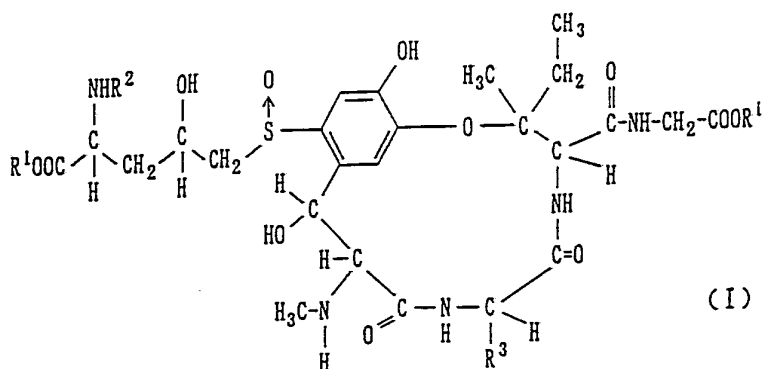




(57) 要約

本発明は、



(式中、

R<sup>1</sup> は水素原子または炭素数 1 乃至 5 個を有するアルキル基、

R<sup>2</sup> は水素原子または炭素数 2 乃至 6 個を有する脂肪族アシル基、

R<sup>3</sup> はメチル基またはプロピル基

を示す。)

で示される新規化合物ウスチロキシニンAもしくはウスチロキシニンBまたはそれらの誘導体あるいはそれらの塩を提供するものである。

上記一般式 (I) で示される化合物は、強い抗腫瘍作用を示す。

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

## 明 細 書

新規化合物ウスチロキシンAもしくはウスチロキシンBまたはそれらの誘導体

## [技術分野]

本発明は、抗腫瘍作用を有する新規化合物ウスチロキシンAもしくはウスチロキシンBまたはそれらの誘導体あるいはそれらの塩（以下、「ウスチロキシン類」という。）ならびにそれらの製法に関する。

## [背景技術]

稲コウジ病菌（ウスチラギノイデア・ヴィレンス・コーク：Ustilaginoidea virens Cooke）は不完全菌類に属するが、菌核上に形成される完全世代も認められており、*Claviceps virens Sakurai* と称される（原田幸雄、日植病報、第3巻、387頁（1984年））。稲コウジ病菌の代謝産物として Ustilaginoidin A、B、C（藪田貞治郎、住木諭介、日本農芸化学会誌、第9巻、478頁（1933年））および Ustilaginoidin D、E、F、G、H、I、J（K.Koyama and S.Natori、Chem.Pharm.Bull.、第36巻、146頁、（1988年））が知られている。しかし、これらの化合物と本発明のウスチロキシン類とは理化学的性質および構造が明らかに異なる。

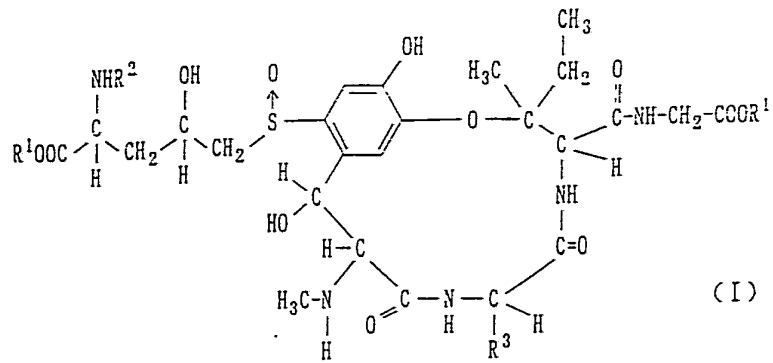
また、環内に1個のエーテル結合と2個のペプチド結合を有する13員環化合物としては、例えばカビの一種 *Phomopsis leptostromiformis* から生産されるフォモプシンA（Phomopsin A）（CLAUDE C.J. CULVENOR ら、Tetrahedron、第45巻、8号、2351頁（1989年））が知られている。しかし、その側鎖の構造はウスチロキシン類とは全く異なる。

## [発明の開示]

本発明者らは、稲コウジ病菌により、自然的に稲穂に発生したまたは人為的に稲穂に発生せしめた稲コウジから単離された新規化合物ウスチロキシンA及びウスチロキシンBが強い抗腫瘍作用を有することを見出すとともに、それらの化学修飾による誘導体も強い抗腫瘍作用を有することを見出して本発明を完成した。

本発明は、

一般式



(式中、

R<sup>1</sup> は水素原子または炭素数 1 乃至 5 個を有するアルキル基、

R<sup>2</sup> は水素原子または炭素数 2 乃至 6 個を有する脂肪族アシル基、

R<sup>3</sup> はメチル基またはプロピル基

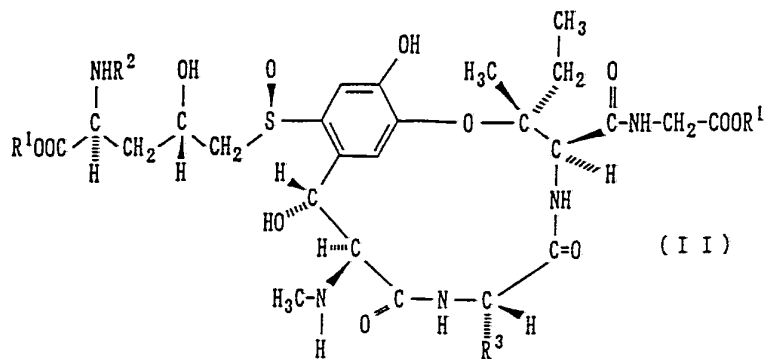
を示す。)

で示される化合物またはその塩に関し、

さらに好適には、

上記の一般式 ( I ) において、

一般式



(式中、

R<sup>1</sup> は水素原子または炭素数 1 乃至 5 個を有するアルキル基、

R<sup>2</sup> は水素原子または炭素数 2 乃至 6 個を有する脂肪族アシル基、

R<sup>3</sup> はメチル基またはプロピル基  
を示す。)

で示される化合物またはその塩に関する。

ここに、

R<sup>1</sup> が炭素数1乃至5個を有するアルキル基である場合、例えばメチル、エチル、プロピル、ブチル、セブチル、ペンチルなどの直鎖状もしくは分枝鎖状のアルキル基があげられる。好適には炭素数1乃至3個を有する直鎖状もしくは分枝鎖状のアルキル基であり、最適にはメチル基である。

R<sup>2</sup> が炭素数2乃至6個を有する脂肪族アシル基である場合、例えばアセチル、プロピオニル、ブチリル、バレリル、ヘキサノイルなどの直鎖状もしくは分枝鎖状の脂肪族アシル基があげられる。好適には炭素数2乃至4個を有する直鎖状もしくは分枝鎖状の脂肪族アシル基であり、最適にはアセチル基である。

本発明の前記一般式 (I) で示される化合物は、常法にしたがって塩とすることができる。

そのような塩としてはR<sup>1</sup> が水素原子の場合、例えばリチウム、ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属の塩；マグネシウム、カルシウム、バリウムなどのアルカリ土類金属の塩；メチルアミン、エチルアミン、ジメチルアミン、ジプロピルアミン、トリメチルアミンなどの脂肪族第1乃至第3アミンの塩；リジン、アルギニンなどのアミノ酸の塩；アンモニウム塩；等の塩をあげることができる。好適にはナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属の塩である。

また、R<sup>2</sup> が水素原子の場合、例えば弗化水素酸、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸などのハロゲン化水素酸の塩；硝酸塩；過塩素酸塩；硫酸塩；リン酸塩；等の無機酸塩、またはメタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、エタンスルホン酸などの低級アルカンスルホン酸の塩；ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などのアリアルスルホン酸の塩；グルタミン酸、アスパラギン酸などのアミノ酸の塩；フマル酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、蔞酸、マレイン酸などのカルボン酸の塩；等の有機酸塩を挙げることができる。好適には塩酸塩である。

これらの塩において、最適なものは薬理上許容しうる塩である。

なお、前記一般式 (I) を有する化合物は、種々の異性体を有する。前記一般式 (I) を有する化合物においてはこれらの異性体がすべて単一の式で示されている。従って、本発明においてはこれらの異性体およびこれらの異性体の混合物をもすべて含むものである。

更に、本発明の前記一般式 (I) を有する化合物においては、生体内において前記一般式 (I) を有する化合物に誘導される、いわゆる「プロドラッグ化合物」もすべて含まれるものである。

前記一般式 (I) を有する化合物において、  
好適には、

$R^1$  が水素原子または炭素数 1 乃至 3 個を有するアルキル基を示し、

$R^2$  が水素原子または炭素数 2 乃至 4 個を有する脂肪族アシル基を示し、

$R^3$  がメチル基またはプロピル基を示す、

化合物またはその塩である。

最適には、

$R^1$  が水素原子またはメチル基を示し、

$R^2$  が水素原子またはアセチル基を示す、

$R^3$  がメチル基またはプロピル基を示す、

化合物またはその塩である。

本発明の前記一般式 (I) を有する化合物の具体例としては、例えば下記の表に記載する化合物をあげることができる。

【表1】

化合物番号	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
1	H	H	Me
2	H	Ac	Me
3	H	Prn	Me
4	H	Byr	Me
5	H	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	Me
6	Me	H	Me
7	Me	Ac	Me
8	Me	Prn	Me
9	Me	Byr	Me
10	Et	H	Me
11	Et	Ac	Me
12	Pr	H	Me
13	Pr	Ac	Me
14	Bu	H	Me
15	Bu	Ac	Me
16	H	H	Pr

但し、表中

H=水素原子、

Me=メチル、

Et=エチル、

Pr=プロピル、

Bu=ブチル、

Ac=アシル、

Prn=プロピオニル、

Byr=ブチリル

基を示す。

上記化合物表中、

好適には例示化合物番号 1、2、3、6、7、10、11、12、14、16 またはその塩である。

最適には例示化合物番号 1、2、6、7、10、16 またはその塩である、  
本発明は、また、ウスチラギノイデア属に属するウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンB生産能を有する稲コウジ病菌を用いて稲に稲コウジを発生せしめ、該稲コウジよりウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンBを単離することを特徴とする、ウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンBの製造法に関し、好適には、ウスチラギノイデア属に属するウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンB生産能を有する稲コウジ病菌が、*Ustilaginoidea virens* (Cooke) Takahashi SANK 15391 株（微工研条寄第3691号：BP-3691）である上記製造法に関する。

1) 本発明の前記一般式 (I) を有する化合物のうち、

$R^1$  が水素原子を示し、

$R^2$  が水素原子を示す、

$R^3$  がメチル基を示す

化合物（即ち、ウスチロキシニンA）、 または、

$R^1$  が水素原子を示し、

$R^2$  が水素原子を示す、

$R^3$  がプロピル基を示す、

化合物（即ち、ウスチロキシニンB）

は次のようにして得られる。

即ち、稲田において稲コウジ病菌 (*Ustilaginoidea virens* Cooke) の感染により稲穂に発生した稲コウジ（コウジ粒）を採取する。コウジ粒は、立毛中の罹病穂から手で取り、室内で約1週間自然乾燥し、粉碎機で粉碎した後に使用することができる。また、粉碎後に、5°C前後の冷蔵庫で保存したものを使用することもできる。

このものより、水、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどの有機酸エステル類、アセトン、メチルエチルケトンなどのケトン類を単独または組み合わせて用いて抽出することにより、ウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンBを含有する抽出物を得ることができる。このようにして得られた抽出

物から、ウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンBを単離、精製するには、その物理化学的性状を利用することによって達成される。例えば、吸着剤を用いて採取することができる。使用される吸着剤としては例えば、活性炭、または吸着樹脂であるアンバーライト XAD-2、XAD-4、XAD-7等（ローム・アンド・ハース社製）、ダイアイオン HP 10、HP 20、HP 50、CHP 20P（三菱化成（株）製）、ポリアミドゲル（ウエルム社製）等が使用される。ウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンBを含む抽出液を上記の吸着剤の層を通過させてウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンBを含む液に含まれる不純物を吸着させて取り除くか、またはウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンBを吸着させた後、適当な溶剤で溶出することによって得られる。このようにして得られたウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンBを更に精製するためにはアビセル（旭化成工業（株））などのセルロース、セファデックス LH-20（ファルマシア社製）などを用いた分配カラムクロマトグラフィー、ウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンBと混在する不純物との溶剤に対する分配率の差を利用した抽出法、または向流分配法などが有効な方法である。

以上の分離、精製の手段を単独または適宜組み合わせ、反復用いることによりウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンBを分離、精製することができる。

あるいは、本発明者らにより単離された稲コウジ病菌株 *Ustilaginoidea virens* (Cooke) Takahashi SANK 15391 の孢子懸濁液を圃場に成育している稲穂に噴霧して一定期間後に発生させた稲コウジを用いて上記と同様にしてウスチロキシニンAまたはウスチロキシニンBを得ることができる。

この場合、出穂2～6週間前の稲にSANK 15391の分生孢子または厚膜孢子を上から噴霧接種し、稲コウジを発生させることができる。

分生孢子の懸濁液は、ショ糖加用ジャガイモ煎汁培地を入れた三角フラスコに菌糸片を移植し、26°Cの暗黒条件下で12～20日間液体培養して得ることができる。この懸濁液にツィーン20等の界面活性剤を0.05%相当量添加し、圃場のイネ体の上から約1 L/m<sup>2</sup>噴霧接種する方法が好ましい。

また、噴霧接種の時刻は、19時頃が好ましい。

厚膜孢子は、以下の方法により得ることができる。

ショ糖加用ジャガイモ煎汁培地を用いて26℃で7日間液体培養して得た菌糸懸濁液を、ショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地上に薄く広がるように流し込み、約25℃の暗黒条件で培養する。

最初の1週間位は分生孢子を形成するが、それ以降は厚膜孢子が形成される。

このような条件下で1～3か月間培養後、ペトリ皿のふたをとった状態で22℃内外の室内に7日間放置し、乾燥させたものを培地ごとミキサーで粉碎し、所望の厚膜孢子を得ることができる。

この厚膜孢子を直接圃場のイネ体の上から接種することにより稲コウジを発生させることができる。接種には、小型散粉器を用いるのが好ましく、また、摂取量としては、m<sup>2</sup>当たりペトリ皿30～40枚分の厚膜孢子が好ましい。

接種時刻は、日中行うのが好ましい。

供試品種としては、特に制限はないが、とりで1号、農林21号などの晩成品種が好ましい。

稲コウジを作る稲コウジ菌株 *Ustilaginoidea virens* (Cooke) Takahashi SANK 15391 は次のようにして単離、保存し必要に応じて使用することができる。即ち、羅病し暗緑色に病徴を示した稲穂から孢子（厚膜孢子）を採取し、これをポテトグルコース培地などの培養液に入れ23～28℃にて1～2日間培養する。この培養液の一部を取り、顕微鏡下で観察し、発芽しはじめている孢子をマニプレータにて単孢子分離を行なう。これを適当な寒天培地、例えばポテトデキストロース寒天培地上にとり23～28℃で培養し充分成育したものを保存しておく。ポテトデキストロース寒天培地上での成育は緩慢で、はじめは白色綿毛状の菌糸が成育するがやがて暗緑褐色となる。また、培地中にも暗緑色の可溶性色素を産出する。菌糸は有色で隔壁を有し、その径は2.0～5.0μmで壁が非常に肥厚し暗緑褐色を示し、菌糸塊を形成するものが多く見られる。分生子はシンポジオ型に生じ、1細胞、無色で5.0～8.0×3.0～4.5μmである。稲コウジに見られる厚膜孢子は観察されない。

なお、これらの諸性状は橋岡らの報告（埼玉県立農業試験場研究報告第2号1～20頁、1951年出版）に詳細に記述されている。

本発明者らにより単離された稲コウジ病菌 *Ustilaginoidea virens* (Cooke)

Takahashi SANK15391 は、通産省工業技術院微生物工業技術研究所に国際寄託されている（寄託番号、微工研条寄第 3691 号 (FERM BP-3691)；寄託日 1991 年 12 月 24 日）。

2) 本発明の前記一般式 (I) を有する化合物のうち、

R<sup>1</sup> がアルキル基を示す、

化合物は次のようにして得られる。

即ち、ウスチロキシニン A またはウスチロキシニン B とメタノール、エタノールのようなアルコール類を用いて、酸でエステル化反応を行なうことによって達成される。反応に使用される酸としては、特に限定はなく、例えば硫酸、塩酸、塩素酸、過塩素酸のような鉱酸；ギ酸、トリフルオロ酢酸のような有機酸；が好ましい。反応温度、反応時間は使用する試薬、溶剤等で異なるが、通常、0 ~ 100 °C、1 ~ 24 時間、でエステル交換反応により他のアルキル基に変換できる。

反応終了後、目的化合物は反応混合物から溶剤を留去し、残渣を乾燥することにより得られる。ウスチロキシニン A またはウスチロキシニン B を原料化合物として酸を過剰に用いた場合は目的化合物は酸の塩として得られる。このようにして得られた目的化合物は更に再結晶または通常のカラムクロマトグラフィーに付して精製することができる。

あるいはジアゾメタンのようなジアゾアルカン類と反応させることによっても達成される。反応は溶剤の存在下で行なわれる。使用される溶剤としては反応に影響を与えないものであれば特に限定はなく、ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジメトキシエタンのようなエーテル類；酢酸エチルのようなエステル類；ジメチルホルムアミドのようなアミド類；ジメチルスルフォキシドのようなスルフォキシド類；が好ましい。反応温度、反応時間は使用する試薬、溶剤等で異なるが、通常、室温 ~ 50 °C、1 ~ 24 時間が好適である。

あるいは R<sup>1</sup> が水素原子を示す化合物をアルキル化することによって得ることもできる。反応は炭酸カリウム、炭酸ナトリウムのようなアルカリ金属炭酸塩の存在下、ヨウ化メチル、ヨウ化エチルのようなハロゲン化アルキル化合物と反応させる。反応は溶剤の存在下で行なわれる。使用される溶剤としては反応に影響を与えないものであれば特に限定はなく、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジ

メトキシエタンのようなエーテル類；ジメチルホルムアミドのようなアミド類；ジメチルスルフォキシドのようなスルフォキシド類；が好ましい。反応温度、反応時間は使用する試薬、溶剤等で異なるが、通常、0～100℃、1～72時間が好適である。

反応終了後、目的化合物は反応混合物から溶剤を留去し、残渣に水および酢酸エチルのような有機溶剤を加えて分液する。有機層を濃縮し、残渣を再結晶または通常のカラムクロマトグラフィーに付して精製することにより得られる。

3) 本発明の前記一般式(I)を有する化合物のうち、

$R^2$  が脂肪族アシル基を示す、

化合物は次のようにして得られる。

即ち、 $R^2$  が水素原子を示す化合物の一級アミノ基を塩基の存在下で選択的にアシル化することによって得られる。反応に使用されるアシル化剤としては、例えば無水酢酸、無水プロピオン酸のような酸無水物；アセチルクロリド、アセチルプロミドなどの酸ハライド；が好適である。反応は溶剤の存在下で好適に行なわれる。使用される溶剤としては反応に影響を与えなければ特に限定はなく、例えば水、メタノール、エタノールのようなアルコール類またはこれらの混合溶剤が好ましい。反応は塩基の存在下で行なわれる。使用される塩基としては例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウムのようなアルカリ金属水酸化物；炭酸ナトリウム、炭酸カリウムのようなアルカリ金属炭酸塩；炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウムのようなアルカリ金属重炭酸塩；ピリジンのような芳香族アミン類；プロリンのような複素環アミン類；トリエチルアミン、ジエチルアミンのような脂肪族アミン類；が好ましい。反応温度はアシル化剤の種類などによって異なるが、通常は0～50℃が好ましい。反応時間は反応条件で異なるが通常1～5時間である。

このようにして得られた目的化合物は必要に応じて、シリカゲル、フロリジルなどの担体を用いた吸着カラムクロマトグラフィー；オクタデシル基、オクチル基などを有するシリカゲルを用いた逆相分配クロマトグラフィー；アビセル（旭化成工業（株）社製）などのセルロースまたはセファデックス LH-20（ファルマシア社製）などを用いた分配カラムクロマトグラフィー；あるいは混在する不

純物との溶剤に対する分配率の差を利用した抽出法などで精製することができる。

4) 本発明の前記一般式 (I) を有する化合物は上記 1) ~ 3) の反応を適宜組み合わせることによって得られる。

また、R<sup>1</sup> が水素原子である化合物は、R<sup>1</sup> がアルキルである化合物を水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどのアルカリ金属水酸化物；炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなどのアルカリ金属炭酸塩；の存在下で加水分解することによっても得られる。

このようにして得られた前記一般式 (I) を有する化合物は、更にシリカゲル、フロリジルのような担体を用いた吸着カラムクロマトグラフィー、セファデックス LH-20 (ファルマシア社製) などを用いた分配カラムクロマトグラフィー、および順相、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー等で精製することが出来る。

〔発明を実施するための最良の形態〕

次に実施例、試験例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

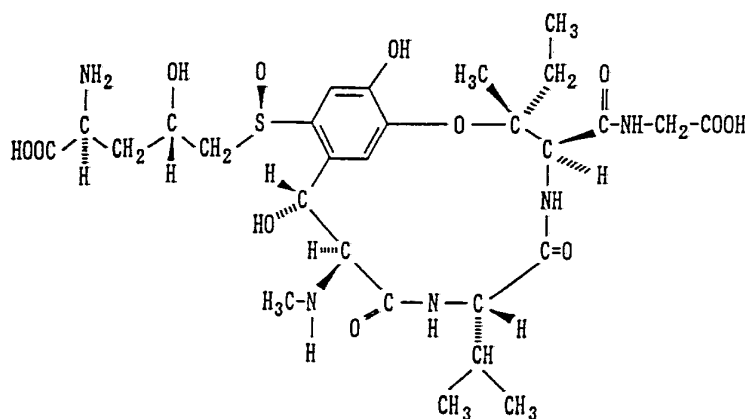
#### 実施例 1. ウスチロキシン A

稲コウジ病菌 (*Ustilaginoidea virens* Cooke) の感染により稲穂に自然発生した稲コウジを採集し、乾燥後、100 g を 10 倍量の水と共にミキサーで粉砕し、室温で 1 時間振とう抽出した。抽出液 1000 ml をろ過後、十分の一に濃縮し、50 ml の ODS カラム (ODS-SS-1020 T、センシュウ科学 (株) 製) に注入した。紫外吸収 254 nm でモニターしながら、水 2.5 リットル、メタノール：水 = 2 : 8 の混合液 2.5 リットル、100 %メタノール 1.5 リットルで展開溶出した。メタノール：水 = 2 : 8 の混合液で溶出した分画を集め、濃縮した。この濃縮物を水に溶解後、再度 30 ml の ODS カラムに注入した。メタノール：水 = 2 : 98 の混合液 0.5 リットルで展開溶出し、分画 200 ml から 400 ml の間の溶出分 200 ml を分取し、ウスチロキシン A を含む分画を得た。これらの分画を濃縮すると約 20 mg の粗結晶が得られた。この粗結晶を水で再結晶すると融点

195 °C (分解) を有する目的化合物の純品 14 mg が結晶として得られた。

本実施例で得られたウスチロキシン A は、以下の物性値を示した。

#### 1) 構造式



2) 物質の性状：水溶性、白色針状結晶

3) 分子式： $C_{28}H_{43}O_{12}N_5S$

4) 分子量：673

5) 質量分析：FAB-MS； $m/z$  674 (M+H)：

HR FAB-MS； $m/z$  674.2730 (M+H) (理論値 674.2718，

$C_{28}H_{43}O_{12}N_5S$ )

6) 元素分析： $C_{28}H_{43}O_{12}N_5S \cdot 2.5 H_2O$ として (%)

実測値：C、46.69；H、6.92；N、9.64；S、4.23

理論値：C、46.80；H、6.82；N、9.75；S、4.45

7) 紫外線吸収スペクトル： $\lambda_{max}$  nm ( $\epsilon$ )

水中で測定した紫外線吸収スペクトルは、次に示す通りである。

207(21300)、249(6000)、287(3200)。

8) 赤外線吸収スペクトル： $\nu_{max}$   $cm^{-1}$

臭化カリウム (KBr) 錠剤法で測定した赤外線吸収スペクトルは、次に示す通りである。

3700~2400 (broad)、1650、1640、1540、1500、1465、1400、1295、  
1225、1155、1130、1090、1030、900。

9)  $^1H$ -核磁気共鳴スペクトル： $(\delta; ppm)$

重水中、外部基準にテトラメチルシランを使用して 50 °C で測定した核磁気共鳴スペクトル (500 MHz) は、次に示す通りである。

0.80 (3H, d,  $J=7.0$  Hz)、0.88 (3H, d,  $J=7.0$  Hz)、1.09 (3H, t,  $J=7.2$  Hz)、

1.73 (1H, dd,  $J=7.2$  および 14.2 Hz)、1.77 (3H, s)、

1.92 (1H, dd,  $J=7.0$  および 10.0 Hz)、

2.12 (1H, ddd,  $J=3.0, 8.0$  および 15.0 Hz)、

2.22 (1H, ddd,  $J=8.0, 10.0$  および 15.0 Hz)、

2.24 (1H, dd,  $J=7.2$  および 14.2 Hz)、2.77 (3H, s)、

3.04 (1H, dd,  $J=3.0$  および 13.6 Hz)、

3.33 (1H, dd,  $J=10.0$  および 13.6 Hz)、

3.79 (2H, s)、4.01 (1H, dd,  $J=4.0$  および 8.0 Hz)、

4.13 (1H, d, J=10.0 Hz)、 4.23 (1H, d, J=10.0 Hz)、  
4.39 (1H, tt, J=3.0 および 10.0 Hz)、 4.83 (1H, s)、  
4.96 (1H, d, J=10.0 Hz)、 7.11 (1H, s)、 7.61 (1H, s)。

1 0)  $^{13}\text{C}$  -核磁気共鳴スペクトル：(  $\delta$  ; ppm )

重水中、外部基準にテトラメチルシランを使用して測定した核磁気共鳴  
スペクトル (100 MHz) は、次に示す通りである。

7.8(q)、 17.9(q)、 18.3(q)、 21.1(q)、 28.7(d)、  
32.1(q $\times$ 2)、 36.7(t)、 43.8(t)、 52.7(d)、 59.6(d)、  
60.1(d)、 63.8(d)、 64.8(t)、 66.7(d)、 73.9(d)、  
87.2(s)、 114.0(d)、 124.2(d)、 128.0(s)、 136.4(s)、  
146.0(s)、 152.2(s)、 166.4(s)、 170.3(s)、 171.0(s)、  
174.4(s)、 176.3(s)。

1 1) 溶解性：

水に易溶、含水メタノールに可溶。

1 2) 呈色反応：

ニンヒドリンに陽性。

1 3) 薄層クロマトグラフィー：

Rf 値； 0.16

吸着剤； シリカゲルプレート Art. 5715 (メルク社製)

展開溶剤； n-ブタノール：酢酸：水 = 3：1：1

検出；紫外線 254 nm およびニンヒドリン発色。

1 4) アミノ酸分析：

6 N 塩酸で 110 °C、20 時間加水分解後、反応混合物より溶剤を留去  
した。得られた残渣をアミノ酸分析機で分析し、バリンとグリシンを検出  
した。バリンについて高速液体クロマトグラフィーで分析した結果、L-  
バリンに一致した。

カラム；Enantio L1 (4.6 mm ID  $\times$  250 mm、東ソー(株)社製)

溶剤；0.8 mM  $\text{CuSO}_4$

温度；27 °C

流速： 1 ml /分

検出：赤外線 250 nm

#### 実施例 2. ウスチロキシニン A

人工接種により稲にコウジ粒を発生せしめ、このものよりウスチロキシニン A を単離、精製した。

稲は以下の方法で育成した。

4月14日に播種した苗を 5月20日に本田に移植した。栽培密度は 3.3m<sup>2</sup>当たり 75株とし、1株 1本上とした。肥料は基肥として窒素(N)、リン酸(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) およびカリ(K<sub>2</sub>O) を成分量として10a 当たり各 8Kgを使用し、7月14日に追肥として窒素(N) を10a 当たり 2Kg 施用した。その他方法は、慣行法に従った。

稲コウジ病菌 SANK 15391 株を培養し、以下の方法により、放置後形成した厚膜胞子を得た。

ショ糖加用ジャガイモ煎汁培地を用いて26℃で 7日間液体培養して得た菌糸懸濁液を、ショ糖加用ジャガイモ煎汁寒天培地上に薄く広がるように流し込み、約 25℃の暗黒条件で培養した。

最初の1週間位は分生胞子を形成したが、それ以降は厚膜胞子が形成された。

このような条件下で1~3か月間培養後、ペトリ皿のふたをとった状態で22℃内外の室内に 7日間放置し、乾燥させたものを培地ごとミキサーで粉碎し、厚膜胞子を得た。

この厚膜胞子を直接圃場のイネ体の上から接種することにより稲コウジを発生させた。すなわち、圃場に成育している稲穂に噴霧し、一定期間(約 2 ヶ月) 放置しておくとも稲コウジが発生した。これらの稲コウジを採集し、実施例 1. 記載と同様の方法によりウスチロキシニン A を単離、精製した。10 g の稲コウジから約 1 mg の目的化合物を単離した。

本実施例で得られたウスチロキシニン A の物性値は実施例 1. で得られたウスチロキシニン A の物性値と同じであった。

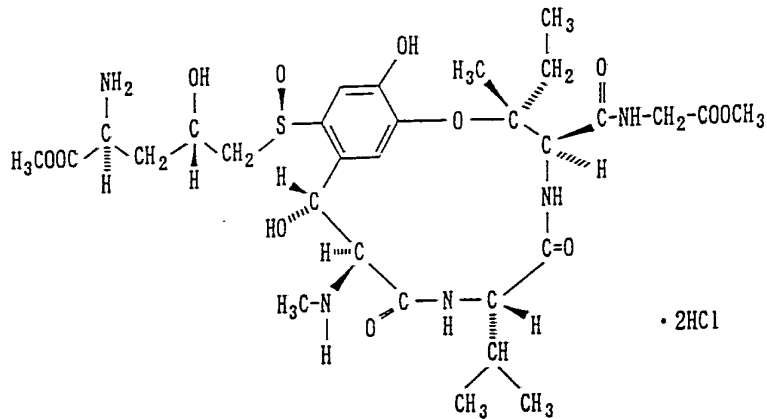
#### 実施例 3. ウスチロキシニン A ジメチルエステル・ジ塩酸塩

実施例 1 で得られたウスチロキシニン A 5 mg を 12 % 塩酸を含むメタノール 0.5 ml に溶解し、4℃ で一夜放置した。この溶液を減圧下で濃縮し、溶

剤を留去すると目的化合物 5.9 mg が得られた。

ウスチロキシシンAジメチルエステル・ジ塩酸塩の物性値は次の通りである。

1) 構造式



2) <sup>1</sup>H-核磁気共鳴スペクトル：(δ ; ppm)

重ジメチルスルホキシド中、外部基準にテトラメチルシランを使用して 50 °Cで測定した核磁気共鳴スペクトル (500 MHz) は、次に示す通りである。

- 0.77 (3H, d)、 0.83 (3H, d)、 1.02 (3H, dd)、 1.43 (3H, s)、 1.87 (1H, m)、
- 1.98 (2H, m)、 2.08 (1H, dd)、 2.43 (3H, s)、 2.79 (1H, dd)、
- 3.04 (1H, dd)、 3.61 (3H, s)、 3.74 (3H, s)、 3.82 (3H, m)、 4.07 (1H, m)、
- 4.22 (1H, dd)、 4.47 (1H, dd)、 4.83 (1H, d)、 4.93 (1H, dd)、
- 6.51 (1H, s)、 7.07 (1H, s)

3) 薄層クロマトグラフィー：

Rf 値； 0.33

吸着剤； シリカゲルプレート Art. 5715 (メルク社製)

展開溶剤； n-ブタノール：メタノール：水 = 3：1：1。

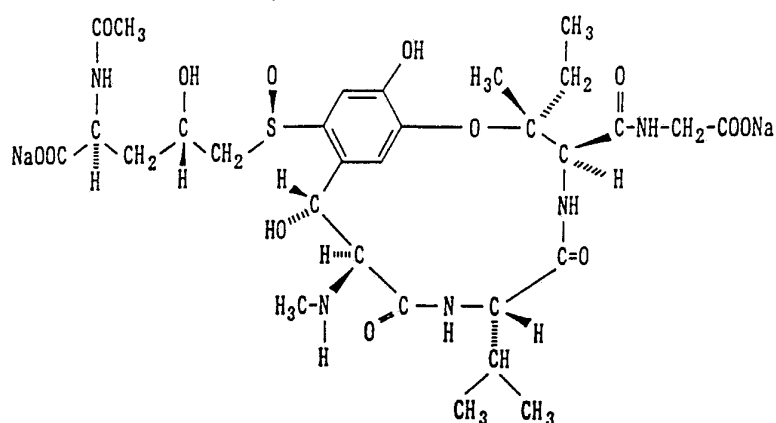
実施例 4. 4'-N-アセチルウスチロキシシンA・ジナトリウム塩

実施例 1 で得られたウスチロキシシンA 5.4 mg を 2% 炭酸水素ナトリウム水溶液 0.5 ml に溶解し、無水酢酸を過剰量加え、0 °C で 2 時間撹拌した。

。反応混合物を 炭酸水素ナトリウム水溶液で中和後、グイエイオン HP 20 カラム（三菱化成（株）社製）2 ml に吸着させた。メタノールを展開溶剤として用いて溶出し、目的化合物を含む分画を集めた。この分画を減圧下で濃縮し、溶剤を留去し乾燥すると、目的化合物 4.6 mg が得られた。

4'-N-アセチルウスチロキシシン A・ジナトリウム塩の物性値は次の通りである。

1) 構造式



2) 呈色反応：

ニンヒドリンに陰性。

3) 薄層クロマトグラフィー：

Rf 値； 0.39

吸着剤； シリカゲルプレート Art. 5715（メルク社製）

展開溶剤； n-ブタノール：メタノール：水 = 3：1：1。

実施例 5. ウスチロキシシン B

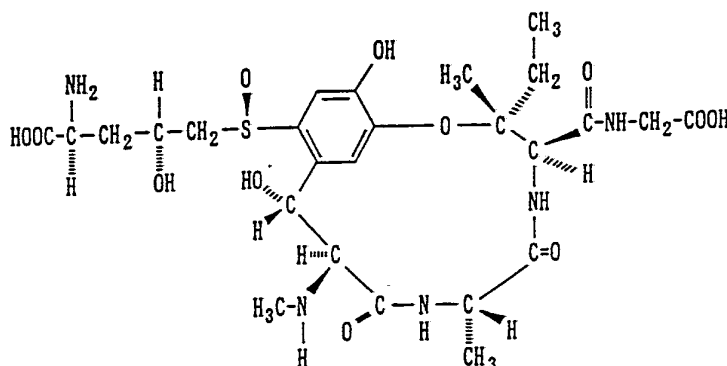
人工接種により稲にコウジ粒を発生せしめ、このものよりウスチロキシシン B を単離、精製した。なお、人工接種には、稲コウジ病菌 SANK 15391 株を使用し、接種方法は、実施例 2 に記載の方法に従った。

稲穂に発生した稲コウジを採集し、乾燥後、100 g を 10 倍量の水と共にミキサーで粉碎し、室温で 1 時間振とう抽出した。抽出液 1000 ml をろ過後、十分の一に濃縮し、50 ml の ODS カラム（ODS-SS-1020 T、センシユウ科学（株）

製)に注入した。紫外吸収254 nm でモニターしながら、水 2.5 リットル、メタノール：水=2：8の混合液 2.5 リットル、100%メタノール 1.5 リットルで展開溶出した。メタノール：水=2：8の混合液で溶出した分画を集め、濃縮した。この濃縮物を水に溶解後、再度 30 ml の ODS カラムに注入した。メタノール：水=2：98の混合液 0.5 リットルで展開溶出し、ウスチロキシン A より先に流出するウスチロキシン B を含む分画を得た。この分画を再度、ODS カラムに注入し、メタノール：水=1：99の混合液で展開溶出し、粗ウスチロキシン B 粉末を得た。この粗粉末を、ODS カラムに注入し、0.02% のトリフルオロ酢酸を含む、メタノール：水=25:75の混合液で溶出展開し、ウスチロキシン B の精製分画を得た。稲こうじ 100 g 当たり約 3 mg のウスチロキシン B が得られた。

本実施例で得られたウスチロキシン B は、以下の物性値を示した。

1) 構造式



- 2) 物質の性状：水溶性、白色固体
- 3) 分子式： $C_{26}H_{39}N_5O_{12}S$
- 4) 分子量：645
- 5) 質量分析：FAB-MS:  $m/z$  646 (M+H)
- 6) 旋光度： $+14.1^\circ$  ( $c=0.55, H_2O$ )
- 7) 紫外吸収スペクトル： $\lambda_{max} nm(\epsilon)$

水中で測定した紫外線吸収スペクトルは、以下に示す通りである。

213(13900), 252(5000), 290(3500)

8) 赤外線吸収スペクトル:  $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$

弗化カルシウム(CaF) 薄膜(フィルム)法で測定した赤外線吸収スペクトルは、次に示す通りである。

3700~2400(broad), 1670, 1600, 1550, 1500, 1465, 1430, 1380, 1290,  
1200, 1140

9)  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル: ( $\delta$ ; ppm)

重水中、外部基準に 2,2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸ナトリウム(DSS)を使用して50°Cで測定した核磁気共鳴スペクトル(500 MHz)は、次に示す通りである。

0.92(3H, dd,  $J=7.2, 7.2\text{Hz}$ ), 1.14(3H, d,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 1.63(1H, dq,  $J=14.0, 7.2\text{Hz}$ ), 1.68(3H, s), 2.01(1H, ddd,  $J=3.0, 15.0, 8.0\text{Hz}$ ), 2.05(1H, dq,  $J=14.0, 7.2\text{Hz}$ ), 2.12(1H, ddd,  $J=10.0, 15.0, 4.0\text{Hz}$ ), 2.60(3H, s), 2.96(1H, dd,  $J=13.4, 2.8\text{Hz}$ ), 3.30(1H, dd,  $J=13.4, 10.0\text{Hz}$ ), 3.70(1H, d,  $J=17.0\text{Hz}$ ), 3.76(1H, d,  $J=17.0\text{Hz}$ ), 3.90(1H, d,  $J=10.0\text{Hz}$ ), 3.90(1H, dd,  $J=8.0, 4.0\text{Hz}$ ), 4.29(1H, m,  $J=2.8, 10.0, 3.0, 10.0\text{Hz}$ ), 4.37(1H, q,  $J=7.0\text{Hz}$ ), 4.65(1H, s), 4.80(1H, d,  $J=10.0\text{Hz}$ ), 7.28(1H, s), 7.47(1H, s)

10)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル ( $\delta$ ; ppm)

重水中、外部基準にDSSを使用して測定した核磁気共鳴スペクトル(100 MHz)は、次に示す通りである。

8.36(q), 15.72(q), 22.24(q), 31.68(t), 33.00(q), 37.08(t), 44.24(t),  
50.00(d), 53.16(d), 60.26(d), 64.22(d), 65.11(t), 68.15(d), 74.70(d),  
84.48(s), 114.42(d), 124.62(d), 128.96(s), 137.14(s), 146.34(s),  
153.24(s), 169.40(s), 170.59(s), 172.72(s), 174.82(s), 176.92(s)

11) 溶解性:

水に易溶、含水メタノールに可溶。

12) 呈色反応: ニンヒドリンに陽性。

13) 薄層クロマトグラフィー:

Rf値: 0.14

吸着剤；シリカゲルプレート Art. 5715

展開溶剤；n-ブタノール：酢酸：水=3：1：1

検出；紫外線 254 nm、ニンヒドリン発色

#### 1.4) アミノ酸分析：

6 N 塩酸で 110°C、20時間加水分解後、反応混合物より溶剤を留去した。

得られた残渣をアミノ酸分析機で分析し、アラニンとグリシンを検出した。アラニンについてはHPLCで分析した結果、L-アラニンに一致した。

カラム；Enantio L1 (4.6 mm ID × 250 mm、東ソー(株)社製)

溶剤；0.8 mM CuSO<sub>4</sub>

温度；27 °C

流速；1 ml / 分

検出；赤外線 250 nm。

ウスチロキシニンBの紫外線吸収スペクトル、旋光度はウスチロキシニンAとよく一致し、分子量はウスチロキシニンAより28 (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>に相当) 小さい 645である。このことは構造中に含まれる発色団、および、立体構造の絶対配置がウスチロキシニンAと一致していることを示す。

アミノ酸分析では、ウスチロキシニンAで検出されたL-バリンに代わって、L-アラニンが検出された。<sup>1</sup>H-NMRでは、ウスチロキシニンAのスペクトルで示された、バリン残基に由来する、 $\delta$  0.80、0.88 ppm の2本のメチルシグナルおよび 0.92 ppm のメチルシグナルが観察されず、代わって、 $\delta$  1.14 ppm にメチルシグナルが現れている。同様に、<sup>13</sup>C-NMRにおいても、炭素シグナルが2本少なく、バリン残基に代わってアラニン残基の存在が示された。

以上のデータから、ウスチロキシニンBの構造は、ウスチロキシニンAにおけるL-バリンがL-アラニンに代わったものと決定した。

#### 実施例 6. 抗腫瘍作用

本発明のウスチロキシニンAおよびウスチロキシニンBならびにその誘導体は抗腫瘍作用を有する。

以下に、ウスチロキシニンA及びウスチロキシニンBについて抗腫瘍作用を測定し

た結果を記載する。

アレイ (Michael C. Alley) らの方法 (Cancer Research、43 巻、589 ~ 601 頁 (1988 年)) に準じて、ウスチロキシン A 及びウスチロキシン B の抗腫瘍作用を検討した。

即ち、96 穴培養プレートに各種癌細胞を  $1 \times 10^3$  個 /  $100 \mu\text{l}$  メディウム (RPMI-1640 + 10 % FCS) ずつ懸濁した。但し、RERF-LC-MA は  $4 \times 10^2$  個、WiDr、SW-480、KU-2 は  $5 \times 10^2$  個、ZR-75-30 は  $3 \times 10^3$  個、SBC-5 は  $2.5 \times 10^2$  個懸濁した。これらの懸濁液を 5 %  $\text{CO}_2$  下、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養後、希釈サンプルを含む  $100 \mu\text{l}$  のメディウムを加え、同じ条件下で更に 48 時間培養した。培養後、 $200 \mu\text{l}$  のメディウムで 3 回洗浄し、薬剤を除去した。次いで、5 %  $\text{CO}_2$  下、 $37^\circ\text{C}$  で 96 時間培養後、 $50 \mu\text{g} / 50 \mu\text{l}$  の MTT を加え、同条件下で更に 4 時間培養した。培養液を除去し、 $150 \mu\text{l}$  の DMSO を加え攪拌し、540 nm における吸光度から細胞増殖率を算定した。細胞増殖を 50 % 阻害するのに必要な試験化合物の濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ;  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) を表 2. に示す。

【表 2】 ウスチロキシン A 及びウスチロキシン B のヒト腫瘍細胞増殖阻害効果

細胞	由来	組織型	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
			ウスチロキシン A	ウスチロキシン B	5-FU (対照化合物)
MKN-1	胃癌	腺扁平上皮癌	2.46	2.85	5.73
MKN-7	胃癌	分化型腺癌	3.75	5.04	3.34
MKN-74	胃癌	高分化型管状腺癌	3.96	11	1.40
RERF-LC-MA	肺癌	小細胞癌	4.27	8.8	0.314
SBC-5	肺癌	小細胞癌	-	0.254	-
MCF-7	乳癌	腺癌	0.656	1.38	0.915
ZR-75-30	乳癌	充実腺管癌	2.93	-	>10
WiDr	結腸癌	腺癌	3.57	5.8	1.05
SW-480	結腸癌	腺癌	4.64	7.3	3.44
KU-2	腎癌	腺癌	3.38	2.55	2.79

表 2. から明かの如く、ウスチロキシン A 及びウスチロキシン B は各種のヒト

腫瘍細胞に対して、優れた増殖阻害効果を示した。

[産業上の利用可能性]

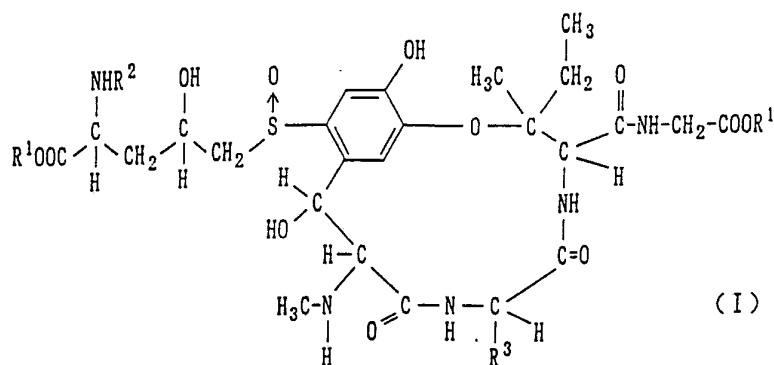
本発明の前記一般式 (I) を有する化合物は、文献未載の新規化合物であり、種々のヒト癌細胞に対して強い増殖抑制作用を示し、抗腫瘍剤として有用である。

本発明の前記一般式 (I) を有する化合物を医薬として用いる場合、常法に従ってそれ自体または適宜の薬学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤と混合し、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、注射剤などの形態で経口的または非経口的に安全に投与することが出来る。投与量は対象疾患、投与経路および投与回数などにより異なる。例えば成人に対して有効 1 日投与量は注射の場合、患者の体重 1 Kg 当たり 0.01 mg から 80 mg、経口投与の場合 0.5 mg から 120 mg を、症状に応じて 1 回または数回に分けて投与するのが好ましい。

## 請求の範囲

1.

一般式



(式中、

R<sup>1</sup> は水素原子または炭素数 1 乃至 5 個を有するアルキル基、R<sup>2</sup> は水素原子または炭素数 2 乃至 6 個を有する脂肪族アシル基、R<sup>3</sup> はメチル基またはプロピル基

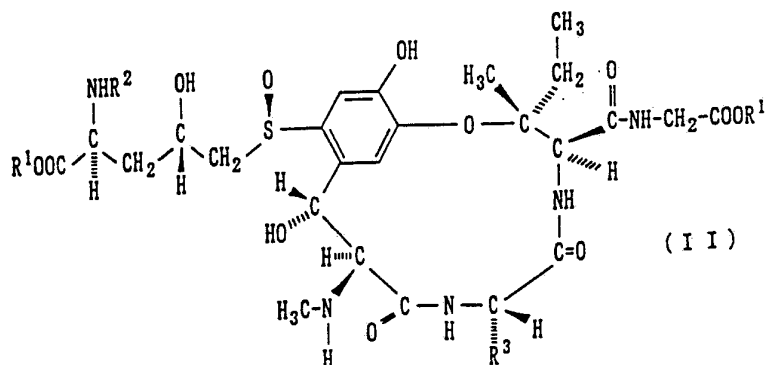
を示す。)

で示される化合物またはその塩。

2.

クレーム 1 記載の一般式 (I) において、

一般式



(式中、

$R^1$  は水素原子または炭素数 1 乃至 5 個を有するアルキル基、

$R^2$  は水素原子または炭素数 2 乃至 6 個を有する脂肪族アシル基、

$R^3$  はメチル基またはプロピル基

を示す。)

で示される化合物またはその塩。

3. ウスチラギノイデア属に属するウスチロキシニン A またはウスチロキシニン B 生産能を有する稲コウジ病菌を用いて稲に稲コウジを発生せしめ、該稲コウジよりウスチロキシニン A またはウスチロキシニン B を単離することを特徴とする、ウスチロキシニン A またはウスチロキシニン B の製造法。

4. ウスチラギノイデア属に属するウスチロキシニン A またはウスチロキシニン B 生産能を有する稲コウジ病菌が、*Ustilagoidea virens* (Cooke) Takahashi SAN K 15391 株 (微工研条寄第 3691 号: BP-3691) であるクレーム 3 記載の製造法。

5. クレーム 1 又は 2 に規定される化合物またはその塩の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、薬学的組成物。

6. クレーム 1 又は 2 に規定される化合物またはその塩の治療学的有効量を、薬学的に許容し得る担体又は賦形剤とともに含有する、制癌剤。

7. クレーム 1 又は 2 に規定される化合物またはその塩の治療学的有効量を、癌患者に投与する、癌の治療又は予防方法。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/00018

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl <sup>5</sup> C07K5/00, C12P21/02//A61K37/02 (C12P21/02, C12R1:645) 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. Cl <sup>5</sup> C07K5/00, C12P21/00-21/04, A61K37/02 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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Tetrahedron Letters, Vol. 33, No. 29, p. 4157-4160, 1992	1-7
PX	Chemical and Organism, Vol. 30, No. 8, p. 491-492, 1992	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 March 25, 1993 (25. 03. 93)		Date of mailing of the international search report April 13, 1993 (13. 04. 93)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer  Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) <b>Int. Cl<sup>7</sup> C07K5/00, C12P21/02 / A61K37/02 (C12P21/02, C12R1:645)</b>		
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)) <b>Int. Cl<sup>7</sup> C07K5/00, C12P21/00-21/04, A61K37/02</b>		
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) <b>CAS ONLINE</b>		
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
PX	Tetrahedron Letters, Vol. 33, No. 29, p4157-4160, 1992	1-7
PX	化学と生物, Vol. 30, No. 8 p491-492, 1992	1-7
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="float: right;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span>		
* 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 <b>25.03.93</b>	国際調査報告の発送日 <b>13.04.93</b>	
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) <b>植野 浩志</b>	4 B 2 1 2 1
電話番号 03-3581-1101 内線 <b>3449</b>		