

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 2 月 12 日 (12.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/013342 A1

(51) 国際特許分類: C12P 17/16, C07D 493/10, A61K 31/35, A61P 31/10 // (C12P 17/16, C12R 1:77)

(JP). 飯田 真依子 (HIDA, Maiko) [JP/JP]; 〒222-8567 神奈川県 横浜市 港北区師岡町 7 6 0 明治製菓株式会社 薬品総合研究所内 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009822

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 1 日 (01.08.2003)

(74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI, Shohei et al.); 〒107-6028 東京都 港区 赤坂一丁目 1 2 番 3 2 号 アーク森ビル 2 8 階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(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2002-225540 2002 年 8 月 2 日 (02.08.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒104-8002 東京都 中央区 京橋二丁目 4 番 1 6 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 矢口 貴志 (YAGUCHI, Takashi) [JP/JP]; 〒250-0852 神奈川県 小田原市 栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 微生物資源研究所内 Kanagawa (JP). 植田 勝 (UEDA, Masaru) [JP/JP]; 〒134-0081 東京都 江戸川区 北葛西四丁目 1 1-1-4 0 2 Tokyo (JP). 伏見 英樹 (FUSHIMI, Hideki) [JP/JP]; 〒222-8567 神奈川県 横浜市 港北区師岡町 7 6 0 明治製菓株式会社 薬品総合研究所内 Kanagawa (JP). 天野 昭一 (AMANO, Shoichi) [JP/JP]; 〒250-0852 神奈川県 小田原市 栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品生産技術研究所内 Kanagawa

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL SUBSTANCES PF1237A, B and M EXHIBITING ANTIFUNGAL ACTIVITY

(54) 発明の名称: 新規抗真菌活性物質 P F 1 2 3 7 A、B および M 物質

(57) Abstract: Novel substances of compounds PF1237A, PF1237B and PF1237M exhibiting antifungal activity; a process for producing these novel compounds through culturing of PF1237 producing strain belonging to the genus Fusarium; and an antifungal agent comprising these novel compounds. The group of these novel compounds have antifungal activity, and thus can be used as an antifungal agent in the field of drugs, agricultural chemicals and sanitary goods. Especially, the use as a remedy for fungal infectious diseases is expected.

(57) 要約: 本発明は、抗真菌活性を有する新規化合物 PF1237A、PF1237B および PF1237M 物質、およびフザリウム (Fusarium) 属に属する PF1237 生産菌株を培養することによる当該新規化合物の製造方法ならびに当該新規化合物を含有する抗真菌剤を提供する。本発明の新規化合物群は、抗真菌活性を有するため、医薬、農薬、衛生用品の分野で、抗真菌剤として使用することができる。特に真菌感染症の治療薬としての活用が期待される。



WO 2004/013342 A1

明 細 書

新規抗真菌活性物質 P F 1 2 3 7 A、B および M 物質

<技術分野>

本発明は新規抗真菌活性物質 P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質またはそれらの塩、それらの製造法ならびにそれらを有効成分とする抗真菌剤に関するものである。

<背景技術>

1950 年代以降の抗生物質に関する研究開発の急速な進歩およびその広範な普及により、細菌性の感染症に対する多くの治療薬が開発されてきた。その一方で、平素は無害な弱病原性微生物による感染症、いわゆる日和見感染症が近年大きな問題になりつつある。この日和見感染症は免疫不全症や悪性腫瘍等の疾病、または免疫抑制剤や抗炎症剤等の投与によって免疫機能が低下した場合、また抗生物質の投与による共生菌の抑制から生じる菌交代などが原因とされている。このような日和見感染症の中で真菌が原因である症例が数多く報告されている。また、本発明による P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質と物理化学的性状が類似する化合物として、パプラカンジン A、B、C、D および E (Papulacandins) [トラキセラー (Traxler) ら、ジャーナルオブアンティバイオティクス (J. Antibiotics) 30: 289-296, 1977]、カエティアカンジン (Chaetiacandin) [コモリ (Komori) ら、J. Antibiotics 38: 455-459, 1985]、L-687, 781 [ヴァンミドルスワース (Vanmiddlesworth) ら、J. Antibiotics 44: 45-51, 1991]、Bu-4794F [アオキ (Aoki) ら、J. Antibiotics 46: 952-960, 1993]、サリカンジン (Saricandin) [ランダー (Randal) ら、J. Antibiotics 49: 596-598, 1996] 等が知られているが、抗真菌物質 P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質はこれらの物質とは物理化学的性状が異なり明確に区別される。

現在使用されている主な抗真菌剤としては、ポリエンマクロライド系、アゾール

系およびフルシトシン等がある。表在性真菌症の治療には、主に外用剤が使用され、それらには多種のイミダゾールやトリアゾール系の抗真菌剤を始め、アリルアミン系の抗真菌剤が用いられている。一方、深在性真菌症の治療においては、トリアゾール系薬剤であるフルコナゾールが、その高い安全性から多用されているが、これは抗菌スペクトルが狭いことが難点とされている。また、ポリエンマクロライド系薬剤であるアムホテリシンBは抗菌スペクトルが広く、抗真菌活性は強いが同時に毒性も高く、安全性の面での問題が残されている。

このような背景からより有効かつ安全な抗真菌剤の提供とその有利な製造法は常に求められる課題である。本発明者らは、以上のような点に着目し、抗真菌活性を有する新規な化合物を提供するとともに、微生物の培養法を用いたそれらの製造法を提供することを目的とした。また、本発明の別の目的は、当該新規化合物を含有する医薬組成物および抗真菌剤の提供である。

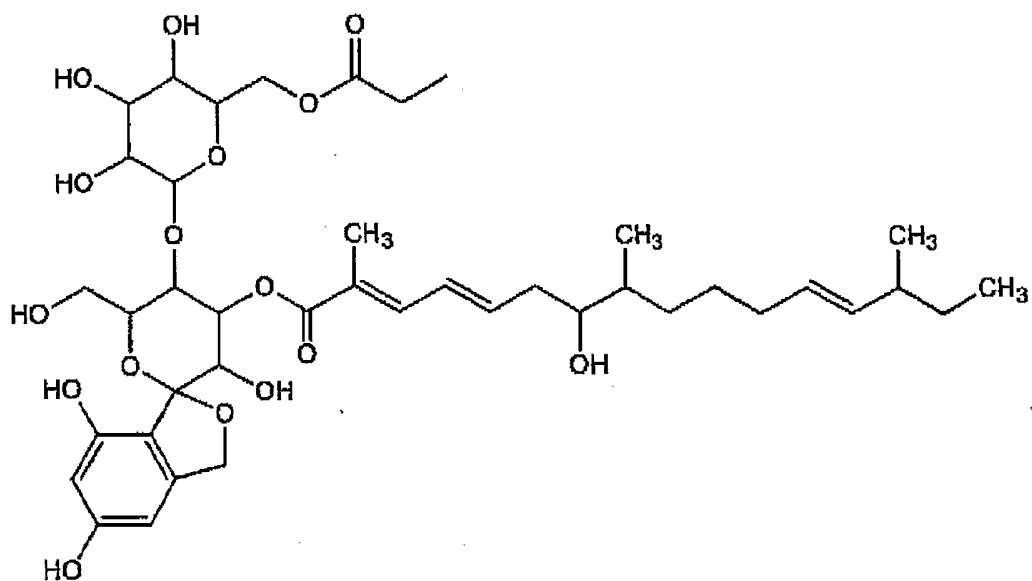
<発明の開示>

本発明者らは、より有効かつ安全な新規抗真菌活性物質を見い出すため、幅広く微生物の探索を行った結果、フザリウム（*Fusarium*）属に属する菌を培養することによって、抗真菌活性を示す物質が培養物中に生産、蓄積されることを見出した。

次いで、本発明者らは培養物中から式（1）で表される有効物質PF1237A物質、式（2）で表されるPF1237B物質、および式（3）で表されるPF1237M物質をそれぞれ単離、精製し、これらの物理化学的性状からこれらの物質が新規物質であることを明らかにし、抗真菌活性を有することを確認した。これらの知見に基づいて、本発明を完成した。

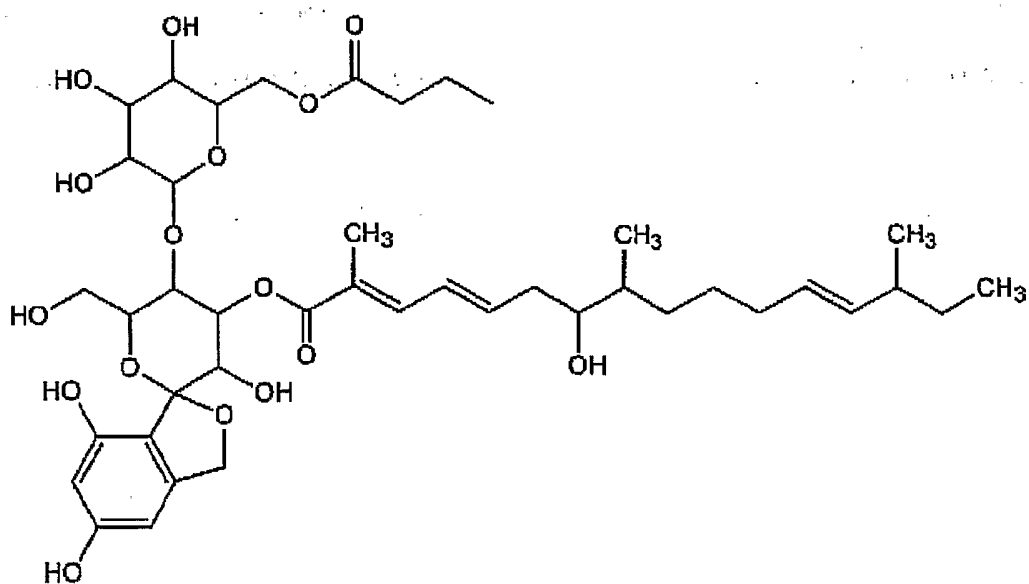
すなわち、本発明は下記の新規抗真菌活性物質PF1237A物質、PF1237B物質およびPF1237M物質またはそれらの薬理学的に許容される塩を提供するものである。

式 (1)



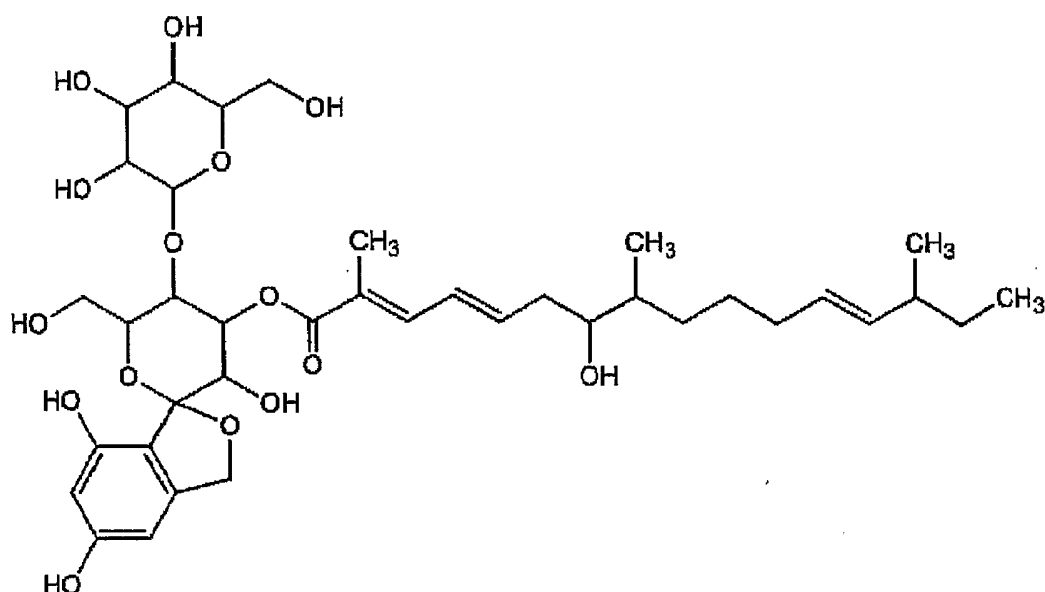
で表される PF 1237 A 物質または薬理学的に許容されるその塩。

式 (2)



で表される PF 1237 B 物質または薬理学的に許容されるその塩。

式 (3)



で表される P F 1 2 3 7 M 物質または薬理学的に許容されるその塩。

また、本発明は、Fusarium 属に属し、P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質を蓄積させ、当該培養物から P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質を採取することを特徴とする P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質あるいはそれらの薬理学的に許容される塩の製造法を提供するもので。

さらに、P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質あるいはそれらの薬理学的に許容される塩を含有する医薬組成物および抗真菌剤に関する。

<発明の実施の態様>

本発明の第 1 の要旨とするところは、前述式 (1) で表され、下記の物理化学的性状を有する新規抗真菌活性物質 P F 1 2 3 7 A 物質にある。

1. P F 1 2 3 7 A 物質の物理化学的性状

(1) 色および形状 : 無色粉末

(2) 分子式 : $C_{41}H_{60}O_{16}$

(3) マススペクトル : 高分解能 FAB-MS ; m/z 809.3958 (M+H)⁺ : 実測値
 m/z 809.3960 (M+H)⁺ : 理論値

(4) 比旋光度 : $[\alpha]_D^{25} = +15.2^\circ$ (c1.0, CH₃OH)

(5) 紫外線吸収スペクトル メタノール中で測定した結果を以下に示す。

λ_{max} nm (ϵ) : 207(1420), 225(640), 267(1410)

(6) 赤外線吸収スペクトル KBr 錠での測定結果を以下に示す。

ν_{max} cm⁻¹ : 3440, 2930, 2860, 1717, 1636, 1610, 1458, 1244, 1154,
1070, 1036, 1010, 978, 843, 745

(7) ¹H NMR スペクトル (400MHz、CD₃OD、測定溶媒中に含まれる CHD₂OD の H のシグナルを 3.38ppm とした時の化学シフト値、積分強度、多重度、結合定数を示す。)

δ (ppm) : 0.85 (3H, t, J=7.5Hz), 0.89 (3H, d, J=6.8Hz), 0.95 (3H, d, J=6.8Hz), 1.13 (3H, t, J=7.5Hz), 1.16 - 1.55 (7H, m), 1.97 (3H, s), 1.90 - 2.03 (3H, m), 2.27 - 2.41 (4H, m), 3.40 - 3.63 (4H, m), 3.72 (1H, d, J=2.2Hz), 3.78 (1H, d, J=11.5Hz), 3.94 - 4.15 (5H, m), 4.34 (1H, d, J=7.1Hz), 4.38 (1H, d, J=10.0Hz), 5.01 (1H, d, J=13.1Hz), 5.04 (1H, d, J=12.4Hz), 5.32 (1H, dd, J=7.9, 15.1Hz), 5.47 (2H, m), 6.11 - 6.24 (3H, m), 6.49 (1H, dd, J=11.2, 14.8Hz), 7.25 (1H, d, J=11.5Hz)

(8) ¹³C NMR スペクトル (100MHz、CD₃OD、重メタノールの ¹³C のシグナルを 49.0ppm とした時の化学シフト値を示す。)

δ (ppm) : 175.7, 170.2, 161.6, 154.5, 145.5, 141.2, 139.9, 137.5, 129.8, 129.0, 127.0, 116.5, 112.0, 105.0, 103.0, 100.0, 77.0, 76.4, 75.4, 74.9, 74.7, 73.9, 73.7, 72.6, 72.0, 69.9, 64.1, 61.5, 39.9, 39.6, 39.3, 34.0, 33.9, 31.0, 28.5, 28.3, 21.0, 14.3, 13.1, 12.2, 9.5

(9) 溶解性 : メタノールに溶け、アセトン、酢酸エチルに溶けにくく、水にほとんど溶けない。

(10) 塩基性、酸性、中性の区別：弱酸性物質

本発明の第2の要旨とするところは、前述式(2)で表され、下記の物理化学的性状を有する新規抗真菌活性物質PF1237B物質にある。

2. PF1237B物質の物理化学的性状

(1) 色および性状：無色粉末

(2) 分子式： $C_{42}H_{62}O_{16}$

(3) マススペクトル：高分解能FAB-MS； m/z 823.4127(M+H)⁺：(実測値)
 m/z 823.4116(M+H)⁺：(理論値)

(4) 比旋光度： $[\alpha]_D^{25} = +19.8^\circ$ (c1.0, CH₃OH)

(5) 紫外線吸収スペクトル メタノール中で測定した結果を以下に示す。

λ_{max} nm (ϵ)：208(1600), 225(760), 267(1850)

(6) 赤外線吸収スペクトル KBr錠での測定結果を以下に示す。

ν_{max} cm⁻¹：3432, 2932, 2876, 1717, 1702, 1636, 1611, 1246, 1154,
 1071, 978, 843

(7) ¹H NMR スペクトル (400MHz、CD₃OD、測定溶媒中に含まれるCHD₂ODのHのシグナルを3.38ppmとした時の化学シフト値、積分強度、多重度、結合定数を示す。)

δ (ppm)：0.93 (3H, t, J=7.3Hz), 0.98 (3H, d, J=6.9Hz), 1.03 (3H, d, J=6.9Hz), 1.06 (3H, t, J=7.4Hz), 1.10 - 1.52 (7H, m), 1.58 - 1.70 (2H, m), 1.97 - 2.12 (3H, m), 2.06 (3H, s), 2.30 - 2.50 (4H, m), 3.48 - 3.73 (4H, m), 3.80 (1H, d, J=1.6Hz), 3.87 (1H, d, J=11.3Hz), 4.02 - 4.14 (4H, m), 4.21 (1H, dd, J=6.5, 10.5Hz), 4.42 (1H, d, J=7.8Hz), 4.47 (1H, d, J=9.7Hz), 5.08 (1H, d, J=26.1Hz), 5.12 (1H, d, J=25.7Hz), 5.33 (1H, dd, J=15.2, 30.0Hz), 5.40 - 5.56 (2H, m), 6.18 - 6.33 (3H, m), 6.56 (1H, dd, J=11.2, 15.7Hz), 7.33 (1H, d, J=11.2Hz)

(8) ¹³C NMR スペクトル (100MHz、CD₃OD、重メタノールの¹³Cのシグナルを49.0ppmとした時の化学シフト値を示す。)

δ (ppm)：174.9, 170.2, 161.6, 154.5, 145.5, 141.2, 139.9, 137.5, 129.8, 129.0, 127.0, 116.5, 112.0, 105.0, 103.0, 100.0, 77.0, 76.4, 75.4, 74.9, 74.7,

73.9, 73.8, 72.6, 72.0, 70.0, 64.1, 61.5, 39.8, 39.6, 39.3, 37.0, 34.0, 33.9, 31.0, 28.5, 21.0, 19.5, 14.3, 14.1, 13.1, 12.2

(9) 溶解性 : メタノールに溶け、アセトン、酢酸エチルに溶けにくく、水にほとんど溶けない

(10) 塩基性、酸性、中性の区別 : 弱酸性物質

本発明の第3の要旨とするところは、前述式(3)で表され、下記の物理化学的性状を有する新規抗真菌活性物質PF1237M物質にある。

3. PF1237M物質の物理化学的性状

(1) 色および形状 : 無色粉末

(2) 分子式 : $C_{38}H_{56}O_{15}$

(3) マススペクトル : 高分解能 FAB-MS ; m/z 753.3682 (M+H)⁺ : 実測値
 m/z 753.3697 (M+H)⁺ : 理論値

(4) 比旋光度 : $[\alpha]_D^{25} = +10.0^\circ$ (c1.0, CH₃OH)

(5) 紫外線吸収スペクトル : メタノール中で測定した結果を以下に示す。

λ_{max} nm (ε) : 206(1150), 225(470), 267(940)

(6) 赤外線吸収スペクトル : KBr 錠での測定結果を以下に示す。

ν_{max} cm⁻¹ : 3410, 2930, 1700, 1640, 1610, 1460, 1240, 1150, 1070, 980, 740

(7) ¹H NMR スペクトル (400MHz、CD₃OD、測定溶媒中に含まれる CHD₂OD の H のシグナルを 3.38ppm とした時の化学シフト値、積分強度、多重度、結合定数を示す。)

δ (ppm) : 0.94 (3H, t, J=7.3Hz), 0.99 (3H, d, J=6.9Hz), 1.04 (3H, d, J=6.3Hz), 1.15 - 1.65 (7H, m), 1.97 - 2.15 (3H, m), 2.07 (3H, s), 2.44 (2H, m), 3.44 - 3.72 (6H, m), 3.84 - 3.92 (2H, m), 4.02 - 4.16 (3H, m), 4.43 (1H, d, J=6.7Hz), 4.47 (1H, d, J=10.0Hz), 5.07 (1H, d, J=12.9Hz), 5.13 (1H, d, J=12.7Hz), 5.34 (1H, dd, J=7.1, 14.9Hz), 5.27 - 5.40 (2H, m), 6.23 - 6.33 (3H, m), 6.58 (1H, dd, J=12.2, 15.8Hz), 7.34 (1H, d, J=11.6Hz)

(8) ¹³C NMR スペクトル (100MHz、CD₃OD、重メタノールの ¹³C のシグナルを 49.0ppm とした時の化学シフト値を示す。)

δ (ppm) : 170.2, 161.6, 154.6, 145.5, 141.3, 140.0, 137.5, 129.8, 129.0, 126.9, 116.5, 112.0, 105.2, 103.0, 100.0, 77.1, 76.7, 76.3, 75.5, 75.0, 74.9, 73.9, 72.9, 72.0, 69.7, 61.7, 61.7, 39.8, 39.5, 39.4, 33.9, 33.9, 31.0, 28.5, 21.0, 14.4, 13.1, 12.2

(9) 溶解性 : メタノールに溶け、アセトン、酢酸エチルに溶けにくく、水にほとんど溶けない

(10) 塩基性、酸性、中性の区別 : 弱酸性物質

本発明の第4の要旨とするところは、フザリウム (Fusarium) 属に属する P F 1 2 3 7 物質群を生産する菌を培養し、その培養物から P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質を採取することを特徴とする、P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質の製造法である。

上記の P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質生産菌としては、例えば本発明者らが新たに分離した P F 1 2 3 7 株が挙げられる。なお、本発明で用いられる P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質生産菌は、本明細書に記載の微生物に限定されるものではない。P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質を生産する能力を有している菌であれば P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質生産菌としていずれを用いてもよい。使用できる微生物の好適な例としては、P F 1 2 3 7 株、あるいはこの菌株の継代培養物、人工変異株ならびに自然変異株、遺伝子組換え株などが挙げられる。P F 1 2 3 7 株の菌学的性状は以下の通りである。

P F 1 2 3 7 株の菌学的性状

(1) コロニーの性状

ツァペック酵母エキスを寒天培地上で生育良く、25℃、7 日間の培養でコロニーの直径は 50~53 mm に達する。濃黄色、放射状のしわを生じ、密な菌糸層からなり、束状の気生菌糸を中央に、なわ状の気生菌糸を周辺に生じる。分生子は形成しない。裏面は濃黄色となる。ツァペック寒天培地上で生育良く、25℃、7 日間の培養でコロニーの直径は 50~52 mm に達する。白色、平坦、薄い菌糸層からなる。

分生子を疎らに形成する。裏面は白色となる。37℃の培養では、どの培地上でも生育しない。

(2) 形態的性状

菌糸は太く 2.5 μm 以上である。フィアライドは無色、円筒形、菌糸側面より直立に生じ、先端は細まり、基部はややくびれ、4.0~8.0 x 1.5~2.5 μm である。分生子は無色、楕円形~円筒形、滑面、3.5~7.5 x 1.5~2.5 μm 、フィアライドの先端に粘塊状に生じる。

以上の菌学的性状より、大分生子を形成しないが、PF1237 株を不完全菌類のフザリウム (*Fusarium*) 属に属する糸状菌と同定した。なお、本菌株は以下のように独立行政法人産業技術総合研究所特許生産寄託センターに FERM BP-8416 として国際寄託されている。

①寄託機関： 国際寄託機関、独立行政法人産業技術総合研究所特許生産寄託センター

住所： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号 305-8566)

②寄託日： 原寄託日：平成14年3月29日
移管請求日：平成15年6月24日 (平成14年3月29日に寄託された FERM P-18798 号より移管)

③寄託番号： FERM BP-8416

生産菌の培養法

本発明の菌株を用いて PF 1 2 3 7 A 物質、PF 1 2 3 7 B 物質および PF 1 2 3 7 M 物質を生産する培養方法としては、通常の微生物が利用し得る栄養物を含む培地を用い、一般に実施されている方法に従って培養することが可能である。

栄養源としては、従来カビの培養に利用されている公知のものが使用できる。例えば、炭素源としては、グルコース、スクロース、水飴、デキストリン、でんぷん、グリセロール、糖蜜、動植物油等を使用し得る。また、窒素源としては、大豆粉、小麦胚芽、コーン・スティープ・リカー、綿実粕、肉エキス、ペプトン、

酵母エキス、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素等を使用し得る。その他必要に応じてナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、燐酸、硫酸およびその他のイオンを生成することができる無機塩類を添加することは有効である。また、菌の発育を助け、P F 1 2 3 7 A物質、P F 1 2 3 7 B物質およびP F 1 2 3 7 M物質の生産を促進するような有機及び無機物を適当に添加することができる。

培養法としては、好氣的条件での培養法、特に液体培養法が最も適している。培養に適当な温度は25～30℃であるが、多くの場合26℃付近で培養する。P F 1 2 3 7 A物質、P F 1 2 3 7 B物質およびP F 1 2 3 7 M物質の生産は、培地や培養条件によって異なるが、静置培養、振盪培養、タンク培養のいずれにおいても、通常2～14日間でその蓄積が最高に達する。培養液中のP F 1 2 3 7 A物質、P F 1 2 3 7 B物質およびP F 1 2 3 7 M物質の蓄積が最高になった時に培養を停止し、培養液から目的物質を単離、精製する。

P F 1 2 3 7 A物質、P F 1 2 3 7 B物質およびP F 1 2 3 7 M物質の精製法

本発明によって得られる新規抗真菌物質は主に菌体中に存在するので、菌体より通常分離手段、例えば溶媒抽出法、イオン交換樹脂への吸脱着法、若しくは分配あるいはゲルろ過等のカラムクロマトグラフィーを単独又は組み合わせて行うことにより精製できる。また高速液体クロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーなども精製に利用可能である。好ましい分離、精製の方法としては以下の方法が挙げられる。培養液から遠心分離により菌体を得る。得られた菌体からメタノールやアセトン等により活性成分を抽出する。この菌体抽出液を減圧下で溶媒を留去後酢酸エチル、クロロホルム等の水と混和し難い有機溶媒を用いて抽出する。抽出液を濃縮乾固後クロロホルム-メタノールの混液を溶出液とするシリカゲルカラムクロマトグラフィー、次いで水-アセトニトリルの混液を溶出液とするODSカラムクロマトグラフィー、次にメタノールを溶出液としたセファデックスLH20を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィー、さらに水-アセトニトリルの混液を溶出液とする高速液体クロマトグラフィー、を行うことにより目的とするP F 1 2 3 7 A物質、P F 1 2 3 7 B物質およびP F 1 2 3 7 M物質を

得ることが出来る。

本発明の要旨とするところは、本発明で得られる新規な抗真菌活性物質または薬理的に許容されるその塩を含有する医薬組成物を提供することにある。薬理的に許容しうる塩の典型例としては、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、マグネシウム、カルシウム、バリウム等のアルカリ土類金属、アンモニウム塩、トリメチルアミン、トリエチルアミン等の有機アミン塩等を挙げることができる。

本発明に用いられる P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質を医薬組成物として使用するには種々の投与形態あるいは使用形態に合わせて、公知の担体を組み合わせて製剤化すればよい。公知の担体としては、賦形剤（例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、ラクトース、リン酸カルシウム、炭酸カルシウムなど）、結合剤（例えば、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等）、崩壊剤（例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロースおよびそのカルシウム塩、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等）潤滑剤（例えばステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリン酸ナトリウム等）、芳香剤（例えば、クエン酸、メントール、グリシン、オレンジ紛等）、保存剤（例えば、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム等）、安定化剤（例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸など）懸濁化剤（例えば、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウムなど）、分散剤（例えば界面活性剤）などの医薬用として常用される種々の有機および無機の担体物質が上げられる。

本発明の化合物は、抗真菌剤として皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、坐薬等による非経口投与あるいは錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等による経口投与などの全身投与のほか、軟膏剤、ローション剤、膣坐薬等の局所投与の形態を例示することができる。農薬用または衛生用品として本発明の化合物を活用する場合には、各分野で常用される調製方法を用いることができる。

<発明を実施するための最良の形態>

以下に本発明の実施例を示すが、これは単なる一例であって本発明を限定するものではなく、ここに例示しなかった多くの変法あるいは修飾手段のすべてを包括するものである。

実施例 1

種培地として、でんぷん 2.0%、グルコース 1.0%、ポリペプトン 0.5%、小麦胚芽 0.6%、酵母エキス 0.3%、大豆粕 0.2%および炭酸カルシウム 0.2% の組成からなる培地（殺菌前 pH7.0）を用いた。また、生産培地としては、グルコース 5.0%（別に殺菌）、肉エキス 0.4%、大豆粕 1.0%、ポリペプトン 0.4%、酵母エキス 0.1%、塩化ナトリウム 0.25%および炭酸カルシウム 0.5% の組成からなる培地（殺菌前 pH7.0）を用いた。

前記の種培地 80 mL を分注した 500 mL 容三角フラスコを 120℃で 20 分間殺菌し、これに P F 1 2 3 7 株（FERM BP-8416）の斜面寒天培養の 3～4 白金耳を植菌後、26℃で 3 日間振とう培養した。次いで、種培地 500 mL を分注した 2000 mL 容三角フラスコを 120℃で 20 分間殺菌し、これに上記種培養液を 10 mL ずつ植菌し 26℃で 2 日間振とう培養した。さらに、生産培地 60 L を仕込んだ 100 L 容ジャーファメンター（福嶋鉄工（株）製）を 121℃で 30 分間殺菌し、これに上記種培養液を 1.5 L 植菌し、攪拌数は最初 150 rpm、24 時間後に 180 rpm、通気量 60 L/分、26℃で 5 日間培養した。

こうして得られた培養液 90L を遠心分離し菌体の沈殿物 20L を得た。この菌体にメタノール 40L を加え室温で 120 分攪拌した後、遠心分離により菌体を除去しメタノール抽出液を得た。メタノール抽出液を減圧下に約 5L に濃縮し 7L の酢酸エチルを加え室温で 60 分攪拌し沈殿物を除去することにより得られた酢酸エチル抽出液 6L を減圧下に濃縮し 28.8g の粗抽出物を得た。

得られた粗抽出物に 400mL のヘキサンと 200mL のメタノールを加え攪拌した後メタノール層を分離し減圧下に濃縮し 25.8g の粗抽出物を得た。これを 70mL のメタノールに溶解し、100g のシリカゲル（ワコーゲル C-300、和光純薬社製）を加えた後、減圧下でメタノールを留去した。得られた粗抽出物をシリカゲルに均一に吸着させた。これをガラスフィルター上のシリカゲル 100g に重層し、クロロホル

ム／メタノール溶液（メタノール濃度が 0% を 2.4L 次いで 1, 10, 50, 100% をそれぞれ 2L）で溶出し活性画分を集めて減圧濃縮により残渣 18.8g を得た。

得られた残渣を 100mL のアセトニトリルに溶解し 200mL の蒸留水を加え懸濁させた。これをアセトニトリル／蒸留水＝3／7 の混合溶媒にて平衡化したグラスフィルター上のコスモシール 75C₁₈－OPN（ナカライテスク社製）200g に吸着した。本カラムを、アセトニトリル／蒸留水＝3／7 1.6L、アセトニトリル／蒸留水＝3／2 1.6L、およびメタノール 500mL にて順じ溶離した。PF1237A 物質、PF1237B 物質および PF1237M 物質を含む分画から有機溶媒を留去し、得られた水層を酢酸エチルで抽出し減圧濃縮により残渣 1.65g を得た。

得られた残渣をメタノールを溶離液とするセファデックス LH20 カラムクロマトグラフィー（ファルマシア社製、内径 5cm、長さ 80cm）にかけ活性画分を濃縮乾固することにより粗物質 721mg を得た。

得られた粗物質を 7.2mL のメタノールに溶解し、その一部を用いアセトニトリル／蒸留水＝55／45 の混合溶液で充填した高速液体クロマトグラフィー（カラム：イナートシル ODS－2、内径 20mm、長さ 250mm、ジューエルサイエンス社製）に注入しアセトニトリル／蒸留水＝55／45 の混合溶液で溶出することを繰り返すことにより PF1237A 物質、PF1237B 物質および PF1237M 物質を含む画分をそれぞれ得た。得られた画分はそれぞれアセトニトリルを留去し、得られた水層を酢酸エチルで抽出し濃縮乾固することにより PF1237A 物質 34.6mg、PF1237B 物質 133mg および PF1237M 物質 63.9mg をそれぞれ無色粉末として得た。

試験例 1

PF1237A 物質、PF1237B 物質および PF1237M 物質の抗真菌活性を液体培養試験法により、各種菌株に対する最小阻止濃度（MIC）として測定した。

培地として RPMI 1640（ギブコ社製）に 165 mM MOPS 緩衝液（ナカライテスク社製）を加え pH7.0 に調製したものを用い、35℃ で 24 時間（*Cryptococcus neoformans* については 72 時間、*Aspergillus fumigatus* については 30℃、48

時間) 培養した。その測定結果を表 1 に示す。

表1 PF1237A物質、PF1237B物質およびPF1237M物質の抗真菌活性

被検菌	最小発育阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	PF1237A 物質	PF1237B 物質	PF1237M 物質
Candida albicans TIMM3165	1	0.5	2
Candida glabrata TIMM3171	8	4	64
Candida parapsilosis TIMM3172	1	0.5	4
Candida krusei TIMM3378	8	8	32
Candida albicans TIMM1768	1	0.5	2
Candida tropicalis TIMM3380	1	1	>128
Cryptococcus neoformans TIMM3174	64	>128	>128
Aspergillus fumigatus TIMM1775	32	32	>128

本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができることは当業者にとって明らかである。

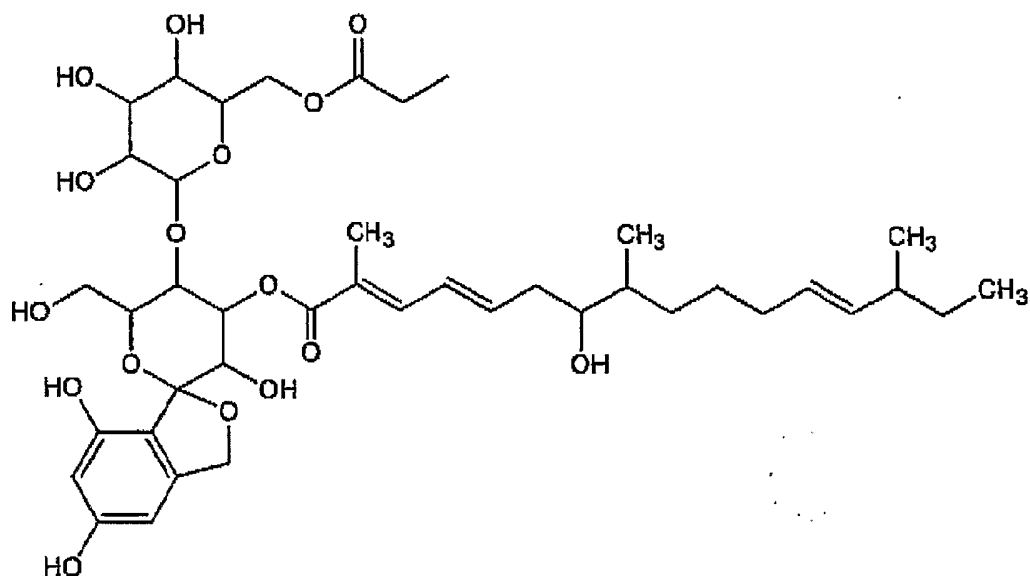
本出願は、2002年8月02日出願の日本特許出願（特願2002-225540）に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。

<産業上の利用可能性>

本発明の新規抗真菌活性物質PF1237A物質、PF1237B物質およびPF1237M物質は、表1に示したように、医療上問題になっている *Candida albicans* を含む各種真菌に対し抗真菌活性を有しており、これらを有効成分とする抗真菌剤は各種真菌を起因菌とする真菌症の治療に有用である。

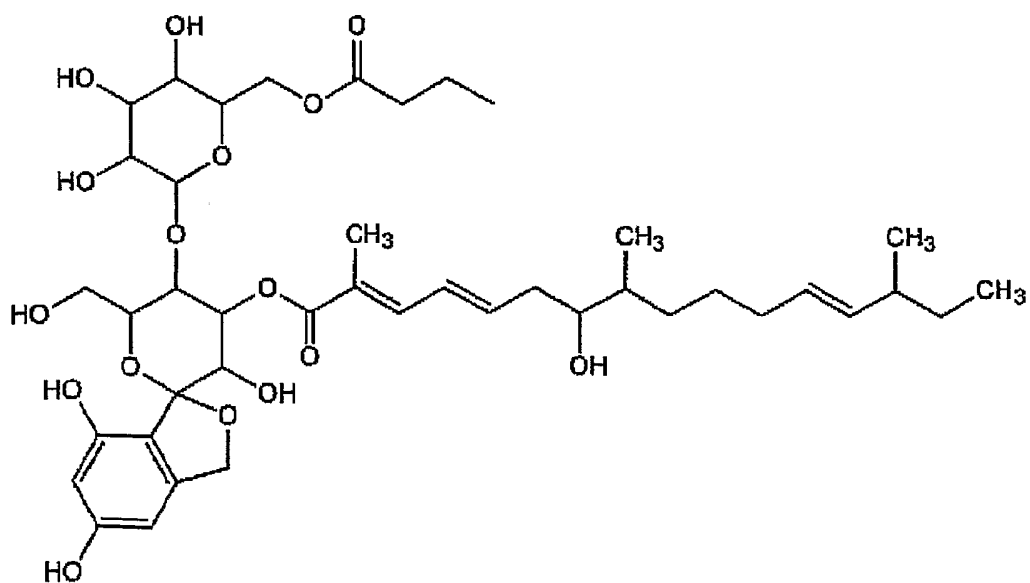
請 求 の 範 囲

1. 式 (1)



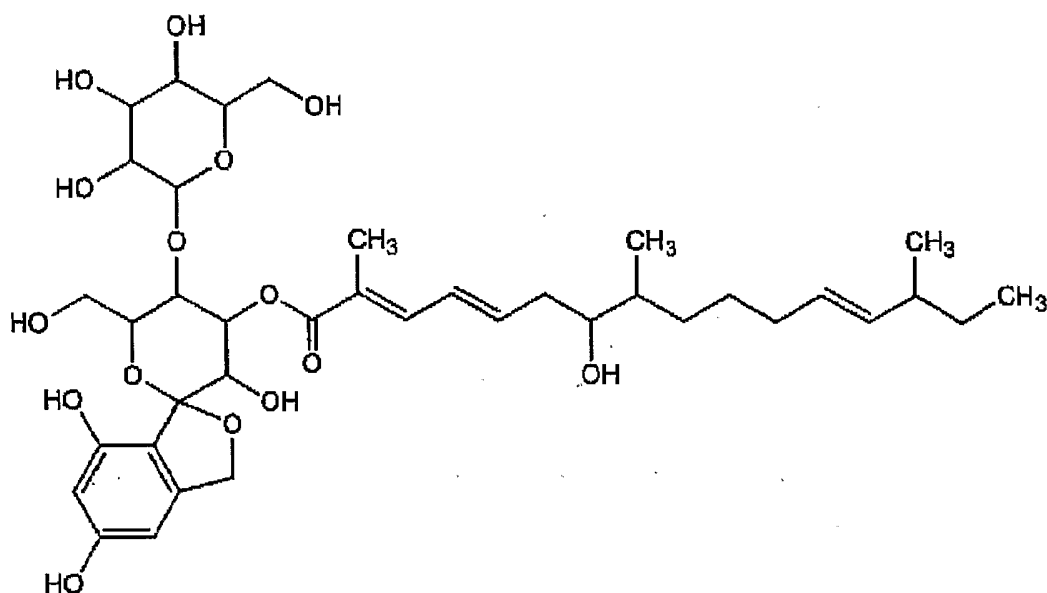
で表される PF 1 2 3 7 A 物質または薬理学的に許容されるその塩。

2. 式 (2)



で表される PF 1 2 3 7 B 物質または薬理学的に許容されるその塩。

3. 式(3)



で表される P F 1 2 3 7 M 物質または薬理学的に許容されるその塩。

4. フザリウム (Fusarium) 属に属する糸状菌を培養し、該培養物より有用物質を採取することを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載されている新規抗真菌活性物質 P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質あるいはそれらの薬理学的に許容される塩の製造法。

5. 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載されている新規抗真菌活性物質 P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質あるいはそれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも 1 つを有効成分として含有する医薬組成物。

6. 請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載されている新規抗真菌活性物質 P F 1 2 3 7 A 物質、P F 1 2 3 7 B 物質および P F 1 2 3 7 M 物質あるいはそれらの薬理学的に許容される塩の少なくとも 1 つを有効成分として含有する抗真菌剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09822

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P17/16, C07D493/10, A61K31/35, A61P31/10// (C12P17/16, C12R1:77)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P17/00-17/18, C07D493/10, C07H17/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	JP 10-114786 A (Sankyo Co., Ltd.), 06 May, 1998 (06.05.98), (Family: none)	<u>1-3, 5-6</u> 4
<u>Y</u> A	JP 11-12296 A (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.), 19 January, 1999 (19.01.99), (Family: none)	<u>4</u> 1-3, 5-6
<u>Y</u> A	JP 5-170784 A (Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.), 09 July, 1993 (09.07.93), (Family: none)	<u>4</u> 1-3, 5-6
<u>Y</u> A	JP 3-201991 A (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 03 September, 1991 (03.09.91), (Family: none)	<u>4</u> 1-3, 5-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"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)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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
"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
"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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 September, 2003 (03.09.03)

Date of mailing of the international search report
16 September, 2003 (16.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12P 17/16, C07D 493/10, A61K 31/35, A61P 31/10 //(C12P 17/16, C12R 1:77)		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12P 17/00-17/18, C07D 493/10, C07H 17/04		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用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)		
CA/REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 10-114786 A (三共株式会社) 1998. 05. 06 (ファミリーなし)	1-3, 5-6 4
Y A	JP 11-12296 A (大正製薬株式会社) 1999. 01. 19 (ファミリーなし)	4 1-3, 5-6
Y A	JP 5-170784 A (萬有製薬株式会社) 1993. 07. 09 (ファミリーなし)	4 1-3, 5-6
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	03. 09. 03	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 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		特許庁審査官 (権限のある職員) 三原 健治 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	JP 3-201991 A (明治製菓株式会社) 1991.09.03 (ファミリーなし)	<u>4</u> 1-3, 5-6