

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 3 月 3 日 (03.03.2005)

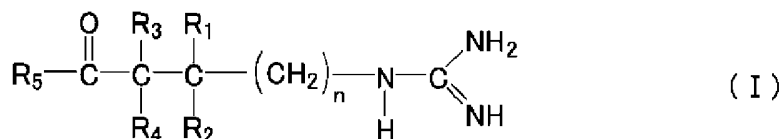
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/019245 A1

- (51) 国際特許分類: **C07K 7/06**, A61K 38/08, A61P 1/02, 1/04, 9/10, 11/00, 13/02, 13/12, 19/02, 27/02, 27/16, 29/00, 29/00, 31/04, 35/00, 35/04, 37/08, 43/00
- (74) 代理人: 一色国際特許業務法人 (ISSHIKI & CO.); 〒1050004 東京都港区新橋 2 丁目 1 2 番 7 号 労金新橋ビル Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/012076
- (22) 国際出願日: 2004 年 8 月 23 日 (23.08.2004)
- (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2003-300419 2003 年 8 月 25 日 (25.08.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1080073 東京都港区三田 2 丁目 1 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 梅澤 一夫 (UMEZAWA, Kazuo) [JP/JP]; 〒2230061 神奈川県横浜市港北区日吉 3 丁目 1 4 番 1 号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 大野 修 (ONO, Osamu) [JP/JP]; 〒2230061 神奈川県横浜市港北区日吉 3 丁目 1 4 番 1 号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP). 池田 洋子 (IKEDA, Yoko) [JP/JP]; 〒1500013 東京都渋谷区恵比寿 1 丁目 3 0 番 1 4 号 2 0 0 4 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HEPTADEPSIN

(54) 発明の名称: ヘプタデプシン



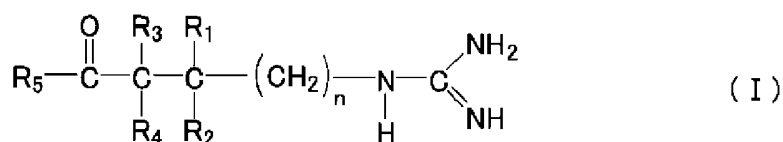
(57) **Abstract:** Compound of the general formula: (I) (wherein all of R₁ to R₄ represent hydrogen, or any one of R₁ to R₄ is hydroxyl while the rests are hydrogen; R₅ is a linear or cyclic peptide; and n is an integer of 10 to 20) can inhibit the adhesion of vascular endothelial cells having been activated by stimulation of LPS or Lipid A and can suppress the cell proliferation of gram-positive bacteria. Therefore, the pharmaceutical composition comprising as an active ingredient the compound of the general formula (I) or a pharmacologically acceptable salt thereof is useful for treating the diseases attributed to the activation of vascular endothelial cells or bacterial infection or proliferation. Further, the compound of the general formula (I) or salt thereof can couple with Lipid A, LPS or fungus having LPS as a constituent thereof, so that the same can be an adsorbent useful for removing of, contained in liquids, Lipid A, LPS or fungus having LPS as a constituent thereof.

/ 続葉有 /



(57) 要約:

一般式(I)



(式中、 $\text{R}_1 \sim \text{R}_4$ は全てが水素原子、または、 $\text{R}_1 \sim \text{R}_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10～20の整数である。)で表される化合物は、LPSやLipid Aの刺激により活性化した血管内皮細胞の細胞接着を阻害することができ、グラム陽性菌に対して細胞増殖を抑制することができる。従って、一般式(I)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物は、血管内皮細胞の活性化、又は細菌の感染もしくは増殖に起因するに起因する疾患に有用である。また、一般式(I)で表される化合物またはその塩は、Lipid A、LPS、又はLPSを構成成分とする菌に結合することができるので、液体に含まれるLipid A、LPS、又はLPSを構成成分とする菌の除去に有用な吸着剤となりうる。

明 細 書

ヘプタデプシン

技術分野

- [0001] 本発明は、血管内皮細胞の活性化に起因する疾患や、細菌の感染または増殖に起因する疾患の予防・治療に有用な化合物、並びに、その化合物を含有する医薬組成物、抗菌剤、細胞接着阻害剤、増殖抑制剤、吸着剤、除去材、及び担持体、並びに、上記化合物を用いた除去方法に関する。

背景技術

- [0002] 炎症性刺激や物理的刺激などが血管内皮細胞に加わると、血管内皮細胞膜上の細胞接着分子の発現が増強し、血中の細胞(腫瘍細胞や白血球など)が血管内皮細胞表面上に接着し、血管外へ移動する。これは、血管内皮細胞内の転写因子であるNF- κ Bが活性化することにより、ICAM-1、VCAM-1、E-セレクトインなどの接着分子の発現を増強するからである。白血球の接着は脂質の蓄積などを介して動脈硬化を誘導し、腫瘍細胞の接着は血管からの浸出、転移を引き起こすことが知られている。そのため、血中の細胞と血管内皮細胞との接着を阻害することができれば、腫瘍転移や動脈硬化などの予防や治療につながると考えられている。
- [0003] 近年、細菌の構成成分であるLPSが血管内皮細胞を活性化し、腫瘍転移や動脈硬化を引き起こす作用を有すると考えられている。従って、LPSによる血管内皮細胞の活性化を抑制することができれば、腫瘍転移や動脈硬化などの予防や治療につながると考えられている。
- [0004] 一方、細菌の感染症を予防・治療すべく、様々な抗菌剤や抗生物質が開発されているが(例えば、特開2003-104893号公報及び特開2002-326952号公報参照)、新たな耐性菌が出現するという問題があり、その対応が迫られている。

発明の開示

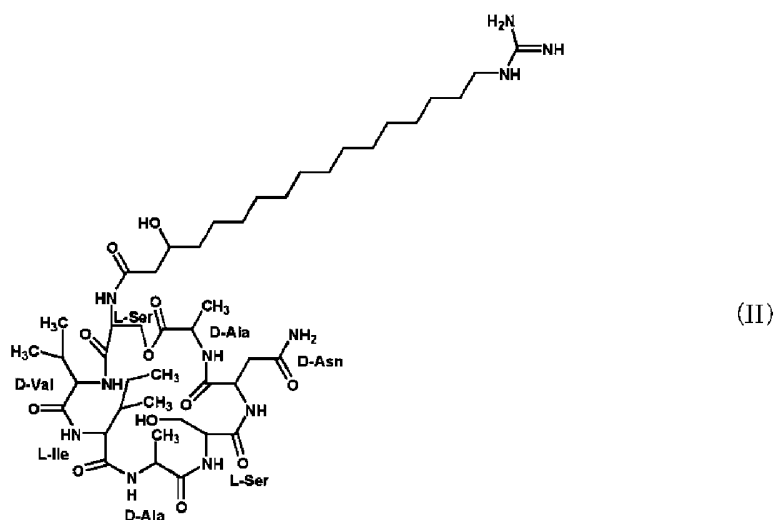
発明が解決しようとする課題

- [0005] そこで、本発明は、血管内皮細胞の活性化に起因する疾患や、細菌の感染または増殖に起因する疾患の予防・治療に有用な化合物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、LPS (リポポリサッカライド: lipopolysaccharide) 刺激により活性化した血管内皮細胞への腫瘍細胞の接着を測定する実験系を用いて、細胞接着阻害物質を探索するスクリーニング系を構築し、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、下式(II)で表される化合物(以下、「ヘプタデプシン(Heptadepsin)」と称する場合もある。)が、LPS刺激により活性化した血管内皮細胞と、白血病細胞との接着を阻害することを見出した。

[0007]



[0008] また、本発明者らは、LPSが示す内毒素(エンドトキシン)活性の活性中心である Lipid A (リピドA)を用いて活性化した血管内皮細胞と白血球との接着に式(II)で表される化合物が与える影響を調べた。その結果、式(II)で表される化合物は、Lipid Aの刺激により活性化した血管内皮細胞と白血病細胞との接着も阻害することを見出した。

[0009] そこで、本発明者らは、LPSやLipid A以外の血管内皮細胞の活性化を誘導する炎症性サイトカインで血管内皮細胞の活性を阻害するか否かを調べた。ここではTNF- α やIL-1 β を用いて、式(II)で表される化合物が、TNF- α やIL-1 β による血管内皮細胞の活性化を阻害するか否かを調べたが、式(II)で表される化合物はTNF- α やIL-1 β による血管内皮細胞の活性化を阻害しなかった。

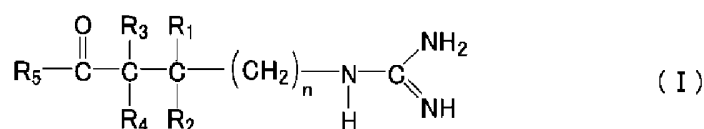
[0010] また、本発明者らは、式(II)で表される化合物がLipid Aと結合することを見出し、こ

ことから、式(II)で表される化合物は、Lipid Aと結合してLipid Aによる血管内皮細胞の活性化を阻害し、結果として血管内皮細胞と白血病細胞との接着阻害を引き起こすことが示唆された。

[0011] さらに、本発明者らは、式(II)で表される化合物の機能を調べる過程で、この化合物が、グラム陰性菌に対して細胞増殖抑制活性を示さず、グラム陽性菌に対して細胞増殖抑制活性を示すことを見出した。このようにして、本発明者らは本発明を完成するに至った。

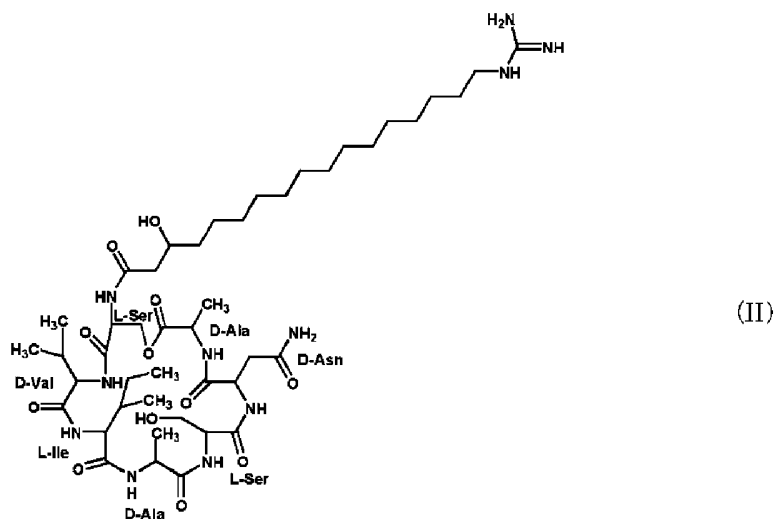
[0012] すなわち、本発明に係る化合物は、一般式(I)で表される化合物であることを特徴とする。

[0013]



[0014] 式中、 R_1 — R_4 は全てが水素原子、または、 R_1 — R_4 のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は1—30の整数であればどのようなものでもよく、10—20の整数が好ましく、14の整数であることが特に好ましい。なお、前記化合物は下式(II)で表される化合物であることが好ましい。

[0015]



- [0016] また、本発明に係る医薬組成物は、上記一般式(I)で表される化合物またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。なお、式(I)中、 R_1 — R_4 は全てが水素原子、または、 R_1 — R_4 のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は1—30の整数であればどのようなものでもよく、10—20の整数が好ましく、14の整数であることが特に好ましい。なお、前記化合物は上記式(II)で表される化合物であることが好ましい。
- [0017] 本発明に係る医薬組成物は、リポ多糖またはリポドAによる血管内皮細胞の活性化に起因する疾患を改善することを特徴とする。特に前記血管内皮細胞の細胞接着を阻害することにより前記疾患を改善することを特徴とする。すなわち、リポ多糖またはリポドAによって活性化された血管内皮細胞の細胞接着を阻害することにより、前記血管内皮細胞の活性化に起因する疾患を改善することを特徴とする。前記疾患は、例えば、動脈硬化や腫瘍転移などである。
- [0018] また、本発明に係る医薬組成物は、グラム陽性菌の感染または増殖に起因する疾患を改善することを特徴とする。前記疾患は、例えば、感染症、中毒症、歯周病、炎症性腸疾患、血管炎、IV型アレルギー性疾患、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群、MRSA感染症、リッター病、新生児における水疱性インペチゴ、腫瘍、肺炎、関節炎、髄膜炎、各種化膿性疾患、腸炎、髄膜炎、菌血症、眼感染、食中毒、呼吸器感染症、中耳炎、副鼻腔炎、咽頭炎、猩紅熱、急性糸状体腎炎、リウマチ熱、膿痂疹、激症型感染、齲齒、尿路感染症、創感染、胆道感染症、細菌感染によるアトピー性疾患(アトピー性皮膚炎など)の重症化などの疾患である。本明細書において「グラム陽性菌」とは、グラム染色に陽性反応を示し、ポリンを有しない細菌をいう。
- [0019] 本発明に係るグラム陽性菌に対する抗菌剤は、上記一般式(I)で表される化合物またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。式(I)中、 R_1 — R_4 は全てが水素原子、または、 R_1 — R_4 のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は1—30の整数であればどのようなものでもよく、10—20の整数が好ましく、14の整数であることが特に好ましい。なお、前記化合物は上記式(II)で表される化合物であることが好ましい。

- [0020] 本明細書において、抗菌剤とは、細菌の増殖を抑制したり、細菌を死滅させたり、細菌を不活性化させたりする物質をいい、化学合成された狭義の抗菌剤、布や生地などにコーティングするための抗菌コート剤、及びカビや菌から単離され、医薬品として用いられる抗生物質を含む広義の抗菌作用を有する物質を意味する。なお、本発明に係るグラム陽性菌に対する抗菌剤は抗生物質として用いられることが好ましいが、用途はそれに限らない。
- [0021] 本発明に係る、リポ多糖またはリピドAによる活性化血管内皮細胞の細胞接着を阻害するための細胞接着阻害剤は、上記一般式(I)で表される化合物またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。式(I)中、 $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子、または、 $R_1 \sim R_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は1～30の整数であればどのようなものでもよく、10～20の整数が好ましく、14の整数であることが特に好ましい。なお、前記化合物は上記式(II)で表される化合物であることが好ましい。
- [0022] 本発明に係る、グラム陽性菌に対する増殖抑制剤は、上記一般式(I)で表される化合物またはその薬理的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。式(I)中、 $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子、または、 $R_1 \sim R_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は1～30の整数であればどのようなものでもよく、10～20の整数が好ましく、14の整数であることが特に好ましい。なお、前記化合物は上記式(II)で表される化合物であることが好ましい。
- [0023] 本発明に係るリピドA吸着剤、LPS吸着剤、及びLPSを構成成分とする菌の吸着剤は、上記一般式(I)で表される化合物またはその塩を有効成分として含有することを特徴とする。式(I)中、 $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子、または、 $R_1 \sim R_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は1～30の整数であればどのようなものでもよく、10～20の整数が好ましく、14の整数であることが特に好ましい。なお、前記化合物は上記式(II)で表される化合物であることが好ましい。
- [0024] 本発明に係るリピドA除去材、LPS除去材、及びLPSを構成成分とする菌の除去材

は、上記一般式(I)で表される化合物またはその塩を有効成分として含有することを特徴とする。式(I)中、 $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子、または、 $R_1 \sim R_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は1～30の整数であればどのようなものでもよく、10～20の整数が好ましく、14の整数であることが特に好ましい。なお、前記化合物は上記式(II)で表される化合物であることが好ましい。

[0025] 本発明の担持体は、上記一般式(I)で表される化合物またはその塩を担持させてなることを特徴とする。式(I)中、 $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子、または、 $R_1 \sim R_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は1～30の整数であればどのようなものでもよく、10～20の整数が好ましく、14の整数であることが特に好ましい。なお、前記化合物は上記式(II)で表される化合物であることが好ましい。

[0026] 本発明に係るリピドA、LPS、又はLPSを構成成分とする菌の除去方法は、上記一般式(I)で表される化合物またはその塩に結合させて除去することを含んでなる。式(I)中、 $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子、または、 $R_1 \sim R_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は1～30の整数であればどのようなものでもよく、10～20の整数が好ましく、14の整数であることが特に好ましい。なお、前記化合物は上記式(II)で表される化合物であることが好ましい。

[0027] 関連文献とのクロスリファレンス

なお、本願は、2003年8月25日付けで出願した日本国特願2003-300419号に基づく優先権を主張する。この文献を本明細書に援用する。

図面の簡単な説明

[0028] 図1は、本実施の一形態において、紫外線吸収スペクトルによりヘプタデプシンを測定した結果を示す図である。

図2は、本実施の一形態において、赤外線吸収スペクトルによりヘプタデプシンを測定した結果を示す図である。

図3は、本実施の一形態において、プロトン核磁気共鳴スペクトルによりヘプタデプシンを測定した結果を示す図である。

図4は、本実施の一形態において、炭素13核磁気共鳴スペクトルによりヘプタデプシンを測定した結果を示す図である。

図5は、本発明の一実施例において、ヘプタデプシンがHUVECとHL-60の接着に及ぼす阻害効果を示す図である。

図6は、本発明の一実施例において、BIAcoreXを用いた表面プラズモン共鳴センサーによりヘプタデプシンとLipid Aとの分子間相互作用を解析した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0029] 以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Ltd.などの標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコールを用いる。

[0030] なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

[0031] === 上記一般式(I)で表される化合物の製造方法 ===

まず、本発明に係る化合物の製造方法について説明する。上記一般式(I)で表される化合物は、例えば、1-グアニジル-アクリル酸アルキルと、直鎖状または環状ペプチドとをアミド結合させ、その後、触媒(例えば、硫酸水銀及び硫酸)を用いることによ

り、二重結合を開裂させて水を付加することにより製造することができる。なお、前記環状ペプチドは、保護基を用いた公知のペプチド合成法により合成することが可能である。

[0032] このようにして得られた化合物は、スペーサとしての疎水性アルキル基の両末端にペプチドとグアノシル基を有しており、これらが血管内皮細胞の活性化に起因する疾患や、細菌の感染または増殖に起因する疾患に対する機能部位であり、リポ多糖やリピドAと結合してリポ多糖またはリピドAによる活性化血管内皮細胞の細胞接着を阻害する機能や、グラム陽性菌に対する抗菌作用や増殖抑制作用などを有するものと考えられる。従って、上記一般式(I)で表される化合物の $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子であってもよく、 $R_1 \sim R_4$ のいずれか1つがヒドロキシル基であって残りが水素原子であってもよく、また、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドであり、 n は1～30の整数であればどのようなものでもよいと考えられる。

[0033] なお、本発明の化合物は、薬理学的に許容される塩、例えば、第4級アンモニウム塩などの有機塩、あるいはアルカリ金属などの金属塩、のような形態としてもよい。このような化合物の塩は、上記一般式(I)で表される化合物と同様の薬理学的作用を有し、本発明の技術的範囲に属する。

[0034] 以下、上記一般式(I)で表される化合物の薬理作用を、上記式(II)で表される化合物を例に挙げて説明する。

[0035] === 上記式(II)で表される化合物の薬理作用 ===

<細胞接着阻害作用>

血管内皮は腫瘍転移や動脈硬化症、糖尿病など様々な疾病の発症・悪化において重要な役割を担っている組織である。これらの疾病に共通して見られる現象に血中の細胞と血管内皮細胞の相互作用がある(Science, 272, 689-693, 1996)。特に血中を流れる腫瘍細胞の血管内皮細胞への接着は腫瘍の転移につながり、単球の接着は動脈硬化症の一つである粥状硬化症(アテローム硬化症)の発症につながることが知られている(Invasion Metastasis, 14, 109-122, 1994-1995、Nature, 362, 801-809, 1993)。これらの細胞同士の接着はいずれも炎症性サイトカイン等の刺激因子が仲介する血管内皮細胞の炎症反応が原因となっていることが報告されている

(Cell Adhesion and Communication, 2, 261-268, 1994)。したがって、血管内皮細胞の炎症を抑え、血管内皮細胞と他の細胞(白血球や腫瘍細胞など)との接着を阻害することで、腫瘍転移や動脈硬化症の改善(予防や治療を含む)が期待できる。

[0036] そこで、本発明者らは、腫瘍転移や動脈硬化症の予防・治療薬として、その発症・悪化の一つの段階である血中の細胞と血管内皮細胞間の細胞接着に着目し、その接着阻害物質を探索するため、LPS刺激により活性化させた血管内皮細胞への白血球の接着を測定する実験系を用いて接着阻害物質を探索するスクリーニング系を構築し、新規接着阻害物質を天然資源より探索した。その結果、本発明者らは、パエニバチルス属(Paenibacillus sp.)に属すると思われるBML771-113F9株(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 P-19367として平成15年5月21日に寄託されている。)の培養液中に、LPSで刺激した血管内皮細胞と白血球の接着を阻害する物質が産生されることを見出した。この接着阻害物質の分子構造を解析し、上記式(II)で表される新規化合物、ヘプタデプシンを同定した。

[0037] このようにして得られたヘプタデプシンは、実施例2に記載のようにLPSやLipid Aの刺激により活性化した血管内皮細胞と腫瘍細胞との接着を特異的に阻害することから、LPSやLipid Aの刺激により活性化した血管内皮細胞の細胞接着阻害剤として有用であることがわかる。

[0038] また、ヘプタデプシンは、実施例3及び4に記載のようにLPSやLipid Aの刺激により活性化した血管内皮細胞と腫瘍細胞との接着を阻害する濃度では、血管内皮細胞に対して毒性や増殖抑制作用を示さないことから、ヘプタデプシンは毒性が弱く、LPSやLipid Aによる血管内皮細胞の活性化に起因する疾患(腫瘍転移や動脈硬化など)に対する薬剤としての有用性が期待できる。

[0039] さらに、ヘプタデプシンは、実施例5に記載のようにグラム陽性菌に対して抗菌活性を有するため、グラム陽性菌に対する増殖抑制剤や抗菌剤として有用であり、グラム陽性菌の感染または増殖に起因する疾患を改善できる。グラム陽性菌の感染または増殖に起因する疾患としては、例えば、感染症、中毒症、歯周病、炎症性腸疾患、血管炎、IV型アレルギー性疾患、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群、MRSA感染症、リッター病、新生児における水疱性インペチゴ、腫瘍、肺炎、関節炎、髄膜炎、各種化

膿性疾患、腸炎、髄膜炎、菌血症、眼感染、食中毒、呼吸器感染症、中耳炎、副鼻腔炎、咽頭炎、猩紅熱、急性糸状体腎炎、リウマチ熱、膿痂疹、激症型感染、齲齒、尿路感染症、創感染、胆道感染症、細菌感染によるアトピー性疾患（アトピー性皮膚炎など）の重症化などを挙げることができる。

[0040] また、ヘプタデプシンは、実施例5に記載のようにLipid Aと直接結合することから、Lipid A、Lipid Aを活性部分として有するLPS、又はLPSを構成成分とする菌に対する吸着剤として利用することができる。従って、ヘプタデプシンを例えば、フィルター、膜、ビーズ、プラスチック、磁性物質、繊維、中空糸、金属、セラミック、ガラス等の担体に担持させてなる担持体又はそれを充填したカラムもしくは装置は、液体（例えば、水、血液、血漿、血清、医薬品など）に含まれるLipid A、LPS、又はLPSを構成成分とする菌の除去材として有用であり、例えば、液体に含まれるLipid A、LPS、又はLPSを構成成分とする菌を結合させて除去し、液体の浄化を行うことができるようになる。

[0041] また、上記除去材を用いることにより、血液におけるLipid A、LPS、又はLPSを構成成分とする菌を体外に除去することも可能になり、感染症（例えば、敗血症や合併症など）の予防や治療を行うこともできる。

[0042] === 上記式(II)で表される化合物の製造 ===

ヘプタデプシンは、上述の方法により製造することもできるが、BML771-113F9株を培養し、その培養液中から以下の物理化学的性質を有する物質を単離することにより得ることもできる。

[0043] <ヘプタデプシンの物理化学的性質>

(1)性状：白色粉末

(2)分子式： $C_{45}H_{81}N_{11}O_{12}$

(3)高分解能FAB-MSスペクトル(m/z)：968.6133 (M+H)⁺

(4)融点：223～225℃(分解)

(5)比旋光度： $[\alpha]_D^{24} +35.7^\circ$ (c 0.27, DMSO(ジメチルスルフォキシド))

(6)溶解度：メタノール、エタノール、n-ブタノール、ジメチルスルフォキシド、水に可溶、クロロホルム、酢酸エチル、アセトン、n-ヘキサン、アセトニトリル、トルエンに不溶である。

(7) TLCのR_f値:

(i) 0.39〔シリカゲル薄層上で展開溶媒としてブタノール-メタノール-水(4:1:2)を用いて測定した場合〕

(ii) 0.36〔シリカゲル薄層上で展開溶媒としてブタノール-酢酸-水(4:1:1)を用いて測定した場合〕

(8) 紫外線吸収スペクトルにより測定した結果を図1に示す。

(9) 赤外線吸収スペクトル(臭化カリウム錠)により測定した結果を図2に示す。

(10) プロトン核磁気共鳴スペクトル(重ジメチルスルフォキシド中、500 MHz)により測定した結果を図3及び表1に示す。

(11) 炭素13核磁気共鳴スペクトル(重ジメチルスルフォキシド中、125 MHz)により測定した結果を図4及び表1に示す。

[表1]

	¹³ C	¹ H	
AlaCO	171.5		
2	47.3	4.11	
3	16.8	0.91	
NH		7.26	
AsnCO	170.3		
2	48.8	4.57	
3	34.6	2.29	2.65
CO	171.5*		
CONH ₂		6.82	7.32
NH		8.21	
SerCO	171.6		
2	56.2	4.07	
3	60.7	3.51	3.57
OH		5.49	
NH		8.69	
AlaCO	172.3		
2	48.0	4.55	
3	19.9	1.18	
NH		8.21	
IleCO	169.7		
2	55.4	4.38	
3	38.0	1.65	
3-CH ₃	15.5	0.79	
4	24.1	1.04	1.36
5	11.1	0.76	
NH		7.24	
ValCO	169.9		
2	56.4	4.49	
3	31.6	1.83	
4	17.5	0.71	
4'	19.1	0.79	
NH		7.13	
SerCO	168.1		
2	53.1	4.42	
3	64.3	3.79	4.67
NH		8.48	
GHHDCO	171.4		
2	43.3	2.31	2.38
3	67.4	3.81	
3-OH		4.72	
4	36.7	1.39	1.39
5	25.3	1.36	1.36
6-14 (CH ₂) ₉	28.6, 29.0, 29.1	1.22	
15	26.0	1.26	
16	28.4	1.43	
17	40.7	3.05	
17NH		7.58	
C=NH(NH)(NH ₂)	157.1		

* : テトラメチルシラン (0 ppm)を内部標準として測定した。

GHHHD : 17-グアニジノ-3-ヒドロキシヘプタデカン酸

実施例

[0044] 以下、本発明の実施例について詳細に述べる。

[0045] <実施例1>ヘプタデプシンの製造

2.5%のラクトース(関東化学株式会社, Tokyo, Japan)、7.5%のポリペプトン(和光純薬株式会社, Tokyo, Japan)、0.5%の肉エキス(極東製薬工業株式会社, Tokyo,

Japan)、0.5%の酵母エキス(和光純薬株式会社)、0.2%の塩化ナトリウム(関東化学株式会社)、0.05%の硫酸マグネシウム7水和物(関東化学株式会社)、0.05%のリン酸水素二カリウム(関東化学株式会社)、及び0.2%の炭酸カルシウム(関東化学株式会社)を含む斜面培地(pH 7.4に調整)にパエニバチルス属のBML771-113F9株を植菌し、好氣的に27°Cで96時間振盪培養した(毎分180回転)。その後、菌体を除かずに培養液を等量のクロロホルム(関東化学株式会社)で洗浄し、水層を等量のn-ブタノール(関東化学株式会社)で3回抽出し、各回で得られた有機層(n-ブタノール抽出液)を混合し減圧濃縮して、4.67gのオイル状物質を得た。

[0046] この物質を少量のn-ブタノールに溶解し、あらかじめn-ブタノールで平衡化させた200gのシリカゲル60(Merck, Darmstadt, Germany)のカラムにかけて吸着させ、1Lの溶出液(n-ブタノール:メタノール:水=7:1:1)で溶出し、6mlずつの画分を回収した。各画分に対し、接着阻害活性の有無を調べ、細胞接着阻害活性の見られた画分を回収し、減圧乾固して212 mgの固体を得た。この固体を少量のメタノールに溶解し、ゲル濾過カラム(Shephadex LH-20)にかけて吸着させ、200mlのメタノールで溶出し、再び活性画分を回収し、減圧乾固するという操作を2回行い、最終的に13.1mgの白色粉末(ヘプタデプシン)を得た。

[0047] <実施例2>

本実施例においては、LPS、Lipid A、TNF- α 、又はIL-1 β により刺激した血管内皮細胞と腫瘍細胞との接着に対するヘプタデプシンの効果を調べた。

[0048] (1)細胞培養

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC; Cell systems, Lake Kirland, WA)は、I型コラーゲン(株式会社高研, Tokyo, Japan)でコートしたプラスチックフラスコ(Costar, New York, USA)を使用し、非働化した10% 子牛胎児血清(FBS; JRH BIOSCIENCES, Lenexa, KS)、10 μ g/ml bFGF(Pepro Tech EC LTD, London, UK)を含むMCDB-131培地(Sigma, St. Louis, MO)を用いて、37°C、5% CO₂のインキュベーター中で培養した。ヒト急性前骨髄球性白血病細胞株HL-60細胞(Japanese Collection of Research Bioresources)は、非働化した10% FBSを含むRPMI1640培地(日本製薬株式会社, Tokyo, Japan)を用いて、37°C、5% CO₂のインキュベーター中で培養した

。

[0049] (2)細胞接着実験

HUVECを48ウェルプレート(Costar)に 4.0×10^4 細胞/ウェル(500 μ l/ウェル)でまき、37°C、5% CO₂の条件で一晩培養した。翌日、培地中に最終濃度0.3、1、3、10 μ g/mlのヘプタデプシンで処理し、37°C、5% CO₂で2時間インキュベートした。その後、最終濃度1 μ g/ml又は10ng/mlになるように、LPS(Sigma)、Lipid A(Sigma)、TNF- α (Genzyme-Techne, Cambridge, MA)、又はIL-1 β (Pepro Tech EC LTD)を添加し、37°C、5% CO₂の条件でさらに4時間インキュベートした(コントロールとして、これらの刺激因子を添加しないウェルも用意した)。その後、各ウェルを37°Cに温めたPBS(リン酸緩衝生理食塩水)で2回洗い、新しい培地(200 μ l/ウェル)を加えた。続いて、各ウェルにHL-60細胞を 6.0×10^4 cells/ウェル(20 μ l/ウェル)の濃度で加え、37°C、5% CO₂で1時間インキュベートした。次に、37°Cに温めたPBSで各ウェルを3回洗い、未接着のHL-60細胞を除去し、新しい培地(200 μ l/well)を加えた。その後、HUVECに接着したHL-60細胞を顕微鏡で確認し、顕微鏡視野内の接着細胞数を測定することで細胞接着能を評価した。

[0050] 図5に示すように、ヘプタデプシンをLPSに先だって培地に加えると、LPSで刺激したHUVECとHL-60細胞との接着を3 μ g/ml以上の濃度で顕著に阻害した。従って、ヘプタデプシンはLPSで刺激したHUVECの活性化による細胞接着を生じさせないように働くことが明らかになった。また、ヘプタデプシンはLipid Aで刺激したHUVECとHL-60細胞との接着もLPSの場合と同様に阻害した。従って、ヘプタデプシンはLipid Aに対しても同様の効果を有することが明らかになった。しかしながら、炎症性サイトカインであるTNF- α やIL-1 β で刺激したHUVECとHL-60細胞との接着に対して阻害作用は示さなかった。これらのことから、ヘプタデプシンはLPS刺激による血管内皮細胞の活性化を選択的に阻害し、LPS及びLipid Aによって活性化された血管内皮細胞の細胞接着を特異的に阻害することが示唆された。

[0051] <実施例3>

次に、実施例2の結果がヘプタデプシンの細胞毒性によらないことを確認するために、ヘプタデプシン自体がHUVECに対して致死的作用を示すかどうかを調べた。

[0052] HUVECを24ウェルプレート(Costar)に 1.6×10^5 細胞/ウェル($500 \mu\text{l}$ /ウェル)でまき、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で一晩培養した。翌日、最終濃度 0.3 、 1 、 3 、 $10 \mu\text{g/ml}$ のヘプタデプシンで処理し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ でインキュベートし、24時間目と48時間目にトリパンプルー細胞外排出試験を行った。細胞培養液をエッペンドルフチューブに移し、その後、各ウェルを $200 \mu\text{l}$ のPBS(リン酸緩衝生理食塩水)で2回洗い、洗ったPBSをエッペンドルフチューブに移した。続いて各ウェルにトリプシン-EDTA溶液 $200 \mu\text{l}$ を加えて 37°C でインキュベートし、細胞をはがし、はがれた細胞ごとトリプシン-EDTA溶液をエッペンドルフチューブに移した。次に、遠心分離($4200\text{rpm} \times 5$ 分間)して上清を取り除き、新しい培養液を加えた。その後、5倍濃縮のトリパンプルー染色液(4mg/ml トリパンプルー(Sigma)、 9mg/ml 塩化ナトリウム)を加えて攪拌し、これを血球計算板(エルマ販売株式会社, Tokyo, Japan)に乗せ、顕微鏡視野内の全細胞数及び細胞内が青く染色した死細胞の数を測定し、細胞生存率を求め、細胞毒性の有無を調べた。結果は示さないが、ヘプタデプシンの濃度が少なくとも $30 \mu\text{g/ml}$ まで細胞生存率には変化がなく、図5におけるヘプタデプシンの細胞接着阻害効果がHUVECに対する細胞毒性によるものではないことが明らかとなった。

[0053] <実施例4>

さらに、実施例2の結果がヘプタデプシンのHUVECに対する細胞増殖抑制作用によるものかどうかを調べた。

[0054] HUVECを96ウェルプレート(Costar)に 2.0×10^3 細胞/ウェル($200 \mu\text{l}$ /ウェル)でまき、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件で一晩培養した。翌日、最終濃度 0.3 、 1 、 3 、 $10 \mu\text{g/ml}$ のヘプタデプシンを添加して 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ でインキュベートし、48時間目と72時間目に以下のようにMTTアッセイを行った。まず各ウェルに 5mg/ml MTT(Sigma)水溶液を $20 \mu\text{l}$ 加え、 37°C のインキュベーター中で4時間静置した。その後、各ウェルから培地を除去し、ジメチルスルフォキシド(関東化学株式会社)を $100 \mu\text{l}$ ずつ加えてホルマザン沈殿を溶解させた。その後、マイクロプレートリーダー(MPR-A4i; 東ソー株式会社, Tokyo, Japan)で波長 570nm におけるOD値を測定し、細胞数の割合を求めた。結果は示さないが、ヘプタデプシンの濃度が少なくとも $30 \mu\text{g/ml}$ までHUVECの細胞数は減少せず、図5におけるヘプタデプシンの細胞接着阻害効果がHUVECによる増殖

抑制作用によるものではないことが明らかとなった。

[0055] <実施例5>

実施例2の結果から、ヘプタデプシンはLPS刺激によるHUVECの活性化を選択的に阻害し、LPS及びLipid Aによって活性化されたHUVECの細胞接着を特異的に阻害することが示唆された。そこで、LPSの活性部分であるLipid Aとヘプタデプシンが直接結合するかどうかを調べた。

[0056] ヘプタデプシンとLipid Aの分子間相互作用は、BIAcoreX (BIAcore AB, Uppsala, Sweden)を用いた表面プラズモン共鳴センサーによる経時的解析により確認した。なお、Lipid AのHPA センサーチップ (BIAcore AB) への固定は、文献 (Biochimica et Biophysica Acta, 1611巻, 234-242頁, 2003年)の記載に基づいて以下のように行った。

[0057] HPAセンサーチップをBIAcore X に挿入し、センサーチップ表面にTBS (Tris緩衝液)を流した。続いて、40 mMの濃度のn-octyl- β -D-glucoside (Sigma)をセンサーチップ表面の測定用セルに5 μ l/minの流速で5分間流して洗浄した。次に、0.5 mg/mlの濃度のLipid Aをセンサーチップ表面の測定用セルに1 μ l/minの流速で30分以上流して固定した。固定後、2 mMの濃度のNaOHを20 μ l/minの流速で1分間ずつ数回流して、センサーチップ表面に過剰に結合したLipid Aを除去した。

[0058] また、センサーチップ表面の対照用セルには、Lipid Aの代わりにDMPC (dimyristoylphosphatidylcholine; Sigma)を用いて、上記と同様に固定したものをを用いた。

[0059] TBSに溶解したヘプタデプシン (最終濃度で1, 3, 4, 5 μ g/ml)を20 μ l/minの流速で2分間添加し、その前後のレゾナンスシグナルの変化を測定し、ヘプタデプシンとセンサーチップ表面に固定したLipid Aとの結合の解析を行った。なお、測定は25 $^{\circ}$ Cの条件下で行った。

[0060] 図6に示すように、ヘプタデプシンの添加直後よりレゾナンスシグナルの上昇が観察された。このレゾナンスシグナルの上昇はヘプタデプシンの濃度の上昇に伴い増大しており、5 μ g/mlのヘプタデプシンを流した時に最大で約200 RUの上昇が観察された。この結果から、ヘプタデプシンはその濃度依存的にセンサーチップ表面に固

定したLipid Aと結合することが明らかになった。また、ヘプタデプシンの添加を止めることにより、時間依存的なレゾナンスシグナルの減少が見られた。この結果から、ヘプタデプシンとLipid Aの結合が可逆的であることが明らかになった。得られた結果を定量的に解析したところ、ヘプタデプシンとLipid Aとの結合の速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d)、及び解離定数(K_D)は、それぞれ $k_a = 10.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_d = 2.04 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $K_D = 1.97 \times 10^{-4} \text{ M}$ であることがわかった。以上のことから、ヘプタデプシンがLPSと結合して、LPSによるHUVECの活性化を阻害することが示唆された。

[0061] <実施例6>

本実施例では、ヘプタデプシンのグラム陽性菌及びグラム陰性菌に対する抗菌効果を調べた。すなわち、表2及び表3に示す各細菌の増殖に対するヘプタデプシンの影響を寒天希釈画線法 (agar dilution streak method; 2-fold dilution) により調べた。各種濃度 (最終濃度 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 5.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) でヘプタデプシンを添加したMueller-Hinton agar (Difco) 又は5% 羊血液添加 Mueller-Hinton agarに、表2又は表3に示される試験菌を画線後、37°Cで18時間培養した。培養後、試験菌が生育しないヘプタデプシンの最低濃度を最低発育阻止濃度 (MIC値) とした。

[0062] その結果を表2及び表3に示す。なお、マイコバクテリウム・スメグマチスATCC607 (Mycobacterium smegmatis ATCC607) の培養は37°Cで42時間行った。

[表2]

種別	試験菌	最低発育阻止濃度 (μ g/ml)
グラム陽性菌	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TY-5708	3.13
	TY-5745	3.13
	TY-5840	1.56
	<i>Streptococcus pyogenes</i> TY-5727	6.25
	TY-5740	12.5
	TY-5914	6.25
	MH624	6.25
	MH630	6.25
	MH742	6.25
	MH750	6.25
	MH635	6.25
	MH759	3.13
	<i>Streptococcus hemolyticus</i> group A St-92TC	6.25
	St-107TC	6.25
	St-108TC	6.25
	St-56-188SM	6.25
	<i>Streptococcus mutans</i> E49	6.25
	<i>Enterococcus faecalis</i> 37787	6.25
	JCM5803	6.25
	<i>Enterococcus faecium</i> JCM5804	6.25
	<i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 12201 VCM R	6.25
	<i>Enterococcus faecium</i> NCTC 12202 VCM R	6.25
	<i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 12203 VCM R	6.25
	<i>Enterococcus faecium</i> NCTC 12204 VCM R	6.25
	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P	6.25
	<i>S. aureus</i> Smith	6.25

培地：ミューラーヒントニアガー（5%羊血液添加）

[表3]

種別	試験菌	最低発育阻止濃度 (μ g/ml)
グラム陽性菌	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P	0.78
	<i>S. aureus</i> Smith	1.56
	<i>S. aureus</i> MS9610	1.56
	<i>S. aureus</i> MRSA No. 5	1.56
	<i>S. aureus</i> MRSA No. 17	3.13
	<i>S. aureus</i> MS16526 (MRSA)	3.13
	<i>S. aureus</i> TY-04282 (MRSA)	3.13
	<i>Micrococcus luteus</i> FDA16	1.56
	<i>M. luteus</i> IFO3333	1.56
	<i>M. luteus</i> PCI1001	1.56
	<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-558	6.25
	<i>B. subtilis</i> PCI219	3.13
	<i>B. cereus</i> ATCC10702	3.13
	<i>Corynebacterium bovis</i> 1810	1.56
グラム陰性菌	<i>Escherichia coli</i> NIHJ	>100
	<i>E. coli</i> K-12	>100
	<i>E. coli</i> K-12 ML1629	>100
	<i>E. coli</i> BEM11	>100
	<i>E. coli</i> BE1121	25
	<i>E. coli</i> BE1186	>100
	<i>Shigella dysenteriae</i> JS11910	50
	<i>Sh. flexneri</i> 4b JS11811	100
	<i>Sh. sonnei</i> JS11746	>100
	<i>Providencia rettgeri</i> GN311	>100
	<i>Serratia marcescens</i>	>100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A3	>100

[0063] 表2及び3に示すように、ヘプタデブシンはスタフィロкокカス・アウレウス等のグラム陽性菌に対してそれぞれ0.78〜6.25 μ g/mlの最低発育阻止濃度で抗菌活性を示した。しかしながら、大腸菌などのグラム陰性菌に対しては抗菌活性を示さなかった。このようなヘプタデブシンのグラム陽性菌に対する抗菌作用は、グラム陽性菌特異的な糖脂質(例えば、リポテイコ酸(lipoteichoic acid:LTA)など)のような表面抗原に因るものと考えられる。

産業上の利用の可能性

[0064] 本発明によれば、血管内皮細胞の活性化に起因する疾患や、細菌の感染または増殖に起因する疾患の予防・治療に有用な化合物を提供することができる。

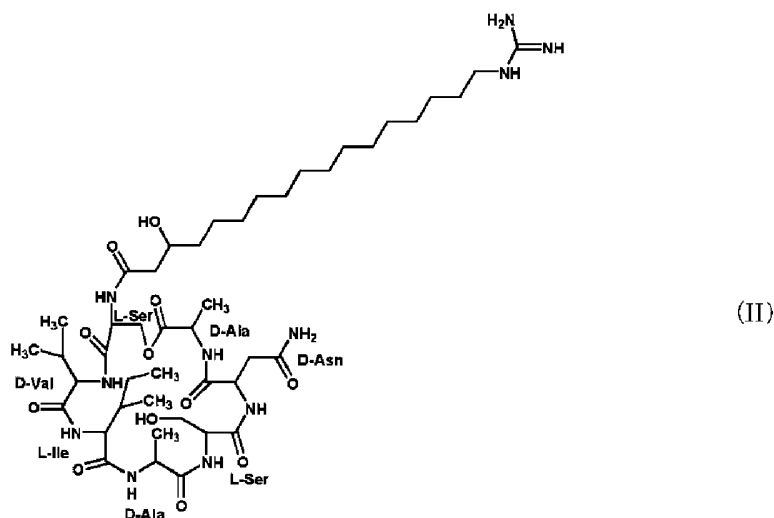
請求の範囲

- [1] 下記的一般式(I)で表される化合物。

$$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{R}_3 \quad \text{R}_1 \\ \parallel \quad | \quad | \\ \text{R}_5-\text{C}-\text{C}-\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{N}-\text{C} \begin{array}{l} \text{NH}_2 \\ \text{NH} \end{array} \\ | \quad | \\ \text{R}_4 \quad \text{R}_2 \end{array} \quad \text{(I)}$$

(式中、 R_1 — R_4 は全てが水素原子、または、 R_1 — R_4 のいずれか1つがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10—20の整数である。)

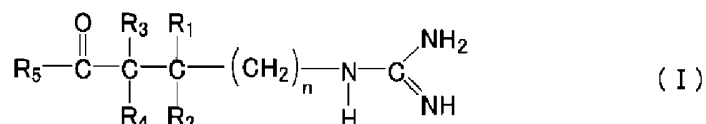
- [4] 前記化合物が下式(II)で表される化合物であることを特徴とする請求の範囲3に記載の医薬組成物。



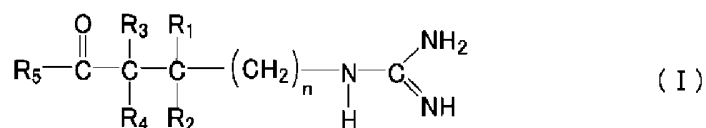
- [5] リポ多糖またはリポDによる血管内皮細胞の活性化に起因する疾患を改善することを特徴とする請求の範囲3または4に記載の医薬組成物。
- [6] 前記血管内皮細胞の細胞接着を阻害することにより前記疾患を改善することを特徴とする請求の範囲5に記載の医薬組成物。
- [7] 前記疾患が、動脈硬化または腫瘍転移であることを特徴とする請求の範囲5または6に記載の医薬組成物。
- [8] グラム陽性菌の感染または増殖に起因する疾患を改善することを特徴とする請求の範囲3または4に記載の医薬組成物。
- [9] 前記疾患が、感染症、中毒症、歯周病、炎症性腸疾患、血管炎、IV型アレルギー性疾患、ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群、MRSA感染症、リッター病、新生児における水疱性インペチゴ、腫瘍、肺炎、関節炎、髄膜炎、各種化膿性疾患、腸炎、髄膜炎、菌血症、眼感染、食中毒、呼吸器感染症、中耳炎、副鼻腔炎、咽頭炎、猩紅熱、急性糸状体腎炎、リウマチ熱、膿痂疹、激症型感染、齲齒、尿路感染症、創感染、胆

道感染症、及び細菌感染によるアトピー性疾患の重症化から選ばれる疾患であることを特徴とする請求の範囲8に記載の医薬組成物。

- [10] 一般式(I)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する、グラム陽性菌に対する抗菌剤。

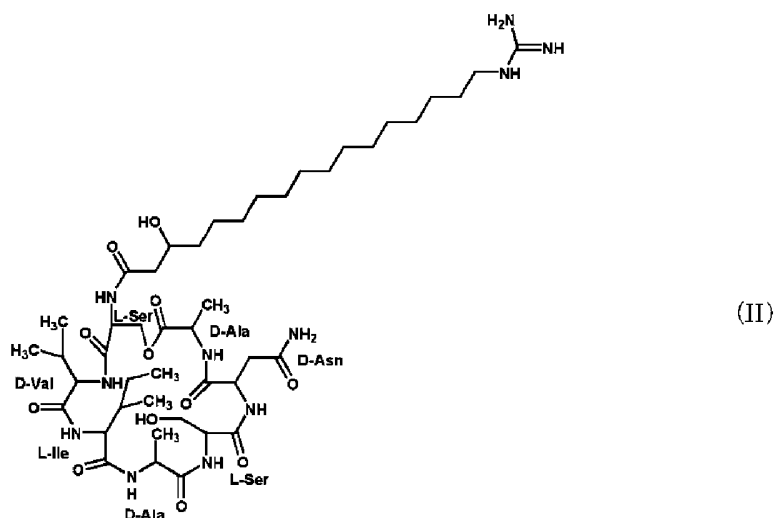


ための細胞接着阻害剤。

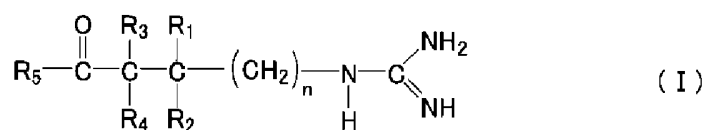


(式中、 $\text{R}_1 \sim \text{R}_4$ は全てが水素原子、または、 $\text{R}_1 \sim \text{R}_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10～20の整数である。)

- [14] 前記化合物が下式(II)で表される化合物であることを特徴とする請求の範囲13に記載の、リポ多糖またはリポドAによる活性化血管内皮細胞の細胞接着を阻害するための細胞接着阻害剤。

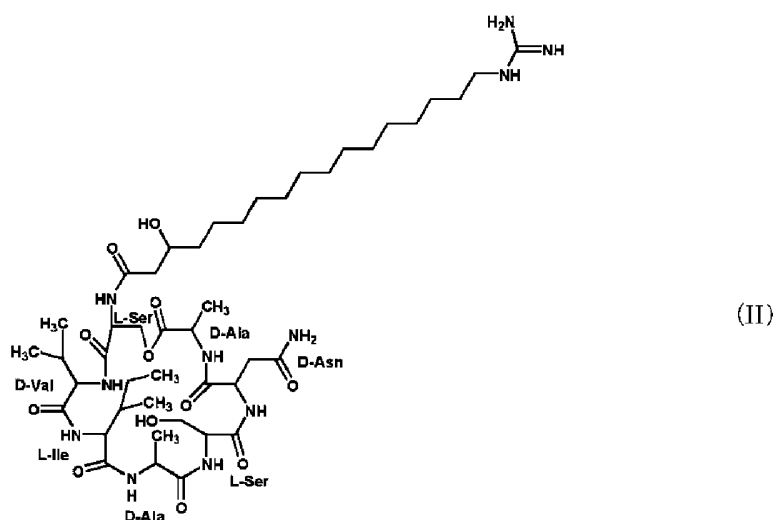


- [15] 一般式(I)で表される化合物またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する、グラム陽性菌に対する増殖抑制剤。

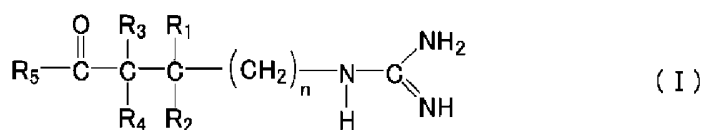


(式中、 $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子、または、 $R_1 \sim R_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10～20の整数である。)

- [16] 前記化合物が下式(II)で表される化合物であることを特徴とする請求の範囲15に記載の、グラム陽性菌に対する増殖抑制剤。

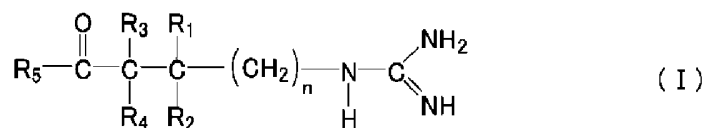


- [17] 一般式(I)で表される化合物またはその塩を有効成分として含有するリポドA吸着剤。



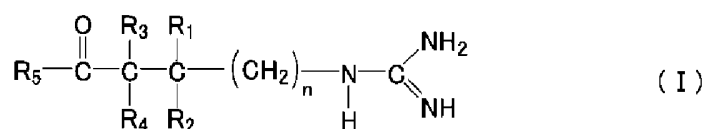
(式中、 $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子、または、 $R_1 \sim R_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10～20の整数である。)

- [18] 一般式(I)で表される化合物またはその塩を有効成分として含有するLPS吸着剤。



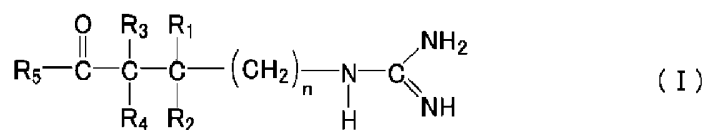
(式中、 $\text{R}_1 \sim \text{R}_4$ は全てが水素原子、または、 $\text{R}_1 \sim \text{R}_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10～20の整数である。)

- [19] 一般式(I)で表される化合物またはその塩を有効成分として含有するLPSを構成成分とする菌の吸着剤。



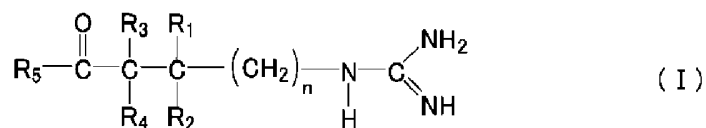
(式中、 $\text{R}_1 \sim \text{R}_4$ は全てが水素原子、または、 $\text{R}_1 \sim \text{R}_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10～20の整数である。)

- [20] 一般式(I)で表される化合物またはその塩を含んでなるリピドA除去材。



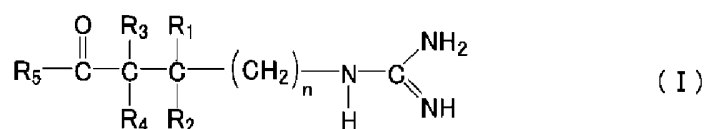
(式中、 $\text{R}_1 \sim \text{R}_4$ は全てが水素原子、または、 $\text{R}_1 \sim \text{R}_4$ のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10～20の整数である。)

- [21] 一般式(I)で表される化合物またはその塩を含んでなるLPS除去材。



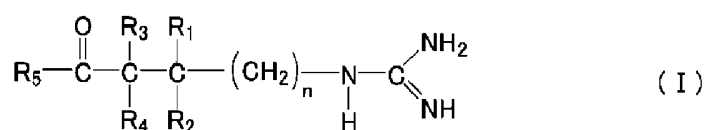
(式中、 $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子、または、 $R_1 \sim R_4$ のいずれかがヒドロキシル基であ
って残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10～20
の整数である。)

- [22] 一般式(I)で表される化合物またはその塩を含んでなるLPSを構成成分とする菌の除去材。



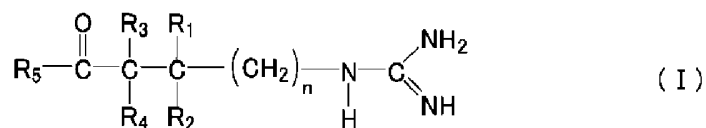
(式中、 R_1-R_4 は全てが水素原子、または、 R_1-R_4 のいずれかがヒドロキシル基であ
って残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10〜20
の整数である。)

- [23] 一般式(I)で表される化合物またはその塩を担持させてなる担持体。



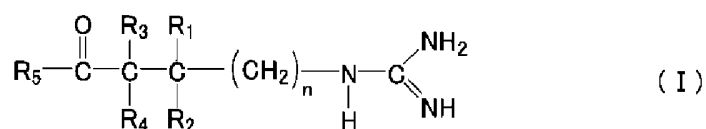
(式中、 $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子、または、 $R_1 \sim R_4$ のいずれかがヒドロキシル基であ
って残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10～20
の整数である。)

- [24] 一般式(I)で表される化合物またはその塩に結合させて除去することを特徴とするリピドAの除去方法。



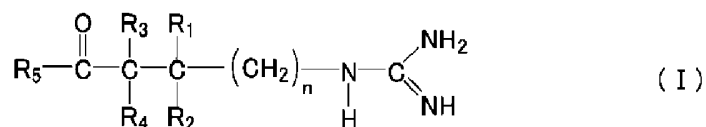
(式中、 $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子、または、 $R_1 \sim R_4$ のいずれかがヒドロキシル基であ
って残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10～20
の整数である。)

- [25] 一般式(I)で表される化合物またはその塩に結合させて除去することを特徴とするLPSの除去方法。



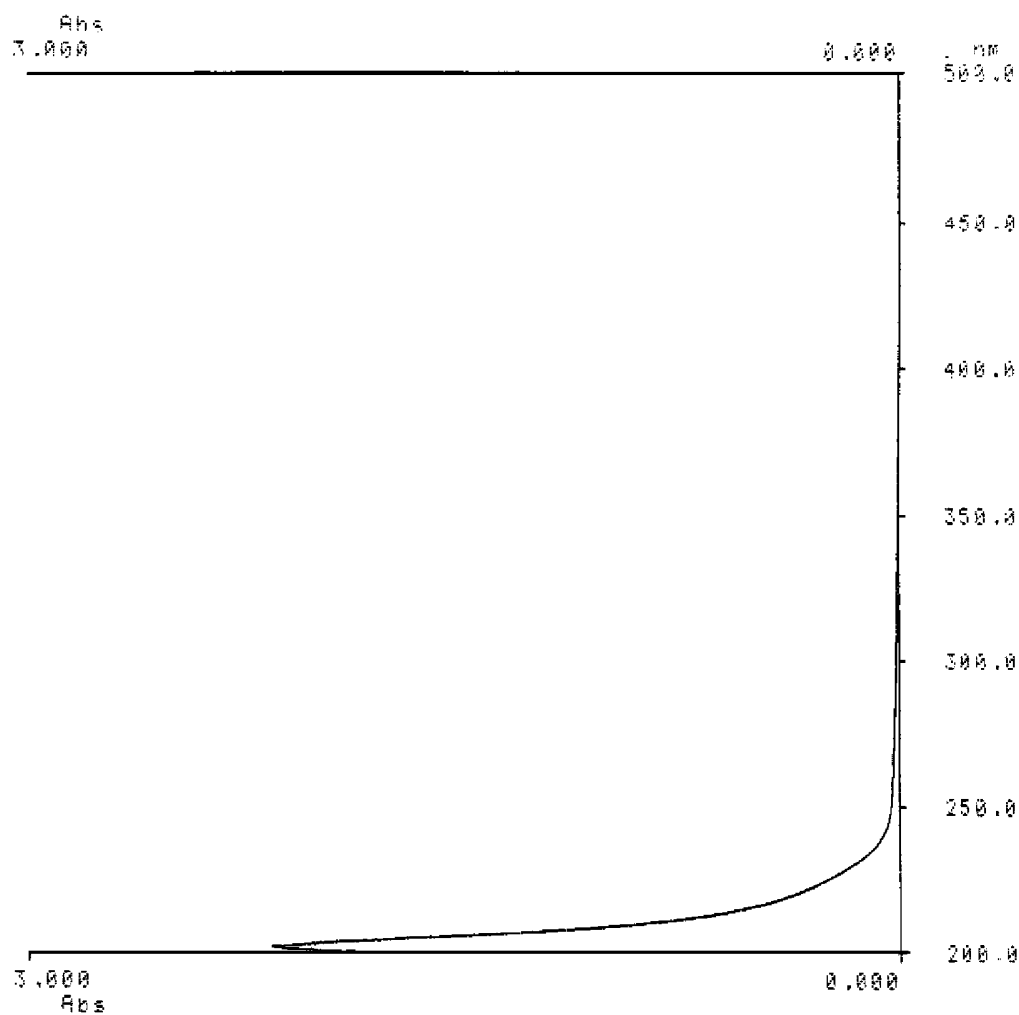
(式中、 R_1-R_4 は全てが水素原子、または、 R_1-R_4 のいずれかがヒドロキシル基であって残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10〜20の整数である。)

- [26] 一般式(I)で表される化合物またはその塩に結合させて除去することを特徴とするLPSを構成成分とする菌の除去方法。



(式中、 $R_1 \sim R_4$ は全てが水素原子、または、 $R_1 \sim R_4$ のいずれかがヒドロキシル基であ
って残りが水素原子であり、 R_5 は直鎖状または環状のペプチドである。 n は10～20
の整数である。)

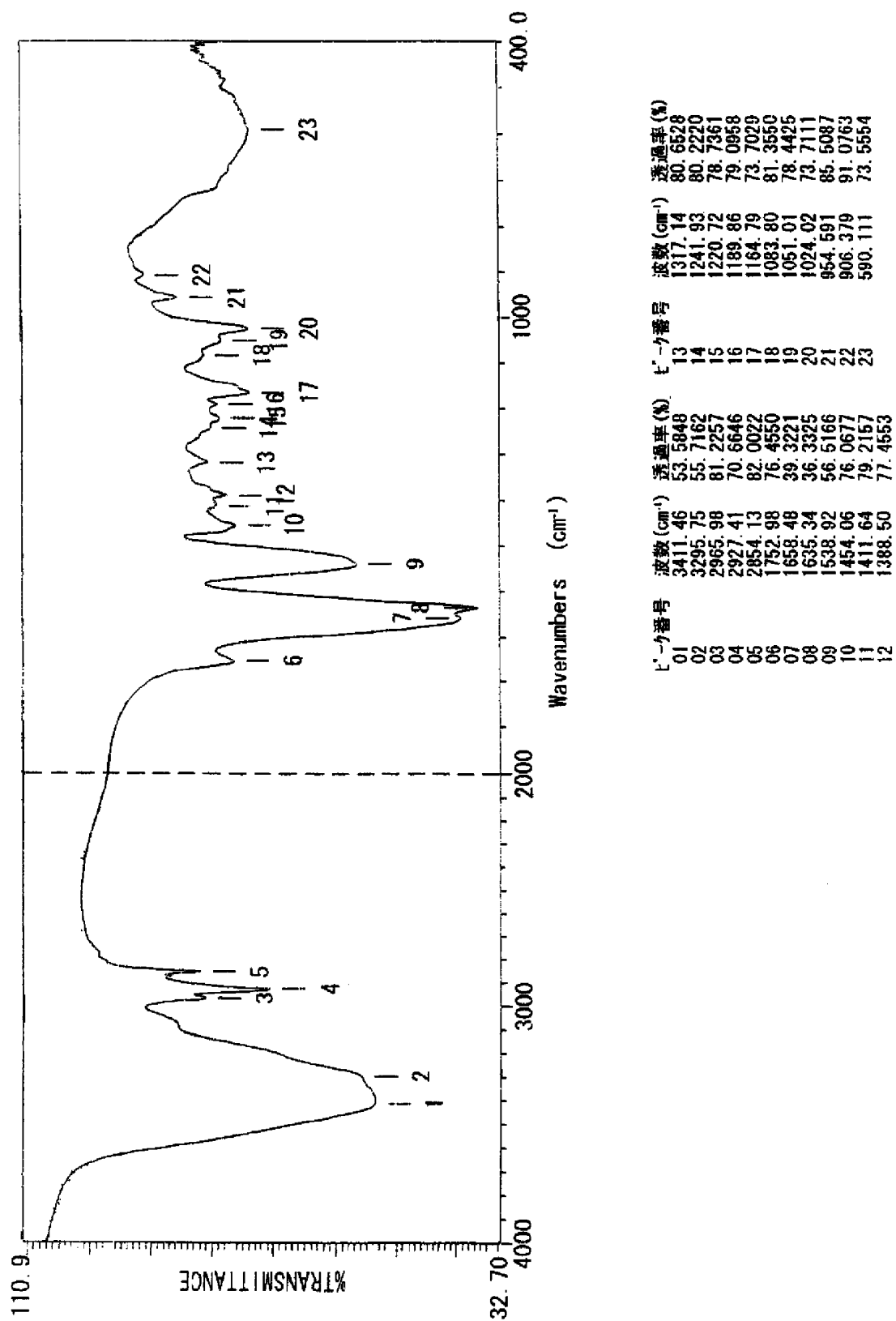
[X1]



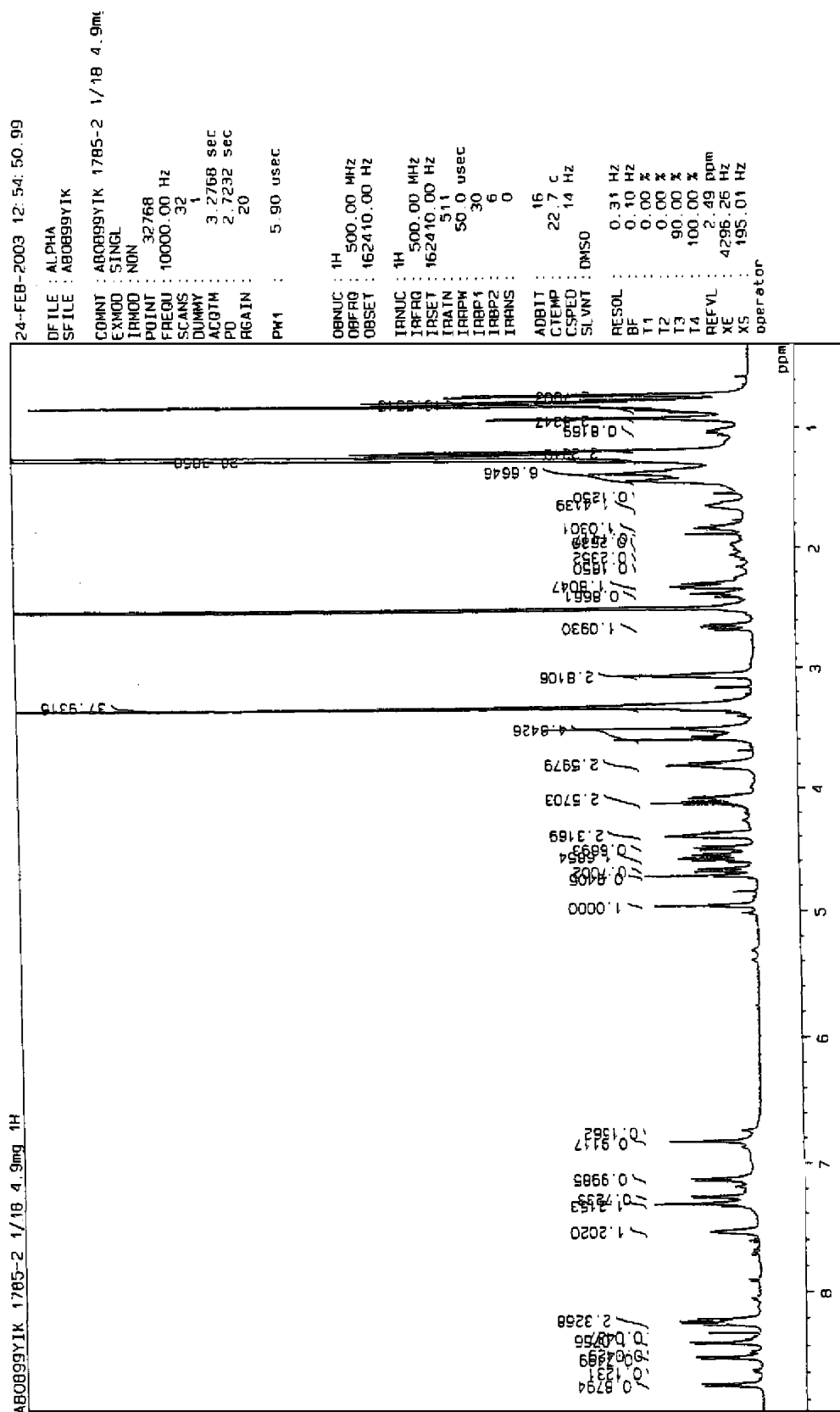
TITLE: HEPTADEPSIN-100 $\mu\text{g/ml}$ MeOH 1:50 PM 6/25/ 3
SCAN SPEED: 120.0 nm/min RESPONSE: MEDIUM
BANDPASS: 2.00nm

NO.	PEAK	VALLEY
1	202.0 nm	2.1723 Abs

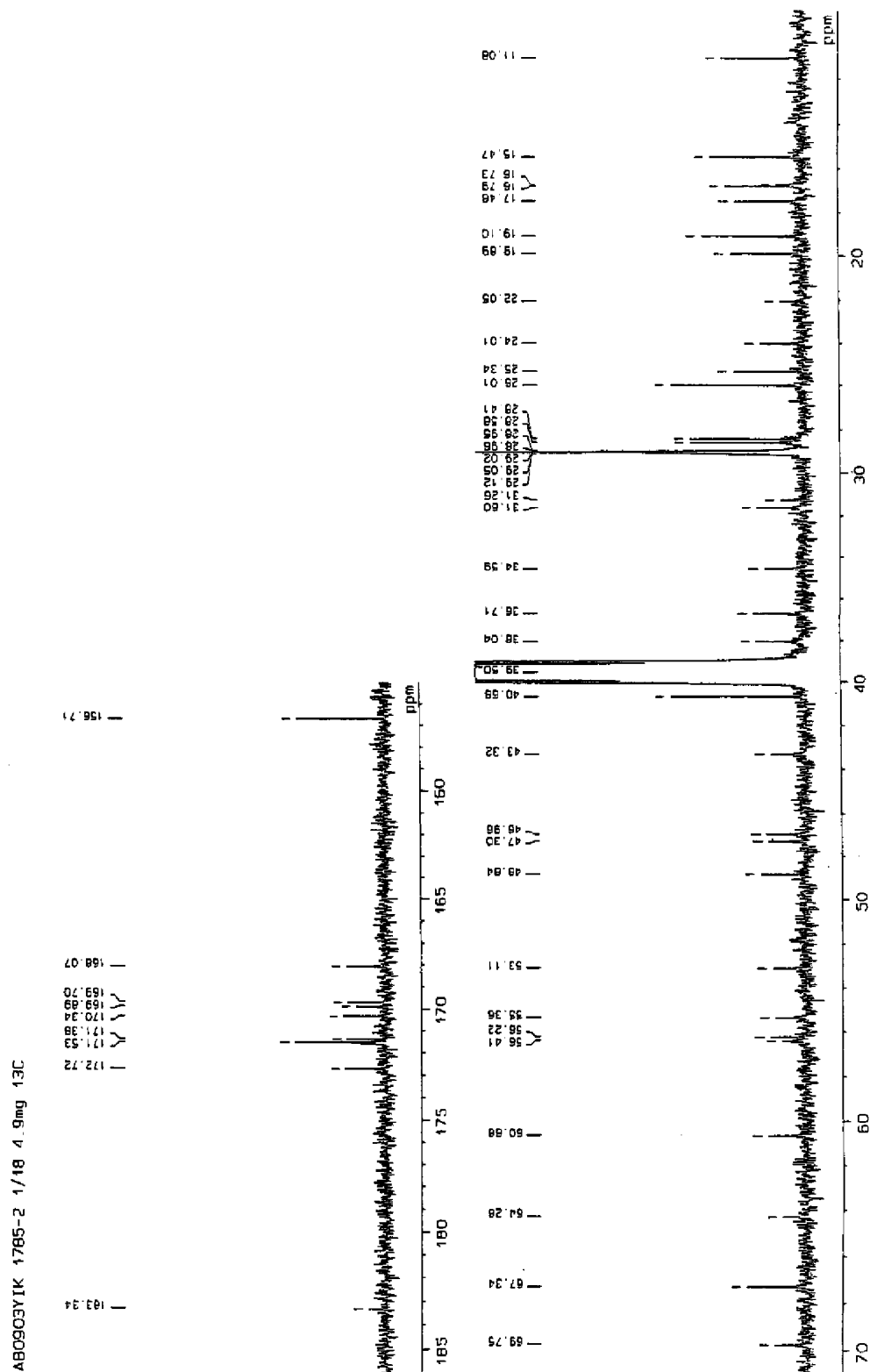
[図2]



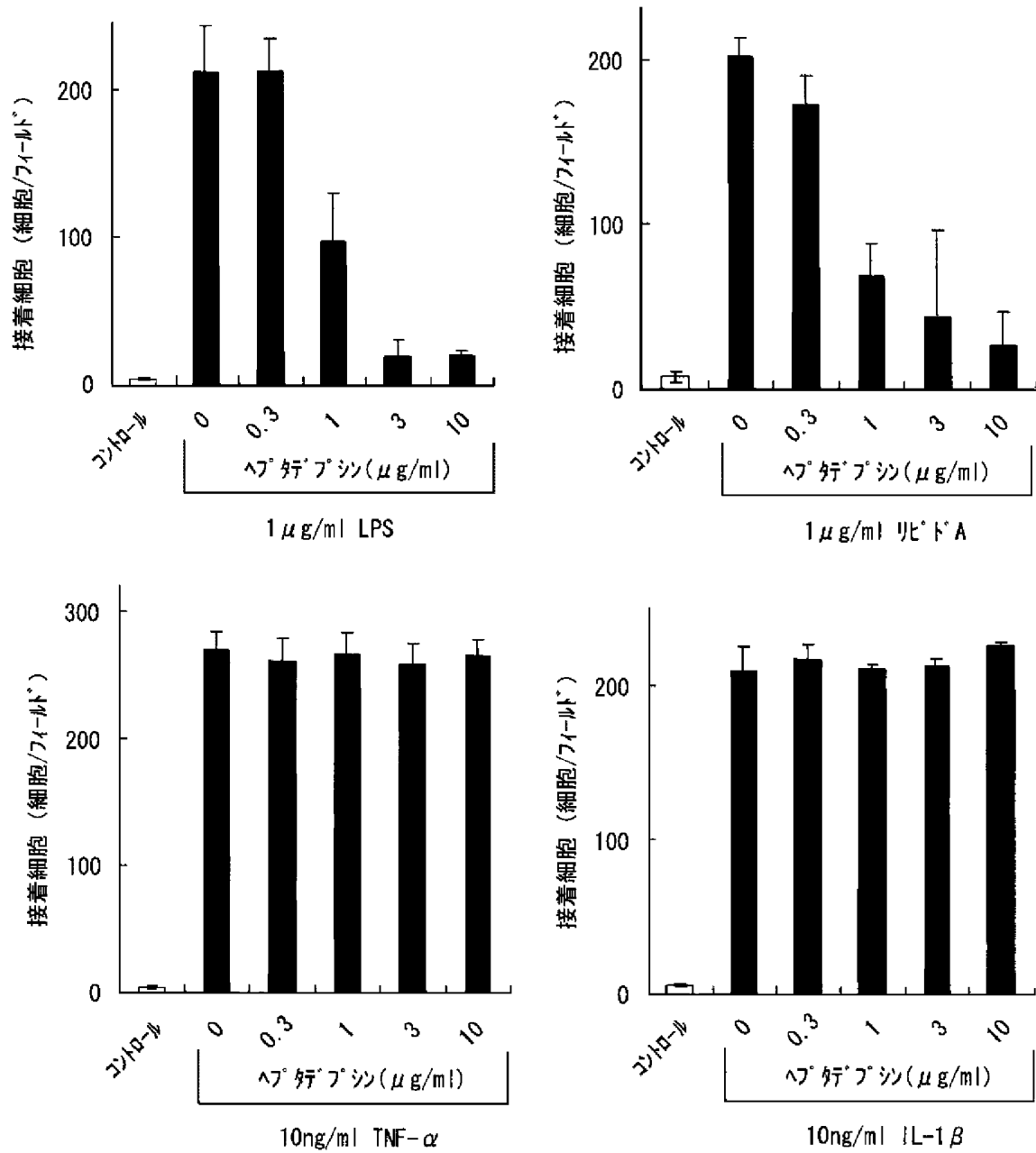
[図3]



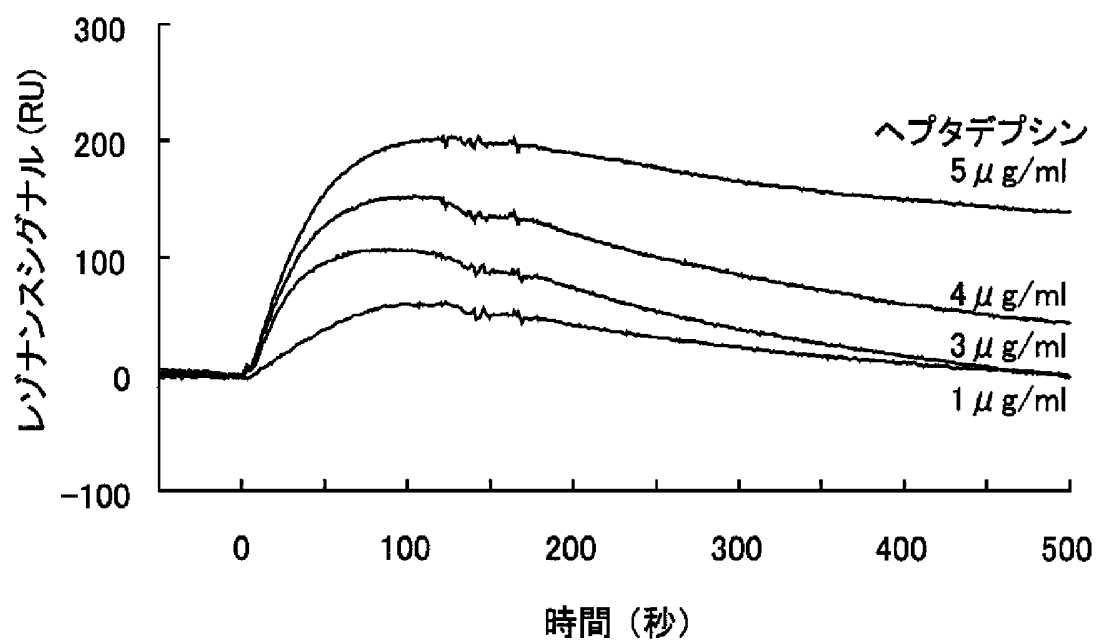
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K7/06, A61K38/08, A61P1/02, A61P1/04, A61P9/10, A61P11/00,
A61P13/02, A61P13/12, A61P19/02, A61P27/02, A61P27/16, A61P29/00,
A61P29/00, A61P31/04, A61P35/00, A61P35/04, A61P37/08, A61P43/00

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)

Int.Cl⁷ C07K7/06, A61K38/08

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 practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KANEDA, Miyuki; KAJIMURA, Yoshio, New anti-fungal antibiotics, bacillopeptins and fusaricidins, Yakugaku Zasshi (2002), 122(9), 651-671	1,3,8-10,12,15,22
X	He, H.; Shen, B.; Korshalla, J.; Carter, G.T., Circulocins, new antibacterial lipopeptides from Bacillus circulans, J2154, Tetrahedron (2001), 57(7), 1189-1195	1,3,8-10,12,15,22

☒ 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
08 September, 2004 (08.09.04)Date of mailing of the international search report
28 September, 2004 (28.09.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012076

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KURODA, Jun; FUKAI, Toshio; KONISHI, Masataka; UNO, Jun; KURUSU, Keiji; NOMURA, Taro, LI-F antibiotics, a family of antifungal cyclic depsipeptides produced by <i>Bacillus polymyxa</i> L-1129, <i>Heterocycles</i> (2000), 53(7), 1533-1549	1, 3, 8-10, 12, 15, 22
X	JP 2-275898 A (Mitsubishi Petrochemical Co., Ltd.), 09 November, 1990 (09.11.90), Full text (Family: none)	1, 3, 8-10, 12, 15, 22
A	JP 7-228565 A (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 29 August, 1995 (29.08.95), Full text (Family: none)	1-24
A	Baatz, H.; Pleyer, U., Modulation of leukocyte-endothelium interaction by nitric oxide synthase inhibitors: effects on leukocyte adhesion in endotoxin-induced uveitis, <i>Inflammation Research</i> (2001), 50(11), 534-543	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012076

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.: 24-26
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 24 to 26 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ 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 cl7 C07K 7/06 A61K 38/08 A61P 1/02 A61P 1/04 A61P 9/10 A61P 11/00 A61P 13/02 A61P 13/12 A61P 19/02 A61P 27/02 A61P 27/16 A61P 29/00 A61P 29/00 A61P 31/04 A61P 35/00 A61P 35/04 A61P37/08 A61P 43/00		
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 cl7 C07K 7/06 A61K 38/08		
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		
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 (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (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 請求の範囲の番号
X	Kaneda, Miyuki; Kajimura, Yoshio, New antifungal antibiotic s, bacillopeptins and fusaricidins, Yakugaku Zasshi (2002), 122(9), 651-671	1, 3, 8-10, 12, 15, 22
X	He, H.; Shen, B.; Korshalla, J.; Carter, G. T., Circulocins, new antibacterial lipopeptides from Bacillus circulans, J21 54, Tetrahedron (2001), 57(7), 1189-1195	1, 3, 8-10, 12, 15, 22
☒ 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 08.09.2004	国際調査報告の発送日 28.9.2004	
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) 内藤 伸一 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 8 6 1 5

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 請求の範囲の番号
X	Kuroda, Jun; Fukai, Toshio; Konishi, Masataka; Uno, Jun; Kurusu, Keiji; Nomura, Taro, LI-F antibiotics, a family of anti fungal cyclic depsipeptides produced by <i>Bacillus polymyxa</i> L-1129, <i>Heterocycles</i> (2000), 53(7), 1533-1549	1, 3, 8-10, 12, 15, 22
X	J P 2-275898 A (三菱油化株式会社) 1990. 11. 09, 文献全体 (ファミリーなし)	1, 3, 8-10, 12, 15, 22
A	J P 7-228565 A (日本化薬株式会社) 1995. 08. 29, 文献全体 (ファミリーなし)	1-24
A	Baatz, H.; Pleyer, U., Modulation of leukocyte-endothelium interaction by nitric oxide synthase inhibitors: effects on leukocyte adhesion in endotoxin-induced uveitis, <i>Inflammation Research</i> (2001), 50(11), 534-543	1-24

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. ☒ 請求の範囲 24-26 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、

請求の範囲24-26の発明は、治療による人体の処置方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 _____ 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. ☐ 請求の範囲 _____ 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の範囲について作成した。
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の範囲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の範囲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の範囲について作成した。

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なかった。