

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年12月18日 (18.12.2003)

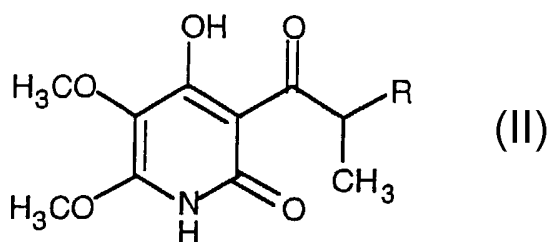
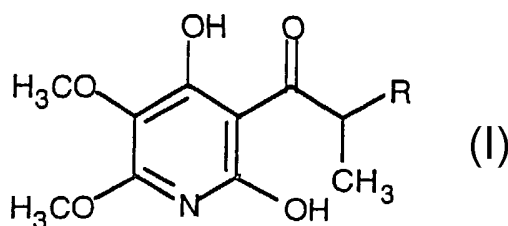
PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/103667 A1

- (51) 国際特許分類: **A61K 31/4409**, 31/4412, 45/00, A61P 43/00, C12N 1/14 // (C12N 1/14, C12R 1:80), C07D 213/69
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/05727
- (22) 国際出願日: 2002年6月10日 (10.06.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 社団法人北里研究所 (THE KITASATO INSTITUTE) [JP/JP]; 〒108-8642 東京都港区白金5丁目9番1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): 大村 智 (OMURA, Satoshi) [JP/JP]; 〒157-0076 東京都世田谷区岡本三丁目3番12号 Tokyo (JP). 塩見 和朗 (SHIOMI, Kazuro) [JP/JP]; 〒150-0013 東京都渋谷区恵比寿一丁目2番7号小野ビル202 Tokyo (JP). 供田 洋 (TOMODA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒182-0034 東京都調布市下石原3-7 1-1 1-2 1 1 Tokyo (JP). 増間 碌郎 (MASUMA, Rokuro) [JP/JP]; 〒108-0073 東京都港区三田四丁目7番13-1 0 2号 Tokyo (JP). 北
- 潔 (KITA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒171-0031 東京都豊島区目白4-2 0-2 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 小林 和憲 (KOBAYASHI, Kazunori); 〒170-0004 東京都豊島区北大塚2丁目25番1号太陽生命大塚ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: INHIBITORS AGAINST COMPLEX II OF ELECTRON TRANSPORT SYSTEM

(54) 発明の名称: 電子伝達系の複合体II阻害剤



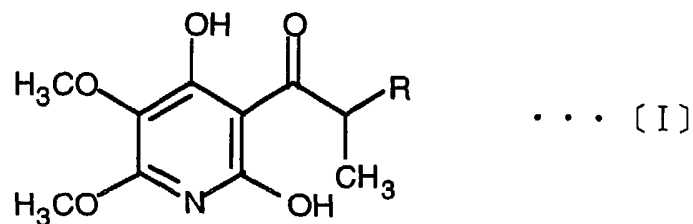
(57) Abstract: Inhibitors against complex II of the electron transport system, containing as the active ingredient pyridinol derivatives of the general formula [I] or tautomers thereof, i.e., 2-pyridone derivatives of the general formula [II], or salts of both: [I] [II] (wherein R is an alkyl or alkenyl group which may have a halogenated substituent). The inhibitors can inhibit complex II with potent activity even when used on the order of nM. Thus, the 2-pyridinol derivatives and the 2-pyridone derivatives being tautomers of the same are useful as complex II inhibitors.

WO 03/103667 A1

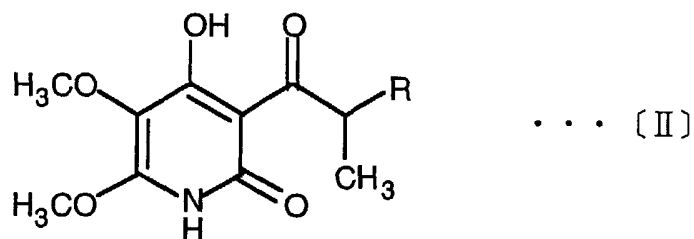


(57) 要約:

下記式一般式〔I〕



(式中、Rはハロゲンを含む置換基を有していてもよいアルキル基またはアルケニル基である)で表されるピリジノール誘導体もしくはその互変異性体である下記一般式〔II〕



(式中、Rはハロゲンを含む置換基を有していてもよいアルキル基またはアルケニル基である)で表される2-ピリドン誘導体、またはそれらの塩を含有する化合物を有効成分とする電子伝達系の複合体II阻害剤であって、nMオーダーで複合体IIを強い活性で阻害する。それ故、2-ピリジノール誘導体もしくはその互変異性体である2-ピリドン誘導体は、複合体II阻害剤として有用である。

明 細 書

電子伝達系の複合体Ⅱ阻害剤

技術分野

本発明は、例えばミトコンドリアでアデノシン三リン酸（ATP）を合成するための酸化的リン酸化を司る電子伝達系に関与するタンパク質複合体に関し、更に詳しくは電子伝達系の複合体Ⅱ（コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素）阻害剤に関する。

背景技術

ミトコンドリアでATPを合成するための酸化的リン酸化を司る電子伝達系には主として4種のタンパク質複合体が関与し、複合体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ及びⅣと呼ばれている（内海耕慥・井上正康監修：新ミトコンドリア学、8-13頁、金森崇・太田成男著：電子伝達とエネルギー転換系、共立出版、2001年）。この複合体のうち、複合体Ⅰ（NADH-ユビキノン酸化還元酵素）、複合体Ⅲ（ユビキノール-シトクロムc酸化還元酵素）、及び複合体Ⅳ（シトクロムc酸化還元酵素）に対しては、それぞれ優れた阻害剤が知られており、生化学研究などにおいて用いられている（内海耕慥・井上正康：新ミトコンドリア学、424-426頁、内海耕慥著：ミトコンドリアのエネルギー転換研究に用いられる阻害剤一覧、共立出版、2001年）。

複合体Ⅱ（コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素）阻害剤としては、テノイルトリフルオロアセトン（*thenoyl trifluoroacetone*）などがよく用いられていたが、その阻害濃度は μM オーダーという活性の弱いものであった（日本生化学会編：生化学実験講座12エネルギー代謝と生体酸化（上）215-255頁、香川靖雄・浅野朗著：ミトコンドリアおよびその構成成分の調

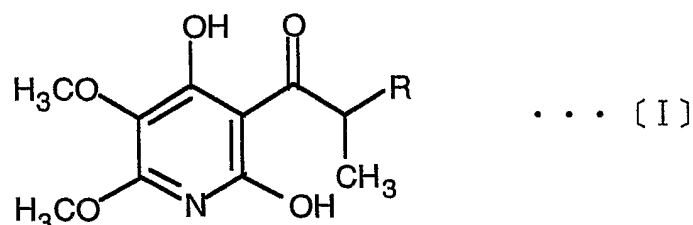
整法、東京化学同人、1976年)。またカルボキシシンがこれまで知られていた複合体II阻害剤としては最も強い阻害活性を示すと言われていたが(P. C. Mowery, B. A. C. Ackrell, and T. P. Singer: Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 71. p354-361、1976)、複合体I阻害剤のロテノン(rotenone)や複合体III阻害剤のアンチマイシン等と比較するとかなり弱い活性であった(日本生化学会編:生化学実験講座12エネルギー代謝と生体酸化(上)215-255頁、香川靖雄・浅野朗著:ミトコンドリアおよびその構成成分の調整法、東京化学同人、1976年)。

発明の開示

そこで本発明者らは、電子伝達系の複合体IIに対する優れた阻害剤の探索を行った。その結果、2-ピリジノール誘導体もしくはその互変異性体の2-ピリドン誘導体である既知の抗生物質アトペニンA4、アトペニンA5、アトペニンB及びハージアノピリドンに意外にも優れた複合体II阻害活性を見出し、本発明を完成するに至った。

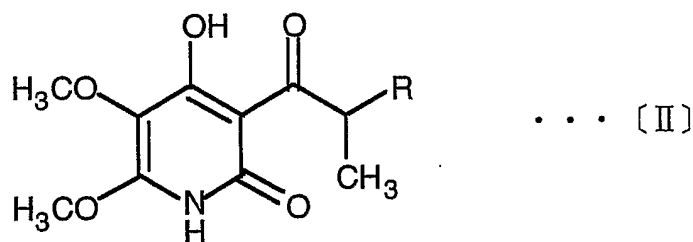
本発明は上記の知見に基づいて完成されたもので、その目的とするところは複合体II阻害剤としてこれまでに用いられていたテノイルトリフルオロアセトンやカルボキシシンに比べ極めて高い阻害活性を示し、生化学研究などに用いて極めて有益となり得る電子伝達系の複合体II阻害剤を提供するものである。

すなわち、本発明は、下記一般式〔I〕



(式中、Rはハロゲンを含む置換基を有していてもよいアルキル基またはアルケ

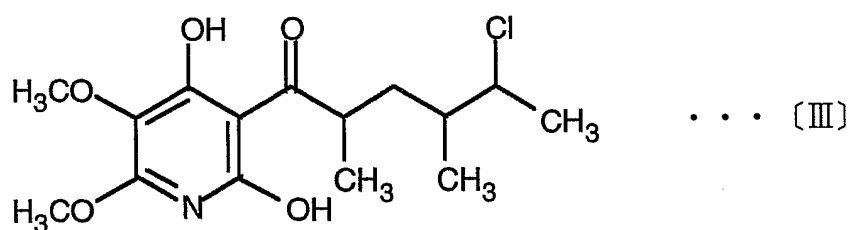
ニル基である) で表される 2-ピリジノール誘導体もしくはその互変異性体である下記一般式〔II〕



(式中、Rはハロゲンを含む置換基を有していてもよいアルキル基またはアルケニル基である) で表される 2-ピリドン誘導体、またはそれらの塩を含有する化合物を有効成分とする電子伝達系の複合体II阻害剤に関する。

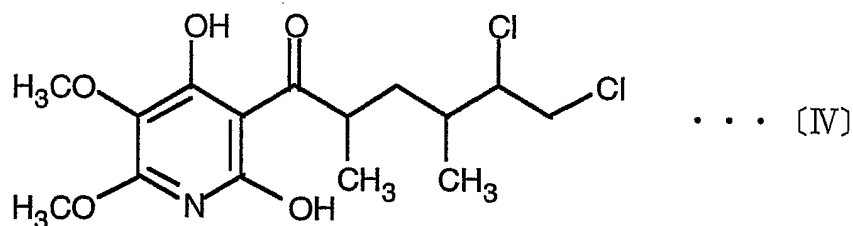
アルキル基としては例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、イソペンチル、2-メチルブチル、ヘキシル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、2-エチルブチル、ヘプチル、オクチル等が挙げられ、アルケニル基としては例えば、1-プロペニル、アリル、1-ブテニル、2-ブテニル、1-ペンテニル、2-ペンテニル、3-ペンテニル、3-メチル-2-ブテニル、ゲラニル等が挙げられる。

本発明はまた、下記式〔III〕



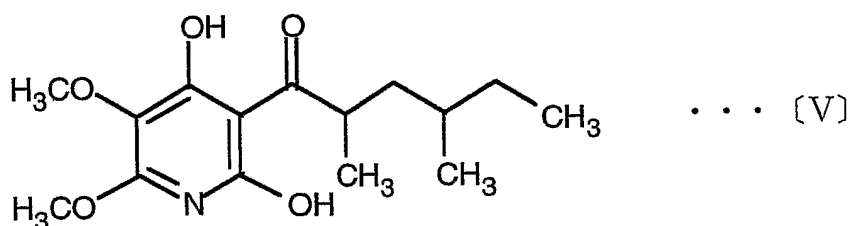
で表されるアトペニンA4である電子伝達系の複合体II阻害剤に関し、該阻害剤はウシ心臓複合体II、ラット肝臓複合体II、ブタ回虫複合体IIのいずれかに対して阻害活性を有する電子伝達系の複合体II阻害剤に関する。

本発明はまた、下記式〔IV〕



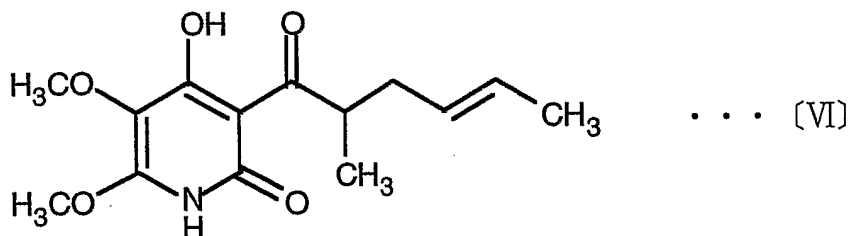
で表されるアトペニンA 5である電子伝達系の複合体II阻害剤に関し、該阻害剤はウシ心臓複合体II、ラット肝臓複合体II、ブタ回虫複合体IIのいずれかに対して阻害活性を有する電子伝達系の複合体II阻害剤に関する。

本発明はまた、下記式〔V〕



で表されるアトペニンBである電子伝達系の複合体II阻害剤に関し、該阻害剤はウシ心臓複合体II、ラット肝臓複合体II、ブタ回虫複合体IIのいずれかに対して阻害活性を有する電子伝達系の複合体II阻害剤に関する。

本発明は更にまた、下記式〔VI〕



で表されるハージアノピリドンである電子伝達系の複合体II阻害剤に関し、該阻害剤はウシ心臓複合体II、ラット肝臓複合体II、ブタ回虫複合体IIのいずれかに関

対して阻害活性を有する電子伝達系の複合体Ⅱ阻害剤に関する。

本発明は更にまた、電子伝達系の複合体Ⅱに対して阻害活性を有する前記の式〔Ⅲ〕で表されるアトペニンA4、式〔Ⅳ〕で表されるアトペニンA5、及び式〔Ⅴ〕で表されるアトペニンBを産生する微生物が、ペニシリウム エスピー (*Penicillium* sp.) FO-125 (FERM BP-8048) である微生物に関する。

本発明に用いた既知の抗生物質アトペニンA4、アトペニンA5、及びアトペニンBは、本発明の発明者らのうち、大村智、供田洋らがペニシリウム エスピー (*Penicillium* sp.) FO-125 菌株の培養液中に抗真菌活性を有する物質を見出し、FO-125A4、A5、Bと命名して特許出願を行った抗真菌抗生物質である (特開平1-199582号)。従って、本物質アトペニンA4、A5、及びBは、特開平1-199582号に記載の方法、あるいはその変法にしたがって、ペニシリウム エスピー (*Penicillium* sp.) FO-125 菌株を培養し、その培養液を精製することにより、得ることができる。

すなわち、本菌株を種培養後、ジャーファーメンターで培養し、培養液を遠心分離して上清を得る。これを酢酸エチルで抽出し、濃縮後シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサノン酢酸エチル系で溶出する。こうして得られたアトペニン各成分粗物質を、セファデックスLH-20カラムクロマトグラフィーに供し、クロロホルム-メタノール系で溶出することにより、単一なアトペニンA4、A5、Bを得ることができる。また、上記アトペニン各成分粗物質は、10mMリン酸緩衝液 (pH3.0) を含んだアセトニトリルを用いた逆相高速液体クロマトグラフィーを1回または繰り返し行うことによっても、単一なアトペニンA4、A5、Bを得ることができる。

上記のアトペニンA4、A5、Bを産生する Penicillium sp. FO-125 菌株は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に従い、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）[AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan] に所在する独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター [International Patent Organism Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology] に平成14年（2002）5月22日に寄託され、受託番号FERM BP-8048が付与された。

本菌株 Penicillium sp. FO-125 の菌学的性状については特開平1-199582号に述べてあるが、本菌株は再寄託のため、以下にその菌学的性状の概要を説明する。

（a）形態的性質

本菌株は、麦芽汁寒天培地、バレイショ・ブドウ糖寒天培地、YpSs寒天培地などで比較的良好に生育し、分生子の着生も良好である。YpSs培地に生育したコロニーを顕微鏡で観察すると、菌糸は透明で隔壁を有しており、分生子柄は基底菌糸より直生している。

ペニシラスは複輪生-対称体である。大きさは変化に富み、まれに単輪生体も認められる。基底梗子の大きさは $15 \sim 20 \times 3 \sim 4 \mu\text{m}$ で3~5個着生する。梗子はペン先型で3~6個群生し、大きさは $10 \sim 15 \times 2 \sim 4 \mu\text{m}$ である。

はじめはフィアロ型分生子が梗子の頂端に1個着生し、培養時間の経過とともに連鎖状となり、最終的にはこの連鎖は $1-50 \mu\text{m}$ 前後に達する。電子顕微鏡で観察すると、分生子は楕円形で、大きさは $2.2 \sim 3.1 \times 1.6 \sim 2.0 \mu\text{m}$ であり、その表面は平滑である。

(b) 各培地上での性状

各種培地上で27℃、14日間培養した場合の肉眼的観察結果を下記の第1表に示す。

第1表

培地	分生子					
	培地上の生育 状態	コロニー裏面 の色調	形成	色	可溶性 色素	コロニー の直径
麦芽汁寒天培地						
良好、 菌糸は拡散せず、 ビロード状、白色	周辺部；黄緑色 中心部；暗赤褐色	良好	黄緑色 ～緑色	なし	5.8 mm	
バレイショ・ブドウ糖寒天培地						
良好、 菌糸は拡散せず、 ビロード状、白色	黄緑色	良好	緑色	なし	6.0 mm	
ツァペック寒天培地						
良好、 菌糸は拡散せず、 フェルト状、白色	アイボリー	中程度	アイボリー	なし	6.2 mm	
サブロー寒天培地						
良好、 菌糸は拡散せず、 フェルト状、白色	ベージュ	良好	淡青色	なし	6.1 mm	

 オートミール寒天培地

良好、 黄色～黄緑色 良好 深緑色 なし 6 5 mm
 菌糸は拡散して生育、
 ビロード状、白色

合成ムコール寒天培地

良好、 無色 僅かに 白色 なし 6 6 mm
 菌糸は長く拡散して生育、 着生
 羊毛状、透明

Y p S s 寒天培地

良好、 白色～
 菌糸は拡散せず、 緑色 良好 緑色 なし 6 4 mm
 ビロード状、白色

(c) 生理学的、生態的性状

本菌株の最適生育条件は、Y p S s 培地においてpH 4～8、温度22～33℃である。本菌株の生育範囲はY p S s 培地においてpH 2～9、温度15～39℃であり、好気性菌である。

前記の諸性状を有するペニシリウム エスピー FO-125 菌株から得られたアトペニンA4、アトペニンA5及びアトペニンBの理化学的性状は文献記載値と一致した(S. Omura, H. Tomoda, K. Kimura, D. - Z. Zhen, H. Kumagai, K. Igarashi, N. Imamura, Y. Takahashi, Y. Tanaka and Y. Iwai, J. Antibiot. 第41巻、1769-1773頁、1988年、およびH.

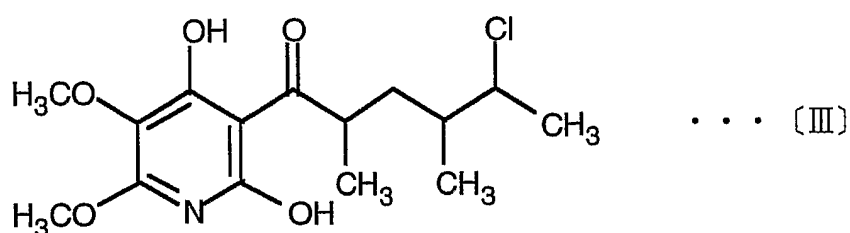
Kumagai, H. Nishida, N. Imamura, H. Tomoda and S. Omura, J. Antibiot. 第43巻、1553-1558頁、1990年)。

本物質アトペニンA4、A5及びBの理化学的性状を要約すると以下のとおりである。

[アトペニンA4]

- (1) 性状 : 白色粉末
- (2) 分子量 : 331
- (3) 分子式 : $C_{15}H_{22}NO_5 \cdot Cl$
- (4) 紫外部吸収極大 (エタノール中) : 235 nm、267 nm、320 nmに極大吸収を有する。
- (5) 赤外部吸収極大 (KBr錠) : 1645、1600、1440、1320、1200、1160、 995 cm^{-1} に極大吸収を有する。
- (6) ^1H -プロトン核磁気共鳴スペクトル : 重クロロホルム中の化学シフト (ppm) 及びJは結合定数 (Hz) : δ 4.19 (3H, s)、4.18 (1H, m)、4.14 (1H, dq, $J=3.1, 6.7$)、3.80 (3H, s)、1.82 (1H, m)、1.76 (1H, m)、1.53 (1H, ddd, $J=6.2, 6.2, 12.4$)、1.45 (3H, d, $J=6.7$)、1.15 (3H, d, $J=6.8$)、0.96 (3H, d, $J=6.7$)。
- (7) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル : 重クロロホルム中の化学シフト (ppm) : δ 210.1、171.1、161.8、155.5、121.2、100.5、63.1、61.5、57.9、39.9、37.7、37.1、22.7、17.7、14.1。

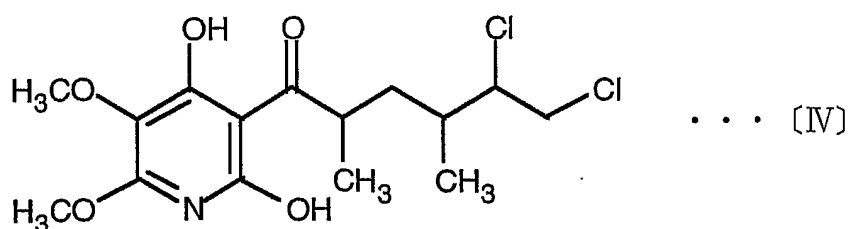
以上、各種理化学的性状やスペクトルデータから、本アトペニンA4物質は下記式〔Ⅲ〕で表される化学構造と解析された。



[アトペニンA5]

- (1) 性状 : 白色粉末
- (2) 分子量 : 365
- (3) 分子式 : $C_{15}H_{21}NO_5 \cdot Cl_2$
- (4) 紫外部吸収極大 (エタノール中) : 237 nm、272 nm、320 nm に極大吸収を有する。
- (5) 赤外部吸収極大 (KBr錠) : 1645、1600、1440、1320、1200、1160、995 cm^{-1} に極大吸収を有する。
- (6) 1H -プロトン核磁気共鳴スペクトル : 重クロロホルム中の化学シフト (ppm) 及びJは結合定数 (Hz) : δ 4.21 (3H, s)、4.21 (1H, m)、4.11 (1H, ddd, $J=2.6, 5.9, 8.5$)、3.77 (3H, s)、3.71 (1H, dd, $J=5.9, 11.2$)、3.62 (1H, dd, $J=8.5, 11.2$)、2.16 (1H, m)、1.90 (1H, ddd, $J=7.1, 8.1, 13.6$)、1.50 (1H, ddd, $J=6.5, 7.3, 13.6$)、1.15 (3H, d, $J=6.8$)、0.92 (3H, d, $J=6.5$)。
- (7) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル : 重クロロホルム中の化学シフト (ppm) : δ 209.8、172.5、161.9、155.2、120.9、100.8、65.4、61.6、58.3、45.9、39.3、37.5、32.5、18.0、12.9。

以上、各種理化学的性状やスペクトルデータから、本アトペニンA5物質は下記式〔IV〕で表される化学構造と解析された。



[アトペニンB]

(1) 性状 : 白色粉末

(2) 分子量 : 297

(3) 分子式 : $C_{15}H_{23}NO_5$

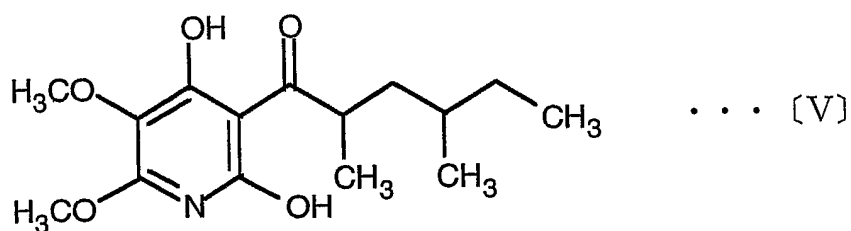
(4) 紫外部吸収極大 (エタノール中) : 237 nm、270 nm、318 nmに極大吸収を有する。

(5) 赤外部吸収極大 (KBr錠) : 1645、1600、1440、1320、1200、1160、995 cm^{-1} に極大吸収を有する。

(6) 1H -プロトン核磁気共鳴スペクトル : 重ピリジン中の化学シフト (ppm) 及びJは結合定数 (Hz) : δ 4.30 (1H, m)、3.78 (3H, s)、3.71 (3H, s)、1.71 (1H, ddd, $J=5.3, 5.9, 12.5$)、1.38 (1H, m)、1.33 (1H, m)、1.21 (1H, m)、1.19 (3H, d, $J=6.6$)、1.06 (1H, m)、0.71 (3H, dd, $J=7.3, 7.3$)、0.86 (3H, d, $J=6.4$)。

(7) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル : 重ピリジン中の化学シフト (ppm) : δ 211.7、165.8、162.6、159.9、124.9、100.6、60.6、54.3、41.9、41.1、30.6、21.0、19.1、17.1、11.7。

以上、各種理化学的性状やスペクトルデータから、本アトペニンB物質は下記式〔V〕で表される化学構造と解析された。



[ハージアノピリドン]

ハージアノピリドン (Harzianopyridone) は、F. Trecoourt, M. Mallet, O. Mongin and G. Queguinerの方法 (J. Heterocyclic Chem. 第32巻、1117-1124頁、1995年) にしたがって合成することができる。すなわち、2,3-ジメトキシピリジンより4段階で6-ブromo-2,3-ジメトキシ-N,N-ジイソプロピルカーバメートを得て、ピリドンに変換し、これを(2-(トリメチルシリル)エトキシ)メチル(SEM)基で保護する。これにブチルリチウムを加え(4E)-2-メチル-4-ヘキセナールと反応させることで得られるアルコールを、ピリジニウムクロクロメートでケトンに酸化し、次いでカーバメートおよびSEMの脱保護を行うことでハージアノピリドンを合成できる。得られたハージアノピリドンの理化学的性状は文献記載値と一致した (Julia M. Dickinson, James R. Hanson, and Peter B. Hitchcock: J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1885-1887頁、1989年)。

本ハージアノピリドン物質の理化学的性状を要約すると以下のとおりである。

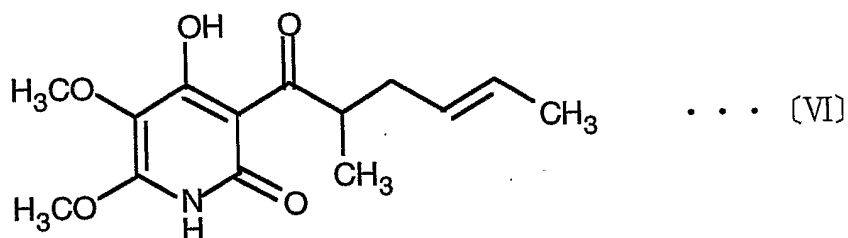
- (1) 性状 : 白色粉末
- (2) 分子量 : 281
- (3) 分子式 : $C_{14}H_{19}NO_5$
- (4) 紫外部吸収極大 (エタノール中) : 243 nm、267 nm、331 nm に極大吸収を有する。

(5) 赤外部吸収極大 (KBr錠) : 1725、1650、1600、720 cm^{-1} に極大吸収を有する。

(6) ^1H -プロトン核磁気共鳴スペクトル : 重クロロホルム中の化学シフト (ppm) 及び J は結合定数 (Hz) : δ 16.4 (1H, s)、12.3 (1H, br. s)、5.42 (1H, m)、5.38 (1H, m)、4.17 (3H, s)、3.95 (1H, m)、3.79 (3H, s)、2.45 (1H, ddd, $J=6.0, 6.0, 14.5$)、2.05 (1H, ddd, $J=6.5, 6.5, 14.5$)、1.65 (3H, d, $J=6.5$)、1.30 (3H, d, $J=6.5$)。

(7) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル : 重クロロホルム中の化学シフト (ppm) : δ 209.8、172.9、161.8、155.7、128.7、127.1、121.6、100.6、61.5、57.6、43.1、36.1、17.9、16.3。

以上、各種理化学的性状やスペクトルデータから、本ハージアノピリドンは下記式〔VI〕で表される化学構造と解析された。



発明を実施するための最良の形態

次に、参考例及び実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれのみに限定されるものではない。

参考例 1

テノイルトリフルオロアセトンのウシ心臓複合体 II に対する阻害活性複合体 II (コハク酸ユビキノン酸化還元酵素) として、ウシ心臓については、

S. Takamiyaらの方法 (Developmental changes in the respiratory chain of Ascaris mithochondria: Biochim. Biophys. Acta、第1141巻、65-71頁、1993年) で調製したミトコンドリアを用いた。複合体IIのコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加によるジクロロフェノールインドフェノール (DCIP、シグマ社製) の酸化型から還元型への変化速度を電子受容体 (DCIP) に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。

すなわち、50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) 中にユビキノーン-2 (シグマ社製)、DCIPをそれぞれ終濃度100 μ M、70 μ Mになるように加え、テノイルトリフルオロアセトンを加え、さらに複合体IIを加えた後、終濃度10 mMのコハク酸カリウムの添加で25 $^{\circ}$ Cで反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取ったDCIPの還元型 (ϵ mM⁻¹ 1 cm⁻¹: 21) の生成速度を600 nmの吸光度変化で測定した。活性は1分間に還元されたDCIPのモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度10 mMのシアン化カリウムを加えた。測定結果は第2表に示す通りであった。

参考例 2

カルボキシンのウシ心臓複合体IIに対する阻害活性

複合体IIとして、ウシ心臓については、参考例1と同様の方法で調製したミトコンドリアを用いた。複合体IIのコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加によるDCIPの酸化型から還元型への変化速度を電子受容体 (DCIP) に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。すなわち、50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) 中にユビキノーン-2、DCIPをそれぞれ終濃度100 μ M、70 μ Mになるように加え、カルボキシンを加え、さらに複合体IIを加えた後、終濃度10 mMのコハク酸カリウムの添加で25 $^{\circ}$ Cで反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取ったDCIPの還元型 (ϵ mM⁻¹ 1 cm⁻¹: 2

1) の生成速度を 600 nm の吸光度変化で測定した。活性は 1 分間に還元された DCIP のモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度 10 mM のシアン化カリウムを加えた。測定結果は第 2 表に示す通りであった。

実施例 1

アトペニン A 4 のウシ心臓複合体 II に対する阻害活性

複合体 II (コハク酸ユビキノン酸化還元酵素) として、ウシ心臓については、参考例 1 と同様の方法で調製したミトコンドリアを用いた。複合体 II のコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加による DCIP の酸化型から還元型への変化速度を電子受容体 (DCIP) に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。すなわち、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中にユビキノン-2、DCIP をそれぞれ終濃度 100 μ M、70 μ M になるように加え、アトペニン A 4 を加え、さらに複合体 II を加えた後、終濃度 10 mM のコハク酸カリウムの添加で 25 $^{\circ}$ C で反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取った DCIP の還元型 (ϵ mM⁻¹ 1 cm⁻¹ : 21) の生成速度を 600 nm の吸光度変化で測定した。活性は 1 分間に還元された DCIP のモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度 10 mM のシアン化カリウムを加えた。測定結果は第 2 表に示す通りであった。

実施例 2

アトペニン A 4 のラット肝臓複合体 II に対する阻害活性

複合体 II として、ラット肝臓については、参考例 1 と同様の方法で調製したミトコンドリアを用いた。複合体 II のコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加による DCIP の酸化型から還元型への変化速度を電子受容体 (DCIP) に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。すなわち、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中にユビキノン-2、DCIP をそれぞれ終濃度 100 μ M、70 μ M になるように加え、アトペニン A 4 を加え、さらに複合体 II を加えた

後、終濃度 10 mM のコハク酸カリウムの添加で 25 °C で反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取った DCIP の還元型 ($\epsilon \text{ mM}^{-1} \text{ l cm}^{-1} : 21$) の生成速度を 600 nm の吸光度変化で測定した。活性は 1 分間に還元された DCIP のモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度 10 mM のシアン化カリウムを加えた。測定結果は第 2 表に示す通りであった。

実施例 3

アトペニン A 4 のブタ回虫複合体 II に対する阻害活性

複合体 II として、ブタ回虫については F. Saruta らの方法 (Stage-specific Isoforms of Complex II (Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase) in Mitochondria from the Parasitic Nematode, Ascaris suum: J. Biol. Chem. 第 270 巻、928-932 頁、1995 年) で調製した精製複合体 II を用いた。複合体 II のコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加による DCIP の酸化型から還元型への変化速度を電子受容体 (DCIP) に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。

すなわち、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中にユビキノン-2、DCIP をそれぞれ終濃度 100 μM 、70 μM になるように加え、アトペニン A 4 を加え、さらに複合体 II を加えた後、終濃度 10 mM のコハク酸カリウムの添加で 25 °C で反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取った DCIP の還元型 ($\epsilon \text{ mM}^{-1} \text{ l cm}^{-1} : 21$) の生成速度を 600 nm の吸光度変化で測定した。活性は 1 分間に還元された DCIP のモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度 10 mM のシアン化カリウムを加えた。測定結果は第 2 表に示す通りであった。

実施例 4

アトペニン A 5 のウシ心臓複合体 II に対する阻害活性

複合体 II として、ウシ心臓については、参考例 1 と同様の方法で調製したミトコンドリアを用いた。複合体 II のコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加による DCIP の酸化型から還元型への変化速度を電子受容体 (DCIP) に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。すなわち、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中にユビキノン-2、DCIP をそれぞれ終濃度 100 μ M、70 μ M になるように加え、アトペニン A 5 を加え、さらに複合体 II を加えた後、終濃度 10 mM のコハク酸カリウムの添加で 25 $^{\circ}$ C で反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取った DCIP の還元型 (ϵ mM⁻¹ 1 cm⁻¹ : 21) の生成速度を 600 nm の吸光度変化で測定した。活性は 1 分間に還元された DCIP のモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度 10 mM のシアン化カリウムを加えた。測定結果は第 2 表に示す通りであった。

実施例 5

アトペニン A 5 のラット肝臓複合体 II に対する阻害活性

複合体 II として、ラット肝臓については、参考例 1 と同様の方法で調製したミトコンドリアを用いた。複合体 II のコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加による DCIP の酸化型から還元型への変化速度を電子受容体 (DCIP) に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。すなわち、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中にユビキノン-2、DCIP をそれぞれ終濃度 100 μ M、70 μ M になるように加え、アトペニン A 5 を加え、さらに複合体 II を加えた後、終濃度 10 mM のコハク酸カリウムの添加で 25 $^{\circ}$ C で反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取った DCIP の還元型 (ϵ mM⁻¹ 1 cm⁻¹ : 21) の生成速度を 600 nm の吸光度変化で測定した。活性は 1 分間に還元された DCIP のモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度 10 mM のシアン化カリウムを加えた。測定結果は第 2 表

に示す通りであった。

実施例 6

アトペニン A 5 のブタ回虫複合体 II に対する阻害活性

複合体 II として、ブタ回虫については、実施例 3 と同様の方法で調製した精製複合体 II を用いた。複合体 II のコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加による DCIP の酸化型から還元型への変化速度を電子受容体 (DCIP) に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。すなわち、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中にユビキノーン 2、DCIP をそれぞれ終濃度 100 μ M、70 μ M になるように加え、アトペニン A 5 を加え、さらに複合体 II を加えた後、終濃度 10 mM のコハク酸カリウムの添加で 25 $^{\circ}$ C で反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取った DCIP の還元型 (ϵ mM⁻¹ l cm⁻¹ : 21) の生成速度を 600 nm の吸光度変化で測定した。活性は 1 分間に還元された DCIP のモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度 10 mM のシアン化カリウムを加えた。測定結果は第 2 表に示す通りであった。

実施例 7

アトペニン B のウシ心臓複合体 II に対する阻害活性

複合体 II として、ウシ心臓については、参考例 1 と同様の方法で調製したミトコンドリアを用いた。複合体 II のコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加による DCIP の酸化型から還元型への変化速度を電子受容体 (DCIP) に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。すなわち、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中にユビキノーン 2、DCIP をそれぞれ終濃度 100 μ M、70 μ M になるように加え、アトペニン B を加え、さらに複合体 II を加えた後、終濃度 10 mM のコハク酸カリウムの添加で 25 $^{\circ}$ C で反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取った DCIP の還元型 (ϵ mM⁻¹ l cm⁻¹ : 21) の生成速度を 600 nm の吸光度変化で測定した。活性は 1 分間に還元され

たDCIPのモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度10mMのシアン化カリウムを加えた。測定結果は第2表に示す通りであった。

実施例 8

アトペニンBのラット肝臓複合体に対する阻害活性

複合体IIとして、ラット肝臓については、参考例1と同様の方法で調製したミトコンドリアを用いた。複合体IIのコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加によるDCIPの酸化型から還元型への変化速度を電子受容体(DCIP)に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。すなわち、50mMリン酸緩衝液(pH7.5)中にユビキノーン-2、DCIPをそれぞれ終濃度100 μ M、70 μ Mになるように加え、アトペニンBを加え、さらに複合体IIを加えた後、終濃度10mMのコハク酸カリウムの添加で25 $^{\circ}$ Cで反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取ったDCIPの還元型(ϵ mM $^{-1}$ 1 cm $^{-1}$: 21)の生成速度を600nmの吸光度変化で測定した。活性は1分間に還元されたDCIPのモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度10mMのシアン化カリウムを加えた。測定結果は第2表に示す通りであった。

実施例 9

アトペニンBのブタ回虫複合体IIに対する阻害活性

複合体IIとして、ブタ回虫については、実施例3と同様の方法で調製した精製複合体IIを用いた。複合体IIのコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加によるDCIPの酸化型から還元型への変化速度を電子受容体(DCIP)に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。すなわち、50mMリン酸緩衝液(pH7.5)中にユビキノーン-2、DCIPをそれぞれ終濃度100 μ M、70 μ Mになるように加え、アトペニンBを加え、さらに複合体IIを加えた後、終濃度10mMのコハク酸カリウムの添加で25 $^{\circ}$ Cで反応を開始した。反応速度は

、コハク酸からの電子を受け取ったDCIPの還元型 ($\epsilon \text{ mM}^{-1} \text{ l cm}^{-1} : 21$) の生成速度を600 nmの吸光度変化で測定した。活性は1分間に還元されたDCIPのモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度10 mMのシアン化カリウムを加えた。測定結果は第2表に示す通りであった。

実施例10

ハージアノピリドンのウシ心臓複合体IIに対する阻害活性

複合体IIとして、ウシ心臓については、参考例1と同様の方法で調製したミトコンドリアを用いた。複合体IIのコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加によるDCIPの酸化型から還元型への変化速度を電子受容体(DCIP)に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。すなわち、50 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)中にユビキノン-2、DCIPをそれぞれ終濃度100 μM 、70 μM になるように加え、ハージアノピリドンを加え、さらに複合体IIを加えた後、終濃度10 mMのコハク酸カリウムの添加で25°Cで反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取ったDCIPの還元型 ($\epsilon \text{ mM}^{-1} \text{ l cm}^{-1} : 21$) の生成速度を600 nmの吸光度変化で測定した。活性は1分間に還元されたDCIPのモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度10 mMのシアン化カリウムを加えた。測定結果は第2表に示す通りであった。

実施例11

ハージアノピリドンのラット肝臓複合体IIに対する阻害活性

複合体IIとして、ラット肝臓については、参考例1と同様の方法で調製したミトコンドリアを用いた。複合体IIのコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加によるDCIPの酸化型から還元型への変化速度を電子受容体(DCIP)に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。すなわち、50 mMリン酸緩衝液(pH 7.5)中にユビキノン-2、DCIPをそれぞれ終濃度100 μM

、70 μM になるように加え、ハージアノピリドンを加え、さらに複合体Ⅱを加えた後、終濃度10 mMのコハク酸カリウムの添加で25 $^{\circ}\text{C}$ で反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取ったDCIPの還元型 ($\epsilon\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$: 21) の生成速度を600 nmの吸光度変化で測定した。活性は1分間に還元されたDCIPのモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度10 mMのシアン化カリウムを加えた。測定結果は第2表に示す通りであった。

実施例 12

ハージアノピリドンのブタ回虫複合体Ⅱに対する阻害活性

複合体Ⅱとして、ブタ回虫については、実施例3と同様の方法で調製した精製複合体Ⅱを用いた。複合体Ⅱのコハク酸デヒドロゲナーゼ活性は、コハク酸添加によるDCIPの酸化型から還元型への変化速度を電子受容体 (DCIP) に特有な吸収極大の吸光度の変化として測定した。すなわち、50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) 中にユビキノーン-2、DCIPをそれぞれ終濃度100 μM 、70 μM になるように加え、ハージアノピリドンを加え、さらに複合体Ⅱを加えた後、終濃度10 mMのコハク酸カリウムの添加で25 $^{\circ}\text{C}$ で反応を開始した。反応速度は、コハク酸からの電子を受け取ったDCIPの還元型 ($\epsilon\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$: 21) の生成速度を600 nmの吸光度変化で測定した。活性は1分間に還元されたDCIPのモル数で表した。また末端酸化酵素を阻害して還元力の漏出を防ぐ必要から、終濃度10 mMのシアン化カリウムを加えた。測定結果は第2表に示す通りであった。

以上の参考例および各実施例における阻害活性については、下記第2表に示す通りであり、複合体Ⅱの50%阻害濃度 (IC_{50} , nM) として示した。

第2表

阻害剤	複合体Ⅱ		
	ウシ心臓	ラット肝臓	ブタ回虫
アトペニンA4	11	24	220
アトペニンA5	3.6	3.7	32
アトペニンB	10	20	50
ハージアノピリドン	17	200	2000
テノイルトリフルオロアセトン	5800	NT	NT
カルボキシシン	1100	NT	NT

NT: not test

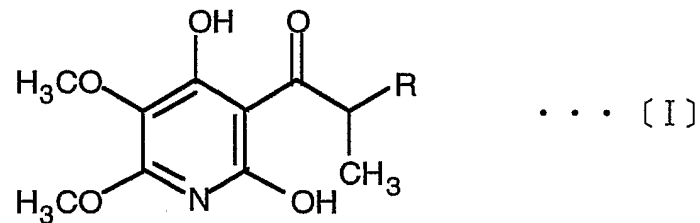
上記の測定結果から、2-ピリジノール誘導体もしくは互変異性体の2-ピリドン誘導体であるアトペニンA4、A5、Bやハージアノピリドンは、ウシ心臓複合体Ⅱ、ラット肝臓複合体Ⅱや、ブタ回虫複合体Ⅱに対してnMオーダーの強い阻害を示した。また、それらのウシ心臓複合体Ⅱに対する阻害活性を、これまで報告されている複合体Ⅱ阻害剤のテイノルトリフルオロアセトンやカルボキシシンと比較すると、60~1600倍強い阻害活性を示した。

産業上の利用分野

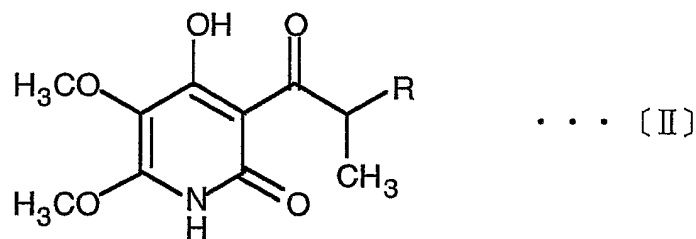
以上に説明したように、2-ピリジノール誘導体もしくはその互変異性体である2-ピリドン誘導体、またはそれらの塩を含有するアトペニンA4、A5、及びBやハージアノピリドンは、nMオーダーでウシ心臓複合体Ⅱ、ラット肝臓複合体Ⅱや、ブタ回虫複合体Ⅱなどを強い活性で阻害した。したがって、本発明の2-ピリジノール誘導体もしくはその互変異性体である2-ピリドン誘導体は、電子伝達系の複合体Ⅱ阻害剤として有用であると期待される。

請求の範囲

1. 下記一般式〔I〕

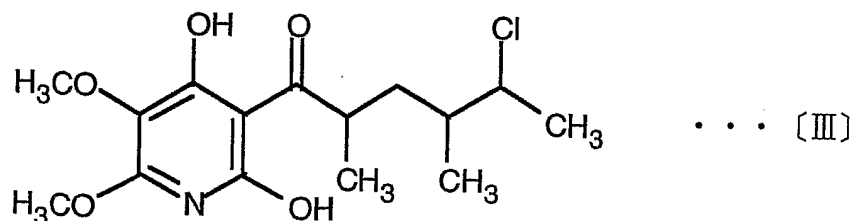


(式中、Rはハロゲンを含む置換基を有していてもよいアルキル基またはアルケニル基である)で表されるピリジノール誘導体もしくはその互変異性体である下記一般式〔II〕



(式中、Rはハロゲンを含む置換基を有していてもよいアルキル基またはアルケニル基である)で表される2-ピリドン誘導体、またはそれらの塩を含有する化合物を有効成分とする電子伝達系の複合体II阻害剤。

2. 前記の複合体II阻害剤が、下記式〔III〕



で表されるアトペンin A 4である請求の範囲1記載の電子伝達系の複合体II阻害

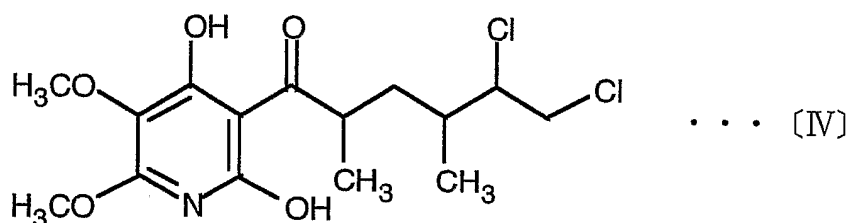
剤。

3. 上記の式〔Ⅲ〕で表されるアトペニンA 4がウシ心臓複合体Ⅱに対して阻害活性を有する請求の範囲2記載の電子伝達系の複合体Ⅱ阻害剤。

4. 上記の式〔Ⅲ〕で表されるアトペニンA 4がラット肝臓複合体Ⅱに対して阻害活性を有する請求の範囲2記載の電子伝達系の複合体Ⅱ阻害剤。

5. 上記の式〔Ⅲ〕で表されるアトペニンA 4がブタ回虫複合体Ⅱに対して阻害活性を有する請求の範囲2記載の電子伝達系の複合体Ⅱ阻害剤。

6. 前記の複合体Ⅱ阻害剤が、下記式〔Ⅳ〕



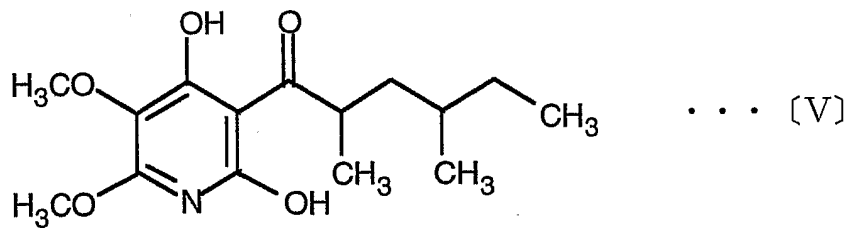
で表されるアトペニンA 5である請求の範囲1記載の電子伝達系の複合体Ⅱ阻害剤。

7. 上記の式〔Ⅳ〕で表されるアトペニン5がウシ心臓複合体Ⅱに対して阻害活性を有する請求の範囲6記載の電子伝達系の複合体Ⅱ阻害剤。

8. 上記の式〔Ⅳ〕で表されるアトペニン5がラット肝臓複合体Ⅱに対して阻害活性を有する請求の範囲6記載の電子伝達系の複合体Ⅱ阻害剤。

9. 上記の式〔Ⅳ〕で表されるアトペニン5がブタ回虫複合体Ⅱに対して阻害活性を有する請求の範囲6記載の電子伝達系の複合体Ⅱ阻害剤。

10. 前記の複合体II阻害剤が、下記式〔V〕



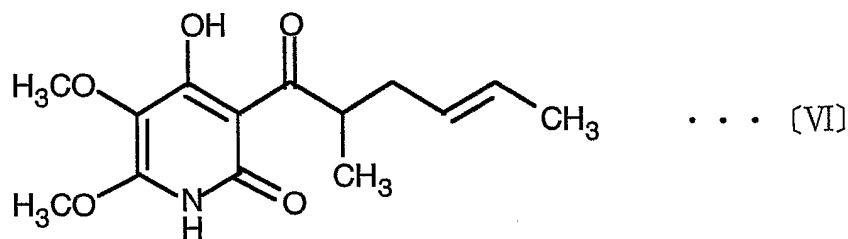
で表されるアトペニンBである請求の範囲1に記載の電子伝達系の複合体II阻害剤。

11. 上記の式〔V〕で表されるアトペニンBがウシ心臓複合体IIに対して阻害活性を有する請求の範囲10に記載の電子伝達系の複合体II阻害剤。

12. 上記の式〔V〕で表されるアトペニンBがラット肝臓複合体IIに対して阻害活性を有する請求の範囲10に記載の電子伝達系の複合体II阻害剤。

13. 上記の式〔V〕で表されるアトペニンBがブタ回虫複合体IIに対して阻害活性を有する請求の範囲10に記載の電子伝達系の複合体II阻害剤。

14. 前記の複合体II阻害剤が、下記式〔VI〕



で表されるハーミアノピリドンである請求の範囲1に記載の電子伝達系の複合体II阻害剤。

15. 上記の式〔VI〕で表されるハーミアノピリドンがウシ心臓複合体IIに

対して阻害活性を有する請求の範囲 1 4 記載の電子伝達系の複合体 II 阻害剤。

1 6. 上記の式〔VI〕で表されるハージアノピリドンがラット肝臓複合体 II に対して阻害活性を有する請求の範囲 1 4 記載の電子伝達系の複合体 II 阻害剤。

1 7. 上記の式〔VI〕で表されるハージアノピリドンがブタ回虫複合体 II に対して阻害活性を有する請求の範囲 1 4 記載の電子伝達系の複合体 II 阻害剤。

1 8. 電子伝達系の複合体 II に対して阻害活性を有する前記の式〔III〕で表されるアトペニン A 4、式〔IV〕で表されるアトペニン A 5 および式〔V〕で表されるアトペニン B を産生する微生物が、ペニシリウム エスピー (P e n i c i l l i u m s p.) F O - 1 2 5 (F E R M B P - 8 0 4 8) である微生物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05727

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/4409, 31/4412, 45/00, A61P43/00, C12N1/14,
(C12N1/14, C12R1:80) // C07D213/69

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/4409, 31/4412, 45/00, A61P43/00, C12N1/14,
(C12N1/14, C12R1:80) // C07D213/69

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)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OSHINO, K.; KUMAGAI, H.; TOMODA, H.; OMURA, S.	1, 18
Y	Mechanism of action of atpenin B on Raji cells. J. Antibiot., 1990, Vol.43, No.9, pages 1064 to 1068	2-17
Y	KUMAGAI, H.; NISHIDA, H.; IMAMURA, N.; TOMODA, H.; OMURA, S.; BORDNER, J. The structures of atpenins A4, A5 and B, new antifungal antibiotics produced by Penicillium sp. J. Antibiot., 1990, Vol.43, No.12, pages 1553 to 1558	2-13
Y	CUTLER, H.G.; JACYNO, J.M. Biological activity of (-)-harzianopyridone isolated from Trichoderma harzianum. Agric. Biol. Chem., 1991, Vol.55, No.10, pages 2629 to 2631	14-17

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 document 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
28 August, 2002 (28.08.02)

Date of mailing of the international search report
17 September, 2002 (17.09.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05727

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 5-339156 A (Kobe Steel, Ltd.), 21 December, 1993 (21.12.93), Full text; particularly, page 3, column 3, lines 1 to 2 (Family: none)	1-18
A	JP 50-132183 A (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), 20 October, 1975 (20.10.75), Full text; particularly, page 3, lower right column (1) (Family: none)	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05727

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-17 relate to an inhibitor against complex II of the electron transport system which contains a publicly known pyridinol derivative as the active ingredient, while claim 18 relates to a microbe and it is described that publicly known pyridinol derivatives produced by the microbe have inhibitory activity against complex II of the electron transport system. However, inhibitory activity against complex II of the electron transport system is a property of the pyridinol derivatives (products of the microbe) and the microbe itself does not have direct relation to the inhibitory activity. Accordingly, the inhibitors described in claims 1-17 and the microbe described in claim 18 do (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest** The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05727

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

not have any special technical feature in common.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ A61K31/4409, 31/4412, 45/00, A61P43/00, C12N1/14, (C12N1/14, C12R1:80) // C07D213/69

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int. Cl⁷ A61K31/4409, 31/4412, 45/00, A61P43/00, C12N1/14, (C12N1/14, C12R1:80) // C07D213/69

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)
 REGISTRY (STN), CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	OSHINO, K.; KUMAGAI, H.; TOMODA, H.; OMURA, S.	1, 18
Y	Mechanism of action of atpenin B on Raji cells. J. Antibiot., 1990, Vol. 43, No. 9, p. 1064-1068	2-17
Y	KUMAGAI, H.; NISHIDA, H.; IMAMURA, N.; TOMODA, H.; OMURA, S.; BORDNER, J. The structures of atpenins A4, A5 and B, new antifungal antibiotics produced by Penicillium sp. J. Antibiot., 1990, Vol. 43, No. 12, p. 1553-1558	2-13

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	の日の後に公表された文献
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「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
「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)	「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
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 28. 08. 02

国際調査報告の発送日 17.09.02

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 齋藤 恵



4 P 9164

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

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
Y	CUTLER, H. G.; JACYNO, J. M. Biological activity of (-)-harzianopyridone isolated from Trichoderma harzianum. Agric. Biol. Chem., 1991, Vol.55, No.10, p.2629-2631	14-17
A	JP 5-339156 A(株式会社神戸製鋼所)1993.12.21 全文献、特に、第3頁第3欄第1-2行などを参照。 (ファミリーなし)	1-18
A	JP 50-132183 A(科研製薬株式会社)1975.10.20 全文献、特に、第3頁右下欄(1)などを参照。 (ファミリーなし)	1-18

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-17に記載された発明は、公知のピリジノール誘導体を有効成分とする電子伝達系複合体IIの阻害剤に関する発明である。これに対し、請求の範囲18には、微生物の発明が記載され、その微生物が産生する公知のピリジノール誘導体が、電子伝達系複合体Iに対して阻害作用を有すると記載されている。しかし、この場合、電子伝達系複合体IIの阻害活性は、生産物であるピリジノール誘導体の性質であり、微生物自体は、電子伝達系阻害作用とは直接関係しない。したがって、請求の範囲1-17に記載された阻害剤の発明と、請求の範囲18に記載された微生物とは、共通する特別な技術的特徴を有していない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。