

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年9月4日(04.09.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/132902 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 17/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01) C07D 215/58 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) C12R 1/365 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/054256
- (22) 国際出願日: 2014年2月24日(24.02.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-035731 2013年2月26日(26.02.2013) JP
- (71) 出願人: 公益財団法人微生物化学研究会(MICROBIAL CHEMISTRY RESEARCH FOUNDATION) [JP/JP]; 〒1410021 東京都品川区上大崎3丁目14番23号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 川田 学(KAWADA, Manabu); 〒1410021 東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内 Tokyo (JP). 井上裕幸(INOUE, Hiroyuki); 〒1410021 東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内 Tokyo (JP). 大庭 俊一(OHBA, Shun-ichi); 〒1410021 東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会

内 Tokyo (JP). 波多野 和樹(HATANNO, Kazuki); 〒1410021 東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内 Tokyo (JP). 阿部 光(ABE, Hikaru); 〒1410021 東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内 Tokyo (JP). 林 千草(HAYASHI, Chigusa); 〒1410021 東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内 Tokyo (JP). 渡邊 匠(WATANABE, Takumi); 〒1410021 東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内 Tokyo (JP). 五十嵐 雅之(IGARASHI, Masayuki); 〒1410021 東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内 Tokyo (JP).

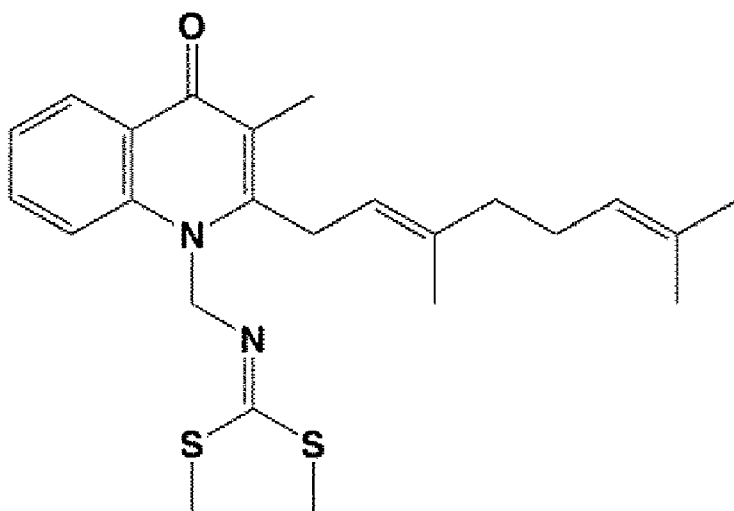
(74) 代理人: 廣田 浩一, 外(HIROTA, Koichi et al.); 〒1510053 東京都渋谷区代々木1-24-10 T Sビル4階 山の手合同国際特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL COMPOUND, PRODUCTION METHOD THEREFOR, USE OF SAID COMPOUND, AND NOVEL MICROORGANISM

(54) 発明の名称: 新規化合物、その製造方法、及びその用途、並びに、新規微生物



(57) Abstract: Provided are: a compound represented by structural formula (1); a production method therefor; a microorganism capable of producing said compound; and a compound-containing composition, an anticancer agent, and an anti-Helicobacter pylori agent which include said compound.

(57) 要約: 下記構造式(1)で表される化合物及びその製造方法、前記化合物を産生する能力を有する微生物、前記化合物を含有する化合物含有組成物、抗がん剤、及び抗ヘリコバクター・ピロリ剤である。

(1)



WO 2014/132902 A1



MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))

明 細 書

発明の名称：

新規化合物、その製造方法、及びその用途、並びに、新規微生物

技術分野

[0001] 本発明は、新規化合物、その製造方法、前記新規化合物を産生する能力を有する新規微生物、並びに前記新規化合物を含有する、組成物、抗がん剤、及び抗ヘリコバクター・ピロリ剤に関する。

背景技術

[0002] がんの組織は、がん細胞だけでなく間質と呼ばれる周辺の正常組織が混在する形で成り立っている。前記間質は、血管や細胞外基質、繊維芽様細胞（単に「間質細胞」と称することもある）など様々な因子で構成されており、がんの増殖に密接に関わっていることが明らかになりつつある。前記間質の中でも、特に間質細胞は、接着や分泌因子を介してがん細胞の増殖を正にも負にも制御することが知られている（例えば、非特許文献1参照）。このような状況下、より有用である新たな抗がん剤の探索が行われており、その速やかな提供が強く求められている。

[0003] 胃潰瘍や十二指腸潰瘍などの胃及び十二指腸障害の中には、ヘリコバクター・ピロリ (Helicobacter pylori) により引き起こされるものがあることが知られている。そこで、抗ヘリコバクター・ピロリ活性を有する化合物として、キノロン化合物が提案されている（例えば、非特許文献2及び特許文献1参照）。しかしながら、前記提案のキノロン化合物は、医薬として用いるには十分とはいえず、新たな抗ヘリコバクター・ピロリ活性を有する化合物が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：米国特許第5942619号明細書

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Kawada, M., Inoue, H., Masuda, T., and Ikeda, D. Insulin-like growth factor-1 secreted from prostate stromal cells mediates tumor-stromal cell interactions of the prostate cancer. *Cancer Res.* 66, 4419-4425 (2006).

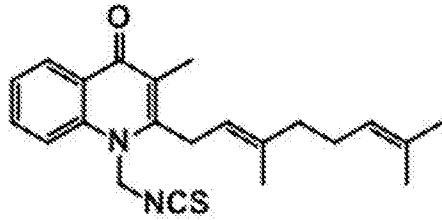
非特許文献2: Dekker, K. A., Inagaki, T., Gootz, T. D., Huang, L. H., Kojima, Y., Kohlbrenner, W. E., Matsunaga, Y., McGuirk, P. R., Nomura, E., Sakakibara, T., Sakemi, S., Suzuki, Y., Yamauchi, Y., and Kojima, N. New quinolone compounds from *Pseudonocardia* sp. with selective and potent anti-*Helicobacter pylori* activity: taxonomy of producing strain, fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. *J. Antibiot.* 51, 145-152 (1998).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、上記従来技術に鑑みて行われたものであり、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、優れた抗がん作用、若しくは、優れた抗ヘリコバクター・ピロリ活性を有する新規化合物、及び該新規化合物の製造方法、前記新規化合物の生産菌である新規微生物、並びに、前記新規化合物を利用した、化合物含有組成物、抗がん剤、及び抗ヘリコバクター・

[化2]



構造式(9)

<5> 前記<1>に記載の化合物を含むことを特徴とする化合物含有組成物である。

<6> 前記<1>に記載の化合物を含むことを特徴とする抗がん剤である。

<7> 前記<1>に記載の化合物を含むことを特徴とする抗ヘリコバクター・ピロリ剤である。

<8> がんを予防又は治療するための方法であって、個体に、前記<6>に記載の抗がん剤を投与することを特徴とする方法である。

<9> ヘリコバクター・ピロリによる感染症を予防又は治療するための方法であって、個体に、前記<7>に記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤を投与することを特徴とする方法である。

<10> ヘリコバクター・ピロリに起因する胃及び十二指腸障害を予防又は治療するための方法であって、個体に、前記<7>に記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤を投与することを特徴とする方法である。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、前記目的を達成することができ、優れた抗がん作用、若しくは、優れた抗ヘリコバクター・ピロリ活性を有する新規化合物、及び該新規化合物の製造方法、前記新規化合物の生産菌である新規微生物、並びに、前記新規化合物を利用した、化合物含有組成物、抗がん剤、及び抗ヘリコバクター・ピロリ剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、構造式(1)で表される化合物の重クロロホルム中で測定した、400MHzにおけるプロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートである。

横軸：ppm単位。

[図2]図2は、構造式(1)で表される化合物の重クロロホルム中で測定した、100MHzにおける炭素13核磁気共鳴スペクトルのチャートである。

横軸：ppm単位。

[図3A]図3Aは、試験例1の細胞増殖試験1において、評価サンプルとして、構造式(1)で表される化合物を用いた場合の結果を示すグラフである。

[図3B]図3Bは、試験例1の細胞増殖試験1において、評価サンプルとして、CJ-13, 136を用いた場合の結果を示すグラフである。

[図3C]図3Cは、試験例1の細胞増殖試験1において、評価サンプルとして、CJ13, 217を用いた場合の結果を示すグラフである。

[図3D]図3Dは、試験例1の細胞増殖試験2の結果を示すグラフである。

[図3E]図3Eは、試験例1の細胞増殖試験3の結果を示すグラフである。

[図4A]図4Aは、試験例2-1-1における腫瘍体積の変化を示すグラフである。

[図4B]図4Bは、試験例2-1-1における腫瘍重量(腫瘍接種から21日目)を示すグラフである。

[図4C]図4Cは、試験例2-1-2における腫瘍体積の変化を示すグラフである。

[図4D]図4Dは、試験例2-1-2における腫瘍重量(腫瘍接種から21日目)を示すグラフである。

[図4E]図4Eは、試験例2-2-1における腫瘍体積の変化を示すグラフである。

[図4F]図4Fは、試験例2-2-1における腫瘍重量(腫瘍接種から21日目)を示すグラフである。

[図4G]図4Gは、試験例2-2-2における腫瘍体積の変化を示すグラフである。

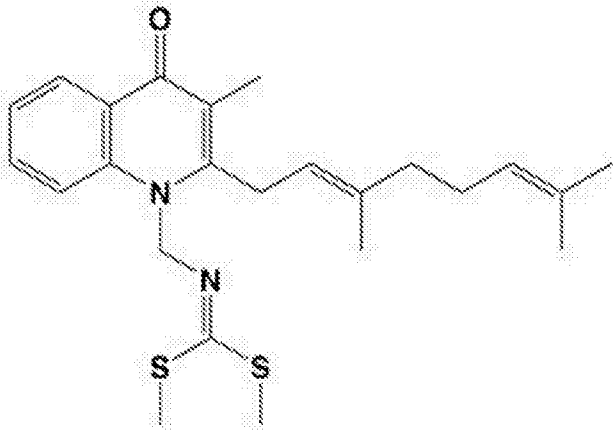
[図4H]図4 Hは、試験例2-2-2における腫瘍重量（腫瘍接種から21日目）を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0010]（新規化合物）

本発明の化合物は、下記構造式（1）で表される化合物であり、本発明者らが分離した新規化合物である（以下、「インターベノリン（Intervenolin）」と称することがある）。

[化3]



構造式(1)

[0011] <物理化学的性質>

前記構造式（1）で表される化合物の物理化学的性質としては、次の通りである。

- (1) 外観 : 淡黄色油状物
- (2) 分子式 : $C_{24}H_{32}N_2OS_2$
- (3) 高分解能質量分析（HRESI-MS）（ m/z ） :

実験値	451.1834	(M+Na) ⁺
計算値	451.1848	($C_{24}H_{32}N_2OS_2Na$ として)
- (4) 紫外線吸収スペクトル :
 メタノール溶液で測定した紫外線吸収のピークは、以下の通りであ

る。

λ_{\max} nm (ϵ) : 214.5 (33,600)、242.5 (37,700)、327.5 (15,600)、341.0 (17,900)

(5) 赤外線吸収スペクトル :

KBr錠剤法で測定した赤外線吸収のピークは、以下の通りである。

ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 2966, 2921, 1617, 1596, 1562, 1372, 1281, 1193, 1022, 761, 696

(6) プロトン核磁気共鳴スペクトル (400MHz, CDCl_3) :

$\delta =$ 1.59 (3H, s), 1.66 (3H, s), 1.73 (3H, s), 2.08 (4H, m), 2.23 (3H, s), 2.31 (3H, s), 2.70 (3H, s), 3.54 (2H, d, $J=6.3$), 5.06 (1H, m), 5.10 (1H, brt, $J=6.3$), 5.55 (2H, s), 7.28 (1H, d, $J=8.2$), 7.32 (1H, t, $J=7.6$), 7.56 (1H, ddd, $J=8.2, 7.6, 1.6$), 8.47 (1H, dd, $J=7.6, 1.6$)

図1に、プロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートを示した。

(7) 炭素13核磁気共鳴スペクトル (100MHz, CDCl_3) :

$\delta =$ 11.4, 14.8, 15.1, 16.6, 17.7, 25.7, 26.4, 30.0, 39.5, 63.9, 115.6, 117.4, 118.4, 122.8, 123.7, 124.8, 126.8, 131.4, 131.9, 139.0, 141.1, 150.6, 161.2, 177.7

図2に、炭素13核磁気共鳴スペクトルのチャートを示した。

[0012] また、下記表1に前記構造式(1)で表される化合物のNMRケミカルシ

フトを示した。

[表1]

Position	¹³ C (mult.)	ppm	¹ H (mult., J)	ppm
N-1				
C-2	150.6	(s)		
C-3	117.4	(s)		
C-4	177.7	(s)		
C-4a	124.8	(s)		
C-5	126.8	(d)	8.47 (dd, 7.6, 1.6)	
C-6	122.8	(d)	7.32 (t, 7.6)	
C-7	131.4	(d)	7.56 (ddd, 8.2, 7.6, 1.6)	
C-8	115.6	(d)	7.28 (d, 8.2)	
C-8a	141.1	(s)		
C-9	11.4	(q)	2.23 (s)	
C-10	63.9	(t)	5.55 (s)	
N-11				
C-12	161.2	(s)		
S-13				
C-14	14.8	(q)	2.31 (s)	
S-15				
C-16	15.1	(q)	2.70 (s)	
C-1'	30.0	(t)	3.54 (d, 6.3)	
C-2'	118.4	(d)	5.10 (brt, 6.3)	
C-3'	139.0	(s)		
C-4'	39.5	(t)	2.08 (m)	
C-5'	26.4	(t)	2.08 (m)	
C-6'	123.7	(d)	5.06 (m)	
C-7'	131.9	(s)		
C-8'	25.7	(q)	1.66 (s)	
C-9'	16.6	(q)	1.73 (s)	
C-10'	17.7	(q)	1.59 (s)	

Chemical shifts in ppm from TMS as an internal standard.

The ¹³C and ¹H NMR were measured at 100 MHz and 400 MHz, respectively.

[0013] 前記化合物が、前記構造式(1)で表される構造を有するか否かは、適宜

選択した各種の分析方法により確認することができ、例えば、前記質量分析法、前記紫外分光法、前記赤外分光法、前記プロトン核磁気共鳴分光法、前記炭素13核磁気共鳴分光法等の分析方法などが挙げられる。なお、前記各分析方法による測定値には、多少の誤差が生じることがあるが、当業者であれば、前記化合物が前記構造式(1)で表される構造を有することは容易に同定することが可能である。

[0014] 前記化合物は、前記構造式(1)で表される化合物の塩であってもよい。

前記塩としては、薬理的に許容され得る塩であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、酢酸塩、クエン酸塩等の有機塩、塩酸塩、炭酸塩などが挙げられる。

前記構造式(1)で表される化合物は、その互変異性体であってもよい。

[0015] 前記構造式(1)で表される化合物は、前記構造式(1)で表される化合物を生産する微生物から得られたものであってもよいし、化学合成により得られたものであってもよい。

[0016] <用途>

前記構造式(1)で表される化合物は、優れた抗がん作用、若しくは、優れた抗ヘリコバクター・ピロリ活性を有し、安全性の高い化合物である。そのため、前記構造式(1)で表される化合物は、例えば、後述する本発明の化合物含有組成物、本発明の抗がん剤、本発明の抗ヘリコバクター・ピロリ剤等の有効成分として好適に利用可能である。

[0017] (化合物の製造方法)

本発明の化合物の製造方法の態様の1つは、培養工程と、採取工程とを少なくとも含み、必要に応じて更にその他の工程を含む。

[0018] <培養工程>

前記培養工程は、ノカルディア (Nocardia) 属に属し、前記構造式(1)で表される化合物を生産する能力を有する微生物を培養する培養工程である。

[0019] 前記微生物としては、ノカルディア (Nocardia) 属に属し、前記

構造式（１）で表される化合物を生産する能力を有する限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、本発明者らの分離したノカルディア エスピー（Nocardia sp.）ML96-86F2株（NITE BP-01464、詳細は後述する本発明の微生物の項目に記す）が挙げられる。また、前記構造式（１）で表される化合物を生産できるその他の菌株についても、常法によって、自然界より分離することが可能である。なお、前記ノカルディア エスピー（Nocardia sp.）ML96-86F2株を含め、前記構造式（１）で表される化合物の生産菌を、放射線照射やその他の変異処理に供することにより、前記構造式（１）で表される化合物の生産能を高めることも可能である。更に、遺伝子工学的手法による前記構造式（１）で表される化合物の生産も可能である。

[0020] 前記微生物が前記構造式（１）で表される化合物を生産する能力を有することを分析する方法としては、例えば、該微生物の培養物、好ましくは、液体培養後の培養上清中又は固体培養後の固体培地中の成分の、抗がん作用若しくは抗ヘリコバクター・ピロリ活性を分析する方法、各種分析法により前記構造式（１）で表される化合物を検出する方法などが挙げられる。

[0021] 前記培養は、前記構造式（１）で表される化合物を生産する生産菌（以下、単に「化合物生産菌」と称することがある）を栄養培地（以下、単に「培地」と称することがある）中に接種し、前記構造式（１）で表される化合物の生産に良好な温度で培養することによって行われる。

[0022] 前記栄養培地としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、従来放線菌の培養に利用されている公知のものを使用することができ、液体培地であってもよく、固体（寒天）培地であってもよい。

前記栄養培地に添加する栄養源としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、市販されている大豆粉、小麦胚芽、押し麦、ペプトン、綿実粕、酵母エキス、肉エキス、コーン・スティープ・リカー、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素等の窒素源；トマトペースト、グリセリン、デンプン、グルコース、ガラクトース、デキストリン、バク

トソイトン等の炭水化物、脂肪等の炭素源；などが挙げられる。

更に、食塩、炭酸カルシウム等の無機塩を培地に添加して使用することもでき、その他、必要に応じて微量の金属塩を培地に添加して使用することもできる。

これらの材料は、前記化合物生産菌が利用し、前記構造式（１）で表される化合物の生産に役立つものであればよく、公知の培養材料は全て用いることができる。

[0023] 前記構造式（１）で表される化合物の生産のための種培養液としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、液体培地、平板培地、斜面培地、半斜面培地等の培地上で前記化合物生産菌を培養した生育物などを使用することができる。

[0024] 前記培養の方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、振とう培養、静置培養、タンク培養などが挙げられる。

前記培養の温度としては、前記化合物生産菌の発育が実質的に阻害されずに、前記構造式（１）で表される化合物を生産し得る範囲であれば、特に制限はなく、使用する生産菌に応じて適宜選択することができるが、 25°C ～ 35°C が好ましい。

前記培養のpHとしては、前記化合物生産菌の発育が実質的に阻害されずに、前記構造式（１）で表される化合物を生産し得る範囲であれば、特に制限はなく、使用する生産菌に応じて適宜選択することができ、例えば、pH 6.0～7.5などが挙げられる。

前記培養の期間としては、特に制限はなく、前記構造式（１）で表される化合物の蓄積に合わせて適宜選択することができる。

[0025] <採取工程>

前記採取工程は、前記培養工程で得られた培養物から前記構造式（１）で表される化合物を採取する工程である。

前記構造式（１）で表される化合物は、上述した物理化学的性質を有するので、その性質に従って培養物から採取することができる。

[0026] 前記培養物としては、前記培養工程で得られ、前記構造式（１）で表される化合物を含むものであれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、菌体、液体培養後の培養上清、固体培養後の固体培地、及びこれらの混合物などが挙げられる。

なお、前記培養物として、前記菌体を用いる場合は、適当な有機溶媒を用いた抽出方法や、菌体破碎による溶出方法などにより、前記構造式（１）で表される化合物を菌体から抽出し、これを分離及び／又は精製に供してもよい。

[0027] 前記採取の方法としては、特に制限はなく、微生物の生産する代謝物を採取するのに用いられる方法を適宜選択することができる。例えば、溶媒抽出法、各種吸着剤に対する吸着親和性の差を利用する方法、クロマトグラフ法などが挙げられる。これらの方法を単独又は適宜組み合わせて、場合によっては反復使用することにより、分離及び／又は精製された前記構造式（１）で表される化合物を採取することができる。

[0028] 前記溶媒抽出法に用いる溶媒としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、エタノール、メタノール、アセトン、ブタノール、アセトニトリルなどが挙げられる。

[0029] 前記吸着剤としては、特に制限はなく、公知の吸着剤の中から目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ポリスチレン系吸着樹脂などが挙げられる。

前記吸着剤の市販品の具体例としては、アンバーライト XAD（ローム・アンド・ハース社製）、ダイヤイオン（登録商標）HP-20（三菱化学株式会社製）などが挙げられる。

[0030] 前記クロマトグラフ法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、薄層クロマトグラフ法、順相あるいは逆相カラムを用いた分取用高速液体クロマトグラフ（分取用 HPLC）法などが挙げられる。

前記クロマトグラフ法に用いる担体としては、特に制限はなく、目的に

じて適宜選択することができ、例えば、イオン交換樹脂、ゲル濾過、シリカゲル、アルミナ、活性炭などが挙げられる。

前記クロマトグラフ法に用いる担体の市販品の具体例としては、アンバーライト（登録商標）CG50（シグマアルドリッチ株式会社製）等のイオン交換樹脂；トヨパール（登録商標）HW-40F（東ソー株式会社製）、セファデックス（登録商標）LH-20（GEヘルスケア社製）等のゲル濾過；CAPCELL PAK C18 UG120、CAPCELL PAK SG120（資生堂株式会社製）等のシリカゲル；などが挙げられる。

[0031] 前記吸着剤や前記クロマトグラフ法における担体から前記一般式（1）で表される化合物を溶出させる方法としては、特に制限はなく、該吸着剤や該担体の種類や性質等に応じて適宜選択することができる。例えば、ポリスチレン系吸着樹脂の場合には、溶出溶媒として、含水アルコール、含水アセトン等を用いて溶出する方法などが挙げられる。

[0032] 以上のようにして前記構造式（1）で表される化合物を製造することができる。

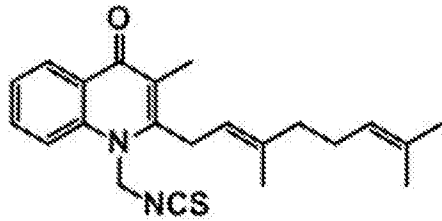
[0033] <その他の工程>

前記その他の工程としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0034] （化合物の製造方法）

本発明の化合物の製造方法の他の態様の1つは、化学合成により製造する方法である。前記化学合成による製造方法としては、アセトニトリルの存在下で、下記構造式（9）で表される化合物と、ナトリウムチオメトキシドとを反応させた後、前記反応物と、メチル化剤とを反応させる方法であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[化4]



構造式(9)

[0035] 前記メチル化剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヨードメタン、メチルトリフルオロメタンスルホナート、ジメチル硫酸、ミアバイン試薬などが挙げられる。前記メチル化剤は、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。これらの中でも、ヨードメタンが好ましい。

[0036] 以下、本発明の化学合成による化合物の製造方法の好ましい態様として、メチルマロン酸ジエステルを出発物質とした態様を以下に説明する。

[0037] <構造式(2)で表される化合物の製造>

前記構造式(2)で表される化合物は、例えば、以下のようにして製造することができる。

メチルマロン酸ジエチルを、テトラヒドロフラン(以下、「THF」と称することがある)と水との混合溶媒に溶解させ、0.25M水酸化カリウム水溶液を氷浴下で滴下する。滴下終了後、更に室温下で攪拌する。反応終了後、1N塩酸を加えpHを3に調整した後、酢酸エチルで抽出し、有機層を芒硝乾燥させ溶媒を留去することにより得ることができる。

なお、前記反応で得られた残渣は、精製することなく次の反応に使用してもよい。

[化5]



構造式(2)

前記反応式中、「Et」は、エチル基を表す。

[0038] <構造式(3)で表される化合物の製造>

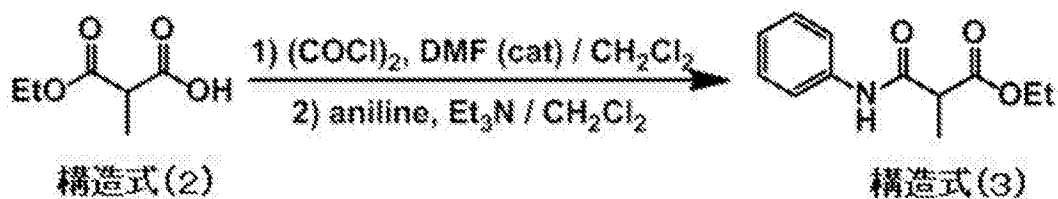
前記構造式(3)で表される化合物は、例えば、以下のようにして製造することができる。

前記構造式(2)で表される化合物を塩化メチレンに溶解させ、氷浴下で塩化オキサリルを滴下し、更にN,N-ジメチルホウマミド(以下、「DMF」と称することがある)を数滴加える。室温下で3時間攪拌させた後、溶媒を留去する。

得られた残渣を塩化メチレンに溶解させ、アニリン、トリエチルアミンを塩化メチレンに溶解させたものに氷浴下で滴下する。更に室温下で6時間攪拌させた後、0.1N塩酸を加えて反応を停止させ、塩化メチレンで抽出後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗浄する。合わせた有機層を芒硝乾燥し、溶媒を留去する。

得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=3:1)で精製することにより、構造式(3)で表される化合物を2工程で得ることができる。

[化6]



前記反応式中、「Et」は、エチル基を表す。

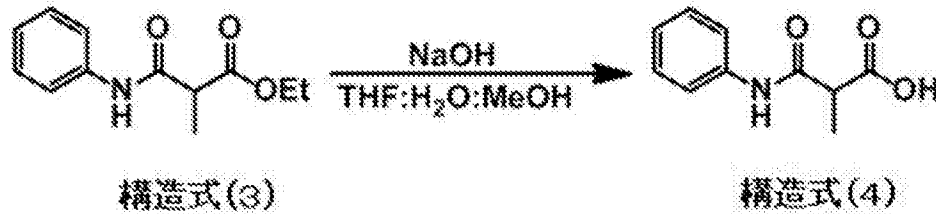
[0039] - 構造式(4)で表される化合物の製造 -

前記構造式(4)で表される化合物は、例えば、以下のようにして製造することができる。

前記構造式(3)で表される化合物をTHF:H₂O:メタノール(4:1:1)の混合溶媒に溶解させ、水酸化ナトリウムを加える。室温下で1時間攪拌させた後、1N塩酸を加えpHを4に調整し、酢酸エチルで抽出する。

得られた有機層は、芒硝乾燥後、溶媒を留去し、構造式（４）で表される化合物を得ることができる。

[化7]



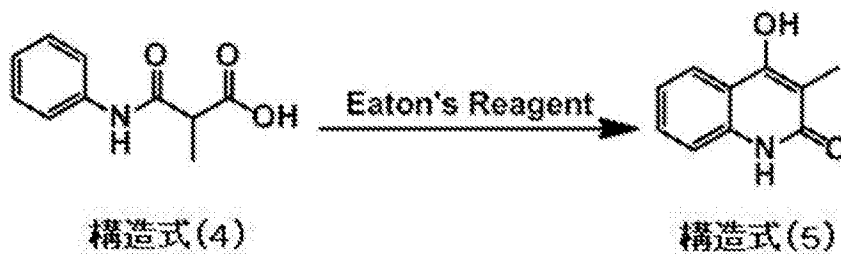
前記反応式中、「Et」は、エチル基を表す。

[0040] ー構造式（５）で表される化合物の製造ー

前記構造式（５）で表される化合物は、例えば、以下のようにして製造することができる。

前記構造式（４）で表される化合物とEaton's試薬（80mL）の混合物を80℃で2.5時間攪拌する。反応溶液を室温まで戻し、氷浴下、10%炭酸水素ナトリウム水溶液をpHが7になるまで加える。生成した白色の固体を吸引濾過し、更に10%炭酸水素ナトリウム水溶液、水で洗浄し、構造式（５）で表される化合物を得ることができる。

[化8]



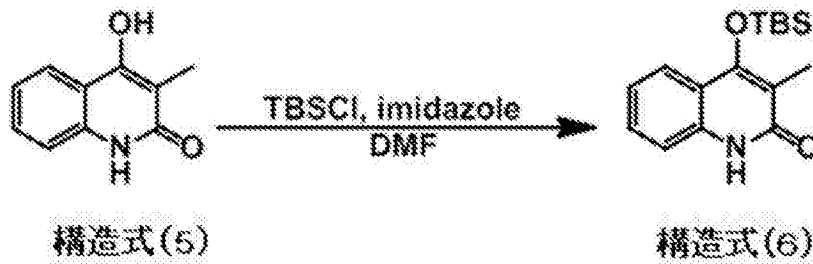
[0041] ー構造式（６）で表される化合物の製造ー

前記構造式（６）で表される化合物は、例えば、以下のようにして製造することができる。

アルゴン雰囲気下、前記構造式（５）で表される化合物をDMFに溶解させ、イミダゾールを加える。更に氷浴下、tert-ブチルジメチルクロロ

シラン（以下、「TBSCl」と称することがある）を加え、室温下で2時間攪拌する。水を加えて反応を停止させ、酢酸エチルで抽出し有機層を分離する。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗浄した後、有機層を芒硝乾燥し溶媒を留去する。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝1：1）で精製し、構造式（6）で表される化合物を得ることができる。

[化9]

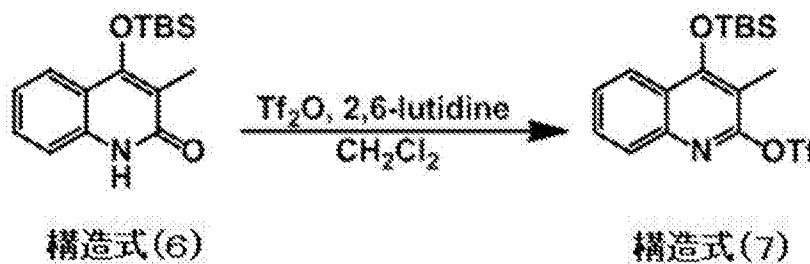


[0042] ー構造式（7）で表される化合物の製造ー

前記構造式（7）で表される化合物は、例えば、以下のようにして製造することができる。

アルゴン雰囲気下、前記構造式（6）で表される化合物を塩化メチレンに溶解させ、2, 6-ルチジンを加える。更に氷冷下、トリフルオロメタンスルホン酸無水物を滴下する。室温下で1時間攪拌させた後、0.1N塩酸で反応を停止させ、塩化メチレンで抽出する。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗浄した後芒硝乾燥させ、溶媒を留去する。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝5：1）で精製し、構造式（7）で表される化合物を得ることができる。

[化10]



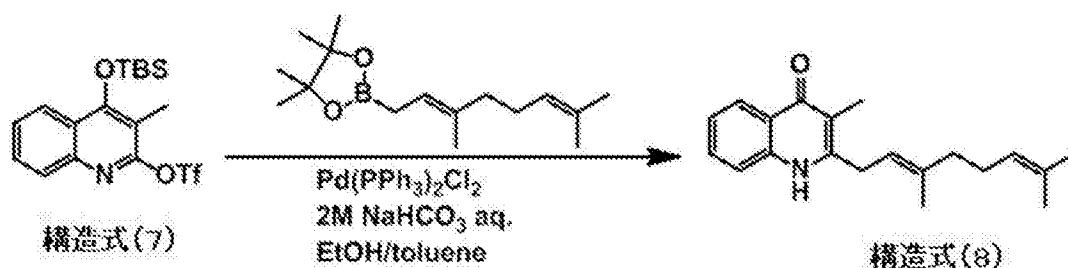
[0043] ー構造式(8)で表される化合物の製造ー

前記構造式(8)で表される化合物は、例えば、以下のようにして製造することができる。

アルゴン雰囲気下、前記構造式(7)で表される化合物と、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ 及びゲラニルボロン酸ピナコールエステル誘導体を入れた混合物に、無水トルエンを加え室温下で30分攪拌する。そこに、無水エタノール(以下、「EtOH」と称することがある)、2M炭酸水素ナトリウム水溶液を順次加え、90℃で4時間攪拌する。食塩水を加えて反応を停止させ、酢酸エチルで抽出する。有機層を芒硝乾燥し、溶媒を留去する。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=1:1)で精製し、構造式(8)で表される化合物を得ることができる。

前記反応において、前記 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ は、 $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ や $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ としてもよい。また、前記2M炭酸水素ナトリウム水溶液は、1M炭酸ナトリウム水溶液としてもよい。また、前記無水トルエンは、THF、1,4-ジオキサンとしてもよい。

[化11]



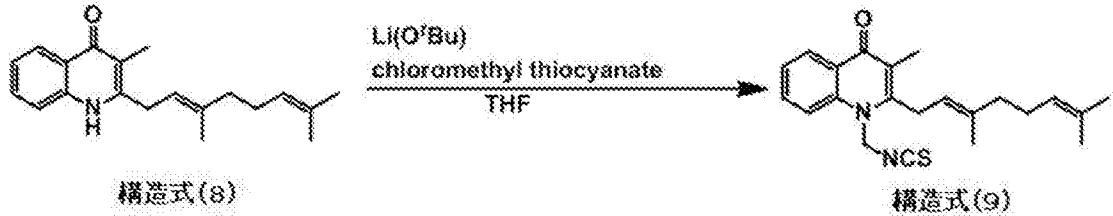
[0044] ー構造式(9)で表される化合物の製造ー

前記構造式(9)で表される化合物は、例えば、以下のようにして製造することができる。

アルゴン雰囲気下、前記構造式(8)で表される化合物をTHFに溶解させ、リチウムt-ブトキシドのTHF 1M溶液を加え室温下で20分攪拌する。そこへ氷冷下、チオシアン酸クロロメチルを滴下し、更に室温下で3時間攪拌する。食塩水を加えて反応を停止させ、酢酸エチルで抽出する。有

機層を芒硝乾燥後、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝3：1）で精製し、構造式（9）で表される化合物を得ることができる。

[化12]

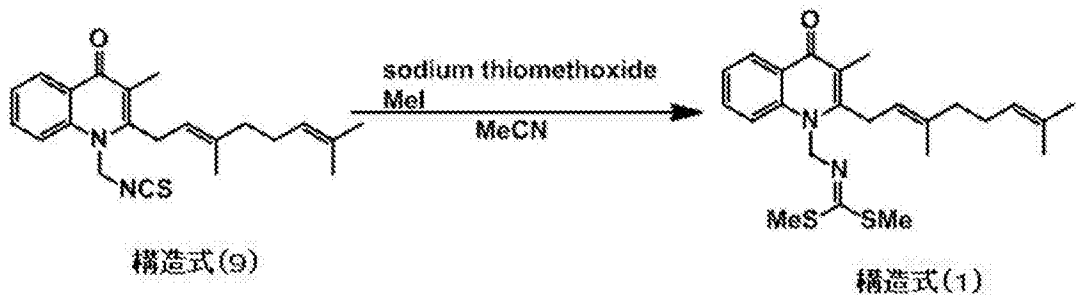


[0045] ー構造式（1）で表される化合物の製造ー

前記構造式（1）で表される化合物は、例えば、以下のようにして製造することができる。

前記構造式（9）で表される化合物とナトリウムチオメトキシドの混合物にアセトニトリルを加え室温下で10分間攪拌する。ヨードメタンを加えて更に室温下で、20分間攪拌する。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させ、酢酸エチルで抽出する。有機層を芒硝乾燥後、溶媒を留去する。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝3：1）で精製し、構造式（1）で表される化合物を得ることができる。

[化13]



前記反応式中、「Me」は、メチル基を表す。

[0046] 前記各構造式で表される化合物の製造方法における反応条件や、用いる化合物及びその使用量、溶媒などは、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記各化合物が、前記各構造式で表される構造を有するか否かは、適宜選択した各種の分析方法により確認することができ、例えば、前記質量分析法、前記紫外分光法、前記赤外分光法、前記プロトン核磁気共鳴分光法、前記炭素13核磁気共鳴分光法等の分析方法などが挙げられる。

[0047] (微生物)

本発明の微生物は、ノカルディア (Nocardia) に属し、上述した本発明の化合物、即ちインターベノリン (Intervenolin) を生産する能力を有する。前記微生物は、インターベノリン (Intervenolin) を生産する能力を有し、そのために、上述した本発明の化合物の製造方法において、インターベノリン (Intervenolin) の生産菌として使用され得る微生物であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0048] このような微生物の中でも、特に、平成11年、公益財団法人 微生物化学研究会 微生物化学研究所において、東京都の土壌より分離された放線菌で、ML96-86F2株の菌株番号が付された微生物を使用することが好ましい。前記ML96-86F2株の菌学的性状は、以下の通りである。

[0049] 1. 形態

ML96-86F2株は、分断がわずかに認められる分枝した基生菌糸より、フック状若しくはらせん状の気菌糸を伸長する。成熟した孢子鎖は3個~10個の柱筒状の孢子を連鎖する。孢子の大きさは約0.5 μm~0.7 μm×0.7 μm~1.2 μmで、孢子の表面は平滑である。

[0050] 2. 各種培地における生育状態

色の記載について [] 内に示す標準は、コンティナー・コーポレーション・オブ・アメリカのカラー・ハーモニー・マニュアル (Container Corporation of Americaのcolor harmony manual) を用いた。

(a) オートミール寒天培地 (ISP-培地3、30℃培養)

うす黄 [1 ca, Pale Yellow] の発育上に、ピンク白 [

near grays, 5 ba, Shell Pink] の気菌糸を着生する。可溶性色素は認められない。

(b) スターチ・無機塩寒天培地 (ISP-培地4、30℃培養)

うす黄茶 [3 ea, Lt Melon Yellow] の発育上に、白 [THE gray scale, a, White] の気菌糸を着生する。可溶性色素は認められない。

(c) グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP-培地5、30℃培養)

うす黄 [3 ea, Lt Melon Yellow] ~うす赤茶 [5 ec, Dusty Peach] の発育上に、白 [The gray scale, a, White] の気菌糸を着生する。可溶性色素は赤味を帯びる。

(d) シュクロース・硝酸塩寒天培地 (30℃培養)

うす黄 [3 ca, Shell] の発育上に、白 [The gray scale, a, White] の気菌糸を着生する。可溶性色素は認められない。

[0051] 3. 生育温度範囲

(a) 生育温度範囲

グルコース・アスパラギン寒天培地 (グルコース 1%、L-アスパラギン 0.05%、 K_2HPO_4 0.05%、ひも寒天 2.6%、pH7.0) を用い、10℃、24℃、27℃、30℃、37℃、42℃及び50℃の各温度で試験した結果、10℃及び37℃以上での生育は認められず、24℃~30℃の範囲で生育した。生育至適温度は27℃付近である。

[0052] 4. 菌体成分

細胞壁中の2,6-ジアミノピメリン酸は、LL-型である。

なお、前記菌体成分は、薄層クロマトグラフィーにより分析した。

細胞壁中の2,6-ジアミノピメリン酸は meso-型である。

菌体成分としてミコール酸を含有する。

[0053] 5. 16S rRNA 遺伝子解析

16S rRNA遺伝子の部分塩基配列(1,431bp)を決定し、DNAデータベースに登録された公知菌株のデータと比較した。

その結果、ML96-86F2株の塩基配列は以下に示すように、ノカルディア(Nocardia)属放線菌の16S rRNA遺伝子と高い同一性を示した。即ち、Nocardia anaemiae(98.8%)、N. pseudovaccinii(98.3%)、N. vinacea(98.3%)などである。なお、前記括弧内の数値は、塩基配列の相同値を表記した。

[0054] 以上の性状を要約すると、ML96-86F2株は、その形態上、よく分枝し分断が認められる基生菌糸より、フック状及びらせん形成を有する気菌糸を伸長する。その先端は柱筒状の胞子を連鎖する。種々の培地で、うす黄～うす赤茶の発育上に白～ピンク白の気菌糸を着生する。生育至適温度は27℃付近である。

ML96-86F2株の細胞壁中の2,6-ジアミノピメリン酸はmeso-型であり、菌体成分としてミコール酸を含有する。

ML96-86F2株の16S rRNA遺伝子の部分塩基配列を解析し、公知菌株のデータと比較したところ、ノカルディア属放線菌と高い同一性を示した。

[0055] 以上の結果より、ML96-86F2株はノカルディア(Nocardia)属に属するものと考えられる。そこで、ML96-86F2株をノカルディア エスピー(Nocardia sp.) ML96-86F2株とした。

なお、前記ML96-86F2株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に寄託申請し、2012年11月15日に国内寄託され、その後、2013年12月2日にブダペスト条約に基づく国際寄託への移管請求が受領され、受託番号NITE BP-01464として国際寄託されている。

[0056] なお、他の菌にも見られるように、前記ML 96-86F2株は、性状が変化し易いが、例えば、前記ML 96-86F2株に由来する突然変異株（例えば、自然変異株や、紫外線、エックス線、放射線、薬品等の変異処理により取得できる人工変異株）、形質接合体、遺伝子組換え体などであっても、前記構造式（1）で表される化合物を生産する能力を有するものは、本発明の微生物に含まれる。

[0057] （化合物含有組成物、抗がん剤、抗ヘリコバクター・ピロリ剤）

<化合物含有組成物>

本発明の化合物含有組成物は、前記構造式（1）で表される化合物を少なくとも含み、必要に応じて、更にその他の成分を含む。

[0058] 前記化合物含有組成物における前記構造式（1）で表される化合物の含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。前記化合物含有組成物は、前記構造式（1）で表される化合物そのものであってもよい。

[0059] -その他の成分-

前記その他の成分としては、特に制限はなく、薬理的に許容され得る担体の中から目的に応じて適宜選択することができ、例えば、添加剤、補助剤、水などが挙げられる。これらは、1種単独で使用してもよく、2種以上を併用してもよい。

[0060] 前記添加剤又は前記補助剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、殺菌剤、保存剤、粘結剤、増粘剤、固着剤、結合剤、着色剤、安定化剤、pH調整剤、緩衝剤、等張化剤、溶剤、酸化防止剤、紫外線防止剤、結晶析出防止剤、消泡剤、物性向上剤、防腐剤などが挙げられる。

[0061] 前記殺菌剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム等のカチオン性界面活性剤などが挙げられる。

[0062] 前記保存剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することが

でき、例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、クレゾールなどが挙げられる。

[0063] 前記粘結剤、増粘剤、固着剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、デンプン、デキストリン、セルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルデンプン、プルラン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸プロピレングリコールエステル、グアーガム、ローカストビーンガム、アラビアゴム、キサンタンガム、ゼラチン、カゼイン、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキサイド、ポリエチレングリコール、エチレン・プロピレンブロックポリマー、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

[0064] 前記結合剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、エチルセルロース、シェラック、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

[0065] 前記着色剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、酸化チタン、酸化鉄などが挙げられる。

[0066] 前記安定化剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、トラガント、アラビアゴム、ゼラチン、ピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、チオグリコール酸、チオ乳酸などが挙げられる。

[0067] 前記pH調整剤又は前記緩衝剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0068] 前記等張化剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択すること

ができ、例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖などが挙げられる。

[0069] 前記化合物含有組成物における前記その他の成分の含有量としては、特に制限はなく、前記構造式（１）で表される化合物の効果を損なわない範囲内で、目的に応じて適宜選択することができる。

[0070] ー用途ー

前記化合物含有組成物は、前記構造式（１）で表される化合物を含むため、優れた抗がん作用、優れた抗ヘリコバクター・ピロリ活性を有し、安全性が高く、例えば、医薬組成物、抗がん剤、抗ヘリコバクター・ピロリ剤などに好適に利用可能である。

なお、前記化合物含有組成物は、単独で使用されてもよいし、他の成分を有効成分とする医薬と併せて使用されてもよい。また、前記化合物含有組成物は、他の成分を有効成分とする医薬中に、配合された状態で使用されてもよい。

[0071] <抗がん剤>

本発明の抗がん剤は、前記構造式（１）で表される化合物を少なくとも含み、必要に応じて、更にその他の成分を含む。

[0072] 前記抗がん剤における前記構造式（１）で表される化合物の含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。前記抗がん剤は、前記構造式（１）で表される化合物そのものであってもよい。

[0073] ーその他の成分ー

前記その他の成分としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、前記化合物含有組成物に記載したその他の成分と同様のものが挙げられる。これらは、１種単独で使用してもよく、２種以上を併用してもよい。

[0074] 前記抗がん剤における前記その他の成分の含有量としては、特に制限はなく、前記構造式（１）で表される化合物の効果を損なわない範囲内で、目的に応じて適宜選択することができる。

[0075] ー用途ー

前記抗がん剤は、前記構造式（１）で表される化合物を含むため、優れた抗がん作用を有し、安全性が高く、胃がん、大腸がん、前立腺がん、肺がん、膵がん、乳がんなどの幅広いがんの予防剤又は治療剤として好適に利用可能である。これらの中でも、胃がん、大腸がん特に好適に利用可能である。

なお、前記抗がん剤は、単独で使用されてもよいし、他の成分を有効成分とする医薬と併せて使用されてもよい。また、前記抗がん剤は、他の成分を有効成分とする医薬中に、配合された状態で使用されてもよい。

また、後述する試験例で示すように、本発明の前記構造式（１）で表される化合物は、正常間質細胞の存在下で、よりがん細胞の増殖を抑制することができる。

[0076] 前記抗がん剤は、前記構造式（１）で表される化合物を含むので、個体に投与することにより、個体におけるがんの発生を予防、又はがんを患う個体を治療することができる。したがって、本発明は、個体に、前記抗がん剤を投与することを特徴とする、がんの予防又は治療方法にも関する。

[0077] <抗ヘリコバクター・ピロリ剤>

本発明の抗ヘリコバクター・ピロリ剤は、前記構造式（１）で表される化合物を少なくとも含み、必要に応じて、更にその他の成分を含む。

[0078] 前記抗ヘリコバクター・ピロリ剤における前記構造式（１）で表される化合物の含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。前記抗ヘリコバクター・ピロリ剤は、前記構造式（１）で表される化合物そのものであってもよい。

[0079] -その他の成分-

前記その他の成分としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、前記化合物含有組成物に記載したその他の成分と同様のものが挙げられる。これらは、１種単独で使用してもよく、２種以上を併用してもよい。

[0080] 前記抗ヘリコバクター・ピロリ剤における前記その他の成分の含有量とし

ては、特に制限はなく、前記構造式（１）で表される化合物の効果を損なわない範囲内で、目的に応じて適宜選択することができる。

[0081] ー用途ー

前記抗ヘリコバクター・ピロリ剤は、前記構造式（１）で表される化合物を含むため、優れた抗ヘリコバクター・ピロリ活性を有し、安全性が高く、胃潰瘍や十二指腸潰瘍などのヘリコバクター・ピロリに起因する胃及び十二指腸障害の予防剤又は治療剤として好適に利用可能である。

なお、前記抗ヘリコバクター・ピロリ剤は、単独で使用されてもよいし、他の成分を有効成分とする医薬と併せて使用されてもよい。また、前記抗ヘリコバクター・ピロリ剤は、他の成分を有効成分とする医薬中に、配合された状態で使用されてもよい。

[0082] 前記抗ヘリコバクター・ピロリ剤は、前記構造式（１）で表される化合物を含むので、個体に投与することにより、個体がヘリコバクター・ピロリに感染することを予防、又はヘリコバクター・ピロリに感染した個体を治療することができる。したがって、本発明は、個体に、前記抗ヘリコバクター・ピロリ剤を投与することを特徴とする、ヘリコバクター・ピロリによる感染症の予防又は治療方法にも関する。

また、前記抗ヘリコバクター・ピロリ剤を個体に投与することにより、ヘリコバクター・ピロリに起因する胃及び十二指腸障害の発生の予防、又はヘリコバクター・ピロリに起因する胃及び十二指腸障害を患う個体を治療することができる。したがって、本発明は、個体に、前記抗ヘリコバクター・ピロリ剤を投与することを特徴とする、ヘリコバクター・ピロリに起因する胃及び十二指腸障害の予防又は治療方法にも関する。

[0083] <剤型>

前記化合物含有組成物、抗がん剤、及び抗ヘリコバクター・ピロリ剤の剤型としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、固形剤、半固形剤、液剤などが挙げられる。これらの剤型の前記化合物含有組成物、抗がん剤、及び抗ヘリコバクター・ピロリ剤は、常法に従い製

造することができる。

[0084] ー固形剤ー

前記固形剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、内用剤として用いられる場合、例えば、錠剤、チュアブル錠、発泡錠、口腔内崩壊錠、トローチ剤、ドロップ剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、ドライシロップ剤、浸剤などが挙げられる。

前記固形剤が、外用剤として用いられる場合、例えば、坐剤、パップ剤、プラスター剤などが挙げられる。

[0085] ー半固形剤ー

前記半固形剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、内用剤として用いられる場合、例えば、舐剤、チューインガム剤、ホイップ剤、ゼリー剤などが挙げられる。

前記半固形剤が、外用剤として用いられる場合、例えば、軟膏剤、クリーム剤、ムース剤、インヘラー剤、ナザールジェル剤などが挙げられる。

[0086] ー液剤ー

前記液剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、内用剤として用いられる場合、例えば、シロップ剤、ドリンク剤、懸濁剤、酒精剤などが挙げられる。

前記液剤が、外用剤として用いられる場合、例えば、液剤、点眼剤、エアゾール剤、噴霧剤などが挙げられる。

[0087] <投与>

前記化合物含有組成物、抗がん剤、及び抗ヘリコバクター・ピロリ剤の投与方法、投与量、投与時期、及び投与対象としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記投与方法としては、例えば、局所投与方法、経腸投与方法、非経口投与方法などが挙げられる。

前記投与量としては、特に制限はなく、投与対象個体の年齢、体重、体質、症状、他の成分を有効成分とする医薬や薬剤の投与の有無など、様々な要

因を考慮して適宜選択することができる。

前記投与対象となる動物種としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、トリなどが挙げられるが、これらの中でもヒトに好適に用いることができる。

実施例

[0088] 以下に本発明の製造例、試験例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの製造例、試験例に何ら限定されるものではない。

なお、下記試験例のデータは、同様な結果が得られた2回又は3回の独立した実験の代表的なものである。統計解析は、スチューデントのt検定を用いた。

[0089] (製造例1)

<構造式(1)で表される化合物の製造>

—種培養液の調製—

種培地として、2質量%ガラクトース、2質量%デキストリン、1質量% Bacto (登録商標) Soytone (BD Biosciences 社製)、0.5質量%コーンステープリカー、0.2質量%硫酸アンモニウム、0.2質量%炭酸カルシウムを含む液体培地 (pH 7.2) を使用した。

スラント上に生育させたML96-86F2菌体を1白金耳かきとり、前記種培地に接種し、30℃、220rpmで8日間振とう培養し、種培養液を得た。

[0090] —培養工程—

生産培地として、前記非特許文献2を参照し、1質量%グルコース、2質量%コーンスターチ、0.5質量%小麦胚芽、0.5質量%NZアミンタイプA (和光純薬工業社製)、0.5質量%酵母抽出物、0.4質量%炭酸カルシウム、0.0001質量%塩化コバルトを含む液体培地 (pH 6.7) を用いた。

前記生産培地に、前記種培養液を2%植菌し、25℃、220rpmで1日間振とう培養した。

[0091] ー採取工程ー

前記インターベノリン (Intervenolin) 生産菌ML96-86F2株の培養液10Lを濾過して菌体を分離した後、前記菌体が十分に浸る量のメタノールを加えて攪拌した。これを濾過して菌体を除き、前記メタノール抽出液を減圧下にてメタノールを留去し、水を加えて1Lにした。

ここに等量の酢酸エチルを加えて攪拌し、酢酸エチル層を回収し、減圧下にて酢酸エチルを留去し、抽出物1gを得た。

次に、前記抽出物を、ヘキサン：酢酸エチル=1：1で充填したシリカゲルカラムに載せ、ヘキサン：酢酸エチル=1：1、ヘキサン：酢酸エチル=1：3、メタノールで順次溶出した。

前記ヘキサン：酢酸エチル=1：1で溶出した粗精製物58.3mgをHPLCクロマトグラフィー (CAPCELL PAK C18 UG120 5μm, 20×250mm、株式会社資生堂製) で80体積%メタノールの溶液で分離し、インターベノリン (Intervenolin) を3.9mg得た。

[0092] ー構造式(1)で表される化合物(インターベノリン)の物理化学的性質ー

得られたインターベノリン (Intervenolin) の物理化学的性質は、以下のとおりであった。前記物理化学的性質、及び前記非特許文献2を参考にし、前記インターベノリン (Intervenolin) が、下記構造式(1)で表される構造を有する新規化合物であることが確認された。

- (1) 外観 : 淡黄色油状物
- (2) 分子式 : $C_{24}H_{32}N_2OS_2$
- (3) 高分解能質量分析 (HRESI-MS) (m/z) :
実験値 451.1834 (M+Na)⁺
計算値 451.1848 ($C_{24}H_{32}N_2OS_2Na$ として)
- (4) 紫外線吸収スペクトル :

メタノール溶液で測定した紫外線吸収のピークは、以下の通りであった。

λ_{\max} nm (ϵ) : 214.5 (33,600)、242.5 (37,700)、327.5 (15,600)、341.0 (17,900)

(5) 赤外線吸収スペクトル :

KBr錠剤法で測定した赤外線吸収のピークは、以下の通りであった。

ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 2966, 2921, 1617, 1596, 1562, 1372, 1281, 1193, 1022, 761, 696

(6) プロトン核磁気共鳴スペクトル (400MHz, CDCl_3) :

$\delta =$ 1.59 (3H, s), 1.66 (3H, s), 1.73 (3H, s), 2.08 (4H, m), 2.23 (3H, s), 2.31 (3H, s), 2.70 (3H, s), 3.54 (2H, d, $J=6.3$), 5.06 (1H, m), 5.10 (1H, brt, $J=6.3$), 5.55 (2H, s), 7.28 (1H, d, $J=8.2$), 7.32 (1H, t, $J=7.6$), 7.56 (1H, ddd, $J=8.2, 7.6, 1.6$), 8.47 (1H, dd, $J=7.6, 1.6$)

図1に、プロトン核磁気共鳴スペクトルのチャートを示した。

(7) 炭素13核磁気共鳴スペクトル (100MHz, CDCl_3) :

$\delta =$ 11.4, 14.8, 15.1, 16.6, 17.7, 25.7, 26.4, 30.0, 39.5, 63.9, 115.6, 117.4, 118.4, 122.8, 123.7, 124.8, 126.8, 131.4, 131.9, 139.0, 141.1, 150.6, 161.2, 177.7

図2に、炭素13核磁気共鳴スペクトルのチャートを示した。

[0093] また、下記表2に前記構造式(1)で表される化合物のNMRケミカルシフトを示した。

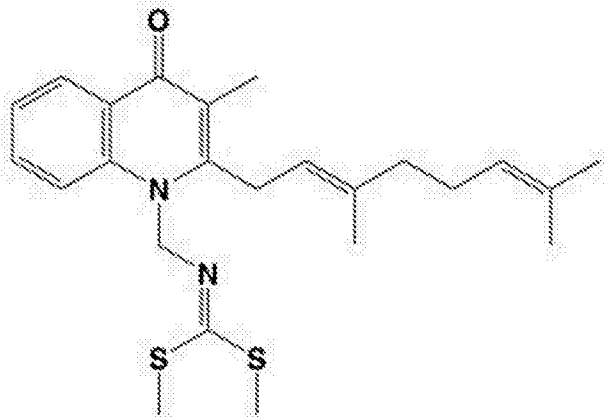
[表2]

Position	¹³ C (mult.)	ppm	¹ H (mult., J)	ppm
N-1				
C-2	150.6	(s)		
C-3	117.4	(s)		
C-4	177.7	(s)		
C-4a	124.8	(s)		
C-5	126.8	(d)	8.47 (dd, 7.6, 1.6)	
C-6	122.8	(d)	7.32 (t, 7.6)	
C-7	131.4	(d)	7.56 (ddd, 8.2, 7.6, 1.6)	
C-8	115.6	(d)	7.28 (d, 8.2)	
C-8a	141.1	(s)		
C-9	11.4	(q)	2.23 (s)	
C-10	63.9	(t)	5.55 (s)	
N-11				
C-12	161.2	(s)		
S-13				
C-14	14.8	(q)	2.31 (s)	
S-15				
C-16	15.1	(q)	2.70 (s)	
C-1'	30.0	(t)	3.54 (d, 6.3)	
C-2'	118.4	(d)	5.10 (brt, 6.3)	
C-3'	139.0	(s)		
C-4'	39.5	(t)	2.08 (m)	
C-5'	26.4	(t)	2.08 (m)	
C-6'	123.7	(d)	5.06 (m)	
C-7'	131.9	(s)		
C-8'	25.7	(q)	1.66 (s)	
C-9'	16.6	(q)	1.73 (s)	
C-10'	17.7	(q)	1.59 (s)	

Chemical shifts in ppm from TMS as an internal standard.

The ¹³C and ¹H NMR were measured at 100 MHz and 400 MHz, respectively.

[0094] [化14]



構造式(1)

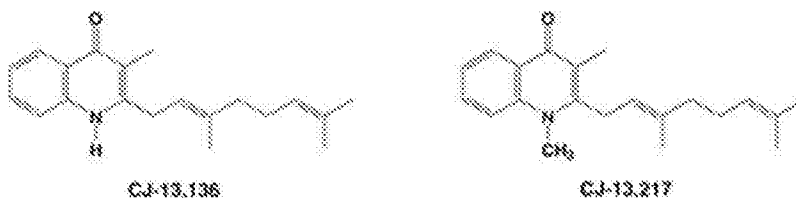
[0095] (試験例1: In vitroの抗がん活性)

前記製造例1で得られた構造式(1)で表される化合物のIn vitroの抗がん活性を以下のようにして試験した。

[0096] <細胞増殖試験1 (ヒト胃がん細胞MKN-74)>

本細胞増殖試験1では、比較として、前記非特許文献2に記載されている下記化合物2種(CJ-13,136及びCJ-13,217)についても同様に試験した。

[0097] [化15]



[0098] -細胞の調製-

ヒト胃がん細胞MKN-74 (理研セルバンク) を、10% FBS (GIBCO社製)、100 units/mLのペニシリンG (Invitrogen社製)、100 µg/mLのストレプトマイシン (Invitrogen社製) を添加したDMEMで、37°C、5% CO₂で培養した。

前記がん細胞に、Green fluorescence protei

n (GFP) 発現ベクター pEGFP-C1 (BD Biosciences 社製) を、Lipofectamine 試薬 (Invitrogen 社製) を用いて遺伝子導入し、安定的に GFP を発現した細胞をクローニングした。

ヒト胃由来の正常間質細胞 Hs 738 (CRL-7869)、ATCC) は、10% FBS、100 units/mL のペニシリン G (Invitrogen 社製)、100 μ g/mL のストレプトマイシン (Invitrogen 社製)、5 μ g/mL のインスリン、5 μ g/mL のトランスフェリン (和光純薬工業社製)、1.4 μ M のヒドロコルチゾン (Sigma 社製)、5 mg/mL の basic-FGF (Pepro Tech 社製) を添加した DMEM で、37°C、5% CO₂ で培養した。

[0099] ー 共培養試験 ー

前記ヒト胃由来の正常間質細胞 Hs 738 を、1% 透析血清、5 μ g/mL のインスリン、5 μ g/mL のトランスフェリン (和光純薬工業社製)、1.4 μ M のヒドロコルチゾン (Sigma 社製) を含む DMEM で 5×10^4 個/mL に分散させ、96 ウェルプレートに 0.1 mL/ウェルずつ撒き、各評価サンプル (構造式 (1) で表される化合物、CJ-13, 136、CJ-13, 217) を各濃度で加え、37°C、5% CO₂ で 2 日間培養した。

次に、前記ヒト胃がん細胞 MKN-74 を、DMEM で 5×10^5 個/mL に分散させ、前記ヒト胃由来の正常間質細胞 Hs 738 を培養したプレートに、10 μ L/ウェルずつ撒き、更に 37°C、5% CO₂ で 3 日間共培養した。

[0100] ー 単独培養試験 ー

1% 透析血清、5 μ g/mL のインスリン、5 μ g/mL のトランスフェリン (和光純薬工業社製)、1.4 μ M のヒドロコルチゾン (Sigma 社製) を含む DMEM のみを 96 ウェルプレートに 0.1 mL/ウェルずつ撒き、各評価サンプル (構造式 (1) で表される化合物、CJ-13, 136

、CJ-13, 217) を各濃度で加え、37℃、5% CO₂で2日間維持した。

次に、前記ヒト胃がん細胞MKN-74を、DMEMで5×10⁵個/mLに分散させ、前記プレートに、10μL/ウェルずつ撒き、更に37℃、5% CO₂で3日間共培養した。

[0101] -細胞増殖率の測定-

前記共培養試験、及び単独培養試験における細胞増殖率の測定は、以下のように行った。

前記プレートのウェルから培地を除去し、細胞溶解液(10mM Tris-HCl [pH 7.4]、150mM NaCl、0.9mM CaCl₂、1% Triton X-100)を0.1mL/ウェルずつ加え細胞を溶解し、GFPの蛍光強度を、励起波長485nm、蛍光波長538nmで測定し、下記式から、細胞増殖率を算出した。

細胞増殖率(%) = (評価サンプルありの蛍光強度/評価サンプルなしの蛍光強度) × 100

[0102] <細胞増殖試験2 (ヒト胃がん細胞MKN-7) >

-細胞の調製-

ヒト胃がん細胞MKN-7 (理研セルバンク) を、10%FBS (GIBCO社製)、100units/mLのペニシリンG (Invitrogen社製)、100μg/mLのストレプトマイシン (Invitrogen社製) を含むDMEMで、37℃、5% CO₂で培養した。

前記がん細胞に、Green fluorescence protein (GFP) 発現ベクターpEGFP-C1 (BD Biosciences社製) を、Lipfectamine試薬 (Invitrogen社製) を用いて遺伝子導入し、安定的にGFPを発現した細胞をクローニングした。

ヒト胃由来の正常間質細胞Hs738 ((CRL-7869)、ATCC) は、10%FBS、100units/mLのペニシリンG (Invit

rogen社製)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のストレプトマイシン (Invitrogen社製)、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のインスリン、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のトランスフェリン (和光純薬工業社製)、1.4 μM のヒドロコルチゾン (Sigma社製)、5 mg/mL のbasic-FGF (Pepro Tech社製)を添加したDMEMで、37°C、5% CO_2 で培養した。

[0103] ー共培養試験ー

前記ヒト胃由来の正常間質細胞Hs738を、1%透析血清、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のインスリン、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のトランスフェリン (和光純薬工業社製)、1.4 μM のヒドロコルチゾン (Sigma社製)を含むDMEMで 5×10^4 個/ mL に分散させ、96ウェルプレートに0.1 $\text{mL}/$ ウェルずつ撒き、評価サンプル (構造式 (1) で表される化合物) を各濃度で加え、37°C、5% CO_2 で2日間培養した。

次に、前記ヒト胃がん細胞MKN-7を、DMEMで 5×10^5 個/ mL に分散させ、前記ヒト胃由来の正常間質細胞Hs738を培養したプレートに、10 $\mu\text{L}/$ ウェルずつ撒き、更に37°C、5% CO_2 で3日間共培養した。

[0104] ー単独培養試験ー

1%透析血清、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のインスリン、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のトランスフェリン (和光純薬工業社製)、1.4 μM のヒドロコルチゾン (Sigma社製)を含むDMEMのみを96ウェルプレートに0.1 $\text{mL}/$ ウェルずつ撒き、評価サンプル (構造式 (1) で表される化合物) を各濃度で加え、37°C、5% CO_2 で2日間維持した。

次に、前記ヒト胃がん細胞MKN-7を、DMEMで 5×10^5 個/ mL に分散させ、前記プレートに、10 $\mu\text{L}/$ ウェルずつ撒き、更に37°C、5% CO_2 で3日間共培養した。

[0105] ー細胞増殖率の測定ー

前記共培養試験、及び単独培養試験における細胞増殖率の測定は、前記細胞増殖試験1と同様にして行った。

[0106] <細胞増殖試験3 (ヒト大腸がん細胞HCT-15)>

-細胞の調製-

ヒト大腸がん細胞HCT-15 (ATCC) を、10%FBS (GIBCO社製)、100units/mLのペニシリンG (Invitrogen社製)、100 μ g/mLのストレプトマイシン (Invitrogen社製) を含むDMEMで、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で培養した。

前記がん細胞に、Green fluorescence protein (GFP) 発現ベクターpEGFP-C1 (BD Biosciences社製) を、Lipfectamine試薬 (Invitrogen社製) を用いて遺伝子導入し、安定的にGFPを発現した細胞をクローニングした。

ヒト大腸由来の正常間質細胞CCD-18Co ((CRL-1459)、ATCC) は、10%FBS、100units/mLのペニシリンG (Invitrogen社製)、100 μ g/mLのストレプトマイシン (Invitrogen社製)、5 μ g/mLのインスリン、5 μ g/mLのトランスフェリン (和光純薬工業社製)、1.4 μ Mのヒドロコルチゾン (Sigma社製)、5mg/mLのbasic-FGF (Pepro Tech社製) を添加したDMEMで、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で培養した。

[0107] -共培養試験-

前記ヒト大腸由来の正常間質細胞CCD-18Coを、1%透析血清、5 μ g/mLのインスリン、5 μ g/mLのトランスフェリン (和光純薬工業社製)、1.4 μ Mのヒドロコルチゾン (Sigma社製) を含むDMEMで5 \times 10⁴個/mLに分散させ、96ウェルプレートに0.1mL/ウェルずつ撒き、評価サンプル (構造式(1)で表される化合物) を各濃度で加え、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で2日間培養した。

次に、前記ヒト大腸がん細胞HCT-15を、DMEMで5 \times 10⁵個/mLに分散させ、前記ヒト大腸由来の正常間質細胞CCD-18Coを培養したプレートに、10 μ L/ウェルずつ撒き、更に37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で3日

間共培養した。

[0108] ー単独培養試験ー

1%透析血清、 $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のインスリン、 $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のトランスフェリン（和光純薬工業社製）、 $1.4\ \mu\text{M}$ のヒドロコルチゾン（Sigma社製）を含むDMEMのみを96ウェルプレートに $0.1\ \text{mL}/\text{ウェル}$ ずつ撒き、評価サンプル（構造式（1）で表される化合物）を各濃度で加え、 37°C 、5% CO_2 で2日間維持した。

次に、前記ヒト大腸由来の正常間質細胞CCD-18Coを、DMEMで 5×10^5 個/ mL に分散させ、前記プレートに、 $10\ \mu\text{L}/\text{ウェル}$ ずつ撒き、更に 37°C 、5% CO_2 で3日間共培養した。

[0109] ー細胞増殖率の測定ー

前記共培養試験、及び単独培養試験における細胞増殖率の測定は、前記細胞増殖試験1と同様にして行った。

[0110] 前記細胞増殖試験1から3の結果を図3Aから図3Eに示した。

図3Aは、前記細胞増殖試験1において、評価サンプルとして、構造式（1）で表される化合物を用いた場合の結果を示し、図3Bは、前記細胞増殖試験1において、評価サンプルとして、CJ-13, 136を用いた場合の結果を示し、図3Cは、前記細胞増殖試験1において、評価サンプルとして、CJ13, 217を用いた場合の結果を示し、図3Dは、前記細胞増殖試験2の結果を示し、図3Eは、前記細胞増殖試験3の結果を示す。図3Aから図3E中、「●」は、共培養試験（co）の結果を示し、「○」は、単独培養試験（mo）の結果を示す。

図3Aから図3Eにおける値は、2連の平均値を示し、標準誤差（SE）は、10%以下であった。

[0111] 図3Aに示したように、前記構造式（1）で表される化合物は、ヒト胃がん細胞MKN-74のみの培養ではその増殖を IC_{50} $3.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ で阻害するが、胃間質細胞と共培養したときは、ヒト胃がん細胞MKN-74の増殖を IC_{50} $0.17\ \mu\text{g}/\text{mL}$ とより低濃度で強く阻害した。

一方、図3Bに示したように、前記CJ-13, 136は、ヒト胃癌細胞MKN-74のみの培養ではその増殖を IC_{50} $0.22 \mu g/mL$ で阻害するが、胃間質細胞と共培養したときは、ヒト胃癌細胞MKN-74の増殖を IC_{50} $0.005 \mu g/mL$ とより低濃度で強く阻害した。また、図3Cに示したように、前記CJ-13, 217は、ヒト胃癌細胞MKN-74のみの培養ではその増殖を IC_{50} $0.03 \mu g/mL$ で阻害するが、胃間質細胞と共培養したときは、ヒト胃癌細胞MKN-74の増殖を IC_{50} $0.006 \mu g/mL$ とより低濃度で強く阻害した。

このようにCJ-13, 136及びCJ-13, 217は、構造式(1)で表される化合物よりも低濃度でヒト胃癌細胞MKN-74の増殖を阻害したが、後述する急性毒性試験で示すように、構造式(1)で表される化合物よりも極めて毒性が強かった。

[0112] 図3Dに示したように、前記構造式(1)で表される化合物は、ヒト胃癌細胞MKN-7のみの培養ではその増殖を IC_{50} $1.6 \mu g/mL$ で阻害するが、胃間質細胞と共培養したときは、ヒト胃癌細胞MKN-7の増殖を IC_{50} $0.13 \mu g/mL$ とより低濃度で強く阻害した。

また、図3Eに示したように、前記構造式(1)で表される化合物は、ヒト大腸がんHCT-15細胞のみの培養ではその増殖を IC_{50} $1.6 \mu g/mL$ で阻害するが、大腸間質細胞と共培養したときは、ヒト大腸がんHCT-15細胞の増殖を IC_{50} $0.21 \mu g/mL$ とより低濃度で強く阻害した。

[0113] (試験例2: *In vivo*の抗がん活性)

前記製造例1で得られた構造式(1)で表される化合物の*In vivo*の抗がん活性を以下のようにして試験した。

[0114] <試験例2-1-1: ヒト胃癌細胞MKN-74単独>

BALB/c nu/nuヌードマウス(雌、5週齢、チャールズリバー社製)をSPF条件下にて飼育した。

培養したヒト胃癌細胞MKN-74をトリプシン処理し、培養ディッシュ

ユから剥がした前記ヒト胃がん細胞MK N-74 (8×10^6 個)を0.3 mLの10%FBSを含むDMEMに分散し、0.5 mLのgrowth factor-reduced Matrigel (BD Biosciences社製)と混合した。

前記混合した細胞液0.1 mL (がん細胞 1×10^6 個)を前記マウスの左鼠脛部に皮下接種した。

前記構造式(1)で表される化合物を静脈内に所定の期間投与し、皮下にできた腫瘍を切り出し、その重量を測定した。なお、前記構造式(1)で表される化合物の投与量は、投与日あたりの量として、 12.5 mg/kg とした。

また、腫瘍体積は、前記非特許文献1を参照し、以下の式から算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = (\text{長径} \times \text{短径}^2) / 2$$

なお、対照として、構造式(1)で表される化合物に代えて、生理食塩水を投与したもの(vehicle)も同様にして試験した。

[0115] <試験例2-1-2:ヒト胃がん細胞MK N-74及びヒト胃由来の正常間質細胞Hs738>

試験例2-1-1において、ヒト胃がん細胞MK N-74を単独で使用していた点を、ヒト胃がん細胞MK N-74及びヒト胃由来の正常間質細胞Hs738とした以外は、試験例2-1-1と同様にして試験した。

なお、細胞液、及びマウスへの細胞液の接種は、以下のように行った。

培養したヒト胃がん細胞MK N-74及びヒト胃由来の正常間質細胞Hs738のそれぞれについて、トリプシン処理し、培養ディッシュから剥がした。前記ヒト胃がん細胞MK N-74 (8×10^6 個)と、前記ヒト胃由来の正常間質細胞Hs738 (8×10^6 個)とを0.3 mLの10%FBSを含むDMEMに分散し、0.5 mLのgrowth factor-reduced Matrigel (BD Biosciences社製)と混合した。

前記混合した細胞液0.1 mL (がん細胞 1×10^6 個、及び間質細胞 1×10^6 個の混合) を前記マウスの左鼠脛部に皮下接種した。

[0116] <試験例 2-2-1 : ヒト大腸がん細胞 HCT-15 単独>

試験例 2-1-1 において、ヒト胃がん細胞 MKN-74 をヒト大腸がん細胞 HCT-15 に代え、また、構造式 (1) で表される化合物の投与量を 25 mg/kg としたものを追加した以外は、試験例 2-1-1 と同様にして試験した。

[0117] <試験例 2-2-2 : ヒト大腸がん細胞 HCT-15 及びヒト大腸由来の正常間質細胞 CCD-18Co>

試験例 2-1-2 において、ヒト胃がん細胞 MKN-74 をヒト大腸がん細胞 HCT-15 に代え、ヒト胃由来の正常間質細胞 Hs 738 をヒト大腸由来の正常間質細胞 CCD-18Co に代え、また、構造式 (1) で表される化合物の投与量を 25 mg/kg としたものを追加した以外は、試験例 2-1-2 と同様にして試験した。

[0118] 前記試験例 2 の結果を図 4 A から図 4 H に示した。

図 4 A は、前記試験例 2-1-1 における腫瘍体積の変化を示し、図 4 B は、前記試験例 2-1-1 における腫瘍重量 (腫瘍接種から 21 日目) を示し、図 4 C は、前記試験例 2-1-2 における腫瘍体積の変化を示し、図 4 D は、前記試験例 2-1-2 における腫瘍重量 (腫瘍接種から 21 日目) を示し、図 4 E は、前記試験例 2-2-1 における腫瘍体積の変化を示し、図 4 F は、前記試験例 2-2-1 における腫瘍重量 (腫瘍接種から 21 日目) を示し、図 4 G は、前記試験例 2-2-2 における腫瘍体積の変化を示し、図 4 H は、前記試験例 2-2-2 における腫瘍重量 (腫瘍接種から 21 日目) を示す。

図 4 A、図 4 C、図 4 E、及び図 4 G 中、「○」は、「vehicle」の結果を示し、「●」は、「構造式 (1) で表される化合物の投与量が 12.5 mg/kg 」の結果を示し、「■」は、「構造式 (1) で表される化合物の投与量が 25 mg/kg 」の結果を示す。また、図 4 A、図 4 C、図 4

E、及び図4 G中、「矢印」は、構造式(1)で表される化合物を投与した日を示す。

図4 B、図4 D、図4 F、及び図4 H中、「白」は、「vehicle」の結果を示し、「黒」は、「構造式(1)で表される化合物の投与量が12.5 mg/kg」の結果を示し、「グレー」は、「構造式(1)で表される化合物の投与量が25 mg/kg」の結果を示す。

図4 Aから図4 H中の値は、マウス5匹の平均値と標準偏差(SD)を表し、*は、 $P < 0.05$ 、**は、 $P < 0.01$ を示す。

[0119] 図4 Aから図4 Dに示されるように、ヒト胃癌細胞MKN-74単独、並びにヒト胃癌細胞MKN-74とヒト胃由来の正常間質細胞Hs738とを一緒に移植した腫瘍のいずれもが、構造式(1)で表される化合物 12.5 mg/kgの静脈内投与によって有意に抑制された。

また、図4 Eから図4 Fに示されるように、ヒト大腸がん細胞HCT-15単独、並びにヒト大腸がん細胞HCT-15と、ヒト大腸由来の正常間質細胞CCD-18Coとを一緒に移植した腫瘍のいずれもが、構造式(1)で表される化合物 25 mg/kgの静脈内投与によって有意に抑制された。

[0120] (試験例3：急性毒性試験)

ICRマウス(雌、4週齢、チャールズリバー社製)をSPF条件下にて飼育した。

評価サンプルとして、前記構造式(1)で表される化合物を静脈内投与し、2週間マウスを観察した。2週間の観察期間中、死亡あるいは重篤な毒性が認められた投与量の2分の1量を本実験における最大耐容量(MTD)とした。

また、比較として、前記CJ-13, 136を静脈内投与したもの、前記CJ-13, 217を腹腔内投与したものについても同様にして試験した。

[0121] 前記試験例3の結果、前記構造式(1)で表される化合物を静脈内投与した場合のMTDは50 mg/kg以上であることが分かった。

一方、前記C J - 1 3, 1 3 6を静脈内投与した場合のMTDは2. 5 m g / k gであり、前記C J - 1 3, 2 1 7を腹腔内投与した場合のMTDは3 m g / k gであった。

したがって、前記C J - 1 3, 1 3 6、及び前記C J - 1 3, 2 1 7は、前記構造式(1)で表される化合物よりも低濃度で胃がん細胞の増殖を阻害するものの、極めて毒性が強いことが分かった。

[0122] (試験例4：抗菌活性)

前記製造例1で得られた構造式(1)で表される化合物(Intervolin)の抗菌活性を以下のようにして試験した。

なお、比較として、クラリスロマイシン(Clarithromycin)、及びアンピシリン(ABPC)についても同様に試験した。

[0123] <試験例4-1：ヘリコバクター・ピロリ菌に対するMICの測定>

前記製造例1で得られた構造式(1)で表される化合物のヘリコバクター・ピロリ菌に対する最小発育阻害濃度(MIC)の測定を行った。

Helicobacter pylori JCM12093株、及びH. pylori JCM12095株を、HP培地(ブレインハートインフュージョンブロス培地(ベクトン・ディッキンソン社製)に10%ウシ胎仔血清(ライフテクノロジー社製)を添加)で37℃、微好気培養条件下(微好気条件(N₂:O₂:CO₂=85:5:10))で144時間静置培養した。培養終了後、培養液をHP培地で懸濁し、ヘリコバクター・ピロリ菌が2×10⁶CFU/mL~9×10⁶CFU/mLになるよう希釈した。

各試験サンプル(構造式(1)で表される化合物、クラリスロマイシン、アンピシリン)は、HP培地でそれぞれ256mg/Lに調製した。ここから、2倍段階希釈を行い、0.125mg/Lまで11段階の希釈を行った。

前記各濃度の試験サンプルを含むHP培地50μL/ウェルに、前記の希釈した各菌液をそれぞれ50μL/ウェル添加し、37℃、微好気培養条件下(微好気条件(N₂:O₂:CO₂=85:5:10))で144時間静置培

養した。

培養終了後、各菌の増殖の有無を濁度にて目視して判定し、各菌株のMICを求めた。結果を表3に示した。

[0124] <試験例4-2：黄色ブドウ球菌及び大腸菌に対するMICの測定>

前記製造例1で得られた構造式(1)で表される化合物の黄色ブドウ球菌及び大腸菌に対する最小発育阻害濃度(MIC)の測定を行った。

Staphylococcus aureus FDA209P株、及びEscherichia coli K-12株を、普通ブイヨン培地(ポリペプトン(日本製薬社製)1%、細菌用魚エキス(極東製薬工業社製)1%、塩化ナトリウム0.2%)で、37℃で一晩振盪培養した。培養終了後、普通ブイヨン培地で、各細菌が 2×10^6 CFU/mL \sim 9×10^6 CFU/mLになるよう希釈した。

各試験サンプル(構造式(1)で表される化合物、クラリスロマイシン、アンピシリン)は、普通ブイヨン培地でそれぞれ256 mg/Lに調製した。ここから、2倍段階希釈を行い、0.0078 mg/Lまで15段階の希釈を行った。

前記各濃度の試験サンプルを含む普通ブイヨン培地50 μ L/ウェルに、前記の希釈した各菌液をそれぞれ50 μ L/ウェル添加し、37℃で一晩静置培養した。

培養終了後、各菌の増殖の有無を濁度にて目視して判定し、各菌株のMICを求めた。結果を表3に示した。

[0125] <試験例4-3：腸球菌に対するMICの測定>

前記製造例1で得られた構造式(1)で表される化合物の腸球菌に対する最小発育阻害濃度(MIC)の測定を行った。

Enterococcus faecalis JCM5803株を、ハートインフュージョンブロス培地(ベクトン・ディッキンソン社製)で、37℃で一晩振盪培養した。培養終了後、ハートインフュージョンブロス培地で希釈し、各細菌が 2×10^4 CFU/mL \sim 9×10^4 CFU/mLになる

よう希釈した。

各試験サンプル（構造式（1）で表される化合物、クラリスロマイシン、アンピシリン）は、ハートインフュージョンブロス培地でそれぞれ256 mg/Lに調製した。ここから、2倍段階希釈を行い、0.125 mg/Lまで11段階の希釈を行った。

前記各濃度の試験サンプルを含むハートインフュージョンブロス培地50 μ L/ウェルに、前記の希釈した各菌液をそれぞれ50 μ L/ウェル添加し、37°Cで18時間静置培養した。

培養終了後、菌の増殖の有無を濁度にて目視して判定し、菌株のMICを求めた。結果を表3に示した。

[0126] <試験例4-4：インフルエンザ菌に対するMICの測定>

前記製造例1で得られた構造式（1）で表される化合物のインフルエンザ菌に対する最小発育阻害濃度（MIC）の測定を行った。

Haemophilus influenzae T-196株、及びH. influenzae ARD476株を、HI培地（Muller Hinton培地（ベクトン・ディッキンソン社製）に5%フィルズエンリッチメント（ベクトン・ディッキンソン社製）を添加）で、37°C、5%炭酸ガス含有好気条件下で一晩静置培養した。

培養終了後、培養液をHI培地で懸濁し、各インフルエンザ菌が 2×10^6 CFU/mL $\sim 9 \times 10^6$ CFU/mLになるよう希釈した。

各試験サンプル（構造式（1）で表される化合物、クラリスロマイシン、アンピシリン）は、HI培地でそれぞれ256 mg/Lに調製した。ここから、2倍段階希釈を行い、0.125 mg/Lまで11段階の希釈を行った。

前記各濃度の試験サンプルを含むHI培地50 μ L/ウェルに、前記の希釈した各菌液をそれぞれ50 μ L/ウェル添加し、37°C、5%炭酸ガス含有好気条件下で18時間静置培養した。

培養終了後、各菌の増殖の有無を濁度にて目視して判定し、各菌株のMI

Cを求めた。結果を表3に示した。

[0127] [表3]

MIC ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Helicobacter pylori</i> JCM 12093	<i>H. pylori</i> JCM 12095	<i>Staphylococcus aureus</i> FDA209P	<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803	<i>Escherichia coli</i> K-12	<i>Haemophilus influenzae</i> T-196	<i>H. influenzae</i> ARD476
Intervenolin	0.016	0.008	64	>128	>128	64	64
Clarithromycin	0.008	0.008	<0.125	0.5	16	8	4
ABPC	0.25	0.125	<0.125	0.5	4	0.5	64

[0128] 表3に示されるように、構造式(1)で表される化合物(Intervenolin)は、*Helicobacter pylori* JCM12093株、JCM12095株に対して、MICが、それぞれ0.016 $\mu\text{g/ml}$ 、0.008 $\mu\text{g/ml}$ と強い抗菌活性を示したが、他の一般的な感染症原因菌に対しては弱い抗菌活性しか示さなかった。

[0129] (製造例2)

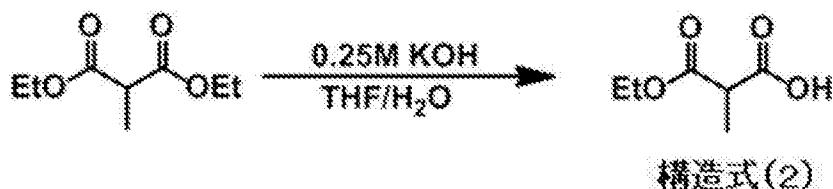
<構造式(1)で表される化合物の製造>

以下のようにして、化学合成により、前記構造式(1)で表される化合物を製造した。

[0130] -構造式(2)で表される化合物の製造-

メチルマロン酸ジエチル(22.0g、126mmol)を、テトラヒドロフラン(以下、「THF」と称することがある)140mLと、水150mLとの混合溶媒に溶解させ、0.25Mの水酸化カリウム水溶液628mLを氷浴下で滴下した。滴下終了後、更に室温下で2時間攪拌させた。反応終了後、1N塩酸を加えpHを3に調整した。酢酸エチルで抽出し、有機層を芒硝乾燥させ溶媒を留去した。得られた残渣(17.8g)は精製することなく次の反応に使用した。

[化16]



前記反応式中、「Et」は、エチル基を表す。

[0131] —物理化学的性質—

前記構造式(2)で表される化合物の物理化学的性質としては、次の通りであった。

(1) 外観 : 無色油状物

(2) 分子式 : $C_6H_{10}O_4$

(3) 高分解能質量分析(HRESI-MS) (m/z) :

実験値 169.0471 ($M+Na$)⁺

計算値 169.0471 ($C_6H_{10}O_4Na$ として)

(4) 赤外線吸収スペクトル :

KBr錠剤法で測定した赤外線吸収のピークは、以下の通りであった。

ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3258-3251, 2990, 2946, 1738, 1620

(5) プロトン核磁気共鳴スペクトル(400MHz, $CDCl_3$) :

δ = 1.26 (3H, t, $J=7.1$), 1.43 (3H, d, $J=7.1$), 3.46 (1H, q, $J=7.3$), 4.20 (2H, q, $J=7.3$), 10.61 (1H, br s)

(6) 炭素13核磁気共鳴スペクトル(100MHz, $CDCl_3$) :

δ = 13.47, 13.92, 45.89, 61.71, 169.85, 175.88

[0132] —構造式(3)で表される化合物の製造—

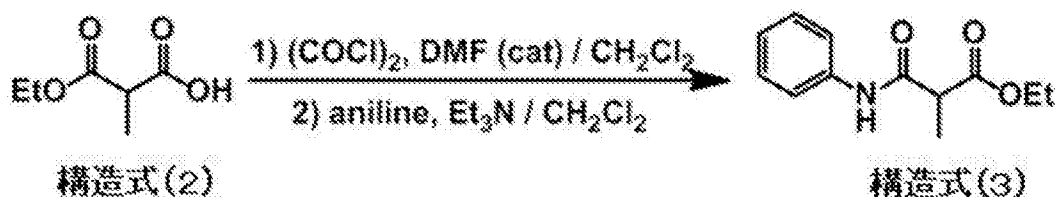
前記構造式(2)で表される化合物(17.0g、116mmol)を塩化メチレン200mLに溶解させ、氷浴下で塩化オキサリル(19.6mL、232mmol)を滴下し、更にN,N-ジメチルホウムアミド(以下、「DMF」と称することがある)を数滴加えた。室温下で3時間攪拌させた後、溶媒を留去した。

得られた残渣(13.0g)を塩化メチレン50mLに溶解させ、アニリ

ン (6.6 mL、71.8 mmol)、トリエチルアミン (13.4 mL、86.1 mmol) を塩化メチレン 100 mL に溶解させたものに氷浴下で滴下した。更に室温下で 6 時間攪拌させた後、0.1 N 塩酸 50 mL を加えて反応を停止させ、塩化メチレンで抽出後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗浄した。合わせた有機層を芒硝乾燥し、溶媒を留去した。

得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1) で精製し、構造式 (3) で表される化合物 (11.3 g、82%) を 2 工程で得た。

[化17]



前記反応式中、「Et」は、エチル基を表す。

[0133] — 物理化学的性質 —

前記構造式 (3) で表される化合物の物理化学的性質としては、次の通りであった。

- (1) 外観 : 黄色粉体
- (2) 融点 : 62°C ~ 63°C
- (3) 分子式 : $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}$
- (4) 高分解能質量分析 (HRESI-MS) (m/z) :
 実験値 244.0943 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺
 計算値 244.0944 ($\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{NNa}$ として)
- (5) 赤外線吸収スペクトル :

KBr錠剤法で測定した赤外線吸収のピークは、以下の通りであった。

ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3257, 2985, 2890, 1745, 1654, 749, 691

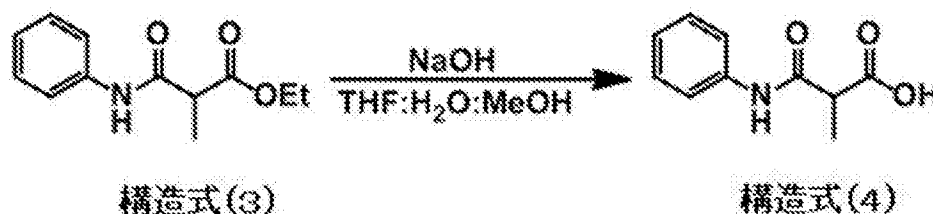
(6) プロトン核磁気共鳴スペクトル (400MHz, CDCl_3) :
 $\delta = 1.30$ (3H, t, $J=7.3$), 1.54 (3H, d, $J=7.3$), 3.44 (1H, q, $J=7.3$), 4.25 (2H, q, $J=7.3$), 7.11 (1H, t, $J=7.5$), 7.32 (2H, t, $J=7.5$), 7.53 (1H, t, $J=7.5$), 8.64 (1H, br)

(7) 炭素13核磁気共鳴スペクトル (100MHz, CDCl_3) :
 $\delta = 14.04$, 15.46 , 47.43 , 61.92 , 119.87 , 124.44 , 128.97 , 137.58 , 166.94 , 172.84

[0134] ー構造式(4)で表される化合物の製造ー

前記構造式(3)で表される化合物(15.2g、68.7mmol)をTHF:H₂O:メタノール(4:1:1)の混合溶媒200mLに溶解させ、水酸化ナトリウム(3.30g、82.4mmol)を加えた。室温下で1時間攪拌させた後、1N塩酸を加えpHを4に調整し、酢酸エチル(200mL)で抽出した。得られた有機層は、芒硝乾燥後、溶媒を留去し、構造式(4)で表される化合物(12.6g、95%)を得た。

[化18]



前記反応式中、「Et」は、エチル基を表す。

[0135] ー物理化学的性質ー

前記構造式(4)で表される化合物の物理化学的性質としては、次の通りであった。

(1) 外観 : 白色粉体

(2) 融点 : 153°C~155°C

(3) 分子式 : $C_{10}H_{11}O_3N$

(4) 高分解能質量分析 (HRESI-MS) (m/z) :

実験値 216.0633 ($M+Na$)⁺

計算値 216.0631 ($C_{10}H_{11}O_3NNa$ として)

(5) 赤外線吸収スペクトル :

KBr錠剤法で測定した赤外線吸収のピークは、以下の通りであった。

ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3327, 3287-2555,
2985, 2941, 1742, 1646, 756, 693

(6) プロトン核磁気共鳴スペクトル (400MHz, $DMSO-d_6$)

:

δ = 1.21 (3H, d, $J=7.1$), 3.42 (1H, q,
 $J=7.1$), 6.99 (1H, t, $J=7.5$), 7.25 (2H,
t, $J=7.5$), 7.55 (1H, t, $J=7.5$), 10.19 (1
H, s)

(7) 炭素13核磁気共鳴スペクトル (100MHz, $DMSO-d_6$)

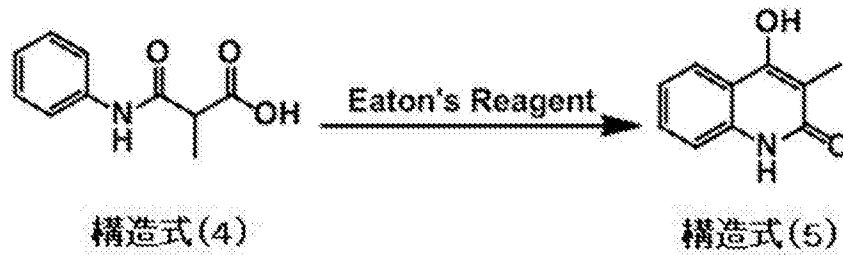
:

δ = 14.19, 47.34, 119.27, 123.47,
128.94, 139.34, 168.97, 172.34

[0136] ー構造式(5)で表される化合物の製造ー

前記構造式(4)で表される化合物(12.6g、65.2mmol)と Eaton's試薬(80mL)の混合物を80°Cで2.5時間攪拌した。反応溶液を室温まで戻し、氷浴下、10%炭酸水素ナトリウム水溶液をpHが7になるまで加えた。生成した白色の固体を吸引濾過し、更に10%炭酸水素ナトリウム水溶液、水で洗浄し、構造式(5)で表される化合物(10.2g、89%)を得た。

[化19]



[0137] — 物理化学的性質 —

前記構造式(5)で表される化合物の物理化学的性質としては、次の通りであった。

(1) 外観 : 白色粉体

(2) 融点 : $>260^{\circ}\text{C}$

(3) 分子式 : $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$

(4) 高分解能質量分析 (HRESI-MS) (m/z) :

実験値 176.0705 (M+H)⁺

計算値 176.0706 ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}$ として)

(5) 赤外線吸収スペクトル :

KBr錠剤法で測定した赤外線吸収のピークは、以下の通りであった。

ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3148-2520, 1644, 1611, 1502, 1478, 747

(6) プロトン核磁気共鳴スペクトル (400MHz, DMSO-d_6)

:

$\delta =$ 1.92 (3H, s), 7.03 (1H, ddd, $J=8.0, 7.1, 0.8$), 7.17 (1H, brd, $J=8.0$), 7.33 (1H, ddd, $J=8.2, 7.1, 1.3$), 7.86 (1H, dd, $J=8.2, 0.8$), 11.04 (1H, br)

(7) 炭素13核磁気共鳴スペクトル (100MHz, DMSO-d_6)

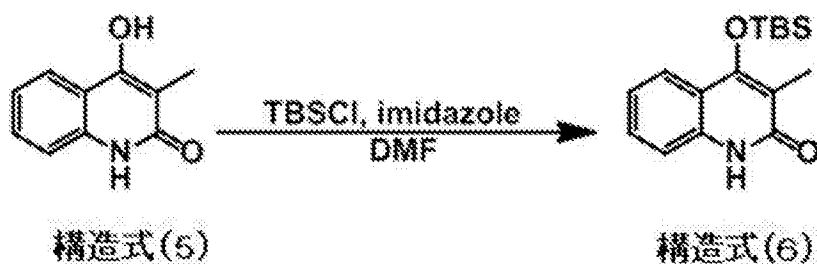
:

$\delta = 9.76, 105.83, 114.90, 117.11$
 $, 120.78, 123.17, 129.42, 137.59,$
 $160.21, 164.44$

[0138] —構造式(6)で表される化合物の製造—

アルゴン雰囲気下、前記構造式(5)で表される化合物(750mg、4.28mmol)をDMF(20mL)に溶解させ、イミダゾール(350mg、5.13mmol)を加えた。更に氷浴下、tert-ブチルジメチルクロロシラン(以下、「TBSCl」と称することがある。710mg、4.71mmol)を加え、室温下で2時間攪拌させた。水を加えて反応を停止させ、酢酸エチルで抽出し有機層を分離した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗浄した後、有機層を芒硝乾燥し溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン：酢酸エチル=1：1)で精製し、構造式(6)で表される化合物(1.1g、89%)を得た。

[化20]



[0139] —物理化学的性質—

前記構造式(6)で表される化合物の物理化学的性質としては、次の通りであった。

- (1) 外観 : 無色結晶
- (2) 融点 : 177℃~178℃
- (3) 分子式 : $C_{16}H_{23}O_2NSi$
- (4) 高分解能質量分析(HRESI-MS)(m/z) :
 実験値 290.1574 (M+H)⁺

計算値 290.1571 ($C_{16}H_{24}O_2NSi$ として)

(5) 赤外線吸収スペクトル :

KBr錠剤法で測定した赤外線吸収のピークは、以下の通りであった。

ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3057, 2955, 1654, 1609, 1572, 1434, 1159, 1032, 826, 812, 751, 697

(6) プロトン核磁気共鳴スペクトル (400MHz, $CDCl_3$) :

$\delta = 0.22$ (6H, s), 1.11 (9H, s), 2.18 (3H, s), 7.17 (1H, ddd, $J=8.2, 7.1, 1.1$), 7.39 (1H, dd, $J=8.2, 1.1$), 7.45 (1H, ddd, $J=8.2, 7.1, 1.4$), 7.73 (1H, dd, $J=8.2, 1.4$), 11.77 (1H, br)

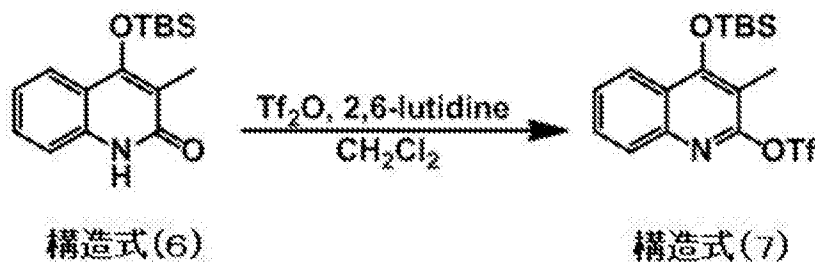
(7) 炭素13核磁気共鳴スペクトル (100MHz, $CDCl_3$) :

$\delta = -3.16, 11.09, 18.68, 25.92, 114.86, 115.70, 118.10, 121.55, 123.26, 129.69, 136.87, 157.39, 166.20$

[0140] ー構造式 (7) で表される化合物の製造ー

アルゴン雰囲気下、前記構造式 (6) で表される化合物 (450mg、1.55mmol) を塩化メチレン (5mL) に溶解させ、2,6-ルチジン (0.36mL、3.1mmol) を加えた。更に氷冷下、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (0.38mL、2.33mmol) を滴下した。室温下で1時間攪拌させた後、0.1N塩酸で反応を停止させ、塩化メチレンで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗浄した後、乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=5:1) で精製し、構造式 (7) で表される化合物 (790mg、92%) を得た。

[化21]



[0141] — 物理化学的性質 —

前記構造式(7)で表される化合物の物理化学的性質としては、次の通りであった。

- (1) 外観 : 白色粉末
- (2) 融点 : 101℃~102℃
- (3) 分子式 : $C_{17}H_{22}O_4NF_3SSi$
- (4) 高分解能質量分析 (HRESI-MS) (m/z) :
- 実験値 422.1062 ($M+H$)⁺
- 計算値 422.1064 ($C_{17}H_{23}O_4NF_3SSi$ として)
- (5) 赤外線吸収スペクトル :

KBr錠剤法で測定した赤外線吸収のピークは、以下の通りであった。

ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 2960, 2936, 1605, 1571, 1501, 1416, 1199, 1134, 1047, 895, 823, 808, 766, 664, 601

- (6) プロトン核磁気共鳴スペクトル (600MHz, $CDCl_3$) :
- δ = 0.24 (6H, s), 1.13 (9H, s), 2.32 (3H, s), 7.52 (1H, ddd, $J=8.2, 7.5, 1.0$), 7.68 (1H, ddd, $J=8.2, 7.5, 1.4$), 7.93 (1H, brd, $J=8.2$), 7.98 (1H, brd, $J=8.2$)

- (7) 炭素13核磁気共鳴スペクトル (150MHz, $CDCl_3$) :

実験値 296.2010 (M+H)⁺

計算値 296.2009 (C₂₀H₂₆ONとして)

(5) 赤外線吸収スペクトル :

KBr錠剤法で測定した赤外線吸収のピークは、以下の通りであった。

ν_{\max} (KBr) cm⁻¹ : 2921, 1638, 1607, 1590, 1554, 1497, 1475, 1445, 1392, 1358, 1257, 998, 757, 692, 608, 566, 431

(6) プロトン核磁気共鳴スペクトル (400MHz, CDCl₃) :

δ = 1.60 (3H, s), 1.69 (6H, s), 2.12 (4H, m), 2.16 (3H, s), 3.50 (2H, d, J=7.1), 5.09 (1H, m), 5.31 (1H, t, J=6.6), 7.26 (1H, ddd, J=8.2, 7.1, 0.9), 7.35 (1H, brd, J=8.2), 7.50 (1H, ddd, J=8.2, 7.1, 1.4), 8.36 (1H, dd, J=8.2, 1.4), 9.49 (1H, br)

(7) 炭素13核磁気共鳴スペクトル (100MHz, CDCl₃) :

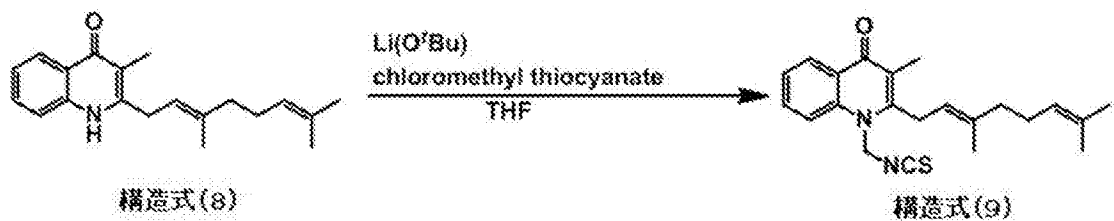
δ = 10.38, 16.41, 17.77, 25.76, 26.37, 31.01, 39.55, 115.45, 117.08, 117.20, 123.01, 123.50, 123.75, 126.13, 131.01, 132.26, 138.71, 142.00, 147.25, 177.90

[0144] ー構造式(9)で表される化合物の製造ー

アルゴン雰囲気下、前記構造式(8)で表される化合物(940mg、3.19mmol)をTHF(6mL)に溶解させ、リチウムt-ブトキシドのTHF 1M溶液(3.56mL、3.56mmol)を加え室温下で20分攪拌させた。そこへ氷冷下、チオシアン酸クロロメチル(0.93mL

、 11.9 mmol) を滴下し、更に室温下で3時間攪拌させた。食塩水を加えて反応を停止させ、酢酸エチルで抽出した。有機層を芒硝乾燥後、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝3：1）で精製し、構造式（9）で表される化合物（592 mg、51%）を得た。

[化23]



[0145] — 物理化学的性質 —

前記構造式（9）で表される化合物の物理化学的性質としては、次の通りであった。

- (1) 外観 : 黄色油状物
- (2) 分子式 : $C_{22}H_{26}O_2N_2S$
- (3) 高分解能質量分析 (HRESI-MS) (m/z) :
 実験値 367.1656 ($M+Na$)⁺
 計算値 367.1658 ($C_{22}H_{26}O_2N_2NaS$ として)
- (4) 赤外線吸収スペクトル :

KBr錠剤法で測定した赤外線吸収のピークは、以下の通りであった。

ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 2921, 2029, 1617, 1598, 1553, 1487, 1372, 1278, 1096, 982, 759, 692, 560, 436

- (5) プロトン核磁気共鳴スペクトル (600MHz, $CDCl_3$) :
 δ = 1.59 (3H, s), 1.66 (3H, s), 1.83 (3H, s), 2.07–2.14 (4H, m), 2.21 (3H, s), 3.59 (2H, d, $J=5.8$), 5.03 (1H, m), 5

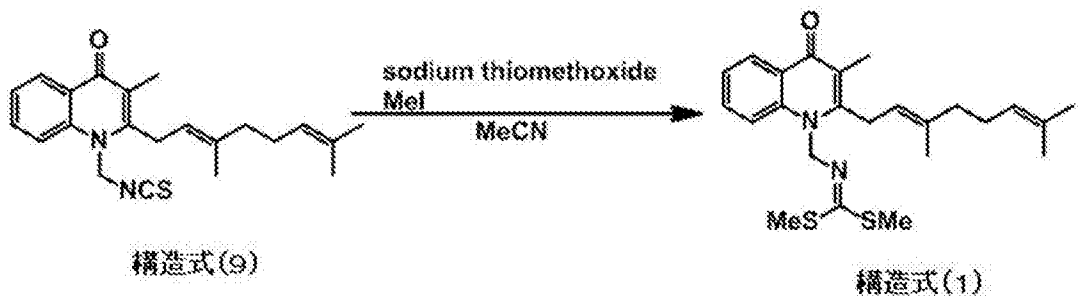
. 09 (1H, t, J=5.1), 5.66 (2H, s), 7.39 (1H, dd, J=8.3, 7.2), 7.45 (1H, d, J=8.3), 7.68 (1H, ddd, J=8.2, 7.2, 1.4), 8.45 (1H, dd, J=8.2, 1.4)

(6) 炭素13核磁気共鳴スペクトル (150MHz, CDCl₃) :
 $\delta = 11.41, 16.64, 17.74, 25.72, 26.32, 30.00, 39.45, 56.23, 114.22, 117.87, 118.53, 123.53, 123.61, 124.65, 127.45, 132.07, 132.40, 140.04, 140.32, 141.77, 148.58, 177.78$

[0146] ー構造式(1)で表される化合物の製造ー

前記構造式(9)で表される化合物(590mg、1.61mmol)とナトリウムチオメトキシド(124mg、1.77mmol)の混合物にアセトニトリル(10mL)を加え室温下で10分間攪拌した。ヨードメタン(1.3mL、3.22mmol)を加えて更に室温下で、20分間攪拌させた。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させ、酢酸エチルで抽出した。有機層を芒硝乾燥後、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=3:1)で精製し、構造式(1)で表される化合物(292mg、42%)を得た。

[化24]



前記反応式中、「Me」は、メチル基を表す。

[0147] ー物理化学的性質ー

前記構造式(1)で表される化合物の物理化学的性質としては、次の通りであった。

(1) 外観 : 淡黄色油状物

(2) 分子式 : $C_{24}H_{32}N_2OS_2$

(3) 高分解能質量分析(HRESI-MS) (m/z) :

実験値 451.1848 (M+Na)⁺

計算値 451.1848 ($C_{24}H_{32}N_2OS_2Na$ として)

(4) 赤外線吸収スペクトル :

KBr錠剤法で測定した赤外線吸収のピークは、以下の通りであった。

ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 2964, 2923, 1617,
1597, 1562, 1371, 1283, 1192, 916,
758, 696

(5) プロトン核磁気共鳴スペクトル(600MHz, $CDCl_3$) :

δ = 1.58 (3H, s), 1.65 (3H, s), 1.73 (3H, s), 2.03-2.11 (4H, m), 2.23 (3H, s), 2.30 (3H, s), 2.69 (3H, s), 3.53 (2H, d, $J=5.8$), 5.05 (1H, m), 5.10 (1H, t, $J=6.5$), 5.55 (2H, s), 7.27 (1H, d, $J=8.6$), 7.31 (1H, t, $J=8.6, 7.1$), 7.55 (1H, d d, $J=8.6, 7.1, 1.7$), 8.47 (1H, d d, $J=8.3, 1.7$)

(6) 炭素13核磁気共鳴スペクトル(150MHz, $CDCl_3$) :

δ = 11.37, 14.79, 15.03, 16.55,
17.70, 25.67, 26.39, 30.02, 39.49,
63.86, 115.56, 117.35, 118.47, 122.75,
123.70, 124.83, 126.84, 131.33,
131.82, 138.99, 141.10, 150.46

, 161.18, 177.63

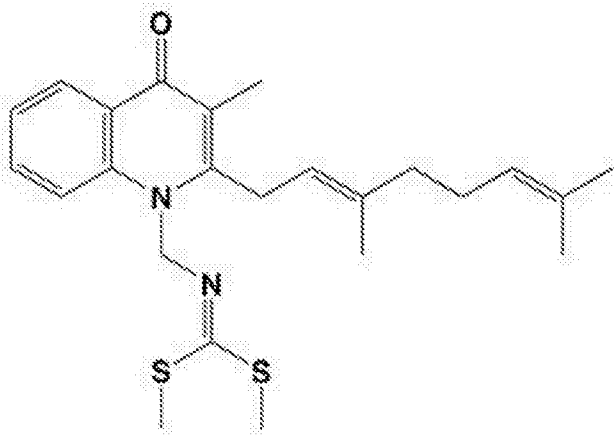
本製造例2で得られた前記構造式(1)で表される化合物の物理化学的性質は、前記製造例1で得られた前記構造式(1)で表される化合物の物理化学的性質と同様であった。

したがって、前記構造式(1)で表される化合物を化学合成により製造できることが示された。

[0148] 本発明の態様としては、例えば、以下のものなどが挙げられる。

<1> 下記構造式(1)で表されることを特徴とする化合物である。

[化25]



構造式(1)

<2> 前記<1>に記載の化合物の製造方法であって、

ノカルディア (Nocardia) 属に属し、前記<1>に記載の化合物を生産する能力を有する微生物を培養する培養工程と、

前記培養工程で得られた培養物から前記<1>に記載の化合物を採取する採取工程とを含むことを特徴とする化合物の製造方法である。

<3> ノカルディア (Nocardia) 属に属し、前記<1>に記載の化合物を生産する能力を有する微生物が、受託番号NITE BP-01464のノカルディア エスピー (Nocardia sp.) ML96-86F2株である前記<2>に記載の化合物の製造方法である。

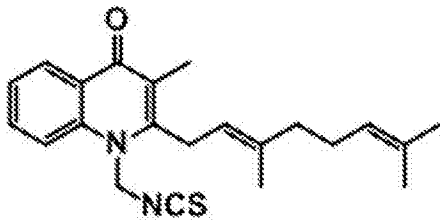
<4> ノカルディア (Nocardia) 属に属し、前記<1>に記載

の化合物を生産する能力を有することを特徴とする微生物である。

<5> 受託番号NITE BP-01464のノカルディア エスピー (Nocardia sp.) ML96-86F2株である前記<4>に記載の微生物である。

<6> 前記<1>に記載の化合物の製造方法であって、アセトニトリルの存在下で、下記構造式(9)で表される化合物と、ナトリウムチオメトキシドとを反応させた後、前記反応物と、メチル化剤とを反応させることを特徴とする化合物の製造方法である。

[化26]



構造式(9)

<7> 前記<1>に記載の化合物を含むことを特徴とする化合物含有組成物である。

<8> 前記<1>に記載の化合物を含むことを特徴とする抗がん剤である。

<9> 前記<1>に記載の化合物を含むことを特徴とする抗ヘリコバクター・ピロリ剤である。

<10> がんを予防又は治療するための方法であって、個体に、前記<8>に記載の抗がん剤を投与することを特徴とする方法である。

<11> ヘリコバクター・ピロリによる感染症を予防又は治療するための方法であって、個体に、前記<9>に記載の抗ヘリコバクター・ピロリ剤を投与することを特徴とする方法である。

<12> ヘリコバクター・ピロリに起因する胃及び十二指腸障害を予防又は治療するための方法であって、個体に、前記<9>に記載の抗ヘリコバ

クター・ピロリ剤を投与することを特徴とする方法である。

受託番号

[0149] N I T E B P - 0 1 4 6 4

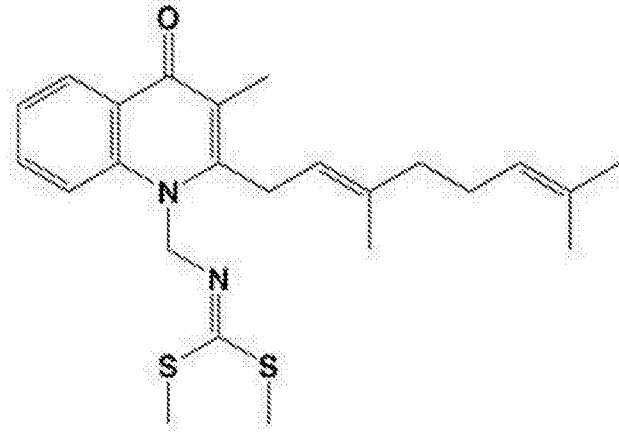
産業上の利用可能性

[0150] 本発明の構造式（１）で表される化合物は、優れた抗がん作用、若しくは、優れた抗ヘリコバクター・ピロリ活性を有し、安全性の高い化合物であるため、医薬組成物、抗がん剤、抗ヘリコバクター・ピロリ剤などの有効成分として好適に利用可能である。

請求の範囲

[請求項1] 下記構造式(1)で表されることを特徴とする化合物。

[化1]

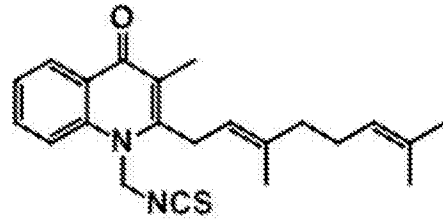


構造式(1)

- [請求項2] 請求項1に記載の化合物の製造方法であって、
ノカルディア (Nocardia) 属に属し、請求項1に記載の化合物を生産する能力を有する微生物を培養する培養工程と、
前記培養工程で得られた培養物から請求項1に記載の化合物を採取する採取工程とを含むことを特徴とする化合物の製造方法。
- [請求項3] ノカルディア (Nocardia) 属に属し、請求項1に記載の化合物を生産する能力を有する微生物が、受託番号NITE BP-01464のノカルディア エスピー (Nocardia sp.) ML96-86F2株である請求項2に記載の化合物の製造方法。
- [請求項4] ノカルディア (Nocardia) 属に属し、請求項1に記載の化合物を生産する能力を有することを特徴とする微生物。
- [請求項5] 受託番号NITE BP-01464のノカルディア エスピー (Nocardia sp.) ML96-86F2株である請求項4に記載の微生物。
- [請求項6] 請求項1に記載の化合物の製造方法であって、

アセトニトリルの存在下で、下記構造式（9）で表される化合物と、ナトリウムチオメトキシドとを反応させた後、前記反応物と、メチル化剤とを反応させることを特徴とする化合物の製造方法。

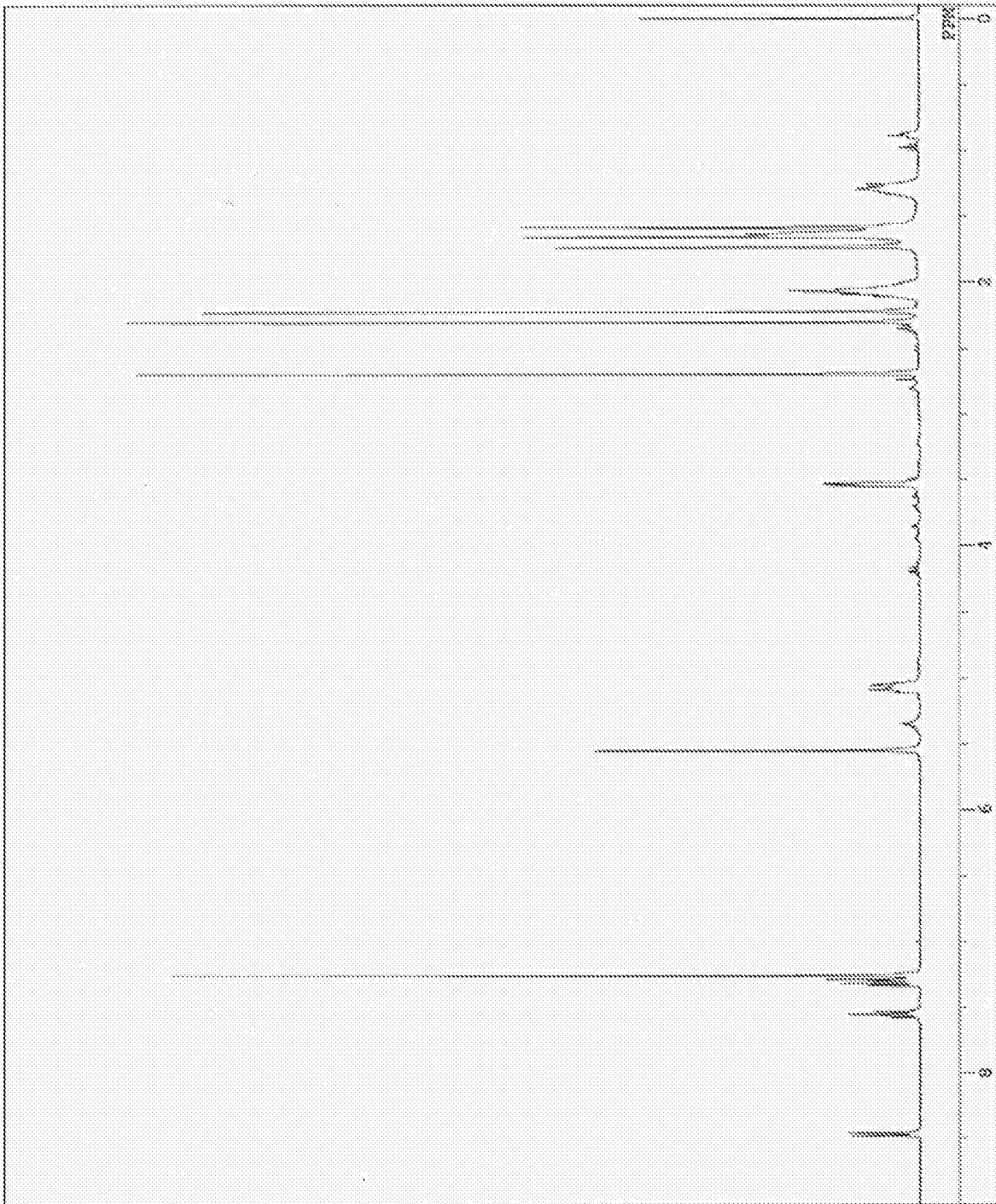
[化2]



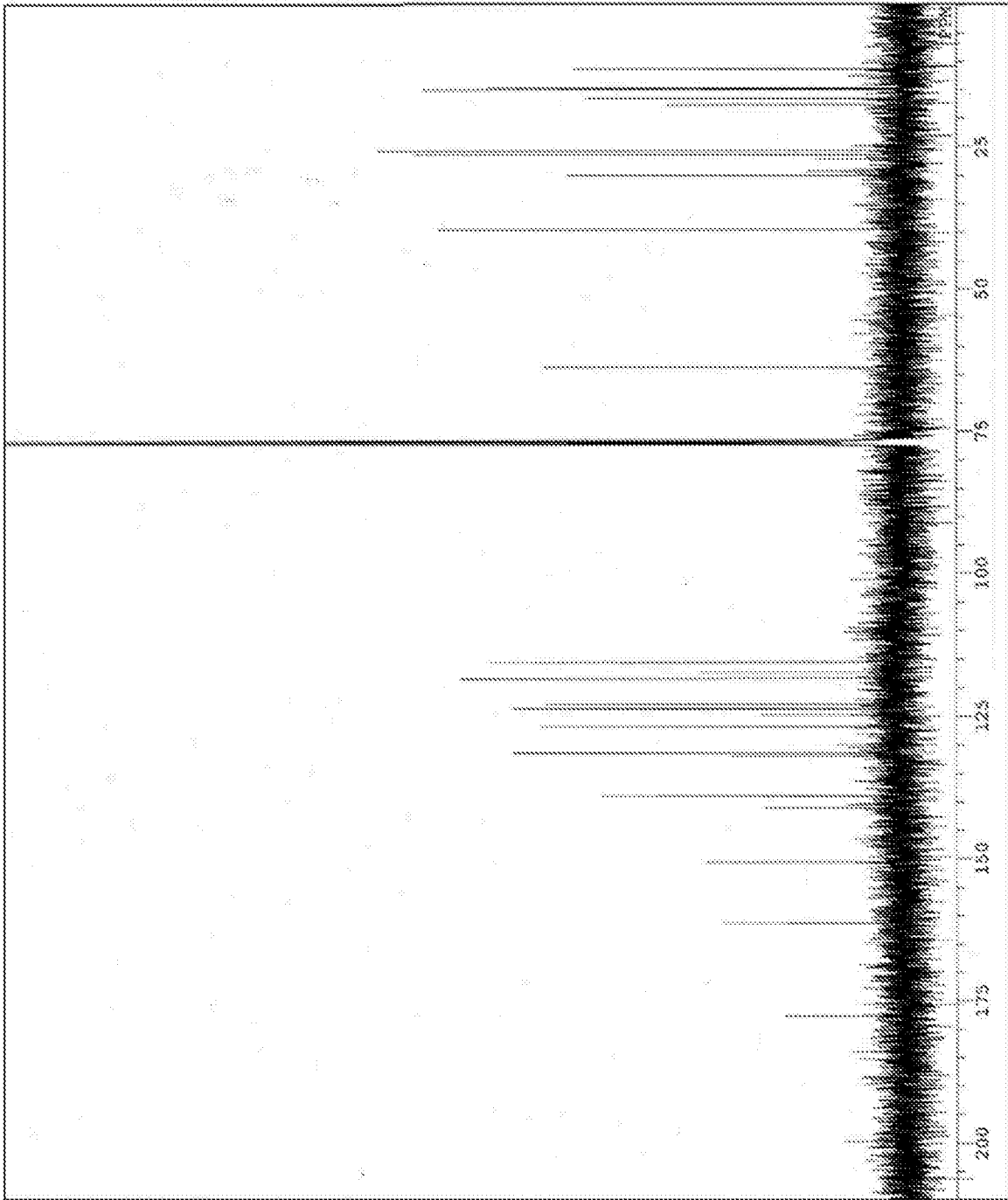
構造式(9)


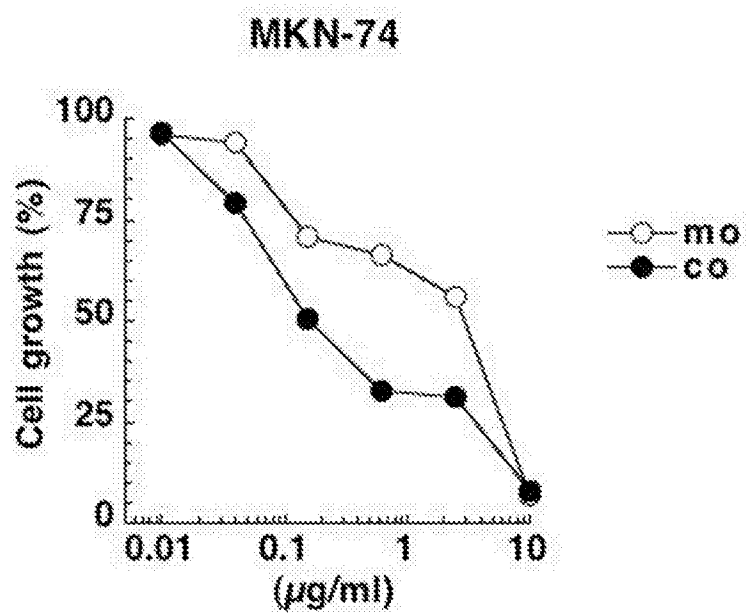
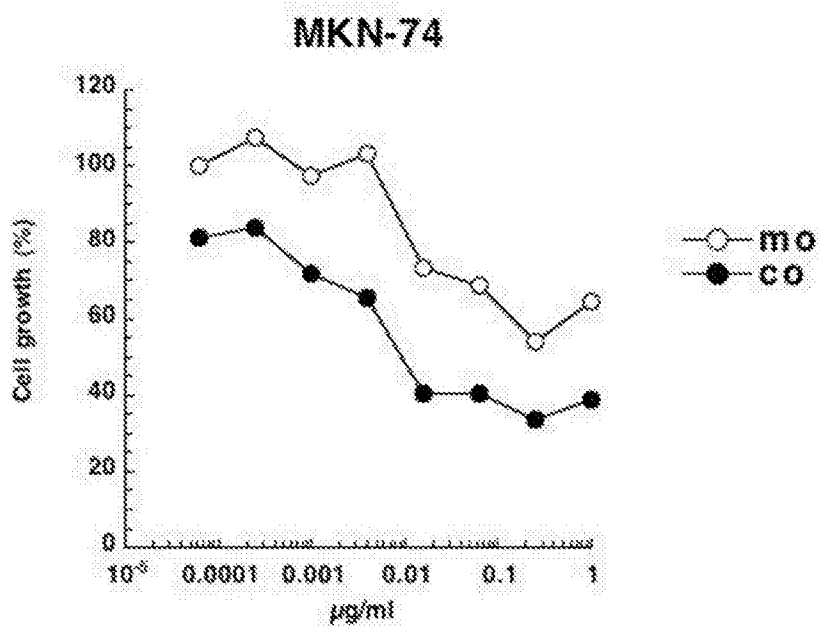
- [請求項7] 請求項1に記載の化合物を含むことを特徴とする化合物含有組成物。
- [請求項8] 請求項1に記載の化合物を含むことを特徴とする抗がん剤。
- [請求項9] 請求項1に記載の化合物を含むことを特徴とする抗ヘリコバクター・ピロリ剤。

[図1]

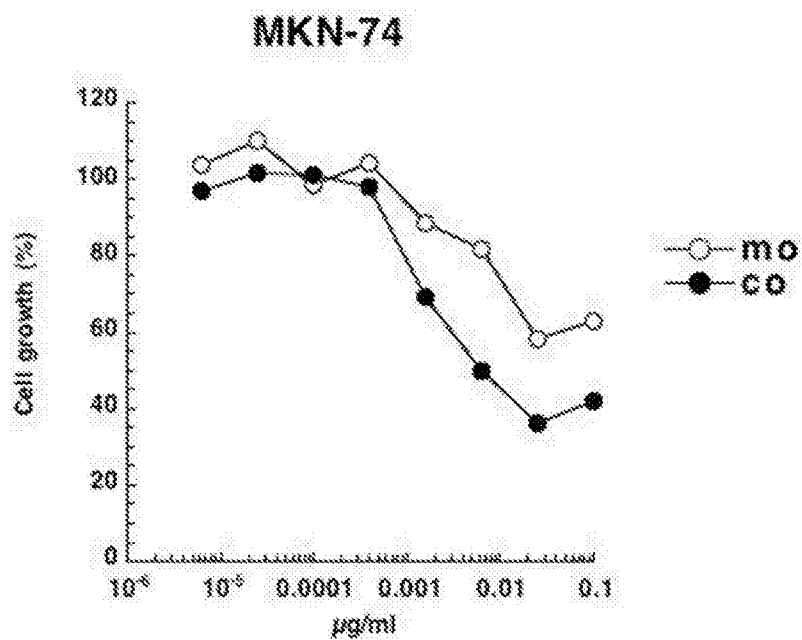


[図2]

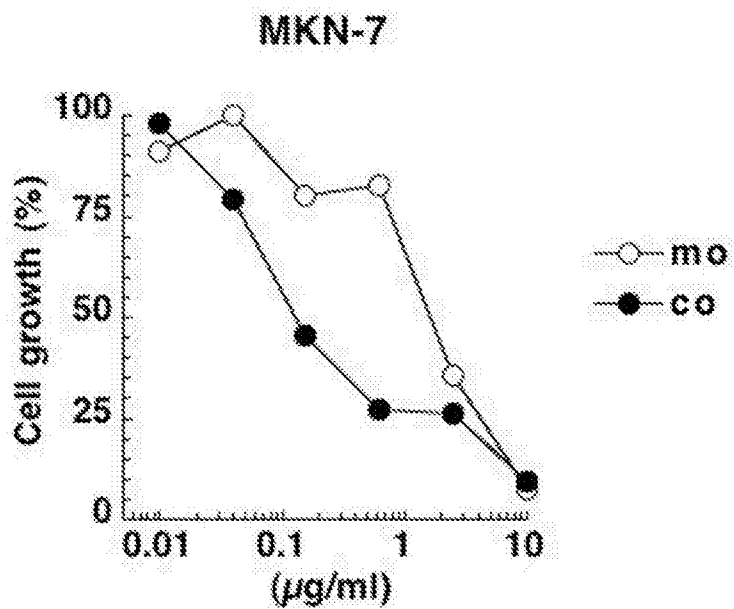


[3A][3B]

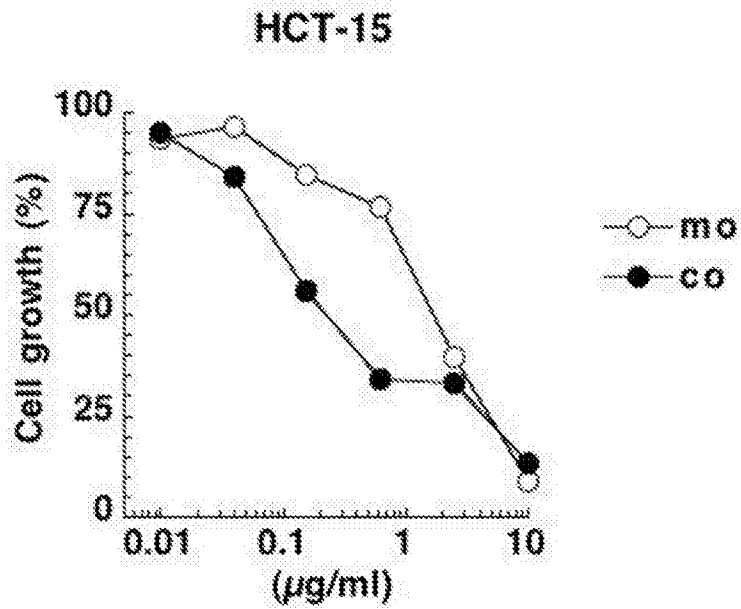
[図3C]



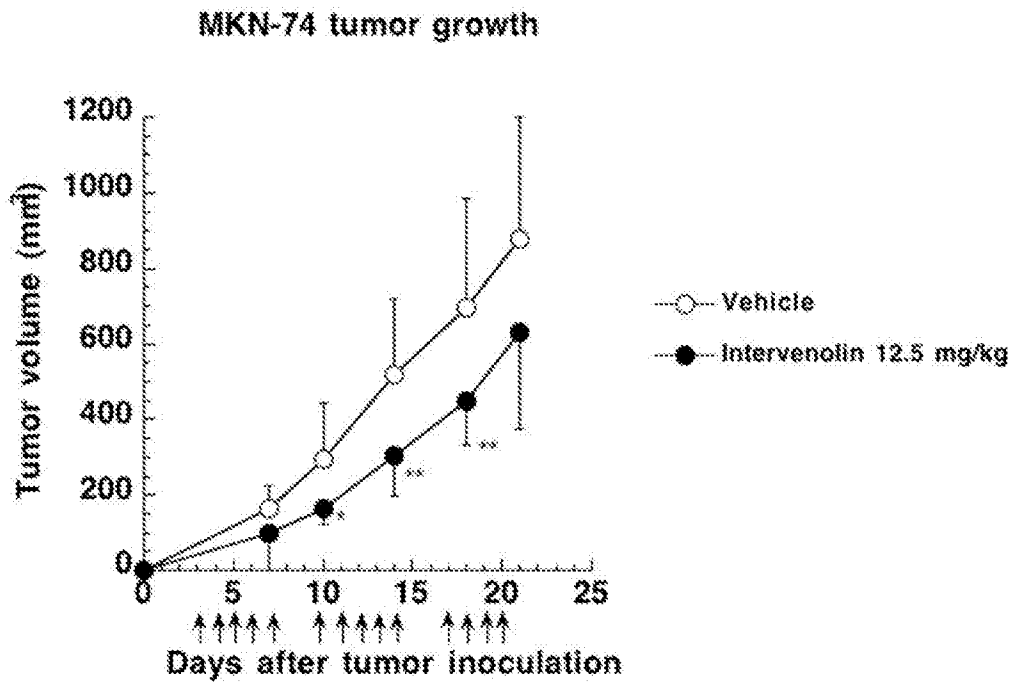
[図3D]

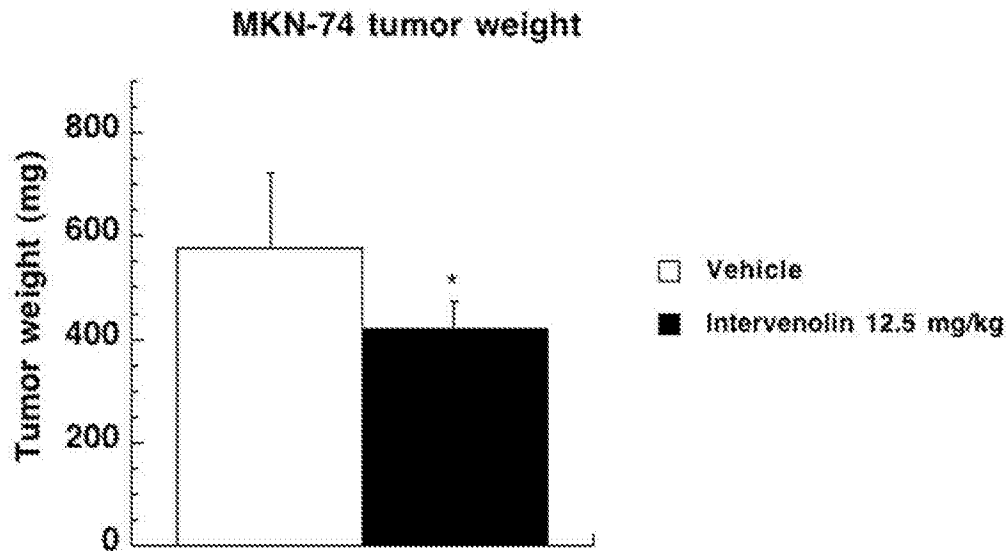
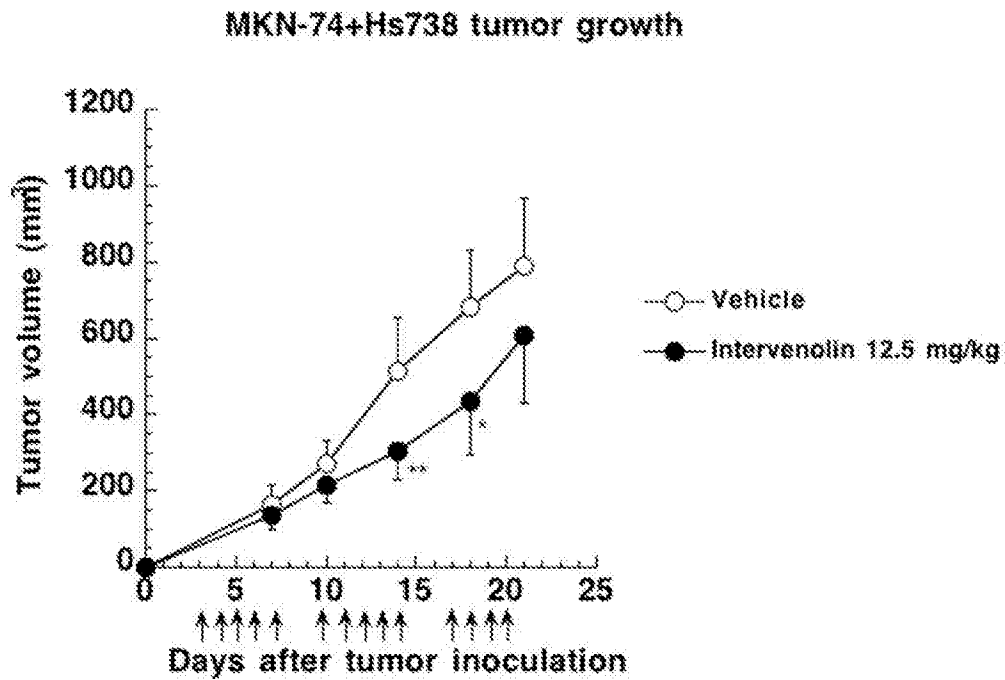


[圖3E]



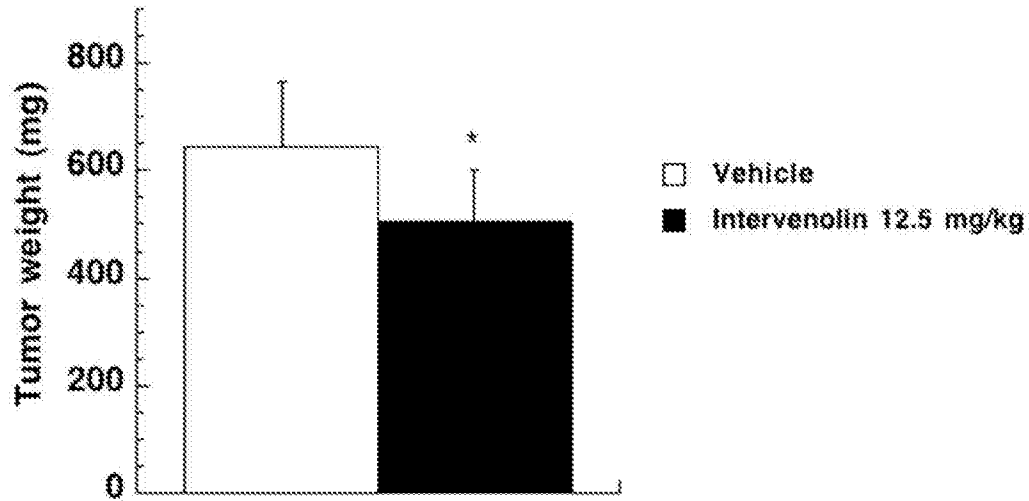
[圖4A]



[4B][4C]

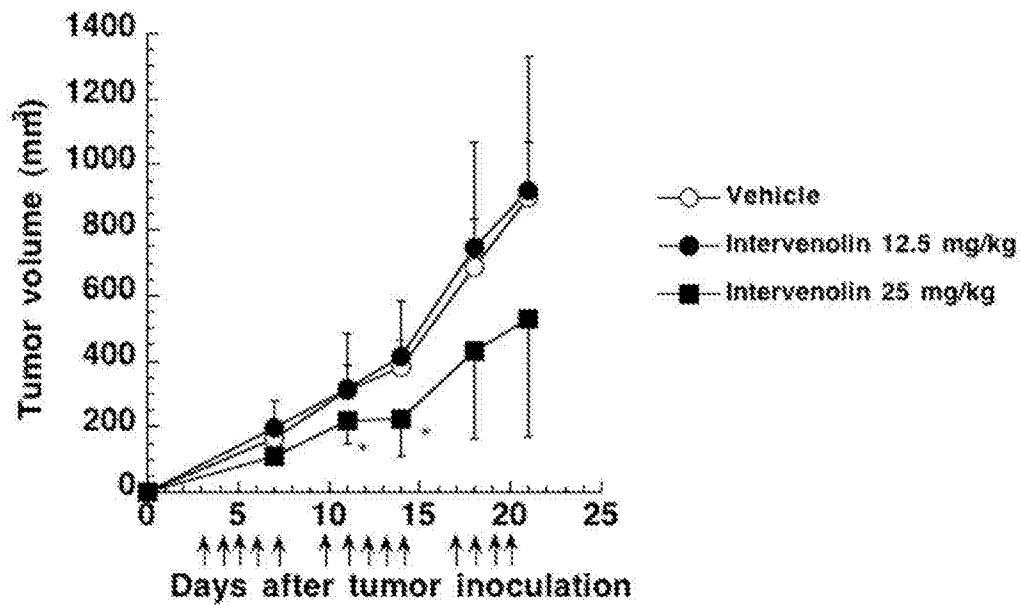
[圖4D]

MKN-74+Hs738 tumor weight



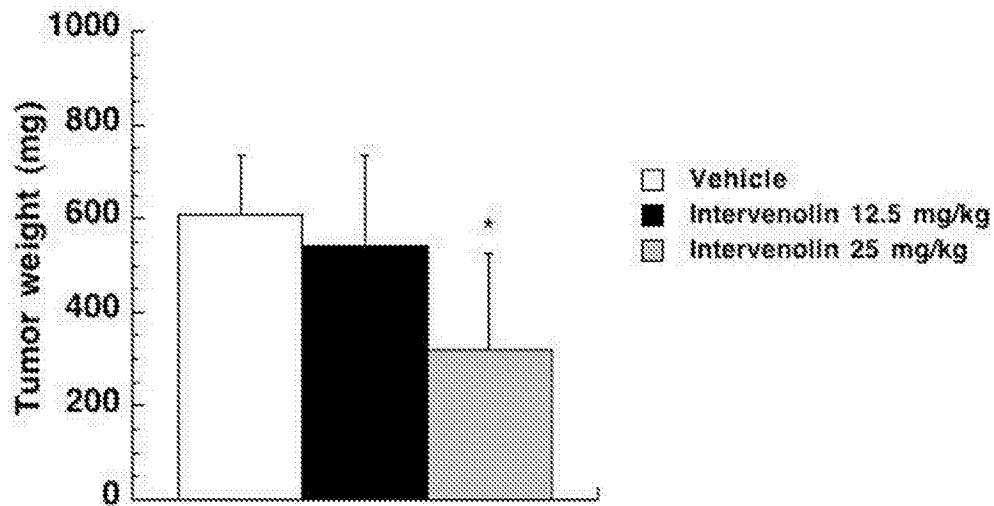
[圖4E]

HCT-15 tumor growth



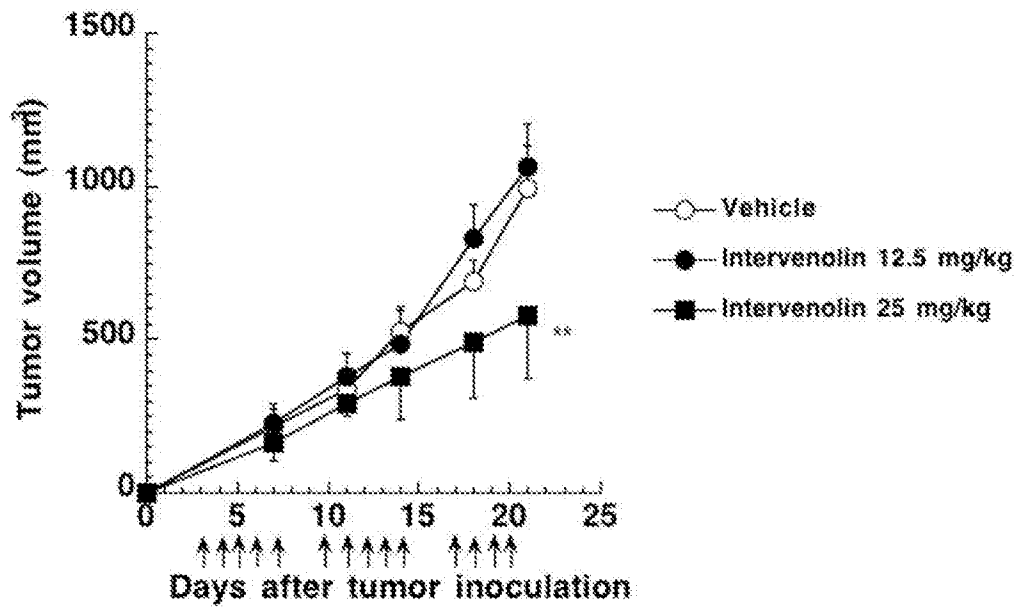
[図4F]

HCT-15 tumor weight



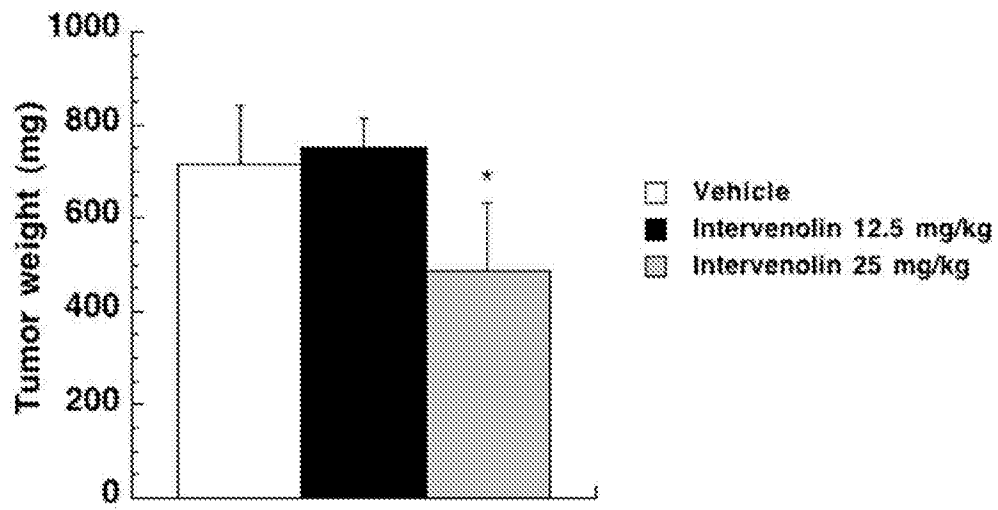
[図4G]

HCT-15+CCD-18Co tumor growth



[図4H]

HCT-15+CCD-18Co tumor weight



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/054256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12P17/12(2006.01)i, A61K31/47(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07D215/58(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12R1/365(2006.01)n</i> 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) <i>C12P17/12, A61K31/47, A61P1/04, A61P31/04, A61P35/00, C07D215/58, C12N1/20, C12R1/365</i>												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched <table border="0"> <tr> <td>Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1922-1996</td> <td>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</td> <td>1996-2014</td> </tr> <tr> <td>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1971-2014</td> <td>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</td> <td>1994-2014</td> </tr> </table>			Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014	Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014		
Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014									
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014									
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), PubMed, Science Direct, ACS PUBLICATIONS</i>												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
P,X/P,A	KAWADA M et al., Intervenolin, a new antitumor compound with anti-Helicobacter pylori activity, from Nocardia sp. ML96-86F2, J Antibiot, SEP-2013, Vol.66, p.543-548	1-5, 7-9/6										
P,X/P,A	ABE H et al., Synthesis of intervenolin, an antitumor natural quinolone with unusual substituents, Org Lett., MAY-2013, Vol.15, p. 2124-2127	1, 6-9/2-5										
A	DEKKER KA et al., New quinolone compounds from Pseudonocardia sp. with selective and potent anti-Helicobacter pylori activity: taxonomy of producing strain, fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities, J Antibiot, 1998, Vol.51, p.145-152	1-9										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"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 27 March, 2014 (27.03.14)		Date of mailing of the international search report 08 April, 2014 (08.04.14)										
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer										
Facsimile No.		Telephone No.										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/054256

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 6-306074 A (Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.), 01 November 1994 (01.11.1994), claims; examples (Family: none)	1-9
A	JP 6-343480 A (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 20 December 1994 (20.12.1994), claims; examples (Family: none)	1-9
A	JP 10-251289 A (Microbial Chemistry Research Foundation), 22 September 1998 (22.09.1998), claims; examples (Family: none)	1-9
A	JP 2000-344768 A (Sankyo Co., Ltd.), 12 December 2000 (12.12.2000), claims; examples (Family: none)	1-9

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12P17/12(2006.01)i, A61K31/47(2006.01)i, A61P1/04(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07D215/58(2006.01)i, C12N1/20(2006.01)i, C12R1/365(2006.01)n</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12P17/12, A61K31/47, A61P1/04, A61P31/04, A61P35/00, C07D215/58, C12N1/20, C12R1/365</p>											
<p>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</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年	
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014年										
<p>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)</p> <p>CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed, Science Direct, ACS PUBLICATIONS</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:15%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:65%;">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</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX/PA</td> <td>KAWADA M et al., Intervenolin, a new antitumor compound with anti-Helicobacter pylori activity, from Nocardia sp. ML96-86F2, J Antibiot, SEP-2013, Vol.66, p.543-548</td> <td>1-5, 7-9/6</td> </tr> <tr> <td>PX/PA</td> <td>ABE H et al., Synthesis of intervenolin, an antitumor natural quinolone with unusual substituents, Org Lett., MAY-2013, Vol.15, p.2124-2127</td> <td>1, 6-9/2-5</td> </tr> </tbody> </table>			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 請求項の番号	PX/PA	KAWADA M et al., Intervenolin, a new antitumor compound with anti-Helicobacter pylori activity, from Nocardia sp. ML96-86F2, J Antibiot, SEP-2013, Vol.66, p.543-548	1-5, 7-9/6	PX/PA	ABE H et al., Synthesis of intervenolin, an antitumor natural quinolone with unusual substituents, Org Lett., MAY-2013, Vol.15, p.2124-2127	1, 6-9/2-5
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 請求項の番号									
PX/PA	KAWADA M et al., Intervenolin, a new antitumor compound with anti-Helicobacter pylori activity, from Nocardia sp. ML96-86F2, J Antibiot, SEP-2013, Vol.66, p.543-548	1-5, 7-9/6									
PX/PA	ABE H et al., Synthesis of intervenolin, an antitumor natural quinolone with unusual substituents, Org Lett., MAY-2013, Vol.15, p.2124-2127	1, 6-9/2-5									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p> </td> </tr> </table>			<p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>							
<p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p>										
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align: center;">27.03.2014</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align: center;">08.04.2014</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align: center;">日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align: center;">北田 祐介</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>	<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:20%;">4 N</td> <td style="width:80%;">4868</td> </tr> </table>	4 N	4868							
4 N	4868										

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 請求項の番号
A	DEKKER KA et al., New quinolone compounds from <i>Pseudonocardia</i> sp. with selective and potent anti- <i>Helicobacter pylori</i> activity: taxonomy of producing strain, fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities, <i>J Antibiot</i> , 1998, Vol.51, p.145-152	1-9
A	JP 6-306074 A (萬有製薬株式会社) 1994. 11. 01, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 6-343480 A (日本化薬株式会社) 1994. 12. 20, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 10-251289 A (財団法人微生物化学研究会) 1998. 09. 22, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 2000-344768 A (三共株式会社) 2000. 12. 12, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-9