

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 5 月 11 日 (11.05.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/049157 A1

- (51) 国際特許分類:
C07C 233/09 (2006.01) *A61K 31/336* (2006.01)
C07C 233/38 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07D 303/46 (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)

(KITA, Yasuyuki) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

- (74) 代理人: 圓谷 徹 (TSUBURAYA, Toru); 〒5300001 大阪府大阪市北区梅田 1-1-3 大阪駅前第 3 ビル 1616 号 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/020089

(22) 国際出願日: 2005 年 11 月 1 日 (01.11.2005)

(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 2004-319630 2004 年 11 月 2 日 (02.11.2004) 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類:
— 国際調査報告書

- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人新産業創造研究機構 (THE NEW INDUSTRY RESEARCH ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町 1 丁目 5 番 2 号 Hyogo (JP). 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 Osaka (JP).

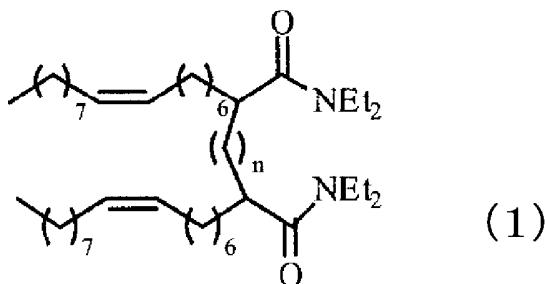
(72) 発明者; および

- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 野島 博 (NOJIMA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 北 泰行

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: MULTIMERIC OLEAMIDE DERIVATIVE HAVING CONNEXIN-26 INHIBITING POTENCY AND USE THEREOF IN CANCER THERAPY, ETC.

(54) 発明の名称: コネキシン 26 阻害活性を有する多量体型オレアミド誘導体と、その癌治療等への利用



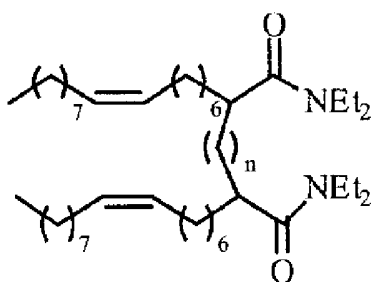
(57) Abstract: Multimeric oleamide derivatives having a connexin-26 inhibiting potency, including dimeric oleamide derivatives of the following formula (1) or pharmacologically acceptable salts thereof (in the formula (1), n is an integer of 3, 5 or 8). These novel oleamide derivatives not only can be used as reagents for researches but also, due to exhibition of useful physiological activity, such as cancer metastasis inhibition or growth inhibition, can find a wide spectrum of uses in not only cancer preventive/therapeutic agents but also pharmaceuticals, supplements, functional foods, etc., ensuring wide applications in industries.

[続葉有]



(57) 要約:

本発明は、コネキシン26阻害活性を有する多量体型オレアミド誘導体に関するものであり、下記の式(1)により表される二量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩を含む。(ただし、式(1)中、nは3, 5又は8の整数である。)本発明に係る新規オレアミド誘導体は、研究用試薬として利用できるほか、癌の転移抑制・増殖抑制など有用な生理活性を示すことから、癌の予防薬・治療薬をはじめとして、医薬、サプリメント、機能性食品などの各種用途を有し、産業上広く利用できる。



(1)

明 細 書

コネキシン26阻害活性を有する多量体型オレアミド誘導体と、その癌治療等への利用

技術分野

[0001] 本発明は、コネキシン26阻害活性を有する多量体型オレアミド誘導体とその利用に関する。これらの新規オレアミド誘導体は、研究用試薬として利用できるほか、癌の転移抑制・増殖抑制など有用な生理活性を示すことから、癌の予防薬・治療薬をはじめとして、医薬、サプリメント、機能性食品などの各種用途を有し、産業上広く利用できるものである。

背景技術

[0002] コネキシンは、ギャップ結合を構成する膜結合タンパク質ファミリーの総称である。コネキシンは、その分子量の違いによって、12を超えるサブタイプが発見されている。分子量が26kDaのものはコネキシン26、43kDaのものはコネキシン43と称されている。

[0003] コネキシンの6量体は、コネクソンと呼ばれ、導管状構造を形成して細胞膜を貫通する。コネクソンが隣接細胞間で連結したものがギャップ結合であり、この連結によって形成された導管内をイオンや低分子量タンパク質が細胞から細胞へと受け渡される。この機構は、上皮性細胞の増殖の恒常性維持などのために必須であると考えられている。

[0004] 本発明者らは以前、癌の転移機序を遺伝子レベルで解明する基礎研究を行っている中で、コネキシン26が癌転移に密接に関わっていること、より具体的には、コネキシン26の機能を抑制することにより癌の転移が抑制されることを見出している(下記の特許文献1および非特許文献1)。

[0005] また、ギャップ結合を阻害する物質として、オレイン酸のアミド誘導体であるオレアミドおよびその誘導体が知られている(下記の非特許文献2)。本発明者らは、オレアミド誘導体のうち、コネキシン26を特異的に阻害し、良好な癌転移抑制活性を示すものを同定し、その1つについて「MI-18」と命名した(下記の特許文献2)。

[0006] なお、下記の特許文献3・4には、イミダゾリジンの原料として、2量体型オレアミド誘導体を使用する例が記載されている。また、生成物であるイミダゾリジンは、in vitroでバクテリア、酵母等の成長阻害活性を有することが記載されている。

[0007] 特許文献1:特開2001-17184号公報

特許文献2:国際公開WO2004/060398号公報

特許文献3:米国特許3,872,120号公報

特許文献4:米国特許3,875,159号公報

非特許文献1:Ito, A. et al. :J. Clin. Invest. , 105:1189-1197, 2000.

非特許文献2:Boger, D. L. et al. :Proc. Nat. Acad. Sci. USA. , 95:4810-4815. 1998.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0008] 現在の癌治療では、抗癌剤の投与、癌細胞および癌組織の摘出、放射線治療など、直接癌細胞に対する治療が行われている。しかし、癌細胞は転移が非常に早いいため、癌治療を行っている途中に、別の組織に転移する場合が多い。その結果、治療が長期化し、あるいは、転移が広がり死に至る事態が生じ得る。

[0009] したがって、癌治療の治療効果を上昇させるためには、抗癌剤投与や癌組織摘出などによる直接的な癌治療のほかに、癌の転移を抑制することが重要となる。しかしながら、癌転移抑制剤の研究開発は難航しており、臨床的に確立された癌転移抑制剤は未だ開発されていない。

[0010] 前述のように、本発明者らは、コネキシン26を特異的に阻害し、良好な癌転移抑制活性を示すMI-18等のオレアミド誘導体を同定している。医薬開発などに産業利用するためには、さらに良好な物質の探索を行い、高いコネキシン26阻害活性を示し、取扱いの容易性、安定性、非毒性などの点でも優れたオレアミド誘導体を同定することが求められている。こうして得られたオレアミド誘導体は、癌転移抑制剤としても非常に有用と考えられる。

[0011] 本発明は、上記の事情に鑑みなされたものであって、コネキシン26阻害活性を有する新規オレアミド誘導体の開発をその課題とする。本発明はさらに、得られた新規

オレアミド誘導体を用いた医薬、サプリメント、機能性食品、および研究用試薬の提供をその課題とする。

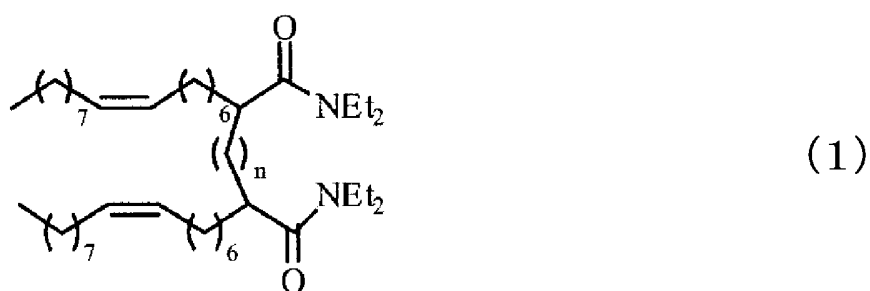
課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、構造上安定な多量体型オレアミド誘導体を種々合成し、この中から色素－トランスファーアッセイによってコネキシン26阻害活性を示す物質を探索した結果、コネキシン26を特異的に阻害する複数の新規オレアミド誘導体を見出した。このうち良好なコネキシン26阻害活性を示した後述のMI-22は、癌自然転移を顕著に抑制し、細胞毒性も殆どなく生体に安全な物質であり、油状物で取扱いにも優れ、さらに、癌の増殖抑制能(抗腫瘍効果)も認められた。これらの知見等から、今回得られた新規オレアミド誘導体は、抗癌自然転移薬、抗癌増殖薬などとして医薬開発に利用可能であり、その他、サプリメント、機能性食品、研究用試薬などとしても有用であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0013] 即ち、本発明は、医療及び産業上有用な発明として、下記A)～L)の発明を包含するものである。

A) 下記の式(1)により表される二量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

[化1]

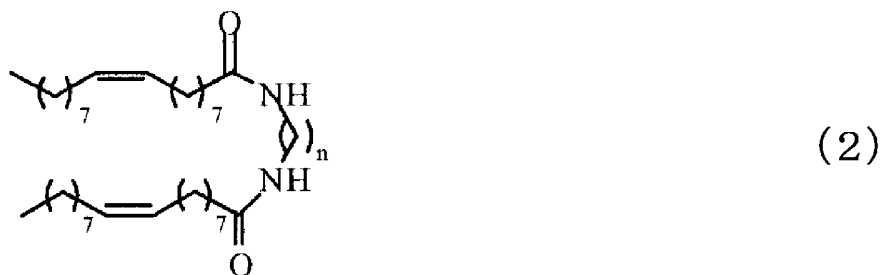


(ただし、nは3, 5又は8の整数である。炭素、水素は慣用表記にしたがって省略した。数字は炭化水素の繰り返し個数である。「Et₂」はジエチル基を表す。他の式の表記も同様である。)

上記式(1)中、n=3のものを以下「MI-22」と称する。同様に、上記式(1)中、n=5、n=8のものを、それぞれ、以下「MI-39」、「MI-40」と称する。

B) 下記の式(2)により表される二量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

[化2]

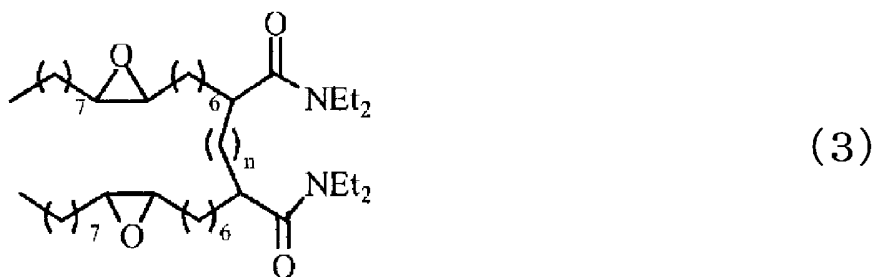


(ただし、nは3又は5の整数である。)

上記式(2)中、n=3、n=5のものを、それぞれ、以下「MI-45」、「MI-46」と称する。

C) 下記の式(3)により表される二量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

[化3]

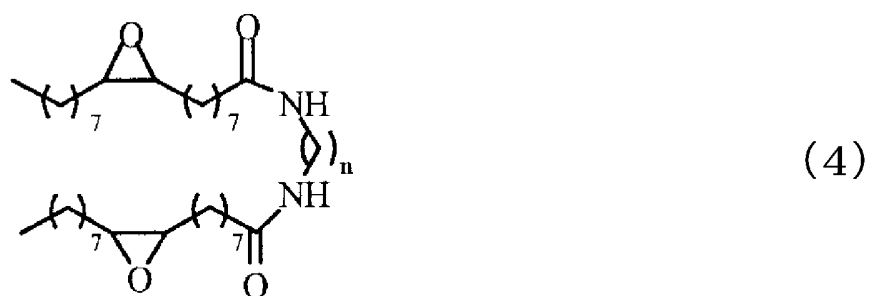


(ただし、nは5又は8の整数である。)

上記式(3)中、n=5、n=8のものを、それぞれ、以下「MI-41」、「MI-42」と称する。

D) 下記の式(4)により表される二量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

[化4]

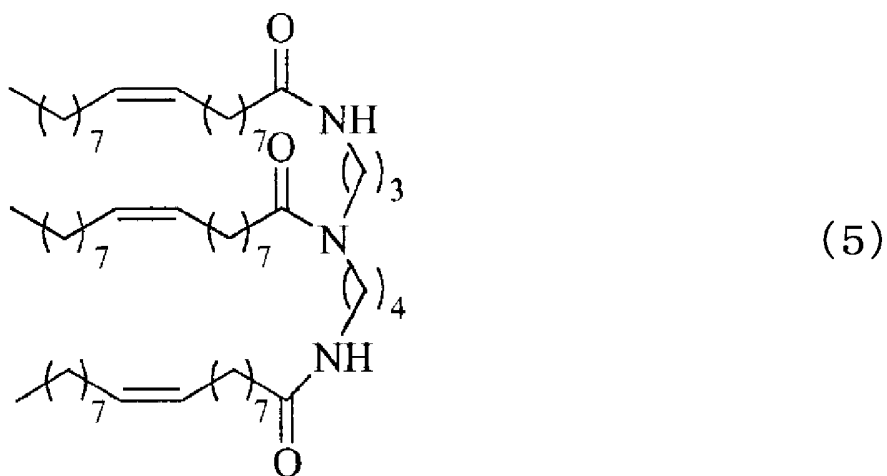


(ただし、 n は3又は5の整数である。)

上記式(4)中、 $n=3$ 、 $n=5$ のものを、それぞれ、以下「MI-47」、「MI-48」と称する。

E) 下記の式(5)により表される三量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

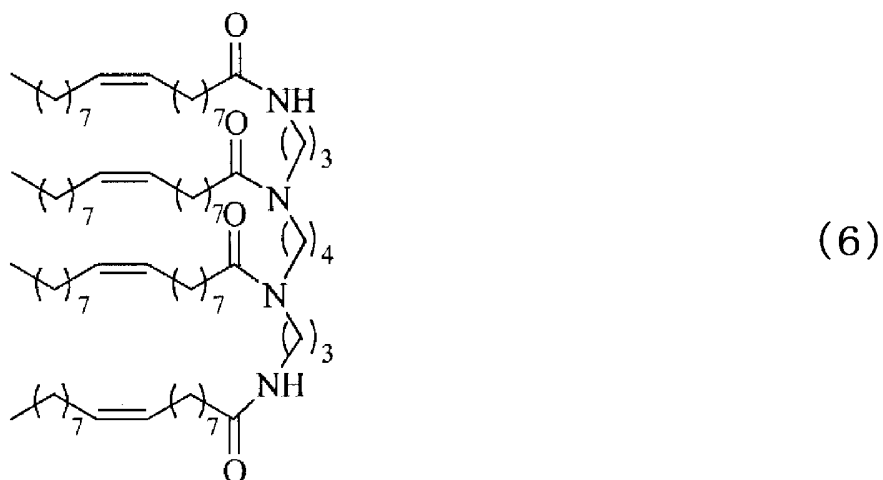
[化5]



上記式(5)により表されるオレアミド誘導体を、以下「MI-50」と称する。

F) 下記の式(6)により表される四量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

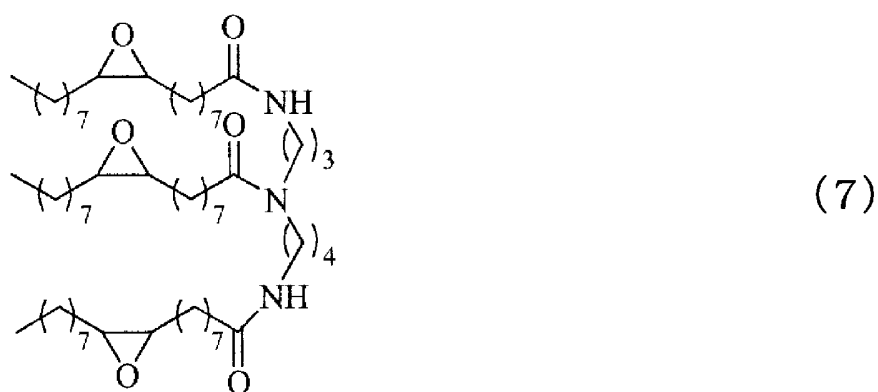
[化6]



上記式(6)により表されるオレアミド誘導体を、以下「MI-52」と称する。

G) 下記の式(7)により表される三量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

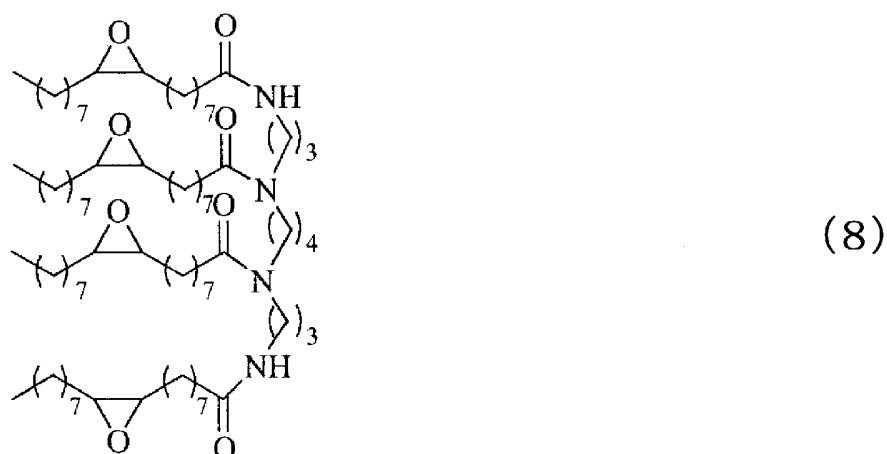
[化7]



上記式(7)により表されるオレアミド誘導体を、以下「MI-51」と称する。

H) 下記の式(8)により表される四量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

[化8]



上記式(8)により表されるオレアミド誘導体を、以下「MI-53」と称する。

I) 上記の式(1)～(8)のいずれかにより表される多量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩を有効成分とする癌の転移抑制剤。

J) 上記の式(1)～(8)のいずれかにより表される多量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩を有効成分とする癌の増殖抑制剤。

K) 上記の式(1)～(8)のいずれかにより表される多量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩を含有する食用組成物。

L) 上記の式(1)～(8)のいずれかにより表される多量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩を含有するコネキシン26阻害剤。

[0014] なお、本明細書において「多量体型」とは、脂肪酸の炭素鎖を複数有する意味で用いており、例えば「二量体型」とは、脂肪酸の炭素鎖を2つ有するものを意味する。同様に、「三量体型」「四量体型」とは、それぞれ脂肪酸の炭素鎖を3つと4つ有するものを意味する。

発明の効果

[0015] 本発明のオレアミド誘導体、即ち、上記の式(1)～(8)により表される多量体型オレアミド誘導体は、コネキシン26の機能を阻害することによって癌の自然転移を抑制・阻害し、癌の予防薬・治療薬として有用である。また、医薬のほか、サプリメント、機能性食品として利用可能であり、さらに、コネキシン26阻害剤として、研究用試薬(生化学試薬)などに利用することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]本発明に係る多量体型オレアミド誘導体の合成方法を概略的に示す図であり、(a)は二量体型オレアミド誘導体、(b)は三・四量体型オレアミド誘導体、の合成方法を示す。

[図2]色素－トランスファーアッセイによって観察された顕微鏡写真の一例を示す図である。

[図3]色素－トランスファーアッセイによって本発明に係る多量体型オレアミド誘導体のコネキシン26阻害活性およびコネキシン43阻害活性を検討した結果を示すグラフである。

[図4]MI－22投与による癌の自然転移抑制の有無を検討した結果を示すグラフである。

[図5]MI－22の投与によるマウスの肺へのマウス・メラノーマBL6細胞の転移の程度を示す図である。転移の程度は、無し(上段)、中程度(中段)、高頻度(下段)の3つに分類しており、典型的なマウス解剖時の肺の写真を載せてある。数値は各程度の肺転移を示したマウスの数を示してある。

[図6]ヒト胃がん細胞であるAz521細胞の培養条件下においてMI－22が細胞毒性を持たないことを示すグラフであり、(a)は培養液に何も加えないコントロールの結果、(b)は培養液にMI－22を加えたときの結果である。

[図7]MI－22投与によってヌードマウスにおけるヒト胃がん細胞であるAz521細胞が増殖抑制を受けることを示すグラフである。

[図8]ヒト胃がん細胞が皮下移植されたヌードマウスに対してMI－22を腹腔内投与し、その抗腫瘍効果を検討した結果を示すグラフである。図中「NT」は、薬剤投与・処置を何も行わなかった皮下腫瘍マウス群の結果である。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 以下、本発明の具体的態様、技術的範囲等について詳しく説明する。

[1]本発明のオレアミド誘導体の生理活性とその特徴

本発明者らは、上記の式(1)～(8)により表される多量体型オレアミド誘導体を後述の実施例に示す方法により合成し、各誘導体についてコネキシン26阻害活性の

有無を検討した。その結果、上記誘導体のすべてにコネキシン26阻害活性が認められた(図3参照)。

[0018] このうち、強いコネキシン26阻害活性が認められた3つの二量体型オレアミド誘導体(MI-22・MI-39・MI-45)について、更にコネキシン43阻害活性の有無を検討したところ、図3に示すように、これらの誘導体はコネキシン43の機能を殆ど阻害しなかった。

[0019] コネキシン43は、コネキシンファミリーの中で、中枢神経や心筋細胞に多く存在し、その機能が阻害されると、不整脈などの悪影響を及ぼすと考えられている。それゆえ、医薬開発に利用する場合は、コネキシン43の機能を阻害することなく、コネキシン26を特異的に阻害する特性が望ましい。この点で、上記3つのオレアミド誘導体のうちMI-22が最も望ましい結果を示したため、このMI-22の抗癌自然転移薬、抗癌増殖薬としての利用可能性について検討を行った。

[0020] その結果、上記MI-22は、癌の自然転移を顕著に抑制し(図4・5)、癌の増殖抑制能(抗腫瘍効果)も認められた(図7)。なお、詳細は後述の実施例において説明する。

[0021] また、上記MI-22は、以下の特徴を有し、抗癌自然転移薬、抗癌増殖薬などの医薬開発に好適な物質である。

(1)油状物で、有機溶媒に良溶であり、取扱いに優れている。

(2)後述の色素トランスファーアッセイによってコネキシン26を介したGJICスコアが「2」以下という低い値を示し、コネキシン26の機能を強力に阻害する一方、コネキシン43を介したGJICスコアはコントロールと殆ど変わらず、コネキシン43の阻害作用は認められなかった(図3)。したがって、不整脈などの副作用の少ない安全な薬剤開発が期待できる。

(3)細胞毒性も認められず(図6)、生体に安全な物質と考えられる。MI-22による癌の自然転移阻害を調べた実験(実施例3)において、MI-22をマウスに連日投与しても、MI-22投与が原因で死亡したマウスは皆無であり、この結果からも安全性が極めて高い物質と考えられる。

(4)一般に酸、塩基、熱、光、求核反応等の種々の条件で容易に分解するようなエ

ポキンド構造を有しておらず、比較的安定である。また、核酸等の塩基と反応して、DNAに損傷を与える可能性もない。

(5)MI-22の二量体構造は、炭素鎖によって形成されているため、分解してモノマー体のオレアミドとなることはない。同様に、本発明の他のオレアミド誘導体についても、その多量体構造は炭素鎖によって形成されているため、容易に分解しがたく変化しにくい、種々の処理を行いやすい。

[0022] なお、注目すべきは、上記MI-22が実験転移ではなく、癌の自然転移を抑制(阻害)することである。従来の薬効評価(癌転移抑制活性の評価)は、癌細胞を移植するのではなく、実験的に癌を転移させる実験転移により行っていた。すなわち、癌細胞を静注し、候補薬剤の投与2週間後の肺への癌の転移から、有効性を評価していた。これに対し、後述の実施例では、癌細胞を移植して、移植後の癌の転移から、薬効評価を行っている。これにより、実際の癌に近い状態での、有効性の評価が可能となる。すなわち、上記MI-22、そのほか本発明のオレアミド誘導体は、生体における癌転移を直接反映する癌の自然転移を抑制(阻害)するものとして、実効性ある癌治療薬の開発に利用できる可能性が極めて高い。

[0023] 本発明のオレアミド誘導体は、後述の実施例記載の方法により製造することができるが、製造方法はもちろん当該方法に限定されるものではなく、種々の改変が可能である。また、もし天然に存在することがわかれば、本発明のオレアミド誘導体を天然物から単離・精製してもよいし、あるいは、天然物から得られた物質を原材料として反応等の処理を施し、製造してもよい。必要であれば、微生物などの生物材料を使用し、生産したものであってもよい。

[0024] 図1に示される工程で製造する場合、炭素鎖に2重結合(アルケン)を有する7個のオレアミド誘導体(MI-22・MI-39・MI-40・MI-45・MI-46・MI-50・MI-52)は、2重結合をオキシランに変換する反応を省略できる分、より少ない工程で製造可能である。

[0025] 本発明のオレアミド誘導体は、コネキシン26阻害活性を有するが、ここで「コネキシン26阻害活性」は、本発明のオレアミド誘導体を投与することにより、コネキシン26を介した細胞間物質移動が抑制されることを意味する。このことは、後述の色素ーTRAN

スファアッセイによりコネキシン26を介したGJICスコアの変化を調べることによって容易に確認することができる。

[0026] [2]本発明のオレアミド誘導体の用途

上記のように、本発明のオレアミド誘導体はコネキシン26阻害活性を示すことから、コネキシン26阻害剤として研究用試薬に利用することができる。また、このようにギャップ結合を構成するコネキシン26を特異的に阻害するという生理活性を有することから、この特性を利用した医薬開発も期待できる。

[0027] さらに上記MI-22等のオレアミド誘導体には、強い癌の転移抑制活性、抗腫瘍活性が認められるので、抗癌剤(制癌剤)などの医薬、さらには抗癌作用または癌予防効果をもつサプリメント、機能性食品(食用組成物)の原材料などに利用可能である。

[0028] なお、本発明には上記オレアミド誘導体のほかに、これら誘導体の薬理上許容される塩も含まれる。このような薬理上許容される塩としては、フッ化水素酸塩、塩酸塩などのハロゲン化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの無機酸塩、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、スルホン酸塩、および、有機酸塩を例示することができる。

[0029] 本発明のオレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩(以下、単に「オレアミド誘導体」という。)を医薬開発に利用する場合、その一態様として、本発明のオレアミド誘導体を医薬品開発過程におけるリード化合物として利用するものであってもよい。

[0030] 本発明のオレアミド誘導体を医薬品(医薬用組成物)に用いる場合の一例について説明する。本発明のオレアミド誘導体は、これをそのまま、あるいは慣用の医薬製剤担体とともに医薬用組成物となし、ヒト(または動物)に投与することができる。医薬用組成物の剤形としては特に制限されるものではなく必要に応じて適宜選択すればよいが、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤等の経口剤、注射剤、坐剤、塗布剤等の非経口剤が挙げられる。

[0031] 錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤等の経口剤は、例えば、デンプン、乳糖、白糖、トレハロース、マンニト、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を用いて常法に従って製造される。これらの製剤中の本発明のオレアミド誘導体の配合量は特に限定されるものではなく適宜設定できる。この種の製剤には、結

合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を適宜に使用することができる。

[0032] 非経口剤の場合、患者の年齢、体重、疾患の程度などに応じて用量を調節し、例えば、静注、点滴静注、皮下注射、筋肉注射などによって投与する。この非経口剤は常法に従って製造され、希釈剤として一般に注射用蒸留水、生理食塩水等を用いることができる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤を加えてもよい。また、この非経口剤は安定性の点から、バイアル等に充填後冷凍し、通常の凍結乾燥処理により水分を除き、使用直前に凍結乾燥物から液剤を再調製することもできる。さらに必要に応じて、等張化剤、安定剤、防腐剤、無痛化剤を加えてもよい。これら製剤中の本発明のオレアミド誘導体の配合量は特に限定されるものではなく任意に設定できる。その他の非経口剤の例として、外用液剤、軟膏等の塗布剤、直腸内投与のための坐剤等が挙げられ、これらも常法に従って製造される。

[0033] なお、公知のDDS (ドラッグ・デリバリー・システム) を利用し、例えば、本発明のオレアミド誘導体をリポソームなどの運搬体に封入して体内投与してもよい。このとき標的部位 (癌細胞等) を特異的に認識する運搬体などを利用すれば、標的部位に本発明のオレアミド誘導体を効率よく運ぶことができ効果的である。

[0034] また前述したように、本発明のオレアミド誘導体は、サプリメント、機能性食品などの食品 (食用組成物) に利用することができる。すなわち、各種飲料や各種加工食品の原材料として本発明のオレアミド誘導体を飲食品に添加したり、必要に応じてデキストリン、乳糖、澱粉等の賦形剤や香料、色素等とともにペレット、錠剤、顆粒等に加工したり、またゼラチン等で被覆してカプセルに成形加工して健康食品や保健食品等として利用できる。

実施例

[0035] 以下、本発明の実施例について説明するが、本発明は下記実施例によって何ら限定されるものではない。

[0036] [実施例1: 本発明に係る多量体型オレアミド誘導体の合成]

まず、MI-22をはじめとする本発明の多量体型オレアミド誘導体の合成方法について説明する。図1(a)は、二量体型オレアミド誘導体の化学合成を概略的に示した

もの、同図(b)は、三量体型・四量体型オレアミド誘導体の化学合成を概略的に示したものの、である。

[0037] なお、以下の実施例では、核磁気共鳴(^1H -NMR)スペクトルは、20–25°Cでテトラメチルシランを内部標準物質として300MHzにて測定した。赤外線(IR)吸収スペクトルは、KBrを希釈剤とした拡散反射法により測定した。カラムクロマトグラフィの吸着剤にはE. Merck silica gel 60を使用し、薄層クロマトグラフィにはE. Merck pre-coated TLC platesおよびsilica gel F₂₅₄を使用した。

[0038] [1. 1]MI-22の合成

MI-22、即ち、 $\text{N}^1, \text{N}^1, \text{N}^7, \text{N}^7$ -テトラエチル-2,6-ジ[(Z)-7-ヘキサデセニル]ヘプタンジアミド($\text{N}^1, \text{N}^1, \text{N}^7, \text{N}^7$ -Tetraethyl-2,6-di[(Z)-7-hexadecenyl]heptanediamide)を以下の方法により合成した。

[0039] 窒素雰囲気下、オレイン酸(503mg, 1.8mmol)の無水メチレンクロリド溶液(8.5mL)に氷冷下、オキザリルクロリド(0.46mL, 5.4mmol)を滴下して、室温で4時間攪拌した後、減圧濃縮した。得られた残渣にジエチルアミン(1.0mL, 9.7mmol)を加え、室温で0.5時間攪拌した後、水を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(n-ヘキサン:酢酸エチル=1:2)を用いて精製し、無色油状物として、(Z)-N,N-ジエチル-9-オクタデセンアミド((Z)-N,N-diethyl-9-octadecenamide) (495mg, 82%)を得た。

[0040] 上記無色油状物の核磁気共鳴(^1H -NMR)スペクトルデータを以下に示す。

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.88 (3H, t, J = 6.6 Hz), 1.11 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.17 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.25–1.39 (20H, m), 1.50–1.75 (2H, m), 1.95–2.10 (4H, m), 2.28 (2H, t, J = 7.4 Hz), 3.30 (2H, q, J = 6.6 Hz), 3.37 (2H, q, J = 6.6 Hz), 5.32–5.36 (2H, m).

[0041] 上記無色油状物(153mg, 0.45mmol)のTHF溶液(12mL)を−40°Cに冷却し、LDA(0.7mL, 1.4mmol)を加え、−40°Cで0.5時間攪拌した。その後、ジヨードプロパン(1,3-diiodopropane) (0.26mL, 2.3mmol)を加え、−40°Cで3時間攪拌した後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた。次に、有機層を分別し、水層を酢

酸エチルで抽出した。混合有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(n-ヘキサン:酢酸エチル=4:1)を用いて精製し、無色油状物として、MI-22(22mg, 21%)を得た。

[0042] 上記MI-22の赤外線(IR)吸収スペクトル、核磁気共鳴(^1H , ^{13}C -NMR)スペクトル、質量分析法(FAB)の各データを以下に示す。

IR (KBr) 3416, 2855, 1614 cm^{-1} ;

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.88 (6H, t, $J = 6.4$ Hz), 1.09 (6H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.14 (6H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.20–1.38 (48H, m), 1.50–1.62 (2H, m), 1.98–2.03 (8H, m), 2.42–2.52 (2H, m), 3.31 (4H, q, $J = 7.2$ Hz), 3.36 (4H, q, $J = 7.2$ Hz), 5.32–5.35 (4H, m);

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 12.9, 13.9, 14.8, 22.5 (2C), 27.0 (2C), 27.4, 29.0 (3C), 29.3, 29.6 (2C), 31.7 (2C), 33.3, 33.5, 40.2, 41.0, 41.6, 129.5, 129.7, 175.1.

LRMS (FAB) m/z 716 (MH^+). HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{47}\text{H}_{91}\text{N}_2\text{O}_2$, 715.7081; found, 715.7078.

[0043] [1. 2]MI-39の合成

MI-39、即ち、 $\text{N}^1, \text{N}^1, \text{N}^9, \text{N}^9$ -テトラエチル-2,8-ジ[(Z)-7-ヘキサデセニル]ノナンジアミド($\text{N}^1, \text{N}^1, \text{N}^9, \text{N}^9$ -Tetraethyl-2,8-di[(Z)-7-hexadecenyl]nonanediamide)を以下の方法により合成した。

[0044] 上記MI-22の合成と同様に、(Z)-N,N-diethyl-9-octadecenamide(70mg, 0.22 mmol)のTHF溶液にLDA(0.34mL, 0.66mmol)を加え、 -40°C で0.5時間攪拌した。その後、ジヨードペンタン(1,5-diiodopentane)(3.0mL, 0.17mmol)を加え、 -40°C で3時間攪拌した後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた。次に、有機層を分別し、水層を酢酸エチルで抽出した。混合有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(n-ヘキサン:酢酸エチル=8:1)を用いて精製し、無色油状物として、MI-39(50mg, 30%)を得た。

[0045] 上記MI-39の核磁気共鳴(^1H -NMR)スペクトル、質量分析法(FAB)の各データを以下に示す。

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.88 (6H, t, $J = 6.4$ Hz), 1.07–1.29 (64H, m), 1.50–1.62 (2H, m), 1.99–2.01 (8H, m), 2.28 (2H, m), 3.35 (8H, q, $J = 5.4$ Hz), 5.33 (4H, m).

LRMS (FAB) m/z 744 (MH^+). HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{95}\text{N}_2\text{O}_2$, 743.7394; found, 743.7415.

[0046] [1. 3]MI-40の合成

MI-40、即ち、 $\text{N}^1, \text{N}^1, \text{N}^{12}, \text{N}^{12}$ -テトラエチル-2,11-ジ[(Z)-9-ヘキサデセニル]ドデカンジアミド($\text{N}^1, \text{N}^1, \text{N}^{12}, \text{N}^{12}$ -Tetraethyl-2,11-di[(Z)-9-hexadecenyl]dodecanediamide)を以下の方法により合成した。

[0047] 上記MI-22の合成と同様に、(Z)-N,N-diethyl-9-octadecenamide (52mg, 0.17 mmol)のTHF溶液にLDA (0.25mL, 0.51mmol)を加え、 -40°C で0.5時間攪拌した。その後、ジヨードオクタン(1,5-diiodooctane) (0.17mL, 0.85mmol)を加え、 -40°C で3時間攪拌した後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた。次に、有機層を分別し、水層を酢酸エチルで抽出した。混合有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(n-ヘキサン:酢酸エチル=8:1)を用いて精製し、無色油状物として、MI-40 (21mg, 16%)を得た。

[0048] 上記MI-40の核磁気共鳴(^1H -NMR)スペクトル、質量分析法(FAB)の各データを以下に示す。

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.88 (6H, t, $J = 6.4$ Hz), 1.08–1.59 (72H, m), 1.99–2.04 (8H, m), 2.50 (2H, m), 3.35 (8H, q, $J = 5.4$ Hz), 5.33 (4H, m).

LRMS (FAB) m/z 786 (MH^+). HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{101}\text{N}_2\text{O}_2$, 785.7863; found, 785.7897.

[0049] [1. 4]MI-45の合成

MI-45、即ち、 N^1 -[(Z)-3-オクタデック-9-エノイルアミノプロピル]-(Z)-9-オクタデセンアミド(N^1 -[(Z)-3-Octadec-9-enoylamino]propyl-(Z)-9-octadecenamide)を以下の方法により合成した。

[0050] 窒素雰囲気下、オレイン酸(100mg, 0.35mmol)の無水メチレンクロリド溶液(3.

0mL)に氷冷下、オキザリルクロリド(0.11mL, 1.2mmol)を滴下して、室温で4時間攪拌した後、減圧濃縮した。得られた残渣にプロパン-1,3-ジアミン(0.015mL, 0.18mmol)を加え、室温で1時間攪拌した後、水を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(n-ヘキサン:酢酸エチル=1:4)を用いて精製し、無色油状物として、MI-45(89mg, 84%)を得た。

[0051] 上記MI-45の核磁気共鳴(^1H -NMR)スペクトル、質量分析法(FAB)の各データを以下に示す。

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.88 (6H, t, $J = 6.6$ Hz), 1.27–1.31 (40H, m), 1.57–1.61 (6H, m), 1.98–2.05 (8H, m), 2.20 (4H, dd, $J = 7.4$ Hz), 3.27 (4H, dd, $J = 12.4$, 5.9 Hz), 5.34 (4H, m), 6.19 (2H, brs).

LRMS (FAB) m/z 604 (MH^+). HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_2$, 603.5829; found, 603.5813.

[0052] [1.5]MI-46の合成

MI-46、即ち、 N^1 -[(Z)-5-オクタデック-9-エノイルアミノペンチル]-(Z)-9-オクタデセンアミド(N^1 -[(Z)-5-Octadec-9-enoylamino-pentyl]-(Z)-9-octadecenamide)を以下の方法により合成した。

[0053] MI-45の合成と同様に、オレイン酸(127mg, 0.45mmol)の無水メチレンクロリド溶液に氷冷下、オキザリルクロリド(0.14mL, 1.58mmol)を滴下して、室温で4時間攪拌した後、減圧濃縮した。得られた残渣にペンタン-1,5-ジアミン(0.026mL, 0.22mmol)を加え、室温で1時間攪拌した後、水を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(ジクロロメタン:メタノール=20:1)を用いて精製し、無色油状物として、MI-46(127mg, 45%)を得た。

[0054] 上記MI-46の核磁気共鳴(^1H -NMR)スペクトル、質量分析法(FAB)の各データを以下に示す。

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.85 (6H, t, $J = 6.5$ Hz), 1.25–1.64 (42H, m), 1.97–2.01 (8H, m), 2.13–2.19 (4H, dd, $J = 7.2$ Hz), 3.23 (4H, dd, $J = 12.4$, 5.9 Hz), 5.27–5.34 (4H, m), 6.19 (2H, brs).

.40 (4H, m), 5.88 (2H, brs).

LRMS (FAB) m/z 631 (MH^+). HRMS (FAB) calcd for $C_{41}H_{78}N_2O_2$, 631.6142; found, 631.6130.

[0055] [1. 6]MI-50の合成

MI-50、即ち、 $N^1-\{(Z)-3\text{-オクタデック-9-エノイル-N-}[(Z)-4\text{-オクタデック-9-エノイルアミノブチル}]-\text{アミノプロピル}\}-(Z)-9\text{-オクタデセンアミド}$ ($N^1-\{(Z)-3\text{-Octadec-9-enoyl-N-}[(Z)-4\text{-octadec-9-enoylaminobutyl}]-\text{aminopropyl}\}-(Z)-9\text{-octadecenamide}$)を以下の方法により合成した。

[0056] MI-45の合成と同様に、オレイン酸(100mg, 0.35mmol)の無水メチレンクロリド溶液に氷冷下、オキザリルクロリド(0.11mL, 1.2mmol)を滴下して、室温で4時間攪拌した後、減圧濃縮した。得られた残渣にスぺルミジン(0.020mL, 0.12mmol)を加え、室温で1時間攪拌した後、水を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(ジクロロメタン:メタノール=20:1)を用いて精製し、無色油状物として、MI-50(75mg, 23%)を得た。

[0057] 上記MI-50の核磁気共鳴(1H -NMR)スペクトル、質量分析法(FAB)の各データを以下に示す。

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.88 (9H, t, $J = 6.5\text{Hz}$), 1.27-1.80 (72H, m), 1.99-2.01 (12H, m), 2.14-2.36 (6H, m), 3.11-3.42 (8H, m), 5.28-5.40 (6H, m).

LRMS (FAB) m/z 939 (MH^+). HRMS (FAB) calcd for $C_{61}H_{116}N_3O_3$, 938.9017; found, 938.9005.

[0058] [1. 7]MI-52の合成

MI-52、即ち、 $N^1-\{(Z)-3\text{-オクタデック-9-エノイル-N-}[(Z)-4\text{-オクタデック-9-エノイル-N-}\{(Z)-3\text{-オクタデック-9-エノイルアミノプロピル}\}-\text{アミノブチル}]-\text{アミノプロピル}\}-(Z)-9\text{-オクタデセンアミド}$ ($N^1-\{(Z)-3\text{-Octadec-9-enoyl-N-}[(Z)-4\text{-octadec-9-enoyl-N-}\{(Z)-3\text{-octadec-9-enoylaminopropyl}\}-\text{aminobutyl}]-\text{aminopropyl}\}-(Z)-9\text{-octadecenamide}$)を以下の方法により合成した。

[0059] MI-45の合成と同様に、オレイン酸(100mg, 0.35mmol)の無水メチレンクロリド

ド溶液に氷冷下、オキザリルクロリド (0.11 mL, 1.2 mmol) を滴下して、室温で4時間攪拌した後、減圧濃縮した。得られた残渣にN, N¹-ビス(3-アミノプロピル)-1, 4-ブタンジアミン (18.2 mg, 0.086 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した後、水を加え、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(ジクロロメタン:メタノール=20:1)を用いて精製し、無色油状物として、MI-52 (71 mg, 16%) を得た。

[0060] 上記MI-52の核磁気共鳴(¹H-NMR)スペクトル、質量分析法(FAB)の各データを以下に示す。

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.88 (12H, t, J = 6.5 Hz), 1.27–1.77 (96H, m), 1.99–2.02 (16H, m), 2.16–2.37 (8H, m), 3.14–3.41 (12H, m), 5.28–5.30 (8H, m).

LRMS (FAB) m/z 1260 (MH⁺). HRMS (FAB) calcd for C₆₈H₁₅₅N₄O₄, 1260.2048; found, 1260.2062.

[0061] [1.8]MI-41の合成

MI-41、即ち、N¹,N¹,N⁹,N⁹-テトラエチル-2,8-ジ[8-{(2S*, 3R*)-3-オクチル-オキシラニル}-オクチル]ノナンジアミド(N¹,N¹,N⁹,N⁹-Tetraethyl-2,8-di[8-{(2S*, 3R*)-3-octyl-oxiranyl}-octyl]nonanediamide)を以下の方法により合成した。

[0062] 前記MI-39 (50 mg, 0.064 mmol) のジクロロメタン溶液 (3 mL) に、氷冷下、m-クロロ過安息香酸 (28 mg, 0.13 mmol) を加えて、室温で3時間攪拌した。次に、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて、有機層を分別し、水層をジクロロメタンで抽出した。混合有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(n-ヘキサン:酢酸エチル=3:1)を用いて精製し、白色固体として、MI-41 (39 mg, 76%) を得た。

[0063] 上記MI-41の核磁気共鳴(¹H-NMR)スペクトル、質量分析法(FAB)の各データを以下に示す。

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.88 (6H, t, J = 6.4 Hz), 1.08–1.64 (78H, m), 2.44–2.53 (2H, m), 2.89 (4H, brs), 3.36 (8H, q, J = 7.2 Hz).

LRMS (FAB) m/z 776 (MH⁺). HRMS (FAB) calcd for C₄₉H₉₅N₂O₄, 775.7292; found, 7

75.7323.

[0064] [1. 9]MI-42の合成

MI-42、即ち、 N^1, N^1, N^{12}, N^{12} -テトラエチル-2,11-ジ[8-{(2S*, 3R*)-3-オクチル-オキシラニル}-オクチル]ドデカンジアミド(N^1, N^1, N^{12}, N^{12} -Tetraethyl-2,11-di[8-{(2S*, 3R*)-3-octyl-oxiranyl}-octyl]dodecanediamide)を以下の方法により合成した。

[0065] 前記MI-40(30mg, 0.038mmol)のジクロロメタン溶液に、氷冷下、*m*-クロロ過安息香酸(21mg, 0.095mmol)を加えて、室温で3時間攪拌した。次に、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて、有機層を分別し、水層をジクロロメタンで抽出した。混合有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(*n*-ヘキサン:酢酸エチル=4:1)を用いて精製し、無色油状物として、MI-42(25mg, 81%)を得た。

[0066] 上記MI-42の核磁気共鳴(^1H -NMR)スペクトル、質量分析法(FAB)の各データを以下に示す。

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.88 (6H, t, $J = 6.4$ Hz), 1.08–1.64 (80H, m), 2.45–2.53 (2H, m), 2.89 (4H, brs), 3.36 (8H, q, $J = 7.2$ Hz).

LRMS (FAB) m/z 818 (MH^+). HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{101}\text{N}_2\text{O}_4$, 817.7761; found, 817.7729.

[0067] [1. 10]MI-47の合成

MI-47、即ち、 N^1 -[3-{8-[(2S*, 3R*)-3-オクチル-オキシラニル]-オクタノイルアミノ}-プロピル]-{8-(2S*, 3R*)-3-オクチル-オキシラニル}オクタナミド(N^1 -[3-{8-[(2S*, 3R*)-3-Octyl-oxiranyl]-octanoylamino}-propyl]-[8-(2S*, 3R*)-3-octyl-oxiranyl]octanamide)を以下の方法により合成した。

[0068] 前記MI-45(60mg, 0.10mmol)のジクロロメタン溶液に、氷冷下、*m*-クロロ過安息香酸(100mg, 0.45mmol)を加えて、室温で3時間攪拌した。次に、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて、有機層を分別し、水層をジクロロメタンで抽出した。混合有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(酢酸エチル)を用いて精製し、無色油状

物として、MI-47 (60mg, 94%)を得た。

- [0069] 上記MI-47の核磁気共鳴(^1H -NMR)スペクトル、質量分析法(FAB)の各データを以下に示す。

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.88 (6H, t, $J = 6.5\text{Hz}$), 1.25-1.76 (54H, m), 2.20 (4H, t, $J = 7.5\text{Hz}$), 3.01 (4H, brs), 3.27 (4H, q, $J = 6.4\text{Hz}$), 6.49 (2H, brs).

LRMS (FAB) m/z 636 (MH^+). HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{75}\text{N}_2\text{O}_4$, 635.5727; found, 635.5726.

- [0070] [1. 11]MI-48の合成

MI-48、即ち、 N^1 -[5-{8-[(2S*, 3R*)-3-オクチルーオキシラニル]-オクタノイルアミノ}-ペンチル]-{8-(2S*, 3R*)-3-オクチルーオキシラニル}オクタナムド(N^1 -[5-{8-[(2S*, 3R*)-3-Octyl-oxiranyl]-octanoylamino}-pentyl]-{8-(2S*, 3R*)-3-octyl-oxiranyl}octanamide)を以下の方法により合成した。

- [0071] 前記MI-46 (63mg, 0. 10mmol)のジクロロメタン溶液に、氷冷下、 m -クロロ過安息香酸(78mg, 0. 35mmol)を加えて、室温で3時間攪拌した。次に、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて、有機層を分別し、水層をジクロロメタンで抽出した。混合有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(ジクロロメタン:メタノール=20:1)を用いて精製し、無色油状物として、MI-48 (66mg, 99%)を得た。

- [0072] 上記MI-48の核磁気共鳴(^1H -NMR)スペクトル、質量分析法(FAB)の各データを以下に示す。

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.88 (6H, t, $J = 6.5\text{Hz}$), 1.25-1.73 (58H, m), 2.17 (4H, t, $J = 7.5\text{Hz}$), 2.90 (4H, brs), 3.24 (4H, q, $J = 6.4\text{Hz}$), 5.70 (2H, brs).

LRMS (FAB) m/z 664 (MH^+). HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{41}\text{H}_{79}\text{N}_2\text{O}_4$, 663.6040; found, 660.6050.

- [0073] [1. 12]MI-51の合成

MI-51、即ち、 N^1 -{3-[8-{(2S*, 3R*)-3-オクチルーオキシラニル}-オクタノイル]-N-[4-{8-[(2S*, 3R*)-3-オクチルーオキシラニル]-オクタノイルアミノ}-ブチル]-アミノプロピル}-{8-(2S*, 3R*)-3-オクチルーオキシラ

ニル}オクタンアミド (N^1 -{3-[8-{(2S*, 3R*)-3-Octyl-oxiranyl}-octanoyl]-N-[4-{8-[(2S*, 3R*)-3-octyl-oxiranyl]-octanoylamino}-butyl]-aminopropyl]-8-(2S*, 3R*)-3-octyl-oxiranyl}octanamide) を以下の方法により合成した。

[0074] 前記MI-50 (36mg, 0.038mmol) のジクロロメタン溶液に、氷冷下、*m*-クロロ過安息香酸 (30mg, 0.19mmol) を加えて、室温で3時間攪拌した。次に、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて、有機層を分別し、水層をジクロロメタンで抽出した。混合有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ (ジクロロメタン:メタノール=20:1) を用いて精製し、無色油状物として、MI-51 (38mg, 100%) を得た。

[0075] 上記MI-51の核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$) スペクトル、質量分析法 (FAB) の各データを以下に示す。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.88 (9H, t, $J = 6.5\text{Hz}$), 1.26–1.77 (84H, m), 2.14–2.36 (6H, m), 2.89–2.91 (6H, m), 3.07–3.42 (8H, m), 5.31 (1H, brs), 6.88 (1H, brs).
LRMS (FAB) m/z 987 (MH^+). HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{61}\text{H}_{116}\text{N}_3\text{O}_6$, 986.8864; found, 986.8820.

[0076] [1.13]MI-53の合成

MI-53、即ち、 N^1 -{3-{[8-{(2S*, 3R*)-3-オクチルーオキシラニル}-オクタノイル]-[4-({8-[(2S*, 3R*)-3-オクチルーオキシラニル]-オクタノイル}-N-{3-[8-{(2S*, 3R*)-3-オクチルーオキシラニル}-オクタノイルアミノ]-プロピル}-アミノ)-ブチル]-アミノ}-プロピル)-8-{(2S*, 3R*)-3-オクチルーオキシラニル}オクタンアミド (N^1 -{3-[8-{(2S*, 3R*)-3-Octyl-oxiranyl]-octanoyl]-N-[4-({8-[(2S*, 3R*)-3-octyl-oxiranyl]-octanoyl]-N-{3-[8-{(2S*, 3R*)-3-octyl-oxiranyl]-octanoylamino]-propyl]-amino)-butyl]-amino)-propyl]-8-(2S*, 3R*)-3-octyl-oxiranyl}octanamide) を以下の方法により合成した。

[0077] 前記MI-52 (36mg, 0.029mmol) のジクロロメタン溶液に、氷冷下、*m*-クロロ過安息香酸 (32mg, 0.14mmol) を加えて、室温で3時間攪拌した。次に、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて、有機層を分別し、水層をジクロロメタンで抽出した。混合有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。

得られた粗抽出物をカラムクロマトグラフィ(ジクロロメタン:メタノール=20:1)を用いて精製し、無色油状物として、MI-53(36mg, 94%)を得た。

[0078] 上記MI-53の核磁気共鳴(^1H -NMR)スペクトル、質量分析法(FAB)の各データを以下に示す。

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0.88 (12H, t, $J = 6.5\text{Hz}$), 1.11–1.77 (112H, m), 2.15–2.66 (8H, m), 3.01–3.02 (8H, m), 3.09–3.41 (12H, m), 6.81 (1H, brs), 6.93 (1H, brs).

LRMS (FAB) m/z 1324 (MH^+). HRMS (FAB) calcd for $\text{C}_{82}\text{H}_{155}\text{N}_4\text{O}_8$, 1324.1845; found, 1324.1849.

[0079] [実施例2: 上記多量体型オレアミド誘導体のコネキシン26特異的阻害]

次に、上記方法により合成した各オレアミド誘導体について、各誘導体によるコネキシン26阻害の有無(換言すれば、コネキシン26によって構成されるギャップ結合を介した細胞間物質輸送の阻害の有無)を検討した。実験方法は、国際公開WO2004/060398号公報に記載の方法と同様であり、色素トランスファーアッセイにより各被検物質のGJICスコア(ギャップ結合細胞間コミュニケーション値)を評価した。

[0080] [2. 1]細胞株と細胞培養

上記公報に記載の方法と同様に、実験にはヒト子宮頸部偏平上皮癌細胞(HeLa細胞)を使用した。より具体的には、ラットコネキシン26(Cx26)を安定して発現するHeLa細胞サブクローン(HeLa-Cx26)、および、ラットコネキシン43(Cx43)を安定して発現するHeLa細胞サブクローン(HeLa-Cx43)を使用した。すべての細胞(後述の実施例で使用了細胞を含む)は、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で、10%ウシ胎仔血清(FCS)を加えて培養した。

[0081] [2. 2]色素トランスファーアッセイ

アッセイの前日、HeLa-Cx26細胞およびHeLa-Cx43細胞をそれぞれ別個に、10%FCS含有DMEM中に懸濁させた。そして、いずれの細胞もドナー細胞用と、レシピエント細胞用とに分けて培養した。レシピエント細胞は、直径3cmの培養皿で培養し、アッセイ時にはほぼコンフルエントな単層を形成するように、調節された。

[0082] アッセイにおいてはまず、ドナー細胞の培養液にカルセイン(ギャップ結合透過性)

およびDiI(ギャップ結合非透過性)の両色素をそれぞれ $10\mu\text{M}$ 、 $2\mu\text{M}$ 添加し、1時間インキュベートした。2重標識ドナー細胞は、トリプシン処理し、リン酸緩衝溶液で3回洗浄した。その後、各単一のドナー細胞を、標識化されていないレシピエント細胞上に静かに載置した。ドナー細胞が単層に定着するには1時間を要した。そして、約1.5時間で色素-カップリングを示し始め、ギャップ結合を介したドナー細胞から隣接レシピエント細胞への色素移動が観察された。

[0083] 色素-カップリングに対する各被検物質の阻害活性を評価するために、ドナー細胞培養1時間後、オレアミドおよび上記多量体型オレアミド誘導体をそれぞれエタノールに溶解し、各培養皿に対して $10\mu\text{L}$ 、終濃度 $20\mu\text{M}$ となるよう添加した。また、コントロールとして、エタノールを1000倍希釈して培養皿に添加した。それから1時間後、各培養皿を共焦点走査顕微鏡(LSM510)により観察した。図2は、こうして観察された顕微鏡写真の一例を示す。

[0084] 図中、*印で示されるドナー細胞は、カルセイン(緑色蛍光)およびDiI(赤色蛍光)を両方含むため、原図では黄色に表示される。また、色素-カップリングにより、ギャップ結合透過性のカルセインがギャップ結合を介してレシピエント細胞に色素移動すると、当該細胞は緑色に表示される。このようなアッセイにより、各被検物質のGJICスコアは、次のように評価される。

[0085] すなわち、ドナー細胞が色素-カップリングしなければ「0」、ドナー細胞から隣接レシピエント細胞に色素-カップリングすれば「1」、このレシピエント細胞に移動したカルセインが、上記ドナー細胞から離れる方向の次の隣接細胞に移動すれば「2」、さらに上記ドナー細胞から離れた3番目の隣接細胞に移動すれば「3」、・・・というように評価する。また、中間レベルとして、図中矢印に示すように、細胞染色の程度を0.25、0.5、0.75、1.0の4段階に評価した。

[0086] このようなアッセイを3回繰り返し行い、各被検物質について、少なくとも30個のドナー細胞を使用して評価を行った。そして、各被検物質のGJICスコアの平均値、標準偏差を算出した。図3は、このアッセイ結果を示すグラフであり、各オレアミド誘導体のGJICスコアが示される。グラフ中、黒色のバーはコネキシン26を介したGJICスコア、灰色のバーはコネキシン43を介したGJICスコア、である。コネキシン26を介したGJI

Cスコアについて、実験に供された二量体型オレアミド誘導体はすべて、オレアミドと同程度またはそれより低い値を示し、コネキシン26阻害活性を有することが認められた。

[0087] 3量体型オレアミド誘導体(MI-50・MI-51)、および、4量体型オレアミド誘導体(MI-52・MI-53)についても、コントロールと比較してコネキシン26阻害活性を有することが、上記アッセイ時に目視で観察された。

[0088] 上記アッセイにより、強いコネキシン26阻害活性が認められた3つの二量体型オレアミド誘導体(MI-22・MI-39・MI-45)は、図に示すように、コネキシン43阻害活性を示さなかった。すなわち、これらのオレアミド誘導体は、コネキシン26を特異的に阻害し、コネキシン43は阻害しなかった。このように、コネキシン43は阻害せずに、コネキシン26を特異的に阻害するという性質の点で、上記3つのオレアミド誘導体のうちMI-22が最も良好な結果を示したため、以下ではこのMI-22を使用して解析を行った。

[0089] [実施例3: 上記MI-22による癌の自然転移阻害]

上記のようにコネキシン26阻害活性を有するMI-22が、実際に動物個体において癌の自然転移を抑制するかどうかを以下の実験により検討した。

[0090] [3. 1]方法

実験は、国際公開WO2004/060398号公報に記載の方法と同様に行った。すなわち、 1×10^5 個のBL6細胞(B16マウスメラノーマ細胞の亜株)を4週齢のC57BL/6マウスの足底部皮下に接種した後、マウスを次の2群に分けた。

1) MI-22投与群: MI-22(10mg)をオリーブ油(10mL)に溶解したものをマウスの体重1gあたり0.01mLとなるよう1日1回(約0.2mLずつ)、連日腹腔内注射したマウス群。

2) 無処置(Nt)群: 注射による薬剤投与・処置を何も行わなかったマウス群。

[0091] 上記の処置をBL6細胞接種の翌日より連日行い、接種部に形成された腫瘍が径約7mmに成長した時点で、膝関節切断により足を切除した。この2日後まで上記の処置を行い、その後は無処置でマウスを飼育する。膝関節切断後4週間でマウスを安楽死させ、左右両肺の胸膜表面に形成された転移結節(肺への転移巣の数)を肉

眼的に数えた。なお、各群マウス15匹で評価を行った。

[0092] [3. 2]結果

上記実験結果を、図4および図5に示す。図4のグラフ縦軸は肺への転移巣の数を示し、MI-22投与群は、無処置(Nt)群と比較して、転移巣の数が80%減少し、MI-22が癌の自然転移を顕著に阻害・抑制することが示された。

[0093] 図5には、MI-22投与群および無処置(Nt)群の各マウスから摘出された肺の写真などが示される。すなわち、パネル上段は癌の自然転移が生じていない肺とそのマウスの数を、パネル中段はやや自然転移が見られた肺とそのマウスの数を、パネル下段は自然転移が多く見られた肺とそのマウスの数を、それぞれ示す。無処置(Nt)群では、癌の自然転移が生じていない肺、やや自然転移が見られた肺、自然転移が多く見られた肺の数がそれぞれ2, 8, 5匹であるのに対して、MI-22投与群では7, 6, 2匹である。この結果からも、MI-22は癌の自然転移を強力に阻害・抑制することが認められた。

[0094] また、上記実験において、MI-22を毎日投与しても、癌の自然転移以外の原因で死亡したマウスは皆無であり、MI-22は、安全性が極めて高い物質である。したがって、MI-22は、副作用の少ない癌転移抑制剤(抗癌転移薬)として利用可能と考えられる。

[0095] [3. 3]細胞毒性実験

MI-22の細胞毒性(細胞増殖阻害能)を調べるため、直径3.5cmのシャーレに、ヒト胃がん細胞であるAz521細胞を約 1×10^5 個撒き、MI-22存在下または非存在下(control)で培養を行った。培養を開始して6, 12, 24, 36, 48時間経過した後、おのおのトリプシン-EDTAで細胞をはがし、遠心後10%FBSを含むDMEMに細胞を溶解させ、この細胞溶解液10 μ Lに、トリパンブルーを10 μ L加え、計算板で細胞数をカウントした。その結果を図6のグラフに示す。縦軸は細胞数、横軸は時間である。3回の実験の平均を示す。

[0096] 同図に示すように、MI-22とコントロールとの間に有意差はなく、MI-22の細胞毒性(細胞増殖阻害能)は認められなかった。

[0097] [実施例4: 上記MI-22による癌の増殖抑制]

ヌードマウスの背中皮下にヒト胃がん細胞であるAz521細胞を移植し、MI-22腹腔投与による癌増殖抑制効果(抗腫瘍効果)について検討を行った。より具体的には、4週齢のBALB/cヌードマウス(nu/nu)の背中に、 $1-2 \times 10^5$ 個のAz521細胞を皮下注射した。この皮下移植3日前に、MI-22(10mg)をオリーブ油(10mL)に溶解したものをヌードマウスに0.1mL腹腔内注射した。皮下移植後は、週2回の割合でMI-22を同様に腹腔内投与した。コントロールのマウス群には、注射による薬剤投与・処置を何も行わなかった。

[0098] 皮下移植後に形成される腫瘍の大きさを観察し、MI-22の抗腫瘍効果は、腫瘍重量を経時的に測定することで評価した。その結果を図7のグラフに示す。縦軸は腫瘍重量(mg)、横軸は皮下移植後の日数である。3匹のヌードマウスについて6つの腫瘍の平均値を示す。

[0099] 同図に示すように、MI-22を投与したマウスでは、コントロールのマウス群と比較して腫瘍の増大が顕著に抑制され、MI-22による抗腫瘍効果が認められた。

[0100] 図8は、上記と同様の実験方法で、ヒト胃がん細胞であるAz521細胞が皮下移植されたヌードマウスに対してMI-22を腹腔内投与し、その抗腫瘍効果を検討した結果である。同図に示すように、MI-22を投与したマウスでは、無処置のマウス群(NT)と比較して腫瘍体積の肥大化が顕著に抑制され、MI-22による抗腫瘍効果が認められた。

[0101] これらの結果は、MI-22が従来の抗癌剤には無い際立って優れた特徴を有することを示している。すなわち、従来開発されてきた抗癌剤の殆どは「正常細胞より増殖能力の高い癌細胞の増殖を優先的に阻害する」特徴を利用したものである。これらは正常細胞に対しても増殖阻害を示すため必然的に細胞毒性を持ち、これが抗癌剤の副作用の原因となるという欠点は免れなかった。これに対して、MI-22はシャーレで培養した正常細胞および癌細胞に対しては細胞毒性(細胞増殖阻害能)を全く示さないにもかかわらず、生体内(ここでは野生マウスおよびヌードマウス)に移植した癌細胞には細胞増殖阻害作用を示したのである。この特徴は、MI-22が極めて高い新規性を持つこれまでに前例の無い新しいタイプの抗癌剤であることを示している。

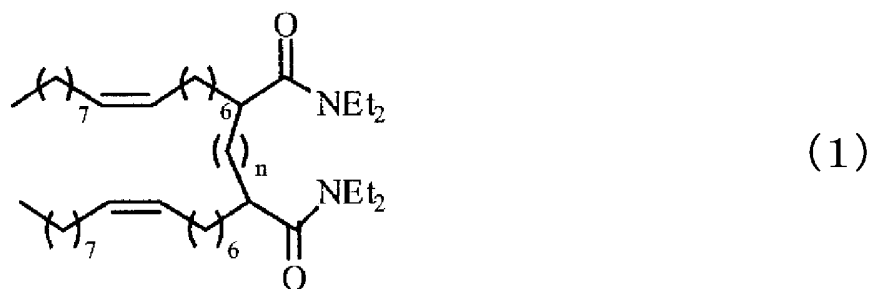
産業上の利用可能性

- [0102] 以上のように、本発明は、コネキシン26阻害活性を有する多量体型オレアミド誘導体に関するものであり、これらの新規オレアミド誘導体は、研究用試薬として利用できるほか、癌の転移抑制・増殖抑制など有用な生理活性を示すことから、癌の予防薬・治療薬をはじめとして、医薬、サプリメント、機能性食品などの各種用途を有し、産業上広く利用できるものである。

請求の範囲

- [1] 下記の式(1)により表される二量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

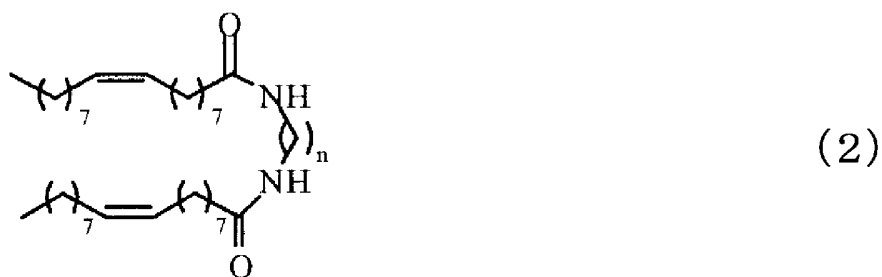
[化1]



(ただし、nは3, 5又は8の整数である。)

- [2] 下記の式(2)により表される二量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

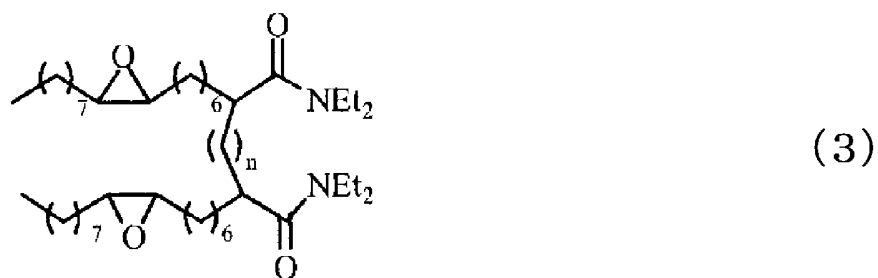
[化2]



(ただし、nは3又は5の整数である。)

- [3] 下記の式(3)により表される二量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

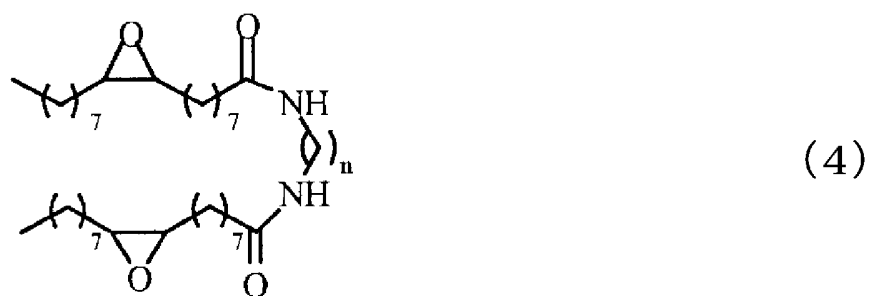
[化3]



(ただし、nは5又は8の整数である。)

- [4] 下記の式(4)により表される二量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

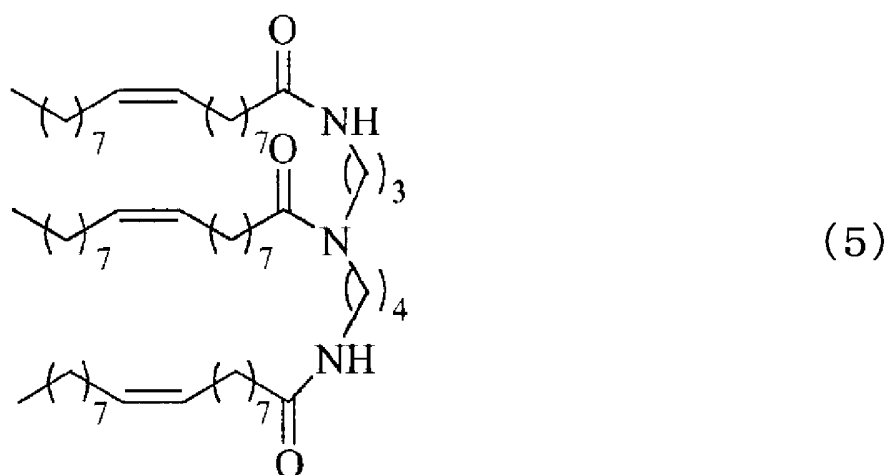
[化4]



(ただし、nは3又は5の整数である。)

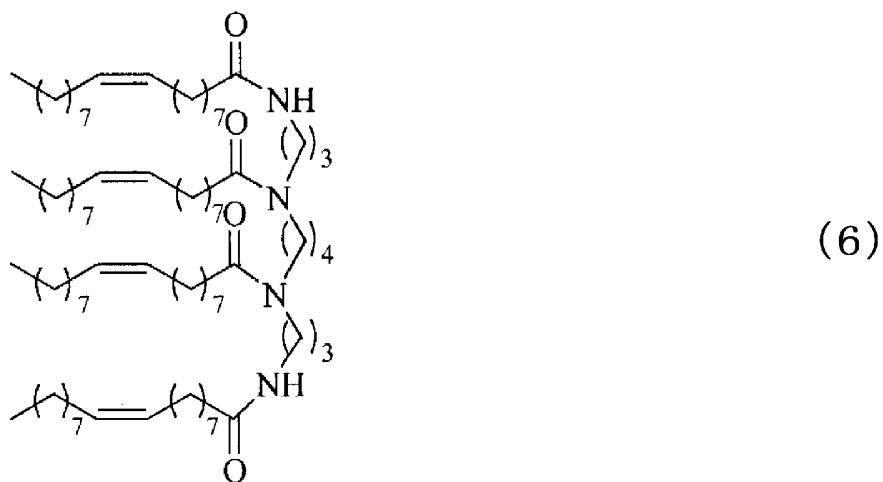
- [5] 下記の式(5)により表される三量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

[化5]



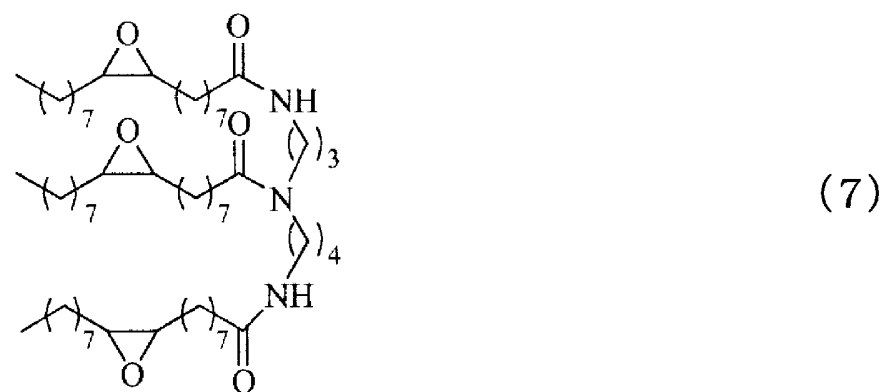
- [6] 下記の式(6)により表される四量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

[化6]



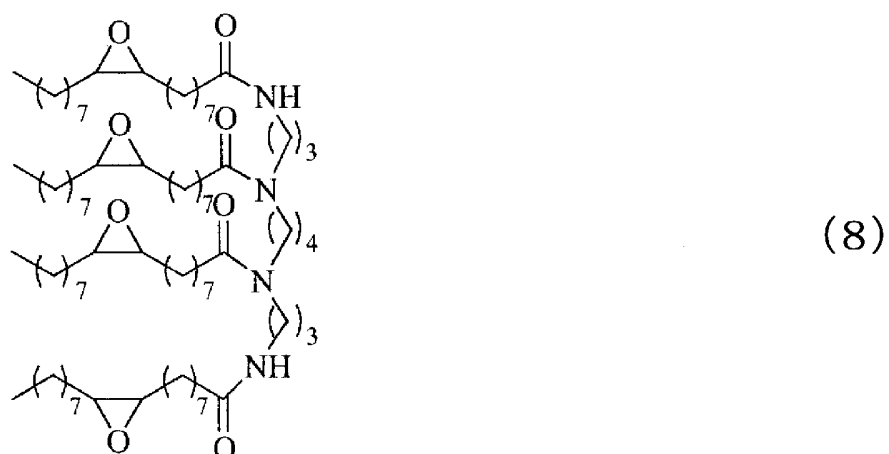
- [7] 下記の式(7)により表される三量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

[化7]



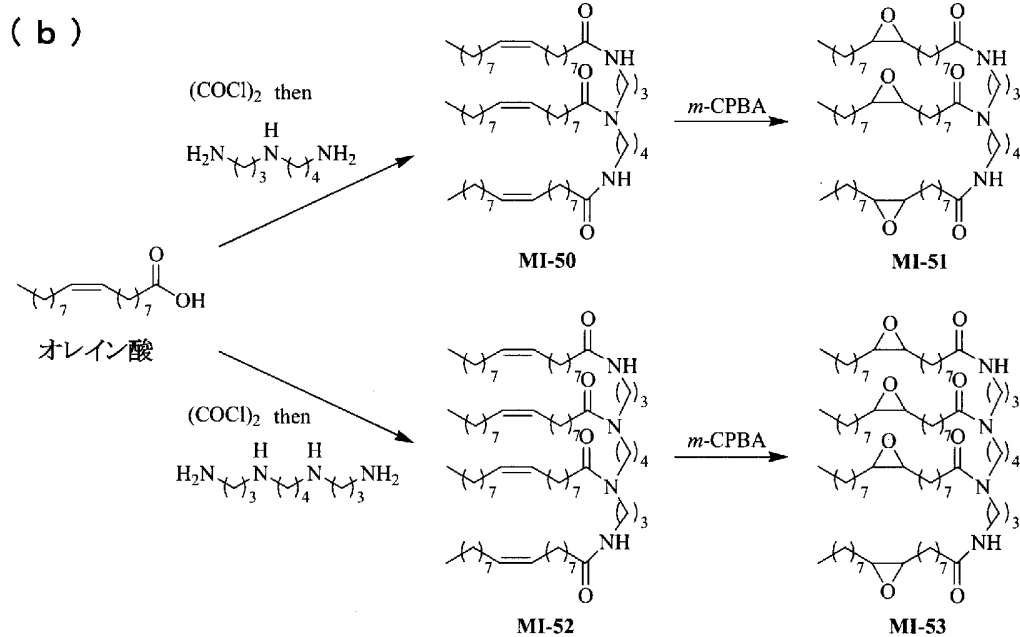
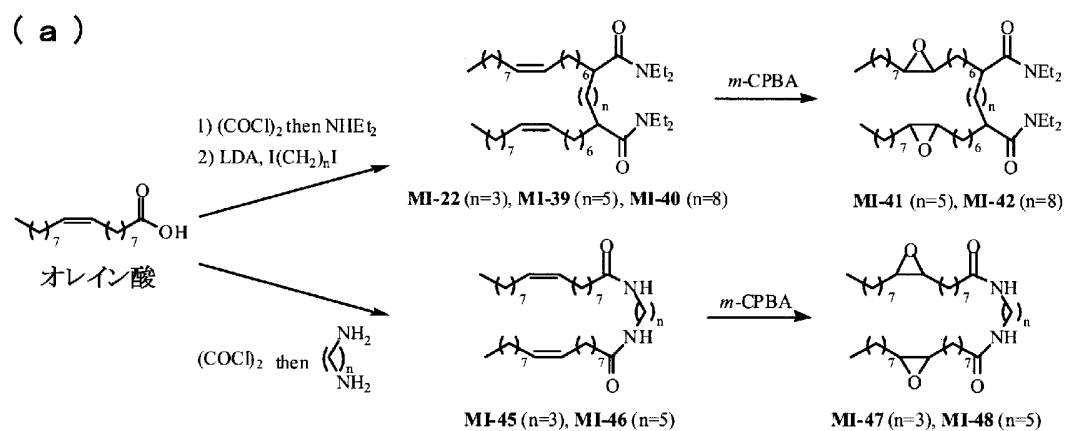
- [8] 下記の式(8)により表される四量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩。

[化8]



- [9] 上記の式(1)～(8)のいずれかにより表される多量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩を有効成分とする癌の転移抑制剤。
- [10] 上記の式(1)～(8)のいずれかにより表される多量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩を有効成分とする癌の増殖抑制剤。
- [11] 上記の式(1)～(8)のいずれかにより表される多量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩を含有する食用組成物。
- [12] 上記の式(1)～(8)のいずれかにより表される多量体型オレアミド誘導体、又はその薬理上許容される塩を含有するコネキシン26阻害剤。

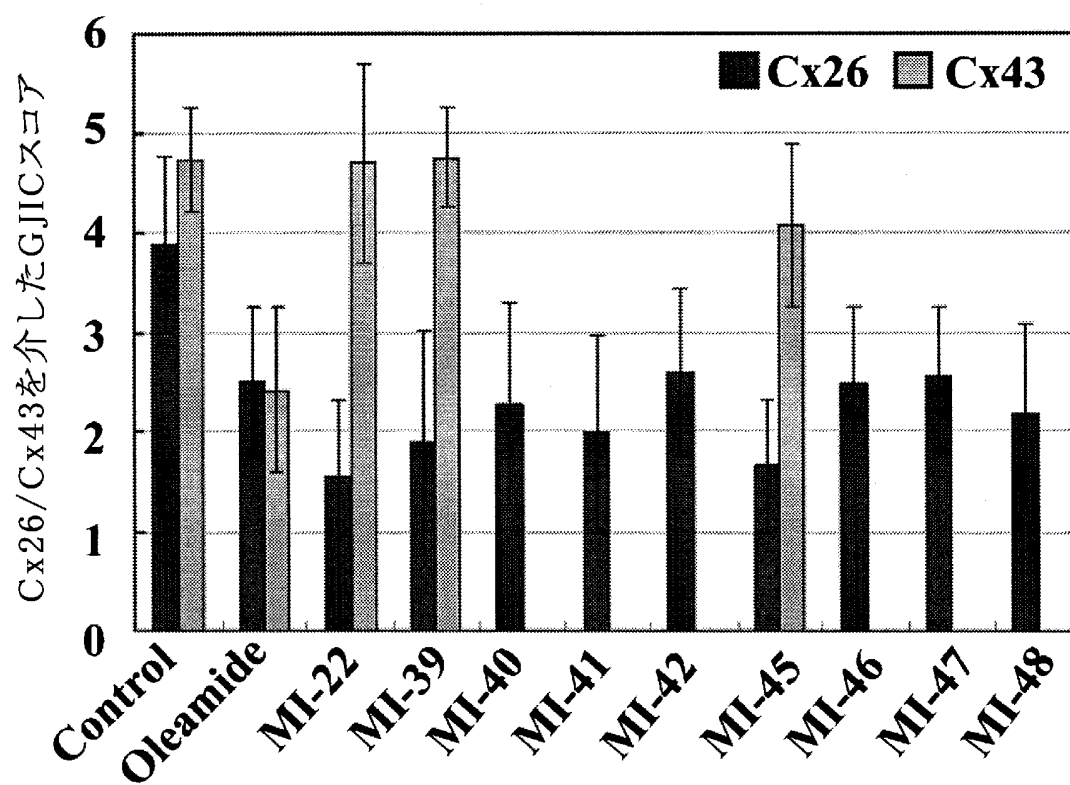
[図1]



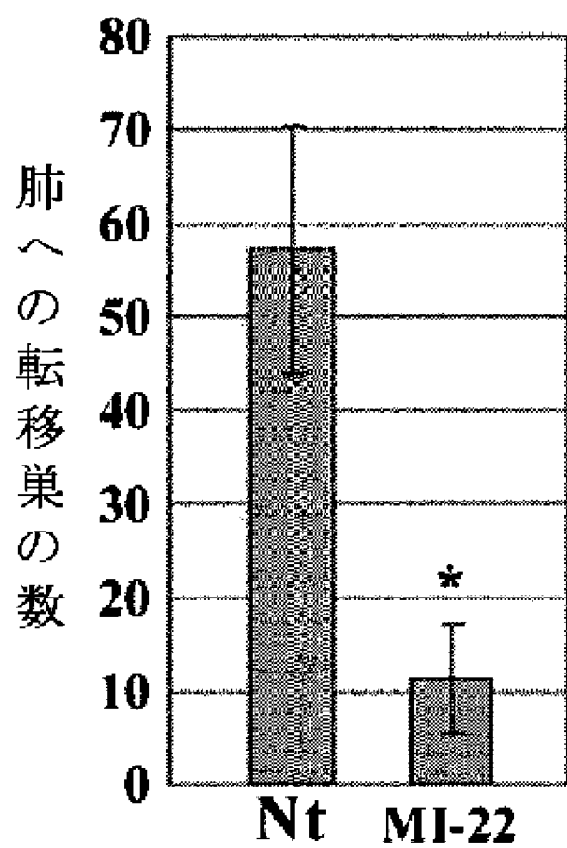
[図2]



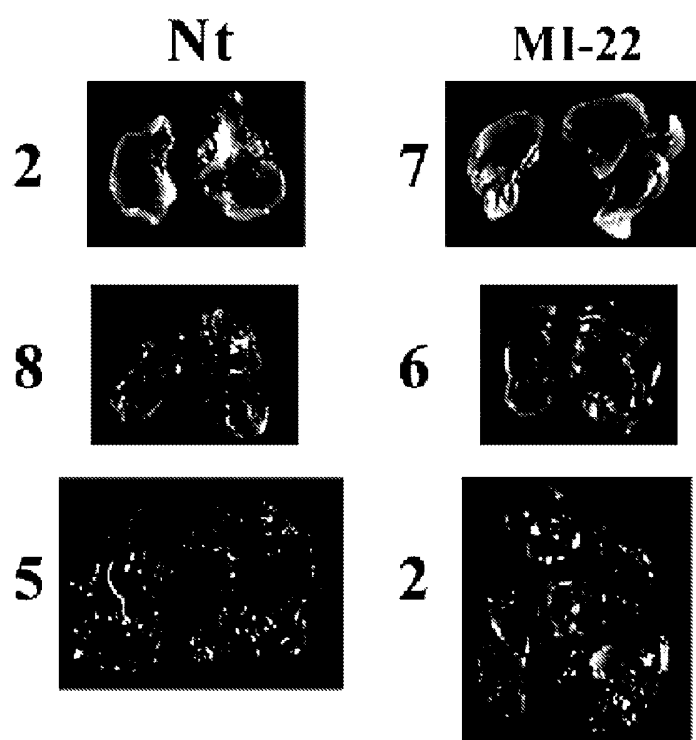
[図3]



[図4]

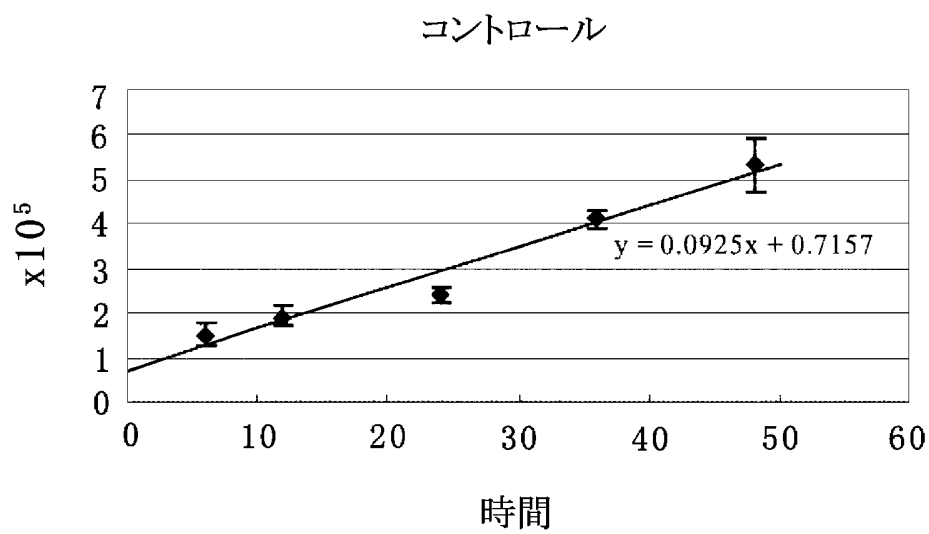


[図5]

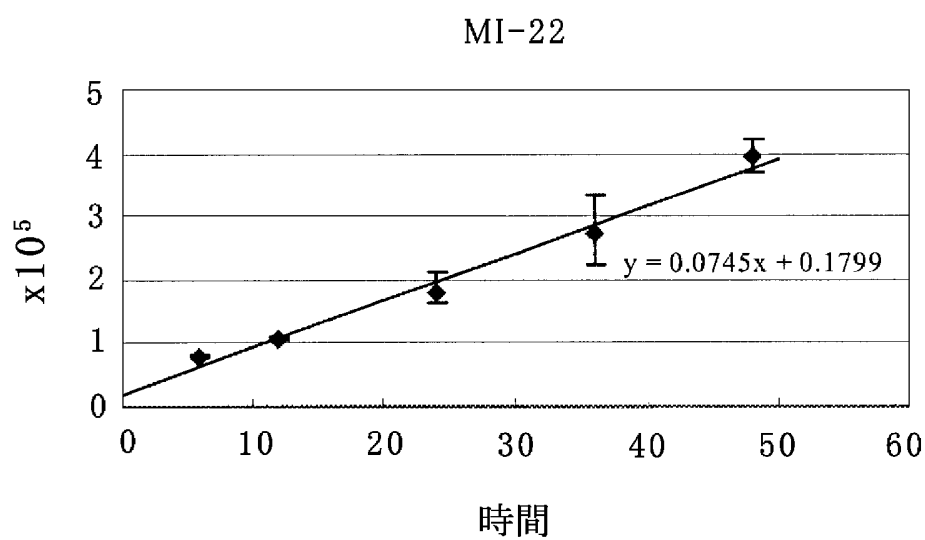


[図6]

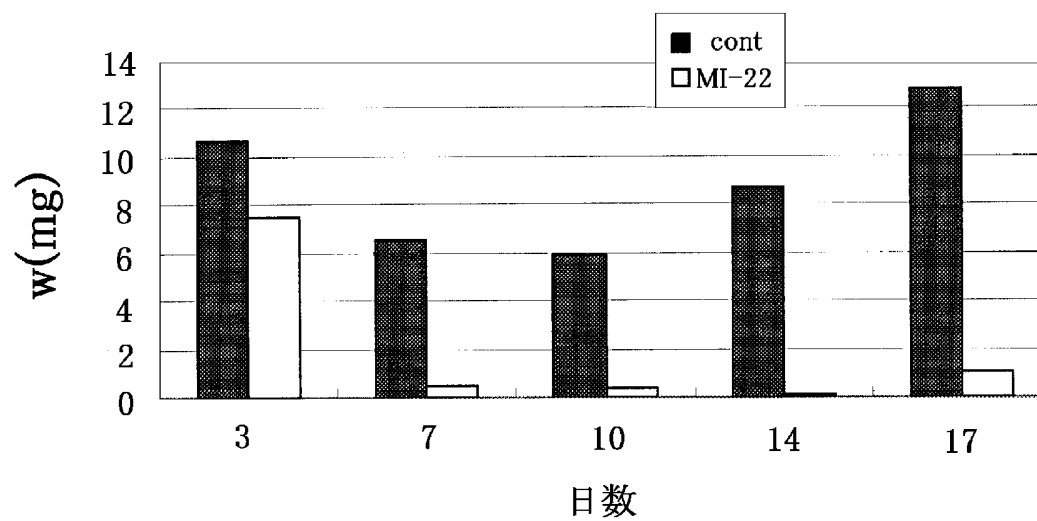
(a)



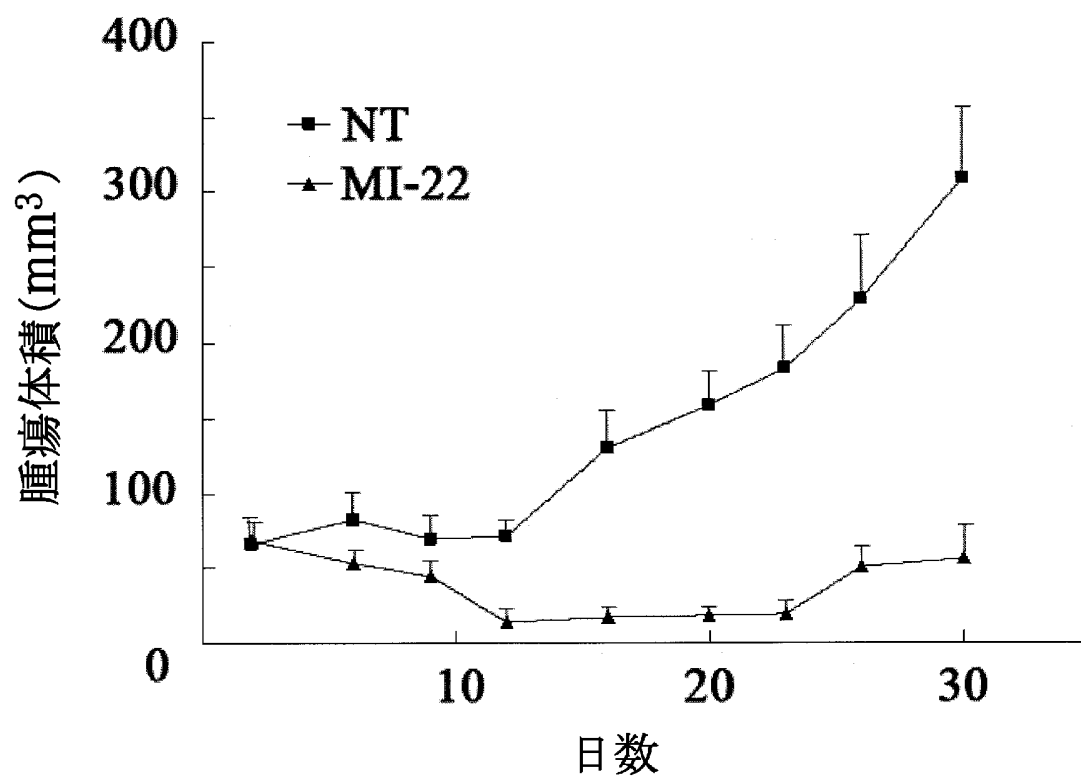
(b)



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07C233/09(2006.01), **C07C233/38**(2006.01), **C07D303/46**(2006.01), **A23L1/30**(2006.01), **A61K31/16**(2006.01), **A61K31/336**(2006.01), **A61P35/00**(2006.01), **A61P35/04**(2006.01), **A61P43/00**(2006.01)

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)

C07C233/09, C07C233/38, C07D303/46, A23L1/30, A61K31/16, A61K31/336, A61P35/00, A61P35/04, A61P43/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 3872120 A (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE), 18 March, 1975 (18.03.75), Examples & US 3875159 A & US 3910948 A & US 3917638 A	2
A	WO 2004/060398 A1 (Japan Science and Technology Agency), 22 July, 2004 (22.07.04), & EP 1582219 A1	1-12
A	JP 2001-17184 A (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.), 23 January, 2001 (23.01.01), & EP 1072687 A2	1-12

☒ 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 application or patent 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
07 February, 2006 (07.02.06)

Date of mailing of the international search report
21 February, 2006 (21.02.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020089

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 2001-523695 A (The Scripps Research Institute), 27 November, 2001 (27.11.01), & EP 1039902 A1 & WO 1999/026584 A2	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020089

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/020089

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

Multimeric oleamide derivatives as a matter common to the invention of claims 1 and 3 and the invention of claims 2 and 4-8 are publicly known as described in the following reference A and hence fall within the category of prior art. Consequently, the matter does not correspond to the special technical feature prescribed in PCT Rule 13.2.

Thus, between these two invention groups, there is no technical relationship involving the same or corresponding special technical features.

Further, the inventions of claims 9-12 involve these two invention groups.

Therefore, this international application contains two invention groups not linked so as to form a single general inventive concept.

Reference A: US 3872120 A
(THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY OF AGRICULTURE) 1975.03.18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C07C233/09 (2006.01), C07C233/38 (2006.01), C07D303/46 (2006.01), A23L1/30 (2006.01), A61K31/16 (2006.01), A61K31/336 (2006.01), A61P35/00 (2006.01), A61P35/04 (2006.01), A61P43/00 (2006.01)			
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. C07C 233/09, C07C 233/38, C07D 303/46, A23L 1/30, A61K 31/16, A61K 31/336, A61P 35/00, A61P 35/04, A61P 43/00			
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			
日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2005年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006年			
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(STN), REGISTRY(STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	US 3872120 A (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE) 1975.03.18 EXAMPLE & US 3875159 A & US 3910948 A & US 3917638 A	2	
A	WO 2004/060398 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2004.07.22 & EP 1582219 A1	1-12	
☒ C欄の続きにも文献が列举されている。 ☐ 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 の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 07.02.2006		国際調査報告の発送日 21.02.2006	
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) 山本 昌広	4H 3445
		電話番号 03-3581-1101 内線	3443

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-17184 A (株式会社医学生物学研究所) 2001. 01. 23 & EP 1072687 A2	1 - 1 2
A	JP 2001-523695 A (ザ スクリップス リサーチ インスティテュート) 2001. 11. 27 & EP 1039902 A1 & WO 1999/026584 A2	1 - 1 2

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

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

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

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

特別ページ参照。

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

<第Ⅲ欄の続き>

請求の範囲1, 3に記載された発明と請求の範囲2, 4-8に記載された発明に共通する事項である、多量体型オレアミド誘導体は、下記文献Aに記載されているように公知であり、先行技術の域を出ないから、PCT規則13.2に規定する特別な技術的特徴に該当しない。したがって、これら2の発明群の間には、同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係は存在しない。

また、請求の範囲9-12に記載された発明は、上記の2の発明群を含むものである。

よって、この国際出願は、単一の一般的発明概念を形成するように連関していない2の発明群を含むものである。

文献A : US 3872120 A

(THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE)

1975.03.18