

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年10月15日(15.10.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/125819 A1

(51) 国際特許分類:

<i>C12P 19/04</i> (2006.01)	<i>C08B 37/00</i> (2006.01)
<i>A61K 31/715</i> (2006.01)	<i>C12N 1/20</i> (2006.01)
<i>A61K 35/74</i> (2006.01)	<i>A61K 31/7034</i> (2006.01)
<i>A61P 3/10</i> (2006.01)	<i>C07H 15/203</i> (2006.01)
<i>A61P 43/00</i> (2006.01)	

(21) 国際出願番号: PCT/JP2009/057292

(22) 国際出願日: 2009年4月9日(09.04.2009)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2008-102983 2008年4月11日(11.04.2008) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アステラス製薬株式会社 (ASTELLAS PHARMA INC.) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 笹村 智司 (SASAMURA, Satoshi) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 笹村 裕美 (SASAMURA, Hiromi) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 西脇 真哉 (NISHIWAKI, Shinya) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 森田 拓, 外 (MORITA, Hiroshi et al.); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番1

1号 アステラス製薬株式会社 知的財産部内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: AMINOSUGAR COMPOUND AND PROCESS FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: アミノ糖化合物及びその生産方法

(57) Abstract: Disclosed is a compound useful as an active ingredient for a pharmaceutical composition having an α -amylase-inhibiting activity, particularly a pharmaceutical composition for the treatment of diabetes. Studies have been made for discovering a compound having an α -amylase-inhibiting activity among the compounds produced by *Streptomyces* sp. Strain 6982 which is a ray fungus belonging to the genus *streptomyces*, and it is confirmed that an aminosugar compound has an α -amylase-inhibiting activity. The aminosugar compound has an α -amylase-inhibiting activity, and therefore can be used as a prophylactic or therapeutic agent for diabetes, obesity, NASH (non-alcoholic steatohepatitis), particularly as an ameliorating agent for postprandial blood glucose elevation.

(57) 要約: 【課題】 α -アミラーゼ阻害作用を有する医薬組成物、特に糖尿病治療用医薬組成物の有効成分として有用な化合物を提供する 【解決手段】 本発明者らは、ストレプトマイセス属の放線菌であるストレプトマイセス エスピー (*Streptomyces* sp.) 6982 株の産生する化合物から、 α -アミラーゼ阻害活性を有する化合物について検討したところ、アミノ糖化合物が α -アミラーゼ阻害作用を有することを確認し、本発明を完成した。本発明のアミノ糖化合物は α -アミラーゼ阻害作用を有し、糖尿病、肥満、NASH (非アルコール性脂肪肝炎) の予防若しくは治療剤、殊として、食後過血糖の改善剤として使用しうる。



WO 2009/125819 A1

明 細 書

発明の名称：アミノ糖化合物及びその生産方法

技術分野

[0001] 本発明は医薬組成物、殊に糖尿病治療用医薬組成物の有効成分として有用なアミノ糖化合物に関する。

背景技術

[0002] 食事摂取された多糖類は、口腔及び胃内において唾液由来 α -アミラーゼにより一部消化され、次いで、十二指腸及び空腸内で膵臓由来 α -アミラーゼにより大部分が消化されることで、二糖類やオリゴ糖となる。これらは小腸上皮微絨毛膜に局在するマルターゼ、スクラーゼに代表されるグルコシダーゼによって単糖へと加水分解され、単糖が腸管より吸収される。吸収された単糖は血中に移行し、血糖値が上昇すると、膵臓からインスリンが分泌され、肝臓からの糖放出を低下させると共に、筋肉や脂肪組織への糖取り込みを増加させる事によって、上昇した血糖値を降下させ、その恒常性は保たれている。

[0003] しかしながら、糖尿病態では、インスリンの分泌不全、あるいはインスリン抵抗性(インスリン作用不足)により、食後高血糖や空腹時高血糖などの慢性的な血糖制御不全状態に陥っている。

[0004] 近年、大規模臨床試験により、糖尿病性合併症の発症ならびに進展抑制には食後高血糖の是正が重要であることが確認された。食後高血糖はたとえ軽度であっても心血管死の独立した危険因子であることを示している。以上のような背景により、食後高血糖(例えば、食後2時間の血糖値が200 mg/dL以上の状態)に対する薬物治療の重要かつ必要性が認識されるようになっている。

[0005] 食後高血糖の治療薬として、消化酵素阻害剤であるグルコシダーゼ阻害剤が臨床において実際に用いられている(例えば、アカルボースやボグリボース)。しかしながら、グルコシダーゼ阻害による、消化器症状(腹部膨満感、下

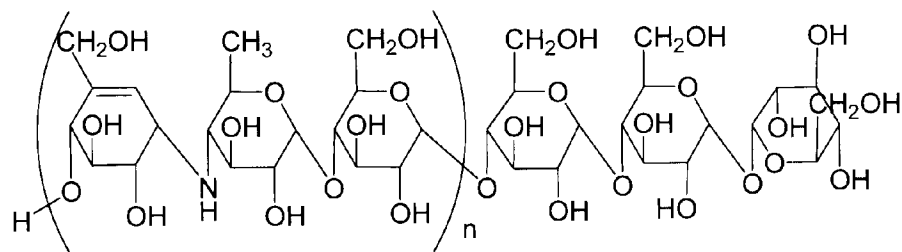
痢、軟便、鼓腸、放屁など)が起こるといふ副作用が問題となっている。

[0006] また、異なる食後高血糖の治療薬(消化酵素阻害薬)として、 α -アミラーゼ阻害剤が挙げられる。グルコシダーゼを阻害すると、未消化のオリゴ糖(二糖類)を多く副生させるが、 α -アミラーゼを阻害しても未消化のオリゴ糖(二糖類)は副生させる量が少ないため、下痢等の消化器症状を引き起こさずに糖の吸収阻害が発揮できると期待されている。

[0007] α -アミラーゼ阻害活性を有するアミノ糖化合物が幾つか報告されている。

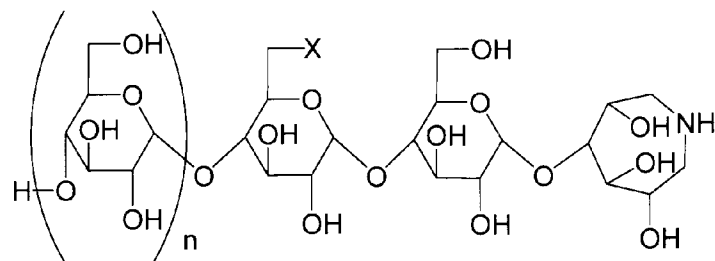
例えば、ストレプトマイセス属の放線菌から単離されたトRESTアチン誘導体(下記式、但し、式中nは1~3を示す)が報告されている(特許文献1)。

[化2]



[0008] また、ヘキサヒドロ-3,5,6-トリヒドロキシ-1H-アゼピンを必須骨格とするマルト-オリゴ糖化合物が報告されている(特許文献2)。

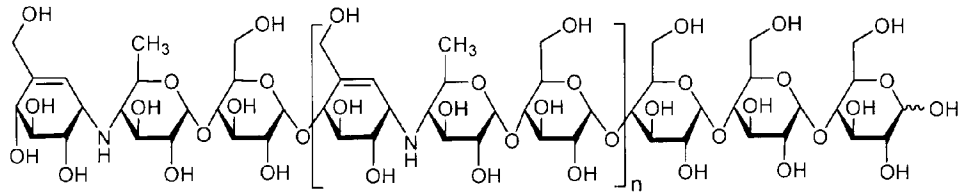
[化3]



(式中、nは0~3を、XはH又は疎水性基を示す。)

[0009] また、下式中nが0から3である末端に還元糖構造を有する化合物が知られている(非特許文献1)。

[化4]



当該非特許文献で開示されているアカルビオスタチン (Acarviostatin) I V O 3 (n=3) は、分子式が $C_{94}H_{156}N_4O_{64}$ がであり、本願の n=4 の化合物と同じであるが、これは末端に還元糖構造を有する化合物である点で構造上異なる。

先行技術文献

特許文献

- [0010] 特許文献1：特開昭54-163511号公報
 特許文献2：米国特許第6596696号明細書

非特許文献

- [0011] 非特許文献1：Carbohydrate Research, 343 (2008), 882-892

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] 医薬組成物、特に糖尿病治療用医薬組成物の有効成分として有用な化合物を提供する。

課題を解決するための手段

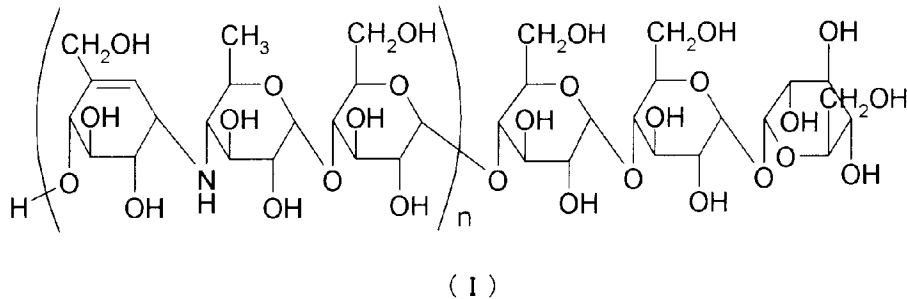
- [0013] α -アミラーゼ阻害薬としては、消化管内で安定性を示す必要がある。消化管内において不安定であることは、その分解産物が吸収され、予期しない副作用を起こす可能性がある。

本発明者らは、医薬品の探索を目的として、微生物が産生する物質について鋭意検討した結果、ストレプトマイセス属の放線菌6982株が優れた α -アミラーゼ阻害活性を有する化合物を生産することを見い出して本発明を完成し

た。

[0014] 即ち、本発明は、式(1)の化合物又はその塩、式(1)の化合物又はその塩を含有する組成物、式(1)の化合物又はその塩、及び賦形剤を含有する医薬組成物、並びに、式(1)の化合物又はその塩の生産方法に関する。

[0015] [化5]



(式中、nは、4、5又は6を示す。)

[0016] また、本発明は、培地中で、 α -アミラーゼ阻害活性を有する化合物又はその塩を産生するストレプトマイセス属の微生物を培養し、その培養液から当該化合物又はその塩を回収することにより得られた、 α -アミラーゼ阻害活性を有し、分子式が $C_{94}H_{156}N_4O_{64}$ 、 $C_{113}H_{187}N_5O_{76}$ 、又は、 $C_{132}H_{218}N_6O_{88}$ の化合物（ただし、末端に還元糖構造を有する化合物を除く）又はその塩、及びこれらの化合物又はその塩を含有する組成物に関する。

さらに、本発明は、式(1)の化合物又はその塩を含有する糖尿病の予防用若しくは治療用医薬組成物、即ち、式(1)の化合物又はその塩を含有する糖尿病治療剤に関する。

また、本発明は、糖尿病の予防用若しくは治療用医薬組成物の製造のための式(1)の化合物又はその塩の使用、若しくは、糖尿病の予防若しくは治療のための式(1)の化合物又はその塩の使用、並びに、式(1)の化合物又はその塩の有効量を患者に投与することからなる糖尿病の予防用若しくは治療方法に関する。

発明の効果

[0017] 式(1)の化合物又はその塩は、 α -アミラーゼ阻害作用を有し、糖尿病、肥

満、NASH（非アルコール性脂肪肝炎）等の予防若しくは治療剤として使用できる。また、グルコシダーゼ阻害剤とは異なり、下痢等の消化器症状を引き起こさずに糖の吸収阻害が発揮できると期待される。

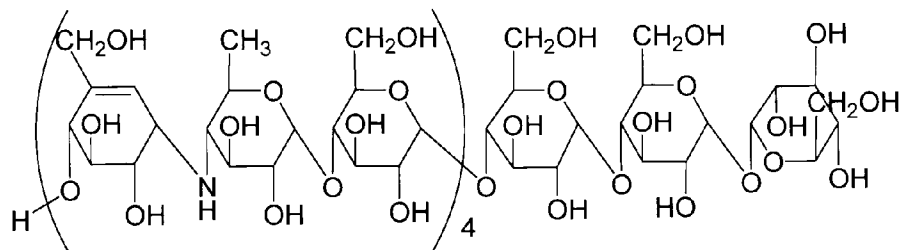
図面の簡単な説明

- [0018] [図1] 図 1 は、化合物 A の¹H-NMRスペクトルを示す。
 [図2] 図 2 は、化合物 A の¹³C-NMRスペクトルを示す。
 [図3] 図 3 は、化合物 B の¹H-NMRスペクトルを示す。
 [図4] 図 4 は、化合物 B の¹³C-NMRスペクトルを示す。
 [図5] 図 5 は、化合物 C の¹H-NMRスペクトルを示す。
 [図6] 図 6 は、化合物 C の¹³C-NMRスペクトルを示す。
 [図7] 図 7 は、炭水化物負荷時の化合物 A による血糖上昇抑制作用を示す。(A) は血糖値の経時変化、(B) はAUCを示す。
 [図8] 図 8 は、炭水化物負荷時の化合物 A によるインスリン上昇抑制作用を示す。(A) はインスリン値の経時変化、(B) はAUCを示す。
 [図9] 図 9 は、化合物 A のHPLCのクロマトグラムを示す。
 [図10] 図 10 は、化合物 B のHPLCのクロマトグラムを示す。
 [図11] 図 11 は、化合物 C のHPLCのクロマトグラムを示す。

発明を実施するための形態

[0019] 例えば、本発明の化合物(I)において、nが4の化合物は下式で示される。

[0020] [化6]



[0021] 式(I)の化合物には、幾何異性体が存在しうる。本明細書中、式(I)の化合物が異性体の一形態のみで記載されることがあるが、本発明は、それ以外の

異性体も包含し、異性体の分離されたもの、あるいはそれらの混合物も包含する。

また、式(1)の化合物には、不斉炭素原子に基づく光学異性体が存在しうる。本発明は、式(1)の化合物の光学異性体の分離されたもの、あるいはそれらの混合物も包含する。

[0022] さらに、本発明は、式(1)で示される化合物の製薬学的に許容されるプロドラッグも包含する。製薬学的に許容されるプロドラッグとは、加溶媒分解により又は生理学的条件下で、アミノ基、水酸基等に変換されうる基を有する化合物である。プロドラッグを形成する基としては、例えば、Prog. Med., 5, 2157-2161(1985)や、「医薬品の開発」(廣川書店、1990年)第7巻 分子設計 163-198に記載の基が挙げられる。

[0023] また、式(1)の化合物の塩とは、式(1)の化合物の製薬学的に許容される塩であり、酸付加塩を形成する場合がある。具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸や、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、マンデル酸、酒石酸、ジベンゾイル酒石酸、ジトルオイル酒石酸、クエン酸、メタンサルホン酸、エタンサルホン酸、ベンゼンサルホン酸、p-トルエンサルホン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の有機酸との酸付加塩、が挙げられる。

[0024] さらに、本発明は、式(1)の化合物及びその塩の各種の水和物や溶媒和物、及び結晶多形の物質も包含する。また、本発明は、種々の放射性又は非放射性同位体でラベルされた化合物も包含する。

[0025] 本明細書において、「末端に還元糖を有する化合物」とは、特に限定されないが、例えば、acarbose (アカルボース)、アカルビオスタチン I O 3、アカルビオスタチン I I O 3、アカルビオスタチン I I I O 3、アカルビオスタチン I V O 3 のように遊離となるアルデヒド基 (あるいはケトン基) をもつ糖が末端にある天然物等の化合物が挙げられる。

[0026] (生産方法)

本発明の化合物は、ストレプトマイセス属に属し、かつ該化合物又はその製薬学的に許容される塩の生産能を有する微生物を用いて製造することができる。このような微生物として好ましくは、沖縄県西表島で採取された土壌より分離されたストレプトマイセス属に属するストレプトマイセス エスピー(Streptomyces sp.)6982株である。本菌株の菌学的性状は次の通りである。

[0027] ストレプトマイセス エスピー6982株は、沖縄県西表島で採集された土壌サンプルから分離された。本菌株の形態、培養性状、生理的性質を調べるための培地および方法は、主にシャーリング、ゴットリーブ(Shirling, E. B. and D. Gottlieb: Methods for characterization of Streptomyces species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16, 313-340, 1966)、および、ワックスマン(Waksman, S. A.: The actinomycetes Vol. 2: Classification, identification and description of genera and species: The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1961)に従った。培養温度30°C、培養日数は14日間、培養した後に観察した。

[0028] 形態観察は、酵母エキス-デンプン寒天培地において培養した後に、光学および走査型電子顕微鏡で観察することにより判定した。酵母エキス-デンプン寒天は、粉末酵母エキスS(和光純薬製)2.0 g、可溶性デンプン10 g および寒天16 gを含む水道水 1 Lの溶液を、1M NaOH水溶液でpH=7.2に調製した後、オートクレーブで滅菌して調製した。生育温度は、酵母エキス-デンプン寒天で判定した。炭素源の利用性は、プリドハム・ゴットリーブの培地(Pridoham, T. G. and D. Gottlieb: The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an acid for species determination: J. Bacteriol. 56: 107-114, 1948)において判定した。

[0029] 色名は「メシューエン・ハンドブック・オブ・カラー」(Kornerup, A. and J. H. Wanscher: Methuen Handbook of Colour, Methuen, London, 1978)から引用した。

[0030] 細胞壁のアミノ酸の分析は、ベッカーらの方法に従った(Becker, B., M. P. Lechevalier, R. E. Gordon and H. A. Lechevalier: Rapid differentiat

ion between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates: *Appl. Microbiol.* 12, 421-423, 1964)。

- [0031] 16SrDNAの塩基配列は、中川らの方法に従って決定した(中川恭好、川▲崎▼浩子、放線菌の分類と同定 pp. 83-117. 2001年日本放線菌学会編: 東京、日本学会事務センター)。
- [0032] 相同性検索は、国立遺伝学研究所のウェブサイトのFASTA検索
- (a) <http://www.ddbj.nig.ac.jp>
 - (b) D. J. Lipman, W. R. Pearson: Rapid and sensitive protein similarity searches, *Science*, 227, 1435-1441 (1985) 及び
 - (c) W. R. Pearson, D. J. Lipman: Improved tools for biological sequence comparison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 2444-2448 (1988)
- を用い、基準株の16SrDNA塩基配列は国立遺伝学研究所のデータベース (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) より入手した。
- [0033] 系統樹はClustal Wパッケージを用いて近隣結合法により作成した (Clustal W Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680, 1994)。
- [0034] また、ストレプトマイセス エスピー6982株とその近縁株とのDNA相同性は、以下の文献に示される江崎らの方法により確認できる。
- (a) Ezaki, T., Hashimoto, Y., Takeuchi, T., Yamamoto, H., Liu, S.-L., Matsui, K & Yabuuchi, E., *J Clin Microbiol.*, 26, (1988) 1708-1713
 - (b) Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E., *Int J Syst Bacteriol.*, 39, (1989) 224-229
- [0035] 本明細書において「近縁株」とは、ストレプトマイセス エスピー6982株と16SrDNAの塩基配列の相同値が97%以上である菌株をいう。尚、16SrDNAの塩基配列の相同値が97%未満である場合、それらは別種と判断されることが知られ

ている。

Stackebrandt, E. & Goebel, B. M., *Int J Syst Bacteriol.*, 44, (1994)
846-849

[0036] (1) 形態的特徴

基生菌糸はよく発達し、不規則に分枝した。気菌糸は不完全ならせん状を呈し、10個以上の分節孢子連鎖で形成されていた。孢子の表面は平滑、形状は楕円状、サイズは $1.2 \times 1.0 \mu\text{m}$ であった。菌核、孢子嚢、基生菌糸の断裂、遊走子は観察されなかった。

[0037] (2) 培養性状

気菌糸は、酵母エキス-デンプン寒天、酵母エキス-麦芽エキス寒天、オートミール寒天、無機塩-デンプン寒天、グリセリン-アスパラギン寒天上で、良好な着生を示し、チロシン寒天上ではかすかに着生が認められた。ペプトン-酵母エキス-鉄寒天上では気菌糸着生は認められなかった。気菌糸の色は灰色味褐色、褐色味灰色であった。生育裏面の色は黄色味褐色、褐色味ベージュ、灰色味黄色、淡黄色、褐色味橙色、淡橙色であった。トリプトン-酵母エキス培地及びペプトン-酵母エキス-鉄寒天上で、メラノイド色素の産生は認められなかった。可溶性色素の産生が認められなかった。菌体内色素はpHにより変化しなかった。

[0038] これらの各培地上での生育状況を表1に示した。略号は次の意味を示す。G: 生育 A: 気菌糸 R: 生育裏面の色 S: 可溶性色素

[0039]

[表1]

培地	生育状況	
酵母エキス-麦芽エキス寒天 (ISP-2)	G A R S	良好 豊富、綿状、灰色味褐色(7E3) 黄色味褐色(5D6) なし
オートミール寒天 (ISP-3)	G A R S	良好 豊富、綿状、褐色味灰色(6E2) 褐色味ベージュ(6E3) なし
無機塩-ゲンブソ寒天 (ISP-4)	G A R S	良好 豊富、褐色味灰色(6E2) 灰色味黄色(4B5) なし
グリセリン-アスパラギン寒天 (ISP-5)	G A R S	良好 豊富、綿状、褐色味灰色(7E2) 淡黄色(4A3) なし
ペプトン-酵母エキス-鉄寒天 (ISP-6)	G A R S	中程度 なし 褐色味橙色(5C6) なし
チロシン寒天 (ISP-7)	G A R S	良好 淡白色 淡橙色(5A3) なし

[0040] (3)細胞壁タイプ

全菌体分解物を分析した結果、アミノ酸としてLL-ジアミノピメリン酸の存在が確認できた。

[0041] (4)生理学的性質

D-グルコース、シュークロース、D-キシロース、D-フルクトース、L-ラムノース、ラフィノース、L-アラビノース、イノシトール、D-マンニトールの利用性は陽性であった。表2に、ストレプトマイセス エスピー-6982株の生理学的特徴を示す。

[0042]

[表2]

条件	特徴
生育温度(°C)	12~45
至適生育温度(°C)	28~43
メラノイド色素の産生	-
可溶性色素の産生	-
炭素源の利用性	
D-グルコース	++
シュークロース	+
D-キシロース	++
D-フルクトース	+
L-ラムノース	+
ラフィノース	++
L-アラビノース	++
イノシトール	+
D-マンニトール	-

[0043] (5) 16SrDNA塩基配列による解析

ストレプトマイセス エスピー6982株の16SrDNA部分塩基配列を、後記配列表に示した。相同性検索の結果、相同値が99.2 %であるストレプトマイセス グラウセセンス DSM40716株 (Accession No: X79322) が最も近縁な株であった。また、ストレプトマイセス属の基準種の基準株であるストレプトマイセス アルブス NBRC 13014株 (Accession No: AB184257) との相同値は、96.2 %であった。また、16SrDNA部分塩基配列により作成した系統樹では、ストレプトマイセス各種と同一のクラスターを形成した。

[0044] (6) 同定

下記文献(a)～(d)を参考に、形態観察、化学分析および16SrDNA塩基配列による解析の結果から、本菌株はストレプトマイセス属に属すると考えられる。

(a) Euzéby, J. P.: List of Bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997, 47, pp. 590-592.

(b) Waksman, S. A., et al.: The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 1943, 46, pp. 337-341.

(c) Williams, S. T.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol

. 4. 1989.

(d) Zhang, Z. et al.: A proposal to revive the genus Kitastospora Int. J. Syst. Bacteriol., 1997, 47, pp.1048-1054.

[0045] そこで本菌株をストレプトマイセス エスピー 6982株と命名した。本菌株は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-10802（受託日2007年3月22日）として国際寄託されている。

また、微生物は人工的に又は自然に変異を起こすので、本発明ストレプトマイセス エスピー6982株は、天然から分離された微生物の他に、これを紫外線、X線、化学薬剤などで人工的に変異させたもの及びそれらの天然変異株についても包含する。

[0046] 本発明のアミノ糖誘導体は、ストレプトマイセス属に属しかつ α -アミラーゼ活性を有する化合物の生産能を有する微生物、好ましくは、当該アミノ糖誘導体生産能を有する微生物、さらに好ましくはストレプトマイセス エスピー6982株を、栄養源を含有する培地に接種し好氣的に発育させることにより得ることが出来る。

[0047] 培養に用いられる培地は、使用する微生物が生育可能な培地であればよく、合成培地、半合成培地あるいは天然培地を用いることができる。

[0048] 栄養物としては、本発明の菌株が資化する栄養源を使用すればよい。例えば、窒素源としては、きな粉、脱脂大豆粉、ペプトン、肉エキス、コーンスティープリカー、綿実粉、落花生粉、大豆粉、酵母エキス、乾燥酵母、N Z-アミン、カゼインの水解物、魚粉、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム等の無機または有機の窒素源が使用できる。炭素源としては、ポテトスターチ、コーンスターチなどのデンプン、糖蜜、デキストリン、ショ糖、グルコース、マルトース、トレハロース、フラクトース、キシロース、ラムノース、マンニトール、グリセリン等の炭水化物あるいは脂肪等が使用できるが、好ましくはデンプン及びきな粉である。

[0049] また金属塩として、Na、K、Mg、Ca、Zn、Fe等の硫酸塩、塩酸塩、硝酸塩、リン酸塩、炭酸塩等が必要に応じて添加されるが、好ましくは炭酸カルシウ

ム及び／又は塩化ナトリウムである。さらに必要に応じて通常知られているアミノ酸類や、オレイン酸メチル、ラード油、シリコーン油、界面活性剤等の生成促進化合物または消泡剤が適宜使用される。これらのもの以外でも、該生産菌が利用し、本発明化合物の生産に役立つものであれば所望により使用することができる。

[0050] 培養は、一般の抗生物質製造における培養と同様に行えばよく、その培養方法は固体培養でも液体培養でもよい。液体培養の場合は静置培養、振とう培養、攪拌培養のいずれを実施してもよく、例えば、通気攪拌培養で実施してもよい。培養条件として、培養温度は生産菌が発育し、本発明の化合物を生産しうる温度、すなわち15～42℃の範囲で適宜適用できるが約20～30℃が好ましく、23～27℃がより好ましい。pHは4～9の範囲で適宜適用できるが、6～8が好ましい。培養時間は種々の条件によって異なり、通常1～30日の範囲で適宜適用できるが、4～10日が好ましい。

[0051] 培養物から目的とする化合物を単離するには、微生物の代謝産物を単離する際に用いる通常の抽出、分離、精製的手段が適宜利用できる。培養物中の該物質は培養液をそのままか、又は遠心分離あるいは培養物にろ過助剤を加えてろ過によってろ液を得る。この際、培養液にアセトン、MeOH、EtOH、MeCNなどの有機溶剤を加えても良く、所望によりpH調節のため塩酸等を加えてもよい。また、ろ液を適宜の担体に接触させ、ろ液中の生産物質を吸着させ、次いで適当な溶媒で溶出することにより該物質を分離することができる。例えば、アンバーライト(登録商標)XAD2、ダイヤイオン(登録商標)HP20、ダイヤイオンCHP20P、又はダイヤイオンSP850のような多孔性吸着樹脂に接触させて該物質を吸着させる。次いで、アセトン、MeOH、EtOH、MeCN等の有機溶媒と水の混合液を用いて該物質を溶出させる。所望によりpH調節のため塩酸等を加えてもよい。このときの有機溶媒の混合比率を低濃度より段階的に又は連続的に高濃度まで上げていくことにより、該物質を含む画分を効率よく得ることができる場合がある。

[0052] 本願化合物において、還元糖化合物などの不安定で単品として単離しにく

い化合物を除去するために、塩基を加えて精製した。また、医薬としての純度を確保するために、繰り返し精製した。

- [0053] 式(I)の化合物は、遊離化合物、その塩、水和物、溶媒和物、あるいは結晶多形の物質として単離され、精製される。式(I)の化合物の塩は、常法の造塩反応に付すことにより製造することもできる。単離、精製は、抽出、分別結晶化、各種分画クロマトグラフィー等、通常の化学操作を適用して行なわれる。
- [0054] 本明細書において、「回収」とは、本発明化合物(I)を単体でもしくは組成物として入手するために行われる操作を意味し、「精製」や「単離」を含む。
- [0055] 本明細書において、「精製」には、本発明化合物を「単離」することを目的として行われる操作を含み、「精製」により本発明化合物が「単離」されてもよい。
- [0056] 各種の異性体は、適当な原料化合物を選択することにより製造でき、あるいは異性体間の物理化学的性質の差を利用して分離することができる。例えば、光学異性体は、ラセミ体の一般的な光学分割法(例えば、光学活性な塩基又は酸とのジアステレオマー塩に導く分別結晶化や、キラルカラム等を用いたクロマトグラフィー等)により得ることもできる。
- [0057] 本明細書において、「クロマトグラフィー」とは、分析化学において汎用されるクロマトグラフィーを意味し、特に限定されないが、例えば、ガスクロマトグラフィー(GC)、液体クロマトグラフィー(LC)、超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)等を含む。
- [0058] 本明細書において、「液体クロマトグラフィー(LC)」とは、移動層に液体を用いるクロマトグラフィーの総称を意味し、特に限定されないが、例えば、中速液体クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等を含む。
- [0059] 式(I)の化合物又はその塩を含有する組成物は、式(I)の化合物を精製若しくは単離する段階において得られる組成物をいい、医薬の製造原体と

して使用し得るものをいう。特に限定されないが、例えば、1種又は2種以上の式(I)の化合物又はその塩と、アカルビオスタチンI V O 3等の活性成分若しくは他の成分との混合物である。また、本組成物は、これに限定されるものではないが、クロマトグラフィーによる分析で式(I)の化合物又はその塩を面積百分率で約80%以上、好ましくは、85%以上、より好ましくは、90%以上、更に好ましくは、95%以上、更に好ましくは、98%以上含有するものが好ましい。

[0060] 式(I)の化合物又はその塩の1種又は2種以上を有効成分として含有する医薬組成物は、当分野において通常用いられている賦形剤、即ち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用されている方法によって調製することができる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等による経口投与、又は、関節内、静脈内、筋肉内等の注射剤、坐剤、点眼剤、眼軟膏、経皮用液剤、軟膏剤、経皮用貼付剤、経粘膜液剤、経粘膜貼付剤、吸入剤等による非経口投与のいずれの形態であってもよい。

[0061] 経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が用いられる。このような固体組成物においては、1種又は2種以上の有効成分を、少なくとも1種の不活性な賦形剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、及び／又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウム等と混合される。組成物は、常法に従って、不活性な添加剤、例えばステアリン酸マグネシウムのような滑沢剤やカルボキシメチルスターチナトリウム等のような崩壊剤、安定化剤、溶解補助剤を含有していてもよい。錠剤又は丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質のフィルムで被膜してもよい。

[0062] 経口投与のための液体組成物は、薬剤的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤又はエリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水又はEtOHを含む。当該液体組成物は不活性な希釈剤以外に可溶化剤、湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、

防腐剤を含有していてもよい。

[0063] 非経口投与のための注射剤は、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤又は乳濁剤を含有する。水性の溶剤としては、例えば注射用蒸留水又は生理食塩液が含まれる。非水性の溶剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール又はオリーブ油のような植物油、EtOHのようなアルコール類、又はポリソルベート80(局方名)等がある。このような組成物は、さらに等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、又は溶解補助剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通す過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。また、これらは無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解又は懸濁して使用することもできる。

[0064] 外用剤としては、軟膏剤、硬膏剤、クリーム剤、ゼリー剤、パップ剤、噴霧剤、ローション剤、点眼剤、眼軟膏等を包含する。一般に用いられる軟膏基剤、ローション基剤、水性又は非水性の液剤、懸濁剤、乳剤等を含有する。例えば、軟膏又はローション基剤としては、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、白色ワセリン、サラシミツロウ、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、モノステアリン酸グリセリン、ステアリルアルコール、セチルアルコール、ラウロマクロゴール、セスキオレイン酸ソルビタン等が挙げられる。

[0065] 吸入剤や経鼻剤等の経粘膜剤は固体、液体又は半固体状のものが用いられ、従来公知の方法に従って製造することができる。例えば公知の賦形剤や、更に、pH調製剤、防腐剤、界面活性剤、滑沢剤、安定剤や増粘剤等が適宜添加されていてもよい。投与は、適当な吸入又は吹送のためのデバイスを使用することができる。例えば、計量投与吸入デバイス等の公知のデバイスや噴霧器を使用して、化合物を単独で又は処方された混合物の粉末として、もしくは医薬的に許容し得る担体と組み合わせて溶液又は懸濁液として投与することができる。乾燥粉末吸入器等は、単回又は多数回の投与用のものであってもよく、乾燥粉末又は粉末含有カプセルを利用することができる。あるいは

は、適当な駆出剤、例えば、クロロフルオロアルカン、ヒドロフルオロアルカン又は二酸化炭素等の好適な気体を使用した加圧エアゾールスプレー等の形態であってもよい。

[0066] 通常経口投与の場合、1日の投与量は、体重当たり約0.01~100 mg/kg、好ましくは0.1~10 mg/kgが適当であり、これを1回であるいは2回~4回に分けて投与する。また、経粘膜剤としては、体重当たり約0.001~100 mg/kgを1日1回~複数回に分けて投与する。投与量は症状、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定される。

[0067] 式(1)の化合物は、前述の式(1)の化合物が有効性を示すと考えられる疾患の種々の治療剤又は予防剤と併用することができる。当該併用は、同時投与、或いは別個に連続して、若しくは所望の時間間隔をおいて投与してもよい。同時投与製剤は、配合剤であっても別個に製剤化されていてもよい。

実施例

[0068] 以下、実施例に基づき、式(1)の化合物の製造法をさらに詳細に説明する。なお、本発明は、下記実施例に記載の化合物に限定されるものではない。また、式(1)の化合物の製造法は、以下に示される具体的実施例の製造法のみ限定されるものではなく、式(1)の化合物はこれらの製造法の組み合わせ、あるいは当業者に自明である方法によっても製造されうる。

[0069] 本明細書において以下の略号を用いることがある。

EtOH: エタノール

MeCN: アセトニトリル

MeOH: メタノール

NaCl : 塩化ナトリウム

NaOH : 水酸化ナトリウム

TFA : トリフルオロ酢酸

[0070] 以下、本発明を実施例により、さらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によって何等限定されるものではない。

[0071] 実施例 1

(培養)

種培地は、100 mL容の三角フラスコに、可溶性デンプン 20 g、パインデックス#3(松谷化学社製) 10 g、きな粉 20 gおよび蒸留水1 Lを含む培地(pH=7.0)を、30 mLずつ分注し、121°Cで30分間オートクレーブで滅菌することにより調製した。

この種培地に、ストレプトマイセス エスピー6982株の斜面培養物を、1白金耳分接種し、30°Cで3日間、振とう培養した。

生産培地は、100 mL容の三角フラスコに、可溶性デンプン 100 g、きな粉 60 g、NaCl 2.5 g、CaCO₃ 2 gおよび蒸留水1 Lを含む培地(pH=7.0)を、30 mLずつ分注し、121°Cで30分間オートクレーブで滅菌することにより調製した。

この生産培地に、前記の種培養液を、各フラスコに2 mLずつ接種し、25°Cで7日間振とう培養した。

[0072] 培養液からの粗精製

上記の培養方法により得られた培養液22 Lを6 M HCl水溶液でpH=3に調製した後、吸引ろ過した。ろ液を6 M NaOH水溶液でpH=7に調製した後、ダイヤイオンHP20(樹脂量1.2 L)を用いて、10% MeOH水溶液で洗浄した後、25% MeOH水溶液で溶出した。

[0073] この活性画分を、DOWEX 50W X1 (ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー社製)陽イオン交換樹脂(樹脂量 550 mL)を用いて、蒸留水、0.5Mおよび1M NaCl水溶液で洗浄した後、3M NaCl水溶液で溶出した。

次いで、ダイソーゲルSP-120-15/30-ODS-B(樹脂量1 L、ダイソー社製)を用いて、10%、15% MeOH水溶液で溶出することで、化合物A、Bをそれぞれ得、20% 及び25% MeOH水溶液で溶出することで、化合物Cを得た。

[0074] (1)化合物Aの精製・単離

前記のODSカラムクロマトグラフィーで精製して得られた化合物Aを含む活性画分を、SP-120-15/30-ODS-B(樹脂量337 mL)を用いて、2%、3% MeOH水溶液(0.05% TFA含有)で溶出した。

この活性画分を6 M NaOH水溶液でpH=13に調製し、ダイヤイオンHP20SS(樹

脂量500 mL)を用いて、12.5%、15% MeOH水溶液(0.05 M NaOH含有)で溶出した。

活性画分を6 M HCl水溶液でpH=7に調製し、ダイヤイオンHP20(樹脂量200 mL)を用いて、50% MeOH水溶液で溶出した。溶出区を減圧濃縮した後、凍結乾燥し、1.14gの粉末を得た。

水に溶解した200mgの上記粉末を、ダイソーパックSP-120-5-ODS-BP(20 x 250mm、ダイソー社製)を用いて、2% MeCN水溶液(0.05% TFA含有)で溶出した。

この活性画分を6 M NaOH水溶液でpH=7に調製し、ダイヤイオンHP20(樹脂量50 mL)に供し、50% MeOH水溶液で溶出した。溶出区を減圧濃縮した後、凍結乾燥し、136mgの粉末を得た。

水に溶解した上記粉末を再度ダイソーパックSP-120-5-ODS-BP(20 x 250mm)を用いて、2% MeCN水溶液(0.05% TFA含有)で溶出した。

この活性画分を6 M NaOH水溶液でpH=7に調製し、ダイヤイオンHP20(樹脂量30 mL)を用いて、50% MeOH水溶液で溶出した。

得られた活性画分を減圧濃縮した後、凍結乾燥して化合物A(65 mg)を得た。

[0075] (2) 化合物Bの精製・単離

前記のODSカラムクロマトグラフィーで粗精製することにより得られた画分を、SP-120-15/30-ODS-B(樹脂量337 mL)を用いて、3%から7%までのMeOH水溶液(0.05% TFA含有)で溶出した。

この活性画分を6 M NaOH水溶液でpH=13に調製し、ダイヤイオンHP20SS(樹脂量250 mL)を用いて、15%、17.5%、20% MeOH水溶液(0.05M NaOH含有)で溶出した。

この活性画分を6M HCl水溶液でpH=7に調製し、ダイヤイオンHP20(樹脂量150 mL)を用いて、50% MeOH水溶液で溶出した。溶出区を減圧濃縮した後、凍結乾燥し、970mgの粉末を得た。

水に溶解した450mgの上記粉末を、ダイソーパックSP-120-5-ODS-BP(20 x 250mm)を用いて、2.2% MeCN水溶液(0.05% TFA含有)で溶出した。

この活性画分を6 M NaOH水溶液でpH=7に調製し、ダイヤイオンHP20(樹脂量115 mL)を用いて、50% MeOH水溶液で溶出した。溶出区を減圧濃縮した後、凍結乾燥し、190mgの粉末を得た。

水に溶解した上記粉末を、再度ダイソーパックSP-120-5-ODS-BP(20 x 250mm)に供し、2.2% MeCN水溶液(0.05% TFA含有)で溶出した。

この活性画分を6 M NaOH水溶液でpH=7に調製し、ダイヤイオンHP20(樹脂量30 mL)を用いて、50% MeOH水溶液で溶出した。

この活性画分を減圧濃縮した後、凍結乾燥して化合物B(129 mg)を得た。

[0076] (3) 化合物Cの精製・単離

前記のODSカラムクロマトグラフィーで粗精製することにより得られた画分をSP-120-15/30-ODS-B(樹脂量80 mL)を用いて、2% MeOH水溶液(0.05% TFA含有)で溶出した。

この活性画分を6 M NaOH水溶液でpH=13に調製し、ダイヤイオンHP20SS(樹脂量200 mL)を用いて、15%、17.5%、20% MeOH水溶液(0.05 M NaOH含有)で溶出した。

この活性画分を6 M HCl水溶液でpH=7に調製し、ダイヤイオンHP20(樹脂量150 mL)を用いて、50% MeOH水溶液で溶出した。溶出区を減圧濃縮した後、凍結乾燥し、1gの粉末を得た。

水に溶解した上記粉末を、ダイソーパックSP-120-5-ODS-BP(20 x 250mm)を用いて、2.2%から3.2%までのMeCN水溶液(0.05% TFA含有)で溶出した。

この活性画分を6 M NaOH水溶液でpH=7に調製し、ダイヤイオンHP20(樹脂量30 mL)を用いて、50% MeOH水溶液で溶出した。溶出区を減圧濃縮した後、凍結乾燥し、236mgの粉末を得た。

水に溶解した184mgの上記粉末を、再度ダイソーパックSP-120-5-ODS-BP(20 x 250mm)を用いて、2.2% MeCN水溶液(0.05% TFA含有)で溶出した。

この活性画分を6 M NaOH水溶液でpH=7に調製し、ダイヤイオンHP20(樹脂量30 mL)を用いて、50% MeOH水溶液で溶出した。

得られた活性画分を減圧濃縮した後、凍結乾燥することにより化合物C(91

mg)を得た。

[0077] 化合物A, B及びCの物理化学的性質

上記抽出、分離、精製された化合物A、BおよびCは、それぞれ以下の物理化学的性質を有した。

(1) 化合物A

1) 色及び形状：白色粉末。

2) 酸性、中性、塩基性の区分：塩基性。

3) 比旋光度： $[\alpha]^{23}_D +157^\circ$ (c=0.5、H₂O)

4) 分子式： $C_{94}H_{156}N_4O_{64}$

5) 高分解能TOF-マスペクトル：実測値 $[M+2H]^{2+}$ 1183.4624

理論値 $[M+2H]^{2+}$ 1183.4616

6) 元素分析： $C_{94}H_{156}N_4O_{64} \cdot 14H_2O$ として

計算値：C 43.12, H 7.08, N 2.14,

実測値：C 43.27, H 7.08, N 2.05

7) 溶解性：水、DMF、DMSOにはよく溶けるが、アセトン、MeOH、EtOH、MeCNにはほとんど溶けない。

8) 紫外吸収スペクトル(溶剤：水)：末端吸収を示す

9) 赤外部吸収スペクトル(ν_{max} (KBr)cm⁻¹)：3330, 2925, 1655, 1385, 1150, 1040, 935

10) ¹H-NMRスペクトル(500MHz, D₂O)：図1に示す。

11) ¹³C-NMRスペクトル(125MHz, D₂O)：図2に示す。

[0078] (2) 化合物B

1) 色及び形状：白色粉末。

2) 酸性、中性、塩基性の区分：塩基性。

3) 比旋光度： $[\alpha]^{23}_D +153^\circ$ (c=0.5、H₂O)

4) 分子式： $C_{113}H_{187}N_5O_{76}$

5) 高分解能TOF-マスペクトル：実測値 $[M+2H]^{2+}$ 1416.0548

理論値 $[M+2H]^{2+}$ 1416.0539

6) 元素分析 : $C_{113}H_{187}N_5O_{76} \cdot 16H_2O$ として

計算値 : C 43.50, H 7.08, N 2.24,

実測値 : C 43.53, H 7.09, N 2.15

7) 溶解性 : 水、DMF、DMSOにはよく溶けるがアセトン、MeOH、EtOH、MeCNにはほとんど溶けない。

8) 紫外吸収スペクトル(溶剤 : 水) : 末端吸収を示す。

9) 赤外部吸収スペクトル(ν_{max} (KBr) cm^{-1}) : 3365, 2930, 1640, 1385, 1150, 1045, 935

10) 1H -NMRスペクトル(500MHz, D_2O) : 図3に示す。

11) ^{13}C -NMRスペクトル(125MHz, D_2O) : 図4に示す。

[0079] (3) 化合物C

1) 色及び形状 : 白色粉末。

2) 酸性、中性、塩基性の区分 : 塩基性。

3) 比旋光度 : $[\alpha]^{23}_D +172^\circ$ (c=0.5, H_2O)

4) 分子式 : $C_{132}H_{218}N_6O_{88}$

5) 高分解能TOF-マスマスペクトル : 実測値	$[M+2H]^{2+}$	1648.6467
	理論値	$[M+2H]^{2+}$ 1648.6462

6) 元素分析 : $C_{132}H_{218}N_6O_{88} \cdot 16H_2O$ として

計算値 : C 44.22, H 7.03, N 2.34,

実測値 : C 44.23, H 7.09, N 2.35

7) 溶解性 : 水、DMF、DMSOにはよく溶けるがアセトン、MeOH、EtOH、MeCNにはほとんど溶けない。

8) 紫外吸収スペクトル(溶剤 : 水) : 末端吸収を示す。

9) 赤外部吸収スペクトル(ν_{max} (KBr) cm^{-1}) : 3365, 2925, 1635, 1340, 1150, 1040, 935

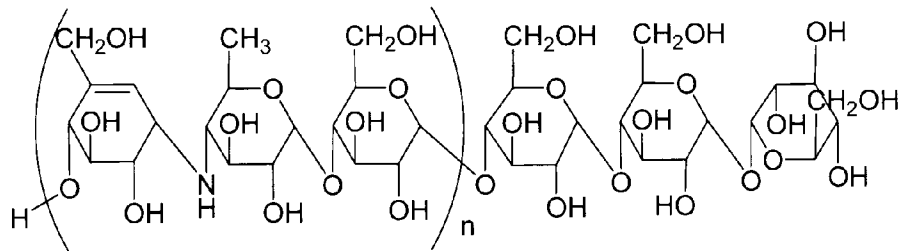
10) 1H -NMRスペクトル(500MHz, D_2O) : 図5に示す。

11) ^{13}C -NMRスペクトル(125MHz, D_2O) : 図6に示す。

前記の物理化学的性質から化合物A、B及びCの化学構造を、下記のように決定

した。

[化7]



式中、化合物A : $n=4$; 化合物B : $n=5$; 及び化合物C : $n=6$ 。

[0080] 又、上記方法にて製造した化合物A、B、Cを、以下の条件により高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法で分析すると、化合物A、B、Cの面積百分率 (%) は、それぞれ99.0%、98.2%、98.3%であった。尚、面積百分率 (%) は、保持時間が6分から22分間にクロマトグラム上に得られた各成分のピーク面積の総和を100とし、それに対するそれぞれの成分のピーク面積の比から求めた。化合物Aから化合物CのHPLCのクロマトグラムを図9から図11に示す。

- 1) カラム : Unison US-C18 250-4.6mm (インタクト社製)
 - 2) 移動相 : 1-7 % MeCN水溶液 (0.05% TFA含有) (0-20分)
 - 3) 流速 : 1.0 ml/分
 - 4) 検出 : UV、210nm
 - 5) カラム温度 : 50°C
 - 6) 保持時間 : 化合物A 16.3分、化合物B 17.9分、化合物C 19.2分
- (参考文献 : 化学便覧 応用化学編 第六版 (丸善)、第8章 分析・計測・管理、P. 342~346)

[0081] 実施例2

本発明化合物の α -アミラーゼ阻害活性は以下の方法で確認した。

(1) 実験方法

マウス、ラット、イヌ及びサル膵臓 α -アミラーゼ溶液はICRマウス (雄、8週齢、日本SLCより購入)、SDラット (雄、8週齢、日本チャールスリバーより購入)、ビーグルイヌ (雄、35ヶ月齢、株式会社ナルクより購入) 及びカニクイ

ザル(雄、10歳、日本クレアより購入)膵臓より調製した。ヒト唾液及び膵臓 α -アミラーゼ溶液はSigma-Aldrich Co.より購入した酵素より調製した。これらの α -アミラーゼ溶液は全てアッセイバッファー(48 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 28 mM Na₂HPO₄, 43 mM NaH₂PO₄, 35 mM マンニトール, pH=7.0)を用いて800 U/mLになるように希釈調製した。96-wellマイクロプレートに各種 α -アミラーゼ溶液(20 U, 25 μ L)及びアッセイバッファーで溶解調製した化合物(25 μ L)を添加して37°C、10分間インキュベーションした。その後、デンプン溶液(5 mg/mL, 50 μ L)を添加して10分間、37°Cでインキュベーションした。0.33 M過塩素酸溶液(50 μ L)を添加して酵素反応を停止させた後、0.01 Mヨウ素溶液(50 μ L)を添加して呈色させ、吸光度(660 nm)を測定した。 α -アミラーゼ活性を50%阻害する化合物の濃度をIC₅₀値として算出した。

(2) 結果

本発明化合物は検討を行った全ての種の α -アミラーゼに対して阻害活性を有し、化合物A、B及びCのマウス膵臓 α -アミラーゼに対する阻害活性(IC₅₀値)はそれぞれ、1.90 nM、2.06 nMおよび1.73 nMであり、ラット膵臓 α -アミラーゼに対する阻害活性(IC₅₀値)はそれぞれ、2.01 nM、2.12 nM及び1.95 nMであり、イヌ膵臓 α -アミラーゼに対する阻害活性(IC₅₀値)はそれぞれ、2.06 nM、2.38 nMおよび2.07 nMであり、サル膵臓 α -アミラーゼに対する阻害活性(IC₅₀値)はそれぞれ、2.14 nM、1.90 nMおよび2.02 nMであり、ヒト唾液 α -アミラーゼに対する阻害活性(IC₅₀値)はそれぞれ、2.20 nM、1.87 nMおよび1.99 nMであり、ヒト膵臓 α -アミラーゼに対する阻害活性(IC₅₀値)はそれぞれ、2.02 nM、2.11 nMおよび2.21 nMであった。

[0082] 実施例 3

本発明化合物の経口活性を以下の方法で確認した。

(1) 実験方法

動物は雄性ICR(正常)マウス(6週齢、日本SLCより購入)を使用した。化合物は0.5%メチルセルロース溶液を用いて溶解液を調製した。一晚絶食させたマウスより血糖値及び血漿インスリン値測定用採血を行い、溶媒もしくはは化合

物A (0.3, 1, 3, 10 mg/kg) を経口投与し、直ちに炭水化物溶液 (75 mg/mL デンプン, 25 mg/mL スクロース, 20 mL/kg) を経口投与した。次いで、0.25、0.5 及び1時間後に血漿インスリン値測定用採血を、0.5、1 及び2時間後に血糖値測定用採血を行った。

血糖値はグルコースCII-テストワコー試薬 (和光純薬) を用いて、血漿インスリン濃度はマウスインスリンELISAキット (株式会社シバヤギ) を用いてそれぞれ測定した。試験結果は平均値±標準誤差で示した。

化合物投与後2時間までの血糖値より血糖値-時間曲線下面積 (AUC) を、1時間までの血漿インスリン値より血漿インスリン値-時間AUCを算出して、溶媒投与群と化合物A投与群間でDunnett's multiple range testを用いて検定を行い、危険率5% 未満を有意とした。

(2) 結果

化合物A (0.3から10 mg/kg) の経口投与により用量依存的な血糖上昇抑制作用が認められ、その作用は1 mg/kg以上の用量において有意であった (図7)。この時、用量依存的かつ有意な血漿インスリン値の低下作用も併せて認められた (図8)。

[0083] 実施例 4

本発明化合物の二糖類水解酵素阻害活性を以下の方法で確認した。

(1) 実験方法

ICRマウス、SDラット、ビーグルイヌ及びカニクイザル小腸より作製した刷子縁標本、ヒト小腸マイクロソーム標本 (BD Biosciences; Lot 36869) を各種の二糖類水解酵素液とした。これらの二糖類水解酵素液及び化合物は全て phosphate buffer (NaCl 48 mM, KCl 5.4 mM, Na₂HPO₄ 28 mM, NaH₂PO₄ 43 mM, mannitol 35 mM, pH=6.0) を用いて調製した。

マウス、ラット、イヌ及びサル二糖類水解酵素阻害活性評価：96-wellマイクロプレートに二糖類水解酵素液 (10 mg/mL, 40 μ L) 及び化合物溶液 (20 μ L) を添加して37°C, 10分間インキュベーションを行った。その後、二糖類水解酵素基質 (スクラーゼ：100 mM スクロース, マルターゼ：100 mM マル

トース, イソマルターゼ : 100 mM イソマルトース, ラクターゼ : 100 mM ラクトース, トレハラーゼ : 100 mM トレハロース, 40 μ L) を添加して30分間、37°Cでインキュベーションを行った。0.04 M過塩素酸溶液 (100 μ L) を添加して反応停止後、遠心分離 (2,000 rpm, 15分) を行い、上清中のグルコース濃度をグルコースGII-テストワコー試薬 (和光純薬) を用いて測定した。酵素非添加 (0%) 及び化合物非添加 (100%) より二糖類水解酵素阻害活性を算出した。

ヒト二糖類水解酵素阻害活性評価 : 96-wellマイクロプレートに二糖類水解酵素液 (0.1 mg/mL, 20 μ L) 及び化合物溶液 (10 μ L) を添加して37°C、10分間インキュベーションを行った。その後、二糖類水解酵素基質 (スクラーゼ : 100 mM スクロース, マルターゼ : 100 mM マルトース, イソマルターゼ : 100 mM イソマルトース, ラクターゼ : 100 mM ラクトース, トレハラーゼ : 100 mM トレハロース, 20 μ L) を添加して30分間、37°Cでインキュベーションを行った。0.04 M過塩素酸溶液 (100 μ L) を添加して反応停止後、遠心分離 (2,000 rpm, 15分) を行い、上清中のグルコース濃度をグルコースGII-テストワコー試薬 (和光純薬) を用いて測定した。酵素非添加 (0%) 及び化合物非添加 (100%) より二糖類水解酵素阻害活性を算出した。

(2) 結果

本発明化合物は検討を行った全ての種の二糖類水解酵素 (スクラーゼ, マルターゼ, イソマルターゼ, ラクターゼ及びトレハラーゼ) に対して阻害性を示さなかった ($IC_{50} > 10 \mu M$)。

[0084] 上記試験の結果、式(1)の化合物は α -アミラーゼ阻害、血糖値及び血漿インスリン値の低下作用を有することが確認され、糖尿病等の治療等に使用できることが確認された。

産業上の利用可能性

[0085] 式(1)の化合物又はその塩は、 α -アミラーゼ阻害作用を有し、糖尿病、肥満、NASH (非アルコール性脂肪肝炎) 等の予防若しくは治療剤として使用できる。また、グルコシダーゼ阻害剤と異なり、下痢等の消化器症状を引き起

こさずに糖の吸収を阻害できると期待される。

配列表フリーテキスト

[0086] ストレプトマイセス エスピー6982株の16SrDNA部分塩基配列を配列表に示す。

[0087]

0-1	様式 PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、右記によって作成された。	JPO-PAS 0361
0-1-1		
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	A09004
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	段落番号	0045
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	IPOD (独)産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒305-8566 茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6
1-3-3	寄託の日付	2007年 03月 22日 (22.03.2007)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-10802
1-4	追加の表示	EPC規則33(1)の規定に基づき、生物材料が請求人により推薦された専門家にのみ試料分譲されることを可能にすることを出願人は希望する(EPC規則32(1))。オーストラリア特許規則の規則3.25(3)の規定に基づき、微生物の試料が発明について利害関係のない当事者である受取人に対して提供されることを出願人は通知する。カナダに関して、出願に基づくカナダ特許が発行されるまで、又は出願が拒絶されるまで、又は放棄され回復の余地がなくなるまで、又は取り下げられるまで、特許庁長官が、出願で言及する試料の分譲は特許庁長官が指名した各専門家に対してのみ認めることを、出願人は希望する。シンガポールに関して、微生物の試料の分譲は、専門家に対してのみ行うことを出願人は要求する。
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	
0-4-1	権限のある職員	

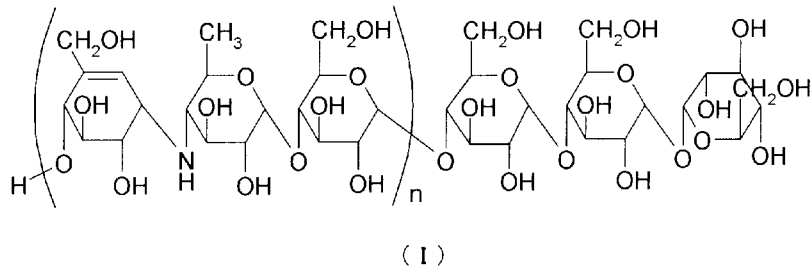
国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

請求の範囲

[請求項1] 式(I)の化合物又はその塩。

[化1]



(式中、nは、4から6である。)

[請求項2] 培地中で、 α -アミラーゼ阻害活性を有する化合物又はその塩を産生するストレプトマイセス属の微生物を培養し、その培養液から当該化合物又はその塩を回収することにより得られた、 α -アミラーゼ阻害活性を有し、分子式が $C_{94}H_{156}N_4O_{64}$ 、 $C_{113}H_{187}N_5O_{76}$ 、又は、 $C_{132}H_{218}N_6O_{88}$ の化合物（ただし、末端に還元糖構造を有する化合物を除く）又はその塩。

[請求項3] ストレプトマイセス属の微生物が、ストレプトマイセス エスピー-698 2株 (FERM BP-10802号) である請求項2記載の化合物（ただし、末端に還元糖構造を有する化合物を除く）又はその塩。

[請求項4] 寄託番号がFERM BP-10802号であるストレプトマイセス (Streptomyces) 属の放線菌、ストレプトマイセス エスピー (Streptomyces sp.) 6982 株およびその変異株。

[請求項5] ストレプトマイセス属の微生物の培養液から、精製若しくは単離された式(I)の化合物又はその塩を含有する組成物。

[請求項6] ストレプトマイセス属の微生物が、ストレプトマイセス エスピー-698 2株 (FERM BP-10802号) である請求項5記載の組成物。

[請求項7] クロマトグラフィーによる分析で、式(I)の化合物又はその塩を面積百分率で約80%以上含有することを特徴とする組成物。

[請求項8] クロマトグラフィーによる分析で、式(I)の化合物又はその塩を面

積百分率で約80%以上含有することを特徴とする請求項5記載の組成物。

[請求項9] クロマトグラフィーによる分析で、式(1)の化合物又はその塩を面積百分率で約80%以上含有することを特徴とする請求項6記載の組成物。

[請求項10] 培地中で、 α -アミラーゼ阻害活性を有する化合物を産生するストレプトマイセス属の微生物を培養し、その培養液から当該化合物を回収することを含む、 α -アミラーゼ阻害活性を有し、分子式が $C_{94}H_{156}N_4O_{64}$ 、 $C_{113}H_{187}N_5O_{76}$ 、又は、 $C_{132}H_{218}N_6O_{88}$ の化合物（ただし、末端に還元糖構造を有する化合物を除く）又はその塩の生産方法。

[請求項11] ストレプトマイセス属の微生物が、ストレプトマイセス エスピー698 2株(FERM BP-10802号)である請求項10記載の生産方法。

[請求項12] ストレプトマイセス属の微生物の培養液から、精製若しくは単離することを特徴とする式(1)の化合物又はその塩の生産方法。

[請求項13] ストレプトマイセス属の微生物が、ストレプトマイセス エスピー698 2株(FERM BP-10802号)である請求項12記載の生産方法。

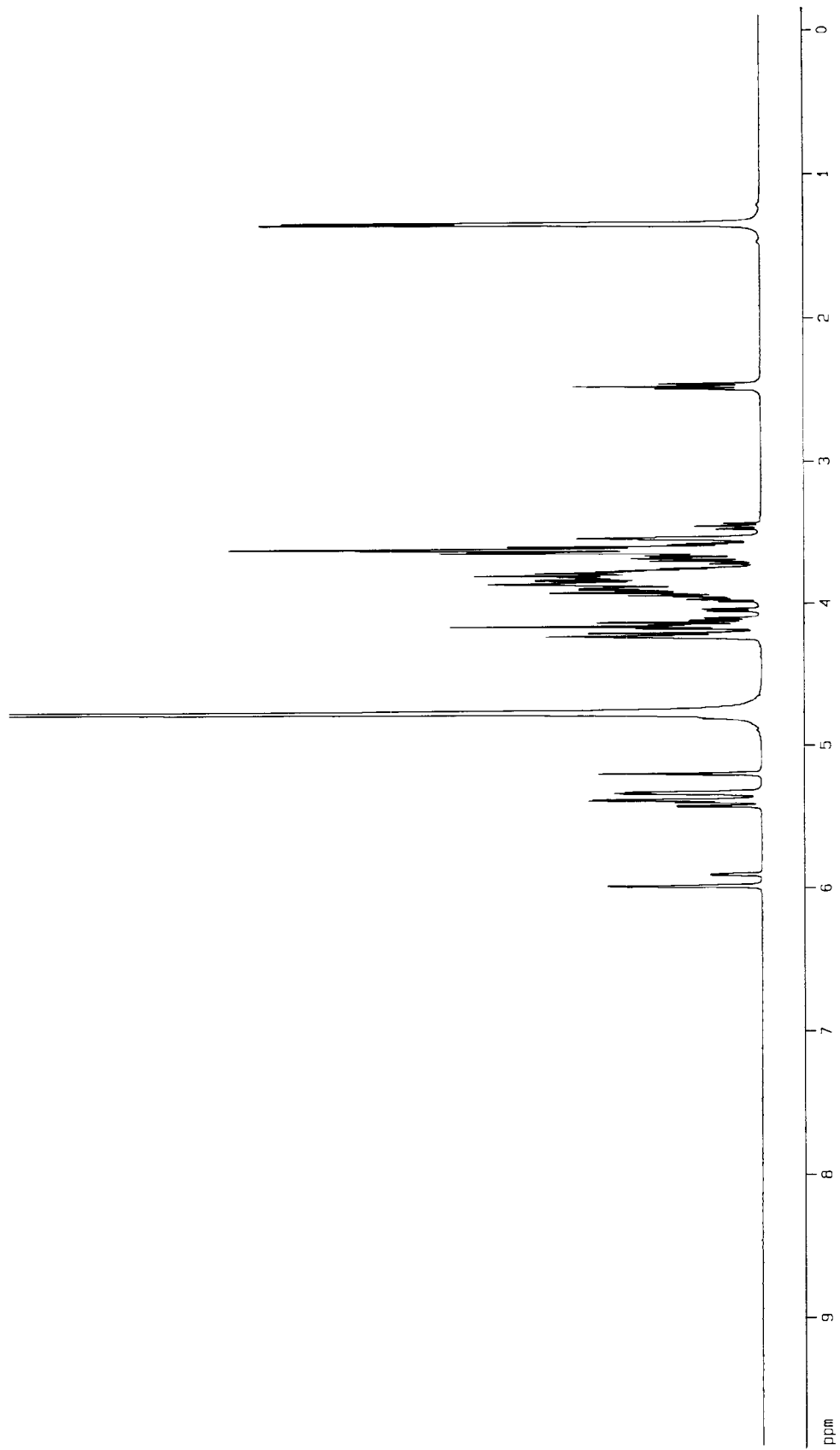
[請求項14] 請求項1に記載の化合物又はその塩、及び製薬学的に許容される賦形剤を含有する医薬組成物。

[請求項15] 請求項1に記載の化合物又はその塩を含有する糖尿病の予防用若しくは治療用医薬組成物。

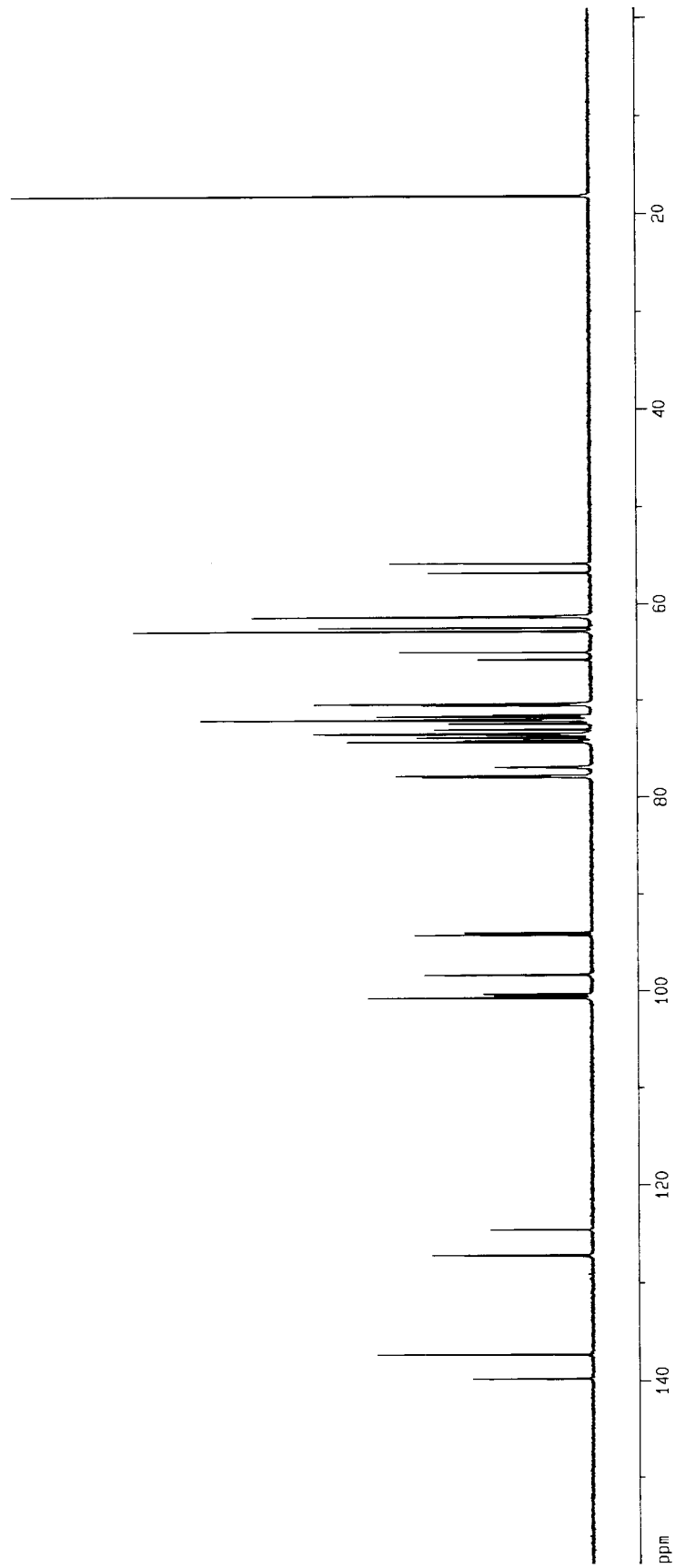
[請求項16] 糖尿病の予防若しくは治療用医薬組成物の製造のための請求項1に記載の化合物又はその塩の使用。

[請求項17] 糖尿病の予防若しくは治療のための請求項1に記載の化合物又はその塩の使用。

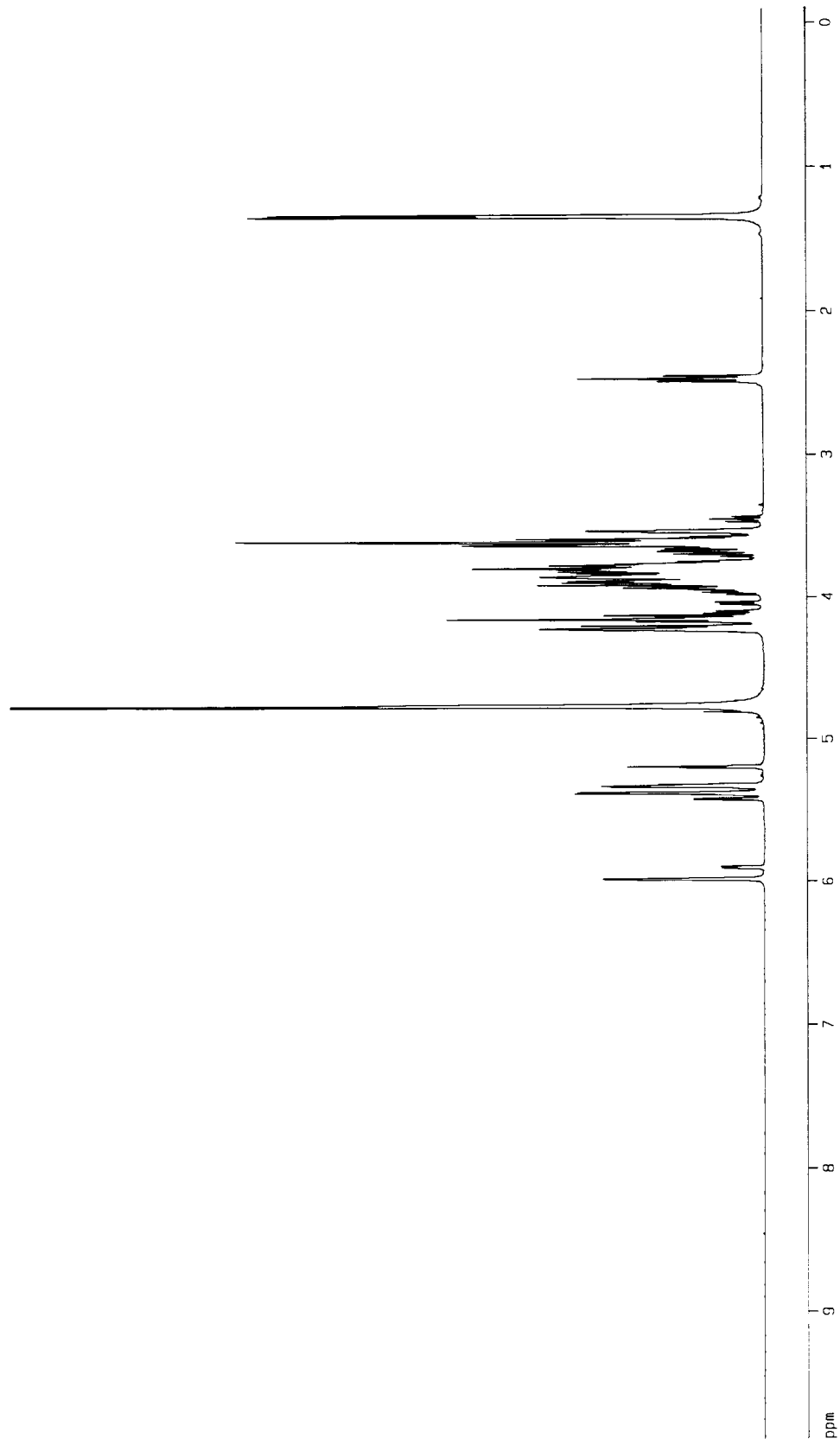
[請求項18] 請求項1に記載の化合物又はその塩の有効量を患者に投与することからなる糖尿病の予防若しくは治療方法。

[1]

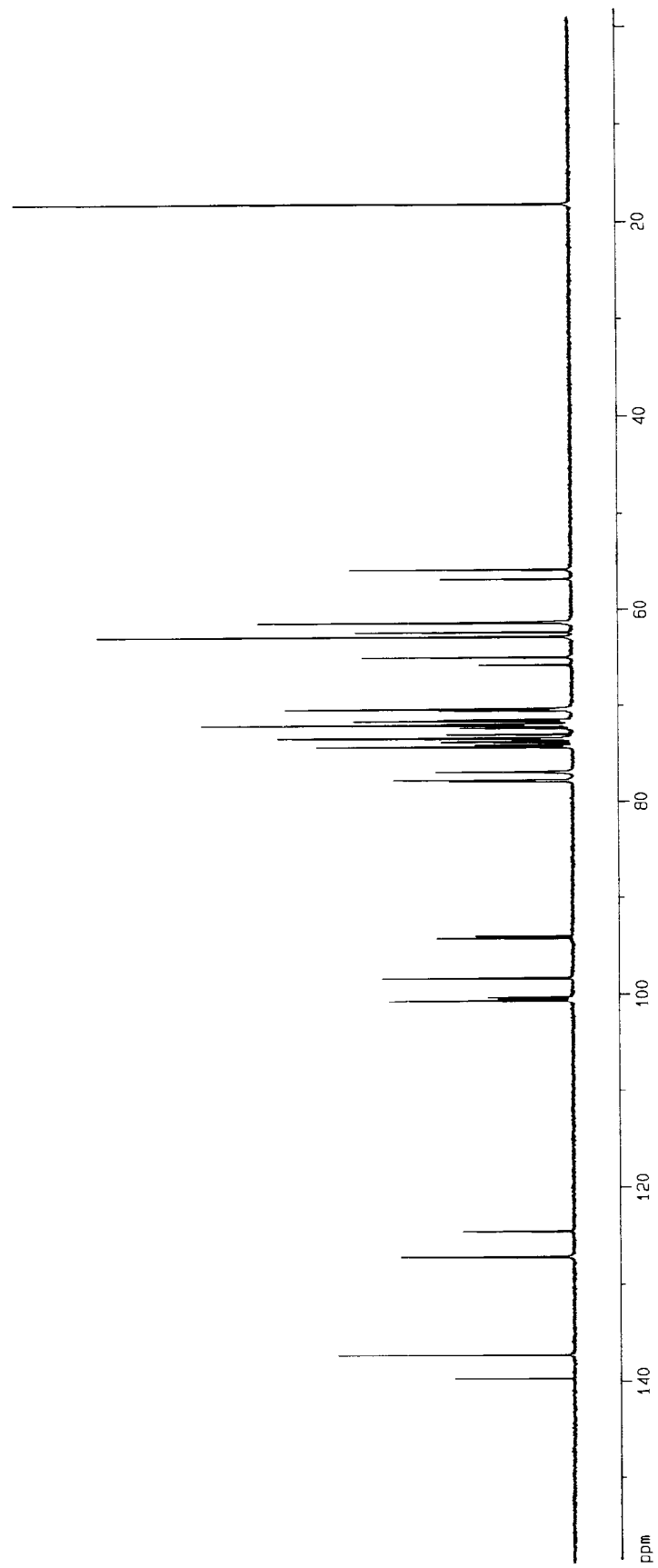
[2]



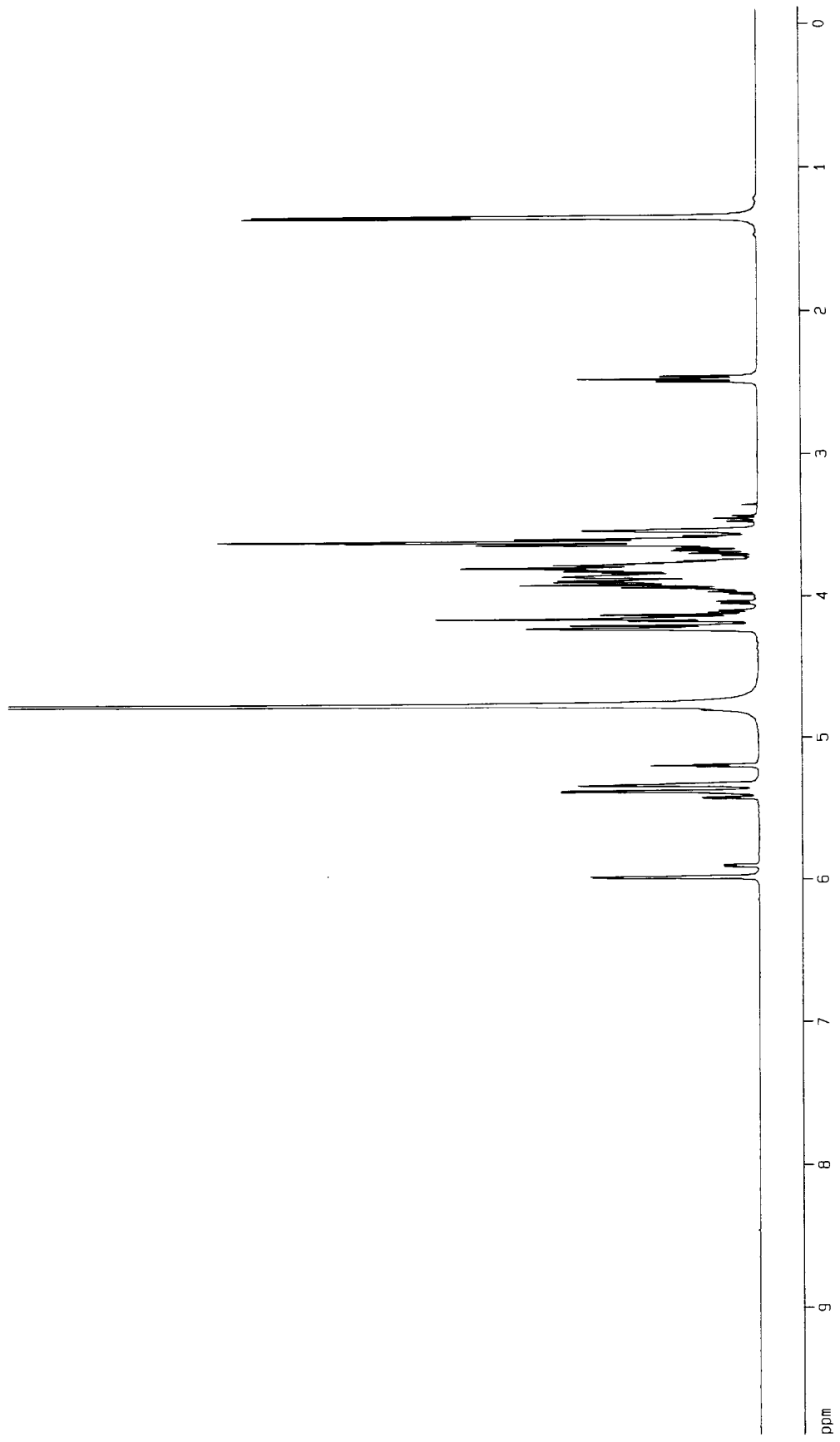
[3]



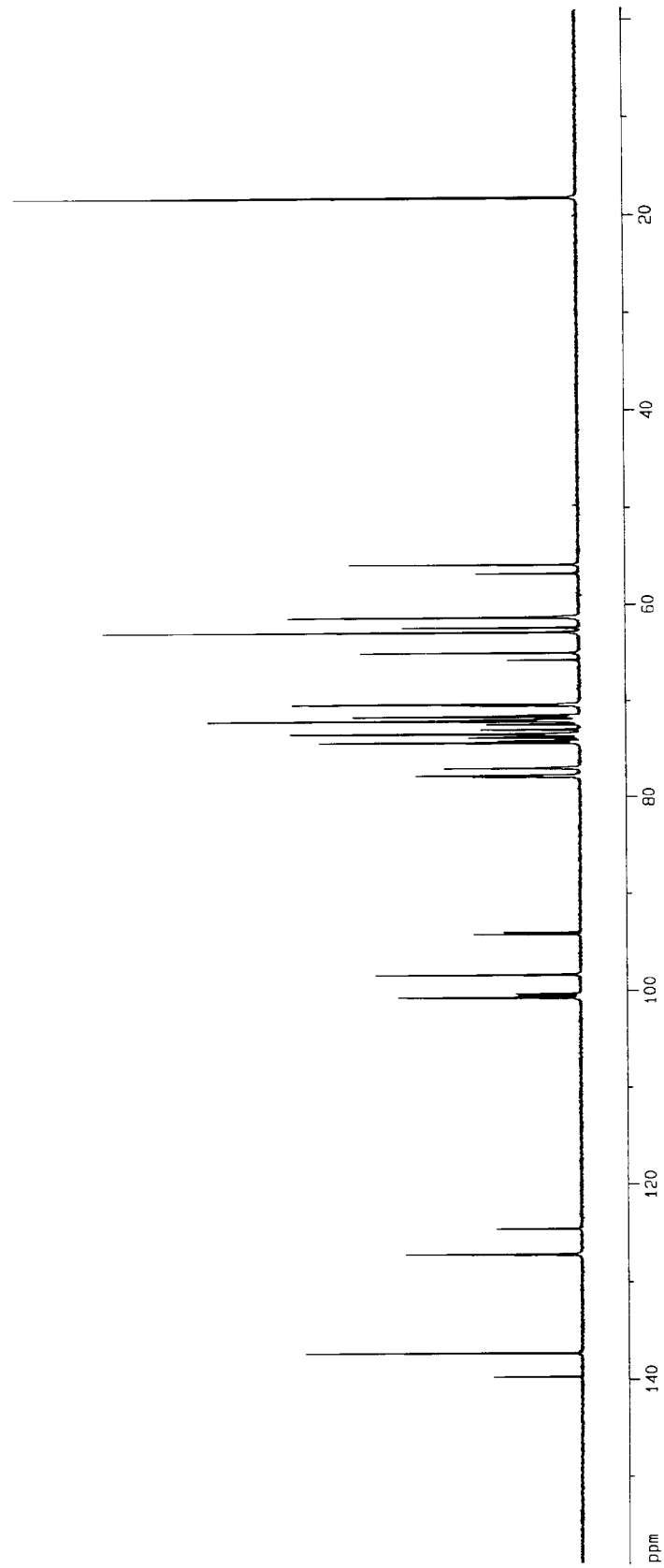
[図4]



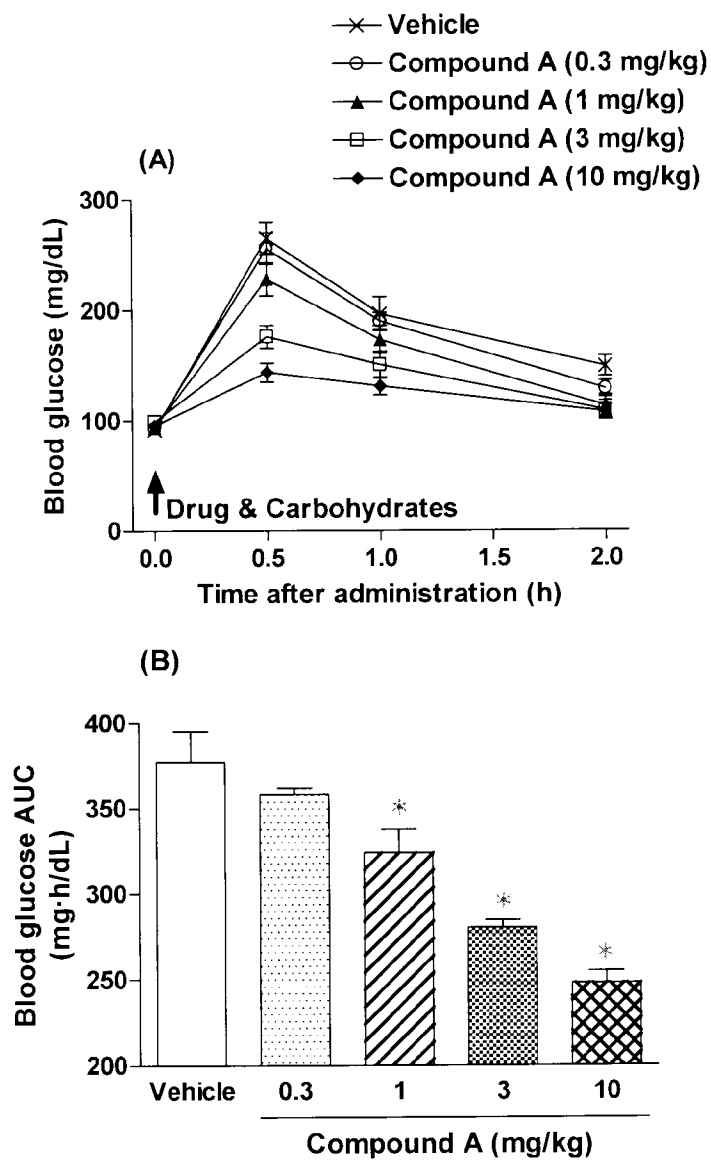
[圖5]



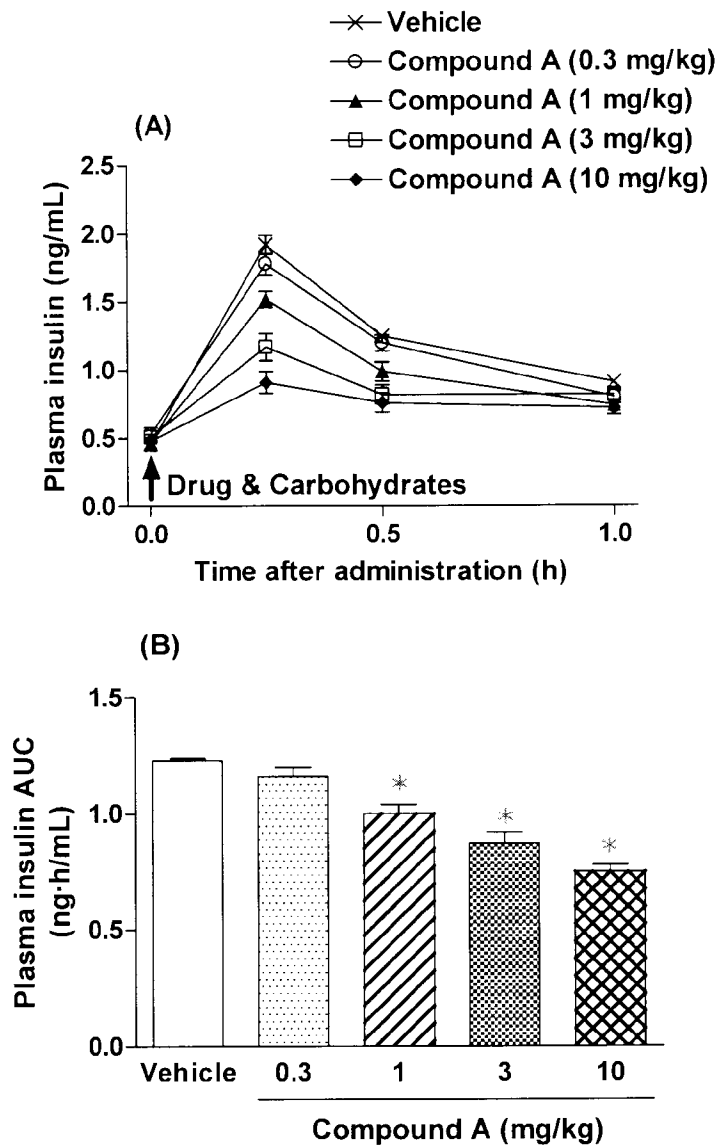
[6]



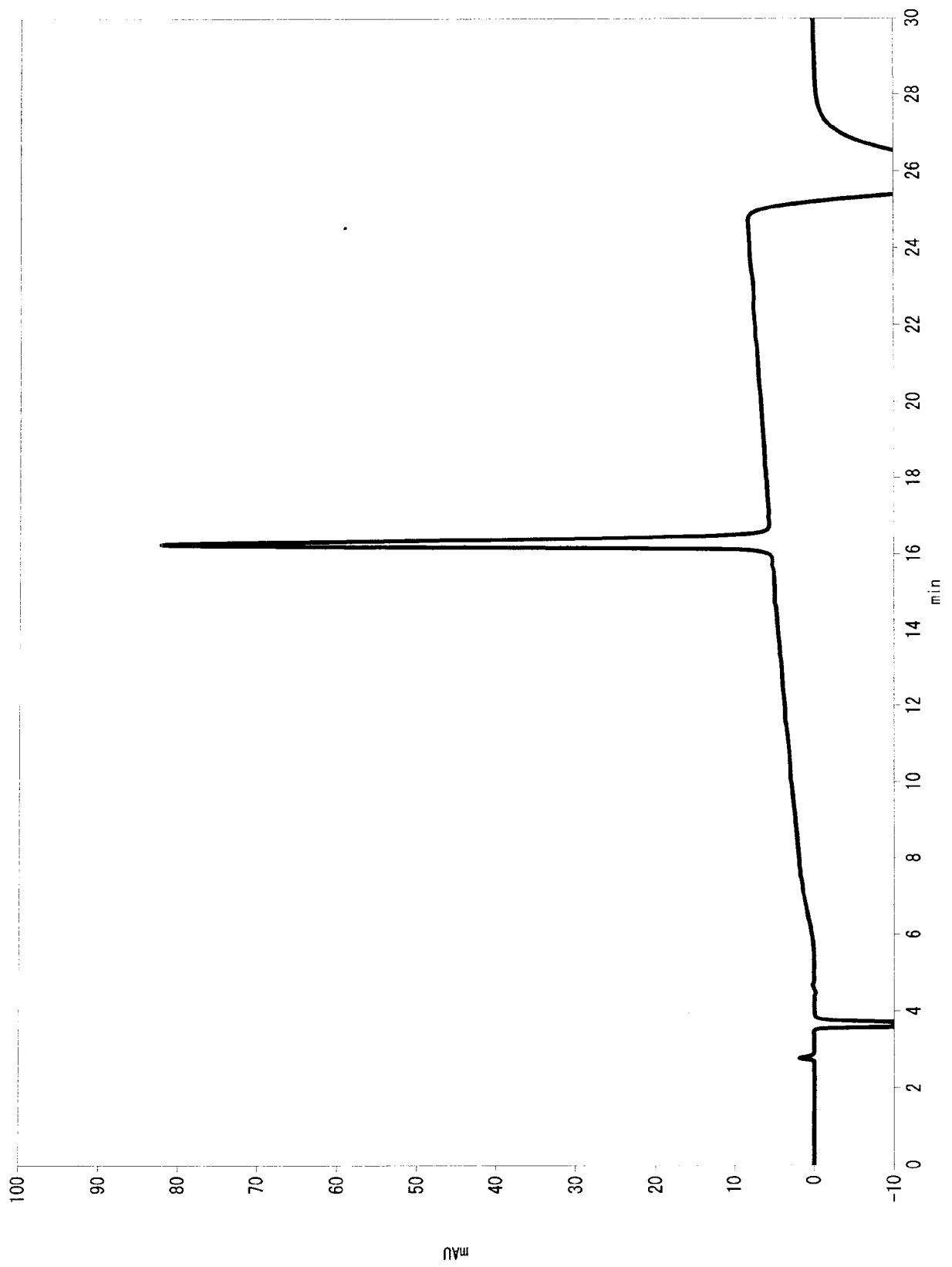
[7]



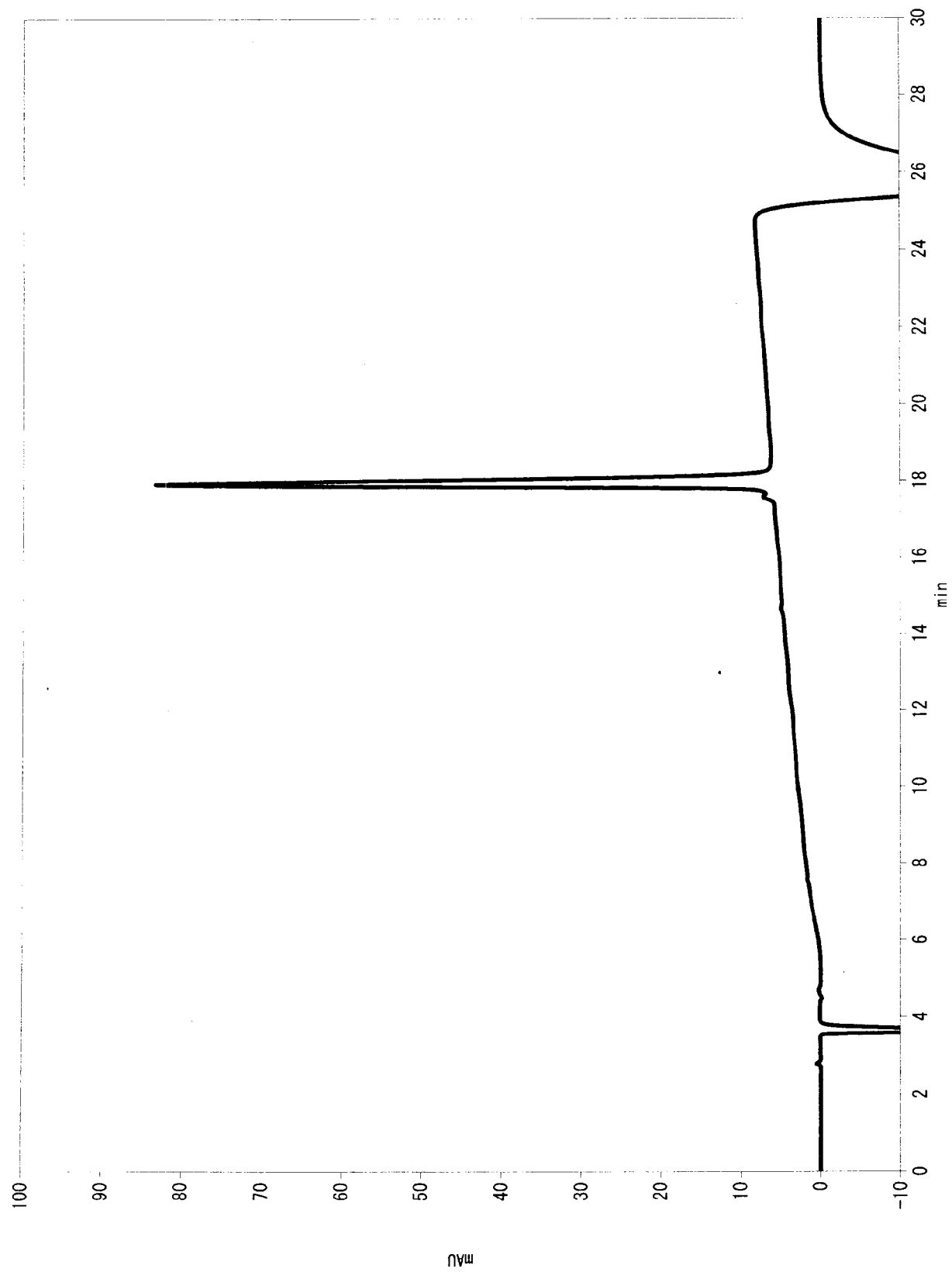
[8]



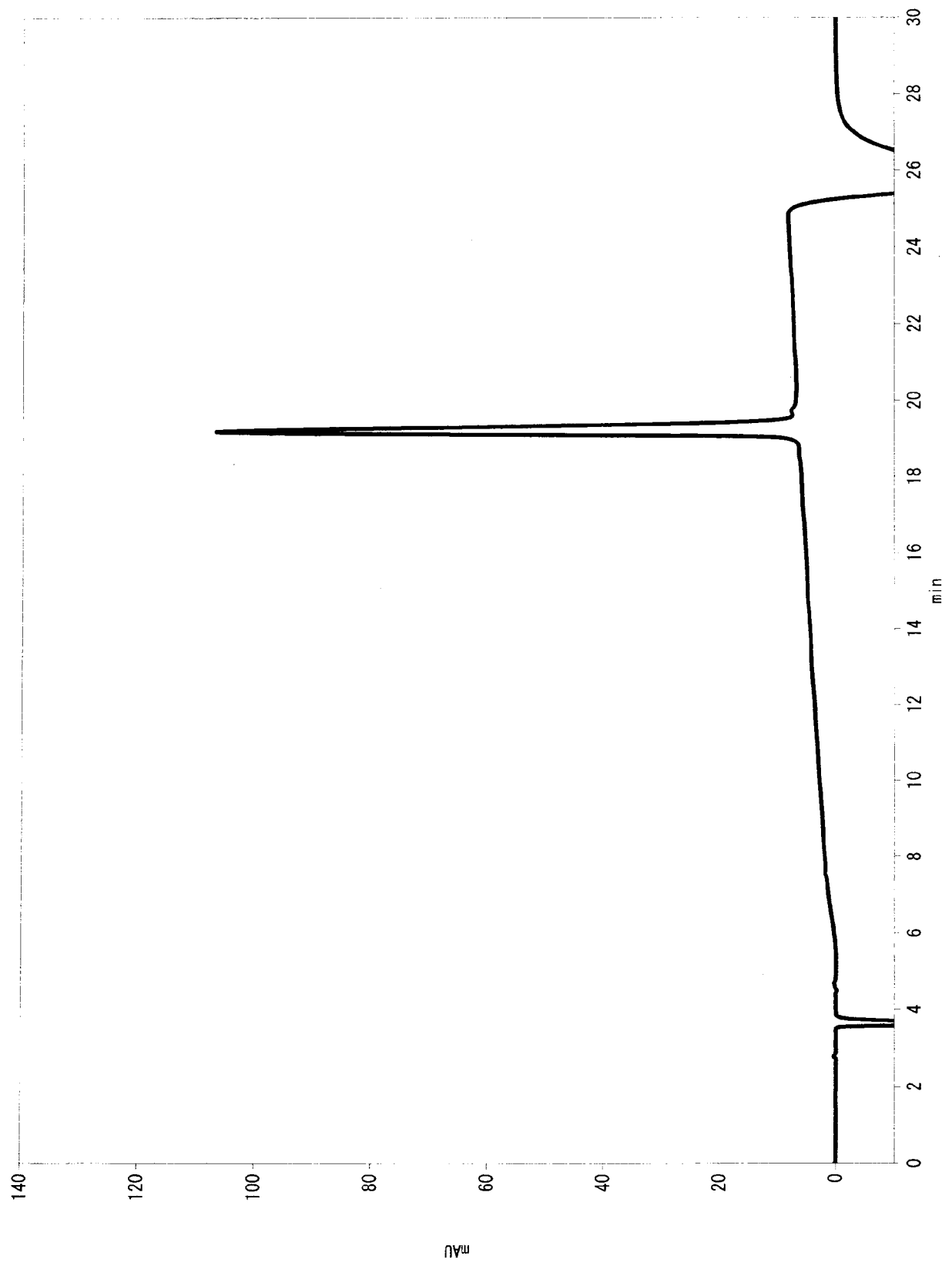
[9]



[10]



[X11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/057292

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12P19/04(2006.01)i, A61K31/715(2006.01)i, A61K35/74(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C08B37/00(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, A61K31/7034(2006.01)n, C07H15/203(2006.01)n
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)
C12P19/04, A61K31/715, A61K35/74, A61P3/10, A61P43/00, C08B37/00, C12N1/20, A61K31/7034, C07H15/203

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YOKOSE, K. et al., New alpha-amylase inhibitor, trestatins. III. Structure determination of new trestatin components Ro 09-0766, Ro 09-0767 and Ro 09-0768, J.Antibiot., 1984, Vol.37, No.2, p.182-186	1-16
A	JP 54-163511 A (F. Hoffmann-La Roche & Co. AG.), 26 December, 1979 (26.12.79), Full text & US 4273765 A & EP 3616 A2 & DE 2905649 A	1-16

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family 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 application or patent 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 07 July, 2009 (07.07.09)	Date of mailing of the international search report 14 July, 2009 (14.07.09)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057292

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GENG, P. et al., Four acarviosin-containing oligosaccharides identified from <i>Streptomyces coelicoflavus</i> ZG0656 are potent inhibitors of alpha-amylase, <i>Carbohydr Res.</i> , 2008.04.07, Vol.343, No.5, p.882-892	1-16
A	JP 2000-239293 A (Kikkoman Corp.), 05 September, 2000 (05.09.00), Full text & US 6596696 B1 & EP 1156057 A1 & WO 2000/050434 A1 & DE 60013560 D	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057292

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 17-18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 17 to 18 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- the
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P19/04(2006.01)i, A61K31/715(2006.01)i, A61K35/74(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C08B37/00(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, A61K31/7034(2006.01)n, C07H15/203(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12P19/04, A61K31/715, A61K35/74, A61P3/10, A61P43/00, C08B37/00, C12N1/20, A61K31/7034, C07H15/203

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	YOKOSE, K. et al., New alpha-amylase inhibitor, trestatins. III. Structure determination of new trestatin components Ro 09-0766, Ro 09-0767 and Ro 09-0768, J. Antibiot., 1984, Vol. 37, No. 2, p. 182-186	1-16
A	JP 54-163511 A (エフ・ホフマン・ラ・ロシユ・ウント・コンパニ-・アクチエンゲゼルシャフト) 1979. 12. 26, 全文 & US 4273765 A & EP 3616 A2 & DE 2905649 A	1-16

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 07. 2009

国際調査報告の発送日

14. 07. 2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4 N

9 2 8 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	GENG,P. et al., Four acarviosin-containing oligosaccharides identified from Streptomyces coelicoflavus ZG0656 are potent inhibitors of alpha-amylase, Carbohydr Res., 2008. 04. 07, Vol. 343, No. 5, p. 882-892	1-16
A	JP 2000-239293 A (キッコーマン株式会社) 2000. 09. 05, 全文 & US 6596696 B1 & EP 1156057 A1 & WO 2000/050434 A1 & DE 60013560 D	1-16

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 17-18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項17-18は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。