

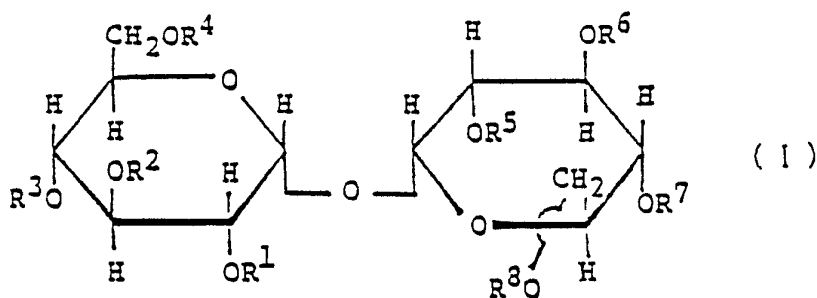


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

|  |   |  |
|--|---|--|
| <p>(51) 国際特許分類<sup>4</sup><br/>C07H 13/06</p>  | <p>A1</p>   | <p>(11) 国際公開番号<br/>WO 87/05606</p> <p>(43) 国際公開日<br/>1987年9月24日 (24.09.87)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP87/00171<br/>(22) 国際出願日 1987年3月19日 (19. 03. 87)<br/>(31) 優先権主張番号 特願昭 61-63004<br/>特願昭 61-203486<br/>(32) 優先日 1986年3月20日 (20. 03. 86)<br/>1986年8月28日 (28. 08. 86)<br/>(33) 優先権主張国 JP<br/>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)<br/>沢井製薬株式会社<br/>(SAWAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) (JP/JP)<br/>〒535 大阪府大阪市旭区赤川1丁目4番25号 Osaka, (JP)<br/>(72) 発明者: および<br/>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)<br/>加藤敬香 (KATO, Yoshiko) (JP/JP)<br/>〒650 兵庫県神戸市中央区港島中町3丁目2番地6<br/>エバグリーンポートアイランド6号棟1401号 Hyogo, (JP)<br/>吉永順司 (YOSHINAGA, Junji) (JP/JP)<br/>〒572 大阪府寝屋川市国松町37番13号 Osaka, (JP)<br/>正垣武志 (SHOGAKI, Takeshi) (JP/JP)<br/>〒565 大阪府茨田市山田南45番, B-903 Osaka, (JP)<br/>蔵野聡子 (KURANO, Satoko) (JP/JP)<br/>〒555 大阪府大阪市西淀川区姫島4丁目11番12-612号<br/>Osaka, (JP)</p> | <p>矢野郁也 (YANO, Ikuya) (JP/JP)<br/>〒562 大阪府箕面市箕面4丁目16番11号 Osaka, (JP)<br/>(74) 代理人<br/>弁理士 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime)<br/>〒541 大阪府大阪市東区平野町4丁目53番地3<br/>ニユーライフ平野町406号 Osaka, (JP)<br/>(81) 指定国<br/>DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許),<br/>IT (欧州特許), JP, US.<br/>添付公開書類 国際調査報告書</p> |  |

(54) Title:  $\alpha$ ,  $\alpha$ -TREHALOSE TRIMYCOLATE AND MEDICINAL COMPOSITION

(54) 発明の名称  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハローストリミコール酸エステルおよび医薬組成物

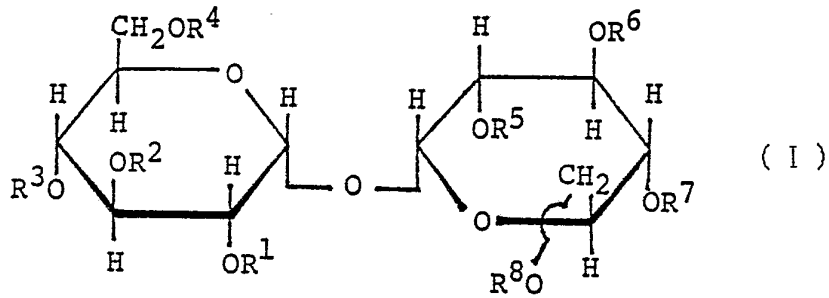


(57) Abstract

$\alpha$ ,  $\alpha$ -Trehalose trimycolates represented by formula (I), wherein  $R^1$  to  $R^8$  each represents a hydrogen atom or a mycolic acid residue, with three of  $R^1$  to  $R^8$  being the mycolic acid residues, provided that the mycolic acid residues may be the same or different from each other. The  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalose trimycolates have immuno-activating and oncostatic activities on animals with low toxicity, and hence they are expected to be used for preventing infection by various microorganisms or as an oncostatic agent and for activating immunity upon the decline of bodily strength.

(57) 要約

式



(式中、 $R^1 \sim R^8$  はそれぞれ水素原子またはミコール酸残基を表わし、かつ $R^1 \sim R^8$  のうち3つがミコール酸残基である。ただし、それらのミコール酸残基は同一であっても異なってもよい。)

で示される $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハローストリミコール酸エステル。

当該 $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハローストリミコール酸エステルは動物に対して免疫賦活作用、抗腫瘍作用を有し、かつ低毒性であるので種々の微生物に対する感染防御や抗腫瘍剤としての応用および体力減退時の免疫賦活への応用が期待される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

|    |           |    |             |    |        |
|----|-----------|----|-------------|----|--------|
| AT | オーストリア    | FR | フランス        | MR | モーリタニア |
| AU | オーストラリア   | GA | ガボン         | MW | マラウイ   |
| BB | バルバドス     | GB | イギリス        | NL | オランダ   |
| BE | ベルギー      | HU | ハンガリー       | NO | ノルウェー  |
| BG | ブルガリア     | IT | イタリア        | RO | ルーマニア  |
| BJ | ベナン       | JP | 日本          | SD | スーダン   |
| BR | ブラジル      | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | SE | スウェーデン |
| CF | 中央アフリカ共和国 | KR | 大韓民国        | SN | セネガル   |
| CG | コンゴ       | LI | リヒテンシュタイン   | SU | ソビエト連邦 |
| CH | スイス       | LK | スリランカ       | TD | チャード   |
| CM | カメルーン     | LU | ルクセンブルグ     | TG | トーゴ    |
| DE | 西ドイツ      | MC | モナコ         | US | 米国     |
| DK | デンマーク     | MG | マダガスカル      |    |        |
| FI | フィンランド    | ML | マリ          |    |        |

- 1 -

## 明 細 書

 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハローストリミコール酸エステル

および医薬組成物

技術分野

本発明は医薬として有用な新規  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハローストリミコール酸エステルおよび医薬組成物に関する。

背景技術

従来、アースロバクター属、コリネバクテリウム属、ノカルジア属又はミコバクテリウム属に属し、ブドウ糖、果糖、ショ糖又はトレハロースのような糖を資化してしこれらの糖を含む脂質の生産能を有する微生物を、これらの糖を主な炭素源とする培地で好気条件下に培養すると、菌体または培地中にこれらの糖脂質を蓄積し、これを回収することにより、ブドウ糖、果糖、ショ糖又はトレハロースのミコール酸エステルが得られることは知られている（特開昭50-48186号、特開昭53-3514号、特開昭59-89632号および J. of The National Cancer Institute, 52, 95-101 (1974)）。

また、炭化水素資化性を有する微生物が各種 n-パラフィン を炭素源とした培地で培養するとトレハロース脂質が得られることも知られている（特公昭47-7349号）。

しかしこれらの糖脂質は、モノ又はジミコール酸エステルであり、例えば、糖がブドウ糖の場合は、その C (6位) - OH におけるミコール酸エステルであり、果糖の場合はその C (1位) - OH 又は C (6位) - OH の何れか又はその両方におけるミコール酸エステルであり、更に、二糖類であるショ糖又は

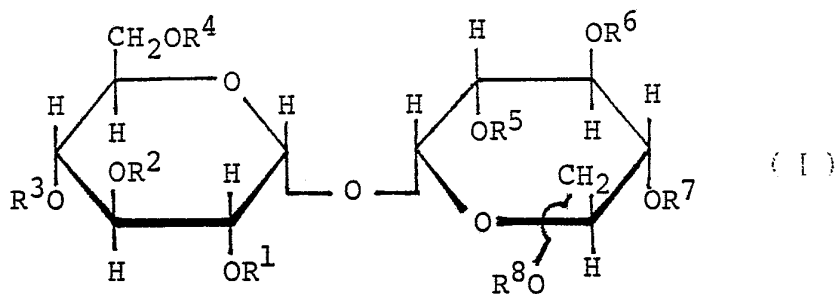
トレハロースの場合でも、これらのC(6位)-OHにおけるモノミコール酸エステル並びにC(6位)-OH及びC(6'位)-OHにおけるジミコール酸エステルしか知られていない。

発明の開示

本発明者らは、これらの事実を鑑み鋭意検討を行ってきたところロドコッカス属に属する菌が従来の糖脂質とは全く異なる糖脂質を生産することを見出し、この成分を単離して構造解析を行い、さらにガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(GC/MSと略す)分析により糖に結合するミコール酸の分子数と結合位置の解析を行った結果、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースの特定位置に3分子のミコール酸がエステル結合したものであることを確認し、これらの知見に基づいて本発明を完成した。

即ち、本発明は

①式



(式中、 $R^1 \sim R^3$  はそれぞれ水素原子またはミコール酸残基を表わし、かつ  $R^1 \sim R^3$  のうち3つがミコール酸残基である。ただし、それらのミコール酸残基は同一であっても異なってもよい。)

で示される  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハローストリミコール酸エステル(以下、トリミコール酸エステル(I)ともいう)、



で、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 及び $R^7$ が水素原子である化合物。

② 式(I)において、 $R^1$ 、 $R^4$ 及び $R^8$ がミコール酸残基で、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 及び $R^7$ が水素原子である化合物。

本発明のトリミコール酸エステル(I)は、例えばロドコッカス属に属する菌、特にロドコッカス オーランチアカス (*Rhodococcus aurantiacus*) (ATCC 25938)を培養することによって主として菌体中に当該化合物を生成せしめ、主として菌体中から採取することによって製造される。

その際の培養法においては、従来公知の合成培地及び天然物使用培地であって、ロドコッカス属に属する微生物の培養に利用できる培地であればすべて使用できる。例えば生育炭素源としてブドウ糖、トレハロース等を用い、窒素源としては、例えば硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機窒素化合物、ペプトン、肉エキス、コーンスティーブリカー等の有機窒素化合物が利用できる。又、無機塩としてナトリウム、カリウム、カルシウム、亜鉛、マグネシウム、マンガン、リン酸等の塩類等を、成長促進因子として、ビタミン類、アミノ酸類又はそれらを豊富に含む酵母エキス等を適宜加えてもよい。

培養のpHは5~9、特に7~7.5が至適であり、培養温度は10~40℃、特に25~30℃が適している。培養は、液体培養または固体培養で好氣的条件下に行う。培養期間は、通常3~14日程度とするのが適当で、これにより $\alpha$ 、 $\alpha$ -トレハロースに3分子のミコール酸がエステル結合した糖脂質が通常菌体中に生産される。

かくして得られる菌体からトリミコール酸エステル (I) を得るには菌体成分を採取する通常の方法を用いる。例えば、溶媒抽出、吸着、溶出、溶解度差、イオン結合力等に対する目的物の特性をそれぞれ単独で、又は繰り返して、あるいは適当に組み合わせて利用し、採取することができる。

例えば、培養菌体をエーテル、クロロホルム、クロロホルム-メタノール (2 : 1、v/v) 混液等の有機溶媒で抽出し、抽出物をシリカゲルのカラム又は薄層クロマトグラフィーあるいは D E A E セルロースカラムクロマトグラフィーにかけ、展開溶媒はクロロホルム、メタノール、アセトン、酢酸、水等の単独又は混合溶媒を使用して目的物を分画採取できる。又、粗脂質あるいは分画物について、メタノール又はアセトン不溶性で且つジエチルエーテル可溶性の分画を集めて、さらに精製することもできる。

このようにして得られたトリミコール酸エステル (I) の構造を解析するには、この精製した試料について I R スペクトルの測定及び水解あるいはメタノリシスを行い、糖はトリメチルシリルエステル誘導体として、又ミコール酸はトリメチルシリルエーテル化メチルエステルとして各々 G C 又は G C / M S 分析することにより、糖の構造とミコール酸の組成を知ることができ、更に、試料について、完全メチル化、加水分解、単糖への分解、還元及びアセチル化を常法により順次行い、得られた部分メチル化アルジトールアセテートについて G C / M S 分析を行うことにより糖へのミコール酸の結合分子数と結合位置を知ることができる。

## 試験例 1 (肉芽腫形成試験)

トリミコール酸エステル (I) の免疫促進作用を山本らの方法 (Immunology, 40, 557 ~ 564 (1980)) に準じて試験した。0.15 M のフォスフェート・バッファード セーライン (phosphate-buffered saline) (pH 7.0) と、それと等容量のフロイントの不完全アジュバント (Freund's incomplete adjuvant) (Difco 社製) 及び実施例 1 で得たトリミコール酸エステル (I) (GL-1 又は GL-2) を混合し、ホモジナイザーで均一にした後、界面活性剤ツイーン 80 (Tween 80) (和光純薬製) を 0.2% 含む生理食塩水を最終油濃度が 3.2% となるように加え、水中油中水型乳剤を調製し、その 0.2 ml を ICR 系雄性マウスに 1 群 9 ~ 10 匹として尾静脈投与した。

一週間後に肺及び脾を取り出し、体重に対する肺及び脾の重量百分率を求めた。第 1 表中対照群は糖脂質を含まない乳剤を投与した群であり、糖脂質投与群の 1 匹当たりの糖脂質投与量は 300  $\mu$ g である。表中の数値は平均値  $\pm$  標準誤差を示す。

第 1 表

| 群        | 肺                 | 脾                 |
|----------|-------------------|-------------------|
| 無投与群     | 0.598 $\pm$ 0.008 | 0.521 $\pm$ 0.016 |
| 対照群      | 0.619 $\pm$ 0.023 | 0.509 $\pm$ 0.028 |
| GL-2 投与群 | 1.959 $\pm$ 0.117 | 1.583 $\pm$ 0.096 |
| GL-1 投与群 | 1.605 $\pm$ 0.072 | 1.212 $\pm$ 0.085 |

- 7 -

第1表から明らかのように、GL-1またはGL-2のトリミコール酸エステル(I)を投与することより、肺および脾臓に肉芽腫が形成された。

そこで、Infection and Immunity, 29 (1), 30~35 (1980) 及び同 10 (5), 1044~1050 (1974) を参照し、本物質に免疫賦活作用及び抗腫瘍作用のあることが示唆された。

#### 試験例2 (抗腫瘍試験)

Sarcoma-180 及び Meth A 細胞を鼠蹊部皮下に移植したマウスにGL-2を試験例1の項に記載した乳剤として移植翌日より3回/週の間隔で25 $\mu$ g/10g/日 $\times$ 10回尾静脈内投与したところ、第2表に示したような固形腫瘍増殖抑制率を示した。

第 2 表

| 増殖抑制率       | 無投与群 (0%として)<br>に対し | 対照群 (0%として)<br>に対し |
|-------------|---------------------|--------------------|
| Sarcoma-180 | 57.1%               | 51.5%              |
| Meth A      | 48.0%               | 53.8%              |

#### 材料と方法

- i) 動物 : ICR系3w、雌性 (日本クレア) (Sarcoma-180用)  
BALB/c系5w、雌性 (静動協) (Meth A用)  
上記を入手、約1週間の予備飼育の後、実験に用いた。
- ii) 腫瘍 : Sarcoma-180 及びMeth A  
共に腹腔内移植後1週間目の腹水を採取し、滅

BAD ORIGINAL

- 8 -

菌生理食塩水で  $2 \times 10^7$  cells/ml に希釈、0.05 ml ( $1 \times 10^6$  cells)/匹ずつ鼠蹊部皮下移植。  
移植日を 0 日とする。

iii) トリミコール酸エステル (I) :

GL-2 を 250  $\mu$ g/ml の w/o/w エマルジョンに調製し、0.1 ml (25  $\mu$ g)/10 g Body weight  $\times$  10 回を 1 日より 3 回/週尾静脈内投与する。

iv) コントロール:

無投与群コントロール及び w/o/w エマルジョンのみを iii) と同様に投与した w/o/w コントロールの 2 群。

v) 効果判定:

25 日目に腫瘍結節を摘出秤量し、腫瘍増殖抑制率を計算した。1 群は 10 匹とした。

### 試験例 3 (毒性試験)

ICR 系雄性マウス (1 群 10 匹) を用い、トリミコール酸エステル (I) (GL-1 または GL-2) を試験例 1 の項に記載した乳剤として投与し、LD<sub>50</sub> 値を求めた。

トリミコール酸エステル (I) の LD<sub>50</sub> 値は静脈内投与では GL-1 では > 50 mg/kg、GL-2 は > 25 mg/kg であり、腹腔内投与では GL-1 は > 50 mg/kg、GL-2 は > 25 mg/kg であった。

又、卵黄ホスファチジルコリン-牛脳ホスファチジルセリン (7:3、モル比) のリポソームとして静脈内投与したときの GL-2 の LD<sub>50</sub> は > 380 mg/kg であった。

従って、Infection and Immunity, 24 (2), 586 ~ 588 (1979)、Journal of the National Cancer Institute, 52 (1), 95~101 (1974) および European Journal of Biochemistry, 87, 497~504 (1978) を参照して得たトレハロースジミコール酸エステルの致死毒性の値から比べて、本物質の毒性は低いことがわかった。

以上、明らかにしたように本発明のトリミコール酸エステル (I) は、ヒトをはじめとするウマ、ウシ、ブタ、ラット、マウス、モルモット等の動物に対して免疫賦活作用、抗腫瘍作用を有し、かつ低毒性であるので種々の微生物に対する感染防御や抗腫瘍剤としての応用および体力減退時の免疫賦活への応用が期待される。

トリミコール酸エステル (I) の投与量は疾病、投与ルート、患者の重篤度、薬物に対する認容度等により異なるが、通常成人1日あたり10 mg ~ 2 g 好ましくは500 mg ~ 1 g の量であり、これを1回又は数回に分けて投与される。

トリミコール酸エステル (I) は慣用の製剤化手段によって任意の製剤に製剤化することができる。従って、本発明はトリミコール酸エステル (I) を含有する医薬組成物をも提供するものである。かかる医薬組成物は任意所要の医薬上許容される添加剤 (例えば、担体、賦形剤等) を使用して常套手段によって調製される。製剤としては、例えば経口剤 (例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、リポソーム等)、注射剤 (リポソーム、乳濁性注射剤 {乳化剤 (例えば有機酸、有機塩基、界面活性剤、水溶性高分子、水溶性有機溶剤等を使用)}、懸濁性注射剤 (

生理食塩水等を使用) ) 等が例示される。特に好ましい剤型としては、リポソーム剤が例示される。

リポソーム剤は自体既知の手段にて調製することが出来るが、具体的には次の如き手段が挙げられる。

即ち、通常ホモジナイザー（例えば、加圧噴射型ホモジナイザー、超音波ホモジナイザー）を用いることにより製造される。その際、まず各々所要量の油脂成分（例えば、大豆油等の植物油）、リン脂質、トリミコール酸エステル（I）及び要すれば公知の乳化補助剤、乳剤安定化剤、等張化剤等を混合・加熱して溶液とし、ホモジナイザーにて均質化処理することにより油中水型分散液を作り、次いでこれに所要量の水を加え再び均質化を行い、分散液を水中油型乳剤に変換することにより容易に製造される（J. Am. Oil Chem. Soc., 32, 365~370 (1950) 参照）。尚、リポソーム製剤は液状製剤としてそのまま、または凍結乾燥することによって乾燥製剤としても提供され得る。凍結製剤の場合には注射用蒸留水等に希釈または分散して用いられるのが一般的である。

#### 図面の簡単な説明

第1図はGL-2の可視・紫外吸収スペクトルを、第2図はGL-2の赤外吸収スペクトルを、第3図はGL-2のNMRスペクトルをそれぞれ示し、第4図は2,3,4-トリ-*o*-メチルグリシトールアセテートのMSスペクトルを、第5図は4,6-ジ-*o*-メチルグリシトールアセテートのMSスペクトルをそれぞれ示す。

また第6図はGL-1の可視・紫外吸収スペクトルを、第7

図はGL-1の赤外吸収スペクトルをそれぞれ示す。

以下、実施例を挙げて本発明をより詳細に説明する。

#### 実施例1

グルコース1%、ペプトン0.5%及び酵母エキス0.2%の組成の培地(pH7.2)5mlに、*R. aurantiacus* (ATCC 25928)を接種し、28~30℃で4日間培養(前培養)し、この1mlをグルコース1%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.2%及び寒天1.5%の組成の培地(pH7.2)を平板にしたものに接種し、28~30℃で5日間好气的条件で培養した。これによって菌体約1.5g(湿重量)が得られるので、以上の操作を繰り返す行い、菌体100g(湿重量)を集め、水で洗浄した後、クロロホルム-メタノール(2:1、v/v)混液100mlを加えワーリング・ブレンダー(waring blender)で高速攪拌した。水800mlを加え、二層に分離した下層を分取した。さらにクロロホルム-メタノール(2:1、v/v)混液を加え、下層を分取し、先の下層と併せてロータリー・エバポレーターで濃縮し、粗脂質1.2gを得た。これは、TLC上少なくとも4つ以上の糖脂質と思われる主スポットを含んでいる。これらの主スポットのRf値の高いものからGL-1、GL-2、GL-3及びGL-4等とする。これを、クロロホルムに溶解させ、不溶物は濾過してシリカゲルのカラム(2.5cmφ×20cm)に注入する。クロロホルム150ml、クロロホルム-エタノール(97:3、v/v)混液150ml、クロロホルム-アセトン(1:1、v/v)混液150ml、アセトン200ml、クロロホルム-メタノール(2:1、v/v)混液200ml及びメタノール200

mlの順に展開し、薄層クロマトグラフィーにて、Rf値の高い方から2番目のGL-2が検出された画分を集めて濃縮し、アセトン不溶物を集めシリカゲル薄層板（アナルテック社製「シリカゲルG」薄層板、20×20cm）にバンド状にスポットした。クロロホルム-メタノール-アセトン-酢酸（90：10：6：1、v/v）混液で展開し、GL-2を含むバンドをかき取り、クロロホルム-メタノール（2：1、v/v）混液で抽出した後、減圧下に濃縮乾固し、無色ペースト状物質6.1mgを得た。これの物性値を次に示す。

分子量：約3500（ゲル濾過法による。）

比旋光度： $[\alpha]_D^{25} = 41.15 \sim 41.57$  (c=0.01、クロロホルム)

融点：測定できない。

可視・紫外吸収スペクトル：245 nm付近に吸収あり。

（第1図参照）

赤外吸収スペクトル：（第2図参照）

NMRスペクトル：CDC<sub>3</sub>中で測定（第3図参照）

溶解性：クロロホルム、ヘキサン、ジエチルエーテル、クロロホルム-メタノール（2：1）、ベンゼン、ピリジンに溶ける。アセトン、メタノール、エタノール、ジメチルスルホキシド、水に不溶である。

呈色反応：アンスロン硫酸反応及び $\alpha$ ナフトール硫酸反応に陽性

酸性、中性、塩基性の区別：中性

薄層クロマトグラフィーにおけるRf値：0.42～0.60

（アナルテック社製「シリカゲルG」薄層板使用）

展開液：クロロホルム－メタノール－アセトン－酢酸  
(90 : 10 : 6 : 1、v/v) 混液

このGL-2の構造解析を下記のようにして行った。

GL-2の1mgに、0.1N水酸化ナトリウム〔クロロホルム－メタノール(1 : 2、v/v)溶液〕1mlを加え、室温で6時間加水分解した後、クロロホルム1mlおよび0.2N塩酸2mlを加え、二層分配をして、クロロホルム層を濃縮乾固した。これにベンゼン－メタノール－硫酸(10 : 20 : 1、v/v)2mlを加え、90℃、2時間メチルエステル化を行った。続いて、水及びヘキサン各2mlを加え、ヘキサン層を濃縮乾固した後、少量のヘキサンの溶解し、これを前記のシリカゲル薄層板を用い、ヘキサン－ジエチルエーテル(4 : 1、v/v)混液で展開し、分離回収した後、N, O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド－ピリジン(2 : 1、v/v)を150μl加え、70℃で30分間反応させた。その後、ベンゼン2mlを数回加えながら、ロータリーエバポレーターで乾固した後、少量のヘキサンを加え、GC/MS分析を行った。

得られた結果を解析すると、GL-2のミコール酸残基は式(II)の構造をもち、R'は炭素原子数が8～26の直鎖状または分岐状で、不飽和結合を0～1程度有するアルキル基であり、R''は炭素原子数が20～60の直鎖状または分岐状で、不飽和結合を1～7(主成分は6付近)程度有するアルキル基であることが判明した。

更に、GL-2につきジアゾメタン－トリフッ化ホウ素エーテラートによる完全メチル化、水酸化カリウムによるエステル

加水分解、4%塩酸（メタノール溶液）および2N-トリフルオロ酢酸による単糖への分解、水素化ホウ素ナトリウムによる還元、続いてピリジン-無水酢酸（1:1）によるアセチル化を順次行い、得られた部分メチル化アルジトールアセテートのGC/MS分析の結果、2,3,4-トリ-O-メチルグリシトールアセテート（第4図参照）及び4,6-ジ-O-メチルグリシトールアセテート（第5図参照）が、ほぼ1:1の比で得られたので、GL-2の構造は $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハコース-2,3,5'-トリミコール酸エステルであることが判明した。

#### 実施例2

実施例1と同様に操作し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより展開し、薄層クロマトグラフィーにてRf値の高い方から1番目のGL-1が検出された画分を集めて濃縮し、以下実施例1と同様に薄層クロマトグラフィーにより分取（展開液：クロロホルム-メタノール-アセトン-酢酸（90:10:6:1、v/v））し、GL-1の無色ペースト状物質1.0mgを得た。これらを、実施例1と同様に分析を行い、GL-1のミコール酸残基は、GL-2とほぼ同じものであり、GL-1の構造は $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハコース-2,6,6'-トリミコール酸エステルであることが判明した。

なお、実施例1におけるGL-3およびGL-4は、ジまたはモノミコール酸エステルであると推定される。以下にGL-1の物性値を示す。

分子量：約3500（ゲル濾過法による。）

融点：測定できない。

可視・紫外吸収スペクトル：（第6図参照）

赤外吸収スペクトル：（第7図参照）

溶解性：GL-2と同様（実施例1参照）

呈色反応：アンスロン硫酸反応及び $\alpha$ -ナフトール硫酸反応  
に陽性

酸性的、中性、塩基性的の区別：中性

薄層クロマトグラフィーにおけるR<sub>f</sub>値：0.73～0.80

（アナルテック社製「シリカゲルG」薄層板使用）

展開液：クロロホルム-メタノール-アセトン-酢酸  
（90：10：6：1、v/v）混液

#### 実施例3

実施例1と同様に前培養したもの1mlを、グルコース1%、  
ペプトン0.5%及び酵母エキス0.2%（pH7.2）から成る培地  
300mlに接種し、30℃で5日間振盪培養し、菌体4gを得、  
実施例1と同様に処理して、粗脂質170mgを得た。以下実施  
例1及び実施例2と同様に操作し、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース-2,  
3,6'-トリミコール酸エステル38.8mg、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース-  
2,6,6'-トリミコール酸エステル29.8mgを得た。

#### 実施例4

10℃で14日間振盪培養した以外は実施例3と同様に操作  
し、 $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース-2,3,6'-トリミコール酸エステル  
及び $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース-2,6,6'-トリミコール酸エステル  
を得た。

なお、かくして得られた上記各トリミコール酸エステル（I）  
におけるミコール酸残基、即ち式（II）におけるR'はそれぞれ

れ炭素原子数 8 ~ 26 の直鎖状又は分岐状で、不飽和結合を 0 ~ 2 程度有するアルキル基であり、R' はそれぞれ炭素原子数 20 ~ 60 の直鎖状又は分岐状で、不飽和結合を 2 ~ 9 程度有するアルキル基であることが判明した。

#### 実施例 5

下記処方よりなるリポソームの懸濁性注射剤を常套手段にて製造した。

|              |        |
|--------------|--------|
| GL-2         | 300 mg |
| 卵黄ホスファチジルコリン | 720 mg |
| 生理食塩水        | 適量     |
| <hr/>        |        |
| 全量           | 5 ml   |

#### 実施例 6

下記処方よりな非水性溶剤を用いた注射剤を常套手段にて製造した。

|       |        |
|-------|--------|
| GL-2  | 100 mg |
| オリーブ油 | 適量     |
| <hr/> |        |
| 全量    | 1 ml   |

#### 実施例 7

下記成分中、水以外の成分の規定量を取り、40℃まで加温しながら攪拌し、均一とする。このものに精製水を加えて攪拌し、白濁した乳濁性注射液を製造した。

- 17 -

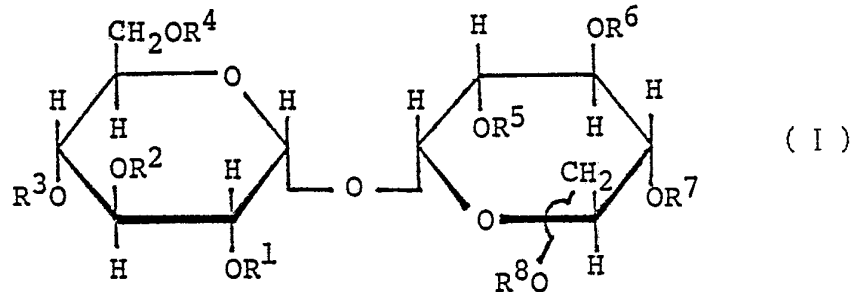
|               |        |
|---------------|--------|
| 原薬 (GL-2)     | 300 mg |
| オリーブ油         | 100 mg |
| d,l-α-トコフェロール | 50 mg  |
| ポリソルベート80     | 30 mg  |
| セスキオレイン酸ソルビタン | 60 mg  |
| 精製水           | 適量     |

---

全量 5 ml

## 請求の範囲

(1) 式



(式中、 $R^1 \sim R^8$  はそれぞれ水素原子またはミコール酸残基を表わし、かつ  $R^1 \sim R^8$  のうち3つがミコール酸残基である。ただし、それらのミコール酸残基は同一であっても異なってもよい。)

で示される  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハローストリミコール酸エステル。

(2) 式 (I) において、 $R^1$ 、 $R^2$  及び  $R^8$  がミコール酸残基で、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$  及び  $R^7$  が水素原子である請求の範囲第(1)項記載の  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハローストリミコール酸エステル。

(3) 式 (I) において、 $R^1$ 、 $R^4$  及び  $R^8$  がミコール酸残基で、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^5$ 、 $R^6$  及び  $R^7$  が水素原子である請求の範囲第(1)項記載の  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハローストリミコール酸エステル。

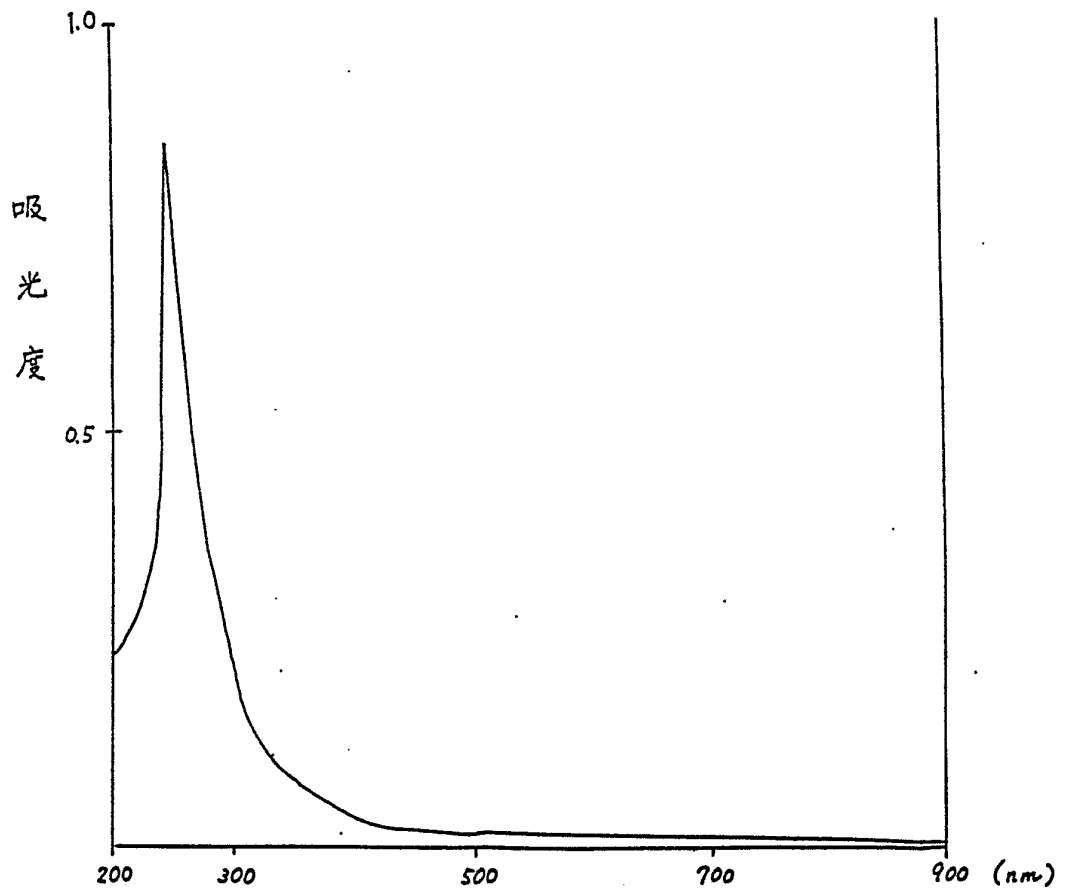
(4) ロドコッカス属に属する菌から得られうる請求の範囲第(1)項記載の  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハローストリミコール酸エステル。

(5) 請求の範囲第(1)項に記載の化合物と製薬上許容される添加剤よりなる医薬組成物。

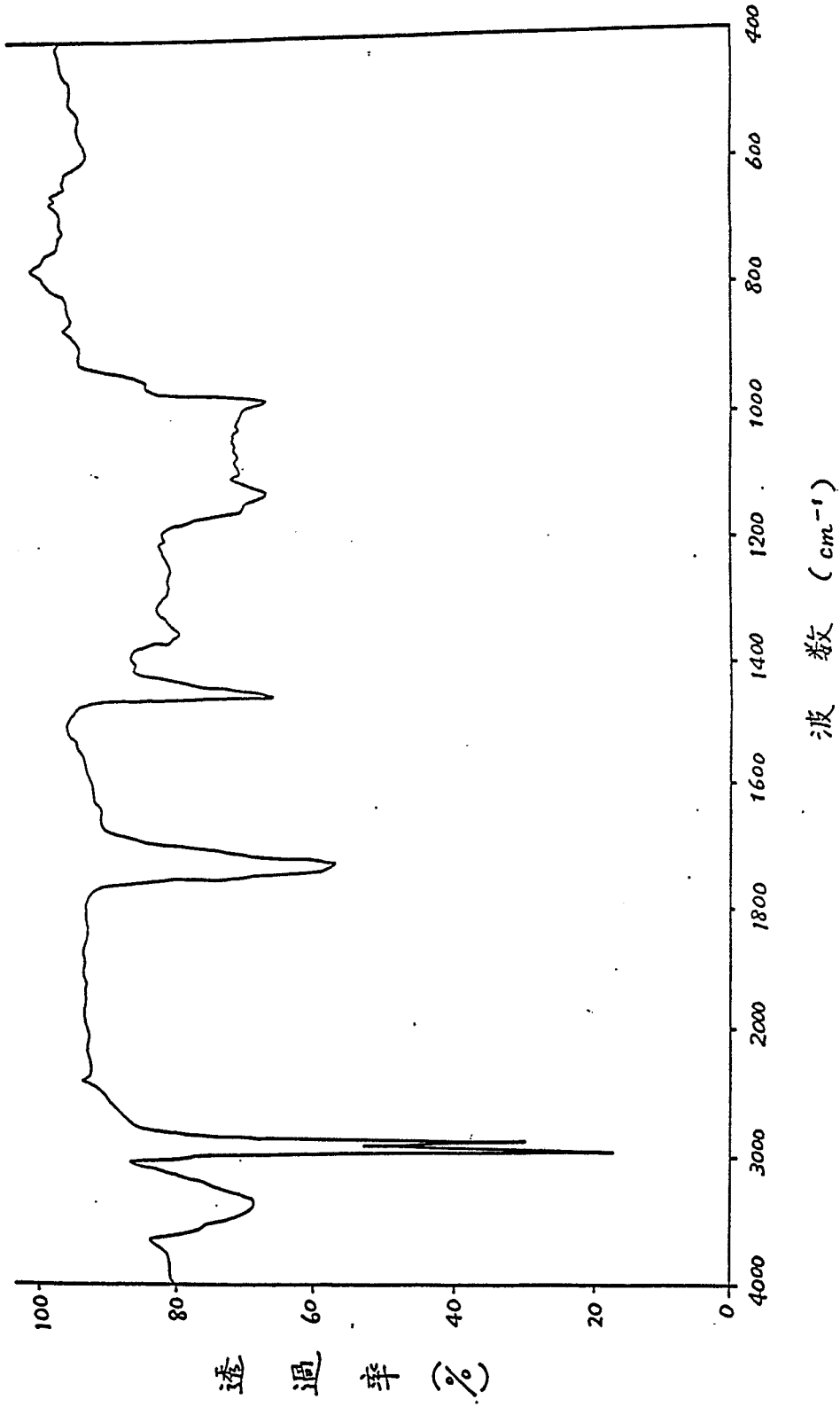
(6) 医薬組成物が抗腫瘍剤の態様である請求の範囲第(5)項に記載の医薬組成物。

(7) リポゾームの態様である請求の範囲第(5)項に記載の医薬組成物。

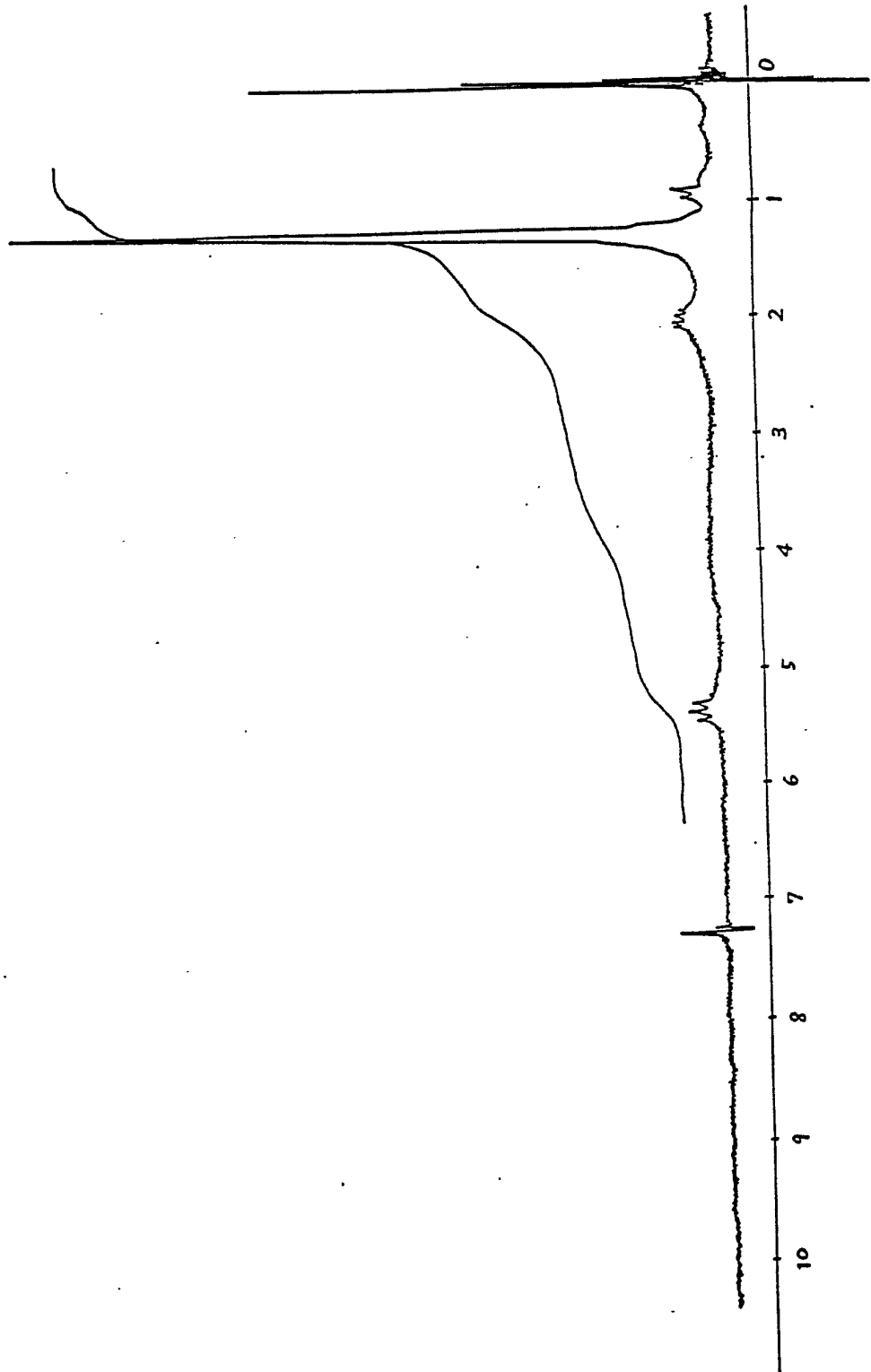
第 1 図



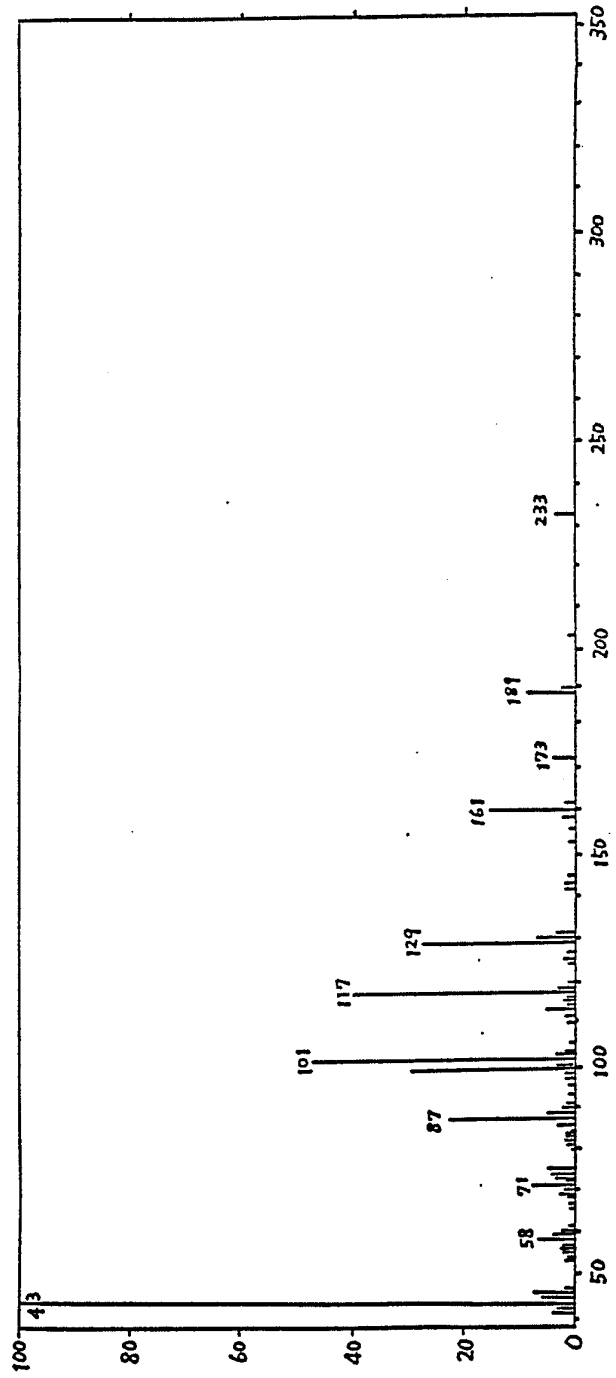
第 2 图



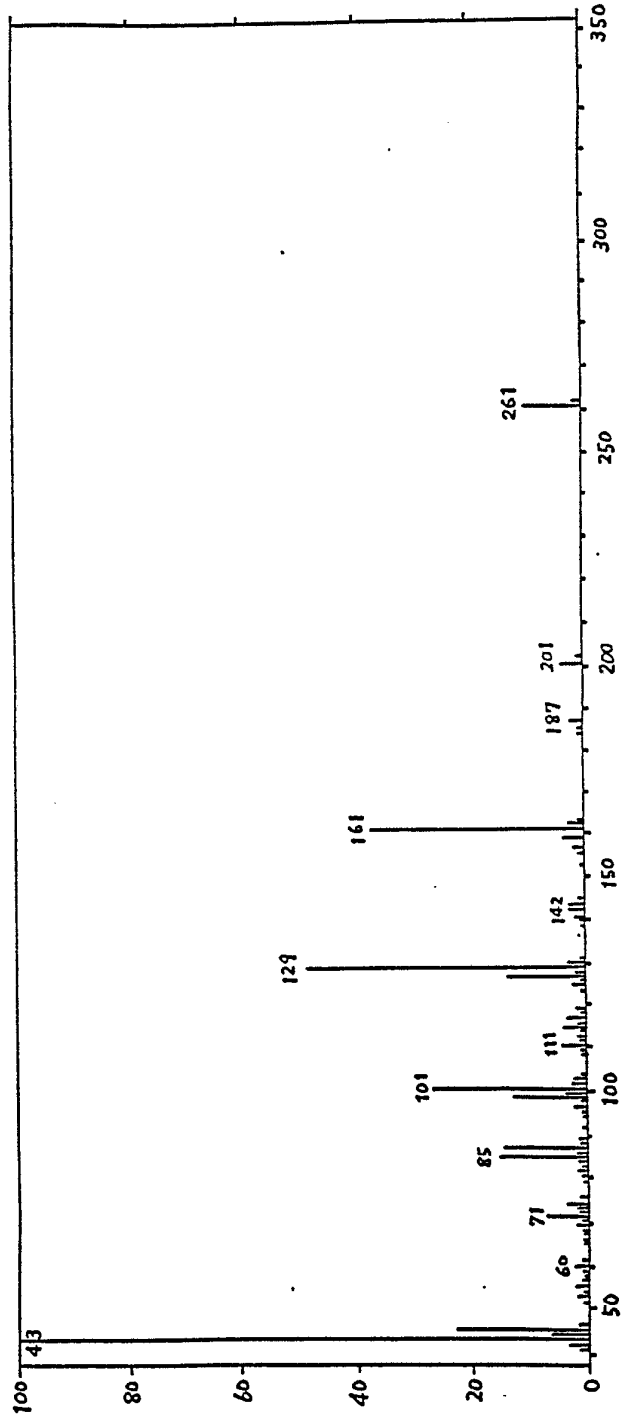
第 3 图



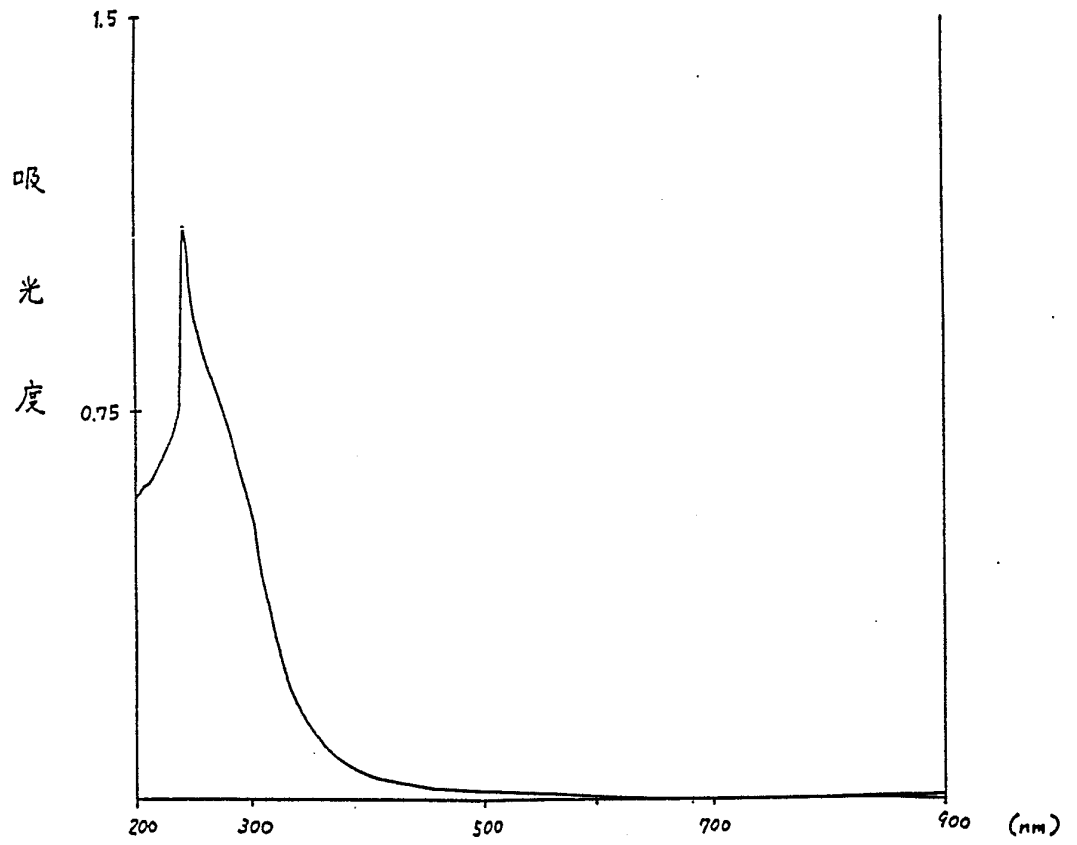
第 4 图



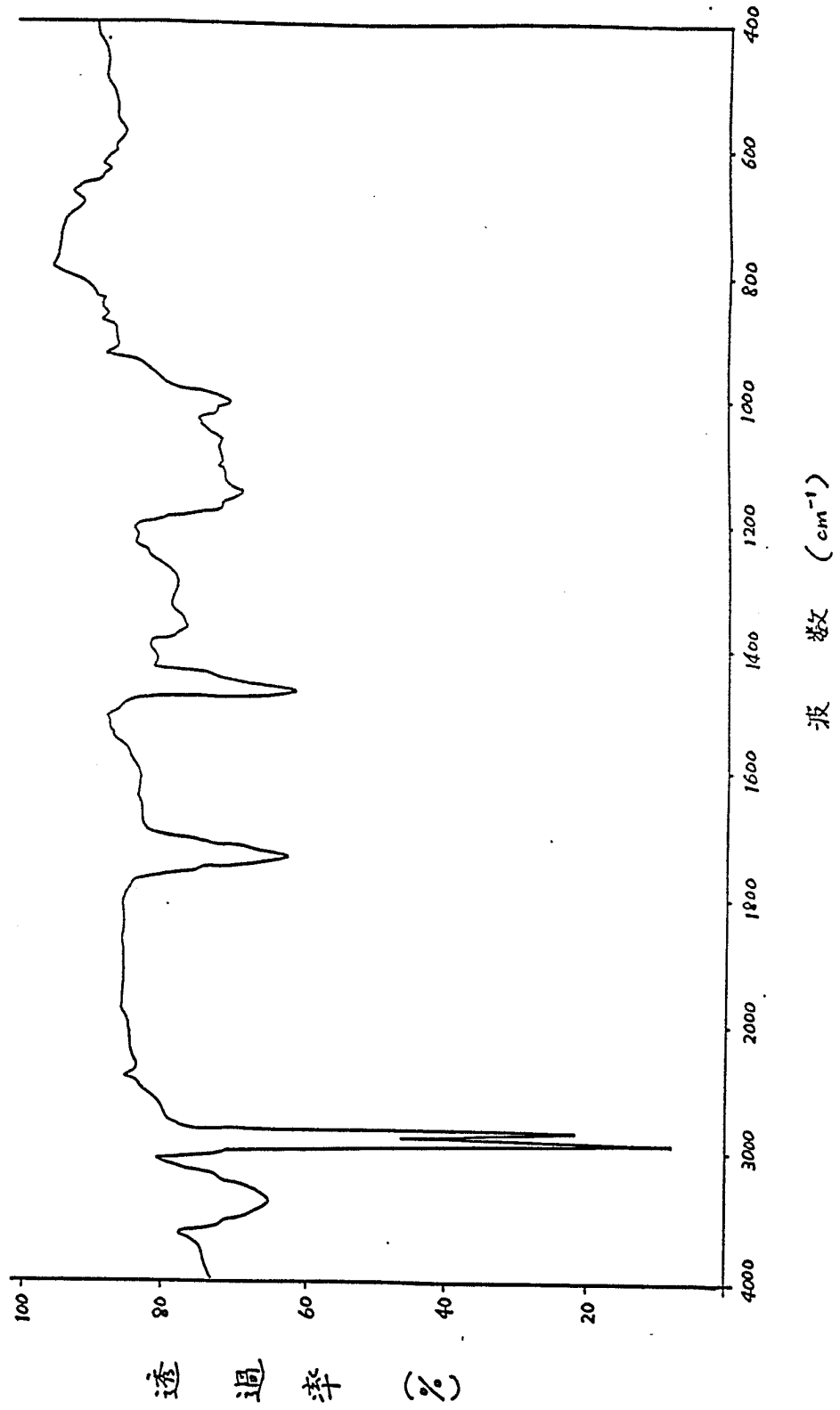
第 5 图



第 6 图



第 7 图



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No **PCT/JP87/00171**

|   |  |                                     |
|---|--|-------------------------------------|
| <b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>3</sup>   |  |                                     |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC   |  |                                     |
| Int.Cl. <sup>4</sup>  | C07H13/06  |                                     |
| <b>II. FIELDS SEARCHED</b>  |  |                                     |
| Minimum Documentation Searched <sup>4</sup>   |  |                                     |
| Classification System   | Classification Symbols   |                                     |
| IPC   | C07H13/06  |                                     |
| Documentation Searched other than Minimum Documentation<br>to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>5</sup>   |  |                                     |
|   |  |                                     |
| <b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>14</sup>   |  |                                     |
| Category *  | Citation of Document, <sup>16</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>17</sup> | Relevant to Claim No. <sup>15</sup> |
|   |  |                                     |
| <p>* Special categories of cited documents: <sup>18</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> |  |                                     |
| <b>IV. CERTIFICATION</b>  |  |                                     |
| Date of the Actual Completion of the International Search <sup>2</sup>  | Date of Mailing of this International Search Report <sup>2</sup>   |                                     |
| June 11, 1987 (11. 06. 87)  | June 29, 1987 (29. 06. 87)   |                                     |
| International Searching Authority <sup>1</sup>  | Signature of Authorized Officer <sup>20</sup>  |                                     |
| Japanese Patent Office  |  |                                     |

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 87/00171

|   |  |               |
|---|--|---------------|
| I. 発明の属する分野の分類  |  |               |
| 国際特許分類 (IPC) <b>Int. Cl.</b><br><b>C07H13/06</b>  |  |               |
| II. 国際調査を行った分野  |  |               |
| 調査を行った最小限資料   |  |               |
| 分類体系  | 分類記号   |               |
| <b>IPC</b>  | <b>C07H13/06</b>   |               |
| 最小限資料以外の資料で調査を行ったもの   |  |               |
| III. 関連する技術に関する文献   |  |               |
| 引用文献の<br>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  | 請求の範囲の番号      |
| ※引用文献のカテゴリー<br>「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<br>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの<br>「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)<br>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献<br>「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の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<br>「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<br>「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<br>「&」 同一パテントファミリーの文献 |               |
| IV. 認 証   |  |               |
| 国際調査を完了した日<br><b>11.06.87</b>   | 国際調査報告の発送日<br><b>29.06.87</b>  |               |
| 国際調査機関<br>日本国特許庁 (ISA/JP)   | 権限のある職員<br>特許庁審査官<br><b>水野昭宣</b> ㊟   | <b>4C7138</b> |