(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3639973号

(P3639973)

(45)発行日　平成17年4月20日(2005.4.20)　(24)登録日　平成17年1月28日(2005.1.28)

(51)Int.Cl.[7]	F I
C07D 493/22	C07D 493/22
A61K 31/365	A61K 31/365
A61P 35/00	A61P 35/00
// A61K 35/56	A61K 35/56

請求項の数 5　(全 41 頁)

(21)出願番号　特願平6-184267
(22)出願日　平成6年7月2日(1994.7.2)
(65)公開番号　特開平7-145050
(43)公開日　平成7年6月6日(1995.6.6)
審査請求日　平成13年4月17日(2001.4.17)
(31)優先権主張番号　08/086,668
(32)優先日　平成5年7月2日(1993.7.2)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　500219799
アリゾナ　ボード　オブ　リーゼンツ
アメリカ合衆国アリゾナ州８５２８７　テンペ　アリゾナ　ステイツ　ユニバシチー（番地なし）
(74)代理人　100061480
弁理士　桑原　尚雄
(72)発明者　ジョージ　アール　ペチット
アメリカ合衆国アリゾナ州８５２５３　パラダイスバレイ　ブレットヒルズドライブ　６２３２番地
(72)発明者　ツビグニュー　エー　シチャスツ
アメリカ合衆国アリゾナ州８５２８１　テンペ　イーストアパッチブルーバード　１４１５番地

最終頁に続く

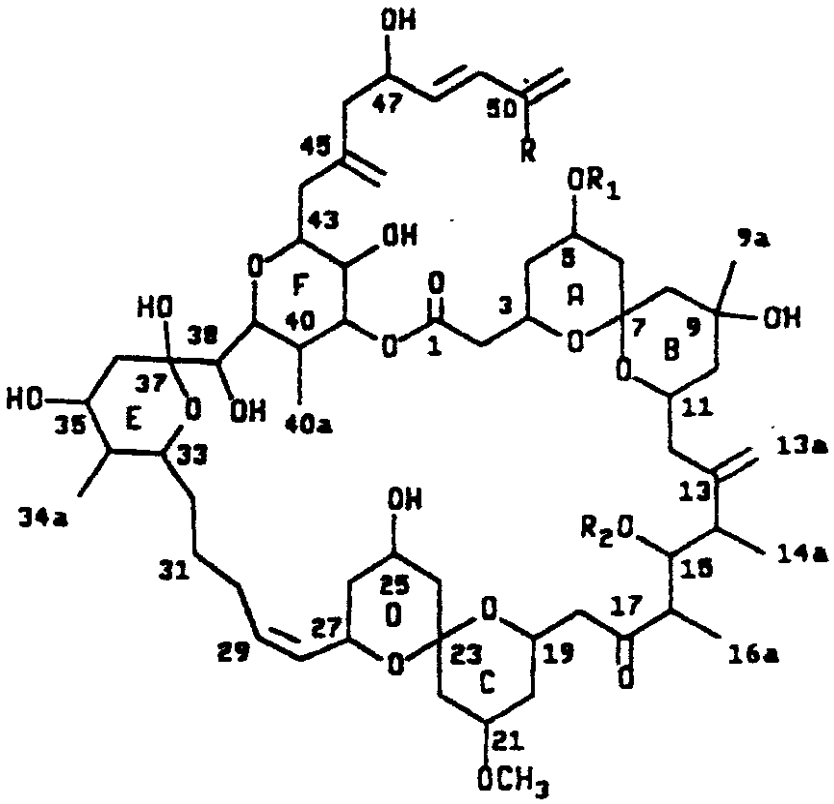
(54)【発明の名称】スポンギスタチン６

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

下記の構造式を有する“スポンギスタチン６”と称する化合物。

【化１】



但し、ＲはＨ、Ｒ$_1$はＣＯＣＨ$_3$、Ｒ$_2$はＨ

【請求項２】

請求項１の【化１】の構造式を有する“スポンギスタチン６”と称する化合物を有効成分として含む抗腫瘍剤組成物。

【請求項３】

Ｐ３８８システム下でＥＤ$_{50}$を達成するに必要な該組成物の濃度は、１．０ｘ１０$^{-1}$μｇ／ｍｌ以下である請求項２の抗腫瘍剤組成物。

【請求項４】

ヒトのがん細胞を含む環境においてヒトのがん細胞成長を阻止するための、請求項１の【化１】の構造式の化合物と結合した薬学的に受容できる担体を有効成分として含む、ヒトの抗腫瘍剤組成物。

【請求項５】

該化合物は、Ｐ３８８システム下でＥＤ$_{50}$を達成するに必要な濃度が１．０ｘ１０$^{-1}$μｇ／ｍｌ以下であるように精製された請求項４の抗腫瘍剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【産業上の利用分野】

本発明は、構造的に関係のある問題の４つの新しい合成物の発見と分離に関する。これ等の化合物の中の２つはＳｐｏｎｇｉａ（ユアミ海綿）属の東インド洋海綿の成分であり、ここでは“スポンギスタチン２”及び“スポンギスタチン３”と呼ばれる。他の２つの化合物は海綿ｓｐｉｒａｓｔｒｅｌｌａ ｓｐｉｎｉｓｐｉｒｕｌｉｆｅｒａ（Ｄｅｍｏｓｐｏｎｇｉａｅ（普通海綿）綱，Ｈａｄｒｏｍｅｒｉｄａ（強靭海綿）目，Ｓｐｉｒａｓｔｒｅｌｌｉｄａｅ科）から抽出された。これ等の化合物はここでは“スポンギスタチン４”及び“スポンギスタチン６”と名付けられている。これ等の新しい大環状のラクトンはＵ．Ｓ．Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（アメリカ国立癌研究所）のパネルの中のヒト癌細胞系に対して非常に有効であり且つ特効があると云うことが発見された。ここに記載されている研究の幾つかはＮＣＩ（＝Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃａｎ

ｃｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）Ｇｒａｎｔ ０１Ｇ ＣＡ－４４３４４－０１－０４によって支持された。合衆国政府は本発明に対して幾らかの権利を持つかもしれない。

【０００２】

Ｐｈｙｌａ Ｂｒｙｏｚｏａ，Ｍｏｌｌｕｓｃａ，及びＰｏｒｉｆｅｒａの種の沢山の数の古い海洋無脊椎動物が１０億年に地球の海の至る所に定着していた。それ等の生物体は、現在の細胞組織、調節、及び防御レベルに到達する迄彼等の進化作用の中で数兆回の生合成反応を行って来たに違いない。海綿は５億年近くの間物理的外観がごく僅かしか変化していないが、これは少なくとも５億年の期間にわたる環境条件の変化に対応して非常に効果的な化学的進化を遂げて来たことを示唆している。生物学的に有効な海洋動物の成分を利用する可能性についての認識は紀元前２，７００年頃にエジプトで記録されており又紀元前２００年迄にはｓｅａ ｈａｒｅ（アメフラシ）からの抽出物がギリシャで医薬的目的の為に用いられていた。その様な考察と、海洋生物体（とりわけ無脊椎動物及びサメ、フカの類）は滅多に癌にならないと云う一般的な観察とが組み合わされたことから、海洋動植物の抗癌成分についての始めての組織的な調査が行われることになった。

【０００３】

１９６８年迄に、アメリカ国立癌研究所の解決の手掛かりとなる実験的癌システムに基づいて、ある種の海洋生物体は新しく且つ構造的に新奇な抗新生物及び／又は細胞障害性の因子（ａｇｅｎｔｓ）をもたらすのではないかと云う沢山の証拠が得られた。同じ様な考察は、海洋生物体は又、その他の厳しい医学的挑戦目標、例えばウィルス性の病気、に対して有効な新しい薬剤をもたらすことが出来るのはないかと云ことを示唆した。更に、海洋生物体は、現代の医薬品化学の技術によっては発見出来なかった、先例のない構造的種類の、潜在的に有効な薬品候補（及び生化学的プローブ）を含んでいると云うことが期待された。幸いなことに、これ等の期待の幾つかはこれ迄の間に実際に実現されている。これ等の成功の中の例証的なケースの中にはアリゾナ州Ｔｅｍｐｅの癌研究所（Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）によるｂｒｙｏｓｔａｔｉｎｓ，ｄｏｌａｓｔａｔｉｎｓ，及びｃｅｐｈａｌｏｓｔａｔｉｎｓの発見が含まれているが、この研究所ではこれ等のシリーズの注目すべき抗癌薬候補の幾つかの薬品が現在ヒトに対して臨床テストされているか或いは前臨床的開発の段階にある。米国特許Ｎｏ．４，８１６，４４４， ４，８３３，２５７，４，８７３，２４５，及び４，８７９，２７８ 参照。

【０００４】

現在医学研究に携わっている人達にとっては良く知られていることであるが、新しい化合物の分離から市場への導入迄の間の時間は、最良のケースで少なくとも数年であり場合によっては数１０年と云うことにもなり得る。その為、産業界は、政府と協力して、次の２つの目的に役立つ幾つかの認定テストを考え出した。一つの目的は、それ以上その物質の開発の為に資金を投入しても経済的に逆効果となるであろうと云うことを認定者達に疑いの余地無く明らかにする物質を除去することである。もう一つの、そしてもっと重要な、目的は、高い成功の可能性を明らかにし、従って、その様な物質の投入が予期されている市場を規制している政府によって課せられている様々な規制的要求に適合する為に要求されているデータを獲得する為に必要な、それ以上の投資の要求に根拠を与えることである。

【０００５】

その様なデータを獲得する為の現在のコストは物質１つ当たり１０００万ドル（＄１０，０００，０００ Ｕ．Ｓ．）に到達しつつある。経済的に見て、その様な投資は、その投資を回収することが出来ると云う妥当な裏付けがない限り、実現は困難である。もしその様な裏付けが得られなければ、その様な投資は行われず、もし投資が行われなければ、潜在的な救命薬品の発見の為の研究結果はストップしてしまうであろう。

【０００６】

わずか２００年前は、多くの病気が人類に悲惨な苦しみを与えていた。それ等の病気の多くは現在では抑制され或いは根絶されている。それ等の病気を治療し或いは抑制する為の手段の開発の際に、適当な共通の実験動物を用いた研究が決定的な重要性を持っている。

様々なタイプの癌を用いて、又ＨＩＶウィルスを用いて、そのような研究は現在も続けられている。様々なタイプの癌の治療の為の研究は合衆国では国立癌研究所（ＮＣＩ）によって調整されている。国立癌研究所は、政府機関として、制癌研究の支援の責任を負って来た。或る物質が制癌作用を持つか否かを判定する為に、国立癌研究所は様々なプロトコルを定めて来たが、その中の一つには、当該の候補物質を６０のヒト腫瘍細胞系を含む細胞系パネルに対してテストすると云う方法が含まれている。このプロトコルは有用なものであると云うことが確認されており、科学の世界で一般的に受け入れられている。このプロトコルと、それから得られた結果を評価する為の確立された統計的手段は参考文献の中に十分に説明されている。このテストプロトコルの徹底的な説明については医学博士、哲学博士Ｍｉｃｈａｅｌ Ｒ．Ｂｏｙｄ著、“Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ＆ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ （『腫瘍学の原理と実習』）”，改訂、第３巻、第１０号、１９８９年１０月、参照。統計的分析については、“Ｄｉｓｐｌａｙ ａｎｄ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｐａｔｔｅｒｎｓ ｏｆ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ Ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ Ｄｒｕｇｓ Ａｇａｉｎｓｔ Ｈｕｍａｎ Ｔｕｍｏｒ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅｓ：Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ Ｍｅａｎｓ Ｇｒａｐｈ ａｎｄ ＣＯＭＰＡＲＥ Ａｌｇｏｒｉｔｈｍ（『ヒト腫瘍細胞系に対する薬の示差活性パターンの表示及び分析：グラフとＣＯＭＰＡＲＥ（比較）アルゴリズムの開発』）”、国立癌研究所報、レポート第８１巻、第１４号、１０８８頁、１９８９年7月１４日、Ｋ．Ｄ．Ｐａｕｌｌほか著、に説明されている。上記の二つの参考文献は共に、これ等の参考文献に対する本書の参照の指示によって本書の中に組み込まれている。国立癌研究所の試験管内プロトコルの有効性と妥当性については今後も確認が続けられて行かねばならない。

【０００７】

より新しい、２つの注目すべき参考文献は、その全部或いは一部が、国立癌研究所のＭ．Ｒ．Ｂｏｙｄ博士によって書かれたものである。一つめは、“Ｄａｔａ Ｄｉｓｐｌａｙ ａｎｄ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｒｏｍ ｔｈｅ ＮＣＩ ｄｉｓｅａｓｅ Ｏｒｉｅｎｔｅｄ ｉｎ ｖｉｔｒｏＡｎｔｉｔｕｍｏｒ Ｄｒｕｇ ＆ Ｓｃｒｅｅｎ（『国立癌研究所の病気向けの試験管内抗腫瘍薬スクリーンからのデータ表示及び分析戦略』）”、Ｂｏｙｄ Ｍ．Ｒ．ほか著、Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｍｏｄｅｌｓ ａｎｄ Ｃｏｎｃｅｐｔｓ ｆｏｒ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ（『薬の発見と開発の為の細胞障害性制癌薬のモデル及びコンセプト』）所収；Ｖｌｅｒｉｏｔｅ，Ｆ．Ａ．，Ｃｏｒｂｅｔｔ，Ｔ．，Ｂａｋｅｒ，Ｌ．編；Ｋｌｕｗｅｒ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ刊；アムステルダム、１９９２年、１１～３４頁、である。二つめは、“Ｔｈｅ Ｆｕｔｕｒｅ ｏｆ Ｎｅｗ Ｄｒｕｇ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ（『新薬開発の将来』）“、Ｍ．Ｒ．Ｂｏｙｄ著、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｈｅｒａｐｙ ｉｎ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（『腫瘍学の最新の療法』）所収；Ｎｉｅｄｅｒｈｕｂｅｒ，Ｊ．Ｅ．編、Ｅｄ．Ｍｏｓｂｙ刊；セントルイス、１９９３年、１１～２２頁、である。

【０００８】

これ等の記事は、当業者達は、試験管内スクリーンが新しい抗新生物薬化合物を発見する為の最初の方法であると信じていると云うことを立証している。進歩は唯沢山の種類の癌を取り扱うという点で欠けていた；何故ならこれらの癌に対して有効な抗新生物薬化合物が未だ発見されていなかったからである。率直に云って、一般の人達の関心は、標準スクリーニングテストで有効であると証明された化合物の発見に対する報酬を、制度上許された範囲内で、最高にすることによって最も良く満たされるものである。

【０００９】

２０年以上にわたる精力的な努力の主たる部分は海綿の抗新生物薬及び／又は細胞障害性の生合成生成物に向けられて来ており、本発明が目指しているのもその様な努力を更に発展させて行くことである。

【００１０】

【従来の技術】

海洋動物の大環状ラクトンタイプの成分は新しい制癌薬候補の非常に重要な源になりつつある。それ等の中の例証的なケースに、現在行われているｂｒｙｏｓｔａｔｉｎ１のヒト臨床テストとｈａｌｉｃｈｏｎｄｒｉｎ Ｂ、ｈａｌｉｓｔａｔｉｎ１及びｅｃｔｅｉｎａｓｃｉｄｉｎ７２９の先進的な前臨床的開発がある。（海綿のＴｈｅｏｎｅｌｌａ種からの）ｏｎｎａｍｉｄｅ系の７つの興味深い（且つ細胞障害性の）ｐｅｒｈｙｄｒｏｐｙｒａｎｓとＭｙｃａｌｅ ａｄｈａｅｒｅｎｓ（海綿動物門）からの、細胞障害性の大環状ラクトンである１３－ｄｅｏｘｙｔｅｄａｎｏｌｉｄｅが関連分野の進歩を物語っている。

【００１１】

本願発明の同時係属出願、出願番号０８／００６，２７９の中で説明されているＳｐｏｎｇｉｓｔａｃｈｉｎ １はインド洋海綿種（Ｓｐｏｎｇｉｉｄａｅ科、Ｄｅｍｏｓｐｏｎｇｉａｅ綱）の中で発見され、Ｕ．Ｓ．Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（アメリカ国立癌研究所）の６０のヒト癌細胞系のパネルの中の、サブセットの高度に化学耐性の腫瘍タイプに対して、現在知られているものの中で最も並外れて有効な物質の一つを代表している。同じ種の海綿からの他の活性留分の集中的な調査（Ｐ３８８ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｉｃｌｅｕｋｅｍｉａ細胞系バイオアッセイ）から、２つの新しく且つ例外的に有効な（国立癌研究所のパネル）大環状ラクトンの存在が明らかとなった；これ等のラクトンはスポンギスタチン２及び３と名付けられた。スポンギスタチン２及びスポンギスタチン３の分離、構造的解明、及びヒト癌細胞系活性の概要が以下に示される。

【００１２】

モルディブ共和国で行われたＳｐｏｎｇｉａ種の４００ｋｇ（湿重量）の拡大再収集（１９８８）から調製された細胞成長抑制（Ｐ３８８１ｅｕｋｅｍｉａ（白血病））ｄｉｃｈｌｏｒｏｍｅｔｈａｎｅ留分が、スポンギスタチン１を暗示しているＰ３８８活性留分を獲得する為にＳＥＰＨＡＤＥＸ ＬＨ－２０を使用した一連の立体的排除及び分配形クロマトグラフィーの手順によって分離された。Ｃ－８ ＳＩＬＩＣＡ ＧＥＬ（ＰＲＥＰＥＸ及びＵＬＴＲＥＭＥＸ）と、１：１のメタノール水から５：５：８のメタノール＝アセトニトリル＝水迄を用いた注意深いＨＰＬＣのシーケンスが４．３４ｍｇのアモルファスなスポンギスタチン２をもたらした：ｍｐ１４０～１４１ ℃；［α］$_{D}$＋２４．５°，（ｃ ０．３９，CH_3OH）；ＵＶ（CH_3OH，ｌｏｇε）λ，２２０（４２．１），λ，２７３（２．９５）ｎｍ；ＩＲ（フィルム）３４２６，２９３７，１７３６，１６５１，１６０３，１３８１，１２３４，１１７７，１０８６cm^{-1}，高解像度ＦＡ－ＢＭＳ，ｍ／ｚ１２２７．６０４０［Ｍ＋Ｋ］$^{+}$ $C_{63}H_{96}O_{21}K$（計算質量 １２２７，６０８２）に対応。スポンギスタチン１のそれとは対照的に、［ｍ－３５］$^{+}$イオンは発見されなかった。スポンギスタチン３も無色の非結晶性の粉末として得られた（２．６９ｍｇ，収率6×10^{-8}％）；ｍｐ１４８～１４９℃；［α］$_{D}$＋２８．１°，（ｃ ０．１５，CH_3OH）；ＵＶ（CH_3OH，ｌｏｇε）λ，２２６（３．１４），λ，２６８（２．２４）ｎｍ；ＩＲ（フィルム）３４２６，２９３４，１７３４，１６５３，１５９１，１３８７，１２３１，１１７３，１０９０cm^{-1}，ＨＲＦＡＢ ｍｓ，ｍ／ｚ １２１９．５５５６［Ｍ＋Ｋ］$_{+}$ $C_{61}H_{93}ClO_{20}K$（計算質量１２１９．５５８４）。

【００１３】

Ｓｐｉｒａｓｔｒｅｌｌａ属（Ｄｅｍｏｓｐｏｎｇｉａｅ綱、Ｈａｄｏｏｍｅｒｉｄａ目、Ｓｐｉｒａｓｔｒｅｌｌｉｄａｅ科）の特に鮮やかな色（赤、紫）の海綿は、Ｓｐｏｎｇｉａ ｉｎｓｉｇｎｉｓのヒ素含有量に関するものを除けば、これ迄生物学的に活性な構成成分に関して検査されたとがなかった。１９７３年に、アフリカの南市海岸沖で収集されたＳｐｉｒａｓｔｒｅｌｌａ ｓｐｉｎｉｓｐｉｒｕｌｉｆｅｒａの抗新生物薬成令についての２０年調査が開始された。この海綿からの、スポンギスタチン４及びスポンギスタチン６と名付けられた、２つの注目すべき効能を持つ抗新生物薬的物質の分離及び構造が開示される。何故ならスポンギスタチン４及びスポンギスタチン６はそれぞれ痕跡成分（収率10^{-7}％）に過ぎないと云うことが明らかにされており、それ等の分離と構

造の解明はとりわけ困難且つ時間のかかるものであったからである。以下にその概要が示される。

【００１４】

１９８０年迄の期間にわたるＳｐｉｒａｓｔｒｅｌｌａ ｓｐｉｎｉｓｐｉｒｕｌｉｆｅｒａの増々拡大されて行った収集（３６０ｋｇ迄）と化学的／生物学的研究は不適当であると云うことが明らかになった。１９８０年迄は全ての努力はエタノールの中に保存された２，４０９ｋｇの海綿の収集に集中され、この過程で大環状ラクトンの発見がなされた（スポンギスタチン４の最初の数μｇの分離は１９８２年９月に行われた）。アルコール抽出物から調製されたｍａｕｒｉｎｅ（ハツカネズミ）Ｐ３８８ リンパ球白血病（ＰＳ系）活性のジクロロメタン留分は最初は、ユニークなパイロットプラント規模の高性能液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）のシステム（ＳＩＬＩＣＡ ＧＥＬ，１５０ｐｓｉで３ｍ×０．１５ｍのカラム）を使用したＨＰＬＣによって分離された。バイオアッセイ（生物学的検定）（ＰＳ）によって導かれた分離は一連のＳＥＰＨＡＤＥＸ ＬＨ－２０（ゲル浸誘及び分配）及びＨＰＬＣ（メタノール＝水成分を用いるＭＥＲＣＫ ＲＰ－２ ＳＩＬＩＣＡ ＧＥＬ，アセトニトリル＝水を用いるＰＲＥＰＥＸ ＲＰ－８，そして最後にアセトニトリル＝水を用いるＬＩＣＨＲＯＳＰＨＥＲ １００ ＲＰ－１８）を用いて続けられ、１０．７ｍｇの無色のスポンギスタチン４（４．４ ×10^{-7}％，ＰＳ ED_5O ４．９×10^{-5} μｇ／ｍｌ）が得られた；ｍｐ １５３－１５４℃；［α］$_D^{22}$＋２３．０°（ｃ＝０．１９，CH_3CH）；ＵＶ（CH_3OH）λ_{max}２２９ｎｍ，ε１７０７９０；ＩＲ（フィルム）３４３５，２９３８，１７３６，１６４３，１５９３，１３８５，１２５８，１１７７，１０８６，９９３cm^{-1}，高解像度 ＦＡＢ ＭＳ，ｍ／ｚ １２１９，５５４６［Ｍ＋Ｋ］$^+$ $C_{61}H_{93}ClO_{20}K$（計算質量１２１９，５５８６）に対応。

【００１５】

同じ様に、南西（アフリカ）のインド洋の海綿Ｓｐｉｒａｓｔｒｅｌｌａ ｓｐｉｎｉｓｐｉｒｕｌｉｆｅｒａ（Ｃａｒｔｅｒ，１８７９）の２，４０９ｋｇの収集から調製されたＳＥＰＨＡＤＥＸ ＬＨ－２０分配形クロマトグラフィー留分のｍａｕｒｉｎｅ（ハツカネズミ）Ｐ３８８リンパ球白血病のバイオアッセイと、水の中の４５％アセトニトリルを用いたＨＰＬＣ（ＭＥＲＣＫ ＬＩＣＨＲＯ－ＳＰＨＥＲ １００ ＲＰ－１８）による最終的分離から、無色のスポンギスタチン６の単離が行われた（８．４ｍｇ，収率３．５×１０％）；Ｐ３８８ＥＤ３．４×１０μｇ／ｍｌ；ｍｐ １３９－１４０℃；［α］$_D^{22}$＋２２．０（ｃ，０．１６，CH_3OH）；ＵＶ（CH_3OH）λ_{max}２２３ｎｍ，（ｌｏｇ ε４．２７）；ＩＲ（フィルム）３４３１，２９３８，１７３６，１６４５，１６０３，１３８７，１２５６，１１７５，１０８６，９９３cm^{-1}，ＨＲＦＡＢ ＭＳ ｍ／ｚ １１８５，５９２６［Ｍ＋Ｋ］$^+$、$C_{61}H_{93}ClO_{20}K$ １１８５，５９２２と計算される。

【００１６】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の第１の目的は、様々なひとがん細胞系に対して各々がｌｏｇ・１０以下のｌｏｇ ｍｏｌａｒ TGI_{50}を持つ、ここで“スポンギスタチン６”と名付けられている構造的に先例のない大環状ラクトンの分離である。

本発明のもう一つの目的は、ここで“スポンギスタチン６”と名付けられている物質の構造の解明を行うことである。

【００１７】

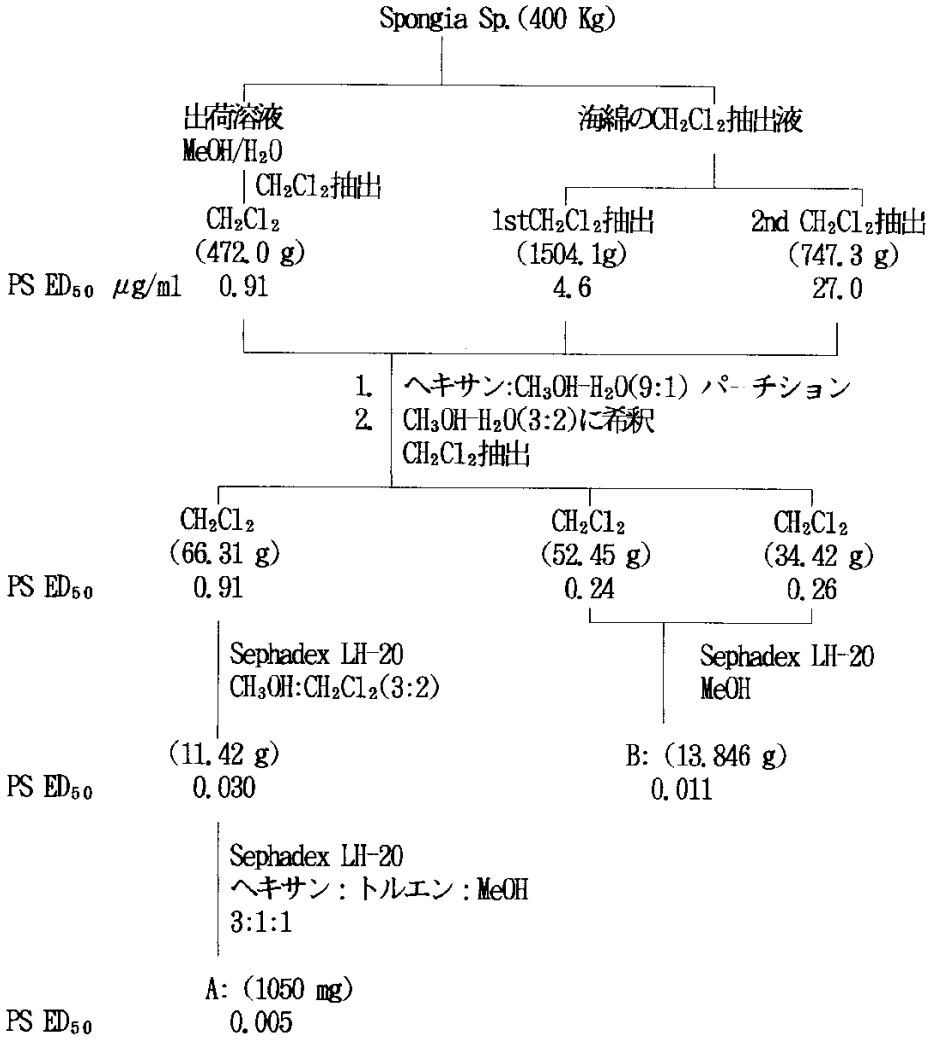
本発明の更にもう一つの目的は、ＮＣｌ細胞系のヒト癌に侵されているヒト細胞を“スポンギスタチン２”，“スポンギスタチン３”，“スポンギスタチン４”及び“スポンギスタチン６”を用いて処置する方法を決定することである。

【００１８】

以上の目的並びにここより後に現れる本発明のその他の目的は、本発明によって、本発明の一つの例示的な実施態様について述べられる、以下の詳細な説明から容易に理解される

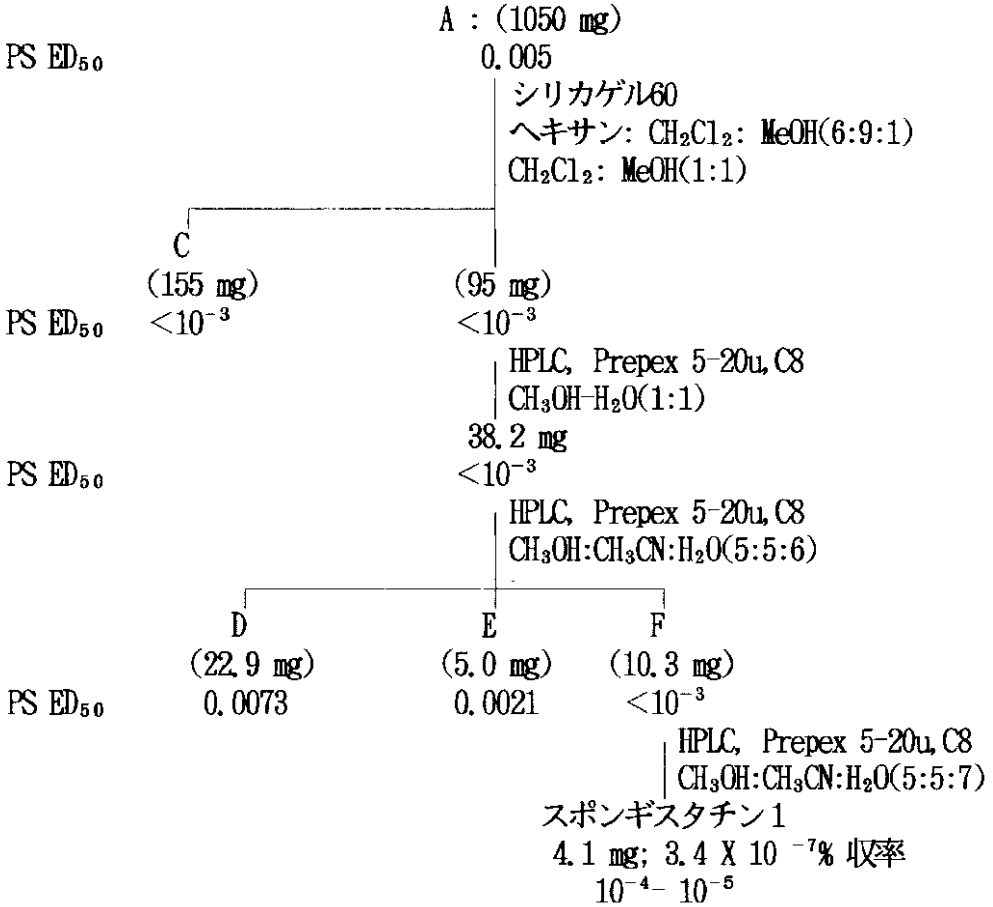
、目覚ましくも予測されていなかったやり方によって容易に達成される。
【課題を解決するための手段】
スポンギスタチン２及びスポンギスタチン３の分離。
分離プロセスはＳｐｏｎｇｉａ（ユアミ海綿）からのＳｈｉｐｐｉｎｇ　ｓｏｌｕｔｉｏｎ（メタノール／海水）の除去によって、又ジクロロメタンによるその分割はｃｏｕｎｔｅｒ－ｃｕｒｒｅｎｔ法によって始まった。ジクロロメタンの留分は蒸発されて黒い固体（４７２．０ｇ；ＰＳ　ＥＤ$_{50}$　０．９１μｇ／ｍｌ）を生じた。容器は再び１：１ジクロロメタン／メタノールで満たされた。８～１３日後に溶液が除去され、メタノール／水からのジクロロメタン層の分離を完了させる為に水（およそ１５％）が加えられた。ジクロロメタン層は“真空中で”蒸発され（最初のジクロロメタンを抽出）暗褐色の固体（１５０４，１ｇ；ＰＳ　ＥＤ$_{50}$　４．６μｇ／ｍｌ）を生み出した。回収されたジクロロメタンは再び上方のメタノール／水層と混ぜられ
、再び単一の相を作る為にメタノールが加えられ、この混合物が海綿容器へ戻された。７日後に再び溶媒が排出され、溶液は水と（１５％）混ぜられた。分離されたジクロロメタン層（２回目のジクロロメタン抽出）は７４７．３ｇ（ＰＳ　ＥＤ$_{50}$　２７．０μｇ／ｍｌ）を生み出した。
【００２０】
Ｓｈｉｐｐｉｎｇ　ｓｏｌｕｔｉｏｎからのジクロロメタンの留分４７２．０ｇはヘキサン相は廃棄された。メタノール／水相は３：２に希釈され（水の添加）、４回にわたってジクロロメタンを用いて抽出された。ジクロロメタン抽出物は濃縮され、残査　（６６．３１ｇ）はかなりのＰＳ細胞毒性活性を示した（ＰＳ　ＥＤ$_{50}$　０．１　６μｇ／ｍｌ）。
【００２１】
最初と２回目のジクロロメタン抽出物は、別々に、同様のやり方でｓｈｉｐｐｉｎｇ　ｓｏｌｕｔｉｏｎのジクロロメタン留分に対して分配された。
始めは、ＳＥＰＨＡＤＥＸ　ＬＨ－２０を使用するクロマトグラフィーの方法が用いられた。ＰＳ活性のジクロロメタン留分（６６．３１ｇ）が最初にＳＥＰＨＡＤＥＸ　ＬＨ－２０をカラム（３ｋｇ；１５×１５０ｃｍ）の上でジクロロメタン－メタノール（３：２）を溶離剤として分離された。溶離された５つの留分が濃縮されてテストされた。最も強い活性を示した留分（１１．４２ｇ；ＰＳ　ＥＤ$_{50}$　０．０３μｇ／ｍｌ）がＳＥＰＨＡＤＥＸ　ＬＨ－２０カラム（１．６ｋｇ；８×１１０ｃｍ）とヘキサン＝トルエン＝メタノール（３：１：１）を用いて再び分離したところ、活性のかなりの上昇（１０５０ｍｇ；ＰＳ　ＥＤ$_{50}$　０．００５μｇ／ｍｌ）がもたらされた。この留分は未だ不活性の黒い固体を含んでおり、この固体はＳＩＬＩＣＡ　ＧＥＬ　６０（４０－６３μｍ）と溶媒の傾度：ヘキサン＝ジクロロメタン＝メタノール→ジクロロメタン＝メタノール（６：９：１→１：３）の溶出を用いた中圧（５０　ｐｓｉ迄）の液体クロマトグラフィーカラムを使用して除去された。最も活性の留分（１５５ｍｇ；ＰＳ　ＥＤ$_{50}$＜０．００１μｇ／ｍｌ）は少量の黄色い色素を含んでおり、この色素は溶離剤としてメタノール＝水（１：１）を用いたＨＰＬＣ逆相カラム（ＰＲＥＰＥＸ　５－２０ｕ，ｃ８）の上で取り除かれた。結果として得られた留分（２３．１３ｍｇ；ＰＳ　ＥＤ$_{50}$＜０．００１μｇ／ｍｌ）は高度にＰＳ活性の成分を含んでおり、第１と第２のジクロロメタン抽出物のＰＳによって導かれた分離によって獲得された類似の留分（８．６ｍｇ；ＰＳ　ＥＤ$_{50}$＜０．００１μｇ／ｍｌ）と結合されていた。これ等の結合留分はメタノール＝アセトニトリル＝水（５：５：６）を用いた同じ逆相ＨＰＬＣカラムの上で分離された。これによって得られた留分（１０．４ｍｇ；ＰＳ　ＥＤ$_{50}$＜10^{-4}－10^{-5}μｇ／ｍｌ）は２つの主要成分を含んでおり、これ等の２つの成分は最終的に、メタノール＝アセトニトリル＝水の混合物（５：５：８）を用いたＨＰＬＣによって精製分離され、スポンギスタチン２と名付けられた第２の化合物（ＰＳ　ＥＤ$_{50}$　10^{-4}－10^{-5}μｇ／ｍｌ）４．３４ｍｇとスポンギスタチン３と名付けられた第２の化合物（ＰＳ　ＥＤ$_{50}$　10^{-4}－10^{-5}μｇ／ｍｌ）２．６９ｍｇが得られた。

【００２１】
分離の手順は、下に示される第１－４部の分離図（Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ｓｃｈｅｍｅ）の中に示されている通りである。
【表１】



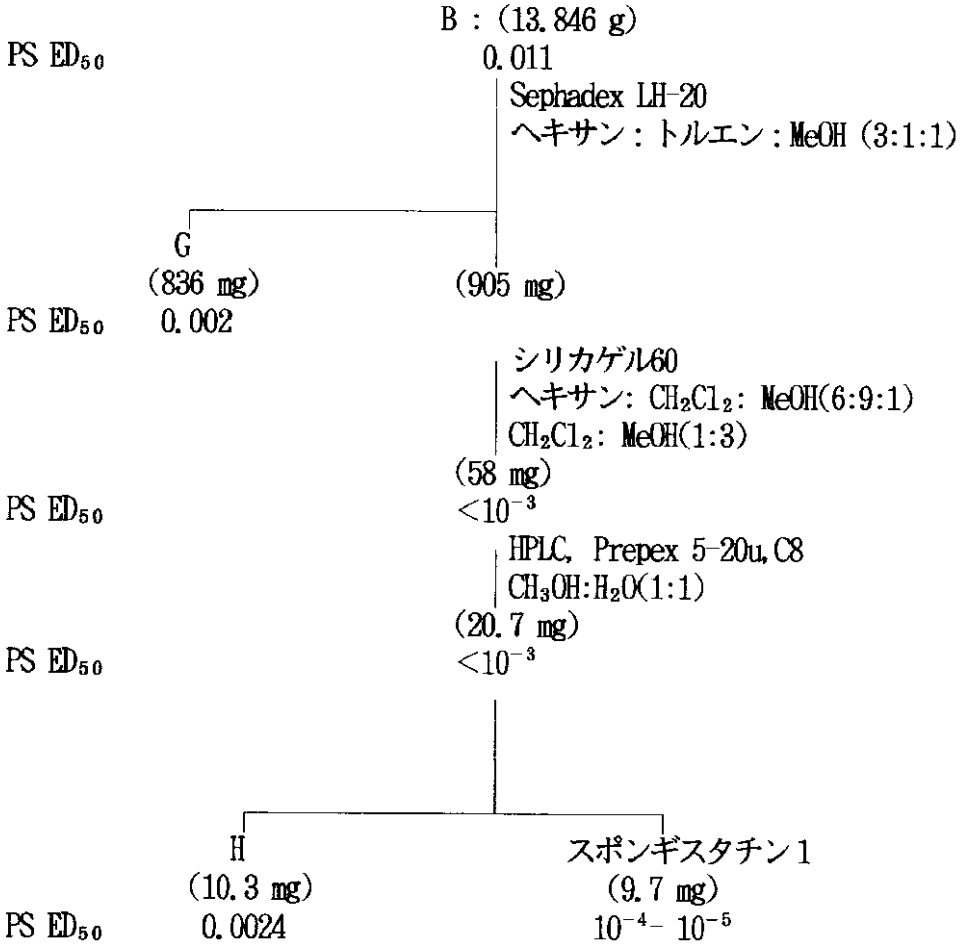
分離図パート１

【００２２】
【表２】



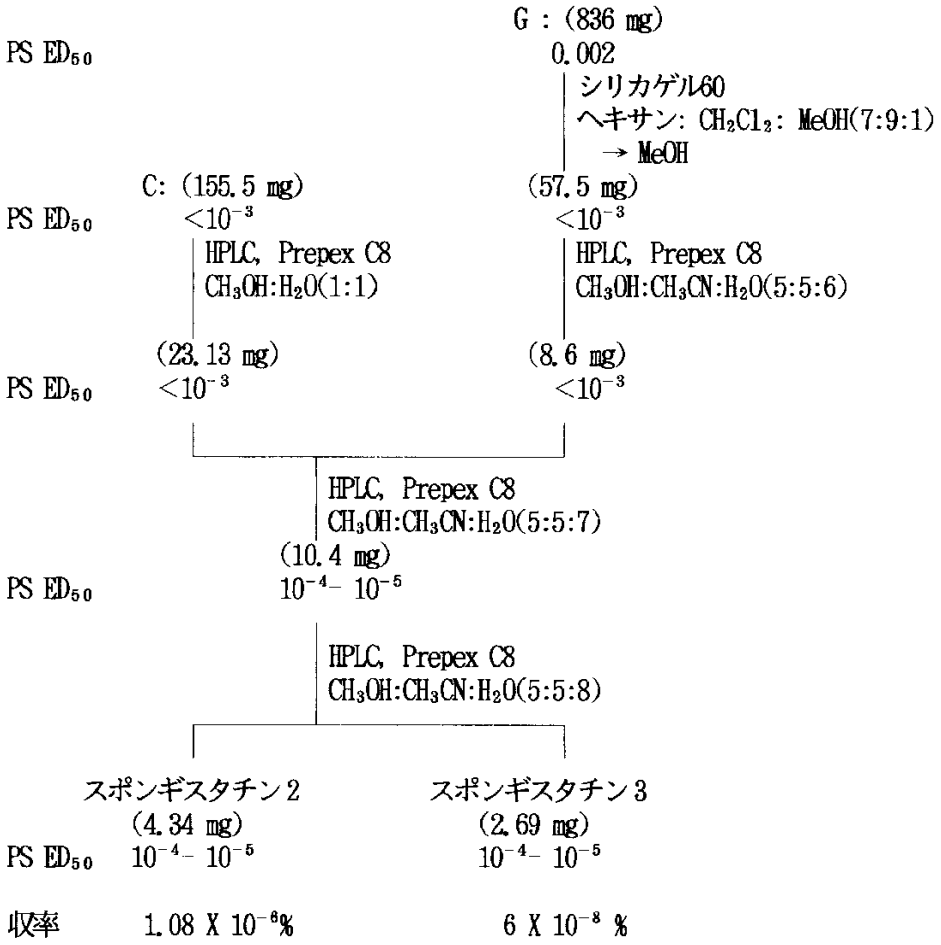
分離図パート2

【００２３】
【表３】



分離図パート3

【００２４】
【表４】



分離図パート4

【００２５】

スポンギスタチン４及びスポンギスタチン６の単離

１９８０年７月に、エタノールの中に保存されたＳｐｉｒａｓｔｒｅｌｌａ　ｓｐｉｎｉ　ｓｐｉｒｕｌｉｆｅｒａの大規模収集（２，４０９ｋｇ）が終了された。最初の抽出、溶剤分配、及び準備段階のＨＰＬＣはパイロットプラント規模で行われた。分離図第５部に、海綿物質２＝プロパノールを用いて抽出され、得られた抽出物が濃縮され、次いで水で希釈され、塩化メチレンを用いて抽出されると云うプロセスが略示されている。乾燥された塩化メチレン抽出物（１３．８６ｋｇ）が、次いでヘキサンとメタノール＝水（９：１）を用いて分配され、それから水性のメタノールが乾燥された（２ｋｇ）。最終的なパイロットプラント規模の高性能液体でクロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）分離（ＳＩＬＩＣＡ　ＧＥＬ，１５０ｐｓｉで０．１５×３ｍのカラム）は下に述べられる段階的勾配システムを用いて実施された：塩化メチレン＝メタノール、１００－０（１６０　１），９６－４（２０５　１），９４－６（１０２　１），９３－７（１０２　１），９０－１０（１０２　１），８５－１５（１０２　１），及び８０－２－（１１０　１）。排出液は１９リットルの容器の中に集められ、薄層クロマトグラフィー（ＴＬＣ）によって検査され、類似の留分は組み合わされ、濃縮された。得られた数系統の活性の留分Ａ－Ｆ（Ｐ３８８　ED_{50}　０．２から＜０．０１μｇ／ｍｌ迄）は次いでメタノールの中のＳＥＰＨＡＤＥＸ　ＬＨ－２０の上でのクロマトグラフィー（カラム：１０×１３０ｃｍ）にかけられ、新しい活性の留分Ｇ－Ｊ（Ｐ３８８　ED_{50}　０．０２～＜10^{-2} μｇ／ｍｌ）がもたらされた。

【００２６】
留分Ｇ（１．４ｇ）は直列に接続された３本のＭＥＲＣＫ　ＬＯＢＡＲサイズＢのＳＩＬＩＣＡ　ＧＥＬカラム（２５×３１０ｍｍ）の中の最初のカラムに対して加えられた。アセトン＝ヘキサン（３：４７）からアセトン＝ヘキサン（２：３）迄の傾度の後に塩化メチレン＝メタノール（９３：７）からメタノール迄の傾度が続けられ、分離図第６部に示されている様に、活性留分Ｋ＝Ｏ（Ｐ３８８　ED_{50} １．８×10^{-5}＜10^{-5} μｇ／ｍｌ）がもたらされた。留分Ｋ（３８．９ｍｇ）が次いで２枚のＡＮＡＬＴＥＣＨ分析的薄層クロマトグラフィー板、１０×２０ｃｍに対して加えられた。アセトン＝ヘキサン（１：１）で溶出することによって単一の成分、Ｋ８６０（３．６ｍｇ）の濃縮された留分が得られた。第２の薄層クロマトグラフィー分離はこの３．６ｍｇを使用し、アセトン＝ヘキサン（３：２）を用いてＡＮＡＬＴＥＣＨ分析板（７．５×１０ｃｍ）の上で行われた。その結果Ｋ８６０　０．３ｍｇが得られた。先の活性留分Ｈから追加のほゞ純粋のＫ８６０　６．３ｍｇが単離され、これが今度の０．３ｍｇに加えられて全部で６．６ｍｇとなった。

【００２６】
ＰＡＲＴＩＳＴＩＬ　Ｍ９　ＳＩＬＩＣＡ　ＧＥＬ　カラムの上でCH_2Cl_2－ＭｅＯＨに対するCH_2Cl_2の溶媒傾度９３：７のＨＰＬＣ（ＡＬＴＥＸプログラミング可能のモデル４２０システム、２モデル１１０Ａ　ポンプ）を用いた後続の精製からほゞ純粋なＫ８６０　６．３ｍｇが得られた。このサンプルは次いでメタノールに対するメタノール＝水の傾度（１：１）のＨＰＬＣ（　ＰＡＲＴＩＳＩＬ　Ｍ９　１０／５０　ＯＤＳ－２カラム）を用いてクロマトグラフィーにかけられ、純粋なＫ８６０、スポンギスタチン４、（１．４ｍｇ）がもたられされた。

【００２７】
活性留分１（分離図第７部）は、メタノール対水、塩化メチレン対メタノールの傾度を用いてＳＩＬＩＣＡ　ＧＥＬ　ＲＰ－２（カラム３．７×４４ｃｍ）の上で分離され、活性留分Ｐが得られた（１．７５ｇ）。ＳＥＰＨＡＤＥＸ　ＬＨ－２０（カラム５．５×９６ｃｍ）の上でヘキサン＝トルエン＝メタノール（３：１：１）を用いることによって活性留分ＱからＵ迄がもたらされた。留分Ｕ（０．１７３ｇ）を繰り返し、水の中に３６％のアセトニトリルの定組成溶媒（ｉｓｏｃｒａｔｉｃ　ｓｏｌｖｅｎｔ）、注入１回当たり１．２×１．８ｍｇを、用いたＧＩＬＳＯＮ準備システム（モデル３０３及び３０５ポンプ及びＰＲＥＰＥＸ　Ｃ８，カラム１０×２５０ｍｍ）による分離にかけることによって、スポンギスタチン４を含む混合物４２．１ｍｇが得られた。最終的分離は、水の中に４５％のアセトニトリルの溶媒、注入１回当たり０．２～０．３ｍｇ、を用いたＬＩＣＨＲＯＳＰＨＥＲ　１００　ＲＰ１８（４．６×２５０ｍｍ）の上での繰り返し分析的（ＧＩＬＳＯＮ）ＨＰＬＣによる分離によって行われた。ＨＰＬＣのピークの検出はＵＶ，λ＝２３０ｍｍ、によって行われた。

【００２８】
スポンギスタチン６も同様にして単離された。水の中に４５％のアセトニトリルを含む溶媒を用いてＨＰＬＣ（Ｍｅｒｋ　ＬＩＣＨＲＯＳＰＨＥＲ　１００ＲＰ１８）による最終的分離によって無色のスポンギスタチン６（８．４ｍｇ）が単離された。

【００２９】
単離されたスポンギスタチン４の総量は１０．７ｍｇ（４．４×10^{-7}％，ＰＳ　ED_{50}　４．９×10^{-3} μｇ／ｍｌ）；ｍｐ　１５３－１５４℃；$[\alpha]_D^{22}$＝＋２３．０°（ｃ＝０．１９，CH_3OH）；ＵＶ（CH_3OH）λ_{max} ２２９ｎｍ，ε１７０７９０；ＩＲ（フィルム）３４３５，２９３８，１７３６，１６４３，１５９３，１３８５，１２５８，１１７７，１０８６，９９３ｃｍ$^{-1}$，高解像度　ＦＡＢＭＳ，ｍ／ｚ　１２１９，５５４６［Ｍ＋Ｋ］$^{+}$，$C_{61}H_{93}ClO_{20}K$（計算質量１２１９，５５８６）に対応。

【００３０】
単離されたスポンギスタチン６の総量は８．４ｍｇ（収率３．５×10^{-7}％），ＰＳ

ED_{50} 3．4×10^{-3}μg／ml）；mp 139－140℃；［α］$^{22}_{D}$＝＋22．0°（c，0．16，CH_3OH）；UV（CH_3OH）λ_{max} 223nm，（log ε 4．27）；IR（フィルム）3431，2938，1736，1645，1603，1387，1256，1175，1086，993cm^{-1}，HRFAB MS m／z 1185，5926［M＋K］$^{+}$，$C_{61}H_{94}O_{20}K$（計算質量1185，5922）に対応。

【0031】

【表5】

スピラストレラ スピニスピルリフェラ抽出物のプレパラチブHPLC

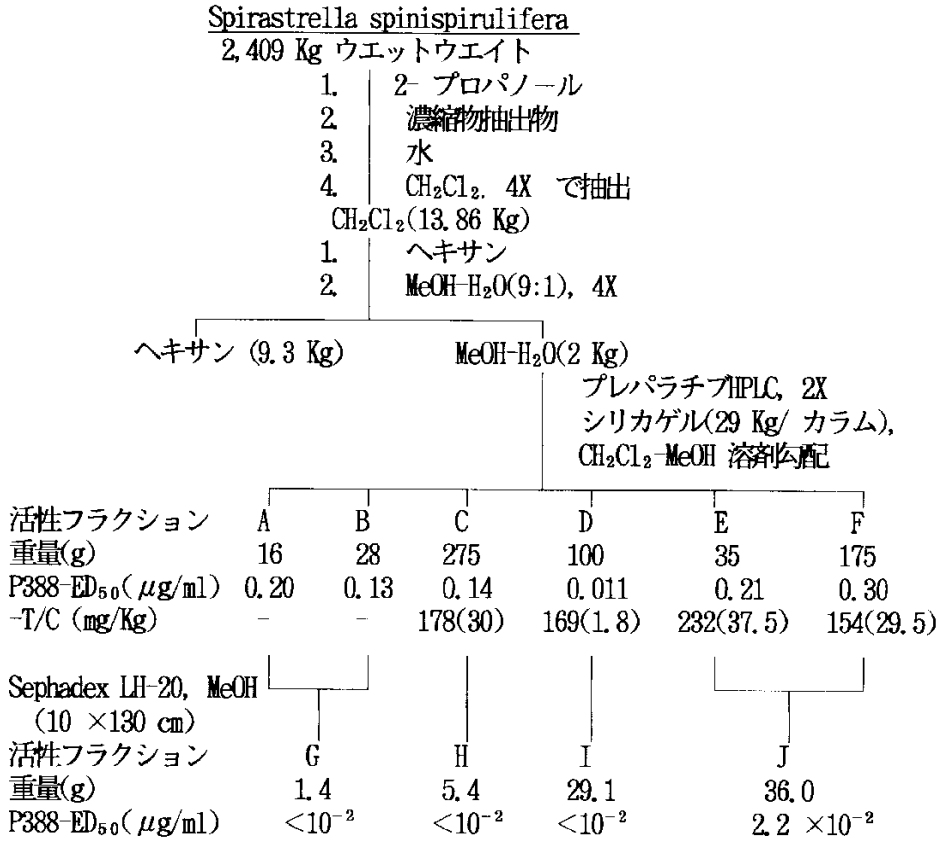
カラム	フラクション*	濃縮物の量（g）	P388 ED_{50}（μg/ml）
1個：2.0Kg 最初の重量	1－4	1700第2コラムで再クロマトグラフした	－
	5－15	0.0	－
	16－17	12.5	17.0
	18－19	9.0	2.3
	20－21 A	16.0	0.2
	22－27 B	28.0	0.13
	28－35	11.0	1.5
	36－47	45.0	1.4
	48－51	28.0	10.0
2個：1.7Kg 最初の重量	沈殿物、バチルアルコール	145.0	－
	1－2	0.0	－
	3－9	470.0	17.0
	10－11	150.0	1.0
	12－14	140.0	11.0
	15－18 C	275.0	0.14
	19－26 D	100.0	＜0.01
	27－34 E	35.0	0.21
	35－46＋F	175.0	0.30

UVと15%硫酸中5%硫酸セリウムと1：2：97のアニスアルデヒド－硫酸－酢酸のスプレ 試薬を用いて観察した。

* フラクション容量は各19リットルで、同じフラクションは一緒にしTLC比較により濃縮した。TLCシステムは、ブリンクマン シル G／UV254 20×20cmプレート上95：5のメチレンクロライド－メタノールで参考サンプルとしてバチルアルコールを使用した。

【0032】

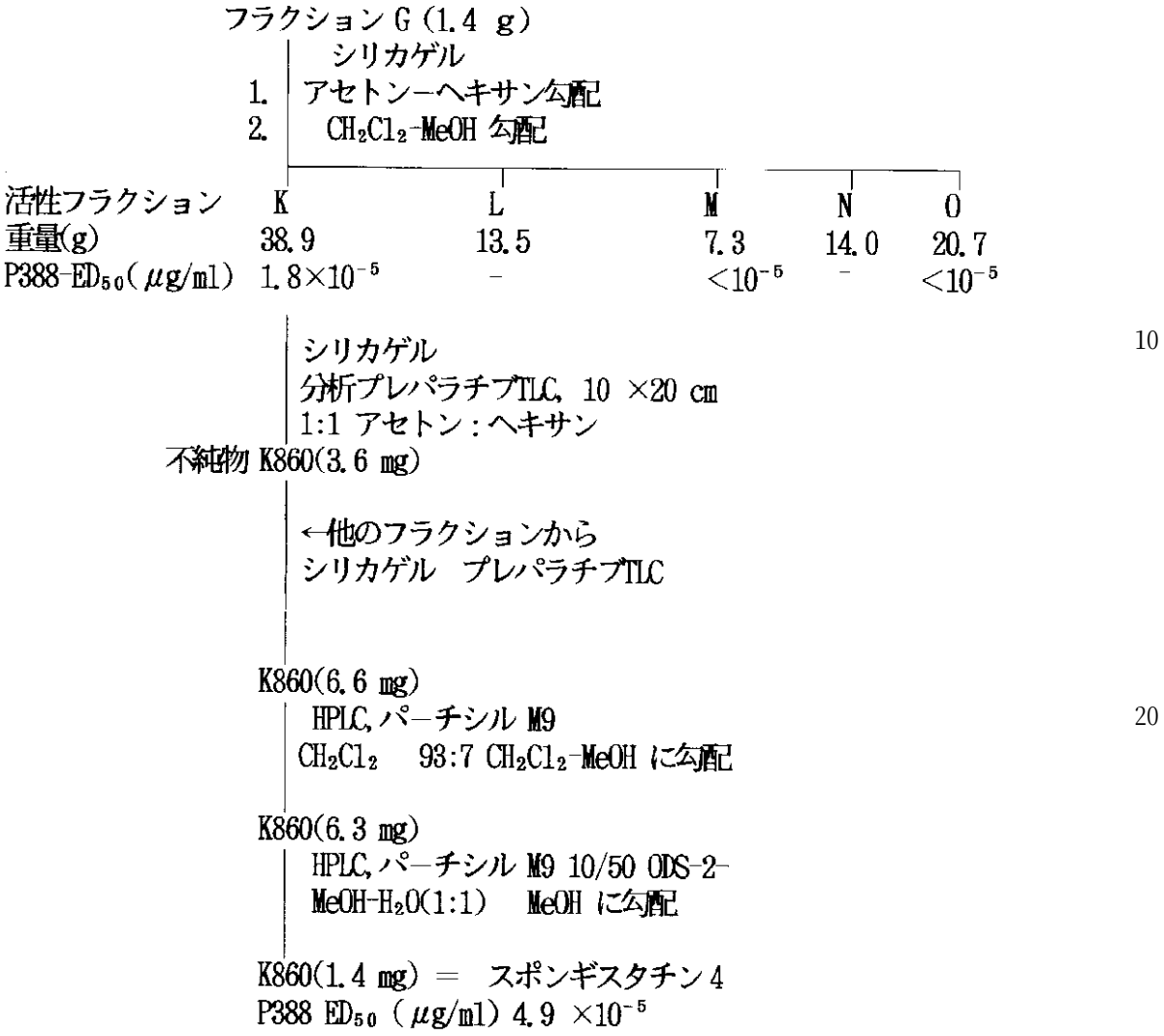
【表6】



分離図 パート5

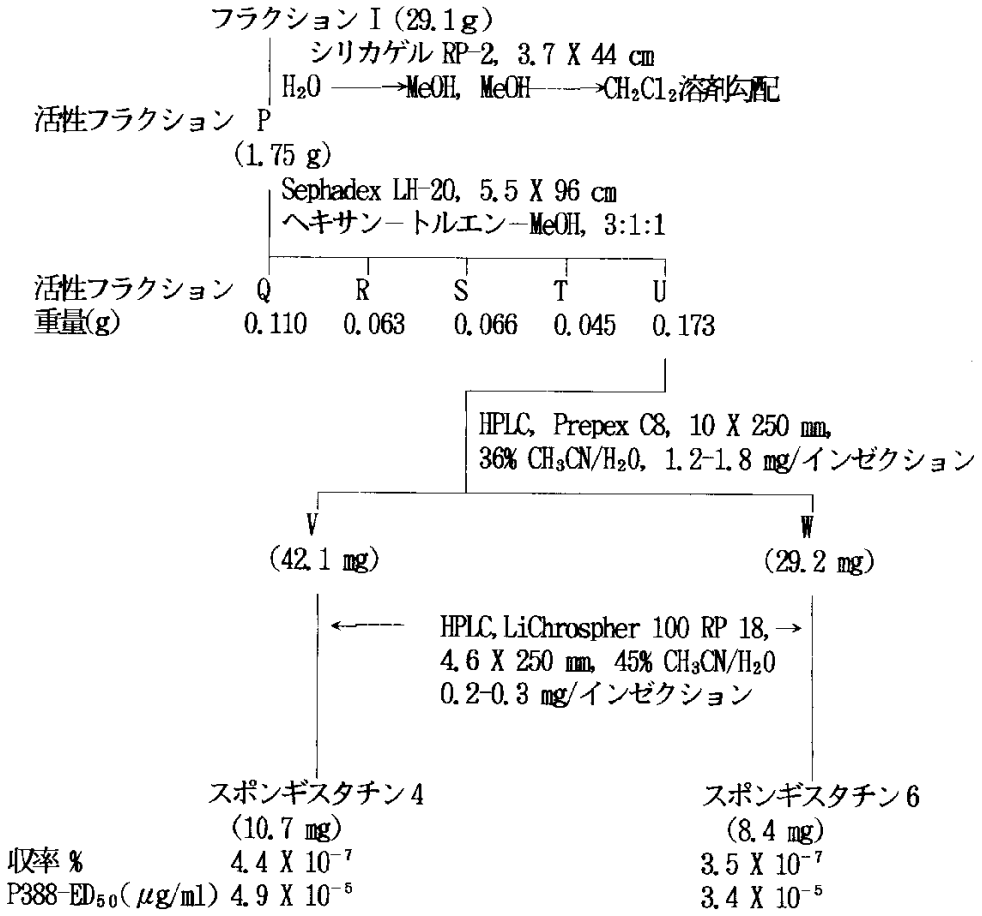
【００３３】

【表７】



分離図 パート6

【００３４】
【表８】



分離図 パート7

【００３５】

スポンギスタチン１の複雑な構造確定は主として高電界（４００及び５００ＭＨｚ）の２Ｄ－ＮＭＲを利用し、広範囲にわたる連結度（ＨＭＢＣ，ＮＯＥ）実験によって成し遂げられた。スポンギスタチン２及び３に対するスポンギスタチン１の一般的関係がひと度明らかにされた後は、構造の解明は著しくスピードアップされた。スポンギスタチン１の構造に到達する為に頼みにされたデータ及びスペクトルの解釈は次の様に利用された。CD_3ODの中のスポンギスタチン２の^{13}C ＮＭＲスペクトルは６３の炭素の信号を示している一方、^{1}H ＮＭＲのスペクトルは、δ １．０４，１．２１，０．９１，０．８４に４つのメチル二重項（ダブレット）信号、δ １．１４に１つのメチル一重項（シングレット）、δ １．８６及び２．０１に２つのアセチルメチルシングレット、又δ３．３３に１つのメトキシルシングレットを、示していた。３つのエステルカルボニル基の存在はδ １７３．５４，１７１．２３，及び１７２．７９の^{13}C ＮＭＲ信号及びδ２．６４（ブロードダブレット、Ｊ＝１８Ｈｚ）、及び２．５７（ダブレット中のダブレット，Ｊ＝１０，１８Ｈｚ）の^{1}H ＮＭＲ信号から明らかであった。ケトンカルボニルとその関連物の存在もδ ２．９２（ダブレットの中のダブレット、Ｊ＝１０，１８Ｈｚ）、２．７４（ブロードダブレット、Ｊ＝１８Ｈｚ）、１．２１（３Ｈ，ダブレット、Ｊ＝７．０Ｈｚ）の信号と、δ２１３．２７，５１．４１，及び１４．２６の^{13}C ＮＭＲ信号によって示唆された。５つの二重結合はδ ４．９２（ブロードシングレット）、４．８５（ブロードシングレット）、５．４０（三重項（トリプレット）、Ｊ＝１０ Ｈ

ｚ）、５．４７（多重項（マルチプレット））、４．９５（ブロードシングレット）、４．９３（ブロードシングレット）、５．７１（ダブレットの中のダブレット、Ｊ＝７．１５Ｈｚ）、６．２３（ダブレットの中のブロードダブレット、Ｊ＝１０，１５Ｈｚ）、６．３４（ダブレットの中のダブレットの中のダブレット、Ｊ＝１０，１０，１６Ｈｚ）、５．１８（ブロードダブレット、Ｊ＝１６Ｈｚ）、５．０５（ブロードダブレット、Ｊ＝１０Ｈｚ）の^{1}Ｈ　ＮＭＲ信号、及びδ　１４８．７１，１１４．８６，１３１．４９，１３４．２５，１４３．９９，１１６．１７，１３７．６６，１３２．０６，１３８．０２，１１７．５２の^{13}Ｃ　ＮＭＲ信号から明らかであった。３つのヘミアセタール又はケタール信号はδ　９９．５９，１００．３１，及び９９．３２で現れた。

【００３６】

上記のＮＭＲ信号はスポンギスタチン２がスポンギスタチン１の構造と類似した構造を持っていると云うことを示唆していた。２Ｄ　ＣＯＳＹ，^{1}Ｈ－^{13}Ｃの相関関係、及びＨＭＢＣスペクトルの詳しい分析がプロトン及び炭素１３信号の割当てを完了させた。スポンギスタチン１とスポンギスタチン２からのＮＭＲデータを直接比較してみると、実際、これ等の２つの化合物の間の相異はＣ－５０にあると云うことが示唆される。δ　５．０５（ブローデンダブレット、Ｊ＝１０Ｈｚ）、５．１８（ブローデンダブレット、Ｊ＝１６Ｈｚ）、及び６．３４（ダブレットの中のダブレットの中のダブレット、Ｊ＝１０，１０，１６Ｈｚ）に於けるスポンギスタチン２の^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトルの中にＡＢＸ　スピン　システムが存在していることがこの仮定を裏付けた。スポンギスタチン２の中のＣ－５１，Ｃ－５０，Ｃ－４９，Ｃ－４８，Ｃ－４７の信号が、スポンギスタチン１の中の対応する化学的シフトと比べてΔδ１．３２，－１．５９，４．１７，－１．２２、及び０．６３ｐｐｍシフトされていると云う観察も、上記の構造的差異と符合している。その他の信号は本質的にスポンギスタチン１のそれと同じであった。かくして、スポンギスタチン１ではＣ－５０に塩素原子が付けられているのに対して、スポンギスタチン２では水素がＣ－５０に付けられていると云うことが明らかになった。CD_3OD　CD_3CHの中でのスポンギスタチン２の広範囲にわたるＨＭＢＣ研究はこの結論を支持していた。

【００３７】

スポンギスタチン３の^{13}Ｃ　ＮＭＲスペクトルは、δ　１７４．００，１７１．１９の２つのエステルカルボニル信号とδ　２１３．１１のケトンカルボニル信号とを含む６１の炭素原子を示していた。３つのヘミアセタール或いはケタール信号がδ　１０１．６４，１００．２９、及び９９．２２で認められた。７つのメチル信号はδ　１１．９３，１４．２５，１１．２５，１１．８３，１２．８５，３０．１０，２０．６７、及び５５．９２に現れた。これ等の中の一つはアセチル基又は一つはメチル基に対応していた。１０のＳＰ^{2}信号がδ　１５０．２９，１１４．２７，１３１．４７，１３４．３４，１４３．８５，１１６．３３，１３８．８３，１２７．９３，１３９．６４、及び１１６．２５で現れた。スポンギスタチン３の^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトルの中では、６つのメチル信号がδ　１．１５（シングレット）、１．８５（シングレット）、１．０３（ダブレット、Ｊ＝６．７Ｈｚ）、１．２１（ダブレット、Ｊ＝７．１Ｈｚ）、０．９１（ダブレット、Ｊ＝７．２Ｈｚ）、０．８４（ダブレット、Ｊ＝６．７Ｈｚ）に対して割り当てられ、メトキシルシングレットはδ　３．３３に対して割り当てられた。これ等は全て、^{13}Ｃ　ＮＭＲスペクトルの中に見られた７つの信号と一致していた。これ等の解釈は、スポンギスタチン３の方がアセチル基が一つ少ないと云うことを除いて、スポンギスタチン３とスポンギスタチン１の構造は密接に関連していると云うことを示唆していた。

【００３８】

スポンギスタチン１とスポンギスタチン３の直接比較によって、Ｃ－４７からＣ－５１迄の領域に於ける^{13}Ｃ　ＮＭＲ信号と^{1}Ｈ　ＮＭＲ信号は非常に良く類似しており、スポンギスタチン３の中に塩素原子が存在していると云うことを示唆していた（このことはＭＳによって確認された）。スポンギスタチン３によってもたらされた２Ｄ　ＣＯＳＹスペクトルの分析から^{13}Ｃ　ＮＭＲ信号と^{1}ＨＮＭＲ信号の割当てが出来た。スポンギスタチン１ではδ　５．０３にあるＨ－５信号がスポンギスタチン３ではδ　４．０１へ反磁

性シフトをしている（結合パターンは同じママである）と云うことからＣ－５にヒドロキシル基があることと、スポンギスタチン３に対する構造３の割当てが確定された。

【００３９】

ひと度スポンギスタチン１の構造が確定され、スポンギスタチン４に対するスポンギスタチン１の関係が明らかにされてしまうと、このＳｐｉｒａｓｔｒｅｌｌａの抗新生物薬的構成成分の構造の解明がスピードアップされた。スポンギスタチン４の^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトル、アセテート１つ、メトキシ１つ、及びその他の５つのメチル基はδ　２．０３（３Ｈ，シングレット）、３．３３（３Ｈ，シングレット）、１．１３（３Ｈ，シングレット）、０．９７（３Ｈ，ダブレット，Ｊ＝６．９Ｈｚ）、１．１２（３Ｈ，ダブレット，Ｊ＝７．３Ｈｚ）、０．９１（３Ｈ，ダブレット，Ｊ＝７．２Ｈｚ）、及び０．８３（３Ｈ，ダブレット，Ｊ＝６．６Ｈｚ）の信号によって明らかであった。アセチルメチルシングレットの化学シフトは、スポンギスタチン３の場合にはこのシングレットがＣ－１５にではなくＣ－５に付けられていると云うことを示唆していた。スポンギスタチン４の２Ｄ　ＣＯＳＹスペクトルの詳細な分析と、Ｈ－５とＨ－１５の化学シフトの差異によってＣ－５アセチル基が容易に確認された。Ｃ－４４からＣ－５１迄の^{13}Ｃ　ＮＭＲ信号と^{1}Ｈ　ＮＭＲ信号は基本的にスポンギスタチン１のそれと同じであり、Ｃ－５０に於ける塩素原子の存在（ＨＲＥＡＢＭＳによって支持された）と符号していた。残りの構造から生じたＮＭＲ信号は本質的にスポンギスタチン３のそれと同じであった。かくして、構造４はスポンギスタチン４に対して割り当てられた。

【００４０】

スポンギスタチン１～４に割り当てられた構造は非常に高電界（４００及び５００ＭＨｚ）の２Ｄ－ＮＭＲと高解像度の質量スペクトル分析の解釈を必要とし、これは極めて困難であった。しかし、これ等の挑戦的な分析の結果はスポンギスタチン６の構造的解明の為に非常に重要であるということが分かった。スポンギスタチン６の高解像度ＦＡＢ質量スペクトルｍ／ｚ１１８５．５［Ｍ＋Ｋ］$^{+}$にピークを合わせることによって$C_{61}H_{94}O_{20}$と云う分子式の割当てを可能にした。スポンギスタチン６の^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトルはスポンギスタチン＝タイプのリングシステムを示唆していた。例えば、スポンギスタチン１～４に存在している４つのメチル信号がδ　０．９７（ｄ，Ｊ＝６．８Ｈｚ）、１．１２（ｄ，Ｊ＝７．１Ｈｚ）、０．９１（ｄ，Ｊ＝７．１Ｈｚ）、及び０．８３（ｄ，Ｊ＝６．６Ｈｚ）で認められた。δ２．９０（ブロードｄ，Ｊ＝１８Ｈｚ）、２．８３に於ける^{1}Ｈ信号とδ２１５．２９に於ける^{13}Ｃ信号はｓｐｏｇｉｐｙｒａｎ　ｃ－１７のカルボニルシステムに特徴的なものであった。δ　５．０４（ブロードｄ，Ｊ＝１１Ｈｚ）、５．１７（ブロードｄ，Ｊ＝１７Ｈｚ）、６．３３（ｄ，ｄ，ｄ，Ｊ＝１１，１１，１７Ｈｚ）に於けるＡＢＸスピンシステムの存在はスポンギスタチン２のそれと同様、Ｃ－５０に塩素原子ではなくプロトンがあると云うことを示唆していた。１つのアセチル基の存在はδ２．０３（ｓ，３Ｈ）１７２．８０及び２１．６５に於ける^{13}Ｃ信号によって明らかであった。^{1}Ｈ－^{1}Ｈ　ＣＯＳＹ実験と^{1}Ｈ－^{13}Ｃ　ＣＯＳＹ実験によって^{1}Ｈと^{13}Ｃの割当てが確定された。δ５．０３（１Ｈ，ブロード　ｓ）及び３．８３（１Ｈ，ブロード　ｄ，Ｊ＝Ｈｚ）に於けるＨ－５及びＨ－１５信号の化学シフトは明らかにＣ－５に於けるアセチル基の存在を指摘していた。これ等の^{1}Ｈと^{13}ＣのＮＭＲの解釈をＨＭＢＣ割当ての結果と組み合わせることによって、スポンギスタチン６に対する構造５の割当てが行われた。

【００４１】

スポンギスタチン１，スポンギスタチン２，スポンギスタチン３，スポンギスタチン４，及びスポンギスタチン６に対するＮＭＲ割当てが下の表Ｉ，ＩＩ，ＩＩＩ，ＩＶ，及びＶに示されている。

【００４２】

米国国立癌研究所の６０のヒト癌細胞系のパネルと対比しながらスポンギスタチン１～４、とスポンギスタチン６を評価してみると、ドラマチックな結果が得られた。米国国立癌研究所の６０の細胞系の試験管内スクリーニングパネルの中でスポンギスタチン１，２，

３，４，及び６を比較テストすることによって、スポンギスタチン１に匹敵するスポンギスタチン２，３，４，及び６の総合的効能が明らかになった（例えば、パネルの平均Gl_{50}　10^{-10}Ｍ；表ＩＸ）。これ等の化合物は今日迄米国国立癌研究所のスクリーンの中でテストされた全ての物質の中でも最も効能の高いもののグループに属している。興味深いことに、最近米国国立癌研究所のスクリーニングパネルの中に組み込まれた幾つかのヒト乳癌細胞系は最も敏感なもののグループに属していた（例えば、Gl_{50}　10^{-11}～10^{-12}Ｍ）。この興味深い抗新生物薬的物質新しいファミリーの中でこれ迄に観察された構造上の様々なバリエーションは重要な試験管内活性の諸属性に重要な損失をもたらすものではない。これ等の構造上のバリエーションが生体内活性の効能に対してどの様な得失をもたらすと云うことは未だ分かっていないが、試験管内でこの様に注目すべき活性を示す全ての入手可能な化合物についての将来の生物学的評価の中で明らかにされて行くであろう。

【００４３】

【表９】

	^{13}C(100 MHz)	XHCorr.(400 MHz)	HMBC(500 MHz, C to H)
1	173.07		H-2;H-41
2	40.86	2.44 dd(10,18) 2.53 dd(2,18)	H-4
3	63.59	4.25 brt(10)	H-2;H-8
4	34.65	1.55*;1.68*	H-2;H-6
5	67.06	4.92 brs	
6	38.17	1.67 dd(5,14); 1.78 brd(14)	H-5;H-8
7	99.26		H-6;H-8;H-9a
8	46.76	1.47 d(14);1.60*	H-9a;H-6
9	69.64		H-9a;OH(C9);H-8
9a	30.21	1.06 s	H-8;H-10
10	44.96	1.28*;1.55*	H-9a;H-12;H-8
11	65.00	4.25 brt(10)	H-12;H-13a;H-15;H-6
12	44.24	1.99*;2.27 brd(14)	H-10;H-13a
13	148.03		H-12;H-13a;H-14a;H-15
13a	114.86	4.83 brs;4.83 brs	H-12;H-14
14	36.60	2.78*	H-13a;H-14a;H-15;H-16;H-12
14a	12.09	1.04 d(6.9)	H-15
15	75.34	5.12 dd(1.7,11)	H-13a;H-14a;H-16;H-16a
16	47.62	3.04 dq(7,11)	H-15;H-16a
16a	13.73	1.15 d(7)	H-15;H-16
17	213.52		H-16;H-16a;H-18;H-15
18	51.94	2.62 brd(18) 2.86 dd(11,18)	H-16;H-20
19	66.16	4.00 brt(11)	H-18
20	37.70	0.97 ddd(12,12,12); 1.98*	H-18;H-22
21	73.98	3.46 tt(4,4,12,12)	H-22;H-OMe;H-20
22	44.18	1.08 t(12);1.99*	H-21;H-20
23	99.91		H-18;H-22;H-24;H-27
24	34.91	1.55*;2.28*	H-22
25	64.41	3.93 brm	H-26;H-27;H-24
26	39.11	1.57*;1.57*	H-28;H-24

^{13}C(100 MHz)	XHCorr.(400 MHz)	HMBC(500 MHz, C to H)
27 61.22	5.00 ddd(4.3,10,10)	H-26;H-29
28 131.22	5.32 brt(10)	H-27;H-30
29 133.42	5.48 ddd(10,10,10)	H-27;H-30
30 28.07	2.00*;2.19*	H-28;H-29;H-31;H-32
31 27.04	1.23*;1.60*	H-29;H-33;H-30;H-32
32 32.82	1.30 m;1.42 m	H-33
33 67.15	4.13 dt(3.4,3.4,8)	H-34a
34 39.32	1.57 m	H-34a;H-36
34a 11.55	0.81 d(7)	H-33;H-34
35 71.47	3.65 brs	H-34a;H-33;H-36
36 33.79	1.61*;1.89*	OH(C37);H-34
37 99.41		H-33;H-36;OH(C37),H-38
38 73.11	3.34 brs	H-36
39 81.30	3.72 brd(10)	H-40a;H-41
40 37.26	1.91*	H-40a;H-39;H-41
40a 12.69	0.74 d(7)	H-40;H-41
41 80.60	4.75 dd(9,11)	H-40a;H-39;H-40; H-42;H-43
42 73.11	3.12 t(9)	H-40;H-41;H-43;H-40a
43 78.72	3.39 brt(9)	H-39;H-41;H-42;H-44
44 40.24	2.08*;2.76 brd(13)	H-42;H-46;H-45a
45 144.00		H-45a;H-43;H-44; H-46;H-47
45a 116.61	4.86 brs;4.89 brs	H-44;H-46
46 43.93	2.33 brdd(7,14); 2.19*	H-44;H-45a
47 70.13	4.36 ddd(6,7,11)	H-46;H-48
48 139.21	6.11 dd(6,15)	H-46;H-47
49 126.99	6.41 brd(15)	H-47;H-48;H-51
50 139.21		H-48;H-49;H-51
51 116.48	5.35 brs;5.45 brs	H-48;H-49
OMe 55.72	3.24 s	H-21
OAc 21.78	1.94 s	
171.61		H-OAc(δ1.94);H-5
OAc 21.00	1.84 s	
170.21		H-OAc(δ1.84);H-15
OH(C25)	4.39 d(9.9)	
OH(C37)	4.73 d(2)	
OH(C9)	4.32 brs	
OH	3.83 brm	

【００４４】
【表１０】

	^{13}C(100 MHz)	^{1}H(400 MHz)
1	172.99p	
2	40.79p	2.53 dd(2,16); 2.48 dd(10,16)
3	63.53n	4.26 *
4	34.57p	1.55 *; 1.69 *
5	66.98n	4.94 brs
6	38.08p	1.79 *; 1.68 *
7	99.18p	
8	46.67p	1.48 d(14); 1.61 *
9	69.56p	
9a	30.12n	1.07 s
10	44.88p	1.55 *; 1.28 *
11	64.61n	4.26 *
12	44.11p**	2.28 *; 2.02 *
13	147.95p	
13a	114.79p	4.85 brs; 4.85 brs
14	36.51n	2.79 *
14a	12.02n	1.06 d(7)
15	75.26n	5.12 dd(2,10)
16	47.52n	3.06 brdq(7.2,10)
16a	13.63n	1.17 d(6.8)
17	213.38p	
18	51.86p	2.87 dd(10,18); 2.63 brd(18)
19	66.06n	4.01 brt(11)
20	37.62p	0.98 ddd(11,12,12)
21	73.90n	3.48 brm
22	43.92p**	1.99 *; 1.08 *
23	98.82p	
24	34.82p	2.29 brd(12); 1.55 *
25	64.31n	3.95 brm
26	38.99p	1.55 *; 1.55 *
27	61.13n	5.02 ddd(4,10,10)
28	131.14n	5.34 brt(10)
29	133.36n	5.50 brddd(7,8,10)
30	27.98p	2.21 *; 2.02 *
31	26.93p	1.62 *; 1.28 *
32	32.74p	1.42 *; 1.33 *
33	67.06n	4.14 dt(8.4)
34	39.23n	1.60 *
34a	11.47n	0.83 d(7.2)
35	71.40n	3.68 brs
36	33.69p	1.90 *; 1.60 *
37	99.33p	

38	73.02n	3.36 brd(9)
39	81.21n	3.75 brd(10)
40	37.18n	1.90 *
40a	12.61n	0.76 d(7.2)
41	80.54n	4.76 dd(8.4,9)
42	73.02n	3.13 brt(9)
43	78.61n	3.40 brt(9)
44	40.08p	2.77 brd(14); 2.03 *
45	144.13p	
45a	116.21p	4.88 brs; 4.85 brs
46	44.17p**	2.34 brdd(6,12); 2.15 *
47	70.68n	4.26 *
48	138.28n	5.72 dd(6,15)
49	130.97n	6.23 brdd(11,15)
50	137.80n	6.36 ddd(11,11,16)
51	117.38p	5.20 dd(2,16)
OMe	55.64n	3.26 s
OAc	171.54p	
	21.70n	1.96 s
OAc	170.11p	
	20.92n	1.86 s
C- 9 OH		4.34 s
C-25 OH		4.40 *
C-35 OH		3.85 m
C-37 OH		4.74 d(2)
C-38 OH		2.88 *
C-42 OH		4.40 *

【００４５】
【表１１】

	^{13}C(100 MHz)	^{1}H(400 MHz)
1	174.00	
2	40.29	2.68;2.62
3	62.98	4.25 brt(10)
4	37.86	1.60 *; 1.60 *
5	66.14	4.01 brs
6	39.81	1.82 brd(14); 1.70 *
7	101.64	
8	46.15	1.73 *; 1.57 d(14)
9	69.76	
9a	30.10	1.15 s
10	45.03	1.68 *; 1.44 brt(12)
11	65.91	4.64 brt(11)
12	44.30	2.47 brd(14);2.15 *
13	150.29	
13a	114.27	4.89 *; 4.89 *
14	37.13	3.00 brm
14a	11.93	1.03 d(6.7)
15	75.04	5.38 *
16	46.08	3.10 dq(7,11)
16a	14.25	1.21 d(7.1)
17	213.11	
18	51.22	2.92 dd(11,18); 2.74 brd(18)
19	66.56	4.09 brt(11)
20	37.97	2.05 *;1.02 *;
21	74.64	3.57 m
22	44.32	2.05 *; 1.20 *
23	100.29	
24	34.88	2.38 brd(14); 1.62 *
25	65.10	4.01 brs
26	39.07	1.64 *; 1.64 *
27	61.69	5.03 m
28	131.47	5.40 *
29	134.34	5.48 m
30	28.26	2.15 *; 2.15 *
31	27.70	1.74 *; 1.28 *
32	33.38	1.45 *; 1.28 *
33	68.00	4.20 brd(8)
34	40.04	1.62 *
34a	11.83	0.91 d(7.2)
35	72.13	3.77 brd(2.7)
36	34.17	2.02 *; 1.66 *
37	99.22	
38	73.45	3.41 brs

39	81.83	3.82 brd(10)
40	37.69	1.98 m
40a	12.85	0.84 d(6.7)
41	80.74	4.89 *
42	73.66	3.18 t(9)
43	79.97	3.43 brt(9)
44	40.68	2.80 brd(14); 2.20 *
45	143.85	
45a	116.33	4.98 brs; 4.97 brs
46	44.30	2.36 dd(6,14); 2.26 brdd(6,14)
47	71.10	4.38 ddd(6,6,6)
48	138.83	6.15 dd(6,15)
49	127.93	6.42 brd(15)
50	139.64	
51	116.25	5.44 brs;5.35 brs
OMe	55.90	3.33 s
OAc	171.19	
	20.67	1.85 s

【００４６】
【表１２】

	^{13}C(100 MHz)	^{1}H(400 MHz)	HMBC(500 MHz, C to H)
1	173.42p		H-41,H-2,H-3
2	39.98p	2.65 *; 2.60 *	
3	62.73n	4.39 *	H-2
4	34.86p	1.74 *; 1.60 *	H-6
5	67.85n	5.02 brs	H-6
6	38.37p	1.93 brd(14); 1.72 *	H-5,H-8
7	99.59p		H-5,H-6
8	46.86p	1.69 *; 1.49 d(14)	H-9a,H-6,H-10
9	70.26p		H-9a
9a	30.02n	1.13 s	H-8
10	45.42p	1.55 brd(12); 1.35 t(12)	H-8,H-9a
11	64.96n	4.67 brt(11)	H-12
12	44.45p	2.27 *;2.23 *	H-13a,H-10
13	148.46p		H-14a,H-13a,H-12,H-14,H-15
13a	114.91p	5.04 brs; 4.92 brs	H-12,H-14
14	37.56n	2.82 *	H-13a,H-14a,H-12,H-15
14a	11.30n	0.97 d(6.9)	H-15
15	73.75n	3.82 brd(9)	H-16a,H-14a
16	49.99n	2.82 *	H-16a,H-15
16a	14.25n	1.12 d(7.3)	H-15
17	215.29p		H-15,H-16a,H-18
18	52.34p	2.89 *; 2.80 *	H-20
19	66.67n	4.11 brdd(10,12)	H-18,H-20
20	38.01p	2.05 *; 1.02 ddd(12,12,12)	H-22
21	74.65n	3.58 m	H-OMe,H-20,H-22
22	44.13p	2.05 *; 1.21 t(12)	
23	100.18p		H-25,H-24,H-22
24	34.86p	2.41 brd(14); 1.63 *	H-22
25	65.22n	4.04 brs	H-24
26	39.16p	1.64 *; 1.64 *	H-24,H-28
27	61.74n	5.03 t(4,9,11)	H-25,H-28,H-29
28	131.43n	5.41 brt(11)	H-27
29	134.08n	5.48 ddd(5,9,11)	H-27
30	28.19p	2.18 *; 2.14 *	H-28
31	27.67p	1.72 *; 1.27 *	H-33
32	33.29p	1.44 *; 1.28 *	H-33
33	67.99n	4.20 brd(8)	H-34a,H-35
34	39.98n	1.62 *	H-34a,H-36

34a	11.92n	0.91 d(7.2)	H-33
35	72.07n	3.77 brd(3)	H-34a,H-36
36	34.18p	2.01 *; 1.66 *	H-38
37	99.26p		H-35,H-38
38	73.38n	3.40 brs	
39	81.80n	3.80 brd(9)	H-40,H-40a
40	37.71n	2.00 m	H-38,H-40a
40a	12.86n	0.83 d(6.6)	H-40
41	80.55n	4.85 t(9)	H-39,H-40,H-40a,H-42
42	73.75n	3.16 t(9)	H-41,H-43,H-44
43	79.89n	3.41 brt(9)	H-44
44	40.68p	2.80 *; 2.18 *	H-45a,H-46
45	143.85p		H-45a,H-47,H-43,H-44,H-46
45a	116.33p	4.97 brs; 4.96 brs	H-44,H-46
46	44.32p	2.33 dd(7,14); 2.26 brdd(7,14)	H-44,H-45a,H-47,H-48
47	71.08n	4.38 *	H-46,H-48,H-49
48	138.80n	6.14 dd(6,15)	H-46,H-47
49	127.88n	6.42 brd(15)	H-47,H-51
50	139.62p		H-48,H-49,H-51
51	116.18p	5.43 brs;5.34 brs	H-49
OMe	55.87n	3.33 s	
C-5Ac	172.80p		H-OAc
	21.63n	2.03 s	

【００４７】
【表１３】

	^{13}C(100 MHz)	^{1}H(400 MHz)	HMBC(500 MHz, C to H)
1	173.44p		H-41
2	40.01p	2.66 brd(18; 2.60 dd(10,18)	
3	62.76n	4.40 brdd(10,12	H-2, H-8
4	34.89p	1.76 *; 1.61 *	
5	67.88n	5.03 brs	
6	38.41p	1.94 brd(14);1.72*	H-8
7	99.63p		H-8
8	46.90p	1.71 *; 1.50 d(14)	H-9a,H-6,
9	70.27p		H-9a,H-8
9a	30.06n	1.13 s	H-8
10	45.42p	1.55 brd(12); 1.36 brdd(12,14)	H-8,H-9a
11	64.98n	4.68 brdd(10.12)	H-8
12	44.45p	2.27 *;2.22 *	H-10
13	148.50p		H-13a,H-14a,H-12,H-15
13a	114.93p	5.04 brs; 4.92 brs	H-12
14	37.61n	2.82 *	H-13a,H-14a,H-12
14a	11.33n	0.97 d(6.8)	H-15
15	73.78n	3.83 brd(9)	H-16a,H-14a
16	50.03n	2.80 *	H-16a,H-15
16a	14.27n	1.12 d(7.1)	H-15,H-16
17	215.29p		H-15,H-16a,H-18
18	52.37p	2.90 brd(18);2.80*	H-20,H-16
19	66.70n	4.11 brdd(10,12)	H-18,
20	38.05p	2.04 *; 1.02 ddd(12,12,12)	H-22,H-18
21	74.68n	3.59 m	H-OMe,H-22
22	44.17p	2.06 *; 1.21 t(12)	
23	100.21p		H-24
24	34.89p	2.41 brd(14);1.64*	
25	65.26n	4.04 brs	
26	39.18p	1.64 *; 1.64 *	
27	61.76n	5.09 m	H-29
28	131.48n	5.41 brdd(10,11)	H-27
29	134.12n	5.41 m	H-27
30	28.18p	2.17 *; 2.13 *	
31	27.66p	1.74 *; 1.28 *	
32	33.29p	1.45 *; 1.27 *	
33	68.01n	4.20 brd(9)	H-34a,
34	40.01n	1.62 *	H-34a,H-36, H-35

34a	11.95n	0.91 d(7.1)	H-35
35	72.13n	3.78 brd(3)	H-34a,H-36
36	34.20p	2.02 *; 1.68 *	H-38, H-35
37	99.31p		H-36,H-38
38	73.42n	3.39 brs	H-36,H-40
39	81.82n	3.81 brd(9)	H-40a
40	37.74n	1.98 m	H-38,H-40a,H-39,H-41,H-42
40a	12.89n	0.83 d(6.6)	H-40,H-41
41	80.59n	4.85	H-39,H-40a,H-42
42	73.74n	3.15 t(9)	H-41,H-44
43	79.95n	3.40 brt(9)	H-42,H-39
44	40.60p	2.78 *; 2.16 *	H-42,H-46
45	144.01p		H-47,H-44,H-46
45a	116.11p	4.95 brs; 4.93 brs	H-44,H-46
46	44.45p	2.34 dd(7,14);2.16*	H-44,H-48
47	71.67n	4.28 ddd(6.5,7,7)	H-46,H-48,H-49
48	137.67n	5.71 dd(6.5,15)	H-46,H-47,H-50
49	132.02n	6.23 brdd(11,15)	H-47,H-51,H-50
50	138.01p	6.33 ddd(11,11,17)	H-49,H-51
51	117.50p	5.17 brd(17); 5.04 brd(11)	H-49
OMe	55.90n	3.33 s	H-21
C-5Ac	172.80p		H-OAc
	21.63n	2.03 s	

【００４８】
スポンギスタチン１と比較されたこれ等の新しい化合物の構造が下に示される：
【化１】

1　R＝Cl，R_1＝R_2＝$COCH_3$　スポンギスタチン１

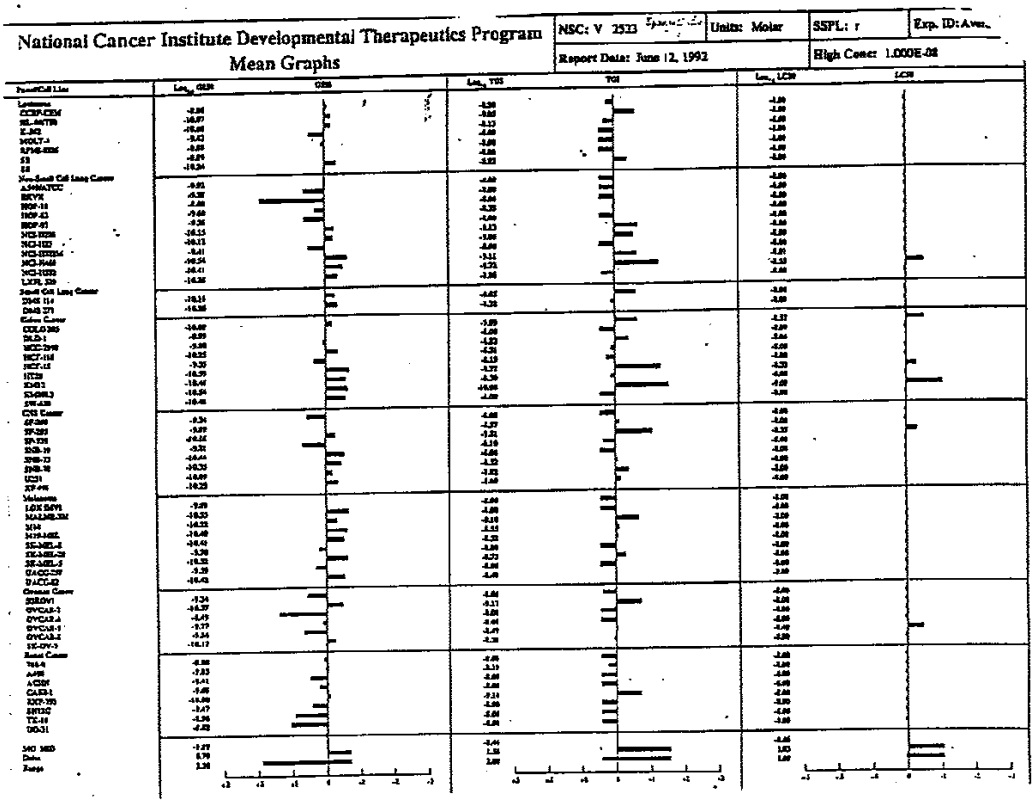
2　R＝H，　R_1＝R_2＝$COCH_3$　スポンギスタチン２

3　R＝Cl，R_1＝H，R_2＝$COCH_3$　スポンギスタチン３

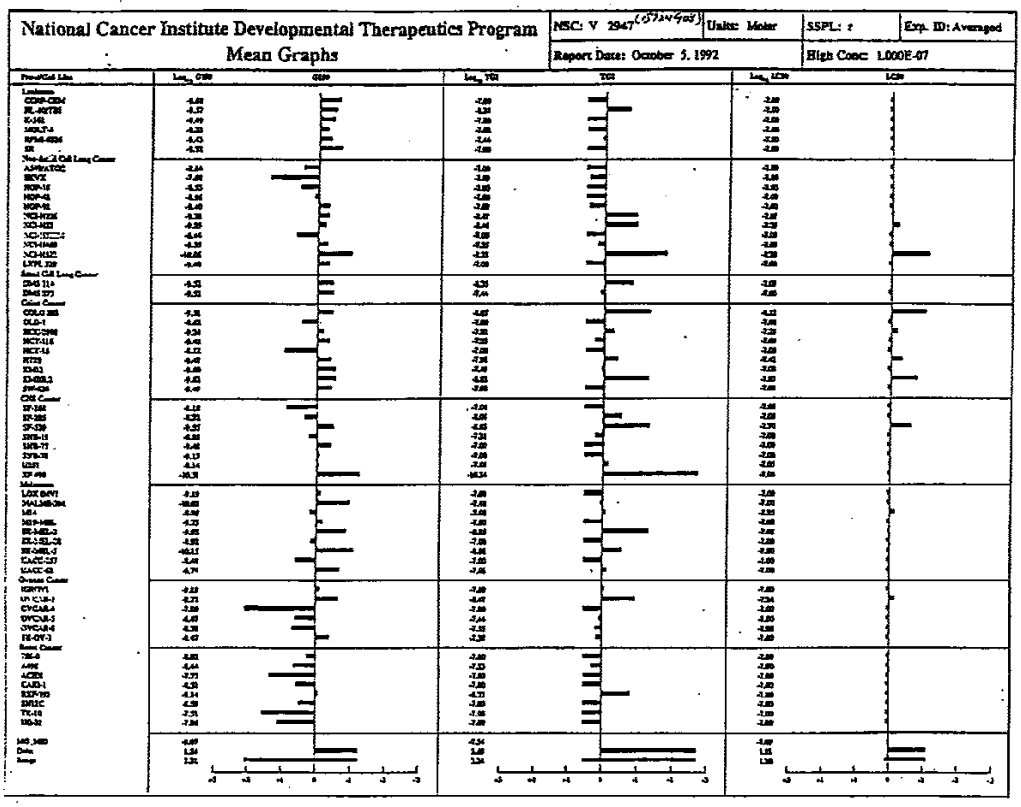
4　R＝Cl，R_1＝$COCH_3$，R_2＝H　スポンギスタチン４

5　R＝H，　R_1＝$COCH_3$，R_2＝H　スポンギスタチン５

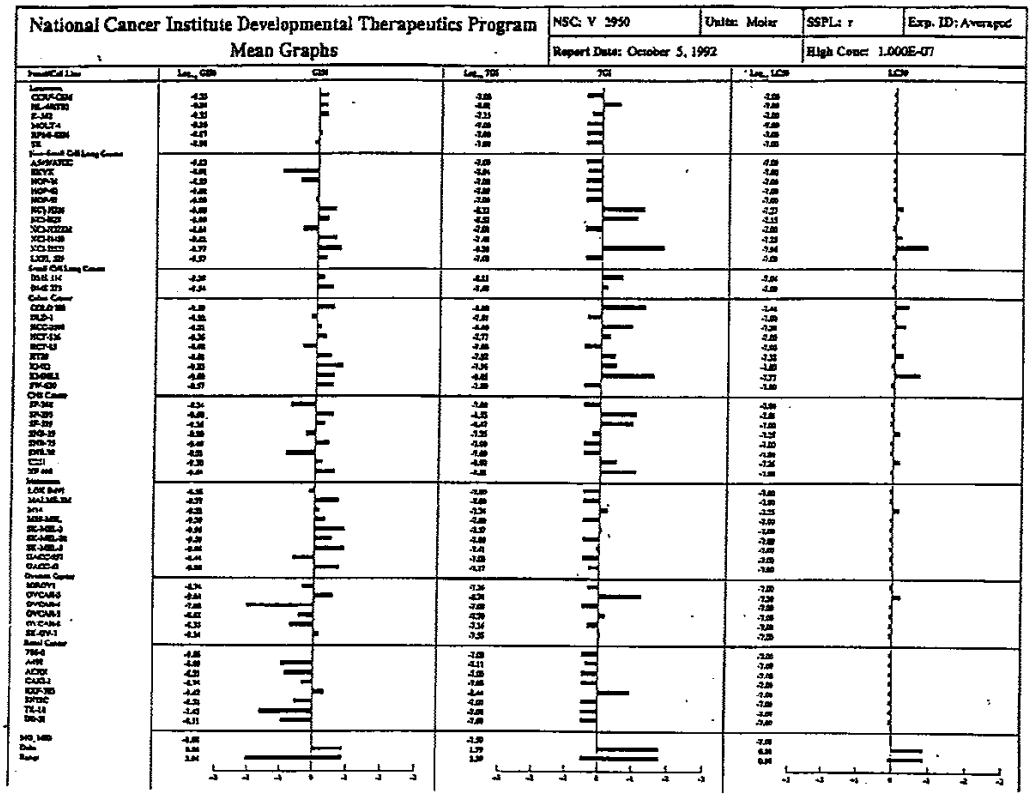
【００４９】
スポンギスタチン１，スポンギスタチン２，スポンギスタチン３，スポンギスタチン４，及びスポンギスタチン６の為の米国国立癌研究所の細胞系のパネルがそれぞれ表１４、１５、１６、１７及び１８に示されている。見られる通り、スポンギスタチン２，スポンギスタチン３，スポンギスタチン４，及びスポンギスタチン６はスポンギスタチン１と比較的高い相関関係を持っている。表２０に示されている様に、標準実験動物に対する移植癌の治療に用いられた場合、動物の実験データはスポンギスタチン１では１０μｇ／ｋｇの用量で７８％の寿命延長（ｉｎｃｒｅａｓｅｄ　ｌｉｆｅ　ｓｐａｎ＝ＩＳＬ）であるのに対してスポンギスタチン４では５μｇ／ｋｇの用量で５５％の寿命延長を示した。スポンギスタチン１とスポンギスタチン２，３，４，及び６との間の高い相関関係と、その他の関連する比較データが表１９に示されている。
【表１４】


National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program
Mean Graphs
NSC: V 2513
Units: Molar
SSPL: r
Exp. ID: Aver.
Report Data: June 12, 1992
High Conc: 1.000E-08
GI50
TGI
LC50

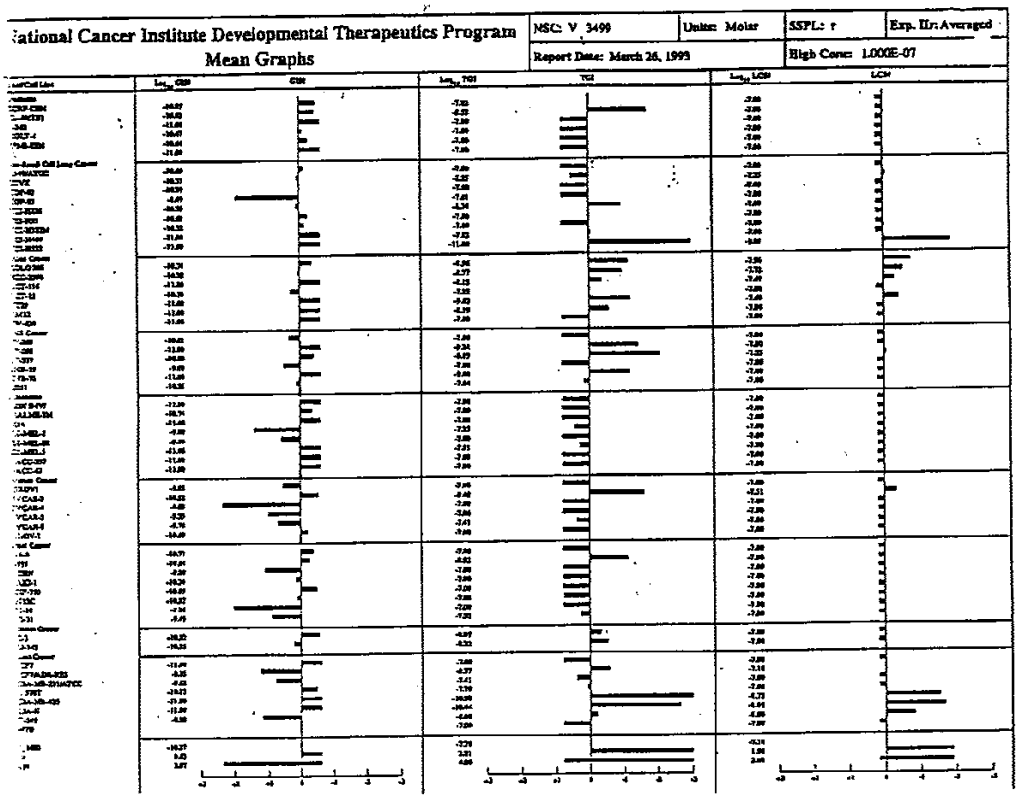
【００４５】
【表１５】


National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program
Mean Graphs
NSC: V 2947
Units: Molar
SSPL: 2
Exp. ID: Averaged
Report Date: October 5, 1992
High Conc: 1.000E-07

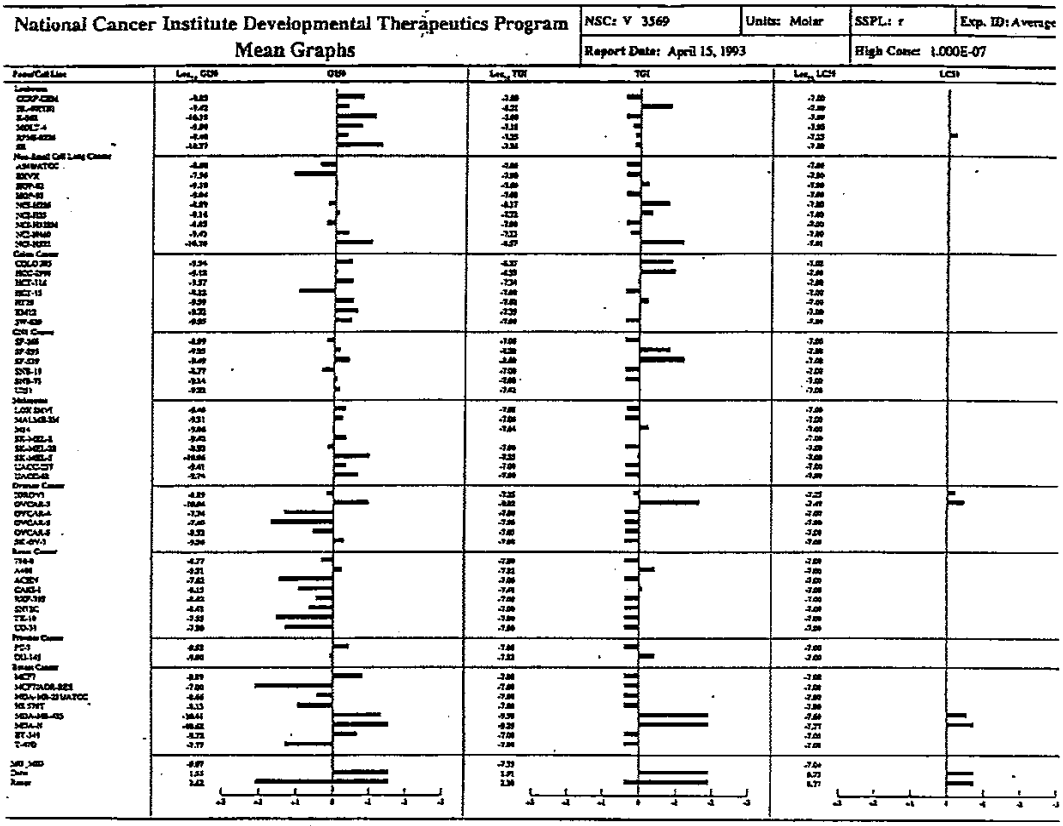
【００４６】
【表１６】


National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program
Mean Graphs
NSC: V 3950
Units: Molar
SSPL: 1
Exp. ID: Averaged
Report Date: October 5, 1992
High Conc: 1.000E-07
GI50
TGI
LC50

【００４７】
【表１７】


National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program
Mean Graphs
NSC: V 3499
Units: Molar
SSPL: 1
Exp. ID: Averaged
Report Date: March 26, 1999
High Conc: 1.00E-07
GI50
TGI
LC50

【００４８】
【表１８】



【００４９】
【表１９】

NCI IN VITRO プライマリークリーン[a]におけるスポンギスタチン１、２、３、４及び６の抗がん性の比較測定の結果

スポンギスタチン	平均パネルGI_{50}（$\times 10^{-10}$ M）[b]	比較相関係数[c]
1	1.17	1.00
2	8.51	0.83
3	8.32	0.90
4	1.02	0.93
6	10.7	0.86

[a] 全ての化合物を、NCIスクリーンから成る６０のヒトのがん細胞ラインの全パネルに対して５つの異なる濃度（10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}及び10^{-12} M）において４重にテストした。
[b] 標準誤差はそれぞれの手段の１５％以下に平均した。
[c] 比較パターンレコグニションアルゴリズムからの相関係数は、１及び５に対する異なった細胞感受性のＴＧＩ平均グラフプロフイルを用いてコンピューターによって計算した。１のＴＧＩ平均グラフプロフイルは、全ての比較に対してベンチマーク又はシードとして用いた。

【００５０】

【表２０】

スポンギスタチン１、４、及び６にたいするIN VIVO データ

化合物	投与量（μg/Kg/ 投与）	％ ＩＬＳ
スポンギスタチン１	４０．０	－１０（毒性）
	２５．０	＋３３
	１０．０	＋７２
スポンギスタチン４	５．０	＋５５
スポンギスタチン６	４０．０	＋７０

がんシステム：Ｐ３８８；
移植材料　：ＩＰ　1.0　Ｅ　＋０６細胞；
ホスト　：ＣＤ２Ｆ１　雌マウス；
死の中央値　：１０；
スケジュール：ＩＰ、　ＱＩＤ×９（１）；
ビヒクル　：５％ＥＴＯＨ＋蒸留水；
％ＩＬＳ　：コントロールに対し生命スパンにおいて%増加。

【００５１】
（分類上並びに地理的に）非常に離れたＰｏｒｉｆｅｒａ種の中に於けるスポンギスタチンの発見は、この非常に重要な注目すべき抗新生物薬物質の新しいシリーズがその様な海洋無脊椎動物及び／又はそれに関連する海洋微生物の中に広く分布しているということを証明しているのかもしれない。興味深いことに、最近行われたＰｏｒｉｆｅｒａの初めての研究は最も遠隔の南太平洋の島であるイースター島の近くの同じ一般的な区域でＳｐｉｒａｓｔｒｅｌｌａ　ｃｕｎｃｔａｔｒｉｘとＳｐｏｎｇｉａｖｉｒｇｕｌｔｏｓａの両方を発見した。これ等の２つの海綿について将来スポンギスタチンの検査をすればきっと有用であることが明らかになるに違いない。現在我々はこれ等のスポンギスタチンの更に詳しい生体内ヒト癌異種移植評価を行っており、ｘ線結晶構造確定法によるスポンギスタチンに対する絶対的構造の割当ての完了に向けて研究が行われている。
これ等の化合物の各々は又下記の酸類の幾つか又は全てによって効果的に変形させることも出来る。
【００５２】
（ａ）飽和又は不飽和の、直鎖形又は分枝形脂肪族カルボン酸、例えば、酢酸、プロピオン酸、ブチル酸、イソブチル酸、第二ブチル酢酸、吉草酸、イソ吉草酸、カプロン酸、カプリル酸、デカン酸、ドデカン酸、ラウリン酸、トリデカン酸、ミリスチン酸、ペンタデカン酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、アクリル酸、クロトン酸、ウンデシレン酸、オレイン酸、ヘキシノン酸、ヘプチノン酸、オクチノン酸、等；（ｂ）飽和又は不飽和の、脂環式カルボン酸、例えば、シクロプタンカルボン酸、シクロペンタンカルボン酸、シクロペンテンカルボン酸、メチルシクロペンテンカルボン酸、シクロヘキサンカルボン酸、ジメチルシクロヘキサンカルボン酸、ジプロピルシクロヘキサンカルボン酸、等；（ｃ）飽和又は不飽和の、脂環式脂肪族カルボン酸、例えば、シクロペンタン酢酸、シクロペンタンプロピオン酸、シクロヘキサン酢酸、シクロヘキサンブチル酸、メチルシクロヘキサン酢酸、等；（ｄ）芳香族カルボン酸、例えば、安息香酸、トルイン酸、ナフトエ酸、エチル安息香酸、イソブチル安息香酸、メチルブチル安息香酸、等；及び（ｅ）芳香族＝脂肪族カルボン酸、例えば、フェニル酢酸、フェニルプロピオン酸、フェニル吉草酸、ケイ皮酸、フェニルプロピオプリン酸、及びナフチル酢酸、等。適当なハロ＝、ニトロ＝、ヒドロキシ＝、ケト＝、アミノ＝、シアノ＝、チオシアノ＝、及び低級アルコ

キシ＝炭化水素カルボン酸の中には、一つ又はそれ以上のハロゲン、ニトロ、ヒドロキシ、ケト、アミノ、シアノ、又はチオシアノ、或いは低級のアルコキシ、好ましくは炭素原子６個以下の低級アルコキシ、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、アミルオキシ、ヘキシルオキシ、及びそれ等の異性体、によって置換された上記の炭化水素カルボン酸が含まれる。その様な置換された炭化水素カルボン酸の例として次のものを挙げられる：モノ＝、ジ＝、及びトリ＝クロロ酢酸；モノ＝、ジ＝、及びトリ＝クロロプロピオン酸；モノ＝、ジ＝、及びトリ＝ブロモブチル酸；モノ＝、ジ＝、及びトリ＝ヨード吉草酸；メバロン酸；２＝及び４＝クロロシクロヘキサンカルボン酸；シキミ酸；２＝ニトロ＝１＝メチル＝シクロブタンカルボン酸；１，２，３，４，５，６＝ヘキサクロロシクロヘキサンカルボン酸；３＝ブロモ＝２＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；４＝及び５＝ブロモ＝２＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；５＝及び６＝ブロモ＝２＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；２，３＝ジブロモ＝２＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；２，５＝ジブロモ＝２＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；４，５＝ジブロモ＝２＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；４，５＝ジブロモ＝２＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；５，６＝ジブロモ＝２＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；３＝ブロモ＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；６＝ブロモ＝３＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；１，６＝ジブロモニ＝３＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；２＝ブロモ＝４＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；１，２＝ジブロモ＝４＝メチルシクロヘキサンカルボン酸；３＝ブロモ２，２，３＝トリメチルシクロペンタンカルボン酸；１＝ブロモ＝３，５＝ジメチルシクロヘキサンカルボン酸；ホモゲンチジン酸；ｏ＝、ｍ＝、及びｐ＝クロロ安息香酸；アニス酸；サリチル酸；ｐ＝ヒドロキシ安息香酸；ｂ＝レゾルシン酸；没食子酸；ベラトルム酸；トリメトキシ安息香酸；トリメトキシ桂皮酸；４，４′＝ジクロロベンジル酸；ｏ＝、ｍ＝、及びｐ＝ニトロ安息香酸；シアノ酢酸；３，４＝及び３，５＝ジニトロ安息香酸；２，４，６＝トリニトロ安息香酸；チオシアノ酢酸；シアノプロピオン酸；乳酸；エトキシギ酸（エチル水素カルボネート）；リンゴ酸；クエン酸；イソクエン酸；６＝メチルサリチル酸；マンデル酸；レブリン酸；ピルビル酸；アミノ酢酸（グリシン）；アラニン；バリン；イソロイシン；ロイシン；フェニルアラニン；プロリン；セリン；トレオニン；チロシン；ヒドロキシプロリン；オルニチン；リジン；アルギニン；ヒスチジン；ヒドロキシリジン；フェニルグリシン；ｐ＝アミノ安息香酸；ｍ＝アミノ安息香酸；アントラニル酸；アスパラギン酸；グルタミン酸；アミノアジピン酸；グルタミン、アスパラギン；等。

【００５３】

スポンギスタチン１、２、３、及び４並びにそれ等の、薬学的に活性で、生理学的に同等の誘導体の投与が、例えば、急性ミエロサイト白血病、急性リンパ球性白血病、悪性黒色腫、肺腺癌、神経芽細胞腫、肺の小細胞癌、乳癌；結腸癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、血液学的悪性疾患、等、に罹患した動物又はヒトの治療の為に有用である。

【００５４】

投与される用量は、新生物形成病の実体；年齢、健康状態、及び体重を含む、当該の宿主のタイプ；もしあれば、並行治療の種類；治療の頻度及び治癒比（ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ｒａｔｉｏ）；に依存するであろう。

【００５５】

投与された活性成分の用量レベルを例示すれば次の通りである；静脈注射、０．１からおよそ４０μｇ／ｋｇ迄；筋肉注射、１からおよそ５０μｇ／ｋｇ迄；経口投与、５からおよそ１００μｇ／ｋｇ迄；鼻腔内点滴注入、５からおよそ１００μｇ／ｋｇ迄；及びエーロゾル、５からおよそ１００μｇ／ｋｇ迄。本書内で用いられた場合、μｇ／ｋｇと云う単位はマイクログラム単位の活性成分の重量をｋｇ単位の宿主の体重で割ったものを意味している。

【００５６】

濃度の点から云うと、皮膚の周囲、鼻腔内、咽喉内、気管支内、膣内、直腸内、又は眼内の局所的使用の場合には、活性成分は本発明の化合物の中に、化合物の重量のおよそ０．０１からおよそ５０重量％迄の濃度で、又非経口的投与の場合には化合物の重量のおよそ

０．０５からおよそ５０重量％迄、好ましくはおよそ５からおよそ２０重量％迄、の濃度で、存在し得る。

【００５７】

本発明の化合物は好ましくは、適当な量の活性成分を含んでいる、錠剤、カプセル、丸薬、粉末、顆粒、座薬、滅菌された非経口投与の為の溶液又は懸濁液、滅菌された経口投与の為の溶液又は懸濁液、並びに経口投与の為の溶液又は懸濁液、等の単位用量の形でヒト及び動物に対する投与の為に提供される。

経口投与の為には固体又は液体の単位用量の形で調製され得る。

【００５８】

粉末は活性成分を適当な細かいサイズへ粉砕しこれを同じ様に粉砕された希釈剤と混合することによって極めて簡単に調製される。この希釈剤は、ラクトーズ或いはスターチ（澱粉）等の、食べられる炭水化物とすることが出来る。甘味料或いは砂糖並びに香味油を加えても良い。

【００５９】

カプセルは粉末の混合物を上に説明された様に調製し、この混合物を成形されたゼラチンの包被の中に充填することによって作られる。充填作業の補助剤として、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、等の潤滑剤を、充填作業の前に粉末混合物に添加しておくことが出来る。

【００６０】

ソフトゼラチンカプセルは、受け入れられる植物油、軽質の液体ワセリン或いはその他の不活性オイル又はトリグリセリドと共に活性成分のスラリーを機械でカプセル化することによって調製される。

【００６１】

錠剤は粉末混合物を調製し、顆粒化し或いはスラグ化し、潤滑剤を加えて錠剤の形にプレスすることによって作られる。粉末混合物は適当に粉砕された活性成分を、スターチ、ラクトース、カオリン、燐酸二カルシウム、等の希釈剤又は基剤と混合することによって調製される。粉末混合物は、コーンシロップ、ゼラチン溶液、メチルセルロース溶液、或いはアカシア粘液、の様な結合剤によって湿りけを与えてから、スクリーンを通して押し出すことによって、顆粒化することが出来る。顆粒化する代わりに、粉末混合物をスラグ化することが出来る；即ち、ダブレット機に掛けてから、不完全な形に成形された錠剤を破片（スラグ）に破砕することが出来る。破片は、ステアリン酸、ステアリン酸塩、タルク、或いは鉱油、を添加することによって、錠剤を形成するさいころ形にくっつき合ってしまうのを防止する為に潤滑することが出来る。潤滑された混合物は其れから錠剤の形に圧縮される。

【００６２】

希望があれば、各々の錠剤は、シェラックの密封コート又は腸溶性のコートから成る保護コーティング、砂糖及びメチルセルロースのコーティング、及びカルナウバ蝋（ｃａｒｎａｕｂａ　ｗａｘ）の光沢コーティングを被せることが出来る。シロップ、エリキシル、及び懸濁液、等の、経口投与の為の液状単位用量の形態に仕立てることが出来るが、この場合にはスプーン１杯の化合物の中に投与の為に前以て定められた量の活性成分が含まれる様にする。水溶性の形態は、砂糖、香味剤、及び保存料と共に水性のビークルに解かしてシロップにすることが出来る。エリキシルは、適当な甘味料及び香味剤と共に水性アルコールのビークルを用いて調製される。懸濁液はアカシア粘液、トラガカントゴム（ｔｒａｇａｃａｎｔｈ）、メチルセルロース、等の助けによって不溶性の形態を適当なビークルの中に懸濁させることによって調製することが出来る。

【００６３】

非経口投与の為には、液体単位用量形態は活性成分と滅菌されたビークル、好ましくは水、を用いることによって調製される。活性成分は、用いられる形態と濃度に応じて、ビークルの中に懸濁させ或いは溶解させることが出来る。溶液を調製する際には水溶性の活性成分が注射用の水に解かされ、適当なバイアル又はアンプルに充填される前にろ過滅菌さ

れ、シールされることが出来る。有利なことに、局部麻酔薬、保存剤、及び緩衝剤、等の助剤をビークルの中に溶解することが出来る。非経口投与の為の懸濁液は、活性成分がビークルの中に溶解される代わりに懸濁されること並びに滅菌がろ過によっては達成されないと云うことを除いて、本質的に同じやり方で調製される。活性成分は、滅菌されたビークルの中に懸濁させる前に酸化エチレンに曝すことによって滅菌されることが出来る。活性成分が均一に分布され易くする為に合成物の中に界面活性剤或いは湿潤剤を含めると有利である。

【００６４】

経口或いは非経口投与に加えて、直腸及び膣からの投与法も用いることが出来る。活性成分は座薬によって投与されることが出来る。およそ体温の融解点或いは容易に溶解可能の融解点を持つビークルを利用することが出来る。例えば、ココアバターや様々なポリエチレングリコール（カーボワックス（Ｃａｒｂｏｗａｘｅｓ））をビークルとして用いることが出来る。

【００６５】

鼻腔内滴注の為には、液体単位用量形態は活性成分と適当な薬学的ビークル、好ましくはパイロゲンフリー（“Ｐ．Ｅ．”）ウォーター（＝無カロリー水）、を用いて調製される。投与法として吸入法が選ばれる場合には乾燥粉末を調製することが出来る。

【００６６】

エーロゾルとして使用する場合には、活性成分は、必要に応じて或いは希望に応じて、共同溶媒及び湿潤剤等の通常の助剤を加えて、ガス状或いは液化された噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、二酸化炭素、窒素、プロパン、等、と共に加圧されたエーロゾル容器にパックされることが出来る。

【００６７】

明細書及びクレームの中で用いれらている“単位用量形態”（ｕｎｉｔ　ｄｏｓａｇｅ　ｆｏｒｍ）と云う用語はヒト及び動物の被験者（体）に対する単位用量として適当な物理的に区分された単位を意味しており、各々の単位は、要求される薬学的希釈剤、キャリヤー、或いはビークルと組み合わされて、希望する治療効果を生み出す様に計算された、前以て定められた量の活性物質を含んでいる。本発明の新奇な単位用量形態の仕様は（ａ）活性物質のユニークな特性と達成されるべき特定の治療効果、及び（ｂ）本明細書に開示されている様に、その様な活性物質をヒトの治療の為に合成するやり方に内在している制約、によって指示され且つこれ等にダイレクトに依存しており、これ等のことが本発明の特徴となっている。本発明に合致する適当な単位用量形態の例を挙げれば次の通りである：錠剤、カプセル、トローチ、座薬、粉末包み、ウエハー、ウエハーカプセル（ｃａｃｈｅｔｓ）、茶さじ一杯、テーブルスプーン一杯、スポイトー杯、アンプル、バイアル、上記のものの中のいずれかの倍数、及び本書中に記載されているその他の形態。

【００６８】

抗新生物薬剤として用いられるべき活性成分は、それ自体入手可能であり且つ確立した手順によって調製されることの出来る薬学的材料を用いて、容易に単位用量形態に調製されることが出来る。以下のものは本発明の単位用量形態の調製方法であるが、それ等は決して本発明を限定するものではない。

【００６９】

例１

本発明の実施態様として幾つかの容量形態が調製され得る。それ等は以下の諸例の中で示されるが、その際“活性成分”（ａｃｔｉｖｅ　ｉｎｇｒｅｄｉｅｎｔ）と云う用語はスポンギスタチン１、２、３、４及び６、それ等の合成対応物、並びにそれ等からの非毒性の、薬学的に活性な誘導体を意味している。

組成“Ａ”

硬質ゼラチンカプセル

１カプセルが活性成分２０μｇを含んでいる、経口投与の為のツーピース形の硬質ゼラチンカプセル１０００個が下記の成分の種類と用量から調製される：

活性成分、ミクロン程度の微粉　２０ｍｇ
コーンスターチ　２０ｇ
タルク　２０ｇ
ステアリン酸マグネシウム　２ｇ
エアミクロナイザーを用いて微粉化された活性成分が他の微粉化された成分に加えられ、十分に混ぜ合わされた後、通常のやり方でカプセル化される。
上記のカプセルは１日４回、１～２個ずつ経口投与することによって新生物形成病を治療する為に有用である。
【００７０】
上記の手順を用いて、上で用いられている２０μｍの代わりに５μｍ、２５μｍ、及び５０μｍの活性成分を用いることによって、活性成分５，２５及び５０μｇを含んでいるカプセルを同じ様に調製することが出来る。
組成“Ｂ”
軟質ゼラチンカプセル
１カプセルが（エアミクロナイザーを用いて微粉化された）活性成分２０μｇを含んでいる、経口投与の為のワンピース形の軟質ゼラチンカプセルが、先ずこの材料をカプセル化することが出来る様にする為に化合物を０．５ｍｌのコーンオイルの中に懸濁させ、次いで上と同じやり方でカプセル化することによって調製される。
【００７１】
上記のカプセルは１日１～４回、１～２個ずつ経口投与することによって新生物形成病を治療する為に有用である。
組成“Ｃ”
錠剤
１錠が活性成分２０μｇを含んでいる錠剤１０００錠が下記の成分の種類と用量から調製される：
活性成分、ミクロン程度の微粉　２０ｍｇ
ラクトース（乳糖）　３００ｇ
コーンスターチ　５０ｇ
ステアリン酸マグネシウム　４ｇ
軽質液体ワセリン　５ｇ
エアミクロナイザーを用いて微粉化された活性成分が他の成分に加えられ、十分に混ぜ合わされた後、スラグ化される。スラグは１６番のスクリーンを通すことによって破砕される。得られた顆粒が圧縮されて錠剤にされる；各々の錠剤は活性成分２０μｇを含んでいる。
【００７２】
上記の錠剤は１日１～４回、１～２錠ずつ経口投与することによって新生物形成病を治療する為に有用である。
上記の手順を用いて、上で用いられている２０μｍの代わりに２５ｍｇ、及び１０ｍｇの活性成分を用いることによって、活性成分２５、及び１０μｇを含んでいる錠剤を同じ様に調製することが出来る。
組成“Ｄ”
経口懸濁液
茶さじ一杯（５ｍｌ）の用量の中に活性成分５μｇを含んでいる、経口投与用の水性懸濁液１０００ｍｌが下記の成分の種類と用量から調製される：
活性成分、ミクロン程度の微粉　５ｍｇ
クエン酸　２ｇ
安息香酸　１ｇ
スクロース（蔗糖）　７９０ｇ
トラガカントゴム　５ｇ
レモン油　２ｇ

脱イオン水、１０００ｍｌ
クエン酸、安息香酸、スクロース、トラガカントゴム、及びレモン油が十分な水に分散されて、８５０ｍｌの懸濁液が作られる。エアミクロナイザーを用いて微粉化された活性成分が上記のシロップの中へ入れられ、均一に分散される迄攪拌される。水を加えて１０００ｍｌとする。
【００７３】
上記の様にして調製された混合物は１日３回、茶さじ一杯（１５ｍｌ）投与することによって新生物形成病を治療する為に有用である。
組成“Ｅ”
非経口用製品
１ｍｌの用量の中に新生物形成病を治療する為の活性成分３０μｇを含んでいる、非経口注射の為の滅菌水性懸濁液が下記の成分の種類と用量から調製される：
活性成分、ミクロン程度の微粉　　３０ｍｇ
ポリソルベート８０　　５ｇ
メチルパラベン　　２．５ｇ
プロピルパラベン　　０．１７ｇ
注射用の水、１０００ｍｌ
活性成分を除いた全ての成分が水の中に溶かされ、この溶液がろ過によって滅菌される。滅菌されたこの溶液の中にエアミクロナイザーを用いて微粉化された、滅菌された活性成分が加えられ、最終的な懸濁液が滅菌されたバイアルに充填され、バイアルが密封される。
【００７４】
上記の様にして調製された混合物は１日３回、１ミリリットル（１ｍｌ）ずつの用量で用いることによって新生物形成病を治療する為に有用である。
組成“Ｆ”
座薬、直腸及び膣から
各々が２．５ｇの重量を持ち且つ活性成分２０μｇを含んでいる座薬１０００個が下記の成分の種類と用量から調製される：
活性成分、ミクロン程度の微粉　　２０ｍｇ
プロピレングリコール　　１５０ｇ
ポリエチレングリコール＃４０００　１５００ｇ
活性成分がエアミクロナイザーを用いて微粉化され、プロピレングリコールに加えられ、この混合物が、均一に分散される迄、コロイドミルを通される。ポリエチレングリコールは溶かされ、プロピレングリコールの分散液が攪拌されながらゆっくりと加えられる。この懸濁液が４０℃の非冷却鋳型の中に注がれる。鋳型が冷えて固化する迄放置した後、鋳型から取り出し、座薬を１個ずつフォイルで包む。
【００７５】
上記の様にして調製された座薬は新生物形成病を治療する為に直腸へ又は膣内へ挿入される。
組成“Ｇ”
鼻腔内用懸濁液
懸濁液１ｍｌ当たり活性成分２０μｇを含んでいる、鼻腔内滴注用の滅菌された水性懸濁液１０００ｍｌが下記の成分の種類と用量から調製される：
活性成分、ミクロン程度の微粉　　２０ｍｇ
ポリソルベート８０　　５ｇ
メチルパラベン　　２．５ｇ
プロピルパラベン　　０．１７ｇ
活性成分を除いた全ての成分が水の中に溶かされ、この溶液がろ過によって滅菌される。滅菌されたこの溶液の中にエアミクロナイザーを用いて微粉化された、滅菌された活性成分が加えられ、最終的な懸濁液が滅菌された容器に充填される。

【００７６】
上記の様にして調製された混合物は１日１～４回、０．２～０．５ｍｌずつ鼻腔内滴注することによって新生物形成病を治療する為に有用である。
活性成分は又皮膚、鼻腔内、咽喉内、気管支内へ局所的に、或いは経口的に用いる為に、希釈されていない純粋な形で提供されることも出来る。
組成“Ｈ”
粉末
バラの活性成分５ｍｇがエアミクロナイザーを用いて微粉化される。微粉化された粉末がシェーカー形の容器に入れられる。
【００７７】
上記の粉末は１日１～４回、局所に付けることによって新生物形成病を治療する為に有用である。
組成“Ｉ”
経口粉末
バラの活性成分１０ｍｇがエアミクロナイザーを用いて微粉化される。微粉化された粉末は２０μｇの個別用量に分けられ、包袋される。
【００７８】
上記の粉末は１日１～４回、１～２包みをコップ一杯の水に懸濁させて経口投与することによって新生物形成病を治療する為に有用である。
組成“Ｊ”
吸入
バラの活性成分１０ｍｇがエアミクロナイザーを用いて微粉化される。
上記の粉末は１日１～４回、３０μｇの吸入によって新生物形成病を治療する為に有用である。
組成“Ｋ”
硬質ゼラチンカプセル
１カプセルが活性成分２０μｇを含んでいる、経口投与の為のツーピース形の硬質ゼラチンカプセル１００個。
活性成分がエアミクロナイザーを用いて微粉化され、通常のやり方でカプセル化される。
【００７９】
上記のカプセルは１日１～４回、１～２個ずつ経口投与することによって、新生物形成病を治療する為に有用である。
上記の手順を用いて、上で用いられている２０ｍｇの代わりに５ｍｇ、２５ｍｇ、及び５０ｍｇの活性成分を用いることによって、活性成分５、２５、及び５０μｇを含んでいるカプセルと同じ様に調製することが出来る。
【００８０】
以上のことから、先に述べられた目標の全てを、注目すべき、予想もされなかったやり方で達成する、新しく且つ有用な発明がここに説明され且つ例示されたと云うことが明らかである。この開示を目にした当業者に容易に思いつかれる様な修正、変更、及び適応は、勿論、本書に付属している請求の範囲によってのみ制限される本開示の精神の範囲内にあるものと考えられると云うことが理解されよう。

フロントページの続き

(72)発明者　チェリー　エル　ヘラルド
アメリカ合衆国アリゾナ州８５２８１　テンペ　ウエスト７ストリート　１３２４番地

審査官　大久保　元浩

(56)参考文献　Chem.Pharm.Bull., １９９３年　5月, 41/5, 989-991
Tetrahedron Letters, １９９３年　4月, 34/17, 2795-2798
J.Org.Chem., １９９３年　3月, 58/6, 1302-1304

(58)調査した分野(Int.Cl.^{7}, ＤＢ名)
C07D493/22
A61K 31/365
CAPLUS(STN)
CAOLD(STN)
REGISTRY(STN)