



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C07G 17/00, C12P 1/06 A61K 35/74, C12N 1/20 // (C12P 1/06, C12R 1:465) (C12N 1/20, C12R 1:465)	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/05679 (43) 国際公開日 1994年3月17日 (17.03.1994)
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01276 (22) 国際出願日 1993年9月8日 (08. 09. 93) (30) 優先権データ 特願平 4/265646 1992年9月9日 (09. 09. 92) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本化薬株式会社 (NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP] 〒102 東京都千代田区富士見一丁目11番2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) 森野富夫 (MORINO, Tomio) [JP/JP] 〒330 埼玉県大宮市東大宮3-1-70 Saitama, (JP) 中谷綾子 (NAKATANI, Ayako) [JP/JP] 〒114 東京都北区豊島5-5-8-1220 Tokyo, (JP) 北川正行 (KITAGAWA, Masayuki) [JP/JP] 〒162 東京都新宿区戸山3-12-2 レオパレス新大久保204 Tokyo, (JP) 佐藤真彌 (SATO, Masaya) [JP/JP] 〒152 東京都目黒区目黒本町6-3-12 Tokyo, (JP) 原田 隆 (HARADA, Takashi) [JP/JP] 〒144 東京都大田区羽田3-15-11 Tokyo, (JP) 斎藤清一 (SAITO, Seiichi) [JP/JP] 〒277 千葉県柏市松葉町4-7-2-407 Chiba, (JP)		(74) 代理人 弁理士 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : NOVEL PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE NK175203, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF (54) 発明の名称 新規生理活性物質NK175203、その製造法及びその薬学的用途 (57) Abstract A novel physiologically active substance, NK175203, is obtained from the medium of incubation of an NK175203-producing bacterium belonging to the genus <i>Streptomyces</i>. It is useful as the active ingredient of a pharmaceutical composition for promoting the growth of myeloid cells.		

(57) 要約

ストレプトミセス属に属する生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3生産菌を培養することにより、生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3が生成蓄積し、培養液より採取される。さらに精製することにより、生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3が得られる。この生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3は骨髓細胞増殖促進のための医薬組成物の有効成分として有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	CS	チェコスロヴァキア	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	DK	デンマーク	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナ・ファソ	ES	スペイン	LU	ルクセンブルグ	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FI	フィンランド	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	FR	フランス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GA	ガボン	MG	マダガスカル	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GB	イギリス	ML	マリ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MN	モンゴル	TD	チャード
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	TG	トーゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	NE	ニジェール	US	米国
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	JP	日本	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム

明 細 書

新規生理活性物質 NK 1 7 5 2 0 3

その製造法及びその薬学的用途

5

技術分野

本発明は新規生理活性物質 NK 1 7 5 2 0 3 またはその薬学的に許容される塩に関する。更に詳細には、本発明は骨髓細胞の増殖促進作用等を有する新規生理活性物質 NK 1 7 5 2 0 3 もしくはその塩、その製造法およびその薬学的用途に関する。

背景技術

従来、骨髓細胞増殖促進剤としては、エリスロポイエチン (Miyake, T. et al., J. B. C., 252, 5558, 1977) 及び G - C S F (Nicola, N. A., Annu. Rev. Biochem., 339, 27-30, 1989) が知られている。しかし、これらは、蛋白製剤であるため、頻回投与ができず、同様の活性を有する低分子化合物の発見が待たれている。

発明の開示

20 本発明者らは、微生物の代謝産物について、種々検索した結果、放線菌に属する一菌株が、骨髓細胞の増殖促進作用等を有する生理活性物質 NK 1 7 5 2 0 3 を産生する事を見出した。

すなわち本発明の目的は下記の 1) ~ 10) の理化学的性質を示す新規生理活性物質 NK 1 7 5 2 0 3 または

25

その薬学的に許容される塩を提供することにある。

1) 外観；無色粉末

2) 分子量；FAB-MS (M)⁺ m/z 303

3) 元素分析値；C₁₂H₁₇NO₆S · H₂O

5	理論値 (%)	測定値
	C : 44.85	C : 44.82
	H : 5.96	H : 5.87
	N : 4.36	N : 4.34

4) 水に可溶、ヘキサン、クロロホルムに難溶

10 5) シリカゲル薄層クロマトグラフィーによるR_f値；
ブタノール；酢酸；水（4：1：2）の展開溶媒で
0.50を示す

6) UV吸収スペクトル（H₂O）

λ_{max} nm : 200

15 7) IR吸収スペクトル（KBr）cm⁻¹：

3400, 2950, 1735, 1600,

1400, 1300, 1145, 1040

8) ¹H-NMR（200MHz, D₂O） δ ppm：

4.30（1H, dd, J = 4.5, 7.8 Hz）,

20 2.97（1H, dd, J = 4.4, 13.6

Hz）, 2.92 - 2.62（5H, m）, 2.5

0 - 2.10（3H, m）, 2.00（3H, s）,

1.81（1H, m）

9) ¹³C-NMR（200MHz, D₂O） δ ppm：

25 226.9（s）, 185.2（s）, 179.9

(s), 176. 6(s), 57. 5(d), 56.
0(d), 52. 6(d), 40. 8(t), 37.
9(t), 33. 6(t), 28. 0(t), 24.
8(q).

- 5 10) 呈色反応；リンモリブデン酸－硫酸、トリジン－クロリンに陽性。

本発明の他の目的は、ストレプトミセス属に属し、上記の生理活性物質NK175203を生産する能力を有する生産菌を、培地に培養し、培養物中に生理活性物質
10 NK175203を生成蓄積せしめ、これを採取する事
を特徴とする生理活性物質NK175203の製造法を
提供することにある。

本発明の更に他の目的は、上記の生理活性物質NK1
75203またはその薬学的に許容される塩を有効成分
15 として含有する骨髓細胞増殖促進のための医薬組成物を
提供することにある。

本発明の更に他の目的は、上記の生理活性物質NK1
75203またはその薬学的に許容される塩の有効量を
投与することからなる骨髓細胞増殖促進方法を提供する
20 ことにある。

本発明の更に他の目的は、上記の生理活性物質NK1
75203またはその薬学的に許容される塩の医薬組成
物の有効成分としての使用を提供することにある。

本発明の更に他の目的は、ストレプトミセス属に属す
25 る上記の生理活性物質NK175203を生産する能力

を有する生産菌を提供することにある。

図面の簡単な説明

第1図は生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3のUVスペクトル (H_2O) を示す。

5 第2図は生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3のIRスペクトル (KBr) を示す。

第3図は生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3の ^1H-NMR (200MHz, D_2O) を示す。

第4図は生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3の $^{13}C-NMR$ (200MHz, D_2O) を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明化合物である生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3は薬学的に許容される塩であってもよく、かかる塩としては、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属、カルシウムなどのアルカリ土類金属等との塩が挙げられる。

新規生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3はストレプトミセス属に属するNK 1 7 5 2 0 3生産菌を培養し、生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3を生成蓄積せしめ、この培養物より生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3を採取することにより得られる。生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3の生産菌の代表的な1例は次の菌学的大よび生理学的性質を有する。

1. 形態的性質

27℃で2週間後に観察した結果、気菌糸は単純分岐し、その先端はらせん状あるいはフック状である。胞子のう及び輪生糸の形成は認められない。また、遊走子も

認められない。胞子表面は平滑または粗面で、胞子はシリンドー型で、大きさ $0.7 \sim 0.9 \times 0.9 \sim 1.3 \mu m$ である。また 20 個以上の連鎖をなして胞子が形成される。

5 2. 各種培地における生育

各種培地上、 $27^{\circ}C$ 、2 週間後の生育状態を下記表 1 に示す。

表 1

	培地	生育	気菌糸
10	シュクロース・硝酸塩寒天培地	適度	適度、茶白～明るい茶灰～黒色（吸湿性）
	グルコース・アスパラギン寒天培地	適度	豊富、茶白～明るい茶灰～黒色（吸湿性）
	グリセリン・アスパラギン寒天培地	適度	豊富、茶白～明るい茶灰～黒色（吸湿性）
15	スターチ・無機塩寒天培地	良好	適度、茶白～明るい茶灰～黒色（吸湿性）
	チロシン寒天培地	良好	適度、茶白～明るい茶灰～黒色（吸湿性）
20	栄養寒天培地	適度	適度、白色
	イースト・麦芽寒天培地	良好	豊富、茶白～明るい茶灰～黒色（吸湿性）
	オートミール寒天培地	適度	適度、茶白～明るい茶灰～黒色（吸湿性）
25	ペプトン・イースト鉄寒天培地	適度	適度、白色

	シュクロース・硝	無色～	なし
	酸塩寒天培地	淡黄色	
	グルコース・アス	淡黄色	わずかに茶色味
	パラギン寒天培地	～褐色	
5	グリセリン・アス	無色～	茶色味
	パラギン寒天培地	淡黄色	
	スターチ・無機	淡黄色	わずかに茶色味
	塩寒天培地		
	チロシン寒天培地	淡黄色	茶色味
		～淡褐色	
	栄養寒天培地	淡黄色	わずかに茶色味
10	イースト・	無色	わずかに茶色味
	麦芽寒天培地		
	オートミール	無色	なし
	寒天培地		
	ペプトン・イースト	淡黄色	なし
	鉄寒天培地		

15 3. 生理学的性質

- 1) 生育適度範囲：24～37℃
- 2) 硝酸塩の還元：陰性
- 3) ゼラチンの液化（グルコース・ペプトン・ゼラチン培地上、20℃）：擬陽性
- 20 4) スターチの加水分解（スターチ・無機塩寒天培地）：陽性
- 5) 脱脂牛乳の凝固：陰性
- 6) 脱脂牛乳のペプトン化：陽性
- 7) メラニン様色素の生成：陰性

25 4. 炭素源の利用生（プリドハム・ゴトリープ寒天

培地上)

	L - アラビノース	+
	D - キシロース	+
	D - グルコース	+
5	D - フラクトース	+
	シュクロース	+
	イノシトール	-
	L - ラムノース	-
	ラフィノール	+
10	D - マニトール	+

5. 細胞壁中のジアミノピメリン酸

LL - ジアミノピメリン酸である。

以上を要約すると、本菌株は細胞壁がLL - ジアミノ
ピメリン酸であり、インターナショナル・ストレプトミ
15 セス属・プロジェクト（略称ISP）の方法によれば、
胞子形成菌系の形態は、セクションスパイラルズ

（Spirales）に属し、胞子表面は平滑あるいは粗面で、
成熟した菌系の色は灰色系統（Gray color-series）で吸
湿性である。また、メラニン様色素は生産しない。基生
20 菌系の色は淡黄色あるいは淡褐色を呈する。炭素源とし
てはL - アラビノース、D - グルコース、D - フラクト
ース、シュクロース、ラフィノース、D - マニトール、
D - キシロースを利用する。

以上の性質をもとにアール・イー・ブッファナン・ア
25 ンド・エヌ・イー・ギボンス編、バーギーズ・マニユア

ル・オブ・デタミネーティブ・バクテリオロジー

(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第
8 版、1974 年に従って検索を行った結果、上記 NK
175203 株はストレプトミセス属に属することが判
5 明したので、本菌をストレプトミセス・エスピー
(*Streptomyces* sp.) NK 175203 と命名した。

該菌株は、工業技術院微生物工業技術研究所（日本国
茨城県）に、1992 年 7 月 10 日に微工研菌寄第 13
058 号（FERM P-13058）として寄託され
10 た。この寄託は更に 1993 年 7 月 28 日にブダペスト
条約による国際寄託に変更され受託番号 FERM BP
-4372 を得た。

本発明に用いるストレプトミセス属に属する菌株は他
のストレプトミセス属の菌株と同様、その性状が変化し
15 やすく、例えば紫外線、エックス線および薬品などを用
いる人工的な変異手段で容易に変異しうるものであり、
どの様な変異株であっても本発明の対象とする生理活性
物質 NK 175203 の生産能を有するものはすべて本
発明に使用することができる。

20 本発明により生理活性物質 NK 175203 を製造す
るには、まず前記菌株を放線菌が利用し得る栄養物を含
有する培地で好氣的に培養する。栄養源としては、従来
から放線菌の培養に利用されている公知のものが使用で
き、例えば炭素源としてはグルコース、フラクトース、
25 グリセリン、シュークロース、デキストリン、ガラクト

ース、有機酸などを単独かまたは組み合わせて用いることができる。

無機および有機窒素源としては塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーン・スチープ・リカー、大豆粉、綿実油カス、カザミノ酸、バクトソイトン、ソリュブル・ベジタブル・プロティン、オートミールなどを単独または組み合わせて用いることができる。

10 その他必要に応じて食塩、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウム、硫酸銅、硫酸鉄、硫酸亜鉛、塩化マンガン、リン酸塩などの無機塩類を加えることができるほか有機物、例えばアミノ酸類、ビタミン類、核酸類や無機物を適当に添加することができる。

15 培養法としては液体培養法、特に深部攪販培養法が最も適している。培養温度は15℃～35℃、pHは中性ないし微酸性で培養を行うことが望ましい。

液体培養では通常3～5日間培養を行うとNK175203物質が培養液中に生成蓄積される。培養液中の生成量が最大に達したときに培養を停止し、菌体と培養液をろ別し、目的物を精製単離する。

ろ液から本物質の精製単離には一般に微生物代謝生産物をその培養菌体から単離するために、用いられる分離精製の方法が利用される。

25 即ち、培養液は通常のろ過法でろ液と菌体部に分離す

る。

得られたろ液に、終濃度 3 % となる様に NaCl を加え、カーボン吸着カラムに吸着させる。次いで、3 % NaCl 溶液で、洗浄した後、蒸留水で溶出し、得られた活性画分を、減圧濃縮乾固する。次いで、ブタノール；酢酸；水で展開するシリカゲルカラムクロマトグラフィー、LH-20 カラムクロマトグラフィー、分取用高速液体クロマトグラフィーに順次かけ、活性画分を集める。最後に、上記の方法で、カーボン吸着カラムにかける事により脱塩を行ない、無色の NK 175203 物質を得る。

本発明の生理活性物質 NK 175203 またはその薬学的に許容される塩は後記の如く、骨髓細胞増殖促進作用を有する医薬品として期待されるものである。

15 医薬品として使用する場合の製剤化及び投与方法は従来公知の種々の方法が適用できる。すわなち、投与方法としては注射、経口、直腸投与などが可能である。製剤形態としては注射剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤、坐剤などの形態がとり得る。

20 製剤化の際に生理活性物質 NK 175203 またはその薬学的に許容される塩に悪影響を与えない限り、医薬用に用いられる種々の補助剤、すわなち、担体やその他の助剤、例えば安定剤、防腐剤、無痛化剤、乳化剤等が必要に応じて使用されうる。

25 製剤中において、生理活性物質 NK 175203 また

はその薬学的に許容される塩の含量は製剤形態等により
広範囲に変えることが可能であり、一般には生理活性物
質NK 1 7 5 2 0 3またはその薬学的に許容される塩を
0. 0 1 ~ 1 0 0 % (重量)、好ましくは0. 1 ~ 7 0
5 % (重量) 含有し、残りは通常医薬用に使用される担体
その他の補助剤からなる。

生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3またはその薬学的に許
容される塩の投与量は症状等により異なるが、成人1人
1日当り0. 0 1 ~ 8 0 0 mg程度である。連投を必要と
10 する場合には1日当り使用量をおさえることが好ましい。

次に試験例、実施例及び製剤例によって本発明を更に
詳細に説明する。

試験例 1

骨髓細胞に対する作用

15 C₅₇BL/6マウス(10週令)より、大腿骨を取り出
し、更にその骨髓細胞を、イーグルMEM培地に洗い出
した。これを37℃ 5%CO₂下で2時間放置後、静
かに上清を取る事により浮遊細胞のみを回収した。これ
を、1200rpm、5分間の遠心分離にかけて細胞を
20 集め、更にα-MEM培地で洗浄後、20%FBS含有
α-MEM培地に懸濁した。こうして得た骨髓細胞を、
本発明の生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3あるいはGM-
CSF(Lantrell.M.A.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci., 82,
6250-6254,1985)と同時に、96穴プレートに7. 5 ×
25 10⁵ cells/200μl/穴となる様に播種し、

37℃ 5%CO₂ 条件下で112時間培養した。最後に37KBqの³H-チミジンを加え、8時間培養後、細胞の³H-チミジンのとりこみを、液体シンチレーションカウンターにより測定した。

5 この結果を表2に示す。

表2 生理活性物質NK175203
の骨髄細胞増殖作用

	GM-CSF	NK175203	〔 ³ H〕-チミジンのとりこみ			
	U/ml	(μg/ml)	平均	±	標準偏差	%
10	0	0	860.2	± 416.4		100
		0.01	1106.7	± 84.5		128.7
		0.1	892.2	± 248.1		103.7
		1	881.2	± 506.2		102.4
15		10	600.6	± 21.2		69.8
		100	397.3	± 84.9		46.2
20	100	0	33484.4	± 2136.1		100
		0.01	43339.8	± 11996.2		129.4
		0.1	63397.1	± 1185.5		189.3
		1	43470.0	± 1065.3		129.8
		10	74630.0	± 10118.7		222.9
		100	531.1	± 18.5		1.6

25 この結果より、本発明の生理活性物質NK17520

3 は、低濃度において、骨髓細胞の増殖促進用を有し、
又、GM-CSF 100 U/ml、存在下では、広い薬
剤濃度において、相乗的に増殖を促進する事が判明した。

試験例 2

5 サイトカインの産生誘導に関する作用

ヒト白血病細胞株 TF-1 細胞 (Mckenzie A.N.J.,
Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 3735 - 3739, 1993) を、2
0 μ g/ml の本発明の生理活性物質 NK175203 を
含む 10% FCS-RPMI 1640 培地に、接種し、
10 37℃、5% CO₂ 下で、培養した。経時的に、1, 2,
3 日と、培養上清を採取し、含まれるサイトカインの量
(pg/ml) を、ELISA (Amersham 製) 法
(Amersham. Biotrack protocol, RPN2143, 2145 and 21
51) により、測定した。この結果を表 3 に示す。
15 尚、コントロールとしてリン酸緩衝液のみを用いた場
合についても比較として測定した。

表 3 NK175203 添加により産生される
サイトカイン量 (単位: pg/ml)

Day	GM-CSF		IL-6		IL-3	
	コントロール	NK175203	コントロール	NK175203	コントロール	NK175203
20						
1	6.8	10.5	0.4	4.2	0	13.2
2	7.5	20.3	—	—	—	—
3	7.1	19.7	—	—	—	—

これらの結果より、本発明化合物である生理活性物質
 NK 1 7 5 2 0 3 は GM - C S F、I L - 6 (Kishimoto,
 T., Blood, 74, 1-10, 1989)、I L - 3 [Ihle, J. N., The
 Year in Immunology, 1988 (Crume J. M. et al., Eds), New
 5 York, Karger, 59-102, 1989] 等のサイトカイン産生誘導を
 することが判明した。

実施例 1

生理活性物質 NK 1 7 5 2 0 3 の製造

(1) 醗酵

10 下記の組成を有する種培養培地を 5 0 0 ml 容の三
 角フラスコに 1 0 0 ml を分注し、1 2 0 °C、2 0 分
 間オートクレーブ滅菌した。これに NK 1 7 5 2 0
 3 株 (微工研菌寄 1 3 0 5 8 号) の - 白金耳を接種
 し、2 7 °C 2 0 0 回転 / 分の条件下で 2 日間培養
 15 しこれを種母とした。

種培養培地組成

	グリセリン	2 %
	グルコース	0 . 5 %
	大豆粉 (サンリッチ昭和産業)	1 . 5 %
20	ペプトン	0 . 5 %
	酵母エキス	0 . 0 5 %
	M g S O ₄	0 . 0 0 5 %
	K ₂ H P O ₄	0 . 0 5 %
	C a C O ₃	0 . 2 %
25	p H = 7 . 0 に修正 (N a O H で)	

本培養にあたり、まず、下記の組成を有する培地 1 0 0 ml を 5 0 0 ml 容の三角フラスコに分注し、1 2 0 °C 2 0 分間、オートクレーブ滅菌した。この培地 1 0 0 本に先の種母培養液を 2 ml ずつ接種し、2 7 °C で 2 0 0 回転 5 / 分、4 日目培養した。こうして得られた 1 0 リットルの培養液につき、フィルタープレスを用いてろ過を行い、ろ液を得た。

本培養培地

10	グルコース	2 %
	可溶性デンプン	1 %
	酵母エキス	1 %
	N Z アミン	0 . 7 %
	C a C O ₃	0 . 5 %
15	p H = 7 . 0 修正 (N a O H で)	

(2) 精製

得られたろ液 9 リットルに、終濃度 3 % となる様に、N a C l を加え、2 リットルのカーボン吸着カラムに 4 °C 下で吸着させた。次いで、3 % N a C l 20 溶液 4 リットルで、洗浄した後、室温にもどし、蒸留水で活性成分を溶出した。これを減圧濃縮乾固して得られた 5 . 2 g を、ブタノール ; 酢酸 ; 水 = 1 0 : 1 : 2 で展開する 5 0 0 ml のシリカゲルカラムクロマトグラフィーにかけ、活性画分を得た。これ 25 を濃縮して得られた 0 . 7 5 g を 2 0 % M e O H 水

溶液で展開する 800 ml の LH-20 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにかけ、活性画分 (103 mg) を得た。

次いで、これを下記の条件で分取用液体クロマトグラフィーにかけ、22.7 分の保持時間に出現する活性成分を、分取した。条件は移動相；2% アセトニトリル-1% リン酸、流速；3 ml/min、温度；40℃、検出波長；220 nm、カラム、ワコーシル I I 5 C 2 8 A R、カラムサイズ；10.0 × 250 mm である。こうして得た分取液を 20 cc のカーボン吸着カラムに先述の方法でかけて、脱塩を行なった。この溶出液を乾固すると、70 mg の生理活性物質 NK 175203 が得られた。この生理活性物質 NK 175203 の UV スペクトル (H₂O)、IR スペクトル (KBr)、¹H-NMR (200 MHz, D₂O) 及び ¹³C-NMR (200 MHz, D₂O) をそれぞれ第 1 図、第 2 図、第 3 図及び第 4 図に示した。

得られた生理活性物質 NK 175203 は下記の 1) ~ 10) の理化学的性質を示した。

- 1) 外観；無色粉末
- 2) 分子量；FAB-MS (M)⁺ m/z 303
- 3) 元素分析値；C₁₂H₁₇NO₆ · S · H₂O

理論値 (%)

測定値

C : 44.85

C : 44.82

H : 5.96

H : 5.87

N : 4 . 3 6

N : 4 . 3 4

4) 水に可溶、ヘキサン、クロロホルムに難溶

5) シリカゲル薄層クロマトグラフィーによる R f 値 ;

ブタノール ; 酢酸 ; 水 (4 : 1 : 2) の展開溶媒で

5 0 . 5 0 を示す

6) UV 吸収スペクトル (H₂ O) : $\lambda_{max} \text{ nm} : 200$ 7) IR 吸収スペクトル (K B r) cm⁻¹ :

3400, 2950, 1735, 1600, 1400, 1300, 1145, 1040

10 8) ¹H - NMR (200 MHz , D₂ O) δ p p m :

4 . 3 0 (1 H , d d , J = 4 . 5 , 7 . 8 H z) ,

2 . 9 7 (1 H , d d , J = 4 . 4 , 1 3 . 6

H z) , 2 . 9 2 - 2 . 6 2 (5 H , m) ,

2 . 5 0 - 2 . 1 0 (3 H , m) , 2 . 0 0 (3 H ,

15 s) , 1 . 8 1 (1 H , m) ;

9) ¹³C - NMR (200 MHz , D₂ O) δ p p m :

226 . 9 (s) , 185 . 2 (s) , 179 . 9

(s) , 176 . 6 (s) , 57 . 5 (d) , 56 .

0 (d) , 52 . 6 (d) , 40 . 8 (t) , 37 .

20 9 (t) , 33 . 6 (t) , 28 . 0 (t) , 24 .

8 (q) .

10) 呈色反応 ; リンモリブデン酸 - 硫酸、トリジン - クロリンに陽性。

製剤例 1

25 顆粒剤の製造

生理活性物質NK 175203のナトリウム塩50重量部、乳糖600部、結晶セルロース330部およびヒドロキシプロピルセルロース20部をよく混和し、ロール型圧縮機（ローラーコンパクターTM）を用いて圧縮し、破碎して19メッシュと16メッシュの間に入るよう篩過し、顆粒とした。

製剤例 2

錠剤の製造

生理活性物質NK 175203のナトリウム塩100重量部、結晶乳糖90部、結晶セルロース107部およびステアリン酸マグネシウム3部をV型混合機で混和後、打錠し、1錠300mgの錠剤を得た。

製剤例 3

注射剤の製造

15 生理活性物質NK 175203のナトリウム塩50重量部、マンニトール120重量部に対し蒸留水を加え全量を2000部としてこれを溶解後ミリポアフィルターGSタイプを用いて除菌ろ過する。このろ液2gを10mlのバイアルビンにとり凍結乾燥し、1バイアルに本化合物のナトリウム塩50mgを含む凍結乾燥注射剤を得た。

産業上の利用可能性

本発明で提供される新規生理活性物質NK 175203またはその塩は骨髓細胞の増殖促進作用等を有する。従って、例えば骨髓細胞増殖剤の有効成分として有用である。

25

請求の範囲

1. 下記の理化学的性状を示す生理活性物質NK 17

5 203 またはその薬学的に許容される塩:

1) 外観; 無色粉末

5 2) 分子量; FAB-MS (M)⁺ m/z 303

3) 元素分析値; C₁₂H₁₇NO₆ S · H₂O

理論値 (%)

測定値

C: 44.85

C: 44.82

H: 5.96

H: 5.87

10 N: 4.36

N: 4.34

4) 水に可溶、ヘキサン、クロロホルムに難溶

5) シリカゲル薄層クロマトグラフィーによるR_f値;
ブタノール; 酢酸; 水 (4:1:2) の展開溶媒で
0.50を示す

15 6) UV吸収スペクトル (H₂O):

λ_{max} nm: 200

7) IR吸収スペクトル (KBr) cm⁻¹:

3400, 2950, 1735, 1600,

1400, 1300, 1145, 1040

20 8) ¹H-NMR (200 MHz, D₂O) δ ppm:

4.30 (1H, dd, J = 4.5, 7.8 Hz),

2.97 (1H, dd, J = 4.4, 13.6

Hz), 2.92 - 2.62 (5H, m),

2.50 - 2.10 (3H, m), 2.00 (3H,

25 s), 1.81 (1H, m)

9) ^{13}C -NMR (200 MHz, D_2O) δ ppm :
226.9 (s), 185.2 (s), 179.9
(s), 176.6 (s), 57.5 (d), 56.
0 (d), 52.6 (d), 40.8 (t), 37.
5 9 (t), 33.6 (t), 28.0 (t), 24.
8 (q).

10) 呈色反応 ; リンモリブデン酸-硫酸、トリジン-クロリンに陽性。

2. ストレプトミセス属に属し、請求項1の生理活性
10 物質NK175203を生産する能力を有する生産菌を、
培地に培養し、培養物中に生理活性物質NK17520
3を生成蓄積せしめ、これを採取する事の特徴とする生
理活性物質NK175203の製造法。

3. 請求項1の生理活性物質NK175203または
15 その薬学的に許容される塩を有効成分とし、これに医薬
用の添加物とからなる骨髓細胞増殖促進のための医薬組
成物。

4. 請求項1の生理活性物質NK175203または
その薬学的に許容される塩の有効量を投与することから
20 なる骨髓細胞増殖促進方法。

5. 請求項1の生理活性物質NK175203または
その薬学的に許容される塩の医薬組成物の有効成分とし
ての使用。

6. 請求項1の生理活性物質NK175203または
25 その薬学的に許容される塩を有効成分として含有する骨

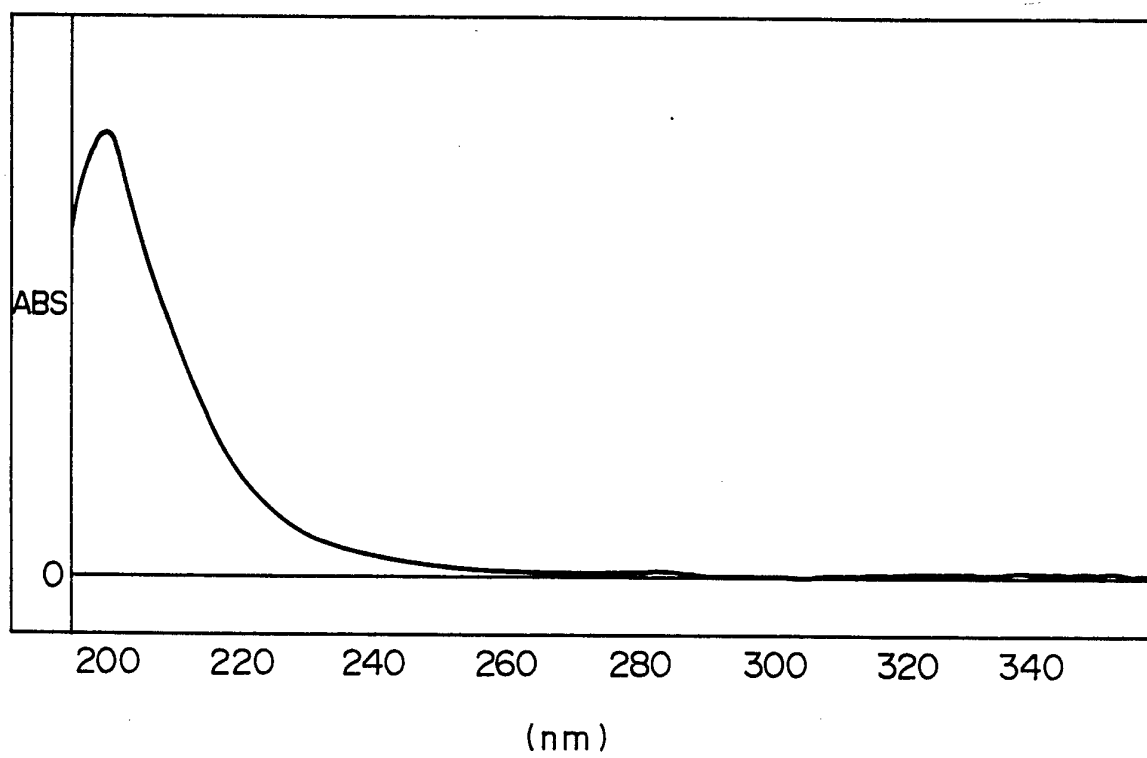
髓細胞増殖促進のための医薬組成物を製造するための生理活性物質NK 1 7 5 2 0 3またはその薬学的に許容される塩の使用。

7. ストレプトミセス属に属する請求項1の生理活性
5 物質NK 1 7 5 2 0 3を生産する能力を有する生産菌。

8. ストレプトミセス *sp.* NK 1 7 5 2 0 3株である請求項7の生産菌。

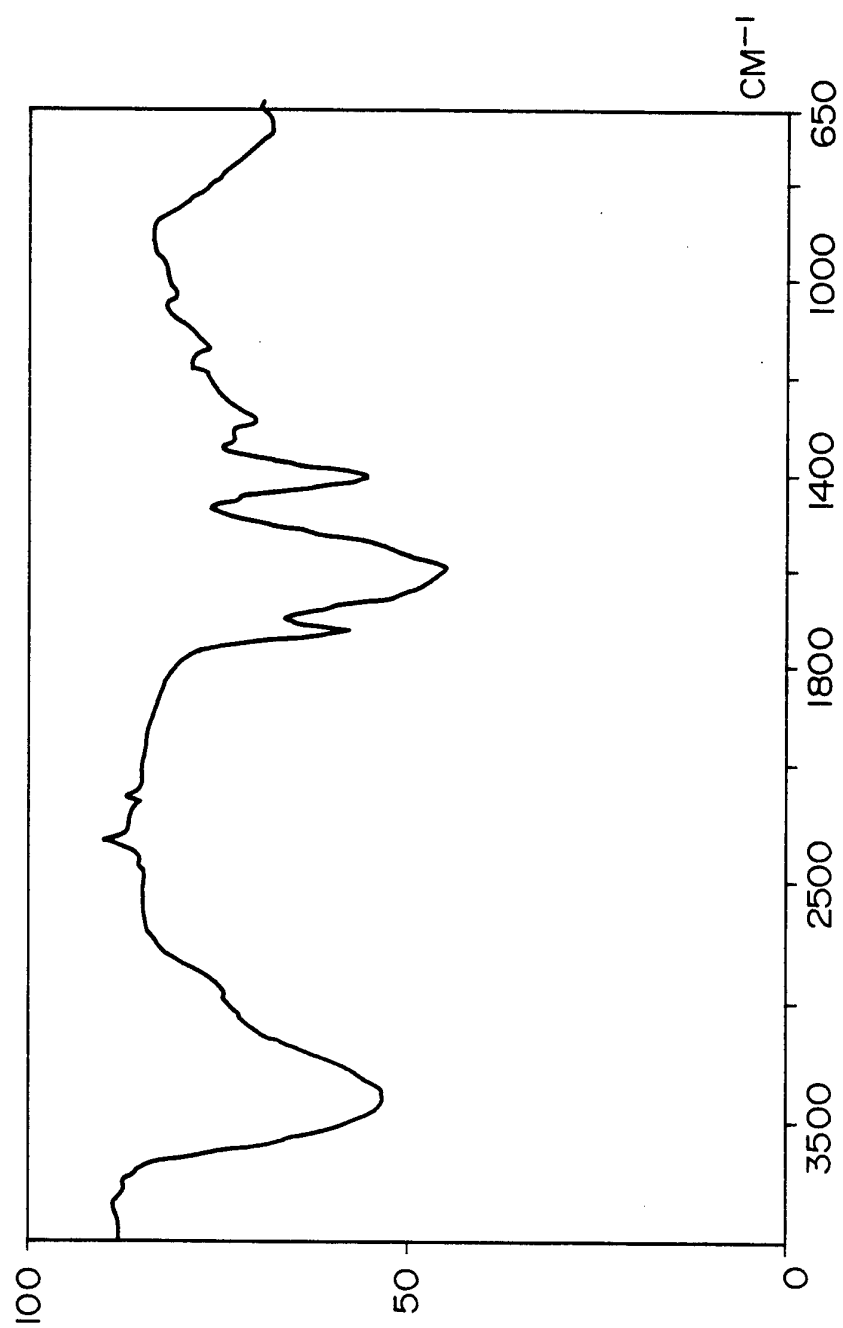
1/4

第1図



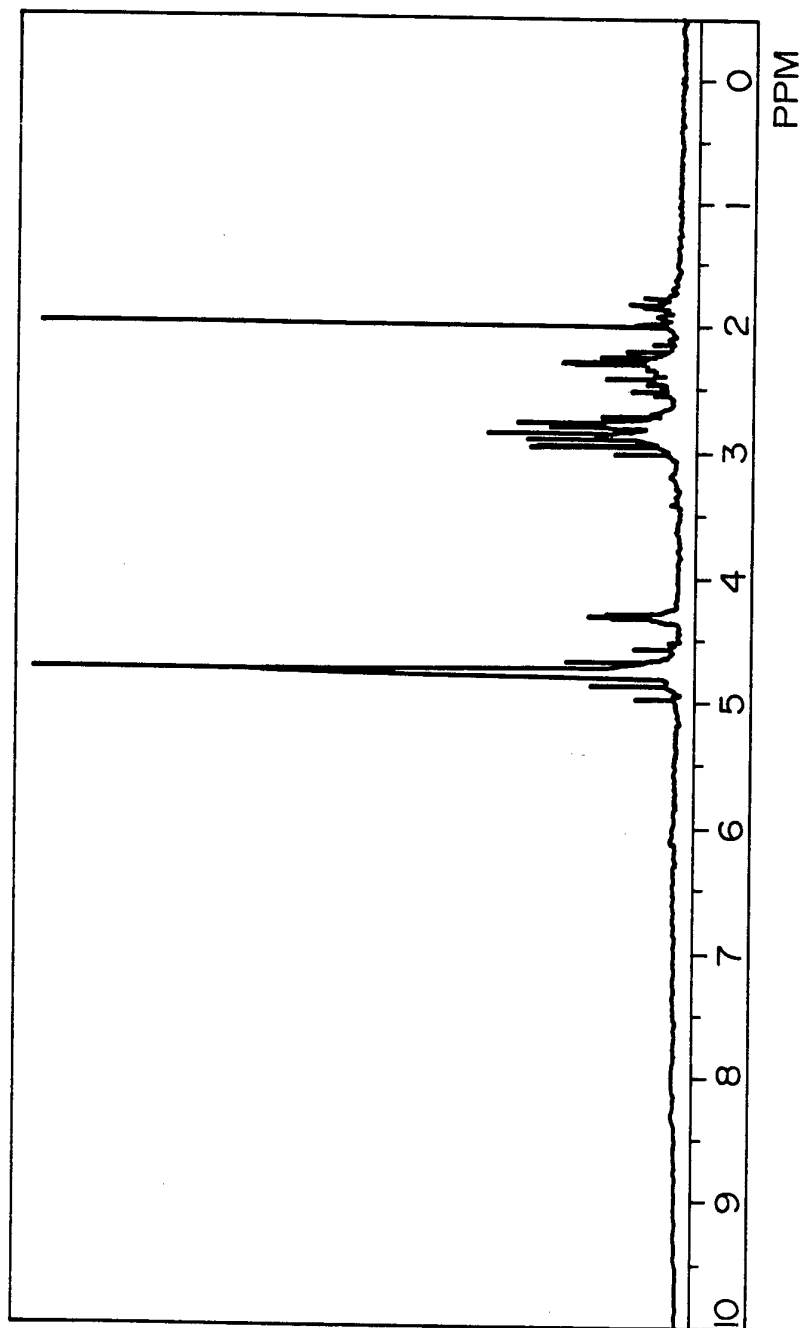
2/4

第2図



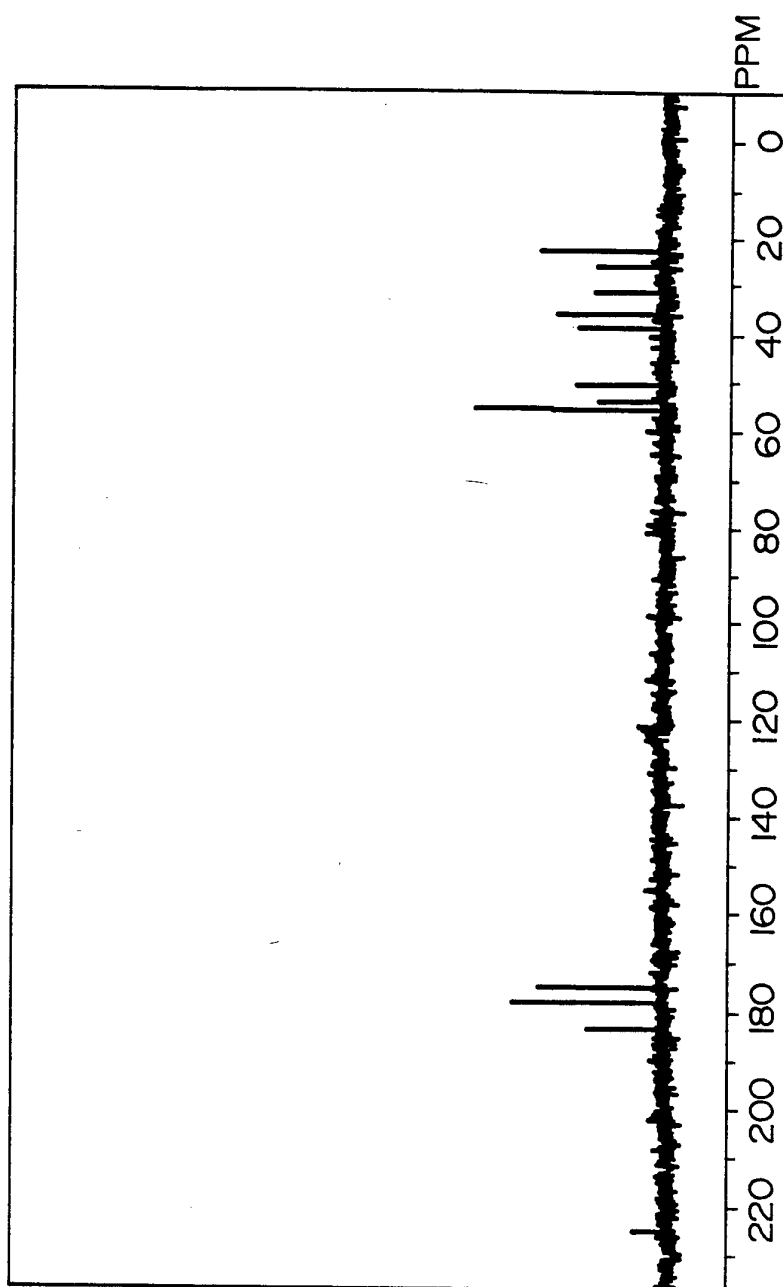
3 / 4

第3図



4 / 4

第4図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01276

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C07G17/00, C12P1/06, A61K35/74, C12N1/20//
(C12P1/06, C12R1:465), (C12N1/20, C12R1:465)

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. Cl⁵ C07G17/00, C12P1/06, A61K35/74, C12N1/20

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)

CAS ONLINE, BIOSIS PRE VIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 61-501627 (Kirin-Amgen, Inc.), August 7, 1986 (07. 08. 86), & WO, A, 85-02610 & AU, A, 85-37467 & ZA, A, 84-09625 & PT, A, 81213 & NO, A, 85-02384 & FI, A, 85-02377 & HU, T, T40694 & DK, A, 85-03651 & US, A, 4703008 & DD, A, 251786 & DD, A, 255359 & ES, A, 88-02329 & CN, A, 85-06191 & JP, A, 1-055190 & FI, A, 89-00498 & JP, B, 90-017156 & EP, B, 148605 & DE, G, 3482828 & AU, A, 90-57504 & JP, A, 3-198792 & JP, A, 3-259098 & JP, B, 92-035159 & AU, A, 92-20421 & IL, A, 73785 & CN, A, 1062764 & IL, A, 100935 & IL, A, 96582 & CN, A, 1065019 & IL, A, 96581	1-8
A	JP, A, 61-166710 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), October 16, 1987 (16. 10. 87),	1-2, 7-8



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 document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

December 2, 1993 (02. 12. 93)

Date of mailing of the international search report

December 21, 1993 (21. 12. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01276

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	& WO, A, 86-04605 & JP, A, 62-129298 & JP, A, 62-132899 & JP, A, 62-236488 & JP, A, 62-236497 & ZA, A, 86-07073 & JP, A, 1-085098 & ES, A, 2002164 & JP, B, 90-005395 & EP, B, 215126 & DE, G, 3680613 & IL, A, 80058 JP, A, 2-227089 (Denki Kagaku Kogyo K.K.), September 10, 1990 (10. 09. 90), (Family: none)	1-2, 7-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁵ C07G17/00, C12P1/06, A61K35/74, C12N1/20// (C12P1/06, C12R1:465), (C12N1/20, C12R1:465)		
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 ⁵ C07G17/00, C12P1/06, A61K35/74, C12N1/20		
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		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
CAS ONLINE, BIOSIS PRE VIEWS		
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
A	JP, A, 61-501627 (キリン-アムジュン, インコーポレ ーテッド), 7. 8月. 1986 (07. 08. 86) & WO, A, 85-02610 & AU, A, 85-37467 & ZA, A, 84-09625 & PT, A, 81213 & NO, A, 85-02384 & FI, A, 85-02377 & HU, T, T40694 & DK, A, 85-03651 & US, A, 4703008 & DD, A, 251786 & DD, A, 255359 & ES, A, 88-02329	1-8
☒ 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」 先行文献ではあるが、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	国際調査報告の発送日	
02. 12. 93	21. 12. 93	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 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) 齊 藤 真由美 印	4 B 8 9 3 1
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

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
	& CN, A, 85-06191 & JP, A, 1-055190 & FI, A, 89-00498 & JP, B, 90-017156 & EP, B, 148605 & DE, G, 3482828 & AU, A, 90-57504 & JP, A, 3-198792 & JP, A, 3-259098 & JP, B, 92-035159 & AU, A, 92-20421 & IL, A, 73785 & CN, A, 1062764 & IL, A, 100935 & IL, A, 96582 & CN, A, 1065019 & IL, A, 96581	
A	JP, A, 61-166710 (中外製薬株式会社), 16. 10月. 1987 (16. 10. 87) & WO, A, 86-04605 & JP, A, 62-129298 & JP, A, 62-132899 & JP, A, 62-236488 & JP, A, 62-236497 & ZA, A, 86-07073 & JP, A, 1-085098 & ES, A, 2002164 & JP, B, 90-005395 & EP, B, 215126 & DE, G, 3680613 & IL, A, 80058	1-2, 7-8
A	JP, A, 2-227089 (電気化学工業株式会社), 10. 9月. 1990 (10. 09. 90) (ファミリーなし)	1-2, 7-8