

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年12月19日(19.12.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/257775 A1

(51) 国際特許分類:
C07D 233/84 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/4178 (2006.01)

神戸市西区室谷2丁目2番3号 長瀬産業株式会社内 Hyogo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/021265

(74) 代理人: 弁理士法人ユニアス国際特許事務所 (UNIUS PATENT ATTORNEYS OFFICE); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目13-9 新大阪MTビル1号館2階 Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2024年6月12日(12.06.2024)

(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 2023-098209 2023年6月15日(15.06.2023) JP

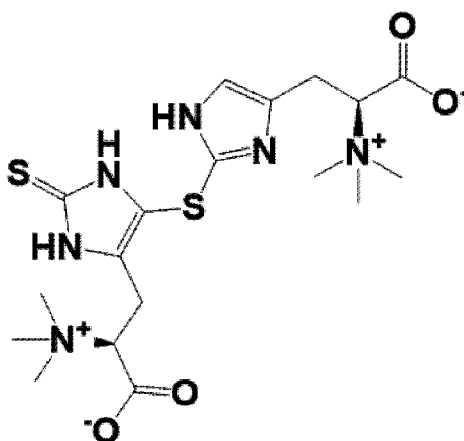
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,

(71) 出願人: 長瀬産業株式会社 (NAGASE & CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5508668 大阪府大阪市西区新町1丁目1番17号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 松本 淳 (MATSUMOTO, Jun); 〒6512241 兵庫県神戸市西区室谷2丁目2番3号 長瀬産業株式会社内 Hyogo (JP). 小坂 邦男 (KOSAKA, Kunio); 〒6512241 兵庫県

(54) Title: COMPOUND OR SALT THEREOF AND METHOD FOR PRODUCING SAME, COMPOSITION, HYDROGEN PEROXIDE REMOVER, AND CYTOTOXICITY INHIBITOR

(54) 発明の名称: 化合物又はその塩及びその製造方法、組成物、過酸化水素除去剤、並びに、細胞毒性抑制剤



(1)

(57) Abstract: Provided are: a novel ergothioneine derivative and a method for producing the same; a composition containing the derivative; a hydrogen peroxide remover; and a cytotoxicity inhibitor. Provided is a compound represented by formula (1) or a salt thereof.

(57) 要約: 新規なエルゴチオネイン誘導体及びその製造方法、当該誘導体を含む組成物、過酸化水素除去剤、並びに、細胞毒性抑制剤を提供する。下記式(1)で表される化合物又はその塩。



WO 2024/257775 A1

SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：

化合物又はその塩及びその製造方法、組成物、過酸化水素除去剤、並びに、細胞毒性抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、新規なエルゴチオネイン誘導体及びその製造方法、当該誘導体を含む組成物、過酸化水素除去剤、並びに、細胞毒性抑制剤等に関する。

背景技術

[0002] L-エルゴチオネイン（本明細書では「EGT」と表記する場合がある）は含硫アミノ酸の一種であり、多様な生理活性を有することが知られている。

[0003] 一方、過酸化水素除去作用を有する組成物として、これまでに、例えば、微細な気泡を含む抗酸化性機能水等が知られている（例えば、特許文献1参照）。また、細胞毒性抑制作用を有する組成物として、これまでに、例えば、ヒノキチオールを含有する細胞内のチオレドキシシステム活性化剤などが知られている（例えば、特許文献2参照）。

[0004] しかしながら、過酸化水素除去作用や細胞毒性抑制作用が求められる用途や使用対象等は多岐にわたり、新たな過酸化水素除去剤や細胞毒性抑制剤の開発が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2008-156320号公報
特許文献2：特開2020-103100号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、このような事情に照らし、新規なエルゴチオネイン誘導体及び

その製造方法、当該誘導体を含む組成物、過酸化水素除去剤、並びに、細胞毒性抑制剤等を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

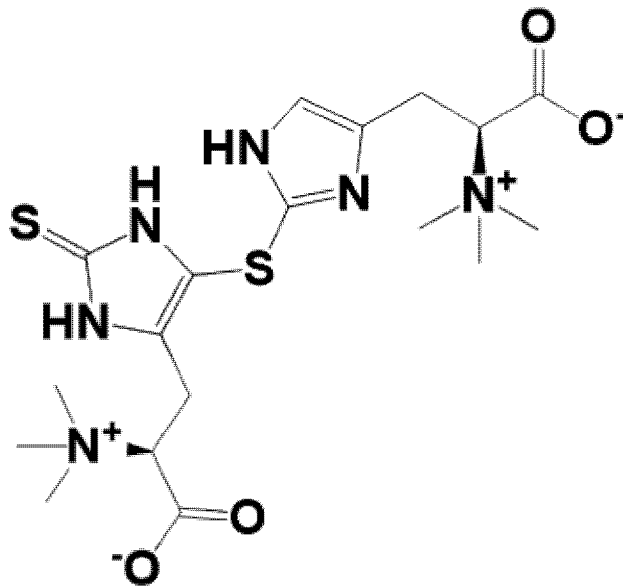
[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、以下に示す新規なエルゴチオネイン誘導体（下記式 1 で表される化合物又はその塩。）の創製に成功し、上記化合物により上記目的を達成できることを見出して、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち、本発明は、下記に掲げる化合物又はその塩（以下、「化合物」「化合物等」と呼ぶ場合もある。）を提供する。

[0009] 項 1.

下記式（1）で表される化合物又はその塩。

[化1]



(1)

[0010] また、本発明は、下記に掲げる組成物を提供する。

[0011] 項 2.

項 1 に記載の化合物又はその塩を含む、組成物。

[0012] また、本発明は、下記に掲げる過酸化水素除去剤を提供する。

[0013] 項 3.

項 1 に記載の化合物又はその塩を含む、過酸化水素除去剤。

[0014] 項 4.

上記化合物又はその塩の濃度が $0.04 \mu\text{M}$ 以上の濃度で用いられる、項 3 に記載の過酸化水素除去剤。

[0015] また、本発明は、下記に掲げる細胞毒性抑制剤を提供する。

[0016] 項 5.

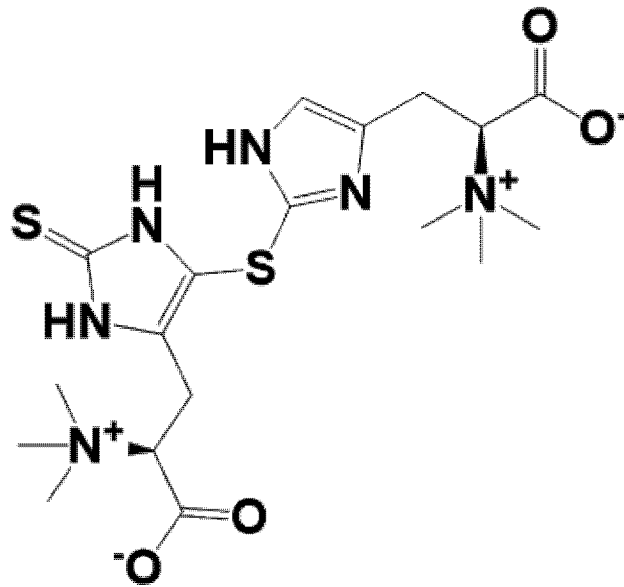
過酸化水素存在下に用いられる、項 1 に記載の化合物又はその塩を含む、細胞毒性抑制剤。

[0017] また、本発明は、下記に掲げる製造方法に関する。

[0018] 項 6.

L-エルゴチオネイン水溶液を 60°C 以上で 24 時間以上加熱処理する工程 (1) を含む、下記式 (1) で表される化合物又はその塩の製造方法。

[化2]



(1)

発明の効果

[0019] 本発明の化合物又はその塩ないしそれを含む組成物は、例えば、過酸化水

素除去剤や細胞毒性抑制剤等として好適に用いることができる。

[0020] また、本発明の過酸化水素除去剤は、例えば、過酸化水素を好適に除去する作用を奏することができ得る。

[0021] また、本発明の細胞毒性抑制剤は、例えば、培地における過酸化水素に起因する細胞毒性の低減作用を奏することができ得る。

[0022] また、本発明の化合物の製造方法を用いることにより、上記化合物又はその塩等を簡便に得ることができる。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]図1は、実施例1における、96時間加熱処理後のHPLC分析結果を示すグラフである。

[図2]図2は、実施例1における、液体クロマトグラフィー高分解能質量分析(LC-HRMS)の測定結果を示すグラフである。

[図3]図3は、実施例2における、残存過酸化水素量の評価結果を示すグラフである。

[図4]図4は、実施例2における、残存過酸化水素量の評価結果を示す表である。

[図5]図5は、実施例3における、HEK293細胞に対する過酸化水素細胞毒性の評価結果を示す写真図である。

[図6]図6は、実施例3における、HEK293細胞に対する過酸化水素細胞毒性の評価結果を示すグラフである。

[図7]図7は、実施例3における、HEK293細胞に対する過酸化水素細胞毒性の評価結果を示すグラフである。

[図8]図8は、実施例3における、HEK293細胞に対する過酸化水素細胞毒性の評価結果を示す写真図である。

発明を実施するための形態

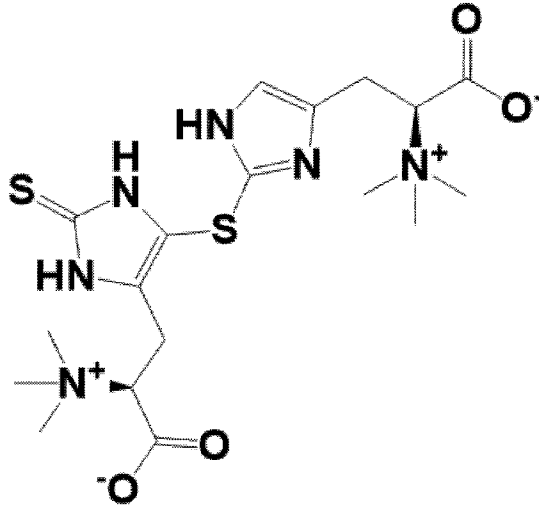
[0024] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

[0025] [化合物又はその塩]

本発明の化合物又はその塩（以下、「化合物(1)」ともいう。）は、下

記式 1 で表される。

[化3]



(1)

- [0026] 上記化合物は、L-エルゴチオネインの酸化二量体の1種である。
- [0027] 上記化合物の塩は、これらの構造における分子内塩であってもよく、他のカウンターカチオン及び／又はカウンターアニオンが含まれていてもよい。
- [0028] 上記化合物の塩としては、例えば、薬理的に又は生理学的に許容される塩であってもよい。上記塩は、特に制限されないが、具体的には、有機酸塩、無機酸塩、有機塩基、又は無機塩基が挙げられる。有機酸塩としては、例えば、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、酪酸塩、パルミチン酸塩、ステアリン酸塩等のモノカルボン酸塩；フマル酸塩、マレイン酸塩、コハク酸塩、マロン酸塩等の多価カルボン酸塩；乳酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩等のオキシカルボン酸塩；メタンスルホン酸塩、トシル酸塩等のトルエンスルホン酸塩等の有機スルホン酸塩が例示される。無機酸塩としては、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩が例示される。有機塩基との塩としては、例えば、メチルアミン、トリエチルアミン、トリエタノールアミン、ジエタノールアミン、モルホリン、ピペラジン、ピロリジン、トリピリジン、ピコリン、エチレンジアミン等の有機アミンとの塩が挙げられる。無機塩基との塩としては、例えば、アンモニウム塩；ナトリウム又はカリウム等の

アルカリ金属、カルシウム又はマグネシウム等のアルカリ土類金属、アルミニウム等の金属との塩等の各種の塩が挙げられる。これらの塩は、1種単独で使用してもよく、また2種以上を任意に組み合わせて使用してもよい。上記塩には、塩の溶媒和物又は水和物を含んでいてもよい。

[0029] 上記化合物(1)は、合成法、抽出法、発酵法等の公知の方法により得ることも可能である。

[0030] 上記化合物(1)の合成方法として、例えば、L-エルゴチオネインを適切に酸化処理することで得ることができ得る。上記合成方法として、例えば、L-エルゴチオネインを高温や長時間加熱処理した後、高速液体クロマトグラフィー等により分取、精製等することで得ることができ得る。

[0031] より具体的には、例えば、L-エルゴチオネイン水溶液を塩基性条件下や加温することにより合成することができ、60℃以上で24時間以上加熱処理する工程(1)を含む方法を用いることが好ましい。さらに60℃以上でpH9-11にて24時間以上加熱処理する工程(1)を含む方法を用いることがより好ましい。また、上記工程(1)において、例えば、80℃以上で行うことにより、例えば、L-エルゴチオネインが水溶液として1500mM等の濃度の溶液合成することもでき得る。また、L-エルゴチオネイン水溶液の濃度は、使用目的や用途に応じて、例えば、1mM以上が好ましく、10mM以上がより好ましく、100mM以上がさらに好ましい。また、L-エルゴチオネイン水溶液の濃度は、使用目的や用途に応じて、例えば、2M以下、1.8M以下、1.5M以下、1.3M以下等とすることができ得る。

[0032] [組成物]

本発明の組成物は、上記化合物(1)を含む。化合物(1)は単独で含んでいてもよく、また2種以上を含んでいてもよい。

[0033] 本発明の組成物において、上記化合物(1)の含有量は、組成物の用途、他の成分の種類や含有量等により適宜調整され、限定はされないが、例えば、組成物全量に対して、0.000001質量%以上とすることができ、0

、0.0000015質量%以上、0.000005質量%以上、0.00001質量%以上、0.00005質量%以上、0.0001質量%以上、0.0005質量%以上、0.001質量%以上等をあげることができる。また、上記化合物（1）の含有量は、例えば、組成物全量に対して、99.999質量%以下とすることができ、99.9質量%以下、99.5質量%以下、99質量%以下、98.5質量%以下、98質量%以下、80質量%以下とすることができ、70質量%以下、60質量%以下、50質量%以下、40質量%以下、30質量%以下、20質量%以下、10質量%以下、5質量%以下、1質量%以下等をあげることができる。別の実施態様において、例えば、液状組成物や液状製剤として調製される場合、限定はされないが、化合物（1）の含有量は、例えば、組成物全量に対して、80質量%以下とすることができ、70質量%以下、60質量%以下、50質量%以下、40質量%以下、30質量%以下、20質量%以下、10質量%以下、5質量%以下、1質量%以下等をあげることができる。

[0034] また、上記組成物は、組成物の用途、他の成分の種類に応じて、さらに公知の各種成分、添加剤を併用することができる。上記各成分、添加剤としては、例えば、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤には、溶剤、溶解補助剤、乳化剤、乳化安定剤、増粘剤、保湿剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、香料等をあげることができる。これらは単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。

[0035] [過酸化水素除去剤]

本発明の過酸化水素除去剤は、上記化合物（1）を含む。化合物（1）は単独で含んでいてもよく、また2種以上を含んでいてもよい。

[0036] 本発明の過酸化水素除去剤は、上記構成を有することにより、例えば、過酸化水素を好適に除去する作用を奏することができ得る。

[0037] 本発明の過酸化水素除去剤において、上記化合物（1）の含有量（複数種存在する場合はそれらの合計量）は、過酸化水素除去剤の用途、他の成分の

種類や含有量等により適宜調整され、限定はされないが、例えば、過酸化水素除去剤全量に対して、0.000001質量%以上とすることができ、0.0000015質量%以上、0.000005質量%以上、0.00001質量%以上、0.00005質量%以上、0.0001質量%以上、0.0005質量%以上、0.001質量%以上等をあげることができる。また、上記化合物の含有量は、例えば、過酸化水素除去剤全量に対して、99.999質量%以下とすることができ、99.9質量%以下、99.5質量%以下、99質量%以下、98.5質量%以下、98質量%以下、80質量%以下とすることができ、70質量%以下、60質量%以下、50質量%以下、40質量%以下、30質量%以下、20質量%以下、10質量%以下、5質量%以下、1質量%以下等をあげることができる。別の実施態様において、例えば、液状過酸化水素除去剤や液状製剤として調製される場合、限定はされないが、化合物(1)の含有量は、例えば、過酸化水素除去剤全量に対して、80質量%以下とすることができ、70質量%以下、60質量%以下、50質量%以下、40質量%以下、30質量%以下、20質量%以下、10質量%以下、5質量%以下、1質量%以下等をあげることができる。

[0038] 上記過酸化水素除去剤が液状で使用される場合、使用目的や用途に応じて、例えば、上記化合物(1)の濃度が0.01 μ M~0.1 μ M、0.02 μ M~0.08 μ M、0.03 μ M~0.06 μ M、0.04 μ M~0.05 μ M等の濃度で用いてもよい。また、例えば、上記化合物(1)の濃度が0.04 μ M以上の濃度で用いられる場合を好ましい例としてあげることができる。

[0039] また、上記過酸化水素除去剤は、過酸化水素除去剤の用途、他の成分の種類に応じて、さらに上述の公知の各種成分、添加剤を併用することができる。これらは単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。

[0040] [細胞毒性抑制剤]

本発明の細胞毒性抑制剤は、上記化合物(1)を含み、過酸化水素存在下

に用いられる。化合物（１）は単独で含んでいてもよく、また２種以上を含んでいてもよい。

[0041] 本発明の細胞毒性抑制剤は、上記構成を有することにより、例えば、培地における過酸化水素に起因する細胞毒性の低減作用を奏することができ得る。

[0042] 本発明の細胞毒性抑制剤において、上記化合物（１）の含有量（複数種存在する場合はそれらの合計量）は、細胞毒性抑制剤の用途、他の成分の種類や含有量等により適宜調整され、限定はされないが、例えば、細胞毒性抑制剤全量に対して、 0.000001 質量%以上とすることができ、 0.000005 質量%以上、 0.00001 質量%以上、 0.00005 質量%以上、 0.0001 質量%以上、 0.0005 質量%以上、 0.001 質量%以上等をあげることができる。また、上記化合物（１）の含有量は、例えば、細胞毒性抑制剤全量に対して、 99.999 質量%以下とすることができ、 99.9 質量%以下、 99.5 質量%以下、 99 質量%以下、 98.5 質量%以下、 98 質量%以下、 80 質量%以下とすることができ、 70 質量%以下、 60 質量%以下、 50 質量%以下、 40 質量%以下、 30 質量%以下、 20 質量%以下、 10 質量%以下、 5 質量%以下、 1 質量%以下等をあげることができる。別の実施態様において、例えば、液状細胞毒性抑制剤や液状製剤として調製される場合、限定はされないが、化合物（１）の含有量は、例えば、細胞毒性抑制剤全量に対して、 80 質量%以下とすることができ、 70 質量%以下、 60 質量%以下、 50 質量%以下、 40 質量%以下、 30 質量%以下、 20 質量%以下、 10 質量%以下、 5 質量%以下、 1 質量%以下等をあげることができる。

[0043] 上記細胞毒性抑制剤が液状で使用される場合、使用目的や用途に応じて、例えば、上記化合物又はその塩の濃度が $0.01\ \mu\text{M}$ ～ $10\ \mu\text{M}$ 、 $0.1\ \mu\text{M}$ ～ $5\ \mu\text{M}$ 、 $1\ \mu\text{M}$ ～ $3\ \mu\text{M}$ 、等の濃度で用いてもよい。

[0044] また、上記細胞毒性抑制剤は、細胞毒性抑制剤の用途、他の成分の種類に応じて、さらに上述の公知の各種成分、添加剤を併用することができる。こ

れらは単独で使用してもよく、また2種以上を混合して使用してもよい。

実施例

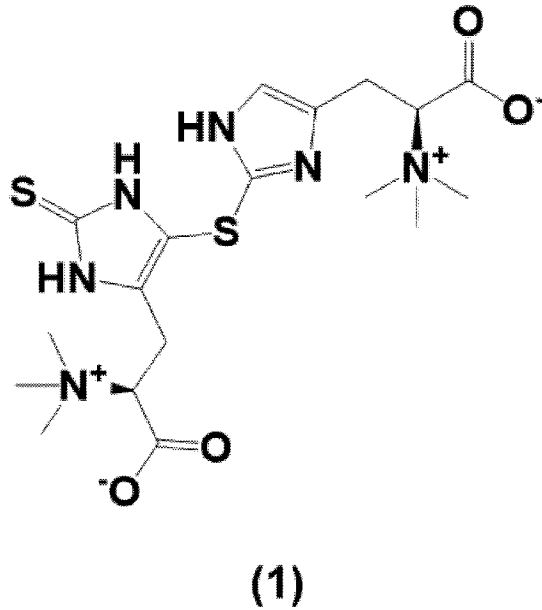
[0045] 次に、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0046] [実施例1]

(化合物の調製)

下記式(1)で表される化合物(以下、「化合物A」又は「EGT-X」ともいう。)は以下の手法で調製した。

[化4]



[0047] L-エルゴチオネイン(テトラエドロン社製)をN-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid緩衝液 pH10に溶解し、250mMのエルゴチオネイン溶液20mLを調製した。60℃で96h加熱処理したのち、下記の条件でHPLC分析を行った(図1)。

装置：シマズLC20A(島津製作所社製)

カラム： μ Bondasphere C18 5 μ m 100A、150 \times 3.9mm I.D.(ウォーターズ社製)

流速：0.5mL/分、温度：30℃

検出器：PDA (260nm)

溶離液：蒸留水 イソクラチック

保持時間：3.3分付近 (L-エルゴチオネイン)、7.8分付近 (化合物A)

装置：中圧カラム分取システムEPLC AI-580S (山善社製)

カラム：ODS-C-50C 37X300mm (山善社製)

流速：6mL/分、温度：室温

検出器：UV (260nm)

溶離液：蒸留水 イソクラチック

保持時間：20分付近 (L-エルゴチオネイン)、30分付近 (化合物A)

インジェクション量：0.5-0.6mL

上記の条件で分取を10回おこない得られた化合物Aの分画を集めた。

[0048] 得られた分画液を、ロータリーエバポレータ (60℃湯浴) で約1000mLから30mLに濃縮した。次いで、凍結乾燥し、108mgの黄色粉末の化合物Aを得た。得られた化合物Aを、D₂Oに再溶解しNMR分析を行った。

[0049] (¹H-NMR測定)

以下に¹H-NMR測定の結果を示す。

¹H-NMR (400MHz, D₂O) DSS-d₆を0ppmとした。

δ 7.00 (s, 1H), 3.91 (m, 2H), 3.33 (m, 2H), 3.29 (s, 9H), 3.24 (s, 9H), 3.14 (m, 2H)

[0050] (¹³C-NMR測定)

以下に¹³C-NMR測定の結果を示す。

¹³C-NMR (400MHz, D₂O) DSS-d₆を0ppmとした。

δ 173.49, 172.93, 169.98, 140.47, 136

. 72, 134. 11,
122. 56, 117. 67, 80. 98, 79. 37, 54. 79, 28
. 00, 25. 65

[0051] (高分解能質量分析)

以下に液体クロマトグラフィー高分解能質量分析 (LC-HRMS) の結果を示す。

(LC-HRMS分析条件)

装置: Agilent Technologies 6224 TOF
LC/MS (アジレントテクノロジー社製)

カラム: μ Bondasphere C18 5 μ m 100A、15
0 \times 3.9 mm I. D. (ウォーターズ社製)

流速: 0.5 mL/分、温度: 30°C

溶離液: 蒸留水 イソクラチック

イオン化条件: ESI キャピラリー電圧 3500V フラグメンタ
ー電圧 100V

保持時間: 7.8分付近 (化合物A)

$C_{18}H_{28}N_6O_4S_2$ の $[M+H]^+$ の理論値: 457.1686 に対し、
実測値: 457.1686 であった。

[0052] また、化合物Aにチオン基が複数あるかどうかを確認するために、S修飾
試薬フェナシルブロミドとの反応試験をおこなった。

[0053] 化合物A 32 mg/mL の水溶液 100 μ L とフェナシルブロミド (東京
化成工業社製) 15 mg/mL のN, N-ジメチルホルムアミド溶液 100
 μ L を混合し室温で10分間インキュベートした。それを下記の条件で液体
クロマトグラフィー高分解能質量分析 (LC-HRMS) にかけた。

装置: Agilent Technologies 6224 TOF
LC/MS (アジレントテクノロジー社製)

カラム: μ Bondasphere C18 5 μ m 100A、15
0 \times 3.9 mm I. D. (ウォーターズ社製)

流速：0.5 mL/分、温度：30℃

検出器：PDA (260 nm)

溶離液：0.1%ギ酸 (A)、アセトニトリル (B) グラジエント

グラジエント条件：0%B (0分) から100%B (20分)

イオン化条件：ESI キャピラリー電圧 3500V フラグメンター電圧 100V

[0054] 結果を図2に示す。検出された主要ピークは保持時間7.9分付近のひとつであった。

以下に保持時間7.9分付近の主要ピークの液体クロマトグラフィー高分解能質量分析 (LC-HRMS) の結果を示す。

$C_{26}H_{34}N_6O_5S_2$ の $[M+H]^+$ の理論値：575.2105に対し、実測値：575.2099であり、フェナシル基が一つ結合したものであることが確認された。(図2)

[0055] [実施例2]

(過酸化水素除去評価)

得られた化合物A (EGT-X) を、10 μ Mから2倍ずつキット (OxiSelect hydrogen peroxide assay kit (CELL BIOLABS社製)) 付属のバッファーで希釈し、それらを25 μ Lずつ96ウェルプレートに添加した。また、過酸化水素をキット付属のバッファーで希釈し4 μ Mとしたものを25 μ Lずつ96ウェルプレートに添加した。さらに、過酸化水素を加えていないこと以外は同じ条件で調製したものをブランクとした。

[0056] 続いて、キットのプロトコールに従い、キット付属のADHP (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) とHRP (horseradish peroxidase) 混合物を50 μ Lずつ添加し攪拌した。室温で30分間インキュベートした後、励起波長530 nm、蛍光波長590 nmの条件で蛍光強度を測定した。各測定値からブランクの値を差し引いた値を算出した。コントロール (化合物A : 0 μ M) の

値を100%とした時のEGT-Xを添加したときの%値を算出しグラフにした(図3、4)。

[0057] 図3、4に示されるように、化合物A(EGT-X)の添加量を増加させるにつれて、残存過酸化水素量の低下が認められる結果となった。

[0058] [実施例3]

(細胞毒性抑制評価)

細胞毒性抑制評価として、HEK293細胞に対する過酸化水素細胞毒性を評価した。

[0059] HEK293細胞 1.5×10^4 cells/mL(5%牛胎児血清(FBS))を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)の懸濁液を96ウェルプレートに100 μ Lずつ加えた。24時間後、DMEMのみもしくは過酸化水素を含むDMEMを100 μ Lずつ添加し、過酸化水素濃度が0、0.001、0.002、0.004%になるようにした。過酸化水素に24時間暴露した時の細胞生存率を観察した。細胞の生存率を測定するために、5%FBSを含むDMEMとWST-1Premix(TAKARAバイオ)を1:1で混合したものを50 μ L加え、5%CO₂インキュベーター内で30分間インキュベートした。450nmの吸光度を測定した。細胞無しであること以外は上記と同じ条件で行ったものを空白用として測定し、上記結果から空白の値を差し引いたものから細胞の生存率を算出した(図5、6)。

[0060] HEK293細胞 1.5×10^4 cells/mL(5%FBS-DMEM)の懸濁液を100 μ Lずつ96ウェルプレートに加えた。24時間後、DMEMに溶解したEGT-Xおよび過酸化水素をDMEMに溶解したものを50 μ Lずつプレートに添加し、過酸化水素濃度は、コントロールは0、それ以外は0.0015%、およびEGT-Xは図(図5、6)に示した濃度になるようにした。更に24時間培養し、細胞の生存率を測定するために、5%FBSを含むDMEMとWST-1Premix(TAKARAバイオ社製)を1:1で混合したものを50 μ L加え、5%CO₂インキュベーター内

で30分間インキュベートした。450nmの吸光度を測定した。細胞無しであること以外は上記と同じ条件で行ったものを空白用として測定し、上記結果から空白の値を差し引いたものから細胞の生存率を算出した。

[0061] 過酸化水素およびEGT-X無添加（コントロール）の時の細胞生存率を100%とした結果をグラフに示した（図7、8）。

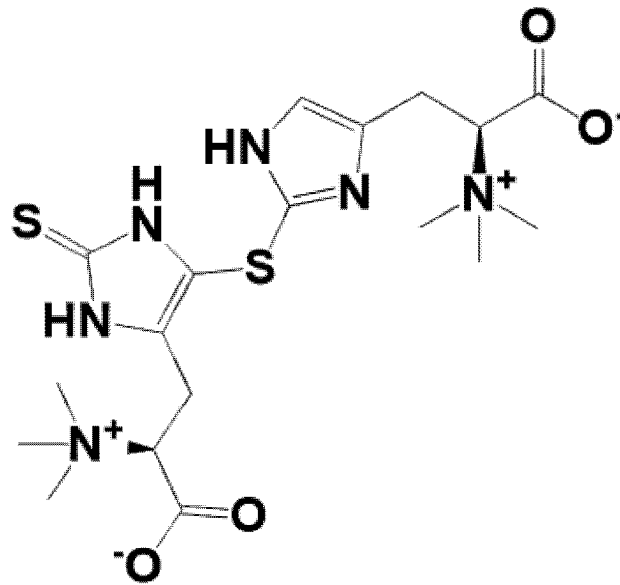
[0062] 図5、6に示されるように、過酸化水素0.001%（292 μ M）では僅かな生存率低下作用しか認められず、0.002%（585 μ M）では細胞が死滅していた。そのため、その間の値、過酸化水素濃度0.0015%の時のEGT-Xの過酸化水素による細胞毒性に対する効果を検討することにした。

[0063] また、図7、8に示されるように、EGT-Xが125 μ M以上の存在下では、過酸化水素による細胞毒性が抑制された結果となった。

請求の範囲

[請求項1] 下記式（1）で表される化合物又はその塩。

[化1]



(1)

[請求項2] 請求項1に記載の化合物又はその塩を含む、組成物。

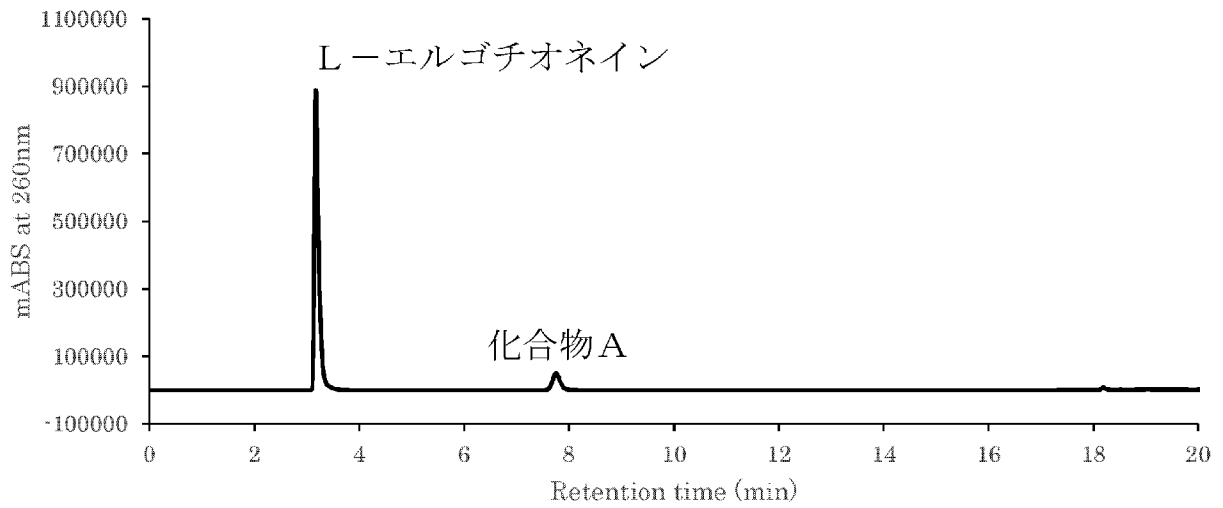
[請求項3] 請求項1に記載の化合物又はその塩を含む、過酸化水素除去剤。

[請求項4] 前記化合物又はその塩の濃度が0.04 μ M以上の濃度で用いられる、請求項3に記載の過酸化水素除去剤。

[請求項5] 過酸化水素存在下に用いられる、請求項1に記載の化合物又はその塩を含む、細胞毒性抑制剤。

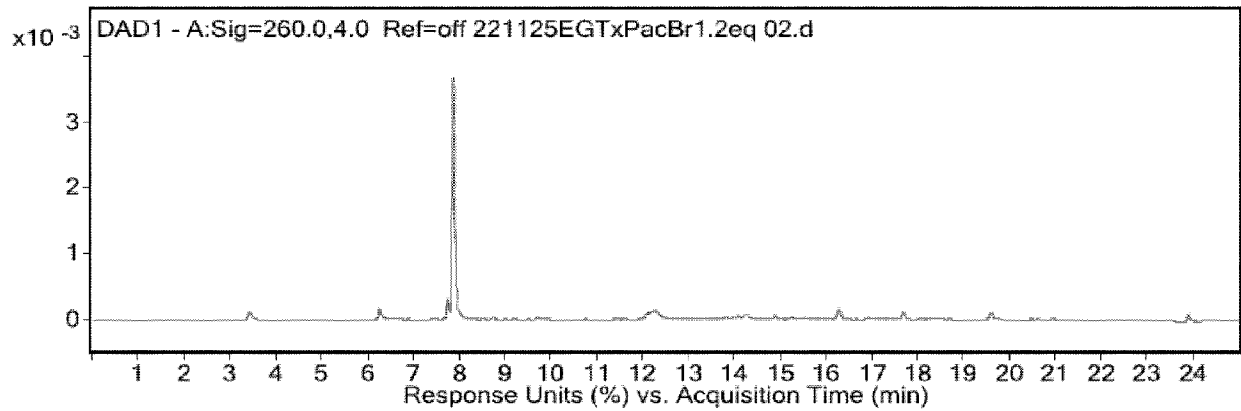
[請求項6] L-エルゴチオネイン水溶液を60℃以上で24時間以上加熱処理する工程（1）を含む、下記式（1）で表される化合物又はその塩の製造方法。

[図1]

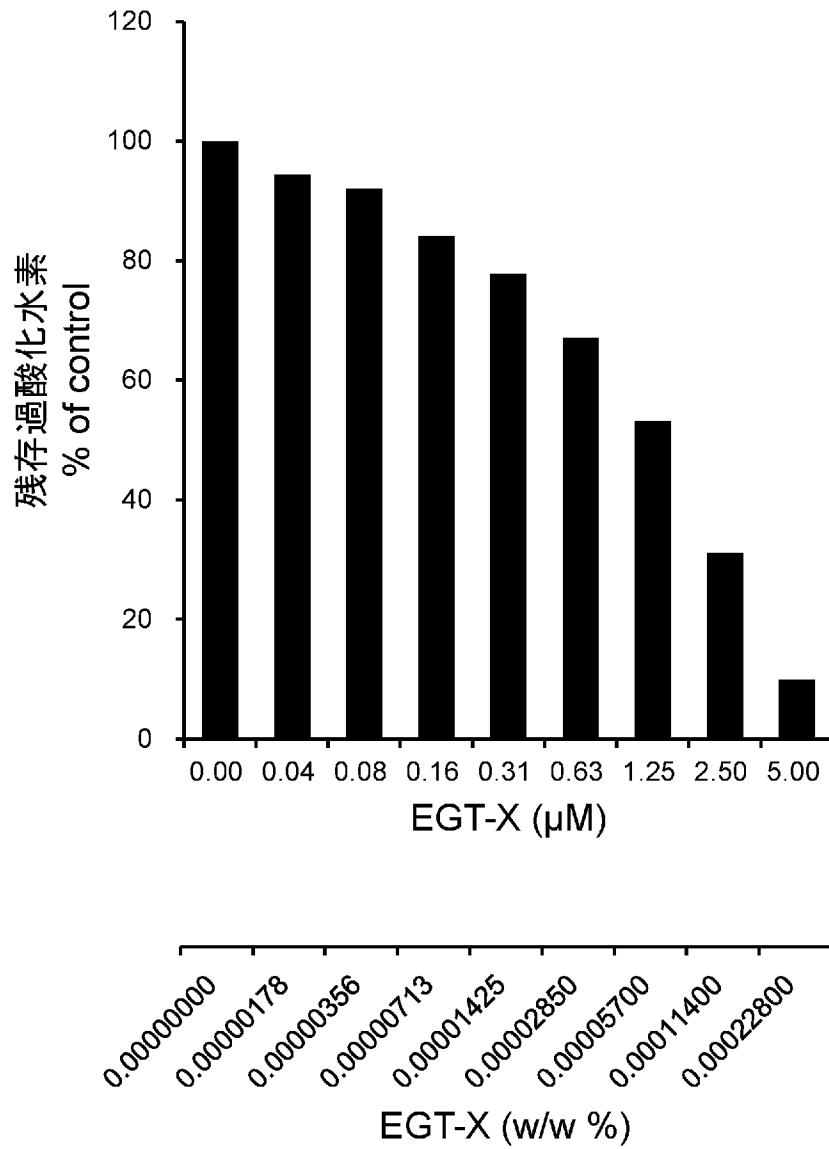


Running buf.: water, column: Waters microBondasphere, 0.5ml/min isocratic

[図2]



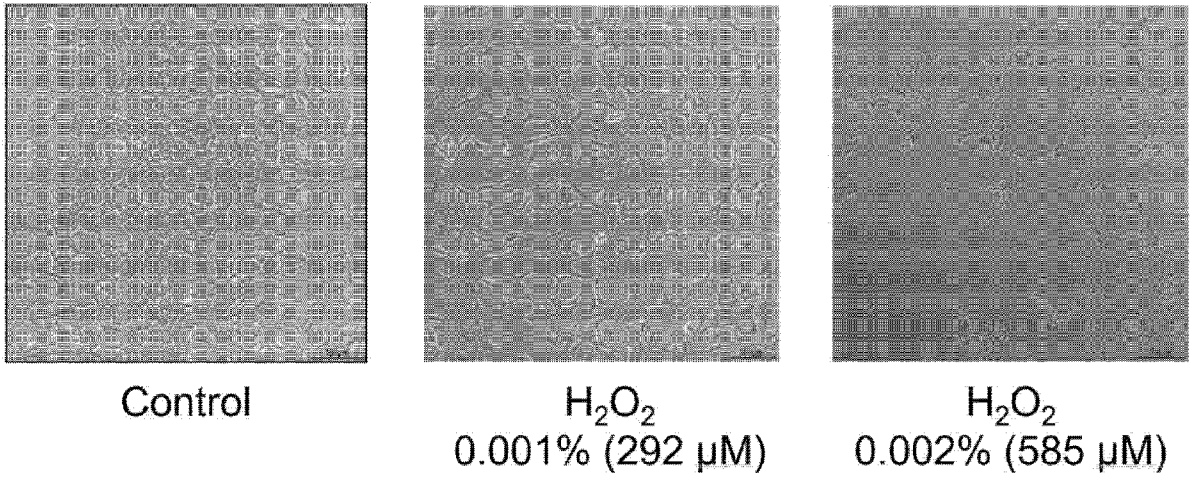
[図3]



[図4]

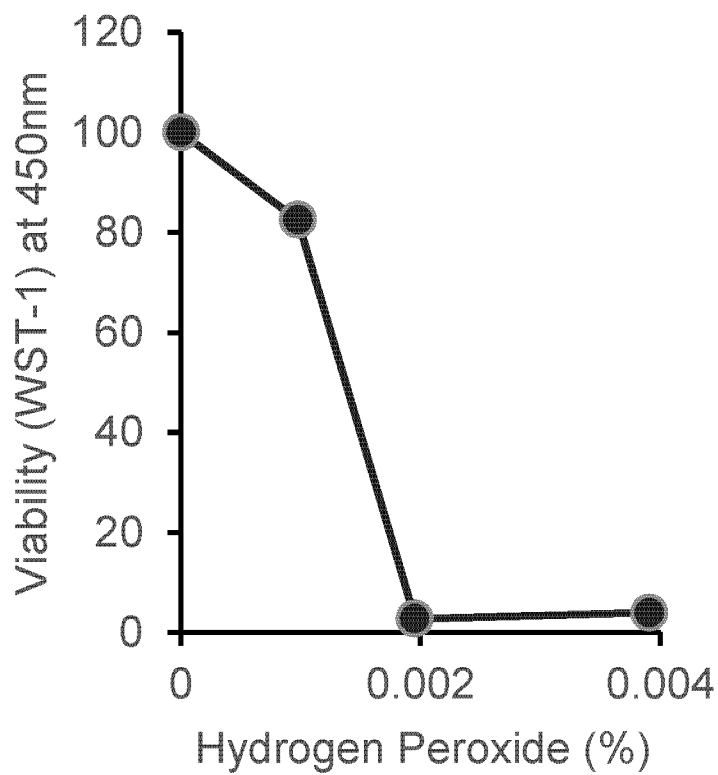
EGTX (w/w%)	EGTX (μM)	FI	% of control
0.00000000	0.000	1380	100.0
0.00000178	0.039	1302	94.3
0.00000356	0.078	1270	92.0
0.00000713	0.156	1161	84.1
0.00001425	0.313	1074	77.8
0.00002850	0.625	926	67.1
0.00005700	1.250	734	53.2
0.00011400	2.500	429	31.1
0.00022800	5.000	137	9.9

[図5]



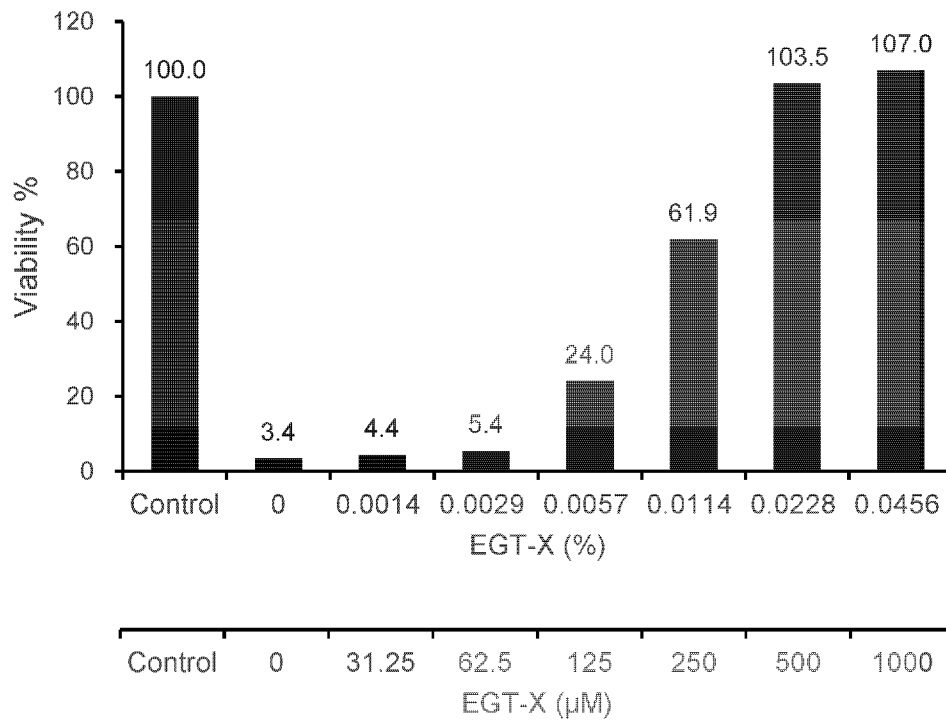
[図6]

Cytotoxicity of Hydrogen Peroxide on HEK293 Cells in 2.5%FBS-DMEM

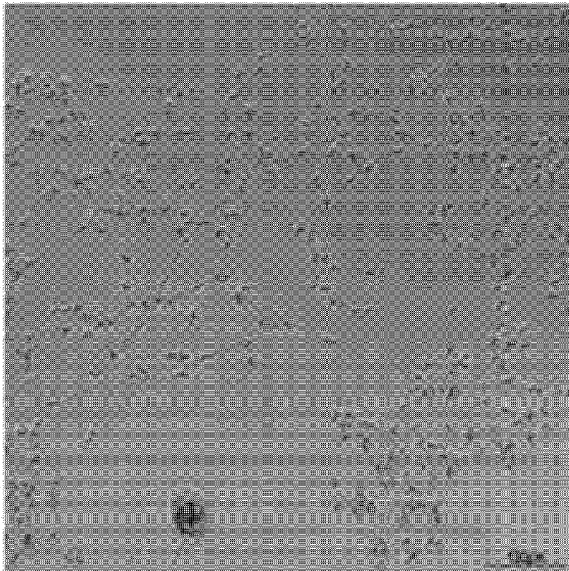
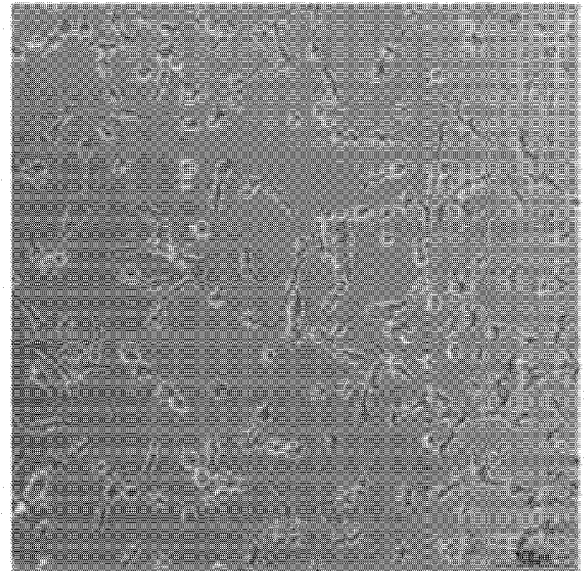
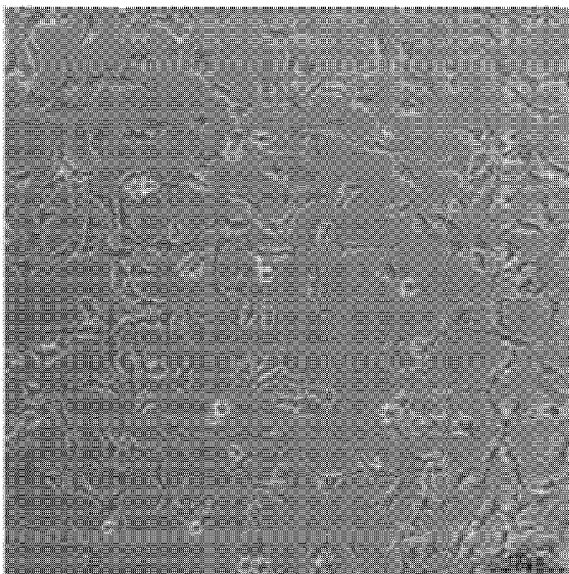


[7]

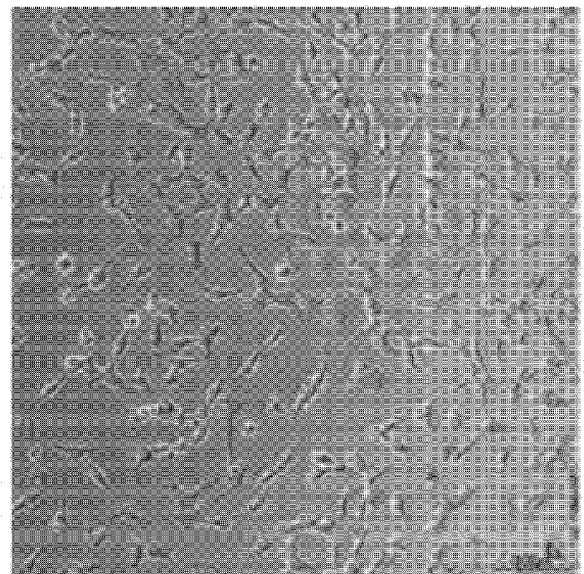
Inhibitory Effect of EGT-X on Cytotoxicity of Hydrogen Peroxide in HEK293 Cells



[図8]

EGT-X (0 μM)EGT-X (125 μM)

Control

EGT-X (500 μM)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/021265

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C07D 233/84</i> (2006.01)i; <i>A61K 31/4178</i> (2006.01)i; <i>A61P 43/00</i> (2006.01)i FI: C07D233/84; A61K31/4178; A61P43/00 111; C07D233/84 CSP		
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) C07D233/84; A61K31/4178; A61P43/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPUS/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	CN 109293572 A (SHANGHAI ACAD AGRIC SCIENCES) 01 February 2019 (2019-02-01) examples 1-3, paragraph [0033], fig. 1	2-5
X	CN 109091422 A (SHANGHAI INST TECH) 28 December 2018 (2018-12-28) examples 1, 5-7, physical property evaluation, (1) antioxidant ability test, fig. 1	2-5
X	JP 2007-300916 A (NUKINA, Manabu) 22 November 2007 (2007-11-22) claims, example 8	2
X	WO 2021/177397 A1 (NAGASE & CO., LTD.) 10 September 2021 (2021-09-10) examples	2
A	SERVILLO, L. et al., An uncommon redox behavior sheds light on the cellular antioxidant properties of ergothioneine, <i>Free Radical Biology & Medicine</i> , 2015, 79, pp. 228-236, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.017 entire text, particularly, fig. 1	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 August 2024		Date of mailing of the international search report 20 August 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/JP2024/021265

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 109293572 A	01 February 2019	(Family: none)	
CN 109091422 A	28 December 2018	(Family: none)	
JP 2007-300916 A	22 November 2007	JP 2008-110988 A	
WO 2021/177397 A1	10 September 2021	US 2023/0126387 A1	
		examples	
		JP 2021-138640 A	
		JP 6864131 B1	
		EP 4115881 A1	
		CN 115209895 A	
		KR 10-2022-0149718 A	
		BR 112022017415 A	
		CA 3170408 A	
		TW 202146013 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07D 233/84(2006.01)i; A61K 31/4178(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i FI: C07D233/84; A61K31/4178; A61P43/00 111; C07D233/84 CSP		
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）） C07D233/84; A61K31/4178; A61P43/00 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 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024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） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/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 請求項の番号
X	CN 109293572 A (SHANGHAI ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 01.02.2019 (2019 - 02 - 01) 実施例 1 - 3、段落[0033]、図 1	2-5
X	CN 109091422 A (SHANGHAI INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 28.12.2018 (2018 - 12 - 28) 実施例 1, 5 - 7、物性評価、(1)抗酸化能力テスト、図 1	2-5
X	JP 2007-300916 A (貫名 学) 22.11.2007 (2007 - 11 - 22) 特許請求の範囲、実施例 8	2
X	WO 2021/177397 A1 (長瀬産業株式会社) 10.09.2021 (2021 - 09 - 10) 実施例	2
A	SERVILLO, L. et al., An uncommon redox behavior sheds light on the cellular antioxidant properties of ergothioneine, Free Radical Biology & Medicine, 2015, 79, pp. 228-236, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.017 全文、特に、図 1	1-6
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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抵触するものではなく、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	07.08.2024	国際調査報告の発送日 20.08.2024
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	権限のある職員（特許庁審査官） 早乙女 智美 4P 3759 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/021265

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
CN 109293572 A	01.02.2019	(ファミリーなし)	
CN 109091422 A	28.12.2018	(ファミリーなし)	
JP 2007-300916 A	22.11.2007	JP 2008-110988 A	
WO 2021/177397 A1	10.09.2021	US 2023/0126387 A1	
		実施例	
		JP 2021-138640 A	
		JP 6864131 B1	
		EP 4115881 A1	
		CN 115209895 A	
		KR 10-2022-0149718 A	
		BR 112022017415 A	
		CA 3170408 A	
		TW 202146013 A	