1 日当たり) を 5 日間動物に投与した。処理後、動物の体重を測定した。この期間中、ソルビシルラクトン A 処理動物の体重 (3 3 \pm 4 g) はコントロール (ソルビシルラクトン A で処理しなかった) の体重 (3 5 \pm 4 g) と有意に異ならなかった。テスト動物は一匹も死亡していない。

【 0 0 8 3 】

結果：5 日間の腹腔内処理でのソルビシルラクトン A の亜急性毒性は > > 2 0 m g / k g であることが以上のデータから結論される。

30

【 0 0 8 4 】

ソルビシルラクトン A とこれらの誘導体の合成の説明

ソルビシルラクトン A および一連の構造類似体は生体模倣的合成により数工程で製造することができる。すなわちソルビシリンおよび関連化合物から出発し、酸化的に脱芳香族化し、続いてアラニン (ソルビシルラクトン A の場合) または他のアミノ酸およびそれらの類似体を加え、次にフマル酸 (ソルビシルラクトン A の場合) または類似のアシル残基を付加する。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/07805

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07D307/86 A61K31/343 A61P31/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02 26726 A (CHEN HONG SHAN ; ABD ELAZEM IBRAHIM SHAWKY (US); HUANG RU CHIH C (U) 4 April 2002 (2002-04-04) page 4, line 7 - line 19	1-23
A	US 5 925 636 A (MONTANA JOHN GARY ET AL) 20 July 1999 (1999-07-20) column 4, line 57 -column 5, line 3; claim 1	1-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 October 2003		Date of mailing of the international search report 11/11/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Seelmann, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 03/07805

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0226726	A	04-04-2002	AU 9304801 A	08-04-2002
			WO 0226726 A2	04-04-2002
			US 2002151584 A1	17-10-2002
US 5925636	A	20-07-1999	AT 215540 T	15-04-2002
			AT 239004 T	15-05-2003
			AU 697976 B2	22-10-1998
			AU 1038697 A	27-06-1997
			AU 2906097 A	09-12-1997
			BR 9611897 A	28-12-1999
			BR 9709113 A	03-08-1999
			CA 2238376 A1	12-06-1997
			CN 1208411 A ,B	17-02-1999
			CN 1219171 A	09-06-1999
			CZ 9801714 A3	14-10-1998
			CZ 9803719 A3	17-03-1999
			DE 69620458 D1	08-05-2002
			DE 69620458 T2	02-10-2002
			DE 69721526 D1	05-06-2003
			EP 0873331 A1	28-10-1998
			EP 0901482 A1	17-03-1999
			ES 2172695 T3	01-10-2002
			WO 9720833 A1	12-06-1997
			WO 9744337 A1	27-11-1997
			HU 0100042 A2	28-01-2002
			HU 9903797 A2	28-04-2001
			IL 126558 A	25-07-2002
			JP 2000501411 T	08-02-2000
			JP 2000510848 T	22-08-2000
			NO 982570 A	04-08-1998
			NO 985375 A	19-11-1998
			NZ 332340 A	28-04-2000
			PL 327181 A1	23-11-1998
			PL 329912 A1	26-04-1999
			RU 2162467 C2	27-01-2001
			SK 160498 A3	11-06-1999
			TR 9802386 T2	22-02-1999
			US 5773467 A	30-06-1998
			US 5972936 A	26-10-1999
			ZA 9704375 A	20-05-1998

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 03/07805

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C07D307/86 A61K31/343 A61P31/12		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C07D		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BEILSTEIN Data, WPI Data, PAJ		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 02 26726 A (CHEN HONG SHAN ; ABD ELAZEM IBRAHIM SHAWKY (US); HUANG RU CHIH C (U) 4. April 2002 (2002-04-04) Seite 4, Zeile 7 - Zeile 19 -----	1-23
A	US 5 925 636 A (MONTANA JOHN GARY ET AL) 20. Juli 1999 (1999-07-20) Spalte 4, Zeile 57 - Spalte 5, Zeile 3; Anspruch 1 -----	1-23
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 31. Oktober 2003		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 11/11/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 51 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Seelmann, I .

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationaler Aktenzeichen

PCT/EP 03/07805

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0226726 A	04-04-2002	AU 9304801 A	08-04-2002
		WO 0226726 A2	04-04-2002
		US 2002151584 A1	17-10-2002
US 5925636 A	20-07-1999	AT 215540 T	15-04-2002
		AT 239004 T	15-05-2003
		AU 697976 B2	22-10-1998
		AU 1038697 A	27-06-1997
		AU 2906097 A	09-12-1997
		BR 9611897 A	28-12-1999
		BR 9709113 A	03-08-1999
		CA 2238376 A1	12-06-1997
		CN 1208411 A ,B	17-02-1999
		CN 1219171 A	09-06-1999
		CZ 9801714 A3	14-10-1998
		CZ 9803719 A3	17-03-1999
		DE 69620458 D1	08-05-2002
		DE 69620458 T2	02-10-2002
		DE 69721526 D1	05-06-2003
		EP 0873331 A1	28-10-1998
		EP 0901482 A1	17-03-1999
		ES 2172695 T3	01-10-2002
		WO 9720833 A1	12-06-1997
		WO 9744337 A1	27-11-1997
		HU 0100042 A2	28-01-2002
		HU 9903797 A2	28-04-2001
		IL 126558 A	25-07-2002
		JP 2000501411 T	08-02-2000
		JP 2000510848 T	22-08-2000
		NO 982570 A	04-08-1998
		NO 985375 A	19-11-1998
		NZ 332340 A	28-04-2000
		PL 327181 A1	23-11-1998
		PL 329912 A1	26-04-1999
		RU 2162467 C2	27-01-2001
		SK 160498 A3	11-06-1999
		TR 9802386 T2	22-02-1999
		US 5773467 A	30-06-1998
		US 5972936 A	26-10-1999
		ZA 9704375 A	20-05-1998

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 P 17/04 (2006.01)	C 1 2 P 17/04	
C 1 2 P 17/16 (2006.01)	C 1 2 P 17/16	
C 1 2 R 1/82 (2006.01)	C 1 2 P 17/04	
	C 1 2 R 1:82	
	C 1 2 P 17/16	
	C 1 2 R 1:82	
	C 0 7 M 7:00	

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

(74) 代理人 100124453

弁理士 資延 由利子

(74) 代理人 100129160

弁理士 古館 久丹子

(74) 代理人 100135208

弁理士 大杉 卓也

(72) 発明者 ブリングマン, ゲルハルド

ドイツ連邦共和国, 9 7 0 7 4 ヴュルツブルク, ゲルトルート - フォン - レ - フォルト - シュトラーセ 4 1

(72) 発明者 ラング, ゲルハルド

ドイツ連邦共和国, 9 7 0 7 2 ヴュルツブルク, シラーシュトラーセ 3

(72) 発明者 ミュールバック, イェーグ

ドイツ連邦共和国, 7 9 0 1 6 フレイブルク, フグステッテルシュトラーセ 3

(72) 発明者 シャウマン, カルステン

ドイツ連邦共和国, 2 7 5 7 8 ブレーマーハヴェン, イム グラーベンスムーア 5

(72) 発明者 シュテッフェンス, シュテファン

ドイツ連邦共和国, 5 2 0 7 2 アーヘン, ヨセフ - ポンテン - シュトラーセ 7 4

(72) 発明者 ミュラー, ウェルネル, エー., ゲー.

ドイツ連邦共和国, 6 5 2 0 3 ヴァイスバーデン, ゼンメルヴァイスシュトラーセ 1 2

F ターム (参考) 4B064 AE45 AE54 CA05 CD21 CD30 CE08 CE10 DA03 DA05

4C037 QA07 QA15

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 BA06 BC36 GA02 GA07 GA16 GA17

MA01 MA04 MA16 MA35 MA37 MA52 MA60 MA66 NA05 NA12

NA14 ZA83 ZB11 ZB26 ZB33 ZC55