

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-502309

(P2007-502309A)

(43) 公表日 平成19年2月8日(2007.2.8)

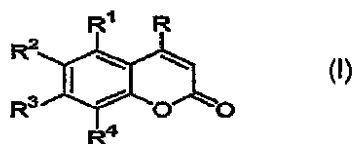
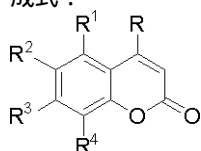
(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>C O 7 D 311/08</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 D 311/08	C S P	4 C O 6 2
<b>C O 7 D 311/22</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 D 311/22		4 C O 6 3
<b>C O 7 D 405/04</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 D 405/04		4 C O 8 6
<b>C O 7 D 407/04</b>	<b>(2006.01)</b>	C O 7 D 407/04		
<b>A 6 1 K 31/37</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 31/37		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願2006-529556 (P2006-529556)	(71) 出願人	505422040
(86) (22) 出願日	平成16年5月17日 (2004.5.17)		中国科学院上海有机化学研究所
(85) 翻訳文提出日	平成18年1月13日 (2006.1.13)		中国 上海市▲楓▼林路354号
(86) 国際出願番号	PCT/CN2004/000491	(74) 代理人	100082050
(87) 国際公開番号	W02004/101543		弁理士 佐藤 幸男
(87) 国際公開日	平成16年11月25日 (2004.11.25)	(72) 発明者	林国▲強▼
(31) 優先権主張番号	03116952.X		中国 上海市▲楓▼林路354号 中国科
(32) 優先日	平成15年5月15日 (2003.5.15)		学院上海有机化学研究所内
(33) 優先権主張国	中国 (CN)	(72) 発明者	雷建光
			中国 上海市▲楓▼林路354号 中国科
			学院上海有机化学研究所内
		(72) 発明者	徐明▲華▼
			中国 上海市▲楓▼林路354号 中国科
			学院上海有机化学研究所内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 クマリン系化合物及び抗真菌薬物

## (57) 【要約】

本発明は4 - 変わりクマリン系化合物、合成方法及び応用などに関連させる。こんな化合物は次のとおりの構成式：

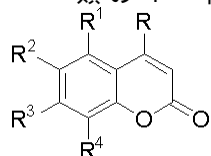


、その中でRは2 - CHOが代わったベンゼン基或いはナフタリンの基或いは窒素雜芳基、或いはR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> 替わりクマリン基；R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> はH、C<sub>1-10</sub> の炭化水素の基、X、NO<sub>2</sub>、OH、CN、OCH<sub>3</sub>、COOCH<sub>3</sub> 或いはOR<sup>5</sup>；R<sup>2</sup> とR<sup>3</sup> は - OCH<sub>2</sub>O - でもいいし；R<sup>5</sup> はH、C<sub>1-10</sub> の炭化水素の基；Xはハロゲンである。こんな化合物ははっきりした抗菌作用がある。こんな化合物は抗菌薬物を作成するのに用いられる。例えば、爪囲炎、爪白癬などの疾病を治療する薬物である。

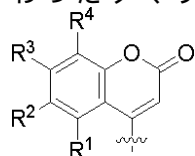
## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

一類の 4 - 代わったクマリン系化合物で、該化合物は次の構成式を有する：

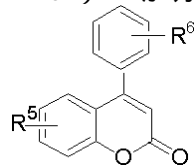


、その中で R は H、CHO、OCH<sub>3</sub>、X、NO<sub>2</sub>、C<sub>1</sub>-<sub>10</sub> の炭化水素の基、-OCH<sub>2</sub>O-、CN 或いは COOCH<sub>3</sub> 基団は単に替わり或いは多替わりの芳基、その中で芳基はベンゼンの基、ナフタリン基或いは窒素雑芳基；或いは R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> が替わったクマリンの基

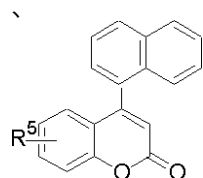


；R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> は H、C<sub>1</sub>-<sub>10</sub> の炭化水素の基、X、NO<sub>2</sub>、CN、OCH<sub>3</sub>、COOCH<sub>3</sub> 或いは OR<sup>5</sup>；R<sup>5</sup> は H、C<sub>1</sub>-<sub>10</sub> の炭化水素の基；X はハロゲン、その条件は、下記のとりの化合物が除かれる：

a) R が芳基の場合、下記のとりの化合物は除く：

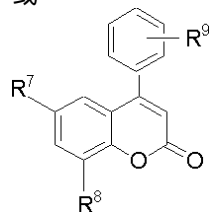


20



30

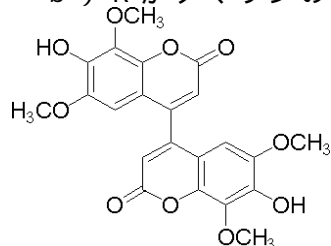
或



、その中で R<sup>5</sup> = H、OH、OCH<sub>3</sub>、C<sub>1</sub>-<sub>10</sub> のアルキル基或いはハロゲン，R<sup>6</sup> = H、CH<sub>3</sub>、CH<sub>3</sub>O 或いはハロゲン，R<sup>7</sup> 或いは R<sup>8</sup> = CH<sub>3</sub>O 或いは OH，R<sup>9</sup> = H、CH<sub>3</sub>、OH 或いは -OCH<sub>2</sub>O-；

40

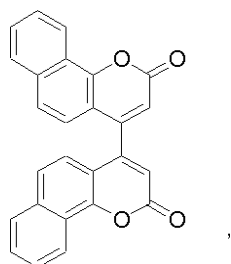
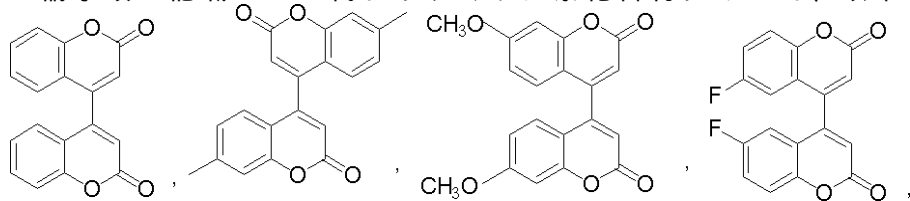
b) R がクマリンの基の場合、下記のとりの化合物は除く：



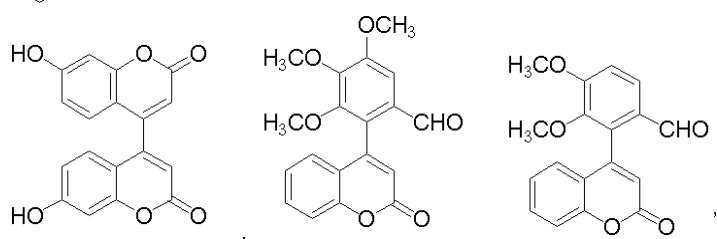
50

## 【請求項 2】

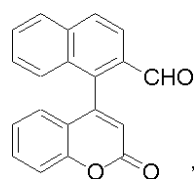
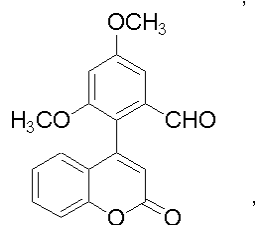
請求項 1 記載の 4 - 代わりクマリン系化合物において、以下の構成式を有する：



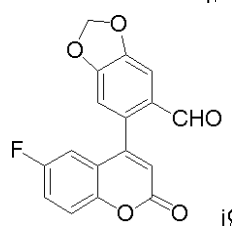
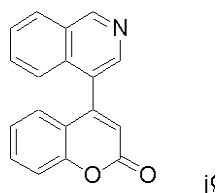
10



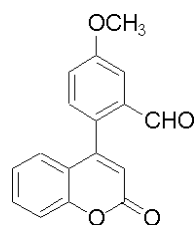
20



30

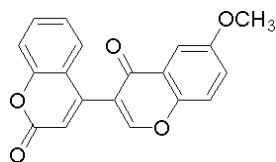


40



或

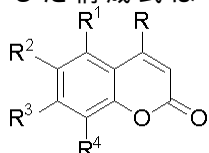
50



。

## 【請求項 3】

請求項 1 記載の 4 - 代わりクマリン系化合物において、分子式が  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  で替わったクマリンスルホン酸エステルの類化合物を底物にし、2 価或いは零価のパラジウム或いは白銅化合物とホスフィンリガンドを触媒で使用し、有機溶剤中和と  $Zn$  の存在下に、60 ~ 100 の温度で、ハロゲン芳香族炭化水素或いは  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  が替わったハロゲンクマリン系化合物或いは別の  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  が替わったハロゲンクマリンのスルホン酸エステルの類化合物と反応させて 0.5 から 20 時間で獲得した構成式は



のクマリン系化合物、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  で替わったクマリンスルホン酸エステルの類化合物と 2 価或いは零価のパラジウム或いは白銅化合物、ホスフィンリガンド、 $Zn$  とハロゲン芳香族炭化水素或いは  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  が替わったハロゲンクマリン系化合物或いは別の  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  が替わったハロゲンクマリンのスルホン酸エステルの類化合物のモル比率は (1) : (0.05 ~ 1) : (0.05 ~ 1) : (1 ~ 5) : (1 ~ 10)、その中で  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  は上記のとおり、ハロゲンは沃素、臭素、塩素であり、芳香族炭化水素は  $H$ 、 $CHO$ 、 $OCH_3$ 、 $X$ 、 $NO_2$ 、 $C_{1-10}$  の炭化水素の基であり、 $CN$ 、 $COOCH_3$  が替わったハロゲン芳基或いはハロゲンナフタリンの基或いはハロゲン窒素雑芳基、上記ハロゲン基は臭素或いは沃素原子。

## 【請求項 4】

請求項 3 記載の 4 - 代わりクマリン系化合物の合成方法であって、前記 2 価或いは零価のパラジウム或いは白銅化合物は 2 の (3 のベンゼンの基ホスフィン) 2 のパラジウム塩化 ( $PaCl_2 (PPh_3)_2$ )、2 の (3 のベンゼンの基ホスフィン) 2 のニッケル塩化 ( $NiCl_2 (PPh_3)_2$ )、4 の (3 のベンゼンの基ホスフィン) パラジウム ( $Pa(PPh_3)_4$ )、4 の (3 のベンゼンの基ホスフィン) 白銅 ( $Ni(PPh_3)_4$ ) 等

## 【請求項 5】

請求項 3 記載のクマリン系化合物において、前記ホスフィンリガンドは 1, 2 - ニ (2 のベンゼンの基ホスフィン) エチル、1, 3 - ニ (2 のベンゼンの基ホスフィン) プロパン、1, 4 - ニ (2 のベンゼンの基ホスフィン) ブタン、1, 1' - ニ (ニベンゼンの基ホスフィン) フェロセン或いは 2, 2' - ニ (ニベンゼン基ホスフィン) バイナブ ( $BINAPO$ )、トリフェニルフォスフィンのいずれかである。

## 【請求項 6】

請求項 1 記載の 4 - 代わりクマリン系化合物を含み、前記 a) と b) の化合物条件を満たすことを特徴とする真菌抵抗の薬物。

## 【請求項 7】

請求項 6 記載の薬物であって、爪囲炎、爪白癬などの疾病の治療に用いられることを特徴とする真菌抵抗の薬物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

この発明は、クマリン系化合物及びその応用にかかわる。当該化合物ははっきりした真菌に抵抗する作用がある。従って、真菌感染および爪囲炎、爪白癬などの病気を治療する

10

20

30

40

50

ことに用いられる。

【背景技術】

【0002】

真菌感染はよくある病気と多発病気なので、人間の健康に危害が大きい。この何十年來臨床で抗生物質、ホルモン、腫瘍抵抗薬、免疫抑制剤等の薬物が広く使用され、また、臓器移植などの大型手術の展開、AIDS病気の流行、2003年上期のSARSを含めて、深さ部真菌の発病率とこれにより引き起こされた死亡率が大幅に増えている。臨床は切に需要が高まっており、低毒性の抗真菌薬物が必要となる。しかし、現状では臨床に選択できる抗真菌薬物の品種は限られている。

【0003】

近年、ゾール系化合物は抗真菌新薬研究のホットスポットとなっている。それぞれの大きい製薬会社はとて大きい関心を持っており、フィザー社(米)が開発したボリコナゾールは2002年に国際市場に出ている。シェリング・プラウのPosaconazoleもまもなく市場に出る。これらの薬物にはその長所があるけれども、毒性が比較的に大きく或いはある真菌の無効が存在し、生物利用度が高くない等の問題があるので需要を満足させるのが難しい。総合的な性能がいっそう優れた新型抗真菌薬物を開発するのは我が国の国民健康事業を保障することに対して、重大な意味を持っている。

【0004】

クマリンはチオルトーヒドロキシ桂皮酸の内エステルに属し、クマリンは傘形科、豆科、ヘンルーダ科、キク科、ユキノシタ科、沈丁花科などの植物および微生物代謝の産物中に幅広く存在している。ただし、動物世界にはほとんど存在しない。クマリンは植物のそれぞれの部分での含有量の多い順から少ない順に：果実>根はし>枝と幹>葉。1980年までに、すでに見つかったクマリン系化合物は大体800個くらいある。

【0005】

フランノクマリン(furanocoumarin)は伝統的薬物として長期に用いられており、インドの神話書籍《Athara Veda》にはPsoralea corylifoliaで樹木中から取り出したパスタ状の薬で白斑症を治療したことが記載されている。古代エジプト人は以前にAmmi majusでなまずを治療したことがある。第1のフランノクマリンと5-“メトキシル補骨脂素(5-methoxypsoralen)は1838年Kalbrunner(Scott, B.R.; Pathak, M.A.; Mohn, G.R. Mutat. Res., 1976, 39, 29.)香気があるレモン油の中から分離して獲得した。

【0006】

クマリン系化合物は広範な生物活性を持っている。例えば：抗凝血(anticoagulant), 動物ホルモン(estrogenic), 抗皮膚敏感な活性(dermal photosensitizing activity), 抗菌(antimicrobial), 血管拡張(vasodilator), 軟体動物を殺す薬(molluscicidal), 駆虫薬(anthelmintic), 鎮静剤と催眠薬(sedative and hypnotic), 痛苦止め剤と温度を下げる剤(analgesic and hypothermal activity)((a). Soine, T.O. J. Pharm. Sci., 1964, 53, 231. (b). Edelson, R.L. Sci. Am., 1988, August, 68. (c). Dini, A.; Ramundo, E.; Saturnino, P.; Stagno, d'Alcontres, I. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1992, Univ. Lodz.)。事実上、クマリン系化合物は広い生物活性を持っているので、“薬学上の多芸多才”と呼ばれている。(pharmacological promiscuity)(Hoult, J.R.; Paya, M. Gen. Pharmacol., 1996, 27, 713.)。比較的目立つ生理学の効果は：黄曲かび毒素(aflatoxin)の急性レバー毒性と発癌性(acute hepatotoxicity and carcino-

10

20

30

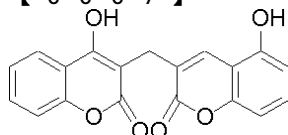
40

50

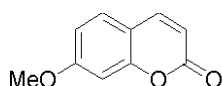
nogenicity), 双香豆アルコール (dicoumarol) の抗凝血性 (Rocha, L.; Marston, A.; Kaplan, M.; Stoeckli-Evans, H.; Thull, U.; Testa, B.; Hostettmann, K. Phytochem., 1994, 36, 1381.)、新生黴素 (novobiocin) と coumermycin A1 の抗生物質活性にあり、いくつかの線形フランノクマリンは細胞での光敏性は生物化学界の大きな興味を引き起こして、DNA の片鱗の交差接続を協力している。以下、いくつかの化合物の結合と生理活性を示す。(Stud. Nat. Prod. Chem., 2000, 33 (Bioactive Natural Products (Part D)), 350.)

10

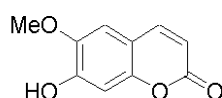
【0007】



Dicoumarol (抗凝血性)

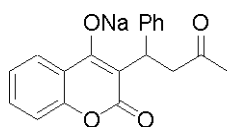


Herniarin (抗真菌性)

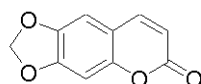


Scopoletin (抗真菌性)

20

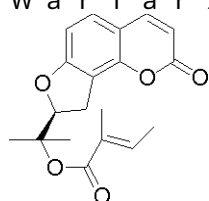
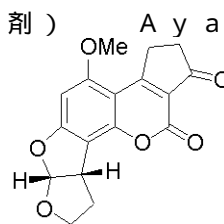


Warfarin sodium salt (抗凝血剤)



Ayapin (抗凝血剤)

30

Columbianadin  
(カルシウムイオンの吸収を誘導)Aflatoxin B<sub>2</sub> (抗血清)

【0008】

クマリン系化合物が植物中に存在している広範性とその優良な生理活性で、その中の多くの化合物は薬物として用いられ、従って化学者、薬学家と生物学者の強烈な興味を起こしている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

しかし、現状では低毒性で抗真菌作用を有するクマリン系化合物の品種が限られている課題があった。

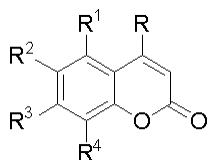
【課題を解決するための手段】

【0010】

発明の概要

本発明はクマリン化合物、合成方法及びその応用にかかわる。当該化合物は次の構造式を持っている。

40



分子式が  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  で置換したクマリンスルホン酸エステル類の化合物を底物（基底）にし、2価或いは零価のパラジウム或いは白銅化合物とホスフィンリガンドを触媒として使用する。有機溶剤中Znの存在下に、60～100の温度で、ハロゲン芳香族炭化水素或いは  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  で置換したハロゲンクマリン系化合物或いは別の  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  で置換したハロゲンクマリンのスルホン酸エステル類の化合物と反応させて0.5から20時間で獲得する。本発明のクマリン系化合物は确实な抗真菌作用があるので、爪囲炎、爪白癬などの疾病を治療するのに用いることができる。

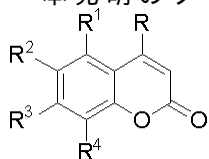
#### 発明内容

本発明の目的は一種クマリン系化合物を提供することにある。

本発明の目的はまた上記の一種クマリン系化合物の合成法を提供することにある。

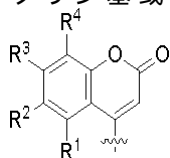
本発明の他の目的は一種クマリン系化合物の応用を提供することにある。

本発明のクマリン系化合物は次のような構成式を有する。



20

その中でRはH、CHO、OCH<sub>3</sub>、X、NO<sub>2</sub>、C<sub>1</sub>-<sub>10</sub>の炭化水素の基、-OCH<sub>2</sub>O-、CN或いはCOOCH<sub>3</sub>基団の置換的芳基、その中で芳基はベンゼン基、ナフタリン基或いは窒素雑芳基；或いは  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  が置換したクマリンの基

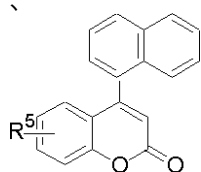
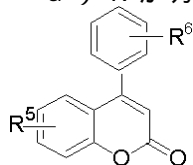


；  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  はH、C<sub>1</sub>-<sub>10</sub>の炭化水素の基、X、NO<sub>2</sub>、CN、OCH<sub>3</sub>、COOCH<sub>3</sub> 或いはOR<sup>5</sup>；R<sup>5</sup>はH、C<sub>1</sub>-<sub>10</sub>の炭化水素の基；Xはハロゲン。

その条件は、下記のとりの化合物を除く。

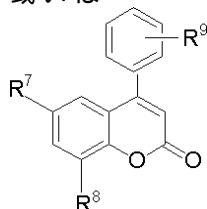
30

a) Rが芳基の場合、下記のとりの化合物は除かれる。



40

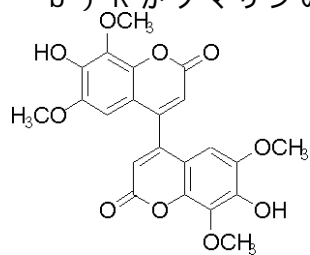
或いは



50

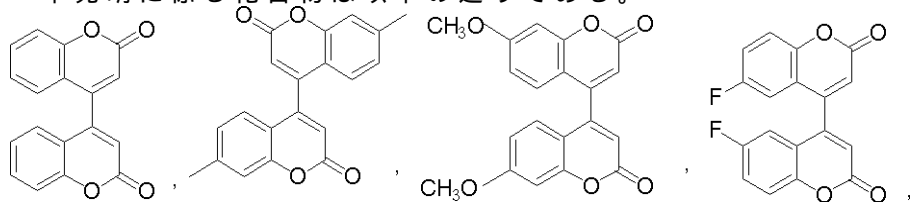
その中で  $R^5 = H, OH, OCH_3, C_{1-10}$  のアルキル基 或いはハロゲン,  $R^6 = H, CH_3, CH_3O$  或いはハロゲン,  $R^7$  或いは  $R^8 = CH_3O$  或いは  $OH$ ,  $R^9 = H, CH_3, OH$  或いは  $-OCH_2O-$  ;

b) R がクマリンの基の場合、下記のとおりの化合物は除かれる。

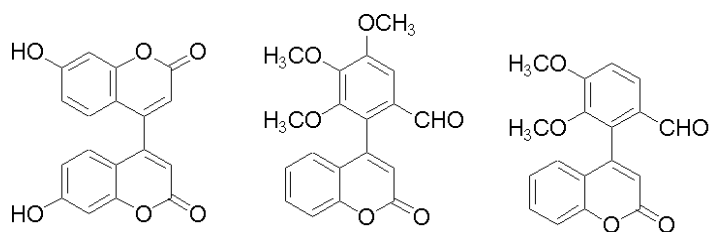
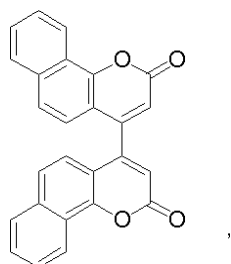


10

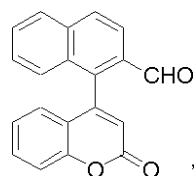
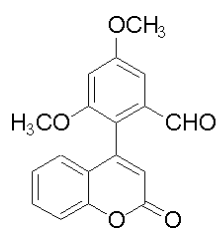
本発明に係る化合物は以下の通りである。



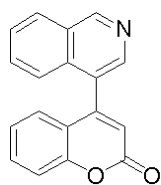
20



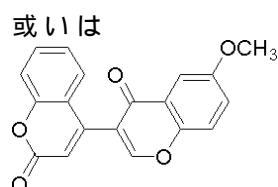
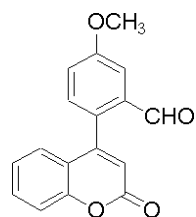
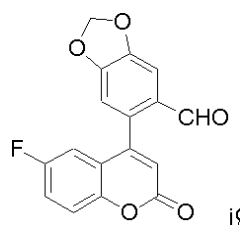
30



40







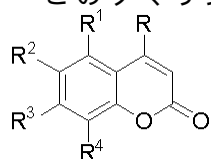
10

本発明の化合物の合成方法は次のとおりに分類して描写される：

20

分子式が  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  で置換したクマリンスルホン酸エステル類の化合物を底物にし、2価或いは零価のパラジウム化合物（又は白銅化合物）とホスフィンリガンドを触媒として使用する。そして、有機溶剤中にこの触媒と  $Zn$  が存在する場合に、60～100の温度で、ハロゲン芳香族炭化水素或いは  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  が置換したハロゲンクマリン系化合物或いは別の  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  が置換したハロゲンクマリンのスルホン酸エステル類の化合物と0.5～20時間反応させて獲得した。

このクマリン系化合物構成式は



30

この化合物において、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  で置換したクマリンスルホン酸エステル類の化合物、2価或いは零価のパラジウム（或いは白銅）化合物、ホスフィンリガンド、 $Zn$ 、ハロゲン芳香族炭化水素或いは  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  が置換したハロゲンクマリン系化合物（又は別の  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  が置換したハロゲンクマリンのスルホン酸エステル類の化合物）のモル比率は(1)：(0.05～1)：(0.05～1)：(1～5)：(1～10)。その中で  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  は上記のとおり、ハロゲンは沃素、臭素、塩素であり、芳香族炭化水素は  $H$ 、 $CHO$ 、 $OCH_3$ 、 $X$ 、 $NO_2$ 、 $C_{1-10}$  の炭化水素の基、 $CN$ 、 $COOCH_3$  が置換したハロゲン芳基或いはハロゲンナフタリンの基或いはハロゲン窒素ヘテロ芳香基。

40

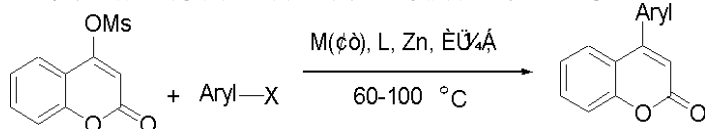
言い換えれば、本発明の方法は、底物はハロゲン芳香族炭化水素或いは  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  が置換したハロゲンクマリン化合物反応できるだけでなく、底物は偶然の一致反応もできる。

上記の反応中、2価或いは零価のパラジウム或いは白銅化合物は2の(3のベンゼンの基ホスフィン)2の塩化パラジウム( $PdCl_2(PPh_3)_2$ )、2の(3のベンゼンの基ホスフィン)2の塩化ニッケル( $NiCl_2(PPh_3)_2$ )、4の(3のベンゼンの基ホスフィン)パラジウム( $Pd(PPh_3)_4$ )、4の(3のベンゼンの基ホスフィン)白銅( $Ni(PPh_3)_4$ )等である。述べたホスフィンリガンドは1,2-ニ(2のベンゼンの基ホスフィン)エチル、1,3-ニ(2のベンゼンの基ホスフィン)プロパン、1,4-ニ(2のベンゼンの基ホスフィン)ブタン、1,1'-ニ(ニベンゼンの基

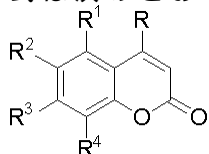
50

ホスフィン)フェロセン或いは2,2'-ニ(ニベンゼン基ホスフィン)バイナブ(BINAP)、トリフェニルフォスフィンであり、その中でXはハロゲン沃素、臭素、塩素である。述べた有機溶剤はベンゼン、トルエン、石油エーテル、四塩化炭素、酸化テトラメチレンのいずれかである。

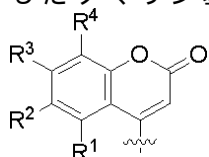
本発明の方法は次の典型的反応式で表示できる。



述べた真菌感染を治療する薬物の調製に用いられている1種のクマリン系化合物の構造式は次のとおりである。 10



その中でRはH、CHO、OCH<sub>3</sub>、X、NO<sub>2</sub>、C<sub>1-10</sub>の炭化水素基、-OCH<sub>2</sub>O-、CN或いはCOOCH<sub>3</sub>基団は単替わり或いは多替わり芳基、その中で芳基はベンゼン基、ナフタリン基或いは窒素雑芳基であり；或いはR<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>が置換したクマリン基



R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>はH、C<sub>1-10</sub>の炭化水素基、X、NO<sub>2</sub>、CN、OCH<sub>3</sub>、COOCH<sub>3</sub>或いはOR<sup>5</sup>；R<sup>5</sup>はH、C<sub>1-10</sub>の炭化水素基；Xはハロゲン、請求項1で述べたa)とb)の化合物条件が存在していない。 20

#### 【発明の効果】

#### 【0011】

本願発明のクマリン系化合物によれば、爪囲炎、爪白癬等に対し抗菌作用を有している。 30

#### 【発明を実施するための最良の形態】

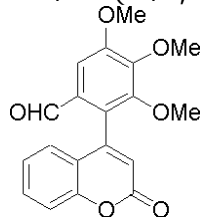
#### 【0012】

次の実施例を通じて発明を理解するのに役立つが、本発明の内容を制限するものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0013】

4-(4,5,6-トリメトキシ-2-ベンズアルデヒド)クマリン(1)の合成



底物4-クマリンメタンスルホン酸エステル(1~100mmol)、NiCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(0.2~20mmol)、PPh<sub>3</sub>(0.4~40mmol)、活性化の亜鉛粉(3~300mmol)を、10~1000ミリリットル(ml)の乾燥した反応の瓶にいっしょに入れて、4~400mlの無水のトルエンを入れ、オイルバスの温度が90に達してから、4~400mlの無水のトルエンに溶解した3,4,5-トリメトキシ2沃素ベンズアルデヒド(1~100mmol)を自動注射器でゆっくりと滴って加え、0.5~20時間攪拌した後に、自然に温度を下げて室温に達すると、反応瓶に4~4 40

00 ml 5%の稀塩酸と4~400 ml 二塩素メタン( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )を入れて、1時間攪拌し、沈殿した後に、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ で水性相( $3 \times 10 \sim 1000 \text{ ml}$ )を抽出し、その後飽和重曹水溶液(aq  $\text{NaHCO}_3$ )と飽和塩化ナトリウム水溶液(brine)を用いて順次有機相( $10 \sim 1000 \text{ ml}$ )を洗い、有機相を収集してから、無水の硫酸ナトリウムで2時間乾燥し、濾過し、濃縮させて、残余物を縦方向にレイヤ分析して産物(4-(4,5,6-トリメトキシ-2-ベンズアルデヒド)クマリン(1))を得た。この産物の収量(yield)71%;

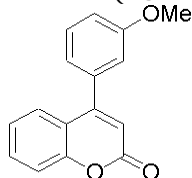
《産物の特徴データ》

$^1\text{H}$  NMR ( $300 \text{ MHz}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 9.70 (s, CHO, 1H), 7.56 (s, Ph, 1H), 7.45 - 7.03 (m, Ph, 4H), 6.41 (s, CH, 1H), 4.02 (s, OMe, 3H), 3.99 (s, OMe, 3H), 3.73 (s, OMe, 3H);  
EI-MS (m/z, %): 341 ( $\text{M}^+ + 1$ , 100), 340 ( $\text{M}^+$ , 91.40), 325 (76.86), 297 (47.70), 282 (23.64), 281 (34.42), 237 (22.72), 155 (17.46);  
IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3007, 2987, 2941, 1726, 1677, 1603, 1587, 1562, 1484, 1365, 1331;  
HRMS.  $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_6$ , 計算値: 340.09469; 実測値: 340.09561.

【実施例2】

【0014】

4-(3-メトキシルベンゼン基)クマリン(2)の合成



底物4-クマリンメタンスルホン酸エステル( $1 \sim 100 \text{ mmol}$ )、 $\text{NiCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ( $0.2 \sim 20 \text{ mmol}$ )、 $\text{PPh}_3$ ( $0.4 \sim 40 \text{ mmol}$ )、活性化の亜鉛粉( $3 \sim 300 \text{ mmol}$ )を10~1000ミリリットル(ml)の乾燥した反応の瓶にいっしょに入れて、4~400 mlの無水のトルエンを入れ、オイルバスの温度が90に達してから、4~400 mlの無水のトルエンに溶解した3-メトキシル2-沃素ベンゼン( $1 \sim 100 \text{ mmol}$ )を自動注射器でゆっくりと滴って加え、0.5~20時間攪拌した後に、自然に温度を下げて室温に達すると、反応瓶に4~400 ml 5%の稀塩酸と4~400 ml 二塩素メタン( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )を入れて、1時間攪拌し、沈殿した後に、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ で水性相( $3 \times 10 \sim 1000 \text{ ml}$ )を抽出し、その後、飽和重曹水溶液(aq  $\text{NaHCO}_3$ )と飽和塩化ナトリウム水溶液(brine)を用いて順次、有機相( $10 \sim 1000 \text{ ml}$ )を洗い、有機相を収集してから、無水の硫酸ナトリウムで2時間乾燥し、濾過し、濃縮させて、残留物を縦方向にレイヤ分析して生成物(4-(3-メトキシルベンゼン基)クマリン(2))を析出し、その収量は70%であった。

《産物の特徴データ》

$^1\text{H}$  NMR ( $300 \text{ MHz}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 7.56 - 7.05 (m, Ph, 6H), 6.99 (s, Ph, 1H), 6.40 (s, CH, 1H), 3.87 (s, OMe, 3H) ppm;  
EI-MS (m/z, %): 263 ( $\text{M}^+ + 1$ , 19.70), 262 ( $\text{M}^+$ , 100), 261 ( $\text{M}^+ - 1$ , 20.31), 205 (9.38), 184 (13.98), 183 (64.62), 108 (22.78), 107 (12.53);  
IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3068, 2846, 1755, 1720, 1596, 1583, 1558, 1470, 1430, 875, 803,

779, 767, 752, 700;

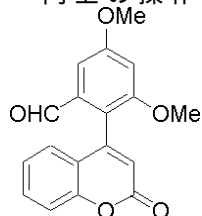
HRMS.  $C_{16}H_{12}O_3$ , 計算値: 252.07814; 実測値: 252.07507.

### 【実施例 3】

#### 【0015】

4 - (4, 6 - ジメトキシ (dimethoxy) - 2 - ベンズアルデヒド) クマリン (3) の合成

同上の操作で、収量は 67% であった。



10

#### 《産物の特徴データ》

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ) d: 9.80 (s, CHO, 1H), 7.23 - 7.03 (m, Ph, 3H), 7.01 (s, Ph, J = 6.6 Hz, 1H), 6.83 (s, Ph, 1H), 6.50 (s, Ph, 1H), 6.37 (s, CH, 1H), 3.88 (s, OMe, 3H), 3.76 (s, OMe, 3H) ppm;

EI-MS (m/z, %): 311 ( $M^+$  + 1, 20.33), 310 ( $M^+$ , 100), 282 (32.64), 281 (23.59), 267 (19.94), 262 (23.04), 57 (24.13), 43 (19.92);

IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3091, 2874, 1729, 1689, 1600, 1564, 1449, 1349, 1361, 1326, 1290;

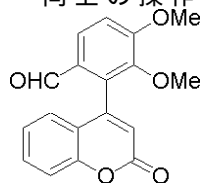
元素分析.  $C_{18}H_{14}O_5$ , 計算値: C, 69.67; H, 4.55; 実測値: C, 69.58; H, 4.37.

### 【実施例 4】

#### 【0016】

4 - (5, 6 - ジメトキシ - 2 - ベンズアルデヒド) クマリン (4) の合成

同上の操作で、収量は 72% であった。



#### 《産物の特徴データ》

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ) d: 9.69 (s, CHO, 1H), 7.86 (Ph, 1H), 7.54 (Ph, 1H), 7.45 (Ph, 1H), 7.22 - 7.16 (Ph, 2H), 7.01 (Ph, 1H), 6.40 (s, CH, 1H), 4.05 (s, OMe, 3H), 3.70 (s, OMe, 3H) ppm;

EI-MS (m/z, %): 310 ( $M^+$ , 70.50), 296 (19.68), 295 (100), 267 (46.51), 252 (29.37), 251 (34.84), 236 (21.91), 139 (27.83);

IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3088, 2947, 2837, 2733, 1729, 1695, 1683, 1604, 1584, 1566;

元素分析.  $C_{18}H_{14}O_5$ , 計算値: C, 69.67; H, 4.55; 実測値: C, 69.86; H, 4.57.

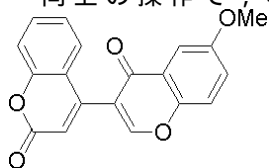
50

## 【実施例 5】

## 【0017】

## (5) の合成

同上の操作で、収量は 83% であった。



## 《産物の特徴データ》

10

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 8.08 (d, CH,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.64 (s, Ph, 1H), 7.54 (d, Ph,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.51 (d, Ph,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.42 - 7.21 (m, Ph, 4H), 6.45 (d, CH,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 3.93 (s, OMe, 3H) ppm;

$^{13}\text{C}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 175.12, 160.67, 157.84, 154.08, 153.90, 151.45, 148.05, 132.41, 127.02, 124.91, 124.52, 120.90, 120.03, 118.95, 117.70, 117.45, 105.45, 56.28 ppm;

20

EI-MS ( $m/z$ , %): 320 ( $\text{M}^+$ , 4.26), 292 (10.00), 277 (34.89), 262 (92.13), 183 (69.87), 105 (100), 71 (49.36), 69 (40.64);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3078, 2963, 1720, 1649, 1610, 1488, 1446, 1334, 1271;

HRMS.  $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{O}_5$ , 計算値: 320.06848; 実測値: 320.07339.

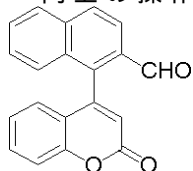
## 【実施例 6】

## 【0018】

## 4 - (2 - ナフタリンのメチルアルデヒド) クマリン (6) の合成

30

同上の操作で、収量は 63% であった。



## 《産物の特徴データ》

40

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 10.06 (s, CHO, 1H), 8.63 - 6.82 (m, Ph, 10H), 6.56 (s, CH, 1H) ppm;

$^{13}\text{C}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 190.09, 159.34, 153.34, 150.99, 135.78, 132.49, 130.55, 129.35, 128.43, 127.78, 126.71, 126.15, 124.63, 124.17, 122.44, 120.13, 118.28, 117.06, 116.50, 116.32 ppm;

EI-MS ( $m/z$ , %): 300 ( $\text{M}^+$ , 63.03), 271 (30.50), 215 (29.10), 118 (100), 90 (43.25), 89 (45.81), 63 (27.80), 46 (92.08);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3068, 2855, 1728, 1687, 1606, 1562, 1452;

50

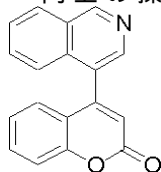
HRMS.  $C_{20}H_{12}O_3$ , 計算値: 300.08064; 実測値: 300.08357.

【実施例 7】

【0019】

4 - (3 - Nナフタリン基) クマリン (7) の合成

同上の操作で, 収量は 30 % であった。



10

《産物の特徴データ》

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ) d: 9.42 (s, NCH, 1H), 8.13 (d, Ph,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.73 - 7.46 (m, Ph, 5H), 7.13 - 7.01 (m, Ph, 2H), 6.55 (s, CH, 1H) ppm;

$^{13}C$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ) d: 160.50, 154.00, 132.63, 132.24, 132.07, 131.77, 128.67, 128.60, 128.54, 128.49, 128.47, 128.45, 127.26, 124.70, 124.69, 124.51, 117.90, 117.58 ppm;

EI-MS (m/z, %): 274 ( $M^+ + 1$ , 23.33), 273 ( $M^+$ , 84.23), 272 ( $M^+ - 1$ , 100), 256 (49.31), 245 (22.69), 244 (26.37), 216 (31.90), 189 (28.37);

IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 2925, 1752, 1723, 1605, 1560, 1501, 1448, 1360, 757;

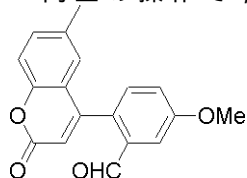
HRMS. 計算値  $C_{18}H_{11}NO_2$ : 273.07900; 実測値: 273.08120.

【実施例 8】

【0020】

6 - メチル - 4 - (4 - メトキシル - 2 - ベンズアルデヒド) クマリン (8) の合成

同上の操作で, 収量は 85 % であった。



《産物の特徴データ》

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ) d: 9.82 (s, CHO, 1H), 7.58 (s, Ph, 1H), 7.32 - 7.29 (m, Ph, 4H), 6.81 (s, Ph, 1H), 6.33 (s, CH, 1H), 3.94 (s, OMe, 3H), 2.26 (s,  $CH_3$ , 3H) ppm;

EI-MS (m/z, %): 294 ( $M^+$ , 9.09), 268 (25.37), 256 (20.23), 240 (21.80), 225 (33.97), 199 (100), 212 (19.84), 105 (51.00);

IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3442, 2927, 2850, 1726, 1606, 1572, 1487, 1423, 1280, 1251;

HRMS. 計算値  $C_{18}H_{14}O_4$ : 294.08921; 実測値: 294.08517.

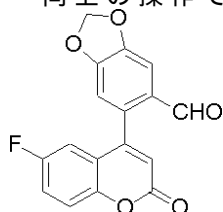
50

## 【実施例 9】

## 【0021】

(9) の合成

同上の操作で、収量は90%であった。



## 《産物の特徴データ》

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 9.70 (s, CHO, 1H), 7.54 - 7.30 (m, Ph, 5H), 6.80 (s, CH, 1H), 6.39 (d,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 15\text{ Hz}$ , 2H) ppm;

EI-MS (m/z, %): 312 ( $\text{M}^+$ , 70.62), 284 (83.77), 283 (26.33), 270 (28.03), 269 (100), 256 (44.59), 255 (20.62), 170 (24.33);

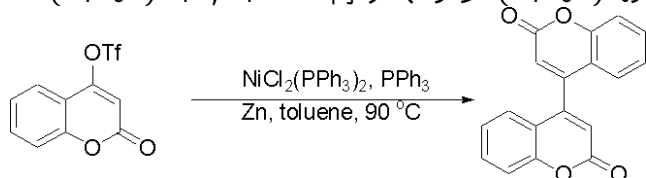
IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3075, 2913, 2861, 1725, 1682, 1610, 1571, 1504, 1482, 1440, 1369, 1268, 1253;

HRMS.  $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{FO}_4$ , 計算値: 312.04340; 実測値: 312.03852.

## 【実施例 10】

## 【0022】

(10) 4, 4'-両クマリン(10)の合成



乾燥させた10 ml 反応瓶中に高純度のアルゴンを通し、0.5 mmolの底物0.1 mmol  $\text{NiCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ , 0.2 mmol  $\text{PPh}_3$ , 1.5 mmol 活性化の亜鉛粉末、3 ml 乾燥したトルエンを入れ、細心の注意をして空気を引き抜き、高純度のアルゴンを通し、2度このように繰り返して、できるだけ体系中の酸素を除去する。温度を高めて(90°C)攪拌し、反応を観察し、反応が終わった後に、室温まで冷却する。その後、3 ml 5% 稀塩酸、3 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  を入れて体系が清澄透明になるまで激しく攪拌する。その後に $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  で水性相を抽出し、有機相を合併し、 $\text{NaHCO}_3$  水溶液、水、brineで有機相を洗い、乾燥、濃縮、シリカゲル(300-400目)で縦方向にレイヤ解析して純化する。

## 《産物の特徴データ》

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 7.64 (d, Ph,  $J = 9.0\text{ Hz}$ , 1H), 7.48 (d, Ph,  $J = 9.0\text{ Hz}$ , 1H), 7.22 (m, Ph, 1H), 6.50 (s, CH, 1H) ppm;

EI-MS (m/z, %): 290 ( $\text{M}^+$ , 38.52), 263 (23.14), 262 (100), 245 (44.28), 234 (31.48), 218 (24.63), 205 (37.60), 176 (23.22);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1973, 1854, 1720, 1604, 1560, 1487, 1376, 1357;

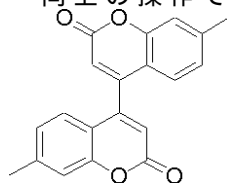
HRMS. 計算値  $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{O}_4$ : 290.05791. 実測値: 290.05670.

## 【実施例 11】

## 【0023】

(11) 4, 4' - 両 (7 - メチル) クマリン (11) の合成

同上の操作で、収量は 38 % であった。



## 《産物の特徴データ》

10

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 7.43 (d, Ph,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , 1H), 7.37 (d, Ph,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , 1H), 6.98 (s, Ph, 1H), 6.44 (s, CH, 1H), 2.31 (s,  $\text{CH}_3$ , 3H) ppm;

EI-MS ( $m/z$ , %): 318 ( $\text{M}^+$ , 38.85), 291 (21.48), 290 (100), 275 (32.52), 273 (67.88), 262 (19.23), 261 (19.01), 246 (26.38);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1973, 1724, 1613, 1573, 1560, 1489, 1418, 1180, 1130, 935, 814;

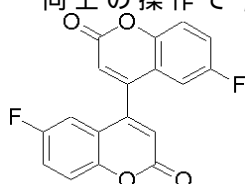
HRMS. 計算値  $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$ : 318.08921. 実測値: 318.08975. 20

## 【実施例 12】

## 【0024】

(12) 4, 4' - 両 (6 - フッ素) クマリン (12) の合成

同上の操作で、収量は 22 % であった。



## 《産物の特徴データ》

30

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $d\text{-DMSO}$ ) d: 7.86 (d, Ph,  $J = 7.5 \text{ Hz}$ , 1H), 7.55 (s, Ph, 1H), 7.09 (d, Ph,  $J = 8.1 \text{ Hz}$ , 1H), 5.95 (s, CH, 1H) ppm;

EI-MS ( $m/z$ , %): 329 ( $\text{M}^+ + 3$ , 19.83), 328 ( $\text{M}^+ + 2$ , 100), 326 ( $\text{M}^+$ , 14.10), 310 (17.48), 299 (16.14), 298 (13.89), 258 (13.10), 257 (50.74);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3053, 2925, 1766, 1721, 1568, 1485, 1430, 1263, 1226, 1189, 1170, 942, 926, 820; 40

HRMS. 計算値  $\text{C}_{24}\text{H}_6\text{F}_2\text{O}_4$ : 326.03906. 実測値: 326.03667.

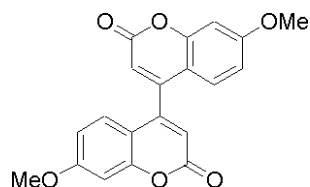
## 【実施例 13】

## 【0025】

(13) 4, 4' - 両 (7 - メトキシル) クマリン (13) の合成

同上の操作で、収量は 55 % であった。





## 《産物の特徴データ》

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 7.65 (d, Ph,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 7.38 (d, Ph,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 6.84 (s, Ph, 1H), 6.27 (s, CH, 1H), 3.88 (s, OMe, 3H) ppm;

$^{13}\text{C}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 163.06, 161.55, 156.12, 143.74, 132.38, 132.25, 129.02, 128.85, 128.69, 113.30, 112.88, 112.76, 101.04, 56.03 ppm;

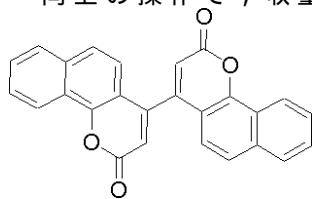
IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1721, 1706, 1614, 1558, 1506, 1465, 1400, 1353, 1284, 1234.

## 【実施例14】

## 【0026】

(14) 4, 4'-両(7, 8-ベンゼン基)クマリン(14)の合成

同上の操作で、収量は63%であった。



## 《産物の特徴データ》

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d: 8.66 (d, Ar,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.89 - 7.57 (m, Ar, 4H), 7.15 (d, Ar,  $J = 6.6$  Hz, 1H), 6.62 (s, CH, 1H) ppm;

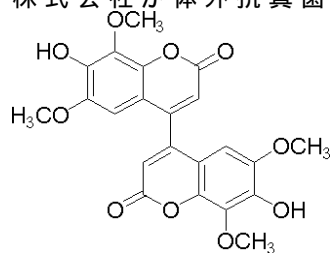
EI-MS ( $m/z$ , %): 390 ( $\text{M}^+$ , 69.95), 363 (30.42), 362 (100), 345 (31.52), 318 (30.22), 305 (32.67), 276 (37.38), 138 (38.32);

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1720, 1632, 1548, 1502, 1469, 1376, 1355, 1327.

## 【実施例15】

## 【0027】

本発明の化合物の一つである4, 4'-バイイソフラケシディンを用いて江蘇恒瑞医薬株式会社が体外抗真菌活性をテストした結果は次のとおりである。



4, 4'-バイイソフラケシディン抗真菌感染の生理活性のテストで、レボフロキサシンなどの抗生物質は明らかな活性を現さなかった。ところが、本発明の化合物4, 4'-バイイソフラケシディンは表葡萄球菌に対して抗菌活性があった。比較的敏感な菌株のMICの値は128  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。白い数珠菌にも制菌作用を呈し、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度下に

その静菌作用圏は約 10 mm である。

【実施例 16】

【0028】

体内保護実験

実験方法

1. 実験菌液の調製

試験菌の 2 ~ 3 個単一菌落 (株) を選んで Sabouraud 液体培養基中に接種して、37 °C で 18 時間培養し、5 % の滅菌イースト液を適当に希釈して備えた。

2. 最小致死菌量 (MLD) の測定

3. 健康な昆明種小鼠を用いて、体重が 18 ~ 22 グラムで、ランダムなグループに分ける。それぞれの鼠に 0.5 ml の実験菌を感染させた後に連続 7 日観察しながら小鼠の死亡数を記録した。小鼠の 100 % 死亡を引き起こす最低菌量を最小致死菌量 (MLD) とする。この菌量を体内保護試験の感染菌量に設定する。

4. 薬液の調合

試験用の薬は全部 0.5 % の CMC で調合し、フルコナゾール、4, 4' - バイソフラケシジンで必要な濃度に調合する。

5. 感染及び治療実験方法

実験動物を性別、体重によってランダムに平均的にグループを分けた。それぞれは 10 個の小鼠で、雌雄半々、それぞれ小鼠の腹腔に 0.5 ml の感染菌液を注射した。感染前 2 時間と感染後の 4 時間にそれぞれの小鼠に濃さの異なるフルコナゾールと 4, 4' - バイソフラケシジンを、薬量として 0.5 ml / 回、20 g で服用させた。同時に、感染比較組を設けて、感染後 7 日以内の死んだ小鼠数を記録した。Bliss 法によって半数有効用量の ED<sub>50</sub> と 95 % の可信限度を計算した。

実験結果

フルコナゾール、4, 4' - バイソフラケシジンによる白いカンジダ (candida) 菌 02 - 6 の感染した小鼠に対する体内保護作用は、Bliss 法に従って半数有効用量 ED<sub>50</sub> 及び 95 % 可信限度を計算した。

【表 1】

CD-011、フルコナゾールは小鼠体内に白いカンジダ菌 02-6 に感染の保護作用

感染菌株 (感染菌量 CFU/ml)	薬物	薬剂量 (mg/kg)	動物数 (匹)	生存数 (匹)	生存率 (%)	ED <sub>50</sub> 及び 95% 可信限度 (mg/kg)
白いカンジ ダ菌 02- 6 (2.07 × 10 <sup>4</sup> )	フルコナ ゾール	200	10	8	80	135.89 (114.98-170.95)
		160	10	6	60	
		128	10	4	40	
		102.4	10	4	40	
		89.2	10	2	20	
		65.5	10	0	0	
	4, 4' - バイソ フラケシ ジン	200	10	7	70	149.50 (127.97-130.7)
		160	10	6	60	
		128	10	4	40	
		102.4	10	3	20	
		89.2	10	1	10	
		65.5	10	0	0	
感染比較組	-	-	10	0	0.0	

【0029】

## 結論

4, 4'-バイイソフラケシディンは小鼠体内に白いカンジダ菌 02-6 の感染にある程度の保護作用があった。投薬量は 200 mg/kg の場合、生存率は 70% であった。4, 4'-バイイソフラケシジンによる小鼠体内の白いカンジダ菌の感染体内保護作用はフルコナゾールと基本的に同じであった。

## 【実施例 17】

## 【0030】

体外薬敏（アレルギー）MIC 試験

方法：それぞれのテストの菌を生理食塩水で菌液を作成し、濁り（湿菌濃度）が 2.0 McF mg/ml 以上の菌液になるように希釈し、再び生理食塩水で 100 倍に希釈し、RPMI 1640 を用いて 10 倍に希釈し、得られたサンプルを 2 倍希釈し、96 の穴を設けた培養板中で 72 - 96 時間だけ培養する。軽く振動を与え、490 nm の波長で光電の比色をする。

試験菌：イースト、白いカンジダ菌 01-5、01-1、02-6、白いカンジダ菌 CMCC、黒曲黴、新型クリプトコックス菌、赤クリプトコックス菌、疣状毛菌。

結果（MIC）は次の表のとおりであった。

【表 2】

	フルコナゾール ( $\mu\text{g/ml}$ )	4, 4'-バイイソフラケシジン( $\mu\text{g/ml}$ )
イースト	64	>128
白いカンジダ菌	>128	64
白いカンジダ菌	>128	>128
白いカンジダ菌 01-5	128	64
白いカンジダ菌 CMCC	64	>128
白いカンジダ菌 02-6	64	32
白いカンジダ菌 01-1	128	64
黒曲黴	>128	128
新型クリプトコックス菌	16	64
赤クリプトコックス菌	16	16
疣状毛菌	128	128

## 【0031】

結論：4, 4'-バイイソフラケシディンは白いカンジダ菌についての抗菌活性は弱い。MIC は 128、>128  $\mu\text{g/ml}$ 、黴中の黒曲黴、新型クリプトコックス菌、赤クリプトコックス菌、疣状毛菌について抗菌活性がある。MIC 値は各 128, 64, 16, 128  $\mu\text{g/ml}$ 、その抗菌の強さはフルコナゾールと基本的に同じであった。

## 【実施例 18】

## 【0032】

細菌回復突然変異試験

《新薬（西洋医学で用いる薬剤）臨床前研究ガイドライン総編（薬学、薬理学、毒理学）》中の急変実験の要求に従って、5、50、500、1000、5000  $\mu\text{g}/\text{皿}$  の5個の薬量の組を設定し、S9のない実験システムの中で、4,4'-バイイソフラケシディンについてテストをした。結果としては、高薬量（5000  $\mu\text{g}/\text{皿}$ ）の4,4'-バイイソフラケシディンは、TA97、TA98、TA100、TA102の各菌株の細菌の成長を抑制できる。そのほかの4個の薬量は各菌株の菌落数の増加或いは抑制が見られなかった。尚、本実験の条件で、4,4'-バイイソフラケシディンは高薬量の時、細菌の成長を抑制する作用があり、そのほかの薬量はマウスサルモネラ菌の各菌株を変化させる作用がなかった。

【実施例19】

10

【0033】

4,4'-バイイソフラケシディンの哺乳動物細胞のCHLの染色体の変異を誘発する試験

CHLの細胞を用いて4,4'-バイイソフラケシディンの誘変作用を評価する。先に一般的方法によってIC50を求めて、それを最高の濃度の薬量に設定し、再び0.5倍で順次希釈し、全部で3個の薬剤組を設ける。実験は-S<sub>9</sub>の実験系で行う。4,4'-バイイソフラケシディンのIC50は248  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、その薬剤量は、62、124、248  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に設定され、この薬物を細胞培養器に入れて24時間、直接的に作用させる。4,4'-バイイソフラケシディンがCHLの細胞に対して誘変作用の有無を観察する。結果として、この試験の条件の下で、-S<sub>9</sub>の実験系中で、4,4'-バイイソフラケシディンの高薬量（248  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を用いた場合の変異率は12%であり、中薬量と低薬量の変異率は1%であった。この二つの組の変異率は用量相関関係を顕示していなかった。2度重複して試験を行った結果は相似していた。従って、この実験条件の下に、4,4'-バイイソフラケシディンは比較的に高薬量の場合は弱い変異誘起物質と考える。

20

【実施例20】

【0034】

4,4'-バイイソフラケシディンの小鼠の髄マイクロ核実験

ICR小鼠70匹を選んで、ランダムに7組、それぞれ10匹、雌雄半々に分けた。小鼠に一回で4,4'-バイイソフラケシディンをMTD>5000  $\text{mg}/\text{kg}$ を胃に詰め込む。最高用量は5000  $\text{mg}/\text{kg}$ を選んで、全部で5000、2500、1250、625  $\text{mg}/\text{kg}$ の4個の用量組、1個の陰性と1個の陽性を照合組として設ける。毎日1回胃に詰め込み、2日続ける。最後の投薬した24時間後に見本を取って、鏡検する。結果として、本実験条件の下に、4,4'-バイイソフラケシジン化合物は小鼠の髄赤血球マイクロ核率増加を誘発する作用がない。

30

【実施例21】

【0035】

毒性試験

4,4'-バイイソフラケシディンは抗真菌作用を持っているので、細菌回復突然変異の試験中で高用量の時、菌の成長を抑制する作用がある。それ自身の薬効学作用に符合する。CHLの染色体の変異試験で、比較的高い用量の時だけ弱い誘発活性を示す。必要に応じて、さらに試験して確定できる。

40

【0036】

小鼠の急毒性のテスト結果として4,4'-バイイソフラケシディンのLD50は測定したが存在していなかった。最大耐用量がMTD>5  $\text{g}/\text{kg}$ であることが測定できた（14匹の小鼠を14日観察して死亡は2匹）。毒性が弱いことを示している。

【0037】

本発明者は同時にフルコナゾールのLD50が約1.6  $\text{g}/\text{kg}$ となることを測定した（4匹の小鼠を14日観察して、2匹死亡）。この結果、4,4'-バイイソフラケシディンの毒性はフルコナゾールより約3倍小さい。最も重要なのは小鼠の髄赤血球マイクロ

50

核率増加を誘発する作用が無いことである。従って、4, 4' - バイソフラキシディンは毒性がフルコナゾールより小さく、抗真菌作用が比較的強い新型化合物と思われる。

#### 【実施例 22】

#### 【0038】

肝毒性について抗真菌化合物「4, 4' - Biisofraxidin」とフルコナゾール (Fluconazole) との比較研究

試験の目的：

抗真菌化合物「4, 4' - Biisofraxidin」とフルコナゾール (Fluconazole) とに対して肝毒性を比較して評価し、薬物の更なる開発のために根拠を提供する。

試験方法及び試験結果：

急性毒性試験

化合物「4, 4' - Biisofraxidin」とフルコナゾール (Fluconazole) との急性毒性に対して共に評価を行い、毒性反応及び死亡状況を観察し、取りあえず ICR 小鼠に両化合物のそれぞれ LD50 を飲ませることを試し、そして比較を行う。

そして、ICR 小鼠が化合物「4, 4' - Biisofraxidin」を一回飲んだ後、14 日続いて観察した結果として、明らかな毒性を出現しなかった。また、死亡 (0 / 10) も出現しなかった。即ち、MTD > 5 g / kg である。ところが、ICR 小鼠がフルコナゾール (Fluconazole) を一回飲んだ後、元気が弱まり、動きが少なくなり、四肢の力が無くなった。更に、投薬約 5 時間 (5 h) 後、ある動物は口で呼吸するのを始め、死亡し、LD50 は約 1.6 g / kg (2 / 4) である。

肝毒性の比較

ICR 小鼠に同等の薬剤量の化合物「4, 4' - Biisofraxidin」とフルコナゾール (Fluconazole) (1.6 g / kg) とをそれぞれ飲ませ、投薬後 4 時間 (4 h) 及び 24 時間 (24 h)、それぞれ血を採り、そして血清を分離し、肝臓の機能指標の aspartate aminotransferase test (AST) 及び alanine aminotransferase test について測定を行った。

結果として、投薬後 4 時間 (4 h)、CWW 組には小鼠の異常は殆ど無かった。しかし、フルコナゾールを飲んだ組の小鼠では、4 匹の中 3 匹は元気が弱まり、動きが少なくなり、四肢の力が無くなった。2 匹を選んで解剖を行って血清を測定した結果、ALT、AST レベルは CWW 組のより明らかに高かった。更に、投薬 24 時間 (24 h) 後、フルコナゾール組に残った 2 匹小鼠の中 1 匹 (1 / 2) の AST レベルが相対的に高く、他の 1 匹の ALT、AST レベルが高まっていなかったと見られた。また、化合物「4, 4' - Biisofraxidin」組の小鼠に対して、投薬 4 時間及び 24 時間後、血清 ALT、AST レベル両方とも異常なし。尚、ICR 小鼠が化合物「4, 4' - Biisofraxidin」(1.6 g / kg) を飲んだ場合、明らかな肝毒性がなかった。ところが、同等の薬剤量でフルコナゾール (Fluconazole) (1.6 g / kg) を飲んだ場合、肝毒性を有し、特に、投薬 4 時間後毒性が明らかに出現した。

これらの比較は、下記のテーブルによって表されている。

10

20

30

40

**Table 1. Serum ALT/AST Activity of ICR Mice**

<b>Group</b>	<b>Time after Treatment</b>	<b>ALT(U/L)*</b>	<b>AST(U/L)*</b>
<b>4,4'-biisofraxidin 1.6g/kg</b>	<b>4hours</b>	<b>47.5 (48,47)</b>	<b>93.5 (96,91)</b>
<b>Fluconazole 1.6g/kg</b>	<b>4hours</b>	<b>84.5 (87,82)</b>	<b>189.5 (155,224)</b>
<b>4,4'-biisofraxidin 1.6g/kg</b>	<b>24hours</b>	<b>55 (46,64)</b>	<b>86 (80,92)</b>
<b>Fluconazole 1.6g/kg</b>	<b>24hours</b>	<b>53.5 (40,67)</b>	<b>99 (73,125)</b>

**\*Note:** under these 2 columns, the first data showed the mean value and the second data in parent thesis showed values of each sample.

## 【 国际调查报告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2004/000491

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D311/18,A61P31/10,A61K31/343

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)

IPC7, C07D, A61P, A61K

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)

PAJ,WPI,EPODOC,CA,STN,CNPAT Coumarin,naphthopyran, naphthopyrone, benzopran, benzopyrone, neoflvoid, bicoumarin,

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP-2876129B2 (DAISO CO. LT) ,22 Jan.1999 (22.01.1999) , claims, example 1-74,table 1	1
X	WO-9825608A(BIO'S SR L et al), 18.June.1998 (18.06.1998), claims, example 4,6	1
X	Lei jianguang et al, "the first total synthesis of 4,4-bisoxfraxidin",Chinese J. Chem., (2002),20,1263-1267, the whole document	1-5
X	Pharkphoom P. et al; "a new biscoumarin from impatiens balsamina root cultures" , Planta Medica, (1998),64,774-775,compound1	1,2
X	Paradkar M. V. et al; "a facile synthesis of new [4,4-bi-2H-1-benzopyran]-2,2-diones", Synthetic Communications,(1988), 18(6),589-596, 表 1, compound 3a-c	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 01/08/2004	Date of mailing of the international search report 26 · AUG 2004 (26 · 08 · 2004)
Name and mailing address of the ISA/ State Intellectual Property Office Of the People's Republic of China No. 6, Xi Tu Chneg Road, Haidian District, Beijing 100088 Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer Telephone No. (86-10)62085590

Form PCT/ISA /210 (second sheet) (January 2004)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2004/000491


C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Zhang yanying et al, "a study on the synthesis and spectra characteristics of coumarins", Dyestuffs and Coloration,(2002),40 (2) , 68-70, the whole document	1
X	Min-liang Yao et al , "a novel and convenient method to 4-substituted coumarins",Heteroatom Chem., (2000),11(6),380-382, table 1	1,2
X	Laurent Schio et al , "tosylates in palladium-catalysed coupling reactions. Application to the synthesis of arylcoumarin inhibitors of gyrase B", Tetrahedron Lett., (2000),41,1543-1547,table1	1,2
X	Jayati et al , "Palladium in organic synthesis:Part IV palladium(0) catalyzed arylation of coumarin",Indian J. Chem. , (1996),35B,588-589, table 1	1,2
X	Bose et al , "synthesis of 4-phenylcoumarins" , Indian J. Chem. , (1990),29B,422-424, table 1	1
X	Dervilla, "a new approach to neoflavonoid synthesis" ,J. Chem. Soc. Perkin Trans.,(1990),1,2851-2852, table 1	1
X	Zhang yanying et al, "current development in synthetic methods for arylcoumarins", Dyestuffs and Coloration, (2002),40(1),39-41, the whole document	1
A	Mohammad et al, "biomimetic synthesis of some novel coumarin dimers" ,Tetrahedron , (1996), 52(11),3991-3996	1,2
A	Johannes, "synthesis of the natural coumarins (E)-suberenol, cyclobisubero diene and two other related new coumarins", J. Reisch, Natural Products Chem., (1990),139,931-933	1,2
A	Sorouh et al, "synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins", Bioorg. Med. Chem.,(1999),7,1933-1940	1,2
A	Hao xiaojiang et al. "the chemical constituents of boenninghausenia sessilicarpa" , Acta Botanica Yunnanica, (1994) , 16 (3) , 310-312	1,2
A	Zhao yajun et al , "a reverse friedel-crafts reaction and the synthesis of enzo[h]coumarin", Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Perkinensis, (1994) , 30 (4) , 421-424	1
A	WO-9804572A(Kureha Chem. Industry CO. LTD.), 05.Feb.1998(05.02.1998),the whole documents	1
A	US-4083857A(Fisons Lim.),11.Apr.1978(11.04.1978), the whole documents	1
A	US-5554611A(Cassella Aktiengesellschaft),10. Sep. 1996(10.09.1996),the whole documents	1



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2004/000491

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
JP2876129B2	22-05-1999	JP2191269A	27-07-1990
		JP2876129B2	22-05-1999
WO9825608A	18-06-1998	ITRM960851A	10-06-1998
		WO9825608A	18-06-1998
		AU7845098A	03-07-1998
		IT1289238B	29-09-1998
WO9804572A	05-02-1998	None	
US4083857A	11-04-1978	GB1518291A	19-07-1978
		US4083857A	11-04-1978
US5554611A	10-09-1996	DE4337906A	11-05-1995
		EP0655242A	31-05-1995
		EP19940116789	25-10-1994
		JP7252147A	03-10-1995

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2004/000491
<b>A. 主题的分类</b> C07D311/18,A61P31/00,A61K31/343 按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
<b>B. 检索领域</b> 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC 7 C07D A61P A61K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) PAJ,WPI,EPODOC,CA,STN,CNPAT Coumarin,naphthopyran, naphthopyrone, benzopran, benzopyrone, neoflvoid, bicoumarin, dicoumarin, biscoumarin		
<b>C. 相关文件</b>		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	JP2876129B2, 22.1月.1999年(22-01-1999), 权利要求, 实施例1-74, 表1	1
X	WO9825608A, 18.6月1998年(18-06-1998), 权利要求, 实施例4, 6	1
X	Lei jianguang et al, "the first total synthesis of 4,4-bisoxfraxidin", Chinese J. Chem., (2002), 20, 1263-1267	1-5
X	Pharkphoom P. et al; "a new biscoumarin from impatiens balsamina root cultures", Planta Medica, (1998), 64, 774-775, 化合物1	1,2
X	Paradkar M. V. et al; "a facile synthesis of new [4,4-bi-2H-1-benzopyran]-2,2-diones", Synthetic Communication, (1988), 18(6), 589-596, 表1, 化合物 3a-c	1,2
X	张彦英等, "香豆素类化合物的合成及其光谱性质的研究", 染料与染色, (2003), 40(2), 68-70, 试验部分	1
X	Min-liang Yao et al, "a novel and convenient method to 4-substituted coumarins", Heteroatom Chem., (2000), 11(6), 380-382, 表1	1-2
X	Laurent Schio et al, "tosylates in palladium-catalysed coupling reactions. Application to the synthesis of arylcoumarin inhibitors of gyrase B", Tetrahedron Lett., (2000), 41, 1543-1547, 表1	1-2
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "Y" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 01/08/2004		国际检索报告邮寄日期 26.8月2004(26.08.2004)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员  电话号码: (86-10)62085590

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2004/000491

## C(续). 相关文件

类型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求要求
X	Jayati et al, "Palladium in organic synthesis: Part IV palladium(0) catalyzed arylation of coumarin", Indian J. Chem., (1996), 35B, 588-589, 表 1	1-2
X	Bose et al, "synthesis of 4-phenylcoumarins", Indian J. Chem., (1990), 29B, 422-424, 表 1	1
X	Dervilla, "a new approach to neoflavonoid synthesis", J. Chem. Soc. Perkin Trans., (1990), 1, 2851-2852, 表 1	1
X	张彦英等, "芳基取代香豆素的合成方法的研究", 染料与染色, (2003), 40(1), 39-41, 试验部分	1
A	Mohammad et al, "biomimetic synthesis of some novel coumarin dimers", Tetrahedron, (1996), 52(11), 3991-3996, 全文	1-2
A	Johannes, "synthesis of the natural coumarins (E)-suberenol, cyclobisubero diene and two other related new coumarins", J. Reisch, Natural Products Chem., (1990), 139, 931-933, 全文	3-5
A	Sorosh et al, "synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins", Bioorg. Med. Chem., (1999), 7, 1933-1940, 全文	1-2
A	郝小江等, "石椒草的化学成分", 云南植物研究, (1994), 16 (3), 310-312	1
A	赵亚军等, "一种逆付克反应及苯并[h]香豆素的合成", 北京大学学报 (1994), 30 (4), 421-424	1
A	WO-9804572A, 05.2 月.1998 年 (05-02-1998), 全文	1
A	US-4083857A, 11.4 月.1978 年 (11-04-1978), 全文	1
A	US-5554611A, 10.9 月.1996 年 (10-09-1996), 全文	1

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2004/000491

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
JP 2876129 B2	22-01-1999	JP 2191269 A	27-07-1990
		JP 2876129 B2	22-01-1999
WO 9825608 A	18-06-1998	ITRM 960851 A	10-06-1998
		WO 9825608 A	18-06-1998
		AU 7845098 A	03-07-1998
		IT 1289238 B	29-09-1998
WO 9804572 A	05-02-1998	WO 9804572 A	05-02-1998
US 4083857 A	11-04-1978	GB 1518291 A	19-07-1978
		US 4083857 A	11-04-1978
US 5554611 A	10-9-1996	DE 4337906 A	11-05-1995
		EP 0655242 A	31-05-1995
		EP 19940116789	25-10-1994
		JP 7252147 A	03-10-1995
		US 5554611 A	10-09-1996

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

**A 6 1 K 31/4725 (2006.01)**

A 6 1 K 31/4725

**A 6 1 P 31/10 (2006.01)**

A 6 1 P 31/10

**A 6 1 P 17/00 (2006.01)**

A 6 1 P 17/00 1 0 1

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

(72)発明者 任 進

中国 上海市 楓 林路3 5 4号 中国科学院上海有机化学研究所内

Fターム(参考) 4C062 EE02 EE43

4C063 AA01 BB01 CC79 CC81 DD15 DD79 EE01

4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 BA19 BC30 GA02 GA07 MA01 MA04

NA14 ZA90 ZB35