

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3920430号
(P3920430)

(45) 発行日 平成19年5月30日(2007.5.30)

(24) 登録日 平成19年2月23日(2007.2.23)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 D 491/16 (2006.01)

C O 7 D 491/16

C 1 2 P 17/18 (2006.01)

C 1 2 P 17/18

C

A 6 1 K 31/40 (2006.01)

A 6 1 K 31/40

A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/04

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 9 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-339535
 (22) 出願日 平成9年12月10日(1997.12.10)
 (65) 公開番号 特開平10-245385
 (43) 公開日 平成10年9月14日(1998.9.14)
 審査請求日 平成16年12月1日(2004.12.1)
 (31) 優先権主張番号 特願平8-337765
 (32) 優先日 平成8年12月18日(1996.12.18)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)
 (31) 優先権主張番号 特願平9-120
 (32) 優先日 平成9年1月6日(1997.1.6)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

微生物の受託番号 FERM BP-5673

微生物の受託番号 FERM BP-5674

(73) 特許権者 000001029
 協和醗酵工業株式会社
 東京都千代田区大手町1丁目6番1号
 (72) 発明者 水上 民夫
 東京都町田市本町田2141-69
 (72) 発明者 小川 はる美
 東京都町田市中町3-9-11
 (72) 発明者 中井 龍一郎
 東京都町田市中町3-9-11
 (72) 発明者 浅井 章良
 神奈川県相模原市上鶴間3069-4
 (72) 発明者 山下 順範
 東京都町田市中町3-9-13
 (72) 発明者 安藤 勝彦
 東京都町田市旭町1-17-8

最終頁に続く

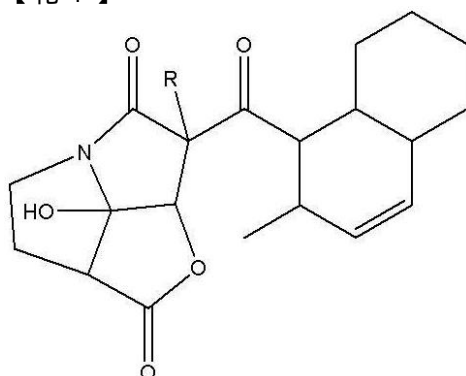
(54) 【発明の名称】 UCS1025化合物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I)

【化1】



(式中、Rは水素原子または水酸基を表す。)で表されるUCS1025化合物、これと化学的に等価な互変異性体またはそれらの薬理的に許容される塩。

【請求項2】

請求項1記載の化合物、これと化学的に等価な互変異性体またはそれらの薬理的に許容される塩を含有してなる医薬。

【請求項3】

Rが水素原子である請求項2記載の医薬。

【請求項4】

Rが水酸基である請求項2記載の医薬。

【請求項5】

請求項1に記載の化合物、これと化学的に等価な互変異性体またはそれらの薬理的に許容される塩を含有してなる抗菌剤または抗腫瘍剤。

【請求項6】

受託番号FERM BP-5674として寄託されている糸状菌であるフミコーラ・スピーシーズ。

【請求項7】

受託番号FERM BP-5673として寄託されている糸状菌であるアクレモニウム・スピーシーズ。

10

【請求項8】

アクレモニウム属またはフミコーラ属に属し請求項1記載の化合物、これと化学的に等価な互変異性体またはそれらの薬理的に許容される塩生産能を有する微生物を培地に培養し、培養物中に請求項1記載の化合物、これと化学的に等価な互変異性体またはそれらの薬理的に許容される塩を生成蓄積させ、該培養物から請求項1記載の化合物、これと化学的に等価な互変異性体またはそれらの薬理的に許容される塩を採取することによる、請求項1記載の化合物、これと化学的に等価な互変異性体またはそれらの薬理的に許容される塩を製造する方法。

【請求項9】

20

微生物が請求項6または7に記載の微生物である、請求項8に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗菌および抗腫瘍作用を有し、抗菌剤および抗腫瘍剤として有用であるUCS1025化合物、これと化学的に等価な互変異性体またはそれらの薬理的に許容される塩に関する。

【0002】

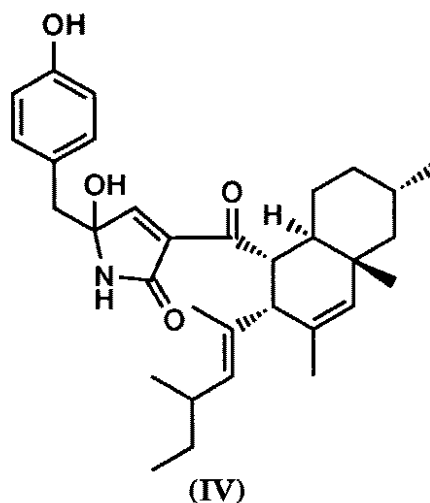
【従来の技術】

式(IV)

30

【0003】

【化2】



40

【0004】

で表される、ZG-1494 α などいくつかの化合物が報告されている[ジャーナル・オブ・アンタيبイオティクス(Journal of Antibiotics), 49, 967-973(1996)].

【0005】

50

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、優れた抗菌および抗腫瘍作用を有する化合物を提供することにある。

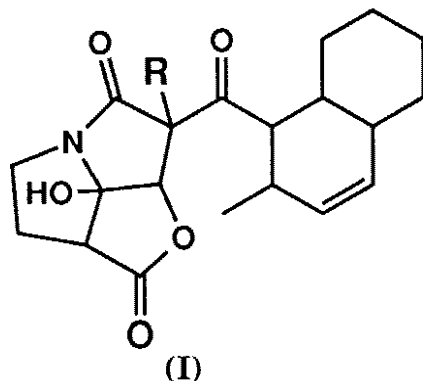
【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明によれば、式 (I)

【0007】

【化3】



10

【0008】

(式中、R は水素原子または水酸基を表わす。) で表され、抗菌および抗腫瘍作用を有する UCS1025 化合物、これと化学的に等価な互変異性体またはそれらの薬理的に許容される塩が提供される。

20

【0009】

【発明の実施の形態】

以下に本発明を詳細に説明する。

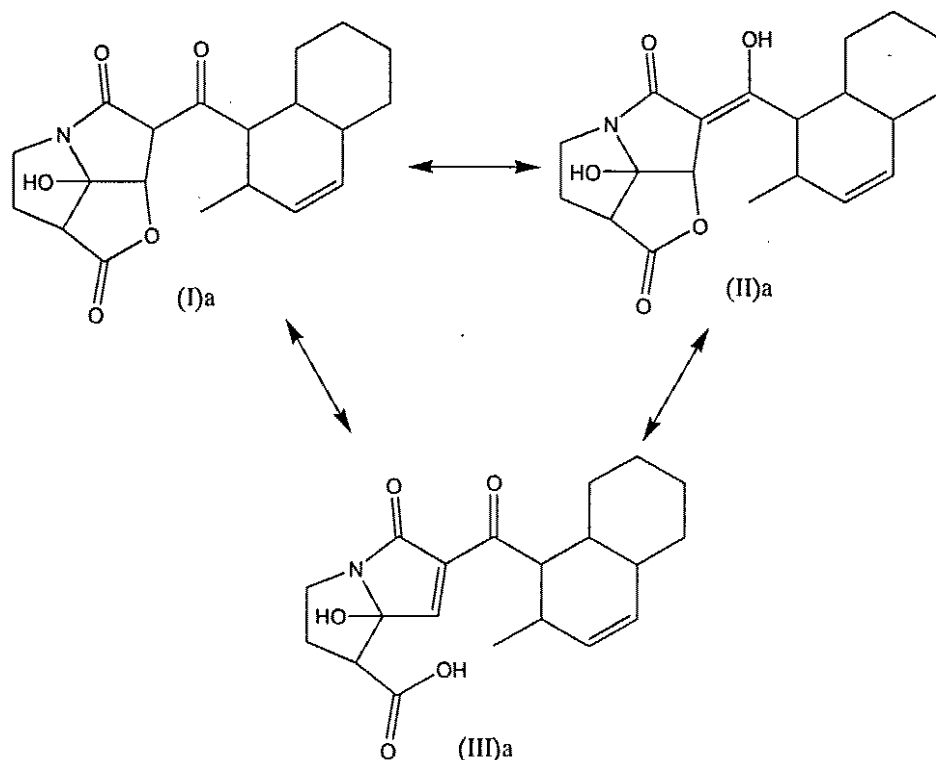
式 (I) 中、R が水素原子で表わされる化合物を UCS1025A、R が水酸基で表わされる化合物を UCS1025B と称する。

UCS1025A は、例えばケト型 (I) a、エノール型 (II) a およびカルボキシル型 (III) a の三種類の化合物の平衡混合物として存在し、その組成比は溶媒や温度等の条件によって様々に変化する。

30

【0010】

【化4】



10

20

【 0 0 1 1 】

本発明は、上記のような化学的に等価な互変異性体または立体異性体が存在し得るが、それら異性体またはそれら異性体のいかなる比率の混合物も本発明に包含される。

【 0 0 1 2 】

UCS1025 化合物の物理化学的性質は、以下に示すとおりである。上記のように本発明化合物は互変異性体の混合物として存在するため、その混合比はサンプルの取得条件ならびに測定条件により変化し、一定ではない。以下に示すデータは実施例に示す方法により取得したサンプルに関するものである。¹H - 核磁気共鳴スペクトルおよび¹³C - 核磁気共鳴スペクトルに関しては各互変異性体のシグナルを区別して観測することが可能であったので、データは互変異性体ごとに分けて記す。

30

なお、物理化学的性質は以下の機器により測定した。

融点：柳本製作所 ミクロ融点測定装置

旋光度：日本分光工業 DIP-370 デジタル旋光計

FAB マススペクトルおよび高分解能FAB マススペクトル：日本電子 JMS-HX110/HX110A質量分析装置

紫外吸収スペクトル：島津製作所 UV-2200 紫外分光光度計

赤外部吸収スペクトル：日本電子 JIR-RFX3001 赤外分光光度計

核磁気共鳴スペクトル：日本電子 JNM-α 400 核磁気共鳴装置

【 0 0 1 3 】

UCS1025Aの物理化学的データ

性状：無色針状結晶

融点：135 ~ 137

旋光度：[α]_D²⁸=30.1° (c=0.1, CH₃OH)

分子式：C₂₀H₂₅NO₅

FAB マススペクトル：m/z 360[M+H]⁺

高分解能FAB マススペクトル：

実測値 360.1799

理論値 360.1811 (C₂₀H₂₆NO₅ として)

紫外吸収スペクトル (CH₃OH)：λ_{max} (ε) 260 (7,100)nm

40

50

赤外吸収スペクトル (KBr) : $\nu_{\max}$ 3440, 2920, 2850, 1790, 1670, 1445, 1415, 1385, 1320, 1235, 1160, 1110, 1020, 970 cm^{-1}

^1H - 核磁気共鳴スペクトル :

ケト型 : δ (CDCl_3) 5.59 (1H, ddd, $J=2.6, 4.7, 9.8\text{Hz}$), 5.41 (1H, br d, $J=9.8\text{Hz}$), 4.754 (1H, s), 4.746 (1H, s), 4.05 (1H, s), 3.84 (1H, ddd, $J=5.9, 9.3, 12.0\text{Hz}$), 3.36 (1H, ddd, $J=5.3, 9.8, 12.0\text{Hz}$), 3.25 (1H, dd, $J=2.1, 9.3\text{Hz}$), 3.18 (1H, dd, $J=5.4, 11.2\text{Hz}$), 2.91 (1H, m), 2.74 (1H, m), 2.56 (1H, m), 1.77 (5H, m), 1.51 (1H, m), 1.33 (2H, m), 1.09 (1H, m), 0.89 (1H, m), 0.79 (3H, d, $J=7.1\text{Hz}$) ppm

エノール型 : δ (CDCl_3) 11.88 (1H, br s), 5.55 (1H, ddd, $J=2.7, 4.2, 10.0\text{Hz}$), 5.39 (1H, br d, $J=10.0\text{Hz}$), 5.29 (1H, s), 3.93 (1H, m), 3.45 (1H, m), 3.30 (1H, dd, $J=4.4, 10.0\text{Hz}$), 2.70 (1H, m), 2.68 (1H, m), 2.56 (1H, m), 2.50 (1H, m), 1.88 (1H, br d, $J=12.9\text{Hz}$), 1.77 (4H, m), 1.58 (1H, m), 1.33 (2H, m), 1.13 (1H, m), 1.00 (3H, d, $J=6.8\text{Hz}$), 0.91 (1H, m) ppm

カルボキシル型 : δ [100mM リン酸バッファ (pH 6) : $\text{D}_2\text{O} = 4 : 1$, v/v] 7.83 (1H, s), 5.44 (1H, d, $J=9.8\text{Hz}$), 3.58 (1H, dt, $J=10.9, 8.7\text{Hz}$), 3.40 (1H, dd, $J=5.9, 11.2\text{Hz}$), 3.24 (1H, ddd, $J=3.0, 9.4, 10.9\text{Hz}$), 2.99 (1H, dd, $J=1.5, 7.0\text{Hz}$), 2.46-2.55 (1H, m), 2.46-2.55 (1H, m), 2.36-2.41 (1H, m), 1.61-1.81 (5H, m), 1.45 (1H, m), 1.22-1.35 (2H, m), 0.98 (1H, m), 0.80 (1H, m), 0.63 (3H, d, $J=7.1\text{Hz}$) ppm

^{13}C - 核磁気共鳴スペクトル : δ (CDCl_3)

ケト型 : 208.5 (s), 174.5 (s), 167.1 (s), 130.7 (d), 130.4 (d), 101.0 (s), 80.3 (d), 66.4 (d), 58.8 (d), 47.7 (d), 42.2 (d), 41.8 (t), 36.8 (d), 32.9 (t), 30.2 (d), 30.0 (t), 29.9 (t), 26.52 (t), 26.46 (t), 17.6 (q) ppm

エノール型 : 192.7 (s), 131.6 (d), 130.3 (d), 102.1 (s), 100.7 (s), 81.3 (d), 48.8 (d), 47.6 (d), 44.4 (t), 42.7 (d), 36.0 (d), 34.8 (d), 33.1 (t), 31.5 (t), 30.4 (t), 26.7 (t), 26.5 (t), 17.9 (q) ppm

溶解性 : メタノール、酢酸エチル、クロロホルム、ジメチルスルホキシド (DMSO) に可溶、ヘキサンに難溶

呈色試薬 : ヨード試薬、硫酸エタノール試薬、リンモリブデン酸 / 硫酸セリウム試薬に陽性

薄層クロマトグラフィー

Rf値 ; 0.39

薄層 ; シリカゲル TLC (Merck 社製)

展開溶媒 ; ヘキサン : アセトン (2 : 1, v/v)

Rf値 ; 0.80

薄層 ; シリカゲル TLC (Merck 社製)

展開溶媒 ; 酢酸エチル : 酢酸 (99 : 1, v/v)

【0014】

UCS1025Bの物理化学的データ

性状 : 無色針状結晶

融点 : 221 ~ 223

旋光度 : $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = -31.8^\circ$ ($c=0.1$, CH_3OH)

分子式 : $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}_6$

FAB マススペクトル : m/z 376 $[\text{M}+\text{H}]^+$

高分解能FAB マススペクトル :

実測値 376.1757

理論値 376.1760 ($\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{NO}_6$ として)

紫外吸収スペクトル : 末端吸収を示すのみである。

【0015】

赤外吸収スペクトル (KBr) : $\nu_{\max}$ 3205, 2925, 2875, 1805, 1720, 1670, 1410, 1325, 1300, 1175, 1130, 1040 cm^{-1}

10

20

30

40

50

¹H - 核磁気共鳴スペクトル :

δ (CDCl₃) 5.54 (1H, ddd, J=2.4, 4.6, 9.8Hz), 5.36 (1H, br d, J=9.8Hz), 5.13 (1H, s), 4.36 (1H, s), 3.83 (1H, ddd, J=6.7, 9.3, 12.0Hz), 3.46 (1H, ddd, J=4.4, 9.8, 12.0Hz), 3.43 (1H, s), 3.21 (2H, m), 2.94 (1H, m), 2.78 (1H, m), 2.64 (1H, dd, J=1.7, 4.4, 9.0, 13.7Hz), 1.80 (1H, m), 1.74 (1H, m), 1.72 (2H, m), 1.63 (1H, m), 1.38 (1H, m), 1.30 (2H, m), 1.13 (1H, m), 1.05 (1H, m), 0.89 (3H, d, J=7.1 Hz) ppm

¹³C - 核磁気共鳴スペクトル :

δ (CDCl₃) 207.7 (s), 173.7 (s), 168.6 (s), 131.1 (d), 130.4 (d), 100.7 (s), 85.0 (s), 83.5 (d), 53.7 (d), 46.9 (d), 42.2 (d), 41.2 (t), 38.7 (d), 33.2 (t), 31.2 (d), 29.31 (t), 29.28 (t), 26.7 (t), 26.4 (t), 17.5 (q) ppm

溶解性：メタノール、酢酸エチル、クロロホルムおよびDMSOに可溶、ヘキサンに難溶
呈色試薬：ヨード試薬、硫酸エタノール試薬およびリンモリブデン酸/硫酸セリウム試薬に陽性

薄層クロマトグラフィー： Rf 値；0.28

薄層；シリカゲル TLC (Merck 社製)

展開溶媒；ヘキサン：アセトン (2 : 1 、 v / v)

UCS1025 化合物の生物活性について、以下の試験例で説明する。

【 0 0 1 6 】

試験例 1：各種細菌に対する抗菌作用

20

UCS1025A化合物およびUCS1025B化合物の各種細菌に対する抗菌活性を測定した。

抗菌活性はバクトトリプトン (Difco 社製) 3g/L、肉エキス 3g/L、酵母エキス 1g/L、グルコース1g/Lおよび寒天 16g/Lの組成からなる培地 (pH7) を用いて寒天希釈法により測定した。抗菌活性は最小生育阻止濃度 (MIC) で示した。

【 0 0 1 7 】

結果を第 1 表に示す。

【 0 0 1 8 】

【 表 1 】

第 1 表

被検菌名	最小生育阻止濃度 (μ g/ml)	
	UCS1025A	UCS1025B
スタフィロコッカス・アウレウス (<u>Staphylococcus aureus</u>) ATCC 6538P	1.3	42
バチルス・ズブチリス (<u>Bacillus subtilis</u>) No. 10707	1.3	83
エンテロコッカス・ヒラエ (<u>Enterococcus hirae</u>) ATCC 10541	1.3	42
プロテウス・ブルガリス (<u>Proteus vulgaris</u>) ATCC 6897	5.2	83

10

20

【 0 0 1 9 】

試験例 2 : ヒト乳癌 MCF-7、ヒト膀胱癌 T 24、ヒト類表皮癌 A431 および ヒト腎癌 ACHN 細胞
に対する増殖阻害

30

96穴マイクロタイタープレート (Nunc#167008) に MCF-7 および T 24 の場合 1×10^3 個 / ウェル、A431 および ACHN の場合 1.5×10^3 個 / ウェルの細胞を分注し、5%炭酸ガスインキュベータ内で 37、24 時間培養した。その後、30mM の UCS1025A 化合物および UCS1025B 化合物を段階的に希釈し、それぞれをウェルに 50 μ l ずつ添加した。このときの各溶液の終濃度は最高で 100 μ M となる。さらに 37、72 時間、5%炭酸ガスインキュベータ内で培養した。培養終了 5 時間前に終濃度 1mg/ml となるように培養培地中に溶解した MTT [3-(4,5-dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide、Sigma 社] を 50 μ l / ウェルずつ分注した。培養終了後、DMSO を 150 μ l / ウェルずつ分注し、プレートミキサーで激しく攪拌し、MTT-ホルマザンの結晶を完全に溶解した。その後、マイクロプレート分光光度計 M-SPmax250 (和光純薬社製) で 550nm の吸光度を測定した。細胞増殖抑制活性は 50%増殖阻止濃度 IC₅₀ で示した。

40

【 0 0 2 0 】

結果を第 2 表に示す。

【 0 0 2 1 】

【 表 2 】

第 2 表

化合物	IC ₅₀ (μ M)			
	MCF-7	T24	A431	ACHN
UCS1025A	21	51	55	58
UCS1025B	>100	>100	>100	>100

【 0 0 2 2 】

次に、UCS1025 化合物の製造法について説明する。

UCS1025 は、アクレモニウム属またはフミコーラ属に属しUCS1025 生産能を有する微生物を培地に培養し、培養物中にUCS1025 化合物を生成蓄積させ、該培養物からUCS1025 化合物を採取することによって製造される。

【 0 0 2 3 】

UCS1025 化合物生産能を有する微生物としては、アクレモニウム属やフミコーラ属に属し、UCS1025 化合物生産能を有する菌株であればいずれの菌株でも用いることができる。またこれらの菌株を人工的変異方法、例えば紫外線照射、X 線照射、変異誘起剤処理などによって変異させた変異株または自然的に変異した変異株でも、UCS1025化合物生産能を有するものであれば本発明に用いることができる。具体的に好適な例として、アクレモニウム・スピーシーズ (*Acremonium* sp.) KPC 7629-19 株やフミコーラ・スピーシーズ (*Humicola* sp.) KPC 7781-6株があげられる。

【 0 0 2 4 】

本発明者らは、土壌より新たに分離したアクレモニウム (*Acremonium*) に属する糸状菌 KPC 7629-19 株やフミコーラ (*Humicola*) に属する糸状菌 KPC 7781-6株が、抗菌および抗腫瘍作用を有するUCS1025 化合物を生産することを見出した。

【 0 0 2 5 】

本発明化合物を生産する代表菌株 (KPC 7629-19)は、土壌より分離したもので、その菌学的性質は次のとおりである。

【 0 0 2 6 】

1. 肉眼的観察

麦芽エキス寒天培地を用いて、25℃ で培養したとき、集落の直径は培養 7日目で16~21mm、培養14日目で28~31mmに達する。集落の表面中央は灰褐色を呈し、周囲はベージュ色あるいは灰白色を呈する。集落裏面中央は赤褐色を呈し、その周囲は灰茶褐色を呈する。また、培地中にオレンジ色の色素を産生する。

【 0 0 2 7 】

バレイショ・ブドウ糖寒天培地を用いて、25℃ で培養したとき、集落の直径は培養 7日目で約15mm、培養14日目で約25mmに達する。集落の表面中央は放射状の皺状となり、クリーム色から茶褐色を呈し、周囲は灰色を呈する。集落裏面中央部は淡褐色から茶褐色を呈し、その周囲は灰白色を呈する。

本菌の至適生育温度は11~31℃ で、23℃ 付近で最も良好に生育する。生育しうるpHは3~10で、pH6 前後で最も良好に生育する。

【 0 0 2 8 】

2. 光学顕微鏡的観察

バレイショ・ブドウ糖寒天培地を用いて、25℃ で 2週間培養したときの本菌の光学顕微鏡

10

20

30

40

50

による観察結果は、以下のとおりである。

菌糸は隔壁を有し、平滑でよく分岐する。分生子は、菌糸から側生あるいは頂生するフィアライドから形成される。フィアライドは菌糸から単生し、無色、平滑で、錐状を呈し、基部は幅 $1.5 \sim 2.5 \mu\text{m}$ 、先端に向かうに従い徐々に細くなり、先端の幅は $0.5 \sim 1.5 \mu\text{m}$ を呈する。フィアライドの長さは $10 \sim 35 \mu\text{m}$ で、その基部に隔壁を有する。フィアライド先端部からは、分生子が内生出芽的、フィアロ型に形成され、通常、フィアライド先端部には分生子の粘球が形成される。分生子は、垂球形から楕円形で、無色、平滑、長さ $2.5 \sim 4.5 \mu\text{m}$ 、幅 $1.7 \sim 2.5 \mu\text{m}$ である。また、球形から垂球形で、直径 $2.5 \sim 5.5 \mu\text{m}$ の厚膜胞子を形成する。

【0029】

本菌株は上述したアナモルフのみ観察され、テレオモルフは観察されない。

以上の菌学的性質より、本菌の分類学的位置を「ザ・ジェネラ・オブ・ファンジャイ・スポルレイティング・イン・ピュア・カルチャー 第2版 (The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture, 2nd ed., Cramer, Vaduz, J. A. von Arx, 1974)」に従って検索した結果、本菌は糸状不完全菌類のアクレモニウム (*Acremonium*) 属に属することが明らかとなった。本発明者らは本菌株を「アクレモニウム・スピーシーズ KPC 7629-19 (*Acremonium* sp. KPC 7629-19)」と命名し、平成8年9月26日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東一丁目1番3号)に受託番号FERMBP-5673として寄託した。なお、アクレモニウム属菌に関しては、ウォルター・ガムス (Walter Gams) 著の「セファロスポリウム - アールティゲ・シメルピルツェ (ヒフォミセテス) (Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes))」(Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1971) に詳しく述べられている。

【0030】

また本発明化合物を生産するもう一方の代表菌株 (KPC 7781-6) も、土壌より分離したもので、その菌学的性質は次のとおりである。

【0031】

1. 肉眼的観察

麦芽エキス寒天培地を用いて、25℃で培養したとき、集落の直径は培養7日目で $40 \sim 50\text{mm}$ 、培養14日目で $63 \sim 75\text{mm}$ に達する。集落の表面はやや緑色がかった灰白色から灰色を呈し、周囲は黒褐色を呈する。集落裏面は黒褐色を呈し、その周囲がクリーム色を呈することもある。

【0032】

バレイショ・ブドウ糖寒天培地を用いて、25℃で培養したとき、集落の直径は培養7日目で $39 \sim 46\text{mm}$ 、培養14日目で $65 \sim 70\text{mm}$ に達する。集落の表面中央は白色を呈し、周囲は黒褐色を呈する。集落裏面は黒褐色を呈し、その中央部がベージュ色を呈することもある。

本菌の至適生育温度は $11 \sim 33^\circ\text{C}$ で、 27°C 付近で最も良好に生育する。生育しうるpHは $3 \sim 12$ で、pH6前後で最も良好に生育する。

【0033】

2. 光学顕微鏡的観察

麦芽エキス寒天培地を用いて、25℃で2週間培養したときの本菌の光学顕微鏡による観察結果は以下のとおりである。

菌糸は隔壁を有し、平滑でよく分岐する。分生子は、菌糸あるいは短い分生子柄から形成される。分生子は外生出芽的、アレウロ型で、分生子形成細胞の頂端に単生する。成熟した分生子は、単細胞、球形から垂球形、淡褐色から暗褐色を呈し、平滑で直径 $6.5 \sim 9.5 \mu\text{m}$ である。稀に棍棒形または広棍棒形の分生子および二細胞性の分生子を形成する。

【0034】

本菌株は上述したアナモルフのみ観察され、テレオモルフは観察されない。

以上の菌学的性質より、本菌の分類学的位置を「ザ・ジェネラ・オブ・ファンジャイ・スポルレイティング・イン・ピュア・カルチャー 第2版 (The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture, 2nd ed., Cramer, Vaduz, J. A. von Arx, 1974)」に従って検

10

20

30

40

50

索した結果、本菌は糸状不完全菌類のフミコーラ (*Humicola*) 属に属することが明らかとなった。本発明者らは本菌株を「フミコーラ・スピーシーズ KPC 7781-6 (*Humicola* sp. KPC 7781-6)」と命名し、平成8年9月26日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5674として寄託した。

【0035】

本発明の UCS1025化合物生産菌の培養に際しては、通常の糸状菌の培養法が適用される。培地としては、微生物の資化し得る炭素源、窒素源、無機物などを程よく含有する培地であれば合成培地、天然培地いずれでも使用できる。

【0036】

炭素源としては、グルコース、澱粉、デキストリン、マンノース、フルクトース、シュクロース、ラクトース、キシロース、アラビノース、マンニトール、糖蜜などが単独または組合せて用いられる。さらに、菌の資化能によっては炭化水素、アルコール類、有機酸なども用いられる。

【0037】

窒素源としては、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーン・スチープ・リカー、大豆粉、カザミノ酸などが単独または組合せて用いられる。そのほか、必要に応じて塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、リン酸二水素カリウム、リン酸マグネシウム・8水塩、硫酸第一鉄、塩化カルシウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸銅などの無機塩類を加える。さらに、使用菌の生育や UCS1025化合物の生産を促進する微量成分を適当に添加することができる。

【0038】

培養法としては、液体培養法、特に深部攪拌培養法が適している。培養は、16~37℃、好ましくは 25~32℃ の温度で、pH 4~10、好ましくは pH 6~8 で行われ、培地の pH 調整にはアンモニア水や炭酸アンモニウム溶液などが用いられる。培養は通常1~9日で完了するが、UCS1025 化合物が培養液中および菌体中に生成蓄積され、培養物中の生成量が最大に達したときに培養を停止することが好ましい。

【0039】

培養物中に蓄積した UCS1025化合物を培養物から単離精製するに際しては、通常の微生物代謝産物を培養物から単離精製するために常用される方法に従って行われる。

例えば、培養物を濾過により培養濾液と菌体とに分け、菌体からクロロホルム、アセトンなどの溶剤で菌体成分を抽出する。ついで、抽出液と培養濾液とを併せて、ポリスチレン系吸着剤、例えばダイアイオン HP-20 (三菱化学社製) などに通塔して活性成分を吸着させ、ついでメタノール、アセトンなどで溶出する。溶出液を濃縮し、オクタデシル基結合型シリカゲル(ODS) によるカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、シリカゲルによるカラムクロマトグラフィーなどにより、UCS1025 化合物を得る。なお、培養、単離精製操作中の UCS1025化合物の検出は、薄層クロマトグラフィー、ついでヨード試薬を用いることにより行うことができる。

【0040】

UCS1025化合物またはこれと化学的に等価な互変異性体の薬理学的に許容される塩は、薬理学的に許容される金属塩、アンモニウム塩、有機アミン付加塩、アミノ酸付加塩を包含する。金属塩としてはリチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、亜鉛塩等があげられ、アンモニウム塩としてはアンモニウム、テトラメチルアンモニウム等の塩があげられ、有機アミン付加塩としてはモルホリン、ピペリジン等の付加塩、アミノ酸付加塩としてはグリシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン等の付加塩があげられる。

【0041】

UCS1025 化合物または化学的に等価な互変異性体の塩を取得したい場合には、UCS1025 化合物または化学的に等価な互変異性体の塩が得られる時はそのまま精製すればよく、また

10

20

30

40

50

遊離の形で得られる時は適当な溶媒に溶解または懸濁し、塩基を加え、塩を形成させればよい。

また、UCS1025 化合物、化学的に等価な互変異性体またはそれらの薬理的に許容される塩は、水あるいは各種溶媒との付加物の形で存在することもあるが、それら付加物も本発明に包含される。

【 0 0 4 2 】

以下に本発明の実施例を示す。

【 0 0 4 3 】

【実施例】

実施例 1 アクレモニウム・スピーシーズ KPC 7629-19株による UCS1025AおよびUCS1025B の製造 10

第一種培地および第二種培地としては、グルコース100g/L、マッシュポテトの素30g/L、酵母エキス5g/Lを組成とする培地(pH6.5)を用いた。種菌—白金耳を300ml容三角フラスコに入れた第一種培地50mlに植菌し、25℃で144時間振盪培養を行った。この第一種培養液50mlを2L容三角フラスコに入った300mlの第二種培地に15mlずつ合計6本に植菌し、25℃で48時間振盪培養した。得られた第二種培養液を、30L容タンクに入れた主発酵培地18Lに900mlずつ2本(合計36L)植菌し、25℃で162時間通気攪拌培養(回転数300rpm、通気量18L/分)を行った。主発酵培地としては、グルコース20g/L、マッシュポテトの素20g/L、ペプトン5g/L、リン酸二水素カリウム5g/L、リン酸マグネシウム・8水塩0.5g/Lを組成とする培地(pH6.0)を用いた。 20

【 0 0 4 4 】

得られた発酵培養液30Lに濾過助剤(ラヂオライト#600、昭和化学工業社製)を10%の割合で添加後、遠心濾過機により濾過を行った。培養濾液と菌体とを分別し、培養濾液をダイヤイオンHP-20を2L充填したカラムに通塔して活性成分を吸着させた。40%メタノール水溶液6Lで不純物を溶出後、メタノール6Lで活性成分を溶出した。活性画分を減圧下で濃縮し400mlとした。これに等量の酢酸エチルを加え活性成分を抽出した。抽出物を減圧下で濃縮乾固すると、褐色の油状物質が得られた。この油状物質をシリカゲルカラム(ワコーゲルC-200、和光純薬社製)を用い、ヘキサン-酢酸エチル混合溶液で展開した。ヘキサン/酢酸エチル(7:3、v/v)溶液で不純物を溶出後、ヘキサン/酢酸エチル(6:4-5:5、v/v)溶液で活性成分を溶出した。活性画分を濃縮乾固すると、淡褐色の油状物質が得られた。これをシリカゲルカラム(LiChroprep Si 60、Merck社製)を用い、ヘキサン-アセトン混合溶液で展開した。ヘキサン/アセトン(86:14、v/v)溶液で不純物を溶出後、ヘキサン/アセトン(84:16-82:18、v/v)溶液でUCS1025Aの画分を溶出した。さらに、ヘキサン/アセトン(80:20-75:25、v/v)溶液でUCS1025Bの画分を溶出した。UCS1025AおよびUCS1025Bの両画分とも4℃で3日間放置することにより、それぞれ結晶化させた。析出した結晶を集め乾燥することにより、UCS1025Aが131mg、そしてUCS1025Bが4.8mg得られた。 30

【 0 0 4 5 】

実施例 2 フミコーラ・スピーシーズ KPC 7781-6株による UCS1025Aの製造

種菌として、フミコーラ・スピーシーズKPC 7781-6株を用いてUCS1025Aを製造した。 40
種培地としては、グルコース100g/L、マッシュポテトの素30g/L、酵母エキス5g/Lを組成とする培地(pH6.5)を用いた。種菌—白金耳を300ml容三角フラスコに入れた種培地50mlに植菌し、25℃で72時間振盪培養を行った。得られた培養液を、300ml容三角フラスコに入れた主発酵培地50mlに2.5mlずつ40本(合計2L)植菌し、25℃で216時間振盪培養を行った。主発酵培地としては、グルコース20g/L、マッシュポテトの素20g/L、ペプトン5g/L、リン酸二水素カリウム5g/L、リン酸マグネシウム・8水塩0.5g/Lを組成とする培地(pH6.0)を用いた。

【 0 0 4 6 】

得られた発酵培養液2Lに濾過助剤(ラヂオライト#600、昭和化学工業社製)を10%の割合で添加後、吸引濾過機により濾過を行った。培養濾液と菌体とを分け、分別した菌体 50

にメタノール1Lを加えて十分に攪拌抽出し、再度吸引濾過機により濾過した。得られたメタノール抽出液を減圧下で濃縮し、さらに水を加え1Lとした。これと培養濾液とをそれぞれダイヤイオンHP-20を充填したカラムに通塔し、メタノールで活性成分を溶出した。各々の活性画分を合わせ減圧下で濃縮し、さらに水を加え5Lとした。これをダイヤイオンHP-20ssを充填したカラムに通塔し、水-メタノール混合溶液で展開した。水/メタノール(3:7、v/v)溶液で不純物を溶出後、水/メタノール(2:8-0:1、v/v)で活性成分を溶出した。活性画分を減圧下で濃縮乾固すると、褐色の油状物質が得られた。この油状物質をシリカゲルカラム(ワコーゲルC-200、和光純薬社製)を用い、クロロホルム-メタノール-酢酸混合溶液で展開した。クロロホルム/メタノール/酢酸(100:10:1、v/v/v)溶液で不純物を溶出後、クロロホルム/メタノール/酢酸(980:20:2、v/v/v)溶液で活性成分を溶出した。活性画分を濃縮乾固すると、淡褐色の油状物質が得られた。これを再度シリカゲルカラム(ワコーゲルC-200、和光純薬社製)を用い、ヘキサン-アセトン混合溶液で展開した。ヘキサン-アセトン(9:1、v/v)溶液で不純物を溶出後、ヘキサン-アセトン(8:2、v/v)溶液で活性成分を溶出した。活性画分を濃縮乾固し、このサンプルのFABマスペクトル解析、HPLC解析、TLC解析を行った。その結果、活性成分はUCS1025Aと同一であることが判明した。種菌として、フミコラ・スピーシーズ KPC 7781-6 株を用いてもUCS1025Aの製造は可能であることが示された。

【0047】

【発明の効果】

本発明によれば、抗菌および抗腫瘍作用を有する UCS1025化合物、これと化学的に等価な互変異性体またはそれらの薬理学的に許容される塩を提供することができる。

10

20

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	1/14	(2006.01)	C 1 2 N	1/14 A
C 1 2 R	1/645	(2006.01)	C 1 2 P	17/18 C
			C 1 2 R	1:645

(72)発明者 我妻 勉
静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 7 9

(72)発明者 秋永 士朗
静岡県駿東郡長泉町下土狩 1 1 3 4 - 6

(72)発明者 大内 弘造
埼玉県蓮田市桜台 2 - 2 - 9

(72)発明者 川崎 秀紀
茨城県土浦市荒川沖西区 2 - 4 0 3 - 1 - 3 0 3

審査官 植原 克典

(56)参考文献 Journal of Antibiotics , 1 9 9 6 年 , vol.49 , pp.967-973

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

C07D491/16

C12P 17/18