

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4865973号
(P4865973)

(45) 発行日 平成24年2月1日 (2012. 2. 1)

(24) 登録日 平成23年11月18日 (2011. 11. 18)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 307/54 (2006. 01)

C O 7 D 307/54

A 6 1 K 31/341 (2006. 01)

A 6 1 K 31/341

A 6 1 P 31/10 (2006. 01)

A 6 1 P 31/10

A O 1 N 43/08 (2006. 01)

A O 1 N 43/08

C

A O 1 P 3/00 (2006. 01)

A O 1 P 3/00

請求項の数 40 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-528145 (P2001-528145)
 (86) (22) 出願日 平成12年10月5日 (2000. 10. 5)
 (65) 公表番号 特表2003-511366 (P2003-511366A)
 (43) 公表日 平成15年3月25日 (2003. 3. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/027573
 (87) 国際公開番号 W02001/025197
 (87) 国際公開日 平成13年4月12日 (2001. 4. 12)
 審査請求日 平成19年9月21日 (2007. 9. 21)
 (31) 優先権主張番号 60/158, 099
 (32) 優先日 平成11年10月7日 (1999. 10. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 508277184
 エボルバ エスア
 スイス連邦 ライナハ ドゥッギンガース
 トラッセ 2 3
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74) 代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74) 代理人 100130845
 弁理士 渡邊 伸一

最終頁に続く

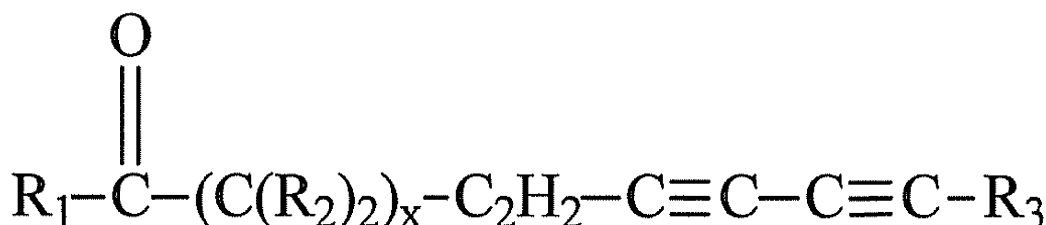
(54) 【発明の名称】 抗真菌剤エンジン (E n e d i y n e)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の式を有する、実質的に純粋な化合物：

【化 1】



10

式中、 R_1 は、ヒドロキシル基または加水分解反応においてヒドロキシル基で置換され得る部分であり；各 R_2 は、独立して、Hまたは1～4個までの炭素原子を含む一価の炭化水素部分であり； R_3 は、ピロール環、フラン環またはチオフェン環であり；かつ x は4～10までの整数である。

【請求項 2】

各 R_2 がHである、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 3】

各 R_2 が、独立して、H、 CH_3 、または C_2H_5 である、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 4】

20

R₂ 部分の炭素原子の合計が15未満である、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 5】

R₂ 部分の炭素原子の合計が9未満である、請求項 4 記載の化合物。

【請求項 6】

R₂ 部分の炭素原子の合計が5未満である、請求項 5 記載の化合物。

【請求項 7】

R₃ が、フラン環である、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 8】

X が、5～7までの整数である、請求項 1 記載の化合物。

【請求項 9】

化合物が、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)の増殖を阻害する、請求項 1 記載の化合物。

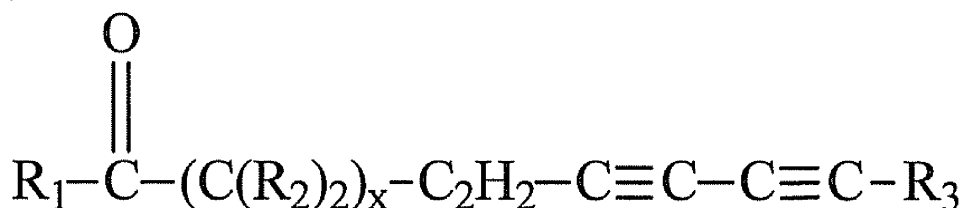
【請求項 10】

R₃ が、フラン環である、請求項 8 記載の化合物。

【請求項 11】

下記の式を有する化合物、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物：

【化 2】



式中、R₁ は、ヒドロキシル基または加水分解反応においてヒドロキシル基で置換され得る部分であり；各R₂ は、独立して、Hまたは1～4個までの炭素原子を含む一価の炭化水素部分であり；R₃ は、ピロール環、フラン環またはチオフェン環であり；かつXは4～10までの整数である。

【請求項 12】

各R₂ がHである、請求項11記載の組成物。

【請求項 13】

各R₂ が、独立して、H、CH₃、またはC₂H₅である、請求項11記載の組成物。

【請求項 14】

R₂ 部分の炭素原子の合計が15未満である、請求項11記載の組成物。

【請求項 15】

R₂ 部分の炭素原子の合計が9未満である、請求項14記載の組成物。

【請求項 16】

R₂ 部分の炭素原子の合計が5未満である、請求項15記載の組成物。

【請求項 17】

R₃ がフラン環である、請求項11記載の組成物。

【請求項 18】

X が、5～7までの整数である、請求項11記載の組成物。

【請求項 19】

化合物が、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)の増殖を阻害する、請求項11記載の組成物。

【請求項 20】

R₃ がフラン環である、請求項18記載の組成物。

【請求項 21】

下記の式を有する実質的に純粋な化合物：

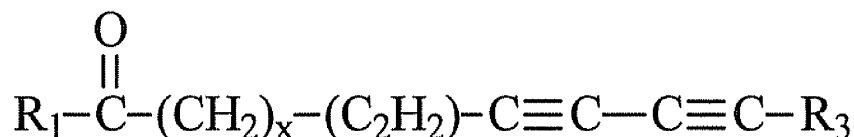
10

20

30

40

【化 3】



式中、 R_1 は、 OH 、 NH_3 、 OCH_3 、または OC_2H_5 であり； R_3 は、ピロール環、フラン環またはチオフェン環であり；かつ x は5～7までの整数である。

【請求項 2 2】

R_1 が OH である、請求項21記載の化合物。

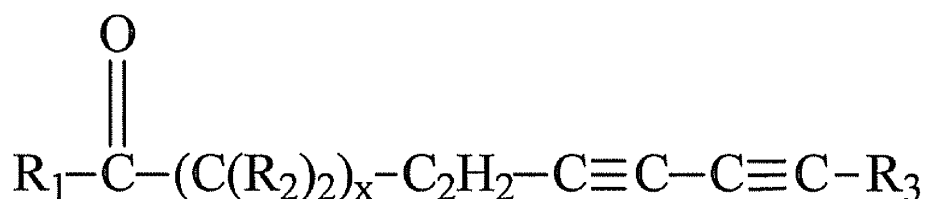
【請求項 2 3】

R_3 がフラン環である、請求項21記載の化合物。

【請求項 2 4】

真菌細胞の増殖を阻害するための薬剤の製造のための、下記の式で表される化合物の使用：

【化 4】



式中、 R_1 は、ヒドロキシル基または加水分解反応においてヒドロキシル基で置換され得る部分であり；各 R_2 は、独立して、 H または1～4個までの炭素原子を含む一価の炭化水素部分であり； R_3 は、ピロール環、フラン環またはチオフェン環であり；かつ x は4～10までの整数である。

【請求項 2 5】

各 R_2 が H である、請求項24記載の使用。

【請求項 2 6】

各 R_2 が、独立して、 H 、 CH_3 、または C_2H_5 である、請求項24記載の使用。

【請求項 2 7】

R_2 部分の炭素原子の合計が15個未満である、請求項24記載の使用。

【請求項 2 8】

R_2 部分の炭素原子の合計が9個未満である、請求項27記載の使用。

【請求項 2 9】

R_2 部分の炭素原子の合計が5個未満である、請求項28記載の使用。

【請求項 3 0】

R_3 が、フラン環である、請求項24記載の使用。

【請求項 3 1】

x が、5～7までの整数である、請求項24記載の使用。

【請求項 3 2】

真菌細胞が、カンジダ・アルビカンス細胞である、請求項24記載の使用。

【請求項 3 3】

化合物が、カンジダ・アルビカンス細胞の増殖を少なくとも90%阻害する、請求項32記載の使用。

【請求項 3 4】

生物における真菌感染症の発症を阻害するための薬剤の製造のための、下記の式で表される化合物の使用：

10

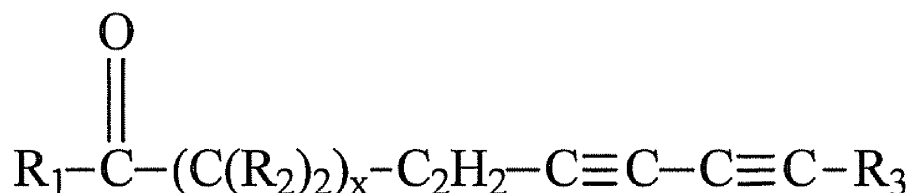
20

30

40

50

【化 5】



式中、 R_1 は、ヒドロキシル基または加水分解反応においてヒドロキシル基で置換され得る部分であり；各 R_2 は、独立して、Hまたは1～4個までの炭素原子を含む一価の炭化水素部分であり； R_3 は、ピロール環、フラン環またはチオフェン環であり；かつ x は4～10までの整数である。

10

【請求項 3 5】

生物が植物である、請求項34記載の使用。

【請求項 3 6】

生物が動物である、請求項35記載の使用。

【請求項 3 7】

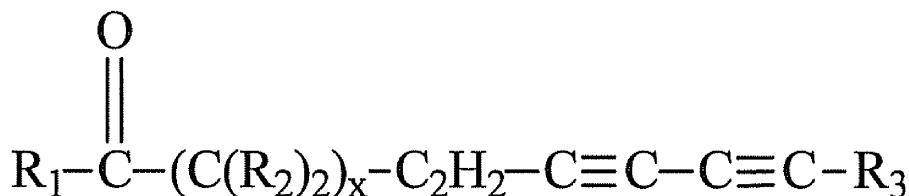
動物がヒトである、請求項36記載の使用。

【請求項 3 8】

下記の式をで表される、真菌感染症治療のための化合物：

20

【化 6】



式中、 R_1 は、ヒドロキシル基または加水分解反応においてヒドロキシル基で置換され得る部分であり；各 R_2 は、独立して、Hまたは1～4個までの炭素原子を含む一価の炭化水素部分であり； R_3 は、ピロール環、フラン環またはチオフェン環であり；かつ x は4～10までの整数である。

30

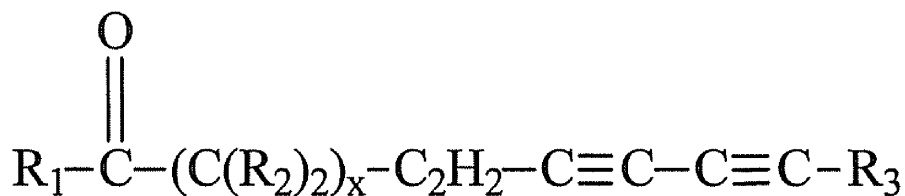
【請求項 3 9】

前記真菌が皮膚糸状菌である、請求項38記載の化合物。

【請求項 4 0】

真菌感染症治療用医薬品の製造における、下記の式で表される化合物の使用：

【化 7】



40

式中、 R_1 は、ヒドロキシル基または加水分解反応においてヒドロキシル基で置換され得る部分であり；各 R_2 は、独立して、Hまたは1～4個までの炭素原子を含む一価の炭化水素部分であり； R_3 は、ピロール環、フラン環またはチオフェン環であり；かつ x は4～10までの整数である。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

50

発明の背景

本発明は、真菌感染症の阻害に有用な化合物に関する。

【0002】

真菌感染症(真菌症)は、肺疾患および気道疾患を含む多くの疾患の一因でありかつ合併している。日和見真菌感染症の症例数は、特にAIDS患者、癌の化学療法を受けている患者、および臓器移植手術後の移植片拒絶反応を防ぐ治療を受けている患者のような免疫無防備状態の患者において、増加しつつある。

【0003】

動物において、真菌感染症は、皮膚性、皮下性、または全身性である。表在性真菌症には、頭部白癬、躯幹白癬、足部白癬、爪甲剥離症(例えば爪真菌症)、周囲爪甲剥離症(perio-
nychomycosis)、でん風、鷲口瘡、およびその他のカンジダ症、例えば膣、気道、胆管、
食道および尿路のカンジダ症を含む。全身性真菌症は、全身および皮膚粘膜のカンジダ症、
クリプトコックス症、アスペルギルス症、ムコール菌症、パラコクシジオイデス症、北
米型プラストミセス症、ヒストプラズマ症、コクシジオイデス症、およびスポロトリコー
シス症を含む。

【0004】

植物も真菌感染症に罹り易い。植物疾病は、多くの属に分類される無数の侵襲性真菌病原
体に起因しており、その例を以下に示す：軟腐病(例えば、Rhizopus種)、縮葉病(例えば
、Taphrina種)、ウドンコ病(例えば、Sphaerotheca種)、斑点病(例えば、Fulvia種)、焼
枯れ病(例えば、Alternaria種)、いもち病(例えば、Magnaporthe種)、黒菌病(例えば、Gu-
ignardia種)、瘡痂病(例えば、Venturia種)、立枯れ病(例えば、Fusarium種)、錆病(例え
ば、Puccinia種)、黒穂病(例えば、Ustilago種)、および根瘤病(例えば、Rhizoctonia種)
。

【0005】

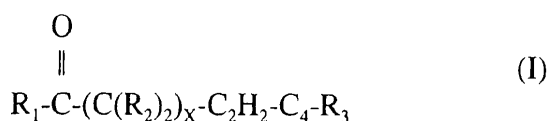
病原性微生物の例は、皮膚糸状菌(例えば、Microsporum canis、M. gypseum、M. distort-
um、M. audouinii、M. ferrugineum、M. rivalieri、M. fulvum、M. cookei、M. vanbreu-
iseghemii、M. persicolor、Trichophyton rubrum、T. mentagrophytes、T. menginii、
T. nanum、T. schoenleinii、T. tonsurans、T. verrucosum、T. soudanense、T. violac-
eum、T. yaoundei、T. gourvilii、T. simii、T. ajelloi、Hendersonula toruloidea)、
酵母(例えば、Candida albicans、C. tropicalis)、トルロプシス・グラブラタ(Torulops-
is glabrata)、有毛表皮糸状菌(Epidermophyton floccosum)、でん風菌(Malassezia furf-
ur)、Pityrosporon orbiculare、P. ovale、クリプトコックス・ネオホルマンズ(Crypto-
coccus neoformans)、アスペルギルス・フミガーツス(Aspergillus fumigatus)および他
のアスペルギルス種、接合菌類(例えば、Rhizopus、Mucor)、ブラジル・パラコクジオイ
デス(Paracoccidioides brasiliensis)、プラストミセス・デルマチチジス(Blastomyces
dermatitidis)、ヒストプラズマ・カスプラートウム(Histoplasma capsulatum)、コクシ
ジオイデス・イミチス(Coccidioides immitis)、およびスポロリックス・シェンキー(Spo-
rothrix schenckii)がある。

【0006】

発明の概要

ある局面において、本発明は、下記の式を有する実質的に純粋な化合物を特徴とする：

【化8】



式中、R₁は、ヒドロキシル基または加水分解反応においてヒドロキシル基で置換され得る
部分であり；各R₂は、独立して、Hまたは1～4個までの炭素原子を含む一価の炭化水素部
分であり；R₃は、ピロール環、フラン環またはチオフェン環であり；かつXは4～10までの
整数である。全ての本発明の化合物(化合物I～V)において、R₂部分の炭素の合計は、15個

10

20

30

40

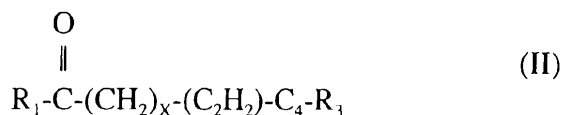
50

未満であることが好ましい。より好ましくは、 R_2 部分の炭素の合計は9個未満であり、かつ最も好ましくは5個未満である。最も好ましくは、各 R_2 はHであるか、または代わりに各 R_2 は、独立して、H、 CH_3 、または C_2H_5 である。別の好ましい態様において、 R_3 はフラン環であり、かつXは5～7までの整数である。特許請求の範囲の化合物は、真菌細胞(例えば、カンジダまたは皮膚糸状菌の種)の増殖を阻害することが可能である。本発明の化合物は、薬学的に許容される担体と混合し、薬学的組成物を製造することができる。ある好ましい実施例において、この組成物は、局所塗布用に製剤される。

【0007】

別の局面において本発明は、下記の式を有する実質的に純粋な化合物を特徴とする：

【化9】



式中、 R_1 は、OH、 NH_3 、 OCH_3 、または OC_2H_5 であり； R_3 は、ピロール環、フラン環またはチオフェン環であり；かつXは5～7までの整数である。好ましい化合物において、 R_1 はOHでありおよび/または R_3 はフラン環である。これらの化合物も、真菌細胞の増殖を阻害するため、例えば、植物およびヒトを含む動物において真菌感染症を治療するために使用される薬学的に許容される組成物として提供することができる。好ましくは、この化合物は、本明細書に記された標準アッセイ法により決定される場合、真菌細胞の増殖を少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、および最も好ましくは少なくとも90%阻害する。

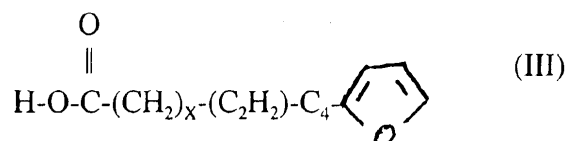
【0008】

本発明の化合物は、真菌感染症の治療に有用であることに加え、真菌感染症を予防するためにも使用することができる。

【0009】

好ましい式(II)の化合物は、下記の式を有する：

【化10】



式中、Xは5～7までの整数である。これらの化合物は、アナーヒヌム (Anarrhinum) の液体培養物から単離することができる。好ましい方法は、(a)アナーヒヌムの液体培養物をDNAメチル化阻害剤と接触する工程；(b)少なくとも3日後、この培養物またはその継代培養物を、エリシターと接触する工程；および、(c)エリシターと接触された培養物、またはその継代培養物から化合物を抽出する工程を含む。この方法は、工程(a)と工程(b)の間に、該培養物を継代培養する工程を更に含む。この液体培養物は、少なくとも2回、継代培養されることが好ましい。あるいは、これらの化合物は、(a)アナーヒヌム種子からのカルス培養を開始する工程；(b)開始されたカルス培養物を培養する工程；(c)カルス培養からの液体培養を開始する工程；(d)液体培養物をDNAメチル化阻害剤と接触する工程；(e)DNAメチル化阻害剤が接触した液体培養物を継代培養する工程；(f)継代培養物をエリシターと接触する工程；および、(g)エリシターと接触した培養物、またはその継代培養物から化合物を抽出する工程を含む。アナーヒヌム液体培養物について、本発明の化合物を得るためには、DNAメチル化阻害剤と接触する工程も、エリシターと接触する工程も必要ではなく、これらの工程が含まれるのは、その収量を増大するためである。

【0010】

別の局面において、本発明は、下記の式を有する実質的に純粋な化合物を特徴としている：

【化11】

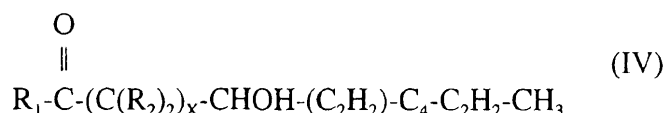
10

20

30

40

50



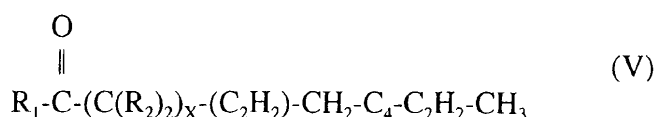
式中、 R_1 は、ヒドロキシル基または加水分解反応においてヒドロキシル基で置換され得る部分であり；各 R_2 は、独立して、Hまたは1～4個までの炭素原子を含む一価の炭化水素部分であり；かつ X は3～9までの整数である。これらの化合物は、真菌細胞増殖の阻害、例えば植物およびヒトを含む動物における真菌感染症の治療または予防のために有用である。

10

【0011】

別の局面において、本発明は、下記の式を有する実質的に純粋な化合物を特徴としている：

【化12】



式中、 R_1 は、ヒドロキシル基または加水分解反応においてヒドロキシル基で置換され得る部分であり；各 R_2 は、独立して、Hまたは1～4個までの炭素原子を含む一価の炭化水素部分であり；かつ X は3～9までの整数である。これらの化合物は、真菌細胞増殖の阻害、例えば植物およびヒトを含む動物における真菌感染症の治療または予防に有用である。

20

【0012】

本発明の化合物は、広範な抗真菌活性および高特異的活性を発揮し、従って生きている動物および植物、並びに植物製品(例えば、穀物または飼料)を含む、植物および動物の両方における真菌感染症の治療または予防に有用である。動物は、哺乳類、特にヒトに加え、食物またはペットとしての家畜の繁殖を含み、例えばウマ、ウシ、ヒツジ、家禽、魚、ブタ、ネコ、イヌおよび動物園の動物を含む。植物は、樹木、作物、草本、および花木を含む。

【0013】

本発明の他の特徴および利点は、下記のその好ましい態様の説明、および特許請求の範囲から明らかであると考えられる。

30

【0014】

詳細な説明

本発明者らは、メチル化阻害剤およびエリシターで順に処理した植物培養物から、新規抗真菌化合物を単離した。これらの化合物および関連化合物は、標準の有機合成技術を用いて生成することができ、真菌感染症の予防または治療に有用である。

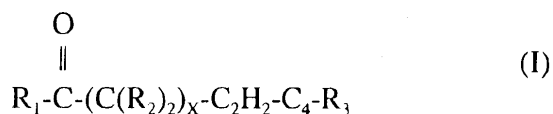
【0015】

化合物

下記の式Iの化合物において：

40

【化13】



好ましい R_2 部分は、化合物1～7(図1)により、本明細書中に例示されたように、Hである。あるいは、1個以上の R_2 部分を、実質的に抗真菌活性を喪失することなく、メチル、エチル、プロピル、またはブチル基(またはそれらの組合せ)のような、炭化水素部分で置換することができる。好ましくは、 R_2 部分の炭素の合計は、15個未満、より好ましくは9個未満、および最も好ましくは5個未満である。

50

【0016】

化合物1~3、5および7などのように、好ましい化合物において、 R_3 はフラン環である。標準の化学合成法を用い、この環を、ピロールまたはチオフェン環で置換することができ；これら3種の環の三次構造および電荷分布は類似しているため、これらの後者の環を有する化合物も、おそらく抗真菌活性を有すると考えられる。

【0017】

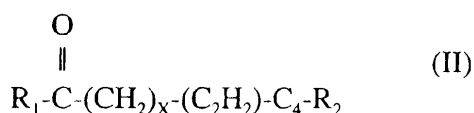
変動可能な X は、飽和炭素主鎖の長さを意味する。請求された化合物の抗真菌活性は、この主鎖の長さを基にある程度変化する。例えば、化合物1、5および7($X=7$)は、最大の抗カンジダ活性を有し、これに化合物3($X=6$)が続き、その後化合物2($X=5$)が続く。好ましくは X は5~7までの整数であるが、より長い炭素鎖($X=8\sim 10$)も抗真菌活性を保存または増大し

10

【0018】

好ましい化合物の群のひとつは、下記の式を有する：

【化14】



式中、 R_1 はOH、 NH_3 、 OCH_3 、または OC_2H_5 であり、 R_2 はピロール環、フラン環、またはチオフェン環であり、かつ X は5~7までの整数である。更により好ましくは、 R_1 はOHであり、 R_2 はフラン環である。この式に含まれる化合物(例えば、化合物1~3、5および7)は、未置換の炭化水素主鎖を含む。

20

【0019】

植物細胞及び組織培養物において、DNAメチル化阻害剤による処理、およびエリシターによる処理の2種類の処理後、式III、IV、およびVの精製化合物生成の増大が誘導される。DNAメチル化阻害剤による処理は、未発芽の種子、発芽中の種子、外植片もしくは組織培養物、または液体培養物に供される。DNAメチル化阻害剤による連続処理も考慮される。例えば、本発明は、未発芽の種子のDNAメチル化阻害剤による処理(第一処理)、処理した種子の発芽、発芽した種子に由来した組織からのカルスの生育、カルス懸濁液の誘導、およびDNAメチル化阻害剤による液体懸濁継代培養物の処理(第二処理)を含む方法を包含して

30

【0020】

DNAメチル化阻害剤処理は、処理された植物細胞による、二次代謝産物の生成に影響を及ぼす。ひとつには、処理された植物細胞への作用は、一時的なストレスで誘導された作用である。より重要なことに、この処理は同じく処理された未発芽種子、発芽中の種子、外植片もしくは組織培養物、または液体培養物に由来する継代培養物の二次代謝産物の生成にも影響を及ぼす。DNAメチル化阻害剤処理の作用は、二次代謝の発現を変更することに関して後成的(epigenetically)に安定している。

【0021】

本発明の方法において、DNAメチル化阻害剤による処理は一般に、それが由来した液体培養物のエリシター処理と組合わせられる。エリシター処理も同じく、二次代謝産物の生成を刺激または促進する。植物細胞または組織培養物のエリシテーション(elicitation)は一般に、植物の液体培養物が確立されかつ本発明の化合物の単離を可能にするのに十分なレベルまで増殖することができる場合に行われる。通常、DNAメチル化阻害剤で処理した培養物は、エリシターと接触される前に、継代培養される(残留DNAメチル化阻害剤除去のため)。

40

【0022】

化合物1、5および7の合成法

本発明の化合物は、標準の有機合成法を用い容易に合成することができる。化合物1、5お

50

よび7の合成例を下記に示す(図2)。

【0023】

工程1: 2-(2,2-ジブromo-ビニル)-フランの合成

四臭化炭素(20mmol)を、無水ジクロロメタン(200mL)中に溶解し、かつアルゴン大気下20で維持した。ジクロロメタン(200mL)中のトリフェニルホスフィン(20mmol)を滴下した。15分間攪拌した後、反応フラスコを-60に維持し、引き続きジクロロメタン(100mL)中のフルアルデヒド(10mmol)およびトリエチルアミン(10mmol)を添加した。この反応混合液を室温に戻し、かつ2容量のエーテルを添加した。沈殿を濾過し、かつ濾液を乾燥した。粗物質を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した(収率>50%)。

【0024】

工程2: 2-ブromoエチニル-フランの合成

テトラヒドロフラン(40mL)中の2-(2,2-ジブromo-ビニル)-フラン(4mmol)を、アルゴン大気下で維持し、かつ-100に冷却した。テトラヒドロフラン中のヘキサメチルジシランナトリウム(4.8mmol、1M溶液)を、反応フラスコに滴下し、かつ10分間攪拌した。その後飽和塩化アンモニウム水溶液を滴下し、かつ反応混合液を室温に戻した。エーテルを用いて、水溶液から生成物を抽出した。有機溶媒を回転蒸発器により除去し、粗残渣を工程6の次反応(下記)に使用した。

【0025】

工程3: 9-ヒドロキシ-ノナン酸メチルエステルの合成

アゼライン酸モノメチルエステル(20mmol)を、テトラヒドロフラン(100mL)に溶解し、アルゴン大気下で-10に維持した。反応フラスコにトリエチルアミン(30mmol)を滴下し、引き続きクロロギ酸エチル(25mmol)を添加した。この溶液を20分間攪拌し、水素化ホウ素ナトリウム(60mmol)を一気に添加した。メタノール(40mL)を滴下し、かつ反応フラスコを0で40分間維持した。水(20mL)を添加し、かつ有機溶媒を回転蒸発器により除去した。残渣を、水および酢酸エチルで分配した。有機層を収集し、かつ乾燥し、9-ヒドロキシ-ノナン酸メチルエステルを、工程4で使用するのに問題のない純度で得た。収率は>90%であった。

【0026】

工程4: 9-オキソ-ノナン酸メチルエステルの合成

ジクロロメタンを溶媒とする9-ヒドロキシ-ノナン酸メチルエステル(7g)を、ニクロム酸ピリジニウム(35g)で処理し、室温で12時間攪拌した。ニクロム酸ピリジニウムを濾過し、かつ有機濾液を水で洗浄した。この溶液にヘキサン(3X容量)を添加し、かつ有機層を収集し、かつ乾燥し、粗生成物を得た。この生成物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、生成物~5gを得た。

【0027】

工程5: ドデカ-9-エン-11-イノン酸(dodec-9-en-11-ynoic acid)メチルエステルの合成

n-ブチルリチウム(750μL、2M)を、アルゴン下室温でメチルスルホキシド(6mL)に添加した。この溶液を30分間攪拌し、かつメチルスルホキシドを溶媒とする(3-トリメチルシリル-2-プロピニル)-トリフェニルホスホニウムブロミド(1mmol)を添加し、かつ1時間攪拌した。反応混合液に、メチルスルホキシドを溶媒とする9-オキソ-ノナン酸メチルエステルを添加し、かつ4.5時間攪拌した。この反応混合液を氷水中に注ぎ、かつ酢酸エチルで3回抽出した。有機層を一緒にし、かつ乾燥し、粗混合物を得、これを更にシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。生成物は、トランスおよびシス異性体を約8:2の比で含んでいた。

【0028】

工程6: 化合物1および化合物5のメチルエステルの合成

塩化銅(I)(0.6mg)、ヒドロキシルアミン塩酸塩(3mg)、およびエチルアミン(水を溶媒とする70%、~100μL)を含有するメタノール(100μL)溶液を、メタノール中のドデカ-9-エン-11-イノン酸メチルエステル(~3.2mg)に添加し、引き続きメタノール中の2-ブromoエチニル-フラン(~2mg)を添加した。この反応混合液を、0で20分間維持し、かつ水および

10

20

30

40

50

エーテルを添加した。有機層を収集し、かつ乾燥した。化合物1および5のメチルエステルの混合物(～1mg)を、分取シリカゲル薄層クロマトグラフィー(PTLC)により得、トランス：シス比は～8：2であった。これらのメチルエステルのひとつは化合物7である。

【0029】

工程7：化合物1および化合物5の合成

工程6の化合物1および化合物5のメチルエステル混合物(4.7mg)を、エタノール-水に溶解し、かつ2N水酸化カリウム(400μl)を添加した。この溶液を1時間還流し、室温に冷却した。塩酸溶液(800μl；1N)を添加し、かつこの溶液を酢酸エチルで抽出した。有機溶媒を除去した後、化合物1および5の合計4mg(トランス：シスの比は～8：2)を得た。

【0030】

当業者は、前述の方法の変法を用いるか、もしくは有機合成の別の常法を用い、本発明のその他の化合物を生成することができることを理解するであろう。このような方法は、例えば、ヒフテ(Hijfte)ら、Tetrahedron Lett.、30:3655；ハウスク(Hauske)ら、Tetrahedron Lett.、33:3715(1992)；および、グランドジーン(Grandjean)ら、Tetrahedron Lett.、35:3529～3530(1994)に記されており、これらは各々本明細書に参照として組入れられている。

【0031】

薬学的治療剤および植物保護剤

本発明は、病原体の増殖、病原性またはビルレンスを阻害することが可能な化合物を特徴としている。従って、これらの化合物は、薬物または植物保護剤として、医学的または農学的価値を有する。本発明の化合物により阻害することができる病原性真菌の例は、例えば、カンジダ・アルピカンス、アスペルギルス種、ムコール種、リゾプス(Rhizopus)種、フザリウム(Fusarium)種、ペニシリウム・マルネフェイ(Penicillium marneffeii)、ミクロスボルム種、クリプトコックス・ネオホルマンズ、ニューモシスティス・カリニ(Pneumocystis carinii)、およびトリコフィトン(Trichophyton)種を含む。

【0032】

本発明は、1種以上の本発明の化合物を含有する薬学的組成物を特徴としている。治療的用途のために、この組成物または化合物は、例えば生理食塩水のような薬学的に許容される緩衝液中に製剤され全身投与される。治療は、例えば動物の本発明の化合物または組成物による治療のように、直接行っても良い。好ましい投与経路は、例えば、患者に連続して持続された薬物レベルをもたらすような、吸引、または皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、もしくは皮内注射を含む。ヒト患者または他の動物の治療は、薬学的に許容される担体中の治療有効量本発明の化合物を用いて行われる。適当な担体およびそれらの製剤は、例えば「レミントン(Remington)：薬科学(The Science and Practice of Pharmacy)」(第19版)、A.R.ジェナロ(Gennaro)AR.編集、1995年、マックパブリッシング(Mack Publishing)社、イーストン、PAに記載されている。投与される抗真菌剤の量は、投与様式、患者の年齢および体重、並びに疾患の種類および疾患の重症度(extensiveness)に応じて変動する。一般に量は、真菌疾患の治療において使用される他の物質の使用範囲内で用いられると考えられる。化合物は、真菌の増殖または生存を阻害する用量で投与される。例えば、全身投与について、化合物は典型的には体重1kg当たり0.1ng～10gの範囲で投与される。

【0033】

ある好ましい方法において、1種以上の本発明の化合物は、皮膚科で許容される固形または液体の担体と組合わせて製剤される。有用な固形担体は、細かく分割された固形物、例えばタルク、クレー、微晶質セルロース、シリカ、アルミナなどを含む。有用な液体担体は、本化合物を、有効レベルで溶解または分散することができるような、水、アルコールまたはグリコール(または水-アルコール/グリコール配合物)を含む。佐剤(香味芳香剤など)、界面活性剤、および追加の抗菌剤を、所定の用途での特性を最適化するために添加することができる。これらの組成物は、吸収パッドから塗布されるか、含浸バンデージおよび他の包帯が使用されるか、またはポンプ式またはエアゾールスプレーを用いて罹患部

10

20

30

40

50

位に噴霧される。この液体組成物は更に、点眼剤、含嗽剤、灌注剤(douche)などとして使用することもできる。合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩およびエステル、脂肪族アルコール、改質セルロースまたは改質無機材料のような増粘剤も、液体担体と共に使用することができ、使用者の皮膚に直接塗布するための塗り広げることができるパスタ剤、ゲル剤、軟膏剤、石鹸などを形成することができる。

【0034】

本組成物中の1種以上の本発明の化合物の総濃度は、広範に変動することができ、かつ有効成分(複数)の溶剤との相溶性、有効成分(複数)の効能、および治療されるべき状態などの要因により決まる。一般にローション剤のような液体組成物中の製剤の化合物(複数)の濃度は、約0.1~25質量%、好ましくは約0.5~10質量%、およびより好ましくは約0.5%~5質量%である。ゲル剤または散剤のような半固形または固形組成物の濃度は、約0.1~5質量%、および好ましくは約0.5~2.5質量%である。

10

【0035】

農業用途については、本明細書に記した組成物または物質は、例えば植物の茎葉に噴霧剤または散粉剤(dust)として、または灌漑において、散布される化学物質として使用することができる。典型的には、このような物質は、感染を防ぐために病原体に先立って植物の表面に投与される。種子、りん茎、根、塊茎、および球茎も、それ自身が保持するかまたは栽植地域の土壤に存在する病原体を制御することにより、栽植後の病原体の攻撃を防止するために処置される。野菜、観葉植物、低木または高木が栽植される土壤も、様々な真菌病原体の制御のために化学的薰蒸剤で処理することができる。処理は、栽植前に数日、または数週間行われることが好ましい。これらの化学物質は、例えばトラクターのような機械的施用によるか、または人手による散布により施用することができる。加えて本発明の化合物は、消毒剤(disinfectant)としても使用することができる。

20

【0036】

他の医学的用途において、抗真菌化合物は、可能性のある真菌病原体による定着および全身への播種(seeding)を防ぐために、静脈用、尿管用、腹腔用、心室用、脊髄用および手術時の排液用カテーテルを含むが、これらに限定されないカテーテルのような医療用具の製造のために使用される物質に添加することができる。同様に、抗真菌化合物は、真菌病原体の定着を防止し、かつそれによりより重篤な侵襲性感染症またはこれらの病原体の全身への播種を予防するために、様々な外科用プロテーゼを構成する材料および義歯に添加することができる。

30

【0037】

抗真菌活性のアッセイ法

真菌増殖、およびその結果としての病原性生物による感染症の経過を阻害する物質の能力は、その生物の増殖を測定するインビトロ実験によるか、または増殖の間接的マーカーとして酵素ベース、もしくは細胞ベースの阻害アッセイ法を使用することにより明らかにすることができる。阻害は、 IC_{50} (50%阻害に必要な化合物濃度)またはMIC(最小発育阻止濃度、すなわち、生物の増殖を阻害する化合物の最低濃度)により説明されることが好ましい。従って、より低い IC_{50} またはMICは、化合物がより大きい増殖阻害活性を有することを示している。特異性の増大した化合物には、以下の1種以上の阻害が示される：宿主細胞又は組織における相応の酵素もしくは類似の酵素に勝る、ある微生物酵素の優先的阻害；他の微生物酵素に勝る、ある微生物酵素の優先的阻害；および、宿主細胞または組織の増殖に勝る、微生物増殖の優先的阻害。一般に、活性化合物は、所定のパラメータで測定される増殖を、該化合物と接触していない生物と比較して、少なくとも25%(例えば、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、または少なくとも65%)阻害することが好ましい。

40

【0038】

薬学的アッセイ法の実例は、以下の阻害を測定するものを含む：C.アルビカンズ(例えば、ATCC #90028)の増殖、真菌特異的キチンシンターゼ、またはグルカンシンターゼ。別のアッセイ法は、フルコナゾール感受性またはフルコナゾール耐性カンジダ・アルビカン

50

スの致死性チャレンジにより感染したマウスの生存の延長における該物質の効能を測定する(例えば、Loら、Cell、90:939～949(1997)参照)。

【0039】

好ましい化合物は、例えば1種以上のカンジダ種、*C. アルビカンス*、*C. クルセイ* (*krusei*)、*C. グラブラタ* (*glabrata*)、*C. トロピカリス* (*tropicalis*)、*C. パラシローシス* (*parapsilosis*)、*C. ギリエルモルリ* (*guilliermorulii*)、*C. ヘムロニ* (*haemulonii*)、*C. ルシタニエ* (*lusitaniae*)、*C. ノベゲンシス* (*norvegensis*)、*C. ビスワナチ* (*viswanathii*)、および*C. ケファー* (*kefyr*) などに加え、本明細書において考察された他のものに対し、広範に有効である。更に好ましい化合物は、アスペルギルス・フミガースツ、*A. フラブス* (*flavus*)、*A. ニガー* (*niger*)、ヒストプラズマ・カスブラートゥム (変種*cap* *sulatum*)、コクシジオイデス・イミチス、クリプトコックス・ネオホルマンズ (変種*neofo* *rmans*、および変種*gattii*)、*C. ビドウス* (*bidus*)、*C. ラウレンティ* (*laurentii*)、および*C. フザリウム* (*fusarium*) に加え、ムコールミコティック (*Mucormycotic*) 菌、例えばリゾープス・オリゼ (*Rhizopus oryzae*)、*R. ミクロプソラス* (*microsporus*)、*R. プシルス* (*pusillus*)、カニングハメレ・ベルソレティエ (*Cunninghamella bertholletiae*)、サクセナエ・バシフォルミス (*Saksenaea vasiformis*)、ムクロ・サーシネロイデス (*Mucro circinelloides*)、*M. ラモシッシムス* (*ramosissimus*)、アブシジア・コリムビフェラ (*Absidia corymbifera*)、アポフィソミセス・エレガンス (*Apophysomyces elegans*)、コケロミセス・レクルバトゥス (*Cokeromyces recurvatus*)、およびシンセファラストルム・ラセルノサム (*Syncephalastrum racernosum*) などのような真菌感染症に対しても有効である。開示された化合物は、1種より多い生物に対する活性を明らかにすることもでき、従って特に1種より多い感染症に罹患した患者への投与に適しかつ有効である(例えば、患者は2種の真菌感染症に罹患している)。ある開示された化合物は、アゾール(例えばフルコナゾール)およびアンホテリシンBのような他の治療薬と組合わせて投与される場合に、相加性または相乗性を示すこともできる。好ましくは、化合物は、哺乳類細胞毒性についてスクリーニングされ(例えば、ベロ (Vero) (サル腎)またはU937(ヒト単球性)細胞株において)；真菌増殖を阻害する濃度で低い哺乳類細胞毒性を伴う化合物が特に好ましい。

【0040】

カンジダ種増殖の阻害

カンジダのような真菌の増殖阻害を測定するために使用することができるアッセイ法は多い。一例としてカンジダ、例えば*C. アルビカンス*株DSY1024およびSC5314、*C. クルセイ* ATCC 6258、並びに*C. グラブラタ* ATCC 90030の培養物を、凍結保存したストックからサブロー (Sabouraud) デキストロース寒天プレートに継代培養する。分芽型分生子を、RPMI-1640培地に浮遊し、かつ被験化合物を最終容量100 μ L/ウェルで含有する96ウェルプレートに接種(500cfu/ウェル)する。35℃で22時間放置後、PMS(フェナジン硫酸メチル、5 μ M)を伴うXTT(2,3-ビス(2-メトキシ-4-ニトロ-5-スルホフェニル)-5-(フェニルアミノ)カルボニル]-2H-水酸化テトラゾリウム)(100 μ g/mL)25 μ Lを各ウェルに添加し、引き続き2時間振盪する。増殖は、 E_{max} マイクロプレートリーダーを用い、可溶性ホルマザン染色の出現を450nmで測定することにより、分光測光法的に評価する。このアッセイ法の妥当性は、アンホテリシンB、5-フルシトシン、フルコナゾール、ニコマイシンZ、およびポリオキシンドのような公知の抗真菌剤についての*C. アルビカンス*の最小発育阻止濃度(MIC)で確認した。

【0041】

当業者は、いずれかの真菌の増殖を測定するアッセイ法を、本発明の化合物による真菌増殖の阻害を決定するのに容易に適合できることを認めるであろう。

【0042】

マウスにおけるフルコナゾール耐性およびフルコナゾール感受性カンジダ症の阻害

免疫適格マウス(ICR、Sprague-Dawley、インディアナポリス、IN)を、フルコナゾールに感受性のある*C. アルビカンス*病原株(例えば、#64株)で感染する。24時間後、感染の広が

り(dissemination)が、器官(腎、脾、および肝)のコロニー数の計測値が 10^5 コロニー形成単位(CFU)より多いことにより示される。感染の24時間後に、1日1回用量で10日間の治療が開始される。未治療の対照マウスは、通常約16日目には死亡していた。30日後、フルコナゾール(40mg/体重kg、1日2回)治療群の生存率は、約30%である。動物の生存力の測定に加え、器官の真菌負荷(CFUにおいて)を測定することができる。

【0043】

フルコナゾール耐性臨床単離体(例えば、C.アルピカンス UTR-14)を使用する同様の実験において、フルコナゾール(40mg/体重kg、p.o.(1日2回))による治療群および未治療群の20日後の生存率は、通常各々0%である。

【0044】

カンジダ・アルピカンスの薬物併用による阻害

本発明の化合物は、前述のアッセイ法のいずれかを用い、公知の抗真菌剤(例えば、アンホテリシンBおよびフルコナゾール)との併用について試験することができる。公知の抗真菌剤と組み合わせる化合物は、真菌感染症の治療または予防のための投薬様式に組込むことができるので、特に有用な化合物である。

【0045】

下記実施例は、本発明を例示するためのものである。これらはいかなる意味においても本発明を制限するものではない。

【0046】

実施例1：アナーヒヌム・ベリディフォリウム(bellidifolium)からの抗真菌化合物の単離

A.ベリディフォリウム(Scrophulariaceae)の植物細胞培養物を、A.ベリディフォリウムの種子を用いて調製した。これらの種子を、5%ドメストス(Domestos)(活性塩素0.25%)中に含浸し15分間滅菌した。滅菌した種子を、種子発芽用培地(Gamborgs B5処方に従い変更したB83)、+ショ糖(1%)、ホルモン非含有、およびB83+プロピコナゾール(10mg/L))上に置いた。発芽および根/徒長枝の適当に成長した時点で、滅菌種子を、およそ5mmの小片に細断し、凝固したカルス誘導培地B50(Gamborgs B5処方に従い変更、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)(1mg/L)、キネチン(0.1mg/L)、ココナツ水(100ml/L)、ショ糖(2%)含有)上に置いた。カルス生成時に、この物質を用いて懸濁培養を開始した。

【0047】

懸濁培養物を確立するために、播種外植片+カルスの一部を、2,4-D(1mg/L)、キネチン(0.1mg/L)、ココナツ水(100ml/L)+3%ショ糖を含むように、ガンボーグス(Gamborgs)B5処方に従い変更したB88上に配置した(Gamborgら、Exp. Cell. Res., 50:151~158(1968))。この懸濁培地は14日間隔で補充した。3ヶ月後、確立された液体懸濁培養物を、250mL三角フラスコ中で常に維持し、14日目の懸濁培養物の28mLを、新鮮なB88培地100mLに移した。この培養物を、連続して暗所で140rpmで振盪しながら25 でインキュベーションした。

【0048】

産生培地B49(Gamborgs B5、5%ショ糖、ホルモン非含有)750mLが入った2Lの三角フラスコに、14日目の懸濁培養物256mLを接種した。7日間増殖した後、フィルター滅菌したメチルジャスモン酸(methyl jasmonate)(最終濃度250μM)およびオートクレーブにかけたカンジダ・アルピカンス調製物(最終濃度50mg/L)を添加した。この細胞培養物を、更に6日間後に減圧濾過により収集した。C.アルピカンス調製物は、YEPD培地(酵母抽出物1%、酵母ペプトン2%、グルコース2%)上のATCC 28516の培養物を最大細胞密度まで増殖することにより得、かつ総酵母培養物を、植物培養物に添加する前に、2回オートクレーブにかけた。

【0049】

引き続いて、再増殖を数回の短期間冷蔵保存した材料を用いて行い、これにより、3日目の培養物140mLを排気蓋付き平底600mL組織培養フラスコに入れ、その後15 で91日間保存した。その後培養物を取り出し、かつ14日間隔で交換される培地が入った250mL三角フラスコに入れ、培養物が日常的に維持されるまで、14日培養物の40mLを100mLの新鮮B88培地

10

20

30

40

50

に移すことにより維持した。収集後、分離した細胞を凍結乾燥し、その後抽出した。

【0050】

実施例2：化合物1～5の単離

6Lの細胞培養物AB-03499-T2(A. ペリディフォルム)からの凍結乾燥した細胞バイオマス(41g)を解凍し、水で十分洗浄し、その後乾燥した。これは、塩化メチレン/メタノール1:1溶液2Lで抽出した。乾燥した抽出物(2.8g)を、ディアイオン(Diaion) HP-20(登録商標)カラム(内径2.5cm、深さ25cm)上に吸着・分画し、かつH₂O、H₂O中の20% MeOH、MeOHおよびアセトンで溶離し、各々画分A1、A2、A3およびA4とした。HPLC分析は、ほとんどのアセチレン誘導体が画分A3中に認められたことを示した(Nova-pak HR C-18カラム(3.9 x 300mm)、20% CH₃CN(0.1% HCOOH)から100% CH₃CN(0.1% HCOOH)までの勾配、14分間)。画分A3(310mg)を、自重カラムクロマトグラフィー(gravity column chromatography)(逆相C-18)により、溶媒系40% MeOHを用い更に分画し、化合物1(50mg)、化合物2(6mg)、化合物3(5mg)、および複合混合物(7mg)とし、後者を更に順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー上で、ヘキサンおよびアセトンの混合液(5:1)用い精製し、化合物4(3mg)および化合物5(2mg)を得た。

10

【0051】

化合物1. UV: 247, 260, 289, 308, 328; 分子式: C₁₈H₂₀O₃; ESMS: m/z 283 [M-H]⁻ ネガティブモード、m/z 307 [M+Na]⁺ ポジティブモード、ヒューレットパッカード(Hewlett Packard)において; HRFABMS: m/z 284.1419 (計算値284.1412) [M]⁺、m/z 307.1297 (計算値307.1311) [M+Na]⁺、フィニガム(Finnigam) MAT95Qにおいて、m/Δm=4,000、10% バレーデフィニション(valley definition)使用。この基質は、3-ニトロベンジルアルコールであった。NMRデータ: 表1参照、(Varian Unity装置上、プロトンについて)。

20

【0052】

化合物2. ESMS m/z: 279 [M+Na]⁺ (C₁₆H₁₆O₃Naについて計算 [279])。

【0053】

化合物3. 非晶質ガム: UV (MeOH_{max} nm: 213, 247, 260, 290, 308, および328; ¹H-および¹³C-NMR: 表1: ESMS m/z: 293 [M+Na]⁺ (C₁₇H₁₈O₃Naについて計算、[293])。

【0054】

化合物4. 非晶質ガム: UV (MeOH_{max} nm: 213, 247, 260, 290, 308, および328; ¹H-および¹³C-NMR: 表1: ESMS m/z: 295 [M+Na]⁺ (C₁₈H₂₄O₂Naについて計算、[295])。

30

【0055】

化合物5. 非晶質ガム: UV (MeOH_{max} nm: 213, 247, 260, 290, 308, および328; ¹H-および¹³C-NMR: 表1: ESMS m/z: 307 [M+Na]⁺ (C₁₈H₂₀O₃Naについて計算、[307])。

【0056】

【表1】

	化合物 1		化合物 2		化合物 3		化合物 4		化合物 5		化合物 6		化合物 7	
	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H
1	177.7 (s)	2.28 (t, J=7.5 Hz, 2H)	177.6 (s)	2.31 (t, J=7.5 Hz)	177.7 (s)	2.30 (t, J=7.5 Hz)	177.8 (s)	2.28 (t, J=7.5 Hz)	177.9 (s)	2.28 (t, J=7.5 Hz)	177.8 (s)	2.28 (t, J=7.5 Hz, 2H)	176.0 (s)	2.33 (t, J=7.5 Hz, 2H)
2	34.9 (t)	1.60 (m, 2H)	34.8 (t)	1.63 (m)	34.9 (t)	1.62 (m)	35.0 (t)	1.60 (m)	35.0 (t)	1.60 (m)	35.1 (t)	1.60 (m, 2H)	34.8 (t)	1.63 (m)
3	26.1 (t)	1.36 (m)	25.9 (t)	1.63 (m)	26.0 (t)	1.50-1.29 (m) ^b	26.1 (t)	1.60 (m)	26.1 (t)	1.60 (m)	26.1 (t) ^a	1.60 (m, 2H)	26.0 (t)	1.63 (m)
4	30.1 (t) ^a	1.36 (m)	29.7 (t) ^a	1.51-1.29 (m) ^c	29.8 (t) ^a	1.51-1.29 (m) ^b	30.1 (t) ^a	1.41-1.30 (m) ^c	30.1 (t) ^a	1.50-1.29 (m) ^b	30.1 (t) ^a	1.36 (m)	30.1 (t)	1.36 (m)
5	30.1 (t) ^a	1.36 (m)	29.5 (t) ^a	1.51-1.29 (m) ^c	30.0 (t) ^a	1.51-1.29 (m) ^b	30.3 (t) ^a	1.41-1.30 (m) ^c	30.1 (t) ^a	1.51-1.29 (m) ^b	30.2 (t) ^a	1.36 (m)	30.0 (t) ^a	1.36 (m)
6	30.0 (t) ^a	1.36 (m)	31.7 (t)	2.38 (q, J=7.5 Hz)	29.7 (t) ^a	1.50-1.29 (m) ^b	30.3 (t) ^a	1.41-1.30 (m) ^c	30.0 (t) ^a	1.50-1.29 (m) ^b	30.4 (t) ^a	1.36 (m)	29.9 (t) ^a	1.36 (m)
7	29.6 (t)	1.46 (m, 2H)	150.1 (d)	6.22 (dt, J=10.8, 7.5 Hz)	31.7 (t)	2.38 (q, J=7.5 Hz)	30.2 (t) ^a	1.41-1.30 (m) ^c	29.5 (t) ^a	1.50-1.29 (m) ^b	26.2 (t) ^a	1.37 (m)	29.6 (t)	1.47 (m)
8	31.7 (t)	2.36 (qd, J=7.5, 1.2 Hz, 2H)	108.7 (d)	5.64 (br d, J=10.8 Hz)	150.3 (d)	6.22 (dt, J=10.8, 7.5 Hz)	28.0 (t)	2.09 (qd, J=6.6, 1.2 Hz)	31.7 (t)	2.19 (qd, J=7.5, 1.2 Hz)	33.5 (t)	1.49 (m)	31.7 (t)	2.37 (qd, J=7.5, 1.2 Hz, 2H)
9	150.4 (d)	6.21 (dt, J=10.8, 7.5 Hz, 1H)	82.3 (s)		108.7 (d)	5.64 (dt, J=10.8, 7.5 Hz)	133.7 (d)	5.55-5.48 (m) ^d	151.1 (d)	6.40 (dt, J=15.9, 1.2 Hz)	86.4 (d)	4.30 (q, J=7.2 Hz, 1H)	150.4 (d)	6.22 (dt, J=10.8, 7.5 Hz, 1H)

10

20

30

	化合物 1	化合物 2	化合物 3	化合物 4	化合物 5	化合物 6	化合物 7
10	108.6 (d) 5.63 (dt, J=10.8, 1.2 Hz, 1H)	78.9 (s)	82.4 (s)	123.7 (d) 5.64 (dt, J=10.8, 6.6, 1.2 Hz)	109.2 (d) 5.67 (dt, J=15.9, 1.2 Hz)	147.7 (d) 6.23 (dd, J=15.9, 7.2 Hz, 1H)	108.6 (d) 5.65 (dt, J=10.8, 1.2 Hz, 1H)
11	82.4 (s)	77.6 (s)	78.9 (s)	18.4 (t) 3.10 (d, J=6.6 Hz)	84.4 (s)	112.0 (d) 5.85 (d, J=15.9, 7.2 Hz, 1H)	82.4 (s)
12	79.0 (s) ^b	71.9 (s)	77.6 (s)	83.5 (s)	79.2 (s)	80.9 (s) ^b	79.0 (s) ^b
13	77.6 (s) ^b	137.8 (s)	71.9 (s)	65.6 (s)	77.4 (s)	75.0 (s) ^b	77.6 (s) ^b
14	71.9 (s)	119.0 (d) 6.80 (d, J=3.3, 3 Hz)	137.7 (s)	72.7 (s)	70.5 (s)	78.9 (s) ^b	71.9 (s)
15	137.7 (s)	112.3 (d) 6.49 (dd, J=3.3, 1.8 Hz)	119.0 (d) 6.80 (dd, J=3.3, 3, 0.6 Hz)	79.5 (s)	137.7 (s)	79.1 (s) ^b	137.7 (s)
16	119.0 (d) 6.78 (dd, J=3.3, 0.9 Hz, 1H)	146.3 (d) 7.55 (d, J=1.8 Hz)	112.3 (d) 6.49 (dd, J=3.3, 1.8 Hz)	110.0 (d) 5.55-5.48 (m) ^a	118.8 (d) 6.77 (br d, J=3.3 Hz)	109.9 (d) 5.59 (bd, J=10.8 Hz, 1H)	119.0 (d) 6.80 (dd, J=3.3, 0.9 Hz, 1H)
17	112.3 (d) 6.47 (dd, J=3.3, 1.8 Hz, 1H)		146.3 (d) 7.55 (d, J=1.8 0.6 Hz)	143.0 (d) 6.15 (dq, J=10.8 6.9 Hz)	112.2 (d) 6.47 (dd, J=3.3, 3, 1.8 Hz)	143.8 (d) 6.20 (dq, J=10.8, 6.89 Hz, 1H)	112.3 (d) 6.49 (dd, J=3.3, 2.1 Hz, 1H)
18	146.3 (d) 7.53 (dd, J=1.8, 0.9 Hz, 1H)			16.3 (q) 1.88 (dd, J=6.9, 1.8 Hz)	146.2 (d) 7.53 (br d, J=1.8 Hz)	16.4 (q) 1.90 (dd, J=6.9, 1.8 Hz, 3H)	146.3 (d) 7.55 (dd, J=2.1, 0.9 Hz, 1H)

10

20

30

40

【 0 0 5 7 】

実施例3：アナーヒヌム・コルシカム (corsicum) からの抗真菌化合物の単離

A. コルシカム(Scrophulariaceae)からの植物細胞培養物を、A. コルシカムの種子を用いて調製した。種子を、30% キロリン (Klorin) + ツイーン (Tween) 20中に30分間、引き続き3% H₂O₂中に3分間含浸することにより滅菌した。滅菌した種子を、種子発芽用培地(Gamborgs B5処方に従い変更したB83、+ ショ糖(1%)、ホルモン非含有、およびB83 + プロピコナゾール(10mg/L))上に置いた。発芽および根/徒長枝の適当に成長した時点で、滅菌種子を、およそ5mmの小片に細断し、凝固したカルス誘導培地B50(Gamborgs B5処方に従い変更、2,4-D(1mg/L)、キネチン(0.1mg/L)、ココナツ水(100ml/L)、ショ糖(2%)含有)上に置いた。開始後2ヶ月で、カルスを確立した。

50

【 0 0 5 8 】

懸濁培養物を確立するために、確立したカルスの一部を、2,4-D(1mg/L)、キネチン(0.1mg/L)、ココナツ水(100ml/L)、グルタミン(1.46mg/L) + 3% ショ糖を含むように、ガンボーグス (Gamborgs) B5処方に従い変更したB105上に配置した。この懸濁培地は14日間隔で補充した。2ヶ月後、確立された液体懸濁培養物を、250mL三角フラスコ中で日常的に維持し、14日目の懸濁培養物の40mLを、新鮮なB105培地100mLに移した。この培養物を、連続して暗所で140rpmで振盪しながら25℃でインキュベーションした。

【 0 0 5 9 】

この培養物は、下記のように試料産生のために調製した：懸濁液の40mLの一定分量を、0日目採取し、100mlフラスコに移した。3日目に、水を溶媒とする5-アザシチジン(5-AC)の滅菌溶液を、最終濃度 3×10^{-5} Mとなるよう添加し、得られた混合物を11日間インキュベーションした。次に5-AC処理した培養物40mLを、2回継代培養し、その後より大規模な更なる操作のために移した。

10

【 0 0 6 0 】

産生培地B49(Gamborgs B5、5% ショ糖、ホルモン非含有)190mLが入った500mLの三角フラスコに、14日目の懸濁培養物70mLを接種した。7日間増殖した後、フィルター滅菌したメチルジャスモン酸(最終濃度250 μ M)およびオートクレーブにかけたC.アルピカンス調製物(最終濃度50mg/L)を添加した。この細胞培養物を、更に6日間後に減圧濾過により収集した。C.アルピカンス調製物は、YEPD培地(酵母抽出物1%、酵母ペプトン2%、グルコース2%)上のATCC 28516の培養物を最大細胞密度まで増殖することにより得、かつ総酵母培養物を、植物培養物に添加する前に、2回オートクレーブにかけた。

20

【 0 0 6 1 】

収集後、分離した細胞を、抽出前に凍結乾燥した。

【 0 0 6 2 】

実施例4：化合物6の単離

LP416E8 (AC-05081-T4-3)は、A. コルシカム由来の操作した植物細胞培養物の有機抽出物であった。この抽出物は、スクリーニングにおいて多剤耐性(MDR)4重(quadruple)ノックアウト株C.アルピカンスDSY1024に対し抗真菌活性を示したので、生体活性が示された画分の対象であった。LP416E8の当初の抽出物の IC_{50} は、この生物に対し3.2 μ g/mLであった。

30

【 0 0 6 3 】

20L培養物由来の粗細胞バイオマスを、濾過しかつ蒸留水で洗浄した。乾燥したバイオマス(393g)を、ジクロロメタンおよびメタノール(1:1)の2Lと混合し、かつ1.5時間攪拌した。バイオマスを濾過により除去した。この抽出操作を3回繰り返した。乾燥した有機抽出物(19.7g)を、回転蒸発器中減圧下での溶媒除去により得た。

【 0 0 6 4 】

乾燥した抽出物(19.0g)を、HP-20(登録商標)ポリスチレン樹脂と混合し、次に100%蒸留水で平衡化したHP-20(登録商標)ポリスチレン樹脂カラム(2000mL)に適用した。カラムを、水中のアセトニトリル濃度が漸増する(25%、40%、60%、70%、80%)2L画分による、段階濃度勾配溶媒系で溶離した。次にカラムを、メタノール、アセトンおよびジクロロメタンの2L分量(portion)で順次溶離した。各画分から、溶媒を減圧除去した。括弧内の重量を伴う画分を、溶離の順に、A1(9.33g)、A2(1.55g)、A3(0.40g)、A4(0.49g)、A5(0.32g)、A6(0.60g)、A7(2.38g)、およびA8(0.67g)と称した。活性画分A6(0.60g)を、セファデックス (Sephadex) LH-20(登録商標)カラムクロマトグラフィー上で、ヘキサン-ジクロロメタン(1:1)による溶離により更に分画し、次にメタノールで洗浄し、下記の画分を得た；B1(8mg)、B2(78mg)、B3(104mg)、B4(12mg)、B5(4mg)、B6(26mg)、およびB7(0.7mg)。画分B4は、化合物1と同定した。画分B3は、同じ溶媒系で溶離した別のセファデックス LH-20(登録商標)カラムを通過させ、26個の画分を収集した。画分C22、C23およびC24と一緒にし、TLCおよび 1H NMRにより同定された化合物1の総量13mgを得た。

40

【 0 0 6 5 】

50

画分C6～C9を更に分画し、化合物4および化合物6を得た。各々は最初にシリカゲル分取TLCプレートに適用した。このプレートを、n-ヘキサン-EtOAc(3:1)で2回発色した。各プレートから、UV光照射により視認された最高のRfバンド(画分C6D1、C7D1、C8D1およびC9D1)を取り出し、アセトンで抽出した。4種の有機抽出物を一緒にし、かつ濃縮し、化合物5(～4mg)を得、これはNMRおよびMSデータから確認した(表1)。

【0066】

画分C8およびC9については、前述の分取TLCプレートの3番目に高いRfバンドを取り出し、かつアセトンで抽出した。2種の有機抽出物を一緒にし、化合物6(～3mg)を得、これはNMRおよびMSデータから確認した(表1)。

【0067】

10

実施例5:化合物1のメチル化

化合物1の3.3mgを、MeOH 1mLに溶解し、かつこの溶液に、過剰量のトリメチルシリルジアゾメタン(～0.3mL)を添加した。この反応混合液を、室温で5時間攪拌せずに放置した。溶媒および過剰な試薬を、窒素掃流で除去した。残渣を、ヘキサンに溶解し、かつシリカゲルPTLCに適用し、ヘキサン-EtOAc(3:1)で発色した。Rf～0.9の大きいバンドを取り出し、アセトンで抽出した。アセトンは窒素掃流で除去し、かつ化合物7の2.5mg(化合物1のメチルエステル)を得た(表1)。

【0068】

実施例6:化合物1の真菌増殖阻害

本明細書に記した細胞増殖アッセイ法を用い、化合物1を、それらのC.アルビカンス、C.ケファー、C.トロピカリス、C.クルセイ、およびC.グラブラタの増殖の阻害能について試験した。MICおよびIC₅₀値を表2に示す。フルコナゾール耐性であるC.アルビカンス株93-1226およびUTR-14を含む全ての被験株の増殖は、IC₅₀値0.35～42ng/mLで阻害された。

20

【0069】

【表2】

	MIC (ng/mL)	IC ₅₀ (ng/mL)
<i>C. アルビカンス</i>		
<i>DSY1024</i>	0.625 1.25 2.5	0.35 1.2 1.6
<i>SC5314</i>	0.625 1.25 2.5	.36 1.2 1.5
90028	1.25	1.22
A26	1.25	1.10
#64	5	1.45
<i>UTR-14^a</i>	2.5	3.64
<i>93-1226^a</i>	2.5	2.10
<i>C. ケファー</i>		
46764	10	10-5
<i>C. トロピカリス</i>		
623-20	5	2.96
750	5	4.67
97-1037	5	3.68
<i>C. クルセイ</i>		
6258	50	41.90
97-1037	50	26.10
<i>C. グラブラタ</i>		
90030	5	12.5-25
95-2421	12.5	8.25
95-2425	12.5	3.13-6.25

^aフルコナゾール耐性株

【 0 0 7 0 】

更に化合物1の他の真菌株、更には細菌株および培養した哺乳類細胞に対する抗細胞増殖活性も試験した(表3)。真菌増殖は、IC₅₀値180ng/mL ~ 100mg/mLの範囲で阻害された。細菌細胞増殖および哺乳類細胞増殖は、実質的により高い濃度の化合物1で阻害された。

【 0 0 7 1 】

【 表 3 】

	MIC (μg/ml)	IC ₅₀ (μg/ml)
<i>S. セレビジエ AD1-9</i>	0.25	0.18
<i>S. セレビジエ 2229-5C</i>	1	0.5-1.0
<i>A. フミガースツ 8001</i>	200	50-100
<i>S. アウレウス 29213</i>	50	31.6
<i>E. フィカリス 29212</i>	12.5	7.5
<i>E. コリ 700</i>	>200	未測定
ペロ細胞	未測定	31.0, 5.7
HFF 細胞	未測定	12

10

【 0 0 7 2 】

実施例7：化合物2～7の真菌増殖阻害

本明細書に記した一般的細胞増殖アッセイ法を用い、化合物2～7を、*C. アルビカンス*株DSY1024およびSC5314の増殖を阻害するそれらの能力についてアッセイした。結果を表4に示す。これらの化合物は各々、4種のMDR変異体を有する株DSY1024の増殖を阻害し、その結果これは増殖阻害剤に対してより感受性があると予想された。化合物2、6および7も、株SC5314の増殖を阻害することができた。

20

【 0 0 7 3 】

【表4】

		DSY1024	SC5314
化合物 2	MIC (ng/ml)	3125	3125
	IC ₅₀ (ng/ml)	1817	2592
化合物 3	MIC (ng/ml)	1000	未測定
	IC ₅₀ (ng/ml)	503	未測定
化合物 4	MIC (ng/ml)	100000	100000
	IC ₅₀ (ng/ml)	68000	88200
化合物 5	MIC (ng/ml)	7.8	未測定
	IC ₅₀ (ng/ml)	3.9	未測定
化合物 6	MIC (ng/ml)	12500	12500
	IC ₅₀ (ng/ml)	11300	8500
化合物 7	MIC (ng/ml)	250	250
	IC ₅₀ (ng/ml)	190	221

30

【 0 0 7 4 】

皮膚糸状菌増殖の阻害

本発明の化合物は、更に皮膚糸状菌に対しても有効である。NCCLS M27A 抗真菌剤プロトコールを基にした微量希釈法を用いて試験を行った。被験化合物をDMSO中に調製し、かつRPMI 1640培地(皮膚糸状菌増殖培地)中に適当な濃度に希釈した。各被験生物の接種物を、オートミール寒天プレートから、 $0.5 \sim 2.5 \times 10^3$ 分生子/mLを含有するように調製した。接種物100 μLを、被験化合物4 μLおよびRPMI 1640の96 μLの入った96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに添加した。テルбинаフィン(商標名、Lamisil(登録商標)として販売)を陽性対照として用いた。プレートを、35℃で4日間インキュベーションし、MICを目視により決定した。データを下記表にまとめる。

40

【 0 0 7 5 】

【表5】

生物	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	化合物 1	化合物 3	化合物 7	テルビナフィン
<i>T. ルブルム</i>	0.001	8.0	0.125	0.002
<i>T. メンタグロフィテス</i>	0.001	2.0	0.125	0.004
<i>T. トンスランス</i>	0.001	2.0	0.125	0.015
<i>M. カニス</i>	0.001	2.0	0.125	0.015

【 0 0 7 6 】

10

その他の態様

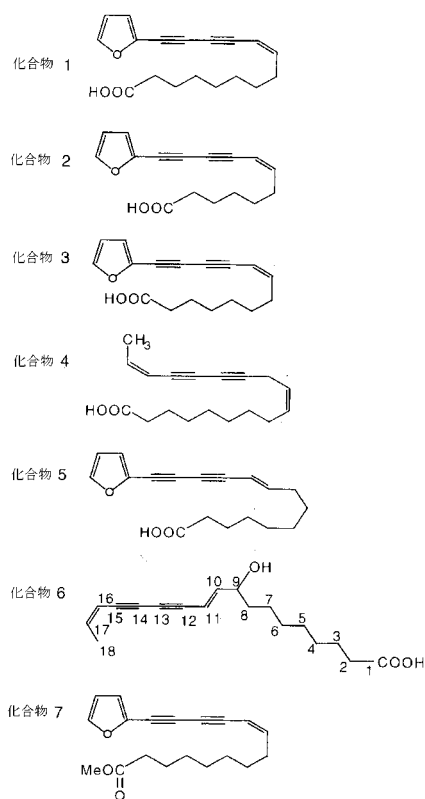
前述の説明から、当業者は、本発明の本質的特徴を容易に理解し、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な用途および条件に適合できるよう、本発明の様々な変更および修飾を施すことができるであろう。本明細書において言及された全ての文献および特許は、本明細書に参照として組入れられている。

【図面の簡単な説明】

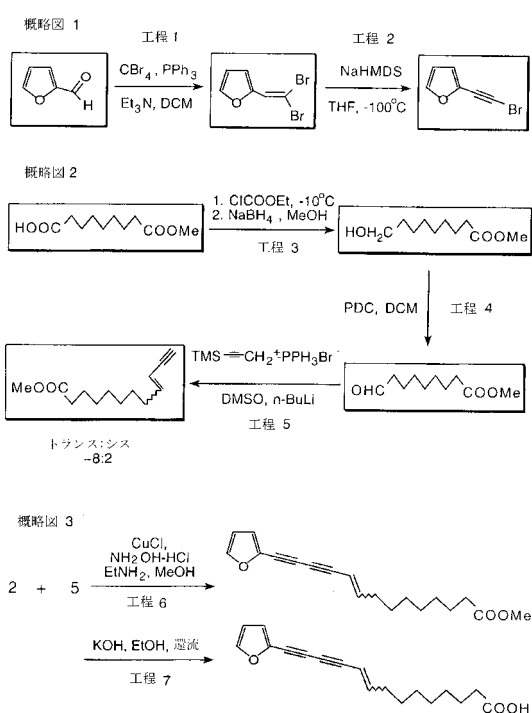
【図 1】 図1は、化合物1~7の構造を示す概略図である。

【図 2】 図2は、化合物1、5および7の合成法を示す概略図である。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 D 207/337	(2006.01)	C 0 7 D 207/337	
C 0 7 D 333/24	(2006.01)	C 0 7 D 333/24	
A 6 1 K 31/40	(2006.01)	A 6 1 K 31/40	
A 6 1 K 31/381	(2006.01)	A 6 1 K 31/381	
A 0 1 N 43/10	(2006.01)	A 0 1 N 43/10	C
A 0 1 N 43/36	(2006.01)	A 0 1 N 43/36	A

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 キュイ バオリャン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウェストボロ ターンバイク ロード 295

(72)発明者 マカルパイン ジェームス ブルース

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボルトン ケトル ホール ロード 180

(72)発明者 タルボット モーリン ケリー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 シュルーズベリー グラフトン ストリート 532

(72)発明者 ヤン シュ・ウェイ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウースター ナンバー 1 ルイス ストリート 9

審査官 井上 典之

(56)参考文献 米国特許第03919260(US,A)

特開昭62-029568(JP,A)

特開昭63-190878(JP,A)

特開平03-170448(JP,A)

米国特許第03475462(US,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07D 307/

C07D 207/

C07D 333/

A61K 31/

A01N 43/

CA/REGISTRY(STN)